مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سوم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۸۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III و بررسی اثر فاکتورهای رشد بر آن

دکتر حسن نیک‌نژاد*، دکتر حبیب‌الله پیروی**، بهرام جامبر نوشین***، دکتر ابوالحسن احمدیانی****، دکتر جلال غنوی*****، دکتر معصومه جرجانی******

*استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
**استاد جراحی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
***کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
****استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
*****استادیار جراحی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
******استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی فاکتورهای رشد متعددی به کار برده شده است. بسیاری از خصوصیات سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی مشابه سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد، بنابراین در صورتی‌که فاکتورهای رشد مذکور دارای اثر مشابهی بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی باشند، می‌توان از آن‌ها به عنوان یک جایگزین برای سلول‌های بنیادی جنینی استفاده نمود. این مطالعه با هدف تعیین تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III و بررسی اثر فاکتورهای رشد بر آن انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی با استفاده از فاکتورهای رشد رتینوئیک اسید (RA) و bFGF بررسی گردید، و نشان‌گر β-tubulin III با روش ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین اثر مهار سیگنالینگ Bone Morphogenetic Protein (BMP) توسط Noggin بر میزان تمایز سلول‌های عصبی از سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی بررسی شد. به همین منظور، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی از پرده آمنیون جداسازی و به مدت ۵ روز در پتری دیش‌های باکتریال رشد داده شد، تا به هم بچسبند، سپس سلول‌های به هم چسبیده از هم جدا شده و به دیش‌های کشت سلول (Adherent Culture Dish) منتقل گردید و به مدت ۷ روز در معرض Noggin و bFGF قرار گرفتند. در نیمی از محیط‌های کشت bFGF حذف و RA به آن‌ها اضافه شده و کشت‌ها به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد (Tukey Post-Test) و تفاوت‌هایی که مقادیر کمتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که در همه محیط‌های کشت که به همراه Noggin بودند، سطوح بالاتری از β-tubulin III در مقایسه با محیط‌های کشت فاقد آن بیان شد. ترکیب bFGF و RA بالاترین سطوح β-tubulin III را هم در کشت‌های حاوی Noggin و هم فاقد Noggin نشان داد. قطع bFGF (Withdrawal) نه تنها بروز β-tubulin III را افزایش نداد؛ بلکه حفظ آن باعث افزایش β-tubulin III گردید.

نتیجه‌گیری: سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی توانایی تمایز به سلول‌های عصبی را دارند و این توانایی تحت تأثیر فاکتورهای Noggin، bFGF، RA قرار می‌گیرد.

کلید واژه‌ها: آمنیون؛ سلول‌های اپی‌تلیال؛ پروتئین نوگین؛ bFGF؛ ترتینیون؛ بتا توبولین III.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸ پست الکترونیکی: niknejad@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۲۱

مقدمه

بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی (Neurodegenerative Diseases) باعث از بین رفتن تدریجی سلول‌ها و در نتیجه کاهش تعداد سلول‌های کارآمد در ناحیه خاصی از سیستم عصبی می‌شوند. برای بهبود کامل بیماری، سلول‌های باقی‌مانده باید عملکردی برابر با سلول‌های اولیه داشته باشند. اگرچه این امر در شروع بیماری با روش‌های مختلف درمانی امکان‌پذیر است، اما در مراحل پیشرفته که توده سلولی به شدت کاهش می‌یابد، تحقق این هدف کار آسانی نیست. بنابراین یکی از چشم‌اندازهای جدید در درمان این بیماری‌ها، درمان بر پایه جایگزینی سلول (Cell Replacement Therapy) استوار گردیده و مطالعات زیادی در این زمینه در حال انجام است (۱). در همین راستا یکی از زمینه‌های تحقیقاتی جالب توجه، استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) می‌باشد. ESCs توانایی نامحدود تکثیر (Self-Renewal) در محیط In Vitro را دارند؛ در حالی‌که خصوصیت پرتوان بودن (Pluripotency) در این سلول‌ها حفظ می‌شود (۲). علی‌رغم همه مزایای ESCs، این سلول‌ها محدودیت‌های بسیار زیادی در استفاده بالینی دارند. این محدودیت‌ها شامل تومورزایی، رد پیوند در صورت استفاده به صورت آلوگرافت و موانع اخلاقی مربوط به تخریب جنین است که بحث استفاده از منابع جایگزین به جای ESCs را مطرح می‌نماید (۱). سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی (AECs) که از داخلی‌ترین لایه پرده آمنیون به دست می‌آیند، با داشتن چندین خصوصیت می‌توانند به عنوان جایگزین مناسبی برای ESCs به کار برده شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که AECs نشان‌گرهای سطحی وابسته به ESCs مانند SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 را بیان می‌کنند. این سلول‌ها دارای نشان‌گر فاکتورهای رونویسی مخصوص سلول‌های بنیادی پرتوان مانند Oct-4 و Nanog نیز هستند (۳،۲). با این‌که نشان داده شد که AECs پرتوان هستند، ولی در صورت پیوند به موش‌های SCID تراتوما ایجاد نمی‌کنند (۵،۴). هم‌چنین مشخص گردیده است که AECs ایمونوژنیسیته اندک دارند که باعث کاهش خطر رد پیوند می‌شود (۱). علاوه بر این، آمنیون به عنوان یک عضو دور انداختنی پس از سزارین، مشکلات اخلاقی مربوط به ESCs را به همراه نخواهد داشت. این ویژگی‌ها باعث می‌گردد؛ تا از AECs به عنوان یک منبع جایگزین برای ESCs در درمان بر پایه جایگزینی سلول استفاده شود، به شرطی که بتوان آن‌ها را به سلول‌های مورد نیاز تمایز داد (۴). اساس تمایز عصبی در ESCs، حذف سرم و bFGF به همراه برخی تغییرات دیگر می‌باشد که در این مطالعه به عنوان الگو استفاده شده است (۶). در الگوی تمایز سلول‌های عصبی از ESCs، القای تمایز با استفاده از فاکتورهای تمایزی مانند رتینوئیک اسید (RA) و bFGF انجام می‌گردد. RA یک نقش اساسی در تکامل سیستم عصبی مرکزی دارد، و باعث رشد و تکثیر سلول‌های عصبی می‌شود (۷). bFGF در سیستم عصبی به میزان زیادی بیان شده و برای رشد و تکامل کورتکس لازم و ضروری به نظر می‌رسد (۸). این موارد بیان‌گر این است که در تمایز سلول‌های عصبی تعامل بین bFGF و RA به عنوان فاکتوری تعیین‌کننده و مهم باید مورد بررسی قرار گیرد (۹). سایر القاکننده‌ها نیز در تمایز عصبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از این عوامل به وسیله مهار سیگنالینگ BMP (Bone Morphogenetic Protein) تمایز عصبی را اعمال می‌کنند (۱۰). نشان داده شده است که BMP2 نقش مهمی در تمایز ESCs به اندودرم خارج جنینی دارد (۱۱) و از تمایز سلول‌ها به سلول‌های نورواکتودرمی جلوگیری می‌نماید (۱۳،۱۲). از سوی دیگر در Xenopus، BMP4 از تمایز سلول‌های اکتودرمی به سلول‌های عصبی پیشگیری می‌کند و باعث تحریک تمایز به سلول‌های اپیدرمی می‌شود (۱۴،۱۰). از آن‌جایی‌که AECs پرتوان هستند و می‌توانند به سلول‌های هر سه رده جنینی تمایز یابند (۱)، بنابراین در این مطالعه، مهار سیگنالینگ BMP به وسیله Noggin به عنوان یک محرک در تمایز AECs به سلول‌های عصبی مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، اثرات RA و bFGF و هم‌چنین قطع bFGF بر میزان بیان β-tubulin III به صورت In Vitro بررسی گردید؛ تا مشخص گردد که نوع پاسخ‌دهی AECs مشابه با ESCs می‌باشد و یا نوع پاسخ متفاوت خواهد بود؟

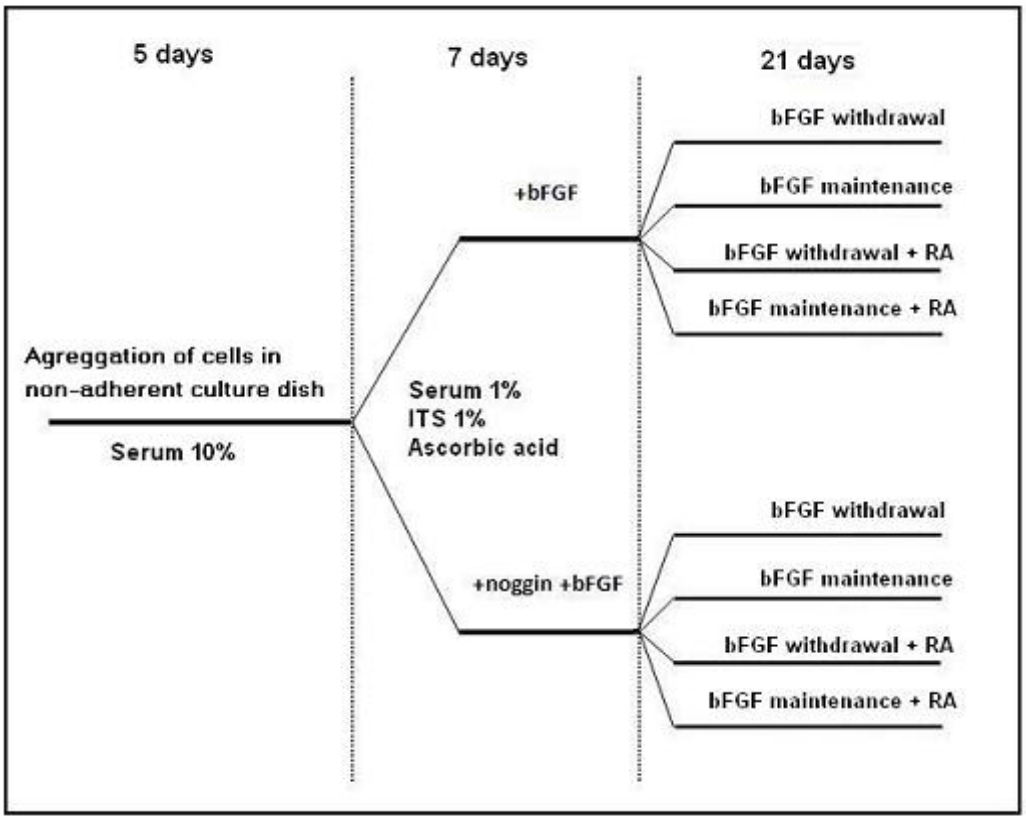
روش بررسی

برای آماده‌سازی پرده آمنیون انسانی، بافت‌های جفت (Placenta) از بیمارستان میرزاکوچک‌خان تهیه گردید. برای این منظور تنها از مواردی استفاده شد که بارداری طبیعی بوده و سزارین‌ها به

صورت انتخابی (Elective) انجام شده بودند و هفته بارداری بین ۳۲ تا ۳۶ هفتگی بود. آزمایش‌های سرولوژیک برای ویروس‌های HIV، هپاتیت B و C و سفلیس برای تمام موارد قبل از سزارین انجام گردید. هرچند جفت یک بافت دور انداختنی است، ولی اطلاعات لازم در زمینه استفاده از این بافت در اختیار کلیه خانواده‌ها قرار گرفت. بافت‌ها پس از خارج شدن در بافر فسفات سالین (PBS) حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نئومایسین و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین B قرار داده شد، و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید (۲). همه مراحل در شرایط استریل و در آزمایشگاه زیر هود انجام شد. سپس پرده آمنیون به روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جداسازی شده و چندین بار با PBS سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شد، تا اثری از لکه‌های خون بر روی آن باقی نماند. برای جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی (۲)، پرده آمنیون به چند تکه کوچک‌تر تقسیم شده و برای هضم آنزیمی در محلول ۰/۱۵٪ EDTA-Trypsin قرار گرفت. از این مرحله به بعد، کلیه کارها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. مواد حاصل از ۱۰ دقیقه اول هضم آنزیمی که بیشتر زواید حاصل از پرده آمنیون بودند؛ دور ریخته شد و محلول حاصل از هضم آنزیمی دوم و سوم که هرکدام ۴۰ دقیقه طول کشید به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و سلول‌های حاصل جمع‌آوری گردید. برای غیرفعال کردن آنزیم، سلول‌ها با سرم جنینی گاوی شتستشو شد و سپس سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 (Sigma) به همراه ۱۰٪ FCS در فلاسک‌های ۲۵ سی‌سی به تعداد ۱۰×۱۰^{۴} تا ۸ در شرایط ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO2 در انکوباتور گذاشته شد. در محیط کشت سلول‌ها علاوه بر سرم، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد EGF (Sigma) و ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین- استرپتومایسین، ۲ میلی مولار L-glutamine، ۱٪ اسید آمینه‌های غیرضروری، ۵۵ میکرومولار 2-Mercaptoethanol و ۱ میلی مولار پیرووات سدیم اضافه گردید. این محیط کشت به عنوان محیط کشت استاندارد در تمامی مراحل تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. شمارش سلول‌ها با لام نئوبار انجام شد و برای حصول اطمینان از درصد سلول‌های زنده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو استفاده گردید. خلوص سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی جدا شده به وسیله ایمونوسیتوشیمی برای مارکر اپی‌تلیالی Pan-Cytokeratin مشخص شد (۲). آنتی‌بادی اولیه برای Pan-Cytokeratin (Sigma;1:200) از نوع Mouse Anti Pan-Cytokeratin و آنتی‌بادی ثانویه از نوع Goat Anti-Mouse IgG (Chemicon; 1:100) کونژوگه شده با Rhodamine استفاده گردید.

القای تمایز اولیه از طریق تماس سلول‌ها (Cell-Cell Contact): در طول ۳ روز پس از شروع کشت، سلول‌ها به بیش از ۹۰٪ Confluency رسیدند. سپس سلول‌ها با استفاده از HBSS (Ca^{2+}-Mg^{2+}-Free Hank's Balanced Salt Solution) جداسازی و به دیش‌های باکتریولوژیکی غیرچسبان (Non-Adherent Bacteriological Dishes) منتقل گردیده و به مدت ۵ روز در محیط کشت استاندارد و در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از ۵ روز سلول‌های موجود در تجمعات سلولی توسط پیپت پاستور کشیده شده (Fire-Drawn Pipette Pasteur) جداسازی گردیدند و در دیش‌های ۲۴ خانه پوشیده با ژلاتین ۲٪ به تعداد ۲×۱۰^{۴} کشت داده شدند.

القای تمایز به سلول‌های عصبی: به محیط کشت استاندارد، ۱٪ انسولین- ترانسفرین- سلنیم (ITS) و ۲ میلی مولار اسید اسکوربیک و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF اضافه گردید. میزان سرم (FCS) از ۱۰٪ به ۱٪ کاهش داده شد. حذف سرم در این مرحله به عنوان یکی از القاکننده‌های عصبی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نیمی از محیط کشت‌ها ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Noggin افزوده شد. پس از ۷ روز کشت، به منظور تمایز نهایی، در برخی از کشت‌ها bFGF حذف گردید (bFGF Withdrawal) و اجازه داده شد تا سلول‌ها به مدت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز تمایز یابند. در این مدت در هر دو گروه Noggin و Noggin free، نیمی از محیط کشت‌ها در معرض ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید (RA) قرار گرفتند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز تعویض گردید. روز حذف bFGF، به عنوان روز 0 (D0) در نظر گرفته شد. طرح شماتیک پروتکل القایی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی در شکل شماره ۱ آورده شده است (۶).



شکل شماره ۱: شکل شماتیک تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III و نشان دادن گروه‌های مورد مقایسه.

آنالیز خصوصیات سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی توسط بررسی میزان بیان پروتئین به وسیله ایمونوسیتوشیمی (ایمونوفلورسنت) انجام گردید. برای این منظور از β-tubulin III به عنوان مارکر سلول‌های عصبی استفاده شد. آنتی‌بادی اولیه برای β-tubulin III (Sigma;1:100) از نوع Anti β-Mouse tubulin III و آنتی‌بادی ثانویه از نوع Goat Anti-Mouse IgG (Chemicon; 1:100) کونژوگه شده با FITC استفاده شد.

مراحل انجام ایمونوسیتوشیمی: از آن‌جایی که در این تحقیق از میکروسکوپ فلورسنت معکوس (NIKON) استفاده شد، بنابراین مراحل ایمونوسیتوشیمی به طور مستقیم در کف دیش‌ها انجام گرفت. برای انجام ایمونوسیتوشیمی مراحل زیر به ترتیب انجام گردید. Medium به آرامی از دیش‌ها خارج و کف دیش‌ها ۲ بار با PBS شسته شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه پارافرمالدئید (PFA) ۴٪ به دیش‌ها اضافه گردید و پس از شستشوی مجدد به مدت ۳۰ دقیقه اسید کلریدریک ۲ نرمال به دیش‌ها افزوده شد. بعد از خارج کردن HCL، بافر بورات به مدت ۱۰ دقیقه به دیش‌ها اضافه گردید و پس از شستشو با PBS، مخلوطی از ۰/۳٪ Triton-X و ۱۰٪ Goat Serum با نسبت ۱:۱ به مدت ۳۰ دقیقه روی سلول‌ها قرار گرفت. پس از تکرار شستشو با PBS، آنتی‌بادی اولیه با رقّت مناسب به نمونه‌ها اضافه شد و یک شب در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید. پس از خارج کردن آنتی‌بادی اولیه، نمونه‌ها ۳ تا ۵ بار با PBS شستشو داده شدند وآنتی‌بادی ثانویه با رقّت مناسب به نمونه‌ها افزوده شد و در نهایت پس از شستشوی نهایی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ معکوس فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت (۴).

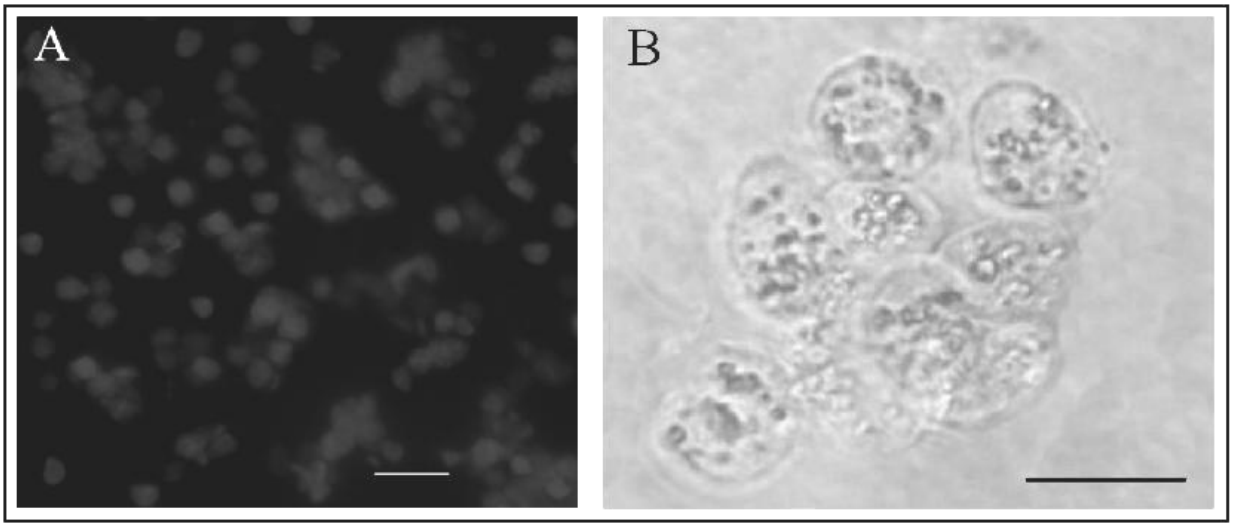
تجزیه و تحلیل آماری: تعداد سلول‌ها به صورت تصادفی در ۸ تا ۱۰ فیلد شمارش شد و نتایج به صورت Mean±SEM گزارش گردید. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد (Tukey Post-Test) و تفاوت‌هایی که مقادیر کمتر از ۰/۰۵ داشتند؛ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

بررسی زنده بودن سلول‌ها با تریپان بلو نشان داد که پس از جداسازی سلول‌ها از بافت بیش از ۹۲ تا ۹۵٪ سلول‌ها زنده‌اند.

میزان زنده بودن سلول‌ها طی مراحل جداسازی به غلظت آنزیم EDTA-Trypsin و مدت زمان و سرعت سانتریفیوژ و میزان تازگی بافت مورد استفاده بستگی داشت. ۳ روز پس از کشت سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی دو رده سلولی به طور کامل قابل شناسایی بود. رده اول سلول‌ها که بر روی محیط کشت شناور بوده و یا به کف فلاسک چسبندگی ضعیفی داشتند، به طوری که با تکان دادن فلاسک به آرامی از جایشان حرکت می‌کردند. این سلول‌ها بیشتر به شکل گرد مشاهده شدند. رده دوم سلول‌هایی را شامل می‌شد که به کف فلاسک چسبیده و تغییرات مورفولوژیکی در آن‌ها مشاهده گردید و دارای شکل‌های متفاوت گرد، هرمی و چند وجهی بودند. از آن‌جایی که نشان داده شده است که سلول‌های رده اول نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی را به میزان بیشتری بیان می‌کنند، این رده از سلول‌ها جداسازی شد و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. کلیه سلول‌های جداسازی شده با نشان‌گر Pan-Cytokeratin واکنش نشان دادند که مشخص‌کننده اپی‌تلیالی بودن این سلول‌ها و عدم آلودگی با سلول‌های مزانشیمال پرده آمنیونی می‌باشد (شکل شماره ۲، A).

برای بررسی القای تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از طریق تماس سلول‌ها با یکدیگر (Cell-Cell Contact) سلول‌ها به دیش‌های باکتریولوژی منتقل شدند و با دانسیته و تعداد سلول بالا در حجم معین از نظر تشکیل اجسام شبه‌جنینی (Embryoid Bodies) مورد بررسی قرار گرفتند. علی‌رغم ایجاد تجمعات ۴ تا ۵ سلولی اثری از تشکیل جسم شبه‌جنینی دیده نشد (شکل شماره ۲، B). در بعضی از موارد تماس بین سلول‌ها در شرایط ذکر شده تا ۱۰ روز هم ادامه یافت، ولی تغییری در ساختار تجمعات سلولی مشاهده نگردید. اگرچه روش ذکر شده و پروتکل القای تمایز از طریق تماس سلول‌ها با یکدیگر منجر به ایجاد اجسام شبه جنینی نشد (به دلیل عدم ایجاد پولاریته سلولی)، ولی از پروسه تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی حذف نگردید و علت آن ایجاد چسبندگی سلولی بود که در ادامه توضیح داده خواهد شد.



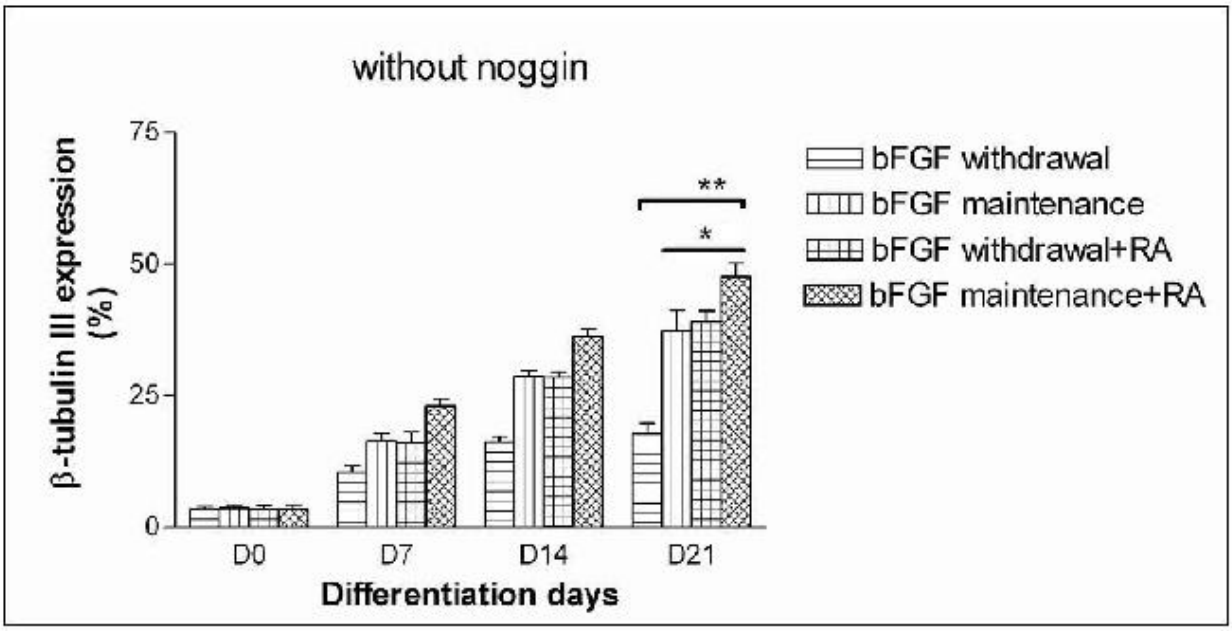
شکل شماره ۲ (شکل 2A): واکنش آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با رودامین با آنتی‌بادی اولیه علیه Pan-Cytokeratin نشان می‌دهد که سلول‌های جداسازی شده، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون هستند. (شکل 2B): علی‌رغم تجمعات سلولی ۵ تایی و بیشتر در محیط کشت غیرچسبان، اثری از تشکیل اجسام شبه‌جنینی دیده نشد (Scale bar = 50µm).

برای بررسی تمایز بر روی ماتریکس ژلاتینی، سلول‌های موجود در تجمعات سلولی توسط پیپت پاستور از هم جداسازی شد و به پلیت‌های پوشیده شده با ژلاتین منتقل گردید. سلول‌ها پس از جداسازی، چسبندگی مناسبی به ماتریکس داشتند، به طوری‌که پس از ۴ ساعت تقریباً تمامی سلول‌ها به ماتریکس چسبیده بودند. معیار چسبندگی فقط به صورت مشاهده با میکروسکوپ بود و روش‌های تکمیلی دیگری برای بررسی چسبندگی سلول‌ها به کار برده نشد. اما تفاوت چسبندگی به ماتریکس بین سلول‌هایی که مرحله تماس سلول‌ها با هم‌دیگر را طی کرده و سلول‌هایی که مرحله تشکیل اجسام شبه‌جنینی را نگذرانده بودند و به طور مستقیم به پلیت‌های حاوی ژلاتین انتقال می‌یافتند، کاملاً مشخص بود؛ به طوری‌که سلول‌های دسته دوم حتی پس از ۳ روز نیز فقط حدود ۷۰٪ به ماتریکس ژلاتینی چسبیده و چسبندگی بسیار ضعیفی به ماتریکس داشتند. بنابراین، اگرچه تماس بین سلول‌ها به

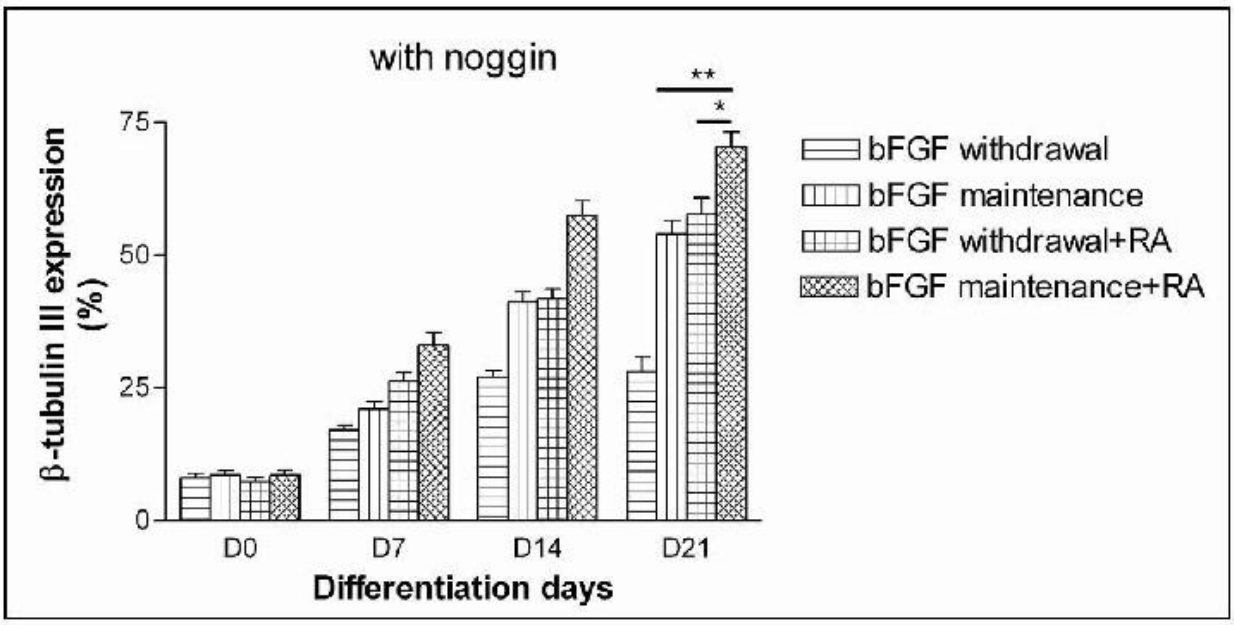
ظاهر باعث بروز پدیده قطبی شدن در سلول‌ها نشد، ولی انجام این مرحله برای ایجاد تمایز از طریق تماس سلول‌ها با ماتریکس (Cell-Matrix Contact) ضروری به نظر رسید.

یکی از مراحل القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی، حذف سرم از محیط کشت است (۶). وجود سرم باعث جلوگیری از تمایز سلول‌ها به سلول‌های عصبی خواهد شد. در این موارد به جای سرم از انسولین- ترانسفرین- سلنیم (۱٪ ITS) در محیط کشت استفاده می‌شود. ITS علاوه بر جایگزینی سرم در شرایط Serum-Free خودش نیز باعث القای تمایز به سلول‌های عصبی خواهد شد. بنابراین در این تحقیق در مطالعات اولیه ابتدا سرم به طور کامل از محیط کشت حذف شد و به جای آن ۱٪ ITS اضافه گردید. اما حذف کامل سرم باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها شد، به طوری‌که در روز D2 میزان زنده ماندن سلول‌ها به کمتر از ۳۰٪ رسید. بنابراین ۱٪ سرم به کلیه دیش‌ها افزوده شد و در واقع میزان سرم از ۱۰٪ به ۱٪ کاهش یافت. با افزودن ۱٪ سرم به محیط کشت میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش قابل توجهی نداشت. بنابراین به جای حذف کامل سرم از کاهش درصد سرم به عنوان القاکننده عصبی استفاده گردید.

یکی از فاکتورهای میتوژنیک که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، فاکتور رشد EGF بود. در بعضی از مطالعات از حذف EGF به عنوان القاکننده سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی استفاده شده است. بنابراین در یک مطالعه اولیه، EGF در روز D0 از محیط کشت حذف گردید. حذف EGF باعث کاهش زنده ماندن (Viability) سلول‌ها در تمامی گروه‌ها شد؛ به طوری‌که در بعضی از گروه‌های با تیمار خاص (مثلاً در تمامی گروه‌های حاوی Noggin) میزان زنده ماندن سلول‌ها به کمتر از ۵٪ رسید. بنابراین طبق این نتایج و بر اساس منشأ اپی‌تلیالی این سلول‌ها، حضور EGF برای ادامه پروسه تمایز ضروری به نظر می‌رسد. فعال شدن سیگنالینگ داخل سلولی BMP باعث افزایش تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های غیرعصبی می‌گردد. در این قسمت از تحقیق مهار سیگنالینگ BMP به عنوان یک محرک برای تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول عصبی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور نیمی از محیط‌های کشت تحت پیش‌تیمار با Noggin به مدت ۷ روز قرار گرفتند (قبل از bFGF Withdrawal در D0). برای مقایسه اثر Noggin بر میزان بیان β-tubulin III تمامی گروه‌های دارای تیمار مشابه، در دو گروه پیش تیمار با Noggin و بدون پیش‌تیمار با Noggin با یکدیگر مقایسه شدند. تمامی چهار تیمار عنوان شده در گروه پیش تیمار با Noggin سطوح بالاتری از نشان‌گر β-tubulin III را در مقایسه با گروه بدون پیش تیمار با Noggin در تمامی روزهای ارزیابی نشان دادند (P<۰/۰۱، نمودارشماره ۱ و ۲).

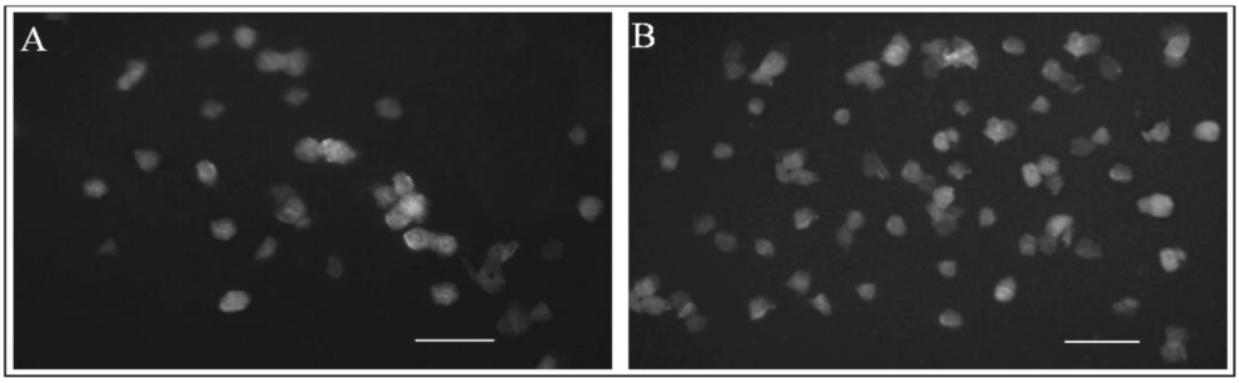


نمودار شماره ۱: تاثیر فاکتورهای رشد بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III بدون حضور Noggin (P<0.01 , * P<0.05).**



نمودار شماره۲: تاثیر فاکتورهای رشد بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III در حضور Noggin (P<0.05 * , P<0.01 **).

در روز شروع دوره تمایزی ۲۱ روزه (D0) به ترتیب ۳/۵٪ تا ۴٪ و ۷/۵٪ تا ۸/۵٪ از سلول‌ها در گروه بدون Noggin و دارای Noggin نسبت به نشان‌گر β-tubulin III مثبت بودند. به منظور این‌که اثر حذف bFGF (bFGF Withdrawal) بر تمایز سلول‌ها به سلول‌های عصبی بررسی گردد در D0، bFGF در نیمی از محیط‌های کشت در هر دو گروه بدون Noggin و دارای Noggin حذف شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دارای bFGF (bFGF Maintenance) و بدون bFGF (bFGF Withdrawal) در روز هفتم و بعد از آن در هر دو گروه بدون Noggin و دارای Noggin وجود دارد (P<۰/۰۵ در D7 و P<۰/۰۱ برای D14 و D21). بیشترین میزان بیان β-tubulin III مربوط به D21 بود که به ترتیب ۲/۶±۵۴٪ و ۲/۹±۲۸٪ در گروه دارای bFGF و در گروه بدون bFGF مربوط به سلول‌های تیمار شده با Noggin و ۳/۹±۳۷/۲٪ و ۱/۹±۱۷/۸٪ مربوط به سلول‌های بدون تیمار با Noggin می‌باشد (نمودار شماره ۱ و ۲). برای بررسی اثر RA به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی، هم‌زمان با حذف bFGF (D0) به نیمی از محیط‌های کشت RA اضافه شد. نتایج اضافه کردن RA به گروهی که bFGF در آن حذف گردید (bFGF Withdrawal+ RA) و گروه دارای bFGF مشابه بود معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت به جزء در D7 که در گروه تیمار شده با Noggin بین دو گروه ذکر شده، تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). این نتایج مشابه در هر دو گروه تیمار شده با Noggin و بدون Noggin قابل مشاهده بود. بیشترین درصد تمایز در گروه bFGF Withdrawal+RA مربوط به D21 بود که در گروه پیش تیمار با Noggin ۳/۲±۵۷/۸٪ از سلول‌ها نسبت به β-tubulin III مثبت بودند و در گروه بدون تیمار با Noggin هم ۲/۱±۳۹٪ از سلول‌ها مارکر β-tubulin III را بیان کردند (نمودار شماره ۱ و ۲). در نیمی از محیط‌های کشت بدون آن‌که bFGF در D0 حذف شود، RA به آن‌ها اضافه گردید. ترکیبی از bFGF و RA (bFGF Maintenance+RA) بالاترین درصد بیان β-tubulin III را در تمامی روزهای بررسی در هر دو گروه پیش‌تیمار با Noggin و بدون پیش‌تیمار با Noggin نشان داد. در D21 به ترتیب ۳±۷۰/۴٪ و ۲/۵±۴۷/۶٪ از سلول‌ها در گروه پیش‌تیمار با Noggin و بدون پیش‌تیمار با Noggin نسبت به مارکر β-tubulin III مثبت تلقی شدند (شکل شماره ۳). در D21 در گروه bFGF Maintenance+RA نسبت به سه تیمار دیگر در هر دو گروه دارای Noggin و بدون Noggin تفاوت معنی‌داری دیده شد. مقایسه آماری در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل شماره ۳: واکنش آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با FITC با آنتی‌بادی اولیه علیه β-tubulin III، ۲۱ روز پس از تمایز با فاکتورهای رشد bFGF و RA، بدون حضور Noggin (A) و در حضور Noggin (B) (Scale bar=50µm).

بحث

در مطالعات قبلی که در زمینه جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی انجام گرفته، جمعیت متغیری از سلول‌ها با درصد متفاوتی از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی جنینی مانند نشان‌گرهای سطح سلولی یا نشان‌گر پرتوان دیده شده است. این جمعیت متغیر می‌تواند به عوامل مختلفی نسبت داده شود: از جمله هفته بارداری (Gestational week's)، فشار هیدرواستاتیک مایع آمنیوتیک، تفاوت در ماتریکس خارج سلولی که سلول‌ها بر روی آن قرار دارند و موقعیت مکانی پرده آمنیوتیک (روی جفت باشد یا خیر) (۳،۲). گسترده‌ترین کار در زمینه جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی توسط Miki و همکاران انجام شده است که بر پایه رابطه مستقیم بین درصد مارکرهای پرتوان در سلول‌ها و میزان چسبندگی در محیط کشت می‌باشد (۲). بر اساس این مطالعه سلول‌هایی که به طور کامل به بستر محیط کشت می‌چسبند دارای نشان‌گرهای پرتوان کمتری خواهند بود. در این مطالعه بررسی نشده است که آیا کاهش درصد نشان‌گرهای پرتوان به علت تمایز سلول‌ها بعد از چسبندگی به محیط کشت می‌باشد، یا این‌که این سلول‌ها بر روی پرده آمنیون درصدی از تمایز را گذرانده‌اند و از ابتدا دارای درصد کمتری از نشان‌گرهای پرتوان می‌باشند، بنابراین باید منشأ این کاهش درصد در نشان‌گرهای پرتوان بررسی شود. اما آن‌چه که مسلم است این است که سلول‌های چسبیده به بستر کشت سلول دارای درصد کمتری از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی هستند. بنابراین در مطالعه حاضر از سلول‌هایی استفاده شد که به محیط کشت نچسبیده و یا دارای چسبندگی کمتری به محیط کشت بودند. واکنش سلول‌های جداسازی شده با آنتی‌بادی Pan-Cytokeratin نشان داد مراحل جداسازی و شستشو به طور کامل انجام شده، که نشان از عدم آلودگی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های دیگر بود. یکی از فاکتورهای رشدی که طی این مطالعه اثراتش بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی مورد بررسی قرار گرفت؛ bFGF بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که bFGF یک فاکتور مهم در تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی می‌باشد. bFGF یک فاکتور میتوژنیک است که هم باعث تمایز به سلول‌های عصبی می‌گردد و هم باعث بقای (Survival) سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود (۱۵،۶). از طرف دیگر نشان داده شده است که حذف bFGF (bFGF Withdrawal) باعث افزایش درصد سلول‌های عصبی در پروتکل تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی می‌گردد (۱۶). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نه تنها حذف bFGF باعث افزایش درصد سلول‌های حاوی β-tubulin III نمی‌شود؛ بلکه باعث کاهش درصد این مارکر نیز می‌شود. از آن‌جایی که حذف bFGF در D0 باعث کاهش Viability سلول‌ها نمی‌گردد به نظر می‌رسد اثر تمایزی bFGF بر سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی شاخص‌تر از اثر بقای (Survival) آن می‌باشد. یکی دیگر از فاکتورهای میتوژنیک که در این تحقیق به کار برده شد، فاکتور رشد EGF بود. در بعضی از مطالعات از حذف EGF به عنوان القاکننده سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی استفاده شده است (۱۷). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که بقای سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به حضور EGF در تمامی مراحل کشت وابسته می‌باشد و حذف آن باعث توقف پروسه تمایز خواهد شد. همان‌طور که از نتایج بر می‌آید میزان سلول‌های حاوی β-tubulin III در حضور RA به صورت مشخصی افزایش می‌یابد. در مطالعات متعددی RA برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی به کار برده شده است. در این مطالعات مشخص گردید که RA به صورت وابسته به دوز باعث افزایش درصد سلول‌های عصبی می‌شود (۱۵،۶). RA برای تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی نیز مورد استفاده

قرار گرفته است. در مطالعاتی که توسط Miki و همکارانش در سال ۲۰۰۵ و Ilancheran و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد از غلظت بالای RA (۵۰ میکرومولار) برای تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های حاوی β-tubulin III استفاده گردید (۴،۲). اگرچه غلظت‌های بالاتر RA می‌تواند درصد بیشتری از سلول‌های عصبی تولید نماید، ولی توجه به این نکته ضروری است که RA در غلظت‌های بالا سمی بوده و در صورت مصرف با غلظت بالا تراتوژن نیز می‌باشد (۱۸)، بنابراین توصیه می‌گردد تا از دوزهای پایین‌تر RA استفاده شود. در این تحقیق این مسأله مدنظر قرار گرفت و از غلظت پایین‌تر RA (۱ میکرومولار) استفاده گردید. البته باید به این نکته توجه کرد که ۱ میکرومولار از RA نیز غلظتی فراتر از حالت فیزیولوژیک (Supraphysiologic) داشته و اثر سمی آن بر سلول‌ها باید مورد مطالعه قرار گیرد. یکی از نتایج مهمی که در این تحقیق حاصل شد، مربوط به مصرف هم‌زمان bFGF و RA بود. بر طبق این نتایج مصرف هم‌زمان bFGF و RA بالاترین درصد سلول‌های مثبت به β-tubulin III را طی پروسه ۲۱ روزه تمایز بوجود می‌آورد. این نتیجه را می‌توان به اثر تجمعی این دو فاکتور رشد به عنوان دو فاکتور نروژنیک مرتبط دانست. اما این مسئله در تضاد با اثرات bFGF و RA در هنگام تکامل سیستم عصبی در داخل بدن (In Vivo) می‌باشد. در تکامل سیستم عصبی در جنین جوجه نشان داده شده است که bFGF موجب مهار نروژنز می‌شود. bFGF این کار را از طریق اثر مهاری خود بر بیان فاکتور نسخه‌برداری Class I HD/bHLH انجام می‌دهد. از طرف دیگر RA با مهار سیگنالینگ bFGF موجب القای نروژنز می‌گردد. بدین ترتیب RA از طریق Upregulation کلاس I ژن‌های نامبرده اثرات bFGF را آنتاگونیزه می‌کند (۱۹). بنابراین حذف bFGF و اضافه کردن RA در بسیاری از پروتکل‌های القایی به همین دلیل انجام می‌گیرد. اما همان‌طور که قبلاً ذکر شد یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که نه تنها bFGF باعث کاهش درصد سلول‌های عصبی نمی‌گردد؛ بلکه باعث افزایش آن نیز می‌شود. این تناقض را می‌توان به دو صورت مورد بررسی قرار داد. ابتدا این‌که می‌تواند به علت تفاوت بین سلول‌های مورد مطالعه باشد، مطالعاتی که تا به حال انجام گرفته یا از سلول‌های بنیادی جنینی و یا از سلول‌های بنیادی مزانشیمال برای تمایز استفاده شده است. بنابراین اختلاف بین این سلول‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی و در نتیجه تفاوت در سیگنالینگ داخل سلولی آن‌ها می‌تواند منشأ این اختلاف در پاسخ‌دهی باشد. از طرف دیگر مشخص شده است که RA باعث القای آپوپتوز در بسیاری از سلول‌ها از جمله سلول‌های کارسینومایی جنینی می‌گردد. bFGF از طریق تعامل با مسیر سیگنالینگ داخل سلولی PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) می‌تواند آپوپتوز القا شده توسط RA را مهار نماید (۱۹،۹). بنابراین افزایش درصد سلول‌های عصبی در حضور bFGF را می‌توان به اثر آنتی‌آپوپتوتیک bFGF نسبت داد. به هرصورت تعامل بین bFGF و RA در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی به صورت In Vitro و تکامل سیستم عصبی به صورت In Vivo یکی از مسائل چالش‌برانگیزی است که تحقیقات زیادی در این زمینه در حال انجام می‌باشد و جای آن دارد که آپوپتوز ناشی از RA و تعامل بین bFGF و RA در مطالعات جداگانه مورد بررسی قرار گیرد؛ تا منشأ این تناقض آشکار گردد.

یکی دیگر از اهداف اصلی این تحقیق بررسی اثر مهار سیگنالینگ BMP بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از Noggin (آنتاگونیست BMP) به طور مؤثری باعث افزایش بیان β-tubulin III می‌شود. این نتیجه را می‌توان با مهار سیگنالینگ BMP مرتبط دانست. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که BMP2 نقشی اساسی در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به اندودرم خارج جنینی دارد (۱۱) و از تمایز سلول‌ها به نورواکتودرم جلوگیری می‌نماید (۱۳،۱۲). در مطالعات دیگری که در Xenopus انجام گرفته، مشخص گردید که BMP4 باعث مهار تمایز به سلول‌های عصبی شده و در عوض باعث القای اپیدرموژنز می‌شود (۱۴،۱۰). هم چنین توسط Kawasaki و همکارانش گزارش گردید که BMP4 باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت سلول‌های مزودرمی می‌شود (۲۰). از آن‌جایی که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی پرتوان بوده و توانایی تمایز به سلول‌های هرسه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) را دارا هستند، بنابراین افزایش درصد سلول‌های عصبی در حضور Noggin مربوط به مهار سیگنالینگ BMP می‌باشد. بدین صورت که Noggin با مهار BMP2 و BMP4 باعث مهار تمایز به سلول‌های مزودرمی، اندودرمی و اپیدرمی شده، لذا باعث هدایت سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی می‌شود. بر این اساس برای حصول اطمینان بیشتر مطالعات گسترده‌تر در این زمینه با بررسی نشان‌گرهای سلول‌های اندودرمی (GATA6) و مزودرمی (FLK1 یا MF20) و نشان‌گر سلول‌های اکتودرمی غیرعصبی (E-Cadherin) ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای سلول‌های بنیادی جنینی در درمان بر پایه جایگزینی سلول به کار گرفته شوند. این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های حاوی

نشان‌گرهای عصبی را دارند و برای رسیدن به این هدف استفاده از فاکتورهای رشد bFGF، RA و Noggin لازم است. در این راستا تحقیقات گسترده‌تر در زمینه بررسی نشان‌گرهای عصبی و هم‌چنین تولید دوپامین یا نروترانسمی‌ترهای دیگر و بررسی پیوند این سلول‌ها در یک مدل حیوانی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به صورت مشترک در مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است. بدین وسیله از خانم دکتر نیرومنش و خانم احیایی در بیمارستان میرزاکوچک‌خان و آقای موسوی‌زاده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the Amniotic Membrane for Potential Use in Tissue Engineering. Eur Cell Mater 2008;15:88-99.

2. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. Stem Cells 2005;23:1549-1559.

3. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of Stem Cell Marker-Positive Cells by Immunofluorescence in Term Human Amnion. J Reprod Immunol 2007;75:91-96.

4. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. Biol Reprod 2007;77:577-588.

5. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, et al. Human Placenta Feeder Layers Support Undifferentiated Growth of Primate Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2004;22:433-440.

6. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient Generation of Midbrain and Hindbrain Neurons from Mouse Embryonic Stem Cells. Nat Biotech 2000;18:675-679.

7. Maden M, Holder N. Retinoic Acid and Development of the Central Nervous System. Bioessays 1992;14:431-438.

8. Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired Cerebral Cortex Development and Blood Pressure Regulation in FGF-2-Deficient Mice. EMBO J 1998;17:4213-4225.

9. Mao Y, Lee AW. A Novel Role for Gab2 in Bfgf-Mediated Cell Survival During Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation. J Cell Biol 2005;170:305-316.

10. Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of Epidermis and Inhibition of Neural Fate by Bmp-4. Nature 1995;376:331-333.

11. Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, et al. Regulation of Human Embryonic Stem Cell Differentiation by BMP-2 and its Antagonist Noggin. J Cell Sci 2004;117:1269-1280.

12. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Van Der Kooy D. Direct Neural Fate Specification from Embryonic Stem Cells: A Primitive Mammalian Neural Stem Cell Stage Acquired Through a Default Mechanism. Neuron 2001;30:65-78.

13. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of Embryonic Stem Cells Into Neuroectodermal Precursors in Adherent Monoculture. Nat Biotechnol 2003;21:183-186.

14. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM. Regulation of Neural Induction by the Chd and Bmp-4 Antagonistic Patterning Signals in Xenopus. Nature 1995;376:333-336.

15. Park S, Lee KS, Lee YJ, Shin HA, Cho HY, Wang KC, et al. Generation of Dopaminergic Neurons in Vitro from Human Embryonic Stem Cells Treated with Neurotrophic Factors. Neurosci Lett 2004;359:99-103.

16. Kuo HC, Pau KY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP. Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells Into Neural Lineages. Biol Reprod 2003;68:1727-1735.

17. Sievertzon M, Wirta V, Mercer A, Frisen J, Lundeberg J. Epidermal Growth Factor (EGF) Withdrawal Masks Gene Expression Differences in the Study of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Activation of Primary Neural Stem Cell Proliferation. BMC Neurosci 2005;6:55.

18. Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM. Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. Retinoic Acid Induction and Lineage Selection of Neuronal Cells. Cell Tissue Res 2001;305:171-176.

19. Appel B, Eisen JS. Retinoids Run Rampant: Multiple Roles During Spinal Cord and Motor Neuron Development. Neuron 2003;40:461-464.

20. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al. Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. Neuron 2000;28:31-40.