Physiology and Pharmacology, 12 (3), 180 - 187
Fall 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Dehydroepiandrosterone increases the proliferation of neural progenitor cells derived from p19 embryonal carcinoma stem cells

Hossein Azizi [1], Narges Zare Mehrjerdy [1], Saeed Kasemi Ashtiani [1], MirzaKhalil Bahmani [2], Hossein Baharvand [1,3*]

1. Stem cell Dept., Royan Institute, P.O.Box:19395-4644, Tehran, Iran
2. HIV & Hepatitis Research Center, Shiraz University of Medical science, Shiraz ,Iran
3. Dept. Developmental Biology University of science and culture, Tehran , Iran

Received: 29 Sep 2007 Revised: 13 Jul 2008 Accepted: 20 Aug 2008

Abstract

Introduction: The p19 line of embryonal carcinoma cells develop into neurons, astroglia and fibroblasts after aggregation and exposure to retinoic acid (RA). Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neurosteroid, which can increase the proliferation of human neural stem cells (NSC) and positively regulate the number of neurons produced. This study was initiated to assess the effect of DHEA on neural progenitor cells derived from p19 embryonal carcinoma stem cells.

Methods: p19 cells were suspended in DMEM containing 5% FBS in bacterial-grade Petri dishes in the presence of RA and DHEA at different concentrations for 6 days. Serum concentration was decreased to 3% on days 5 and 6. The aggregates were then collected and processed for flow cytometry, immunocytochemistry and RT-PCR analyses. Cells were trypsinized for dispersion and were placed in to poly-L-lysine (10 µg/ml) coated tissue culture dishes without RA and DHEA for 4 days. Differentiated cells were then evaluated by phase contrast microscopy.

Results: Flow cytometry analyses of Nestin and Brdu/Nestin showed percent Nestin positive and proliferating Nestin positive cells in different groups including DHEA and RA groups. Brdu/Nestin immunochemistry confirmed proliferation of Nestin positive cells and also RT-PCR analysis showed the expression of proneural markers and estrogen receptor genes. Result showed that RA + DHEA (1µM) significantly increased the number of Nestin positive and newly formed Nestin positive cells compared to other groups.

Conclusion: These results showed that DHEA accompanied by RA significantly increased the number of Nestin positive and newly formed Nestin positive cells derived from p19 embryonal carcinoma cells but in comparison to RA could not induce neural progenitor cells.

Keywords: DHEA, RA, neuron, differentiation, p19 embryonal carcinoma stem cells

* Corresponding author e- mail:baharvand@royanInstitute.org
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۳)، ۱۸۰ – ۱۸۷
پاییز ۱۳۸۷

افزایش تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی حاصل از سلول‌های بنیادی کارسینومایی رویانی با استفاده از دهیدرواپی اندرواسترون

حسین عزیزی[۱]، نرگس زارع مهرجردی[۱]، سعید کاظمی آشتیانی[۱]،
میرزا خلیل بهمنی[۲]، حسین بهاروند [۱و۳*]
۱. گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشکده رویان، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات هپاتیت و HIV ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. گروه زیست شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

دریافت: ۸ مهر ۸۶ بازبینی: ۲۳ تیر ۸۷ پذیرش: ۳۰ مرداد ۸۷

چکیده

مقدمه: سلول p19 بعنوان یک سلول بنیادی سرطانی جنینی، بعد از کشت بصورت توده‌ای و مجاورت با اسید رتینوئیک به سلول‌های عصبی،آستروسیتی وفیبروبلاستی تمایز می یابد. دهیدرواپی اندرو استرون، یکی از انواع نورواستروديد است که تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی و تمایز این سلول‌ها را افزایش می‌دهد. در این مطالعه اثر فاکتورهای دهیدرواپی اندرواسترون (DHEA) و اسید رتینوئیک (RA) به تنهایی و اثر اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون بر القای تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای رویانیP19 به سلول‌های پیش سازعصبی بررسی خواهد شد.

روش‌ها: سلول‌های P19 همزمان با تشکیل اجسام شبه رویانی (Embryoid Bodies) ،به مدت ۶ روز تحت تیمار های اسید رتینوئیک (RA) و دهیدرواپی اندرواسترون (DHEA) با غلظت های مختلف قرار گرفت. محیط این سلول‌ها در چهار روز اول حاوی DMEM با ۵ درصد سرم جنین گاوی بوده به طوری که مقدار سرم در دو روز آخر به ۳ درصد کاهش یافت. به منظور ارزیابی سلول‌های پیش ساز عصبی از آزمون‌های فلوسایتومتری، RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. سپس سلول‌های اجسام شبه رویانی از هم جدا شده و در محیط عصبی قرار گرفته و بعد از ۴ روز مورفولوژی سلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: مطالعات فلوسایتومتری علیه آنتی بادی Nestin و Brdu/Nestin به ترتیب درصد سلول‌های پیش ساز عصبی ودرصد تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی درگروه‌های مختلف اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی و اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون بررسی شده وآزمایش ایمونوسیتوشیمی Brdu/Nestin هم تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی را نشان داد. علاوه بر این آزمایش RT-PCR بیان ژن های Mash1, Nestin , pax-6 و ER (پاسخ دهنده استروژن) را تایید کرد. یافته‌ها نشان داد، گروه تحت تیمار اسید رتینوئیک + (1μM) دهیدرواپی اندرواسترون افزایش معنی داری در درصد سلول‌های پیش ساز عصبی و درصد تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که دهیدرواپی اندرواسترون به همراه اسید رتینوئیک سبب افزایش سلول‌های پیش ساز عصبیو افزایش تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی در سلول‌های پیش ساز عصبی مشتق شده از سلول P19 شده، اما در مقایسه با اسید رتینوئیک، به تنهایی نمی‌تواند سبب القای سلول‌های پیش ساز عصبی شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های کارسینومایی رویانی P19، تمایز، عصب، دهیدرواپی اندرواسترون، اسید رتینوئیک

مقدمه

سلول کارسینومایی رویانی به عنوان یک سلول پرتوان مدل‌های سلولی مناسبی برای بررسی وقایع تمایزی سلول های غیر اختصاصی به انواع سلول های اختصاصی است [۵، ۳۱]. سلول های کارسنیومایی رویانی را می توان از تراتوکارسینوماها جدا کرده و باکشت های مکرر در محیط آزمایشگاهی به حالت غیر تمایز یافته نگه داشت [۲۳]. سلول‌های کارسینومایی رویانی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: baharvand@royanInstitute.org
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

می‌تواند به انواعی از سلول‌ها مانند اپیتلیال‌ها، عصب‌ها، ماهیچه‌ها و غضروف‌ها تمایز یابد[۲۰]. این سلول‌ها را می توان با برخی از شیوه‌ها مانند کشت با حالت توده ای (aggregation) و همچنین تیمار با مواد القاگر فاکتورهای رشد مختلف به انواعی از سلول های رویانی و خارج رویانی تمایز داد. [۷و۶]. کشت سلول های با حالت توده ای P19 و درمحیط های کشت معمولی بسیاری از سلول‌ها حالت بنیادی را حفظ کرده وتنها بخش کوچکی از سلول‌ها به سلول های شبیه اندودرم خارج رویانی تمایز می یابند[۹]. به عنوان مثال اگر توده‌های سلولی P19 در معرض غلظت بالای (۵×۱۰^{-۷}M) اسید رتینوئیک قرار بگیرند به عصب‌ها، گلیال و فیبروبلاست‌ها تمایز می یابند از طرفی دیگر،اگر این توده‌ها در معرض غلظت‌های غیر سمی دی متیل سولفوکساید (DMSO) قرار بگیرد به تعداد زیادی از سلول های ماهیچه ای قلبی و اسکلتی تمایز می یابند اما به عصب‌ها و سلول های گلیکال تمایز نمی‌یابند [۷]. درگذشته محققان اثر اسید رتینوئیک(RA) به تنهایی یا درترکیب با دیگر داروها را برروی انواع دیگر سلول‌های کارسینومایی رویانی مانند F9 بررسی کردند و نشان دادند که این سلول‌ها می توانند بافتهای اندودرمی خارج رویانی مختلفی راشکل دهند [۱۸و۴]. چندین پروتوکل برای تمایز سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادی وجود دارد که از اسید رتینوئیک [۱] ، اسید آسکوربیک [۱۱ و۲] ، BMP-2 [۲۹] و پروتئین‌های shh [14] استفاده می شود.مشخص شده که استروییدها تمایز سلول‌های عصبی را افزایش می دهد [۱۵]. دهیدرواپی اندرواسترون یک نورواستروئید است که در مغز، آدرنال و غده های جنسی (gonads) ساخته می‌شود [۱۶و۲۷] . دهیدرواپی اندرواسترون می تواند عصب های ناحیه هیپوکامپ را نسبت به اثرات نوروتوکسیک کورتیکواسترون و آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کرده و اثرات گلوکوکورتیکوئیدها (GC) را کاهش دهد [۱۰]. دهیدرواپی اندرواسترون در سلول های پیش ساز عصبی با فعال کردن مسیر سیگنالی AKT مرگ سلولی را کاهش داده [30] وتکثیر این نوع از سلول‌ها را افزایش می‌دهد [۲۶]. اخیراً مشخص شد که دهید رواپی اندرواسترون بیان مارکر سلول عصبی NeuN (neuronal specific nuclear protein) و Map-2 (Microtubule associated protein 2) را در سلول‌های هیپوکامپ موش بالغ افزایش می‌دهد[۸ ،۱۰]. امروزه یکی از روش‌ها رایج در درمان بیماری های عصبی استفاده از سلول های پیش ساز عصبی است. افزایش سلول‌های پیش ساز عصبی احتمال موفقیت در پیوند بیماری های عصبی را افزایش می دهد بنابراین پروتوکلی که سلول های پیش ساز عصبی را افزایش دهد، مفید خواهد بود. تا کنون تاثیری از دهیدرواپی اندرواسترون بر روی سلول های بنیادی با منشا جنینی گزارش نشده است. لذا ما در اینجا به بررسی اثر اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی و اثر اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون بر روند افزایش تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومایی رویانیP19 به سلول های پیش ساز عصبی خواهیم پرداخت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سلول های کارسینومایی رویانی رده P19 (تهران، موسسه پاستور) استفاده شد. این سلول‌ها درمحیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۵ درصد FBS و پنی سیلین- استرپتومایسین (100U/ml) کشت داده شده اند.

نحوه تمایز سلول های بنیادی P19 به سلول های عصبی بر اساس تشکیل اجسام شبه رویانی انجام شد بدین ترتیب که سلول‌ها با غلظت۵×۱۰^{۵} .۱سلول بر میلی لیتر، به مدت ۶ روز به صورت سوسپانسیون در ظروف کشت مخصوص کشت داده شد. محیط سلول‌ها در روزهای ۴-۱ حاوی DMEM با ۵ درصد سرم جنین گاوی بوده و مقدار آن در روزهای ۶-۵ به ۳ درصد کاهش یافت. در این مدت زمان سلول‌ها در گروه های مختلف با اسید رتینوئیک (Fluka 30770) و دهیدرواپی اندرواسترون (Sigma S964778) به تنهایی و اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون با هم تیمار شده‌اند گروه‌ها به ترتیب شامل:

الف) گروه کنترل: گروهی که تحت تیمار های اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون قرار نگرفت.

ب) گروهی که تنها با دهیدرواپی اندرواسترون در غلظت‌های متفاوت (0.1,1,10μM) تیمار شد.

ج) گروهی که با اسید رتینوئیک در غلظت ۴μM تیمار شد.

د) گروهی که با اسید رتینوئیک وغلظت های متفاوت DHEA (0.1, 1, 10μM) با هم تیمار شد.

سپس سلول‌های اجسام شبه رویانی با ترکیب تریپسین-EDTA از هم جدا شده و روی بستر پوشیده شده از پلی L-لیزین(10μg/ml) حاوی محیط کشت عصبی (Neurobasal medium) قرارگرفته و بعد از ۴ روز مورفولوژی سلول‌ها بررسی شده است.

به منظور ارزیابی سلول های نستین مثبت و تکثیر این نوع از سلول‌ها در گروه های مختلف وهمچنین میزان بیان Oct-3/4 (RD MAB1759) در مرحله پیش ساز عصبی (روز۶ تمایز) وحالت غیر تمایز یافته از آزمایش فلوسایتومتری استفاده شد.مراحل فلوسایتومتری برای آنتی ژن اختصاصی سلول های پیش ساز عصبی نستین به شرح زیر بود: تعداد سلول‌های انتخاب شده حدود 10^6 و در تمام مراحل دما۴ درجه و شستشو با محلول PBS حاوی سرم جنین گاوی یک درصد و EDTA 0.058 درصد انجام شد. بدین نحو که بعد از اضافه کردن محلول شستشو، سلول‌ها با دور 2000rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت محلول رویی حذف شد. ابتدا سلول های مورد نظر از همدیگر جدا شده و با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس سلول‌ها شستشو داده شده و با تریتون 100- X یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه نفوذپذیر شد و بعد از شستشو سلول‌ها با سرم بزی ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. به سلول‌ها آنتی بادی اولیه نستین (Chemicon MAB353) با غلظت1/20 اضافه شده و بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری وشستشو، آنتی بادی ثانویه (Goat anti-mouse IgG FITC) (Chemicon, AP308F) اضافه کرده وبه مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس سلول‌ها شستشو داده شده و بعد از تثبیت با پارافرمالدئید یک درصد توسط دستگاه فلوسایتومتری مدلBectin Dekenson و نرم افزار Win MDI 2.8 خوانده شد. برای بررسی تکثیر سلول‌های نستین مثبت در روزهای ۶-۵ سلول‌ها در معرض ۵- برومو-۲-داکسی یوریدین(Brdurd) با غلظت 1μM (Roche 1296736) قرار گرفتند و سپس مراحل آماده سازی سلول‌های Brdu/Nestin انجام شد. بدین نحو که ابتدا مراحل آماده سازی سلول‌ها برای ۵- برومو-۲-داکسی یوریدن طبق روش ذکر شده در مرحله پیش ساز عصبی انجام شده و بعد از شستشو، سلول‌ها با سرم بزی ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. به سلول‌ها آنتی بادی اولیه نستین با غلظت1/20 اضافه کرده و بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری وشستشو، آنتی بادی ثانویه Rphycoerythin (Sigma p9670) با غلظت 1/50 اضافه شده وبه مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس سلول‌ها شسته شده و بعد از تثبیت با پارافرمالدئید یک درصد توسط دستگاه فلوسایتومتری خوانده شد.

مراحل ایمونوسیتوشیمی برای آنتی ژن های اختصاصی سلول‌های عصبی B-tubulin (Sigma T5293)، MAP-2(Sigma M1406)، Tau (RD MAB 361) به شرح زیر انجام شد: سلول‌ها با محلول پارافورما الدئید4٪ به مدت 10دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد در یخچال تثبیت (Fixed) شده وبا محلول100 % Triton x-0.2 تهیه شده درPBS به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شده و سپس با آنتی بادی اولیه رقیق شده و به مدت60 دقیقه در دمای37درجه سانتیگراد یا یک شبانه روز در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. همچنین به منظور تایید تکثیر سلول های نستین مثبت از ایمونوسیتوشیمی Brdu/Nestin استفاده شد.برای آماده سازی Brdu/Nestin ابتدا مراحل ایمونوسیتوشیمی آماده سازی سلول‌ها برای ۵- برومو-۲-داکسی یوریدن انجام شده و بعد از شستشو، سلول‌ها با سرم بزی ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. به سلول هاآنتی بادی اولیه نستین با غلظت1/50 اضافه شده و بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری وشستشو، آنتی بادی ثانویه Rphycoerythin با غلظت 1/200 بر علیه نستین اضافه شده و یک شب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

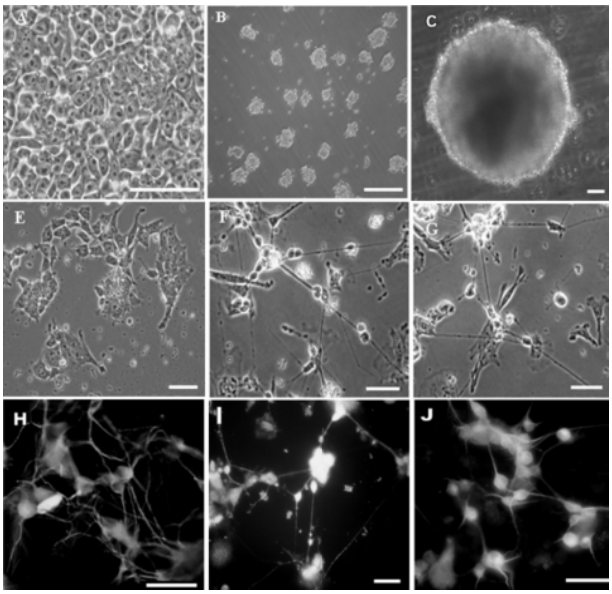
به منظور ارزیابی بیان ژن های پیش ساز عصبی Nestin,Mash-1,pax-6 و ER (Estrogen Receptor) در حالت غیر تمایز یافته و همچنین روز ۶ تمایز از تستRT-PCR استفاده شده است.برای این منظور حدود 10^6 سلول، RNA سلول های مد نظر با استفاده از محلول RNX-plus solution و مطابق با پروتوکل این شرکت جداسازی شد.در ادامه با استفاده از محلولDnase I به همراه $MgCl_2$ وReaction buffer DNA احتمالی همراه با RNA استخراج شده حذف گردید. سپس فعالیت Dnase I با افزودن ۲۵ میلی گرم EDTA متوقف شد.ساخت CDNA در واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت Revert acid H minus انجام شد.در ادامه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ژن های پیش سازهای عصبی انجام شد (جدول ۱). شرایط PCR به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳ درجه سانتیگراد) ۳) Annealing: با توجه به Tm پرایمرهای

جدول ۱- پرایمرهای ژن‌های پیش سازهای عصبی و پاسخ دهنده استروژن

Genes	Primer sequences (5/-3/)	Size (bp)	Annealing Tempreture(ºC)
Nestin	F: 5`-TCGAGCAGGAAGTGGTAGG-3` R: 5`-TTGGGACCAGGGACTGTTA-3`	352	53
Pax-6	F: 5`-GAGAGGACCCATTATCCAGATG -3` R: 5`-GCTGACTGTTCATGTGTG TTTG -3`	466	63
Mash-1	F: 5`-GCCAACAAGAAGATG AGCAAGG -3` R:5`-TCAGAACCAGTTGGTAAAGTC CAG-3`	264	65
ESR	F: 5`-GATCAACTGGGCAAAGAGAG-3` R: 5`-GAGACTTCAAGGTGCTGGAC -3`	317	63
β-tubulin	F: 5`-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3` R: 5`-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3`	335	67

هر ژن که در جدول ذکر شده است. ۴) Extention هـر سـیکل: ۴۵ ثانیه Extention محصولات PCR روی آگارز۱.۷ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل روٴیت شد.

مطالعـه حاضـر بـه صـورت Parallel experimental Design طراحی شد که در آن گروه های مختلف سـلول هـای کارسینومایی رویانیp19 به صورت دو به دو بررسی شد. در ایـن مطالعه از تست ANOVA بـرای بررسـی P-value بـین همـه گروه‌ها و از آزمون Tukey برای بررسی اختلاف میانگین هـای دو گروه استفاده شد.



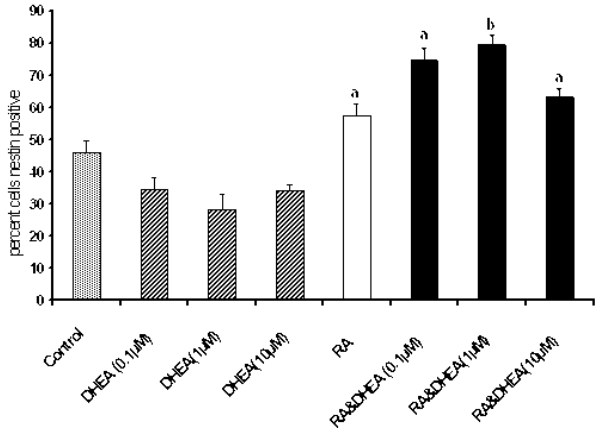
شکل ۱- مورفولوژی سلول‌هـایP19 در حالـت‌هـای مختلـف را نشـان مـی‌دهـد. A) سلول P19 در حالت غیر تمایز یافته B) توده‌های اجسام شـبه رویـانی در روز سومC) توده های اجسام شبه رویانی در روزششم، همچنین بعد از چهـار روز پلیـت شـدن: در گـروه‌هـای دهیـدرواپی اندرواسـترون (E) ، اسـید رتینوئیـک (F) ، اسـید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون (G) و تصویر ایمونوسیتوشیمی Tuj1 (H) ، (I)Tau-1، (J)MAP-2 . مقیاس :50µm

یافته‌ها

سلول هـای P19 در محـیط ۱۵ درصـد سـرم و در محـیط DMEM معمولا" طی یک یا دوروز ۷۰ الـی ۸۰ درصـد بسـتر فلاسک را پر می کنند. (شکل*A* ۱). این سلول‌ها در ظـرف‌هـای غیر چسبنده قادر هستند توده هایی را شکل دهند کـه بـه مـرور زمان تکثیر یافته و اجسام شـبه رویـانی را شـکل دهنـد (شـکل B,C ۱).زمانی کـه تـوده هـای سـلولی p19 در معـرض اسـید رتینویک قرار بگیرد، بعـد از شـش روز پلیـت شـدن، سـلول‌هـا مورفولوژی سلول های عصبی را نشان مـی دهنـد کـه از مهـم ترین این شاخص‌ها می توان به وجود اکسون‌هـا و دنـدریت‌هـا اشـاره کـرد(شـکل F,G۱) بـه طـوری کـه رنـگ آمیـزی ایمونوسیتوشیمی هم این موضوع را تایید می کند (شـکل H,I,J ۱) اما این حالت در گروه تحت تیمار بادهیدرواپی اندرواسترون و گروه کنترل مشاهده نشد(شکل E۱).

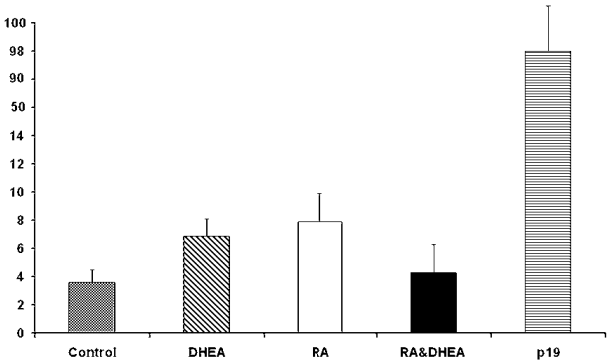
نتایج فلوسایتومتری حاصل اثر القای دهیدرواپی اندرواسترون و اسید رتینوئیک به تنهایی و اثر اسـید رتینوئیـک + دهیـدرواپی اندرواسترون بر میزان بیان نستین نشان داد که گروه های اسـید رتینوئیک تنها و اسید رتینوئیـک + دهیـدرواپی اندرواسـترون در غلظت‌های مختلف

افـزایش معنـی داری($p<0.05$) بـا گـروه هـای کنتـرل و دهیدرواپی اندرواسترون دارد. علاوه بر این گروهی کـه بـا اسـید رتینوئیک+ دهیدرواپی اندرواسترون (1µM)تیمار شد، بیان ژن نستین حتی افـزایش معنـی داری ($p<0.05$) را بـا گـروه اسـید رتینوئیک نشان داد. این نتایج نشان مـی دهـد کـه دهیـدرواپی اندرواسترون برخلاف اسید رتینوئیـک نمـی توانـد سـبب القـای سلول های پیش ساز عصبی شود اما به همراه اسـید رتینوئیـک

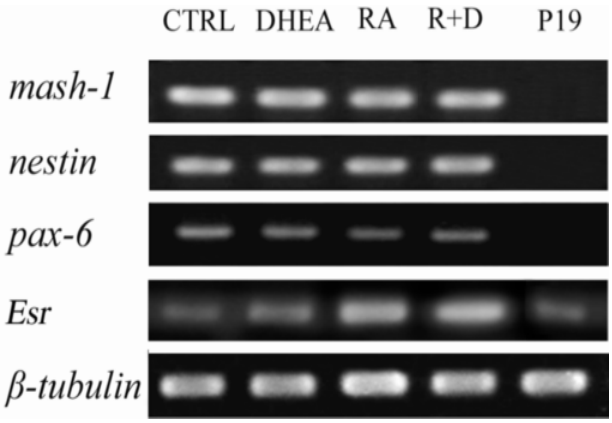


شکل۲- نتایج فلوسایتومتری بیان ژن نستین در سلول‌های تحت تیمار و همچنین گروه کنترل نشان داد گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون (1μM) افزایش معنی داری ($p<0.05$) را با گروه اسید رتینوئیک دارد. a اختلاف معنی داری ($p<0.05$) با گروه های کنترل و دهیدروپی اندرواسترون .b اختلاف معنی داری ($p<0.05$) با گروه اسید رتینوئیک.

جمعیت سلول‌های پیش ساز عصبی را افزایش می‌دهد (شکل۲). سلول *P19* در حالت غیر تمایز یافته ژن oct-4 را به مقدار زیادی بیان می کنند اما در سلول های تمایز یافته بیان این ژن مهار می‌شود. ما در آزمایشات خود با تست فلوسایتومتری نشان دادیم که سلول‌های غیر تمایز یافته P19 حدود ۹۸ درصد ژن oct-4 را بیان کرد، اما کشت سلول های p19 به مدت ۶روز در حالت توده ای و کاهش سرم، بیان ژن oct-4 را به کمتر از ۱۰درصد کاهش می دهد. آنالیز RT- PCR بیان ژن های پیش ساز عصبی Mash-1, Pax-6 و Nestin را درگروه های اسید رتینوئیک، دهیدروپی اندرواسترون، اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون وکنترل نشان می‌دهد اما این ژن‌ها در سلول‌های p19 تمایز نیافته بیان نمی‌شود (شکل۳).



شکل۳- نتایج فلوسایتومتری بیان ژن Oct-۴ نشان داد که سلول‌های غیر تمایز یافته حدود ۹۸ درصد ژن Oct-4 را بیان کرده اما کشت سلول‌های p19 به مدت ۶ روز در حالت توده‌ای و کاهش سرم، بیان ژن Oct-4 را به کمتر از ۱۰درصد کاهش داد.

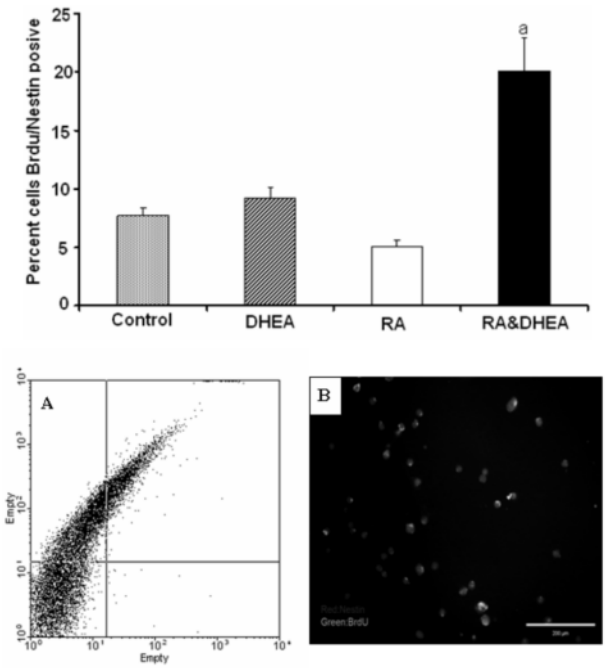


شکل۴- آنالیز RT- PCR بیان ژن‌های پیش ساز عصبی Pax-6 Mash-1و Nestin و پاسخ دهنده استروژن را در طی تمایز سلول‌های عصبی درگروه‌های کنترل، اسید رتینوئیک، دهیدروپی اندرواسترون،اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون و سلول‌های تمایز نیافته p19 را نشان می‌دهد.

نتایج فلوسایتومتری حاصل اثر القای دهیدروپی اندرواسترون و اسید رتینوئیک به تنهایی و اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون بر میزان تکثیر سلول‌های نستین مثبت نشان داد، گروه تیمار شده با اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون (1μM) افزایش معنی داری($p<0.001$) را با سایر گروه‌ها نشان می دهد اما در بین گروه های کنترل، اسید رتینوئیک، دهیدروپی اندرواسترون تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بنابراین یکی از دلایل افزایش سلول های نستین مثبت در گروه اسید رتینوئیک + دهیدروپی اندرواسترون (1μM) تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی بوده است (شکل ۵).

بحث

توده‌های سلولی P19 که در معرض غلظت بالای اسید رتینوئیک قرار گیرند به سلول‌های عصبی و آستروسیتی متمایز می‌شوند[۴]. بررسی های انجام شده در طی تیمار با اسید رتینوئیک و دهیدروپی اندرواسترون نشان داد در گروه هایی که با دهیدروپی اندرواسترون به تنهایی تیمار شده‌اند هیچ افزایشی در بیان ژن نستین نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. نتیجه نشان می‌دهد که دهیدروپی اندرواسترون نمی‌تواند سبب القا سلول‌های پیش ساز عصبی شود اما در گروه‌های تحت تیمار با اسید رتینوئیک افزایش معنی داری در بیان ژن نستین نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود که نشان می‌دهد اسید رتینوئیک



شکل ۵ – نتایج فلوسایتومتری تکثیر سلول‌های نستین مثبت نشان داد گروه تیمار شده با اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون افزایش معنی‌داری ($p<0.001$) را با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. .a اختلاف معنی‌دار ($p<0.001$) با گروه‌های کنترل، اسید رتینوئیک، دهیدرواپی اندرواسترون. تصویر A) نمودار دات پلات در گروه اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون B) تصویرایمونوسیتوشیمی Nestin\Brdu بعد از ۶ روز تیمار در گروه اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون را نشان می دهد.

برخلاف دهیدرواپی اندرواسترون سبب القا سلول‌های پیش ساز عصبی می‌شود. همچنین در بین گروه هایی که با اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون با هم تیمار شده اند، در گروه اسید رتینوئیک+دهیدرواپی اندرواسترون (1μM) بیان ژن نستین حتی نسبت به گروه RA هم افزایش معنی داری را نشان داده است. که نشان می‌دهد گرچه دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی نمی‌تواند سبب القا سلول های پیش ساز عصبی شود اما بهمراه اسید رتینوئیک سبب افزایش سلول‌های پیش ساز عصبی حتی نسبت به گروه اسید رتینوئیک شود.

نتایجRT-PCR بیان ژن‌های پیش ساز عصبی Pax-6، Mash-1 وNestin را در تمام گروه‌ها نشان داده است.گرچه در گروه های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی بیان این ژن‌ها در سطح mRNA تایید شده اما این گروه‌ها از نظر کمی در بیان پروتئین نستین کاهش معنی داری نسبت به گروه‌های تیمار شده با اسید رتینوئیک نشان داده‌اند .علاوه براین در گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون سلول‌ها چهار روز بعد از پلیت شدن هیچ مورفولوژی سلول های عصبی را نشان نداده اند.امادرگروه های تحت تیمار با اسید رتینوئیک مورفولوژی سلول های عصبی کاملا مشخص می باشد که نشان می دهد دهیدرواپی اندرواسترون برخلاف اسید رتینوئیک نمی تواند سبب القا سلول های پیش ساز عصبی شود. رنگ آمیزی همزمان Brdu و نستین نشان داد در گروهی که با اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون همزمان تیمار شده بود در تعداد سلول های Brdu/Nestin مثبت نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش معنی داری مشاهده شده است.این نتیجه نشان می دهد تکثیر سلول های نستین مثبت در این گروه بیشتر از سایر گروه‌ها است،بنابر این افزایش سلول های نستین مثبت در گروه اسید رتینوئیک +دهیدرواپی اندرواسترون نسبت به سایر گروه‌ها بعلت تکثیر سلول های نستین مثبت می باشد. به طوری که اسید رتینوئیک سبب القا سلول های پیش ساز عصبی شده و دهیدرواپی اندرواسترون با تکثیر سلول های نستین مثبت سبب افزایش این سلول‌ها شده است. علی رغم اینکه یک پاسخ دهنده خاص برای دهیدرواپی اندرواسترون گزارش نشده اما برخی از محققان یک رابطه مستقیمی بین دهیدرواپی اندرواسترون و پاسخ دهنده استروژن (ER) گزارش کردند. مشخص شده ۱۷ بتا استرادیول با فعال کردن پاسخ دهنده استروژن در سلول های پیش ساز عصبی سبب تکثیر و تمایز سلولی می شود [۳]. در شرایط آزمایشگاه دهیدرواپی اندرواسترون اتصالات ضعیفی با پاسخ دهنده استروژن انسانی نوترکیب شده برقرار می کند [۱۲]. دهیدرواپی اندرواسترون پاسخ دهنده های استروژن انسانی که در مخمر بیان شده را نسبت به E2 (۱۷- بتااستراديول) ۱۰۰ برابر فعال تر می کند [۱۹]. در سلول های MCF-7، دهیدرواپی اندرواسترون با تاثیر روی پاسخ دهنده های استروژنی تکثیر سلولی را تحریک می کند به طوری که این فعالیت با آنتاگونیست ICI182,780 مهار می شود [۲۴] .همان طوری که در شکل ۴ نشان داده شده است بیان پاسخ دهنده استروژن در سطح mRNA در گروه اسید رتینوئیک+ دهیدرواپی اندرواسترون مشاهده می شود. بنابراین احتمال دارد دهیدرواپی اندرواسترون در سلول های پیش ساز عصبی مشتق شده از سلول های P19 با فعال کردن پاسخ دهنده‌های استروژن سبب افزایش تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی در گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک و دهیدرواپی

اندرواسترون شده باشد.اگرچه بیان پاسخ دهنده استروژن در گروه های دیگر هم مشاهده می‌شود اما همان طوری که نشان داده شده در گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون سلول‌های پیش ساز عصبی تشکیل نمی شوند و در گروه اسید رتینوئیک سلول‌های پیش ساز عصبی در معرض دهیدرواپی اندرواسترون قرارنمی گیرند تا سبب فعال شدن پاسخ دهنده استروژن شود. دهیدرواپی اندرواسترون می تواند به آندروژن‌ها یا استروژن‌ها تبدیل شود [۱۴و۱۳]. استروژن هورمونی است که اثرات مختلفی در بافتهای مختلف مانند سیستم عصبی دارد [۱۷]. استروژن بر تکوین، بلوغ، بقا و فعالیت انواع مختلف سلول‌های عصبی تاثیر دارد [۲۱]. در طی فرایند القا سلول های P19 با اسید رتینوئیک سلول‌ها ممکن است دستخوش اپیتوز شده و غلظت قطعات DNA در داخل سیتوپلاسم افزایش یابد در سلول های P19 القا اپیتوز توسط اسید رتینوئیک ازطریق فعال شدن پروتئین BCL-2 مهار می شود در طی تمایز سلول‌های P19 با اسید رتینوئیک وتمایز سلول های عصبی فعالیت پروتئاز Caspase-3 افزایش می یابد [۲۵و۲۲]. بنابراین احتمال دارد در سلول های پیش ساز عصبی مشتق شده از سلول p19، دهیدرواپی اندرواسترون با فعال کردن مسیر سیگنالی Akt و فعال کردن پروتئین BCL-2 یا BCL-XL بقا سلول‌های پیش ساز عصبی را افزایش داده و این امر سبب افزایش سلول‌های پیش ساز عصبی شده باشد.در مجموع بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر و یافته های قبلی به نظر می رسد که دهیدرواپی اندرواسترون با افزایش تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی سبب افزایش سلول‌های پیش ساز عصبی مشتق شده از سلول P19 شده اما در مقایسه با اسید رتینوئیک، به تنهایی نمی‌تواند سبب القاء سلول‌های پیش ساز عصبی شود.

سپاسگزاری

با گرامیداشت یاد دانشمند فقید جناب آقای دکتر سعید کاظمی آشتیانی که این پروژه در ابتدا با راهنمایی ایشان آغاز شد، نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تشکر خود را از آقایان هاشمی، تقی آبادی، پویا و خانم‌هاحاتمی، کیانی، نعمتی، شاهسونی وحمصی اعلام نمایند.

منابع

[1] Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI: Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. ***Biochem Biophys Res Commun*** 223 (1996) 691-694.

[2] Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L: Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. ***Nat Biotechnol*** 21 (2003) 1200-1207.

[3] Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D: Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. ***Mol Cell Neurosci*** 21 (2002) 512-520.

[4] Chen Y, Du Z, Yao Z: Roles of the nanog protein in murine f9 embryonal carcinoma cells and their endoderm-differentiated counterparts. ***Cell Res*** 16 (2006) 641-650.

[5] Graham CF: Teratocarcinoma endoderm. ***Differentiation*** 13 (1979) 29-31.

[6] Heim KC, White KA, Deng D, Tomlinson CR, Moore JH, Freemantle SJ, Spinella MJ: Selective repression of retinoic acid target genes by rip140 during induced tumor cell differentiation of pluripotent human embryonal carcinoma cells. ***Mol Cancer*** 6 (2007) 57.

[7] Hogan BL, Taylor A, Adamson E: Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. ***Nature*** 291 (1981) 235-237.

[8] Iwata M, Muneoka KT, Shirayama Y, Yamamoto A, Kawahara R: A study of a dendritic marker, microtubule-associated protein 2 (map-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA). ***Neurosci Lett*** 386 (2005) 145-149.

[9] Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI: Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. ***J Cell Biol*** 94 (1982) 253-262.

[10] Karishma KK, Herbert J: Dehydroepiandrosterone (dhea) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. ***Eur J Neurosci*** 16 (2002) 445-453.

[11] Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-

Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of parkinson's disease. ***Nature*** 418 (2002) 50-56.

[12] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. ***Endocrinology*** 138 (1997) 863-870.

[13] Labrie F: Adrenal androgens and intracrinology. Semin Reprod Med 2004;22:299-309.

[14] Labrie F: Intracrinology. ***Mol Cell Endocrinol*** 78 (1991) C113-118.

[15] Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR: Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. ***J Neurosci*** 18 (1998) 7768-7778.

[16] Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G: Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by ppar activation. ***Life Sci*** 73(2003) 289-299.

[17] McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG: Ovarian steroids and the brain: Implications for cognition and aging. ***Neurology*** 48 (1997) S8-15.

[18] Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA: Biosynthesis and action of neurosteroids. ***Brain Res Brain Res Rev*** 37 (2001) 3-12.

[19] Nephew KP, Sheeler CQ, Dudley MD, Gordon S, Nayfield SG, Khan SA: Studies of dehydroepiandrosterone (dhea) with the human estrogen receptor in yeast. ***Mol Cell Endocrinol*** 143 (1998) 133-142.

[20] Nicolas JF, Dubois P, Jakob H, Gaillard J, Jacob F: [mouse teratocarcinoma: Differentiation in cultures of a multipotential primitive cell line (author's transl)]. ***Ann Microbiol (Paris)*** 126 (1975) 3-22.

[21] Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA: Mechanisms of estrogen action. ***Physiol Rev*** 81 (2001) 1535-1565.

[22] Okazawa H, Shimizu J, Kamei M, Imafuku I, Hamada H, Kanazawa I: Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. ***J Cell Biol*** 132 (1996) 955-968.

[23] Rosenthal MD, Wishnow RM, Sato GH: In vitro growth and differetiation of clonal populations of multipotential mouse clls derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. ***J Natl Cancer Inst*** 44 (1970) 1001-1014.

[24] Schmitt M, Klinga K, Schnarr B, Morfin R, Mayer D: Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in mcf-7 cells after conversion to estradiol. ***Mol Cell Endocrinol*** 173(2001) 1-13.

[25] Slack RS, Skerjanc IS, Lach B, Craig J, Jardine K, McBurney MW: Cells differentiating into neuroectoderm undergo apoptosis in the absence of functional retinoblastoma family proteins. ***J Cell Biol*** 129(1995) 779-788.

[26] Suzuki M, Wright LS, Marwah P, Lardy HA, Svendsen CN: Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (dhea) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 101 (2004) 3202-3207.

[27] Vallee M, Mayo W, Le Moal M: Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. ***Brain Res Rev*** 37 (2001)301-312.

[28] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM: Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. ***Cell*** 110 (2002) 385-397.

[29] Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF: Differential modulation of bmp signaling promotes the elaboration of cerebral cortical gabaergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 99 (2002) 16273-16278.

[30] Zhang L, Li B, Ma W, Barker JL, Chang YH, Zhao W, Rubinow DR: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the akt signaling pathway in opposing ways. ***Mol Brain Res*** 98 (2002) 58-66.

[31] Zhang L, Rayner S, Katoku-Kikyo N, Romanova L, Kikyo N: Successful co-immunoprecipitation of oct4 and nanog using cross-linking. ***Biochem Biophys Res Commun*** 361 (2007) 611-614.