



پروفایل بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جنسی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال انسانی پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی

ماریا ظهیری^۱، منصوره موحدین^{۲*}، سیدجواد مولا^۳، مهرداد نوروزی نیا^۴،
محمد رضا نوروزی^۵، ناصر امیرجنتی^۶

^۱ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، ایران

^۲ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۴ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۵ مرکز تحقیقات سرطان‌های دستگاه ادراری تناسلی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

^۶ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی باروری، پژوهشکده ابن سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۲۴ - پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۱۹)

چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پایه اسپرم‌زایی انسان می‌باشند. با توجه به شمار اندک و نبود شاخص اختصاصی، مطالعه پیرامون ویژگی‌ها و عملکرد این سلول‌ها در شرایط داخل آزمایشگاهی می‌تواند در درک بیولوژی باروری مردان کمک کننده باشد. بررسی کنونی به منظور ارزیابی تأثیر هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی بر میزان کلونی‌زایی و بیان تعدادی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های جنسی مردان در شرایط داخل آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بیضه‌ای با استفاده از روند هضم آنزیمی دو مرحله‌ای و استفاده از صفحات تمایزی، از بیوپسی‌های بیضه جداسازی شدند. دو سیستم کشت به صورت هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم‌کشتی (به عنوان گروه کنترل) طراحی شد. طی سه هفته کشت تعداد و قطر کلونی‌های حاصل ارزیابی شد. بیان اینتگرین آلفا ۶، اینتگرین بتا ۱ و PLZF به عنوان شاخص‌های اختصاصی سلول‌های جنسی با استفاده از Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه در نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و با محدوده اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد هم‌کشتی با سرتولی به طور معنادار منجر به افزایش تعداد و قطر کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی طی دوره کشت نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$). همچنین میزان بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی جنسی تحت بررسی در طی هفته‌های دوم و سوم، در گروه هم‌کشتی نسبت به گروه کنترل به طور معنادار بالاتر بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات بهینه سلول‌های سرتولی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، به نظر می‌رسد بهره‌مندی از سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی می‌تواند به عنوان روش مناسبی به منظور غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان، کلونی‌زایی، کشت، بیان ژن

مقدمه

تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی^۱ پایه اسپرماتوژنز می‌باشند. اسپرماتوژنز روندی است که در طی آن، روزانه میلیون‌ها اسپرم بالغ در بیضه تشکیل می‌شود (۱).

علیرغم پژوهش‌های گسترده‌ای که طی دهه اخیر بر روی سلول‌های جنسی نر در گونه‌های آزمایشگاهی به‌خصوص موش انجام شده است ولی تعمیم این یافته‌ها به انسان نیازمند دقت نظر ویژه‌ای می‌باشد (۲). شناخت عوامل مؤثر در زیست‌شناسی و رفتار این سلول‌ها در چرخه نوینی جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در روند اسپرماتوژنز را می‌گشاید و در زمینه‌های مختلف مانند پیشگیری از بارداری، ژن درمانی، ناباروری مردان و بررسی‌های مرتبط با سرطان بیضه سودمند باشد (۳).

مطالعه مستقیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلیل اندک بودن تعداد آن‌ها در بیضه، نبود مارکر اختصاصی جهت شناسایی و خالص‌سازی این سلول‌ها و همچنین پیچیده بودن محیط تکاملی آن‌ها مشکل می‌باشد، بنابراین تلاش برای بهبود شرایط کشت، تکثیر، غنی‌سازی این سلول‌ها همواره مورد توجه بوده است (۴). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در ریز محیطی اختصاصی درون لوله‌های منی‌ساز، قرار دارند که به آن کنام سلولی^۲ گفته می‌شود. این ریز محیط شامل اجزاء مختلف غشاء پایه و تعدادی سلول‌های سوماتیک می‌باشد. به‌طور حتم سلامت این ریز محیط ضامن تداوم یک روند اسپرماتوژنز طبیعی می‌باشد (۵).

تلاش‌های زیادی جهت بهبود شرایط محیط کشت و هر چه نزدیک‌تر نمودن آن به شرایط موجود در داخل بدن صورت گرفته است ولی به‌دلیل در دست نبودن

اطلاعات کافی در مورد نیازهای رفتاری و تغذیه‌ای این سلول‌ها، موفقیت زیادی در این زمینه به‌دست نیامده است (۶). ایجاد تغییراتی مناسب در محیط کشت این سلول‌ها، به بهبود روند کشت و غنی نمودن آن‌ها کمک می‌نماید (۷). به‌طور نمونه نشان داده شده است که حضور سرم (۸)، افزودن فاکتورهای کشت مختلف (۹)، بهره‌مندی از محیط‌های کشت خاص (۱۰) و یا کشت سلول‌های اسپرماتوگونیای موش بر روی لایه‌های مختلف تغذیه‌کننده از جمله سلول‌های فیبروبلاست یا سرتولی می‌تواند باعث افزایش غنی‌سازی آن‌ها گردد (۱۱ و ۱۲).

شایان ذکر اینکه برخی بررسی‌ها دلالت بر این دارند که هم‌کشتی می‌تواند باعث القاء تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در گونه‌هایی از جمله موش شود (۱۳). بنابراین به‌نظر می‌رسد ریز محیط موجود در بیضه می‌تواند سرنوشت تکاملی سلول‌های جنسی را تنظیم نماید. در این میان نقش سلول‌های سرتولی به واسطه ارتباط نزدیک آن‌ها با سلول‌های جنسی موجود در بیضه دارای اهمیت است (۱۴ و ۱۵).

بر این اساس این پژوهش به‌منظور بررسی نقش هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی بر میزان کلونی‌زایی و الگوی ژنتیکی سلول‌های اسپرماتوگونی در انسان طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌ها از مراکز درمان ناباروری شایامهر و بیمارستان خاتم‌الانبیا تهران از بیمارانی جمع‌آوری شد که برای درمان ناباروری، نمونه بیوپسی از آن‌ها گرفته شده بود و بعد از اتمام مراحل درمانی از مابقی نمونه آن‌ها

^۱ SpermatogoniaS stem Cell (SSC)

^۲ Niche

استفاده شد. کلیه مراحل این پژوهش بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و اخذ رضایت‌نامه آگاهانه از بیماران انجام شد.

جداسازی سلولی

نمونه بیوپسی بیضه بیماران در محیط کشت در طی حداکثر یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شده و پس از توزین، به قطعات کوچک خرد شدند و سپس به آن محیط هضم آنزیمی که حاوی محیط کشت DMEM (DMEM, Gibco, Paisley, UK) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپسین، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیالورونیداز^۳ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DNase (Sigma, St. Louis, MO, USA) بود، اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در طی این مرحله لوله‌های منی‌ساز از بافت‌های هم‌بند اطراف جدا شدند. سپس چند بار با محیط DMEM شستشو داده شده و اجازه داده شد لوله‌ها به کمک گرادیان جاذبه ته‌نشین شدند، سپس محیط بالایی که حاوی سلول‌های بینابینی، سلول‌های خونی و بافت هم‌بند بود، جمع‌آوری و دوباره به لوله‌های محیط کشت تازه حاوی آنزیم‌های فوق‌الذکر اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این مرحله لوله‌های منی‌ساز متلاشی شده و تمامی سلول‌های موجود در لوله از جمله سلول‌های جنسی و سلول‌های سرتولی آزاد شدند. سپس این تعلیق سلولی جهت جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت ۴۰۰ RPM سانتریفوژ شده و فاز بالایی جمع‌آوری شد.

طراحی سیستم کشت

سلول‌های حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی به مدت یک شب در ظروف کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ قرار گرفتند. در طی این مدت سلول‌های سرتولی به کف ظرف متصل شده و سلول‌های جنسی به‌صورت معلق باقی ماندند. در گروه کشت سلول‌های جنسی بدون لایه تغذیه‌ای، پس از گذشت یک شب، سلول‌های شناور موجود در بخش بالایی جمع‌آوری و به کمک لام هموسایتومتر شمارش شدند و به تعداد (۲۰×۱۰) سلول به ازاء هر سانتی‌متر مربع کشت داده شد. در گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد، پس از سانتریفوژ و شمارش، سلول‌های جنسی بر روی سلول‌های سرتولی متصل به کف ظروف ریخته و کشت داده شدند. هر دو گروه در محیط کشت StemPro-۳۴ همراه با مکمل آن (Invitrogen)، انسولین انسانی ۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ترانسفرین، ۶۰ میکرومولار پوترسین، ۳۰ نانومولار سدیم سلنیت، ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر D (+)-گلوکز، ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید، ۱ میکرو لیتر/میلی‌لیتر DL-لاکتیک اسید، ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر البومین گاوی، ۲ میکرومولار ال-گلوتامین، ۱۰×۱۰^{-۵} مولار ۲-مرکاپتوتانول، محلول ویتامین MEM، ۱۰^{-۴} اسکوربیک اسید، ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر d-بیوتین، ۳۰ نانو گرم/ میلی‌لیتر بتا استرادیول، ۶۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر پروژسترون، ۲۰ نانو گرم/ میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمال انسانی، ۱۰ نانو گرم/ میلی‌لیتر فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده سلولی گلیال انسانی، ۱۰ نانو گرم/ میلی‌لیتر فاکتور مهار کننده لوکمیای انسانی، ۱۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر فاکتور رشد فیروبلاست پایه، ۱ درصد FCS، پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml، ۱۰۰ میکروگرم/

³ Hyaluronidase

cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل با روش PCRReal-Time تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده پس از نرمال نمودن بر اساس ژن رفرانس، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ آنالیز شد. داده‌های مربوط به بررسی کلونیزاسیون و بیان ژن بر حسب مورد به کمک آزمون t و آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA, II, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۶ در سطح معناداری ۰/۰۵ و با محدوده‌ی اطمینان ۹۵ درصد انجام شد و نمودار داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند.

یافته‌ها

جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی تعلیق سلولی حاصل از هضم آنزیمی شامل دو دسته عمده سلول با اندازه و مورفولوژی مختلف بود. یک نوع سلول با اندازه‌ی کوچک که پس از تکثیر یک تک لایه سلولی را ایجاد می‌نمودند، به نام لایه تغذیه کننده سرتولی و نوع دوم سلول‌ها که اندازه‌ای بزرگتر داشته و پس از کشت قادر به تکثیر و ساخت کلونی بودند (شکل ۱).

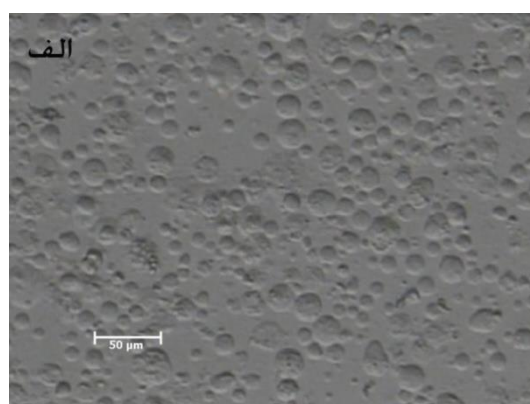
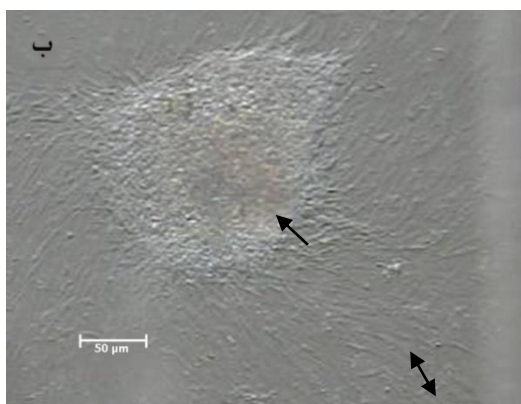
میلی‌لیتر استرپتومایسن (Sigma) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 به مدت سه هفته کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر سه روز تعویض شد.

ارزیابی تشکیل کلونی در سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت

گروه‌های مورد مطالعه از نظر تعداد و قطر کلونی‌های مشتق از سلول‌های اسپرماتوگونی در طی دوره کشت به کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess, Germany) مجهز به میکروسکوپ چشمی مدرج ارزیابی شدند.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های جنسی به روش Real-Time PCR

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های جنسی (Integrin Alpha 6, Integrin Beta1, PLZF) در انتهای هفته دوم و سوم کشت در گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. در این بررسی از ژن TBP به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. همچنین بافت بیضه به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. در این بررسی‌ها ابتدا RNA کل استخراج شده و پس از تیمار با آنزیم DNaseI، با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به



شکل ۱ (الف) سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی که عمدتاً شامل سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونیا می‌باشند. (ب) مورفولوژی کلونی (↓) پس از هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونیا با سلول‌های سرتولی (↑).

میانگین قطر کلونی‌ها نشان می‌دهد که در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی طی دوره کشت قطر کلونی‌ها افزایش داشت ($P < 0/005$). طوری که در روز پانزدهم به بیشترین میزان خود رسید. مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها در گروه بدون هم کشتی تنها بین روزهای ۵ و ۱۰ تفاوت افزایش داشت ($P < 0/005$).

جدول ۲) مقایسه قطر کلونی‌ها (میکرومتر) در روزهای مختلف کشت بین گروه‌های مختلف

روزهای کشت	مقایسه قطر کلونی‌ها (میکرومتر) در روزهای مختلف	
	هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سرتولی فرد	کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی
۰	۱۰۸/۸۶±۱/۱۲ ^a	۸۷/۸±۱/۷۵ ^b
۵	۱۱۵/۰۲±۱/۳۸ ^a	۸۸/۴۳±۱/۲۶
۱۰	۱۴۹±۱/۹۰ ^a	۱۱۱±۱/۶۰ ^b
۱۵	۱۶۸/۰۵±۱/۶۱ ^a	۱۱۱/۵۵±۱/۴۰

مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. آزمایش برای هر گروه حداقل ۳ بار تکرار شده است. α در مقایسه با گروه دیگر در همان روز و همچنین در مقایسه با روزهای دیگر در همان روز از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۵ معنادار می‌باشد ($P < 0/005$). β در مقایسه با روز بعد در همان گروه از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۵ معنادار نمی‌باشد ($P < 0/005$).

نتایج حاصل از Real Time PCR و مقایسه بیان

ژن‌های اختصاصی رده سلول جنسی در گروه‌ها

بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جنسی β 1 Integrin, alpha 6 Integrin و PLZF با استفاده از تکنیک PCR – Real Time در گروه سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی بدون هم کشتی و گروه هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی با سلول‌های سرتولی طی هفته‌های دوم و سوم کشت بررسی شد.

طی هفته دوم، بررسی درون گروهی نشان داد که بیان ژن β 1 integrin در گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در هفته سوم کشت بیان ژن α 6 integrin در مقایسه با گروه کنترل و همچنین در مقایسه با هفته دوم کشت افزایش معنادار را نشان داد

ارزیابی یافته‌های حاصل از کشت

مقایسه میانگین شمار کلونی‌ها در گروه‌های مختلف کشت در جدول ۱ ارائه شده است. در کل دوره کشت بین میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی با گروه هم کشتی اختلاف آماری معنادار را نشان می‌داد. به گونه‌ای که میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه هم کشتی نسبت به گروه بدون هم کشتی به‌طور بالاتر می‌باشد ($P < 0/005$).

مقایسه درون گروهی میانگین تعداد کلونی‌ها نشان داد که علیرغم اینکه در روزهای نخستین پس از ظهور کلونی، به عبارتی بین روزهای صفر و پنجم از کشت در هر دو گروه میانگین تعداد کلونی‌ها به‌طور معنی‌دار افزایش داشت ($P < 0/005$) ولی میانگین تعداد کلونی‌ها طی ادامه کشت از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌داد ($P > 0/005$).

جدول ۱) مقایسه تعداد کلونی‌ها در روزهای مختلف کشت بین گروه‌های مختلف

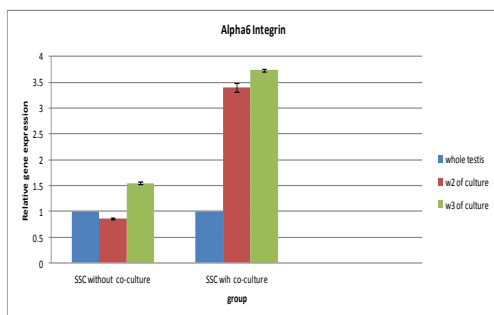
روزهای کشت	مقایسه تعداد کلونی‌ها در روزهای مختلف کشت بین گروه‌های مختلف	
	هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سرتولی فرد	کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی
۰	۱۱±۰/۶ ^{a,b}	۵±۰/۵ ^b
۵	۱۳/۳۳±۰/۵۷ ^a	۶/۶۶±۰/۱۸
۱۰	۱۳/۳۳±۰/۵۷ ^a	۶/۶۶±۰/۱۷۵
۱۵	۱۳/۳۳±۰/۵ ^a	۶/۶۶±۰/۱۸۸

مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. α در مقایسه با گروه دیگر در همان روز از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۵ معنادار می‌باشد ($P < 0/005$). β در مقایسه با روز پنجم کشت از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۵ معنادار می‌باشد ($P < 0/005$).

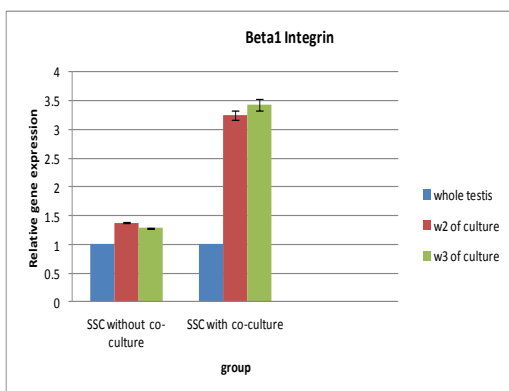
نتایج مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها در گروه‌های مختلف کشت در جدول ۲ ارائه شده است. طی روزهای مختلف کشت میانگین قطر کلونی‌ها در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی نسبت به گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی به‌طور بالاتر می‌باشد ($P < 0/005$). ارزیابی درون گروهی تغییرات زمانی

بود ($P < 0.005$).

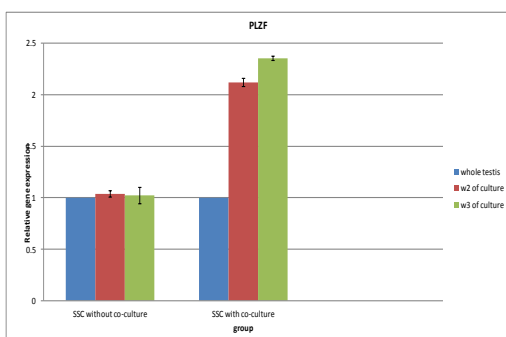
مقایسه بین گروهی نشان داد که میزان بیان این ژن در هفته دوم و سوم در گروه هم کشتی نسبت به گروه کنترل و گروه بدون هم کشتی افزایش معنادار داشت ($P < 0.005$) (شکل ۲-ج).



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲) الگوی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایا در گروه‌های مختلف پس از سه هفته کشت. الف) بیان ژن اینتگرین آلفا ۶. ب) بیان ژن اینتگرین بتا ۱. ج) بیان ژن PLZF. هر ستون میانگین ۳ تکرار را نشان می‌دهد. بافت بیضه به‌عنوان کالیبراتور به‌کار رفته است و از TBP به‌عنوان نرمالایزر استفاده شده است ($P < 0.005$, $n=3$, $\pm SE$).

($P < 0.005$). در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی، بیان ژن $\alpha 6$ Integrin طی کشت روند افزایشی معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0.005$).

بررسی بین گروهی نشان‌دهنده این مطلب بود که میزان بیان ژن $\alpha 6$ Integrin در هفته‌های دوم و سوم کشت در گروه هم کشتی افزایش معناداری را نسبت به گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی دارد ($P < 0.005$) (شکل ۲-الف).

در ارتباط با بررسی درون گروهی میزان بیان ژن $\beta 1$ Integrin دیده شد که در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی افزایش معنی‌دار بیان طی کشت وجود داشت ($P < 0.005$). ولی بیان این ژن در گروه کشت SSC بدون هم کشتی طی دوره کشت کاهش معناداری را نشان داد.

در مقایسه بین گروه‌ها دیده شد که طی هفته دوم هر دو گروه کشت نسبت به گروه کنترل بیضه افزایش بیان داشتند، ولی در هفته سوم در گروه بدون هم کشتی بیان این ژن به‌طور معنادار کاهش ($P < 0.005$) و در گروه هم کشتی به‌طور غیرمعنادار افزایش بیان نشان داد ($P > 0.05$). کمترین میزان بیان مربوط به SSC و پس از آن گروه کنترل و نهایتاً گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد بیشترین میزان بیان را در هفته سوم نشان دادند ($P < 0.005$) (شکل ۲-ب).

بررسی درون گروهی بیان ژن PLZF نشان داد که در گروه بدون هم کشتی طی دوره کشت در هفته دوم نسبت به گروه کنترل افزایش بیان وجود داشت، که به لحاظ آماری معنادار نبود ($P > 0.005$). همچنین در هفته سوم نسبت به دوم نیز کاهش غیر معنادار بیان وجود داشت ($P > 0.005$). بین هفته دوم و سوم در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنادار افزایش بیان PLZF مشهود

بحث

در این پژوهش جهت بررسی نقش سلول‌های سرتولی بر روند کشت سلول‌های اسپرماتوگونیای انسانی و ایجاد شرایط کشت بهینه برای آن‌ها، سلول‌های اسپرماتوگونیال انسانی در دو گروه کشت داده شدند: گروهی بدون هم کشتی و در گروه دیگر همراه با سلول‌های سرتولی تحت هم کشتی قرار گرفتند. کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در این سیستم‌ها ارزیابی شد، همچنین پس از هفته دوم و سوم کشت، میزان بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin و PLZF با استفاده از تکنیک Real Time – PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که تعداد و قطر کلونی‌ها در شرایط هم کشتی با سلول‌های سرتولی دارای میانگین معنادار بیشتری می‌باشند.

با توجه به اینکه در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون سیستم هم کشتی نیز از فاکتورهای رشد مکمل استفاده شده است، خود می‌تواند تأییدکننده روند افزایشی تعداد و قطر کلونی‌ها در این سیستم کشت باشد. در این راستا بررسی‌های گوناگونی وجود دارند که نشان دهنده توانایی تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت بدون لایه تغذیه کننده و در حضور فاکتورهای رشد مکمل می‌باشند، از جمله مورنا (Morena) و همکاران نتیجه گرفتند که حضور GDNF و فاکتورهای رشد می‌تواند منجر به تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی موش شود (۱۶).

توجه به میانگین پایین‌تر قطر و تعداد کلونی در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی نسبت به گروه هم کشتی، بیانگر تأثیر مثبت هم کشتی با سلول‌های سرتولی بر روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی و کلونیزاسیون آن‌ها می‌باشد.

شینوهارا (Shinohara) و همکاران نشان دادند که سلول‌های سرتولی به واسطه مجاورت نزدیک با SSC و ترشح فاکتورهای محرک رشد، حمایت فیزیکی و تنظیمی خود را بر روی SSCها اعمال می‌کنند و منجر به تکثیر و افزایش کیفیت بقاء SSCها می‌شود. این فاکتورهای ترشحی از جمله عوامل محرک تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی محسوب می‌شود (۱۷).

علیرغم این یافته، شماری هر چند اندک از پژوهشگران از جمله هاستروپ (Hasthorpe) و ناگانو (Nagano) بیان نمودند که حضور سلول‌های سرتولی می‌تواند القاءکننده تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی می‌باشد (۱۴) و (۱۸). شاید رده‌های مختلف سلول‌های لایه تغذیه‌ای و منشأ سلول‌های اسپرماتوگونی مورد استفاده در این مطالعات، دلیل این مغایرت باشد. که البته بررسی‌های ژنتیکی انجام شده در این تحقیق خود تأییدی بر ماهیت سلول‌های حاصل از کشت می‌باشد.

نکته دیگر اینکه علیرغم افزایش معنادار در مورد میانگین قطر کلونی‌ها، در هر گروه تعداد کلونی‌ها طی روزهای مختلف کشت تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد که می‌تواند بیانگر هماهنگی و همزمانی تحریک‌پذیری SSCها طی روند کشت باشد. آنالیز بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های جنسی نشان‌دهنده حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه این بررسی می‌باشد.

یافته‌ها نشان دهنده این است که سیستم هم کشتی حمایت بیشتری را از حضور این سلول‌ها به عمل می‌آورند و همچنین به نظر می‌رسد در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی هماهنگی بیشتری در این راستا وجود دارد.

مطالعات گوناگونی در ارتباط با تأثیر سیستم‌های مختلف کشت بر روی بیان ژن‌ها در سلول‌های اسپرماتوگونی انجام گرفته است و ماهیت این سلول‌ها بر اساس میزان بیان ژن‌ها و بررسی‌های پس از پیوند مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۹). همواره تعادلی در سلول‌های زایای بنیادی مردان بین تولید اسپرم با لغو خودنوزایی وجود دارد (۲۰). مطالعات پیشین از جمله بررسی گریسولد (Griswold) و همکاران بیان داشت که چنانچه برخی از سلول‌های زایای بنیادی نامیرا شوند و یا همراه با لایه‌های تغذیه کننده هم کشتی شوند، قادر به تکثیر در داخل آزمایشگاه و یا در صورت پیوند قادر به تمایز به سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌باشند (۲۱).

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی زایای انسانی از بافت‌های بیضه جداسازی شد. این سلول‌ها قادر به تکثیر در محیط آزمایشگاهی می‌باشند. بر اساس بررسی‌های گوناگون، حفظ شرایط مناسب برای پایداری حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی طی کشت دشوار است (۲۲). این مسئله می‌تواند به دلیل ناکفایتی شرایط کشت پیرو نبود لایه تغذیه کننده مناسب و همچنین ناکارآمدی شرایط کشت باشد. در حمایت از این فرضیه می‌توان به مطالعه گاسی (Gassei) اشاره نمود که بیانگر قابلیت تکثیر و حیات سلول‌های زایای بنیادی پس از تعویض و جایگزینی لایه تغذیه کننده بود (۲۳).

شینوهارا و همکاران سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی را به کمک تکنیک‌های جداسازی مبتنی بر اتصال آن‌ها به آنتی‌بادی نشان‌دار شده با فلورسنت ۱ یا ذرات مغناطیسی ۲ جداسازی نمودند و پس از پیوند نشان دادند که این سلول‌ها اینتگرین‌های A β و b β را بیان می‌کنند (۲۴ و ۲۵). این یافته تأییدی بر ماهیت سلول‌های موجود در کلونی‌های کشت داده شده در سیستم کشت‌تین بررسی می‌باشد.

در ارتباط با ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونیال بیان کننده PLZF می‌توان به پژوهش‌هایی از جمله بررسی بواس (Buass) و همکاران اشاره نمود که نشان دادند که موش‌های نر با موتاسیون لوکوس Zfp1۴۵ که باعث مهار PLZF می‌شود، نابارور می‌باشند و تکامل اسپرم غیرطبیعی را نشان می‌دهند. این ناباروری به دنبال از دست رفتن تدریجی SSC رخ می‌دهد (۲۶). در بیضه PLZF محدود به اسپرماتوگونیاهای غیرتمایزی Apr، Aa، As و می‌باشد که شامل SSCها می‌باشند. مطالعات نشان داده که پس از پیوند SSCها از موش‌هایی بدون PLZF، در موش گیرنده روند اسپرماتوژنز از سر گرفته نمی‌شود (۲۷). بنابراین یکی از نقش‌های احتمالی برای PLZF می‌تواند در حفظ موقعیت غیرتمایزی باشد (۲۸). با توجه به مطالب پیشین میتوان اینگونه نتیجه گرفت که سیستم هم کشتی می‌تواند در حمایت از تکثیر و حفظ ماهیت SSCها مؤثر باشد بنابراین طراحی سیستم‌های کشت هر چه مشابه‌تر به محیط تکاملی طبیعی سلول‌های اسپرماتوگونیای انسانی می‌تواند منجر به غنی‌سازی هر چه بیشتر این سلول‌ها در محیط داخل آزمایشگاهی شود. خود این مطلب مفهوم امکان تعمیم را بیان می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر مثبت حضور سلول‌های سرتولی بر روند کشت سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی، بهره‌مندی از هم کشتی این سلول‌ها در جهت بهینه‌سازی شرایط کشت سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی توصیه می‌گردد. همچنین به منظور ارزیابی رفتار سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی در شرایط داخل بدن، پیوند این سلول‌ها به مدل موشی آزو اسپرمی و بررسی عملکرد این سلول‌ها پیشنهاد می‌شود.

این مقاله در راستای رساله دکتری علوم تشریح و از محل بودجه پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس گردآوری و نگاشته شده است.

سیاس و قدردانی

بدین وسیله از همه کارکنان مرکز درمان ناباروری شایان مهر و بیمارستان خاتم الانبیا صمیمانه قدردانی می‌شود.

References:

- Dadoune JP. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 141-7.
- de Rooij DG, editor. *Trends in Stem Cell Biology and Technology*. New York: Humana Press; 2009: p. 149-62.
- Yeh JR, Nagano MC. Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of Spermatogonial transplantation in male fertility restoration? *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9: 109-14.
- He Z, Kokkinaki M, Jiang J, et al. Isolation, Characterization, and Culture of Human Spermatogonia. *Biol Reprod* 2010; 82: 363-72.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287: 1489-93.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 275-82.
- Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 2005; 82: 381-8.
- Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, et al. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction* 2002; 124: 791-9.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germ-line stem cells. *Hum Reprod* 2003; 18: 2660-7.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69: 612-6.
- Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl* 2003; 24: 661-9.
- Yoon KA, Chae YM, Cho JY. FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol* 2009; 220: 245-56.
- Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, et al. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 2006; 65(9): 1828-47.
- Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells in-vitro. *Biol Reprod* 2003; 68(6): 2207-14.
- Eddy EM. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 103-28.
- Morena AR, Boitani C, Pesce M, et al. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl* 1996; 17: 708-17.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; 72: 985-91.
- Hasthorpe S, Barbic S, Farmer PJ, et al. Growth factor and somatic cell regulation of mouse gonocyte derived colony formation in vitro. *J Reprod Fertil* 2000; 119: 85-91.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1-and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5504-9.
- Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 2005; 82: 381-8.
- Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 411-6.
- Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, et al. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14302-7.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365: 1663-78.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta1- and alpha6 integrin are surface

- markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 5504-9.
25. Shinohara T, Orwig K, Avarbock M, et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 8346-51.
26. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. lzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nat Genet 2004; 36: 647-52.
27. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet 2004; 36: 653-9.
28. Filippini D, Hobbs RM, Ottolenghi S, et al. Repression of kit expression by Plzf in germ cells Mol Cell Biol 2007; 27: 6770-81.

Original Article

Expression profile of germ stem cell-specific genes in human spermatogonial stem cells after co culture with sertoli cells

M. Zahiri ^{1,2}, M. Movahedin ^{2*}, S. J. Mowla ³, M Noruzinia ⁴,
M. R Noroozi ⁵, N Amirjanati ⁶

¹ Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

² Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

³ Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

⁴ Department of Medical genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

⁵ Uro -Oncology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

⁶ Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute (ACECR), Tehran, IRAN

(Received 13Jun, 2012 Accepted 10Oct, 2012)

Abstract

Background: Human spermatogonial stem cells (SSCs), are the foundation of spermatogenesis. Because of low number and lack of significant marker in human SSCs, studying their characteristics, could provide better understanding about the biology of male fertility. This study was designed to examine the effects of in vitro co-culture with sertoli cells on SSC colonization and germ cells specific gene expression of human spermatogonial stem cells.

Material and Methods: Testicular cells were isolated from testis biopsies by using two step enzymatic digestion and differential plating. two culture system were designed: co-culture with patient Sertoli cells and culture of SSC without co-culture(as control group). The number and diameter of colonies were evaluated during 3 weeks of culture. The expression of alpha 6 integrin, beta1 integrin and PLZF, as germ stem cell specific markers, was assessed using quantitative RT-PCR. Statistical analysis was performed using one way ANOVA in SPSS vesion 16 software with 95% *Confidence interval* .

Result: Our results were showed that the number and diameter of colonies increased significantly in co-culture with sertoli cells (P<0.05). The expression profile of genes in 2nd and 3rd weeks of culture revealed that there is significant higher expression of germ stem cell markers in our co-culture group versus control group.

Conclusion: Based on the optimal effects of sertoli cells on spermatogonial stem cells, co culture of the human SSCs with the feeder layer sertoli may be used as a suitable method for the enrichment of human spermatogonial stem cells.

Keywords: human Spermatogonial Stem Cells, Colony Formation, Culture, gene expression

*Address for correspondence: Department of Anatomical Science, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN. Email: m.movahed@modares.ac.ir