Review Article

مروری بر تمایز و تکثیر سلول‌های زایای بدوی در محیط کشت

زهره ماکولاتی، مجید نقدی*

گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۸/۳

چکیده

سلول‌های زایای بدوی Primordial germ cells (PGCs) جمعیت سلولی بسیار تخصص یافته‌ای هستند که در شرایط درون بدن (In vivo) از سلول‌های اپی بلاست ایجاد می‌شوند. در طی سیکل زندگی این سلول‌ها سه مرحله اساسی قابل تشخیص است: ۱ ـ اختصاصی شدن ۲ ـ مهاجرت و تکثیر ۳ ـ تکامل وابسته به جنس در زمان قبل و بعد از تولد. فرآیند اختصاصی شدن منطقه‌ای در اپی بلاست تحت اثرات القای فاکتورهایی است که توسط سلول‌های خارج رویانی ترشح می‌شوند. سلول‌های زایای بدوی مسئول ادامه و تکامل گونه می‌باشند. از این رو ایجاد راهی جهت تمایز و استخراج سلول‌های زایا از منابع سلولی مختلف در محیط کشت روشی با ارزش جهت انجام تحقیقات، تشریح ژنتیکی تکامل سلول‌های زایا، ارزیابی مسائل اپی ژنتیک و درمان ناباروری می‌باشد. مهم‌ترین قسمت در تمایز یک سلول خاص شامل ایجاد شرایط کشت مناسب، تشخیص و خالص سازی سلول‌های تمایز یافته می‌باشد. تاکنون چندین گزارش مبنی بر تمایز سلول‌های زایای بدوی در محیط کشت ارائه شده است. به منظور تشخیص این سلول‌ها در محیط کشت، از شاخص‌هایی که در PGC ها به طور اختصاصی بیان می‌گردند استفاده می‌شود. به علاوه از عملکرد سلول‌های زایا نظیر تولید یک موجود زنده نیز برای این منظور می‌توان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سلول زایای بدوی، تمایز، تکثیر

مقدمه

چرخه تکامل سلول‌های زایای بدوی موش در محیط In vivo

در طی سیکل زندگی سلول‌های زایای بدوی سه مرحله اساسی قابل تشخیص است: ۱- اختصاصی شدن ۲- مهاجرت و تکثیر ۳- تکامل وابسته به جنس در زمان قبل و بعد از تولد (۱).

سلول‌های زایای بدوی در شرایط درون بدن از سلول‌های اپی بلاست ایجاد می‌شوند (۲). سلول‌های اپی بلاست از توده سلولی بلاستوسیست مشتق شده و پیش ساز تمامی سلول‌های تشکیل دهنده جنین می‌باشند. در موش، پتانسیل تکاملی تمامی سلول‌های اپی بلاست تا روز ۶ بعد از جفت گیری ظاهراً یکسان بوده و تمامی سلول‌ها توانایی ورود به رده سلول‌های زایا را دارا می‌باشند. اما پیدایش ویژگی‌های خاص هر منطقه در اپی بلاست درست کمی قبل از شروع پدیده گاسترولاسیون، منجر به اختصاصی شدن هر منطقه شده، به نحوی که تنها سلول‌هایی که به طور مستقیم در مجاورت اکتودرم خارج رویانی قرار دارند توانایی شرکت در رده سلول‌های زایا را کسب می‌نمایند. فرآیند اختصاصی شدن منطقه‌ای در اپی بلاست تحت اثرات القایی فاکتورهایی است که توسط سلول‌های خارج رویانی ترشح می‌شوند. از جمله فاکتورهای موثر در اختصاصی شدن سلول‌های زایا، پروتئین شکل دهنده استخوان Bone Morphogenetic Protein4 (BMP4) می‌باشد (۳ و ۴). BMP4 از اعضای خانواده فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده بتا Transforming Growth Factor-β (TGF-β) است کـه توسط مزودرم خارج رویـانی تولید شده (۵) و بـه گیرنده‌هـای R-smad و Alk3 در سطح سلول‌های زایای بدوی اتصال می‌یابد. این امر سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی و بیان ژن‌های خاص سلول‌های زایای بدوی می‌گردد (۶). فاکتور مذکور، سبب تشدید بیان ژن Fragilis در منطقه پروگزیمال اپی بلاست می‌گردد. بیان این ژن اولین مرحله در متعهد شدن سلول برای تولید رده سلول زایا می‌باشد (۷). در حدود روز ۷ بعد از جفت گیری و درست کمی بعد از شروع گاسترولاسیون، سلول‌های زایای احتمالی توانایی واکنش به BMP4 را از دست داده و گروهی از سلول‌های بیان کننده Fragilis که به مزودرم خارج رویانی مهاجرت نموده‌اند ژن stella را بیان می‌نمایند. این سلول‌ها اولین جمعیت از سلول‌های زایای جنینی هستند که سلول‌های زایای بدوی نامیده شده و بر اساس واکنش فسفاتاز قلیایی مثبت قابل تشخیص می‌باشند. در طی این فرآیند، بیان ژن Oct-4 که مرتبط با خاصیت پرتوانی (Pluripotency) است به سلول‌های رده زایا محدود شده و در سلول‌های رده سوماتیک خاموش می‌شود (۸). در این زمان، سلول‌های زایای بدوی موجود در فضای خارج رویانی به داخل بدن جنین برگشته و از طریق روده خلفی به ستیغ تناسلی (بیضه یا تخمدان آینده) مهاجرت می‌نمایند. این مهاجرت همراه با تکثیر بوده و در طی آن، این سلول‌ها در تماس با طیف گسترده‌ای از سلول‌های سوماتیک می‌باشند که ممکن است سبب ایجاد تغییراتی در سلول‌های زایای بدوی گردند (۱۱-۹). مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در روز ۱۱/۵ بعد از جفت گیری پایان یافته و در این زمان سلول‌ها شروع

* **نویسنده مسئول:** گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، فسا، ایران.
تلفن: ۲۲۲۰۹۹۴ ـ ۰۷۳۱ Email: majidnaghdi@yahoo.com

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

به بیان ژن Mvh (VASA) می‌نمایند. Mvh شاخص ویژه سلول‌های زایای پس مهاجر (واژه معادل انگلیسی) می‌باشد (۱۲). هم‌زمان با قابل تشخیص شدن بیضه و تخمدان از نظر ریخت شناسی در روز ۱۳/۵ بعد از نزدیکی، سلول‌های زایای بدوی روند تکامل وابسته به جنس را شروع می‌نمایند (۱۳ و ۱۴). در جنس مؤنث، این سلول‌ها پس از ورود به مرحله تقسیم میوز در فاز پروفاز میوز ۱ توقف نموده و پس از بلوغ در پدیده تولید فولیکول به صورت دوره‌ای فعال می‌شوند. در حالی که در جنس مذکر این توقف در مرحله تقسیم میتوز بوده و این سلول‌ها پس از بلوغ در فرآیند اسپرم زایی فعال می‌گردند. اسید رتینوئیک در هر دو جنس در مزونفروز تولید و در تنظیم تصمیم گیری سلول‌های زایای پس مهاجر جهت ورود به مرحله میوز و یا توقف در مرحله میتوز نقش اساسی دارد (۱۷-۱۵). بیان آنزیم Cyp26b1 در سلول‌های سوماتیک ستیغ تناسلی در جنس مذکر سبب تخریب اسید رتینوئیک و ممانعت از ورود سلول‌های زایای بدوی پس مهاجر به مرحله تقسیم میوز می‌گردد. در جنس مؤنث آنزیم مذکور بیان نشده و در نتیجه سلول‌های زایای بدوی وارد مرحله میوز می‌گردند. تحقیقات نشان داده است که اسید رتینوئیک در محیط In vitro، سبب تحریک تکثیر میتوزی سلول‌های زایای بدوی تا روز ۱۳/۵ بعد از نزدیکی می‌گردد (۱۸). تکامل سلول‌های زایای هر جنس علاوه بر تأثیرپذیری از اسید رتینوئیک، تحت تأثیر محیط سوماتیک گنادها نیز می‌باشد (۱ و ۱۹ و ۲۰).

شاخص‌های مولکولی سلول‌های زایای بدوی: تخصصی شدن سلول‌های زایای بدوی مستلزم عملکرد BMP ها می‌باشد. همان گونه که قبلاً ذکر گردید، BMP4 از اعضای این خانواده در تشکیل PGC دخیل است. فاکتور مذکور از طریق گیرنده‌های R-smad و Alk3 موجود بر سطح سلول‌های زایای بدوی سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی و بیان ژن‌های خاص PGC می‌گردد (۶). در همین زمان، اینترفرون سبب القای بیان خانواده ژن‌های Fragilis (Fragilis2,3) در سلول‌های زایای بدوی می‌گردد. محصول این ژن پروتئینی تراغشایی است که به نظر می‌رسد در کسب قابلیت سلول زاینده توسط سلول‌های اپی بلاست نقش دارد (۲۱ و ۲۲).

سلول‌های زایای بدوی پروتئین c-kit را به میزان نسبتاً زیادی بیان می‌نمایند. در موش این ژن از طریق دو محصول مختلف tr-kit و SCF نقشی دوگانه در کنترل باروری جنس مذکر بر عهده دارد. محصول اول گیرنده تیروزین کیناز است که یک گیرنده تراغشایی برای فاکتور SCF می‌باشد. این فاکتور در تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه پس از تولد نقش دارد. محصول دوم، پروتئین درون سلولی tr-kit است که به طور ویژه در طول فرآیند اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد (۲۳).

همان گونه که قبلاً ذکر شد، بیان ژن Fragilis نیز در سلول‌های زایای بدوی مهاجر افزایش می‌یابد. این امر سبب القای بیان سایر ژن‌های وابسته به سلول زایا نظیر Stella (PFC7 یا DPPa3) و Mvh (VASA) می‌گردد. VASA یک پروتئین سیتوپلاسمیک و محصول ژن VASA homolog است که بیان آن توسط سلول‌های سوماتیک ستیغ تناسلی القا می‌شود و تا زمان تشکیل سلول‌های زایای پس میوزی باقی می‌ماند. از این رو، جهش در این ژن منجر به نقص در تکثیر و تمایز سلول‌های زایای بدوی می‌گردد (۲۲).

اعضای خانواده DAZ (خانواده ژنی حذف شده در آزوسپرمیا) که به عنوان شاخص‌هایی برای تشخیص سلول زایا به کار می‌روند نیز به طور گسترده و انحصاری در سلول‌های زایا بیان می‌شوند. یکی از پروتئین‌های محصول این ژن تقریباً در تمام مدت حیات سلول‌های زایا بیان می‌شود و برای تکامل سلول زایای بدوی و نیز تمایز و بلوغ سلول‌های زایای رده‌های بعدتر از PGC مورد نیاز است (۲۴). از شاخص‌های دیگر PGC ها، آنتی ژن جنینی ویژه مرحله-۱ (SSEA1) و فاکتور رونویسی Oct3/4 را می‌توان نام برد. بیان Oct3/4 که در ایجاد فنوتیپ پرتوانی یا توتی پوتنسی اهمیت دارد، بعد از مرحله گاسترولاسیون به PGC ها محدود می‌شود (۲۷-۲۵). همچنین مشخص شده است که PGC دارای میزان بالایی از فعالیت آلکالین فسفاتاز غیراختصاصی بافتی می‌باشد (۲۸). بیان این شاخص پس از تمایز PGC ها کاهش می‌یابد (۲۹). سایر مارکرها برای سلول زایای بدوی متعلق به خانواده piwi بوده و شامل mivi و mili (Piwil2) می‌باشد که تولید PGC و اسپرم زایی را تنظیم می‌نمایند (۳۰). به علاوه ژن mil1 در مرحله تمایز PGC در حدود روز ۶/۵- ۷/۵ بعد از نزدیکی و mil2 در حدود روز ۹/۵-۱۳/۵ بعد از نزدیکی بیان می‌شود (۳۱). ژن Piwil2 بیان شاخص‌های سطحی سلول اسپرماتوگونی از قبیل اینتگرین آلفا ۶، CD9 و CD90 (Thy-1) و مارکرهای ویژه سلول اسپرماتوگونی از جمله Stra8 و Hsp90a که دارای نقش اساسی در تمایز سلول زایا می‌باشند را کنترل می‌نماید (۳۲). سایر شاخص‌هایی که در PGC شناسایی شده‌اند شامل مارکرهای سطحی از قبیل اینتگرین 6α و β 1 می‌باشند که بیان آن‌ها در موش در تمامی مراحل سلول‌های زایا از زمان جنینی تا حیوان بالغ ادامه دارد و به تدریج تا مرحله سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افزایش می‌یابد (۳۳ و ۳۴). ژن Stra8 نیز به عنوان یک نشانگر مولکولی برای PGC است. این شاخص در سلول‌های زایای موش از مرحله جنین ۱۴/۵روزه تا سلول‌های اسپرماتوگونیا بیان می‌شود. بیان این ژن در زمان جنینی محدود به گنادهای در حال تکامل جنس مذکر و در بیضه افراد بالغ محدود به سلول‌های زایایی می‌باشد که در مرحله قبل از تقسیم میوز قرار دارند (۳۵).

تمایز سلول‌های زایای بدوی در محیط کشت و عوامل مؤثر بر آن: تمایز و استخراج سلول‌های زایا از منابع سلولی مختلف در محیط In vitro روشی با ارزش جهت انجام تحقیقات، تشریح ژنتیکی تکامل سلول‌های زایا، ارزیابی مسائل اپی ـ ژنتیک و درمان ناباروری می‌باشد. مهم‌ترین قسمت در تمایز یک سلول خاص شامل ایجاد شرایط کشت مناسب، تشخیص و خالص سازی سلول‌های تمایز یافته می‌باشد (۳۶). در سال‌های اخیر چندین مطالعه در زمینه تمایز سلول زایا در محیط In vitro ارائه شده است (۳۷-۵۴). گروه‌های متعددی نشان دادند که BMP4 به طور ویژه جهت تمایز سلول‌های زایا در موش مورد نیاز می‌باشد (۵، ۴۱، ۶۲ - ۵۵).

مطالعات Ying در سال ۲۰۰۱ افزایش تعداد سلول‌های زایای بدوی را پس از استفاده از سیستم هم کشتی سلول‌های اپی ـ بلاست جنین ۶-۶/۲۵ روزه با سلول‌های Cos7 تولید کننده BMP8b و BMP4 به مدت ۷۲ ساعت نشان داد. این امر تأیید کننده نقش پروتئین BMP4 در کمک به سلول‌های اپی بلاست جهت کسب ظرفیت تبدیل شدن به سلول زایا می‌باشد (۵۷). Hayashi و همکاران در مطالعات خود، اپی بلاست جدا

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

شده از جنین‌های ۷/۵ و ۸/۵ روز را بر روی سلول‌های STO تیمار شده با میتومایسین C و در حضور غلظت های مختلف BMP4 (۱۰۰-۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر) کشت دادند. بررسی‌ها پس از ۹۶ ساعت از کشت فعالیت آلکالین فسفاتازی مثبت که شاخص PGCها می‌باشد را نشان داد (۵۹). تحقیقات Lawson در سال ۱۹۹۹ با استفاده از فعالیت آلکالین فسفاتازی نشان داد که جهش در ژن تولید کننده پروتئین BMP4 در سلول‌های اپی بلاست جنین‌های ۷/۵-۹/۵ روزه، منجر به عدم تشکیل سلول‌های زایای بدوی خواهد شد. همچنین این جهش عدم تشکیل آلانتوئیس و بافت‌های مشتق شده از مزودرم خارج رویانی را نیز در پی داشت که نشان می‌دهد BMP4 در مراحل قبل از گاسترولاسیون در اکتودرم خارج رویانی و سپس در مزودرم خارج رویانی پوشاننده آلانتوئیس بیان شده و برای تشکیل PGC مورد نیاز می‌باشد (۵۶). در سال ۲۰۰۲، Pesce و همکاران سلول‌های اپی بلاست را از جنین‌های ۵-۶/۵ روزه جدا نمودند و آن‌ها را در ظروف کشت پوشیده شده با کلاژن تیپ IV یا فیبرونکتین و در حضور BMP4 با غلظت ۱۰۰ ng/ml کشت دادند. پس از گذشت ۲ روز از کشت، فعالیت آلکالین فسفاتازی مشاهده گردید که موید تمایز سلول‌های زایای بدوی تمایز یافته از سلول‌های اپی بلاست می‌باشد (۵۸). به دنبال این مطالعات، Toyooka و همکاران تمایز سلول‌های زایای مذکر از اجسام شبه جنینی را گزارش نمودند. در این بررسی از سلول‌های بنیادی جنینی حامل ساختار Mvh-reporter استفاده شد و بیان Mvh به عنوان یک شاخص ویژه برای سلول‌های زایا مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که ۳ روز بعد از تشکیل خودبه خودی اجسام شبه جنینی، سلول‌های بیان کننده Mvh پدیدار می شوند. این نتایج حضور سلول‌هایی با خصوصیت سلول‌های زایای بدوی پس مهاجر را در اجسام شبه جنینی نشان می‌دهد. در ادامه، سلول‌های Mvh مثبت تخلیص و با سلول‌های ستیغ تناسلی مذکر کشت داده شد. تجمعات سلولی حاصل در زیر کپسول بیضه های موش بالغ کاشته شد. بررسی‌ها تشکیل لوله‌های منی سازی که به طور کامل از فرآیند اسپرماتوژنز حاصل از سلول‌های تخلیص شده حمایت می کرد را نشان داد. در این تحقیق همچنین از مواجهه اجسام شبه جنینی با سلول‌های تولیدکننده BMP4 استفاده شد که منجر به ظهور سلول‌های Mvh مثبت پس از گذشت ۲۴ ساعت گردید. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اختصاصی شدن رده زایا و ظهور سلول‌های زایای بدوی می‌تواند به طور خود به خود یا القایی در اجسام شبه جنینی اتفاق بیفتد (۲۲ و ۳۷).

نتایج ارزیابی‌های مولکولی و ایمونوسیتوشیمی گروه ما نیز پیشنهاد می‌کند که BMP4 به عنوان یک القا کننده موثر و توانا در تمایز PGC از سلول‌های بنیادی جنینی موش می‌باشد. در این مطالعه بیان میزان بالاتری از mRNA و پروتئین Mvh در گروه تیمار شده با BMP4 نشان می‌دهد که افزودن BMP4 به محیط کشت قادر به پیشبرد تمایز سلول زایای بدوی از سلول بنیادی جنینی می‌باشد (۵۵). این نتایج تأییدی بر یافته‌های سایر محققین در زمینه نقش BMP4 برای تمایز سلول زایای بدوی بود (۵، ۵۹-۵۶ و ۶۳).

Chang در تحقیقات خود نشان داد که Smad5 برای پاسخگویی به سیگنال‌های BMP4 جهت تولید PGC ضروری است و در یک روش وابسته به غلظت بر تعداد این سلول‌ها تأثیر گذار است (۶۴). Hayashi نیز نشان داد که Smad1 برای شروع پیشبرد سلول‌ها به سمت رده سلولی زایا از اپی بلاست لازم است و جهش در Smad1 منجر به عدم تولید PGC می‌گردد. وی نشان داد که در محیط In vitro تمایز در حضور BMP4 به طور کامل وابسته به حضور Smad1 فسفوریله داشته و بیان هم‌زمان Smad1,5,8 برای تولید سلول‌های زایا از اپی بلاست ضروری می‌باشد (۵۹). BMP4 سبب افزایش فسفوریلاسیون Smad1 در سلول‌های بنیادی جنینی می‌گردد (۶۵). این فاکتور از طریق اتصال به گیرنده‌های خود و به دنبال آن فسفوریلاسیون Smad1,5,8 و فعال شدن Smad4، سبب القای بیان ژن‌های هدف BMP4 نظیر Id1 و Kit1 می‌گردد. Id1 تمایز سلول‌های PGC و Kit1 نیز بقا و تکثیر PGC را کنترل می نماید. به نحوی که جهش در این ژن ها منجر به از دست رفتن کامل PGC در طی تکامل می‌شود (۵۸، ۵۹ و ۶۶-۶۳). نتایج مولکولی مطالعات ما همچنین نشان داد که میزان بالاتری از ژن‌های ویژه سلول زایا در سیستم کشت ساده نسبت به سیستم‌های هم کشتی بیان می‌شوند که پیشنهاد می کند که استفاده از فیبروبلاست جنینی موش و STO به عنوان لایه تغذیه کننده تأثیری بر تمایز سلول زایای بدوی ندارد (۵۵).

Geijsen در سال ۲۰۰۴ تحقیقات خود را در زمینه تولید گامت از سلول‌های بنیادی جنینی موش با استفاده از اجسام شبه جنینی انجام و پدیدار شدن خود به خود سلول‌های زایای بدوی مذکر در محیط In vitro را گزارش نمود. وی در بررسی‌های خود بیان ژن‌های خاص سلول‌های زایا را در سلول‌های بنیادی جنینی موش و در اجسام شبه جنینی در روز های ۹-۳ مورد قرار داده و سلول‌ها را بر اساس مارکر سطحی SSEA1 جدا نمود (۳۸، ۶۷). Geijsen در ادامه بررسی‌ها نشان داد که اسید رتینوئیک سبب تکثیر سلول زایای بدوی می‌گردد. بدین ترتیب که سلول‌های بنیادی جنینی یا سلول مشتق شده از اجسام شبه جنینی را بر روی یک لایه سلولی تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش و در حضور اسید رتینوئیک به مدت ۷ روز کشت داد. وی نشان داد که پس از پایان مدت کشت تمامی جمعیت سلولی SSEA1 مثبت، سلول زایای بدوی می‌باشند. سلول‌های زایای تمایز یافته شاخص‌های متیلاسیون نظیر ژن‌های Igf2r و H19 را بیان نموده و نیز فعالیت آلکالین فسفاتازی را دارا بودند (۳۸، ۶۸ و ۶۹).

مطالعات جدیدتر در سال های اخیر توسط نیرنیا و همکاران تولید سلول‌های زایای مذکر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش و سلول‌های کارسینومای جنینی تحت اثرات القایی اسید رتینوئیک را نشان داده است (۴۴ و ۴۵). در مطالعه سلول‌های کارسینومای جنینی، سلول‌های F9 ECC با اسید رتینوئیک تیمار و سلول‌های کشت داده شده به درون تخمک تزریق گردید که منجر به تولید ساختارهای شبه مورولا شد. سلول‌های کشت داده شده به درون بیضه موش های نابارور نیز پیوند زده شد و توانایی آن‌ها برای احیای اسپرم زایی بررسی گردید. روش‌های بررسی شامل آنالیز سیتومتری سلول‌های هاپلوئید و ارزیابی پیوند جهت کشف فعالیت سلول‌های زایا در احیای اسپرم زایی بود. نتایج نشان داد که هرچند احیای اسپرم زایی کامل نبوده است اما بیان ژن‌های سلول‌های زایای قبل از میوز نظیر DAZL در پیوند دیده شد (۴۴ و ۴۵). گروه تحقیقاتی فوق همچنین سلول‌های بنیادی مغز استخوان را از موش ترانس ژنیک استخراج نمودند و فرآیند تمایز را در این سلول‌ها نیز بررسی نمودند. سلول‌های بنیادی زایای تمایز یافته به طور اختصاصی EGFP را بیان می‌کردند. به دنبـال کشت دو هفته‌ای این سلول‌ها در محیط حاوی

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

اسید رتینوئیک، بیان شاخص های Mvh، Stella، Fragilis و Rnf17 که در مراحل اولیه رشد سلول‌های بنیادی زایای بدوی بیان می‌گردند نیز مشاهده گردید. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید قادر به تمایز به سلول‌های زایا می باشند (۴۵).

توانایی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی برای ورود به رده زایا نیز به وسیله Clark و همکاران بررسی گردید. این محققین گزارش کردند که برخی از سلول‌ها که به صورت اتفاقی در اجسام شبه جنینی پراکنده شده‌اند شاخص‌های ویژه هر مرحله از تکامل سلول زایا نظیر Mvh و DAZL را بیان می‌نمایند. این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی جنینی انسانی هر دو جنس ممکن است به صورت خود به خود به سلول‌های زایا متمایز شوند (۴۰). مطالعات دیگری نیز در زمینه تمایز سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی گزارش شده است. این بررسی‌ها توسط Kee و همکاران در سال ۲۰۰۶ افزایش بیان شاخص‌های خاص سلول زایا (VASA و Sycp3) به دنبال افزودن BMP7، BMP4 و BMP8b به محیط کشت حاوی این سلول‌ها را نشان داده است (۴۱). Drusenheimer و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارشی مبنی بر تمایز سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسانی را ارائه نمودند که در آن از اسید رتینوئیک به مدت ۱۵روز استفاده شده بود. نتایج مولکولی بیان ژن‌های Stella، cyclinA2، Vasa، Piwil2، Fragilis، Oct-4 و c-kit که در سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش بدون دریافت اسید رتینوئیک بیان نشده و یا به میزان کمی بیان می‌شود را نشان داد. این در حالی که است که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان در حضور یا عدم حضور اسید رتینوئیک، ژن‌های مشابه با سلول‌های زایای بدوی را بیان می‌کنند بیان برخی از این ژن‌ها در حضور اسید رتینوئیک افزایش می‌یابد (۴۶).

تکثیر سلول‌های زایای بدوی در محیط In vitro: در طی مرحله دوم از تکامل سلول‌های زایای بدوی، سلول‌های اولیه‌ای که به عنوان سلول زایا شناخته می‌شوند شروع به مهاجرت از قاعده آلانتوئیس به سمت ستیغ تناسلی نموده و در این مسیر تکثیر می‌یابند. سلول‌های زایای بدوی دارای دوره محدودی از تکثیر در محیط In vitro می‌باشند و سپس به مرحله توقف رشد فرو می‌روند که این وقایع مشابه با سیر تکاملی آن‌ها در محیط In vivo می‌باشد (۷۰). تا به امروز سیستم‌های کشت متعددی جهت بقا و تکثیر PGC ها تثبیت شده است. جداسازی PGC از جنین‌های مراحل ۸/۵-۱۳/۵ روزه و کشت آن‌ها در سیستم‌های کشت مختلف امکان بررسی تأثیر فاکتورهای مختلف بر بقا و تکثیر این سلول‌ها را فراهم کرده است (۷۱ و ۷۲). در آزمایش‌های اولیه از محیط کشت‌های غنی شده با بافت‌های جنینی مختلف استفاده شد و مشاهده گردید که ستیغ تناسلی فاکتورهای محلولی را ترشح می‌کند که تعداد PGCها را افزایش می‌دهد (۷۳). نتیجه این تحقیق خالص سازی فاکتورهای رشد دارای اثرات مشابه با نمونه In vivo بود. یافته‌های مهمی که از نتایج کشت PGC به دست آمده از اپی بلاست و ستیغ تناسلی در محیط In vitro به دست آمده این است که این سلول‌ها در پاسخ به سیگنال‌هایی نظیر Leukemia inhibitory factor (LIF) و Stem cell factor (SCF) (۷۴-۷۷)، tumor necrosis (۷۸) (TNF)-α factor، فورسکولین و فاکتورهـای رشد beta fibroblast growth factor (bFGF)، Macrophage Growth Factor (MGF) و Kit Ligand (KL) تکثیر می‌یابند (۷۸). بعلاوه، سیگنال‌های داخل سلولی القا شده توسط RA نیز نقش مهمی در تکثیر PGC دارد (۱۸). عملکرد تکثیری اسید رتینوئیک ممکن است از طریق القای سیگنال‌های ضد آپوپتوزی و یا کوتاه کردن سیکل سلولی در PGC باشد (۷۹). نقش تکثیری فاکتور Buffalo rat liver cell (BRL-CM) نیز توسط Kawase و همکاران اثبات شده است (۸۰). همچنین، افزایش بقا و تکثیر PGC های جدا شده از جنین‌های ۸/۵ تا ۱۰/۵ کشت داده شد بر روی لایه‌های تغذیه کننده مناسب نظیر سلول‌های STO (۸۱)، سلول‌های سرتولی رده TM4 (۸۲) و Sl/Sl4-m220 (۸۳) گزارش شده است. کشت PGC انسانی جداشده از ستیغ تناسلی جنین های ۷ تا ۸ هفته به مدت ۲ روز بر روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست و در حضور فورسکولین و لیگاند کیت نیز نتایج مثبتی را بر بقا و تکثیر این سلول‌ها داشته است (۸۴-۸۶). نتایج تحقیقات Geijsen حاکی از تأثیرات مثبت استفاده از RA بر تکثیر سلول زایای بدوی بود. وی سلول‌های زایای مشتق شده از اجسام شبه جنینی را برای ۷ روز در حضور RA و بر روی یک لایه سلولی تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش کشت داد. پس از ۷ روز تمامی جمعیت سلولی SSEA1 مثبت، سلول زایای بدوی بودند و فعالیت آلکالین فسفاتازی این سلول‌ها نیز مثبت بود (۳۸). Koshimizu نیز نشان داد که RA در محیط In vitro سبب تحریک تکثیر میتوزی PGC تا روز ۱۳/۵ بعد از نزدیکی می‌شود (۱۸). مطالعات West نیز نشان دهنده افزایش معنی دار بیان ژن های مراحل قبل، حین و بعد مهاجرت سلول زایای بدوی نظیر ژن و پروتئین Mvh در سیستم هم کشتی با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش به عنوان یک منبع سیگنالی جهت غنی سازی سلول‌های زایای مشتق شده از سلول بنیادی جنینی انسان بود (۸۷). تکثیر سلول‌های زایای مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسانی نیز توسط Drusenheimer و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارش شده است. آن‌ها در بررسی خود از RA به مدت ۱۵روز استفاده کردند. نتایج بررسی‌های مولکولی نشان دهنده افزایش بیان ژن‌های Oct-4 و Mvh بود (۴۶).

نتیجه گیری

انتخاب محیط کشت و مکمل‌های مناسب، تأثیر زیادی بر رشد و عملکرد سلول‌های جنینی در محیط خارج از بدن دارد (۸۸). تا به امروز سیستم‌های کشت متعددی در راستای ارتقای مطالعات ناباروری ابداع گردیده است (۸۹). هرچند که نتایج حمایت کننده از تولید سلول‌های زایای بدوی عملکردی در محیط In vitro گسترده نیست، اما این مطالعات نشان دهنده تلاش‌های در زمینه تولید و تشخیص این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد. با وجود تحقیقات انجام شده، انجام مطالعات گسترده‌تر جهت تشخیص شرایط صحیح

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

کشت شامل مکمل‌های تغذیه‌ای صحیح می‌تواند در تکامل مؤثرتر سلول‌های زایا کمک نماید (۹۰ و ۹۱). این سلول‌ها جهت انجام تحقیقات و درمان ناباروری بسیار با ارزش می‌باشند.

References

1. Nagano MC. In vitro gamete derivation from pluripotent stem cells: progress and perspective. Biol Reprod. 2007;76:546-551.
2. Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:246-250.
3. Anderson A, Copel TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. Mech Dev. 2000;91:61-68.
4. De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cell. Reproduction. 2001;121:347-354.
5. Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic endoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. Dev Biol. 2001;232:484-492.
6. Surani MA, Ancelin K, Hajkova P, Lange UC, Payer B, Western P, et al. Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 2004;69:1-9.
7. Saitou M, Payer B, Lange UC, Erhardt S, Barton SC, Surani MA. Specification of germ cell fate in mice. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003;358:1363-1370.
8. Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, Geremia R, Dolci S. Developmental expression of BMP4/ ALK3/ SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: a potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. J Cell Sci. 2003;116:3363-3372.
9. Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. Nature. 2002; 418: 293-300.
10. Boiani M, Scholar HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6:872-884.
11. Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. Activin and TGF beta limit murine primordial germ cell proliferation. Dev Biol. 1999;207:470-475.
12. Maatouk DM, Resnick JL. Continuing primordial germ cell differentiation in the mouse embryo is a cell-intrinsic program sensitive to DNA methylation. Dev Biol. 2003;258:201-208.
13. Maatouk DM, Kellam LD, Mann MRW, Lei H, Bartolomei MS, Resnick JL. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. Development. 2006;133:3411-3418.
14. Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, et al. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:12258-12262.
15. Brennan J, Capel B. One Tissue, Two fates; molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet. 2004;5:509-521.
16. McLaren A. Germ and somatic cell linages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol. 2000;163:3-9.
17. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:2474-2479.
18. Koshimizu U, Watanabe M, Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. Dev Biol. 1995;168:683-685.
19. 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. 2011;18. [Article in press]
20. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Haron AW, Makoolati Z, Nowroozi MR. Effect of donor cells concentration on colonization of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. J Biol Sci. 2010;10(8):730-738.
21. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science. 2006;312:569-600.
22. Bowles J. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science. 2006;312:596-600.
23. Cairns LA, Moroni E, Levantini E, Clinger FG, Ronzoni S, Tatangelo L, et al. Kit regulatory element required for expression in developing hematopoietic and germ cell linages. Blood. 2003;102:3954-3962.
24. Tanaka SS, Matsui Y. Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like gene, during formation and differentiation of primordial germ cell. Mech Dev. 2002;119:261-267.
25. Yen PH. Putative biological functions of the DAZ family. Int JAndrol. 2004;27:125–129.
26. MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. Development. 1995;121:1487–1496.
27. Fox M, Damjanov I, Martinez-Hernandez A, Knowles BB, Solter D. Immunohistochemical localization of the early

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

embryonic antigen (SSEA-1) in post-implantation mouse embryos and fetal and adult tissues. Dev Biol. 1981;83:391–398.
28. Lee JH, Engel W, Nayernia K. Stem cell protein Piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes. Mol Reprod Dev. 2006;73:173-179.
29. Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, et al.Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonic cells. Development. 1996;122:881–894.
30. Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, et al. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. Mech Dev. 2002;113:91–94.
31. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, et al. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. Mech Dev. 2001;108:121–133.
32. Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse vasa-homologue protein during germ cell development. Mech Dev. 2000;93:139–149.
33. Pesce M, Scholer HR. Oct-4 control of totipotency and germ-line determination. Mol Reprod Dev. 2000;55:452–457.
34. Sandlow JI, Feng HL, Zheng LJ, Sandra A. Migration and ultra-structural localization of the c-kit receptor protein in spermato-genic cells and spermatozoa of the mouse. J Urol. 1999;161:1676–1680.
35. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analyses of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. Dev Biol. 2000;220:401–411.
36. Choi K, Chung YS, Zhang WJ. Hematopoietic and endothelial development of mouse embryonic stem cells in culture. Method Mol Med. 2005;105:359-368.
37. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:11457–11462.
38. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2004;427:148–154.
39. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science. 2003;300:1251–1256.
40. Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriquez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. Hum Mol Genet. 2004;13:727–739.
41. Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2006;15:831-837.
42. West JA, Park IH, Daley GQ, Geijsen N. In vitro generation of germ cells from murine embryonic stem cells. Nat Protoc. 2006;1:2026-2036.
43. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Dev Cell. 2006;11:125-132.
44. Nayernia K, Li M, Jaroszynski L, Khusainov R, Wulf G, Schwandt I, et al. Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. Hum Mol Genet. 2004;13:1451-1460.
45. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Notle J, Wulf G, Dressel R, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. Lab Invest. 2006;86:654-663.
46. Drusenheimer N, Wulf G, Nolte J, Ho Lee J, Dev A, Dressel R, et al. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;63:69-76.
47. Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, J.V. Medrano JV, Pellicer A, Simon C. Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. Hum Reprod Update. 2009;15:379–390.
48. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. Stem Cells. 2006;24:266-273.
49. Novak I, Lightfoot D.A, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Hoog C. Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. Stem Cells. 2006;24:1931–1936.
50. Dyce PW, Wen L, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. Nat Cell Biol. 2006;8:384-390.
51. Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. Mol Hum Reprod. 2007;13:11-20.
52. Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H, et al. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. Differentiation. 2007;75:902-911.
53. Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS, et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: implications for men with testicular failure. Am J Pathol. 2007;170:899–908.
54. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature. 1984;309:255–256.
55. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011;47:391-398.
56. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev. 1999;13:424–436.
57. Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:7858–7862.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

58. Pesce M, Klinger FG, De Felici M. Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by BMP4 signaling. Mech Dev. 2002;112:15-24.
59. Hayashi K, Kobayashi T, Umino T, Goitsuka R, Matsui Y, Kitamura D. SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. Mech Dev. 2002;118:99-109.
60- Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Effects of different doses of Bone Morphogenetic Protein 4 on viability and proliferation of CCE mouse embryonic stem cells. Yakhteh. 2009;11(1):29-34.
61. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Assessment of Piwil2 Gene Expression Pattern upon Germ Cell Development from Mouse Embryonic Stem Cell. Iran Red Cres Med J. 2009;11(4):408-413.
62. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Effects of Treatment with Bone Morphogenetic Protein 4 and Co-culture on Expression of Piwil2 Gene in Mouse Differentiated Embryonic Stem Cells. Int J Fer Steril. 2009;3(2):80-85.
63. Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, Chytil A, Minowa O, Noda T, et al. BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. Dev Biol. 2000;221:249-258.
64. Chang H, Matzuk MM. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. Mech Dev. 2001;104:61-67.
65. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. Cell. 2003;115:281-292.
66. Dostchman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst derived embryonic stem cell line: formation of visceral yolk sac, Blood Island and myocardium. J Embryol Exp Morphol. 1985;87:27-45.
67. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. Genesis. 2003;35:43-56.
68. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. Mol Endocrinol. 2000;14:1053-1063.
69. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proc Natl Acad Sci USA. 1978;75:5565–5569.
70. Nakatsuji N, Chuma S. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. Int J Dev Biol. 2001;45:541-548.
71. DeFelici M. In vitro culture systems for germ cells from mouse embryo: primordial germ cells and oocytes. Adv Exp Med Biol. 1998;444:41-47.
72. DeFelici M. Isolation and culture of germ cells from mouse embryo. In Celis JC (ed) Cell Biology: A Laboratory Handbook. 2nd ed. Academic Press:1998.P.73-85.
73. Godin I, Wylie CC, Heasman J. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development. 1990;108:357-363.
74. De Felici M, Dolci S. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev Biol. 1991;147:281-284.
75. Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, et al. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. Nature. 1991;352:809-811.
76. Godin I, Deed R, ooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie C. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature. 1991; 352:807-809.
77. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Wil

liams D, Zsebo K, et al. Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature. 1991;353:750-752.
78. Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K, Nakatsuji N. Tumor necrosis factor-b (TNF-b) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Dev Biol. 1994;161:91-95.
79. Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). Development. 1993;118:1089-1094.
80. Kawase E, Shirayoshi Y, Hashimoto K, Nakatsuji N. A combination of buffalo rat liver cell-conditioned medium, forskolin and membranebound stem cell factor stimulates rapid proliferation of mouse primordial germ cells in vitro similar to that in vivo. Devel Growth Differ. 1996;38:315-322.
81. Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behavedifferently in culture. Cell. 1986;44:831-838.
82. De Felici M, Dolci S. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev Biol. 1991;147:281-284.
83. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Williams D, Zsebo K, et al. Effect of steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature. 1991;353:750-752.
84. Goto T, Holding C, Daniels R, Salpekar A, Monk M. Gene expression studies on human primordial germ cells and preimplantation embryos. Ital J Anat Embryol. 2001;106:119-127.
85. Castrillion DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:9585-9590.
86. De Felici M, Scaldaferri ML, Lobascio M, Iona S, Nazzicone V, Klinger FG, et al. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. Hum Reprod Update. 2004;10:197-206.
87. West FD, Machacek DW, Boyd NL, Pandiyan K, Robbins KR, Stice SL. Enrichment and differentiation of human germ-like cells mediated by feeder cells and Basic fibroblast growth factor signaling. Stem Cells. 2008;26:2768-2776.
88. Mather JP. Making informed choices: medium, serum, and serum-free medium. How to choose the appropriate medium and culture systems for the model you wish to cre-

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

ate. Meth Cell Biol. 1998;57:19-30.
89. Vanroose G, Van Soom A, de Kruif A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. Reprod Dom Anim. 2001;36:25-28.
90. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. Fertil Steril. 2000;73:435–442.
91. Oishi K, Barchi M, Au AC, Gelb BD, Diaz GA. Male infertility due to germ cell apoptosis in mice lacking the thiamin carrier, Tht1. A new insight into the critical role of thiamin in spermatogenesis. Dev Biol. 2004;266:299–309.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]

Review Article

Review of Differentiation and Proliferation of Primordial Germ Cells in Culture

Makoolati Z, Naghdi M*

Department of Anatomy, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

Abstract

Primordial germ cells (PGCs) are highly specialized cell population that arises from the epiblast in vivo. There are three critical steps in the life cycle of these cells:
1-Specification 2-migration and proliferation 3-prenatal and postnatal sex specific development. Specification of germ cells in epiblast occurs due to signals secreted from extraembryonic tissues. Primordial germ cells are required for continuation and development of the species. Thus, differentiation and purification of these cells from different cell sources is valuable for research, genetical analysis of germ cell development, epigenetic eveluation and infertility treatment. The most important part in the germ cell differentiation includes; optimum media selection, distinguishing and purification of differentiated cell. Several studies about in vitro PGC differentiation have been reported. In order to distinguish PGCs in vitro, specific markers which are expressed in these cells are used. Furthermore, functional ability of these cells for production of offspring can be employed for this purpose.

Keywords: Primordial germ cell, Differentiation, Proliferation

* **Corresponding author: Naghdi Majid**, Department of Anatomy, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.
Tel: +987312220994
E-mail: majidnaghdi@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences/ Dec 2011/ Vol.1/ No.3/ P 107-115

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2022-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2011.1.3.1.2]