

جداسازی و کشت اولیه سلول‌های ستیغ عصبی از لوله عصبی جنین جوجه

مریم متین، M.D.، محمدقاسم گل محمدی، Ph.D.، محسن سقا، Ph.D.*

- دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، اردبیل، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ms217059@gmail.com.m.sagha@arums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۷

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه ارائه یک روش ساده و کارآمد جهت جداسازی و تعیین خصوصیت سلول‌های ستیغ عصبی از بافت لوله عصبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تخم مرغ‌های نطفه‌دار حدود ۳۵ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد در داخل انکوباتور قرار داده شدند تا جنین‌ها به مراحل ۱۰-۱۲ طبق جدول تکاملی هامبورگر-هامیلتون رسیدند. سپس جنین‌ها از روی سطح زرده تخم مرغ جداسازی شده و لوله عصبی از جنین جوجه جدا و به مدت ۲۴ ساعت در ظروف کشت سلولی، کشت داده شد تا سلول‌های ستیغ عصبی از آن جدا شوند. آن‌گاه لوله عصبی از کف ظروف کشت جدا و خارج شد و به سلول‌ها به مدت ۵ روز اجازه تکثیر و ازدیاد داده شد. در نهایت این سلول‌ها جمع‌آوری شدند و جهت ارزیابی پروفایل بیان ژن، PCR صورت گرفت.

نتایج: سلول‌های ستیغ عصبی از لوله عصبی جدا شده و در شرایط کشت گسترش یافتند. این سلول‌ها هم‌چنین نشانگرهای Slug، Sox9 و Sox10 را به روش RT-PCR بیان کردند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های ستیغ عصبی می‌توانند در محیط آزمایشگاهی از لوله عصبی رها شده و در شرایط کشت مناسب و ساده تکثیر و گسترش یابند.

واژگان کلیدی: جنین جوجه، سلول ستیغ عصبی، لوله عصبی

مقدمه

سلول‌های ستیغ عصبی سلول‌های مشتق از نورواکتودرم هستند که در مرز بین صفحه عصبی و اپی‌درم در حال تکوین جنین شکل می‌گیرند و با مهاجرت و جابه‌جایی فعال از این ناحیه و نفوذ به مزودرم زیرین از حالت اپی‌تلیالی به حالت مزانشیمی تغییر حالت می‌دهند (۱). این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های پیش‌ساز چند توان نامیده می‌شوند، چون قابلیت تمایز به‌رده‌های مختلف سلولی را دارند (۲). از مشتقات مختلف سلول‌های ستیغ عصبی می‌توان به بافت همبند و استخوان‌های صورت و جمجمه، گانگلیون‌های اعصاب نخاعی و جمجمه‌ای، سپتوم مخروطی-تنه‌ای در قلب، اودونتوبلاست‌ها، بخش مرکزی غدد فوق کلیه، سلول‌های شوان اشاره نمود (۳).

با توجه به نقایص شدید ناشی از عدم تشکیل سلول‌های ستیغ عصبی، توجه محققان به بیماری‌های مرتبط با این سلول‌ها معطوف شده است؛ چراکه، اختلال در تکوین، تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها می‌تواند با ناهنجاری‌های شدیدی در بخش جمجمه و صورت، قلب و عروق و بیماری‌های عصبی همراه باشد (۳، ۴).

امروزه روش‌های آزمایشگاهی متداول و متنوعی برای دستیابی به سلول‌های ستیغ عصبی وجود دارد. می‌توان با جداسازی مستقیم این سلول‌ها از لوله عصبی جنین در حال تکوین جانوران (۵، ۶) یا تمایز سلول‌های بنیادی مختلف به سلول‌های پیش‌ساز ستیغ عصبی و در نهایت سلول‌های ستیغ عصبی، به چگونگی تکوین و تمایز این سلول‌ها پی برد و به بررسی روند تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی پرداخت (۷، ۸). هم‌چنین می‌توان با استفاده از (FACS) fluorescence activated cell sorting به‌تمایز و جداسازی جمعیت سلول‌های ستیغ عصبی از پیش‌سازهای سلول‌های بنیادی با منشا مختلف نظیر پالپ دندان، فولیکول مو و سلول‌های شوان اقدام نمود. تلاش‌های فراوانی صورت می‌گیرد تا شرایط کشت این دسته از سلول‌ها به‌گونه‌ای بهبود یابد که بتوان با استفاده از آن‌ها به ارزیابی دقیق‌تر فرآیند تکوین و تمایز و رفتار مهاجرتی این سلول‌ها پرداخت (۹). بسیاری از این روش‌ها بسیار پرهزینه و مستلزم صرف زمان زیاد می‌باشند و برخی از آن‌ها نیاز به یک لایه سلولی تغذیه‌کننده (Feeder layer) جهت کشت و تکثیر این سلول‌ها دارند. برخی از سلول‌های بنیادی که به‌عنوان منبع تمایز به سلول‌های ستیغ عصبی به‌کار می‌روند از پتانسیل تمایزی متفاوتی برخوردارند و نمی‌توانند سلول‌های ستیغ عصبی در مرحله پیش‌مهاجرتی (Premigratory) جهت ارزیابی دینامیک مهاجرت سلولی این سلول‌ها تولید کنند (۵، ۹). لذا هدف از این مطالعه ارائه یک راه‌کار ساده، سریع و تا حدی کم‌هزینه جهت جداسازی و کشت اولیه سلول‌های ستیغ عصبی در مرحله پیش‌مهاجرتی از بافت لوله عصبی جنین جوجه در محیط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت اولیه لوله عصبی: در این مطالعه تجربی، تخم مرغ‌های نطفه‌دار حدود ۲۸ تا ۳۳ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد در داخل انکوباتور قرار داده شدند تا جنین‌ها به‌مرحله ۷ تا ۱۰ برطبق جدول تکاملی هامبورگر-هامیلتون برسند. در این مطالعه کلیه موازین اخلاقی جهت کار بر روی جنین‌های حاصل از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار مطابق با تاییدیه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل رعایت شده بود. سپس جنین‌ها از روی سطح زرده تخم‌مرغ جداسازی شده و در محیط Leibovitz's (L15) جمع‌آوری شدند. برای جداسازی راحت‌تر بافت‌ها از هم‌دیگر، جنین‌ها در ۵ میلی‌لیتر آنزیم Dispase با غلظت ۱ mg/ml به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس برای خنثی شدن اثر آنزیم جنین‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محیط L15 حاوی سرم جنینی گوساله قرار داده شدند. سپس در زیر استریومیکروسکوپ به‌کمک سوزن‌های انسولین لوله عصبی از جنین جوجه جدا شد و به‌محیط L15 تازه منتقل شد. لوله‌های عصبی سپس به‌ظروف کشت ۶ خانه‌ای که حاوی DMEM/F12 + 15% FBS + 10⁻⁷ μM RA + 20ng/mL bFGF

ستیغ عصبی شروع به جداسازی از لوله عصبی کردند. آنگاه لوله عصبی از کف ظروف کشت جدا و خارج شد. سپس به سلول‌ها در محیط کشت 10^{-7} DMEM/F12 + 15% FBS + μ M RA به مدت ۵ روز اجازه تکثیر و ازدیاد داده شد.

استخراج RNA و انجام RT-PCR در این بررسی از روش RT-PCR برای ارزیابی بیان ژن‌های *Sox9*، *Sox10* و *MyoD* و *Brachyury* که در سلول‌های ستیغ عصبی بیان می‌شوند، استفاده شد. هم‌چنین بیان ژن‌های *MyoD* و *Brachyury* که در سلول‌های مزودرمی و پیش‌سازهای عضلانی تجلی می‌یابند در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های ستیغ عصبی پس از جداسازی از ظروف کشت، در محلول تریزول قرار داده شده و در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از استخراج Total RNA از نمونه‌های جدا شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA از روی یک میکروگرم Total RNA، cDNA سنتز شد. سپس واکنش PCR برای پرایمرهای اختصاصی مختلف در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه مسترسایکلر گرادیان اپندورف مدل ۵۳۳۱ صورت گرفت. لیست پرایمرها و توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در نهایت محصول PCR حاصل از تکثیر بیان ژن‌های اختصاصی *Sox9*، *Sox10*، *MyoD* و *Brachyury* و ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن خانگی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندهای ایجاد شده به کمک نور UV دستگاه doc Gel مشاهده و تصاویر آن ثبت شد.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای مورد استفاده همراه با تعداد جفت بازها (Base pair: bp)، دمای اتصال پرایمر به الگو (AT) و تعداد سیکل

Gene	Primer Sequence (5'→3' Gene)	AT(°C)	Length(bp)	Cycle
<i>GAPDH</i>	F: AGTCATCCCTGAGCTGAATG	50	330	28
	R: AGGATCAAGTCCACAACACG			
<i>Sox9</i>	F: CAGCCCCACCATGTCGGAT	60	448	35
	R: GGTGGTCTTCTTGTGCTGC			
<i>Sox10</i>	F: CAAGAGCAAACCCACGTCA	60	447	33
	R: CTCGGTCTTAGGGTGGTGG			
<i>Slug</i>	F:CCAAGAAGCCAAACTACAGCG	53	509	33
	R:GTAGCGTGTGGGTCCTGATGT			
<i>MyoD</i>	F:ACTACACGGAATCACCAAATGACC	55	200	35
	R: AAGGAATCTGGGCTCCACTGTC			
<i>Brachyury</i>	F: CCTCAAGTTTGGCATCTGG	49	388	35
	R: GCTGACAGGGGTCTGAATGT			

نتایج

کشت اولیه لوله عصبی جدا شده از جنین جوجه

پس از جداسازی لوله‌های عصبی از جنین جوجه و کشت آن‌ها در ظروف کشت (شکل 1A)، لوله‌های عصبی به کف این ظروف چسبیدند و طی مدت ۲۴ ساعت، سلول‌های ستیغ عصبی از اطراف آن‌ها شروع به جدا شدن نمودند (شکل 1B). بعد از این زمان، توده‌های باقی‌مانده از بافت لوله عصبی از ظروف کشت جدا شدند و جای آن‌ها به صورت یک حفره در وسط سلول‌های جدا شده از آن مشاهده شد (شکل 1C).



شکل ۱: کشت اولیه لوله عصبی. (A) استقرار لوله عصبی در ظرف کشت، (B) جدا شدن سلول‌های ستیغ‌عصبی از اطراف لوله عصبی کشت داده شده و (C) حذف بافت کشت داده شده لوله عصبی از ظرف کشت پس از ۲۴ ساعت (بزرگنمایی $\times 20$).

ظهور و تکثیر سلول‌های ستیغ‌عصبی

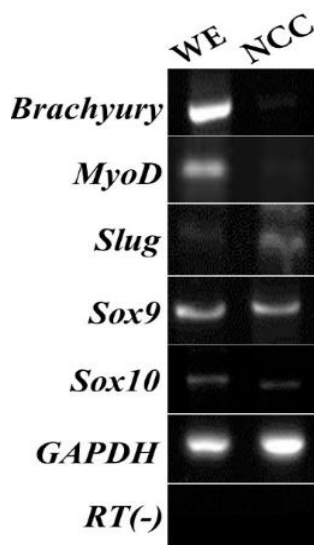
بررسی مورفولوژی سلول‌ها با استفاده میکروسکوپ اینورت نشان داد که ۲۴ ساعت بعد از جداسازی توده‌های باقی‌مانده لوله عصبی از ظروف کشت، سلول‌هایی با زواید متعدد که از نظر مورفولوژیکی با سلول‌های ستیغ‌عصبی مطابقت داشتند، ظاهر شدند (شکل ۲A). تعداد این سلول‌ها پس از تعویض محیط کشت روبه افزایش نهاد؛ طوری که بعد از ۵ روز، تعداد فراوانی از آن‌ها با مورفولوژی سلول‌های ستیغ‌عصبی در کف ظروف کشت مشاهده شدند (شکل ۲B). حدوداً ۵-۶ روز بعد از تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت، برخی از آن‌ها به سمت تولید سلول‌های ملانوسیت پیش رفتند. این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژیکی، سلول‌هایی با دانه‌های سیتوپلاسمی سیاه رنگ بودند (شکل ۲C).



شکل ۲: (A) مورفولوژی سلول‌های ستیغ‌عصبی با زوائد متعدد. تکثیر فوق‌العاده آن‌ها بعد از ۵ روز، (B) سلول‌های ستیغ‌عصبی با بزرگنمایی بیشتر (C) سلول‌های شبیه ملانوسیت ۵ روز بعد از کشت.

نتایج RT-PCR

با استفاده از روش RT-PCR، بیان ژن‌های *Slug Sox10 Sox9* در سلول‌های ستیغ‌عصبی به‌دست آمده از کشت اولیه لوله عصبی جنین بررسی شد. بیان ژن *GAPDH* نیز به‌عنوان ژن خانگی در همه سلول‌ها ارزیابی شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که ژن‌های *Slug Sox10 Sox9* که نشان‌دهنده هویت سلول‌های ستیغ‌عصبی بودند در سلول‌های ستیغ‌عصبی جدا شده از لوله عصبی بیان شدند. همچنین جهت ارزیابی بهتر این سلول‌ها، بیان ژن *MyoD* به‌عنوان ژنی که در مایوتوم‌های حاصل از سومات‌های جنینی بیان می‌شود و نیز بیان ژن *Brachyury* که خاص سلول‌هایی با منشأ مزانشیمی است، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ مشخص شده است، بیان این ژن در سلول‌های ستیغ‌عصبی در مقایسه با کل جنین و حتی ژن‌های اختصاصی سلول‌های ستیغ‌عصبی به‌مراتب کمتر بود.



شکل ۳: نتایج RT-PCR بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های ستیغ عصبی (NCC) و کل جنین (WE).

بحث

با توجه به اهمیت و گستردگی تمایز سلول‌های ستیغ عصبی در موجودات زنده و بیماری‌های مختلف مرتبط با نواقص و جهش‌های این سلول‌ها، امروزه مطالعات مختلفی بر روی نمونه‌های آزمایشگاهی این سلول‌ها معطوف شده است. از بین حیوانات آزمایشگاهی بیشتر مطالعات بر روی جنین‌های موش و جوجه صورت گرفته است (۱۰). در مطالعه حاضر از لوله عصبی جنین جوجه برای دست‌یابی به سلول‌های ستیغ عصبی در محیط آزمایشگاهی استفاده شده است.

بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که نوع محیط کشت تاثیر مهمی در تکثیر و تمایز سلول‌ها دارد. به‌عنوان مثال؛ بدون وجود FBS در محیط کشت، لوله عصبی توانایی اتصال به ظروف کشت را ندارد. در غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۰ درصد FBS توانایی اتصال لوله عصبی وجود دارد، اما در صورتی که غلظت FBS از ۱۵ تا ۲۰ درصد بالاتر رود توانایی تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های ملانوسیت افزایش می‌یابد. به‌همین دلیل بهترین غلظت حدود FBS ۱۵ درصد است تا علاوه بر اتصال لوله عصبی و آزادسازی سلول‌های ستیغ عصبی، از تمایز سریع آن‌ها به سمت سلول‌های ملانوسیت جلوگیری شود. در صورت حضور لوله عصبی، ظرف مدت ۱ تا ۴ روز جمعیت زیادی از سلول‌های ستیغ عصبی در محیط کشت ایجاد می‌شود. اما در صورت جدا کردن لوله عصبی از محیط، بیشتر سلول‌ها لیز می‌شوند (۱۱). این امر احتمالاً نشان‌دهنده وجود فاکتورهای حفظ‌کننده بقا سلول‌های ستیغ عصبی است که از لوله عصبی ترشح می‌شود (۱۲). مطالعات مختلف افزودن اسید رتینوئیک و بتامرکاپتواتانول را نیز در حفظ بقای سلول‌های ستیغ عصبی موثر دانسته‌اند (۱۳). لذا در این مطالعه از bFGF و EGF و نیز اسید رتینوئیک و بتا مرکاپتواتانول برای حفظ بقای سلول‌های ستیغ عصبی در محیط کشت استفاده شد و نتایج بیان‌گر تکثیر و تزايد این سلول‌ها در محیط کشت بود.

۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از کشت لوله عصبی در محیط کشت، ۲ دسته سلول در اطراف آن از نظر مورفولوژیکی ایجاد می‌شود که یک دسته از سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی ستاره‌ای شکل با فضای بین آن‌ها هستند که شبیه سلول‌های ستیغ عصبی می‌باشند و دسته دیگر سلول‌های پهنی هستند که از قسمت شکمی لوله عصبی منشا می‌گیرند. حدود ۴-۵ روز بعد از کشت، شبکه پیچیده‌ای از آکسون و ساختارهای شبیه نورون در محیط شکل می‌گیرد. هم‌چنین ملانوسیت‌ها نیز در این مرحله تشکیل می‌شوند که این نوع تمایز، ارتباط مستقیمی با غلظت‌های بالای FBS دارد (۱۱). در این مطالعه نیز ۱ روز بعد از کشت لوله

عصبی، سلول‌هایی که از لحاظ مورفولوژی شبیه سلول‌های ستیغ عصبی بودند، تکثیر یافتند و بعد از جداسازی از لوله عصبی و اضافه کردن ترکیبات مکمل به محیط کشت، تکثیر قابل توجهی از سلول‌های ستیغ عصبی اتفاق افتاد. با گذشت زمان، از تکثیر سلول‌های ستیغ عصبی در محیط کشت کاسته شده و به سمت تمایز پیش رفتند. لذا در این مطالعه حدود ۵ روز بعد از تکثیر، سلول‌های ستیغ عصبی از محیط کشت جمع‌آوری شدند.

بعد از جداسازی و جمع‌آوری سلول‌های ستیغ عصبی، ماهیت این سلول‌ها باید از طریق بیان نشانگرهای اختصاصی به اثبات برسد. ژن‌های مختلفی برای تعیین ماهیت این سلول‌ها استفاده می‌شود (۱۴، ۱۵ و ۱۶). در مطالعه حاضر بیان ژن‌های *Sox9*، *Sox10* و *Slug* با استفاده از روش RT-PCR بررسی شدند.

مطالعات نشان می‌دهند که در تشکیل سلول‌های ستیغ عصبی فاکتورهای مختلفی از جمله اعضا خانواده *Sox* و *Snail* در تنظیم تغییر حالت اپی‌تلیال به مزانشیم (EMT) و نیز مهاجرت سلول‌های ستیغ عصبی نقش دارند (۱۷، ۱۸ و ۱۹). *Sox9* هم به طور مستقیم و هم از طریق فعال‌سازی *Snail2* سبب این تغییر حالت می‌شود (۱۷، ۱۸). در تشکیل سلول‌های ستیغ عصبی، علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، مولکول‌های پیام‌رسانی مانند BMP و WNT نیز نقش دارند. در واقع، BMP سبب فعال شدن *Snail2* و *Sox9* می‌شود (۲۰، ۲۱ و ۲۲).

Snail1/2 در مراحل اولیه تشکیل سلول‌های ستیغ عصبی بیان می‌شود که نقش مهمی در تخصص یافتگی این سلول‌ها دارد. اختلال در بیان این ژن سبب بروز مشکلات جمجمه‌ای-چهره‌ای مانند کام شکاف‌دار در موش می‌شود (۱۰). *Sox10* نقش‌های مختلفی در سلول‌های ستیغ عصبی و مشتقات آن‌ها بازی می‌کند از جمله حفظ ظرفیت تمایز به سمت سلول‌های نورون و گلیال، جلوگیری از تمایز آشکار به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای صاف و نورون و حفظ تکثیر سلول‌های ستیغ عصبی (۱۸). در انسان، موش و ماهی گورخری، جهش‌های *Sox10* مشتقات سلول‌های ستیغ عصبی واگال و ترانکال را تحت تاثیر قرار می‌دهد که این نشان می‌دهد سلول‌های ستیغ عصبی این دو منطقه به *Sox10* وابسته هستند (۲۳، ۲۴ و ۲۵).

Slug و *Snail* از اولین عوامل رونویسی بودند که در سلول‌های ستیغ عصبی شناسایی شدند. این ژن‌ها جزو خانواده Zn-finger هستند و به وفور به عنوان نشان‌گر سلول‌های ستیغ عصبی استفاده می‌شوند. در جنین جوجه *Slug* بیان می‌شود ولی *snail* بیان ندارد؛ اما در موش و ماهی گورخری سلول‌های ستیغ عصبی *Snail* را به جای *Slug* بیان می‌کنند (۱۶، ۱۹). کاهش عمل کرد *Slug* در جنین جوجه و *Xenopus* سبب نقص مهاجرت سلول‌های ستیغ عصبی در محیط آزمایشگاهی می‌شود. بنابراین *Slug* از مهم‌ترین عوامل لایه‌زایی سلول‌های ستیغ عصبی به شمار می‌رود (۱۶، ۱۷).

در مطالعه حاضر بیان ژن‌های *Sox9*، *Sox10* و *Slug* روی سلول‌های ستیغ عصبی با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد که نتایج نشان‌دهنده بیان بالای ژن‌های ذکر شده روی سلول‌های ستیغ عصبی بود. از آنجایی که صرف بیان ژن‌ها در سلول‌های کشت داده شده نمی‌تواند تعیین‌کننده هویت سلول‌ها باشد بلکه ژن‌هایی که در آن سلول‌ها بیان نمی‌شوند نیز باید مورد بررسی قرار گیرند (۲۶)، در این مطالعه بیان دو ژن *MyoD* و *Brachyury* نیز در این سلول‌ها بررسی شدند که نتایج به دست آمده نشان‌دهنده عدم بیان *MyoD* و بیان بسیار ضعیف *Brachyury* در سلول‌های ذکر شده بود. *MyoD* از ژن‌هایی می‌باشد که در سومایته‌ها با غلظت بالا تحت تاثیر SHH بیان می‌شود و در واقع نشان‌دهنده هویت میوژنیک در سلول‌های سومایته می‌باشد و عدم بیان ژن ذکر شده در سلول‌های ستیغ عصبی نیز به نوعی ماهیت غیرمزودرمی این سلول‌ها را نشان می‌دهد (۲۷).

ژن *Brachyury* که در گره اولیه، سلول‌های پیش‌ساز نوتوکورد و نوتوکورد تجلی می‌یابد، تنظیم تشکیل مزودرم پستی را در نواحی میانی و دمی رویان کنترل می‌کند. این ژن برای مهاجرت سلول‌ها از طریق شیار اولیه ضرورت دارد. *Brachyury* نوعی پروتئین متصل شونده به توالی‌های اختصاصی DNA را که به عنوان عامل نسخه‌برداری عمل می‌کند، رمزگذاری

می‌نماید (۱). این ژن نیز در سلول‌های ستیغ عصبی بیان بسیار ضعیفی را در مقایسه با ژن‌های اختصاصی سلول‌های ستیغ عصبی نشان داد که این امر بیان‌گر ماهیت غیرمزودرمی این سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که لوله عصبی جنین جوجه در محیط آزمایشگاهی قادر به‌رهاسازی سلول ستیغ عصبی می‌باشد و می‌توان هویت آن‌ها را از طریق بیان ژن‌هایی که در شکل‌گیری و مهاجرت این سلول‌ها نقش دارد مانند *Sox9*، *Sox10* و *Slug* و عدم بیان ژن‌هایی که نقشی در تشکیل آن‌ها ندارند مثل *MyoD* و *Brachyury* تعیین نمود. هم‌چنین با استفاده از یک محیط کشت غنی حاوی فاکتورهای رشد می‌توان به تکثیر و ازدیاد این سلول‌ها مبادرت نموده و از آن‌ها در مطالعات آتی بهره جست.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی با کد ۰۵۳۹ در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد و بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جهت تامین اعتبار این پایان‌نامه به‌عمل می‌آورند.

منابع

1. Sadler TW. Langman's medical embryology. 13th Ed. USA: Walter kluwer; 2015.
2. Zhang J, Duan X, Zhang H, Deng Z, et al. Isolation of neural crest-derived stem cells from rat embryonic mandibular processes. Cell Biology. 2006; 98(10): 567–575.
3. Schoenwolf GC. Larsen's human embryology. 5th Ed. Philadelphia: CH Livingstone; 2014.
4. Szabó A, Mayor R. Mechanisms of neural crest migration, Annual Review of Genetics. 2018; 52: 43-6.
5. Pfaltzgraft ER, Mundell NA, Labosky PA. Isolation and culture of neural crest cells from embryonic murine neural tube, Journal of Visualized Experiments. 2012; 64: e4134.
6. Zhu S, Liu W, Ding H, Cui H, et al. BMP4 and Neuregulin regulate the direction of mouse neural crest cell differentiation, Experimental and Therapeutic Medicine. 2019; 17: 3883-3890.
7. Zhu Q, Li M, Yan C, Lu Q, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells to neural crest stem cells, functional peripheral neurons, and corneal keratocytes. Biotechnology Journal. 2017; 12(12): 1700268.
8. Huang M, Miller ML, Mchenry LK, Zheng T, et al. Generating trunk neural crest from human pluripotent stem cells. Scientific Report. 2016; 6: 19727.
9. Etchevers H. Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells, Nature Protocols, 2011;6(10):1568-1577.
10. Brüstle O, Hoch M. Neural crest development in a human embryonic stem cell-based model system. Dissertation, Bonn 2012; 24: 08-2012.
11. Hou L, Takeuchi T. Differentiation of reptilian neural crest cell in vitro. Developmental Biology 1992; 28A(5):348-354.

12. McLennan R, Schumacher LJ, Morrison JA, Teddy JM, et al. VEGF signals induce trailblazer cell identity that drives neural crest migration. *Developmental Biology* 2015; 1606(15):30-124.
13. Ito K, Morita T. Role of Retinoic Acid in Mouse Neural Crest Cell Development In Vitro. NIH. 1995; 204(2): 211-218.
14. Barrallo GA, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005; 132(14): 3151-3161
15. Cheng U, Cheung M, Elmagd AM, Orme A, et al. Chick sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain Research*. 2000; 121(2): 233-241.
16. del Barrio MG, Nieto MA. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development*. 2002; 129(7): 1583-1593.
17. Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Cooperative action of sox9, snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 2006; 133: 323-333.
18. Kim J, Lo L, Dormand E, David J. Anderson. Sox10 Maintenance, Multipotency and inhibit neuronal differentiation of neural crest cell Neuron. 2003; 38(1): 17-31.
19. Nieto MA. The Snail superfamily of Zinc-finger transcription factors. *Cell Biology*. 2002; 3(3): 155-166.
20. Sefton M, Sanchez S, Nieto MA. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*. 1998; 125: 3111-3121.
21. Castro MI, Marcelle C, Fraser M. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science*. 2002; 297(5582): 848-851.
22. Chang C, Hemmati BA. Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Developmental Biology*. 1998; 194(1):129-34.
23. Morais d, Silva S, Hacker A, Harley V, et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*. 1996; 14(1): 62-68.
24. Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Cell Biology*. 2004; 16(6): 681-687.
25. Kleber M, Lee HY, Wurdak H, Buchstaller J, et al. Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *Cell Biology*. 2005; 169(2): 309-320.
26. Diez D, Corral R, Storey KG. Markers in vertebrate neurogenesis. *nature review*. 2001; 2(1):835-839.
27. Gordon M, Jay W, Frank E. Sonic hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm. *Anatomy embryology* 1999; 200(3): 239-252.

Isolation and primary culture of chick embryonic neural crest cells

Matin M M.Sc., Golmohammadi MGH Ph.D., Sagha M* Ph.D.,

Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences,
School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* Email corresponding author: m.sagha@arums.ac.ir, ms217059@gmail.com

Received: 17 Dec. 2020

Accepted: 6 Mar.2021

Abstract

Aim: we aimed at presenting a simple and efficient method for isolating and characterizing the neural crest cells.

Material and Methods: The hen's fertilized eggs were incubated for about 35h at 38°C and 55-60% humidity until the embryos reached to stages 10-12 according to Hamburger-Hamilton developmental stage table. Then the embryos were removed from the egg's yolk and the neural tube was isolated and cultured for 24 h in a tissue culture dish to release neural crest cell. Then after, the neural tube was removed and allowed to NCC to expand for further 5 days. Finally, the cells were collected and subjected to PCR to study their gene expression profile.

Results: The neural tube released NCC and these cells proliferated in culture condition. They also expressed markers including Slug, Sox9, and Sox10 by the RT-PCR method.

Conclusion: The neural tube can release NCC in culture condition and these cells can proliferate in the presence of an appropriate medium.

Keywords: Chick embryo, Neural crest cell, Neural tube