مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ۱۵۵-۱۴۷

ارزیابی بیان مارکرهای پرتوانی در کلونی‌های سلول‌های ES-like حاصل از اسپرماتوگونی و سلول‌های بنیادی جنینی

هاتف قاسمی حمیدآبادی Ph.D. ، مریم نظم بجنوردی Ph.D.* ، نورالله رضایی Ph.D.

- دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، ساری، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: bojnordi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۶

چکیده

هدف: اخیرا ماهیت پرتوانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells, SSCs) در محیط کشت مورد توجه قرار گرفته است. هدف از تحقیق حاضر تولید سلولهای شبه بنیادی جنینی (Embryonic Stem like cells, ES-like cells) از SSCs و بررسی تغییرات مورفولوژیک و ژنتیکی در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells, ESCs) است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه موش نوزاد با استفاده از یک روش هضم مکانیکی و آنزیمی دو مرحله‌ای استخراج شده و در محیط حاوی DMEM و FBS ۱۵ درصد کشت داده شدند. به‌طوری‌که در پاساژ پنجم کلونی های ES-like cells حاصل شد. بیان ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی *Stra8*، *DAZL*, *Plzf* و ژن‌های پرتوانی *Nanog*، *SOX2*، *Klf4* به‌روش RT-PCR، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و نشانگر پرتوانی Oct4 به‌روش ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های ES-like cells بررسی و با سلول‌های ESCs مقایسه شد.

نتایج: ماهیت سلول‌های ES-like cells حاصله توسط معیارهای نظیر مورفولوژی، میزان بالای فعالیت آلکالین فسفاتاز و نشانگر پرتوانی Oct4 مورد تایید قرار گرفت. طی تبدیل سلول‌های اسپرماتوگونی به سلول‌های ES-like cells بیان ژن‌های اختصاصی نظیر *Stra8*، *DAZL*, *Plzf* کاهش و بیان ژن‌های پرتوانی نظیر *Nanog*، *SOX2*، *Klf4* افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجر به تولید کلونی‌های ES-like cells می شود این فرآیند همراه با تغییرات ژنتیکی گسترده‌ای در بیان ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی و ژن‌های پرتوانی در سلول‌های ES-like cells می‌باشد. در مجموع سلول‌های اسپرماتوگونی می‌تواند دریچه‌ای به‌سمت دستیابی به سلول‌های پرتوان مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های شبه بنیادی جنینی ، سلول بنیادی جنینی، پرتوانی

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells, SSCs) از طریق گامت‌زایی اطلاعات ژنتیکی را از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌کنند (۱). علی‌رغم انتقال اطلاعات ژنتیکی که مهم‌ترین عمل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. مطالعات جدید الگوی تکاملی دیگری را نیز برای این سلول‌ها در نظر می‌گیرند (۲). سلول‌های اسپرماتوگونی پس از کشت در محیط In vitro کلونی‌های سلولی (ES-like cells, Embryonic Stem like cells) را شکل می‌دهند که این سلول‌ها به سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic ESCs) stem cell, شبیه هستند و دارای قابلیت خودترمیمی (Self-renewal) و تولید هر سه نوع لایه زایای اکتودرمی، مزودرمی و آندودرمی می‌باشند (۳).

طی تبدیل شدن سلول‌های اسپرماتوگونی به سلول‌های ES-like cells بیان ژن‌ها دستخوش تغییرات گسترده‌ای می‌گردند به‌طوری‌که برخی از ژن‌های پر توانی نظیر *SOX2*, *SSEA1*, *Nanog*، C-myc و *Oct4* افزایش می‌یابد که برای برنامه ریزی مجدد (Reprogramming) فیبروبلاست به‌مرحله پر توانی ضروری است (۴). در حالی‌که بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی شامل *Stra8*، *DAZL*, *Plzf* کاهش می‌یابد (۵).

نظریه‌ی خاصیت پرتوانی سلول‌های اسپرماتوگونی برای نخستین‌بار در سال ۲۰۰۴ پس از کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش تازه متولد شده عنوان شد (۶). محققان دیگر پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ ES-like cells حاصله را به انواع مختلف سلولی تمایز دادند (۷). همچنین نتایج مشابهی پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی به‌دست آمد (۸).

امروزه استراتژی‌های سلول درمانی فعالیت تکثیری گسترده و پرتوانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را پیشنهاد می‌دهد (۹). در واقع این سلول‌ها می‌توانند به حد کافی تکثیر و گسترش یابند که منبع کافی جهت تولید سلولی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات ژنتیکی فراهم آورند (۱۰).

منشا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی سلول‌های اپی‌بلاست جنینی هستند که این سلول‌ها تحت القای (Bone BMP4, Morphogenetic Protein 4) وارد مرحله اختصاصی شدن می‌شوند (۱۱). سپس این سلول‌ها به مزودرم خارج رویانی مهاجرت کرده و در گناد در حال تکامل به سلول‌های رده اسپرماتوگونی تمایز می‌یابند (۱۲و۱۳). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مارکرهای ویژه را نظیر Dazl, Plzf, Stra8 را بیان می‌کنند که از این مارکرها به‌عنوان مارکرهای اختصاصی اسپرماتوگونی جهت جداسازی این سلول‌ها استفاده می‌شود (۱۴). علاوه بر این تحقیقات جدید نشان می‌دهد که سلول‌های اسپرماتوگونی دارای پتانسیل تشکیل کلونی‌های سلولی ES-like cells تحت شرایط محیط کشت in vitro و حتی بدون دستکاری‌های ژنتیکی می‌باشند (۱۵). این کلونی‌ها از نظر مورفولوژی بسیار شبیه کلونی‌های سلولی بنیادی جنینی هستند. این کلونی‌ها مشابه کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی دارای قابلیت خودترمیمی و تولید هرسه نوع لایه زایای جنینی می‌باشند (۱۶-۱۹).

در همین راستا نتایج تحقیقات Huang و Glasser (۲۰و۲۱) نیز موید ظهور کلونی سلول‌های ES-like cells پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بودند که این کلونی‌ها از نظر مورفولوژی مشابه سلول‌های ES-like cells بوده و مارکرهای پرتوانی و میزان بالای از فعالیت آلکالین فسفاتاز را خود بیان کردند. با توجه به گزارشات مذکور و اهمیت استفاده از سلول‌های اسپرماتوگونی به‌عنوان یک منبع سلولی جدید برای تولید و دستیابی به سلول‌های پرتوان، لذا تحقیقات بیشتری در زمینه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و تولید سلول‌های ES-like cells ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین هدف از تحقیق حاضر تولید سلول‌ها ES-like cells پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و بررسی تغییرات مورفولوژی و ژنتیکی حاصله در این سلول‌ها و مقایسه با سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های بنیادی جنینی است.

مواد و روش‌ها

تهیه و جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی: در این تحقیق از سلول‌های اسپرماتوگونی موش نوزاد ۲ تا ۴ روز استفاده شد. بدین ترتیب سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه موش نوزاد توسط دو مرحله هضم مکانیکی و آنزیمی جداسازی می‌شوند (۲۲).

مرحله اول هضم مکانیکی: در این مرحله پس از جداسازی کپسول، بیضه‌های موش های نوزاد ۲ تا ۴ روزه نژاد **NMRI** در محیط کشت حاوی آنزیم‌های لازم جهت هضم آنزیمی به‌طور

مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در طی این مدت محیط حاوی بیضه‌ها، هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی و توسط سمپلر به‌مدت ۱ دقیقه به‌هم زده می‌شد. پس از ۱ ساعت، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰RPM سانتریفیوژ شده و محیط بالای رسوب ته لوله با محیط DMEM تازه جایگزین شد. این‌کار باعث حذف بافت بینابینی، از قطعات بیضه شد. حاصل اولین مرحله هضم آنزیمی در انتهای این مرحله قطعات لوله‌های منی‌ساز بودند که برای هضم بیشتر وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شدند.

مرحله دوم هضم آنزیمی: به‌منظورجدا شدن سلول‌ها از قطعات لوله‌های منی‌ساز حاصل از اولین مرحله هضم آنزیمی، لوله‌ها در محیطی مشابه مرحله اول به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در طی این مدت هر ۱۰ دقیقه یک بار، محلول حاوی لوله ها توسط سمپلر و به‌مدت یک دقیقه به‌منظور خرد شدن تجمعات سلولی موجود در تعلیق تا حد امکان به‌طور کامل هم زده شد. در انتهای زمان انکوباسیون تعلیق فوق جهت جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت معادل ۴۰۰rpm و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرده و سلول‌های منفرد و برخی از تجمعات سلولی در بالای تعلیق قرار گرفتند. مایع سلولی بالای رسوب از فیلترهای نایلونی ۷۰ میکرومتر عبور داده شد. تعلیق حاصل عمدتا حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی بود که در مراحل بعدی از یکدیگر جدا شدند (۲۲).

جداسازی سلول‌های سرتولی: جداسازی سلول‌های سرتولی از تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی با استفاده از روش اسکارپینو و همکاران (۲۲) انجام شد. برای این منظور از ۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر لکتین داچورا استرامونیوم اگلوتینین (DSA, Sigma, USA) در بافر فسفات استفاده شد پتری دیش حاوی این محلول به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشوی پتری دیش با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline, PBS) حاوی ۰/۵ درصد سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin,BSA) محصولات شرکت Sigma تعلیق سلولی به پتری دیش پوشیده با لکتین DSA منتقل شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2، انکوبه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون سلول‌های شناور به‌عنوان سلول‌های اسپرماتوگونی در نظر گرفته شدند درحالی‌که سلول‌های چسبیده به کف پتری به‌عنوان سلول‌های سرتولی شناخته شدند. (۲۲).

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی: سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط ES medium که حاوی DMEM، FBS ۱۵ درصد، LIF (1000 IU/ml; Chemicon)، ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری، بتا مرکاپتواتانول ۱mM و ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین بوده کشت داده شدند. پاساژ سلول‌های اسپرماتوگونی هر سه روز یک‌بار و با استفاده از تریپسین-EDTA و پیپتاز انجام شد. در هر گروه به تعداد پنج بار مراحل کشت سلولی تکرار شد.

ایجاد ES-like cell: سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط ES medium به‌مدت دو تا سه هفته کشت داده شدند. سلول‌ها هر هفته دو بار پاساژ داده شده و در پاساژ پنجم معادل هفته ۳ کشت کلونی‌های ES-like cells حاصل شد.

کشت سلول بنیادی جنینی موش (ESC): در پژوهش فوق از رده سلولی بنیادی جنینی موشی (CGR8) مشتق از گونه موش ۱۲۹/SV، اهدائی از طرف دکتر سلیمانی (دانشگاه تربیت مدرس) استفاده شد. کشت اولیه سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت ES medium بوده که پس از بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، به‌صورت روزانه تعویض محیط کشت انجام شد

ارزیابی سلول‌های ES-like Cells: در مطالعه حاضر سعی شد با به‌کارگیری روش‌های متفاوتی حضور سلول‌های ES-like cells حاصله مشخص گردید که شامل ارزیابی‌های مورفولوژیک، ایمونوسیتوشیمی و مولکولی بود. ماهیت پر توانی سلول‌های ES-like cells از طریق مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی ذکر شده به‌عنوان کنترل مثبت انجام شد.

ارزیابی‌های مورفولوژیک: پس از گذشت ۳ تا ۴ روز از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی به‌تدریج کلونی‌های اسپرماتوگونی ظاهر شدند. این کلونی‌ها از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک و شکل ظاهری توسط میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین کلونی‌های ES-like cells حاصله از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در هفته چهارم نیز از نظر ویژگی مذکور مجددا مورد ارزیابی و مقایسه با کلونی های سلولی اسپرماتوگونی و ESC قرار گرفتند.

هیستوشیمی آلکالین فسفاتاز: برای ارزیابی آلکالین فسفاتاز (Sigma) ابتدا سلول‌های حاصل از کلونی‌های اسپرماتوگونی، ES-like cells و سلول بنیادی جنینی به‌وسیله PBS سه مرتبه شستشو شدند. ابتدا سلول‌ها در محلول تثبیت کننده که حاوی استن، فرمالدئید و سیترات به‌مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند. در مرحله بعد سلول‌ها توسط محلول Tris 0.1 M دو مرتبه شستشو داده شدند. سپس سلول‌های فیکس شده در محلولی که حاوی 0.5 mg/ml Fast Red Violet (Sigma) و 40 µl/ml Naphtol Phosphate به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق، نسبتا مرطوب و تاریک انکوبه شدند. در نهایت سلول‌ها با آب مقطر شستشو شدند و محل‌های فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط میکروسکوپ نوری Olympus مشاهده و عکس‌برداری شدند (۲۳).

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی: در ابتدا سلول‌های حاصل از کلونی‌های اسپرماتوگونی، ES-like cells و سلول بنیادی جنینی توسط PBS سه مرتبه شستشو شدند. سلول‌های مذکور در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق به‌مدت یک شب تثبیت شدند. سپس سلول‌ها با محلول 0.05% Tween 20 + PBS شستشو داده شده و با محلول 0.2% Triton X-100 نفوذپذیر شده و مجددا توسط محلول 0.05% Tween 20 + PBS به‌مدت ۵ دقیقه شسته شدند و سلول‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرم بز پوشانده شدند. آنتی بادی اولیه Oct4 (Goat polyclonal IgG, ab764, abcam system) به رقت ۱/۲۰۰ در محلول 0.05% Tween 20 + PBS + 1٪ BSA به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به سلول‌های مذکور اضافه شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS، سلول‌های مذکور توسط آنتی‌بادی ثانویه (Phycoerythrin (PE) - conjugated Donkey polyclonal to Goat IgG, ab976, abcam system) به رقت ۱/۱۰۰ در محلول 0.05% Tween 20 + PBS + 1٪ BSA به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق و در شرایط تاریکی انکوبه شدند. رنگ آمیزی هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI محصول شرکت سیگما صورت پذیرفت و در انتها بررسی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس Olympus phase contrast microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) صورت گرفت (۲۴و۲۵).

ارزیابی مولکولی: به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های *Stra8*، *Plzf*، *Dazl*، *Nanog*، *Klf4*، *SOX2* از روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) استفاده شد. بدین ترتیب که RNA کل با استفاده از کیت RNA Plus (محصول شرکت فرمنتاز) از کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی، ES-like cells و سلول بنیادی جنینی استخراج شده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده، جهت تبدیل mRNA مورد نظر به cDNA از پرایمر الیگو dT (MWG-Biotech AG) و آنزیم نسخه بردار معکوس (Gibco BRL, M-MLV) استفاده شد. لازم به‌ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده تحقیق مذکور در جدول ۱ آورده شدند (۲۸-۲۶).

جدول ۱: ویژگی‌ها و توالی پرایمرهای ذکر شده در تحقیق حاضر.

Gene	Primer (forward/reverse)	Significance
Stra8	5'- ACGACGCGTCGCTATTCCCTCTCACATCTTC-3' 5'- AGCGAGCTCGATGCACCTTCGACACTTG -3'	Spermatogonial marker
DAZL	5'- CCACCACAGTTCCAGAGTGTTTGG-3' 5'- CTTGAGTAACAAGAGAGTTTCTCAG-3'	Spermatogonial marker
Plzf	5'-CAAGAAGTTCAGCCTCAAGCA-3' 5'-CACTCAAAGGGCTTCTCACC-3'	Spermatogonial marker
Nanog	5'-CTGGGAACGCCTCATCAA-3' 5'-CGCATCTTCTGCTTCCTGG-3'	Pluripotency marker
Sox2	5'-CAGCTCGCAGACCTACATGA-3' 5'-TGGAGTGGGAGGAAGAGGTA-3'	Pluripotency marker
Klf4	5'-GAAATTCGCCCGCTCCGATGA-3' 5'-CTGTGTGTTTGGTAGTGCC-3'	Pluripotency marker
β actin	5'- CTTCTTGGGTATGGAATCCTG -3' 5' - GTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC-3	Internal control

نتایج

تایید هویت سلول‌های ES-like cells

مورفولوژی

کلونی‌های ES-like cells به لحاظ مورفولوژیک بسیار شبیه کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی و دارای شکل کروی تا بیضی با محدود سلولی نامشخص بودند.

توانایی تولید اجسام شبه جنینی

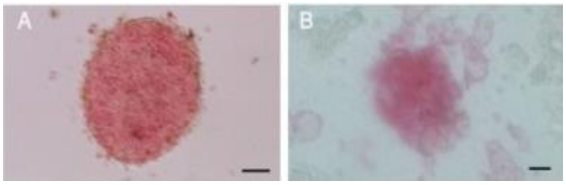
سلول‌های ES-like cells در صورت کشت معلق قادر به تشکیل دستجات و تولید اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies, EBs) هستند.

سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز

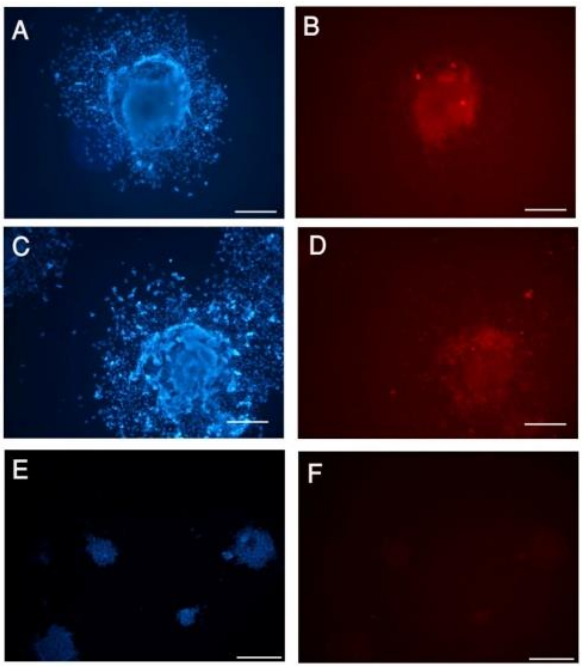
بررسی هیستوشیمی آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داد که سلول‌های ES-like cells مشابه ESC دارای فعالیت آلکالین فسفاتازی نسبتا بالای هستند. به‌طوری‌که محل‌های فعالیت آنزیم به‌صورت نقاط صورتی تا قرمز قابل مشاهده است. علاوه بر این سلول‌های مشتق شده از اسپرماتوگونی نیز دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌باشند (شکل ۱، A و B).

ردیابی نشانگر سلولی Oct4

به‌کارگیری آنتی‌بادی ضد Oct4 به‌روش ایمونویستوشیمی بیان این نشانگر را در سلول‌های ES-like cells مذکور به اثبات رسانید (شکل ۲، B)، علاوه بر این بیان این پروتئین در ES-like cells مشابه سلول‌های بنیادی جنینی بوده (شکل ۲، D) که این امر دال بر فعالیت پرتوانی سلول‌های ES-like cells است. هر چند که در کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی این نشانگر ظهور پیدا نکرد (شکل ۲، F).



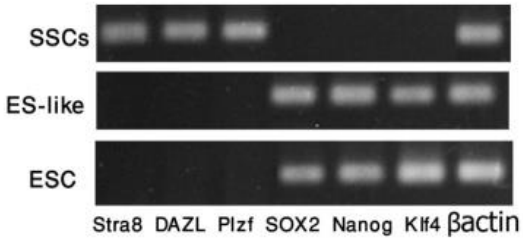
شکل ۱: ارزیابی هیستوشیمی آنزیم آلکالین فسفاتاز. (A) کلونی‌های حاصل از ESC و (B) کلونی‌های ES-like cells مشتق از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بزرگنمایی ×۴۰۰.



شکل۲: روش ایمونوسیتوشیمی برای تعیین محل Oct4 در کلونی‌های ES-like. (A) کلونی‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی، (B) کلونی‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی، (C) در کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی ،(D) در کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی، (E) توسط DAPI به رنگ آبی در آمده اند، (F) همچنین هسته سلول‌ها به‌ترتیب برای کلونی‌های ES-like ، بزرگنمایی ×۴۰۰.

بررسی مولکولی

بررسی مولکولی با روش RT-PCR نشان داد که ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی نظیر *Dazl, Plzf, Stra8* در کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌طور واضحی بیان می شوند در حالی‌که ژن‌های فوق در کلونی‌های ES-like cells و ESC بیان نمی شوند. علاوه بر این میزان بیان ژن‌های پرتوانی نظیر *Nanog ,Klf4 SOX2*، در کلونی‌های ES-like cells مشابه ESC بیان شد درحالی‌که ژن‌های مذکور در کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی بیان نگردید (شکل ۳).



شکل۳: ژل الکتروفورز بیان ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی و ژن‌های پرتوانی در کلونی‌های حاصل از اسپرماتوگونی، ES-like cells و ESC. همچنین ژن βactin به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جمعیت زایای در بیضه‌ها هستند که بر روی غشای پایه لوله‌های منی ساز قرار گرفته و با عمل اسپرماتوژنز وظیفه انتقال ژنتیکی را بر عهده دارند (۲۹). این سلول‌ها دارای ویژگی‌هایی نظیر قابلیت خودترمیمی و تکثیر سلولی هستند (۳۰). به‌طوری‌که این ویژگی منجر به تولید کلونی‌های اسپرماتوگونی در شرایط in vitro می‌شود. در تحقیق حاضر ۳ الی ۴ روز پس از جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، کلونی‌های فوق ظاهر شدند. پس از بررسی‌های مولکولی ثابت شد که این سلول‌ها مارکرهای اختصاصی اسپرماتوگونی نظیر *Dazl, Plzf, Stra8* را بیان کردند. در همین ارتباط Sadri ardekani و Yamazaki (۳۱و۳۲) اظهار داشتند که کلونی‌های ES-like مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی تمامی مارکرهای پرتوانی را طی تمایز بروز دادند و در ادامه مطالعات پیوند (Transplantation) ویژگی تومورزایی سلول‌های مذکور را نشان دادند که خود دال بر ویژگی پرتوانی و برنامه ریزی مجدد این سلول‌ها به سلول‌های ES-like می‌باشد و در ادامه امکان ایجاد موجود کایمرا (chimaeric animal) نیز از این سلول‌ها حاصل گردید. بنابراین این فرآیند یک مثال واضحی از تمایز سلول‌های پرتوان از سلول‌های پستانداران بالغ می باشد که احتمالا برای مطالعات پایه بیولوژیک و درمان بیماری‌های ژنتیکی (Genetic Diseases) مفید می‌باشد.

در همین راستا نتایج تحقیقات Guan و همکاران (۱۶) نشان داد که کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی توسط مارکرهای SSEA1 و Oct4 مشخص می‌شوند. علاوه بر این برای شناسایی کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی از مارکرهای Stra8 و Mvh استفاده شد. در ادامه پس از ۳ هفته کشت سلول‌های اسپرماتوگونی به‌تدریج کلونی‌های ES-like ظاهر شدند. این کلونی‌ها متشکل از سلول‌های متراکم و با حاشیه سلولی کاملا مشخص و واضح مشابه کلونی‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی هستند. در تحقیق حاضر از یک روش کشت ساده و کوتاه به‌منظور ایجاد سلول‌های ES-like از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط محیط کشت استفاده شد. هر چند که در این راستا روش‌ها و فاکتورهای مختلفی گزارش شده است. اهمیت روش فوق زمانی مشخص می‌گردد که با پروتکول‌های طولانی مدت و وقت‌گیر به‌کار رفته دیگر مقایسه گردد. به‌منظور شناسایی ماهیت کلونی‌های ES-like از ارزیابی‌های مولکولی و ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. در سطح مولکولی مشخص شد که این سلول‌ها مارکرهای پرتوانی نظیر *SOX2, Klf4,Nanog* را بیان می‌کنند. بررسی‌های مولکولی کلونی های ESC نیز موید بیان ژن‌های فوق در این کلونی هستند که این امر دال بر ماهیت پرتوانی سلول‌های فوق است. علاوه بر این نتایج پژوهش حاضر نشان داد که طی تبدیل سلول‌های اسپرماتوگونی به سلول‌های ES-like، بیان ژن‌های اسپرماتوگونی*Plzf Stra8, DAZL* کاهش و در عوض بیان ژن‌های سلول‌های بنیادی افزایش می‌یابد. این مساله همراستا با نتایج Guan و Shinohara (۶ و ۱۶) است که تغییرات گسترده‌ای از ژن‌های را طی تبدیل سلول‌های اسپرماتوگونی به سلول‌های ES-like گزارش کردند. به‌طوری‌که طی تبدیل سلول‌های ES-like از سلول‌های اسپرماتوگونی ژن‌های پرتوانی افزایش و ژن‌های احتصاصی اسپرماتوگونی کاهش می‌یابند. به‌منظور ارزیابی اینکه آیا کلونی‌های ES-like ویژگی پرتوانی را دارند از ایمونوسیتوشیمی Oct4 استفاده شد. سلول‌های بیان کننده Oct4 در کلونی‌های سلول‌های ES-like و ESC به‌وضوح مشاهده شدند که بیانگر خاصیت پرتوانی هر دو تیپ سلولی می‌باشد. یکی از مهم‌ترین فاکتورها در عامل ایجاد خودترمیمی فاکتور نسخه برداری Oct4 (Pou5f1) است که جهت حفظ پرتوانی این

سلول‌ها ضروری می‌باشد. همچنین تحقیقات اخیر نشان داد که تمایز اولیه اپی‌بلاست‌ها به سه لایه زایای جنینی طی گاسترولاسیون به مقادیر مشخص فاکتور نسخه‌برداری (Pou5f1) Oct4 وابسته است. بنابراین طی تمایز سلولی Oct4 در تعیین سرنوشت سلولی (Cell Fate) سلول‌های در حال تمایز نقش مهمی دارد (۲۴). با توجه ظهور سلول‌های ES-like از سلول‌های اسپرماتوگونی و بیان فاکتور نسخه برداری Oct4 در این سلول‌ها، به‌نظر می‌رسد برخی از فاکتورهای موجود در محیط کشت از جمله سرم بتواند از طریق مسیرهای سیگنالی داخل سلولی PI3k/Akt ویژگی‌های خودترمیمی و بنیادی بودن (Stemness) را در سلول‌های ES-like حفظ کند (۳۲) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

با توجه به پروفایل سلولی و مولکولی مشترکی که سلول‌های ES-like با سلول‌های ES دارند لذا می‌توان از این سلول‌ها به‌عنوان یک منبع سلولی جدید برای دستیابی به سلول‌های پرتوان استفاده کرد. به‌نظر می‌رسد که این منبع سلولی جدید قابلیت تمایز به هر سه رده لایه زایای اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی را در شرایط in vitro داشته باشد (۳۲). در مجموع ایجاد کلونی‌های ES-like پرتوان از سلول‌های اسپرماتوگونی و شناسایی آن‌ها در شرایط محیط کشت می‌تواند یک قدم اولیه و ضروری در زمینه تولید سلول‌های پرتوان باشد که خود می‌تواند در تحقیقات پایه‌ای و سلول درمانی مفید و موثر باشد.

در مطالعه حاضر کلونی‌های ES-like از برخی جنبه‌ها مشابه سلول‌های بنیادی جنینی هستند از جمله اینکه دارای فعالیت نسبتا بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز هستند در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در SSCs نسبتا پایین مشاهده شد. همچنین کلونی‌های ES-like مشابه ESC فاکتور نسخه‌برداری (Pou5f1) Oct4 را بیان کردند درحالی‌که این فاکتور در SSCs بروز پیدا نکرد. علاوه بر این مطالعات بیان ژن نشان داد که افزایش بیان ژن‌های پرتوانی نظیر *Nanog*, *Klf4* *SOX2*, و همزمان کاهش بیان ژن های احتصاصی اسپرماتوگونی نظیر *Stra8* Dazl, Plzf در کلونی‌های ES-like حاصله می‌تواند دال بر برنامه ریزی مجدد (Reprogramming) سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط محیط کشت باشد به‌نظر می‌رسد برخی از فاکتورهای محیط کشت نظیر سرم در کنترل مکانیسم این فرآیند نقش داشته باشند که همگی دال بر خاصیت پرتوانی کلونی‌های ES-like می‌باشد.

از سوی دیگر پیشرفت‌های جدید در سلول درمانی منجر به بروز روش‌های نوین علمی در درمان بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات ژنتیکی شده است (۸). امروزه استراتژی‌های سلول درمانی متعددی با استفاده از منابع مختلف مانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی خونی و سلول‌های بنیادی جنینی در دست بررسی و مطالعه‌اند (۹).

در مجموع به‌نظر می‌رسد کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط In vitro باعث ایجاد تغییرات گسترده‌ای در بیان ژن‌ها و مارکرهای اسپرماتوگونی و پرتوانی می‌شود. به‌طوری‌که عناصر محیط کشت سرنوشت این سلول‌ها را به سمت سلول‌های پرتوان سوق می‌دهند. لذا بررسی‌های دقیق تر و جزیی‌تر این تغییرات امری ضروری است که باید مورد توجه محققین قرار گیرد.

شواهد متعددی از جمله یافته‌های مطالعه حاضر فعالیت تکثیری گسترده و پرتوانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را پیشنهاد می‌دهد (۱۰) درواقع این سلول‌ها می‌توانند به حد کافی تکثیر و گسترش یابند که منبع کافی برای تولید سلولی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات ژنتیکی باشند (۶) این ویژگی‌های اسپرماتوگونی استفاده این سلول‌ها را برای درمان های ترمیمی میسر می‌سازد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر کلونی‌های ES-like از برخی جنبه‌ها مشابه سلول‌های بنیادی جنینی هستند از جمله اینکه دارای فعالیت نسبتا بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز هستند در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در SSCs نسبتا پایین مشاهده شد. همچنین کلونی‌های ES-like مشابه ESC فاکتور نسخه‌برداری (Pou5f1) Oct4 را بیان کردند درحالی‌که این فاکتور در SSCs بروز پیدا نکرد. علاوه بر این مطالعات بیان ژن نشان داد که افزایش بیان ژن‌های پرتوانی نظیر *Nanog*, *Klf4* *SOX2*, و همزمان کاهش بیان ژن‌های احتصاصی اسپرماتوگونی نظیر *Stra8* Dazl, Plzf در کلونی های ES-like حاصله می‌تواند دال بر برنامه ریزی مجدد (Reprogramming) سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط محیط کشت باشد به‌نظر می‌رسد برخی از فاکتورهای محیط کشت نظیر سرم در کنترل مکانیسم این فرآیند نقش داشته باشند که همگی دال بر خاصیت پرتوانی کلونی‌های ES-like می‌باشد.

منابع

1. Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. Int J Biochem Cell Biol. 2005; 37(2): 246–250.

2. Mardanpour P, Guan K , Nolte J, Lee J , et al. Potency of germ cells and its relevance for regenerativemedicine. J Anat. 2008; 213(1): 26–29.

3. Nayernia K, Lee J, Wolfgang E, Nolt J, et al. From stem cells to germ cells and from germ cells to stem cells. Iranian J Reprod Med. 2005; 5(2): 41-44.

4. Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. J Nat Cancer. 1967; 38(4): 549-552.

5. Nayernia K. Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions. Cell Res. 2007; 17: 895-897.

6. Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse Testis. Cell. 2004; 119(7): 1001–1012.

7. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatta S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Hum Reprod. 2006; 3: 275–282.

8. Kossack N, Meneses J, Shefi S, Nguyen H, et al. Isolation and characterization of cluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. Stem cells. 2009; 27: 138–149.

9. Donovan P, Miguel M. Turning germ cells into stem cells. Gen Dev. 2003; 13: 463–471.

10. Niels G, Lean J. Seminal discoveries in regenerative medicine: contributions of the male germ line to understanding pluripotency. Hum Mol. 2008; 17: 16-22.

11. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Nat Acad Sci U S A. 2003; 100(20):11457–11462.

12. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol. 2000; 163(1-2): 3–9.

13. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Sci. 2006; 312: 596–600.

14. Baba S, Heike T, Umeda K, Iwasa T, et al. Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25: 1375-1383.

15. Guan G, Nayernia K, Lars M, Wagner S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature. 2006; 440:1199-1203.

16. Guan K, Wanger S, Unsold B, Lars S, et al. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. Circ Res. 2008; 100: 1615-1625.

17. De Rooij DG. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(21): 7939-7940.

18. Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E. In vitro culture of testicular germ cells: regulatory factors and limitations. Growth Factors. 2007; 25(4): 236-52.

19. De Rooij DJ, Mizrak C. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. Development. 2008; 135: 2207–2213.

20. Glaser T, Opitz T, Kischlat T, Konang R, et al. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. Stem Cells. 2008; 26: 2434–2443.

21. Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1- dependent pathway. The FASEBJ. 2009; 23(7): 2076-2087.

22. Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Fröysa B, et al. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. Mol Cell Endocrinol. 1998; 146(1-2): 121-7.

23. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. Andrologia. 2012; 441: 41-55.

24. Hobbs R, Seandel M, Falciatori I, Rafii S, et al. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. Cell. 2010; 142(3): 468–479.

25. Ghasemi HH, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, et al. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. IJFS. 2011; 5(2):104-109.

26. Saitou M, Payer B, Lange UC, Erhardt S, et al. Specification of germ cell fate in mice. Biol Sci. 2003; 358: 1363–1370.

27. Izadyar F, Pau F, Marh J, Slepko N, et al. Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. Reprod. 2008; 135: 771–784.

28. Nayernia K, Nolte J, Michelmann H, Lee J, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise

to male gametes that can generate offspring mice. Dev cell. 2006; 11(1): 125-132.

29. Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reprod. 2003; 126(6): 765–774.

30. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell. 2011; 146(4): 519–532.

31. Yamazaki Y. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005; 102: 11361–11366.

32. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, et al. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. JAMA2011; 305: 2416–2418.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2014; 5(2): 147-155

Original Article

Characterization of Pluripotency Markers Expression on ES-like Cells derive from Spermatogonia Stem Cells and Embryonic Stem Cells

Ghasemi Hamidabadi H, Ph.D., Nazm Bojnordi M, Ph.D.[1*], Rezaei N, Ph.D.

- Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

* Email corresponding author: bojnordi@modares.ac.ir

Received: 13 Jul. 2013 Accepted: 17 Dec. 2013

Abstract

Aim: Recently, attention has been diverted to the pluripotency characteristic of Spermatogonia Stem Cells (SSCs) in in-vitro culture. The aim of this study was to evaluate the morphological and molecular genetics changes of differentiated SSCs to Embryonic-like Stem cell (ESC).

Material and Methods: The SSCs were collected from neonatal mouse testis via a two-step mechanical and enzymatic digestion and cultured in DMED containing 15% FBS. ES-like cells colonies was appeared in the fifth passage. The expression of pluripotency and spermatogonia specific genes; *Nanog, SOX2, Klf4, Stra8, DAZL, Plzf* as well as the expression of puripotency markers Oct4 and Alkaline Phosphatase Activity (ALP) of ESC respectively was investigated using RT-PCR and immunocytochemical techniques and compared with ESCs.

Results: The pluripotent characteristic of ES-like cells derived from SSCs was confirmed based on morphological investigation and high expression of ALP as well as pluripotency marker Oct4. The expression of specific spermatogonia genes like *Stra8, DAZL, Plzf* was decreased and the expression of pluripotency genes such as *Nanog, SOX2, Klf4* was increased during the differentiation of SSCs to ES-like cells.

Conclusion: In vitro culture of SSCs was conformed to induced ES-like cells. This process was accompanied by wide alteration in molecular profile expression of specific spermatogonia and pluripotency genes. In over all, SSCs can be considered as an opening window to generate pluripotent stem cell.

Keywords: Spermatogonia Stem Cells**,** ES-like cells, Embryonic Stem Cell**,** Pluripotency