

Dehydroepiandrosteron Accompanied Retinoic Acid Enhances Differentiation of P19 Embryonal Stem Cells into Neural Cells

Hossein Azizi, M.Sc.¹, Narges Zare Mehrjerdi, M.Sc.¹, Mirza Khalil Bahmani, Ph.D.², Hossein Baharvand, Ph.D.^{1, 3*}

1. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

2. HIV & Hepatitis Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

3. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
Email: baharvand@royaninstitute.org

Received: 6/Dec/2007, Accepted: 5/Jun/2008

Abstract

Objective: Dehydroepiandrosteron (DHEA) is a neurosteroid with potential effect on neurogenesis, neuronal survival and proliferation of neural progenitor cells. However there is no direct evidence for its biological effect during the differentiation of stem cell-derived neurons. The p19 line of embryonal carcinoma cells develops into neurons, astroglia and fibroblasts after exposure to retinoic acid (RA). This study was initiated to assess the effect of DHEA on neural cells derived from p19 embryonal carcinoma stem cells.

Materials and Methods: P19 cells were suspended in dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) containing fetal bovine serum (FBS) in bacterial-grade petri dishes in the presence of RA, DHEA and RA+DHEA for 6 days. Then cells were trypsinized for dispersion and replaced in poly L- lysine (10µg/ml) coated tissue culture dishes without RA and DHEA for 4 days. The expression of neural markers Map-2, Tau, beta-tubulin III- clone Juj (Tuj1), astrocyte marker GFAP and the percent of neurotransmitters tyrosin hydroxylase, glutamate, serotonin and actyl cholin transferase were evaluated by flowcytometry, immunocytochemistry and RT-PCR analysis.

Results: Flowcytometry analysis showed that about $63 \pm 3\%$ of the cells express neuronal marker Tuj1 and about $5 \pm 1\%$ of the cells express tyrosine hydroxylase neurotransmitters in RA treated groups. However when RA and DHEA were added to the culture medium, Tuj1 expression increased to about $74 \pm 1\%$ and tyrosine hydroxylase expression increased to $23 \pm 2\%$.

Conclusion: Results showed that DHEA accompanied RA increased the number of Tuj1 and dopaminergic neurons that were derived from p19 embryonal carcinoma stem cells.

Keywords: Retinoic Acid, Neurogenesis, Dehydroepiandrosteron

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 228-235

اثر دهیدرواپی اندرواسترون همراه با اسیدرتینوئیک بر تمایز سلول‌های بنیادی رویانی P19 به سلول‌های عصبی

حسین عزیزی ^۱، M.Sc.، نرگس زارع مهرجردی ^۱، M.Sc.، میرزا خلیل بهمنی ^۲، Ph.D.، حسین بهاروند ^۳، Ph.D.

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

۲. دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات هپاتیت و HIV، شیراز، ایران

۳. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی

پست الکترونیک: Email: baharvand@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۶/۱/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۱۶

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی و اثر دهیدرواپی اندرواسترون همراه با اسیدرتینوئیک بر تمایز سلول‌های عصبی از سلول‌های P19 و تعیین ماهیت آنها

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های P19 به مدت ۶ روز به صورت سوسپانسیون در ظروف کشت پلاستیکی مخصوص کشت باکتری همراه با محیط DMEM حاوی سرم کشت شد. در این مدت زمان سلول‌ها در معرض اسیدرتینوئیک، دهیدرواپی اندرواسترون و اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون قرار گرفت. سلول‌ها تریبسینه شده و به مدت ۴ روز روی بستر پوشیده شده از پلی-L-لیزین کشت شد. سپس درصد بیان مارکرهای عصبی Tuj1, MAP-2, Tau، مارکر آستروسیتی (GFAP)، درصد نوروترانسمیترهای تیروزین هیدروکسیلاز، گلوتامات، سروتونین و استیل کولین سلول‌های عصبی با فلوسایتومتری، ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** آنالیزهای فلوسایتومتری نشان داد که حدود 63 ± 3 درصد سلول‌ها Tuj1 و حدود 5 ± 1 درصد سلول‌ها تیروزین هیدروکسیلاز را در گروه اسیدرتینوئیک بیان می‌کند. اما در گروه تحت تیمار اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون بیان Tuj1 به حدود 1 ± 74 درصد و نوروترانسمیتر تیروزین هیدروکسیلاز به حدود 2 ± 23 درصد افزایش یافت.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که دهیدرواپی اندرواسترون به همراه اسیدرتینوئیک تعداد سلول‌های عصبی Tuj1 و عصب‌های دوپامینرژیک مشتق شده از سلول P19 را افزایش می‌دهد.

* **کلیدواژگان:** اسیدرتینوئیک، تمایز به سلول‌های عصبی، دهیدرواپی اندرواسترون

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۲۸-۲۳۵

مقدمه

استروئیدها نقش مهمی در کنترل عصب‌زایی ایفا می‌کنند. سطح استروئیدها در خون و مغز به برخی از وقایع خارجی مانند استرس‌ها یا فرایندهای زیستی مانند طول سن وابسته است (۱، ۲). در سلول‌های بنیادی کورتکس رویان انسان دهیدرواپی اندرواسترون سبب افزایش بیان مارکر گلیال (Glial Fibrillar Acidic Protein; GFAP) و مارکر عصبی (Beta-Tubulin III- Clone Tuj; Tuj1) می‌شود (۳). محققان دریافتند که رت‌های بالغی که در دوران نوزادی در معرض دهیدرواپی اندرواسترون قرار می‌گیرند، بیان پروتئین عصبی (Microtubule-Associated Protein; MAP-2) در سلول‌های هیپوکامپ آنها افزایش می‌یابد (۴). مشخص شده که دهیدرواپی اندرواسترون بیان مارکر عصبی (Neuronal Specific Nuclear Protein; NeuN) را در سلول‌های هیپوکامپ موش بالغ تحریک کرده و سبب افزایش عصب‌زایی می‌شود (۵). یک اثر هم‌افزایی بین اسیدرتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون بر سلول‌های نورویلاستوما‌ی انسانی گزارش شده که می‌تواند باعث افزایش بیان مارکر عصبی

اسیدرتینوئیک به عنوان مشتقی از ویتامین A، برای حفظ رشد و پیشرفت طبیعی سلول‌ها ضروری است. این ماده یک تمایزدهنده عمومی بوده که در بافت‌های مختلف در دوران رویانی و بلوغ به خصوص در سیستم عصبی وجود دارد و باعث پیشرفت تمایز عصبی می‌شود. الگوی رشد لوله عصبی در محور پستی-شکمی تحت تأثیر ریخت‌زاهای خارج سلولی هم‌چون (FGF) Fibroblast Growth Factors, Retinoic Acid, (BMP) Bone Morphogenetic Protein, Shh (Sonic Hedgehog) قرار می‌گیرد (۷، ۸). لوله عصبی در حال رشد به عنوان یکی از بخش‌های اصلی رویانی، حاوی مقادیر زیادی از اسیدرتینوئیک است (۹). تحقیقات نشان داده که عدم حضور اسیدرتینوئیک باعث ایجاد اختلالاتی در سازمان دهنده‌های مورفولوژیکی نخاع و همچنین رفتارهای سلولی در طی رشد نخاع می‌گردد. از ویژگی‌های سلول‌های P19 در این است که اگر در محیط‌های کشت معمولی به صورت توده‌ای کشت داده شوند، بسیاری از سلول‌ها حالت بنیادی را حفظ کرده و تنها بخش کوچکی

و EDTA ۰/۰۵۸ درصد انجام شد. بدین نحو که بعد از اضافه کردن محلول شست‌وشو، سلول‌ها با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت محلول رویی حذف شد. در ابتدا سلول‌های مورد نظر با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سلول‌ها شست‌وشو داده شده و با تریتون ۱۰۰-X یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه نفوذپذیر شد. بعد از شست‌وشو، سلول‌ها با سرم ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. به سلول‌ها آنتی‌بادی اولیه Tuj1 (Sigma T5293)، MAP-2 (Sigma M1406)، Tau (RD MAB 361) پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال (GFAP) (Chemicon MAB3402)، نوروترانسمیترهای تیروزین هیدروکسیلاز (TH) (Sigma T1299)، گلوتامات (گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز) (Sigma G5038)، سروتوین (۵-هیدروکسی تریپتامین 5HT) (Sigma S5545) و استیل کولین ترانس‌فراز (Chemicon MAB5270) با غلظت ۲۰۰/۱ اضافه شده و بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری و شست‌وشو، آنتی‌بادی‌های ثانویه Goat Anti-Mouse IgG FITC (Chemicon AP308F) و Anti Rabbit IgG FITC (Sigma, F1262) غلظت ۱۰۰/۱ اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس سلول‌ها شست‌وشو داده شده و بعد از تثبیت با پارافرمالدئید یک درصد، توسط دستگاه فلوسایتمتری مدل Bectin Dekenson و نرم‌افزار Win MDI ۲/۸ ۸/۲ خوانده شد.

رنگ‌آمیزی ایمنونو فلورسانس

مراحل ایمنونو سیتوشیمی برای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های عصبی به شرح زیر می‌باشد: سلول‌ها با محلول پارافورما الدئید ۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال تثبیت (Fixed) و با محلول Triton X-100 دودهم درصد تهیه شده در PBS به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شده و سپس با آنتی‌بادی اولیه GFAP، Tau، β -Tubulin III رقیق شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یا یک شبانه روز در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از شست‌وشو آنتی‌بادی‌های ثانویه Goat anti-mouse IgG FITC و Anti Rabbit IgG FITC با غلظت ۲۰۰/۱ علیه آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

RT-PCR

حدود ۱۰^۶ سلول در روز ۱۰ تمایز از لحاظ بیان ژن‌های عصبی HB9، β -Tubulin III، TH بررسی شد. برای این منظور، RNA سلول‌های مد نظر با استفاده از محلول RNX-plus solution و مطابق با پروتوکول این شرکت جداسازی شد. در ادامه با استفاده از محلول Dnase I به همراه MgCl₂ و DNA، Reaction buffer احتمالی همراه با RNA استخراج شده، حذف گردید. سپس فعالیت Dnase I با افزودن ۲۵ میلی‌گرم EDTA متوقف شد. ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت Revert acid H minus انجام شد. در ادامه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های عصبی انجام شد. شرایط PCR به صورت: واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳ درجه سانتی‌گراد) و واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه (۹۳ درجه سانتی‌گراد) Annealing: با توجه به Tm پرایمرهای هر ژن که در جدول یک ذکر شده است. Extention هر سیکل: ۴۵ ثانیه Extention.

از سلول‌ها به سلول‌های شبیه اندودرم خارج رویانی تمایز می‌یابند (۱۰) و زمانی که در معرض اسیدرتینوئیک قرار بگیرند به طور چشم‌گیری به سمت سلول‌های عصبی هدایت می‌شوند (۱۱). اما وقتی در معرض Dimethyl Sulfoxide (DMSO) قرار بگیرند به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای هدایت می‌شوند (۶). بنابراین این سلول‌ها مدل سلولی مناسبی برای بررسی تکوین سلول‌های عصبی و ماهیچه‌ای می‌باشد. اهمیت سلول‌های p19، در این است که در حالت غیرتمایز یافته، سلول‌های مناسبی برای دست‌کاری ژنتیکی هستند و همچنین زمانی که در معرض اسیدرتینوئیک قرار بگیرد به سلول‌های عصبی شبیه سیستم عصبی مرکزی تمایز می‌یابد (۱۲). بنابراین با مطالعه سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول‌های p19، می‌توان نتایج را به سلول‌های عصبی ناحیه سیستم عصبی مرکزی تعمیم داد. تا کنون مطالعه‌ای در مورد اثر اسیدرتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون بر تمایز سلول‌های بنیادی رویانی به سلول‌های عصبی صورت نگرفته است. مطالعه قبلی ما نشان داد که دهیدرواپی اندرواسترون به همراه اسیدرتینوئیک می‌تواند سبب افزایش تکثیر پیش‌سازهای عصبی مشتق از p19 شود (۱۳). لذا در این مطالعه ابتدا اثر اسیدرتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون را به صورت مجزا بر تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومایی رویانی p19 به سلول‌های عصبی بالغ مورد بررسی قرار داده سپس در ادامه به اثر هم‌زمان آنها نیز بر تمایز این سلول‌ها به مشتقات عصبی خواهیم پرداخت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سلول‌های کارسینومایی جنینی رده p19 (تهران، موسسه پاستور) استفاده شد. این سلول‌ها در محیط Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) حاوی ۱۵ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) کشت داده شده‌اند.

تمایز به سلول‌های عصبی

نحوه تمایز سلول‌های بنیادی p19 به سلول‌های عصبی بر اساس تشکیل اجسام شبه رویانی انجام شد. بدین ترتیب که سلول‌ها با غلظت $1/5 \times 10^5$ سلول بر میلی‌لیتر به مدت ۶ روز به صورت سوپانسیون در ظروف کشت پلاستیکی مخصوص کشت باکتری کشت شد. محیط سلول‌ها در روزهای ۴-۱ حاوی DMEM با ۵ درصد FBS بوده و مقدار آن در روزهای ۶-۵ به ۳ درصد کاهش یافت. در این مدت زمان سلول‌ها در گروه‌های کنترل (در این گروه سلول‌ها در مدت ۶ روز در معرض اسیدرتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون قرار نگرفت)، دهیدرواپی اندرواسترون (۱ میکرومولار)، اسیدرتینوئیک (۴ میکرومولار) و اسیدرتینوئیک (۴ میکرومولار) + دهیدرواپی اندرواسترون (۱ میکرومولار) با هم تیمار شد. سپس سلول‌های اجسام شبه رویانی از هم جدا شده و روی بستر پوشیده شده از پلی-L-لیزین (۱۰ میکرومولار بر میلی‌لیتر) حاوی محیط کشت عصبی قرار گرفته و بعد از ۴ روز تست‌های سلول‌های عصبی بررسی شد.

فلوسایتمتری

مراحل فلوسایتمتری برای آنتی ژن اختصاصی سلول‌های عصبی به شرح زیر بود: تعداد سلول‌های انتخاب شده حدود ۱۰^۶ و در تمام مراحل آزمایش دما ۴ درجه و شست‌وشو با محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) حاوی FBS یک درصد

جدول ۱: محصولات PCR روی آگارز ۱.۷ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل رویت شد.

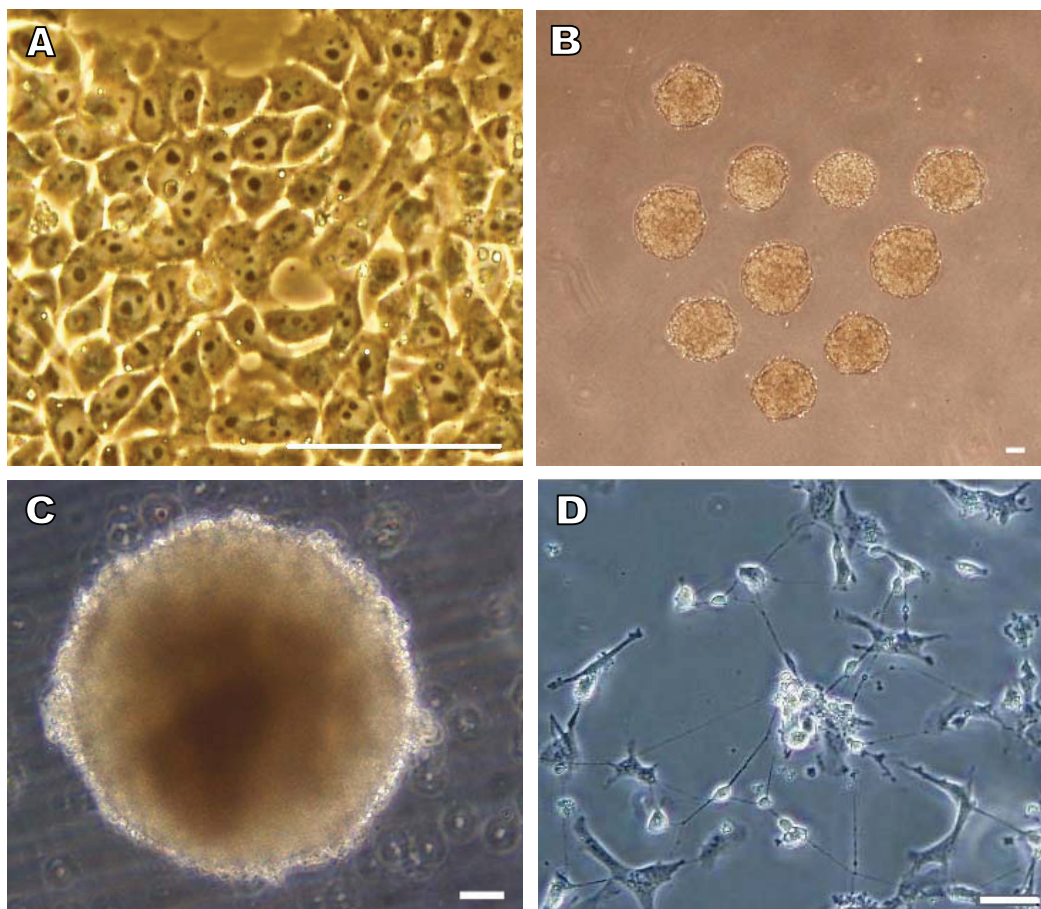
Genes	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)	Annealing Temperature
HB9	F:5'-GGCGCTTTCCTACTC ATACC- 3' R:5'-TCCTCTTCCGTCTTC TCCTCAC -3	456	64
TH	F:5'-TCCTGCACTCCCTGTCAGAG- 3' R:5'-CCAAGAGCAGCCCATCAAAGG-3'	423	59/4
Tubulin3	F:5'- GTTCCCACG TCTCCA CTTCTTC -3' R:5'-CCAGGTCATTGTTGC TCTC-3'	479	65
β -tubulin	F:5'-GGAACATAGCCGTAACACTGC-3' R:5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'	335	67

یافته‌ها

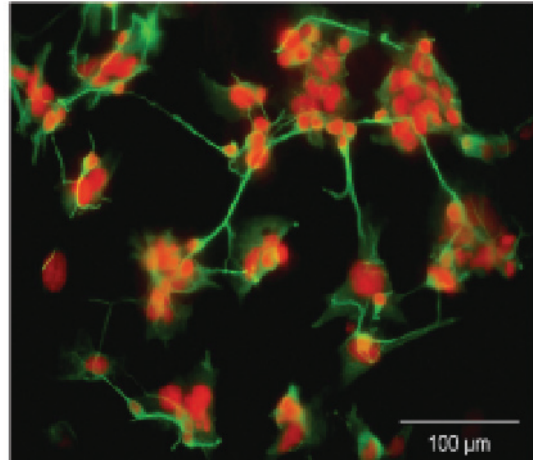
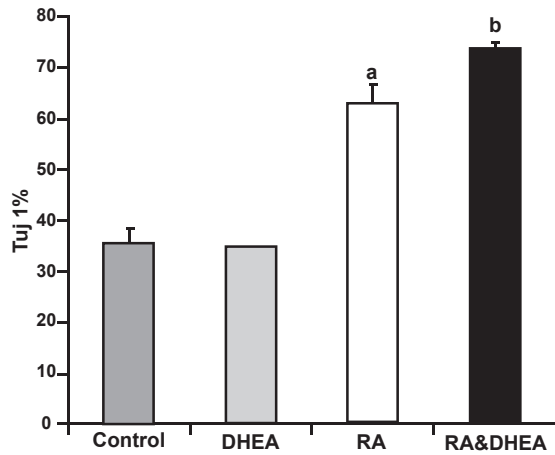
سلول‌های P19 بدون نیاز به لایه تغذیه‌کننده (Feeder layer) به سادگی در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS رشد می‌کنند (شکل ۱A). نحوه تمایز سلول‌های بنیادی P19 به سلول‌های عصبی بر اساس تشکیل اجسام شبه رویانی انجام شد. این سلول‌ها در ظروف غیرچسبنده قادر هستند توده‌های اجسام شبه رویانی را شکل دهند (شکل ۱B, C).

آزمون آماری

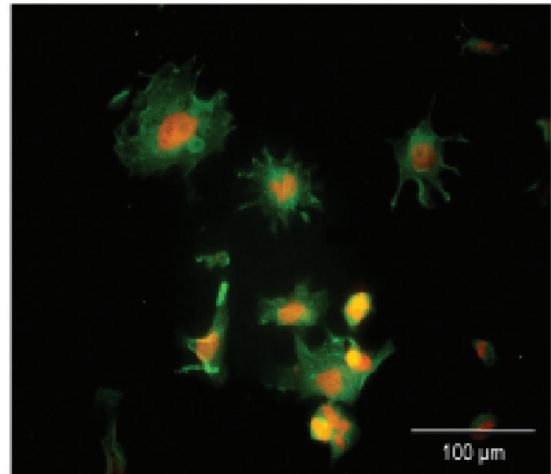
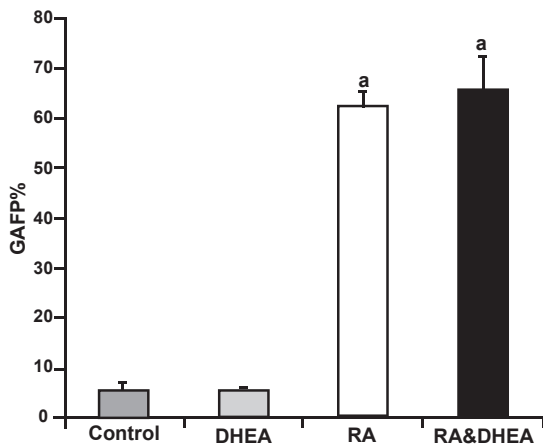
مطالعه حاضر به صورت Parallel Experimental Design طراحی شد که در آن گروه‌های مختلف سلول‌های کارسینومایی جنینی P19 به صورت دو به دو بررسی شد. در این مطالعه از تست ANOVA برای بررسی P-value بین همه گروه‌ها و از تست Tukey برای بررسی اختلاف میانگین‌های دو گروه استفاده شد. حداقل تکرارهای آزمایش برای گروه‌ها سه بار بوده و $p < 0.05$ به عنوان معنی داری در نظر گرفته شد.



شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های P19 در حالت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در شکل A سلول‌های P19 را در حالت غیرتمایز یافته می‌توان مشاهده کرد. شکل B توده‌های اجسام شبه رویانی در روز سوم را نشان می‌دهد. شکل C اجسام شبه رویانی در روز ششم را نشان می‌دهد. شکل D بعد از ۴ روز پلیت شدن سلول‌های پیش‌ساز عصبی در گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک، مورفولوژی سلول‌های عصبی را می‌توان مشاهده کرد. مقیاس: ۵۰ میکرومتر



شکل ۲: سمت چپ: نتایج فلوسایتومتری حاصل از آنالیز آماری TuJ1 بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد. a اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون ($p < 0.001$) b اختلاف معنی‌دار با گروه اسیدرتینوئیک ($p < 0.05$). سمت راست تصویر ایمونوسیتوشیمی TuJ1 بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد.



شکل ۳: سمت راست: نتایج فلوسایتومتری حاصل از آنالیز آماری GFAP بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد. a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون. سمت چپ: تصویر ایمونوسیتوشیمی GFAP بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد.

به حدود 4 ± 62 درصد اما در گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون به حدود 1 ± 5 درصد کاهش یافت ($p < 0.001$) (شکل ۳). بنابراین با توجه به پایین بودن میزان عصب‌زایی در گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون، در آزمایشات بعدی بررسی‌ها فقط در گروه‌های اسیدرتینوئیک و اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون انجام شد.

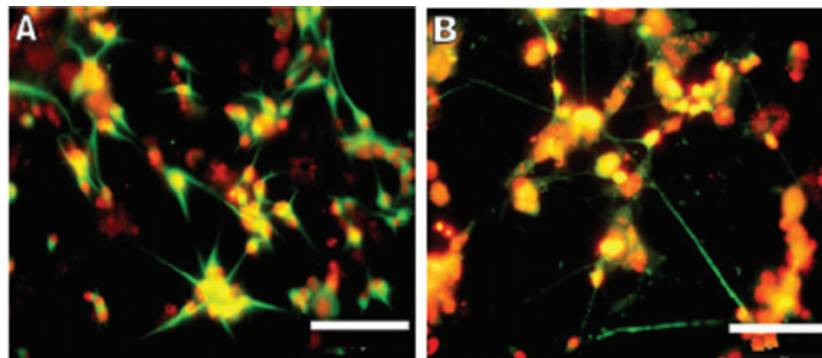
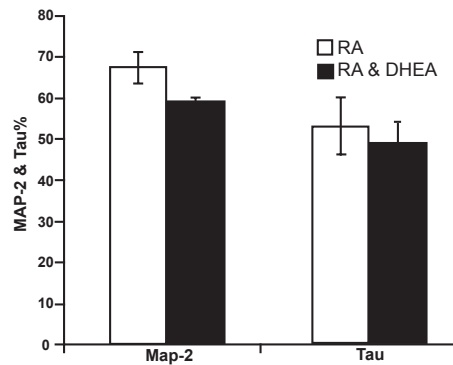
از بررسی‌های به عمل آمده بر میزان بیان مارکر Tau و Map-2 در دو گروه اسیدرتینوئیک و اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون می‌توان به ترتیب 12 ± 53 و 8 ± 49 درصد سلول‌ها مارکر Tau، و 5 ± 65 و 1 ± 59 درصد سلول‌ها مارکر Map-2 را بیان کرد (شکل ۴).

آنالیز RT-PCR بلوغ سلول‌های عصبی را با بیان ژن‌های TH، TuJ1، و HB9 در سطح mRNA در دو گروه اسیدرتینوئیک و اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون تایید کرد (شکل ۵).

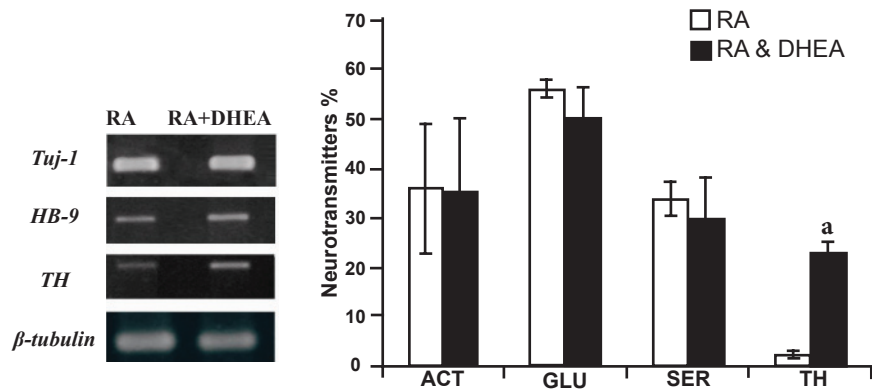
از بررسی‌های به عمل آمده بعد از ۴ روز پلیت شدن توده‌های سلولی p19 تحت تیمار با اسیدرتینوئیک مورفولوژی، سلول‌های عصبی کاملاً مشخص شده که از مهم‌ترین این شاخص‌ها می‌توان به وجود استپاله‌هایی شبه اکسون‌ها و دندریت‌ها اشاره کرد (شکل ۱D).

از بررسی‌های به عمل آمده بعد از ۴ روز پلیت شدن بر تیمار توده‌های سلول p19 با دهیدرواپی اندرواسترون و اسیدرتینوئیک نشان داده شد. حدود 3 ± 63 درصد سلول‌ها در گروه اسیدرتینوئیک و حدود 1 ± 74 درصد سلول‌ها در گروه اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون TuJ1 را بیان کرده است ($p < 0.05$) اما این میزان در گروه‌های کنترل و دهیدرواپی اندرواسترون به حدود 3 ± 35 درصد کاهش یافت ($p < 0.001$) (شکل ۲).

هم‌چنین میزان بیان GFAP (مارکر سلول‌های آستروسیتی) در دو گروه اسیدرتینوئیک و اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون



شکل ۴: بالا، نتایج فلوسایتومتری حاصل از آنالیز آماری MAP-2 و Tau بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد. پایین تصویر ایمنوسیتوشیمی MAP-2 (A) و (B) Tau بعد از ۴ روز پلیت شدن را نشان می‌دهد. مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.



شکل ۵: سمت راست نتایج فلوسایتومتری حاصل از آنالیز آماری نوروترانسمیترها را نشان می‌دهد. a اختلاف معنی‌دار با گروه اسیدرتینوئیک ($p < 0.001$). سمت چپ آنالیز RT-PCR برای ژن‌های بالغ عصبی را نشان می‌دهد.

Tau-2 و پاسخ دهنده‌های دوپامین را به همراه دارد که از طریق پاسخ دهنده‌های N-متیل دی‌آسپاراتات کلسیم داخل سلولی را افزایش می‌دهد (۱۴، ۱۵). توده‌های سلول p19 در طی ۶ روز تیمار با دوز نرمال اسید رتینوئیک و ۴ روز بعد از پلیت شدن حدود ۶۰ درصد سلول‌ها مارکرهای عصبی Tuj-1 MAP-2 و پروتیین فلامنتی حد واسط GFAP و حدود ۵۰ درصد سلول‌ها مارکر Tau و در بررسی نوروترانسمیترها حدود ۵۰ درصد عصب‌ها حاوی گلو تامات، ۳۵ درصد استیل کولین، ۳۳ درصد سروتونین و ۲ درصد تیروزین هیدروکسیلاز رایان می‌کنند در صورتی که گروه تیمار شده با اسید رتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون بیان Tuj-1 به حدود ۷۰ درصد و تیروزین هیدروکسیلاز به حدود ۲۰ درصد افزایش یافته است. این یافته‌ها نشان می‌دهد، اضافه شدن دهیدرواپی اندرواسترون

بررسی نوروترانسمیترها بعد از ۴ روز پلیت شدن توده‌های سلولی P19 با اسید رتینوئیک و دهیدرواپی اندرواسترون نشان داد حدود ۳۵ درصد سلول‌ها استیل کولین، ۵۰ درصد سلول‌ها گلو تامات و ۳۰ درصد سلول‌ها سروتونین را بیان کرده است. اما میزان بیان نوروترانسمیتر TH در گروه اسید رتینوئیک حدود ۵ درصد و در گروه اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون به حدود ۲۰ درصد افزایش یافت ($p < 0.001$) (شکل ۴).

بحث

مطالعات به دست آمده از تاثیر دهیدرواپی اندرواسترون بر Neural Stem Cells نشان می‌دهد، دهیدرواپی اندرواسترون افزایش رشد اکسونی، اتصالات سیناپسی افزایش mRNA مارکرهای Tau-1

با تبدیل به DHEAS سبب افزایش پروتئین تیروزین هیدروکسیلاز شده باشد. در ابتدا تنها حضور نوروترانسمیترهای استیل کولین (۱۵) و کاتکول‌آمین (۳۰) در سلول‌های عصبی متمایز شده از سلول P19 شناسایی شده بود. مطالعات اخیر حضور گلوتامات را در درصد زیادی از عصب‌ها نشان می‌دهد (۳۱، ۳۲). ۶ روز بعد از شروع تیمار با دوز نرمال اسیدرتینوئیک (5×10^{-7}) بیش از ۸۵ درصد سلول‌ها مارکرهای عصبی مانند پروتئین‌های فلامنتی 68KD، 160KD را بیان می‌کند و در روزهای بعد به علت تکثیر سلول‌های غیرعصبی از جمعیت سلول‌های عصبی کاسته می‌شود (۳۳). در روز دهم سلول‌های آستروسیتی بالغ با پروتئین فلامنتی حد واسط GFAP قابل شناسایی است (۱۰). در محیط کشت بقا طولانی مدت عصب‌های مشتق شده از سلول P19 به حضور سلول‌های غیرعصبی یا فاکتورهای رشد وابسته است (۳۴). عصب‌های مشتق شده از سلول P19 زمانی که به سیستم عصبی مرکزی پستانداران (۳۵) منتقل شود، می‌تواند عملکرد داشته باشند. در مطالعاتی با پیوند سلول‌های P19 تیمار شده با اسیدرتینوئیک به ناحیه stratum رت بالغ (عصب‌های این ناحیه با نوروتوکسین تخریب شده بود) نشان داد، عصب‌های سلول‌های P19 و سلول‌های غیرعصبی به مدت ۱۳ هفته در این ناحیه بقا می‌یابند (۳۶). بررسی‌ها نشان می‌دهد که دهیدرواپی اندرواسترون در فعال کردن پاسخ دهنده‌های NMDA تاثیر دارد. زیرواحدهای NMDAR-1 به طور تکوینی در لایه ۷ نئوکورتکس در انتهای بارداری و اولین زندگی نوزادی (در رت) بیان می‌شود (۳۷). زیر واحدهای مختلف ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیکی و فسفریلاسیون متفاوتی داشته، بنابراین ممکن است در طی تکوین پاسخ دهنده‌های متفاوتی نیز داشته باشد (۴۰-۳۸).

نتیجه‌گیری

در طی تکوین، واکنش‌های دهیدرواپی اندرواسترون می‌تواند از طریق اشکال خاص پاسخ دهنده NMDA تنظیم شود که رشد اکسونی و تماس‌های سلولی را به همراه دارد. با این فرایندها عصب‌زایی شروع می‌شود که این حالت‌ها را می‌توان به مغز افراد بالغ تعمیم داد. بنابراین دهیدرواپی اندرواسترون ممکن است در شکل گرفتن مغز در طی جنین زایی و اوایل زندگی نوزادی نقش ایفا کند. در مجموع نتایج نشان می‌دهد که دهیدرواپی اندرواسترون به همراه اسیدرتینوئیک میزان تمایز به سلول‌های عصبی و بیان نوروترانسمیترهای دوپامینرژیک را افزایش داده اما به تنهایی نمی‌تواند سبب تمایز سلول‌های عصبی شود.

تقدیر و تشکر

با گرامیداشت یاد دانشمند فقید، دکتر سعید کاظمی آشتیانی که این پروژه در ابتدا با راهنمایی ایشان آغاز شد، نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تشکر خود را از پژوهشکده رویان که تمام هزینه‌های این طرح را تامین کردند و هم‌چنین آقایان فرخی، حقیقی و خانم‌ها صعودی، دکتر ابراهیمی، مرادمنند و ولد بیگی ابراز نمایند.

References

- Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience*. 2004; 128: 645-654.
- Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neurobiol*. 2003; 55: 247-260.

در هنگام تشکیل پیش‌سازهای عصبی علاوه بر افزایش عصب‌زایی، سلول‌های عصبی را به سمت دوپامینرژیک‌ها سوق می‌دهد و ممکن است اضافه شدن آن بعد از تشکیل پیش‌سازهای عصبی نقش‌های دیگری را بر سلول‌های عصبی ایفا کند.

اسیدرتینوئیک که فرم فعال ویتامین A است، تاثیر زیادی بر مراحل تکوینی جانوران دارد. این ترکیب در مراحل اندام‌زایی، تعیین رده سلولی و مرگ سلولی نیز اثر دارد (۲۱-۱۶). در دوران جنینی این ماده توسط ژن Retinaldehyde Dehydrogenase ساخته می‌شود و با تاثیر بر سلول‌های بنیادی رویانی CNS و ساقه مغز موجب القای سلول‌های پیش‌ساز عصبی و تمایز آنها به سمت تشکیل عصب و سلول‌های گلیال می‌شود (۲۲-۲۰). اسیدرتینوئیک به یک گروهی از پاسخ دهنده‌های اسیدرتینوئیک (RARs) متصل می‌شود (۲۳). سلول‌های P19 دو تا از ژن‌های RAR α و RAR β را بیان می‌کند (۲۴). بنابراین این سلول‌ها زمانی که در معرض اسیدرتینوئیک قرار می‌گیرد، تنها برخی از ژن‌های پاسخ دهنده به اسیدرتینوئیک را بیان می‌کند نه همه آنها (۲۵). در این مطالعه دیده شد اسیدرتینوئیک سبب القای سلول‌های عصبی شده اما دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی چنین نقشی را ایفا نمی‌کند. در صورتی که دهیدرواپی اندرواسترون به همراه اسیدرتینوئیک میزان عصب‌زایی را حتی نسبت به اسیدرتینوئیک بیشتر افزایش می‌دهد. در واقع استفاده از اسیدرتینوئیک موجب القای رونویسی گروهی از ژن‌ها مانند گلیکوپروتئین ترش‌چی Sonic hedgehog، فاکتور رونویسی ژن HNF-3، Mash-1، pax-6 و Kappa Opidi در سلول‌های بنیادی رویانی می‌شود و روشن شدن این آبشار و بیان ژن‌های مختلف موجب القای تمایز عصبی و توقف تمایز مزودرمال و کاهش میزان بیان mRNA ژن‌های مزودرمال مانند globin، cardiac actin و Brach-yary می‌شود (۲۰، ۲۶، ۲۷). ممکن است دهیدرواپی اندرواسترون به تنهایی قادر به فعال کردن این مسیر سیگنالی نباشد اما به همراه اسیدرتینوئیک از مکانیزم‌های دیگری میزان عصب‌زایی را افزایش دهد. به عنوان مثال مطالعه قبلی نشان داد، گروه اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون میزان تشکیل سلول‌های پیش‌ساز عصبی را نسبت به گروه اسیدرتینوئیک افزایش می‌دهد (۱۳). بنابراین ممکن است افزایش عصب‌زایی در گروه اسیدرتینوئیک + دهیدرواپی اندرواسترون به علت افزایش سلول‌های پیش‌ساز عصبی در این گروه باشد. DHEAS و Allopregnanolon سبب افزایش سنتز کاتکول‌آمین می‌شود به طوری که این اثر توسط مهارکننده‌های تیروزین هیدروکسیلاز و 3-(4-hydroxyphenyl)-ala-nine متوقف می‌شود. این استروئیدها سبب افزایش سطح mRNA و پروتئین تیروزین هیدروکسیلاز می‌شود (۲۸). آنزیم استروئیدسولفو هیدرولاز یک پروتئین تنظیم کننده کلیدی نئوکورتکس در طی جنین‌زایی بوده و دهیدرواپی اندرواسترون را به دهیدرواپی اندرواسترون سولفات تبدیل می‌کند (۲۹). بنابراین ممکن است در سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول P19، دهیدرواپی اندرواسترون

- Suzuki M, Wright LS, Marwah P, Lardy HA, Svendsen CN. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 3202-3207.
- Iwata M, Muneoka KT, Shirayama Y, Yamamoto A, Kawahara R. A study of a dendritic marker, microtubule-associated protein 2 (MAP-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA). *Neurosci Lett*. 2005; 386: 145-149.

5. Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci.* 2002; 16: 445-453.
6. Silvagno F, Guarnieri V, Capizzi A, Pescarmona GP. Synergistic effect of retinoic acid and dehydroepiandrosterone on differentiation of human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 2002; 532: 153-158.
7. Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 16273-16278.
8. Chojnacki A, Weiss S. Isolation of a novel platelet-derived growth factor-responsive precursor from the embryonic ventral forebrain. *J Neurosci.* 2004; 24: 10888-10899.
9. Kessel M. Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development.* 1992; 115: 487-501.
10. Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.* 1982; 94: 253-262.
11. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 1441-1445.
12. Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays.* 1994; 16: 343-348.
13. Azizi H, Zare N, Kasemi Aashtiani, Bahmani MKH, Baharvand H. Dehydroepiandrosteron increased the proliferation of neural progenitor cells derived from P19 embryonal carcinoma stem cells. *Physiology and P19 Wmbryonal Carcinoma Stem Cells. Physiology and Pharmacology.* 2008; 12(3): 180-187.
14. Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol.* 2000; 21: 1-56.
15. Jones-Villeneuve EM, Rudnicki MA, Harris JF, McBurney MW. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 1983; 3: 2271-2279.
16. Maden M. Retinoic acid and its receptors in limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 1997; 8: 445-453.
17. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 675-679.
18. Kocsis JD, Akiyama Y, Lankford KL, Radtke C. Cell transplantation of peripheral-myelin-forming cells to repair the injured spinal cord. *J Rehabil Res Dev.* 2002; 39: 287-298.
19. Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 223: 691-694.
20. Bain G, Gottlieb DI. Neural cells derived by in vitro differentiation of P19 and embryonic stem cells. *Perspect Dev Neurobiol.* 1998; 5: 175-178.
21. Hens J, Nuydens R, Geerts H, Senden NH, Van de Ven WJ, Roebroek AJ, et al. Neuronal differentiation is accompanied by NSP-C expression. *Cell Tissue Res.* 1998; 292: 229-237.
22. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* 1995; 168: 342-357.
23. Rudnicki MA, Jackowski G, Saggin L, McBurney MW. Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells. *Dev Biol.* 1990; 138: 348-358.
24. Pratt MA, Kralova J, McBurney MW. A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 6445-6453.
25. Pratt MA, Langston AW, Gudas LJ, McBurney MW. Retinoic acid fails to induce expression of Hox genes in differentiation-defective murine embryonal carcinoma cells carrying a mutant gene for alpha retinoic acid receptor. *Differentiation.* 1993; 53: 105-113.
26. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29: 1525-1539.
27. Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR. Differential induction of HNF-3 transcription factors during neuronal differentiation. *Exp Cell Res.* 1997; 234: 277-284.
28. Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology.* 2005; 146: 3309-3318.
29. Compagnone NA, Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 4678-4683.
30. Sharma S, Notter MF. Characterization of neurotransmitter phenotype during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev Biol.* 1988; 125: 246-254.
31. Pawson L, Pack AK, Bolanowski SJ. Possible glutaminergic interaction between the capsule and neurite of Pacinian corpuscles. *Somatosens Mot Res.* 2007; 24: 85-95.
32. Greenwood SM, Connolly CN. Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 2007; 53: 891-898.
33. McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci.* 1988; 8: 1063-1073.
34. Hogan BL, Taylor A, Adamson E. Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. *Nature.* 1981; 291: 235-237.
35. Strickland S, Mahdavi V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell.* 1978; 15: 393-403.
36. McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol.* 1993; 37: 135-140.
37. Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, et al. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci.* 1995; 15: 6509-6520.
38. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* 1992; 256: 1217-1221.
39. Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS. Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 9359-9363.
40. Brady RJ, Gorter JA, Monroe MT, Swann JW. Developmental alterations in the sensitivity of hippocampal NMDA receptors to AP5. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994; 83: 190-196.