

## Role of retinoic acid in neural patterning of mouse embryonic stem cells

Sagha M<sup>1\*</sup>, Esfandiari E<sup>2</sup>, Razavi S<sup>2</sup>, Tanhaee S<sup>3</sup>, Nasr-Esfahani MH<sup>3</sup>, Baharvand H<sup>4,5</sup>

1. Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
2. Department of Anatomical Sciences and Cell Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Department of Cell and Molecular Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
4. Department of Stem cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
5. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

Received: 21 Feb. 2013, Accepted: 29 May 2013

### Abstract

**Background:** Retinoic acid (RA) is a vitamin A derivative and one of the most important inducing signals in vertebrates that is involved in differentiation, morphogenesis, apoptosis, and reproduction. This study was done to evaluate the role of RA in *in vitro* neural patterning of mouse embryonic stem cells (mESCs).

**Materials and Methods:** In this experimental study, upon formation of embryoid bodies (EBs) from mESCs, Royan B1, they were induced by 1  $\mu$ M RA for four days and then plated for eight days. Untreated EBs were considered as the control group. Finally, in both groups, neural induction and patterning of EB-derived neural cells were evaluated by using immunostaining, flowcytometry, and RT-PCR methods.

**Results:** RA induced neurogenesis in ES cells, from which 35% showed to express MAP2. RT-PCR analysis also indicated that RA-treated neural cells derived from ES cells could at the same time express Mash1, Pax6/7, and Dbx1/2 as dorso-ventral (DV) patterning markers and Hoxb4, Hoxc5, and Hoxc8 as the rostro-caudal (RC) axis markers.

**Conclusion:** RA induces *in vitro* neural induction along with neural patterning of ES-derived neural cells in DV and RC axes.

**Keywords:** Mouse embryonic stem cells, neural patterning, retinoic acid

\*Corresponding author:

Address: Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Email: m.sagha@arums.ac.ir

Email: Baharvand@Royaninstitute.org

## نقش اسید رتینوئیک در الگویابی عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش

محسن سقا<sup>1\*</sup>، ابراهیم اسفندیاری<sup>2</sup>، شهناز رضوی<sup>3</sup>، سمیه تنهایی<sup>4</sup>، محمد حسین نصر اصفهانی<sup>5</sup>، حسین بهاروند<sup>6</sup>

1- استادیار، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

2- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

3- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

4- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جانوری رویان، ACECR، اصفهان، ایران

5- دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جانوری رویان ACECR، اصفهان، ایران

6- دانشیار، گروه سلول‌های بنیادی و بیولوژی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری و بیولوژی سلول‌های بنیادی رویان ACECR، تهران، ایران

7- دانشیار، گروه سلول‌های بنیادی و بیولوژی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، ACECR، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/12/02 تاریخ پذیرش: 92/03/08

### چکیده

**زمینه و هدف:** اسید رتینوئیک یکی از مشتقات ویتامین A و یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های القایی در مهره‌داران است که در تمایز، مورفوژنز، آپوپتوز و تولید مثل نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش این ماده در الگویابی عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش در محیط آزمایشگاهی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پس از تشکیل ساختارهای شبه جنینی، از سلول‌های بنیادی جنینی رده Royan B1، اسید رتینوئیک با غلظت یک میکرومول به مدت چهار روز بر ساختارهای شبه جنینی تاثیر داده شد و پس از آن سلول‌ها به مدت هشت روز گسترش داده شدند. محیط کشت سلولی در گروه کنترل فاقد اسید رتینوئیک بود. در پایان کشت، القاء عصبی و الگویابی نورون‌ها در سلول‌های هر دو گروه با روش‌های ایمونوسیتوشیمی، فلوسایتومتری و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** مطالعه حاضر نشان داد که اسید رتینوئیک نورون‌زایی را در سلول‌های بنیادی القا نمود و توانست سبب بروز نشانگر MAP2 در 35 درصد از این سلول‌ها شود. نتایج RT-PCR نیز مشخص کرد که همزمان، نورون‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی تحت تاثیر اسید رتینوئیک توانستند نشانگرهای Pax7، Pax6، Mash1 و Dbx1/2 مربوط به هویت یابی عصبی نورون‌ها در جهت پشتی، شکمی و نیز Hoxb4، Hoxc5 و Hoxc8 مربوط به الگویابی عصبی نورون‌ها حول محور سری، دمی لوله عصبی را بیان نمایند.

**نتیجه‌گیری:** اسید رتینوئیک همزمان با القای عصبی سلول‌های بنیادی جنین موش در محیط آزمایشگاهی قادر به ایجاد هویت عصبی این نورون‌ها نیز می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی جنینی موش، الگویابی عصبی، اسید رتینوئیک

\* **نویسنده مسئول:** اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی

Email: m.sagha@arums.ac.ir

Email: Baharvand@Royaninstitute.org

## مقدمه

اسید رتینوئیک (Retinoic Acid- RA) به عنوان نوعی مورفوژن در مراحل اولیه تکامل سیستم عصبی مرکزی نقش دارد و سبب الگویابی عصبی، تمایز نورونی و رشد آکسونی می‌شود. این مولکول پیام رسان حالت تمایزی نورون‌های بالغ را نیز حفظ می‌کند و چنانچه مسیر پیام‌رسانی آن دچار اختلال شود نورون‌های حرکتی از بین خواهند رفت (1).

به دنبال القای عصبی و تمایز صفحه عصبی از اکتودرم، این صفحه شروع به تا خوردن و تشکیل لوله عصبی می‌کند. همزمان سلول‌های پیش ساز عصبی این لوله حول دو محور سری دمی و پشتی شکمی لوله عصبی الگو می‌یابند و بافت‌های اطراف آن با ترشح مولکول‌های پیام رسان سبب هویت مکانی این سلول‌ها می‌شوند. در محور پشتی شکمی، سلول‌های پیش ساز عصبی به انواع نورون‌های رابط و یک دسته نورون حرکتی تمایز می‌یابند و در محور سری دمی، لوله عصبی به بخش‌های مغز قدامی، مغز میانی، مغز خلفی و نخاع تمایز می‌یابد (2، 3). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مزودرم پاراگزیمال اطراف لوله عصبی با ترشح فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblastic Growth Factor- FGF)، Wnt3a، RA هویت دمی به لوله عصبی در حال تکوین می‌بخشد و باعث شکل‌گیری نورون‌های مغز میانی، مغز خلفی و نخاعی می‌گردد (4، 5). تکوین نورون‌های رابط نیمه پشتی لوله عصبی تحت تاثیر پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (Bone Morphogenic Proteins- BMP) مترشحه از اکتودرم سطحی و صفحه سقفی لوله عصبی و تکوین نورون‌های رابط شکمی و حرکتی نیز تحت کنترل گلیکوپروتئین Sonic Hedge Hog (SHH) مترشحه از نوتوکورد زیر لوله عصبی و رتینوئیدهای حاصل از مزودرم پاراگزیمال طرفین این لوله است (6).

سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های پرتوانی هستند که از جنین قبل از لانه‌گزینی به دست می‌آیند (7). این سلول‌ها واجد دو ویژگی بسیار مهم هستند، اول این که توان نوسازی بسیار بالایی دارند و دوم این که سلول‌های تمایز

نیافته‌ای هستند که توانایی تمایز به لایه‌های جنینی یعنی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را دارند (8). سلول‌های بنیادی جنینی با ایجاد ساختارهای سه بعدی و کروی شکلی به نام اجسام شبه جنینی در اغلب موارد مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی ابعاد مختلف مراحل اولیه تکامل جنینی پستانداران محسوب می‌شوند و ابزار توانمندی را فراهم می‌سازند که می‌توان با استفاده از آنها به مطالعه حوادث مختلف تکوین جنینی و فرآیندهای القا و تخصصی شدن سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن در مراحل اولیه تکوینشان پرداخت (9، 10). در تحقیق گذشته نقش اسید رتینوئیک در القای عصبی سلول‌های بنیادی جنینی بررسی شد (11). در تحقیق حاضر نیز نقش این مولکول در الگویابی عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش مطابق با دو محور سری دمی و پشتی شکمی لوله عصبی مورد ارزیابی قرار گرفت.

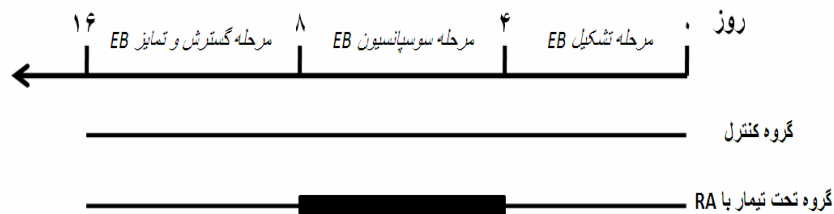
## مواد و روش‌ها

## کشت سلول‌های بنیادی جنینی

در این مطالعه تجربی، تعداد  $3 \times 10^5$  سلول بنیادی جنینی موش دودمان Royan B1 در 37 درجه سانتی‌گراد و 6 درصد  $CO_2$  روی فیبروبلاست‌های جنینی موش تیمار شده با مایتومایسین در محیط-K-DMEM (Gibco, 10829-018) حاوی ES-FCS (Gibco, 16141-079) 15 درصد، 1 میلی‌مولار اسید آمینه غیرضروری (Sigma, M7145)، 0/1 میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانل (Sigma, M7522)، 1 درصد آل‌گلوتامین (Gibco, 25030-024)، 1 درصد پنی سیلین و استرپتومایسین (Gibco, 15140-0148) و LIF 1000 U/ml یا عامل مهارکننده لوسمی (Chemicon, ESGRO, 1107) کشت داده شدند.

جهت تهیه ساختارهای شبه جنینی (Embryoid bodies-EBs) پس از جداسازی سلول‌های ES از سلول‌های فیبروبلاستی، برای تهیه EB به روش توده‌ای تعداد 50000 سلول بنیادی جنینی موشی در محیط کشت K-DMEM، ES-FCS 15 درصد، 1 میلی‌مولار اسید آمینه غیرضروری، 0/1 میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانل، 1 درصد آل‌گلوتامین، 1 درصد پنی سیلین و استرپتومایسین بدون

(شکل 1). در گروه کنترل هیچ گونه RA بر EBS طی مدت سوسپانسیون تاثیر داده نشد. سپس EBS هر دو گروه به مدت 8 روز در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ES-5FCS درصد، گسترش داده شدند (شکل 1) و در نهایت تمایز نورونی و الگوپذیری عصبی EBS هر دو گروه به روش RT-PCR ارزیابی شد.



شکل 1. تصویر شماتیکی از مراحل تشکیل، سوسپانسیون، گسترش و تمایز EBS طی روزهای مختلف در گروه کنترل و گروهی که طی روزهای چهارم تا هشتم (مرحله سوسپانسیون) EBS تحت تیمار با RA قرار گرفتند (مستطیل تیره).

شستشوی EBS گسترش یافته با PBS به کمک آنزیم Trypsin/EDTA این توده‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه تک سلولی شدند و در نهایت پس از تثبیت با پارافرمالدئید 4 درصد و نفوذپذیر شدن با Triton X-100 1 درصد در 4 درجه سانتی‌گراد با Normal goat serum 10 درصد انکوبه شدند. سپس آنتی بادی اولیه MAP2 و آنتی بادی ایزوتایپ کنترل در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت به نمونه‌ها اضافه شدند و در نهایت پس از انکوبه کردن سلول‌ها در آنتی بادی ثانویه رقیق شده FITC نمونه با دستگاه فلوسایتمتری (Becton BD-FACS Calibur (Dickinson, Franklin Lakes, NJ) و با نرم افزار Flomax 2.4e داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند.

#### RT-PCR

کل RNA سلولی از سلول‌های بنیادی جنینی و اجسام شبه جنینی همه گروه‌ها با استفاده از RNeasy Mini Kit (Qiagen, 7410) استخراج شد و پس از تیمار با free DNase (Fermentase) - RNase (EN0521) مطابق با دستورالعمل سازنده reverse RNase H superscript II

حضور LIF به مدت چهار روز در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

#### گسترش و تمایز EB

مطابق با پروتکل 4<sup>-</sup>/4<sup>+</sup> در گروه RA پس از چهار روز تهیه EB (4<sup>-</sup>)، تعدادی از آنها در مرحله سوسپانسیون به مدت 4 روز تحت تاثیر یک میکرومول all-trans RA (Sigma, R2625) در محیط کشت KDMEM حاوی ES-FCS 10 درصد، قرار گرفتند (4<sup>+</sup>)

#### ایمونوسیتوشیمی

EBS پس از تثبیت با پارافرمالدئید 4 درصد، به مدت 25 دقیقه تحت تاثیر Triton X-100 قرار گرفتند. سپس در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 ساعت با 10 normal goat serum (Chemicon CBL600) درصد بلوک شده و به صورت overnight در 4 درجه سانتی‌گراد با آنتی بادی‌های اولیه mouse anti-MAP-2 (Sigma, M1406) و anti-β-tubulin III (Sigma, T8660) پس از شستشو با PBS/Tween20، ساختارهای شبه جنینی به مدت 2 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد در معرض secondary fluorescein-conjugated anti-goat IgG (FITC) (Chemicon AP124F) قرار گرفتند. در نهایت هسته سلول‌ها با PI رنگ شدند و عکس‌های لازم به کمک میکروسکوپ فلوروسنس Olympus مدل BX51 و با نرم افزار Olysia گرفته شد.

#### فلوسایتمتری

بیان نشانگر سلول‌های عصبی یعنی MAP2 توسط فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. پس از

(CinnaGen,R0611) الکتروفورز شدند و باند ایجاد شده به کمک نور UV مشاهده شد. نتایج به دست آمده در تجزیه و تحلیل آماری از سه بار آزمون مستقل از هم این مطالعه، پس از تعیین میانگین  $\pm$  انحراف معیار داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 11/5 و به کمک آزمون تی مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

transcriptase (Fermentase,1622) 1 میکروگرم از RNA توتال برای سنتز cDNA در دمای 42 درجه به مدت 1 ساعت در حجم نهایی 20 میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها و طول قطعات تکثیر یافته در جدول 1 آورده شده است. محصولات PCR بر روی ژل‌های آگاروز 1/5 درصد حاوی اتیدیوم بروماید (0/5  $\mu\text{g/ml}$ )

جدول 1. فهرست پرایمرهای مورد استفاده همراه با دمای اتصال و طول قطعه و تعداد چرخه ها.

ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه (bp)	چرخه ها
Math1	F:AGGGTGAGCTGGTAAGGAGAAG R:GGACAGCTTCTTGTCTGTTGTTG	63	281	36
Mash1	F:GCCAACAAGAAGATGAGCAAGG R:TCAGAACCAGTTGGTAAAGTCCAG	65	264	36
Ngn1	F:CCTGCATCTCTGATCTCGACTG R:TCAATCTTGGTGAGCTTGGTG	64	379	36
Pax7	F:GCTCAGATGTGGAATCAGAACC R:GCTGTCAGAGTAGCTGGAGAAGC	67	488	36
Pax6	F:GAGAGGACCCATTATCCAGATG R:GCTGACTGTTTCATGTGTGTTG	63	467	36
Dbx1	F:CGTTCGCCTTTCCATACTTC R:CGGATTGTCTTCTCCTCATC	55	438	36
Dbx2	F:TGACCCAGGACTCAAATTCC R:CCTGAAGGCTCACTTCTT	55.5	261	36
Irx3	F:CTGGGTCCCTATCCAATGTG R:CGTTTGCCTCTTCCCTCGTC	60.5	539	36
Evx1	F:GATGCTCTGGGTAGCAGTCC R:CATCATGTAGGTGTAGAAGG	60.5	342	36
Evx2	F:CCCTACTGCTGGCAAGAGGTTCTCC R:CGGGTGTGCAGGTTGAACAAAGT	63.5	193	36
Olig2	F:GAACCCGATGATCTTTTCTGC R:CCGTAGATCTCGCTCACCAGTC	63	489	36
Hb9	F:GGCGCTTCCCTACTCATAACC R:TCCTCTCCGCTTCTCCTCAC	64	456	36
Hoxb4	F:CTCCAGTGCAGCCAACAG R:GCGTCAGGTAGCGATTGTAG	54	288	36
Hoxc5	F:CTGCTTGGTAAAGAGGTTGTTGG R:ATTGTGGAAGGCTGGAGAGG	63	459	36
Hoxc8	F:CATCTCCAACCTCGGGCTACC R:CCTTTTCCACTTCATCCTTC	57	422	36
Hoxc10	F:CCTCTGTCCTCCTGTTCTTACC R:GTTATCCGAGGTGCTGGACTG	64	460	36
$\beta$ -tubulin	F:TCACTGTGCCTGAACTTACC R:GGAACATAGCCGTAAACTGC	63	319	25

F= Forward primer

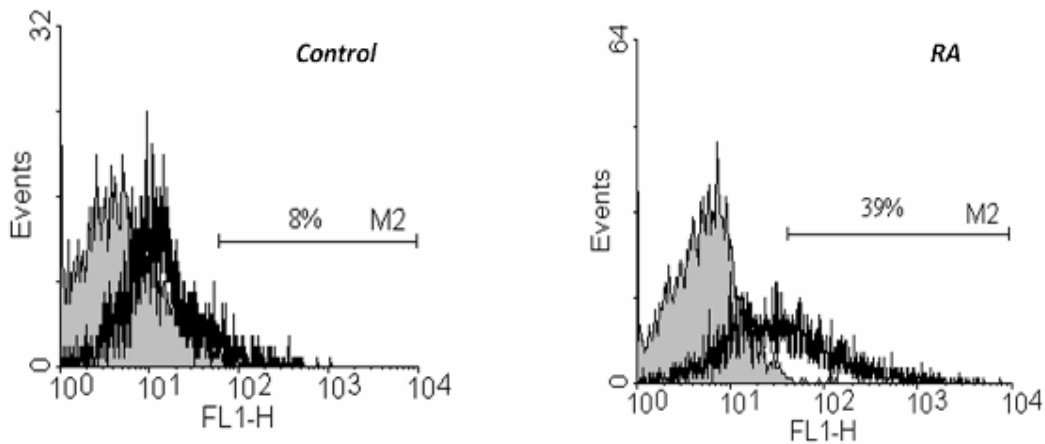
R= Reverse primer

در این مطالعه از غلظت بالای RA ( $10^{-6}$  M) برای ارزیابی پتانسیل القای عصبی EBs حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی موش استفاده شد. بعد از این که EBs به

**یافته‌ها**  
**نقش RA در القای عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش**

تاثیر RA به نوروں تمایز یافتند و نشانگر MAP2 را بیان نمودند در حالی که این میزان در گروه کنترل  $1/1 \pm$   $7/8$  درصد بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $p < 0/01$ ) (شکل 2).

مدت 4 روز تحت تیمار با غلظت بالای RA قرار گرفتند در ظروف کشت حاوی محیط کشت تمایزی گسترش یافتند و توانستند به نوروں تمایز یابند. یافته‌های حاصل پس از انجام فلوسایتومتری نشان داد که به طور متوسط  $4 \pm 35$  درصد از سلول‌های بنیادی جنینی تحت

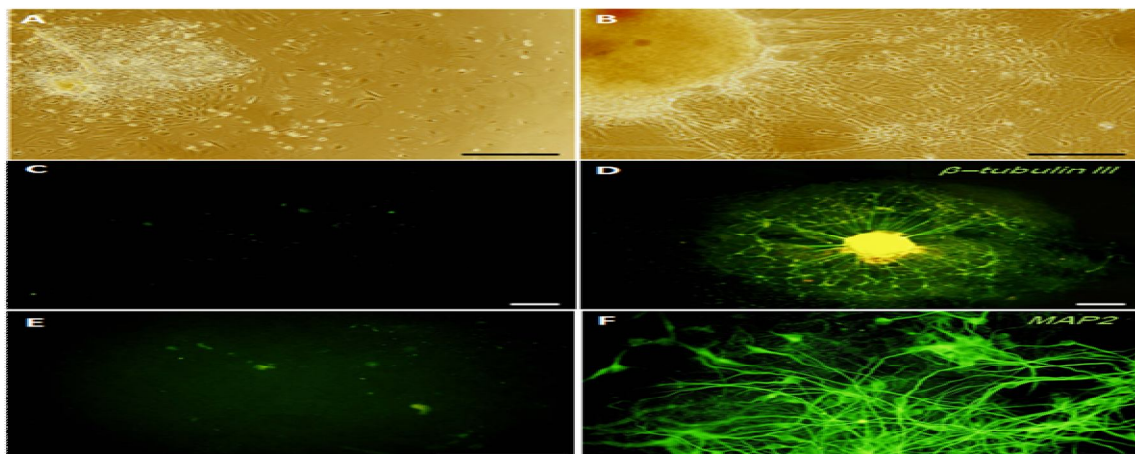


شکل 2. مقایسه درصد نوروں‌های MAP2 مثبت در گروه کنترل و گروه RA با استفاده از روش فلوسایتومتری. در گروه کنترل 8 درصد از سلول‌های بنیادی جنینی موش به نوروں‌های MAP2 مثبت تمایز یافتند در حالی که این میزان در گروه RA 39 درصد بود.

روز کشت به خوبی نشانگرهای خاص نرونی مانند  $\beta$ -Tubulin III و MAP2 را بیان کردند در حالی این دسته از آنتی‌ژن‌ها در گروه کنترل بیان نداشتند (شکل 3).

### بیان آنتی ژن اختصاصی در نوروں‌های حاصل از تمایز EBs

نتایج بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی نشان داد که نوروں‌های حاصل از تمایز EBs در گروه RA پس از 8

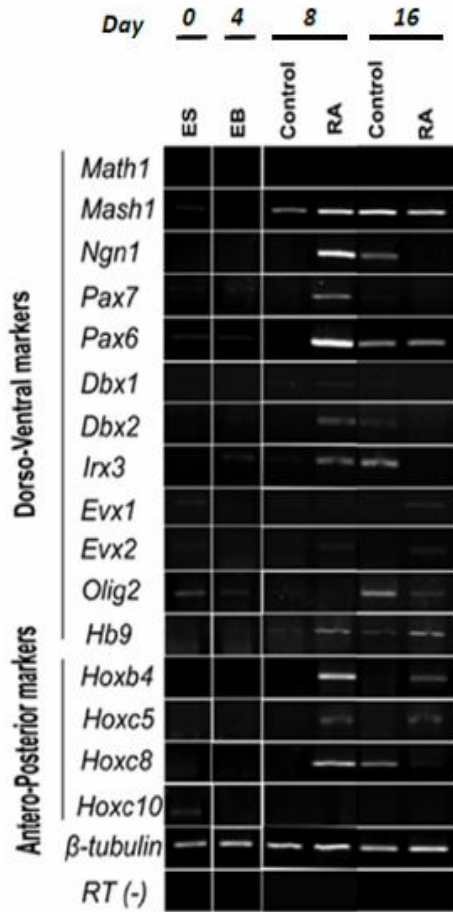


شکل 3. تصویر میکروسکوپ فازکنتراست از سلول‌های بنیادی حاصل از گسترش اجسام شبه رویانی در گروه کنترل و (B) سلول‌های شبه نرونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی تحت تیمار با اسید رتینوئیک. (C, E) تصویر میکروسکوپ فلوروسنس از عدم بیان نشانگر اختصاصی  $\beta$ -tubulin III و MAP2 در سلول‌های بنیادی گروه کنترل و (D, F) بیان این نشانگرها در گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک. Bar=100  $\mu$ m.

## تعیین هویت مکانی نورون‌های حاصل از تاثیر

## اسید رتینوئیک بر سلول‌های بنیادی جنینی به

## روش RT-PCR



در این مطالعه بیان ژن‌هایی که در الگویابی عصبی نورون‌ها نقش داشتند در مراحل مختلف تشکیل، سوسپانسیون و گسترش و تمایز EBs طی روزهای مختلف در دو گروه کنترل و تحت تیمار با RA (شکل 4) به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت انجام این بررسی، قدرت الگویابی ESCs در محور پشتی شکمی و سری دمی لوله عصبی مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی‌های RT-PCR نشان دادند که EBs گروه RA نسبت به گروه کنترل توانستند نشانگرهای مربوط به نورون‌های رابط پشتی (Mash1, Pax7, Ngn1, Dbx2) و شکمی (Dbx1, Irx3, Pax6) و نیز نورون‌های حرکتی (Olig2, Pax6) را در مرحله پیش‌سازی (روزهای 5-8) در محور پشتی شکمی لوله عصبی بیان کنند (شکل 4). در این گروه همچنین ESCs پس از گسترش و تمایز (روزهای 9 تا 16)، نشانگرهای نورون‌های بالغ مربوط به قلمرو نورونی V0 (Evx1/2) را بیان کردند. نورون‌های حاصل از تاثیر RA حتی توانستند نشانگر HB9 را که مربوط به نورون‌های حرکتی بالغ است بیان کنند. نورون‌های حرکتی حاصل از این گروه در طول محور سری دمی نیز تخصص یافته بودند و نشانگرهای مربوط به نورون‌های ناحیه مغز خلفی (Hoxb4)، نورون‌های حرکتی نخاع ناحیه گردنی فوقانی (Hoxc5) را قبل و بعد از گسترش EBs و نورون‌های حرکتی نخاع ناحیه گردنی تحتانی و سینه‌ای فوقانی (Hoxc8) را قبل از گسترش EBs بیان کردند (شکل 4).

شکل 4. بررسی الگویابی عصبی ESCs به روش RT-PCR قبل و بعد از تمایز در گروه‌های مختلف بر اساس بیان ژن‌های مربوط به نورون‌های رابط و حرکتی حول دو محور پشتی شکمی و قدامی خلفی لوله عصبی نخاعی. ESCs پس از تشکیل EB، به مدت 4 روز تحت تیمار با RA قرار گرفتند و سپس به مدت 8 روز گسترش یافتند.

## بحث

نتایج فلوسایتومتری مطالعه حاضر نشان داد که حدود 35 درصد از سلول‌های ESCs توانستند تحت تاثیر RA نشانگر عصبی MAP2 را بیان کنند. در حالی که این میزان در گروه کنترل به مراتب کمتر بود (حدود 8 درصد). این نتایج مشابه با یافته‌های قبلی است که نشان می‌دهند که حدود 37-40 درصد از ESCs تیمار شده با RA به نورون تمایز می‌یابند (12-14). نتایج ایمونوسیتوشیمی نیز این

سیگنال‌های القایی در این زمینه نقش دارند. ممکن است RA و پیام‌رسانی BMP در این زمینه نقش داشته باشد (17) چرا که در غیاب RA قلمرو بیان ژن‌هایی که باعث استقرار الگوی پشتی نورون‌ها می‌شود کاهش می‌یابد (3). در مطالعه حاضر نیز علاوه بر Mash1، Ngn1/2، Pax7، Dbx2 نیز بیان خوبی را در گروه RA نشان داد. این نتایج با یافته‌های پیرانی و همکارانش هم‌خوانی دارد که نشان دادند RA با تاثیر بر بافت عصبی جدا شده از ناحیه میانی محور D-V لوله عصبی سبب بیان نشانگرهای Pax7 و Dbx1/2 می‌شود (18). بنابر این ممکن است RA به تنهایی در تخصص‌یابی پشتی پیش‌سازهای نورونی رابط پشتی و شکمی فوقانی (dp4-Vp1) نقش داشته باشد.

از طرف دیگر، اسید رتینوئیک در القای دسته‌ای از نورون‌های رابط شکمی و تخصص‌یافتگی نورون‌های حرکتی نیز نقش دارد. نوروبلاست‌های موجود در ناحیه شکمی نخاع ژن‌های کلاس I (Pax7، Dbx1/2، Irx3، Nkx6.2، Nkx6.1، Olig2، II) و کلاس II (Nkx2.2) را بیان می‌کنند و بیان این ژن‌ها بستگی به شیب غلظتی Shh مترشح از نوتوکورد و صفحه کفی لوله عصبی دارد (4، 19). در تحقیق حاضر مشخص شد که RA توانست سبب القای بیان ژن‌های کلاس I در ESCs گردد در حالی که ژن Olig2 در این گروه در روز هشتم بیان نشدند. این نتایج مشابه با یافته‌های اوکادا بر روی ESCs و پیرانی در جنین جوجه بود. آنها نشان دادند در حضور غلظت بالای RA ژن‌های کلاس I بیان خوبی را خواهند داشت در حالی که ژن‌های کلاس II بیان نمی‌شوند (18، 20). نتایج حاصل از RT-PCR در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که RA نقش پشتی‌کننده بر روی ESCs دارد چرا که توانسته است باعث بیان ژن‌های کلاس I و نیز Evx 1/2 گردد که در نورون‌های رابط شکمی منطقه V0 بیان می‌شود. بنابر این، بیان این نشانگرها در روز شانزدهم و به دنبال ظهور و گسترش نورون‌ها، تاثیر RA را در القای شکل‌گیری نورون‌های رابط شکمی V0 تأیید می‌کند.

یافته‌ها را تأیید نمود و نشان داد که سلول‌های نورونی موجود در RA توانستند نشانگرهای عصبی MAP2 و  $\beta$ tubulin III را بیان کنند.

در مطالعه حاضر ارزیابی نسبتاً جامعی از نقش RA در تخصص‌یافتگی عصبی ESCs در محور D-V بر اساس تکنیک RT-PCR صورت گرفت و برای این کار بیان ژن‌های Mash1، Math1، Ngn1، Pax6، Pax7، Pax6، Olig2، Irx3، Dbx1/2 به عنوان نشانگرهای عصبی نورون‌های رابط و حرکتی در مرحله پیش‌ساز عصبی ژن‌های Evx1/2 و Hb9 به عنوان نشانگرهای عصبی نورون‌های رابط و حرکتی در مرحله بالغ (15، 16) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که پس از 4 روز تیمار ESCs با اسید رتینوئیک نشانگر Math1 در این سلول‌ها همانند سلول‌های گروه کنترل در روز هشتم (پس از 4 روز سوسپانسیون) بیان نشد در عوض ژن‌های Mash1، Ngn1، Pax7 نسبت به گروه کنترل بیان خوبی داشتند. این ژن‌ها در نورون‌های رابط پشتی قلمرو dp1-dp3 لوله عصبی تحت تاثیر مولکول‌های BMP و Wnt مترشح از اکتودرم سطحی و صفحه سقفی لوله عصبی بیان می‌شوند (15).

بیان فاکتورهای رونویسی Mash1، Ngn1، Pax7 و Pax6 پس از 8 روز گسترش سلول‌های پیش‌ساز عصبی کاهش یافت و یا متوقف شد. تضعیف بیان این دسته از ژن‌ها به دلیل تمایز نورونی سلول‌های پیش‌ساز عصبی است که از مرحله پیش‌سازی عبور کردند و به نورون‌های بالغ تبدیل شدند. یافته‌های فلوسایتومتری و افزایش سلول‌های MAP2 مثبت در ESCs تمایز یافته حاصل از تاثیر RA در مرحله گسترش و تمایز صحت این ادعا را به اثبات می‌رساند. نورون‌های رابط پشتی قلمروهای dp4-dp6 نیز ژن‌های Mash1، Ngn1/2، Pax7 و Dbx2 را بیان می‌کنند. با این حال هنوز مشخص نیست که تخصص‌یافتگی این دسته از نورون‌ها در جنین پرندگان و پستانداران با چه مکانیسمی صورت می‌گیرد و آیا این جمعیت‌های نورونی به طور محتوم تمایز می‌یابند و یا



باربری، میزوسکی و رنونکورت به طور جداگانه نشان دادند که با استفاده از RA می‌توان سلول‌های بنیادی را به سمت نورون‌های حرکتی و نورون‌های رابط گابارژیک هدایت نمود (23-21). نتایج تحقیق ما نشان داد که RA نتوانست سبب القای Olig2 به عنوان نشانگر سلول‌های پیش‌ساز نورون‌های حرکتی در ESCs گردد. بررسی‌های صورت گرفته بر روی بافت جدا شده از محور D-V لوله عصبی جنین جوجه و نیز EBs حاصل از ESCs نشان می‌دهند که RA به تنهایی قادر به القای بیان این دسته از ژن‌ها نیست و برای بیان آنها حضور Shh نیز در محیط کشت لازم است. حضور توام این دو ماده در محیط کشت میزان حضور سلول‌های Olig2 را در بافت بخش میانی از محور D-V لوله عصبی از 60 درصد به 85 درصد افزایش می‌دهد دلیل این امر مهار FGF توسط RA است که به دنبال آن اثر مهاری FGF بر Shh برداشته می‌شود و در نهایت تحت تاثیر Shh ژن‌های کلاس II از جمله Olig2 بیان خوبی را خواهند داشت (26-24). بیان ضعیف Olig2 در سلول‌های گروه RA مطالعه ما مشابه با نتیجه اوکادا و همکارانش بود که نشان دادند در EBs که با غلظت بالای RA تیمار شده‌اند بعد از 6 روز بیان این ژن‌ها به شدت کاهش یافت (20). این نتایج با یافته‌های حاصل از انجم شعاع و همکارانش نیز هم‌خوانی دارد، چرا که آنها نیز نشان دادند Olig2 در EBs تحت تیمار با RA در مرحله سوسپانسیون بیان نمی‌شوند (14). به هر حال، پس از 8 روز گسترش EBs این ژن تا حدی در گروه RA بیان شد هر چند بیان آن بسیار ضعیف‌تر از گروه کنترل بود.

برخلاف نشانگر پیش‌ساز نورون‌های حرکتی (Olig2)، EBs گروه RA فاکتور رونویسی Pax6 را به شدت بیان کردند. از طرف دیگر این توده‌های سلولی فاکتور Hb9 را که نشانگر نورن‌های حرکتی محسوب می‌شود هم در مرحله سوسپانسیون و هم پس از گسترش بیان کردند.

مور با مطالعه جنین جوجه به این نتیجه رسید که بافت عصبی که در ابتدا در جنین بوجود می‌آید ویژگی‌های

نورون‌های سری (مغز قدامی) دارد و سلول‌های عصبی حاصل تحت تاثیر فاکتورهایی مانند RA ویژگی‌های نورون‌های خلفی لوله ی عصبی (شامل مغز میانی، مغز خلفی و طناب نخاعی) را کسب می‌کنند (27). از طرف دیگر، نقش RA را در القای عصبی نمی‌توان به آسانی از نقش آن در کودالیزه کردن سلول‌های عصبی جدا کرد به این دلیل که این دو پدیده در محیط بدن همزمان تحت تاثیر RA روی می‌دهند (26، 28). همچنین لیو و همکارانش نشان دادند زمانی که EBs با غلظت بالای RA تیمار شوند ژن‌های بخش قدامی نخاع بیان می‌شوند (29). در تحقیق حاضر مشخص شد علاوه بر القای بیان نشانگر Hb9 و تشکیل نورون‌های حرکتی، RA بیان ژن‌های Hoxb4، Hoxc5 و Hoxc8 را القاء نمود و بدین وسیله سبب هدایت تمایز نورون‌های حرکتی به سمت تشکیل نورون‌های حرکتی بخش خلفی مغز پسین و ناحیه گردنی فوقانی نخاع شد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که RA در تعامل با FGF و GDF11 پروفایل فضایی ژن‌های Hoxc را پایه‌ریزی می‌کند، به طوری که در حضور شیب غلظتی بالای RA و مقادیر کم FGF سلول‌های عصبی بخش خلفی مغز پسین Hoxb4 را بیان می‌کنند و نورون‌های حرکتی ناحیه گردنی نخاع نیز به بیان Hoxc5 و Hoxc8 می‌پردازند. این نحوه بیان ژن‌های Hoxc در نهایت سبب تخصص یافتگی عصبی نورون‌های حرکتی در طول محور سری دمی لوله عصبی می‌گردد (27، 29). عدم بیان Hoxc10 در تحقیق حاضر نیز نشان داد که RA در تمایز نورن‌های حرکتی سینه‌ای نقشی نداشت چرا که بیان این دسته از نورون‌ها وابسته به حضور FGF می‌باشد (27، 29). در مجموع می‌توان اذعان داشت که RA توانست در القای نورون‌های حرکتی از سلول‌های بنیادی جنینی و تمایز آنها به تاثیر به سزایی را نشان دهد.

### نتیجه گیری

اسید رتینوئیک همزمان با القای عصبی سلول‌های بنیادی جنین موش در محیط آزمایشگاهی قادر به ایجاد

8. Sato M, Nakano T. Embryonic stem cell. *Internal medicine* (Tokyo, Japan). 2001;40(3):195.
9. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Experimental physiology*. 2000;85(6):645-51.
10. Salehi H, Karbalaie K, Razavi S, Tanhaee S, Nematollahi M, Sagha M, et al. Neuronal induction and regional identity by co-culture of adherent human embryonic stem cells with chicken notochords and somites. *International journal of developmental biology*. 2011;55(3):321-6.
11. Sagha M, Esfandiari E, Razavi S, Karbalaie K, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. Neuronal Induction of Mouse Embryonic Stem Cells Following Co-culture with Chick Embryonic Somites. *J Iran Anat Sci*. 2008;21(22):231-43.
12. Du Z-W, Zhang S-C. Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem cells and development*. 2004;13(4):372-81.
13. Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Owensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal interneurons. *The FASEB journal*. 2005;19(2):252-4.
14. Anjomshoa M, Karbalaie K, Mardani M, Razavi S, Tanhaei S, Nasr-Esfahani MH, et al. Generation of motor neurons by coculture of retinoic acid-pretreated embryonic stem cells with chicken notochords. *Stem cells and development*. 2009;18(2):259-68.
15. Helms AW, Johnson JE. Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current opinion in neurobiology*. 2003;13(1):42-9.
16. Wilson L, Gale E, Chambers D, Maden M. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Developmental biology*. 2004;269(2):433-46.
17. Lewis KE. How do genes regulate simple behaviours? Understanding how different neurons in the vertebrate spinal

هویت در این سلول‌های عصبی به صورت نورون‌هایی با هویت نورون‌های رابط V0 و نیز نورون‌های حرکتی مغز پسین و گردنی نخاع می‌باشد (الگویابی همزمان در دو محور سری دمی و پشتی شکمی لوله عصبی).

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از منابع مالی موسسه رویان انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از موسسه رویان به عمل می‌آورند.

### منابع

1. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(10):755-65.
2. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental biology*. 2005;282(1):1-13.
3. Zhuang B, Sockanathan S. Dorsal-ventral patterning: a view from the top. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(1):20-4.
4. Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature Reviews Genetics*. 2000;1(1):20-9.
5. Vieira C, Pombero A, García-López R, Gimeno L, Echevarria D, Martínez S. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *International journal of developmental biology*. 2010;54(1):7-20.
6. Poh A, Karunaratne A, Kolle G, Huang N, Smith E, Starkey J, et al. Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *International journal of developmental biology*. 2002;46(4):597-608.
7. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.

23. Renoncourt Y, Carroll P, Filippi P, Arce V, Alonso S. Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mechanisms of development*. 1998;79(1):185-97.
24. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002;110(3):385-97.
25. Appel B, Eisen JS. Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron*. 2003;40(3):461-4.
26. Novitsch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron*. 2003;40(1):81-95.
27. Muhr J, Graziano E, Wilson S, Jessell TM, Edlund T. Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*. 1999;23(4):689-702.
28. Del Corral RD, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*. 2003;40(1):65-79.
29. Liu J-P, Laufer E, Jessell TM. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron*. 2001;32(6):997-1012.
- cord are genetically specified. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361(1465):45-66.
18. Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell TM. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell*. 1999;97(7):903-15.
19. Min TH, Kriebel M, Hou S, Pera EM. The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. *Developmental biology*. 2011;358(1):262-76.
20. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental biology*. 2004;275(1):124-42.
21. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature biotechnology*. 2003;21(10):1200-7.
22. Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(10):5828-33.