Physiology and Pharmacology, 11(3), 192 - 198
Fall 2007 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Cholinergic Differentiation of neural precursor cells derived from mouse embryonic stem cells

Farshad Homayouni-Moghadam[1], Hojatoallah Alaie[1], Khadije Karbalaie[2], Somayeh Tanhaei[2], Mehrafarin Fesharaki[1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[2*], Hossein Baharvand[3,4*]

Dept. Physiology, Medical Faculty, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Dept. Stem Cells, Isfahan Campus of Royan Institute, Isfahan, Iran
3. Dept. Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran
4. Dept. Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Embryonic stem cells (ESCs) isolated from mouse blastocyst are genetically normal pluripotent cells and are able to differentiate to all types of cells. Study of mechanism of differentiation of these cells to neural cells could help us to know the mechanism of central nervous system development and finding better strategies for stem cell based therapies in human neurodegenerative disorders. The aim of this study was to evaluate the effect of Sonic hedgehog (Shh), Retinoic Acid (RA), Leukemia inhibitory factor (LIF), Interleukin-6 (IL6) and nerve growth factor (NGF) on differentiation of neural progenitor cells (NPCs), produced by lineage selection method from mouse ESCs, to cholinergic neurons.

Methods: Royan B1, mouse ESCs derived from C57BL/6 strain was used to produce aggregates. According to growth factor mediated lineage selection method aggregates were cultured in serum free medium to produce nestin positive or NPCs, then cell expansion was achieved by treatment with EGF and FGF2. Following withdrawal of EGF and FGF2, the cells were further cultured in presence or absence of differentiation factors: LIF, Shh, RA, NGF and IL6 in serum containing medium. Relative number of neurons and cholinergic neurons were assessed by immunocytochemical procedure using antibodies against MAP2, β-tubulin3, and ChAT.

Results: Data obtained show that around 70% of the cells were β-tubulin3 positive. We found different percentage of cholinergic neurons from 10-20% in cultured cells in different groups. RT-PCR analysis showed that cholinergic specific genes were also expressed in cultured cells.

Conclusion: This study shows that some of the neurons produced by lineage selection method are cholinergic neurons and the percentage of cholinergic neurons increases after treatment by Shh, LIF and RA.

Keywords: Embryonic stem cells, Neuron, Cholinergic, Differentiation, Mouse

* Coresponding Author Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir or Baharvand50@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۱ (۳)، ۱۹۲ – ۱۹۸
پاییز ۱۳۸۶

تمایز سلولهای پیش ساز عصبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موش به نورونهای کولینرژیک

فرشاد همایونی‌مقدم[۱]، حجتا... علایی[۱]، خدیجه کربلایی[۲]، سمیه تنهایی[۲]، مهرآفرین فشارکی[۱]، محمدحسین نصر اصفهانی[۲*]، حسین بهاروند[۳و۴*]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
۲. گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان شاخه اصفهان، اصفهان
۳. گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان، تهران
۴. گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران

دریافت: فروردین ۸۶ بازبینی: شهریور ۸۶ پذیرش: شهریور ۸۶

چکیده

مقدمه: سلولهای بنیادی جنینی موش mESC تولید شده از توده سلولی داخلی بلاستوسیست از نوع سلولهای پرتوان هستند، شناخت مکانیسم تمایز سلولهای بنیادی موش به سلولهای عصبی در شناخت نحوه تکامل سیستم عصبی و همچنین کاربرد آن در درمان بیماریهای نرودژنراتیو ضروری میباشد هدف این مطالعه ارزیابی اثر القائی عوامل Sonic Hedghog protein (Shh) , Retinoic Acid (RA) Nerve Growth Factor (NGF) و Leukemia Inhibitory Factor (LIF) و Interleukin6 (IL6) بر پیش سازهای عصبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی موش و تمایز آنها به نورونهای کولینرژیک میباشد.

روش‌ها: از سلولهای بنیادی جنینی موش نژاد C57BL/6 تولید شده در آزمایشگاه موسوم به (رویانB1) جهت تولید پیش سازهای عصبی استفاده شد. بدین منظور از سلولهای رویان B1 اجسام شبه جنینی (embryoid bodies) ساخته شد و به دنبال آن طبق روش انتخاب دودمان (Lineage selection) سلولهای پیش ساز عصبی به واسطه فاکتورهای رشد اپیدرمی و فیبروبلاستی (EGF,FGF) انتخاب شدند. سلولهای حاصل با حذف فاکتورهای رشد و کشت در محیط مناسب همراه یا و بدون القاء کننده‌های Shh , RA , NGF، LIF و IL6 به سلولهای عصبی تمایز یافتند. جهت تعیین تعداد نورونهای کولینرژیک و همچنین کل نورونها در هر گروه علاوه بر مورفولوژی از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه (ChAT(Choline Acetyl Transferase و B-tubulin3 استفاده شد.

یافته‌ها: مطالعات ایمنوسیتوشیمی نشان داد نزدیک به ۷۰٪ سلولهای حاصل نورون میباشند و نورونهای کولینرژیک موجود در آنها ۱۰ تا ۲۰ درصد به تفکیک گروه‌های مختلف متغیر بود. همچنین در RTPCR نیز بیان ژنهای مربوط به سلولهای عصبی شامل Nestin، Tyrosine Hydroxylase، ChAT، بررسی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده افزایش معنی داری در درصد نورونهای کولینرژیک نسبت به کل نورونها در گروه تیمار با RA، LIF و Shh میباشد.

واژه‌های کلیدی: سلولهای بنیادی، نورون، کولینرژیک، تمایز

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی موش (mESC) تولید شده از توده سلولی داخلی بلاستوسیست از نوع سلولهای پرتوان (Pleuripotent) هستند که میتوانند به سلولهای نرواکتودرم تمایز پیدا کنند. شناخت مکانیسم تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای عصبی در شناخت نحوه تکامل سیستم عصبی و همچنین کاربرد آن در درمان بیماریهای نرودژنراتیو ضروری می‌باشد [۱و۲].

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mh_nasr@med.mui.ac.ir Or Baharvand50@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

با استفاده از تیمارهای با فاکتورهای رشد تمایز به نورونهای دوپامینرژیک، گلوتاماترژیک، گابائرژیک نشان داده شده است [۷-۳]. در مورد کشت نورونهای دوپامینرژیک محققین متعددی با به کار گیری فاکتورهای رشد مختلف توانسته‌اند تمایز به دوپامینرژیکها را در محیط کشت و بدن موجود زنده نشان دهند و تاثیر عواملی نظیر فاکتور رشد فیبروبلاستی ۸ (FGF8) و Shh در تمایز دوپامینرژیکها توسط مطالعات متعددی به اثبات رسیده است [۸،۹].

در باره نورونهای کولینرژیک نیز مهمترین تحقیقات در حال انجام شامل: ۱) تمایز سلولهای بنیادی جنینی به کولینرژیک [۱۰]، ۲) تمایز سلولهای پیش ساز عصبی به کولینرژیک [۱۱-۱۳]، ۳) تمایز سلولهای گانگلیون سمپاتیک از نوع آدرنرژیک به کولینرژیک میباشد [۱۴،۱۵]. از آنجا که در صدمات نخاعی و همچنین بیماری آلزایمر سیستم کولینرژیک دچار اختلال میشود لذا بررسی قابلیت تمایز سلولهای پیش ساز عصبی به نورونهای کولینرژیک در درمان این اختلالات اهمیت دارد [۱۶].

سیستم عصبی مرکزی و محیطی شامل سه نوع نورون کولینرژیک میباشد: ۱) نورونهای شاخ قدامی نخاع [۱۰،۱۶]، ۲) نورونهای کولینرژیک مغز قدامی که با تحریک نورونهای گلوتاماتی در هیپوکامپ باعث بروز یادگیری و حافظه میشوند و در بیماری آلزایمر تعداد نورونهای کولینرژیک در این ناحیه کاهش شدیدی نشان میدهد [۱۲،۱۷]، نورونهای شاخ قدامی از نظر جنین شناسی از نوع دمی (caudal) و نورونهای کولینرژیک مغز قدامی از نوع سری (rostral) هستند [۱۸]، و ۳) نورونهای محیطی کولینرژیک که به غدد و عضلات صاف می‌رسند. وجود نورونهای کولینرژیک سیستم سمپاتیک یکی از نشانه‌های بروز تمایز از نورون آدرنرژیک به کولینرژیک در سیستم عصبی محیطی میباشد زیرا نورونهای سمپاتیک در ابتدای تولد از نوع آدرنرژیک هستند ولی بعدا تحت تاثیر عوامل کولینرژیک کننده به نوع کولینرژیکی تغییر شکل میدهند [۱۴و۱۵]. این عوامل کولینرژیک کننده شامل فاکتورهای متعددی نظیر NGF، گلوکوکورتیکوئیدها، EGF، انسولین، IL6، NT3، استروژن، (cilliary derived neurotrophic factor)، CDNF، LIF، TGFβ (transforming growth factor β)، bFGF، Shh و RA میباشند [۲۰،۱۴،۱۵،۱۹] بعنوان مثال نورونهای گانگلیون گردنی فوقانی رت پس از کشت در محیط حاوی فاکتورهای رشد و تمایز همچون LIF وCDNF از ترشح نورآدرنالین به استیل کولین تغییر حالت میدهند و LIF و CDNFرا بعنوان عوامل تمایز دهنده کولینرژیک و افزایش دهنده بقای این سلولها در محیط کشت نام برده‌اند [۲۰].

در مورد القاء تمایز به نورونهای کولینرژیک با استفاده از سلولهای بنیادی گزارشات متنوعی موجود است. رتینوئیک اسید و Shh از جمله عوامل موثر در تمایز موتور نورونهای کولینرژیک از ESC میباشند. رتینوئیک اسید باعث تکامل سیستم عصبی در محور سری دمی (rostrocaudal) و Shh باعث تکامل در محور شکمی پشتی میشوند [۲۱]. Okada و همکارانش نشان دادند که استفاده از رتینوئیک اسید در دوز بالا باعث بیان ژنهای دمی (caudal) و در دوز پایین تر باعث بیان ژنهای سری (rostral) در نورونها میشود [۳]. همچنین اثر NGF نیز در کمک به بقای نورونهای کولینرژیک مغز قدامی گزارش شده است [۱۳،۱۱]. در این مطالعه سلولهای پیش ساز عصبی تولید شده توسط روش انتخاب دودمان (lineage selection) تحت تیمار با عوامل القا کننده‌ای که بعنوان عوامل القاء کننده تمایز به نورونهای کولینرژیک شناخته شده‌اند قرار داده شدند تا قدرت تمایز آنها به نورونهای کولینرژیک ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

از کشت سلولهای بنیادی جنینی (ES) موش نژاد C57BL/6 تولید شده در آزمایشگاه موسوم به (رویانB1) جهت تولید پیش سازهای عصبی استفاده شد [۲۲]. مراحل کشت و همچنین القاء تمایز طبق روش .Okabe et al [۲۳] با کمی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه سلولهای ES بر روی فیبروبلاست جنینی موش و در محیط KDMEM حاوی LIF ۱۰۰۰ u/ml،βME ۰/۱ mM، FCS ٪۱۵، NEAA ۰/۱ mM، L-Glu ۲ mM کشت و تکثیر شدند همچنین به تمام محیطها پنی سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۰/۱ mg/ml اضافه میشد. سپس تعداد ۵×۱۰^{۴} سلول ES به ازای هر سی سی محیط در پلیت باکتریال حاوی محیط بالا اما بدون LIF جهت تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) به مدت ۴ روز نگهداری شدند. EBها به روش ته نشینی جدا شده و تعداد ۲۰ تا ۳۰ عدد از آنها با قطر متوسط ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر به هر چاهک پلیت کشت سلولی ۲۴تائی منتقل شدند و به مدت یک روز در محیط بالا بدون LIF نگهداری شدند. از روز بعد محیط جدید فاقد سرم شامل

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای سلول‌های عصبی (نورون‌ها)، نام ژن، توالی بازها و اندازه پرایمرها بر حسب جفت تعداد بازها ذکر شده است.

ژن‌ها	توالی پرایمرها		تعداد جفت بازها
	Forward	Reverse	(bp)
Pax6	5'GAGAGGACCCATTATCCAGATG3'	5'GCTGACTGTTCATGTGTGTTTG3'	466
ChAT	5'GTGAACTCCCTGCTCCCAGA3'	5'CTCAGTGCCAGAAGATGGTTGT3'	460
VAChT	5'CCCACCTCCTCTAATGAGTACC3'	5'GCAGGAAGGACAAACAGATGC3'	226
β-Tubulin3	5'GTTCCCACGTCTCCACTTCTTC3'	5'CCAGGTCATTCATGTTGCTCTC3'	479
TH	5'TCCTGCACTCCCTGTCAGAG3'	5'CCAA0047AGCAGCCCATCAAAGG3'	424
Nestin	5'TCGAGCAGGAAGTGGTAGG3'	5'TTGGGACCAGGGACTGTTA3'	352
HB9	5'GGCGCTTTCCTACTCATACC3'	5'TCCTCTTCCGTCTTCTTCTCAC3'	456
Oct-4	5'GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC3'	5'CATACTCGAACCACATCCTTCTCT3'	320
β-Tubulin	5'GGAACATAGCCGTAAACTGC3'	5'TCACTGTGCCTGAACTTACC3'	317

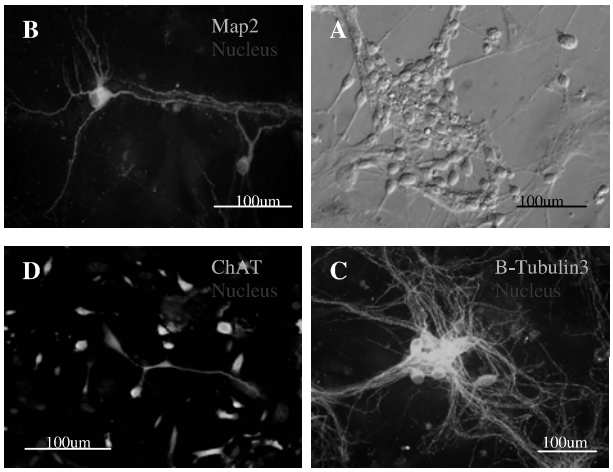
fibronectin ۵ ug/ml، supplement N2 ٪۱، DMEM/F12 L-Glu، و NEAA جایگزین محیط قبلی شد و هر دو روز یک بار و جمعا به مدت ۶ روز محیط آنها تعویض می‌شد. در روز ۱۲ سلولها با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ ٪ از ظرف جدا شدند و جهت تکثیر به محیط حاوی bFGF ۲۰ng/ml، EGF ۱۰ng/ml، DMEM/F12، ۲۰ nM، NEAA، L-Glu، laminin ۱ug/ml، N2 ٪۱ putrescine ۱۰۰ μM، progestrone منتقل شدند و این مرحله ۶ روز ادامه یافت و محیط هر ۲ تا ۳ روز یک بار تعویض می‌شد و فاکتورهای رشد هر روز اضافه می‌شدند. در روز ۱۸ محیط بالا با محیط جدید حاوی سرم و neurobasal media (NB)، N2، ٪۲، B27، L-Glu، NEAA تعویض شد و سیتوزین آرابینو فورانوزید ($۱۰^{-۶}$ M) نیز جهت کاهش تولید سلولهای گلیال از روز ۲۲ به محیط اضافه می‌شد و هر ۳ تا ۴ روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. جهت تیمار از روز ۱۶ به مدت ۷ روز تیمار با فاکتورهای القاء کننده که هر روز اضافه می‌شدند شروع شد و گروههای تیمار شامل۱) بدون تیمار (Non Treated)، ۲) IL6 (۵ ng/ml)، ۳) LIF (۵۰۰ u/ml)، ۴) RA ($۱۰^{-۶}$ M)، ۵) IL6+LIF (۶ ug)، ۷) Shh (۰/۵ ng/ml)، ۸) Shh+RA، ۹) LIF+RA، ۱۰) NGF+Shh، ۱۱) NGF+LIF و ۱۲) NGF+IL6 بودند که به محیط حاوی ۲-۵ درصد سرم و بدون bFGF وEGF اضافه می‌شدند. پس از پایان هفت روز القا سلولها برای ۷ روز دیگر در محیط حاوی ۱۰٪ سرم و neurobasal media (NB)، N2، B27، L-Glu، NEAA نگهداری شدند. در روز ۳۰ سلولها با پارا فرمالدئید ۴ ٪ تثبیت شده و رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی انجام شد.

در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی، رنگ آمیزی با آنتی‌بادی‌های علیه MAP2a,b و B-tubulin3 جهت تشخیص و شمارش تعداد کل نورونها و آنتی ChAT (Choline Acetyl Transferase) جهت شمارش نورونهای کولینرژیک در هر دو گروه به ترتیب زیر انجام شد.

پس از تثبیت، سلولها با Triton X100 ۰/۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه نفوذ پذیر شدند و با آنتی بادیهای اولیه ذکر شده به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند و پس از شستشو در مرحله بعد با آنتی بادی ثانویه Goat Anti Mouse FITC conjugated برای MAP2a,b وβ-tubulin3 و Rabbit Anti Goat FITC conjugated برای ChAT جهت رنگ آمیزی برای دو ساعت انکوبه شدند. برای رنگ آمیزی هسته سلولها از ۱ug/ml پروپیدیوم آیودید (PI) استفاده شد.

جهت بررسی بیان ژنهای مربوط به سلولهای عصبی بیان ژن ChAT جهت تائید وجود نورونهای کولینرژیک در کنار چند ژن دیگر اختصاصی سلولهای عصبی در حداقل دو کشت متفاوت انجام شد و تفاوتی بین این دو مشاهده نشد. به این منظور سلولهای پیش ساز عصبی همراه با چند تیمار مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. کل RNA با استفاده از RNeasy Mini Kit (Qiagen) و تیمار با DNaseI (Fermentas) استخراج شد. از RNA حاصل cDNA با استفاده از Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ساخته شد و PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ جهت تکثیر cDNA انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگاروز الکتروفورز شده و باندهای حاصل تحت نورUV با استفاده از اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

شمارش سلولهای B-Tubulin3 مثبت که نشانگر نورونهای بالغ می‌باشد (در شکل ۱-C به رنگ سبز مشاهده می‌شود) نسبت به هسته کل سلولها که با پروپیدیوم آیودید که هسته

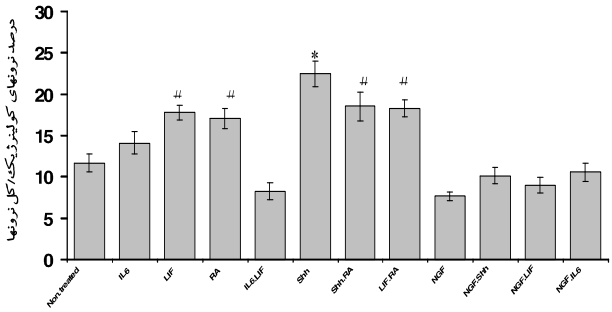


شکل ۱- نرونهای کشت یافته با استفاده از روش انتخاب دودمان قبل و بعد از رنگ آمیزی ایمیونوسایتوشیمی (A) عکس از نورونها با میکروسکوپ معکوس. (B) رنگ آمیزی نورونها با استفاده از آنتی بادی نشاندار علیهMAP2 و هستهها PI. (C) رنگ آمیزی با استفاده از آنتی بادی نشاندار علیه B-Tubulin3 و هستهها PI. (D) رنگ آمیزی با استفاده از آنتی بادی نشاندار علیه (Choline ChAT Transferase) Acetyl و هستهها PI. (تمام عکسها با بزرگنمایی ۴۰x)

سلولها را به رنگ قرمز (شکل ۱-C) در می‌آورد جهت تعیین درصد نورونها نسبت به کل سلولها انجام شد و درصد نورونهای کولینرژیک نیز نسبت به کل نورونها با شمارش سلولهای ChAT مثبت تعیین شد (شکل ۲).

جهت شمارش دو لام برای هر گروه در هر بار آزمایش و در کل سه تکرار برای هر آزمایش تهیه شد (۶ اسلاید برای هر گروه تیمار) و ۳۰ عکس با بزرگ نمایی ۴۰x با استفاده از دوربین Olympus D 70 از هر لام تهیه شد و شمارش انجام شد.

جهت آنالیز آماری اعداد خام بدست آمده از هر عکس به نرم افزار SPSS نسخه ۱۲ داده شد و معنی دار بودن داده‌ها توسط آزمون unpaired t Student با فرض P<۰/۰۵ بررسی شد.



شکل ۲- درصد نورونهای کولینرژیک به کل نورونها در گروههای تیمار شده و کنترل (Non treated) . (P<۰/۰۵ =# و p<۰/۰۱ =* در مقایسه با گروه کنترل)

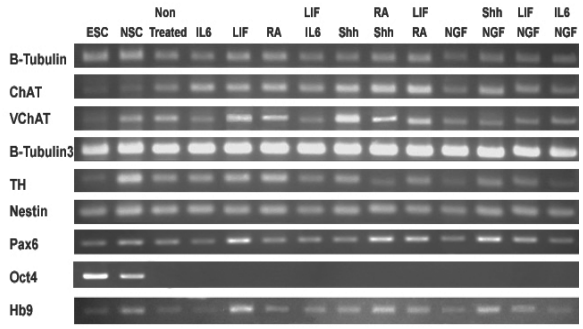
یافته‌ها

تولید نورون توسط روش انتخاب دودمان (Lineage Selection) رنگ‌آمیزی ایمنو هیستوشیمیایی سلولهای کشت یافته نشان داد که در گروههای کنترل و تیمار شده به طور میانگین تقریبا ۷۰ ٪ از کل سلولها با آنتی بادیهای علیه MAP2 و β-tubulin3 که جزو مارکرهای نورونی میباشند رنگ‌آمیزی شدند (شکل۱B,C) که نشاندهنده درصد بالایی از تمایز به سلولهای عصبی می‌باشد.

تاثیر RA, Shh و LIF بر القاء تمایز نورونها به نوع کولینرژیک تیمار سلولها با هر سه عامل RA LIF, و Shh باعث تمایز بالای نورونها به نوع کولینرژیک شد (شکل۲) به طوریکه نزدیک به ۲۰٪ از کل نورونها در رنگ آمیزی با آنتی ChAT در این گروهها از نوع کولینرژیک بودند و تفاوت معنی داری P<۰/۰۵ را با سایر گروهها نشان دادند. در حالیکه در گروه کنترل نزدیک به ۱۰٪ از نورونها را نورونهای کولینرژیک تشکیل میدادند همچنین در گروههای تیمار شده با RA+Shh، RA+LIF نیز افزایش معنی داری در تعداد نورونهای کولینرژیک مشاهده شد اما این افزایش به اندازه افزایش مشاهده شده در گروه Shh به تنهایی نبود.

بیان ژنهای عصبی

نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژنهای اختصاصی سلولهای عصبی مثل β-Tubulin3 بود. بیان ژنهای



شکل ۳- بیان ژنهای عصبی (B-Tubulin3 ,TH)، ژنهای ویژه نورونهای کولینرژیک (ChAT,VChAT)، سلولهای بنیادی (oct4) و پیش سازهای عصبی (Pax6,Nestin) با استفاده از RTPCR در گروههای مختلف تیمار، سلولهای بنیادی موش ESC و پیش سازهای عصبی NSC. از β-tubulin بعنوان مارکر عمومی استفاده شده است.

اختصاصی نورونهای کولینرژیک مثل ChAT و VAChAT نیز در گروههای مختلف وجود داشت اما قویترین باند در گروه تیمار با Shh مشاهده شد (شکل۳). بیان ضعیفی از Hb9 که مارکر اختصاصی نورونهای حرکتی می‌باشد نیز در شکل به چشم می‌خورد. همچنین بیان TH مارکر نورونهای دوپامینرژیک نشانگر حضور این نوع از نورونها در محیط کشت می‌باشد. ژن Oct4 فقط در سلولهای بنیادی و NSC بیان شده است این فاکتور، سبب تحریک یا مهار دسته‌ای از ژن‌ها می‌شود که سلول‌های بنیادی جنینی را در حال تکثیری و غیرتمایزی نگه می‌دارد. Pax6 و Nestin مارکر سلولهای پیش ساز عصبی هستند و β-tubulin بعنوان یک مارکر عمومی استفاده شده است.

بحث

شواهد به دست آمده در این مطالعه بیانگر این بود که سلولهای ES رویان B1 میتوانند به سلولهای کولینرژیک تمایز پیدا کنند. در این مطالعه ابتدا از سلولهای ES سلول پیش ساز عصبی تهیه شد که طبق روش Okabe و همکاران [۲۳] یعنی شرایط کشت بدون سرم و با فاکتورهای رشد میتوان به طور موثری سلولهای عصبی بدست آورد (انتخاب دودمان). در سایر مطالعات انجام شده و با استفاده از رنگ آمیزی‌های ایمنو هیستوشیمیایی نشان داده شده است که نورونهای تولید شده بر اساس این روش اکثرا از انواع گابائرژیک، دوپامینرژیک و سروتونرژیک بوده اند [۲۳]. وجود انواع کولینرژیک احتمالا به دلیل پایین بودن فعالیت ChAT در نورونهای تولید شده در محیط آزمایشگاه در مقایسه با نورونهای کولینرژیک طبیعی گزارش نکرده اند [۲۳]. اما در بسیاری دیگر از مطالعات اقدامی جهت بررسی امکان وجود نورون کولینرژیک بین نورونهای تولید شده صورت نگرفته است [۱۲،۲۴].

نتایج شمارش سلولی نشان داد که درصد کمی از نورونها در گروه کنترل از نوع کولینرژیک هستند و تیمار با RA، LIF و Shh نشان میدهد این عوامل به تنهایی میتوانند باعث افزایش تمایز به نورونهای کولینرژیک بشوند. در حالیکه در گروههای تیمار شده با Shh+RA و RA+LIF تعداد نورونهای کولینرژیک کمتر از گروه تیمار شده با Shh به تنهایی بود.

بنابراین Shh و RA همچنانکه بر پیش سازهای عصبی حاصل از روشهای SDIA و القاء با RA اثر کرده و باعث تولید نورون کولینرژیک میشوند (که در این مطالعات ۲۰ تا ۵۰ درصد از نورونها از نوع کولینرژیک گزارش شده‌اند) [۱۰،۲۵] بر سلولهای پیش ساز عصبی حاصل از روش انتخاب دودمان نیز چنین تاثیری دارند (که نزدیک به ۲۰٪ از نورونها کولینرژیک بودند).

Shh در طی تکامل نخاع برای تشکیل نورونهای شکمی که اکثرا کولینرژیک حرکتی میباشند ضروری است که از طریق فعال کردن ژنهای Olig1,2 صورت میگیرد که در تکامل نورونهای کولینرژیک و اولیگو دندروسیتها دخالت دارند [۱۰].

همچنین بیان ژن Shh بعد از بلوغ نیز در نواحی مختلفی از CNS که در آنجا نورونهای کولینرژیک وجود دارند [۱۸]. مثل قائده مغز قدامی و نخاع ادامه میابد که حکایت از اثر حمایتی آن بر بقاء و فعالیت نورونهای کولینرژیک دارد[۱۸]. از آنجا که ژن Olig2 در نواحی قائده مغز قدامی نیز بیان می‌شود لذا Shh در تکامل نورونهای کولینرژیک این ناحیه نیز دخالت دارد [۲۶].

مسیری که Shh از طریق آن ژنهای زیر مجموعه خود را فعال میکند از طریق رسپتور Patched (PTC) و کورسپتور آن Smoothened (SMO) میباشد که نهایتا پروتئینهای Gli را فعال می‌کند که در بیان ژنهای مربوط به نورونهای کولینرژیک دخالت می‌کنند [۱۸]. Kessaris و همکارانش [۲۷] گزارش کردند که Shh و FGF2 هر دو باعث بیان Olig2 درNeocortical Precursors می‌شوند و Shh برای اعمال اثرش به فعال بودن مسیر MapK نیز احتیاج دارد که bFGF میتواند این مسیر را روشن نگه دارد و جالب اینکه در روش انتخاب دودمان از این فاکتور در مرحله تکثیر سلولهای پیش ساز استفاده میشود و این امر نیز میتواند در تمایز به نوع کولینرژیک دخالت داشته باشد.

از طرفی تاثیر RA نیز بر فعال کردن مسیر تمایز به کولینرژیک در مطالعات انجام یافته بر روی سلولهای پیش ساز عصبی جدا شده از مغز پستانداران و سلولهای بنیادی به کرات گزارش شده است و RA در این سلولها بیان ChAT و VAChT را افزایش میدهد [۳،۱۰،۲۸،۲۹] و در این مطالعه نیزRA باعث القاء تمایز به نوع کولینرژیک شد که حاکی از دخالت مسیر سیگنالینگ RA در تمایز به کولینرژیک میباشد در

پیش سازهای عصبی می‌باشد.

اثرLIF و دیگر هم خانواده‌اشCDNF در تکامل نورونهای کولینرژیک حرکتی در مطالعات انجام یافته در تکامل سیستم عصبی گزارش شد است [۳۰] و همچنین بیان LIF mRNA در نورونهای مغز و خصوصا در نورونهای گابائرژیک و کولینرژیک قائده مغز قدامی وجود دارد [۳۱]. LIF بر سلولهای گانگلیونی سمپاتیک نیز اثر دارد و باعث تبدیل آنها به نوع کولینرژیک می‌شود لذا به آن (CDF: Cholinergic Differentiation Factor) فاکتور تمایز کولینرژیک هم گفته می‌شود [۱۹و۳۰]. این مطالعه نشان داد که تیمار سلولهای پیش ساز عصبی با LIF باعث القاء تمایز آنها به نوع کولینرژیک می‌شود. در حالیکه استفاده از دیگر نروکین هم خانواده اش IL6 چنین تاثیری نداشت. که این مسئله میتواند نشانگر نقش رسپتور اختصاصی LIF (LIFR) در تحریک بیان ژنهای مربوط به نورونهای کولینرژیک مثل ChAT باشد. LIF از طریق اتصال به رسپتور gp130 و LIFR و پس از هترودیمریزاسیون آنها باعث بروز اثراتش می‌شود در حالیکه IL6 از طریق فعال کردن رسپتورهایش gp130 و IL6R و هترودیمریزاسیون آنها اثر میکند که این اختلاف دیمریزاسیون در LIFR و IL6R با gp130 مسئول اثر متفاوت آنها در تحریک بیان ژنها و نشانگر اثر اختصاصی LIFR در القاء تمایز به نوع کولینرژیک میباشد [۳۲].

در بعضی مطالعات به اثر توام Shh و NGF در تمایز به کولینرژیک اشاره شده است [۱۳]، اما در این مطالعه اثر معنی داری مشاهده نشد و لذا مطالعات بیشتری در این مورد نیاز میباشد.

نتایج این مطالعه نشان میدهد که میتوان از سلولهای پیش ساز عصبی حاصل از روش انتخاب دودمان مشابه سایر روشها نورونهای کولینرژیک بدست آورد و احتمالا در درمان بیماریهای درگیر کننده سیستم کولینرژیک مثل صدمات نخاعی و آلزایمر سود برد اما مطالعات وسیعتری جهت شناخت کامل و دقیق مسیر تمایز به نورونهای کولینرژیک و شناخت سایر عوامل موثر در این مسیر ضروری میباشد. همچنین مطالعات بیشتر جهت تعیین اینکه نورونهای کولینرژیک بدست آمده به کدام منطقه از سیستم عصبی از نظر جنینی تعلق دارند نیز حائز اهمیت خواهد بود.

منابع

[1] Ahn JIK, Lee KH, Shin DM, Shim JW, Lee JS, Chang SY, Lee YS, Brwnstein MJ, et al, Comprehensive transcriptome analysis of differentiation of embryonic stem cells into midbrain and hindbrain neurons. ***Dev Biol*** 256 (2004) 491-501.

[2] Isacson O, The production and use of cells as therapeutic agents in neurodegenerative diseases. ***LANCET*** 2 (2003) 417-24.

[3] Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H, Retinoic acid concentration dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiatin of mouse emberyonic stem cells. ***Dev Biol*** 275 (2004) 124-142.

[4] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al, Emberyonic stem cells Express neuronalproperties in vitro. ***Dev Biol*** 168 (1995) 342-357.

[5] Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J, In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. ***J Cell Sci*** 108 (Pt 10) (1995) 3181-3188.

[6] Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A, Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. ***Nat Biotechnol*** 21 (2003) 183-186.

[7] Stavridis MP, Smith AG, Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. ***Biochem Soc T*** 31 (part 1) (2003) 45-49.

[8] Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y, Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. ***Neuron*** 28 (2000) 31-40.

[9] Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y, Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 99 (2002) 1580-1585.

[10] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM, Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. ***Cell*** 110 (2002) 385-397.

[11] Yuhara A, Ishi K, Nishio C, Abiru Y, Yamada M, Nawa H, Hatanaka H, Takeib N, PACAP, NGF cooperatively enhance cholineacetyltransferase activity in postnatal basal forebrain neurons by complementary induction of its different mRNA species. ***Biochem Bioph Res Co*** 301 (2003) 344-349.

[12] Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, Huang LM, Coggeshall RE,

Yu Y, Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. ***Nat Neurosci*** 5 (12) (2002) 1271-1278.

[13] Ott Reilly J, Karavanova ID, Williams KP, Mahanthappa NK, Allendoerfer KL, Cooperative Effects of Sonic Hedgehog and NGF on Basal Forebrain Cholinergic Neurons. ***Mol Cell Neurosci*** 19 (2002) 88-96.

[14] Brodski C, Schnurch H, Dechant G, Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. ***PNAS*** 97 (17) (2000) 9683-9688.

[15] Lewis SE, Rao MS, Symes AJ, Dauer WT, Fink JS, Landis SC, Hyman SE, Coordinate Regulation of Choline Acetyltransferase, TyrosineHydroxylase, and Neuropeptide mRNAs by Ciliary Neurotrophic Factor and Leukemia Inhibitory Factor in Cultured Sympathetic Neurons. ***J Neurochem*** 63 (2) (1994) 429-438.

[16] McDonald JW, Liu XZ, QuY, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW, Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. ***Nat Med*** 5 (1999) 1410-1412.

[17] Qing-hua W, Ru-xiang X, Nagao S, Transplantation of cholinergic neural stem cells in a mouse model of Alzheimer's disease. ***Chinese Med J*** 118 (6) (2005) 508-511.

[18] Traiffort E, Charytoniuk D, Watroba L, Faure H, Sales N, Ruat M, Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. ***Eur J Neurosci*** 11 (1999) 3199-3214.

[19] Fukada K, Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 82 (1985) 8795-8799.

[20] Lewis S, Rao M, Symes A, Dauer W, Fink S, Landis S, Coordinate regulation of choline acetyltransferase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptide mRNAs by ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor in cultured sympathetic neurons. ***J Neurochem*** 63 (2) (1994) 429-438.

[21] Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Owensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, Fletcher PL. Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal inter neurons. ***FASEB J*** 2004; 19(2).

[22] Baharvand H, Matthaei KI, Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. ***In Vitro Cell Dev Biol Anim*** 40 (2004) 76-81.

[23] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD, Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. ***Mech Develop*** 59 (1996) 89-102.

[24] Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD, Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. ***Nat Biotechnol*** 18 (2000) 675-699.

[25] Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone R, Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. ***J Neurosci*** 24-36 (2004) 7848-58.

[26] Furusho M, Ono K, Takebayashi H, Masahira N, Kagawa T, Ikeda K, Ikenaka K, Involvement of the Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain. ***Dev Bio***l 293 (2006) 348-357.

[27] Kessaris N, Jamen F, Rubin LL, Richardson WD, Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signaling pathways in neocortical precursors. ***Development*** 131 (2004) 1289-1297.

[28] Corral RD, Oliviera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K, Opposing FGF and Retinoid pathways control ventral neural patterns, neural differentiation, and segmentation during body axis extension. ***Neuron*** 40 (2003) 65-79.

[29] Liu JP, Laufer E, Jessel TM, Assigning the positional identity of spinam motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. ***Neuron*** 32 (2001) 997-1012.

[30] Patterson PH, Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 91 (1994) 7833-35.

[31] Lemke R, Rossner S, Schliebs R, Leukemia inhibitory factor expression is not induced in activated microglia and reactive astrocytes in response to rat basal forebrain cholinergic lesion. ***Neurosci Lett*** 267 (1999) 53-56.

[32] Bartoe JL, Nathanson NM, Differential regulation of leukemia inhibitory factor stimulated neuronal gene expression by protein phosphatases SHP-1 and SHP-2 through mitogen activated protein kinase dependent and independent pathways. ***J Neurochem*** 74 (2000) 2021-2032.