تولید رده‌های جدید سلولهای بنیادی جنینی از موش نژاد Balb/c

حسین بهاروند (M.Sc)[1]، **کلاس ماتایی** (Ph.D.)[2].

۱-استادیار پژوهشی، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، جهاددانشگاهی علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲-دانشیار، گروه علوم زیستی مولکولی، دانشکدهٔ تحقیقات پزشکی جان‌کورتین، دانشگاه ملی استرالیا، کانبرا، استرالیا.

چکیده

سلولهای بنیادی جنینی (ES)، سلولهایی پرتوان و با قابلیت نوسازی هستند. این سلولها از توده سلولی داخلی بلاستوسیستها به دست می‌آیند. تحت شرایط خاص‌می‌توان این سلولها را در جهت خاصی در محیط آزمایشگاهی متمایز کرد. حتی با دستکاری ژنتیکی آنها می‌توان موشهای ترانس ژن و یا موشهایی که یک ژن آنها از کار افتاده است (Knockout) ایجاد کرد. به دلیل اهمیت فراوان سلولهای ES، این مطالعه برای تولید رده‌های جدیدی از موش انجام شد. بدین منظور، بلاستوسیستهای ۳/۵ روزه از موشهای نژاد Balb/c بدست آمدند و روی فیبروبلاستهای جنین‌های موشی در محیط ES حاوی ۱۰۰۰*IU/ml* و ۵۰۰۰*IU/ml* فاکتور ممانعت‌کننده لوکمیایی (LIF) کشت شدند. رده‌های حاصل از نظر کاریوتیپ ساده، نواربندی C، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن تعیین‌کننده بیضه (SRY-PCR)، آلکالین فسفاتاز و بیان فاکتور رونویسی Oct-4 با استفاده از RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین روش سه رده سلولی با مشخصات مورفولوژیکی سلولهای ES در غلظت ۵۰۰۰ *IU/ml* از فاکتور LIF به دست آمد. سه رده حاصل نر بودند. اما مشخصات کاریوتیپ آنها نشان داد که دو رده دارای کاریوتیپ طبیعی و دیپلویید هستند و یک رده تتراپلویید می‌باشد. هر سه رده، آلکالین فسفاتاز و Oct-4 را بیان می‌کردند. نتایج مذکور نشان داد که دو رده سلولی نر از نژاد Balb/c با مشخصات سلولهای ES (مورفولوژی، کاریوتیپ طبیعی همراه با فعالیت آلکالین فسفاتاز و Oct-4)بدست آمد.

گل واژگان: سلولهای بنیادی جنینی، موش، نژاد Balb/c، و پرتوانی.

آدرس مکاتبه: حسین بهاروند گروه جنین‌شناسی، پژوهشکدهٔ رویان، پلاک ۳۶، کوچه سیمین، تقاطع آصف، خیابان زعفرانیه، صندوق‌پستی ٤٦٤٤-١٩٣٩٥، تهران، ایران.

پست الکترونیک: baharvand50@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

سلولهای بنیادی[1] سلولهایی هستند که حداقل با دو مشخصه تقسیمات مداوم وقدرت تمایز بالا، مشخص می‌شوند؛ بطوریکه این سلولها قادرند تا انواعی از سلولهای تمایز یافته را در محیط آزمایشگاهی به وجود آورند که این مشخصه را پرتوانی[2] می‌نامند. از جمله سلولهای پرتوان می‌توان سلولهای بنیادی جنینی(ES)[3] را نام‌برد. سلولهای بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی(ICM)[4] بلاستوسیستها (۲،۱) و یا از جمعیت سلولی پرتوان اکتودرم اولیه بلاستوسیستهایی بدست می‌آیند که لانه‌گزینی آنها به تأخیر افتاده است(۳).

تا کنون تولید رده‌های سلولی پرتوان جنینی، ازمهره‌دارانی غیر از موش، نظیر ماهیان(٥،٤)، جوجه (٧،٦)، خرگوش(٩،٨)، موش بزرگ آزمایشگاهی[5](١٠)، هامستر(١١)، خوک (١٣،١٢)، گاو(١٤)، گوسفند(١٥) و میمون رزوس(٦) گزارش شده است. بالاخره در سال ١٩٩٨، تولید سلولهای بنیادی جنینی انسان نیز از بلاستوسیستهای انسانی گزارش شد(١٧). با توجه به توان تکثیر دائم و قابلیت تمایز بالای سلولهای بنیادی جنینی، این سلولها در طب پیوند[6]، تحقیق و توسعه داروسازی، مطالعات ژنتیکی، تولید حیوانات با خصوصیات تغییر یافته ژنتیکی و مطالعات زیست‌شناسی تکوینی حائز اهمیت می‌باشند. به گونه‌ای که می‌توان با افزودن القاءگرهای مناسب، این سلولها را در جهت خاصی تمایز داد. این موضوع گذشته از آنکه ما را نسبت به القاءگرهای مناسب، غلظت و زمان افزودن آنها آشنا می‌کند سبب حصول منبع نامتناهی از انواع سلولهای تمایز یافته برای پیوند می‌شود. بطوریکه با انتقال سلولهای تمایز یافته مولد انسولین و یا نرونهای حاصل به ترتیب به موشهای دیابتی و یا پارکینسونی علائم بهبود در آنها گزارش شده است(١٨،١٩). حتی در شرایط مناسب می‌توان فردی کامل را از سلولهای بنیادی جنینی ساخت که این موضوع تاکنون تنها از سلولهای بنیادی جنینی موشی گزارش شده و از سلولهای بنیادی جنینی سایر مهره‌داران گزارش نشده است.

بیشتر رده‌های سلولهای بنیادی جنینی موجود از موش همخون[7] نژاد ١٢٩ می‌باشند که گزارشات موجود نشان می‌دهد که تولید حیوانات ترانس ژن و یا موشهای ناک اوت[8] (موشهایی که یک ژن آنها از کار افتاده است) با آن دارای اشکالاتی است(٢٢ـ٢٠). لذا علاقمندی به تولید سلولهای بنیادی جنینی از موشهایی با نژاد دیگر بیشتر می‌باشد. لذا به منظور حصول فن‌آوری تولید و کشت سلولهای بنیادی جنینی در کشور، در این مطالعه تولید رده‌های جدیدی از سلولهای بنیادی جنینی موشی نژاد Balb/c انجام شده و پرتوانی آنها نیز با استفاده از روشهای رایج در محیط آزمایشگاهی نشان داده شده است.

مواد و روشها

- سلولهای تغذیه کننده جنین‌ها و سلولهای‌بنیادی جنینی: از سلولهای فیبروبلاستی جنین ١٣ روزه موش (MEF)[9] نژاد MTK-Neo به عنوان سلولهای تغذیه‌کننده استفاده شد. تقسیم این سلولها تحت تیمار مایتومایسین-C (Sigma، M0503 ، USA) و با غلظت ١٠*μg/ml* و به مدت ١/٥ ساعت متوقف شد.

سلولهای MEF در محیط کشت DMEM[10] (Gibco , 12800،UK) حاوی ١٥٪ سرم جنین گاوی (FCS)[11] (Australlia، 0500v-15-010، Multiser)

1-Stem Cells
2-Pluripotency
3-Embryonic Stem Cells
4-Inner Cell Mass
5-Rat
6-Transplantation

7-Inbred
8- Knockout
9-Mouse Embryo Fibroblasts
10- Dulbecco's modified Eagle's medium
11-Fetal Calf Serum

Downloaded from http://www.jri.ir

بلاستوسیستهای ۳/۵ روزه حاصل از موش Balb/c روی سلولهای MEF که تقسیم آنها متوقف شده بود، کشت شدند. محیط کشت برای کشت بلاستوسیستها و سلولهای بنیادی عبارت بود از: Knockout DMEM (Gibco , 10829-018،UK)، ۱۵٪ FCS (Gibco،16141-079،UK) ۱۰۰μM بتامرکاپتواتانول (Sigma،M7522،UK) گلوتامین ۲mM (Gibco،25030-149،UK) اسیدهای آمینه غیرضروری ۰/۱mM (Sigma , M7145،USA) و فاکتور ممانعت‌کننده لوکمیایی (LIF)[1] (Chemicon،ESGRO،Austria) به محیط کشت مزبور ۱۰۰۰IU/ml و یا ۵۰۰۰IU/ml LIF اضافه گردید.

توده سلولی داخلی (ICM) بلاستوسیستها به روش مکانیکی در روز چهارم کشت و با کمک پیپت جدا شد. سپس ICM حاصل یا تحت تیمار تریپسین[2] /EDTA (Gibco,25300-054،UK) قرار گرفتند و در همان روز روی MEF کشت شدند (پروتکل اول)(۲۵-۲۳) و یا پس از جداسازی، روی MEF جدید کشت شده و در روز بعد تحت تیمار تریپسین /EDTA (Gibco,15305-014-UK) قرار گرفتند(پروتکل دوم)(۲۶). این کشتها در ظروف ۴۸ خانه (Costar،USA) انجام شد. پس از هشت روز مجدداً، سلولها پاساژ داده شدند و بدنبال آن کلونیهای با مورفولوژی ES مشاهده و به ظرفهای ۶ خانه پاساژ داده شدند. کلونیهای ES به صورت متراکم، سه بعدی و با کناره صاف بودند. سلولها از هم قابل تفکیک نبودند؛ ولی هسته سلولها مشخص و حاوی یک تا سه هستک تیره بود.

- **مشخصات سلولهای بنیادی جنینی تولیدی**: به غیر از خصوصیات مورفولوژیکی سلولهای بنیادی جنینی تولید شده، این سلولها از نظر خصوصیات دیگر مورد ارزیابی قرار گرفتند که روش کامل آنها قبلاً بیان شده است(۲۷). اما به اختصار برای آنالیز کاریوتیپی سلولهای ES تولیدی، آنها تحت تیمار کلسمید (۰/۰۵mg/ml) (Sigma,D7385،USA) قرار داده شدند و سپس سلولها در معرض محلول هیپوتونیک ۵/۶٪ KCl قرار گرفتند و پس از تثبیت در محلول متانول و اسید استیک (۳:۱) بر لام گسترش داده و با گیمسا ۵٪ رنگ‌آمیزی شدند.

همچنین برای تعیین جنسیت و آنالیز بیشتر کروموزومی از نواربندی-C استفاده شد؛ زیرا سانترومر کروموزوم Y رنگ نمی‌گیرد. بدین ترتیب که پس از تیمار کلسمیدی، سلولها در معرض محلول هیپوتونیک سیترات سدیم ۰/۸٪ قرار گرفتند و پس از تثبیت مطابق روش استاندارد رنگ‌آمیزی شدند(۲۳).

فعالیت آلکالین فسفاتاز سلولها مطابق روش موجود در کیت (Sigma-USA) انجام شد. این آنزیم در سلولهای تمایز نیافته بیان می‌شود. محلول نمکی دیازونیوم شامل ۰/۱ml از محلول نیتریت سدیم (۴-۹۱) و ۰/۱ ml محلول آلکالین-ERV (۲-۸۶) تهیه شده پس از دو دقیقه ۴/۵ ml آب بدون یون به آن اضافه شد. به دنبال آن ۰/۱ml از محلول آلکالین AS-B1 (۱-۸۶) اضافه شد و سپس مخلوط گردید. از سوی دیگر سلولها را در بافر سیتراتی استن (شامل ۲۵ml محلول سیترات، ۶۵ml استن و ۸ml فرمالائید ۳۷٪) برای مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۲۶-۱۸ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند. سلولها با آب بدون یون به مدت ۴۵ ثانیه شستشو شدند و سپس محلول فاز قبل در تاریکی به سلولها افزوده شد. بعد از ۱۵ دقیقه سلولها به مدت ۲ دقیقه شسته شدند.

تعیین جنسیت رده‌های سلولی تولیدی به غیر از نواربندی-C با استفاده از PCR ژن SRY (ژن تعیین‌کننده بیضه) و پرایمرهای آن، پس از استخراج DNA با کیت Qiagene (USA) انجام شد. در گروه کنترل PCR بجای DNA آب اضافه شد. همچنین

1-Leukemia Inhibitory Factor
2-Trypsin

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۱- نتایج جداسازی سلولهای بنیادی جنینی از موش نژاد Balb/c

متغیر / پروتوکل	غلظت LIF (*IU/mL*)	تعداد اولیه بلاستوسیست	تعداد ICM جدا شده از بلاستوسیست	تعداد ES تولیدی
*اول	۱۰۰۰	۹۹	۹۹	۰
	۵۰۰۰	۹۳	۹۳	۰
**دوم	۱۰۰۰	۶۰	۶۰	۰
	۵۰۰۰	۶۸	۶۸	۳

* ICM به روش مکانیکی در روز چهارم از تروفوبلاست جدا و پس از قراردادن در معرض آنزیم تریپسین روی MEF کشت شد.
** ICM به روش مکانیکی در روز چهارم از تروفوبلاست جدا و بر MEF کشت و روز بعد در معرض آنزیم تریپسین قرارداده شد.

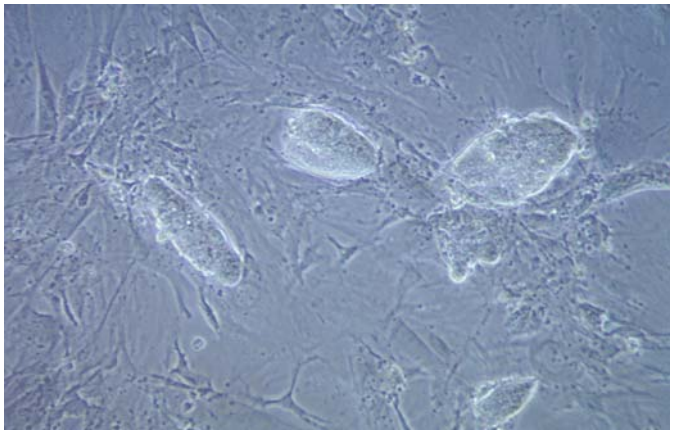
از DNA استخراج‌شده از دم موشهای نر و ماده Balb/c به عنوان گروههای کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

برای ارزیابی بیان پروتئین Oct-4 که یک فاکتور رونویسی است و به عنوان عاملی مهم در شناسایی سلولهای پرتوان می‌باشد(۲۸) از روش RT- PCR[1] استفاده گردید. برای انجام این ارزیابی، RNA سلولهای ES تولیدی با استفاده از RNAzol B (Tel-Test Inc., USA) استخراج شده و سپس ساخت cDNA با کمک پرایمرهای هگزامر تصادفی و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس[2] (Gibco-UK) انجام شد. از ۱۸S rRNA به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. سپس PCR با استفاده از پرایمرهای ژن Oct-4 انجام‌شد.

نتایج

- **تولید سلولهای بنیادی جنینی**: داده‌های حاصل از جداسازی سلولهای بنیادی جنینی از بلاستوسیست موشهای نژاد Balb/c در جدول شماره ۱ آمده است. در مجموع سه رده سلولی با مورفولوژی سلولهای بنیادی جنینی از ٦٨ توده سلولی داخلی (ICM) جدا شده با روش مکانیکی دوم یعنی جداسازی ICM در روز چهارم و سپس قراردادن آنها در معرض آنزیم تریپسین در روز بعد، بدست آمد (٤/٤٪). تمام رده‌ها از غلظت اولیه LIF ۵۰۰۰*IU/ml* حاصل شدند. اما از روش اول جداسازیICM (جداسازی ICM در روز چهارم و سپس قراردادن در معرض آنزیم تریپسین در همان روز) رده ES تولید نشد. مورفولوژی سلولهای بنیادی جنینی بر اساس کلونی‌های متراکم پرسلولی بود که کناره کلونی‌ها صاف و سلولها در آن قابل تفکیک نبودند و تنها هسته‌ها که یک تا سه هستک تیره داشتند، قابل مشاهده بودند(شکل ۱). سلولهای تمایز یافته که دارای مرفولوژی فیبروبلاستی بودند پاساژ داده نشدند.

شکل ۱-کلونی‌های سلولهای بنیادی جنینی کشت‌یافته بر فیبروبلاسیتهای جنینی موش



1-Reverse Transcription PCR
2-Super Script II

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۲- خصوصیات سلولهای بنیادی جنینی تولیدی از موش نژاد Balb/c

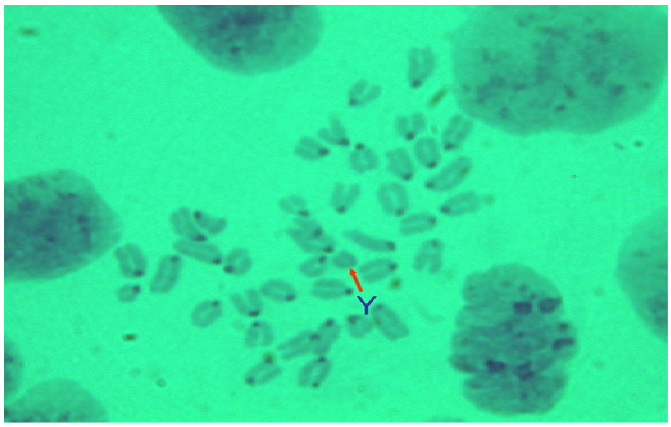
متغیر / نام رده سلولیES	کاریوتیپ	کروموزوم Y (نواربندی C)	ژن SRY	فعالیت آلکالین فسفاتاز	بیان Oct-4
رویان C1	۴۰	+	+	+	+
رویان C2.3	۸۰	+	+	+	+
رویان C3	۴۰	+	+	+	+

تا کنون ردههای ES تولیدی تا ۸ بار پاساژ داده شدهاند و طی این مدت حالت غیرتمایزی خود را حفظ کرده و به تکثیر خود ادامه دادهاند.

شکل ۲- کاریوتیپ ساده از سلولهای بنیادی جنینی تولیدشده از روش نژاد balb/c

ردههای حاصل تحت عنوان رویان[1] C1، رویان C2.3 و رویان C3 نامگذاری شدند (حرف C اشاره به نژاد Balb/c و شماره، اشاره به ترتیب تولید آنها دارد). آزمونهای دیگر که خلاصه آنها در جدول شماره ۲ آمده است نشان میدهد که رویان C1 و رویان C3 دارای مشخصات سلولهای بنیادی جنینی است. بطوریکه مطالعه خصوصیات کاریوتیپ ساده و نواربندی C این سلولها نشان داد که رویان C1 و رویان C3 دارای کاریوتیپ طبیعی دیپلویید (۴۰ کروموزومی) هستند(شکل شماره ۳). اما رده سلولی رویان C2.3 به صورت تتراپلویید (۸۰ کروموزومی) است. مطالعه نواربندی C کروموزومهای ردههای حاصل موید نربودن همهردههای تولیدی بود؛ زیرا سانترومر کروموزوم Yرنگ نمیگیرد(شکل شماره ٤). گذشته از این، انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) بر ژن تعیینکننده بیضه (SRY) مؤید آن بود که تمام ردههای تولیدی نر میباشند(شکل شماره ٤).

شکل ۳- نواربندی-C از سلولهای بنیادی جنینی تولیدشده از روش نژاد balb/c



آزمون آلکالین فسفاتاز نشان داد که تمام ردههای تولیدی و همچنین رویان C2.3 نیز که پلیپلویید است بیانکننده آلکالین فسفاتاز میباشند (شکل شماره ٥). از سوی دیگر بررسی RT-PCR برای ژن Oct-4 نشان داد

2-Embryo

Downloaded from http://www.jri.ir

که تمام رده‌های سلولی نیز OCt-4 را بیان می‌کنند (شکل شماره ٦).

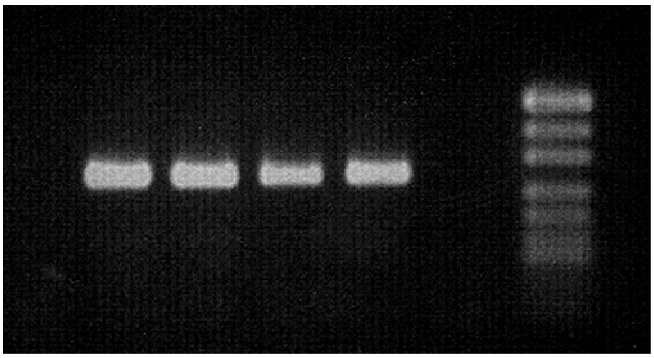
بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سه رده سلولی از موش نژاد Balb/c با مورفولوژی سلولهای بنیادی جنینی به دست آمد که دارای قابلیت تکثیر بودند. تمام سلولهای بنیادی جنینی تولیدی باید دارای خصوصیات زیر باشد: از توده سلولی داخلی (ICM) و یا اپی‌بلاست بلاستوسیست مشتق شده باشد؛ دارای توان تقسیم نامحدود و بدون تمایز باشد؛ دارای کاریوتیپ طبیعی کروموزومی باشد و این حالت را حفظ نماید؛ بتواند کلونی‌زایی کند یعنی یک سلول بنیادی جنینی توان تولید یک کلونی متشکل از سلولهای با خواص ژنتیکی یکسان را داشته باشد و آلکالین فسفاتاز و Oct-4 را بیان نماید (۲۹). بر این اساس تنها دو رده سلولی رویان C1 و رویان C3 دارای خصوصیات مذکور بودند و رویان C2.3 علیرغم داشتن تمام خصوصیات، دارای کاریوتیپ غیرطبیعی (تتراپلویید) بود. لذا اگرچه رده سلولی رویان C2.3 پرتوان است؛ ولی رده سلولی بنیادی جنینی محسوب نمی‌شود. سلولهای کارسینومای جنینی نیز که حاصل تراتوما هستند به عنوان سلولهایی پرتوان می‌باشند؛ ولی از آنجا که دارای مشکلات کروموزومی هستند و در ضمن به دلیل منشاء آنها، به عنوان سلول بنیادی جنینی مطرح نمی‌شوند. یکی دیگر از خصوصیات سلولهای بنیادی جنینی که نشان‌دهنده پرتوانی فوق‌العاده سلولها است، قابلیت تولید فرد زایا می‌باشد و یا به عبارتی دارای قابلیت Germ Line Transmission باشند که این آزمایش تاکنون بر سلولهای بنیادی جنینی حاصل انجام نشده است.

تاکنون رده‌های سلولهای بنیادی جنینی زیادی تولید شده که از آنها در مطالعات گوناگون استفاده گردیده است. بیشتر این رده‌های سلولی نظیر CCE(۳۰)، D3(۳۱)، E14(۳۲)، AB1 (۳۳) و R1(۳٤) از موش نژاد ۱۲۹ بدست آمده‌اند. ولی رده‌های F1/1 (۳۵) و TT2 (۳٦) از هیبرید بین نرهای نژاد CBA و ماده‌های نژاد C57BL/6 به دست آمده‌اند و رده BL/6III (۳۷) و رویان B1 و رویان B2 از نژاد C57BL/6 مشتق‌شده است(۲۷). از موش NOD نیز که به عنوان مدل جانوری بیماری دیابت نوع I استفاده می‌شود، رده سلولی بنیادی جنینی تولید شده است(۳۸).

در این مطالعه مشاهده شد که ٤/٤ درصد (۳:٦۸) از توده‌های سلولی داخلی (ICM) جدا شده از بلاستوسیستها خصوصیات مورفولوژیکی سلولهای بنیادی جنینی را داشتند و در واقع تنها ۲/۹٪ (۲:٦۸) از ICM تولیدی علاوه بر خصوصیات مورفولوژیکی دارای سایر خصوصیات سلولهای بنیادی جنینی بودند. فراوانی تولید سلولهای بنیادی جنینی از Balb/c نیز قبلاً پس از انجام ایمونوسرجری[1] (جراحی با استفاده از سیستم ایمنی) ۲/۵٪ گزارش شده است(۳۹). به هر ترتیب تولید رده‌های سلولی‌بنیادی جنینی از این نژاد به سختی انجام می‌شود.

شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR ژن SRY در سلولهای بنیادی جنینی از موش نژاد Balb/c



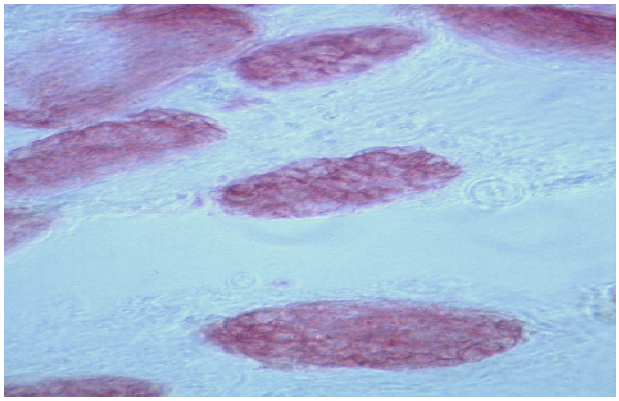
این در حالی است که فراوانی تولید سلولهای ES در موش نژاد۱۲۹sv به مقدار ۳۰-۱۰٪ گزارش شده است

1-Immunosurgery

Downloaded from http://www.jri.ir

(۲۳). نژاد ۱۲۹sv دارای شیوع[1] بالایی از تراتوم بیضه‌ای یا تراتوکارسینومس است و به عنوان منبع تولید رده‌های سلولی کارسینومای جنینی بکار می‌رود (٤٠). احتمال دارد که نژاد مزبور دارای مشخصات منحصر به فردی باشد که در نژادهای دیگر یافت نمی‌شود و سبب تولید رده‌های سلولیES پایدار می‌شود. جدای از نژاد موش، تولید رده‌های جدید سلولهای بنیادی جنینی به مقدار زیاد به دسترس‌بودن شرایط مطلوب کشت و به مهارت تکنیکی محقق بستگی

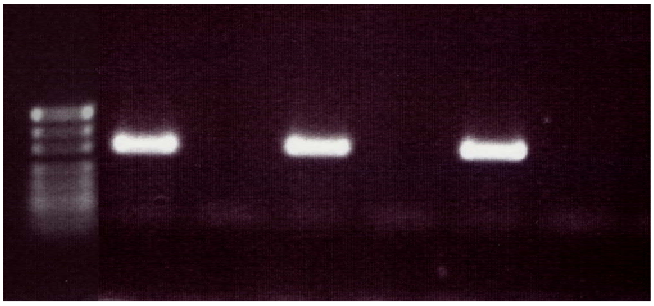
شکل ۵- فعالیت فسفاتاز کلونی‌های سلولهای بنیادی، کلونی‌ها به رنگ قرمز و سلولهای تمایز یافته فیبروبلاستی جنین موش بی‌رنگ می‌باشد



دارد. نکته مهم دیگر نحوه دستکاری سلولهای ICM برای حصول رده سلولی ES بود. این موضوع بسیار حائز اهمیت است. در حقیقت تنها بکارگیری روش دوم (٢٦) جداسازی ICM در این نژاد یعنی جداسازی ICM از بلاستوسیست در روز چهارم کشت و سپس کشت مجدد آن بر MEF و سپس تریپسینه‌نمودن ICM در روز بعد، سلولهای بنیادی جنینی تولید شد. قبلاً نیز همین روشها بر ICM مشتق از بلاستوسیستهای موش نژاد C57BL/6 نیز بکار برده شد و تنها با روش اول جداسازی ICM یعنی جداسازی ICM در روز چهارم و تریپسینه نمودن آن در همان روز و سپس کشت بر MEF، دو رده سلولی بنیادی جنینی جدید تولید شد(۲۷). شاید در اینجا نیز نوع نژاد و روش جداسازی ICM در تولید سلول بنیادی جنینی مؤثر باشد. به هرحال ممکن است مجموع این عوامل یا هر کدام از آنها در حصول نتایج مؤثر بوده است.

همچنین اگرچه در این مطالعه از دو غلظت متفاوت LIF (۵۰۰۰*IU/ml* و ۱۰۰۰) استفاده شد، ولی در موش نژاد Balb/c سه رده رویانC1، رویان C2.3 و رویان C3 از غلظت ۵۰۰۰*IU/ml* بدست آمدند. این در حالی است که در مطالعه قبلی ما تولید سلولهای بنیادی جنینی در غلظتهای ۱۰۰۰*IU/ml* و ۵۰۰۰*IU/ml* و از نژاد C57BL/6 گزارش شده است(۲۷). LIF به عنوان عامل ممانعت‌کننده از تمایز، بسیار حائز اهمیت باشد(٤١). احتمال دارد که نوع نژاد با غلظت LIF در

شکل ۶- بیان OCT-4 در سلولهای بنیادی جنینی تولیدشده



تولید رده جدید ES حائز اهمیت باشد.

Kawase نیز با غلظت LIF ۵۰۰۰*IU/ml* توانست رده‌های جدید سلولهای بنیادی جنینی ازBalb/c، C57BL/6 تولید کنند. مطالعات نواربندی C و PCR ژن SRY (ژن تعیین‌کننده بیضه) نشان داد که همه رده‌های سلولی ES تولیدی نر می‌باشند. این موضوع بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا نگهداری حیوان حاصل از آن راحت‌تر است و دیگر اینکه طی پاساژهای متوالی، پایداری کروموزومی آن نسبت به سلولهای ES ماده

1-Incidence

Downloaded from http://www.jri.ir

بالاتر است؛ بطوریکه در ES ماده همانند اپی‌پلاست هر دو کروموزوم X فعال می‌باشند، در نتیجه ناپایدار هستند(۴۲) و طی پاساژهای متوالی معمولاً یک کروموزوم X از بین می‌رود و رده سلولی ES تبدیل به کاریوتیپ XO ۳۹ کروموزومی می‌شود. از سوی دیگر تولید حیوانی کایمرا از سلولهای ES نر راحت‌تر است. زیرا بدلیل مشارکت سلولهای ES در برآمدگی گنادی[1] حتی اگر جنین میزبان ماده باشد، از آنجاکه سلولهای XX در محیط بیضه‌ای رشد نمی‌کنند سلولهای زاینده حاصل ES نر بوده و کایمراهای تولیدی نر می‌شوند(۴۳).

بدین ترتیب نتایج این مطالعه، حصول دو رده جدید از سلولهای بنیادی جنینی موش از بلاستوسیست موش نژاد Balb/c را نشان داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمام کسانیکه ما را در انجام این مطالعه یاری کرده‌اند اعلام می‌دارند.

References

1- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292,154-156.
2- Martin G.R. Isolation of apluripotent cell line from early mouse embryos culture in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78,7634-7638.
3- Brook F.A., Gardner R.L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Aced Sci SA.1997;94, 5709-5712.
4- Hong Y.C؛ Winkler M. Schartl Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:3679-3684.
5- Sun L.C.S., Bradford G., Ghosh. PCollodi: ES-like cell cultures derived from early zebra fish embryos. Mol Mar Boil Biotechnol. 1995;4: 193-199.
6- Pain B., ME Clark M., Shen., H.N akazawa M., Sakura J., Samarut. Etches R.J. Long term in vitro culture and characterizations of avian embryonic stem cells with multiple morphogenic potentialities. Development. 1996;122: 2339-2348.
7- Chang I.K., D.L. Jeong., Y.H. Hong, T.S. Park, Y.K. Moon, T. Ohon, J.Y. Han. Production of germ line chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. Cell Biol Int. 1997; 21:495-499.
8- Schoonjans L., GM Albricht., JL Li., D Collen., RW Moreadith. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overcoat color chimeras following injection into blastocysts. Mol Reproed Dev. 1996; 45:439-443.
9- Moens A.B., Flechon J., Degrouard X., Vignon J., Ding J.E., Flechon K.J; Betteridge J.P. Renard. Ultra structural and immunocytochemical analysis of diploid germ cells isolated from fetal rabbit gonads. Zygote. 1997;5:47-60.
10- Jannaccone P.M. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. Dev Biol. 1994;163: 288-292.
11- Doetschman T., Williams C.P., Maeda M. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. Dev Biol. 1988;127:224-227.
12- Wheeler M.B. Development and validation of swine embryonic stem cells. A review. Reprod Fertil Dev. 1994;6:563-568.
13- Piedrahita J.A., Moore K., Octama B., Lee C.K., Seales N., Ramsoondar J., Baze F.W. Ott T. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. Biol Reprod. 1998; 58:1321-1329.
14- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.G., Kane., J Jerry J.J., Blackwell E.S.C., Ponce de Leon F.A., Robl M.J. Transgenic bovine chimeric

1-Gonadal ridge

Downloaded from http://www.jri.ir

۲۷- حسین بهاروند، کلاس ماتایی، کاظم پریور، تولید ردههای جدید سلولهای بنیادی جنینی از موش نژاد C57BL/6، مجله علمی پژوهشی کوثر، در دست چاپ.
28- Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4.Cell. 1998;5:379-391.
29- Smith A.G. embryo-derived stem cells of mice and men. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:435-462.
30- Robertson E., Bradley A., KaehnM., Evans M. Germ-line transmissionof genes introduced into cultured pluripotential cells by retrovial vector. Nature. 1986;323: 445-448.
31- Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R9. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:9065-9069.
32- Hooper M., Hardy K., Handyside A., Hunter S., Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germ line colonization by cultured cells. Nature. 1987;326,292-295.
33- McMahon A.P., Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. Cell. 1990;62:1073-1085.
34- Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Establishment of germ-line competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. Development. 1990;110:1341-1348.
35- Tokunaga T., Tsunoda Y. Efficacious production of viable germ-line chimerase between embryonic stem (ES) cells and 8-cell stage embryos. Dev Growth Differ. 1992;34:561-566.
36- Yagi T., Tokunaga T., Furuta Y., Nada S., Yoshida M. A novel ES cell line, TT2, with high germ line. Differentiating potency. Anat Bioch. 1993;214,70-76.
37- Ledermann B., Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem line. Exp Cell Res. 1991;197:254-258.
38- Nagafuchi S., Katsuta H., Kogawa K., Akashi T. Establishment of and embryonic stem (ES) cell line derived from a non obese diabetic (NOD)mouse: in vitro differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission. FEBS Letters. 1999;455,101-104.
offspring produced from somatic cell-derived stem-likecells. Nat Biotechnol. 1998;16:642-646.
15- Wells O.N., Misica P.M., T.A. Day M., Tervit H.R. Production of cloned lambs from an stem (ES) cell lines. Int J Dev Biol. 1994;38: 385-390.
established embryonic cell line: A comparsion between in vivo and in vitro matured cytoplasts. Biol Reprod. 1997;57:385-393.
16- Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G., Durning M., Harris CP., Becker RA., Hearn J. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc. 1995;92:7844-7848.
17- Thompson J.A. Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282: 1145-1147.
18- Soria B., Roche E., Berna G., Leon-Quinto T., Reig J.A., Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalizeglycemia in streptozotocin-induceddiabetic mice. Diabetes. 2000;49,157-162.
19- Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson’s disease. Brain Res Bull. 2002;57(6):795-808. Review.
20- Cantin E., Mann J. Genetic variation among 129 sub strains. Practical consequences. J Immunol. 1999;162: 6294-5295.
21- Sechler J.M., Yip J.C., Rosenberg A.S. Genetic variation among 129 substrains: practical consequences. J Immunol. 1997; 159:5766-5768.
22- Simpson E.M., Linder C,C., Sargent E.E., Davisson M.T., Mobraaten L.E., Sharp J.J. Genetics variation among 129 sub strains and its importance for targeted mutagenesis in mice. Nat1 Genet. 1997; 16:19-27.
23- Abbondanzo S.J., Gadi I., Stewart C.L. Derivation of embryonic stem cellines. Methods in Enzymology, Wasserman, PM Depamphilis M.L., Eds. Academic Press, San Diego. 1993;225, 803-823.
24- Robertson E.J. Derivation and maintanance of embryonic stem cell cultures. Methods Mol Biol. 1997;75: 173-184.
25- Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratorial. Cold Spring Harbor, NY. 1994.
26- Roach M.L., McNeish J.D. Methods for the isolation and maintenance of murine embryonicstem cells. Methods in Molecular Biology. 2002;1850:1-16.

Downloaded from http://www.jri.ir

39- Kawase E., Saemori H., Takahashi N., Okazaki K., Hashimoto K., Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. Int J Dev Biol. 1994;38: 385-390.
40- Stevens L.C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre and post implantation mouse embryos. Dev Biol. 1970;21,364-382.
41- Nichols J., Evans E., Smith A.G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cell sousing differentiation inhibiting activity. Development. 1990;110:1341-1348.
42- Rastan S., Robertson E.J. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell line associated with lack of X-chromosome inactivation. J Embryol Exp Morphol. 1985;90:379-388.
43- Bradley A., Evans M.J., Kaufman M.H. Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocar cinoma cell lines. Nature. 1984;309:255-256.

Downloaded from http://www.jri.ir