دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۲، صفحه ۱۶۰ – ۱۵۰ (خرداد و تیر ۱۳۹۳)
ISMJ 2014; 17(2): 150-160

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

ماریا ظهیری [۱و۲]، منصوره موحدین [۲*]، سیدجواد مولا [۳]، مهرداد نوروزی‌نیا [۴]،
محمدرضا 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 ابن‌سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

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

چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پایه اسپرم-زایی 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 به‌منظور ارزیابی تأثیر هم کشتی 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 به‌صورت هم کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی (به‌عنوان گروه کنترل) طراحی شد. طی سه هفته کشت تعداد و قطر کلونی‌های حاصل ارزیابی شد. بیان اینتگرین آلفا ۶، اینتگرین بتا ۱ و **PLZF** به‌عنوان 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 بامحدوده اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد هم کشتی با سرتولی به‌طور معنادار منجر به افزایش تعداد و قطر کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی طی دوره کشت نسبت به گروه کنترل شد (**P<۰/۰۵**). همچنین میزان بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی جنسی تحت بررسی در طی هفته‌های دوم و سوم، در گروه هم کشتی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنادار بالاتر بود (**P<۰/۰۵**).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات بهینه سلول‌های سرتولی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، به‌نظر می‌رسد بهره‌مندی از سیستم هم کشتی با سلول‌های سرتولی می‌تواند به‌عنوان روش مناسبی به‌منظور غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان، کلونی زایی، کشت، بیان ژن

[*] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی گروه علوم تشریح
Email: m.movahed@modares.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

مقدمه

تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی[1] 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 زیست شناسی و رفتار این سلول‌ها دریچه 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 به‌دلیل 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[2] 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 تغذیه کننده 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 هم کشتی 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 هم کشتی 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

[1] SpermatogoniaS stem Cell (SSC)
[2] Niche

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

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[3] و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DNase (Sigma ،St.Louis ،MO ،USA) بود، اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در طی این مرحله لوله‌های منی‌ساز از بافت‌های هم بند 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 به‌مدت 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 ۴۰۰RPM سانتریفوژ شده و فاز بالایی جمع‌آوری شد.

طراحی سیستم کشت

سلول‌های حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی به‌مدت یک شب در ظروف کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد Co_2 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 (۱۰×۲۰) سلول به ازاء هر سانتی‌متر مربع کشت داده شد. در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد، پس از سانتریفیوژ 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 میلی گرم/میلی‌لیتر D –(+)-گلوکز، ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید، ۱ میکرو لیتر/میلی‌لیتر DL–لاکتیک اسید، ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر البومین گاوی، ۲ میکرومولار ال- گلوتامین، ۱۰×۵^{-۵} مولار ۲- مرکاپتواتانول، 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 فیبروبلاست پایه، ۱ درصد FCS، پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml، ۱۰۰ میکروگرم/

[3] Hyaloronidaze

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

میلی‌لیتر استرپتومایسن (Sigma) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد Co_2 به‌مدت 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 به‌کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess ،Germany) مجهز به میکروسکوپ چشمی مدرج ارزیابی شدند.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های جنسی به‌روش Real-Time PCR

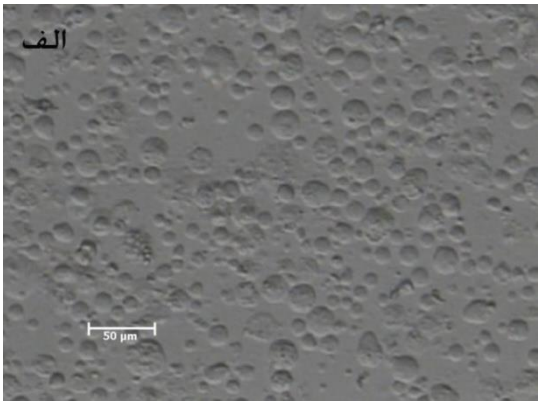
بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های جنسی (PLZF، Integrin Beta1، Integrin Alpha 6) در انتهای هفته دوم و سوم کشت در گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. در این بررسی از ژن TBP به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. همچنین بافت بیضه به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار گرفته شد. در این بررسی‌ها ابتدا RNAی کل استخراج شده و پس از تیمار با آنزیم DNaseI، با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل با روش PCRReal-Time تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده پس از نرمال نمودن بر اساس ژن رفرانس، با استفاده از روش $\Delta\Delta CT-$ ۲ آنالیز شد.

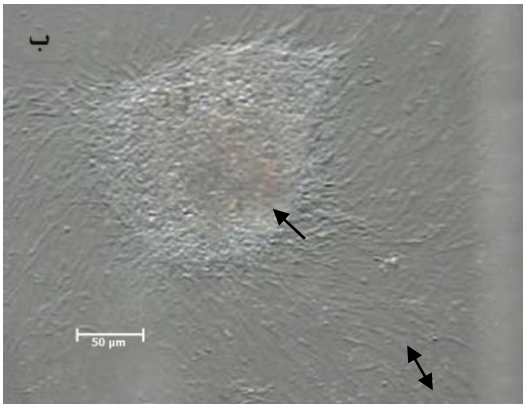
داده‌های مربوط به بررسی کلونیزاسیون و بیان ژن بر حسب مورد به کمک آزمون t و آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA، Il، Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۶ در سطح معناداری ۰/۰۵ و با محدوده‌ی اطمینان ۹۵ درصد انجام شد و نمودار داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند.

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).





شکل ۱) الف) سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی که عمدتا شامل سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونیال می‌باشند.
ب) مورفولوژی کلونی(↓) پس از هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونیال با سلول‌های سرتولی(↕).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

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<۰/۰۰۵).

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<۰/۰۰۵) ولی میانگین تعداد کلونی‌ها طی ادامه کشت از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌داد (P>۰/۰۰۵).

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

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم‌کشتی	هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سرتولی فرد	روزهای کشت
۵±۰/۵[b]	۱۱±۰/۶[a,b]	۰
۶/۶۶±۰/۸	۱۳/۳۳±۰/۵۷ [a]	۵
۶/۶۶±۰/۷۵	۱۳/۳۳±۰/۵۷ [a]	۱۰
۶/۶۶±۰/۸۸	۱۳/۳۳±۰/۵ [a]	۱۵

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

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<۰/۰۰۵). ارزیابی درون گروهی تغییرات زمانی میانگین قطر کلونی‌ها نشان می‌دهد که در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی طی دوره کشت قطر کلونی‌ها افزایش داشت (P<۰/۰۰۵). 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<۰/۰۰۵).

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

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم‌کشتی	هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سرتولی فرد	روزهای کشت
۸۷/۷±۱/۷۵[b]	۱۰۸/۸۶±۱/۱۲[a]	۰
۸۸/۴۳±۱/۲۶	۱۱۵/۰۲±۱/۳۸[a]	۵
۱۱۱±۱/۶۰ [b]	۱۴۹±۱/۹۰[a]	۱۰
۱۱۱/۵۵±۱/۴۰	۱۶۸/۰۵±۱/۶۱[a]	۱۵

مقادیر بر اساس میانگین± انحراف معیار بیان شده است. آزمایش برای هر گروه حداقل ۳ بار تکرار شده است. a: 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<۰/۰۰۵) b: در مقایسه با روز بعد در همان گروه از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۵ معنادار نمی‌باشد (P<۰/۰۰۵).

نتایج حاصل از Real Time PCR و مقایسه بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول جنسی در گروه‌ها

بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جنسی Beta1 Integrin، alpha 6 Integrin و PLZF با استفاده از تکنیک Real Time – PCR 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 Alpha6 integrin در گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در هفته سوم کشت بیان ژن integrin α۶ در مقایسه با گروه کنترل و همچنین در مقایسه با هفته دوم کشت افزایش معنادار را نشان داد

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

(P<۰/۰۰۵). در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی، بیان ژن Integrin α۶ طی کشت روند افزایشی معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۵).

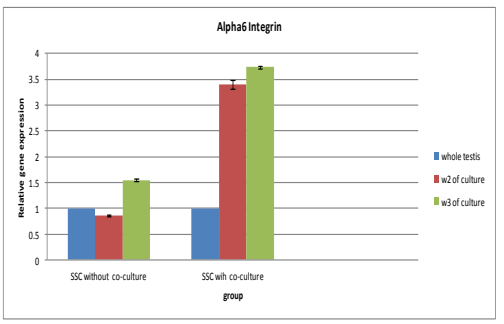
بررسی بین گروهی نشان‌دهنده این مطلب بود که میزان بیان ژن Integrin α۶ در هفته‌های دوم و سوم کشت در گروه هم کشتی افزایش معناداری را نسبت به گروه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بدون هم کشتی دارد (P<۰/۰۰۵) (شکل ۲-الف).

در ارتباط با بررسی درون گروهی میزان بیان ژن Beta1 Integrin دیده شد که در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی افزایش معنی‌دار بیان طی کشت وجود داشت (P<۰/۰۰۵). ولی بیان این ژن در گروه کشت SSC بدون هم کشتی طی دوره کشت کاهش معناداری را نشان داد.

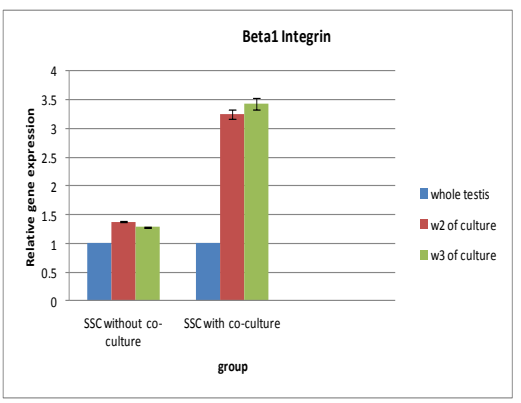
در مقایسه بین گروه‌ها دیده شد که طی هفته دوم هر دو گروه کشت نسبت به گروه کنترل بیضه افزایش بیان داشتند، ولی در هفته سوم در گروه بدون هم کشتی بیان این ژن به‌طور معنادار کاهش (P<۰/۰۰۵) و در گروه هم کشتی به‌طور غیرمعنادار افزایش بیان نشان داد(P>۰/۰۰۵). کمترین میزان بیان مربوط به SSC و پس از آن گروه کنترل و نهایتاً گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد بیشترین میزان بیان را در هفته سوم نشان دادند (P<۰/۰۰۵) (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>۰/۰۰۵). همچنین در هفته سوم نسبت به دوم نیز کاهش غیر معنادار بیان وجود داشت (P>۰/۰۰۵). بین هفته دوم و سوم در گروه هم کشتی با سلول‌های سرتولی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنادار افزایش بیان PLZF مشهود بود (P<۰/۰۰۵).

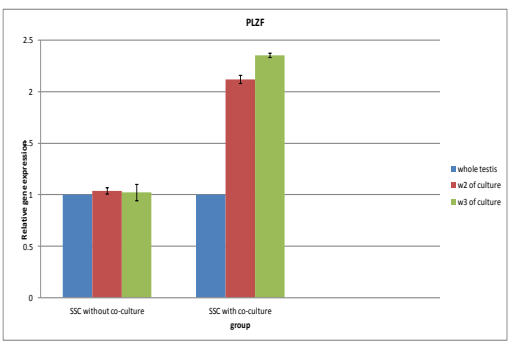
مقایسه بین گروهی نشان داد که میزان بیان این ژن در هفته دوم و سوم در گروه هم کشتی نسبت به گروه کنترل و گروه بدون هم کشتی افزایش معنادار داشت (P<۰/۰۰۵) (شکل ۲-ج).



(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 ژنPLZF. هر ستون میانگین ۳ تکرار را نشان می‌دهد. بافت بیضه به‌عنوان کالیبراتور به‌کار رفته است و از TBP به‌عنوان نرمالیزر استفاده شده است (±SE، n=۳، P<۰/۰۰۵)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

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 α۶ Integrin، β۱ Integrin و PLZF و 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 وکلونیزاسیون 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.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

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 لغوخودنوزایی 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 A۶ و b۱ را بیان می‌کنند (۲۴ و ۲۵). این یافته تأییدی بر ماهیت سلول‌های موجود در کلونی‌های کشت داده شده در سیستم کشتاین 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 موتاسیونلوکوس Zfp۱۴۵ 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، As، Aal 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 آزواسپرمی و بررسی عملکرد این سلول‌ها پیشنهاد می‌شود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

سپاس و قدردانی

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

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

References:

1.Dadoune JP. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? Folia Histochem Cytobiol 2007; 45: 141-7.
2.de Rooij DG, edithor. Trends in Stem Cell Biology and Technology. New York: Humana Press; 2009: p. 149-62.
3.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.
4.He Z, Kokkinaki M, Jiang J, et al. Isolation, Characterization, and Culture of Human Spermatogonia. Biol Reprod 2010; 82: 363-72.
5.Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science 2000; 287: 1489-93.
6.Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells questions, models and perspectives. Hum Reprod Update 2006; 12: 275-82.
7.Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. Int J Hematol 2005; 82: 381-8.
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.
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.
10.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.
11.Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. J Androl 2003; 24: 661-9.
12.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.
13.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.
14.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.
15.Eddy EM. Male germ cell gene expression. Recent Prog Horm Res 2002; 57: 103-28.
16.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.
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.
18.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.
19.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.
20.Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. Int J Hematol 2005; 82: 381-8.
21.Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol 1998; 9: 411-6.
22.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.
23.Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulationand spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2010; 365: 1663-78.
24.Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta1- and alpha6 integrin are surface

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

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.Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, et al. Repression of kit expression by Plzf in germ cells Mol Cell Biol 2007; 27: 6770-81.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

ISMJ 2014; 17(2): 150-160

Orginal 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 Medecine, 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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]