نقش سلول‌های سرتولی در تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

مریم خانه‌زاد[۱]، فرید ابوالحسنی[۲*]
سید مرتضی کروجی[۱]
ایرج راگردی کاشانی[۱]
فرشته علی اکبری[۱]

۱- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بین ۱٦ آذر و قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی.
تلفن: ۰۲۱-٦٤٠٥٣٣٢٩
E-mail: abolhasf@sina.tums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹٤/۰٦/۱٤ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۱/۰٦ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۱/۱٤

زمینه و هدف: اسپرم‌زایی فرآیندی پیچیده و سازمان‌یافته از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) به‌عنوان سلول‌های بنیادی منحصر به فرد با توان خود نوزایی، تمایز و انتقال داده‌های ژنتیکی به نسل بعد در حفظ باروری نقش اساسی دارند. همچنین سلول‌های سرتولی در تعادل بین تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مؤثر هستند. با توجه به اهمیت و کاربرد گسترده SSCs به‌ویژه در درمان ناباروری، هدف از انجام این پژوهش نقش هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی در تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از آبان ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳ در گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، بر روی موش‌های NMRI نابالغ (٦-۳ روزه) انجام گرفت. ابتدا سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از موش‌های نوزاد طی دو مرحله هضم آنزیمی جدا شدند. ماهیت سلول‌های سرتولی با نشانگر ویمنتین و SSCs با نشانگر پروتیین انگشت روی لوسمی پرومیلوسیتیک (Promyelocytic leukemia zinc-finger, PLZF) تأیید شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در دو گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و بدون هم‌کشتی (کنترل) قرار گرفتند. میزان بیان ژن تمایزنیافته مهارکننده اتصال DNA چهار (ID4) و تمایزیافته c-Kit توسط تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز ارزیابی شدند.

یافته‌ها: درصد خلوص SSCs با روش فلوسایتومتری ۹۱/٦٦٪ گزارش شد. بیان ژن ID4 در گروه هم‌کشتی نسبت به کنترل افزایش معناداری را نشان داد (P=۰/۰٤٥)، در حالی که بیان ژن c-Kit در گروه هم‌کشتی در پایان هر هفته در مقایسه با کنترل کاهش معناداری داشت (P=۰/۰٤٦).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی برای مدت بیشتری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در مرحله تکثیر نگه می‌دارد، بنابراین می‌تواند جهت بهینه‌سازی محیط کشت در کلینیک استفاده شود.

کلمات کلیدی: تکنیک هم‌کشتی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های سرتولی، اسپرماتوژنز، باروری، بیان ژن، مطالعات تجربی.

مقدمه

اسپرم‌زایی فرآیندی پیچیده و بسیار سازمان‌یافته از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که طی تقسیمات متوالی میتوز و میوز در نهایت به تعداد بی‌شماری اسپرماتوزوآ تمایز می‌یابند.[۱و۲] به عبارت دیگر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای شروع و تداوم اسپرم‌زایی لازم و ضروری هستند.[۳] سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با توان خودنوزایی و تمایز به سلول‌های دختری، در تولید نسل بعد و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

انتقال مواد ژنتیکی به آن نقش مؤثری دارند، از این‌رو در بین سلول‌های بنیادی مختلف در بدن منحصر به فرد می‌باشند.[۴و۵] خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به یک ریزمحیط بی‌نظیر و اختصاصی به نام آشیانه نیاز دارد. سلول‌های سرتولی به‌عنوان تنها سلول‌های سوماتیک موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز در واکنش مستقیم با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از طریق ترشح فاکتورهای رشد مانند فاکتور نوروتروفیک مشتق‌شده از گلیال Glial (Derived Neurotrophic Factor، فاکتور رشد فیبروبلاست (Fibroblast Growth Factor 2) پروتیین ریخت‌شناسی استخوان (Bone Morphogenetic Protein 4) فاکتور سلول بنیادی (Stem Cell Factor) فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor) و سیگنال‌های پاراکرین در تشکیل آشیانه و تعادل بین تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش مرکزی دارند.[۶-۸]

به‌عنوان مثال فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور نوروتروفیک مشتق‌شده از گلیال، فاکتور رشد فیبروبلاست و فاکتور رشد فیبروبلاست بر تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اثر دارند و از تمایز آنها جلوگیری می‌کنند.[۹-۱۱] در مقابل ترشح فاکتورهای ضروری نظیر فاکتور سلول بنیادی، پروتیین ریخت‌شناسی استخوان و ریتینوییک اسید باعث پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شوند.[۱۲]

تعادل بین دو فرآیند خودنوزایی و تمایز، منجر به حفظ باروری طبیعی در طول دوران تولیدمثل فرد می‌شود و عدم تعادل از مهمترین علل ناباروری مردان به شمار می‌رود.[۱۳] امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مواردی مانند تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی، اصلاح ژنتیکی، انجماد و درمان ناباروری کودکانی که پیش از بلوغ تحت شیمی‌درمانی و رادیوتراپی قرار گرفته و اسپرم بالغی جهت ذخیره نداشته‌اند، بسیار ارزشمند است.[۱۴-۱۶]

به دلیل نقش حیاتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در فرآیند باروری، پیچیدگی واکنش‌های بین سلولی، تعداد کم سلول‌ها (۰/۰۳٪ از کل سلول‌های بیضه)،[۱و۲] عدم نشانگر اختصاصی جهت جداسازی و دانش کافی از نیازهای تغذیه‌ای این سلول‌ها، غنی‌سازی، تکثیر و تمایز آنها در محیط کشت بسیار حایز اهمیت می‌باشد.[۱۷]

در میان تلاش‌هایی که جهت بهبود شرایط محیط کشت برای سلول‌های اسپرماتوگونی گونه‌های مختلف به‌کار رفته است، با توجه به نقش ویژه‌ای که سلول‌های سرتولی در حمایت این سلول‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز دارند، هم کشتی با سلول‌های سرتولی به‌عنوان لایه مغذی بیشتر مورد توجه پژوهشگران می‌باشد.[۱۸-۲۰]

در بررسی‌های انجام شده در مورد تکثیر با استفاده از هم‌کشتی سلول‌های سرتولی اختلاف‌نظر وجود دارد. برخی مطالعات کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ را بر روی سلول‌های سرتولی در جهت تکثیر، مفید گزارش کرده‌اند[۲۰و۲۱] و همچنین در مورد مطالعات انسانی نیز هم‌کشتی با این سلول‌ها را توصیه کرده‌اند[۲۲و۲۳] در مقابل این تحقیقات، مطالعات دیگری وجود دارند که هم کشتی با سلول‌های سرتولی را باعث کاهش تزاید و پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دانسته‌اند.[۱۸و۲۴و۲۵] همچنین در بین گزارشات بسیاری که نگهداری و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت را به دنبال هم‌کشتی با یک لایه تغذیه‌کننده مؤثر دانسته‌اند، مطالعه‌ای در مورد بررسی بیان ژن‌های درگیر در زمان تکثیر و یا تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم کشتی با سلول سرتولی انجام نشده است.

با توجه مطالب فوق و اهمیت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در یک محیط کشت مناسب از یک سو و اختلاف‌نظر در مطالعات مختلف در نقش و تأثیر سلول‌های سرتولی در تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (خودنوزایی و تکثیر یا تمایز) از سوی دیگر، مطالعه حاضر با هدف مطالعه میزان بیان ژن تمایزنیافته Inhibitor of DNA Binding 4 (ID4)[۶و۸و۲۶و۲۷] و تمایزیافته (c-kit)[۱و۸و۲۸] در SSCs به‌دنبال کشت بر لایه تغذیه‌کننده سلول‌های سرتولی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که از آبان ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳ در گروه آناتومی دانشکده پزشکی انجام شد موش‌های نر و ماده بالغ مدل (National Medical Research Institute, NMRI) با وزن تقریبی ۲۰ gr از مرکز حیوانات انستیتو پاستور تهیه و جهت انجام جفت‌گیری در حیوان‌خانه گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و تحت شرایط استاندارد به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا و با

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

رعایت کاردستور اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری شدند.

هضم آنزیمی: در هر بار جداسازی از بافت بیضه ٤-٣ موش NMRI نابالغ (٦-٣ روزه) استفاده شد.

فرآیند هضم آنزیمی جهت جداسازی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی بر اساس پروتکل Kanatsu-Shinohara و همکاران (۲۰۰۳) با تغییرات انجام گرفت.[۲۹] پس از خروج و شستن هر بیضه در پتری حاوی Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Cat#: 31966, Gibco-BRL, Life Technologies, Paisley, UK) و Pen/strep، نمونه‌ها به محلول هضم آنزیمی شامل ۵ ml محیط DMEM همراه با Collagenase 1 mg/ml IV (Sigma C0l30, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، Hyaluronidase 1 mg/ml (Sigma H-3506, St. Louis, MO, USA) و DnaseI 0.05 mg/ml (Sigma D5025, St. Louis, MO, USA) منتقل شدند. مخلوط سلول و آنزیم در داخل انکوباتور ۳۲ °C با CO_2 ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و هر پنج دقیقه یک‌بار پیپتاژ شدند (جهت جلوگیری از لیز شدن و آسیب به سلول‌ها پیپتاژ به آرامی انجام شد).

پس از ۱۵ دقیقه سلول‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از خارج کردن مایع رویی (Supernatant)، سلول‌ها یک بار با Phosphate Buffered Saline (PBS) (Cat#: Gibco -014, Gibco, Paisley, UK) شسته و با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند.

پس از اتمام مرحله اول هضم آنزیمی، پلیت سلولی حاصل بار دیگر با استفاده از آنزیم‌های پیشین و به روش مشابه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و در نهایت به همان روش سانتریفوژ شدند. پلیت سلولی در مقداری محیط کشت پیپتاژ و از فیلترهای نایلونی ۷۰ میکرونی عبور داده شد. در پایان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو و لام هموسیتومتر بررسی شد.

جداسازی، تأیید و کشت سلول‌های سرتولی: جداسازی سلول‌های سرتولی با به کارگیری روش اسکارپینو (Scarpino) انجام شد.[۳۰] تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C و فشار CO_2 ۵٪ در پتری‌های پوشیده از ۵ µg/ml لکتین داچورا استرامونیوم اگلوتینین در بافر فسفات (Sigma L2766, St. Louis, MO, USA) انکوبه شد. پس از گذشت یک ساعت، سلول‌هایی که شناور بودند به آرامی خارج شده و مقدار مناسب از محیط مورد نیاز برای کشت به سلول‌های چسبیده به کف پتری که همان سلول‌های سرتولی بودند اضافه گردید. جهت تأیید سلول‌های سرتولی از نشانگر اختصاصی ویمنتین و روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. بعد از ٤-٣ روز این سلول‌ها شروع به ایجاد زواید کردند. حدوداً در روز هفت که گسترش سلول‌ها در سطح پتری به ۸۰ تا ۹۰ درصد رسیدند با استفاده از آنزیم تریپسین EDTA ۰/۲۵٪ سرد از سطح لکتین جدا شده و به عنوان لایه مغذی و جهت هم‌کشتی به پتری‌های دیگر منتقل شدند.

جداسازی و تعیین خلوص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: سوسپانسیون سلولی که بر اساس پروتکل، پس از یک ساعت از روی پتری‌های پوشیده شده با لکتین برداشته شد، به صورت غالب حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بودند. این سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و به پلیت سلولی حاصل محیط کشت مناسب اضافه گردید.

سلول‌ها بعد از شمارش به مقدار 2×10^5 cell/cm^2 به پتری‌های پوشیده شده با ژلاتین منتقل گردید. در نهایت پتری‌ها به انکوباتور ۳۲ °C با CO_2 ۵٪ منتقل و ٢٤ ساعت بعد سلول‌های معلق (که بیشتر SSCs بودند) جمع‌آوری شدند. جهت تعیین خلوص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی فلوسایتومتری با نشانگر PLZF انجام شد.[۳۱و۳۲]

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:

۱) گروه کنترل: سلول‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در دیش‌های حاوی محیط DMEM (Cat#: Gibco -31966, Gibco, Paisley, UK)، Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Cat#: 10270106014, Gibco, Paisley, UK)، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ mg/ml، اسیدآمینه‌های غیرضروری 1x و LIF ۱۰ ng/ml (Sigma L5158) کشت شدند.

۲) هم‌کشتی SSCs با سلول‌های سرتولی: SSCs در دیش‌های پوشیده شده با سلول‌های سرتولی و محیط پایه فوق کشت داده شدند.

تعداد SSCs کشت داده شده در دو گروه یکسان بودند (2×10^5 cell/cm^2). کلیه گروه‌ها در انکوباتور ۳۲ °C و CO2 ۵٪ قرار داشتند. محیط کشت سلول‌ها یک روز در میان تعویض شد.

بررسی بیان ژن‌های ID4 و c-kit به روش واکنش زنجیره پلی‌مراز

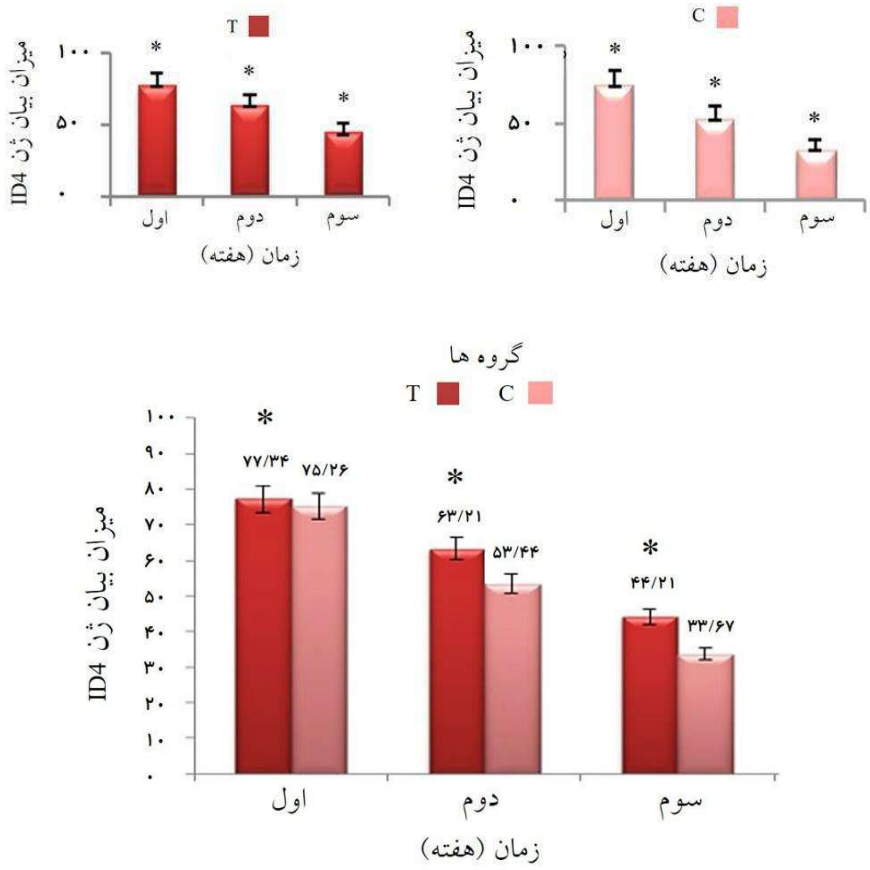
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

(Real-Time PCR): جهت تعیین نقش سلول‌های سرتولی در سرنوشت SSCs در پایان هر هفته سلول‌های مورد نظر با استفاده از تریپسین از پتری‌ها جدا شده و به منظور بررسی میزان بیان ژن‌ها از روش Real-Time PCR استفاده شد.

تمامی آزمایشات سه بار تکرار شدند. در این بررسی ابتدا RNAی کل استخراج شده و پس از تیمار با آنزیم DNase I، توسط آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل با روش Real-Time PCR تکثیر و مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش ژن ACTIN به‌عنوان کنترل داخلی House keeping استفاده شد. نتایج حاصل پس از نرمال نمودن بر اساس ژن رفرانس، با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. آنالیز داده‌ها با آزمون واریانس یک طرفه و به دنبال آن Tukey's test و SPSS software, version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) جهت بررسی و معناداری در سطح P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

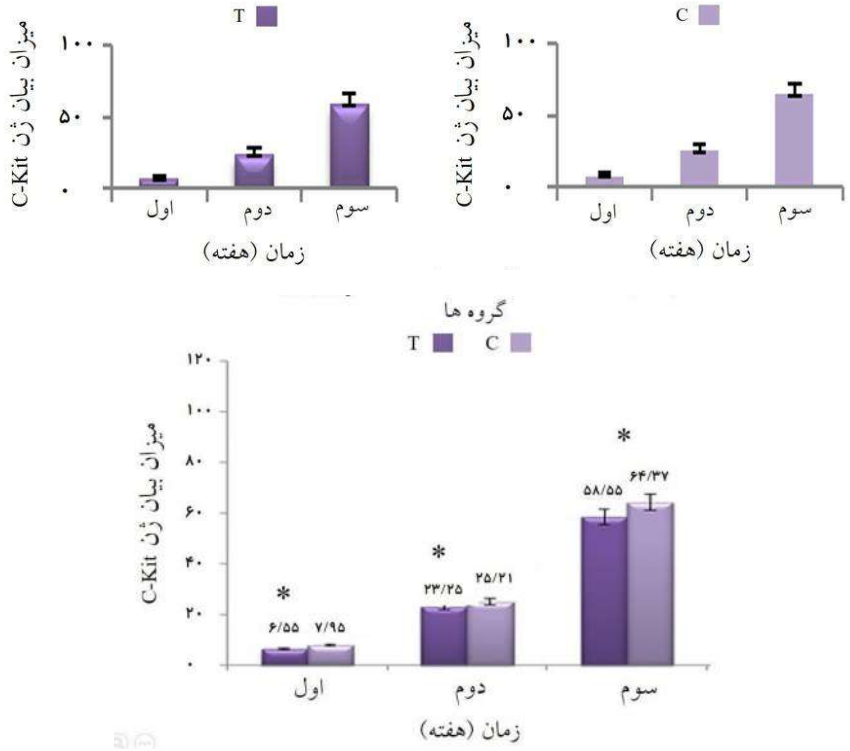
یافته‌ها

جداسازی و تأیید سلول‌های سرتولی: درصد زنده‌مانی سلول‌ها بعد از دو مرحله هضم آنزیمی ۹۴/۶۶ به دست آمد. جهت کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از سلول‌های سرتولی نوزاد به‌عنوان لایه مغذی استفاده شد. سلول‌های سرتولی با استفاده از هضم آنزیمی و خاصیت چسبندگی‌شان به لکتین جدا و به مدت یک هفته کشت داده شدند. در ابتدا این سلول‌ها به صورت گرد به کف پتری چسبیده بودند، ولی به تدریج شروع به تکثیر کرده و زائده‌دار و مثلثی شکل

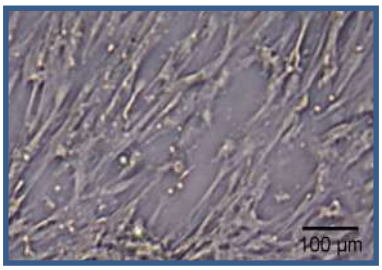


نمودار ۱: مقایسه بیان ژن ID4 در دو گروه (C=control) و گروه (T=co-culture) در پایان هر هفته. * معنادار بودن با (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد (n=۳).

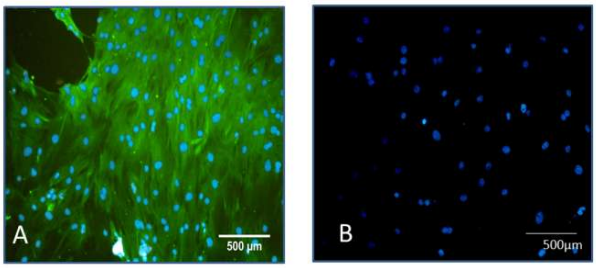
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]



نمودار ۲: مقایسه بیان ژن c-Kit در دو گروه (C=control) و گروه (T=co-culture) در پایان هر هفته. * معنادار بودن با (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد (n=۳).



شکل ۱: سلول‌های سرتولی بـه صـورت زائـده‌دار و مثلثـی در محـیط کـشت. بزرگ‌نمایی ۲۰۰×



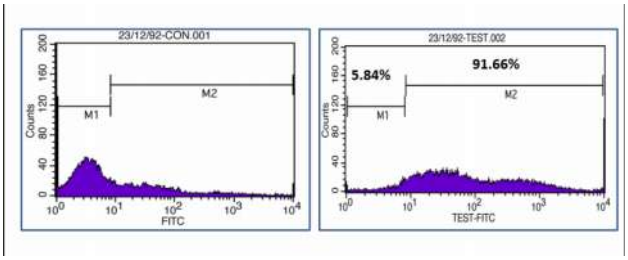
شکل ۲: A- ایمونوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی با استفاده از آنتی‌بادی ویمنتـین (رنگ سبز نشان‌دهنده وجود ویمنتین در سیتوپلاسم سلول‌هـا ورنـگ آبـی هـسته‌هـا را نـشان می‌دهد. بزرگ‌نمایی ۲۰×) **B- کنترل منفی سلول‌های سرتول**

شدند (شکل ۱). شناسایی آن‌ها با روش ایمونوسیتوشـیمی و اسـتفاده از نشانگر ویمنتین موجود در سیتوپلاسم انجام شد. (شکل ۲).

تعیین خلوص و کشت سلول‌های بنیادی اسـپرماتوگونی: پـس از هضم آنزیمی و جداسازی سلول‌های بنیادی اسـپرماتوگونی بـا روش Differential plating، جهت تعیین درصد خلـوص از فلوسایتومتـری و یکی از نشانگـرهـای سطحی سلول اسپرماتوگونی پروتیین انگشت روی لوسـمی پرومیلوسـیتیک(PLZF) اسـتفاده شـد. نتـایج حاصـل، خلوص ۹۱/٦٦٪ را نشان می‌دهد (شکل ۳).

نتایج حاصل از Real-Time PCR: میـزان بیـان نسبی ژن ID4 در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]



شکل ۳: نتایج حاصل از فلوسایتومتری برای تعیین درصد خلوص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی.

گروه هم‌کشتی در سه هفته اول کشت نسبت به هفته‌های مشابه در گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد (P=۰/۰۴۵). در حالی که در مقایسه بیان این ژن بین هفته‌های اول تا سوم در تک تک گروه‌ها، کاهش معناداری مشاهده شد (P=۰/۰۴۸) (نمودار ۱) نتایج حاصل از مقایسه میزان بیان نسبی ژن c-Kit در گروه هم کشتی در هر هفته نسبت به هفته مشابه در گروه کنترل کاهش معناداری را (P=۰/۰۴۶) نشان داد. افزون بر این بیان ژن یادشده بین هفته‌های اول تا سوم به صورت جداگانه در هر گروه نیز افزایش معناداری (P=۰/۰۴۷) داشت (نمودار ۲).

بحث

در پژوهش حاضر جهت به دست آوردن جمعیت زیادی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از موش‌های نوزاد ۶-۳ روزه استفاده شد. پژوهشگران بسیاری همچون Mclean و Eslahi نیز در مطالعات خود بیان داشتند که تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش‌های نابالغ فراوان‌تر می‌باشد[۳۳و۳۴] به نظر می‌رسد این یافته‌ها با توجه به زمان شروع فرآیند اسپرم‌زایی و عدم وجود رده‌های مختلف اسپرماتوسیت و اسپرماتید در موش‌های ۶-۳ روزه می‌تواند قابل توجیه باشد.

به دلیل به حداقل رساندن آسیب سلولی، هضم آنزیمی بدون هضم مکانیکی و با ترکیب ۳ آنزیم کلاژناز، هیالورونیداز و DNase I طی دو مرحله انجام گردید. این روش ساده، قابل اجرا، با حداقل آلودگی و میزان بالایی از زنده‌مانی سلول همراه بود. هضم مکانیکی و هضم بالای دو مرحله ضمن نیاز به زمان بیشتر می‌تواند روی زنده‌مانی سلول‌ها اثر منفی بگذارد. Yang و همکاران نیز به این نکته اشاره کرده‌اند[۳۵] درصد زنده‌مانی سلول‌ها در روش مورد استفاده بالای ۹۰٪ به دست آمد که با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه هم‌خوانی دارد.[۵]

میزان درصد خلوص سلول‌های حاصل از این مرحله با روش فلوسایتومتری و نشانگر PLZF بررسی شد. نتایج نشان داد که ۹۱/۶۶٪ از سلول‌های جدا شده در این روش، پروتیین انگشت روی لوسمی پرومیلوسیتیک (PLZF) را بیان کردند. به دلیل عدم وجود نشانگر اختصاصی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، خلوص ۱۰۰ درصدی در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است و از طرف دیگر نیز به دلیل استفاده از موش‌های نوزاد، درصد خلوص به دست آمده در این مطالعه پذیرفتنی به‌نظر می‌رسد. پژوهشگران بسیاری PLZF را به‌عنوان یک نشانگر اختصاصی در اسپرماتوگونی‌های تمایزنیافته As، Ap و Aal معرفی کرده‌اند.[۳۱و۳۶و۳۷]

در سیستم کشت مطالعه حاضر، از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی نوزاد استفاده شد. استفاده از سلول‌های سرتولی بیضه نابالغ به دلیل چسبندگی‌های سست، امکان جداسازی بهتر و تخلیص ساده‌تر را با مقدار کمی مواد هضم‌کننده فراهم می‌کنند. سلول‌های سرتولی نابالغ همچنین توانایی فعالیت میتوزی دارند، حال آنکه سلول‌های سرتولی بالغ در محیط آزمایشگاه تقسیم نشده و به تدریج از محیط کشت حذف می‌گردند. بنابراین به‌نظر می‌رسد با توجه به تغییرات سلول سرتولی پیش و پس از بلوغ، سلول‌های سرتولی بیضه نابالغ گزینه بهتری در سیستم‌های هم‌کشتی باشند. Tavakolifar، Baazm و همکارانشان نیز مانند مطالعه ما از سلول‌های سرتولی نابالغ استفاده و گزارش کردند که این سلول‌ها در ایجاد محیط کشت مطلوب مناسب‌تر هستند.[۳۸و۳۹]

در حالی که سایر مطالعات به رد این نظر پرداخته و ادعا می‌کنند که اگرچه می‌توان بقا و تمایز سلول‌های سرتولی نابالغ را با اضافه نمودن عواملی همچون تستسترون و FSH افزایش داد، این سلول‌ها هنوز قادر به بیان فنوتیپ اصلی خود نمی‌باشند، از این‌رو ممکن است پاسخگوی مناسبی به عوامل آندروژنی و FSH نبوده و همچنین توانایی تولید فاکتورهای رشدی مناسب و پروتیین‌های لازم جهت اتصال به سلول‌های زایا و بقای آنها را نداشته باشند.[۴۰و۴۱]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

با وجود بودن فیلامنت حد واسط ویمنتین در سلول‌های بافت همبند، در این تحقیق جهت تأیید ماهیت سلول‌های سرتولی علاوه بر شکل مثلثی و زائده‌دار سلول‌ها، از روش ایمونوسیتوشیمی و نشانگر ویمنتین استفاده شد. نتایج حاصل مبنی بر وجود فیلامنت حد واسط ویمنتین در سیتوپلاسم سلول‌های جدا شده با این روش، نشان داد که این سلول‌ها، سرتولی هستند. یافته‌های این بررسی با نتایج پژوهش‌های انجام شده در این زمینه که ویمنتین را به‌عنوان یک نشانگر اختصاصی معرفی کرده‌اند مطابقت دارد و تأییدی بر این پژوهش می‌باشد.[٤٢-٤٥]

مطالعه حاضرجهت تعیین نقش سلول‌های سرتولی در راستای ایجاد شرایط کشت مطلوب، بیان ژن تمایزنیافته و در مرحله تزاید (ID4) و یک ژن تمایزیافته (c-kit) در SSCs به دنبال کشت بر لایه تغذیه‌کننده سلول‌های سرتولی بررسی شد. استفاده از ID4 به این دلیل بود که نتایج مطالعات جدید این ژن را به‌عنوان تنها ژنی که در اسپرماتوگونی‌های تمایزنیافته As بیان می‌شود و در سایر اسپرماتوگونی‌های تمایزنیافته Apr و Aal وجود ندارد معرفی کرده‌اند.[٦و٨و٢٦]

Phillips، Kolasa، Chen و همکارانشان گزارش کردند که c-kit در As تا Aal اولیه بیان نمی‌شود و بیان آن در مراحل بعدی Aal و اسپرماتوگونی‌های تمایزیافته افزایش می‌یابد، بنابراین استفاده از این نشانگر جهت تشخیص اسپرماتوگونی‌ها در مرحله تمایز مورد توجه پژوهشگران می‌باشد[١و٨و٢٨] در این مطالعه نیز مشابه مطالعات دیگر، جهت بررسی شروع تمایز در SSCs از بیان ژن c-kit استفاده شد.

میزان بیان نسبی ژن ID4 در هر دو گروه کنترل و هم‌کشتی طی هفته‌های مختلف به صورت معناداری کاهش یافته است، اما روند کاهش بیان این ژن‌ها در گروه کنترل نسبت به گروه هم‌کشتی شیب قابل ملاحظه‌تری دارد که از پس از هفته دوم آشکارتر است. این مطلب به نقش ویژه سلول‌های سرتولی در ایجاد آشیانه (Nicheh) سلولی و کمک به بقا و تکثیر SSCs اشاره دارد و با مطالعات زیادی در این زمینه هم‌راستاست.[٤٦و٧]

میزان بیان نسبی ژن تمایز یافته c-Kit در هر دو گروه طی هفته‌های مختلف افزایش معناداری را نشان داد. روند افزایش بیان ژن در گروه کنترل نسبت به گروه هم‌کشتی شیب مشخص‌تری داشت و در هفته سوم به بیشترین مقدار رسید. این یافته‌ها حاکی از تأثیر سلول‌های سرتولی در تمایز SSCs است که با یافته‌های مطالعاتی همچون Nagano، Minaee، Sousa، Park و همکارانشان هم‌خوانی دارد.[١٨و٢٤و٢٥و٤٧]

در مقایسه کلی بین هم‌زمانی بیان ژن تمایزنیافته و تمایز یافته در گروه‌ها می‌توان گفت که با کاهش بیان ژن تمایزنیافته، بیان ژن تمایزیافته به شرح زیر افزایش یافت:

در گروه کنترل میزان بیان نسبی ژن c-Kit در مقایسه با ژن ID4 در هفته اول بسیار کم بود در حالی که در هفته سوم بیان آن به طرز چشمگیری افزایش یافت. این یافته‌ها گویای آن است که محیط کشت پایه بدون لایه مغذی پس از حدود ۱۰ روز باعث کاهش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود. در گروه هم‌کشتی میزان بیان نسبی ژن تمایز نیافته نسبت به ژن تمایزیافته در انتهای هفته اول بسیارکمتر بود، اما در هفته سوم بیان نزدیک به هم داشتند. این مطلب نشان داد که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی به‌احتمال تا حدود هفته دوم می‌توانند بیشتر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در مرحله تکثیر نگه‌داری کند و پس از این سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وارد مرحله تمایز می‌شوند. این یافته‌ها با نقش ثابت شده سلول‌های سرتولی در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قابل توجیه می‌باشد.

در نهایت با توجه به یافته‌های فوق در پاسخ به این سؤال که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی باعث تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود یا تمایز، می‌توان گفت که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی تا دو هفته باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نسبت به تمایزشان می‌شود و پس از این زمان اکثر سلول ها را وارد مرحله تمایز می‌کند.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، به‌احتمال استفاده از سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی تا حدود دو هفته در جهت بهینه‌سازی محیط کشت مناسب برای SSCs در راستای درمان ناباروری کودکان سرطانی مفید است، اما نیازمند پژوهش‌های بیشتر در این زمینه می‌باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی میزان بیان ژن‌های تمایزنیافته (PLZF, ID4) و تمایزیافته (c-kit) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد به دنبال هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ با کد

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

۱۳۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی میزان بیان ژن‌های تمایزنیافته (PLZF, ID4) و تمایزیافته (c-kit) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد به دنبال هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی" مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۳ با کد ۲۱۳۹۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

References

1. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365(1546):1663-78.
2. Oatley JM, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol* 2006;419:259-82.
3. Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol* 2010;205(2):133-45.
4. Ning L, Goossens E, Geens M, Saen DV, Tournaye H. Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Mid East Fertil Soc J* 2012;17:1-7.
5. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:141.
6. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(12):1838-50.
7. Rossi P, Dolci S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:181.
8. Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* 2015;149(4):R159-67.
9. Dovere L, Fera S, Grasso M, Lamberti D, Gargioli C, Muciaccia B, et al. The niche-derived glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces migration of mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *PLoS One* 2013;8(4):e59431.
10. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010;82(2):363-72.
11. Wu X, Oatley JM, Oatley MJ, Kaucher AV, Avarbock MR, Brinster RL. The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF-induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2010;82(6):1103-11.
12. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014;29:66-75.
13. Wu SM, Baxendale V, Chen Y, Pang AL, Stitely T, Munson PJ, et al. Analysis of mouse germ-cell transcriptome at different stages of spermatogenesis by SAGE: biological significance. *Genomics* 2004;84(6):971-81.
14. Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, Hobbie WL, Wigo E, Wu X, et al. An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Hum Reprod* 2010;25(1):37-41.
15. Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(2):274-80.
16. Goossens E, Geens M, De Block G, Tournaye H. Spermatogonial survival in long-term human prepubertal xenografts. *Fertil Steril* 2008;90(5):2019-22.
17. Goossens E, Frederickx V, De Block G, Van Steirteghem AC, Tournaye H. Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. *Hum Reprod* 2003;18(9):1874-80.
18. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod* 2003;68(6):2207-14.
19. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 2006;65(9):1828-47.
20. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. I*n Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009;45(5-6):281-9.
21. Mohamadi SM, Movahedin M, Koruji SM, Jafarabadi MA, Makoolati Z. Comparison of colony formation in adult mouse spermatogonial stem cells developed in Sertoli and STO coculture systems. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:431-7.
22. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:41-55.
23. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 2009;302(19):2127-34.
24. Minaee Zanganeh B, Rastegar T, Habibi Roudkenar M, Ragerdi Kashani I, Amidi F, Abolhasani F, et al. Co-culture of spermatogonial stem cells with sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. *Acta Med Iran* 2013;51(1):1-11.
25. Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 2002;17(1):161-72.
26. Aloisio GM, Nakada Y, Saatcioglu HD, Peña CG, Baker MD, Tarnawa ED, et al. PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *J Clin Invest* 2014;124(9):3929-44.
27. Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, Oatley JM. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod* 2011;85(2):347-56.
28. Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol* 2012;12(1):5-23.
29. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003;69(2):612-6.
30. Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Fröysa B, Söder O, Boitani C. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol* 1998;146(1-2):121-7.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

31. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004;36(6):653-9.
32. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004;36(6):647-52.
33. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine* 2013;8:4563-76.
34. McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS, Griswold MD. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod* 2003;69(6):2085-91.
35. Yang Y, Yarahmadi M, Honaramooz A. Development of novel strategies for the isolation of piglet testis cells with a high proportion of gonocytes. *Reprod Fertil Dev* 2010;22(7):1057-65.
36. Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* 2009;325(5946):1394-8.
37. Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol* 2009;9:38.
38. Tavakolifar F, Shahverdi A, Pirouz M, Shakeri M, Koruji M, Baharvand H. Comparison of Neonatal and Adult Mice-derived Sertoli Cells in Support of Expansion of Mouse Spermatogonial Stem Cells In vitro. *Int J Fertil Steril* 2012;5(4):217-24.
39. Baazm M, Abolhassani F, Abbasi M, Habibi Roudkenar M, Amidi F, Beyer C. An improved protocol for isolation and culturing of mouse spermatogonial stem cells. *Cell Reprogram* 2013;15(4):329-36.
40. Sá R, Neves R, Fernandes S, Alves C, Carvalho F, Silva J, et al. Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2008;79(5):962-75.
41. Bucci LR, Brock WA, Johnson TS, Meistrich ML Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes. *Biol Reprod* 1986;34(1):195-206.
42. Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. *Biol Reprod* 2003;68(3):996-1002.
43. Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ. Combination of in vivo cryptorchid testis and In vitro co-culture system to obtain high purification and proliferation of mouse spermatogonial stem cells. *Int J Fertil Stetil* 2008;2(3):115-20.
44. Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2003;68(1):272-81.
45. Pramod RK, Mitra A. In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (Capra hircus). *J Assist Reprod Genet* 2014;31(8):993-1001.
46. Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev* 2012;92(2):577-95.
47. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 2003;59(1):73-86.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2016; Vol. 73, No. 12: 878-887 Original Article

The roles of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells

Maryam Khanehzad M.Sc.[1]
Farid Abolhasani Ph.D.[2*]
Seyed Morteza Koruji Ph.D.[1]
Iraj Ragerdi Kashani Ph.D.[1]
Fereshteh Aliakbari Ph.D.[1]

1- Department of Anatomy, Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Anatomy, Medical School, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Histology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 64053329
E-mail: abolhasf@sina.tums.ac.ir

Received: 05 Sep. 2015 Accepted: 26 Jan. 2016 Available online: 02 Apr. 2016

Abstract

***Background*:** Spermatogenesis is a complex and highly organized process of proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Spermatogonial stem cells (SSCs) as a unique stem cell have the potential to self-renewal, differentiation and transmit genetic information to the next generation and play a vital role in maintaining fertility. Sertoli cells as the only somatic cells within the seminiferous epithelium play central roles in the formation of niche and balance between self-renewal and differentiation by secrete many growth factors. Given the importance and widespread use of SSCs, particularly in the treatment of infertility, the aim of this study was to create an optimal environment for the proliferation of SSCs. So we decided to study of undifferentiated (ID4) and differentiated (c-Kit) gene expression in SSCs followed by co-culture with Sertoli cells for a one-month.

***Methods*:** This experimental study was conducted from November 2013 to December 2014 in Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, on immature NMRI mouse (6-3 days old). Initially, Sertoli cells and SSCs were isolated from neonates mouse testes during the two-step enzymatic digestion characteristics Sertoli cells with vimentin marker and SSCs with promyelocytic leukemia zinc-finger (PLZF) marker were confirmed. Then SSCs were cultured in two groups: co-culture with Sertoli and without co-culture (control). Undifferentiated (ID4) and differentiation (c-Kit) gene expression were evaluated by Real-time PCR technique.

***Results*:** Spermatogonial stem cells purity was obtained 66.91% by flow cytometry. The relative expression levels of gene ID4 in co-culture group at the end of each week, compared to the control group showed a significant increase ($P<0.05$). While the expression of this gene significantly decreased in each group over time ($P<0.05$). The results of the comparison of the relative expression of c-Kit gene in co-culture group are indicated significant decrease than the control group at the end of each week ($P<0.05$). In addition, this gene expression was showed significant increase in each group individually over time ($P<0.05$) ID4 gene expression showed a significant ($P<0.05$) increase toward the control group, while in the expression of c-Kit was observed a significant ($P<0.05$) decrease compared with the control group at the end of each week.

Conclusion: According to the results of this study, co-culture with Sertoli cells maintains SSCs in the prolifration stage for long-term, so can be used to optimize the culture medium at the clinic.

Keywords: co-culture techniques, experimental studies, fertility, gene expression, sertoli cells, spermatogenesis, spermatogonia stem cells.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]