تأثیر رتینوئیک اسید بر تمایز سلولهای عصبی از بن‌یاخته‌های جنینی انسان با و بدون مورفولوژی Rosette

حسین بهاروند M.Sc.[☆♦]، مریم حاتمی M.Sc.[☆]، نرگس زارع M.Sc.[☆]

☆پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

♦آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، گروه سلولهای بنیادی

پست الکترونیک: Email: info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۲۰

* **هدف:** ارزیابی اثر فاکتور القائی رتینوئیک اسید (RA) بر تمایز پیش‌سازهای عصبی با منشاء بن‌یاخته‌های جنینی انسان در نواحی دارای مورفولوژی روزت (Rosette) و فاقد مورفولوژی روزت.

* **مواد و روشها:** از کلونیهای سلولهای بنیادی جنینی انسان رویان H1 برای تولید سلولهای عصبی انسانی استفاده شد. بدین منظور نواحی دارای مورفولوژی روزت و بدون مورفولوژی روزت برش زده شد و از قطعات حاصل، اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) ساخته شد و به دنبال آن این اجسام به مدت ۲۰ روز تحت تیمار رتینوئیک اسید (RA) (10^{-6} M) قرا رگرفته و به دنبال آن، اجسام شبه جنینی به صورت منفرد به محیط کشت neurobasal حاوی ۲ درصد B27 و ۱۰ درصد سرم جنینی گاو منتقل شده و به سلولهای عصبی تمایز یافتند. به منظور ارزیابی نورونهای تولید شده در محیط آزمایشگاه به غیر از مورفولوژی از آزمونهای ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

* **یافته ها:** مطالعات ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی علیه (Microtubule Associated protein -2) و Tubulin III و NF (Neurofilament protein) و NSE (Neuron specific enolase) و سیناپتوفیزین (Synaptophysin) نشان داد که سلولهای حاصل نورون هستند. همچنین بکارگیری RA در گروه دارای مورفولوژی روزت و بدون روزت موجب افزایش معنی‌دار اجسام شبه جنینی دارای سلول عصبی شد (مورفولوژی روزت: ۷۳/۲ در مقابل ۱۳/۲ درصد ($P<0.01$) و بدون روزت: ۵۷/۵ در مقابل ۱۹/۵ درصد ($P<0.01$) از طرفی نواحی دارای روزت در مقایسه با نواحی بدون روزت در نورون‌زایی پاسخ بیشتری در تیمار با رتینوئیک اسید داشتند.

* **نتیجه گیری:** این نتایج نشان می‌دهد RA نورون زایی را در بن‌یاخته‌های جنینی انسان القاء نموده و ساختارهای Rosette در این سلولها از پتانسیل بالایی به منظور نورون‌زایی برخوردار می‌باشند و این امکان وجود دارد که بتوان از این سلولها در طب پیوند به منظور درمان بیماریهای عصبی در آینده بهره جست.

گل واژگان: بن‌یاخته‌های جنینی انسان، روزت، تمایز، نورون

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۱۰۹-۱۰۳

مقدمه

در طی تکوین سیستم اعصاب مرکزی مهره‌داران صدها نوع سلول عصبی مختلف ایجاد می‌شود که مسیرهای تکوین طبیعی اغلب این گروههای سلولی هنوز کاملاً مشخص نیست. مطالعه تکوین سلولهای عصبی در محیط آزمایشگاهی، گذشته از افزایش درک ما در مورد مکانیسم تکوین، ابزار سودمندی را در طب پیوند فراهم می‌کند. لذا مطالعه و بررسی پتانسیل تبدیل سلولهای مختلف به سلولهای عصبی در سه گروه اصلی ذیل متمرکز شده است. الف: پیش‌سازهای عصبی برگرفته از بافتهای عصبی بالغ و جنین (۱، ۲). ب: پیش‌سازهای غیرعصبی و تمایز نیافته با منشاء بافتها و اعضای غیرعصبی مانند مغز استخوان (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹)، ج: بن‌یاخته‌های جنینی (۳، ۵، ۱۰).

از این میان بن‌یاخته‌های جنینی به دلیل ویژگی‌های خاصی همچون توان تقسیم نامحدود و بدون تمایز و حفظ کاریوتایپ طبیعی کروموزومی بیشتر مورد توجه قرار دارد. بن‌یاخته‌های جنینی سلولهای تمایز نیافته و پرتوانی هستند که از توده سلولی داخلی (ICM) منشاء گرفته‌اند و توانایی تشکیل انواع سلولهای آندودرمال، مزودرمال، اکتودرمال را دارا هستند (۲، ۱۰، ۱۱).

در شرایط طبیعی توده سلولی داخلی در طی مراحل گاسترولاسیون، سه لایه جنینی اکتودرم، مزودرم، آندودرم را ایجاد می‌کند، سپس با القاء مزودرم بر اکتودرم موجب تشکیل سیستم عصبی می‌شود (۱۲).

گاه به طور خود به خود در بعضی نواحی کلونی سلولهای بنیادی جنینی، تجمع آرایش یافته‌ای از سلولها ایجاد می‌شود که شبیه گل رُز است و به آن ساختار روزت می‌گویند. سلولهای این ناحیه شبه

نوروا‌کتودرمی هستند و پروتئین nestin که یک فیلامنت بینابینی خاص سلولهای پیش‌ساز عصبی است را بیان می‌کنند (۱۳).

با درنظر داشتن توان بالقوه بن‌یاخته‌ها در تشکیل انواع سلولها می‌توان با القاء مسیرهای نورون زایی تمایز آنها را به سمت تشکیل نورون سوق داد. بن‌یاخته‌های جنینی دارای ظرفیت تولید نورون‌ها و سایر سلولهای عصبی هستند و حتی در مواردی گروههای خاصی از نورونها مانند نورونهای دوپامینرژیک مغز میانی را ایجاد می‌کنند (۱۳، ۱۴، ۱۵).

تولید سلولهای عصبی با استفاده از بن‌یاخته‌های جنینی، ابزار سودمندی را در جهت درک بهتر مکانیسمهای کنترل کننده مراحل اولیه تمایز عصبی و نقش عملکردی نورون‌های تمایز یافته در روشهای آزمایشگاهی ایجاد نموده است. همچنین ترکیب روشهای آزمایشگاهی زیست‌شناسی مولکولی و سیستمهای تمایز عصبی، امکان جداسازی و مشخص نمودن ژنهای درگیر در تمایز عصبی را به وجود آورده است. به علاوه سیستمهای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی را می‌توان به عنوان مدل سلولی بررسیهای آزمایشات فارماکولوژیکی مورد استفاده قرار داد. گزارشات متعددی در زمینه تمایز نورونها از بن‌یاخته‌های موشی و انسانی وجود دارد (۵، ۷، ۹، ۱۶). بررسی بن‌یاخته‌های جنینی موشی نشان داده است که با تشکیل اجسام شبه جنینی (EBs) و به‌کارگیری فاکتورهای تمایزی مانند اسیدرتینوئیک (۳، ۱۱، ۱۷) و یا حذف سرم از محیط و تیمار توسط فاکتورهای نوروتروپیک (۱۴، ۱۸) GDNF(Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) NTN(Neurtuin) تمایز آنها را می‌توان در جهت تشکیل پیش‌سازهای عصبی و نورونهای عملکردی postmitotic سوق داد (۴، ۱۹).

رتینوئیک اسید (RA) یکی از مشتقات ویتامین A می‌باشد که نقش تنظیم‌کنندگی مهمی را در طی تکوین جنین بر عهده دارد (۲۰).

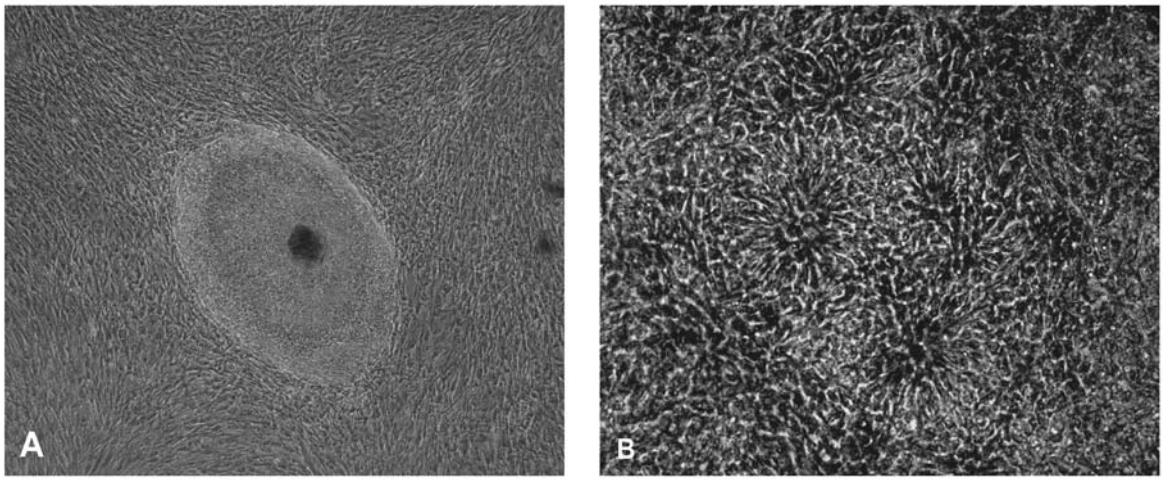
تأثیر رتینوئیک اسید در محیط آزمایشگاه بر سلولهای تاج عصبی (۱۴)، نوروبلاستومای انسانی (۸، ۱۶) و سلولهای کارسینومای جنینی انسان (۲۱) موجب القاء تمایز عصبی در محیط کشت سلولی می‌شود.

به‌کارگیری و استفاده از RA با غلظت 10^{-7} و 10^{-6} مولار در مراحل اولیه تکوین بر روی اجسام شبه جنینی منشاء گرفته از ناحیه نوروا‌کتودرمال موجب القاء تمایز عصبی می‌شود (۱۱، ۱۷).

با تولید بن‌یاخته‌های جنینی انسانی در سال ۱۹۹۸ (Thomoson et al) بررسی سیگنالهای مداخله‌گر در تمایز آنها به سلولهای عصبی اهمیت بسیاری یافته است (۲۲). لذا در این مطالعه از RA به عنوان عامل القاءگر سلولهای عصبی با منشاء بن‌یاخته‌های جنینی انسان استفاده شد. تا نقش نورون‌زایی آن در محیط آزمایشگاه بر روی نواحی دارای مورفولوژی روزت و فاقد مورفولوژی روزت معین شود.

مواد و روشها

در این مطالعه از بن‌یاخته‌های جنینی انسان رده رویان H1 دارای کاریوتایپ (XX+46) کشت داده شده بر لایهٔ فیبروبلاست موشی در محیط حاوی KO-DMEM (Gibco, 10829-018)، L-glutamin(Gibco, 25030-24), nonessential amino acid (Gibco, 11140-034), insulin transferin selenium (Gibco-41400-045), penicilin streptomycin (Gibco-15070-063), fetal bovine serum: (Gibco, 10439-024) Olympuse(CkX41) بررسی شدند (شکل A۱) (۲۳).



شکل ۱: A) یک کلونی از بن‌یاخته‌های جنینی انسانی Royan H1 که بر فیبروبلاستهای جنینی موشی به عنوان سلولهای تغذیه کننده کشت شده است. B) نواحی دارای مورفولوژی روزت در کلونی بن‌یاخته‌های جنینی انسانی

تمایز به سلولهای عصبی

قسمتهایی از کلونیهای بن‌یاخته‌های جنینی در زیر میکروسکوپ استریوفازکنتراست Olympus بریده شد. این قسمتها دارای دو حالت بودند، نواحی دارای روزت که سلولهایی با آرایش شعاعی می‌باشند (شکل ۱B) و نواحی بدون روزت، سپس قطعات سلولی حاصل به دو گروه تقسیم شدند. الف) گروه بن‌یاخته‌های جنینی دارای روزت همراه با انجام تیمار RA و بدون تیمار RA. ب) گروه بن‌یاخته‌های جنینی بدون روزت تحت تیمار RA و بدون تیمار RA. نحوه تمایز به شکل ذیل بود، در ابتدا برای تشکیل اجسام شبه جنینی، هر قطعه درون یک قطره آویزان (hanging drop) در محیط hES گذاشته شد. پس از گذشت دو روز اجسام شبه جنینی به ظرف باکتریایی (Greiner Germany, 628102) انتقال یافته و در محیط Dulbecco modified Eagles medium F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, 21331-020), insulin transferin selenium (Gibco- 414 00-045), L-glumin (Gibco, 25030-24), nonessential aminoacid (Gibco, 11140-034), fetal bovine serum (Gibco, 10433-024) به صورت سوسپانسیون کشت داده شدند.

بعد از گذشت ۴ روز و کشت در ظرف باکتریایی، اجسام شبه جنینی درمحیط فوق الذکر تحت تیمار اسید رتینوئیک RA(Sigma, R-2625) با غلظت 10^{-6} مولار قرار داده شدند و این تیمار هرسه روز یک بار همراه با تعویض محیط به مدت ۲۰ روز ادامه یافت، در روز ۴+۲۰ اجسام شبه جنینی تیمار یافته، به درون پلیتهای ۲۴ خانه Tissue culture plate (TPP) (switzerland) پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱درصد (Sigma; G-250) و دارای محیط کشت neuro basal medium (Gibco; 21103-046) واجد۲درصد B27(Gibco 17504-044) و ۱۰درصد سرم جنین گاوی (Fetal calf serum) (Gibco; 1027106) انتقال داده شد .هر ۴ روز یکبار نیمی از محیط تعویض می‌گردید و ارزیابی سلولها با میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست Olympus(CKX41) انجام شد.

ایمونوسیتوشیمی

در روزهای ۴+(۲۰+۴)و ۸+(۲۰+۴) و ۱۲+(۲۰+۴) سلولها توسط پارافرماآلدئید ۱درصد و گلوتارآلدئید ۲/۵درصد تثبیت شده و جهت بررسی آنتی‌بادی‌های اختصاصی سلولهای عصبی Microtubule Associated protein [Map-2(a+b)] 1:200 (Sigma M1406) Neuro filament protein (M0762; DAKO), Tubulin III 1:150 (Sigma: T-5293), Synaptophysin 1:250 (Sigma S-5768), Neuron Specific enolase (NSE) 1:150 (Dako, V-7026) و آنتی بادی ثانویه FITC 1:200 (Sigma: F-9006) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Niconeclips TE 2000U مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. البته برای مشخص نمودن NSE، از آنتی‌بادی اولیه نشاندار با HRP سوبسترای DAB استفاده شد.

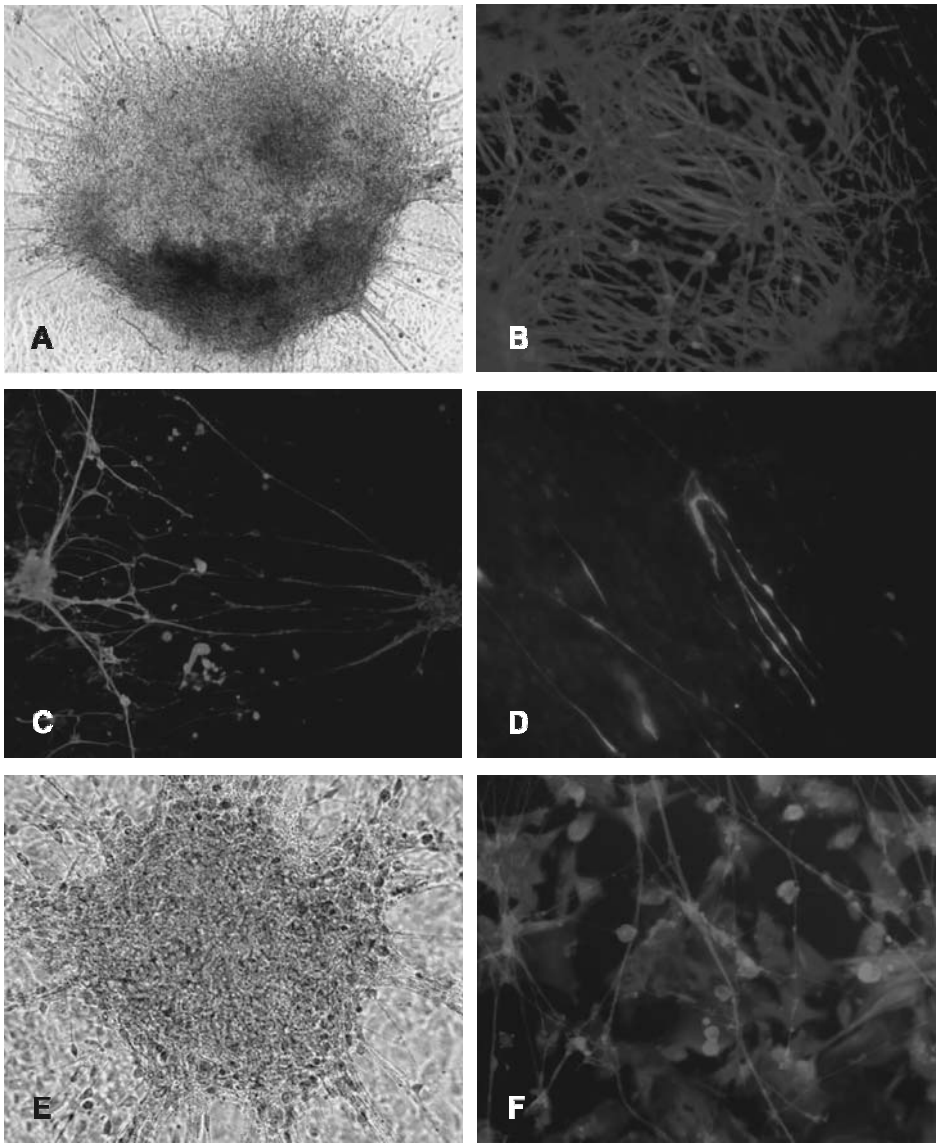
آزمون آماری

مطالعه حاضر به صورت Parallel Experimental Design طراحی شد که در آن گروههای مختلف بن‌یاخته‌های جنینی انسان Royan H1 به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم و یکی از آنها در معرض RA قرار گرفت. گروه دیگر به عنوان شاهد به کار برده شد در پایان تعداد اجسام شبه جنینی عصبی شده در هر یک از گروههای یاد شده بررسی و مقایسه شدند. همچنین مورفولوژی روزت در دو گروه تحت تیمار و شاهد برای بررسی اثر تیمار RA و روزت مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش به منظور بررسی اطلاعات و نتایج از آزمون آماری برآورد (Relating Risk) (RR) استفاده شد.

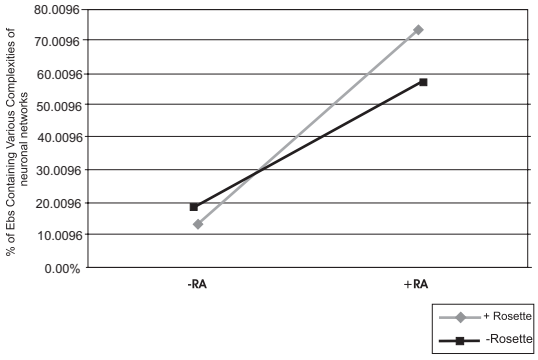
یافته‌ها

با توجه به تأثیر عامل القاء کننده نورون‌زایی در طی مدت کشت، به منظور افزایش میزان سلولهایی که در مسیر نورون‌زایی قرار می‌گیرند از تیمار RA و مورفولوژی روزت به طور همزمان، استفاده شد. بلوغ سلولهای عصبی با انتقال اجسام شبه جنینی تیمار شده در محیط Neuronal medium و گذشت چهار روز حاصل شد. به طوری که سلولهای عصبی به صورت شعاعی از اطراف اجسام شبه جنینی خارج و مورفولوژی خورشید مانندی را ایجاد نمودند (شکل ۲A). در این زمان ساختار آکسون ها و دندریتها کاملاً قابل مشاهده و تشخیص بود. ادامه بررسی و مطالعات ایمونوسیتوشیمی این سلولها نسبت به آنتی‌بادیهای اختصاصی سلولهای عصبی نظیر MAP-2 (شکل ۲B) بتاتوبولین (شکل ۲c) نوروفیلامنت پروتئین (شکل ۲E) و Neurone Specific Enolase (NSE) (شکل ۲G) مثبت است. همچنین بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی سیناپتوفیزین وجود وزیکولهای سیناپتوفیزین را در این سلولها به وضوح نشان داد (شکل ۲G).

بررسی رابطه تولید سلولهای عصبی و وجود مورفولوژی روزت در گروههای شاهد و تحت تیمار با استفاده ازبرآورد آماری Relating risk نشان داد ۷۳/۲ درصد از اجسام شبه جنینی دارای مورفولوژی روزت و تحت تیمار به سلولهای عصبی تمایز پیدا می‌کنند در حالی که این میزان در گروه شاهد، اجسام شبه جنینی دارای مورفولوژی روزت۱۳/۳درصد ($P<0.01$) در اجسام شبه جنینی فاقد روزت و تحت تیمار ۵۷/۵ درصد و در اجسام شبه جنینی فاقدروزت و شاهد ۱۹/۵درصد ($p<0.01$) مشاهده گردید (نمودار ۱).



شکل ۲: (A) مهاجرت استطاله‌های عصبی از جسم شبه جنینی، ROYAN H1 رنگ آمیزی شده با آنتی بادی‌های اختصاصی سلولهای عصبی، (B) :MAP-2، (C) :Tubulin III و NF(E)، NSE: (E) و synaptophysin: (F)



نمودار ۱: مقایسه میزان درصد نورون زایی اجسام شبه جنینی دارای مورفولوژی روزت وبدون مورفولوژی روزت در گروهای شاهد و تحت تیمار

بحث

با توجه به ویژگیهای منحصر به فرد بن‌یاخته‌های جنینی این سلولها، ابزاری سودمند در جهت درک بهتر فرآیند نورون‌زایی و تشکیل سیستم عصبی در طی روند تکوینی پستانداران به شمار می‌آیند.

محققین با مطالعه و بررسی توان بالقوه بن‌یاخته‌ها به منظور تولید سلولهای عصبی توانسته‌اند بن‌یاخته‌های عصبی از مغز جوندگان (۲۴، ۲۵) نخاع (۲۵) ماهیچه اسکلتی (۲۶) و مغز استخوان وبند ناف (۲۷) جداساخته و از آنها در پیوند استفاده کنند .در ادامه این بررسی‌ها نشان داده است ۲ تا ۵ هفته بعد از پیوند این سلولها به منطقه آسیب دیده در نخاع رت این سلولها به نورون، اولیگودندروسیت،

آستروسیت تمایز می‌یابند و در وسعتی بیش از ۸mm ناحیه آسیب دیده‌نخاعی مهاجرت پیدا می‌کنند و در اغلب موارد نیز بعد از پیوند در عملکرد فیزیولوژیک جاندار بهبود حاصل می‌شود (۲۸). از عوامل مهم در تمایز بن‌یاختـــــــــه‌ها به سلولهای عصبی می‌تـــــوان از نـقش فـاکتور مـحـــیطی یـاد کرد (۲۵). کـنترل ایـن فـاکتور در آزمـــایشگاه، بـــا اســـتفاده از تـــیمارهای مـــناسب همچون bFGF-2 (basic Fibroblast Growth Factor-2)، BMP (Bone Morphologenetic Protein)، EGF (Epidermal Growth Factor)، RA (Retionic Acid) و یا حذف سرم به کارگیری بن یاخته‌های محدود به رده‌های عصبی سبب افزایش‌تولید سلولهای عصبی و در نهایت افزایش بازده پیوند می‌شود (۲۹). از جمله فاکتورهای فوق RA می‌باشد که فرم فعال ویتامین A بوده و تأثیر زیادی بر مراحل تکوینی جانوران دارد، این‌ترکیب در مراحل اندام‌زایی ،تعیین رده سلولی و مرگ سلولی نیز اثرگذار است (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲). در دوران جنینی این ماده توسط ژن Retinaldehyde Dehydrogense ساخته می‌شود و با تأثیر بر بن یاخته‌های جنینی CNS و ساقه مغز موجب القاء سلولهای پیش ساز عصبی و تمایز آنها به سمت تشکیل‌نورون و سلولهای گلیا می‌شود (۳، ۳۳، ۳۴).

در این مطالعه دیده شد که RA بن‌یاخته‌های جنینی انسان سبب افزایش معنی‌دار نورون‌زایی می‌شود. در واقع استفاده از RA موجب القـاء رونویسی گروهـــی از ژن‌هـــا نـــظیر گلیکوپروتـــئین ترشحی Sonic hedgehog ، فـاکتور رونـویسی ژن Pax6 و Mash-1 و HNF-3 و بیان ژن رسپتور و Kappa Opidi در بن یاخته‌های جنینی شده و روشن شدن این آبشار و بیان ژنهای مختلف موجب القاء تمایز عصبی و توقف تمایز مزودرمال و کاهش میزان بیان mRNA ژنهای مـــزودرمال هـــمچون cardic actin و globin و Brachyary می‌گردد (۳۳، ۳۵، ۳۶).

شـایان ذکـر است مـدت زمـان تـیمار بـا اسـتفاده از RA غـلظت و مرحله شروع تیمار، در نوع و شدت القائات مولکولی بعدی این ماده و روند راه‌اندازی آبشارهای مولکولی تأثیرات متفاوتی را برجا می‌گذارد (۳۷، ۳۸، ۳۹). مطالعه Zhang و همکارانش در زمینه القاء نورون‌زایی در بن‌یاخته‌های جنینی در نواحی دارای مورفولوژی روزت نشان دهندهٔ افزایش نورون‌زایی در این نواحی است. به‌طوری که ایشان این نواحی را القاء کننده نورواکتودرم اولیه شناسایی نمودند (۴۰). بنابراین با توجه به مـطالعه تـأثیر تـیمار RA بر بـن‌یاخته‌های جـنینی تـوسط Bain و همکاران (۳۲) در افزایش میزان القاء نورون‌زایی و تأثیر نواحی دارای مـورفولوژی روزت در القـاء نـورن زایـی مـی تـوان انـتظار داشت در صورت ترکیب این دو عامل،افزایش معنی‌داری در میزان نورون‌زایی مـشاهده شود. چنـانکه در مـطالعـات مـا نـیز مـشخص شـد در صـورت ترکیب‌همزمان این دو عامل ،درمیزان تولید سلولهای عصبی نسبت به گروه اجسام شبه جنینی و فاقد مورفولوژی روزت و شاهد، افزایش مـعنی‌داری مـشاهده مـی‌شود. در ایـن مـطالعه نـشان داده شـد، وجـود سـاختارهای روزت در اجـسام شـبه جنیـنی مـوجب افـزایش‌القـائات مولکولی متأثر از تیمارRA در جهت نورون‌زایی می‌گردد. همچنین وجـود اخـتلاف کـم مـیان گروههـای شـاهد اجـسام شـبه جـنینی فـاقد مـــورفولوژی روزت (۱۹/۵درصـــد) و دارای مـــورفولوژی روزت (۱۳/۳درصـد) نـشان دهـندهٔ اهـمیت انـجام تـیمار RA نـسبت به وجـود ساختار روزت در اجسام شبه جنینی به منظور القاء نورون‌زایی در این مطالعه می‌باشد. بنابراین بن‌یاخته‌های جنینی انسانی مدل آزمایشگاهی مناسبی بوده به منظور درک بهتر مکانیسم مولکولی تکوین سیستم عصبی در انسان وبررسی تجلی ژنهای سیستم عصبی استفاده است. همچنین می‌توان با ایجاد جهش در سلولهای ES انسانی نقش و میزان تاثیر ژن مورد نظر را در تمایز عصبی مورد ارزیابی قرار داد.

References

1. Alvarez- Buylla A, Garcia – Verdugo JM, Tramino, D. A Unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Neurosci. 2001; 2: 287-2933

2. Thomson JA, Itskovitz- Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1988; 282:211

3. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro Dev Biol. 1995; 168: 342-357

4. Mayer- Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS: Isolation of lineage- restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Neuron. 1997; 19: 773-785

5. Okabe S, Forsberg- Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD: Development of neuronal precurs or cells and functional postmitotic neurons from embryos stem cells in vitro. Mech Dev. 1996; 59: 89-102

6. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science. 2000; 290: 1775-1779

7. Przyborski SA, Morton IE, Wood A, Andrews PW: Develppmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. Eur J Neurosci. 2000; 12: 3 521-528

8. Strubing C, Ahnert- Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Heschler J, Wobus AM: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech Dev. 1995; 53: 275-287

9. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Heschker J, Franz WM, Retinoci acid accelerates embryonic stem cell – derived cardiac differentiation and

enhances development of ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 1997; 29: 152 5-1539
10. Romero – Ramos M, Vourch P, Young HE, Lucas PA, Wu Y, Chivatakarn O, Zaman R, dunkelman N, el-Kalay MA, Chesselet MF: Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. J Neurosci Res. 2002; 69: 894-907
11. Rathjen J, Haines BP, Hudson KM, Nesci A, Dunn S, Rathjen PD: Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: Homogeneous formation and differentiation of a neurectoderm population. Development. 2002; 129: 2649-2661
12. Beddington RS, Smith JC: Control of vertebrate gastrulation: induction signals and responding genes. Curr Opin Genet Dev. 1993; 3: 655-661
13. Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG: Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. BMC Neurosci. 2003; 22; 4: 27
14. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell- derived inducing activity. Neuron. 2000; 28: 31-40
15. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T: Neural prognitors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2001; 19: 1134-1140
16. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J: In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci. 1995; 108: 1381-3188
17. Morriss- Kay GM, Sokolova N: Embryonic development and pattern formation. FASEB J. 1996; 10: 961-968
18. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. J Neurosci. 1996; 16: 1991-1100
19. Henion PD, Weston JA: Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. Dev Biol. 1994; 161: 243-250
20. Hill DP, Robertson KA: Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retionic acid. Brain Res dev Brain Res. 1997; 102: 53-67
21. Cervello MD, Amelio L, Tesoro V, Rougon G, Matranga V: Expression of PSA-N-CAM in human neuroblastoma cells induced to neuronal differentiation by retinoic acid. Eur J Cell Biol. 1997; 73: 270-275
22. Strubing C, Rohwedel J, Ahnert- Hilger G, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM: Development of G protein- mediated Ca^{2+} channel regulation in mouse embryonic stem cell – derived neurons. Eur J Neurosci. 1997 ; 9: 824-832
23. Baharvand H, Kazemi Ashtianei S, Rezazadeh Valojerdi M, Shahverdi A, Taee A, Sabour D: Establishment and in vitro differentiation of anewe embryonic stem cell line from human blasotycsts. Differentiation 2004; 72: 1-6
24. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR: Stem cel repair of central nervous system injury. J Neurosci Res. 2002; 68: 501-510
25. Rohwedel J, Malsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM: Muscle cell differentiation on embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. Dev Biol. 1994; 164: 87-101
26. Rolletschek A, Change H, Guan K, Zzyz J, Meyer M, Wobus AM: Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons in enhanced by survival – promoting factors. Mech Dev. 2001 ; 105: 93-104
27. Maden M, Heads or tails? Retinoic acid will decid Bioessays 1999; 21: 809-812
28. Maden M: The role of retinoids in developmental mechanisms in embryos. Subcell Biochem. 1998; 30: 81-111
29. Maden M: Retinoic acid and its receptors in limb regeneratin. Semin Cell Dev Biol. 1997; 8: 445-53
30. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM. McKay RD: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechol. 2000; 18: 675-679
31. Kocsis JD, Akiyama Y, Lankford KL, radtke C: Cell transplantation of peripheral – myolin – forming cells to repair the injured spinal cord. J rehabil Res Dev. 2002; 39: 287-298
32. 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 Biophsy Res Commun. 1996; 223: 691-694
33. Bain G, Gottlieb DI: Neural cells derived by in vitro differentiation of P19 and embryonic stem cells. Perspect Dev Neurobiol. 1998; 5: 175-178
34. Hens J, Nuydens R, Geerts H, Senden NH, Van de Ven WJ, Roebroek AJ, Van de Velde HJ, Rammaekers FC, Broers JL: Neuronal differentiation is accompanied by NSC1-2 expression. Cell Tissue Res. 1998; 292: 229-237
35. Wobus AM, Rohwedel j, Maitsev v, Hescheler J:

Invitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. Rouxs Arch Dev Biol, 1994; 204: 36-45

36. Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR: Differential induction of HNF-3 transcription factors during neuronal differentaion. Exp Cell Res. 1997; 234: 277-284

37. Gage FH: Mammalian neural stem cells. Science. 2000; 25: 287 (5457): 1433-1438

38. Strikland S, Madavi The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. cell 1978; 5: 393-403

39. Chambon A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J. 1996; 10: 940-954

40. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA: In vitro differentiation of transplant able neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2001; 19(12);

The Effect of Retinoic Acid on Human Embryonic Stem Cells with and without Rosette Morphology

H. Baharvand, M.SC. *, M. Hatami, M.Sc., N. Zare, M.Sc.

* P.O.Box: 19395-4644, Royan Institute, Stem Cell Departement
Tehran, Iran

Email: info@royaninstitute.org

Abstract

Received 10/Jul/2004, Accepted 10/Aug/2004

Introduction: Human Embryonic Stem (hES) Cells are pluripotent cells derived form the inner cell mass of blastocyst. These unique cells have the potential to form virtually any cell type in the body and can be propagated in vitro indefinitely in an undifferentiated state. This study was initiated to assess the effect of retinoic acid (RA) on hES cells with and without rosette morphology (neuroectodermal-like cells).

Material and Methods: Embryoid bodies (EBs) were made from ES cell line (Royan H1) with and without rosset compartments. The EBs treated with retinoic acid (RA)(10 μM) for 20 days and the cultured on tissue culture plate individually containing neuronal medium . Differentiated cells were evaluated by phase contrast microscopy and immunocytochemistry.

Results: Differentiated cells were positive with the neuron specific antibodies against microtubules associated protein 2(a+b) (MAP-2), neurofilament protein (NP), neuron-specific enolase (NSE), synaptophysin, and tubulin III. In presence of RA, more EBs were differentiated into neurons in both groups (in group with rosette compartment, 73.2% v.s. 13.2%, $P<0.01$, and in group with non-rosette compartment, 57.5% v.s. 19.5% $P< 0.01$). Moreover, RA in EBs with rosette compartment increased neural morphology.

Conclusion: These results showed RA induces hES into neurogenesis and rosette compartments of hES have more potential for neurogenesis and these cells may be used in stem cell transplantation therapies for neuronal diseases in future.

Key words: Human Embryonic Stem Cell, Rosette, Differentiation, Neuron

Yakhteh Medical Journal, Vol 6, No 22, Summer 2004, pp 103-109