مقایسه دو روش فیزیکی و آنزیمی برداشت سلول از ظرف کشت از طریق فلوسایتومتری

مونا زمانیان عضدی[1]*؛ کبری رضایی طاویرانی[1]؛ معصومه موسوی[1]

چکیده

زمینه: کشت سلول به‌منظور دستیابی به اهداف آزمایشگاهی مختلفی صورت می‌گیرد. جداسازی سلول از ظرف کشت برای انجام آزمایشات دیگر به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از این روش‌های جداسازی سلول چسبنده از ظرف، استفاده از آنزیم‌های جداکننده مانند تریپسین است. این عمل ممکن است توأم با اثرات جانبی ناشی از تأثیر هضم آنزیمی بر سایر جنبه‌های حیاتی سلول‌ها باشد. برای اجتناب از این امر با روش استفاده از ابزار فیزیکی، می‌توان سلول‌ها را از ظرف جدا کرد. به‌نظر می‌رسد آسیب فیزیکی، بقاء سلول‌ها را نیز تهدید می‌کند. در این مقاله، این دو نوع آسیب با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی و مقایسه می‌شوند.

روش‌ها: دودمان سلولی MKN45 که از نوع سلول‌های سرطانی معده بوده و در محیط RPMI با دمای ۳۷°C و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شده و بعد از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، به دو روش هضم و فیزیکی از ظرف کشت، جدا و وضعیت حیاتی سلول‌ها از طریق روش فلوسایتومتری مورد بررسی و سپس آنالیز قرار گرفته است.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان داد که برداشت فیزیکی، نسبت به روش آنزیمی، سبب وقوع نکروز سلولی بیشتری می‌شود. این اختلاف معنادار از طریق مشاهدات میکروسکوپی مورد تأیید بوده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به وقوع مرگ سلولی کم‌تر ناشی از اعمال هضم آنزیمی، به‌نظر می‌رسد که روش هضم آنزیمی در مقایسه با روش فیزیکی برای برداشت سلول از ظرف کشت روش بهینه‌تری است.

کلیدواژه‌ها: کشت سلول، برداشت فیزیکی، هضم آنزیمی، تریپسین، فلوسایتومتری

«دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱»

۱. مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

* **عهده‌دار مکاتبات:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس تلفن: ۲۲۷۱۴۲۴۸-۰۲۱

Email: mona.azodi@gmail.com

مقدمه

کشت سلول به‌منظور اهداف آزمایشگاهی مختلفی صورت می‌گیرد. از تست‌های مولکولی نظیر پروتئومیکس، ساخت محصولات بیوتکنولوژی نظیر آنتی‌بادی و واکسن گرفته تا انجام تست‌های بقای سلولی تحت تأثیر عوامل گوناگون که در واقع به‌عنوان جایگزینی برای تست‌های توکسیسیتی روی حیوانات است، می‌توان از کاربردهای کشت سلولی نام برد. تحقیقاتی که براساس زیست‌شناسی مولکولی، مهندسی بافت و مطالعات سلول‌های بنیادی است، نیز وابسته به انجام کشت سلول است. کشت سلول در حقیقت نه‌تنها در عرصه تحقیقات پایه کاربرد دارد، بلکه در رابطه با آزمایشات بالینی نظیر ساخت ارگان‌های مصنوعی و لقاح مصنوعی، کاربرد فراوان پیدا کرده است(۱). کشت سلول در واقع پروسه‌ای را شامل می‌شود که طی آن سلول‌ها خارج از محیط طبیعی خود رشد می‌کنند که به‌طور معمول این سلول‌ها از یوکاریوتیک پرسلولی جداسازی می‌شوند که عمدتاً سلول‌هایی با منشأ جانوری هستند. هرچند که در برخی موارد سلول‌هایی با منشاء گیاهی، قارچ‌ها وحتی ارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و پروتیست‌ها (پروتزوئرها، آلگ‌ها و قارچ‌ها) نیز کشت داده می‌شوند. کشت سلول در اواسط قرن بیستم رواج

یافت (۲). اما این موضوع برای اولین بار در قرن نوزدهم مطرح شد (۳). سلول‌ها به‌طرق مختلفی برای انجام کشت، از بدن موجود زنده جداسازی می‌شوند. یکی از این راه‌ها، جداسازی سلول‌های خونی از سیستم گردش خون است. جداسازی سلول‌ها از بافت‌های نرم نیز به‌کمک آنزیم‌هایی نظیر کلاژناز، تریپسین و پروتئاز صورت می‌گیرد که در واقع ماتریکس خارج سلولی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و هضم می‌شود. در روش دیگر، قسمتی از بافت داخل پلیت قرار داده می‌شود تا سلول‌های آن رشد کنند. اکثر سلول‌های استخراج‌شده از بافت‌های سخت در ظرف محیط کشت به‌صورت تک‌لایه رشد می‌کنند که به این نوع سلول‌ها، سلول‌های چسبنده می‌گویند. سلول‌های چسبنده بعد از انجام پاساژ، برای آن‌که شروع به رشد و یا تقسیم کنند، برای اتصال به یک بستر نیاز دارند (۴). بستری که برای این کار انتخاب می‌شود، معمولاً از نوع پلی‌استارن است که سطح کف آن با بار منفی پوشانده شده است و به اتصال سلول‌ها به این بستر کمک می‌کنند. از آن‌جایی که از طریق یکسری سیگنال‌هایی که روی سطح سلول‌ها وجود دارد، سلول به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شود، در مهندسی این ظروف از وجود یکسری از پروتئین‌های ماتریکس سلولی از جمله پروتئوگلیکان‌ها استفاده می‌شود. سه گروه اصلی پروتئین ترانس ممبرن در اتصالات بین سلولی و سلول‌ها با سوبسترا نقش دارند. دسته اول شامل مولکول‌های اتصالی بین سلول- سلول و دسته دوم اتصالات کادهرین (وابسته به کلسیم) و در نهایت اتصالات CAMs (اتصالات مستقل از کلسیم) است (۵). بسته به این‌که سلول‌ها از نوع سوسپانت یا چسبنده باشند، نوع کشت آن‌ها متفاوت خواهد بود. سلول‌های سوسپانت را از فلاسک به درون لوله‌های فالکون ریخته و پس از سانتریفوژ، مایع رویی را دور می‌ریزند و بقیه به لوله محیط کشت اضافه می‌شود. اما معمولاً سلول‌ها از نوع چسبنده هستند و برای انجام پاساژ و کشت سلولی لازم است سلول‌ها را از کف ظرف جدا کرد. از آن‌جایی که اتصال محکمی بین لایه سلولی و کف ظرف برقرار است، عمل جداسازی کمی دشوار بوده و در حین جداسازی، تعداد زیادی از سلول‌ها دچار آسیب شده و از بین می‌روند. از این رو، روش‌های مختلفی در این جهت پیشنهاد می‌شود، از جمله می‌توان به روش‌های آنزیمی مانند استفاده از تریپسین و یا روش‌های فیزیکی مانند اسکراپر اشاره کرد. در روش آنزیمی، برای انجام پاساژ ابتدا محیط کشت رویی را دور می‌ریزند و سپس به‌میزان کافی تریپسین اضافه کرده و سه دقیقه بعد سلول‌ها کاملاً از کف فلاسک جدا می‌شوند. از آن‌جایی که سلول‌های چسبنده پس از جدا شدن از کف فلاسک، به‌صورت سوسپانت در می‌آیند که در هنگام جداسازی، تعدادی از آن‌ها از بین می‌روند، بنابراین انتخاب روش مطمئن‌تر به‌منظور جداسازی، حایز اهمیت بسیار است که به‌کمک تکنیک فلوسایتومتری این فاکتور سنجیده می‌شود (۶). تکنیک فلوسایتومتری از جمله تکنیک‌های بیوفیزیک برای بررسی مرگ سلولی، شمارش، ردیابی بیومارکرها و در مهندسی پروتئین استفاده دارد (۷). در روش فلوسایتومتری، سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده به‌وسیله فلوروکروم‌های اتصالی به اجزای سلولی در یک جریان سیال قرار می‌گیرند و به‌صورت تک‌تک از مقابل پرتو نوری (لیزر) عبور می‌کنند و متعاقب آن نور پراکنده شده و نور فلورسنس جانبی، توسط آشکارسازها جمع‌آوری می‌شود. این آشکارسازها سیگنال‌های نوری را به سیگنال‌های الکتریکی متناسب با نور جمع‌آوری‌شده تبدیل می‌کنند. پراکنش نور در زاویه‌های مختلف می‌توانند سلول‌ها را بر اساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی شان از هم متمایز کنند (۸). در این تحقیق، استفاده از مناسب‌ترین روش جداسازی به‌منظور به حداقل رساندن آسیب به سلول‌ها به‌کمک تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلول به‌منظور دسترسی به جمعیت موردنظر سلول‌هاست. به این ترتیب که سلول‌های مورد مطالعه، در

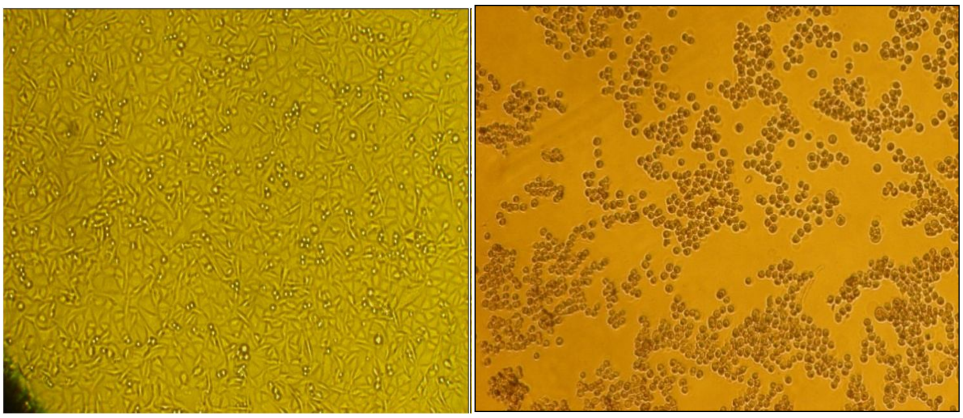
محیط RPMI 1640 حاوی ۲۰-۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) به همراه پنی‌سیلین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد گاز CO2 کشت داده شده‌اند (۹). برای درک مکانیسم مرگ سلولی فلوسایتومتری از بهترین روش‌ها محسوب می‌شود (۱۰). به‌همین منظور سلول‌های سرطانی معده که به رشد مناسب رسیده بودند و حجم زیادی از کف فلاسک را پوشانده بودند، توسط روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا سلول‌های سرطانی معده در دو فلاسک t25 مجزا کشت داده شدند و زمانی که یکی از فلاسک‌ها به تراکم ۸۰ درصد سلولی رسید، جداسازی سلول‌ها به‌کمک تریپسین و اسکرپر انجام شد. برای خنثی کردن تریپسین، مقداری محیط کشت حاوی سرم به فلاسک اضافه شد، سپس سلول‌های جداشده را در لوله فالکون ریخته، سانتریفوژ کردیم. در نهایت مایع رویی را دور ریخته و سلول‌ها به‌همراه محیط کشت جدید به فلاسک یا پلیت دیگر اضافه گردیدند. در روش فیزیکی به جای آنزیم، از ابزاری مانند اسکرپر استفاده شد. به این ترتیب که در یکی از فلاسک‌ها جداسازی با شستشو توسط PBS و سپس اثردهی آنزیم تریپسین همراه با EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) این ماده برای کلات کردن اتصالات کلسیم‌دار استفاده می‌شود (۱۱) و تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ ثانیه با استفاده از ضربات فیزیکی و اثر آنزیم جداسازی انجام می‌گیرد. پیپیتاژ به‌منظور جداسازی کلونی‌های سلولی انجام می‌شود. سلول‌های فلاسک دیگر را با کمک اسکرپر از کف فلاسک جدا کردیم و سپس محتویات دو فلاسک را که حاوی نمونه بود، در فاکلون‌های جدا ریخته و تحت سانتریفیوژ قرار دادیم و محلول رویی را دور ریخته و سپس از کیت (Kit) مربوط به فلوسایتومتری (Annexin V) حاوی سه محلول بافرِ باندکننده، انکسین و ماده PI ۵ استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر Binding Buffer ریخته و پیپتاژ کردیم تا حل شود. سپس آن را داخل ویال مربوط به انجام فلوسایتومتری ریخته و بعد ۲ میکرولیتر آنکسین و ۲ میکرولیتر PI اضافه شد. بعد از اضافه کردن مواد کیت انکسین، سلول‌های تیمارشده به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی، در دمای اتاق قرار داده و در آخر به ویال منتقل کردیم تا توسط برنامه خوانده شوند. چون حجم داخل ویال برای خواندن دستگاه نبایستی کم‌تر از ۵۰۰ میکرولیتر باشد در نتیجه ۴۰۰ میکرولیتر PBS نیز به داخل ویال‌ها اضافه شد (۱۲).

یافته‌ها

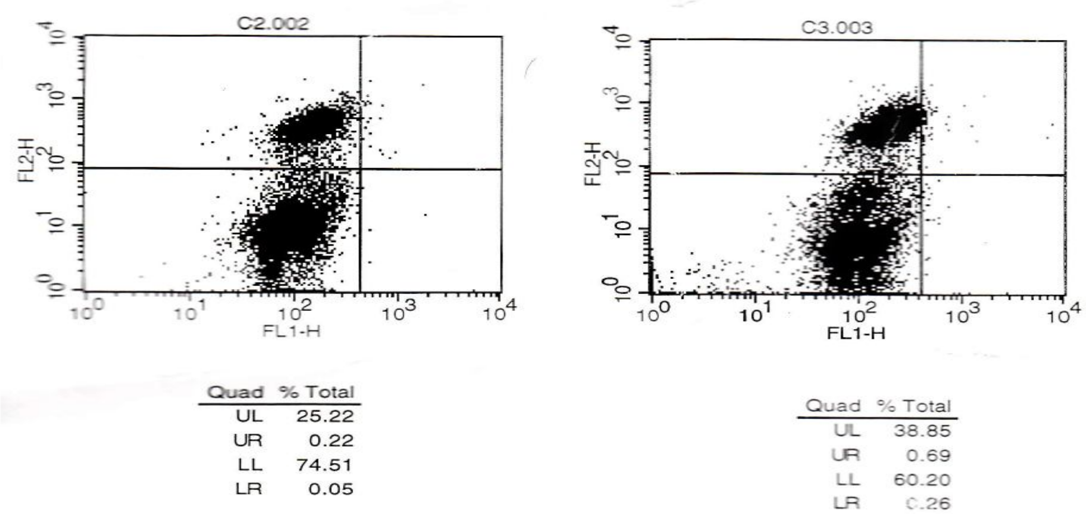
به‌منظور مشاهده سلول‌های کشت داده شده که آماده برداشت از کف ظرف بودند ابتدا تصویر میکروسکوپی تهیه شد (تصویر ۱- راست). با توجه به این شکل مشخص است که سلول‌ها به‌طور طبیعی رشد کرده و به کف ظرف چسبیده‌اند. پس از اعمال هضم آنزیمی نیز از سلول‌ها تصویر برداشته شده است (تصویر ۱-چپ). در این تصویر مشاهده می‌گردد که سلول‌ها متعاقب هضم آنزیمی از کف ظرف جدا شده‌اند.

در تصویر ۲، نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داده شده است. با استفاده از فلوسایتومتری می‌توان درصد سلول‌های زنده و نیز سلول‌هایی که از طریق نکروزیس و یا آپوپتوزیز از بین رفته‌اند تعیین نمود. در این تصویر، نتایج بدست آمده برای سلول‌هایی که به‌وسیله تیغه از ظرف جدا شده‌اند و نیز سلول‌هایی که توسط روش آنزیمی برداشته شده‌اند، نشان داده شده است.

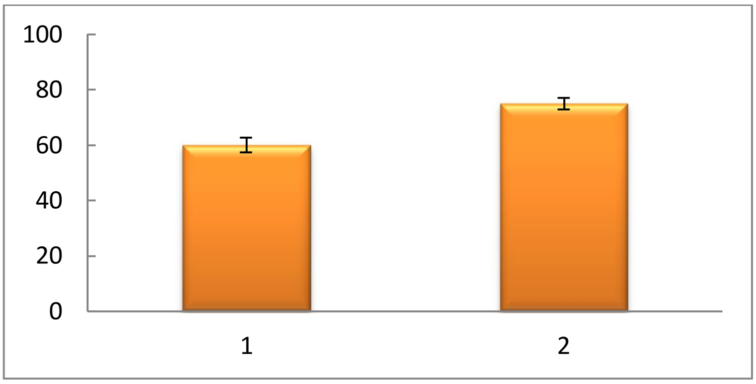
در تصویر ۳، جمعیت سلول‌های سالم در نمونه‌های جداسازی‌شده با تیغه و هضم آنزیمی به تصویر کشیده شده است. آنالیز آماری نشان‌دهنده تفاوت معنادار تعداد دو جمعیت می‌باشد.



تصویر ۱- راست: تصویر و مورفولوژی سلول‌های سرطانی معده و نحوه اتصال آن‌ها به کف ظرف کشت و چپ: سلول‌های سرطانی معده بعد از اعمال هضم آنزیمی



تصویر ۲- نتایج فلوسایتومتری مربوط به سلول‌های سرطانی معده. راست: جداسازی شده به کمک تیغه و چپ: جداسازی به کمک هضم آنزیمی. سمت راست پایین تصاویر مربوط به وقوع پدیده آپوپتوزیز است در صورتی که در ناحیه سمت چپ پایین مربوط به جمعیت سلول‌های سالم می‌باشد. در سمت چپ فوقانی وقوع پدیده نکروزیس به تصویر کشیده شده است در حالی که در سمت راست فوقانی نکروزیس و آپوپتوزیس توأمان نشان داده شده است.



تصویر ۳- نمایش درصد جمعیت سلول‌های سالم پس از برداشت آنزیمی (ستون ۲) و درصد سلول‌های بقا یافته پس از برداشت با تیغه. دو میانگین با مقدار P<۰/۰۱ با هم دیگر اختلاف معنادار دارند

بحث

برداشت سلول از محیط کشت یکی از مراحل مهم کشت است. از آن‌جا که سلول‌ها در محیط کشت به‌حالت معلق یا چسبیده وجود دارند. برداشت سلول‌های معلق فاقد پیچیدگی یا دشواری می‌باشد. در صورتی‌که برداشت سلول‌های چسبنده از کف ظرف مستلزم به‌کارگیری روشی مناسب است تا بتوان با حداقل آسیب‌رسانی به آن‌ها سلول‌ها را برای ادامه مطالعه و انجام آزمایش از ظرف جدا و به محیط جدید منتقل کرد (۱۳). اولین نکته در برداشت سلولی این است که برداشت کارایی و بازده بالا داشته باشد (۱۴ و ۱۵). چنان‌چه عمل برداشت ناقص انجام شود، کمیت سلول‌های برداشت‌شده پایین خواهد بود و در نتیجه ممکن است در بحث شمارش یا انجام مراحل بعد کشت، خطاهای غیرقابل قبولی بروز کند. دومین نکته در خصوص برداشت سلولی از سطح چسبنده، آسیب‌دیدگی سلول است. سلول‌هایی که هنگام برداشت دچار آسیب می‌شوند ممکن است اقدام به تولید آنزیم‌هایی کنند که در حالت عادی تولید نمی‌شوند یا این‌که موادی از داخل سلول به فضای خارج سلولی ریزش کند. به‌همین علت تلاش می‌شود از روش‌های کارآمد و در عین‌حال با کم‌ترین اثر بر سلول بتوان سلول‌ها را از ظرف جدا کرد (۱۶ و ۱۷). دو روش مختلف برای برداشت سلول از ظرف کشت موجود است که هرکدام ویژگی خاص خودشان را دارند (۱۸). روش اول، استفاده از آنزیم و روش دوم، برداشت توسط تیغه است که روش فیزیکی نامیده می‌شود. در این تحقیق، تأثیر به‌کارگیری این دو روش در برداشت سلول از ظرف، با استفاده از دودمان سلولی MKN45 بررسی شد. مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های کشت‌داده‌شده به‌خوبی به کف ظرف چسبیده و یک لایه منظم سلولی را تشکیل داده‌اند و بنابراین یک جمعیت سلولی آماده برای مراحل بعدی آزمایش تشکیل شده است. همچنین نشان داده شد که با استفاده از آنزیم سلول‌ها از حالت یک لایه منظم خارج و از ظرف کشت جدا شدند. روش فلوسایتومتری، روش دقیقی برای تشخیص و افتراق سلول‌های زنده و مرده است (۱۹ و ۲۰). خروجی فلوسایتومتری یک نمودار صفحه‌ای است که تجمع سلول‌های زنده را به‌صورت نقاطی متناظر در بخش تحتانی و سمت چپ تصویر نشان می‌دهد. همچنین جمعیت سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند را به‌طریقی مشابه در سمت راست و پایین تصویر نشان می‌دهد. در این روش جمعیت سلول‌ها متحمل نکروزیز در سمت چپ فوقانی و سلول‌های متحمل آپوپتوز توأمان با نکروزیز در سمت راست فوقانی نمایش داده شد. در مطالعه حاضر سلول‌هایی که با کمک تیغه از ظرف جدا شده بودند نسبت به سلول‌های برداشت شده با روش هضم آنزیمی، بقای کم‌تری داشتند. سلول‌هایی که تحت اثر هضم آنزیمی بودند نکروزیس کم‌تری نسبت به گروه دیگر داشتند و بقا سلول‌های جداشده به آنزیم با آنالیز آماری مناسب به‌طور معناداری از سلول‌های دیگر بیشتر بود. وقوع آپوپتوز در هر دو گروه یکسان، ناچیز و قابل چشم‌پوشی بود و این به مفهوم فعال نشدن مسیر آپوپتوز در هر دو روش است.

نتیجه‌گیری

استفاده از هضم آنزیمی روشی کارآمدتر و بهینه است. گرچه ممکن است در برخی از آزمایشگاه‌ها آنزیم مصرف نشود می‌توان اعتماد کرد که روش برداشت فیزیکی، آسیب کیفی به سلول‌های برداشت شده وارد نمی‌کند و تنها از نظر کمی، جمعیت سلولی کم‌تری را منتقل می‌نماید که قابل جبران است و ماهیت آزمایش را مخدوش نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله برخود واجب می‌دارد تشکرات صمیمانه خود را به مناسبت حمایت‌های ارزشمند جناب آقای دکتر مصطفی رضایی طاویرانی ریاست محترم مرکز تحقیقات پروتئومیکس در تهیه این مقاله، تقدیم دارد.

References

1. Macdonald C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. Crit Rev Biotechnol. 1990; 10(2):155-78.
2. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B, Yang SY. Bone marrow–allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. N Engl J Med. 1990; 323(26):1818-22.
3. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. Annu Rev Chem Biomol Eng. 2011;2:403-30.
4. Freshney RI. Culture of Animal Cells. 5th ed. NewYork: Wiley. 2005; 5-7.
5. Hashim YZY, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. Int J Cancer Suppl. 2008; 122(3):495-500.
6. Miller RG, Phillips R. Separation of cells by velocity sedimentation. J Cell Physiol. 2005; 73(3):191-201.
7. Qian Y, Wei C, Eun Hyung Lee F, Campbell J, Halliley J, Lee JA, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B cell subsets and quantification of the tetanus response using a density based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. Cytometry Part B: Clin Cytom. 2010; 78(1):69-82.
8. Madigan MT. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall. 2005; 149-52.
9. Loken MR. Simultaneous quantitation of Hoechst 33342 and immunofluorescence on viable cells using fluorescence activated cell sorter. Cytometry. 1980; 1(2):136-42.
10. Ardeshiry lajimi A, Rezaie-Tavirani M, Mortazavi M, Barzegar M, Moghadamnia M, Rezaee M. Study of anti-cancer property of Scrophularia striata extract on the human astrocytoma cell line (1321). IJPR. 2010;9(4):403-10.
11. Bell D, Davies R. Cell harvesting of oleaginous yeast by cross flow filtration. Biotechnol Bioeng. 2004; 29(9):1176-8.
12. Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. GHFBB. 2011; 5(1).
13. Ito A, Ino K, Kobayashi T, Honda H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. Biomaterials. 2005; 26(31):6185-93.
14. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci. 2003; 116(9):1827-35.
15. Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimble JM. Adipose-derived adult stem cells for cartilage. Tissue Eng Biorheology. 2004; 41(3-4):389-400.
16. Halvorsen Y-DC, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. Tissue Eng. 2001; 7(6):729-41.
17. Van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, Lee Y, Halbleib M, Aprath-Husmann I, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. Int J Obes. 2003; 27(8):889-95.
18. van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. Metabolism. 2004;53(5):632-7.
19. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. CTO. 2004; 178(1):2-12.
20. Hauner H, Entenmann G. Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. Int J Obes. 1991; 15(2):121