

الگوی بیان چرخه‌های سیگنالی LIF و FGF-۲ در سلول‌های بنیادی رویانی حاصل از لقاح آزمایشگاهی، هم‌تاسازی و خودگشنی در گاو‌میش

• محمد زندی (نویسنده مسئول)

گروه علوم دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

• محمدرضا سنجایی

گروه علوم دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۲

Email: mz1075@yahoo.com

چکیده

سلول‌های بنیادی رویانی که از لایه زاینده داخلی رویان در مرحله بلاستوسیست تولید می‌شوند، توانایی تمایز به انواع سلول‌های لایه زاینده رویان شامل برون پوست، میان پوست و درون پوست را دارند. اطلاعات کمی در ارتباط با فاکتورهایی که بر تمایز یا حفظ سلول در حالت تمایز نیافته اثر می‌گذارند وجود دارد. در این مطالعه الگوی بیان چرخه‌های فاکتور مهارکننده لوکمیا (LIF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF-۲)، به منظور درک بهتر ارتباط چرخه‌های سیگنالی در خودنوسازی سلول‌های بنیادی رویانی گاو‌میش مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی رویانی از رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF)، هم‌تاسازی (IVC) و خودگشنی (Parthenogenesis) بدست آمدند و از آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی ایمونو فلورسانس به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی استفاده شد. به منظور کشت سلول‌های بنیادی از لایه تغذیه کننده استفاده شد و محیط کشت حاوی LIF، Ko-DMEM.KSR، FGF-۲، ال-گلوتامین، اسیدهای آمینه غیر ضروری و جنتامایسین بود. بیان ژن‌های حد واسط چرخه‌های LIF و FGF-۲ با استفاده از RT-PCR بدست آمد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، بیان FGF-۲ در سلول‌های بنیادی رویانی گاو‌میش بیشتر از LIF بود. FGF-۲، LIF، گیرنده‌های آن‌ها و ترکیبات حد واسط این چرخه‌ها در سلول‌های بنیادی رویانی حاصل از هر سه منشاء تقریباً در حد یکسانی بیان شدند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی رویانی، LIF، FGF، گاو‌میش

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 24-33

Transcriptional profiling of LIF and FGF-2 signaling pathways in buffalo embryonic stem cells derived from in vitro fertilized, parthenogenetic and handmade cloned embryos

By: Zandi, M. (Corresponding Author), Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST).

Sanjabi, M.R., Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST).

Received: August 2013 Accepted: July 2013

Email: mz1075@yahoo.com

Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass (ICM) of blastocyst and differentiate into all three embryonic germ layers: ectoderm, endoderm, and mesoderm. There is less information available about the factors that are affecting buffalo ES cells in culture. In this study, expression profiles of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) signaling pathways were investigated to better understand the relationships of the signaling pathways for self-renewal in buffalo ES cells. Buffalo ES cells were derived from in vitro fertilized (iESC), parthenogenetic (pESC) and handmade cloned (cESC) embryos. Alkaline phosphatase and immune-fluorescence staining were used to characterize buffalo ES cells. Feeder layer was used for ESCs culture, and culture medium consisting of Knockout- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Ko-DMEM) supplemented with Knockout Serum Replacement (KSR), leukemia inhibitory factor (LIF), basic fibroblast growth factor-2 (FGF-2), L-glutamine, nonessential amino acids and gentamicin. Gene expression was analyzed by RT-PCR for signaling pathways. Results showed that, the expression of FGF-2 was higher than LIF in buffalo ESCs. LIF, FGF, their receptors and intermediate signaling pathways was expressed at almost same level in three sources of buffalo ESCs.

Key words: Embryonic Stem Cells, FGF, LIF, Buffalo

مقدمه

بیماریهای ویروسی ناشناخته و یا آلودگی های بین گونه ای شوند. در این ارتباط، مطالعه چرخه های ارتباطی داخل سلولی که در حفظ پرتوانی و خودنوسازی سلول های بنیادی حیوانات مختلف نقش دارند می تواند به عنوان راهنمایی به منظور ایجاد محیط های کشت تعریف شده برای تولید سلول های بنیادی بکار روند (Okita و Yamanaka، ۲۰۰۶).

تحقیقات نشان داده اند، محیط های القا شده با سلول های فیبروبلاست رویانی موش باعث حفظ خودنوسازی سلول های بنیادی موش شده و نیاز به لایه تغذیه کننده را مرتفع ساخته است. به نظر می رسد، سلول های فیبروبلاست موش از تمایز سلول های بنیادی از طریق تولید مهارکننده لوکمیا (LIF) ممانعت به عمل می آورد. بطوری که با اضافه کردن پروتئین نوترکیب LIF به محیط کشت، سلول های بنیادی موش بدون استفاده از لایه تغذیه کننده کشت شده اند (Okita و Yamanaka، ۲۰۰۶). LIF با اتصال به گیرنده gp130 (glycoprotein ۱۳۰) و با استفاده از Shp² و STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) باعث فعال شدن Jak kinases می شود. با این وجود، LIF در حفظ پرتوانی سلول های بنیادی رویانی انسان نقشی ندارد و چرخه فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) در این امر موثر است (Darr و Benvenisty، ۲۰۰۶؛ Biswas و Hutchins، ۲۰۰۷). FGF-2 از طریق گیرنده هایی که منجر به فعال کردن پروتئین تیروزین کیناز می شود، باعث ممانعت از تمایز خودبخودی و افزایش تکثیر و ماندگاری سلول های بنیادی رویانی انسان می شود. بطوری که تمامی محیط های کشت سلول های بنیادی رویانی انسان داری FGF-2 می باشند (Dvorak و همکاران، ۱۹۹۸).

سلول های بنیادی رویانی از توده سلولی داخلی رویان در مرحله قبل از لانه گزینی در رحم بدست می آیند (Sasaki و همکاران، ۲۰۰۸). تا زمانی که شرایط برای حفظ پرتوانی آنها محیا باشد، قابلیت ماندگاری و خودنوسازی دارند و می توانند به انواع سلول های برون پوست، میان پوست و درون پوست تمایز یابند. این خصوصیات جالب توجه سلول های بنیادی را به ابزار بسیار مفیدی تبدیل کرده است (Okita و Yamanaka، ۲۰۰۶). در سال ۱۹۸۱ تولید سلول های بنیادی موش منجر به توسعه فناوری هدف گیری ژن به منظور تولید موش های با ژن ناک اوت شد و از این فناوری به سرعت به منظور تحقیقات و مدل سازی عملکرد ژن ها استفاده شد (Kaufman و Evans، ۱۹۸۱). همچنین از زمان جدا سازی سلول های بنیادی رویانی انسان در سال ۱۹۹۸، از آنها به منظور تولید انواعی از سلول ها از جمله سلول های عصبی، کبدی، سلول های بتای پانکراس، سلول های بافت عضلانی، پوششی و قلبی استفاده شده است و از آنجایی که سلول های بنیادی ظرفیت تکاملی نامحدودی دارند، می توانند به منظور پیوند اعضا در درمان بیماری های انسان نوید دهنده باشند (Okita و Yamanaka، ۲۰۰۶؛ Kurosawa، ۲۰۰۷؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۹). با این وجود، استفاده از سلول های بنیادی به عنوان ابزار درمانی در انسان با مشکلات علمی و اخلاقی عمده ای روبرو است. از آن جمله می توان به استفاده از ترکیبات تعریف نشده از جمله سرم خون و همچنین سلول ها و ترکیباتی که منشاء حیوانی دارند در تولید سلول های بنیادی انسان اشاره کرد. بطوری که استفاده از منابع حیوانی می تواند باعث انتقال

٪ ۰/۶ آلبومین سرم گاو و ٪ ۱۰ سرم جنین گاو انتقال یافتند و به مدت ۶ روز درون انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و ٪ ۵ دی اکسید کربن قرار گرفتند تا به مرحله بلاستوسیت برسند.

تولید رویان

با استفاده از تکنیک HMC (Handmade Cloning)

برای تولید رویان با استفاده از تکنیک HMC از روش بهینه شده Shah و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. بطور خلاصه، سلول‌های فیبروبلاست از سلول‌های پوست گوش گاو میش با سن کمتر از ۶ سال استحصال شدند و به عنوان دهنده ماده ژنتیکی بکار رفتند. پس از به بلوغ رساندن تخمک‌ها، سلول‌های کومولوس آنها با استفاده از هیالورونیداز (۰/۵ mg/mL) در محیط TCM (۲T-۱۹۹ + ٪ ۲ سرم جنین گاو) جدا شد و به منظور حذف لایه زونا پلوسیدا از پرونیوز (۲ mg/mL) در محیط TCM (۱T-۱۹۹ + ٪ ۱۰ سرم جنین گاو) استفاده شد. به منظور پیدایش برجستگی مخروطی شکل، تخمک‌های عاری از سلول‌های کومولوس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در محیط کشت TCM (۲T-۱۹۹ + ٪ ۲۰ سرم جنین گاو) در انکوباتور حاوی ٪ ۵ دی اکسید کربن با دمای ۳۸/۵°C نگهداری شدند. پس از آن به محیط کشت ۲T حاوی سایتوکالایسین (۲/۵ μg/mL) منتقل شدند و برجستگی مخروطی شکل به کمک میکروتیغ جدا شد. به منظور بازگشت حالت کروی، سایتوپلاست‌های نیمه در محیط کشت ۲T و انکوباتور حاوی ٪ ۵ دی اکسید کربن با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه نگهداری شدند. پس از آن سایتوپلاست‌های نیمه به فایتوهمالوتنین (۰/۵ mg/mL) در محیط کشت ۲T به مدت ۳-۴ ثانیه آغشته شدند و پس از آن به محیط کشت ۲T حاوی سلول‌های دهنده انتقال یافتند. هر سایتوپلاست نیمه به آرامی دور سلول دهنده حرکت داده شد تا به یکدیگر متصل شوند. به منظور انجام هم جوشی با استفاده از روش تک مرحله ای، زوج سایتوپلاست نیمه و سلول دهنده و یک سایتوپلاست نیمه دیگر به لام هم جوشی منتقل شدند. زوج سایتوپلاست نیمه و سلول دهنده با استفاده از پالس جریان متناوب (۴ ولت) دستگاه BTX Electrocell Manipulator ۲۰۰ (San Diego, CA, USA) بطوری که سلول بدنی روبروی الکترود منفی باشد در یک خط قرار گرفتند و یک سایتوپلاست نیمه دیگر نزدیک سلول بدنی قرار گرفت. یک پالس جریان مستقیم ۳/۳۶ (kV/cm) برای ۴ μsec بلافاصله بعد از قرار گرفتن سلول بدنی بین دو سایتوپلاست نیمه برقرار شد. پس از آن ترکیب سه تایی در محیط کشت ۲T در انکوباتور حاوی ٪ ۵ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C به مدت ۶ ساعت قرار گرفتند تا به شکل کروی درآیند. به منظور فعال سازی، آنها در محیط کشت ۲T حاوی کلسیمایسین ۲۳۱۸۷A (۲ μM) درون انکوباتور حاوی ٪ ۵ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس تخمک‌ها سه بار در محیط ۲T شستشو داده شدند و در قطره‌های ۵ μL حاوی ۲۰T -۶ دای متیل آمینو پورین (۲ mM) تحت روغن معدنی درون انکوباتور حاوی ٪ ۵ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در پایان رویان‌ها چهار بار در محیط کشت RVCL حاوی ٪ ۱ آلبومین سرم گاو

در حالی که FGF-۲ در حفظ خود نوسازی سلول‌های بنیادی انسان موثر است، در سلول‌های بنیادی موش منجر به تمایز شده و در سلول‌های بنیادی گاو میش همراه با LIF منجر به ماندگاری آنها می‌شود. بطوری که نگهداری سلول‌های بنیادی رویانی گاو میش بدون حضور FGF-۲ و LIF امکان پذیر نیست (Sharma و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به نقش چرخه های سیگنالی LIF و FGF-۲ در حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی رویانی گاو میش و همچنین تفاوت آن با سلول‌های بنیادی موش و انسان در این تحقیق به منظور تعیین الگوی بیان چرخه های سیگنالی LIF و FGF-۲ در سلول‌های بنیادی رویانی گاو میش، سلول‌های بنیادی از سه روش لقاح آزمایشگاهی، هم‌تاسازی و خود گشنی تولید شدند و الگوی بیان چرخه های مذکور در آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

بجز مواردی که در متن اشاره شده است، کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت از شرکت Sigma آمریکا و وسایل مصرفی پلاستیکی از شرکت Nunc دانمارک خریداری شدند.

تولید رویان با استفاده از روش لقاح آزمایشگاهی

برای تولید رویان با استفاده از لقاح آزمایشگاهی، تخمدان‌های گاو میش از کشتارگاه جمع آوری شدند و درون محلول نمکی فسفات بافری در دمای ۳۰ تا ۳۴ درجه سانتیگراد در مدت ۵ ساعت از کشتار به آزمایشگاه انتقال یافتند. به منظور استحصال مجموعه تخمک-کومولوس، فولیکول‌های با قطر ۲ تا ۸ میلی متر با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری با سرسوزن سایز ۱۸ مکیده شدند. تخمک‌هایی که دارای بیش از سه لایه گرانولوزای فشرده و اووپلاسم یکنواخت بودند، به قطرات ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت بلوغ انتقال یافتند. بطوری که هر قطره حاوی ۱۵ تا ۲۰ تخمک بود. محیط کشت بلوغ حاوی TCM-۱۹۹ به همراه ٪ ۱۰ سرم جنین گاو، هورمون تحریک کننده فولیکولی (۵ μg/mL)، β-۱۷ استرادیول (۱ μg/mL)، سدیم پیرووات (۱۸ mM)، ٪ ۱۰ مایع فولیکولی گاو میش و جنتامایسین سولفات (۵۰ μg/mL) بود. تخمک‌ها درون محیط کشت بلوغ، تحت روغن معدنی و در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت به بلوغ رسیدند. به منظور لقاح آزمایشگاهی، تخمک‌ها با محیط کشت Bracket and Oliphant's (BO) دو بار شستشو شده و درون قطره‌های ۵۰ μL از محیط کشت BO قرار گرفتند (۱۵ تا ۲۰ تخمک به ازای هر قطره). محیط کشت BO حاوی ۱۰ mg/mL آلبومین سرم گاو بود. آماده سازی اسپرماتوزوآ بر اساس روش ۵ و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. پس از آن اسپرم‌های پرتحرک (۱۰^۶ × ۱-۲) به قطرات حاوی تخمک اضافه شدند و درون انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. پس از این مدت زیگوت‌های احتمالی از سلول‌های کومولوس جدا شدند و در محیط Modified Charles Rosenkrans Medium with Amino Acids (mCRa 2) حاوی ٪ ۰/۶ آلبومین سرم گاو به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در پایان این مدت رویان‌ها به محیط کشت mCR2a حاوی

فیبروبلاست جنینی گاو میش تولید شده بود کاشته شدند. از محیط کشت (KO-DMEM (GIBCO/BRL حاوی ۱۵ درصد KSR (GIBCO/BRL)، ال-گلوتامین (۲ mM)، اسیدهای آمینه غیر ضروری (۱٪ v/v) (GIBCO/BRL)، LIF، BRL موشی (۱ μg/mL) و FGF^{-2} (۵ ng/mL) استفاده شد. هر ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض می شد و نمونه های کشت شده در شرایط ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد بود. کلونی ها پس از هر ۷ روز به لایه های تغذیه کننده جدید منتقل می شدند.

شناسایی سلول های بنیادی رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز

به منظور انجام رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز، سلول های بنیادی دوبار با DPBS شستشو داده شدند. سپس آنها با استفاده از کیت رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز (Sigma, Catalog No. ۸۶C) و بر اساس روش کار شرکت تولید کننده رنگ آمیزی شدند. بطوری که سلول های بنیادی پس از رنگ آمیزی به رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل ۱).

آنالیز ایمونوسیتوکمیکال

به منظور شناسایی سلول های بنیادی گاو میش، بیان شناساگرهای پرتوانی که شامل شناساگرهای سطح سلولی (SSEA-4 و TRA-1-81) و

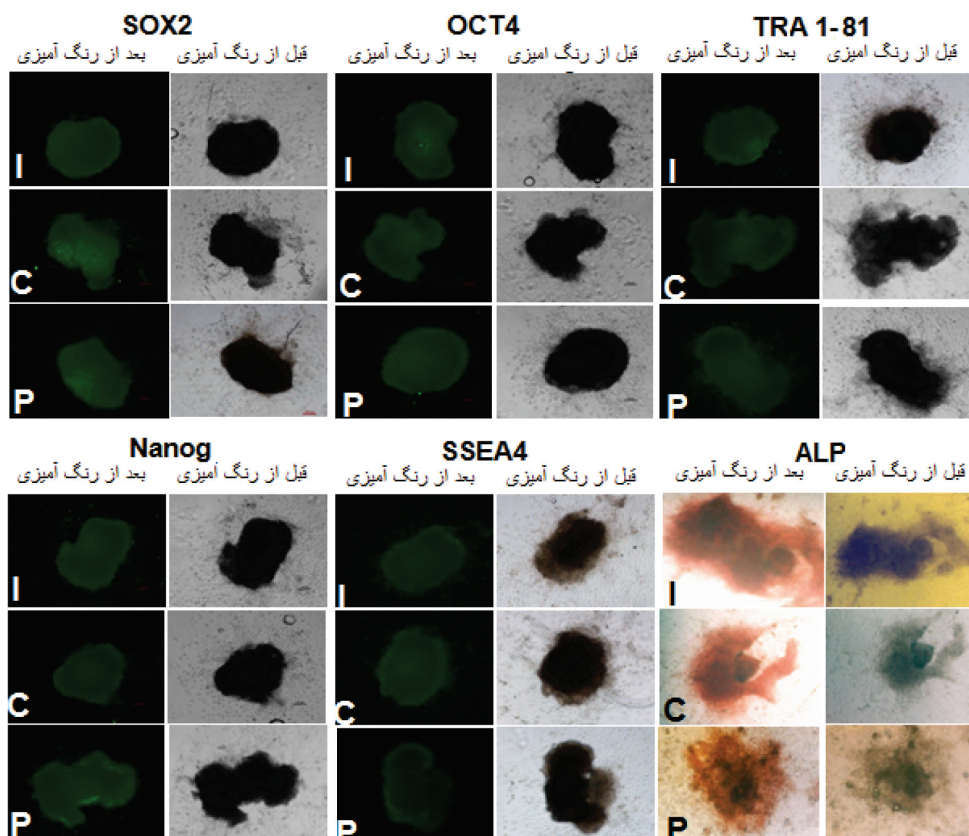
بدون اسید چرب شستشوداده شدند و در ۴۰۰ Lμ از این محیط در ظروف چهار خانه ای (۱۰ تا ۱۵ رویان در هر خانه) تحت روغن معدنی در انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ روز تا مرحله بلاستوسیست انکوبه شدند.

تولید رویان با استفاده از روش خودگشنی

تخمک ها همانند روشی که در مرحله لقاح آزمایشگاهی عنوان شد پس از مدت ۲۴ ساعت به بلوغ رسیدند. پس از این مرحله، فعال سازی تخمک های بالغ همانند روش HMC انجام شد، بطوری که آنها به مدت ۵ دقیقه در محیط کشت ۲۰T حاوی کلسیماسین ۲۳۱۸۷A (۲ μM) درون انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد به منظور فعال سازی قرار گرفتند و پس از شستشو، به مدت ۸ روز در محیط کشت RVCL قرار گرفتند تا به مرحله بلاستوسیست رسیدند.

تولید سلول های بنیادی رویانی

سلول های بنیادی رویانی از بلاستوسیست های با منشأ لقاح آزمایشگاهی و همسازی بر اساس روش Muzaffar و همکاران (۲۰۱۲) تولید شدند. بطور خلاصه سلول های لایه زاینده داخلی بلاستوسیست ها با روش مکانیکی جدا شده و بر روی لایه تغذیه کننده ای که از سلول های



شکل ۱- رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس شامل شناساگرهای سطح سلولی (SSEA-4 و TRA-1-81) و شناساگرهای داخل سلولی (OCT4، SOX2، NANOG) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در سلول های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی (I)، همسازی (C) و خودگشنی.

استخراج RNA و Reverse Transcriptase-PCR

کل محتوای RNA هر گروه آزمایشی با استفاده از روش ترایزول (Invitrogen) استخراج شد و از ۵۱۹۰۶) به منظور جلوگیری از آلودگی با DNA استفاده شد. نسخه برداری معکوس با استفاده از آنزیم ۵ (USB) و آغازگر oligo dT انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ μ L انجام پذیرفت و شامل بافر (۱۰ mM dNTPs)، (U) Taq DNA polymerase، (۱/۰)، آغازگر پیشرو و پیرو (۱۰ μ M) بود. شرایط واکنش شامل واسرشتی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳ دقیقه بود. پس از آن برنامه چرخشی (۳۶ چرخه) شامل ۹۴ سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ویژه اتصال آغازگر بر اساس جداول او ۲ به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان ۷۲ سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش با مرحله توسعه در دمای ۷۲ سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و عمل عکس برداری با دستگاه ژل داک (BIO-RAD) صورت گرفت. مقایسه بیان ژن ها با استفاده از تصاویر حاصل از دستگاه ژل داک، بصورت چشمی انجام گرفت.

نتایج

سلول های بنیادی در فواصل زمانی معین با استفاده از رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز و شناساگرهای پرتوانی شناسایی شدند. بطوری که نتایج

شناساگرهای داخل سلولی (NANOG، SOX۲، OCT۴) می باشند، بوسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس بر اساس روش Anand و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. بطور خلاصه، به منظور تثبیت سلول های بنیادی از DPBS حاوی ۴٪ پارافمالدئید استفاده شد. سپس به منظور افزایش نفوذپذیری، سه بار با DPBS شستشو شده و با DPBS حاوی ۰/۱٪ Triton X-۱۰۰ تیمار شدند. پس از شستشوی مجدد با DPBS، با مایع انسداد کننده (سرم بز ۴٪) انکوبه شدند و پس از آن با آنتی بادی های اولیه (SSEA-۴، OCT۴، SOX۲، TRA-1-81، NANOG) با نسبت ۱ به ۱۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق درمان شدند. پس از شستشوی مجدد با DPBS، به مدت دو ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه که با FITC نشان دار شده بود انکوبه شدند. پس از این مرحله با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Diaphot, Nikon, Tokyo Japan) مورد بررسی قرار گرفتند. بطوری که سلول های بنیادی پس از رنگ آمیزی به رنگ سبز مشاهده شدند (شکل ۱). آنتی بادی های ثانویه به نسبت ۱ به ۲۰۰ شامل goat anti-mouse IgG-FITC conjugate و anti-mouse IgM-FITC conjugate از شرکت Sigma و goat anti-rat IgM-FITC conjugate از شرکت Pierce Biotechnology Inc استفاده شد. به منظور بررسی صحت رنگ آمیزی، از آنتی بادی اولیه در گروه کنترل استفاده نشد، بطوری که پس از رنگ آمیزی گروه کنترل به رنگ سبز مشاهده نشد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام PCR در چرخه LIF

نام ژن	توالی	دمای اتصال	تعداد بازها	شماره دسترسی (NCBI)
GAPDH	F-5'-CCGCAATTACATCGAAATCA-3' R-5'-AGCCACAGATGGTGGAGGTA-3'	60	245	GU-324291.1
LIF	F-5'-TGGGGAAGTACAAGCAGGTC-3' R-5'-CTCTGGGAGTTCTGGCTCTG-3'	60	212	EU-926738.1
LIFR	F-5'-TGAGGATGGCTTCAAATTCC-3' R-5'-CCGCTTTTCAATGCAAACCTT-3'	60	200	NM-001192263.1
JAK2	F-5'-AACGCTGAGGGGATTATCT-3' R-5'-ATGGTTGGGTGGATACCAGA-3'	59	156	XM_002689603.2
GP130	F-5'-ACGTGCTTTGGGTAGAATGG-3' R-5'-TATATGCTTGGGGCTTCCTG-3'	59	221	XM_002696322.2
PIM	F-5'-CCAACCTTCAAGAAATCCA-3' R-5'-CTTGGGAAGCTGGAGACAAG-3'	60	181	XM_001969426
CDX2	F-5'-AAGACAAATACCGGGTCGTG-3' R-5'-CTGCGGTTCTGAAACCAAT-3'	60	157	NM_001206299.1
STAT3	F-5'-AAGACAAACGGGTTGACAGG-3' R-5'-GAGAGAATGCAGGCAGGTTTC-3'	60	226	NM_001012671.2
PIAS3	F-5'-AGGTCAATGGGAAACTGTGC-3' R-5'-TGCCCTTTGCTCTGAGTTTT-3'	59	240	NM_001102185.1
SOCS	F-5'-AGAGCTTCGACTGCCTCTTC-3' R-5'-AGGGGAAGGAGCTCAGGTAG-3'	58	201	XM_002697964.1

F: آغازگر پیشرو، R: آغازگر پیرو

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام PCR در چرخه FGF

نام ژن	توالی	دمای اتصال	تعداد بازها	شماره دسترسی
FGF2	F-5'-AGCCTTGCAACTCTGCTTGT-3' R-5'-TGAGTATTCGGCAACAGCAC-3'	60	193	M13440.1
FGFR1	F-5'-TGGTCCCTTGTATGTTCATCG-3' R-5'-GGAGGCAAGATACTCCATGC-3'	60	187	AJ004952.1
FGFR3	F-5'-CACCGACAAGGAGCTAGAGG-3' R-5'-CTCAGGCGGTAGAGCGTAAC-3'	60	249	AF368288.1
SHP2	F-5'-AACCACCTCAAACCCGAGTG-3' R-5'-GACCACACGCAGACAGAGAA-3'	60	155	XM002694590.2
E-ras	F-5'-GCTGTCTGTGATGGTGTGCT-3' R-5'-TCTCCAGCAGTGGTCACAAG-3'	60	152	NM_181532.3
Erk1	F-5'-ACAGTCTCTGCCCTCCAAGA-3' R-5'-GCTCCTTCAGTCGTTCTTG-3'	60	245	NM_001110018.1
RAF1	F-5'-AGGCTCCTTTGGGACTGTTT-3' R-5'-GGTCACTATCGCCAGGTTGT-3'	60	193	NM_001102505.1
PI3K	F-5'-CGAGATCCAGGAGCACTTTC-3' R-5'-GCAGCAGGTAAGGAAAAGC-3'	60	233	NM_001205548.1
AKT1	F-5'-AAGAGGCAGGAGGAGGAGAC-3' R-5'-TCTCCTTCACCAGGATCACC-3'	60	178	NM_173986.2

F: آغازگر پیشرو، R: آغازگر پیرو

بحث

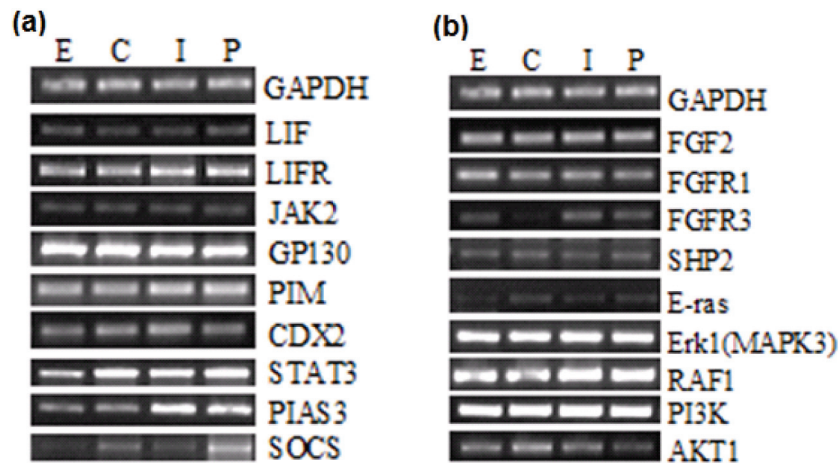
نتایج این تحقیق نشان دادند، LIF در سلول های بنیادی رویانی گاو میش حاصل از هماتاسازی، لقاح آزمایشی و خودگشایی و همچنین امبروئید بادی به میزان کمی بیان شد در حالی که گیرنده های آن (LIFR و GP130) بیان خوبی داشتند. Rho و همکاران نشان دادند، بیان LIF و گیرنده های آن در سلول های بنیادی رویانی انسان در مقایسه با سلول های HeLa کمتر است. همانند سلول های بنیادی رویانی انسان (Rho و همکاران، ۲۰۰۶)، JAK2 در سلول های بنیادی رویانی گاو میش کاهش یافته بود در حالی که بیان STAT3 بیشتر از امبروئید بادی بود. مطالعات متعددی نشان دادند STAT3 برای حفظ پرتوانی سلولهای بنیادی رویانی موش اهمیت دارد (Smith، ۲۰۰۱؛ Smith و همکاران، ۱۹۸۸؛ Burdon و همکاران، ۲۰۰۲). STAT ها فاکتورهای رونویسی خاموش در سیتوپلاسم هستند که توسط JAKs فسفوریله شده و پس از انتقال به هسته فعال می شوند (Rawlings و همکاران، ۲۰۰۴). STAT3 از طریق فعال کردن cMYC باعث خودنوسازی سلول های بنیادی موش می شود (Anneren، ۲۰۰۸) (شکل ۳ b).

بیان PIM در سلول های بنیادی رویانی گاو میش و امبروئید بادی تقریباً نزدیک به هم بود. این ژن در حفظ پرتوانی و ممانعت از تمایز خود بخودی در سلول های بنیادی موش نقش دارد (Aksoy و همکاران، ۲۰۰۷). برخلاف سلول های بنیادی رویانی موش، Stewart و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند، فعال شدن چرخه LIF/STAT3 برای حفظ پرتوانی

برای سلول های بنیادی از هر سه منشاء لقاح آزمایشگاهی، هماتاسازی و خودگشایی برای SOX2 و SSEA-4، TRA-1-81، NANOG، OCT4 و ALKALIN فسفاتاز (ALP) مثبت بودند. سلول های بنیادی پس از رنگ آمیزی با آلکالین فسفاتاز به رنگ قرمز مشاهده شدند و برای سایر شناساگرها به رنگ سبز بود (شکل ۱).

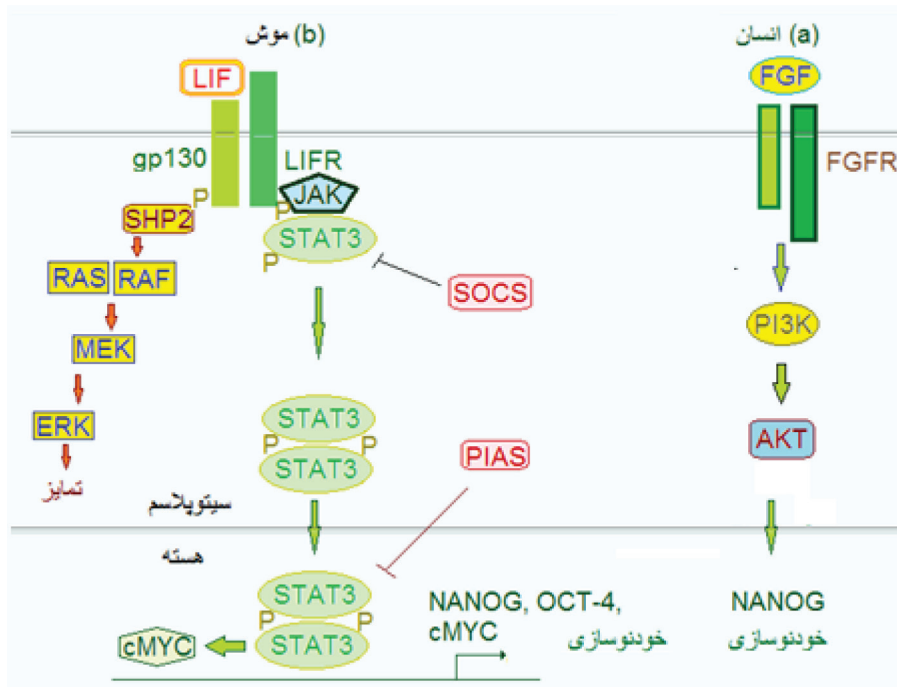
نتایج حاصل از RT-PCR در ارتباط با چرخه سیگنالی LIF در سلول های بنیادی رویانی گاو میش نشان دادند، LIF به میزان کمی در سلول های بنیادی از هر سه منشاء بیان شد. در حالی که LIFR و GP130 به عنوان گیرنده های LIF بیان خوبی داشتند. در ارتباط با اجزاء حد واسط این چرخه سلولی JAK2 بیان کمی داشت. STAT3 در سلول های بنیادی بیشتر از امبروئید بادی بود. SOCS به عنوان ممانعت کننده STAT3 در سلول های بنیادی رویانی گاو میش به میزان کمی بیشتر از امبروئید بادی بود و PIAS3 به عنوان دیگر ممانعت کننده STAT3 در سلول های بنیادی رویانی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و خودگشایی، بیشتر از نوع هماتاسازی آن و امبروئید بادی بود. بیان PIM و CDX2 در سلولهای بنیادی رویانی گاو میش و امبروئید بادی به یک میزان مشاهده شد (شکل ۲a).

در ارتباط با چرخه سیگنالی FGF-2 نتایج این مطالعه نشان داد، FGF-2 و گیرنده اول آن در سلول های بنیادی رویانی گاو میش بیان شدند، در حالی که گیرنده سوم آن در سلول های بنیادی حاصل از هماتاسازی بیان نشد. اجزاء حد واسط این چرخه در سلول های بنیادی رویانی گاو میش از هر سه منشاء به یک میزان بود (شکل ۲b).



شکل ۲- بیان ژن های چرخه های سیگنالی LIF و FGF^{-2} در سلول های بنیادی رویانی گاو میش (a) چرخه سیگنالی LIF b چرخه سیگنالی FGF-2 (E: امبروئید بادی، C: سلول های بنیادی حاصل از هماتاسازی، I: سلول های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی، P: سلول های بنیادی حاصل از خودگشتی)

(FGF=fibroblast growth factor, FGFR= fibroblast growth factor receptor, SHP2=SH2 domain-containing phosphatase; MAPK = mitogen-activated protein kinase, PI3K=Phosphoinositide-3kinase, JAK2=Janus kinase 2; GP130, glycoprotein 130, CDX2: Caudal-related homeobox, SOCS= Suppressors of cytokine signaling.)



شکل ۳- تفاوت حفظ پرتوانی و خودنوسازی در سلول های بنیادی رویانی انسان و موش. در سلول های بنیادی موش ژن های پرتوانی در اثر اتصال LIF به گیرنده آن و فعال شدن چرخه JAK/STAT3 افزایش می یابند (a) در حالی که در انسان چرخه FGF در این امر موثر است (Anneren et al., 2008; Okita و Yamanaka, 2006). (b) Rho و همکاران، 2006.

می توانند باقی بمانند (Okita و Yamanaka، ۲۰۰۶). همچنین مطالعات مربوط به خرگوش نیز نقش FGF-۲ در حفظ سلول های بنیادی در حالت تمایز نیافته را نشان داده اند (Hond و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، در حالی که بیان گیرنده ها و ترکیبات حد واسط هر دو چرخه FGF-۲ و LIF در سلول های بنیادی گاو میش حاصل از سه منشاء لقاح آزمایشگاهی، همتا سازی و خود گشنی تا حدود زیادی مشابهت داشتند و نتایج نشان داده اند که هر دو چرخه در حفظ پرتوانی، خود نوسازی و ماندگاری سلول های بنیادی در گاو میش نقش دارند، اما اختلافات زیادی در عملکرد FGF-۲ و LIF در حفظ پرتوانی، خود نوسازی و ماندگاری سلول های بنیادی بین موجودات مختلف وجود دارد، بطوری که FGF-۲ در انسان، میمون و خرگوش و LIF در موش اثر تعیین کننده ای در حفظ پرتوانی و خودنوسازی سلول های بنیادی رویانی دارند. این تفاوت می تواند در عملکرد سلول های بنیادی در گونه های مختلف نقش داشته باشد. به عنوان مثال سلول های بنیادی موش قابلیت تمایز به سلول های تپنده قلب را دارند، درحالی که این امکان در انسان و میمون گزارش نشده است. در نتیجه با مقایسه ترکیبات حد واسط این چرخه ها در سایر حیوانات اهلی و مقایسه آنها می توان تفاوت های موجود را شناسایی و از طریق انتقال ژن هایی که در یک نوع از سلول بنیادی فعال نیست، قابلیت تمایز آنها را به سایر سلول ها افزایش داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پروفسور مان ماهان سینگ جوهان و پربهات پالتا که با حمایت های خود در انجام این پروژه ما را همراهی نمودند کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- 1 - Aksoy, I. Sakabedoyan, C. Bourillot, P. Malashicheva, A.B. Mancip, J. Knoblauch, K. (2007). Self-Renewal of Murine Embryonic Stem Cells Is Supported by the Serine/Threonine Kinases Pim-1 and Pim-3. *Stem cells*, Vol, 25, pp: 2996-3004.
- 2 - Anand, T. Kumar, D. Singh, M.K. Chauhan, M. S. Manik, R. S. Singla, et al. (2011). Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells and preimplantation embryos exhibit comparable expression of pluripotency related antigens. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol, 46, pp: 50-58.
- 3 - Anneren, C. (2008). Tyrosine kinase signalling in embryonic stem cells. *Clinical Science*. Vol, 115, pp: 43-55.
- 4 - Biswas, A. and Hutchins, R. (2007). Embryonic stem cells. *Stem Cells Development*, Vol, 2, pp: 213-222.
- 4 - Bottcher, R.T. Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Review*, Vol, 26, pp: 63-77.
- 5 - Burdon, T. Smith, A. and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, Vol, 12, No, 9, pp: 432-438.

سلول های بنیادی انسان و میمون ضروری و کافی نیست. در حالی که در مورد گاو میش این چرخه به منظور حفظ پرتوانی سلول های بنیادی ضروری به نظر می رسد (Muzaffar و همکاران، ۲۰۱۲). بطور کلی سلول های بنیادی انسان، مقدار کمی از اجزاء سازنده چرخه LIF که شامل گیرنده های LIF، JAK و STAT۳ هستند را بیان می کنند. در حالی که بیان ممانعت کننده چرخه LIF مانند SOCS در آنها بالاتر است (Wei و همکاران، ۲۰۰۵).

اگرچه LIF برای ماندگاری سلول های بنیادی رویانی موش ضروری است، اما تحقیقاتی که بر روی رویان های بدون گیرنده LIF و gp۱۳۰ انجام گرفته مشخص کرده است که این رویان ها توانایی تولید سلول های بنیادی را دارند. این نتایج نشان دادند، عواملی بجز LIF در توده سلولی داخلی رویان در این امر دخیل هستند و چرخه های دیگری بجز gp۱۳۰-LIF در ممانعت از تمایز سلول های بنیادی نقش دارند (Rao، ۲۰۰۴).

نتایج مطالعات ما نشان دادند، FGF-۲ و گیرنده های ۱ و ۳ آن در سلول های بنیادی رویانی گاو میش بیان شدند، اگرچه گیرنده ۳ آن در سلول های بنیادی حاصل از رویان های همتا سازی شده مشاهده نشد. Zandi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند، رشد سلول های بنیادی حاصل از همتا سازی در مقایسه با نوع لقاح آزمایشی آن کمتر بود. این اختلاف رشد می تواند به نوعی در اثر کاهش بیان گیرنده سوم FGF-۲ در سلول های بنیادی حاصل از همتا سازی باشد. Bottcher و Niehrs (۲۰۰۵) گزارش کردند، اتصال FGF به گیرنده اش و هپارین منجر به فسفوریلاسیون گیرنده و فعال شدن چرخه های آبشاری درون سلولی، از جمله چرخه Ras/ERK و چرخه Kinase PI۳ می شود (شکل ۳ b). چرخه Ras/ERK در تمایز سلول های بنیادی رویانی موش و جوجه نقش دارد و توسط LIF فعال می شود (Kunath و همکاران، ۲۰۰۷؛ Stavridis و همکاران، ۲۰۰۷) در حالی که چرخه FGF/ERK خودنوسازی سلول های بنیادی رویانی انسان را افزایش داد (Greber و همکاران، ۲۰۱۰).

چرخه Kinase PI۳ در خودنوسازی سلول های بنیادی رویانی انسان نقش دارد (Kim و همکاران، ۲۰۰۵). FGF-۲ از طریق تنظیم چرخه WNT با فعال کردن Kinase/GSK3β PI۳ در حفظ سلول های بنیادی رویانی انسان در حالت تمایز نیافته موثر است (Ding و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج ما نشان دادند Kinase PI۳ و AKT در سلول های بنیادی رویانی گاو میش بیان شدند و بیان Kinase PI۳ بیشتر از AKT بود. در سلول های بنیادی رویانی موش Kinase PI۳ با فعال کردن AKT باعث مهار عملکرد GSK3β و در نتیجه باعث فعال کردن چرخه WNT می شود. این در حالی است که Kinase PI۳ در سلول های بنیادی موش با استفاده از LIF فعال می شود (Anneren، ۲۰۰۸). Zandi و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند، FGF-۲ و LIF اثر هم افزایی با WNT۳A به منظور افزایش سرعت رشد سلول های بنیادی رویانی گاو میش داشتند. سایر مطالعات در این زمینه نیز نشان دهنده نقش FGF-۲ و LIF در حفظ پرتوانی سلول های بنیادی رویانی گاو میش بود (Sharma و همکاران، ۲۰۱۱).

مهمترین عامل در حفظ خودنوسازی در سلول های بنیادی انسانی FGF می باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۵) (شکل ۳ a). سلول های بنیادی رویانی انسان در حضور FGF-۲ حتی در نبود لایه تغذیه کننده و سرم خون

- 6 - Chauhan, M.S. Singla, S.K. Palta, P. Manik R.S. and Madan M.L. (1998). In vitro maturation and fertilization and subsequent development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryo: Effect of oocyte quality and type of serum. *Reproduction Fertility Development*, Vol, 10, pp:173-177.
- 7 - Darr, H. and Benvenisty, N. (2006). Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation. *Regenerative Medicine*, Vol, 1, No, 3, pp: 317-325.
- 8 - Ding, V.M. Ling, L. Natarajan, S. Yap, M.G. Cool, S.M. and Choo, A.B. (2010). FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. *Journal of Cell Physiology*, Vol, 225, No, 2, pp:417-28.
- 9 - Dvorak, P. Hampl, A. Jirmanova, L. Pacholikova, J. and Kusakabe, M. (1998). Embryoglycan ectodomains regulate biological activity of FGF-2 to embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, Vol, 111, pp:2945-2952.
- 10 - Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, Vol, 292, pp: 154-156.
- 11 - Greber, B. Wu, G. Bernemann, C. Joo, J.Y. Han, D.W. Ko, K. et al. (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, Vol, 6, pp: 215–226.
- 12 - Hond, A. Hirose, M. and Ogura, A. (2009). Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Experimental Cell Research*, Vol, 315, pp:2033-2042.
- 13 - Kim, S.J. Cheon, S.H. Yoo, S.J. Kwon, J. Park, J.H. Kim, C.G. et al. (2005). Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Letters*, Vol, 579, pp: 534-540.
- 14 - Kunath, T. Saba-El-Leil, M.K. Almousaillekh, M. Wray, J. Meloche, S. and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, Vol, 134, No, 16, pp:2895-2902.
- 15 - Kurosawa, H. (2007). Methods for Inducing Embryoid Body Formation: In Vitro Differentiation System of Embryonic Stem Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 103, No. 5, pp: 389–398.
- 16 - Lanner, F. and Rossant, J. (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*, Vol, 137, pp: 3351-3360.
- 17 - Muzaffar, M. Selokar, N.L. Singh, K.P. Zandi, M. Singh, M.K. Chauhan, M.S. et al. (2012). Equivalency of Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Embryonic Stem Cells Derived from Fertilized, Partheno-genetic and Handmade cloned Embryos. *Cellular Reprogramming*. Vol, 14, pp: 267-279.
- 18 - Okita, K. and Yamanaka, S. (2006). Intracellular Signaling Pathways Regulating Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, Vol, 1, pp: 103-111.
- 19 - Rao, M. (2004). Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Developmental Biology*, Vol, 275, pp: 269– 286.
- 20 - Rawlings, J.S. Rosler K.M. and Harrison D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, Vol, 117, pp: 1281-1283.
- 21 - Rho, J. Yu, K. Han, J. Chae, J. Koo, D. Yoon H. et al. (2006). Transcriptional profiling of the developmentally important signaling pathways in human embryonic stem cells. *Human Reproduction*, Vol, 21, No, 2 pp: 405–412.
- 22 - Sasaki, N. Okishio, K. Ui-Tei, K. Saigo, K. Kinoshita-Toyoda, A. Nishimura, H.T. et al. (2008). Heparan Sulfate Regulates Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol, 283, No, 6, pp: 3594–3606.
- 23 - Shah, R.A. George, A. Singh, M.K. Kumar, D. Anand, T. Chauhan, M.S. et al. (2009). Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, Vol, 71, No, 8 pp:1215-1219.
- 24 - Sharma, R. George, A. Kamble, N.M. Singh, K.P. Chauhan, M.S. Singla, S.K. et al. (2011). Optimization of culture conditions to support long-term self-renewal of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells. *Cell Reprogramming*, Vol, 13, No, 6: pp: 539-549.
- 25 - Smith, A.G. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol, 17, pp: 435-462.
- 26 - Smith, A.G. Heath, J.K. Donaldson, D.D. Wong, G.G. Moreau, j. Stahl, M. et al. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, Vol, 336, pp: 688–690.
- 27 - Stavridis, M.P. Lunn, J.S. Collins, B.J. and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development*, Vol, 134, No, 16, pp: 2889-2894.
- 28 - Stewart, M.H. Bendall, S.C. and Bhatia, M. (2008). Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency. *Molecular Medicine*, Vol, 86, pp: 875-886.
- 29 - Wei, C.L. Miura, T. Robson, P. Lim, S.K. Xu, X.Q. Lee, M.Y. et al. (2005). Transcriptome profiling of human and murine ESCs

identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. Stem Cells, Vol, 23, pp: 166-185.

30 - Xie, J. Willerth, S.M. Li, X. Macewan, M.R. Rader, A. Sakiyama-Elbert, S.E. et al. (2009). The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. Biomaterials, Vol, 30, pp: 354-362.

31 - Xu, R.H. Peck, R.M. Li, D.S. Feng, X. Ludwig, T. and Thomson, J.A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods,

Vol, 2, pp: 185-90.

32 - Zandi, M. Muzaffar, M. Shah, S. Kaushik, R. Singh, M. Palta, P. et al. (2013). WNT3A Signaling pathway in buffalo (Bubalus Bubalis) embryonic stem cells. Reproduction Fertility and Development. RD13084

33 - Zandi, M. Sanjabi, M.R. Khamoushi, S. (2013). Production of Buffalo Embryonic Stem Cell from HMC Embryos. Iranian Journal of Animal Science Research, Vol. 5, pp. 242-250

