بررسی تمایز سلول‌های عضلانی ماهواره‌ای گوسفند

زهرا رشیدیان [۱]، علی جوادمنش [۲]، حسام دهقانی [۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران (zahra.rashidian@um.ac.ir)

[۲] استادیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران (javadmanesh@um.ac.ir).

[۳] استاد گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی. پژوهشکده فناوری زیستی. دانشگاه فردوسی مشهد، ایران (dehghani@um.ac.ir)

چکیده

نگهداری مادام‌العمر توده عضلانی و پتانسیل بازسازی بستگی به حضور مداوم منبع تجدیدپذیر سلول‌های ماهواره‌ای دارد. این سلول‌ها، پیش‌ساز سلول‌های میوبلاست و مسئول بازسازی و رشد ماهیچه‌های بالغ می‌باشند. از آنجایی که سلول‌های ماهواره‌ای گوسفند از لحاظ طول عمر، تکثیر، تمایز و متابولیسم شباهت بسیاری به سلول‌های ماهواره‌ای انسان نسبت به سلول‌های رت و موش دارد، مورد توجه قرار گرفتند. این سلول‌ها کاربرد بسیاری در مدل‌سازی و درمان بیماری‌هایی مانند نارسایی‌های قلبی، اختلالات عصبی، دیستروفی عضلانی، پیوند سلول‌های مغزی برای درمان میگرن، غربالگری و تولید داروهای جدید و ... دارند. هدف از این مطالعه کشت سلول‌های ماهواره‌ای و تمایز آن به میوبلاست بود. بدین منظور، از عضله پا جنین گوسفند ۵۰-۶۰ روزه استفاده شد. پس از هضم آنزیمی، ترکیبی از سلول‌های ماهواره‌ای و غیر میوژنیک در کف فلاسک کشت داده شدند. جهت جداسازی سلول‌هایی که میوژنیک نیستند مانند فیبروبلاست‌ها، بعد از ۳ ساعت، فلاسک ها تعویض گردیدند. پس از گذشت ۶ روز، سلول‌ها تمایز پیدا کردند. به منظور تایید سلول‌های مورد نظر، از سرم اسب (HS) استفاده شد. با استفاده از محیط تمایز، سلول‌های میوتیوب در کف فلاسک رویت شد که نشان می‌داد سلول‌های اولیه کشت داده شده، سلول‌های ماهواره‌ای هستند.

کلمات کلیدی: سلول‌های ماهواره‌ای، میوبلاست، گوسفند.

Differentiation of ovine myogenic satellite cells to myoblast

Zahra Rashidian[1], Ali Javadmanesh[2*], Hassam Dehghani[3]

[1] MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran (zahra.rashidian@um.ac.ir)
[2] Assistant Professor. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran (javadmanesh@um.ac.ir)
[3] Professor. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Science, and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (dehghani@um.ac.ir)

Abstract
Lifelong maintenance of muscle mass and regenerative potential depends on the continuing presence of a functional pool of self-renewing MDSCs. These cells, progenitor myoblasts cells and responsible for the reconstruction and development of mature muscle. Sheep satellite cells have a greater similarity to human satellite cells with regard to metabolism, life span, proliferation and differentiation, than satellite cells of the rat and mouse. These cells are widely used in the modeling and treatment of diseases like heart insufficiency, neurological diseases, muscular dystrophy, cerebral cell transplantation for the treatment of migraines, screening and the production of new drugs. The aim of this study was to cultured satellite cells and differentiate to myoblast. therefore, muscle tissues were collected from 50 to 60-day-old sheep fetuses. After enzymatic digestion, a combination of satellite and non-myogenic cells was cultured on the flask. Flasks were replaced after 3 hours to isolate non-myogenic cells, such as fibroblasts. After 6 days, the cells differentiated. Horse serum was used to confirm the cells. Using a differentiation medium, myotubes cells were seen on the flask, indicating that the cells cultured are satellite cells.
Keywords: Satellite Cells, Myoblasts, Sheep.

مقدمه

طی سال‌های اخیر پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در ارتباط با سلول‌های بنیادی حاصل شده که نویدبخش راه‌کارهای نوین درمانی در بیماری‌های صعب‌العلاج می‌باشد. این سلول‌ها که در تمام ارگانیسم‌های چند سلولی حضور دارند، توانایی تقسیم و تبدیل به سلول‌هایی بسیار اختصاصی را داشته و همچنین قادر به جایگزینی سلول‌های ازدست‌رفته و آسیب‌دیده می‌باشند(۱۱). در مسیر درمان‌های مبتنی بر سلول و کاربرد سلول‌های بنیادی، ردیابی دقیق و شناسایی یک منبع سلولی ایده‌آل برای بازسازی بافت، یک چالش بزرگ محسوب می‌گردد. استفاده از سلول‌های بنیادی میوژنیک بالغ، به عنوان سلول‌درمانی و برای ترمیم عضلات اسکلتی سال‌هاست که مورد سعی و تلاش قرار گرفته و در این میان موفقیت‌های نسبی به دست آمده است(۱). تا جایی که می‌توان یک قلب صدمه دیده را با تزریق سلول‌های بنیادی ماهیچه‌ای ترمیم کرد. به‌طوری‌که سلول‌های بنیادی تزریق شده در یک قلب آسیب دیده، به سلول‌های ماهیچه‌ای قلب تکامل می‌یابد. این سلول‌ها پس از کشت در آزمایشگاه به داخل قلب بیمار قلبی تزریق می‌شوند. برای اولین بار این عمل در فرانسه برروی یک بیمار ۷۲ ساله مبتلا به حمله قلبی انجام شد. هرچند که این سلول‌ها ازبافت ماهیچه‌ای اسکلتی جدا شده بودند واز لحاظ ظاهری به این سلول‌ها شباهت داشتند ولی پس از رشد در قلب پروتئینی را ساخته بودند که مخصوص سلول‌های عضلانی قلبی بود و فعالیتی شبیه آنها داشتند. به عقیده دانشمندان، شرایط محیط قلب باعث این تغییر عملکرد در این سلول‌ها نشده بود(۳). به گزارش بنیان به نقل از ژورنال Clin Med، پیش‌سازهای میوژنیک ساخته شده از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، که به سلول‌های ماهواره‌ای نیز معروفند، کاندیداهای امیدوارکننده‌ای برای سلول‌درمانی(بیماری‌هایی از جمله دیستروفی عضلانی، بیماری‌های قلبی و ...)، تولید

حیوانات تراریخته و ترمیم عضلات اسکلتی هستند(۱). این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی ماهیچه‌های اسکلتی بوده و پیش‌ساز سلول‌های میوبلاست و مسئول بازسازی و رشد ماهیچه‌های بالغ می‌باشند(۴۸) و از آن‌جایی که اجازه پیوند آلوژن را می‌دهند، می‌توانند در مقادیر زیاد تولید شوند و در مقایسه با میوبلاست‌های بالغ ویژگی‌های شبه جنینی بیشتر و توانایی تکثیری بالاتری را در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی ظرفیت ترمیمی و خودنوزایی[1] بیشتر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد(۱). این سلول‌ها در عضله بالغ تا زمان تحریک توسط یک محرک خارجی، برای ورود مجدد به چرخه‌ی سلولی خاموش(غیرفعال) می‌مانند. به محض آسیب عضلانی شروع به تکثیر میوبلاست‌ها و همچنین سلول‌های ماهواره‌ای جدید می‌کنند(۵،۹). سلول‌های ماهواره‌ای گوسفند از لحاظ طول عمر، تکثیر، تمایز و متابولیسم شباهت بسیاری به سلول‌های ماهواره‌ای انسان نسبت به سلول‌های رت و موش دارد(۱۰) با توجه به این ویژگی، می‌توان از سلول‌های ماهواره‌ای گوسفند به عنوان مدل حیوانی برای درمان بیماری‌های انسانی استفاده کرد و نیز از آنجایی که گوشت گوسفند در مقایسه با سایر گوشت‌ها بالاترین نسبت مصرف را به خود اختصاص داده است(حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد)،از این رو، با تحقیق در مورد میوبلاست گوسفند، می‌توان کمیت وکیفیت آن را تغییر داد و از آن برای تغذیه و درمان بیماری‌های انسانی استفاده کرد(۷).

مواد و روش‌ها

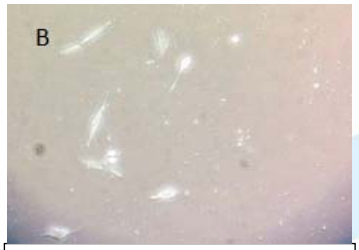
در این مطالعه از بافت ماهیچه‌ای اندام‌های عقبی جنین گوسفند ۵۰ روزه نژاد کردی از کشتارگاه صنعتی مشهد استفاده شد. بلافاصله پس از کشتار، نمونه در محیط DMEM[2] حاوی ۱۰٪ FBS[3]، 3% پنی سیلین و استرپتومایسین گذاشته و درون یخ نگهداری شد. در آزمایشگاه نمونه را از محیط حمل برداشته، درون پتری دیش استریل قرار داده و با تیغ خرد شد. پس از حذف پوست و اندام‌های اضافی، ماهیچه را درون پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی یخ و PBS[4] استریل قرار داده شد. خون ماهیچه، با استفاده از محلول PBS شسته و درون پلیت ۶ سانتی‌متری گذاشته شد. در زیر میکروسکوپ رگ‌های خونی، بافت پیوندی، شبکه‌ی عصبی و ... را جدا، بافت به قطعات ریز تقسیم شده و درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتر قرار داده و ۵ میلی‌لیتر محلول کلاژناز (۲٪ کلاژناز درون DMEM) روی آن ریخته شد. فالکون به مدت ۳۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای همگن شدن مخلوط، با استفاده از سرنگ، محلول درون فالکون را بالا و پایین، سپس به مدت ۱۵ دقیقه درون انکوباتور گذاشته شد. این عمل دوبار تکرار شد. سوسپانسیون جدا و ۵۰ میلی‌لیتر DMEM حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد. صافی سلول (۷۰ میکرومتر) بر روی فالکون ۵۰ میلی‌لیتر قرار و محلول سوسپانسیون از روی آن عبور داده شد. ۵ میلی‌لیتر DMEM حاوی ۲٪ FBS، به آن اضافه، محلول را به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و سوسپانسیون آن جدا شد. سپس ۶ میلی‌لیتر DMED حاوی ۲٪ FBS ریخته شد و به درون ۲ فلاسک منتقل شد. سلول‌های ماهواره‌ای همانند سلول‌های فیبروبلاست خاصیت چسبندگی دارند، با این تفاوت که سرعت چسبندگی آن‌ها کمتر از فیبروبلاست‌ها است. به همین علت، بعد از ۳۴ ساعت سلول‌هایی که میوژنیک نیستند مانند فیبروبلاست‌ها به کف ظرف می‌چسبند در حالی که سلول‌های ماهواره‌ای هنوز معلق هستند. بنابراین با تعویض ظرف می‌توان فیبروبلاست‌ها را از محیط جدا کرد. سپس هر ۲ روز یک‌بار محیط کشت فلاسک‌ها تعویض می‌شد.

[1] self-renewing
[2] Dulbecco's Modified Eagle Medium
[3] Fetal Bovine Serum
[4] Phosphate Buffered Solutions

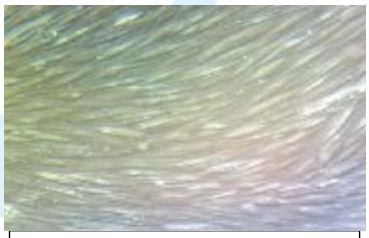
سلول‌های ماهواره‌ای بعد از تمایز به میوبلاست، در حضور HS توانایی تمایز به سلول‌های میوتیوب را دارند. بنابراین می‌توان از ویژگی برای شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای استفاده کرد. بدین منظور پس ۷۰٪ چسبندگی از محیط DMEM حاوی 10% FBS و 2% HS استفاده شد.

نتایج و بحث

شکل ۱–A سلول‌های ماهواره‌ای
Figure 1 -Satellite Cells



شکل 1– B سلول‌های نابالغ
Figure 2- Immature Cells



شکل 2– سلول‌های میوتیوب
Figure 3- Myotube Cells

با قرار دادن پلت درون فلاسک‌ها و تعویض آن پس از ۳ ساعت، به تدریج سلول‌های ماهواره‌ای قابل رویت شدند(شکل-A 1). پس از گذشت ۶ روز سلول‌ها به ۷۰ درصد چسبندگی رسیدند. در این حین برخی از سلول‌ها تمایز پیدا کرده بودند(شکل-B۱). با استفاده از افزودن DMEM حاوی FBS 10% و HS 2% سلول‌ها تمایز پیدا کردند به‌طوریکه پس از گذشت ۴ روز ۹۰٪ سلول‌های درون فلاسک به میوتیوب تبدیل شده بودند(شکل۲). مطالعات اخیر نیز نشان دادند که سلول‌های ماهواره‌ای به راحتی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده می‌شود ولی به منظور افزایش کلون‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای می‌توان از محیط DMEM حاوی ۲۰٪ FBS و ۱۰ng/ml bfgf استفاده کرد(۸). درواقع فاکتور رشد bfgf مانع پیری سلول‌های میوبلاست جنین گوسفند می‌شود (۱۲). برای شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای از مارکرهای خاصی مانند M-cadherin, c-Met, Pax3, Pax7و Syndecan-3, CD34 و calcitonin نیز استفاده می‌شود(۵). از این میان، مارکر Pax7 بیشترین کاربرد را دارد. در گورخرماهی بیان Pax7 نشان‌دهنده سلول‌های ماهواره‌ای است و زمانی که بافت ماهیچه‌ای آسیب میبیند، Pax7 به محل زخم مهاجرت کرده و وارد چرخه‌ی سلولی می‌شود(۱۰) این مارکر توانایی تحریک رونویسی سلول‌های ماهواره‌ای خاموش و فعال را داشته، همچنین مانع همجوشی سلول‌های میوبلاست مشتق شده از سلول‌های ماهواره‌ای نمی‌شود (۶). همچنین در پژوهشی دیگر بیان کردند که Pax7 می‌تواند به عنوان یک مارکر برای شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای باشد. با این حال، مطالعه‌ای که اخیرا با هدف شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای و موقعیت آنها در داخل بدن انجام شد، پروتئین Pax7 بیان نشد. برخی از دانشمندان معتقدند که بیان Pax7 های مختلف به موقعیت چرخه‌ی سلولی آنها بستگی دارد(۲) اما مارکرهای سطحی مانند M-cadherin، Syndecan 3 و CD34 بیان کننده کشت خالص از سلول‌ها نیستند، چون معرف مناسب و دردسترسی ندارند(۵).

منابع

1-Bonyan news (2000). Myogenic precursors creation of iPS cells for the treatment of skeletal muscle. Retrieved September 02,2015, from http://www.bonyannews.ir/News

2-Deasy BM, Li Y, Huard J. Tissue engineering with muscle-derived stem cells. Curr Opin Biotechnol. 2004; 15:419–10.

3- Iran Medline (2016). Stem cells. Retrieved July 01,2017, from http://irmedline.com/index.php/family-and-parents.

4-Lepper, C., Partridge, T. A. and Fan, C. M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Development 138, 3639-3646.

5-Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. Science. 2005 Sep 23;309(5743):2064-7. Epub 2005 Sep 1.

6-Peter, S. Z., Frederic, R., Yosuke, N., Ana Pérez Ruiz, Charlotte, A.C., Terence, A. P., Jonathan, R. B. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. Journal of Cell Science 119, 1824-1832.

7-Saadat Nouri, M., siahmansour.(2003). Principles of keeping and breeding sheep. E-Publishing of the ninth edition Ashrafi., Tehran.

8-Salabi, F., Nazari, M., Cao, W.G. (2014). Cell culture, sex determination and single cell cloning of ovine transgenic satellite cells in vitro. Journal of Biological Research-Thessaloniki 21:22.

9-Susan, M., Abmayr, Grace K. Pavlath. 2012. Review. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. Development 139, 641-656.

10-Wu, H., Yu Ren, Shuo Li, Wei Wang, Jianlong Yuan, Xudong Guo, Dongjun Liu and Ming Cang. (2012). In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. Cell Biol. Int. 36, 579–587.

11-Zahiri M, Shafikhodaii Sh, Keshavarz, H.(2014). Stem cells in review. ISMJ 2014; 17(4): 733-747. (In Farsi)

12-Zheng, Y.L., Ma, HM., Zheng, Y.M., Wang, Y.S., Zhang, B.W., He, XY., Liu, J., Zhang, Y.(2012). Site-directed mutagenesis of the myostatin gene in ovine fetal myoblast cells in vitro. Res Vet Sci 2012, 93:763–769.