

Corneal Differentiation Following HSC70 and HSP72 Expression in Air-Exposed Limbal Stem Cells Cultured on Denuded Amniotic Membrane

Parvaneh Mohammadi, M.Sc.¹, Marzieh Ebrahimi, Ph.D.^{1, 2*}, Hossein Baharvand, Ph.D.¹

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

2. Department of Regenerative Medicine, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

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

Received: 21/Oct/2009, Accepted: 9/Mar/2010

Abstract

Objective: The aim of this study is to create an *ex vivo* model to examine the expression of two heat shock protein 70 (HSP70) family members, heat shock protein 72 (HSP72) and heat shock constitute protein 70 (HSC70), at the mRNA and protein levels in differentiating corneal cells from air exposed limbal stem cells.

Materials and Methods: Limbal biopsies were cultured as explants on a cellular amniotic membrane for 14 days. The cells were then exposed to air for 16 extra additional days. The proposed expression of limbal stem cell markers (p63, ABCG2), corneal markers (K3/12, connexin 43), as well as HSP72 and HSC70 were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at the mRNA level, and by immunocytochemistry and flowcytometry at the protein level both pre and post air exposure. Fresh limbal and corneal tissues were used as control group.

Results: Air exposure decreased expression of p63 and increased expression of K3/K12 indicating an increase in the number of corneal cells. Our data showed that HSP72 and HSC70 were expressed at the mRNA level before and after air exposure while their expression significantly increased post air exposure at the protein level.

Conclusion: We assume HSC70 expression may be related to early and terminal stages of differentiation in cultured limbal stem cells. In addition, limbal stem cells were protected during normal development against oxidative stress thru increased HSP72 expression. These findings may have broader implications in development of therapeutic strategies for treating wound healing disorders by induction of HSPs.

Keywords: Air-Lifting, Corneal Development, Heat Shock Protein, Limbal Stem Cells

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 173-182

بیان پروتئین‌های شوک حرارتی HSC70 و HSP72 در سلول‌های بنیادی لیمبال کشت شده بر پرده آمینوتیک برهنه به دنبال هوادهی و تمایز به سمت اپی‌تلیوم قرنیه

پروانه محمدی، M.Sc.^۱، مرضیه ابراهیمی، Ph.D.^{۲*}، حسین بهاروند، Ph.D.^۱

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

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان،

مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه طب پیوندی

پست الکترونیک: Emai: mebrahimi@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۸/۷/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۱۸

چکیده

* **هدف:** ایجاد مدل به منظور بررسی بیان پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی (Heat Shock Protein 70; HSP70) و (Heat Shock Constitute Protein 70; HSC70) در سطح پروتئین و mRNA در سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال پس از هوادهی

* **مواد و روش‌ها:** لیمبال به صورت قطعه‌ای بر روی پرده آمینوتیک برهنه به مدت ۱۴ روز کشت گردید و پس از آن به منظور القای تمایز، سلول‌ها به مدت ۱۶ روز در معرض هوا قرار گرفتند. بیان شاخص‌های لیمبال (P63, ABCG2)، اپی‌تلیال قرنیه (k3, Connexin43) و HSP72، HSC70 در سطح پروتئین توسط ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری و در سطح mRNA توسط Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) قبل و پس از هوادهی مورد مطالعه قرار گرفتند. از بافت‌های لیمبال و قرنیه به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

* **یافته‌ها:** هوادهی سبب کاهش سلول‌های P63+ و افزایش سلول‌های K3+ گردید که که نشانه‌ای از تمایز به سمت سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه است. همچنین *HSC70 mRNA* و *HSP72* قبل و پس از هوادهی بیان شدند. با این وجود بیان آنها در سطح پروتئین پس از هوادهی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که بیان HSC70 در ارتباط با مراحل اولیه و نهایی تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال به اپی‌تلیوم قرنیه باشد. علاوه بر این سلول‌های لیمبال با افزایش بیان HSP72 سبب حفظ سلول‌ها از آسیب به واسطه استرس اکسیداتیو طی تکوین به سمت قرنیه می‌گردند. این یافته‌ها راهی برای استفاده از HSPها در ترمیم زخم‌های قرنیه معرفی می‌کند.

* **کلیدواژگان:** هوادهی، پروتئین‌های شوک حرارتی، تکوین قرنیه، سلول‌های بنیادی لیمبال

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۸۲-۱۷۳

مقدمه

پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Protein; HSP) مولکول‌های بسیار حفظ شده‌ای هستند که در همه موجودات از باکتری و مخمر تا انسان بیان می‌شوند. بیان این پروتئین‌ها به وسیله طیف وسیعی از محرک‌های محیطی شامل: استرس‌های اکسیداتیو، نقص‌های تغذیه‌ای، اشعه UV، عوامل شیمیایی (مثل اتانول) و عفونت‌های ویروسی القا می‌شوند (۱). این مولکول‌ها نقش مهمی در حفاظت موجودات زنده در مقابل عوامل آسیب‌رسان، پیشرفت چرخه سلولی، تکوین جنینی، تمایز سلولی، تحریک هورمونی در مهره‌داران و رشد در میکروارگانیسم‌ها دارند (۲).

پروتئین شوک حرارتی ساختاری (Heat Shock Constitute Protein; HSC70) که در کروموزوم ۱۱ قرار دارد و پروتئین شوک حرارتی قابل القا با استرس Heat Shock Protein 70 (HSP70) که در کروموزوم ۶ قرار دارد، هر دو در سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها بیان شده و بیش از ۹۵ درصد تشابه ساختاری داشته و واجد خواص زیستی مشابهی هستند. در سلول‌های پستانداران HSC70 به طور دائمی بیان شده و کمتر القایی می‌باشد در حالی که HSP70 در شرایط طبیعی سلول‌ها در مقادیر بسیار پایین بیان شده و بیان آن توسط استرس‌ها القا

می‌گردد (۱).

قرنیه چشم، سطح خارجی بینایی را پوشش می‌دهد که در نتیجه تکثیر و تمایز سلول‌های موجود در ناحیه لیمبوس - حدفاصل قرنیه و ملتحمه - حاصل می‌گردد. هنگام تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال به اپی‌تلیال قرنیه چندین نوع سلول را می‌توان مشاهده کرد که از آن جمله می‌توان به سلول‌های بنیادی لیمبوس [واجد خاصیت خود نوزایی (Self Renewal) و تمایز به انواع سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه]، سلول‌های تکثیر شونده گذرا [Transient Amplifying Cell] واجد خواص تکثیر زیاد اما کوتاه مدت] و سلول‌های پس میتوزی [Post Mitotic Cell] که در انتهای مسیر تمایزی قرار داشته و قدرت تکثیر خود را از دست داده و به تدریج از سطح چشم به داخل اشک ریزش می‌کنند] اشاره کرد (۳، ۴). سلول‌های قرنیه چشم در تماس مستقیم با هوا می‌باشند که از جمله عوامل استرس‌زا و موثر در تمایز این سلول‌ها است. مطالعات چندی نشان داده است که باز شدن پلک‌ها و مواجهه با هوا، نقش مهمی در تکوین سلول‌های بنیادی لیمبال به سمت سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه در جوندگان دارند (۵، ۶) که ممکن است به علت بیان مولکول‌های استرسی باشد. تاکنون مطالعه‌ای به منظور بررسی HSPها طی تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال به قرنیه صورت نگرفته است

(Gibco, 17105-041) به مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. سپس قطعات بر روی پرده آمینوتیک که از قبل توسط آنزیم تریپسین (27250-018 Gibco), سلول‌های اپی‌تلیال آن برداشته شده بود به گونه‌ای قرار گرفتند که سطح اپی‌تلیال آن رو به بالا و سطح استرومایی آن به سمت پرده آمینوتیک باشد. کشت در محیط DMEM/F12 (Gibco, 21331-020), حاوی ۱۰ درصد DMSO (Gibco, 213331-020), ۵ درصد EGF (Sigma, 9644) و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر EGF (Sigma, D2650) و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انسولین (Biochem, 57590) ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلنیوم (Sigma 556), ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترانسفرین (Sigma, T-1147) ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیدروکورتیزون (Sigma, H08888-56), ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین (Sigma, G1287), ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفوتریپسین B (Sigma, A2411) و ۴ میلی‌مولار آل-گلوتامین (Gibco, 25030-) صورت گرفت. سلول‌ها به مدت ۳۰ روز در محیط کشت قرار گرفتند. در ابتدا (مرحله پیش از هوادهی) سلول‌ها به مدت ۱۴ روز توسط ۴ میلی‌لیتر محیط کشت پوشانده شدند تا از تماس سلول‌ها و هوای سطحی ممانعت به عمل آید. در مرحله بعد (مرحله هوادهی) حجم محیط کشت به مدت ۱۶ روز به حداقل میزان مورد نظر (۸۰۰ میکرو لیتر) کاهش یافت که سبب مواجه بیشتر سلول‌ها با اکسیژن هوا گردید. محیط کشت قبل از هوادهی هر ۲-۳ روز یک بار و پس از هوادهی نیمی از محیط کشت روزانه با محیط کشت کامل تعویض گردید.

ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

به منظور بررسی بیان شاخص‌های مربوط به سلول‌های لیம்பال و قرنیه چشم و نیز HSPها در سلول‌های کشت شده بر پرده آمینوتیک قبل از هوا دهی (روز ۱۴ کشت) و پس از هوادهی (روز ۳۰ کشت) و بافت‌های لیம்பال و قرنیه از دو تکنیک ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید (۸). به این ترتیب که در روش ایمونوسیتوشیمی ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد (Sigma, P6148) فیکس شدند و سپس توسط ۰/۲ درصد تریتون ۱۰۰-100 (Biogene, CT120) نفوذ پذیر شدند. برای ممانعت از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با بافر بلوکه کننده حاوی ۱۰ درصد سرم بز (Gibco, 16210-064) در Phosphate Buffer Saline (PBS) قرار گرفتند. برای رنگ آمیزی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (جدول ۱) استفاده گردید و تیمار به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق صورت گرفت. در انتها به منظور آشکار ساختن مکان اتصال آنتی‌بادی‌های اولیه از آنتی‌بادی‌های ثانویه کوئزومگ با FITC (جدول ۱) استفاده گردید. برای بررسی و رنگ آمیزی هسته از یدید پرویدوم (Propidium Iodid; PI) یا رنگ Dappi استفاده شد و نتایج توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nicon, Japan) مورد بررسی قرار گرفت.

در ایمونوهیستوشیمی به منظور حذف پارافین از برش‌های بافتی محلول گزلیول استفاده شد. سپس برش‌ها در غلظت‌های مختلف اتانول (۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) آب‌گیری شدند و پس از شست‌وشو با PBS، احیای آنتی‌ژنی با استفاده از محلول ۲۰ میلی‌مولار تریس (pH=۷/۶-۸) حاوی ۰/۱ درصد تریپسین و ۰/۱ درصد کلرید کلسیم صورت گرفت. بقیه مراحل مشابه روش ایمونوسیتوشیمی انجام گرفت.

و مطالعات موجود تنها به بررسی بیان این پروتئین‌ها در بافت قرنیه و یا لیம்பال پرداخته‌اند. مطالعات دین و همکارانش نشان دادند که بیان HSP70, HSP25, HSC70, HSP90 در بسیاری از سلول‌های پایه‌ای اپی‌تلیوم قرنیه نسبت به سلول‌های سطحی‌تر بیشتر است. از آنجا که سلول‌های پایه‌ای‌تر فعالیت بیشتری نسبت به سلول‌های سطحی‌تر دارند به نظر می‌رسد که نیاز آنها به عملکرد چیرونی HSPها هم بیشتر باشد (۱). هم‌چنین آنان مشخص ساختند که بیان HSP70 در مرکز قرنیه رت بیش از HSC70 است. در مطالعه دیگری بیان HSP70 تنها در ناحیه قرنیه، شناسایی گردید و مشخص شد که در تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه موثر باشد (۷).

با توجه به عدم وجود مطالعه کامل در زمینه حضور پروتئین‌های شوک حرارتی در تمایز سلول‌های بنیادی لیம்பال، الگوی بیان پروتئین‌های شوک حرارتی HSC70 و HSP72 در سلول‌های بنیادی لیம்பال قبل و بعد از هوادهی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کشت سلول‌های بنیادی لیம்பال از پرده آمینوتیک استفاده شد. پرده آمینوتیک به علت حضور عناصر ماتریکس خارج سلولی چون لومیکان، استئوگلاسیین/میکان، کلاژن IV، فیبرینوزن، پریپلاکین، پیدوزن ۲، ترانس گلو میناز ۲ (TG2)، اینتگرین ۶، لامینین ۱ و ۵ و فاکتورهای رشد سلول‌های اپی‌تلیال (EGF)، سلول‌های کبدی (HGF) و فیبرو بلاست (bFGF) ریز محیط مناسبی به منظور تکثیر و حفظ سلول‌های بنیادی لیம்பال فراهم می‌نماید (۸) و امروزه در بالین و در پیوند سلول‌های کشت شده قرنیه به بیماران با نقص سلول‌های بنیادی لیம்பال مورد استفاده می‌باشد (۹-۱۲). هم‌چنین به منظور بررسی فتوتیپ سلول‌ها در مراحل مختلف کشت، شاخص‌های اپی‌تلیوم قرنیه، K3 [از انواع فیلامنت‌های بینایی که در سیتوپلاسم سلول‌های مرکزی قرنیه بیان می‌شوند (۱۳)] و کانکسین ۴۳ (Connexin 43; CX43)، از جمله پروتئین‌های داخل غشایی که در تشکیل اتصالات منفذ دار [Gap Junction] شرکت می‌کند (۱۴)] و شاخص‌های بنیادی لیம்பال، P63 [از فاکتورهای رونویسی که در هسته سلول بیان می‌شود (۱۵)] و ABCG2 [از پروتئین‌های داخل غشایی است که با تجزیه ATP سبب خروج مواد سمی از سلول‌ها می‌شود (۱۶)] مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج این مطالعه مشخص ساخت که هوادهی سبب افزایش بیان K3 (شاخص سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه) و کاهش بیان P63 و ABCG2 (شاخص‌های بنیادی لیம்பال) می‌گردد که نشانه‌ای از تمایز سلول‌های کشت شده بر پرده آمینوتیک متعاقب هوادهی است. هم‌چنین بیان HSC70 و HSP72 در حین پروسه هوادهی افزایش یافت که می‌تواند به دلیل اثر حفاظتی آنان در قبال استرس‌های محیطی و یا نقش آنها در فرایند تمایز به اپی‌تلیوم قرنیه باشد.

مواد و روش‌ها

کشت قطعه ای (Explant) ناحیه لیம்பال بر پرده آمینوتیک

سلول‌های بنیادی لیம்பال بر روی پرده آمینوتیک (۱۷) کشت گردید. به طور خلاصه ۱۰ عدد کره کامل چشم (HIV, HBV, HCV) با دامنه سنی ۷۰-۱۷ سال (میانگین ۴۳/۵) که کمتر از ۷۲ ساعت از مرگ دهنده آن گذشته بود، از بانک چشم ایران (تهران) تهیه گردید. این طرح مصوبه کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان می‌باشد. ناحیه لیம்பال پس از جداسازی ملتحمه به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. برای جداسازی اپی‌تلیال از استروما از آنزیم دیسپاز II

جدول ۱: مشخصات آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده در تکنیک ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

نام آنتی‌بادی	Host/Isotype	شرکت	ضریب رقت	شماره کانالوگ
Anti p63	Ms/ IgG2a	Chemicon	۱:۱۰۰	MAB4135
Anti K3/K12	Ms/ IgG1	Chemicon	۱:۱۰۰	CBL-218
Anti Connexin 43 (clone CXN-6)	Ms/ IgG	Sigma	۱:۱۰۰	C8093
Anti hsc70	Rat /IgG	Stressgen	۱:۱۰۰	SPA-815
Anti HSP72 FITC Goat	Ms/ IgG	Stressgen	۱:۱۰۰	C92F3A-5
Anti-mouse FITC	Goat/ IgG	Sigma	۱:۲۰۰	F9006
Goat anti-rat FITC	Goat/ IgG	Sigma	۱:۲۰۰	F6258

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک RT-PCR

ژن	توالی پرایمر	دمای Annealing	طول قطعه تکثیر شده
ABC2	F: 5' CTC TTC TTC CTG ACG ACC AAC C 3' R: 5' CAC ACT CTG ACC TGC TGC TAT G 3'	60	515bp
KRT 3	F: 5' AGA CTT CAA GAA GAA ATA TGA G 3' R: 5' TCA TCT ATC AAG GCA TCC AC 3'	60	141bp
HSP A8 HSPA8=HSP72,HSC70	F : 5' TCT TGG CAC CAC CTA CTC TTG 3' R : 5' CAT CAC CGA TCA ACC GTT CAG 3'	58	125 bp
p63	F: 5' GAG GTT GGG CTG TTC ATC AT 3' R: 5' GTG GGA AAG AGA TGG TCT GG 3'	58	229 bp
GAPDH	F:5' CTC ATT TCC TGG TAT GAC AAC GA3' R:5' CTT CCT CTT GTG TTG CT3'	58	224 bp

بر اساس دستورالعمل کیت ساخته شد (۸) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. محصولات PCR روی ژل آگاروز (۲ درصد) جدا شد و با اتیدیوم برمایند رنگ و توسط دستگاه ترانس لومینوتور (Uvidio, UK) قابل رویت گردید.

آنالیز آماری

آزمایش‌ها حداقل در ۳ تکرار و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از Paired-Samples t test انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده‌اند و اختلاف $p < 0.05$ معنی‌دار گزارش گردید.

یافته‌ها

تغییر ظاهری سلول‌های بنیادی لیம்பال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک به دنبال هوادهی
مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های کشت شده بر پرده آمنیوتیک، قبل از هوادهی از اندازه کوچک و ظاهری به هم فشرده برخوردار بودند. هم‌چنین نسبت هسته به سیتوپلاسم در آنها بالا بود (شکل ۱A). کاهش سطح محیط کشت و افزایش هوادهی در سلول‌ها سبب تغییر تدریجی برخی سلول‌ها به خصوص در حاشیه کشت گردید. به این صورت که اندازه سلول‌ها افزایش و نسبت هسته به سیتوپلاسم در آنها کاهش یافت. در این مرحله سلول‌ها فشردگی خود را از دست دادند و در حاشیه کشت سلول‌های سنگ‌فرشی به مقادیر زیاد و نیز به طور پراکنده در میان سایر سلول‌ها ظاهر گردیدند (شکل ۱B).

بررسی سلول‌ها توسط فلوسایتومتری

روش فلوسایتومتری برای مطالعه ی پروتئین‌های HSP72, HSC70 مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها در مراحل قبل و بعد از هوادهی توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد و دیسپاز (U ۱/۲) از پرده آمنیوتیک جدا شده و توسط متانول سرد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فیکس گردیدند. سپس سلول‌ها با استفاده از محلول (۰/۲ درصد) TritonX-۱۰۰ نفوذپذیر شده و به منظور حذف اتصالات غیراختصاصی با سرم ۱۰ درصد بز تیمار شدند. پس از شست‌وشو با PBS سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Rat Anti hsc70 (SPA-815) و HSP72 Antibody کونژوگه با فلورسین (C92F3A-5) در رقت ۱:۱۰۰ و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای شناسایی پروتئین HSC70 از آنتی‌بادی ثانویه Anti Rat IgG کونژوگه با FITC (F6258) استفاده گردید. در نهایت نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری BD مورد بررسی قرار گرفتند. از نرم‌افزار Cell Quest به منظور آنالیز داده‌ها استفاده شد.

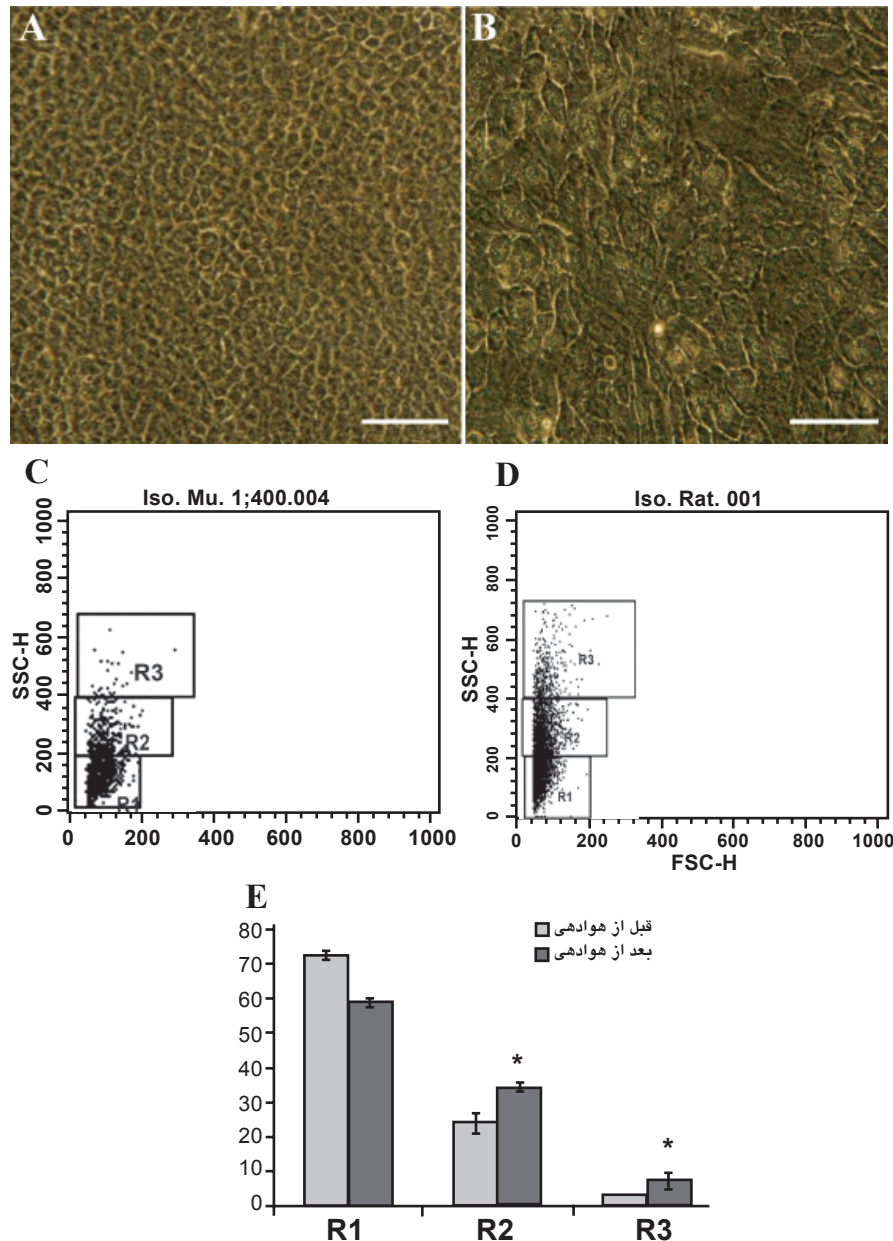
بررسی بیان ژنی توسط واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

از واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) برای بررسی بیان ژن‌های ویژه اپی‌تلیال قرینه (k3) و سلول‌های بنیادی لیம்பال (ABC2, p63) و نیز HSP72 و HSC70 در سلول‌های کشت شده بر پرده آمنیوتیک قبل و بعد از هوادهی استفاده گردید. RNA سلول‌ها توسط Trisol استخراج و با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و کیت Fermentase رشته مکمل cDNA

بیان HSC70 و HSP72 در کشت سلول‌های لیمبال

سلول‌های بالغ یا تمایز یافته از FSC و SSC بزرگ‌تری برخوردارند (۱۸). لذا برای بررسی بهتر در این مطالعه، سلول‌ها در سه منطقه R1=(0-200) ناحیه سلول‌های بنیادی، R2=(200-400) یا ناحیه سلول‌های اولیه تقسیم شونده گذرا (Transient Amplifying Cells; TAC) و R=(>400) یا ناحیه سلول‌های نهایی TAC مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل 1C, D). نتایج نشان داد که درصد سلول‌ها در منطقه R1 پس از هوادهی کاهش ($p < 0.05$) و در منطقه R2 و R3 به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$) (شکل 1E).

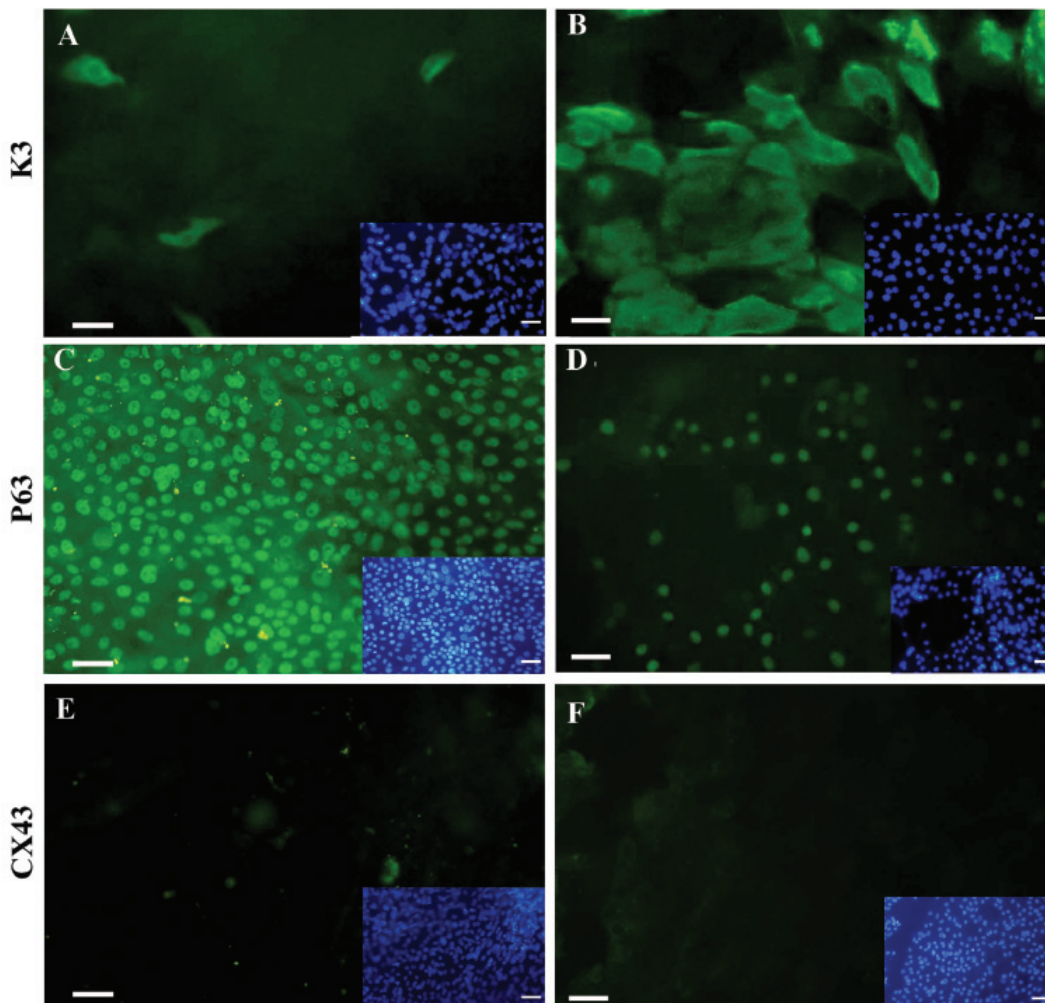
از آنجا که در مشاهدات میکروسکوپی جمعیت هتروژنی از سلول‌ها مشاهده گردید، پراکنش نوری سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. در این روش پراکنش نوری جلویی (Forward Scatter; FSC) به عنوان یک اندازه‌گیری غیرمستقیم از اندازه سلول و پراکنش جانبی نور (Side Scatter; SSC) به عنوان یک اندازه‌گیری غیرمستقیم از گرانولوسیتی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. چنانچه سلول‌ها در ناحیه FSC و SSC کوچک‌تری قرار گیرند، نشانه‌ای از نابالغ بودن سلول‌ها است در حالی که



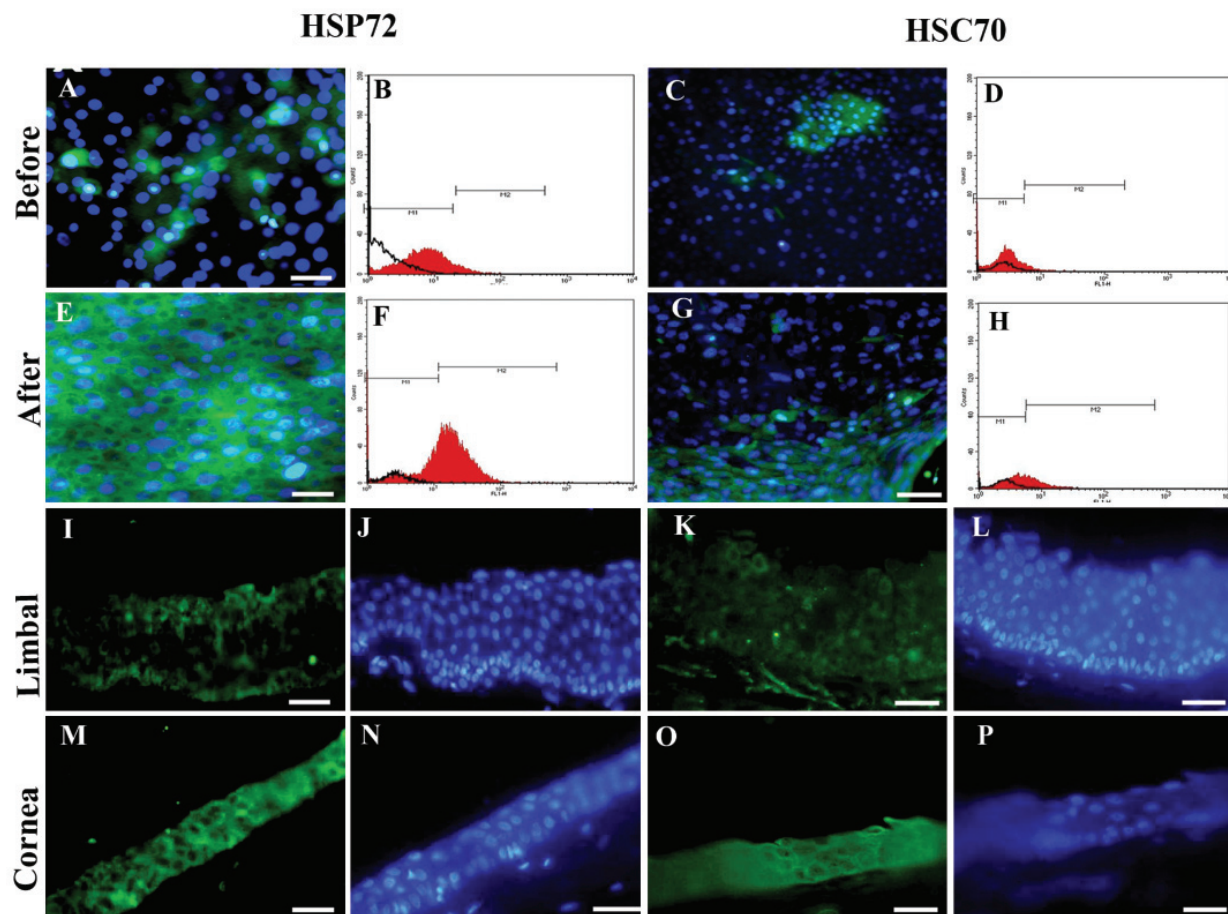
شکل ۱: بررسی سلول‌های کشت شده توسط میکروسکوپ نوری در روز ۱۴ کشت و قبل از هوادهی (A)، و پس از ۱۶ روز هوادهی (B) [Scale Bar=200µm]. وضعیت FSC و SSC سلول‌ها قبل (C) و پس از هوادهی. مقایسه سلول‌ها از نظر پراکنش نوری و گرانولوسیتی (SSC) قبل و پس از هوادهی ($p < 0.05$) (E).

هوادهی و القای تمایز در سلول‌های بنیادی لیمبال منجر به افزایش بیان HSP72 و HSC70 در سطح پروتئین می‌گردد از آنجا که هدف از این تحقیق بررسی بیان پروتئین‌های شوک حرارتی طی فرایند هوادهی بوده است، برای اولین بار از روش فلوسایتومتری و نیز برای تعیین محل بیان HSC70 و HSP72 از روش ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی قبل و بعد از هوادهی استفاده شد. HSP72 در سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها قابل شناسایی بود (شکل ۳A, B) و پس از هوادهی بیان آن ۲ برابر گردید ($1/33 \pm 3/09$ درصد در روز ۱۴ در مقابل $2/42 \pm 6/54$ درصد در روز ۳۰ (شکل ۳C, D). HSC70 نیز مشابه HSP72 در سیتوپلاسم و هسته برخی سلول‌ها بیان گردید (شکل ۳C, D) و بیان آن به دنبال هوادهی در حدود ۷ برابر ($7/54 \pm 10/54$ درصد در روز ۱۴ در مقابل $9/47 \pm 69/1$ درصد در روز ۳۰) افزایش یافت (شکل ۳G, ۳H). اکثر سلول‌های بیان کننده این پروتئین در حاشیه کشت مستقر بودند.

کاهش شاخص بنیادی (P63) و افزایش شاخص تمایز یافتگی (K3) در کشت سلول‌های لیمبال بر روی پرده آمینوتیک به دنبال هوادهی برای بررسی سلول‌های طی کشت و به منظور نشان دادن سلول‌های تمایز نیافته، شاخص‌های P63 و ABCG2 و به منظور نشان دادن سلول‌های تمایز یافته، شاخص‌های K3 و کانکسین 43 توسط ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. برای کمی نمودن نتایج، ۱۰ تصویر به طور تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت به کل سلول‌ها محاسبه گردید. آنالیز نتایج با استفاده از Paired Samples t test نشان داد که پس از هوادهی افزایش معنی‌داری ($p < 0/01$) در بیان K3 (از $0/21 \pm 0/06$ درصد در روز ۱۴ به $2/7 \pm 22/4$ درصد در روز ۳۰، (شکل ۲A, B) و کاهش معنی‌داری در بیان P63 (از $4/5 \pm 82/5$ درصد در روز ۱۴ به $12/2 \pm 40/57$ درصد در روز ۳۰، $p < 0/01$) مشاهده گردید (شکل ۲C, D). در حالی که تغییری در بیان CX43 قبل و بعد از هوادهی مشاهده نشد و این پروتئین طی فرایند کشت بیان نشد و یا بسیار کم بیان گردید ($p > 0/05$) (شکل ۲E, F).



شکل ۲: بررسی سیتوکراتین ۳ در سلول‌های کشت شده (A, B) p63 (C, D) و کانکسین ($100\mu\text{m}$ Scale) (E, F) قبل و بعد از هوادهی با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی. هسته‌ها به رنگ آبی نشان داده شده‌اند.



شکل ۳: بررسی بیان Hsp72 (A, E) و Hsc70 (C, G) قبل و بعد از هوادهی در سلول‌های کشت شده توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی (Scale bar=۲۰۰ μm). درصد سلول‌های بیان‌کننده HSP72 (B, F) و HSC70 (D, H) توسط فلووسایتومتری محاسبه گردید. بیان Hsp72 در بافت لیمبال (I, J) و قرنیه (M, N) (Scale bar=۲۰۰ μm) و نیز Hsc70 در بافت لیمبال (K, L) و قرنیه (O, P) (Scale bar=۲۰۰ μm) توسط ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید. هسته‌ها به رنگ آبی نشان داده شده‌اند.

قبل و پس از هوادهی در سلول‌های کشت شده بر پرده آمنیوتیک بیان شدند در حالی که K3 پس از هوادهی بیان گردید. با توجه به آنکه ژن‌های *P63* و *ABCG2* در سلول‌های بنیادی لیمبال و نیز سلول‌های تقسیم‌شونده گذرا (TAC) و نه سلول‌های تمایز یافته نهایی بیان می‌شوند (۵، ۱۹) و نیز بیان K3 در مراحل انتهایی یعنی سلول‌های تقسیم‌شونده (TAC) نهایی و یا سلول‌های تمایز یافته نهایی گزارش شده است (۱۹، ۲۰). بنابراین چنین می‌توان استنباط نمود که سلول‌های کشت شده جمعیت هتروژنی متشکل از سلول‌های لیمبال و سلول‌های تقسیم‌شونده گذرا در مراحل مختلف می‌باشند. با توجه به آنکه کاهش بیان دو ژن *ABCG2* و *P63* مشاهده نگردید، می‌توان چنین استنباط کرد که سلول‌ها به مرحله تمایز نهایی راه نیافته‌اند. هرچند که مطالعات Real-Time PCR می‌تواند مراحل اصلی تمایزی را مشخص تر نماید. بررسی بیان ژن‌های *HSP72* و *HSC70* نشان داد که این دو ژن قبل و پس از هوادهی در سلول‌های کشت شده بیان می‌شوند (شکل ۴).

بررسی این پروتئین‌ها در بافت طبیعی قرنیه و لیمبال نشان داد که HSP72 در تعداد اندکی از سلول‌های ناحیه لیمبال بیان می‌شود (شکل L، ۳۱) در حالی که کل سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه و به خصوص مرکز قرنیه این پروتئین را بیان می‌کنند (شکل ۳M, N). سلول‌های بیان‌کننده HSC70 نیز مشابه HSP72 در قرنیه (شکل L، ۳K) و به خصوص مرکز آن بیشتر از ناحیه لیمبال (شکل P، ۳O) بودند. با این وجود تعداد بیشتری از سلول‌ها Hsc70 را در مقایسه با HSP72 در هر دو ناحیه بیان می‌کردند.

هوادهی سبب افزایش بیان ژن K3 می‌گردد در حالی که بیان ژن‌های *HSP72*، *ABCG2* و *P63* تغییری نمی‌یابند به منظور بررسی ژن‌های *HSP72*، *ABCG2*، *K3*، *P63* و *HSC70* از تکنیک RT-PCR استفاده شد. GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (شکل ۴). ژن‌های *ABCG2* و *P63*

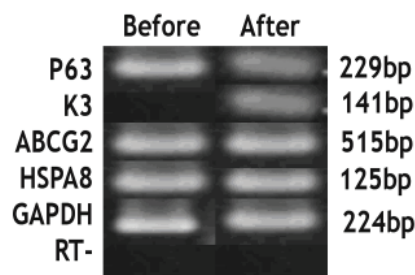
و گرانولوسیتی پایین، بیان بالای p63، بیان پایین K3 و فقدان بیان CX43 در سلول‌های لیملال کشت شده بر پرده آمینوتیک بیانگر این نکته است که بیشتر این سلول‌ها پیش از هوادهی در حالت بنیادی قرار دارند (۸، ۲۴). در حقیقت پرده آمینوتیک با دارا بودن عناصر ماتریکس خارج سلولی چون فیبرو نکتین-لامینین-کلاژن IV و فاکتورهای رشد EGF، bFGF، HGF در حفظ خواص بنیادینگی در سلول‌های بنیادی اپی‌تلیوم لیملال موثر می‌باشد (۸). به دنبال هوادهی سلول‌های کشت شده لیملال به صورت چندوجهی و سنگ‌فرشی در آمده و نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش و گرانولوسیتی افزایش یافت. علاوه بر اینکه شاخص اختصاصی قرنیه (K3) نیز افزایش و شاخص P63 کاهش یافت. در حالی که تغییری در بیان CX43 مشاهده نگردید. طی تکوین قرنیه سلول‌های مستقر در غشای پایه (Base Membrane) لیملال کوچک و کروی بوده و 'P63+K3-CX43' می‌باشند. طی مهاجرت به سمت قرنیه و نیز به سمت سطح چشم، سلول‌ها به صورت سنگ‌فرشی در آمده و دسموزوم‌ها در آنها افزایش می‌یابد. در این زمان سلول‌ها درجات متفاوتی از P63، K3 و CX43 را بیان می‌کنند. در نهایت سلول‌های تمایز یافته نهایی که به فرم مطبق و پهن شده (تخت) در لایه‌های سطحی قرنیه مشاهده می‌گردند، فاقد بیان P63 بوده و مقادیر زیادی K3 و CX43 را بیان می‌کنند (۲۵، ۲۶).

در بخش دیگر این مطالعه الگوی بیان HSP72 و HSC70 در سلول‌های بنیادی لیملال قبل و بعد از هوادهی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که هوادهی ضمن القای تمایز در سلول‌های بنیادی لیملال، سبب افزایش بیان HSP72 یا HSP70 می‌گردد. در بسیاری از سلول‌های مرکز قرنیه بیان می‌گردد و در ناحیه لیملال از بیان پایینی برخوردار است (۱). بیان این پروتئین در شرایط استرسی تا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد و نقش مهمی در فرآیندهای وابسته به چپرون‌ها، ترمیم پروتئین‌ها و جلوگیری از آپوپتوز ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد که مواجهه با اکسیژن منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌ها شده و به منظور حفظ بقای سلول، بیان این پروتئین افزایش می‌یابد (۲۷). هم‌چنین این پروتئین در مهاجرت، چسبندگی و رشد اپی‌تلیال در حالت طبیعی و طی تکوین موثر است و بیان آن به هنگام ترمیم زخم‌های ناحیه اپی‌تلیوم قرنیه افزایش می‌یابد (۷).

بیان HSC70 نیز به دنبال هوادهی افزایش یافت. هم‌چنین تعداد زیادی از سلول‌های اپی‌تلیوم مرکز قرنیه نسبت به ناحیه لیملال این پروتئین را بیان می‌کردند. دین و همکارانش نیز گزارش کردند که HSC70 در مرکز قرنیه بیان می‌شود و در منطقه لیملال تنها سلول‌های wing این پروتئین را بیان می‌کنند (سلول‌های wing و سلول‌های بازال قرنیه ماهیت TAC دارند). آنها اعلام داشتند که از آنجا که سلول‌های TAC از توانایی تکثیر بالایی برخوردارند، به عملکرد چپرونی HSC70 برای فولدینگ مناسب پروتئین‌های تازه سنتز شده نیازمند می‌باشند (۱). با توجه به اینکه ژن‌های HSP70 و HSC70 قبل و پس از هوادهی بیان می‌شوند می‌توان چنین نتیجه گرفت که آنها در سطح mRNA نقش تنظیم‌کنندگی دارند هرچند که به مطالعات بیشتر در این زمینه نیاز می‌باشد.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه که برای اولین بار به بررسی



شکل ۴: بررسی ژن‌های لیملال، قرنیه و پروتئین‌های شوک گرمایی توسط RT-PCR

بحث

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) خانواده بسیار حفاظت شده‌ای هستند که در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارند و نقش مهمی در فرایندهای پایه‌ای سلول ایفا می‌کنند (۱) و بیان آنها در مقابل استرس‌ها افزایش می‌یابد. امروزه این پروتئین‌ها را در انجام بسیاری از فرایندهای سلولی همچون تنظیم چرخه سلولی، تکوین جنینی، تمایز سلولی، تحریک هورمونی در مهره‌داران و رشد در میکروارگانیسم‌ها موثر می‌دانند.

تکوین قرنیه بلافاصله بعد از هفته پنجم در جنین انسان شروع شده و تا زمان باز شدن پلک ادامه می‌یابد. عمده‌ترین تغییر در قرنیه با باز شدن پلک‌ها و در معرض هوا قرار گرفتن سلول‌های قرنیه صورت می‌گیرد (۵، ۲۱، ۲۲). هم‌چنین سلول‌های بنیادی لیملال در روی غشای پایه قرار داشته و از نظر ساختاری در معرض هوا محیطی قرار ندارند، این سلول‌ها به دنبال تقسیمات مداوم به سمت سطح قرنیه - مکانی که به طور مستقیم در معرض هوا قرار دارد - مهاجرت می‌کنند و ضمن حرکت، تمایز نیز می‌یابند، به این ترتیب به نظر می‌رسد که در فرایند تمایز پروتئین‌های شوک حرارتی ضمن حفاظت سلول در برابر استرس اکسیداتیو در تمایز سلول‌ها نیز موثر باشند. از آنجا که هیچ مطالعه مشخصی در این زمینه وجود ندارد، در این مطالعه بر آن شدیم که الگوی بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP72-HSC70) را به دنبال مواجهه با هوا (هوادهی) در کشت سلول‌های بنیادی لیملال مورد مطالعه قرار دهیم. به منظور کشت بهینه سلول‌های بنیادی لیملال، پرده آمینوتیک که بر اساس مطالعات پیشین (۸) به عنوان بستر مناسب کشت این سلول‌ها معرفی گردیده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج نشان داد که پیش از هوادهی، سلول‌ها کوچک، گرد با هسته بزرگ و سیتوپلاسم کم بوده و به طور پیوسته و به هم فشرده رشد می‌کنند. به هنگام مطالعات فلوسایتومتری، اکثر این سلول‌ها در ناحیه سلول‌های بنیادی لیملال (شکل ۱) قرار می‌گرفتند. از آنجا که سلول‌های اپی‌تلیال لایه قاعده لیمبوس که حاوی سلول‌های بنیادی قرنیه می‌باشند در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته مرکز قرنیه اندازه کوچکتر و گرانولوسیتی کمتری دارند (۱۸) می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌ها در این مرحله تمایز نیافته باقیمانده‌اند. بررسی شاخص‌های K3 و P63 نیز نشان داد که پیش از هوادهی درصد سلول‌های بیان‌کننده P63 بیش از K3 می‌باشد. علاوه بر این هیچ گونه بیانی از CX43 مشاهده نگردید. سیتوکراتین K3 و CX43 در اپی‌تلیال قرنیه در مرکز قرنیه به فراوانی بیان می‌شوند و بیان آنها در سلول‌های پایه لیملال بسیار کم گزارش شده است (۲۳). اندازه

۳. افزایش HSC70 به دنبال هوادهی در سلول‌های تقسیم شونده گذرا صورت می‌گیرد که از خاصیت تکثیر بالایی برخوردار هستند. شناخت مکانیسم عمل این پروتئین‌ها طی تکوین قرنیه نیازمند به مطالعات دقیق‌تر با استفاده از روش‌های خاموش‌سازی ژنی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی پژوهشکده رویان و سازمان امور زنان و خانواده نهاد ریاست جمهوری به انجام رسیده است.

References

1. Dean DO, Kent CR, Tytell M, Constitutive and inducible heat shock protein 70 immunoreactivity in the normal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(12): 2952-2962.
2. Missotten GS, Journée-de Korver JG, Wolff-Rouendaal DD, Keunen J E, Schlingemann RO, Jager MJ. Heat shock protein expression in the eye and in uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(7): 3059-3065.
3. Lavker RM, Sun TT. Epithelial stem cells: the eye provides a vision. *Eye (Lond).* 2003; 17(8): 937-942.
4. Ang L, Tan D. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singapore.* 2004; 33(5): 576-580.
5. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea.* 2004; 23(8 Suppl): S8-S19.
6. Zieske JD. Corneal development associated with eyelid opening. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(8-9): 903-911.
7. Lyngholm M, Vorum H, Nielsen K, Østergaard M. Bent Honoré and Niels Ehlers. Differences in the protein expression in limbal versus central human corneal epithelium -a search for stem cell markers. *Exp Eye Res.* 2008; 87(2): 96-105.
8. Ahmadiankia N, Ebrahimi M, Hosseini A, Baharvand H. Effects of different extracellular matrices and co-cultures on human limbal stem cell expansion in vitro. *Cell Biol Int.* 2009; 33(9): 978-987.
9. Espana EM, Prabhasawat P, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. *Br J Ophthalmol.* 2002; 88(6): 640-645.
10. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol.* 1997; 123(3): 303-312.
11. Chen HJ, Piers R, Tseng S. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84(8): 826-833.
12. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology.* 1997; 104(12): 2068-2076.
13. Liu CY, Zhu G, Westerhausen-Larson A, Converse R, Kao CW, Sun TT, Kao WW. Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development. *Curr Eye Res.* 1993; 12(11): 963-974.
14. Chen Z, Evans WH, Pflugfelder SC, Li DQ. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative

چگونگی بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در کشت سلول‌های بنیادی لیمبال ضمن تمایز پرداخته است نشان داد که:

۱. هوادهی سبب القای تمایز در سلول‌های کشت شده لیمبال بر پرده آمینوتیک می‌گردد.

۲. تمایز به دنبال هوادهی سبب افزایش HSP72 در سلول‌ها می‌گردد که به نظر می‌رسد در محافظت سلول‌ها از استرس اکسیداتیو حاصله و نیز در مهاجرت سلول‌ها بر پرده آمینوتیک موثر باشد.

marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells.* 2006; 24(5): 1265-1273.

15. Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Connon CJ, Kinoshita S. Expression and Tissue Distribution of P63 Isoforms on Ocular Surface Epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 82(2): 293-299.

16. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett.* 2004; 565(1-3): 6-10.

17. Baharvand H, Ebrahimi M, Javadi A M. Comparison of characteristics of cultured limbal cells on denuded amniotic membrane and fresh conjunctival, limbal and corneal tissues. *Develop Growth Differ.* 2006; 49: 241-251.

18. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(12): 5125-5129.

19. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Expression of the 55-KD/64 KD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31: 448-456.

20. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *Cell Biol.* 1986; 103(1): 49-62.

21. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33(1): 143-152.

22. Zieske JD, Wasson M. Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *J Cell Sci.* 1993; 106(Pt 1): 145-152.

23. Joseph A, Powell-Richards AOR, Shanmuganathan VA, Dua HS. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88(3): 393-398.

24. Arpitha P, Prajna NV, Srinivasan M, Muthukkaruppan V. High Expression of p63 Combined with a Large N/C Ratio Defines a Subset of Human Limbal Epithelial Cells: Implications on Epithelial Stem Cells Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2005; 46: 3631-3636.

25. Li W, Hayashida Y, Chen YT, He H, Tseng DY, Alonso M, et al. Air exposure induced squamous

metaplasia of human limbal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(1): 154-162.

26. Qia HC, Lia DQ, Shineb DH, Chena Z, Yoona KC, Jonesa DB, et al. Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells. Exp Eye Res. 2008;

86(1): 34-40.

27. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol. 2000; 20(19): 7146-7159.
