The effect of BMP4 on mouse embryonic stem cell proliferation and differentiation into primordial germ cells

Ghasemi Hamidabadi H [1], Nazm Bojnordi M [2], Azizi H [3], Rezaie N[4]

1. Associated Professor of Anatomy Sciences, Department of Anatomy and Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2278-6503

2. Assistant Professor of Anatomy, Department of Anatomy and Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-1133542429, Email: bojnordim@yahoo.com, ORCID ID: 0000-0003-1176-2417

3. Assistant Professor of Cell Biology, Department of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

4. Associated Professor of Anatomy Sciences, Department of Anatomy and Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Artificial gamete production from stem cells is a novel strategy for treatment of infertility. Among various stem cell sources, embryonic stem cells (ESC) can be considered as an appropriate source for in vitro formation of germ cells. In this study we evaluated the effect of BMP4 on proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells into primordial germ cells (PGCs).

Materials and Methods: Embryonic stem cells (ESC) were cultured in ES medium. At first, embryoid bodies (EBs) were formed by hanging drop method, and then were differentiated into primordial germ cells at different concentrations of BMP4 (10, 50 and 100 ng/ml). The viability and proliferation rate of treated cells with BMP4 were evaluated by MTT assay. The EBs were cultured in induction medium. Expression of Oct4 ،Stella and Mvh genes were evaluated by real time PCR.

Results: In the group treated with BMP4 for 7 days, maximum cell viability was detected at the concentration of 10ng/ml. But the groups treated with100ng/ml of BMP4 showed minimum cell viability. Maximum expression of *Stella* and *Mvh* genes were detected at the concentration of 10ng/ml of BMP4 in the treated group.

Conclusion: The results showed that BMP4 can promote proliferation and differentiation of ES *in vitro*. Also different concentrations of BMP4 showed different effects on in vitro differentiation of ES into germ cells.

Keywords: Embryonic stem cells, Proliferation, Primordial germ cells, Viability, Embryoid Bodies

Received: Jan 7, 2019 **Accepted:** June 30, 2019

How to cite the article: Ghasemi Hamidabadi H, Nazm Bojnordi M, Azizi H, Rezaei N. The effect of BMP4 on mouse embryonic stem cell proliferation and differentiation into primordial germ cells. SJKU 2019;24(3):110-120.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / مرداد و شهریور ۱۳۹۸/۱۲۰-۱۱۰

تاثیر BMP4 بر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی جنینی به سلول های زایای بدوی در شرایط آزمایشگاهی

هاتف قاسمی حمیدآبادی[۱]، مریم نظم بجنوردی[۲]، حسین عزیزی[۳]، نورالله رضایی[۴]

۱. دانشیار علوم آناتومی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. شناسه ارکید: ۶۵۰۳-۲۲۷۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. استادیار آناتومی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (مولف مسئول)، تلفن ثابت: ۳۳۵۴۲۴۲۹-۰۱۱، پست الکترونیک: bojnordim@yahoo.com، شناسه ارکید: ۲۴۱۷-۱۱۷۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استادیار زیست شناسی سلولی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه فناوریهای نوین پزشکی ، آمل، ایران.

۴. دانشیار علوم آناتومی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: تولید آزمایشگاهی گامت از سلول های بنیادی به عنوان یکی از گزینه های جدید درمانی نابـاروری، مطـرح مـی باشد. در این راستا، استفاده از سلول های بنیادی جنینی جهت تولید سلول های زایا در شرایط آزمایشگاهی گزینه مناسبی به نظر می رسد. دراین تحقیق تاثیر BMP4 در القائ تمایز و تکثیر سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی بررسی شد.

روش بررسی: سلول های بنیادی جنینی موشی در محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند. در مرحله بعد اجسام شبه جنینـی بـر اساس روش قطرات آویزان ایجاد شدند. جهت القای تمایز سلولی از غلظت های کم (۱۰ ng/ml)، متوسط (۵۰ ng/ml) و بـالا (۱۰۰ ng/ml) BMP4 استفاده شد. به منظور تاثیر غلظت های مختلف BMP4 بر درصد زنده بودن و تکثیر سلولی از آزمـون متیل تیازول تترازولیوم استفاده شد. اجسام شبه جنینی در محیط تمایزی کشت داده شدند و سپس با جمع آوری آنها در گروه های مربوطه، بیان ژن های Oct4، Stella و Mvh با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین درصد زنده مانی در گروهی که به مدت هفت روز بـا غلظـت ng/ml BMP4 ۱۰ کشت داده شد مشاهده شد ولی گروه های که غلظت ۱۰۰ BMP4 ng/ml را دریافت نموده اند کمترین درصد زنده مانی را نشان دادند. همچنین بیشترین میزان بیان مارکرهای سلول های زایای بدوی نظیر Mvh و Stella در گروه تیمار شده به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 به مدت ۴ روز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری : یافته ها ی این تحقیق نشان می دهد BMP4 نقش مهمی در تمایز سلول های زایای بدوی از سـلول هـای بنیـادی جنینی در شرایط in vitro دارد. غلظت های مختلف BMP4 تأثیرات متفاوتی بر عملکرد سلول های بنیادی جنینی طی تمـایز بـه سمت رده های جنسی زایا در شرایط آزمایشگاهی دارند.

کلید واژه ها: سلول های بنیادی جنینی، تکثیر، سلول های زایای بدوی، زنده مانی، اجسام شبه جنینی

وصول: ۹۷/۱۰/۱۷ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۳/۱۱ پذیرش: ۹۸/۴/۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

مقدمه

پیشرفت های نوین درمان ناباروری مبتنی بر تکنیک های درمانی با استفاده از سلولهای بنیادی است. شناخت مکانیسم های ژنتیکی و تکاملی در تکثیر و تمایز سلول های زایای بدوی به گامت جنسی موثر بوده بوده و از این روش می توان جهت درمان ناباروری بیماران استفاده کرد (۱). تولید آزمایشگاهی گامت از سلول های بنیادی در دو دهه گذشته، به عنوان یکی از گزینه های درمانی در زمینه طب تولید مثل مطرح شده است. یکی از انواع این سلول ها سلول های بنیادی جنینی جهت تولید سلول های زایای جنسی می باشد (۳ و۲).

جهت متمایز شدن سلول زایا از سلول های بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاهی وجود برخی فاکتورهای رشدی ضروری است. جهت تشخیص سلول های زایا در محیط آزمایشگاهی عمدتاً از مارکرهایی استفاده می شود که خاص سلول های زایا هستند (۵،۴).

در زمینه تمایز سلول های زایا از سلول های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی گزارشات محدودی وجود دارد به طور مثال درمطالعه ای سلول های بنیادی جنینی به سلول های شبه زایای بدوی متمایز شدند وشناسایی و غنی سازی سلول های تمایز یافته از مارکرهای Oct4,Vasa استفاده شد. (۷،۶).

مطالعات بعدی درباره تمایز سلول های زایا از سلول های بنیادی جنینی صورت گرفت. نتایج این تحقیق مشخص کرد که پس از هم کشتی سلول های زایای مشتق شده از سلولهای بنیادی جنینی با سلول های سوماتیک گناد و پیوند گامت بالغ تشکیل شد(۸).

در همین راستا محقیقین دیگر تمایز خودبخودی سلول های بنیادی جنینی انسان را به سلول های زایا گزارش کردند (۹). در تحقیق دیگری به منظور تمایز سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی از اسید رتینوئیک استفاده شد. اسید رتینوئیک سبب تمایز سلول های بنیادی جنینی به سلول های زایا و تکثیر آنها می گردد. سلول های بنیادی یا سلول های اجسام شبه جنینی در حضور اسید رتینوئیک به مدت ۷ روز بر روی یک لایه سلول های فیبروبلاست جنینی موش کشت داده شدند و پس از ارزیابی مارکر SSEA1 مشخص شد که تمامی سلول های بیان کننده SSEA1 ، سلول های زایای بدوی هستند (۱۰). هر چند که مطالعاتی در زمینه تمایز گامت جنسی از سلول های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است، اما به نظر می رسد که این سلول‌ها کفایت لازم را نخواهند داشت بنابراین به تکنیک ها و سیستم های کشتی نیاز است تا امکان دستیابی به گامت جنسی مطلوب تر در محیط کشت فراهم گردد. دراین تحقیق سعی شده که تاثیر BMP4 جهت القائ تمایز و تکثیر سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی استفاده شود.

روش بررسی

کشت سلول‌های بنیادی جنینی

در پژوهش فوق از رده سلول های بنیادی جنینی موشی استفاده شد. کشت سلول های بنیادی جنینی در محیط کشت DMEM حاوی سدیم پیروات وسرم Fetal) FCS (Calf Serum، پنی سیلین/ استرپتومایسین گلوتامکس، اسید آمینه غیر ضروری، بتا مرکاپتواتانول، فاکتور مهار کننده لوسمی انجام شد.

شکل گیری اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies):

جهت شکل گیری اجسام شبه جنینی از محیط فاقد LIF و روش قطرات آویزان استفاده شد. بدین ترتیب سوسپانسیون سلولی از سلول های بنیادی ایجاد و با شمارش سلولی، قطرات ۲۰ میکرولیتری در سه غلظت مختلف سلولی (۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰) بر روی درپوش دیش کشت قرار داده شدند. با برگرداندن درپوش بر روی دیش و قرار دادن آنها در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت، اجسام شبه جنینی تشکیل شدند. سپس اجسام شبه جنینی توسط میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی واقع شدند و برخی از شاخص ها از قبیل اقطار اجسام محاسبه شدند. بررسی ها نشان داد که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

مناسب ترین شرایط برای ایجاد اجسام شبه جنینی با کیفیت بالا، غلظت ۲۰۰۰ است(۱۱).

نحوه محاسبه اقطار و Ratio:

نسبت حجم به سطح اجسام شبه جنینی Ratio در نظر گرفته شد. بدین ترتیب در ابتدا با به کار گیری نرم افزار Image J اقطار بزرگ و کوچک اجسام شبه جنینی بر حسب میلی متر محاسبه شدند(۱۲).

تمایز سلول های بنیادی جنینی به سلول های زایای بدوی (PGCs) توسط فاکتور رشد BMP4:

طی مراحل مختلف تمایز سلولی از غلظت های کم (۱۰ ng/ml)، متوسط (۵۰ ng/ml) و بالا (ng/ml ۱۰۰BMP4) استفاده شد.

کشت EBs در غلظت های مختلف BMP4:

در این تحقیق از غلظت های مختلف BMP4 استفاده شد. بدین ترتیب که اجسام شبه جنینی در روز دوم (D2) جمع آوری شده و به پلیت های کشت سلولی ۲۴ خانه که حاوی غلظت های کم (۱۰ng/ml)، متوسط (۵۰ ng/ml) و بالا (۱۰۰ ng/ml) BMP4 بودند به مدت ۴ و ۷ روز منتقل شدند و دو گروه نیز فاقد BMP4 به عنوان گروه های کنترل در نظر گرفته شدند. بنابراین گروه های مورد مطالعه در این قسمت از تحقیق شامل:

کشت EBs در غلظت ۱۰ ng/ml BMP4 به مدت ۴ روز: گروه D4B10

کشت EBs در غلظت ۵۰ ng/ml BMP4 به مدت ۴ روز: گروه D4B50

کشت EBs در غلظت ۱۰۰ ng/ml BMP4 به مدت ۴ روز: گروه D4B100

کشت EBs در عدم حضور BMP4 به مدت ۴ روز: گروه D4B0 (گروه کنترل)

کشت EBs در غلظت ۱۰ ng/ml BMP4 به مدت ۷ روز: گروه D7B10

کشت EBs در غلظت ۵۰ ng/ml BMP4 به مدت ۷ روز: گروه D7B50

کشت EBs در غلظت ۱۰۰ ng/ml BMP4 به مدت ۷ روز: گروه D7B100

کشت EBs در عدم حضور BMP4 به مدت ۷ روز: گروه D7B0 (گروه کنترل)

ارزیابی درصد زنده بودن (Viability) و تکثیر سلولی:

در مطالعه حاضر به منظور تاثیر غلظت های مختلف BMP4 بر درصد زنده بودن و تکثیر سلولی از آزمون متیل تیازول تترازولیوم Methyl Thiazolyl Tetrazolium (Sigma-Aldrich, MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا اجسام شبه جنینی در هر گروه جمع آوری شدند و با افزودن تریپسین- EDTA و پیپتاژ، سلول های منفردی از اجسام شبه جنینی تهیه گردید. پس از شمارش سلولی هر گروه توسط لام نئوبار، تعداد $۴/۸ \times ۱۰^{۴}$ سلول به چاهک های پلیت 96خانه منتقل شده و به مدت یک شب در انکوباتور قرار داده شدند. سپس با دور ریختن محیط کشت، ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر یک از چاهک ها اضافه گردیده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محلول MTT دور ریخته شده و توسط DMSO جایگزین گردید. سپس پلیت مذکور به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه بر روی Shaker قرار داده شد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Cytofluor 4000 plate reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts, USA) صورت گرفت. همچنین آزمایش ها سه بار تکرار شدند(۱۳).

ارزیابی کمی میزان بیان ژن های Oct4، Stella و Mvh طی تمایز

اجسام شبه جنینی در محیط تمایزی حاوی غلظت های کم، متوسط و بالا BMP4 به مدت ۴ و ۷ روز کشت داده شدند. سپس با جمع آوری آنها در گروه های مربوطه، بیان ژن های Oct4، Stella و Mvh با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا اجسام شبه جنینی در تمام گروه های مورد مطالعه جمع آوری شدند. سپس

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

RNA کل استخراج و پس از ساخت cDNA با روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

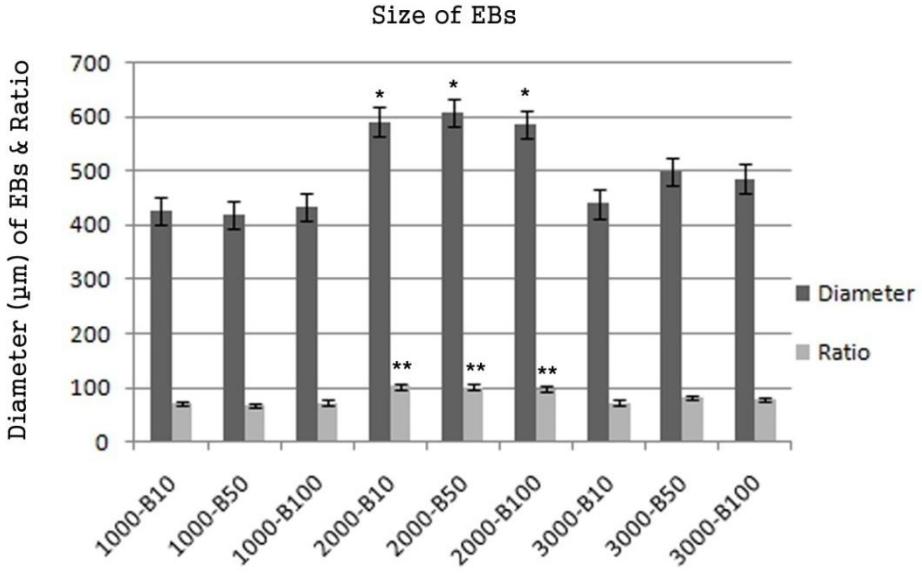
روش آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نوع ۱۳ بررسی و از تحلیل آماری آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. همچنین در ادامه از آزمون آماری Tukey Test نیز استفاده شد. p value ≤ ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

شکل گیری اجسام شبه جنینی در غلظت های مختلف سلولی

یافته های این بخش نشان داد که اختلاف معنی داری در اندازه و Ratio (f) اجسام شبه جنینی در گروه ۲۰۰۰ سلولی نسبت به سایر گروه ها یعنی ۳۰۰۰ سلولی و ۱۰۰۰ سلولی در هر قطره مشاهده شد (نمودار۱) p ≤ ۰/۰۵ value معنی دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۱: تاثیر هم زمان غلظت های مختلف سلولی و BMP4 بر اندازه اجسام سبه جنینی (EBs).

ارزیابی سلول های زایای بدوی تمایز یافته در حضور **غلظت های مختلف BMP4**

ارزیابی میزان زنده بودن (Viability) طی تمایز:

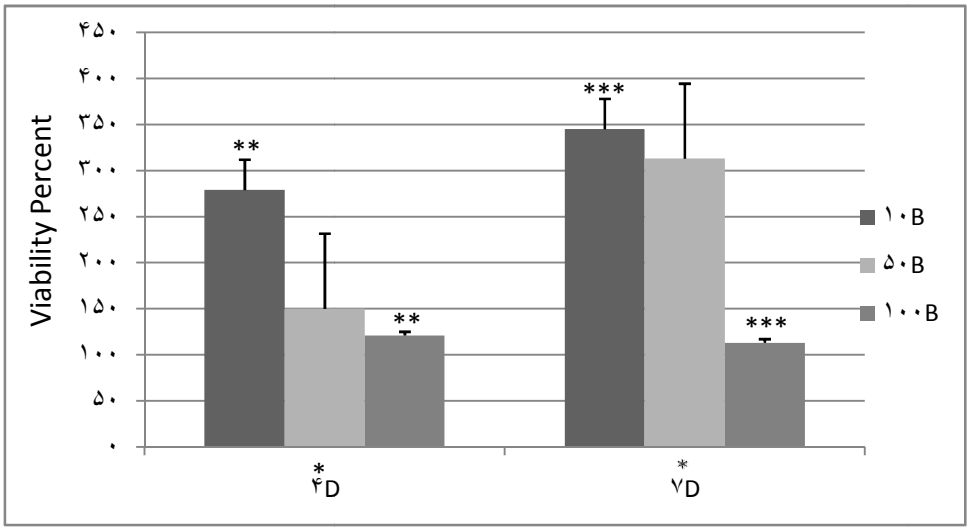
با استفاده از تست MTT درصد زنده بودن سلول های زایای بدوی تمایز یافته در حضور غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ ng/ml BMP4 سنجیده شد. گروه D7B10 بیشترین درصد زنده مانی را دارا بودند اما گروه های که غلظت ۱۰۰ ng/ml BMP4 را دریافت نموده اند (گروه های D4B100 و D7B100) کمترین درصد زنده مانی را دارا بودند. در ادامه مشخص شد که تفاوت معنی داری در غلظت های مذکور بین روزهای ۴ و ۷ ($p \leq 0/05$) مشاهده شد (جدول ۱ و نمودار ۲).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

جدول ۱: درصد زنده بودن سلول های تمایز یافته در غلظت های مختلف BMP4.

Bmp4 concentration (ng/ml)	Viability percent (Mean±SD)
D4B10/D4B0	۲۷۹ ± ۶۴/۴۱
D4B50/D4B0	۱۵۰ ± ۴۰/۸۵
D4B100/D4B0	۱۲۱ ± ۴۵/۹۶
D7B10/D7B0	۳۴۵ ± ۱۰۷/۸۲
D7B50/D7B0	۳۱۳ ± ۳۱/۰۰
D7B100/D7B0	۱۱۳ ± ۴۳/۷۱



نمودار ۲: مقایسه درصد زنده بودن سلول های تمایز یافته در غلظت های مختلف BMP4.

* تفاوت معنی داری در غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ BMP4 ng/ml بین روزهای ۴ و ۷ مشاهده شد.

** تفاوت معنی داری در روز چهارم بین غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ BMP4 ng/ml مشاهده شد.

*** این تفاوت معنی داری در روز هفتم بین غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ BMP4 ng/ml مشاهده شد. در تمام موارد $p\ value \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

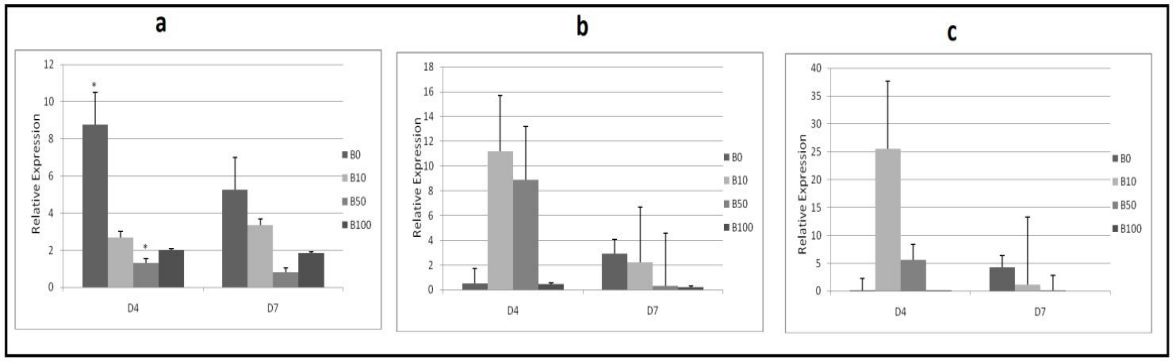
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

ارزیابی کمی میزان بیان ژن های Oct4، Stella و Mvh

پس از تمایز اجسام شبه جنینی

مقایسه بیان هر یک از ژن ها در بین گروه های مذکور نشان داد که میزان بیان ژن Oct4 (مارکر پرتوانی سلول های زایا) در گروه های کنترل بالا بود و به تدریج با افزودن غلظت های BMP4ng/ml ۱۰و ۵۰ کاهش یافت. در ادامه مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف از نظرمیزان بیان ژن مذکوروجود دارد. میزان بیان ژن Stella در گروه های که به مدت ۴ روز در معرض BMP4 قرار گرفته بودند متغیر بود. بدین ترتیب که در گروه های کنترل پایین ولی در غلظت‌های BMP4 ng/ml ۱۰و ۵۰ افزایش یافته بود. ژن Mvh فقط در گروه های D4B10، D4B50، D7B10 و D7B50 بیان گردید و حداکثر میزان بیان آن در گروه D4B10 مشاهده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳: مقایسه بیان نسبی ژن های مورد ارزیابی بوسیله Real Time PCR که به مدت ۴ و ۷ روز در معرض غلظت های مختلف BMP4 قرار گرفته اند. بیان نسبی Oct4 نسبت به β – actin (a)، Stella نسبت به β – actin (b) و Mvh نسبت به β – actin (c)

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که BMP4 به عنوان یک القا کننده مؤثر و توانا در تمایز PGCs از سلول های بنیادی جنینی موش می باشد(۱۴). سلول های بنیادی جنینی سلول های پرتوانی هستند و قادر به تمایز به انواع رده های سلولی می باشند به طوری که اساس استفاده گسترده از آنها در سلول درمانی به ویژگی پرتوانی آنها نسبت داده می شود(۱۷-۱۵). در این قسمت از تحقیق پتانسیل سلول های بنیادی جنینی موش جهت تمایز به پیس سازهای سلول زایا در محیط in vitro با تکنیک و افزودن BMP4 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های مختلف BMP4 تأثیرات متفاوتی بر عملکرد سلول های بنیادی جنینی دارند. به طوریکه بررسی میزان زنده ماندن سلولی پس از تیماربا BMP4 مشخص کرد که افزودن ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 (غلظت کم) تأثیر بهتری بر درصد زنده ماندن سلول های نسبت به سایر غلظت های به کار رفته در این تحقیق داشته است. اما بر خلاف انتظار با بالا رفتن غلظت BMP4، میزان زنده ماندن سلول ها کاهش یافت. به نظر می رسد که غلظت های متوسط و بالای BMP4 اثر منفی بر زنده ماندن سلول ها داشته باشند. در همین راستا برخی مطالعات نشان داد که افزودن BMP4 به محیط کشت وابسته به دوزبوده و بر درصد زنده ماندن سلول ها موثر است. یکی از مکانیسم های اثرگذاری BMP4 از طریق فسفریله کردن پروتئین های Smad است (۱۸). محققان گزارش کردند که BMP4 در کشت سلول کاملا وابسته به دوز است. به طوری که با افزودن ۵ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 ، تعداد سلول های زایای بدوی افزایش می یابد در حالی که در غلظت های بالاتر، درصد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

زنده ماندن سلول های مذکور کاهش پیدا می کند (۱۹). اما به غیر از مسیر Smad، BMP4 ممکن است از طریق القا نمودن برخی ژن های وابسته به پروتئین کیناز، در فرآیند میتوز و زنده ماندن سلول ها نقش داشته باشد (۲۱ و ۲۰). القا سلول های زایای بدوی در شرایط آزمایشگاهی از سلول های بنیادی جنینی با افزودن BMP4 به محیط کشت تکمیل می گردد. در تحقیق حاضر تمایز PGCs از سلول های بنیادی جنینی در حضور غلظت های مختلف BMP4 و مدت زمان متفاوت صورت گرفت. به نظر می رسد که غلظت های متوسط و بالای BMP4 اثری مطلوبی در فرآیند تمایز PGCs از سلول های بنیادی جنینی ندارند.

در همین راستا West و همکاران ۲۰۰۴ گزارش کردند که با افزودن BMP4 به محیط کشت درصد سلول های بیان کننده Vasa افزایش می یابد و ذکر کردند که اثرات BMP4 کاملا وابسته به دوز است به طوری که غلظت های کم BMP4 مؤثرتر است (۲۲).

یافته های ارزیابی مولکولی پیشنهاد می کند که BMP4 نقش مهمی در تمایز سلول های زایای بدوی در شرایط in vitro دارد. در این مطالعه میزان بیان ژن های مرتبط با تکامل سلول های زایای بدوی سنجیده شد. میزان بیان Oct4 به عنوان شاخص پرتوانی در گروه های کنترل بالاتر از گروه های تیمار شده با BMP4 بود بنابراین سلول های بنیادی جنینی Oct4 را تنها در حالت غیر تمایزی بیان نموده اند و همزمان با شروع روند تمایز این بیان کاهش یافته است و از جمله ژن هایی است که در سلول های زایای بدوی در سطح پائین بیان می گردد. یکی دیگر از ژن های مورد ارزیابی در این مطالعه ژن Stella (اولین ژن اختصاصی در روند تکامل سلول های زایا که در مرحله تمایز سلول های زایای بدوی بروز پیدا می کند) بود. در یافته های تحقیق حاضر مشخص شد که بیشترین میزان بیان آن در گروه تیمار شده به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 به مدت ۴ روز مشاهده شد. همچنان که گفته شد یکی از اساسی ترین شاخص ها در شناسایی سلول های زایای بدوی Mvh است که تنها در سلول های زایای بدوی بروز پیدا می کند. یافته های تحقیق حاضر نشان داد که میزان بالاتری از بیان ژن Mvh در گروه تیمار شده به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 در مدت ۴ روز مشاهده شد. افزایش میزان بیان این ژن در مقایسه با غلظت های بالاتر اگرچه که از لحاظ آماری معنی دار نبود اما به لحاظ بیولوژیک افزایش قابل توجهی یافت.

یافته های تحقیق حاضر تأییدی بر نتایج سایر محققین در زمینه نقش و تأثیرگذاری BMP4 جهت تمایز سلول های زایای بدوی است. در همین راستا، Toyooka و همکاران در سال ۲۰۰۳ با به کارگیری سلول های جنینی و درج کردن ژن Mvh در ساختار ژنومی این سلول ها، موفق به جداسازی سلول های زایای بدوی از اجسام شبه جنینی براساس بیان این ژن شدند (۲۳).Kee و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که با افزودن BMP4 به محیط کشت سلول های بنیادی جنینی انسانی میزان بیان ژن Mvh افزایش می یابد (۲۴).

در مجموع نتایج سلولی و مولکولی نشان داد که افزودن ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 به مدت ۴ روز برای القای تمایز سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی مطلوب تر است. بنابراین با برگزیدن گروه فوق به عنوان گروه منتخب جهت القای تمایز اختصاصی برای تولید گامت جنسی در نظر گرفته خواهد شد.

نتیجه‌گیری

BMP4 به عنوان عامل القا کننده مزودرمی نقش مهمی در تمایز سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی در شرایط *in vitro* دارد. غلظت های مختلف BMP4 تأثیرات متفاوتی بر عملکرد سلول های بنیادی جنینی طی تمایز دارند. به طوری که افزودن ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر BMP4 به مدت ۴ روز در محیط کشت بیشترین تأثیر را در القاء تمایز سلول های زایای بدوی از سلول های بنیادی جنینی دارد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل پروژه مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد 1718 است که نویسندگان بدینوسیله ازکارشناسان محترم آزمایشگاه گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر و تشکر می نمایند.

References.

1. Johnson AD, Richardson E, Bachvarova RF, Crother BI. Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. Reproduction 2011;141:291-300.
2. Kashir J, Jones C, Child T, Williams SA, Coward K. Viability assessment for artificial gametes: the need for biomarkers of functional competency. Biol Reprod 2012;87:114.
3. Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. Cell 2015;160:253-68.
4. Sugawa F, Arauzo-Bravo MJ, Yoon J, Kim KP, Aramaki S, Wu G, et al. Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. EMBO J 2015;34:1009-24.
5. Dominguez AA, Chiang HR, Sukhwani M, Orwig KE, Reijo Pera RA. Human germ cell formation in xenotransplants of induced pluripotent stem cells carrying X chromosome aneuploidies. Sci Rep 2014;4:6432.
6. Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, et al. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. Dev Cell 2013;27:516- 29.
7.Hackett JA, Zylicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. Trends Genet 2012;28:164-74.
8. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD and Page DC: Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2006: 103: 2474–9.
9. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R and Noce T: Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2003:100:11457–62.
10. Ghasemi Hamidabadi H, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, Forouzandeh M, Sobhani A. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. Int J Fertil Steril 2011;5:104–9.
11. Eskandari N, Hassani Moghaddam M, Atlasi MA, Amini Mahabadi J, Taherian A, Nikzad H. The combination of retinoic acid and estrogen can increase germ cells genes expression in mouse embryonic stem cells derived primordial germ cells. Biologicals 2018;56:39-44.
12. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Proliferation in culture of primordial germ cells derived from embryonic stem cell: induction by retinoic acid. Biosci Rep 2016; 36: e00428.
13. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. A simple co-culture system for generation of embryonic stemlike cells from testis. Iran Red Crescent Med J 2012;14:811-5.
14. Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells. Cytotechnology 2013;65:97-104.
15. Shah SM, Singla SK, Palta P, Manik RS, Chauhan MS. Retinoic acid induces differentiation of buffalo (Bubalus bubalis) embryonic stem cells into germ cells. Gene 2017;631:54-67.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]

16. Haratizadeh S, Bojnordi MN, Niapour A, Bakhtiari M, Hamidabadi HG, Sari I. Improvement of neuroglial differentiation from human dental pulp stem cells using CSF. J Mazandaran Uni Med Sci 2016; 26:1-14. [In Persian]
17. Moayeri A, Bojnordi MN, Haratizadeh S, Esmaeilnejad-Moghadam A, Alizadeh R, Hamidabadi HG. Transdifferentiation of human dental pulp stem cells into oligoprogenitor cells. Basic and clinical neuroscience 2017;8:387.
18. Jung D, Xiong J, Ye M, Qin X, Li L, Cheng S, et al. In vitro differentiation of human embryonic stem cells into ovarian follicle-like cells. Nat Commun 2017;8:15680.
19. Gholamitabar Tabari M, Jorsaraei SGA, Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Ahmadi AA, Mahdinezhad Gorji N. Evaluation of specific germ cell genes expression in mouse embryonic stem cell-derived germ cell like cells treated with bone morphogenetic protein 4 in vitro. Int Reprod Biomed (Yazd) 2018;16:507-18.
20. Gholamitabar Tabari M, Jorsaraei SGA, Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Ahmadi AA, Ghasemi M. Comparison of germ cell gene expressions in spontaneous monolayer versus embryoid body differentiation of mouse embryonic stem cells toward germ cells. Int J Fertil Steril 2019;13:139-47.
21. Devika AS, Wruck W, Adjaye J, Sudheer S. The quest for pluripotency: a comparative analysis across mammalian species. Reproduction 2019;1: pii: REP-18-0083.R4.
22. West JA, Daley GQ. In vitro gametogenesis from embryonic stem cells. Curr Opin Cell Biol 2004:16: 688-92.
23. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 2003:100:11457–62.
24. Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RAR. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2006;15:831–7.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.110]