

Induction of Human Embryonic Stem Cells into neuronal differentiation by increasing cyclic Adenosine Mono Phosphate

Baharvand H*, Hatami M and Massumi M

Department of Stem cells, Royan Institute, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: To evaluate the cAMP -mediated IBMX (3-IsoButyle -1-Methyl Xanthin) and db-cAMP (dibutyryl cAMP) effects on differentiation of human Embryonic Stem Cells (hESCs) into nerve cells were the objectives of this study.

Methods: We have used Royan H1 hESC- derived embryoid bodies with four treatment groups: six days treatment with IBMX ($5 \times 10^{-4}M$) and db-cAMP ($10^{-9}M$) (referred to as cAMP), retinoic acid (RA, $10^{-6}M$), IBMX + db-cAMP + RA, and control (no treatment). Immunocytochemistry was carried out for neural specific antibodies including β -Tubulin III, Microtubule Associated Protein 2 (MAP-2), Neurofilament Protein-Heavy chain (NF-H), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and Synaptophysin as well as morphological studies. Semi-quantitative RT-PCR was also used to evaluate gene expression involved in neurogenesis.

Results: In the 4+6+4 days the neuronal process were apparently observed. Immunocytochemical studies using nerve specific antibodies for proteins such as β - Tubulin III, MAP-2, NF-H, GFAP and Synaptophysin showed the presence of these neuronal and astrocyte markers in differentiated cells by cAMP. Evaluation of expression of genes involved in neurogenesis showed that Hash1, Synaptophysin, β -Adrenergic Receptor and Acetylcholine Receptor- which were silent in embryoid bodies - switched on after treatment with cAMP and/or RA. Relative expression of nerve specific genes showed a significant enhancement in expression of Synaptophysin, NFM and β -Adrenergic Receptor during differentiation, which, with the enhancement in cAMP treated groups were more than those treated with RA and control ($p < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, this study showed that cAMP could be a neurogenic agent for human embryonic stem cells differentiation.

Keywords: Embryonic stem cells, cAMP, Neurogenesis.

* Corresponding Author Email: Baharvand50@yahoo

بررسی تأثیر افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی درون سلولی در القاء نوروژایی بن‌یاخته‌های جنینی انسان

حسین بهاروند^{*}، مریم حاتمی و محمد معصومی
پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

دریافت: خرداد ۱۳۸۴، بازبینی: بهمن ۱۳۸۴، پذیرش: تیر ۱۳۸۵

چکیده

هدف: مطالعه اثر افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) ایجاد شده توسط دو فاکتور القاکننده ۳ ایزوبوتیل-۱-متیل گزانتین (IBMX) و دی بوتیریل آدنوزین مونوفسفات حلقوی (db-cAMP) بر تمایز بن‌یاخته‌های جنینی انسان به سلولهای عصبی.

مواد و روشها: در این مطالعه از کلونی‌های سلولهای بنیادی جنینی انسان (رویان HI) برای تولید سلولهای عصبی استفاده شد. به این منظور اجسام شبه جنینی (Embryoid body) با به کارگیری قطعاتی از کلونیهای جنینی انسان ساخته و به مدت ۶ روز تحت تیمار با استفاده از (۱) 10^{-6} مولار IBMX و (۲) 10^{-6} مولار db-cAMP یا (۳) 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید (RA) و (۴) تیمار همزمان (IBMX+db-cAMP+RA) و (۴) کنترل قرار گرفتند. سپس اجسام شبه جنینی تیمار شده به صورت منفرد در محیط کشت Neuro basal کشت شدند.

به منظور بررسی بازده عصب‌زایی تیمارهای انجام شده، علاوه بر بررسی‌های مورفولوژیکی از روش ایمونوسیتوشیمی با بکارگیری آنتی‌بادی‌های ویژه سلولهای عصبی بالغ مانند سیناپتوفیزین، نوروفیلانت پروتئین-سنگین، بتا توبولین - III، MAP-2 (Microtubule Associated Protein) و GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) استفاده شد. همچنین برای بررسی کمی بیان ژن‌های درگیر در فرآیند عصب‌زایی واکنش نیمه کمی RT-PCR انجام شد.

یافته‌ها: در بررسی‌های مورفولوژیکی، آغاز مهاجرت ساختارهای استتاله‌های عصبی در روز (۴+۶+۴) مشاهده شد. مطالعات ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مذکور آنتی‌ژنهای شاخص عصبی نشان داد که سلولهای تمایز یافته شامل سلولهای عصبی بالغ همچون نورو و آستروسیت می‌باشند. ارزیابی بیان پروتئین‌های ژن‌های درگیر در نوروژایی نشان داد ژن‌های سیناپتوفیزین، Hash1، گیرنده β آدرنژیک و گیرنده استیل کولین که در گروه اجسام شبه جنینی خاموش بوده‌اند پس از تیمار بیان آنها مشاهده شد. بررسی کمی بیان ژن‌های شاخص نوروژایی بالغ افزایش معنی‌دار گیرنده رتینوئیک اسید و سیناپتوفیزین و نوروفیلانت پروتئین - متوسط و گیرنده β -آدرنژیک را در طول زمان تمایز از روز (۴+۴) تا (۴+۶+۱۶) با استفاده از تیمار نشان داد که این افزایش بیان، در گروه‌های القاء شده با cAMP نسبت به دیگر گروهها (RA و کنترل) بیشتر بوده است (حداقل $p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: مشاهدات مورفولوژیکی و نتایج ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR نیمه کمی نشان داد که cAMP می‌تواند به عنوان یک القاء کننده عصبی در بن‌یاخته‌های جنینی انسانی باشد.

واژه‌های کلیدی: بن‌یاخته‌های جنینی انسان، cAMP، عصب‌زایی.

مقدمه

این سلولها با قدرت تکثیر بالا در محیط آزمایشگاهی، قابلیت تمایز به انواع سلولها را دارا هستند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه فناوری سلولهای بنیادی جنینی نشان داده است پیش‌سازهای عصبی برگرفته از این سلولها از توان بالقوه بسیار بالایی در درمان برخوردار بوده و منبع سلولی نامحدودی در طب پیوند را ایجاد کرده‌اند، به طوری که در حال حاضر مطالعات فراوانی در زمینه استفاده از بن‌یاخته‌های جنینی و سلولهای پیش‌ساز برگرفته از آنها در درمان بیماریهای تحلیل رونده عصبی همچون پارکینسون و Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) در حال انجام است.

بن‌یاخته‌های جنینی انسان hESC (Human Embryonic Stem Cells)، سلولهایی پرتوان هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست (Inner Cell Mass) منشأ گرفته و توانایی خود نوزایی (self-renewal) دارند [۱۹، ۲۷].

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:

baharvand50@yahoo.com

در حال انجام می‌باشد [برای مثال ر.ش ۱۳].

در این راستا در ابتدا سلولهای بن یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای پیش‌ساز نورویلی تالیالی تمایز داده می‌شوند. برای این منظور از مواد القاء کننده ای همچون رتینوئیک اسید (RA) [۳]، اسید آسکوربیک [۴]، ۱۷-بتااسترادیول [۱۷]، استورسپورین [۲۵] و Bone Morphogenic Protein (BMP) [۳۰] استفاده شده است که موجب راهاندازی آبشارهای مولکولی متفاوت در تمایز بن یاخته‌های جنینی به گروههای خاصی از جمعیت‌های سلولی عصبی می‌شوند. در طی این مسیرها فاکتورهای نروتروپیک و سایتوکاین‌های گوناگون همچون Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)، Neuroturin (NTN) و Nerve Growth Factor (NGF) در بقاء و تمایز سلولهای عصبی نقش مهمی را بازی می‌کنند [۱۱، ۲۱، ۲۶].

cAMP (cyclic Adenosine Mono Phosphate) یکی دیگر از القاء‌گرهای پیشنهادی در مسیر عصب‌زایی است [۱۰]. این ماده پیامبر ثانویه و مولکول سیگنال دهنده وسیع طیفی است که توسط آنزیم آدنیلات سیکلاز ساخته و توسط آنزیم فسفودی استراز متابولیزه می‌شود [۶]. نقش اولیه این ماده فعال کردن مجموعه‌ای از پروتئین‌کینازها و در نهایت القاء بیان گروهی از ژن‌ها می‌باشد. چنانچه نشان داده است افزایش سطح cAMP درون سلولی موجب فعال شدن پروتئین کیناز A (PKA) و آبشارهای کینازی وابسته به آن شده و در نهایت با فسفریلاسیون گروهی از پروتئینها موجب القاء بیان ژن‌های درگیر در فرآیند عصب‌زایی می‌شوند [۱۶].

در این مطالعه از دو ترکیب db-cAMP (دی‌بوتیریل آدنوزین مونوفسفات حلقوی) که از لحاظ ساختاری آنالوگ cAMP است و IBMX (۳-ایزوبوتیل - ۱-متیل گزانتین) که مهارکننده فسفودی استراز است برای افزایش سطح cAMP درون سلولی استفاده شد. با توجه به پتانسیل نورون‌زایی cAMP در سایر سلولها، این مطالعه به منظور بررسی اثر القائی این ماده بر بن یاخته‌های جنینی انسانی و ارزیابی پروفایل بیانی ژن‌های درگیر در این مسیر انجام شد.

مواد و روشها

در این مطالعه از بن یاخته‌های جنینی انسان رویان H1 استفاده شد [۱]. این سلولها بر فیبروبلاستهای جنین موش -۵/۱۳/۵ روزه NMRI که قبلاً با مایتومایسین (Sigma; M0503 10 µg/ml) روند تقسیم سلولی شان متوقف شده است و در ظروف کشت (Falcon; 3037) پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد (Sigma; G2500) و محیط hESC کشت می‌شوند. محیط hESC حاوی مواد ذیل می‌باشد.

- Knockout Dulbecco's modified Eagels medium (Gibco; 10829-018), 2mM glutamine (Gibco; 25030-024), 1% nonessential amino acid (Gibco; 10439-

024),

- 20% ES- Qualified fetal calf serum (Gibco; 11140-035),
- 0.1 mM β-mercaptoethanal (Sigma; M 7522),
- Insulin transferrin- selenium (Gibco; 41400-045),
- Penicillin, 100 µg/ml, Streptomycin 100 unit/ml (Gibco; 15070-063)

سلولها تحت شرایط نگهداری ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط اتمسفر (اکسیژن حدود ۲۰ درصد) در طی ۷ روز رشد و تکثیر یافتند و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس (CKX 41) Olympus مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

القاء تمایز

به منظور القاء تمایز در ابتدا کلنی‌های بن یاخته‌های جنینی انسانی رویان H1 با استفاده از روش مکانیکی و میکروسکوپ استریوفاز کنتراست برش زده شد و قطعات ۲۰۰ تا ۵۰۰ سلولی حاصل که شامل نواحی سلولی تمایز نیافته بن یاخته‌های جنینی انسان بودند به منظور تشکیل اجسام شبه جنینی در محیط hESC به صورت قطرات آویزان (hanging drop) به مدت دو روز کشت شدند. سپس اجسام شبه جنینی به ظروف باکتریایی (Greiner; Germany - 628102) انتقال یافته و در محیط hESC برای دو روز دیگر بصورت معلق کشت داده شدند. بعد از گذشت دو روز، اجسام شبه جنینی در ظروف باکتریایی به ۴ گروه تقسیم شدند و همه گروهها به محیط (Dulbecco modified Eagle's medium: Ham's (DMEM/F12) (Gibco; 21331-020) F-12) واجد L-glutamine (Gibco; 2503024) Insulin transferrin- selenium (Gibco; 41400-045)، تحت تیمار در ۴ گروه با غلظت‌های مشخص قرار گرفتند. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از:

- الف) دی بوتیریل آدنوزین مونوفسفات db-cAMP (Sigma; D0627) (۱۰^{-۶} مولار) و ۳-ایزوبوتیل - ۱-متیل گزانتین (IBMX) (Sigma; 15879) (۱۰^{-۴} × ۵ مولار)
 ب) اسید رتینوئیک (RA) (Sigma; R- 2625) (۱۰^{-۶} مولار)
 ج) RA (۱۰^{-۶} مولار) و db-cAMP (۱۰^{-۶} مولار) و IBMX (۱۰^{-۴} × ۵ مولار)
 د) کنترل (بدون تیمار)

تیمار اجسام شبه جنینی هر ۲ روز یکبار همراه با تعویض محیط به مدت ۶ روز ادامه یافت. در روز (۶ + ۴) اجسام شبه جنینی تیمار شده در هر سه گروه و گروه کنترل به صورت منفرد به درون ظروف کشت ۲۴ خانه (Tpp: Switzerland) پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد دارای محیط کشت Neurobasal medium (Gibco; 21103-046)

و رطوبت اشباع قرار گرفت. سپس نمونه توسط (۰/۰۵ درصد) PBS/Tween 20 در صد شستشو شده، سلولها توسط میکروسکوپ فلورسنت Nikon eclips TE 2004 مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. البته برای رنگ آمیزی سلولهای گلیال بعد از تثبیت سلولها با استفاده از متانل/استون به نسبت ۱:۳ از کیت آزمایشگاهی Glial fibrillary acidic protein (GFAP) Sigma:IMMH-6 در ۴ بار استفاده شد.

آنالیز نیمه کمی نسخه برداری معکوس - واکنش زنجیروار پلیمرازی (RT-PCR)

برای ارزیابی کمی بیان ژنهای درگیر در عصبزایی از تکنیک نیمه کمی RT-PCR استفاده شد لیست ژنهایی که در این مطالعه استفاده قرار گرفت به همراه پرایمرهای آنها، طول قطعات تکثیر شده و دمای باز سرشتی (annealing) این پرایمرها در جدول (۱) خلاصه شده است. در ابتدا RNA اجسام شبه جنینی (EBS) و سلولهای تمایز یافته در روزهای (۴+۴) و (۴+۶+۱۶) با استفاده از کیت آلودگی RNAهای استخراج شده از DNA ژنومیک، نمونههای استخراج شده تحت تیمار با آنزیم DNase I (EN0521; Fermentas) قرار گرفتند غلظت RNAهای استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. ۲ میکروگرم از RNA با به کار بردن پرایمر

واجد ۲ درصد B27 (Gibco; 17504 - 044) و ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (fetal calf serum) (Gibco; 1027 106) منتقل و هر ۴ روز یکبار نیمی از محیط تعویض گردید. ارزیابی سلولها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس انجام گرفت.

ایمونوسیتوشیمی

۱۲ روز بعد از کشت اجسام شبه جنینی تیمار یافته در درون ظروف کشت سلولهای مورد نظر توسط پارافمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند و سپس با سرم ۱۰ درصد بز به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شده و جهت بررسی آنتی ژنهای اختصاصی سلولهای عصبی از آنتی بادیهای Microtubule Associated Protein [2(a+b)] (MAP-2) (Sigma: M-1406) Neurofilament Protein-Heavy chain (NF-H) (1:50) (Sigma; N-0142), Synaptophysin (1:250) (Sigma; S-5768) β -Tubulin III (1:250) (Sigma; T-8660) در طی ۴ بار تکرار استفاده گردید. بعد از یک ساعت تیمار و انکوباسیون با آنتی بادیهای اولیه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت اشباع سلولها دوبار با استفاده از PBS+Tween 20 (۰/۰۵ درصد) شستشو شده و برای شناسایی از آنتی بادی ثانویه (Sigma; F-9006) و anti mouse IgG (FITC-Conjugated 1:200) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژنهای شاخص عصبی به همراه طول قطعه تکثیر شده و دمای باز سرشتی

نام ژن	توالی پرایمر 3'-5'	اندازه قطعه	دمای باز سرشتی	Gene Bank Code
Synaptophysin	Forward: 5' GGT CAG TTC CGG GTG GTC A3' Reverse: 5' GGT ACT TGT TCT GCA GGA AGA3'	۵۸	۲۳۶	BC -06550
RAR- α (Retinoic Acid Receptor- α)	Forward: 5' CCA GCT TCC AGT CAG TGG TTA 3' Reverse: 5' GGC AGT ACT GGC AGC GGT T 3'	۶۰	۳۳۲	AC-09042
NFM (Neuro filament Protein Medium chain)	Forward: 5' GGC ACA AAG TGG GAA ATG G3' Reverse: 5' CCT TCA TGG AAG CGG CCA A3'	۵۸	۳۴۳	XM -54323
Nestin	Forward: 5' CTC TGA CCT GTC AGA AGA AT3' Reverse: 5' CCC ACT TTC TTC CTC ATCTG3'	۵۸	۱۷۲	X-65964
OTX2	Forward: 5' GGC TTC AGG TTA TAG TCA AG 3' Reverse: 5' AGG AGG CAG TTT GGT CCT TA 3'	۶۰	۲۵۳	NM-17233
Pax 6	Forward: 5' CAG CTC GGT GGT GTC TTT G 3' Reverse: 5' AGT CGC TAC TCT CGG TTT A 3'	۶۰	۲۵۵	NM-001604
Wnt1	Forward: 5' CCT CCA CGA ACC TGC TTA CA3' Reverse: 5' TCG GGT GAC GAT CTT GCC GAA 3'	۶۲	۲۳۳	NM-00543
Hash-1 (Human achaete-scute complex homologue)	Forward: 5' CCA ACT ACT CCA ACG ACT 3' Reverse: 5' TGC GAT CAC CCT GCT TCC AA3'	۶۰	۱۸۴	NM-004316
Beta adrenergic 1 Receptor (β - 1AR)	Forward: 5' CTG CCT CCC GCC AGC GAA A 3' Reverse: 5' GTC CAC AGC TCG CAG AAG AA3'	۶۴	۲۷۷	NM-00684
AchR (Acetyl Cholin Receptor)	Forward: 5' AGG CAG ATA TCA GTG GCT ATA 3' Reverse: 5' AGC CAC GAG CAG CAT GAA GA3'	۶۰	۲۸۹	BC -030757
Oct - 4	Forward: 5' CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A3' Reverse: 5' CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA 3'	۶۷	۱۸۷	NM-000842
β -actin	Forward: 5' CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT 3' Reverse: 5' TTC TCC TTG ATG ATG TCA CGC AC3'	۶۲	۲۰۰	NM-00271

به شکل درصد گزارش شد. آزمایش چهار بار تکرار شده و در نهایت نتایج به صورت (انحراف معیار \pm میانگین) گزارش شد. برای ارزیابی معنی دار بودن اختلاف عصب زایی بین گروهها در روزهای مورد مطالعه از تست آماری GLM (General Linear Model) استفاده شد در مورد نتایج به دست آمده از آنالیز نیمه کمی RT-PCR نیز از تست آماری GLM برای ارزیابی معنی دار بودن اختلاف بیان یک ژن در گروهها و روزهای مورد مطالعه استفاده شد.

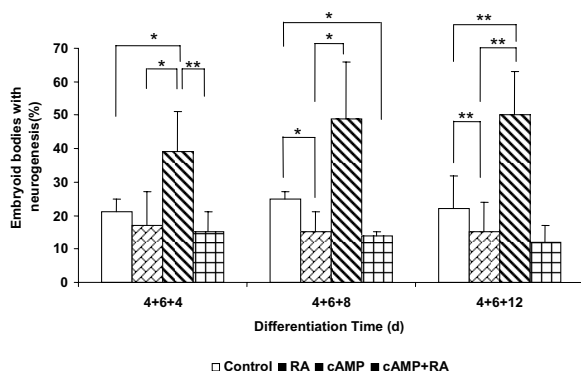
نتایج

مشاهدات مورفولوژیک

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود درصد عصب زایی در بن یاخته های جنینی انسانی، رویان H1 که تحت تیمار در (۴+۶+۱۲) روز پس از تیمار و کشت با مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ معکوس تعیین و با یکدیگر و با گروه کنترل (گروهی که تحت تیمار هیچ گونه القاء کننده ای نبوده است و نشان دهنده تمایز خودبه خودی بن یاخته های جنینی انسان به سمت عصب می باشد) مقایسه شد. در اینجا معیار تمایز به سمت عصب در بن یاخته های جنینی انسانی وجود استتالهای آکسونی و دندریتها در این سلولها بود و EB های دارای بیش از ۱۰٪ عصب به عنوان EB عصب دار در نظر گرفته شد. درصد اجسام سلولی دارای سلول عصبی در گروه cAMP بیش از گروههای دیگر بود و این موضوع با گذشت زمان حفظ شد (حداقل $P < 0.05$) بطوریکه حدود ۴۰-۵۰٪ اجسام سلولی در گروه تیمار شده با cAMP دارای سلولهای عصبی بودند این در حالی بود که با تیمار RA و یا مجموع cAMP+RA اجسام سلولی تمایز چندانی به عصب نداشتند و نسبت به گروه کنترل تفاوتی نمی کردند (شکل ۱).

تجلی ژنهای عصبی در سلولهای تمایز یافته

برای بررسی اینکه این ساختارهای القاء شده، ساختارهای عصبی می باشند و استتالهای مشاهده شده در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس همان اکسونهای سلولهای عصبی است با استفاده از آنتی بادیهای



شکل ۱- مقایسه درصد نورون زایی در اجسام شبه جنینی در روزهای (۴+۶+۸) و (۴+۶+۱۲) در گروههای تحت تیمار و کنترل. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

Revert Adi™ First Strand و Random Hexamer cDNA Synthesis (K1622; Fermentas) مطابق دستور العمل به Complementary DNA (cDNA) تبدیل شد. سپس روی cDNA های تولیدی واکنش PCR صورت گرفت. به منظور انجام PCR موارد زیر در یک لوله PCR مخلوط شدند:

۲/۵ μl X PCR buffer، ۱۰ μl DNA (۵۰ ng/μl)، ۰/۷۵ μl MgCl₂ (۱۰ μM)، ۰/۱ μl (سینازن، TAX ۱۰۹ G) هر پرایمر (۱۰ μM) ۰/۵ μl SmarTaq (۵ Unit/μl) در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر فاقد یون به حجم ۲۵ μl رسانده شد PCR در داخل دستگاه Master cycler gradient machine (Eppendorf, Germany) انجام شد. شرایط PCR به صورت زیر بود:

(۱) واسرشتگی (denaturation) اولیه: ۵ دقیقه، ۹۳ درجه سانتی گراد

(۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی گراد

(۳) دمای باز سرشتی هر سیکل: ۴۵ ثانیه در دمای باز سرشتی مربوط به هر جفت پرایمر که در جدول ۱ ذکر شده است.

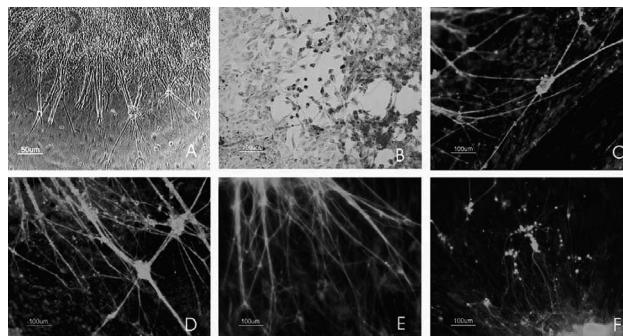
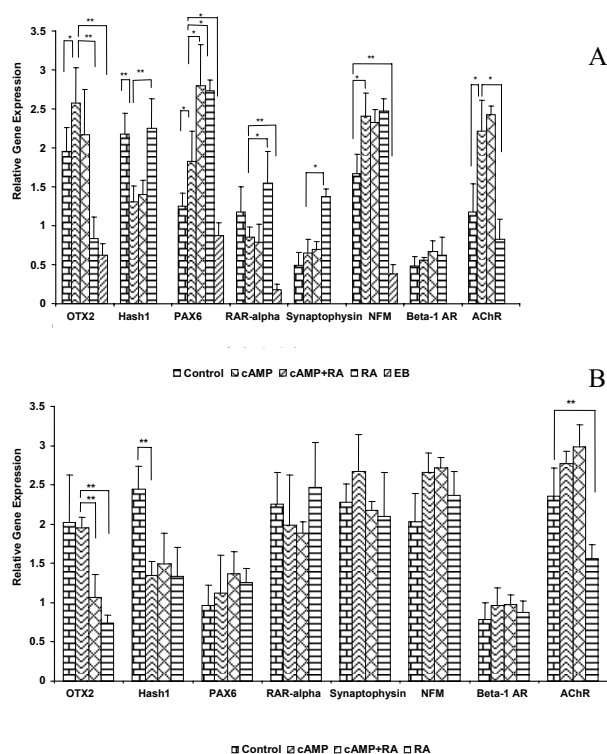
(۴) طولیل شدن (extension) هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد

(۵) طولیل شدن نهایی: ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد

تعداد سیکلها برای تمام ژنها به استثنای β-actin که به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد ۳۰ سیکل بود که تماماً در ناحیه لگاریتمی PCR هر ژن بود PCR با استفاده از پرایمرهای β-actin در ۲۰ سیکل (ناحیه لگاریتمی PCR برای ژن β-actin) انجام شد. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. ژلها توسط اتیدیوم بروماید (۱۰ μg/ml) رنگ آمیزی شده و توسط دستگاه UV transilluminator (UVIdoc, UK) از آن عکسبرداری صورت گرفت. تصاویر به دست آمده، توسط برنامه UVI bandmap (UVItec, Cambridge) آنالیز شدند. نتایج کمی RT-PCR برای هر ژن حاصل نسبت سیگنال به دست آمده از آن ژن به سیگنال به دست آمده از ژن β-actin بود. آزمایش نیمه کمی RT-PCR برای هر گروه چهار بار تکرار شد.

روش آماری

مطالعه حاضر به صورت Parallel experimental design طراحی و در آن بن یاخته های جنینی انسان به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، cAMP، RA، و cAMP+RA تقسیم و مورد مطالعه قرار گرفت. در پایان روزهای (۴+۶+۴) و (۴+۶+۸) و (۴+۶+۱۲) تعداد اجسام شبه جنینی که به سمت عصب تمایز یافته و واجد بیش از ده درصد از تراکم سلولی دارای مورفولوژی عصبی بودند در هر گروه جداگانه شمارش شده و نسبت به تعداد کل اجسام شبه جنینی در همان گروه و



شکل ۲ - سلولهای عصبی تمایز یافته از بن یاخته های جنینی (A) میکروسکوپ فاز کنتراست، و ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی بادی علیه (B) GFAP، (C) بتا-توبولین III، (D) سیناپتوفیزین، (E) MAP-2، (F) نوروفیلانمنت پروتئین - زنجیره سنگین.

اختصاصی سلولهای عصبی ایمونوسیتوشیمی انجام شد. سلولهای القاء شده نسبت به آنتیبادیهای اختصاصی عصبی بر علیه سیناپتوفیزین، نوروفیلانمنت پروتئین - سنگین، بتا توبولین - III، MAP-2، GFAP و مثبت بوده و نشان دهنده تشکیل سلولهای عصبی بالغ و بیان شاخص های بالغ عصبی در سلولهای تمایز یافته می باشد (شکل ۲).

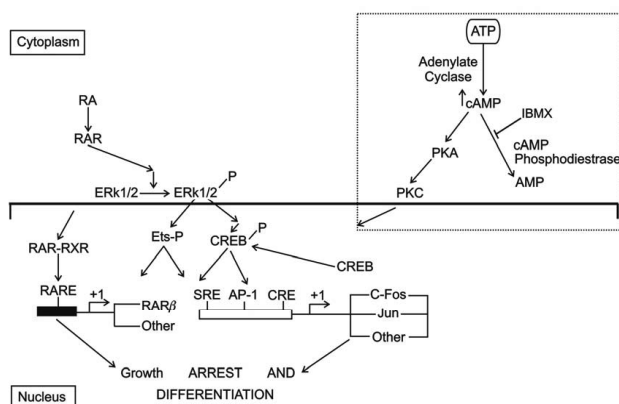
همانطوری که در شکل های (ب، الف-۴) و ۳ مشاهده می شود به منظور ارزیابی پروفایل بیانی ژنهای درگیر در میسر عصب زائی، واکنش نیمه کمی RT-PCR در روزهای (۴+۴) و (۴+۶+۱۶) روی RNA های استخراج شده از سلولهای تیمار شده به وسیله RA، cAMP+RA، cAMP و کنترل و همچنین اجسام شبه جنینی انجام شد. ژنهای سیناپتوفیزین، Hash1، گیرنده بتا آدرنژیک و گیرنده استیل کولین که در گروه اجسام شبه جنینی خاموش بوده اند پس از تیمار، در گروههای القاء شده بیان شدند (شکل ۳).

ارزیابی نیمه کمی بیان ژن PAX6 به عنوان یکی از شاخص های آنتی ژنی مراحل اولیه القاء نورون زایی، بیان بالای این ژن را در روز

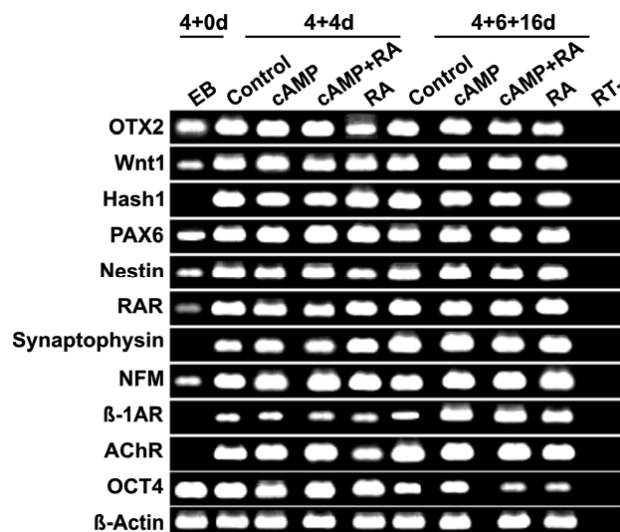
شکل ۴ - بررسی نیمه کمی بیان ژنهای درگیر در عصب زائی در روزهای ۴+۴ (A) و ۴+۶+۱۶ (B) سیگنال بدست آمده از بیان هر یک ژنهای فوق نسبت به سیگنال بدست آمده از بیان ژن β -actin سنجیده شده است. نمودارها حاصل چهار بار تکرار بوده و به صورت میانگین \pm انحراف نشان داده شده است. (* $p < 0.01$), (** $p < 0.05$)

(۴+۴) در تمام گروههای تیمار شده نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$). بیان این ژن در روز (۴+۶+۱۶) با کاهش معنی داری ($p < 0.01$) در تمام گروهها مواجه شد.

در گروههای cAMP و cAMP+RA به ترتیب کاهش در بیان ژن OTX2 که از جمله دیگر شاخص های آنتی ژنی مراحل اولیه نورون زایی شناخته شده است در روز (۴+۶+۱۶) نسبت به روز (۴+۴) مشاهده شد. در مورد بیان ژن Wnt 1 و Nestin (شاخصهای پیش سازهای عصبی) تغییر معنی داری در طول زمان مشاهده نشد. بررسی نیمه کمی



شکل ۵ - مکانیسم مولکولی القاء نورون زایی تحت تاثیر اسید رتینوئیک و افزایش سطح cAMP به واسطه فسفوریله شدن CREB در طی مسیر ERK/1-2 و PKA [۲۵]. با کمی تغییر (کادر نقطه چین)



شکل ۳ - نتایج RT-PCR نیمه کمی ژنهای درگیر در عصب زائی

تحت تیمار می شود. این میزان نسبت به گروههای تیماری RA و cAMP+RA و کنترل بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد تیمار RA در طی ۶ روز به منظور القاء عصب زایی و راه اندازی مکانیسم های مولکولی وابسته به آن در بن یاخته های جنینی انسان کافی نمی باشد.

نتایج ایمونوسیتوشیمی، شاخصهای بالغ عصبی همچون سیناپتوفیزین نوروفیلانت پروتئین - زنجیره سنگین، بتا توبولین - III،

MAP-2 و GFAP در گروههای تیمار و کنترل، نشانگر بلوغ سلولهای عصبی تولید شده می باشد. القاء و بیان ژن های بالغ عصبی در گروههای کنترل بدلیل پرتوانی بن یاخته های جنینی قابل پیش بینی بود. وجود آنتی ژن GFAP (شاخص آستروسیتی) نشان دهنده وجود این دسته از سلولهای گلیال در بین سلولهای تمایز یافته است.

کم شدن معنی دار بیان ژن های PAX6 و OTX2 (ژن های مراحل اولیه تمایز عصبی که در بالا دست آبشار مولکولی منتهی به عصب زایی قرار دارند) در گروههای تیمار شده با RA و cAMP و cAMP+RA در طی زمان کشت بیانگر این مطلب است که افزایش زمان کشت باعث شده است که درصد بیشتری از سلولها از حالت نورواکتودرم اولیه خارج و به سمت سلولهای بالغ عصبی بروند.

در حالی که عدم وجود اختلاف معنی دار در بیان ژن های Nestin و Wnt-1 که از جمله دیگر ژن های مراحل اولیه تمایز عصبی هستند، در گروههای تیمار شده با RA و cAMP و cAMP+RA در طی زمان کشت نشان داد که گروههای تیماری فوق و شرایط کشت بکار گرفته برای القاء همه ژنهای پیش ساز عصبی مناسب نبوده است و چنانچه شرایط بطوری تغییر داده شود که بیان این گروه از ژنهای پیش ساز های عصبی نیز تحت تاثیر قرار گیرد، بازده القاء عصب زایی نیز افزایش یابد.

بررسی نیمه کمی بیان ژن های شاخص نورون های بالغ از قبیل سیناپتوفیزین، نوروفیلانت پروتئین - متوسط و گیرنده-β آدرنژیک در طول زمان کشت نشان دهنده افزایش معنی داری بیان این ژن ها در طول زمان است. این افزایش در گروههای القاء شده با cAMP تقریباً دوبرابر افزایش بیان همین ژن ها در گروه کنترل (تمایز خودبه خودی) و تیمار RA بوده است. همچنین نتایج نشان می دهد انجام تیمار cAMP برای تولید سلولهای عصبی حساس به استیل کولین نسبت به تیمار RA و کنترل، از بازده مناسب تری برخوردار می باشد. افزایش چشمگیر بیان این ژن ها می تواند به دلیل وجود توالی های محافظت شده CRE (cAMP Response Element) در فرادست پرموتور این ژن ها باشد [۲۴]. برای راه انداختن این مسیر مولکولی ابتدا پروتئین کیناز A (PKA) به مولکولهای cAMP درون سلولی متصل شده و فعال می گردد. سپس این آنزیم فعال شده به طور مستقیم باعث فسفریله شدن پروتئین های CREB (cAMP Response Element Binding) متصل شده به ناحیه CRE ژن ها می شود. این CREB فسفریله شده به پروتئین CBP (cAMP Binding Protein) متصل شده و این کمپلکس می تواند به فاکتورهای نسخه برداری متصل به ناحیه TATA متصل شود و باعث فعال شدن نسخه برداری گردد [۱۶]. بنابراین

بیان ژنهای شاخص نورونهای بالغ افزایش معنی داری رادر بیان ژنهای سیناپتوفیزین، نوروفیلانت پروتئین - متوسط و گیرنده β آدرنژیک در طول زمان تمایز از (۴+۴) تا (۴+۶+۱۶) با استفاده از تیمار نشان داد، که این افزایش بیان در گروههای القاء شده با cAMP نسبت به دیگر گروهها بیشتر بوده است. پروفایل بیانی ژن گیرنده استیل کولین در گروههای مختلف نشان داد که این ژن در گروههای تیمار شده با cAMP [(cAMP) و (cAMP+RA)] نسبت به دیگر گروهها در هر دوروز (۴+۴) و (۴+۶+۱۶) از بیان بالاتری برخوردار است. همچنین گروه تیماری RA افزایش چشمگیر سطح mRNA گیرنده α ریتینوئیک اسید را در روز (۴+۴) و در ادامه افزایش زمان کشت در همین گروه نسبت به سایر گروه ها نشان داد (شکل A, B - ۴، شکل ۳).

بحث

بن یاخته های جنینی تحت تاثیر مواد القاء کننده به سلولهای عصبی تمایز پیدا می کنند. این مواد سبب راه اندازی مکانیسم های بیوشیمیایی و آبشارهای مولکولی القاء گر ژنهای ویژه عصب زایی در طی دو مرحله پاسخ فوری و تاخیری و بروز مورفولوژی عصبی در این سلولها می شود [۲۴، ۹].

در این مطالعه به بررسی فعالیت نورون زایی cAMP بر بن یاخته های جنینی انسانی پرداخته شد. مطالعات قبلی نشان داده است که تنظیم فعالیت cAMP درون سلولی در روند عمومی تمایز عصبی همچون Neuronal synaptic plasticity, Neuronal Transmission, Axonal projection, Axonal guidance از اهمیت بسزایی برخوردار است [۱۵، ۱۸، ۸].

نشان داده شده است که cAMP بر دودمانهای سلولی مختلف اثرات القائی گوناگون را در جهت نورون زایی اعمال می کند. القاء دودمان سلولی نوروبلاستوما (SH-SY5Y) با cAMP نورون هایی را بوجود می آورد که بیشتر صفات اختصاصی نورون های CNS (Central Nervous System) را بیان می کند. در حالی که نشان داده شده بود که القاء دودمان سلولی PC12 (فتوکروموسایتوما) با cAMP منجر به تولید نورون هایی با خصوصیات PNS (Peripheral Nervous System) می شود [۲۲، ۲۱].

از طرفی القاء سلولهای استرومای مغز استخوان انسان با cAMP منجر به ظهور مورفولوژی شبه نورونی (Neuron Like Cells) کاهش تکثیر سلولی و افزایش سطح بیان بعضی از مارکرهای اولیه عصبی همچون (Neuron Specific Enolase) (NSE) و Viementin می گردد بیان ژن های مرحله بلوغ عصبی مثل نوروفیلانت پروتئین - متوسط، GFAP, MAP-2, MBP (Myelin Basic Protein) را مشاهده نشده است [۲۳].

در این مطالعه مشاهده شد تیمار cAMP بر بن یاخته های جنینی انسانی موجب القاء ساختارهای عصبی در ۵۰ درصد اجسام شبه جنینی

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدر دانی خود را از همکاری صمیمانه خانم‌ها عادلہ طائی، نرگس زارع مهرجردی، اکرم تیموری و آقای احمد رضا باغستانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند مبذول می‌دارند. این مطالعه با حمایت پژوهشکده رویان انجام شد.

منابع

- [1] Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taeae A, Sabour D, Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation* 72 (2004) 224-9.
- [2] Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI, Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168(1995) 342-57.
- [3] 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) 691-4.
- [4] 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* (2003)1200-7.
- [5] Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A, Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 5583 (2004)15-92.
- [6] Cosgaya JM, Aranda A, Nerve growth factor activates the RARbeta2 promoter by a Ras-dependent mechanism *Neurochem* 76(2001) 661-71.
- [7] Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ, In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282 (2001) 148-52.
- [8] Dohovics R, Janaky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS, Regulation of glutamatergic

وجود CRE در فرادست ژن‌های NF-M، سیناپتوفیزین و گیرنده β - آدرنرژیک و تیمار بن‌یاخته‌های جنینی توسط cAMP باعث افزایش دوبرابری نسخه‌برداری این ژن‌ها گردیده است.

نشان داده شده است که RA می‌تواند به طور مستقیم و طی یک مسیر انتقال سیگنال پیچیده ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2) که تمام اجزاء شرکت کننده در آن به خوبی شناخته نشده است موجب فسفریلاسیون CREB شود (شکل ۵) [۲۵]. ولی نتایج ما در مورد بیان ژن‌های بالغ عصبی NF-M سیناپتوفیزین و گیرنده β -آدرنرژیک نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در سلول‌های تحت تیمار RA نصف بیان این ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده با cAMP و RA+cAMP است. این موضوع را می‌توان به دلیل شرایط متفاوت کشت و یا مناسب نبودن مدت زمان تیمار RA بر بن‌یاخته‌ها جنینی به منظور راه اندازی مسیرهای سیگنالینگ مولکولی (ERK1/2) و یا PKA در القاء عصب زایی دانست [۱۴،۲،۲۹،۲۳].

بیان ژن‌های اولیه و بالغ عصبی و Oct-4 (به عنوان شاخص سلول‌های تمایز نیافته) در تمام گروه‌های تحت تیمار و کنترل در روزهای مورد مطالعه نشان دهنده هتروژنیسیته (ناهمگنی) جمعیت سلولی می‌باشد و نشان می‌دهد که در این جمعیت طیفی از سلول‌های تمایز نیافته تا سلول‌های بالغ عصبی وجود دارد. در این مطالعه که از cAMP به طور مستقیم برای فعال کردن مسیر القاء عصب‌زایی استفاده شد اثر سینرژیک و افزایشی بین cAMP و RA مشاهده نشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که بکارگیری NGF و RA به منظور القاء عصب زایی بر سلول‌های PC12 موجب افزایش فسفریلاسیون CREB و القاء میزان نورون زایی نشده و اثر سینرژیک ندارند [۵].

همچنین بررسی تاثیر استوروسپورین و RA در القاء بن‌یاخته‌های جنینی موشی نشان داد این دو نسبت به یکدیگر اثر آنتاگونیستی داشته و استوروسپورین در طی مسیر MAP کیناز همچون NGF همراه با مهار پروتئین کیناز C (PKC) موجب القاء عصب زایی می‌شود [۲۵] با توجه به اینکه پروتئین CREB مولکول مشترک مسیرهای سیگنالینگ مختلف PKA و NGF و RA بوده و در طی هر سه مسیر فسفریله شدن این پروتئین منجر به القاء عصب زایی می‌گردد. بنابراین باید یک مکانیسم دقیق در کنترل فسفریلاسیون CREB و القاء تمایز عصبی در زمان فعال شدن هر سه مسیر، دخیل باشد. لذا اینگونه به نظر می‌رسد زمانی که مولکول‌های CREB توسط یک مسیر فعال می‌شوند، فسفریلاسیون توسط مسیر دیگر را مهار می‌کنند. بنابراین، این نظریه که فعال شدن CREB تحت کنترل یک مکانیسم باز خوردی منفی است را تقویت می‌کند.

با توجه به این مطالعه از مولکول cAMP می‌توان به عنوان یک عامل القاء کننده عصب زایی در بن‌یاخته‌های جنینی به منظور مطالعه مسیرهای مولکولی درگیر در تکامل سیستم عصبی و مقاصد کلینیکی در طب پیوند بهره جست.

- cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. *J Neurosci* 23 (2003) 2228-38 .
- [19] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18 (2000) 399-404.
- [20] Sanchez S, Jimenez C, Carrera AC, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F, A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* 44(2004) 231-42.
- [21] Sariola H, Saarma M, GDNF and its receptors in the regulation of the ureteric branching. *Int J Dev Biol* 43 (1999) 413-8 Review.
- [22] Sayas CL, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F, The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem* 274(1999) 37046-52.
- [23] Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA, Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 113(1991) 1173-82 .
- [24] Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N, Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 913(2001) 201-5.
- [25] Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W, Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Neurosci* 23 (2003)669-80.
- [26] Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W. Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Neurosci* 23 (2003) 669-80.
- [27] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(1998) 1145-7.
- [28] Tokuda M, Hatase O, Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Neurobiol* 17 (1998) 137-56
- neurotransmission in the striatum by presynaptic adenylyl cyclase-dependent processes. *Neurochem Int* 42 (2003) 1-7.
- [9] Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME, Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77 (1994) 713-25.
- [10] Gunning PW, Letourneau PC, Landreth GE, Shooter EM, The action of nerve growth factor and dibutylryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate on rat pheochromocytoma reveals distinct stages in the mechanisms underlying neurite outgrowth. *J Neurosci* 10 (1981) 1085-95.
- [11] Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E Jr, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS, Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 18 (1998)4929-37.
- [12] Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A, Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8(1998) 971-4.
- [13] Lonze BE, Ginty DD, Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(2002) 605-23 Review.
- [14] Maden M, Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209 (2001) 1-77 Review.
- [15] Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne, M, Poo MM, cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19 (1997) 1225-35.
- [16] Montmayeur JP, Borrelli E, Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 3135-9 .
- [17] Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Tatko LM, 17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett* 569 (2004)165-8.
- [18] Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Bacharvet KN, Girault JA, Welker E, Gaspar P, Adenylate

- GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 16273-8 .
- [31] Zhang, SC., Embryonic stem cells for neural replacement therapy: prospects and challenges, J Hematother *Stem Cell Res* 12)2003(625-34 Review.
- www.phypha.ir/ppj متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است
- Review.
- [29] Van Buskirk R, Corcoran T, Wagner JA, Clonal variants of PC12 pheochromocytoma cells with defects in cAMP-dependent protein kinases induce ornithine decarboxylase in response to nerve growth factor but not to adenosine agonists. *Mol Cell Biol* 5 (1985) 1984-92.
- [30] Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF, Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical