

کارایی اکسی توسین در تمایز سلول‌های بنیادی P19cl6 به سلول‌های قلبی ضربان‌دار

دکتر فردین فتحی^۱، دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد^۲، دکتر بهزاد احسن^۳، مسعود علاسوند^۴، دکتر محمد جعفر رضایی^۵، لیلا پیر مرادی^۶، دکتر تاکا یوکی آسهارا^۶

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های P19cl6 یکی از ساب کلون‌های سلول‌های P19 است که اخیراً جدا سازی شده است. این سلول‌ها بیشتر ویژگی مزودرمی دارند و قادرند بدون تشکیل جسم شبه رویانی به سلول‌های قلبی تمایز یابند. پژوهش حاضر به منظور بررسی کارایی اکسی توسین در تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی در دو حالت تک لایه (مونولایر) و جسم شبه رویانی و نیز تولید سلول‌های قلبی ضربان‌دار و نشاندار شده با پروتئین فلورسنت انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. ابتدا سلول‌ها به دو شکل مونولایر و جسم شبه رویانی تحت تاثیر اکسی توسین با غلظت $10^{-7} \times 1$ مول و در گروه کنترل مثبت تحت تاثیر DMSO با غلظت ۱ درصد قرار گرفتند. سپس روند القای تمایز سلول‌ها به سلول‌های قلبی با انجام ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. در ادامه پژوهش، پلاسمید pEGFP-C1 با استفاده از الکتروپوریشن به داخل سلول‌های بنیادی P19cl6 ترانسفکت شده و از اکسی توسین جهت تمایز سلول‌های نشاندار شده به سلول‌های قلبی استفاده شد.

یافته‌ها

مشاهدات انجام شده در این تحقیق نشان داد در گروه آزمایش، اجسام شبه رویانی تهیه شده از سلول‌ها تحت تاثیر اکسی توسین به سلول‌های قلبی تمایز پیدا کردند در حالی که سلول‌های کشت داده شده به صورت مونولایر قادر به تمایز به سلول‌های قلبی نبودند. در گروه کنترل سلول‌ها به هر دو شکل مونولایر و جسم شبه رویانی تحت تاثیر DMSO به سلول‌های قلبی تمایز یافتند. در بخش دوم پژوهش، سلول‌های P19cl6 به کمک الکتروپوریشن با کارایی بالا با ژن پروتئین فلورسنت سبز تحت تاثیر اکسی توسین ترانسفکت شده به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز پیدا کردند. ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی به عمل آمده ماهیت سلول‌های قلبی را تایید کرد.

نتیجه گیری

آن چه از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت این است که هنگام به کارگیری اکسی توسین، تشکیل جسم شبه رویانی جهت تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی ضروری است و نیز این سلول‌ها پس از ترانسفکت شدن با ژن پروتئین فلورسنت سبز، قادرند به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز یابند. لذا این سلول‌ها مدل مناسبی جهت مطالعات مبتنی بر پیوند سلولی در مدل‌های آزمایشگاهی بیماری قلبی می‌باشند.

کلمات کلیدی: تمایز سلولی، سلول‌های قلبی، اکسی توسین، سلول‌های بنیادی، P19

تاریخ دریافت: ۱۵/۲/۵

تاریخ پذیرش: ۱۵/۱۱/۲

۱- مؤلف مسؤل: PhD علوم تشریح - آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان - صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶

۲- PhD علوم تشریح - پژوهشکده رویان

۳- متخصص بیهوشی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۴- کارشناس ارشد فیزیولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۵- PhD علوم تشریح - آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۶- متخصص قلب و عروق - انستیتو Riken ژاپن - مرکز بیولوژی تکاملی (CDB)

مقدمه

سلول‌های سرطانی جنینی P19 موش، سلول‌های بنیادی چند استعدادی هستند که قادرند در هنگام کشت حالت تمایز یافتگی خود را حفظ کنند یا این که تحت تاثیر عوامل القایی به سلول‌های گوناگون مشتق از سه لایه جنینی از جمله سلول‌های قلبی تمایز یابند (۱). سلول‌های P19 می‌توانند به راحتی از نظر ژنتیکی دست‌کاری شده که از این طریق می‌توانند باعث از دست رفتن بیان یا بیان بیش از حد یک ژن خاص شوند. لذا به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مذکور، سلول‌های P19 سلول‌های مناسبی برای بررسی آن دسته از مکانیسم‌های مولکولی محسوب می‌شوند که حوادث تکاملی را در طی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عضلانی قلبی یا اسکلتی کنترل می‌کنند (۱).

اخیراً گیرنده اکسی توسین در قلب کشف شده است. فعال شدن گیرنده اکسی توسین، باعث رها سازی پپتید ناتوریتیک دهلیز (ANP) می‌شود که در تنظیم فشار خون و رشد سلولی درگیر می‌باشد. بالا رفتن سطح اکسی توسین در قلب جنین و نوزادان در مرحله‌ای از هیپرپلازی شدید سلول‌های عضلانی قلبی، این فرضیه را تقویت می‌نماید که اکسی توسین می‌تواند در تمایز سلول‌های قلبی نقش داشته باشد. اخیراً پیشنهاد شده است که اکسی توسین به عنوان عاملی در جهت رشد و تمایز سلولی نیز ایفای نقش می‌کند (۲). اثرات ضد تکثیر اکسی توسین که با واسطه رسپتور اکسی توسین صورت می‌گیرد، در سلول‌های سرطان پستان و سایر تومورها اثبات شده است (۳-۵). بر خلاف اثرات آن بر روی سلول‌های مذکور، اثرات میتوژنیک آن نیز توصیف شده است به طوری که منجر به پرولیفراسیون تیموسیت‌ها و تحریک میتوز در اپی تلیوم پروستات، اندوتلیوم عروق و تروفوبلاست‌ها می‌شود (۱۰-۶). هم چنین گزارش شده است که اکسی توسین باعث افزایش تمایز سلول‌های میوایی تلیال و افزایش تکثیر سلول‌های غدد پستانی موش می‌شود (۲). در راستای بررسی تاثیر اکسی توسین بر تکامل قلب، نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد چنانچه اکسی توسین با دوز بالا به جنین تزریق شود، ممکن است در نمونه‌های انسانی

و موش‌های صحرایی منجر به اختلال در رشد قلب شود. از طرف دیگر بلوکه کردن گیرنده‌های اکسی توسین به کمک آنتاگونیست‌های اختصاصی، در مراحل اولیه تکامل جوجه منجر به مالفورمیشن قلبی در جنین‌ها می‌شود (۲). اخیراً پس از موفقیتی که در کشف گیرنده اکسی توسین در سلول‌های قلبی حاصل شد، پاکوبین و همکاران و پس از ایشان حاتمی و همکاران توانستند در راستای ارزیابی توانایی اکسی توسین در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی، سلول‌های P19 را تحت تاثیر اکسی توسین به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز دهند. به طوری که نتایج ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و مولکولی، بیان آنتی‌ژن‌های MHC، $DHPR-\alpha$ ، آلفا اکتینین، دسمین و کاردیک تروپونین I و نیز ژن‌های ANP و OTR (رسپتور اکسی توسین) را تایید کرد (۱۱، ۲). هم‌چنین در هر دو مطالعه در گروه اکسی توسین نسبت به گروه DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) سلول‌های قلبی ضربان‌دار به مدت ۲ روز زودتر در محیط کشت ظاهر شدند. رده سلولی P19c16 یکی از ساب کلون‌های سلول‌های P19 است که در سال ۱۹۹۶ توسط هابارا - اکوبو تحت شرایط کشت سلول‌های مزودرمی، جداسازی شد (۱۲). این سلول‌ها قادرند بدون گذر از مرحله تشکیل اجسام شبه رویانی، به شکل تک لایه و تحت تاثیر دی‌متیل سولفوکسید به سلول‌های قلبی تمایز یابند، در حالی که جهت تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های قلبی تشکیل اجسام شبه رویانی کاملاً ضروری است. از طرف دیگر سلول‌های P19c16 تحت تاثیر اسید رتینوئیک قادرند با کارایی پایین به سلول‌های عصبی تمایز یابند، لذا سلول‌های P19c16 بیشتر از آن که سلول‌هایی با ویژگی مزودرمی باشند، سلول‌های مناسبی جهت تمایز به سلول‌های قلبی محسوب می‌شوند. تاکنون مشخص نشده است که اکسی توسین از طریق کدام مکانیسم‌های داخل سلولی، سلول‌های P19 را به سلول‌های قلبی تمایز می‌دهد. یکی از نتایجی که از مطالعه پاکوبین و همکاران حاصل شد این بود که چنانچه رسپتور اکسی توسین که به میزان کمی در سلول‌های P19 بیان می‌شود با به کارگیری آنتاگونیست آن مهار شود، هم در گروه اکسی توسین و هم در گروه DMSO روند تمایز

وجود داشت. نظر به این که تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی به شکل تک لایه به وسیله DMSO قبلاً انجام شده است، در گروه آزمایش از اکسی توسین و در گروه کنترل مثبت از DMSO جهت تمایز سلول‌ها استفاده شد. در هر دو گروه سلول‌ها به دو شکل تک لایه و اجسام رویانی تحت تاثیر عوامل القایی مذکور قرار گرفتند. در هر دو گروه به منظور القای تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی در وضعیت تک لایه، پس از پاساژ دوم سلول‌ها با تراکم 8×10^4 سلول در هر خانه به دیش‌های ۶ خانه فالكون منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده برای القای تمایز سلول‌های قلبی در گروه آزمایش اکسی توسین با غلظت 1×10^{-7} مول، و در گروه کنترل مثبت DMSO با غلظت ۱ درصد به محیط کشت معمولی سلول‌ها اضافه شد و هر دو روز یک بار محیط کشت حاوی عوامل القایی با محیط کشت جدید و مشابه تعویض شد. به طور هم‌زمان جهت تهیه اجسام رویانی در هر دو گروه سلول‌ها با تراکم 1×10^5 سلول در میلی لیتر به ظرف‌های باکتریولوژیک ۱۰۰ میلی متری انتقال داده شدند. محیط کشت مورد استفاده برای القای تمایز سلول‌ها به سلول‌های قلبی کاملاً مشابه حالتی بود که سلول‌ها به صورت تک لایه کشت داده شدند و به آن اشاره شد. با این تفاوت که محیط کشت سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت با محیط کشت مشابه که حاوی سرم و عوامل القایی (اکسی توسین یا DMSO) بود تعویض شد و بعد از گذشت ۴ روز اجسام رویانی به ظرف‌های کشت سلول‌های چسبیده یعنی همان دیش‌های ۶ خانه‌ای که جهت کشت سلول‌ها به صورت تک لایه از آن‌ها استفاده شد منتقل شدند و تا پایان آزمایش از محیط کشت حاوی سرم اما فاقد عوامل القایی، جهت کشت آن‌ها استفاده شد.

کشت و ترانسفکشن سلول‌های P19cl6

الکتروپوریشن سلول‌ها با استفاده از دستگاه *Gene pulser* II:

الکتروپوریشن با شرایط $300 \mu\text{F}$ ، 500 V انجام شد. جهت انجام ترانسفکشن، پلاسمید pEGFP-C1 به شکل خطی مورد استفاده قرار گرفت و خطی کردن پلاسمید با

مختل شده و سلول‌های P19 به سلول‌های قلبی تمایز پیدا نمی‌کنند. از طرف دیگر سطح بیان رسپتور اکسی توسین در گروهی از سلول‌ها که تحت تاثیر DMSO به سلول‌های قلبی تمایز می‌یابند بیشتر می‌شود (۲). لذا این نتایج تا حدودی می‌تواند بیانگر این باشد که اکسی توسین و DMSO از طریق مکانیسم‌های یکسانی القای تمایز به سلول‌های قلبی را باعث می‌شوند. در این پژوهش با این فرض که احتمالاً مکانیسم‌های مولکولی درگیر در القای تمایز سلول‌های قلبی در حالتی که سلول‌های P19cl6 به دو صورت تک لایه و جسم شبه رویانی به سلول‌های قلبی تمایز می‌یابند ممکن است متفاوت باشد، از اکسی توسین جهت تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی در هر دو حالت تک لایه و جسم شبه رویانی استفاده شد و نتایج آن با گروه کنترل مثبت مقایسه شد. به عبارت دیگر توانایی اکسی توسین در تمایز سلول‌های P19cl6، هنگام کشت آن‌ها به صورت تک لایه، به سلول‌های قلبی بررسی شد. هم‌چنین در مرحله دیگری از پژوهش نظر به اهمیتی که نشان‌دار کردن سلول‌ها جهت مطالعات مبتنی بر پیوند سلولی دارد و نیز نظر به ویژگی‌های پروتئین فلورسنت سبز، از روش الکتروپوریشن جهت انتقال ژن پروتئین فلورسنت سبز به سلول‌های P19cl6 و گرفتن بیان دایم ژن مذکور از این سلول‌ها استفاده شد و توانایی سلول‌های ترانسفکت شده در تمایز به سلول‌های قلبی بررسی شد.

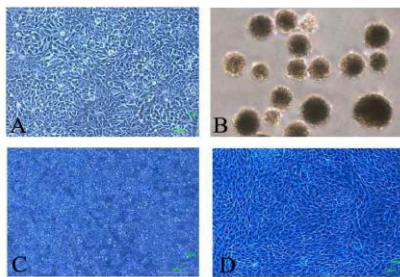
مواد و روش‌ها

رده سلولی P19cl6 از بانک سلولی مرکز بیولوژی تکاملی کوبه ژاپن تهیه شد. کشت و تکثیر این سلول‌ها مطابق روش هابارا - اکوبو انجام گرفت (۱۲). به طور خلاصه جهت رشد و تکثیر این سلول‌ها از محیط کشت α -MEM (Minimal Essential Medium) (جیبکو) حاوی ۱۰٪ سرم FBS، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین و دیش‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری استفاده شد و به منظور پاساژ سلول‌ها، مخلوط مایع تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد و EDTA با غلظت ۴ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام مرحله اول این تحقیق دو گروه مورد مطالعه

MHC (هر دو با غلظت $\frac{1}{100}$) در دمای اتاق استفاده شد. در مورد تروپونین I در مرحله بعد، پس از شستشوی سلول‌ها به تعداد دو بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، سلول‌ها با آنتی‌بادی سوم کونژوگه به آویدین - FITC (فارمین ژن) با غلظت $\frac{1}{50}$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. لازم به ذکر است در مورد سلول‌هایی که با آنتی‌بادی تروپونین I بررسی شدند، در اولین مرحله از ایمونوسیتوشیمی از بافر بلاک کننده حاوی بافر فسفات و ۱۰ درصد سرم، تریتون X ۰/۰۲٪ و آویدین جهت بلوکه کردن سلول‌ها استفاده شد. نهایتاً پس از سه بار شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه از Vector hard set که محتوی رنگ فلورسنت دایمی بود جهت ماونت کردن سلول‌ها استفاده شد و سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و عکس‌برداری شدند.

یافته‌ها

نتایج مشاهده‌های به عمل آمده در این پژوهش نشان داد در گروه آزمایش که در آن سلول‌ها به دو شکل تک لایه و اجسام شبه رویانی تحت تاثیر اکسی توسین قرار گرفتند، فقط در گروه اجسام شبه رویانی سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی ضربان‌دار متمایز شدند.



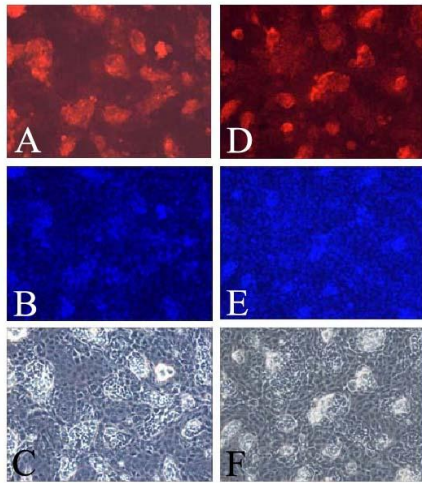
تصویر ۱: A: تصاویر میکروسکوپ نوری از کشت تک لایه‌ای سلول‌های P19cl6 در روز چهارم، $\times 200$. B: تصویری تجمعات سلولی تشکیل شده از این سلول‌ها در روز چهارم، $\times 100$. C: در این تصویری سلول‌های نکروتیک به صورت معلق در محیط کشت دیده می‌شوند، این سلول‌ها در نتیجه تاثیر اکسی توسین بر روی سلول‌های کشت داده شده به صورت تک لایه ایجاد شده‌اند، روز ششم، $\times 200$. D: تصویری سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز یافته از اجسام شبه رویانی سلول‌های P19cl6 که تحت تاثیر اکسی توسین ایجاد شده‌اند، روز هشتم، $\times 200$.

استفاده از آنزیم ApaL1 صورت گرفت. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، به محیط کشت سلول‌ها آنتی‌بیوتیک G418 اضافه شد و کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جهت تمایز به سلول‌های قلبی جمع‌آوری و تکثیر شدند. تشخیص بیان پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت صورت گرفت. سلول‌های حامل ژن پروتئین فلورسنت جهت تشکیل جسم شبه رویانی به پتری دیش‌های باکتریولوژیک منتقل شده و تحت تاثیر اکسی توسین با غلظت 1×10^{-7} مول به سلول‌های قلبی تمایز داده شدند.

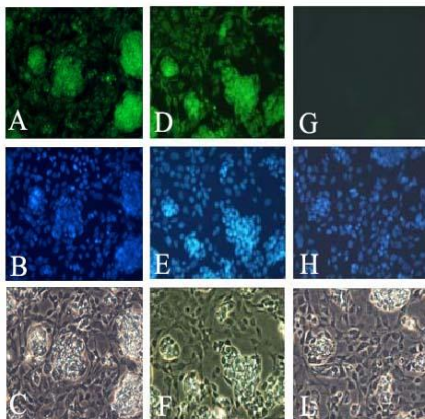
ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی سلول‌های تمایز یافته:

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس و فلورسنت جهت ارزیابی مورفولوژیک سلول‌ها استفاده شد و به کمک دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ از سلول‌ها عکس گرفته شد.

به منظور ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها، در روز دوازدهم در گروه‌هایی که سلول‌های قلبی ضربان‌دار مشاهده شده بود، بخشی از سلول‌ها به کالچر اسلایدهای چهارخانه‌ای که کف آن‌ها به وسیله ژلاتین پوشیده شده بود منتقل شدند و بعد از گذشت چند ساعت جهت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی آماده شدند. پس از دور ریختن محیط رویی سلول‌ها، سلول‌ها با PBS به خوبی شسته شده و با استفاده از پارافمالدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. سپس با استفاده از بافر فسفات حاوی تریتون X-100 (۰/۰۲٪ سیگما) دوبار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، سلول‌ها شستشو داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بافر بلاک کننده (بافر فسفات حاوی ۱۰ درصد سرم و تریتون X ۰/۰۲٪) قرار داده شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه (تروپونین I)، با غلظت $\frac{1}{100}$ و MHC با غلظت $\frac{1}{50}$ به ترتیب به مدت ۱ و ۲ ساعت به سلول‌ها اعمال شدند. سپس سلول‌ها با بافر بلاکینگ محتوی تریتون X و سرم ۲ درصد، سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. از آنتی‌بادی‌های ثانویه متصل به بیوتین و cy3 به ترتیب جهت اتصال به آنتی‌بادی اولیه بر علیه تروپونین I و

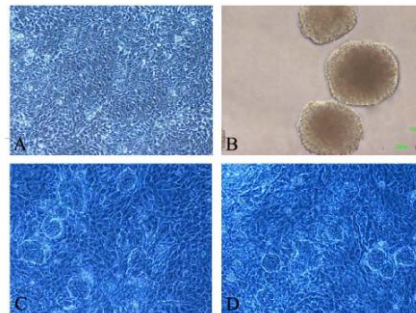


تصویر ۳: بررسی حضور آنتی‌ژن اختصاصی سلول‌های قلبی (MHC) به کمک روش ایمونوسیتوشیمی (بزرگ‌نمایی $\times 200$)، تصاویر A, B و C مربوط به گروه آزمایش و تصاویر D, E و F مربوط به گروه کنترل مثبت است. A و D: تصاویر سلول‌های قلبی تمایز یافته را نشان می‌دهند که واکنش‌شان به آنتی‌بادی بر علیه MHC مثبت شده است. B و E: هسته سلول‌ها را نشان می‌دهند که با دایمی رنگ شده‌اند. C و F: سلول‌های تمایز یافته با میکروسکوپ فاز کنتراست، مشاهده و عکس‌برداری شده‌اند.



تصویر ۴: بررسی حضور آنتی‌ژن تروپونین I در سلول‌های قلبی تمایز یافته به کمک ایمونوسیتوشیمی (بزرگ‌نمایی $\times 200$)، تصاویر A, B و C مربوط به گروه آزمایش، تصاویر D, E و F مربوط به گروه کنترل مثبت و تصاویر G, H و I مربوط به گروه کنترل منفی است. A, D و G: تصاویر سلول‌های قلبی تمایز یافته را نشان می‌دهند که واکنش‌شان به آنتی‌بادی بر علیه تروپونین I مثبت شده است. B, E و H: هسته سلول‌ها را نشان می‌دهند که با دایمی رنگ شده‌اند. C, F و I: سلول‌های تمایز یافته با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده و عکس‌برداری شده‌اند.

در حالی که در گروهی که سلول‌ها به شکل تک لایه بودند، نه تنها سلول‌های قلبی حاصل نشدند بلکه بعد از گذشت ۷ الی ۸ روز به تدریج تعداد سلول‌های معلق و مرده زیاد شده و اکثریت سلول‌ها از کف دیش‌ها کنده شدند (تصویر ۱). در گروه کنترل مثبت که از DMSO جهت القای تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی استفاده شد، در هر دو گروهی که سلول‌ها متشکل از اجسام شبه رویانی و یا به صورت تک لایه بودند، سلول‌های قلبی ضربان‌دار مشاهده شد با این تفاوت که در گروه اجسام شبه رویانی سلول‌های قلبی ضربان‌دار در روز نهم اما در سلول‌های تک لایه بعد از روز دهم در محیط کشت دیده شدند (تصویر ۲).



تصویر ۲: A: تصاویر میکروسکوپ نوری از کشت تک لایه‌ای سلول‌های P19cl6 در روز چهارم. B: تصویر تجمعات سلولی تشکیل شده از این سلول‌ها در روز چهارم. C: تصویر سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز یافته از کشت تک لایه‌ای سلول‌های P19cl6 تحت تاثیر DMSO، روز دوازدهم. D: تصویر سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز یافته از اجسام شبه رویانی تهیه شده از سلول‌های P19cl6 تحت تاثیر DMSO، روز نهم. بزرگ‌نمایی کلیه عکس‌ها $\times 200$ است.

هم در گروه کنترل مثبت و هم در گروه آزمایش از روز ششم به بعد، سلول‌هایی با مورفولوژی تمایز یافته در محیط کشت ظاهر شده و بعد از ظاهر شدن سلول‌های قلبی ضربان‌دار به تدریج در ادامه آزمایش بر تعداد آن‌ها افزوده شد. نتایج مشابهی پس از چهار بار آزمایش به دست آمد. نتایج به دست آمده از ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد که در گروه‌هایی که سلول‌های قلبی ضربان‌دار مشاهده شدند، پاسخ سلول‌های حاصل از تمایز به آنتی‌بادی‌های استفاده شده در این پژوهش یعنی آنتی‌بادی بر علیه MHC و تروپونین I در روز دوازدهم

سلول‌های قلبی ضربان‌دار هم در روز هشتم مشاهده شدند که از این سلول‌ها عکس‌برداری و فیلم‌برداری به عمل آمد (تصویر ۵).

بحث

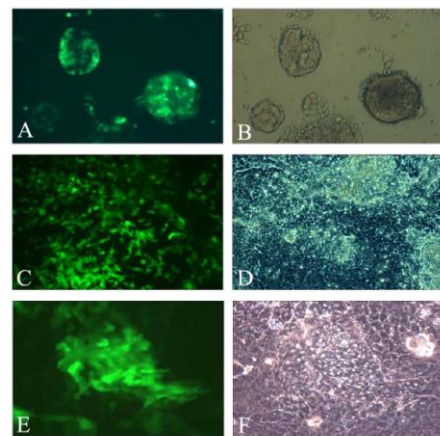
نتایج این پژوهش نشان داد هنگامی که سلول‌های P19cl6 به صورت تک لایه‌ای کشت داده می‌شوند اکسی توسین اضافه شده به محیط کشت آن‌ها با غلظت 1×10^{-7} مول باعث القای تمایز سلول‌های قلبی نمی‌شود در حالی که اثر دادن غلظت مشابه به اجسام شبه رویانی تهیه شده از سلول‌ها، باعث تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی ضربان‌دار می‌شود که این از طریق بررسی ایمونوسیتوشیمی آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های قلبی یعنی آنتی‌ژن‌های MHC و تروپونین I هم تایید شد.

پاکوین و همکاران پس از شناسایی گیرنده اکسی توسین در سلول‌های قلبی، در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار نشان دادند چنانچه اکسی توسین با غلظت 1×10^{-7} به محیط کشت اجسام شبه رویانی تهیه شده از سلول‌های P19 اضافه شود، این سلول‌ها به سلول‌های قلبی تمایز می‌یابند و در مقایسه با گروه کنترلی که عامل القایی آن DMSO است، سلول‌های قلبی ضربان‌دار در محیط کشت زودتر ظاهر می‌شوند (۲). سلول‌های P19cl6 به عنوان یکی از ساب کلون‌های سلول‌های P19 که از طریق کشت سلول‌های P19 در شرایط مزودرمی حاصل شده‌اند، قادرند بر خلاف سلول‌های P19 در حالت تک لایه‌ای هم تحت تاثیر DMSO به سلول‌های قلبی تمایز پیدا کنند اما بر خلاف DMSO، اکسی توسین قادر نیست سلول‌های P19cl6 را هنگام کشت به صورت تک لایه، به سلول‌های قلبی تمایز بدهد. لذا اگر چه مکانیسم‌ها، مسیرها و سیگنال‌های داخل سلولی متعددی که هنگام استفاده از اکسی توسین، تمایز سلول‌های بنیادی رویانی به سلول‌های قلبی را کنترل می‌کنند تا به حال به طور کامل شناسایی نشده‌اند اما نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند بیانگر این واقعیت باشد که هنگام استفاده از اکسی توسین و DMSO به عنوان عوامل القایی سلول‌های قلبی، احتمالاً مکانیسم‌ها و مسیرهای داخل سلولی کاملاً مشابهی روند تمایز

مثبت بود (تصاویر ۳ و ۴).

در حالی که در گروه‌هایی که از هر نظر مشابه سلول‌های گروه آزمایش و کنترل مثبت بودند اما ارزیابی ایمونوسیتوشیمی آن‌ها بدون اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه انجام شد (کنترل منفی جهت ایمونوسیتوشیمی)، هیچ گونه سیگنال فلورسنتی که دال بر کاذب بودن جواب در گروه‌های آزمایش یا کنترل مثبت باشد مشاهده نشد (تصویر ۴).

در بررسی‌های به عمل آمده با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت ۲۴ الی ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکت شده با ژن پروتئین فلورسنت سبز مشاهده شدند. اگر چه بررسی کمی جهت مشخص نمودن تعداد سلول‌هایی که ژن پروتئین فلورسنت سبز را بیان می‌کردند انجام نشد اما به طور تقریبی می‌توان گفت که حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد سلول‌ها قادر به بیان ژن مذکور بودند. در بخشی از پژوهش که سلول‌های نشان‌دار شده به سلول‌های قلبی تمایز داده شدند، از روز ششم به بعد سلول‌هایی با مورفولوژی تمایز یافته ظاهر شده و



تصویر ۵: A: تصویری از تجمعات سلولی تشکیل شده از سلول‌های P19cl6 نشان‌دار شده با GFP در روز چهارم، $\times 200$. C: تصویری از سلول‌های نشان‌دار شده با GFP پس از انتقال آن‌ها از پتری دی‌ش‌های باکتریولوژی‌ک به ظروف کشت مخصوص سلول‌های چسبیده، روز ششم، $\times 200$. E: تصویری از سلول‌های قلبی ضربان‌داری که از سلول‌های نشان‌دار شده با GFP تحت تاثیر اکسی توسین حاصل شده‌اند، روز دهم، $\times 200$.

قلبی ضربان دار مشاهده شدند. اگر چه حوادث مولکولی که در طی تشکیل اجسام شبه رویانی رخ می دهند و برای تمایز سلول های P19 به سلول های قلبی هم ضروری می باشند کاملاً شناخته شده نیستند اما اسکر جانس و همکاران گزارش کردند که القای بیان ژن NKX 2-5 می تواند کاردیومیوژنیزیس را در اجسام شبه رویانی متشکل از سلول های P19 القا کند در حالی که قادر به القای این فرایند در سلول های P19 به صورت تک لایه نیست (۲۱)، اضافه کردن BMP (Bone Morphogenetic Protein) (۲۰). به محیط کشت سلول ها نیاز به تشکیل اجسام شبه رویانی را مرتفع کرده و لذا سلول های P19 که ژن NKX 2-5 را بیان کرده و به صورت تک لایه کشت داده شده اند هم به سلول های قلبی تمایز می یابند (۲۲). این مساله بیانگر این است که عبور سلول ها از مرحله تشکیل اجسام شبه رویانی جهت تولید سیگنالینگ BMP کاملاً ضروری می باشد (۱۳). چوی و همکاران در توجیه اثر القایی ۵-آزاسیتیدین چنین استدلال کردند که احتمالاً این ماده از طریق تغییر بیان مولکول های سیگنالینگ BMP در سلول های کشت داده شده به صورت تک لایه، نیاز به تشکیل اجسام شبه رویانی و متعاقب آن تنظیم فعالیت NKX 2-5 را مرتفع کرده و لذا القای تمایز سلول های کشت داده شده به صورت تک لایه را به سلول های قلبی امکان پذیر می سازد (۱۳). یکی دیگر از نتایج این مطالعه این بود که اضافه کردن اکسی توسین به محیط کشت سلول های تک لایه نه تنها باعث تمایز آن ها به سلول های قلبی نمی شود بلکه باعث افزایش قابل توجه سلول های نکروتیک در محیط کشت می گردد. در مطالعه چوی و همکاران هم اگر چه عامل القایی مورد استفاده آن ها متفاوت بود، گزارش شد که اضافه کردن غلظت های بالای ۵-آزاسیتیدین به محیط کشت سلول های تک لایه باعث افزایش مرگ سلول ها می شود، در حالی که اضافه کردن غلظت های مشابه از ۵-آزاسیتیدین به محیط کشت اجسام شبه رویانی تهیه شده در حضور DMSO باعث مرگ سلولی نمی شود (۱۳). لذا این احتمال وجود دارد که میزان اکسی توسین اضافه شده به محیط کشت سلول های تک لایه زیاد بوده و باعث مرگ سلول ها شده است. اگر چه میزان آن

سلول های بنیادی رویانی به سلول های قلبی را کنترل نمی کنند. اخیراً چوی و همکاران گزارش کردند که ۵-آزاسیتیدین قادر است سلول های P19 را در حالت تک لایه به سلول های قلبی تمایز دهد، به طوری که در روز دوازدهم آزمایش سلول های قلبی ضربان دار ظاهر می شوند (۱۳). ۵-آزاسیتیدین یک عامل مؤثر در پدیده هیپومیتلاسیون DNA بوده و از این طریق قادر به بیان ژن های خاصی می باشد (۱۵، ۱۴). گزارش هایی وجود دارد که نشان می دهند، ۵-آزاسیتیدین هم چنین قادر به تمایز سلول های مزانشیمی و سلول های ES (امبریونیک استم سل) انسانی به سلول های قلبی می باشد (۱۸-۱۶). اگر چه چوی و همکاران از ۵-آزاسیتیدین به تنهایی جهت تمایز اجسام شبه رویانی متشکل از سلول های P19 به سلول های قلبی استفاده نکردند اما آن ها در گزارش خود اظهار نمودند که بعد از روز ششم سلول هایی با فنوتیپ تمایز یافته و بعد از روز نهم ساختمان هایی شبیه به اجسام شبه رویانی که متشکل از چند لایه سلول هستند در محیط کشت ظاهر می شوند و نهایتاً بعد از روز دوازدهم سلول های ضربان دار ایجاد می شوند (۱۳). از طرف دیگر آن ها گزارش کردند که در گروه کنترل هم سلول هایی با ویژگی های مورفولوژیک مشابه ظاهر شده و حتی به طور اتفاقی سلول های قلبی ضربان دار هم در روزهای مشابهی با گروه آزمایش مشاهده می شوند، لذا آن ها احتمال دادند که تراکم سلولی بالا یکی از شرایط ضروری برای تمایز سلول های قلبی باشد و حتی اظهار کردند که احتمالاً تمایز سلول های P19cl6 در حالت تک لایه به سلول های قلبی (تحت تاثیر DMSO) به این دلیل است که سلول ها با تراکم بالا کشت داده شده و تحت تاثیر عامل القایی قرار می گیرند (۱۳). مروری بر مطالعات انجام شده نشان می دهد که تهیه اجسام شبه رویانی یکی از شرایط ضروری برای تمایز سلول های P19 به سلول های قلبی می باشد (۱۹). در این مطالعه نیز از چهار بار آزمایش، یک بار از سلول ها به صورت کنترل منفی استفاده شد و از آن ها اجسام شبه رویانی تهیه شد. با این که هیچ گونه عامل القایی به محیط کشت آن ها اضافه نشد اما به طور اتفاقی سلول هایی با مورفولوژی مشابه گروه کنترل مثبت و حتی سلول های

با وجود این که پلاسمید مورد استفاده حامل پروموتور سلول‌های قلبی نبود، سلول‌های قلبی ضربان‌دار حامل ژن GFP با کارایی بالا فراهم شد. لازم به ذکر است که پلاسمید و روش مورد استفاده جهت ترانسفکشن سلول‌ها در این دو مطالعه یکسان نبود. در مطالعه حاضر از پلاسمید pEGFP-C1 و روش الکتروپوریشن جهت انتقال سلول‌ها استفاده شد در حالی که در مطالعه قلبی پلاسمید و روش مورد استفاده به ترتیب pEGFP-N2 و کلسیم فسفات بود (۲۳). پروتئین GFP به عنوان یکی از مهم‌ترین عواملی که جهت نشان‌دار کردن سلول‌ها برای رسیدن به اهداف مختلف استفاده می‌شود به دلیل ساختاری که دارد، در شرایط سخت نظیر pH های بسیار بالا یا پایین، غلظت‌های ۶ مولار گوانیدین کلراید و ۸ مولار اوره و در دماهای کمتر از ۶۵°C (در SDS یک درصد دماهای کمتر از ۴۵°C)، خصوصیت فلورسانس خود را حفظ می‌کند و لذا از این لحاظ بر اکثر عوامل موجود جهت نشان‌دار کردن سلول‌ها مزیت دارد (۲۴).

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که اکسی توسین با غلظت 1×10^{-7} ، باعث تمایز سلول‌های P19cl6 به سلول‌های قلبی ضربان‌دار می‌شود در حالی که اعمال غلظت مذکور به سلول‌های P19cl6 در وضعیت تک لایه نه تنها باعث تمایز سلولی نمی‌شود بلکه باعث مرگ سلول‌ها می‌گردد. هم‌چنین سلول‌ها با به کارگیری پلاسمید pEGFP-C1 و روش الکتروپوریشن با کارایی بالا ترانسفکت شده و اجسام شبه رویانی حاصل از سلول‌های نشان‌دار شده با GFP تحت تاثیر اکسی توسین با کارایی بالا به سلول‌های قلبی تمایز می‌یابند.

تشکر و قدردانی

در این پژوهش از کمک‌ها و مساعدت پرسنل محترم دپارتمان Stem cell and translational research واقع در مرکز بیولوژی تکاملی، انستیتو Riken کشور ژاپن بهره‌مند شدیم که بدین وسیله از ایشان قدردانی می‌شود.

کاملاً مشابه میزان اضافه شده به اجسام شبه رویانی در این مطالعه و نیز مشابه مطالعه پاکوین و همکاران و نیز حاتمی و همکاران بود اما با این فرض که سلول‌های P19cl6 متفاوت از سلول‌های P19 می‌باشد شاید بتوان گفت که حساسیت دو نوع سلول مذکور نسبت به اکسی توسین مشابه نیست (۱، ۲). احتمال فوق با یادآوری این واقعیت که اکسی توسین دارای اثر ضد تکثیری بر روی بعضی سلول‌ها می‌باشد قوی‌تر می‌شود (۵-۲). آن چه مسلم است این است که انجام مطالعات بیشتر جهت روشن شدن مکانیسم اثر القایی اکسی توسین در تمایز سلول‌های قلبی ضروری می‌باشد.

یکی دیگر از یافته‌های این مطالعه این بود که مشخص شد سلول‌های P19cl6 به عنوان یک رده سلولی مناسب جهت بررسی روند تکامل و تکوین سلول‌های قلبی با کارایی بالا با ژن پروتئین فلورسنت سبز نشان‌دار شده و اجسام شبه رویانی تهیه شده از آن‌ها در محیط کشت حاوی اکسی توسین به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز می‌یابند. لذا این سلول‌ها هم از آن جهت که از توانایی خوبی در تمایز به سلول‌های قلبی برخوردار می‌باشند و هم از این نظر که بعد از ترانسفکشن پایدار با ژن پروتئین فلورسنت سبز تحت تاثیر اکسی توسین به عنوان ماده‌ای که در تکامل طبیعی سلول‌های قلبی جنین نقش دارد، به سلول‌های قلبی تمایز می‌یابند، مدل مناسبی جهت مطالعات مبتنی بر پیوند بافتی محسوب می‌شوند (۱۲، ۲). به عنوان مثال می‌توان از کار دیومیوسیت‌های نشان‌دار شده‌ای که از سلول‌های P19cl6 تمایز یافته‌اند در درمان مدل‌های آزمایشگاهی بیماری قلبی استفاده کرد. تنها مطالعه نسبتاً مشابه با این بخش از پژوهش در سال ۲۰۰۴ توسط مور و همکاران صورت گرفت که در طی آن از پلاسمید حامل ژن GFP که بیان آن تحت کنترل پروموتور MLC-2v (زنجیره سبک میوزین) بوده نیز پروموتور سائتومگالو ویروس که جلوتر از پروموتور قلبی به داخل پلاسمید ساب کلون شده بود استفاده کرده و توانستند از طریق ترانسفکشن و تمایز سلول‌های P19cl6، سلول‌های قلبی بطنی نشان‌دار شده با GFP ایجاد کنند (۲۳). در این مطالعه

References :

- 1- Ilona SS. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma. Trends Cardiovasc Med 1999; 9(5): 139-43.
- 2- Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 9550-9555.
- 3- Cassoni P, Sapino A, Stella A, Fortunati N, Bossolati G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. Int. J. Cancer 1998; 77: 695-700.
- 4- Cassoni P, Fulcheri E, Carcangiu ML, Stella A, Deagliu S, Bussolati G. Oxytocin receptors in human adenocarcinomas of the endometrium: presence and biological significance. J. Pathol 2000; 190: 470-477.
- 5- Copland JA, Ives KL, Simmons DJ, Soloff MS. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. Endocrinology 1999; 140: 4371-4374.
- 6- Martens H, Kecha O, Charlet-Renard C, Deffesne MP, Geenen V. Neurohypophysial peptides stimulate the phosphorylation of pre-T cell focal adhesion kinases. Neuroendocrinology 1998; 67: 282-289.
- 7- Geenen V, Kecha O, Brilot F, Charlet-Renard C, Martens H. The thymic repertoire of neuroendocrine-related self antigens: biological role in T-cell selection and pharmacological implications. Neuroimmunomodulation 1999; 6: 115-125.
- 8- Plecas B, Popovic A, Jovovic D, Hristic M. Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats. J. Endocrinol. Invest 1992; 15: 249-253.
- 9- Thibonnier M, Conarty DM, Preston J, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. Endocrinology 1999; 140: 1301-1309.
- 10- Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio S, Chini B, Graziani A, *et al.* Activation of functional oxytocin receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. Endocrinology 2001; 142: 1130-1136.
- ۱۱- حاتمی لیا، رضازاده مجتبی، القای تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های قلبی با استفاده از هورمون اکسی توسین. مجله علوم تشریح ایران ۱۳۸۳؛ شماره ۴: ۳۹-۳۳.
- 12- Habara Okhubo A. Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. Cell Struct Funct 1996; 21: 101-10.
- 13- Seung-Cheol Choi, Jihyun Yoon, Wan-Joo Shim, Young-Moo Ro, Do-Sun Lim. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. Experimental and Molecular Medicine 2004; 36(6): 515-523.
- 14- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. Science 1981; 211: 393-6.
- 15- Branch S, Francis BM, Chernoff N. Teratogenic effects of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in the Swiss Webster mouse. Toxicology 1996; 112: 37-43.
- 16- Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, *et al.* Bone marrow derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 2002; 105: 380-6.
- 17- Rangappa S, Fen C, Lee EH. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. Ann Thorac Surg 2003; 75: 775-9.
- 18- Xu C, Police S, Rao N. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 2002; 91: 501-8.
- 19- McBurney MW, Jones-Villeneuve EMV, Edwards MKS. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 1982; 299: 165-7.
- 20- Van der Heyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation. Cardiovasc Res 2003; 58: 292-302.
- 21- Skerjanc IS, Petropoulos H, Ridgeway AG. Myocyte enhancer 2c and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells. J Biol Chem 1998; 273: 34904-10.
- 22- Jamali M, Karamboulas C, Rogerson PJ, Skerjanc IS. BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis. FEBS Lett 2001; 509: 126-30.
- 23- Jennifer CM, Rene S, Anton CM, Teun de B, Martin BR, *et al.* A P19c16 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells. Int. J. Dev. Biol 2004; 48: 47-55.
- 24- Word WW, Cormier MJ. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. J Biol Chem 1979; 254(3): 781-8.

Oxytocin efficiency in differentiation of P19c16 stem cells into cardiomyocytes

Fathi F.¹(PhD), Bagheban Eslami M.R.²(PhD), Ahsan B.¹(MD), Alasvand M.¹(MS),
Rezaei M.J.¹(PhD), Pirmoradi L.¹(MS), Asahara T.³(MD)

¹ School of Medicine, Kordestan University of Medical Sciences

² Royan Research Center, Stem Cells Research Group

³ Riken Institute, CDB, Japan

Abstract

Background and Objectives

Recently, P19c16 has been cloned from P19 cells. This stem cell line has mesodermal traits and can be differentiated into cardiomyocytes without embryoid body formation. The present study was designed to investigate the oxytocin effect on differentiation of P19c16 into cardiomyocytes and production of GFP-labeled cardiomyocytes.

Materials and Methods

At first, the P19c16 cells were cultured as monolayer and embryoid body; then oxytocin with 1×10^{-7} M concentration was added to culture media as the inducer agent. DMSO was used as an inducer agent in positive control under the same conditions. Differentiated cells underwent morphological and immunocytochemical evaluation. The research in its continuation pursued the transfection of pEGFP-C1 plasmid with P19c16 cells by electroporation method; then, stably expressed GFP cells were differentiated into cardiomyocytes by oxytocin.

Results

The obtained data indicated that in the experimental group EBs from P19c16 cells could be differentiated into cardiomyocytes whereas monolayer cells could not. In the control group, both EBs and monolayer cells could be differentiated into cardiomyocytes by DMSO. In second part of this study, P19c16 cells were efficiently transfected with GFP, and GFP expressed cells were differentiated into beating cardiomyocytes by oxytocin. The results of morphological and immunocytochemical evaluation confirmed that differentiated cells were cardiomyocytes.

Conclusions

Our results showed that the embryoid body formation is necessary for differentiation of P19c16 cells into cardiomyocytes and these cells after stable transfection with GFP could be differentiated into beating cardiomyocytes. It can be concluded that probably P19c16 line is a good stem cell line for cell transplantation in the experimental model of cardiac disease.

Key words: Cell differentiation, Cardiomyocytes, Oxytocin, Stem cells, P19
SJIBTO 2007; 3(4): 281-290

Received: 25 Apr 2006

Accepted: 23 Jan 2007

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Cellular and Molecular Research Lab, Kordestan University of Medical Sciences.

P.O.Box: 66177-13446, Sanandaj, Iran. Tel: (+9871) 6661830; Fax: (+9871) 6660051

E-mail: farfath@yahoo.com