مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره یازدهم، شمارهٔ ۵، آذر – دی ۱۳۸۸، صفحه ۱۵-۷

بررسی اثر حمایتی لایه های مختلف تغذیه کننده بر روی سلول های بنیادی جنینی موش

علیرضا شمس (PhD)*[۱]، نسیم فرقانی (MSc)[۲]، فرشته آقائی (MSc)[۳]، پریچهر یغمائی (PhD)[۲]، عبدالرحمن رحیمیان (MSc)[۴]

۱- گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
۳- گروه آموزش های آزاد وزارت علوم و تحقیقات و فناوری
۴- دانشگاه محقق اردبیلی

دریافت: ۸۷/۱۱/۲۰ ، اصلاح: ۸۸/۲/۲۳، پذیرش: ۸۸/۷/۸

خلاصه

سابقه و هدف: کاربرد سلول های بنیادی در تحقیقات پزشکی و درمان افق جدیدی در بهبود بسیاری از بیماری ها ایجاد کرده است. لذا روش هایی که موجب جداسازی، کشت و نگاهداری بهتر این سلولها گردد، دارای اهمیت ویژه ای می باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر حمایتی سه لایه تغذیه کننده سلول های فیبروبلاستی جنینی (MEF)، سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) و رده سلولی 3T3 در جداسازی و کشت سلول های بنیادی جنینی جهت افزایش بقا و تعداد سلول ها می باشد.

مواد و روشها: جهت تهیه سلول های بنیادی جنینی از موش نژاد Balb/c بلاستوسیست گرفته شد. سلولها بر روی لایه های MEF، MSC و3T3 قرار داده شد. ۲ تا ۳روز بعد سلولها از زونا پلوسیدا خارج شدند و ۵ روز پس از رشد توده سلولی داخلی، توده های مذکور تریپسینه و به خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل شدند. سپس کلونی های تشکیل شده بر روی هر لایه کشت شدند. در نهایت کلونی ها از نظر تعداد و ویژگی های مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز مقایسه شدند.

یافته ها: از ۲۹ جنین قرار داده بر روی لایه MEF همگی به لایه مذکور متصل شدند و همگی (۱۰۰٪) خروج از لایه زونا و رشد را انجام دادند. از ۳۲ جنین بر روی لایهMSC (۶۴/۵٪) چسبیده و رشد کردند. اتصال ۲۰ جنین روی لایه 3T3 اتصالی کم بود و هیچ کدام به مرحله رشد توده سلولی داخلی نرسیدند. نسبت درصد خروج از زونا و میزان زنده ماندن بلاستوسیست ها بر روی سه لایه اختلاف معنی داری را نشان داد ($p<0/05$) بطوریکه بیشترین نتیجه و نقش حمایتی مربوط به لایه MEF بود.

نتیجه گیری: نتایج این ۳ لایه تغذیه کننده سلولهای بنیادی جنینی نشان داد که لایه MEF از MSC بهتر و هر دو نسبت به لایه 3T3 در حمایت و پشتیبانی سلولهای بنیادی برتری دارند.

واژه های کلیدی: ***سلول های بنیادی جنینی، لایه تغذیه کننده، الکالین فسفاتاز، سلولهای بنیادی مزانشیال، فیبروبلاست جنسی موش، 3T3***

مقدمه

کاربرد سلول ها بنیادی در تحقیقات پزشکی و درمان به صورت جایگزینی، افق جدیدی در درمان نواقص استخوانی و غضروفی ناشی از بیماری های اسکلتی و بیماری های تحلیل برنده عصبی مانند پارکینسون ایجاد نموده است (۳-۱). سلول های بنیادی به علت ویژگی های منحصر به فرد خود قادر هستند به انواع متفاوت رده های سلولی مانند عصبی، عضلانی، پوششی و... تبدیل شوند (۵و۴). اولین بار در سال ۱۹۸۱، سلول های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells, ES) حیوانی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست موش بدست آمد (۶). Thomson و همکاران تولید سلولهای بنیادی جنینی انسان را گزارش کردند (۷). سلول های بنیادی جنینی قادر به تقسیم مجدد می باشند و تحت تاثیر برخی عوامل مانند فاکتورهای رشد، اسید اسکوربیک، رتینوییک اسید و یا هورمون ها می توانند به انواع متفاوت رده های سلولی مانند سلول های اندوتلیال، نورو اپی تلیال، خون ساز، عضلانی و یا سلولهای دیگر تمایز یابند (۸و۴). لایه تغذیه کننده یکی از مهم ترین فاکتور های تأثیر گذار در کشت سلولهای بنیادی جنینی است. بسیاری از محققین گزارش

▣ مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مشترک شماره ۶ م ت و حاصل پایان نامه نسیم فرقانی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد تهران می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه آناتومی، تلفن: ۰۲۸۱-۳۳۳۶۰۰۱
e-mail: arshams_2000@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

کردند که لایه تغذیه کننده می تواند بعضی از انواع سیتوکین ها مانند LIF را ترشح نماید که این امر می تواند رشد سلولهای بنیادی جنینی را تحریک و از تمایز آنها جلوگیری نماید. در کشت سلولهای بنیادی جنینی معمولاً از لایه تغذیه کننده استفاده می شود تا آنها را در حالت پر توانی و غیر تمایزی نگه دارد، بطوریکه یکی از مهمترین فاکتورهای تاثیرگذار در کشت سلولهای بنیادی جنینی است. ترکیبات مختلفی معمولاً به عنوان مکمل برای کشت سلولهای بنیادی جنینی، از جمله ترکیبات LIF و (recombinant human growth factor basic, rh –bFGF) وجود دارند اما بعضی از محققین تنها از لایه تغذیه کننده، استفاده کرده و هیچ سیتوکاین خارجی به محیط ES اضافه نکرده اند (۹). Martin با استفاده از محیط رویی (Condition media) رده سلولی تراتوکارسینوما به عنوان لایه تغذیه کننده توانست سلول های بنیادی جنینی موش را بدست آورد (۱۰). محققین دیگر از محیط رویی سلول های STO (یک رده نامیرا از فیبروبلاست های موشی)، سلول های کبدی رت (Buffalo rat liver) سلول های قلبی (rat myocardial) به عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول های بنیادی جنینی یا سلول های کارسینومای جنینی استفاده کردند (۱۲و۱۱). گروهی دیگر LIF وbFGF به محیط کشت اضافه و از لایه تغذیه کننده سلولی هم استفاده کردند (۱۳). با تکثیرICM بر روی سلولهای تغذیه کننده و پاساژ آنها، کلونی هایی تشکیل میشود که می توان آنها را برای مدت طولانی کشت داد و یا منجمد کرد تا در یک شرایط مطلوب حالت غیر تمایزی و کاریوتیپ خود را برای سالها حفظ کنند (۱۶-۱۴). در بسیاری از تحقیقات روتین از فیبروبلاست جنین موش (Fibroblast Mouse Embryonig, MEF) به عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول های بنیادی جنینی استفاده می شود (۷و۶و۴). سلول های استرومایی، سایتوکاین ها و مواد با وزن ملکولی پایین را که برای تکثیر و تمایز پیش سازهای خونی مورد نیاز هستند، تولید می نمایند، ماتریکس خارج سلولی نیز شرایطی فراهم می سازد تا تماس های مستقیم سلول به سلول بین انواع سلولهای موجود در مغز استخوان به سهولت انجام گیرد. علاوه بر سایتوکاینهای ترشحی، ثابت شده که برخی سایتوکاینها بر روی غشاء سلول های استرومایی وجود دارند و یا به ماتریکس خارج سلولی متصل هستند. این یافته ها نقش سایتوکاینها که به صورت واسطه های پاراکرینی اعمال می شود را تایید می کند (۱۷). بعضی از محققین تمایز سلول های بنیادی جنینی در محیط درون شیشه (in vitro) را به همه زیر مجموعه های خونی مانند اریتروئیدها، میلوئیدها، لنفوسیت ها و مگاکاریوسیت ها نشان داده اند (۲۰-۱۸). Nakano و همکاران، با رشد و هم کشتی سلول های بنیادی جنینی بر روی لایه تغذیه کننده مشتق از مغز استخوان رت(Mesenchymal Stem Cell, MSC) بدست آمدن سلولهای خونی را گزارش کردند (۱۸). رده سلولی 3T3 لایه تغذیه کننده دیگری است که از حدود ۳۰ سال پیش جهت تغذیه انواع سلول های کشت شده، استفاده می گردید. اخیراً محققین متوجه شدند که شکل گیری کلونی های سلولی از کراتینوسیت های اپیدرمال انسانی در هم کشتی با استفاده از این نوع لایه تغذیه کننده بهتر و مطلوب تر انجام می شود و استفاده از این لایه منجر به کاربردهای کلینیکی اپیدرم های کشت شده برای افراد با سوختگی پوست گردیده است (۲۳-۲۱). در بعضی از تحقیقات نیز از سلول های 3T3 به عنوان لایه تغذیه کننده برای هم کشتی با انواع سلول های مختلف مانند سلول های اپی تلیال پوستی و قرنیه استفاده شده است (۲۵و۲۴). با توجه به نقش روز افزون سلول های بنیادی و به ویژه نوع جنینی در روند تحقیقات پزشکی و کاربرد متفاوت آنها در درمان و جایگزینی سلولها در بیماری های مختلف، هدف از این تحقیق مطالعه اثر حمایتی سه لایه تغذیه کننده MEF سلولهای رده MSC و رده سلولی فیبروبلاستی 3T3 در جدا سازی و کشت سلول های بنیادی جنینی موش است. همچنین در این مطالعه نقش حمایتی این سه لایه در بقای سلول های بنیادی جنینی مقایسه شد تا بتوان در تحقیقات پزشکی و کاربردی بعدی از نتایج آنها استفاده کرد.

مواد و روشها

روش تهیه فیبروبلاست جنین موش (MEF): برای تهیه رده MEF بصورت کشت اولیه، از ۱۰ سر موش ماده نژاد Balb/c در روزهای ۱۴-۱۲ حاملگی استفاده گردید. ابتدا موش های باردار به روش قطع نخاع کشته شدند و جنین ها از رحم خارج گردیدند. پس از دوبار شستشو درPBS احشای جنین شامل سر و کبد جدا و مجددا شستشو و تریپسینه شدند. نمونه ها به ابعاد کوچک خرد و به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید (۲۶). مخلوط سلولی به محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) منتقل گردید. سپس ظروف حاوی سلول در انکوباتور ۳۷ درجه با Co_2 ۵٪ قرار گرفت. بعد از ۲ تا ۴ پاساژ از سلول های حاصل به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده شد (۲۸و۲۷).

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت(MSC): ۵ راس رت، با وزن حدود ۱۵۰ تا۲۰۰ گرم با استفاده از کلروفرم بیهوش و کشته شدند. محتویات مغز استخوان فمور به روش فلاشینگ و با محیط DMEM گرفته شد. سپس مخلوط به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۴۰۰rpm سانتریفیوژ و سلولها در فلاسک حاوی محیط DMEM و سرم (FBS)۱۰٪ کشت شد تا پر کردن سطح ظرف با سلولها هر روز محیط کشت تعویض گردید. پاساژ سلولی با استفاده از PBS حاوی تریپسین ۰/۰۵٪ و EDTA ۰/۰۲٪ صورت گرفت و از پاساژ چهارم به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده شد (۲۹و۸).

کشت رده سلولی فیبروبلاستی 3T3: رده سلولی3T3 از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری شد. این رده سلولی از بافتهای جنینی Swiss NIH mouse بدست آمده و از لحاظ ظاهر شبیه فیبروبلاست هستند (۳۰). سلولهای رده 3T3 در ظروف کشت سلول حاوی DMEM با ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شد. سپس از سلولهای به دست آمده از پاساژهای سوم یا چهارم به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده گردید (۳۱).

تهیه جنین در مرحله بلاستوسیست: برای تهیه جنین در مرحله بلاستوسیست از موشهای Balb/c ۸ تا۱۰ هفته ای استفاده شد. به منظور تحریک تخمک گذاری در موش های ماده، ۱۰ واحد هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) و پس از ۴۸ ساعت ۱۰ واحد هورمون (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) داخل صفاقی تزریق شد. پس از جفت گیری و بررسی پلاک واژن جهت زمان بارداری موشها با جابجایی مهره های گردنی ۴ روز بعد کشته شدند. سپس با روش فلاشینگ (Flushing) جنینهای بلاستوسیست خارج شده و پس از شناسایی، داخل ظروفی که با سلولهای

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

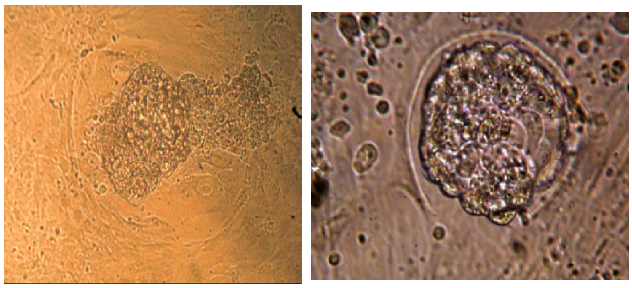
MEF، MSC و 3T3 پوشیده شده بود، انتقال یافتند (۳۲).

جدا کردن توده سلولی داخلی و پاساژ آنها: بلاستوسیست ها ۲ تا ۳ روز بعد از قرار گرفتن بر روی لایه تغذیه کننده از لایه زونا پلوسیدا خارج و بوسیله سلولهای تروفو اکتودرمی به لایه تغذیه کننده چسبیدند. بلاستوسیستهای خارج شده از لایه زونا پلوسیدا پس از عمل خروج یا هچینگ (hatching)، در طی ۴ تا ۵ روز به اندازه کافی بر روی لایه تغذیه کننده، رشد کردند. به طوری که سلول های تروفو اکتودرمی در سطح شروع به رشد کردند. ولی سلولهای توده داخلی سلولی (Inner Cell Mass, ICM) به صورت سه بعدی و گنبدی شکل تکثیر یافتند. سپس توسط روش مکانیکی و به کمک پیپت دهانیICM را از سلولهای تروفو اکتودرمی جدا کرده و بر روی قطرات دو درصد و پنج درصد محیط Trypsin/EDTA گذاشته و چندین بار با کمک پیپت مخلوط شدند تا توده سلولی به سلولهای منفرد و خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل شود. سپس با FBS سلول ها شتشو شدند (۳۲). به منظور رشد و تکثیر و بررسی تشکیل کلونی، سلولهای منفرد شده و خوشه های کوچک چند سلولی بر روی سلول های تغذیه کننده قرار داده شد، که این اولین پاساژ محسوب شد. بعد از چند روز دوباره کلونی هایی تشکیل شد و باز هم پاساژ داده شدند (۲۷و۱).

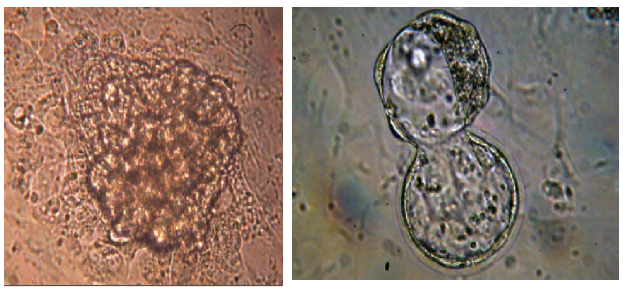
رنگ امیزی سلول های بنیادی با استفاده از روش بیان فعالیت آلکالین فسفاتاز(AP): بیان فعالیت آلکالین فسفاتاز در کلونی های سلول های بنیادی(ES) با رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز تعیین شد (۳۵-۳۳). جهت این کار سلول ها از محیط کشت خارج گردیده و با پارا فرم آلدیید (Para formaldehyde) یک درصد و محلول سوکروز هفت و نیم درصد (w/v) (Sucrose) ثابت شدند. سپس سلول ها سه بار در صد میلی مولار محلول تریس بوفر (Tris-Hcl) با PH9.5 و 50mM , 50mMNaCl, MgCL2, .01%Tween-20) هر ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند (۳۶و۲۹). جهت رنگ آمیزی از دو نوع محلول A حاوی ۷۵ میلی گرم نمک نیترو بلو تترزولیوم (nitroblue tetrazolium) در ۷۰٪ دی متیل فرمالدئید (Amresco) و محلول B شامل ۵۰ میلی گرم در میکرولیتر نمک 5-bromo-4-chloro-3-indoly phatetoluicinium از شرکت سیگما در دی متیل فورموماید(DMF ۱۰۰٪) استفاده گردید. در هنگام رنگ آمیزی سلولهای بنیادی ارغوانی- آبی شدند(۱۶ و ۲۸). در تجزیه و تحلیل داده ها از روش غیر پارامتریک استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

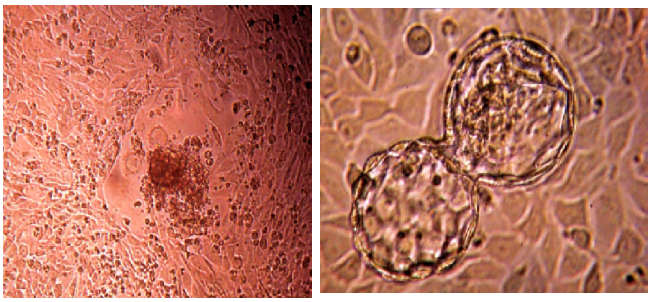
بعد از کشت و آماده سازی ۳ لایه تغذیه کننده شامل جداسازی و کشت فیبروبلاست جنینی موش (شکل ۱ الف)، جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان فمور رت (شکل ۱ ب) و کشت رده سلولی3T3 (شکل ۱- ج) و بدست آوردن جنین های بلاستوسیست از موش های نژاد Balb/c و قرار دادن آنها بر روی لایه های تغذیه کننده، از ۲۹ بلاستوسیستی که بر روی لایه تغذیه کننده MEF قرار داده شد ۱۰۰٪ آنها از لایه زونا خارج و همگی رشد خوبی را بر روی لایه تغذیه کننده نشان دادند. رشد این سلول ها به مدت ۵ روز پس از خروج از لایه زو نا پلوسیدا ادامه یافت. ۳۲ بلاستوسیست نیز بر روی لایه تغذیه کننده MSC قرار گرفت و ۹۶٪ بلاستوسیست ها هچینگ را انجام دادند ولی از این تعداد ۳۵/۴٪ آنها پس از خروج از لایه زونا رشدی را نشان ندادند و مردند. از ۲۰ بلاستوسیست قرار گرفته روی لایه تغذیه کننده 3T3 تنها ۶۵٪ از بلاستوسیست ها عمل هچینگ را نشان دادند اما هیچ کدام به مرحله رشد نرسیدند و ۱۰۰٪ بلاستوسیست ها مردند (نمودار ۱و ۲). سلولها بر روی لایه تغذیه کننده MEF و MSC پس از گذشت ۲ روز لایه زونا را پاره کرده و خارج شدند در حالیکه جنین های واقع بر روی لایه تغذیه کننده 3T3 بهترین میزان هچینگ را در روز ۳ کشت نشان دادند (جدول۱). در بین سه لایه از لحاظ قرار گیری بلاستوسیست اختلاف معنی داری وجود نداشت ولی در تعداد آزاد شدن بلاستوسیست ها و مدت زمان هچینگ و تعداد بلاستوسیست های چسبیده به لایه تغذیه کننده و میزان زنده ماندن شان اختلاف معنی داری وجود داشت ($p<0/05$). این اختلاف در مورد لایه MEF نسبت به سایر لایه های MSC و 3T3 واضح و مشخص بود (نمودار ۱).



شکل یک- الف چگونگی خروج بلاستوسیست را از لایه زونا پلوسیدا را ۲ روز پس از کشت و رشد توده سلولی داخلی را ۵ روز پس از خروج زونا پلوسیدا بر روی MSC بر روی لایه تغذیه کننده MSC نشان میدهد (بزرگنمایی۲۵X).



شکل یک- ب خروج از زونا پلوسیدا را ۲ روز پس از کشت و رشد توده سلولی داخلی را ۵ روز پس از خروج زونا پلوسیدا بر روی لایه MEF نشان می دهد.

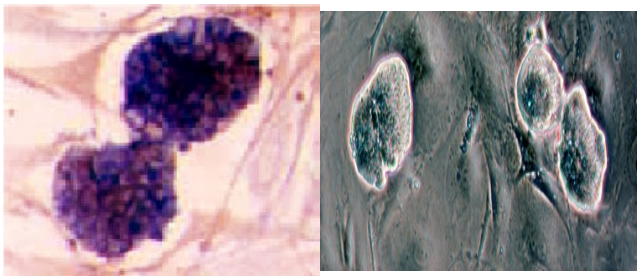


شکل یک- ج خروج از زونا را ۳ روز پس از کشت بر روی لایه 3T3 و مرگ توده سلولی را پس از خروج زونا پلوسیدا بر روی 3T3 نشان میدهد. (بزرگنمایی۱۰X)

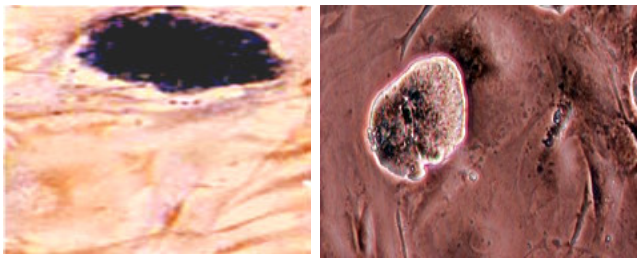
[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

کشت بلاستوسیست ها: پس از اینکه جنین ها ناحیه زونا را پاره کرده و خارج شدند، به لایه تغذیه کننده چسبیدند و شروع به رشد کردند. به مدت ۷ روز رشد سلول های مذکور بر روی لایه تغذیه کننده بررسی و ادامه یافت (جدول ۱).

کشت توده سلولی داخلی: پس از رشد بلاستوسیست ها بر روی لایه های تغذیه کننده MEF و MSC توده سلولی داخلی به کمک تریپسین ۲/۵٪ به سلول های منفرد و یا خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل شدند و مجددا بر روی لایه های تغذیه کننده قرار گرفتند. یکبار هم توده سلولی داخلی به صورت کامل کشت داده شد. عمل جداسازی توده سلولی داخلی و پاساژ در مورد بلاستوسیست های لایه تغذیه کننده 3T3 صورت نگرفت، چون هیچ کدام از آنها به مرحله رشد بر روی لایه تغذیه کننده 3T3 نرسیدند (شکل۱ الف، ب و ج). بعد از ۲-۳ روز که توده سلولی داخلی به خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل شده بود، شاهد تشکیل کلونی هایی بودیم که از طریق مورفولوژی و همچنین با رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز شناسایی شدند. تا ۳ پاساژ این عمل تکرار شد که میزان تشکیل کلونی بر روی لایه تغذیه کننده MEF دو برابر بیشتر از MSC بود، بطوریکه میزان و وسعت کلونی های سلولی با استفاده از رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز بر روی لایه MEF بیشتر از لایهMSC بود. اما وقتی توده سلولی داخلی را به صورت کامل بر روی لایه تغذیه کننده قرار دادیم به لایه تغذیه کننده نچسبید و کلونی هم تشکیل نشد. هنگامیکه کلونی ها برای بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز رنگ آمیزی شدند، کلونی های تشکیل شده در ۳ پاساژ، فعالیت آلکالین فسفاتاز مثبت را نشان دادند. (شکل۲ الف و ب).



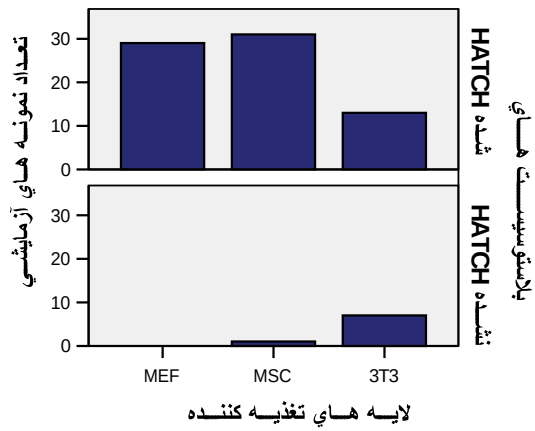
شکل ۲ الف- کلونی های تشکیل شده و بیان الکالین فسفاتاز بر روی رده سلولی MEF را در پاساژ ۳



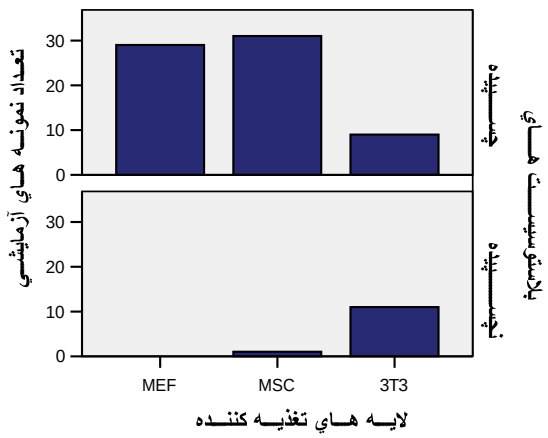
شکل ۲ ب- کلونی های تشکیل شده بر روی MSC و بیان الکالین فسفاتاز را در پاساژ ۳ نشان می دهد. (بزرگنمایی X۲۵)

جدول۱. تعداد بلاستوسیست های قرار گرفته بر روی هر لایه تغذیه کننده و میزان خروج زوناپلوسیدا و میزان زنده ماندن و امکان پاساژ را نشان میدهد.

لایه تغذیه کننده	تعداد کل بلاستوسیست	زمان hatching	درصد hatching	درصد viability	امکان پاساژ	کلونی مورفولوژی	کلونی ALP
MEF	۲۹	2d	٪۱۰۰	٪۱۰۰	+	+	+
MSC	۳۲	2d	٪۹۶	٪۶۴,۵	+	+	+
3T3	۲۰	3d	٪۶۵	٪۰	–	–	–



نمودار ۱. مقایسه تعداد بلاستوسیست های آزاد شده از لایه زونا پلوسیدا (HATCHING) بر روی سه لایه تغذیه کننده مختلف نشان میدهد که لایه 3T3 نسبت به دو لایه دیگر به صورت واضحی کمتر می باشد.



نمودار۲. مقایسه وضعیت بلاستوسیست های چسپیده و نچسپیده روی لایه های تغذیه کننده بعد از آزاد شدن از لایه زونا نشان میدهد که بیشترین میزان اتصال مربوط به لایه MEF می باشد هر چند که تفاوت معنی داری با تعداد ان در لایه MSC دیده نمی شود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که لایه تغذیه کننده MEF در مقایسه با دو لایه تغذیه کننده دیگر دارای بیشترین اثر و نقش حمایتی در تغذیه و بقا و آزاد شدن سلول های بلاستوسیست از لایه زونا پلوسیدا و تشکیل کلونی های سلولی می باشد. نقش حیاتی MEF در کشت طولانی مدت سلول های بنیادی جنینی چندان مشخص نیست. اما به نظر می رسد که سلولهای سازنده لایه MEF محیط مناسب و مفیدی را برای برهم کنش شبکه سیگنالینگ در محیط کشت سلول ها فراهم می کنند تا سرنوشت انها را در رشد و تمایز تنظیم نماید (۳۸و۳۷). اخیرا محققینی که از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت در کشت سلول های بنیادی جنینی استفاده کرده اند، نشان دادند که MSC هم مانندMEF بطور موثری رشد سلول های بنیادی جنینی را حمایت می کند. بطوریکه سلول های بنیادی جنینی کشت یافته تا ۱۵ پاساژ بدون از دست دادن خصوصیات ظاهری و شکل، مارکرهایی مثل آلکالین فسفاتاز و بیان ژن های Oct-4، SSEA1 را در سلولها نشان دادند(۴۰و۳۹). در این مطالعه که از سه رده متفاوت لایه تغذیه کننده برای کشت بلاستوسیست و بررسی میزان تشکیل کلونی استفاده گردید، رده سلولی MEF دارای نتایج بهتری از MSC بود. هرچند که نتایج این دو رده بهتر از سلول های رده 3T3 در محیط کشت بودند. در توضیح رفتار متفاوت این رده ها می توان گفت که توزیع گستردگی و تعداد متفاوت میکروتوبول ها در لایه تغذیه کننده ممکن است عملکرد سلول و حالتهای رفتاری آنها را مشخص نماید. به عبارتی فعالیت ترشحی سلول ها مربوط به میکروتوبول های سلول می باشد. سلول هایی با میکروتوبول های بیشتر، فعالیت ترشحی بیشتری دارند، برای سلول وجود میکروتوبولها برای انتقال سایتوکاینهای ترشحی به مایع خارج سلولی و نهایتا به محیط کشت ضروری است. به نظر میرسد که شاید میزان میکروتوبول های سلولهای رده های MEF و MSC بیشتر از 3T3 باشد که البته این امر نیاز به بررسی های بیشتر در سطح مولکولی در سلول دارد (۳۴). در مقابل گزارش شده که سلولهای لایه 3T3 موش عمدتا در تولید و ترشح هر دو نوع کلاژن تیپIV، لامینین، گلیکوپروتئین های بافت پیوندی فیبروبلاستی، پروکلاژن های بینابینی interestital و فیبرونکتین نقش دارند (۴۲و۴۱).

در این تحقیق میزان بقای بلاستوسیست ها بر روی لایه تغذیه کننده MEF ۱۰۰٪ و بر روی لایه تغذیه کننده 3T3 ۰٪ بود. تمامی بلاستوسیست ها بر روی لایه تغذیه کننده MEF چسبیده و رشد کردند. عده ای از محققین نیز استفاده از لایه های تغذیه کننده را در تکثیر سلولهای بنیادی جنینی انسان بسیار موثر دانسته و آن را ضروری می دانند (۲۸). در مورد لایه تغذیه کننده MSC نتایجی مشابه با MEF بدست آمد ولی در یکسری از بلاستوسیست ها پس از خارج شدن از لایه زو نا، توده سلولی داخلی رشدی را نشان نداد و سلولها مردند. همچنین کلونی هایی که بر روی لایه تغذیه کننده MEF تشکیل می شد بیشتر از میزان تشکیل کلونی بر روی لایه تغذیه کننده MSC در پاساژ های اول تا سوم بود که این کلونی ها با رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز شناسایی شدند و مشخص شد که تمایز نیافته و کلونی های سلول های بنیادی هستند. در هنگام کشت سلولها با لایه3T3، بلاستوسیست ها از زونا پلوسیدا خارج نشده و یا پس از خروج از لایه زونا مردند و هیچ کدام به مرحله جداسازی توده سلولی داخلی نرسیدند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تشکیل کلونی به کیفیت و نوع توده سلولی داخلی بستگی دارد به بیانی دیگر توده سلولی تبدیل شده به خوشه های کوچک چند سلولی قادر به تشکیل کلونی هر چند به تعداد کم بودند اما توده سلولی که بطور کامل بر روی لایه تغذیه کننده قرار گرفت و سلول های منفرد شده، به لایه تغذیه کننده نچسبیدند و در نتیجه کلونی هم تشکیل نشد. به نظر می رسد علت آن ناشی از شرایط کشت آزمایشگاهی و گونه موش باشد. عده ای از محققین نیز تاثیر محیط های متفاوت بر روی رشد سلولهای جنینی مانند اوسیت را بررسی کرده و نتایج متفاوت آن را بیان نموده اند (۴۳). به نظر می آید از نظر تولید فاکتور های رشد و تکثیر و انواع سایتوکین ها این سه رده دارای اثرات متفاوتی حداقل بر روی سلولهای جنینی باشند (۴۵و۴۴و۸). در مقابل استفاده از لایه تغذیه کننده عده ای از محققین معتقدند که در کشت سلولهای بنیادی عدم استفاده از لایه (Feeder –free) بهتر از استفاده از لایه تغذیه کننده است چرا که لایه تغذیه کننده امکان انتقال پاتوژنها را افزایش می دهد و همچنین در حالت feeder-free کلونی های تک لایه با مورفولوژی یکسان تشکیل می شود (۴۷و۴۶). آنها به استفاده از محیط و فاکتورهای مختلف بدون وجود هیچ هم کشتی تمایل دارند (۲۹).

عده ای از محققین قبلاً گزارش کردند که سلولهای بنیادی جنین موش بر خلاف سلولهای بنیادی جنین انسان فقط نیازمندLIF هستند و مستقل از لایه تغذیه کننده می باشند (۴۸). در حالیکه در مطالعه ای که توسط Ming و همکارانش انجام شد، گزارش دادند که بدست آوردن سلولهای بنیادی وابسته به نوع، منبع و کیفیت لایه تغذیه کننده است. آنها بهترین نتایج را در فیبروبلاست جنین موشهای تحریک تخمک گذاری شده و بخصوص در پاساژ های اول بدست آوردند. نتایج آنان نشان داد که تأخیر در پروسه مکانیکی جدا شدن یا هر افزایشی در غلظت تریپسین باعث از بین رفتن شکل گیری کلونی های ES خواهد شد (۳۴). در این تحقیق از میتومایسین C برای متوقف کردن فعالیت میتوزی لایه های تغذیه کننده استفاده نکردیم و تحت یکسری شرایط مناسب نتیجه مطلوبی گرفتیم. عده ای از محققین نیز در روش های کشتی خود با کم کردن میزان مواد مورد نیاز سلولها از جمله اسید های آمینه و یا سرمFBS نتیجه مشابهی گرفتند (۲۸و۲۶). در نهایت می توان گفت که لایه های تغذیه کننده مشتق از فیبروبلاست جنین موش (MEF) و سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت (MSC) می توانند خروج زونا پلوسیدا، رشد، تکثیر، امکان پاساژ و تشکیل کلونی های سلول های بنیادی را تا حدود زیادی حمایت و پشتیبانی نمایند که در این میان نقش MEF شاخص تر از سایر رده ها می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری داده اند، مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر کدیور و مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه دانشگاه علوم پزشکی قزوین تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

Evaluation of Protective Effects of Different Feeder Layers on Mouse Embryonic Stem Cells

A.R. Shams (PhD) [1*], N. Forghani (MSc) [2], F. Aghaee (MSc) [3], P. Yagmaee (PhD) [2], A. Rahimian (MSc) [4]

1. Department of Anatomy, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2. Research Center of Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Open Educations Affairs, Ministry of Research, Technology & High Education
4. Mohaghegh Ardabili University

Received: Feb 10th 2009, Revised: May 13th 2009, Accepted: Sep 30th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Application of stem cells in medical research and treatment has made a new horizon to progress in many disorders. So finding methods for better isolation and culture and maintenance of stem cells (SC) has a specific importance. Aim of this research was to evaluate the protective effects of 3 different layers of mesenchymal stem cells (MSC), mouse embryonic fibroblast (MEF) and 3T3 on Sc for increasing the amounts of cells for transplantation and differentiation.

METHODS: Blastocysts were obtained from 10 Balb/c pregnant mice. Collected embryos were put on 3 different feeder layers of mouse embryonic fibroblast (MEFs), Mesenchymal stem cells (MSC) and 3T3 cell line. Two or 3 days later, the zona pellucida was removed and after 5 days the inner cell mass (ICM) growth, was removed mechanically and changed to small multi-cellular clumps through trypsination. Then formed colonies were cultured on feeder layers. Finally the colonies were identified through staining with alkaline phosphates for their numbers and morphological characteristics.

FINDINGS: From 29 embryos put on MEF layer all t of them (100%) was attached. From 32 embryos put on the MSC layer (64.5%) was attached. While the amount of attaching of 20 blastocysts to the 3T3 feeder layer was low and none of them reach to the growth stage of the inner cell mass. The amount of colonies formation during three passages on MEF feeder layer was more than MSC feeder layer. Data analysis demonstrated a significant difference ($p<0.05$) in percentage and time of hatching and time for living of blastocysts

CONCLUSION: Considering these three feeder layers, MEF was better than MSC and both of them had priority to 3T3.

KEY WORDS: *Embryonic Stem Cells, Feeder Layer, Alkaline phosphates, Mesenchymal stem cells, Mouse embryonic fibroblast, 3T3.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Department of Anatomy, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Boulevard, Qazvin, Iran
Tel: +98 281 3336001
E-mail: arshams_2000@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

References

1. Anjos Afonso F, Bonnet D. Isolation, culture, and differentiation potential of mouse marrow stromal cells. Curr Protoc Stem Cell Biol 2008; Chapter 2: Unit 2B.3.
2. .Laitinen A, Laine J. Isolation of mesenchymal stem cells from human cord blood. Curr Protoc Stem Cell Biol 2007; Chapter 2: Unit 2A.3.
3. Cao QL, Onifer SM, Whittemore SR. Labeling stem cells in vitro for identification of their differentiated phenotypes after grafting into the CNS. Methods Mol Biol 2008; 438: 361-74.
4. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 1998; 336(6200): 688-90.
5. Meissner A, Eminli S, Jaenisch R. Derivation and manipulation of murine embryonic stem cells. Methods Mol Biol 2009; 482: 3-19.
6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1998; 292(5819): 154–6.
7. Thomson JA, Itskovitz Eldor J, Shapiro SS, Wakintz MA, and Swiergel JJ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282(5391): 1154-47.
8. Sytl?k R, Stehl?k D, Soukup T, et al. The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. Biomaterials 2009; 30(20): 3415-27. Epub 2009 Apr 10.
9. Chen LR, Shiue YL, Bertoline L, Medrano JF, Bondurant RH, Anderson GB. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. Theriogenology 1999; 52(2): 195-212.
10. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by terato carcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-8.
11. Smith TA, Hooper ML. Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures. Exp Cell Res 1983; 145(2): 458-62.
12. Tong Y, Zou JH, Shang K. Establishment of a C57BL/6J ES cell line by conditioned media of rat myocardial cells. Acta Sci Nat Univ Pekin 2000; 36(4): 472-6.
13. Piedrahita JA, Gillespie L, Maeda N. Establishing an embryonic stem (ES) cell system utilizing hamster embryos. Biol Reprod 1990; 42(Supple): 175.
14. Baharvand H, Matthaei KI. Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and Balb/c mouse strains. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40(3-4): 76-81.
15. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocysts. Differentiation 2004; 72(5): 224-9.
16. Yang PF, Hua TC, Wu J, Chang ZH, Tsung HC, Cao YL. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling. Cryo Letters 2006; 27(6): 361-8.
17. Audet J, Miller CL, Eaves CJ, Piret JM. Common and distinct features of cytokine effects on hematopoietic stem and progenitor cells revealed by dose-response surface analysis. Biotechnol Bioeng 2002; 80(4): 393-404.
18. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lympo hematopoietic cells from embryonic cells in culture. Science 1994; 265(5175): 1098-101.
19. Li F, Lu S, Vida L, Thomson JA, Honig GR. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. Blood 2001; 98(2): 335-42.
20. Sainteny F. Production of hematopoietic cells from ES cells. J Soc Biol 2001; 195(1): 13-18.
21. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975; 6(3): 331-43.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

22. Germain L, Auger FA. Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, part B; Applications. New York, USA: Marcel Decker Inc. Publishers 1995; pp: 699-734.
23. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Reginald JG. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci1993; 34(9): 2672-9
24. Zhang WH, Sun XF, Kong S, et al. Cultivation and karyotype analysis of the human embryonic stem cells HUES4 2007; 24(3): 275-8. [in Chinese]
25. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. Mol Vis 2006; 12: 65-75.
26. Sun H, Taneja R. Analysis of transformation and tumorigenicity using mouse embryonic fibroblast cells. Methods Mol Biol 2007; 383: 303-10.
27. Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. Nat Protoc 2006; 1(4): 2082-7.
28. Richards M, Bongso A. Propagation of human embryonic stem cells on human feeder cells. Methods Mol Biol 2006; 331: 23-41.
29. Both SK, van der Muijsenberg AJ, van Blitterswijk CA, de Boer J, de Bruijn JD. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. Tissue Eng 2007; 13(1): 3-9.
30. Rittling SR. Clonal nature of spontaneously immortalized 3T3 cells. Exp Cell Res 1996; 229(1): 7-13.
31. Hayashi K, Sasaki K, Asada S, et al. Technical modification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay: the use of serum-reduced medium to optimise the practicability of the protocol. Altern Lab Anim 2008; 36(6): 653-65.
32. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. Nat Protoc 2007; 2(8): 1963-72.
33. Tavolini IM, Bettella A, Boscolo Berto R, et al. Immunostaining for placental alkaline phosphatase on fine-needle aspiration specimens to detect noninvasive testicular cancer: a prospective evaluation in cryptorchid men. BJU Int 2006; 97(5): 950-4.
34. Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Sun QY, Wang WH. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. J Repord Dev 2004; 50(2): 237-44.
35. Knabe C, Kraska B, Koch C, Gross U, Zreiqat H, Stiller M. A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections. Biotech Histochem 2006; 81(1):31-9.
36. Knuutila S. Morphology antibody chromosome technique for determining phenotype and genotype of the same cell. Curr Protoc Hum Genet. 2005; Chapter 4: Unit 4.7.
37. Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19(10): 971-4.
38. Lim JW, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. Proteomics 2002; 2(9): 1187-203.
39. Cui G, Qi Z, Guo X, Qin J, Gui Y, Cai Z. Rat bone marrow derived mesenchymal progenitor cells support mouse ES cell growth and germ-like cell differentiation. Cell Biol Int 2009; 33(3): 434-41.
40. Neri T, Monti M, Rebuzzini P, et al. Mouse fibroblasts are reprogrammed to Oct-4 and Rex-1 gene expression and alkaline phosphatase activity by embryonic stem cell extracts. Cloning Stem Cells 2007; 9(3): 394-406.
41. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. Cell 1978; 15(3): 801-11.
42. Ceriotti L, Kob A, Drechsler S, et al. Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. Anal Biochem 2007; 371(1): 92-104. Epub 2007 Jul 25.
43. Beebe L, McIlfatrick S, Grupen C, et al. A comparison of two in vitro maturation media for use with adult porcine oocytes for adult somatic cell nuclear transfer. Cloning Stem Cells 2007; 9(4): 564-70.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

44. Festag M, Viertel B, Steinberg P, Sehner C. An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds. Toxicol In Vitro 2007; 21(8): 1631-40. Epub 2007 Jul 18.

45. Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, et al. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality in vitro fertilization embryos. Nat Protoc 2008; 3(5): 923-33.

46. Van Hoof D, Braam SR, Dormeyer W, et al. Feeder-free monolayer cultures of human embryonic stem cells express an epithelial plasma membrane protein profile. Stem Cells 2008; 26(11): 2777-81.

47. Sj?gren-Jansson E, Zetterstr?m M, Moya K, Lindqvist J, Strehl R, Eriksson PS. Large-scale propagation of four undifferentiated human embryonic stem cell lines in a feeder-free culture system. Dev Dyn 2005; 233(4): 1304-14.

48. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(17): 7844-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.5.1.4]