

Isolation, Expansion and Purification of Mouse Spermatogonial Stem Cells in an Autologous Sertoli Cell Co-culture System

Setareh Javanmardi¹, Mohammad Hossein Asadi^{2*}, Mansoureh Movahedin³

1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1435116471, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: Asadi_mh@yahoo.com

Received: 19/Dec/2012, Accepted: 16/Feb/2013

Abstract

Objective: This study presents a simple method for isolation, expansion and purification of neonatal mouse spermatogonial stem cells.

Methods: We used enzymatic digestion to isolate a cell suspension of spermatogonia and Sertoli cells from neonatal 2-day-old mice. The cells were cultured in DMEM/F12 that contained 10% serum for two weeks. Sertoli and spermatogonia cell characteristics were confirmed by examining for the presence of vimentin and PLZF proteins, respectively. To assess the rate of spermatogonia stem cell expansion, the area and number of colonies were measured during the two weeks of culture. At the end of the second week, we detected spermatogonia cell-specific expressions of the *Stra8*, *Piwill2*, *DAZL*, and *Mvh* genes.

Results: Current results indicated that isolated Sertoli and spermatogonia cells were immunopositive for specific markers. During the culture period, a significant difference was seen in the number and area of spermatogonial stem cell colonies ($P<0.05$) at four time points. In addition, spermatogonial specific gene expression demonstrated that these cells were undifferentiated after two weeks of culture.

Conclusion: Our study showed that co-culture of spermatogonia and Sertoli cells from same source provides a convenient and efficient environment. This co-culture, without the addition of external growth factors and chemical manipulations, can be used for proliferation of spermatogonia stem cells.

Keywords: Spermatogonia, Stem Cell, Co-culture, Colonization

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 21-33

جداسازی، تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد در روش هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی اتولوگ

ستاره جوانمردی^۱، محمدحسین اسدی^{۲*}، منصوره موحدین^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، تهران، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۳۵۱۱۶۴۷۱، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: Asadi_mh@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۸

دریافت مقاله: ۹۱/۰۹/۲۹

چکیده

هدف: ارایه یک روش ساده برای جداسازی، تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد
مواد و روش‌ها: سوسپانسیون سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با استفاده از هضم آنزیمی از بیضه موش نوزاد دو روزه جداسازی شد. سلول‌ها به صورت هم‌کشتی و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم به مدت دو هفته کشت داده شدند. ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به ترتیب توسط بیان پروتئین‌های ویمنتین و PLZF تأیید شد. برای ارزیابی میزان تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تعداد کلونی‌های تشکیل شده و مساحت آن‌ها در طول دو هفته کشت اندازه‌گیری شد. در پایان هفته دوم، بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (Stra8, Mvh, DAZL, Piwill2) ارزیابی شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان داد که سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی جدا شده نشانگرهای اختصاصی این سلول‌ها را بیان می‌کنند. در طی دوره کشت، بین چهار نقطه زمانی اختلاف معنی‌داری در تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دیده شد ($P < 0/05$). علاوه بر این بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از دو هفته کشت، نشان دهنده عدم تمایز این سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی با منبع یکسان محیط رشد مناسب و بهینه‌ای را فراهم می‌کند که بدون اضافه کردن عوامل رشد خارجی و دستکاری‌های شیمیایی می‌توان از آن برای تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده کرد.

کلیدواژگان: اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی، هم‌کشتی، کلونی‌زایی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۲۱-۲۳

مقدمه

قاعده‌ای بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز بیضه قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها برای تولید مداوم اسپرم در طول زندگی و انتقال اطلاعات ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر تخصص یافته‌اند [۱].

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells)، سلول‌های منفردی هستند که روی غشای

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش

امکان شرایط طبیعی بدن را برای سلول‌ها فراهم کند. سلول سرتولی (Sertoli cell) یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین سلول‌های بیضه است که در تماس مستقیم با سلول‌های اسپرماتوگونی است. سلول‌های سرتولی علاوه بر حمایت فیزیکی از این سلول‌ها، با ترشح انواع عوامل رشد باعث بقا و تکثیر آن‌ها می‌شوند [۱۸، ۱۹].

این ویژگی منحصر به فرد سلول‌های سرتولی باعث شده است که تعدادی از محققین برای کشت و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی از روش هم‌کشتی (Co-Culture) این سلول‌ها با سلول‌های سرتولی استفاده کنند [۲۰-۲۲]. اما در همه این مطالعات یا از رده‌های سلول سرتولی به عنوان یک لایه مغذی استفاده شده است یا سلول‌های سرتولی هومولوگ از بیضه جدا شده و پس از چند روز کشت و ایجاد یک لایه در کف ظروف کشت، سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده روی آن‌ها کشت داده شده‌اند. با توجه به اهمیت و نقش سلول‌های سرتولی اتولوگ و عدم نیاز به جداسازی این سلول‌ها از هم و مهم‌تر از همه فراهم کردن شرایط کشت شبیه بدن، هدف این تحقیق استفاده از سیستم هم‌کشتی (سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با منبع یکسان) برای تکثیر و بقای سلول‌های اسپرماتوگونی است. و برای جلوگیری از ایجاد تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی طی فرایند کشت از عامل LIF (Leukemia Inhibitory Factor) استفاده شد. ارزیابی کمی کلونی‌زایی به عنوان معیاری برای فعالیت میتوزی سلول‌های بنیادی موجود در سوسپانسیون سلولی استفاده شد. علاوه بر این؛ در این مطالعه یک محیط کشت ساده بدون اضافه کردن عوامل رشد که از نظر اقتصادی به صرفه است به کار برده شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این تحقیق موش‌های باردار (نژاد NMRI) از مؤسسه رازی کرج خریداری و در حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نور و تاریکی و دسترسی آزاد به آب و

کشت و تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌تواند اطلاعات ارزنده‌ای از عملکرد این سلول‌ها و به عبارت دیگر فرآیند اسپرماتوژنز (Spermatogenesis) در اختیار ما قرار دهد. به علاوه این سلول‌ها منبع ارزشمندی برای آزمایش‌های زیستی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری دامی و اصلاح ژنتیکی از طریق دست‌ورزی سلول زاینده مذکر فراهم می‌کنند [۳].

پژوهش در مورد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از سال ۱۹۹۴ که استفاده کاربردی از این سلول‌ها برای اولین بار توسط برینستر (Brinster) و همکارانش ارایه شد پیشرفت زیادی کرده است [۴، ۵]. مطالعات انجام گرفته برای کشت طولانی مدت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه نشان داده است که پس از ۲ سال کشت و تحت شرایط مناسب این سلول‌ها زنده مانده‌اند و هیچ‌گونه تغییر ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی یا کاهش پتانسیل زایشی در آن‌ها دیده نمی‌شود [۶].

همانند بقیه سلول‌های بنیادی، یکی از مشکلات اصلی استفاده از این سلول‌ها کم بودن تعداد آن‌هاست به طوری که این سلول‌ها تنها ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های زایای بیضه موش بالغ را تشکیل می‌دهند [۲]. علاوه بر این؛ با توجه به نبودن نشانگرهای سلولی اختصاصی برای جداسازی این سلول‌ها، استفاده از روش‌هایی که بتوان این سلول‌ها را به صورت خالص و به میزان زیاد تهیه کرد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۷]. اولین قدم برای استفاده از این سلول‌ها دستیابی به یک سیستم کشت بهینه است که در آن سلول‌ها به میزان زیادی تکثیر یافته و به صورت تمایز نیافته باقی بمانند. برای رسیدن به این هدف تاکنون سیستم‌های کشت مختلفی همچون کشت سلول‌های اسپرماتوگونی روی لایه تغذیه کننده [۸-۱۱]، استفاده از محیط کشت‌های حاوی یا فاقد سرم [۶، ۱۲، ۱۳]، افزودن انواع عوامل رشد و هورمون‌های جنسی به محیط کشت [۱۴-۱۷] یا استفاده از محیط کشت‌های مخصوص مثل Stem pro ارزیابی شده است [۱۴]. توجه به این نکته ضروری است که سیستم کشت مورد استفاده بایستی حداقل آسیب و دستکاری‌های شیمیایی و فیزیکی را به همراه داشته باشد و علاوه بر این بتواند تا حد

واحد در میلی لیتر کشت داده شد. تعویض محیط و تیمار سلولی به ترتیب هر ۳ و ۵ روز یک بار انجام شد.

ارزیابی ریخت‌شناختی سلول‌های کشت داده

شده و کلونی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی

به منظور ارزیابی کارایی این سیستم کشت یعنی هم‌کشتی سلول‌ها در محیط کشت ساده بدون اضافه کردن عوامل رشد، میزان تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از ارزیابی میزان کلونی‌زایی بررسی شد. به این منظور ریخت‌شناسی (Morphology) سلول‌ها به صورت روزانه و با کمک میکروسکوپ معکوس (OLYMPUS 1X70، ژاپن) مجهز به دوربین ارزیابی شد. در ادامه اولین روز ظهور کلونی‌ها در پلیت‌های مختلف و کشت‌های متعدد ثبت شده و تعداد کلونی‌های شکل گرفته در هر پلیت در طول یک دوره کشت دو هفته‌ای، در روزهای ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ شمارش شد. در روزهای مورد نظر از کلونی‌ها تصویر تهیه شده و سپس مساحت کلونی‌ها با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد.

غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی

به منظور غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی از روش حذف تمایزی (Differential Plating) استفاده شد. در این روش سوسپانسیون به دست آمده از بیضه به مدت ۴ ساعت در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. در این مدت تعداد زیادی از سلول‌های سوماتیک شامل سلول‌های سرتولی، فیبروبلاست (Fibroblast) و میویدی (Myoid) به کف ظرف کشت می‌چسبند. سلول‌های معلق جمع‌آوری شده و مجدداً به مدت ۴ ساعت دیگر کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌های نچسبیده، این روند بار دیگر تکرار شد. میزان کارایی این روش جداسازی با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شد.

غذا نگهداری شدند. پس از ثبت دقیق روز زایمان، از سلول‌های بیضه موش‌های نوزاد ۲ روزه نر استفاده شد. تمام مراحل مراقبت از حیوانات و روش انجام جراحی طبق دستورالعمل کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

برای هر بار جداسازی سلول، از بیضه‌های ۵ سر موش نوزاد ۲ روزه استفاده شد. بعد از کشتن حیوان، سطح شکم آن با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. با باز کردن قسمت پایین شکم، بیضه‌ها در طرفین مثانه دیده می‌شود. بیضه‌ها خارج شده و پس از شستشو در PBS (Phosphate Buffer Serum) به محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) منتقل شد. بعد از شستشوی مجدد کپسول و بافت‌های اضافی (اپیدیدیم: Epididyme) از بیضه‌ها جدا شد. سپس نمونه‌ها در محیط DMEM حاوی آنزیم (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر کلاژناز) به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد.

مخلوط سلول‌ها و آنزیم در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفته و هر ۵ دقیقه با استفاده از پیپت با هم مخلوط شدند. بعد از ۱۵ دقیقه سلول‌ها با سرعت ۴۵۰ یا ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن مایع رویی، سلول‌ها دو بار با استفاده از PBS شسته شده و با سرعت ۲۰۰ یا ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله ۳ میلی لیتر آنزیم تریپسین ۰/۱ درصد به پلاک سلولی در کف لوله فالكون اضافه شده و به مدت ۳۰ ثانیه پیپتاژ انجام شد تا این‌که سلول‌ها کاملاً به صورت مجزا درآمدند. درصد حیات سلول‌ها به کمک رنگ‌آمیزی با محلول ۰/۰۴ درصد تریپان بلو (Trypan Blue) و استفاده از یک لام نئوبار ارزیابی شد. در ادامه سوسپانسیون سلولی به دست آمده که اغلب حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی بود به صورت هم‌کشتی و با تعداد مساوی در دو خانه از پلیت ۶ خانه حاوی محیط DMEM/F12 دارای ۱۰ درصد سرم و LIF به میزان ۱۰۰۰

تصادفی شمارش شد.

بررسی مولکولی سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده

از Real-Time PCR

برای تعیین میزان بیان ژن‌های سلول‌های اسپرماتوگونی (Stra8, Dazl, Mvh, Piwil2) در سلول‌های اسپرماتوگونی جدا شده در روز اول کشت و نیز کلونی‌های سلولی به‌دست آمده در پایان هفته دوم کشت، از روش Real-Time PCR استفاده شد. کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی به صورت مکانیکی از کف ظرف جدا شده و سپس با استفاده از آنزیم تریپسین (۰/۲۵ درصد) سلول‌ها از هم جدا شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، استخراج RNA کل با کمک تریازول (Triazole) (Invitrogen، آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت RNA به‌دست آمده با دستگاه اسپکترومتر ارزیابی شد. برای تهیه cDNA تک رشته‌ای از آغازگر (Primer) Oligo dt و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentase، لیتوانی) و براساس برنامه مربوط استفاده شد. هر چرخه Real-Time PCR در ۴۰ چرخه و با استفاده از آغازگرهای پیشرو و معکوس اختصاصی برای هر ژن (جدول ۱) انجام شد. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن کنترل داخلی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

تأیید ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با

روش ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry)

برای تأیید ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی به ترتیب بیان PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc-Finger) و ویمنتین (Vimentin) ارزیابی شد. برای این منظور بعد از خارج کردن محیط کشت سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. سپس برای ثابت کردن سلول‌ها از پارافرمالدیید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از این مدت سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. برای ایجاد نفوذپذیری در سلول نمونه‌ها با تریتون X-100 به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. به منظور پوشاندن آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی، سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۴۵ دقیقه به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه [PLZF (۱:۳۰۰)، Abcam rabbit anti-PLZF، انگلیس]، ویمنتین (۱:۱۰۰ rabbit polyclonal anti-Vimentin)] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۳ بار شستشو با PBS، آنتی‌بادی ثانویه FITC conjugated anti-rabbit IgG (۱:۵۰۰، Abcam، آمریکا)] به مدت ۱ ساعت، در دمای اتاق و محیط تاریک به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۳ بار شستشو با PBS هسته‌ها با DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، تعداد ۱۰۰ سلول در حداقل ۵ زمینه میکروسکوپ فلورسنت به صورت

جدول ۱ آغازگرهای طراحی شده برای بررسی ژنی با دستگاه Real-Time PCR

نام ژن	توالی آغازگر (5'-3')	دمای اتصال (Annealing) (درجه سانتی‌گراد)
Stra8	جلویی: 5'-CTCCTCCTCCACTCTGTTGC-3' برگشتی: 5'-GCCGCAGAGACAATAGGAAG-3'	۵۷
DAZL	جلویی: 5'-AAGGCAAAATCATGCCAAAC-3' برگشتی: 5'-TCCTGATTCGGTTTCATCC-3'	۵۷
Mvh	جلویی: 5'-CGGAGAGGAACCTGAAGC-3' برگشتی: 5'-CGCCAATATCTGATGAAGC-3'	۵۸
Piwil2	جلویی: 5'-CCTCCAGCTCTGTCTCCAAC-3' برگشتی: 5'-CCTTGCTTGACCAAAAGCTC-3'	۵۹
GAPDH*	جلویی: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' برگشتی: 5'-GGATGCAGGGATGATGTCT-3'	۵۸

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، آزمون من‌ویتنی (Mann-Whitney) و Repeated measure ANOVA، تجزیه و تحلیل شد. تفاوت داده‌ها در سطح $P \leq 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی ریخت‌شناختی سلول‌های کشت داده شده

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی درصد سلول‌های زنده جداسازی شده، میانگین سلول‌های زنده در ۶ بار تکرار ۹۵/۳۷ درصد بود (جدول ۲). می‌توان گفت که این درصد بالای سلول‌های زنده کارایی این روش ساده جداسازی سلولی از بافت بیضه را تأیید می‌کند.

جدول ۲ میانگین درصد سلول‌های زنده جداسازی شده از بافت بیضه موش نوزاد ۲ روزه با روش هضم آنزیمی

تکرار	میانگین درصد سلول‌های زنده جداسازی شده \pm انحراف معیار
۱	۹۸/۰۲ \pm ۰/۰۹
۲	۹۱/۹۷ \pm ۰/۴۸
۳	۹۸/۲۵ \pm ۰/۱۵
۴	۹۲/۵۳ \pm ۰/۳۷
۵	۹۴/۱۴ \pm ۰/۴۳
۶	۹۷/۳۵ \pm ۰/۱۸
میانگین تکرارها	۹۵/۳۷ \pm ۰/۲۸

در این مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از هضم آنزیمی بیضه به صورت سیستم هم‌کشتی انجام شد. پس از مشاهده به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی بالا دو نوع سلول اصلی با شکل و اندازه مختلف در این تعلیق سلولی دیده شد. سلول‌های سرتولی با حدود سلولی نامنظم، نمایی گرانولار و قطر (۷/۵-۸/۲ میکرومتر) مشخص شدند. این نوع سلول طی ۲۴-۳۶ ساعت پس از کشت به صورت یک لایه

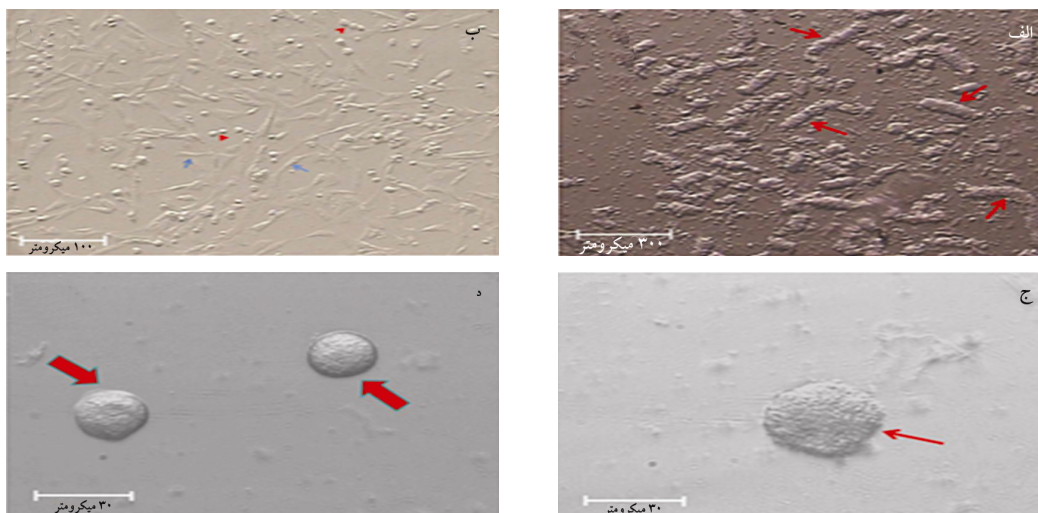
سلولی به کف ظروف کشت چسبیده و به عنوان یک لایه تغذیه‌کننده و حمایت‌کننده بستری را برای سلول‌های اسپرماتوگونی فراهم می‌کند. سلول‌های اسپرماتوگونی بزرگ‌تر بوده، قطر آن‌ها حدود ۱۴-۱۶ میکرومتر و نمایی صاف و منظم دارند. در این سلول‌ها ممکن است ۲-۳ هسته خارج مرکزی دیده شود. این سلول‌ها به صورت معلق و در لابلای سلول‌های سرتولی قرار گرفته و پس از تقسیم کلونی ایجاد می‌کنند (شکل ۱).

بررسی کمی کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی

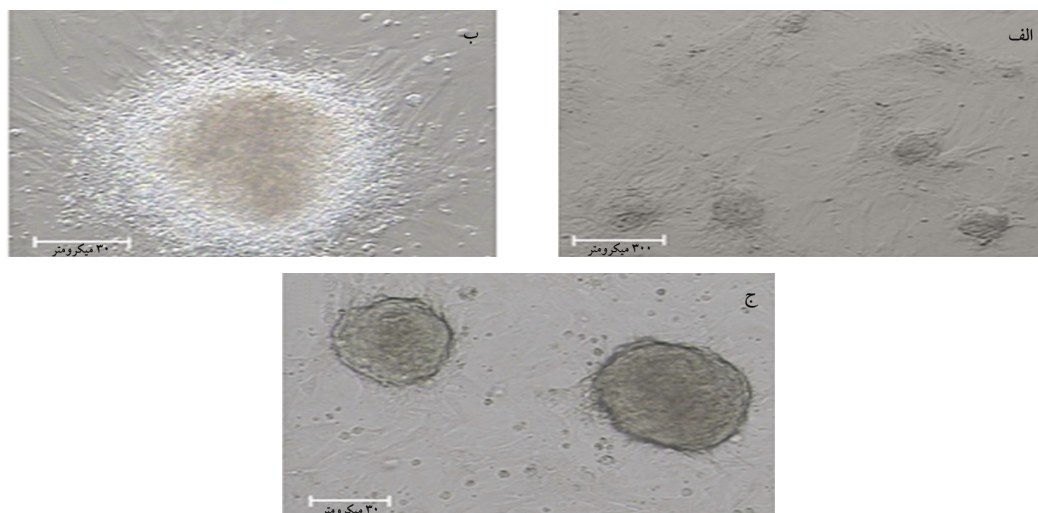
اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی (In vitro)

نتایج به‌دست آمده از بررسی روند رشد و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت نشان داد که در پی تقسیمات متعدد این سلول‌ها در ابتدا تجمعات سلولی (Cluster) شکل می‌گیرد که در ادامه به توده‌های سلولی متراکم و غالباً گرد تبدیل می‌شوند که کلونی نامیده می‌شود (شکل ۲). از آنجا که تقسیمات سلولی در سلول‌های اسپرماتوگونی هم زمان نیست، تعداد کلونی‌ها و اندازه آن‌ها در ظروف مختلف کشت متفاوت بود. نتایج به‌دست آمده از بررسی کلونی‌زایی در ۲۵ گروه کشت نشان داد که میانگین زمان ظهور کلونی‌ها در محیط کشت ۰/۱۹ \pm ۳/۸۴ روز پس از کشت بوده و در ۴۸ درصد موارد کلونی‌ها در روز چهارم کشت دیده شدند (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی تعداد کلونی‌ها نشان داد که میانگین تعداد کلونی‌ها در روز پنجم ۰/۵۷۷ \pm ۴، در روز هشتم ۱/۴۶۱ \pm ۱۲، در روز یازدهم ۱/۱۰۸ \pm ۱۷/۱۶ و در روز چهاردهم ۱/۵۲۸ \pm ۲۳ بود. با توجه به این یافته‌ها، با گذشت زمان میانگین تعداد کلونی‌ها افزایش معنی‌داری ($F_{3,15} = 176/6$, $P < 0/001$) را نشان داد. علاوه بر افزایش میانگین تعداد کلونی‌ها، در میانگین مساحت آن‌ها نیز افزایش معنی‌داری دیده شد به طوری که در آخرین روز ارزیابی کمی کلونی‌زایی (روز ۱۴)، بیشترین تعداد کلونی ظاهر شد که مساحت آن‌ها هم به شکل معنی‌داری افزایش یافته بود (شکل ۴).

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش



شکل ۱ (الف) قطعات لوله‌های اسپرم‌ساز توپر بیضه موش نوزاد ۲ روزه بعد از مرحله اول هضم آنزیمی، (ب) کشت اولیه سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از گذشت ۲۴ ساعت، پیکان‌ها سلول‌های سرتولی و سر پیکان‌ها سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را نشان می‌دهد. (ج) سلول‌های سرتولی با قطر ۷/۵-۸/۲ میکرومتر، حاشیه‌ای نامنظم و نمایی گرانولار، (د) سلول‌های اسپرماتوگونی با قطری حدود ۱۴-۱۶ میکرومتر و نمایی صاف و منظم

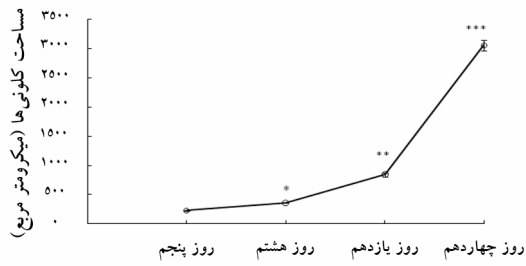


شکل ۲ کلونی سلولی حاصل از تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ (الف) روز پنجم کشت، (ب) روز هشتم کشت، (ج) روز ۱۴ کشت

بررسی ایمنوسیتوشیمی حضور ویمتین را به شکل فیلامنت‌هایی در درون سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی نشان داد. بررسی تعداد سلول‌های ویمتین مثبت در جمعیت سلولی سوماتیک جدا شده با روش حذف تمایزی نشان داد که سلول‌های سرتولی با درجه خلوص ۹۲ درصد جداسازی شده‌اند. علاوه بر این؛ وجود عامل نسخه‌برداری PLZF نیز در هسته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تأیید شده (شکل ۵) و

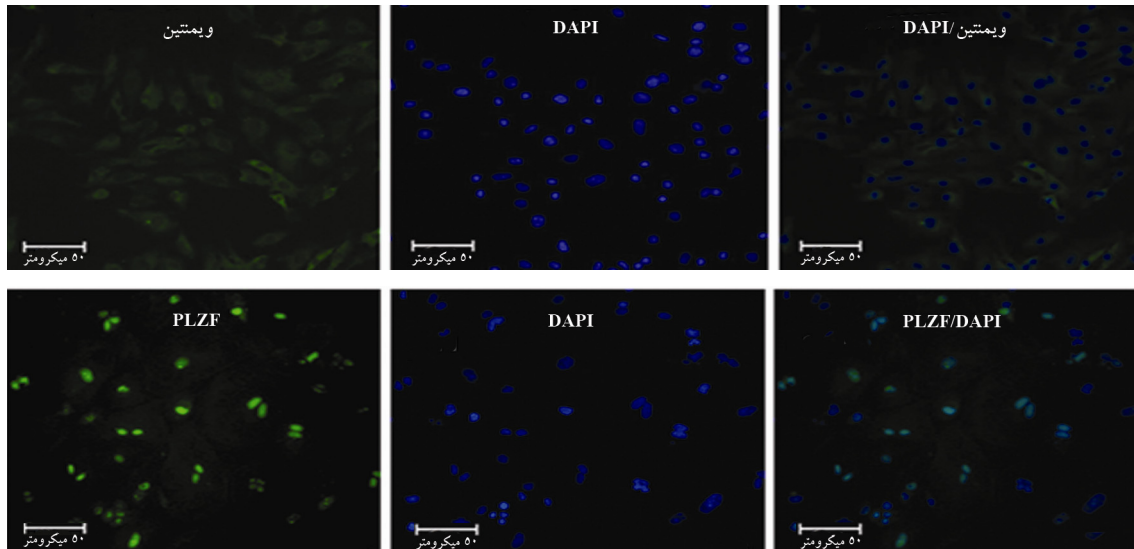


شکل ۳ میانگین درصد پلتهای دارای کلونی براساس زمان ظهور کلونی‌ها در محیط کشت



شکل ۴ بررسی میانگین مساحت کلونی‌ها (میکرومتر) در روزهای پنجم، هشتم، یازدهم و چهاردهم کشت؛ (* تفاوت معنی‌دار بین میانگین مساحت کلونی‌ها در روز هشتم با سایر روزها، (** تفاوت معنی‌دار بین میانگین مساحت کلونی‌ها در روز یازدهم با سایر روزها، (***) تفاوت معنی‌دار بین میانگین مساحت کلونی‌ها در روز چهاردهم با سایر روزها ($P < 0.05$)

۸۰ درصد سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده مثبت بودند. با استفاده از روش Real-Time PCR بیان ژن‌های شاخص اسپرماتوگونی بررسی شد. نتایج حاصل از مقایسه پروفایل بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی نشان داد که برای بیان ژن‌های *Stra8*, *Piwill2*, *DAZL*, *Mvh* سلول‌های اسپرماتوگونی در روز اول کشت و کلونی‌های به‌دست آمده در هفته دوم کشت اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($P > 0.05$) به عبارت دیگر؛ میانگین بیان ژنی پس از اصلاح آن نسبت به ژن مرجع در بین دو گروه سلولی تقریباً یکسان بود (شکل ۶).

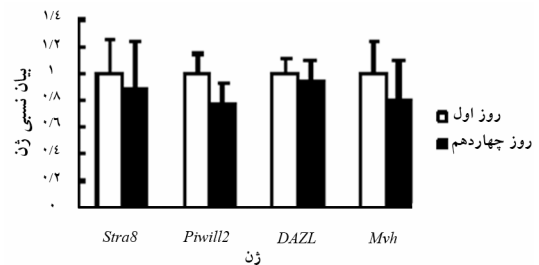


شکل ۵ واکنش ایمنوسیتوشیمی مثبت برای آنتی‌بادی‌های ویمنتین در سلول‌های سرتولی و PLZF در سلول‌های اسپرماتوگونی

بحث

در مطالعه حاضر برای ایجاد محیط کشت مناسب و کارآمد، از روش هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی بیضه موش نوزاد ۲ روزه استفاده شد. علاوه بر این برای هر سه مرحله جداسازی، تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت روش‌های کاربردی، کم هزینه و ساده‌ای ارائه شده است.

با توجه به این‌که میزان خلوص سلول‌های بنیادی



شکل ۶ مقایسه پروفایل بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی در روز اول و روز چهاردهم. ژن‌ها با ژن مرجع *GAPDH* نرمالایز و به صورت ۳ تکرار است. میزان تغییرات بیان ژن‌ها در روز اول و چهاردهم تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$).

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش

(Laminin) [۲۸، ۲۹] کشت سلول‌ها در حضور یا عدم حضور سرم و لایه مغذی [۶، ۳۰]، استفاده از فاکتورهای رشد متعدد یا محیط‌های کشت اختصاصی بوده است [۳۱، ۳۲]. هر چند که تلاش بیشتر محققین در راستای استفاده از یک محیط کشت طبیعی و شبیه شرایط درون بدنی (In vivo) بوده، با این وجود در اکثر این مطالعات دستکاری‌های فیزیکی و اضافه کردن مواد شیمیایی صورت گرفته است تا نیاز سلول‌ها به مواد مغذی و عوامل تنظیم کننده برآورده شود. در شرایط درون بدنی در بیضه، سلول‌های سرتولی در تماس مستقیم با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قرار گرفته که علاوه بر حمایت فیزیکی از این سلول‌ها، بسیاری از فاکتورهای رشد از جمله IGF1 (Insulin-Like Growth Factor)، BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor)، TGF (Transforming Growth Factor)، EGF (Epidermal Growth Factor)، IL-1، IL-6، TNF، IFN- α ، LIF، SCF (Stem Cell Factor)، GDNF (Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor) را ترشح می‌کنند [۱۸، ۱۹]. این فاکتورها ریز محیط مناسبی را برای بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم می‌کنند.

در سال ۲۰۰۹ کروجی و همکاران نشان دادند که هم‌کشتی کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده از موش بالغ با سلول‌های سرتولی منجر به افزایش تعداد و قطر کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود [۹]. نتایج مطالعه محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که استفاده از سلول‌های سرتولی به عنوان لایه مغذی در مقایسه با سلول‌های فیروبلاست موشی میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در طول ۲ هفته کشت افزایش می‌دهد [۱۰]. در مطالعه حاضر نیز برای حفظ بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به جای افزودن عوامل رشد به محیط کشت از روش هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و عوامل ترشحی آن‌ها استفاده شد؛ با این تفاوت که در این مطالعه از سلول‌های سرتولی اتولوگ استفاده شد به این ترتیب که

اسپرماتوگونی در بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز موش نوزاد (سن کمتر از ۶ روز) در بالاترین سطح است، در این مطالعه از سلول‌های موش نوزاد ۲ روزه استفاده شد. قدم اول استفاده از این سلول‌ها، جداسازی آن‌ها از بافت بیضه است. استفاده از یک روش مناسب که با حداقل آسیب بتوان بالاترین درصد سلول‌های زنده را به دست آورد دارای اهمیت ویژه‌ای است. جداسازی و تهیه سوسپانسیون سلول‌های بیضه معمولاً با هضم آنزیمی بافت بیضه صورت می‌گیرد که در آن از چهار آنزیم ویژه کلاژناز (Collagenase)، دیسپاز (Dispase)، هیالورونیداز (Hyaluronidase) و تریپسین (Trypsin) طی دو مرحله استفاده می‌شود [۲۳-۲۵]. در این روش علاوه بر صرف هزینه و زمان که خطر آلوده شدن سلول‌ها را افزایش می‌دهد، با قرارگیری در معرض آنزیم‌ها به مدت طولانی درصد سلول‌های زنده جداسازی شده به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. در مطالعه اصلاحی و همکاران در سال ۲۰۱۲ درصد حیات سلول‌های تازه پس از فرآیند جداسازی از بافت بیضه موش نوزاد ۸۹ درصد بود [۲۶]. علاوه بر این لیو (Liu) و همکارانش در سال ۲۰۱۱ سلول‌های بافت بیضه انسان را با استفاده از آنزیم‌های کلاژناز و تریپسین جدا کرده و میانگین درصد سلول‌های زنده را ۹۱ درصد گزارش کردند [۲۷]. در مطالعه حاضر برای حذف اثر آنزیم‌ها و کاهش خطر آسیب‌دیدگی، از دو آنزیم (کلاژناز و تریپسین) استفاده کرده و سلول‌ها چندین بار با PBS شستشو داده شدند. با این روش میانگین درصد سلول‌های زنده به دست آمده ۹۵/۳۷ درصد بود که می‌توان گفت این نتایج کارایی این روش ساده جداسازی سلول‌ها را نشان می‌دهد.

طراحی سیستم‌های کشت حمایت کننده از بقا و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی امکان دسترسی به تعداد کافی از این سلول‌ها را برای مطالعات زیستی فراهم می‌کند. تاکنون مطالعات متعددی برای بهبود شرایط کشت و افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی صورت گرفته است که از جمله آن‌ها، استفاده از ظروف کشت پوشیده با ژلاتین و لامینین

سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های سرتولی بیضه جدا نشده و به مدت ۲ هفته با هم کشت داده شدند.

ناگانو (Nagano) و همکارانش برای سنجش ساده‌تر و سریع‌تر میزان تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روش ارزیابی تشکیل کلونی (Cluster-Forming Activity Assay: CFA) را ابداع کردند [۳۳]. با وجود این‌که سنجش CFA نمی‌تواند جایگزینی برای ارزیابی براساس پیوند این سلول‌ها به بیضه موجود زنده باشد با این وجود این روش ارزیابی سریع و قابل اعتماد تحقیق در مورد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را سرعت بخشیده است. در این مطالعه نیز برای سنجش میزان تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، میزان کلونی‌زایی سلول‌ها بررسی شد. نتایج مطالعه انجام‌روز و همکارانش در سال ۲۰۰۶ پس از ۲ هفته هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی همولوگ و استفاده از عوامل رشد نشان داد که اولین کلونی‌ها در روزهای ۷-۸ در محیط کشت قابل تشخیص بودند در حالی که در این مطالعه میانگین زمان ظهور کلونی‌ها در محیط کشت $0/19 \pm 3/84$ روز پس از کشت بود [۳۴]. علاوه بر این؛ نتایج به‌دست آمده نشان داد که تعداد و مساحت کلونی‌ها در طول دو هفته کشت افزایش معنی‌داری یافته است. به عبارت دیگر؛ با استفاده از این سیستم هم‌کشتی در طول دو هفته کشت نه تنها سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی زنده ماندند بلکه کلونی‌های حاصل از تکثیر آن‌ها در مدت زمان کوتاه‌تری ظاهر شده و تعداد و مساحت آن‌ها نیز به صورت تصاعدی افزایش یافت. ماهیت اصلی سلول‌های تشکیل دهنده این کلونی‌ها با روش Real-Time PCR ارزیابی شد و نتایج نشان داد که بین سلول‌های اسپرماتوگونی در روز اول کشت و کلونی‌های به‌دست آمده در هفته دوم کشت اختلاف معنی‌دار وجود ندارد به عبارتی سلول‌های این کلونی‌ها ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی را بیان

کرده که خود تأییدی بر عدم تمایز این سلول‌ها در این دوره کشت است. سلول‌های به‌دست آمده در این مرحله می‌توانند منبع مناسبی برای انجام مطالعات زیستی روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی باشند.

برای استفاده از این سلول‌های اسپرماتوگونی، خالص‌سازی و جداسازی کامل آن‌ها از سلول‌های سرتولی ضروری است. با توجه به این‌که تاکنون نشانگر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی معرفی نشده است، از روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی این سلول‌ها استفاده شده است. بعضی از این روش‌های خالص‌سازی، از جمله سانتریفوژ براساس شیب غلظت پرکل (Percoll)، MACS (Magnetic Cell Sorting) و FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) که در بسیاری از مطالعات انجام گرفته است [۱۱، ۱۶، ۳۵-۳۷]، روش‌های پرهزینه‌ای است. کاربرد روش حذف تمایزی در این تحقیق نشان دهنده کارایی این روش ساده در جداسازی درصد بالایی از سلول‌های اسپرماتوگونی (۸۰ درصد) است. در پایان با توجه به نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با نتایج سایر مطالعات داخلی و خارجی، سادگی این روش برای حفظ بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عدم نیاز به صرف هزینه، استفاده از این سیستم هم‌کشتی را منطقی می‌سازد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته علوم تشریح است و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله انجام شده است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس به دلیل همکاری‌های انجام گرفته در رابطه با اجرای این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Meistrich ML, Van Beek M. Spermatogonial stem cells. In: Desjardins C, Ewing LL (Eds).

- Cell and molecular biology of the testis. New York: Oxford University Press, 1993; p: 266-94.
- [2] de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21(6): 776-98.
- [3] Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human compar. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87(1): 27-34.
- [4] Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11303-7.
- [5] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11298-302.
- [6] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development* 2005; 132(18): 4155-63.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45(5-6): 281-9.
- [10] 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.
- [11] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004; 71(3): 722-31.
- [12] Nagano M, Brinster RL. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS* 1998; 106(1): 47-55; discussion 56-7.
- [13] Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction* 2002; 124(6): 791-9.
- [14] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
- [15] Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(12): 4467-73.
- [16] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47): 16489-94.

- [17] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 2003; 18(12): 2660-7.
- [18] Hess R, França LR, Skinner M, Griswold M. Structure of the Sertoli cell. In: Skinner MK, Griswold MD (Eds). *Sertoli Cell Biology*. California: Elsevier Academic Press, 2005; p: 19-40.
- [19] Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 2004; 6(3): 259-68.
- [20] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *IJRM* 2007; 5(3): 109-15.
- [21] Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafeian SH. 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.
- [22] Kala S, Kaushik R, Singh KP, Kadam PH, Singh MK, Manik RS, Singla SK, Palta P, Chauhan MS. In vitro culture and morphological characterization of prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) putative spermatogonial stem cell. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(12): 1335-42.
- [23] Tres LL, Kierszenbaum AL. Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(11): 3377-81.
- [24] Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 1998; 30(4): 389-97.
- [25] Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124(1): 85-94.
- [26] Slahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Bakhtiyari M, Ayyoubiyan M, Asadi MH, Koruji M. The effects of plla nanofiber scaffold on proliferation of frozen-thawed neonate mouse spermatogonial stem cells. *J Iran Anat Sci* 2012; 9(37): 279-94. (Persian)
- [27] Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 141.
- [28] Tavakolifar F, Shahverdi A, Pirouz M, Shakeri M, Koruji M, Baharvand H. The effect of laminin and gelatin extracellular matrix on short-term cultivation of neonate mouse spermatogonial stem cells. *J Iran Anat Sci* 2010; 8: 37-48. (Persian)
- [29] Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(48): 17430-5.
- [30] 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.

- [31] Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl* 2003; 24(5): 661-9.
- [32] Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol Reprod* 1999; 61(1): 225-30.
- [33] Nagano MC, Yeh JR. The Cluster-Forming Activity Assay: A Short-Term In Vitro Method to Analyze the Activity of Mouse Spermatogonial Stem Cells. In: Orwing KE, Hermann BP (Eds). *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential*. New York: Humana Press, 2011; p: 125-34.
- [34] Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(6): 709-20.
- [35] van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, Stefanini M. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod* 1996; 55(2): 439-44.
- [36] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(11): 6487-92.
- [37] Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 2005; 279(1): 114-24.