

تحقیقی

مقایسه ظرفیت تکثیر سلولی و بیان عامل نورونیک از کشت چسبنده سلول‌های بنیادی عصبی نواحی Subventricular zone، Subgranular zone و مجرای مرکزی نخاع موش صحرائی بالغ

آناهیتا سلطانیان^۱، دکتر محمد تقی قربانیان*^۲، دکتر تقی لشکرلوکی^۲

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش بافت شناسی و جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان.

۲- استادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان.

چکیده

زمینه و هدف: روند از دست رفتن نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی با افزایش سن روی می‌دهد. برای جلوگیری از مرگ نورون‌ها، می‌توان با پیوند سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) علاوه بر جایگزینی سلول‌های از دست رفته، با تولید عوامل نوروتروفیک، بقا و تکثیر سلول‌های درون زاد (آندوژنوس) را افزایش داد. این مطالعه به منظور مقایسه ظرفیت تکثیر سلولی و بیان عامل نورونیک از کشت چسبنده سلول‌های بنیادی عصبی نواحی Subventricular zone (SVZ)، Subgranular zone (SGZ) و مجرای مرکزی نخاع موش صحرائی بالغ انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی عصبی نواحی SVZ، SGZ و مجرای مرکزی نخاع موش صحرائی بالغ نژاد ویستار استخراج و تا ۱۳ پاساژ در محیط MEM- α غنی شده با سرم به صورت تک‌لایه‌ای یا چسبنده کشت داده شد. بیان نشانگرهای نستین و GFAP به روش ایمونوسیتوشیمی و بیان ژن‌های NGF، CNTF، NT3، NT4/5، GDNF و BDNF به روش RT-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: ویژگی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی استخراج شده نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی در محیط کشت مشابه بود. زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی عصبی SVZ (۳۷/۴۵ ساعت) نسبت به SGZ (۴۴/۰۴ ساعت) و مجرای مرکزی نخاع (۵۷/۲۲ ساعت) کوتاه‌تر بودند. در شرایط کشت تک‌لایه‌ای سلول‌های بنیادی عصبی قادر به تولید نوروسفر بودند. همچنین نشانگرهای نستین و GFAP توسط NSCs این سه ناحیه بیان شده بودند. الگو و پروفایل بیان ژن‌های نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی استخراج شده از SVZ، SGZ و مجرای مرکزی نخاع مشابه یکدیگر بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی جدا شده از نواحی مختلف سیستم عصبی مشابه بود؛ ولی سلول‌های بنیادی جدا شده از ناحیه SVZ دارای ظرفیت تکثیری بالاتری بودند.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی عصبی، SVZ، SGZ، مجرای اپاندیم نخاع، کشت چسبنده

* نویسنده مسئول: دکتر محمد تقی قربانیان، پست الکترونیکی ghorbanian@du.ac.ir

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی، گروه سلولی و مولکولی، کدپستی ۳۶۷۱۶۴۱۱۶۷، تلفن ۰۲۳۲-۰۲۴۷۱۴۶، نمابر ۰۲۴۷۱۴۶

وصول مقاله: ۹۱/۴/۶، اصلاح نهایی: ۹۱/۹/۱۸، پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۸

مقدمه

کشت سوسپانسیون نوروسفر در محیط DMEM با حضور عوامل رشد است (۱۰-۸)؛ اما کشت نوروسفری با تمام محاسن، معایبی نیز دارد. معمولاً این روش کشت با کاهش پیشرونده توان خود نوزایی و پتانسیل تمایزی سلول‌ها همراه است و از سوی دیگر با توجه به هتروژن بودن جمعیت سلولی نوروسفر، تعیین کمیت و کیفیت سلول‌های سازنده دشوار بوده و کیفیت و خصوصیات سلول‌ها در هنگام پیوند مورد تردید است (۱۱و۴).

روش دیگر کشت سلول‌های بنیادی عصبی، روش تک‌لایه‌ای و چسبنده به کف است. سلول‌ها پتانسیل تمایزی خود را حفظ کرده و تعیین هویت سلول‌هایی که مورد پیوند قرار خواهند گرفت؛ نسبت به کشت نوروسفری آسان است (۹و۱۰). بنابراین برای مقایسه رشد،

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه علوم پزشکی، هنوز برای بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات سیستم عصبی مرکزی درمان قطعی وجود ندارد. پس از کشف سلول‌های بنیادی عصبی (neural stem cells: NSCs) امیدهای تازه‌ای برای درمان بسیاری از بیماری‌های فرسایشی مانند بیماری‌های سیستم عصبی ایجاد شد. به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های بنیادی برداشت شده از بافت عصبی که به نیچ (niche) عصبی تعلق دارند و از نظر تکوینی نسبت به سایر سلول‌های بنیادی یک گام به نورون و سلول‌های گلیالی نزدیک‌تر هستند؛ مناسب‌تر باشند (۳-۱). روش‌های مختلفی برای برداشت و کشت این سلول‌ها وجود دارد (۷-۴). معمول‌ترین روش،

انتقال به هود لامینار، نخاع به کمک فشار محلول PBS، از محل خود خارج گردید و به پتری دیش محتوی PBS استریل سرد انتقال یافت. سپس بخش‌های اضافی آن حذف و ناحیه اطراف مجرای اپاندیمی برای هضم آنزیمی برداشته شد (۱۴).

هضم آنزیمی به وسیله محلول پاپائین گرم (۳۷ درجه سلسیوس) به مدت ده دقیقه داخل انکوباتور (۱۷۰۵) و هضم مکانیکی به روش پیپتاژ با پیپت پاستور کشیده شده بر روی شعله انجام گرفت (۱۸). پس از افزودن محیط α -MEM غنی شده با سرم FBS ده درصد (Fetal Bovine Serum; Gibco) سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوز (Eppendorf [5810 R]) شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی تخلیه شده و پلیت سلولی به همراه محیط کشت α -MEM حاوی سرم FBS ده درصد، پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Gibco) یک درصد، به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب منتقل شد. سلول‌ها در شرایط انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند. در کشت اولیه، فلاسک‌ها به مدت ۶ روز در انکوباتور قرار داده شدند و سپس تعویض محیط انجام گردید. تعویض محیط هر ۳ روز یک بار انجام شد و سلول‌ها با تراکم حدود ۷۰ درصد پاساژ داده شدند.

پاساژ سلول‌ها (ایجاد Subculture) و شمارش سلولی

پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم (confluency) ۸۰-۷۰ درصد پاساژ سلول‌ها و ایجاد Subculture (نوبت‌های کشت) به وسیله آکو تاز انجام گردید. وضعیت سلول‌ها و جدا شدن آنان از کف فلاسک به وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفت. در هر نوبت پاساژ پیش از انتقال سلول‌ها به فلاسک شمارش سلولی به وسیله رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد) و لام هموسایتومتری انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از شمارش، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در فاز Log به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید (۱۹).

$$n = 3.32 \frac{(\log N_2 - \log N_1)}{(t_2 - t_1)}$$

تعیین هویت و میزان خلوص سلول‌های بنیادی عصبی

برای تعیین هویت NSCs سلول‌های پاساژ سوم با تراکم 5×10^4 سلول در سانتی‌متر مکعب به پتری دیش لامل گذاری شده آغشته به ژلاتین منتقل و ایمونوسیتوشیمی برای نشانگرهای نستین و GFAP انجام شد (۱۴ و ۲۰).

نمونه‌های سلولی با آنتی‌بادی‌های آنتی‌نستین (Sigsms [N5413]) (۱:۵۰۰) و آنتی‌بادی آنتی GFAP (Sigma [G6171]) (۱:۱۰۰) ارزیابی شدند. پس از شستشو با PBS برای انجام ثبوت، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پارافرمالدهید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با Triton X-100 ۰/۳ درصد و مدت ۱۵ دقیقه سرم بز ۱۰ درصد انکوبه شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس و شرایط مرطوب در معرض

تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز یا بنیادی عصبی، کشت تک‌لایه‌ای مناسب‌تر از کشت نوروسفری است (۱۲). روش کشت تک‌لایه‌ای، نسبت به کشت نوروسفر کمتر مورد مطالعه قرار گرفته و پرسش‌هایی در این زمینه وجود دارد (۴). تعیین نیچ سلول‌های بنیادی به منظور شناخت ارتباط بین سلول‌ها و عواملی که در تقسیم و تمایز این سلول‌ها ایفای نقش می‌کنند؛ اهمیت بسیار دارد (۱۴ و ۱۳). این مطالعه به منظور بررسی امکان کشت سلول‌های بنیادی عصبی در محیط α -MEM غنی شده با سرم به صورت تک‌لایه‌ای یا چسبنده انجام شد. همچنین خصوصیات و ظرفیت تکثیر سلولی و بیان عوامل نوروتروفیک توسط سلول‌های بنیادی عصبی برداشت شده از SVZ، SGZ و مجرای مرکزی نخاعی مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی

این مطالعه آزمایشگاهی روی ۴۵ سر موش صحرائی بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتوی رازی کرج در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. کار بر روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. این حیوانات در شرایط دوازده ساعت روشنایی - دوازده ساعت تاریکی، دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و در حضور آب و غذای کافی در محل خاص (حیوانخانه) نگهداری شدند.

تهیه کشت اولیه NSCs از SVZ، SGZ و مجرای مرکزی نخاعی

موش صحرائی بالغ

پس از بیهوشی کامل حیوان با استفاده از اتر، در شرایط استریل سر حیوان قطع شد. پوست سر برداشته شد و استخوان از محل خود جدا گردید. اتصالات مغز جدا و به پتری دیش حاوی PBS استریل نیمه منجمد که در کف آن کاغذ صافی قرار گرفته بود؛ منتقل گردید. پتری دیش مزبور به هود لامینار انتقال یافت. دو نیمکره مغز از هم جدا گردید و هیپوکامپ با کمک اسپاچولا از محل خود خارج گردید (۱۵). با استفاده از تیغ ناحیه SGZ، از سایر نواحی هیپوکامپ جدا گردید.

برای برداشت SVZ با استفاده از تیغ بیستوری برش ساژیتال از مغز تهیه گردید که در برگیرنده بطن‌های جانبی بود (۱۶). دیواره جانبی بطن جانبی با استفاده از پنس ظریف و تیغ اسکالپل جدا و به پتری دیش دیگری منتقل شد و با استفاده از تیغ اسکالپل تاحدممکن ساتوری گردید.

برای برداشت مجرای مرکزی نخاع، ابتدا پوست ناحیه پشت کنار زده شد. سپس ماهیچه‌های اطراف ستون مهره‌ها جدا گردید. بخش کمری ستون مهره‌ها توسط قیچی قطع و جدا شد. پس از

توالی پرایمرهای طراحی شده برای سنجش عوامل نوروتروفیک به روش RT-PCR و کد دسترسی آنان در Genbank

نام پرایمر	کد دسترسی	اندازه (bp)	توالی
NGF	NM_012610	۱۶۴	F: 5- CCTCTTCGGACACTCTGG-3 R: 5- CGTGGCTGTGGTCTTATC-3
CNTF	NM_013166	۷۰	F: 5- CTGGCTAGCAAGGAAGATTTCG-3 R: 5- CAGGCCCTGATGTTTACATAAGA-3
NT3	NM_031073	۱۸۱	F: 5- AGGTCGGAATTCAGCCGAT-3 R: 5- GTTTCCTCCGTGGTGTATGTT-3
NT4/5	NM_013184	۲۱۳	F: 5- TATGTGCGGCGTTGACTGC-3 R: 5- CACAGTCAGAAGGCACGGTA-3
GDNF	NM_019139	۲۴۲	F: 5- GACTCCATTATGCCCGAAGA-3 R: 5- TAGCCCAAACCCAAAGTCAGT-3
BDNF	D 10938	۴۰۵	F: 5- GCCCAACGAAGAAAACATA-3 R: 5- GATTGGGTAGTTCGGCATTG-3
β 2M	NM-012512	۳۱۸	F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3' R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'

ثانیه، انلینگ ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اکستنشن ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۴ سیکل، مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگار ۱/۵ درصد بررسی برای هر نمونه سه بار تکرار صورت گرفت. از پرایمر β 2M به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

در مرحله تهیه cDNA با حذف نمونه RNA و آنزیم Reverse Transcriptase و در مرحله RT-PCR با حذف آنزیم Taq polymerase و محصول cDNA تمامی مراحل کنترل گردید.

تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 انجام شد. بیان نشانگرهای نستین و GFAP به روش ایمنوسیتوشیمی و بیان ژن‌های NGF، CNTF، NT3، NT4/5، GDNF و BDNF به روش RT-PCR با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey بررسی شد. مرز استنتاج آماری نتایج کمتر و مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید.

یافته‌ها

مقایسه مورفولوژی NSCs کشت شده از مناطق مختلف در شرایط کشت
به طور کلی مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های مختلف مشابه بود. در روز پنجم کشت اولیه، شمار قابل توجهی از سلول‌ها به شکل تک‌لایه به کف فلاسک چسبیده بودند. این سلول‌ها مورفولوژی دوقطبی داشتند و دارای استتاله‌های نسبتاً کشیده‌ای بودند. ساختارهای نوروسفری نیز به دو شکل چسبیده و نیمه چسبیده قابل مشاهده بود (شکل یک).

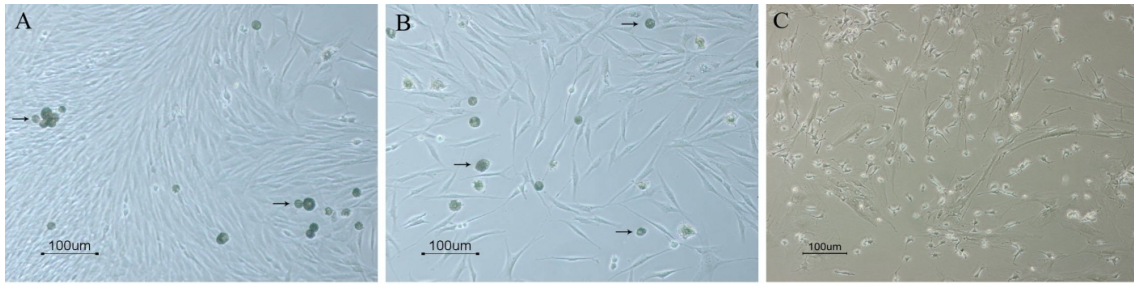
آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. در ادامه نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط مرطوب با آنتی‌بادی ثانویه در تاریکی انکوبه شدند. بدین منظور از آنتی‌بادی ثانویه ضد موش (Chemicon [AP132F]) (۱:۱۰۰) کونژوگه به FITC استفاده شد. در پایان نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Eclipse E600 Nikon) و دوربین دیجیتال (DXM 1200 Nikon Digital Camera) مطالعه و عکسبرداری شدند.

برای آزمون درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل گردید. آزمایش فوق برای هر یک از آنتی‌بادی‌ها در هر گروه سه بار تکرار شد.

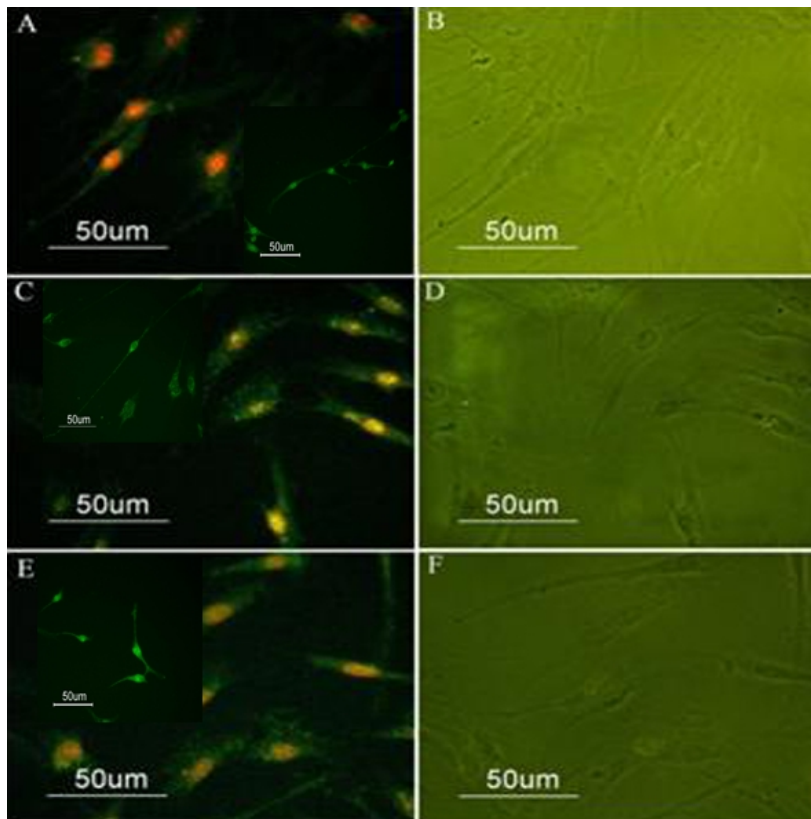
بررسی مولکولی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

برای بررسی بیان ژن‌ها از روش RT-PCR استفاده شد. بدین منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر در پاساژ چهارم با استفاده از RNX-Plus (RN7713C) و مطابق با دستور کیت سیناژن جداسازی شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز ژل آگارز (شکل F-۴) و اسپکتروفتومتری انجام گردید. سپس cDNA تک زنجیره‌ای با ۰/۵ میکروگرم RNA و استفاده از پرایمر oligo(dt) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (K1622, Fermentas, EU) براساس دستور کیت فرمتاز (Fermentase-k1622 kit) تهیه شد (واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت). در ادامه واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. برای تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (سیناژن) و ۱۰ پیکومولار پرایمرهای بالادست و پایین دست استفاده شد. پس از آماده‌سازی حجم مورد نظر، واکنش PCR با شرایط دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، سیکل‌های با شرایط دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰



شکل ۱: تصویر فاز کنتراست سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از SVZ (A)، SGZ (B) و مجرای مرکزی نخاعی (C). مورفولوژی سلول‌ها با جسم سلولی باریک، کشیده و دوکی شکل و برخی با زوائد و استتاله بلند و توده‌های سلولی نوروسفر مانند مشخص شده با پیکان قابل مشاهده است.



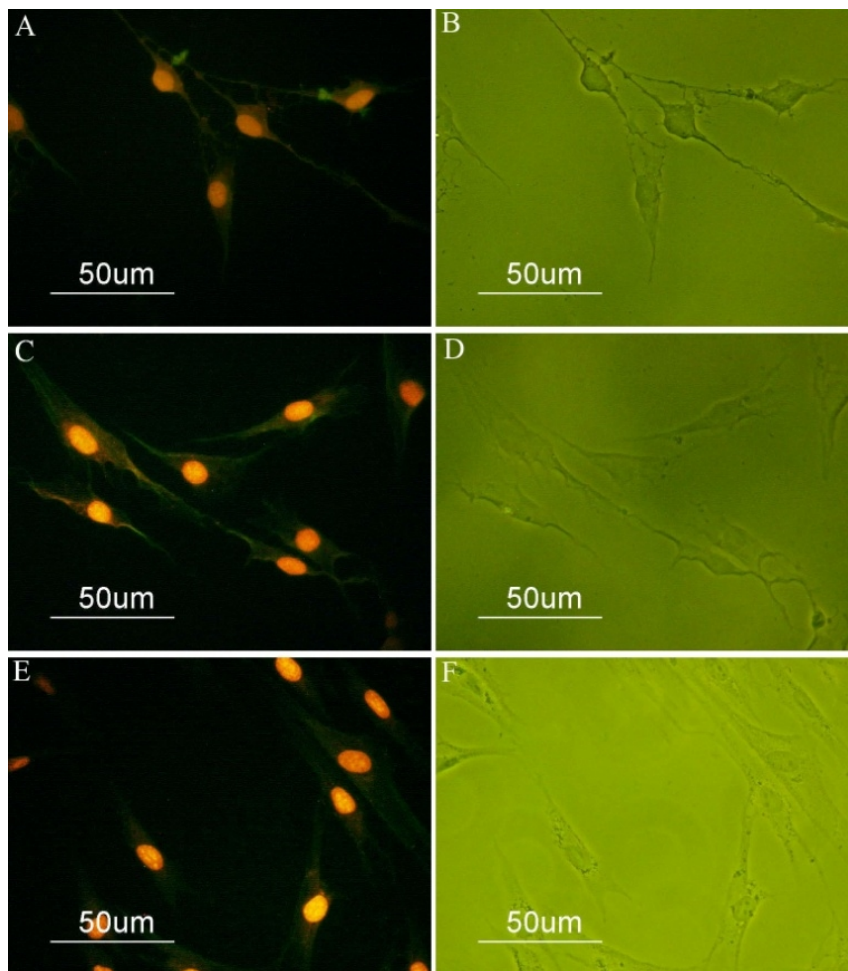
شکل ۲: تصویر فاز کنتراست و فلورسانس سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از SVZ (A و B) و SGZ (C و D) و مجرای مرکزی نخاعی (E و F) برای نشانگر نستین به روش ایمنوسیتوشیمی که سیتوپلاسم سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC به رنگ سبز و هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. همچنین تصاویر کوچک فلورسانس نیز بدون رنگ آمیزی هسته دیده می‌شود.

به طور کلی سلول‌ها دو قطبی و کشیده و نسبتاً یک‌دست و هم‌اندازه بودند. گاهی در بین سلول‌ها، سلول‌هایی با جسم سلولی مثلی یا هرمی شکل نیز دیده شدند. سلول‌هایی با جسم سلولی پهن و استتاله‌های کوتاه نیز در میان سلول‌ها دیده شدند (شکل یک). سلول‌های به دست آمده از مجرای مرکزی نخاعی به طور کلی ظریف‌تر از سلول‌های به دست آمده از مغز به نظر رسیدند.

زمان دو برابر شدن و ارزیابی وضعیت حیاتی

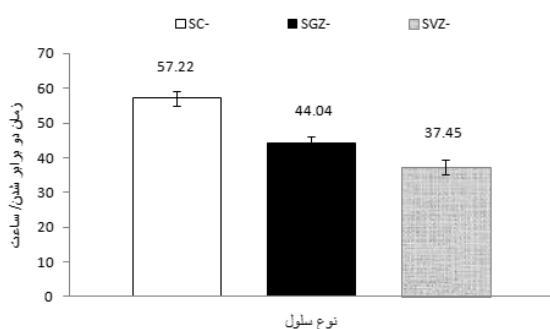
از پاساژ دوم تا یازدهم، ارزیابی حیاتی نشان داد که بیش از ۹۵ درصد از سلول‌ها در هر سه گروه کشت زنده بودند. نتایج حاصل از

به تدریج در هر دو گروه، بر تراکم سلول‌های چسبیده به کف افزوده شد. نوروسفرهای چسبیده به کف، کانون‌های زایای سلولی ایجاد کردند. نوروسفرها بیشتر در کشت اولیه و پاساژ اول و دوم مشاهده شد. NSCs استخراج شده از نخاع در کشت اولیه نوروسفرهای کمتری داشتند؛ ولی در پاساژهای اول و دوم بر تعداد آن افزوده شد. حضور نوروسفرها مربوط به پاساژهای پایین‌تر بود و در پاساژهای بالاتر دیده نشد. در فلاسک‌های حاوی سلول‌های SVZ، به طور کلی تعداد توده‌های نوروسفری بیشتر از سایر فلاسک‌ها بود. پس از پاساژ دوم، سلول‌ها ظاهری یک‌دست یافته و



شکل ۳: تصویر فازکتراست و فلورسانس سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از SVZ (A و B) ، SGZ (C و D) و مجرای مرکزی نخاعی (E و F) برای نشانگر GFAP به روش ایمنوسیتوشیمی که سیتوپلاسم سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC به رنگ سبز و هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ نارنجی دیده می‌شوند.

استخراج و بیان ژن‌های NGF، CNTF، NT3، NT4/5، GDNF و BDNF توسط RT-PCR به صورت نیمه کمی سنجش شد. فراوانی نیمه کمی mRNA ژن‌های نوروتروفیک تفاوت معنی‌داری را بین سه گروه سلولی نشان نداد. مقایسه بیان ژن عوامل نوروتروفیک در سیکل‌های مختلف نشان داد که در سیکل ۲۰ هیچیک از ژن‌ها بیان نگشته و از سیکل ۲۸ بیان ژن‌ها مشاهده گردید. از ژن $\beta 2M$ به



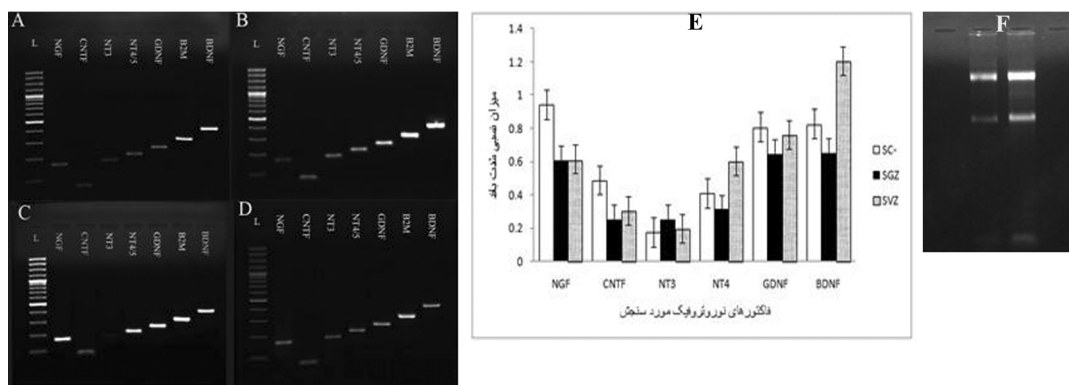
نمودار ۱: مقایسه زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی عصبی (پاساژ چهارم) در سه گروه آزمایشی (سلول‌های مجرای مرکزی نخاعی SC، سلول‌های SGZ و سلول‌های SVZ) بر حسب ساعت

مقایسه زمان دو برابر شدن سلول‌ها در گروه‌های آزمایشی در نمودار یک آمده است. سلول‌های استخراج شده از SVZ کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن (۳۷/۴۵ ساعت) و سلول‌های حاصل از مجرای مرکزی نخاعی طولانی‌ترین زمان دو برابر شدن (۵۷/۲۲ ساعت) را نشان دادند.

تأیید هویت NSC با ردیابی ایمنوسیتوشیمیایی GFAP و NESTIN
بیشتر سلول‌ها به دو نشانگر نستین و GFAP سیتوپلاسمی پاسخ مثبت دادند. رنگ آمیزی هسته توسط اتیدیوم بروماید، برای شمارش و افتراق این دو بخش سلولی صورت گرفت (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج RT-PCR

سلول‌های بنیادی عصبی گروه‌های مختلف در پاساژ چهارم برای بررسی بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. RT-PCR برای عوامل نوروتروفیک NGF، CNTF، NT3، NT4/5، GDNF و BDNF انجام شد. نتایج RT-PCR نشان داد که هر سه گروه سلولی، همه عوامل نوروتروفیک را بیان نمودند و الگوی مشابهی را نشان دادند (شکل ۴). برای تعیین تفاوت بیان عوامل نوروتروفیک، RNA کل از سلول‌های کشت شده SGZ، SVZ و مجرای مرکزی نخاعی



شکل ۴: نمای ژل الکتروفورز محصول RT-PCR که بیان ژن‌های نوروتروفیک را در NSCs مشتق از SVZ (A)، مجرای مرکزی نخاع و بافت مغز به عنوان کنترل مثبت، (D) که ژن‌ها در هر ستون عبارتند از: *BDNF 405 bp, β2M 318 bp, GDNF 254 bp, NT4/5 213 bp, NT3 181 bp, CNTF 70 bp, NGF 164 bp, Ladder* نمودار (E) - مقایسه نیمه کمی بیان ژن‌های نوروتروفیک در سه گروه سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از SVZ، SGZ، و مجرای مرکزی نخاعی به روش RT-PCR تصویر (F) - الکتروفورز RNA کل و مشاهده باندهای ۱۸ S و ۲۸ S، گواه سالم بودن RNA استخراج شده است.

در گزارش Sun و همکاران کشت سلول‌های بنیادی عصبی در محیط دارای سرم موجب تشکیل جمعیتی یک دست از سلول‌های آستروسیتی گردید (۴).

در نتایج حاصل از این پژوهش، سلول‌های کشت داده شده در محیط غنی شده با سرم علاوه بر GFAP که نشانگر اختصاصی آستروسیت‌هاست؛ نشانگر نستین (سلول‌های نوروپیتالیال) را نیز بیان کردند (۱۴ و ۲۰). در پژوهش حاضر سعی شد ویژگی‌های این سلول‌ها با یکدیگر مقایسه گردد. بررسی‌های صورت گرفته نشان داده صرف نظر از تفاوت در معماری سلولی نواحی مختلف، الگوی مشابهی بین خصوصیات مورفولوژیکی و عملکردی نواحی مختلف نوروتنیک وجود دارد (۲۱). بررسی مورفولوژیکی سلول‌های برداشت شده از SVZ، SGZ، و مجرای مرکزی نخاعی وجود این الگوی مشابه را تأیید می‌کند. پس از پاساژ دوم، سلول‌ها ظاهری یک دست یافتند. زمان دو برابر شدن، از معیارهایی است که برای ارزیابی و مقایسه توان تکثیری سلول‌های بنیادی، از جمله سلول‌های بنیادی عصبی استفاده می‌شود (۲۲ و ۲۳). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ متوسط زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی عصبی جوندگان، در شرایط کشت نوروسفری را ۲۰ ساعت گزارش کردند (۲۳). پیش از این در سال ۲۰۰۶ Pollock و همکاران این زمان را برای سلول‌های بنیادی عصبی انسان ۵۰ تا ۶۰ ساعت گزارش کرده بودند (۲۴). در سال ۲۰۱۱ Pu و همکاران گزارش کردند که زمان دو برابر شدن در سلول‌های بنیادی عصبی موش در کشت اولیه حدود ۶۰ ساعت و در رده سلولی همین گونه موش، حدود ۲۸ ساعت است (۲۵). گزارشی مبنی بر مقایسه زمان دو برابر شدن سلول‌های برداشت شده از نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی تا زمان نگارش این مطالعه یافت نشد.

عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن‌ها در گروه‌های مختلف مشاهده نشد. نتایج نشان داد که ژن‌ها در هر سه گروه آزمایشی الگوی بیان تقریباً مشابهی دارند. سالم بودن RNA کل با الکتروفورز و مشاهده باندهای ۱۸ S و ۲۸ S تأیید شد (شکل ۴ F). از بافت مغز نیز برای کنترل مثبت استفاده شد. ژن‌های موردنظر در سلول‌های برداشت شده از هر سه محل، الگوی بیان تقریباً مشابهی دارند (شکل ۴ E).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی در محیط α -MEM و در حضور سرم به شکل چسبیده به کف، قابل کشت هستند. همچنین سلول‌های برداشت شده از سه ناحیه، نستین و GFAP را بیان می‌کنند. در میان سلول‌های برداشت شده از سه ناحیه SVZ، SGZ، و کانال نخاعی، سلول‌های SVZ کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن (۳۷/۴۵ ساعت) و سلول‌های مجرای مرکزی نخاع طولانی‌ترین زمان دو برابر شدن (۵۷/۲۲ ساعت) را دارند. سلول‌های بنیادی عصبی برداشت شده از هر سه ناحیه، عوامل نوروتروفیک *NGF*، *CNTF*، *NT3*، *NT4/5*، *GDNF* و *BDNF* را با الگوی مشابهی بیان می‌کنند.

در این تحقیق از محیط α -MEM غنی شده با سرم، برای کشت NSC استفاده گردید. سرم موجود در محیط، شرایط را برای چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک فراهم می‌کند. ترکیبات موجود در سرم دارای مولکول‌های اتصال است که چسبیدن سلول را به سوبسترا تسهیل می‌کند (۱۲). Sun و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که حذف عوامل رشد موجب تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به نورو و آستروسیت می‌شود (۴). Weiss و Reynolds نیز حضور EGF را برای کشت سلول‌های بنیادی عصبی ضروری دانستند (۵).

در میان عوامل ارزیابی شده NT3 کمتر و BDNF و GDNF بیشتر از سایر عوامل در سطح mRNA بیان گردیدند. BDNF یکی از عوامل نوروتروفیک مهم است که در نورون‌زایی، تسهیل فعالیت نورون‌ها، ارتباطات سیناپس و پلاستیسیته سیناپسی نقش قابل توجهی دارد (۳۱ و ۳۳).

در سال ۲۰۰۹ Zhang و همکاران گزارش کردند که NGF، GDNF و BDNF از حیات نورون‌ها حمایت کرده و مانع از آپاتوز این سلول‌ها می‌گردند (۳۴). در سال ۲۰۰۸ Johnson و همکاران گزارش کردند که پس از ایجاد آسیب در سیستم عصبی، سلول‌های گلیالی مانند سلول‌های شوان، عوامل نوروتروفیکی چون NGF، CNTF، NT3، BDNF و GDNF را ترشح کرده و بدین ترتیب رشد و ترمیم آکسونی را القا می‌کنند (۳۲). همچنین BDNF هم به صورت طبیعی و هم در شرایط کشت بر مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز در ناحیه SVZ اثر می‌گذارند (۳۵). استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ برای پیوند و تمایز این سلول‌ها به نورون در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌های درمانی مطرح است (۳۶ و ۳۷). انتخاب نوع سلول بنیادی و شرایط کشت برای درمان بیماری‌های دستگاه عصبی تعیین کننده است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی جدا شده از نواحی مختلف سیستم عصبی مشابه بود؛ ولی سلول‌های بنیادی جدا شده از ناحیه SVZ دارای ظرفیت تکثیری بالاتری بودند. سلول‌های بنیادی عصبی به دلیل قابلیت خود تکثیری و ظرفیت تمایزی و نیز بیان عوامل نوروتروفیک، می‌توانند کاندید مناسبی برای پیوند باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم ناهیتا سلطانیان برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش بافت‌شناسی و جنین‌شناسی از دانشگاه دامغان بود. از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

References

1. Billauer-Haimovitch H, Slotkin TA, Dotan S, Langford R, Pinkas A, Yanai J. Reversal of chlorpyrifos neurobehavioral teratogenicity in mice by nicotine administration and neural stem cell transplantation. *Behav Brain Res.* 2009 Dec;205(2):499-504.
2. Brekke C, Williams SC, Price J, Thorsen F, Modo M. Cellular multiparametric MRI of neural stem cell therapy in a rat glioma model. *Neuroimage.* 2007 Sep;37(3):769-82.
3. Liu X, Wang Y, Li D, Ju X. Transplantation of rat neural stem cells reduces stereotypic behaviors in rats after intrastriatal microinfusion of Tourette syndrome sera. *Behav Brain Res.* 2008 Jan;186(1):84-90.

در مطالعه حاضر کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن به سلول‌های برداشت شده از SVZ تعلق داشت و طولانی‌ترین زمان دو برابر شدن به سلول‌های برداشت شده از مجرای مرکزی نخاع مربوط بود. با توجه به این که سلول‌های اپاندیمال مجرای نخاعی تنها در شرایط آسیب تقسیم می‌شوند و سلول‌های گلیالی ایجاد می‌کنند و حضور سلول‌های بیان‌کننده نستین در مناطق مختلف نخاع بسیار پراکنده و محدود است؛ پتانسیل تقسیم و تمایز محدودتری از سلول‌های برداشت شده از این ناحیه انتظار می‌رود (۲۶ و ۲۷).

در خصوص نشانگر مورد استفاده برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی اتفاق نظر وجود ندارد (۲۸). از نشانگرهایی که برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده می‌شوند؛ پروتئین رشته‌ای نستین و پروتئینی متصل شونده به RNA به نام Musashi است. برخی نشانگرها که در دوران جنینی بیان می‌شوند (مانند نستین و Musashi) در دوران بزرگسالی نیز در سلول‌های پیش‌ساز عصبی بیان می‌شوند. علاوه بر این پروتئین رشته‌ای GFAP نیز در سلول‌های بنیادی پیش‌ساز بزرگسالان بیان می‌شود (۲۹). در پژوهش حاضر برای تعیین هویت سلول‌های برداشت شده از سه ناحیه مختلف از دو نشانگر نستین و GFAP استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان بیان این دو پروتئین در سلول‌های برداشت شده از نواحی مختلف چندان متفاوت نیست.

عوامل نوروتروفیک، پپتیدهایی ترشحی از خانواده سیتوکین‌ها هستند که در تکوین سیستم عصبی مرکزی، رشد آکسونی، تشکیل سیناپس، حفظ حیات نورون‌ها و حمایت از بقای سلول‌های پیوند زده شده به سیستم عصبی مرکزی نقش موثری ایفا می‌کنند (۳۰-۳۲). در این پژوهش بیان عوامل نوروتروفیک NGF، CNTF، BDNF و GDNF، NT4/5، NT3 در بین سه گروه به صورت نیمه کمی مقایسه گردید. گزارشی مبنی بر سنجش همزمان این عوامل به نحوی که در این پژوهش صورت گرفته است و مقایسه بیان آنان در سلول‌های بنیادی عصبی برداشت شده از نقاط مختلف سیستم عصبی مرکزی تا زمان نگارش این مطالعه گزارش نشده است. تمام عوامل سنجدیده شده در تمام گروه‌های آزمایشی بیان شدند و الگوی بیان تقریباً مشابهی داشتند.

4. Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci.* 2008 Jun; 38(2):245-58.
5. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 1996 Apr;175(1):1-13.
6. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-50.
7. Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb*

Cortex. 2006 Jul;16(Suppl 1):i12-20.

8. Lindley RM, Hawcutt DB, Connell MG, Edgar DH, Kenny SE. Properties of secondary and tertiary human enteric nervous system neurospheres. *J Pediatr Surg*. 2009 Jun;44(6):1249-55.

9. Lum M, Croze E, Wagner C, McLenachan S, Mitrovic B, Turnley AM. Inhibition of neurosphere proliferation by IFN γ but not IFN β is coupled to neuronal differentiation. *J Neuroimmunol*. 2009; 206(1-2): 32-8.

10. Meissner KK, Kirkham DL, Doering LC. Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson's. *Brain Res*. 2005 Sep;1057(1-2):105-12.

11. Machon O, Backman M, Krauss S, Kozmik Z. The cellular fate of cortical progenitors is not maintained in neurosphere cultures. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Nov;30(3):388-97.

12. Ray J, Gage FH. Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Mar;31(3):560-73.

13. Ahmed S. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem*. 2009 Jan;106(1):1-6.

14. Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR, Aumont A, Fernandes KJ. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*. 2009 Dec;164(3):1044-56.

15. Chiou SH, Chen SJ, Peng CH, Chang YL, Ku HH, Hsu WM, et al. Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May; 343(2):391-400.

16. McLenachan S, Lum MG, Waters MJ, Turnley AM. Growth hormone promotes proliferation of adult neurosphere cultures. *Growth Horm IGF Res*. 2009 Jun;19(3):212-8.

17. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res*. 2007 Feb;32(2):353-62.

18. Ishido M, Suzuki J. Inhibition by rotenone of mesencephalic neural stem-cell migration in a neurosphere assay in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2010 Mar;24(2):552-7.

19. Davis JM. *Basic Cell Culture*. 2nd. New York: Oxford University Press. 2002; pp:162-70.

20. Shanley DK, Sullivan AM. Alterations in cellular phenotypes differentiating from embryonic rat brain neurosphere cultures by immunoselection of neuronal progenitors. *Brain Res*. 2006 Jan; 1067(1):85-94.

21. Bonfanti L, Peretto P. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol*. 2007 Sep; 83(1):24-36.

22. Gobbel GT, Choi SJ, Beier S, Niranjana A. Long-term cultivation of multipotential neural stem cells from adult rat subependyma. *Brain Res*. 2003 Aug;980(2):221-32.

23. Wang TY, Sen A, Behie LA, Kallos MS. Dynamic behavior of cells within neurospheres in expanding populations of neural precursors. *Brain Res*. 2006 Aug;1107(1):82-96.

24. Pollock K, Stroemer P, Patel S, Stevanato L, Hope A, Miljan E, et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol*. 2006 May;199(1):143-55.

25. Pu K, Li SY, Gao Y, Ma L, Ma W, Liu Y. Bystander effect in suicide gene therapy using immortalized neural stem cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene on medulloblastoma regression. *Brain Res*. 2011 Jan;1369:245-52.

26. Farrell BC, Power EM, Mc Dermott KW. Developmentally regulated expression of Sox9 and microRNAs 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *Int J Dev Neurosci*. 2011 Feb;29(1):31-6.

27. Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner LM, Märki D, Büchmann-Møller S, et al. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol*. 2007 Apr; 304(1):394-408.

28. Williams C, Wirta V, Meletis K, Wikström L, Carlsson L, Frisén J, et al. Catalog of gene expression in adult neural stem cells and their in vivo microenvironment. *Exp Cell Res*. 2006 Jun; 312(10):1798-812.

29. Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L. Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res*. 2003 Nov-Dec;34(6):572-88.

30. Leng J, Jiang L, Chen H, Zhang X. Brain-derived neurotrophic factor and electrophysiological properties of voltage-gated ion channels during neuronal stem cell development. *Brain Res*. 2009 May; 1272:14-24.

31. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2003 Jun; 181(2):115-29.

32. Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. *Injury*. 2008 Sep; 39(Suppl 3): S37-42.

33. Chaturvedi RK, Shukla S, Seth K, Agrawal AK. Zuckerkandl's organ improves long-term survival and function of neural stem cell derived dopaminergic neurons in Parkinsonian rats. *Exp Neurol*. 2008 Apr; 210(2):608-23.

34. Zhang J, Brodie C, Li Y, Zheng X, Roberts C, Lu M, et al. Bone marrow stromal cell therapy reduces proNGF and p75 expression in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci*. 2009 Apr; 279(1-2):30-8.

35. Petridis AK, El Maarouf A. Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb. *J Clin Neurosci*. 2011 Feb; 18(2):265-70.

36. Abdanipour A, Tiraihi T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer. *Brain Res*. 2012 Feb;1440:23-33.

37. Wang Y, Zhao Z, Ren Z, Zhao B, Zhang L, Chen J, et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2012 Apr; 514(1):96-101.

Original Paper

Comparison of the proliferation potential and neurotrophic factors expression in the adherent neural stem cells culture of the Subgranular, Subventricular zone and the central canal of the spinal cord of the adult rats

Soltanian A (MSc)¹, Ghorbanian MT (PhD)^{*2}, Lashkarbolouki T (PhD)²

¹MSc in Biology (Histology and Embryology), Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ²Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Degeneration of neurons in the central nervous system occurs during aging. Transplantation of neural stem cells (NSCs) can be preventing the degeneration of neurons. In addition to neuronal replacement, with the production of neurotrophic factors, increased survival and proliferation of endogenous cells. This study was done to compare the cell proliferation, neurotrophic factors expression and features of NSCs harvested from different areas of the central nervous system in vitro.

Materials and Methods: In this laboratory study NSCs have been harvested from subgranular zone (SGZ), subventricular zone (SVZ) and central canal of spinal cord from adult Wistar rats with mechanical, enzymatical digestion and subsequently was cultured in α -MEM medium supplemented with serum as monolayer or adherent conditions and passaged for 13 times. Immunocytochemistry was used to determine expression of the nestin and GFAP markers. Semi-quantitative RT-PCR was used to confirm genes expression (NGF, CNTF, NT3, NT4/5, GDNF and BDNF).

Results: Morphological features of stem cells extracted from different regions of the central nervous system were similar in the culture. Doubling time NSCs in the SVZ (37.45 hr) is shorter than in the SGZ (44.04 hr) and central canal of spinal cord (57.22 hr). The culture conditions as well as monolayer neural stem cells are capable of producing neurospheres. Also, nestin and GFAP markers, expressed by NSCs. Neurotrophic gene expression pattern profiles were similar to each other in stem cells extracted from the SGZ, SVZ and central canal of spinal cord.

Conclusion: Neurotrophic gene expression in stem cells extracted from different regions of the central nervous system were similar, but proliferation capacity was higher in NSCs, which have been harvested from the SVZ.

Keywords: Neural stem cells, SGZ, SVZ, Central canal of spinal cord, Adherent culture

* Corresponding Author: Ghorbanian MT (PhD), E-mail: ghorbanian@du.ac.ir

Received 26 June 2012 Revised 8 December 2012 Accepted 26 February 2013