Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Evaluation and Comparison of the Expression Levels of the ZBTB16 (Plzf) and ZFP Genes and Alkaline Phosphatase in Three Cell Populations: Mouse Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Stem-Like Cells (Es-Like), And Embryonic Stem Cells

Emad Reza [1], Hossein Azizi [1*], Ali Asghar Ahmadi [2]

[1] Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
[2] North Research Center, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 06 June 2022
Revised: 16 September 2022
Accepted: 23 October 2022
Published Online:26 February 2023

**** Correspondence to:***
Hossein Azizi
Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
Email:
h.azizi@ausmt.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: One of the vital enzymes during spermatogenesis, which is one of the pluripotency factors of stem cells and contributes to maintaining their pluripotency is alkaline phosphatase. ZBTB16 and ZFP proteins are critical elements in stem cells which are expressed in pluripotent stem cells and maintain their pluripotency due to their role in messaging pathways.

Material & Methods: The separation of the spermatogonial stem cells is the initial stage, followed by the preparation of the mouse embryonic stem cells and ES-like cells. The protein-protein network and the connections between genes were then investigated after alkaline phosphatase staining. Then, using the Fluidigm PCR method, the expression of the ZBTB16 and ZFP genes was determined. Finally, spermatogonia was immunohistochemically stained for the ZBTB16 protein. (Ethic Code: IR.AUSMT.REC.1400.29)

Findings: Alkaline phosphatase was expressed positively by stem cell types; moreover, it was absent in Sertoli and fibroblast cells. Additionally, the specificity of these factors was demonstrated by the positive expression of the ZBTB16 and ZFP genes in these three cells and their negative expression in Sertoli cells. The connection and effect of these genes on the other genes are shown by the Protein-Protein network analysis.

Discussion & Conclusion: Alkaline phosphatase, as well as ZBTB16 and ZFP genes are expected to be among the special markers of pluripotent stem cells and the critical elements of embryonic stem-like cells.

Keywords: Alkaline phosphatase, Embryonic stem cells, Spermatogonial stem cells (SSCs), ZBTB16 protein, ZFP protein

➢ **How to cite this paper**
Emad R, Azizi H, Ahmadi AA. Evaluation and Comparison of the Expression Levels of the ZBTB16 (Plzf) and ZFP Genes and Alkaline Phosphatase in Three Cell Populations: Mouse Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Stem-Like Cells (Es-Like), And Embryonic Stem Cells. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(1): 29-41.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی و مقایسهٔ میزان بیان ژن‌های ZBTB16(Plzf)، ZFP و آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت سلولی: سلول‌های بنیادی جنینی، شبه‌جنینی (ES-like) و اسپرم‌ساز موش

عماد رضا[۱]، **حسین عزیزی**[۱*]، **علی‌اصغر احمدی**[۲]

[۱] گروه زیست‌فناوری، دانشکدهٔ زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

[۲] پژوهشکدهٔ شمال، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷

نویسنده مسئول:

حسین عزیزی

گروه زیست‌فناوری، دانشکدهٔ زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

Email:

h.azizi@ausmt.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیمهای اساسی طی فرایند اسپرماتوژنز است که جزو عامل‌های پرتوانی سلول‌های بنیادی است و در حفظ پرتوانی آن‌ها نقش دارد. پروتئینهای ZBTB16 و ZFP نیز جزو عوامل بااهمیت سلول‌های بنیادی هستند که در سلول‌های بنیادی پرتوان بیان می‌شوند و با نقش خود در مسیرهای پیامرسانی باعث حفظ حالت پرتوانی آن‌ها می‌گردند.

مواد و روش‌ها: اولین اقدام، جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و پس از آن، تهیهٔ سلول‌های بنیادی جنینی موش و سلول‌های ES-like است. پس از آن، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز انجام شد و در ادامه، بررسی شبکهٔ پروتئین-پروتئین و ارتباط ژن‌ها صورت گرفت؛ سپس با استفاده از فن Fluidigm PCR بیان ژن‌های ZBTB16 و ZFP سنجیده گشت و همچنین در انتها، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی پروتئین ZBTB16 در لوله‌های اسپرم‌ساز نیز انجام شد.

یافته‌های پژوهش: جمعیتهای سلول‌های بنیادی بیان مثبت آلکالین فسفاتاز را نشان دادند و همچنین بیان بسیار اندک و منفی آن در سلول‌های سرتولی و فیبروبلاستها مشاهده گردید. بیان مثبت ژن‌های ZBTB16 و ZFP نیز در این سه جمعیت نشان داده شد و بیان منفی آن‌ها در سلول‌های سرتولی نیز مشاهده گردید که نشان‌دهندهٔ اختصاصی بودن این عوامل است. شبکهٔ ارتباطی رسم‌شده نشان‌دهندهٔ میزان و نوع تأثیر این ژن‌ها بر یکدیگر و دیگر ژن‌ها است.

بحث و نتیجه‌گیری: می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که آلکالین فسفاتاز و همچنین ژن‌های ZBTB16 و ZFP جزو نشانگرهای خاص سلول‌های بنیادی پرتوان و همچنین جزو عامل‌های اصلی سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی هستند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (SSC)، سلول‌های بنیادی جنینی، آلکالین فسفاتاز، پروتئین ZBTB16، پروتئین ZFP

استناد: رضا، عماد؛ عزیزی، حسین؛ احمدی، علی‌اصغر. بررسی و مقایسهٔ میزان بیان ژن‌های ZBTB16(Plzf)، ZFP و آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت سلولی: سلول‌های بنیادی جنینی، شبه‌جنینی (ES-like) و اسپرم‌ساز موش. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۲؛۳۱(۱): ۴۱-۲۹.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

CC BY NC

مقدمه

اسپرماتوژنز فرایندی بسیار سازمان‌یافته با مراحل مختلف است (۱). عوامل و فاکتورهای بسیاری هستند که مراحل مختلف این چرخه و مسیرهای پیامرسانی دخیل در آن را تحت کنترل دارند. آلکالین فسفاتازها (AP) گروهی از آنزیمها هستند که در شرایط قلیایی، مولکول‌های حاوی فسفات را هیدرولیز می‌کنند. برای سلول بنیادی جنینی (ESC) موش، از روش آزمایشگاهی تشکیل کلونی AP مثبت، به‌عنوان معیاری برای سنجش پرتوانی آن‌ها استفاده می‌شود (۲). اخیراً از تشکیل کلونیهای AP مثبت در مراحل اولیهٔ برنامه‌ریزی مجدد سلولی، به‌عنوان شاخص اولیهٔ برنامه‌ریزی مجدد موفق سلول‌ها استفاده می‌گردد. سنجش بیان AP معیاری برای سنجش تفاوت میان سلول های تمایزیافته و تمایزنیافته است که کمتر استفاده شده است؛ زیرا سطح بیان آن با توجه به مرحلهٔ تمایز، متفاوت است؛ درنتیجه، بیان AP یک نشانگر مناسب برای سلول‌های بنیادی پرتوان است؛ اما با برخی محدودیت ها. سطح بالای AP با فنوتیپ‌های پرتوانی و سلول‌های بنیادی پرتوان تمایزنیافته همبستگی بسیار مناسبی دارد. سطح پایین فعالیت AP نشان‌دهندهٔ محدودیت پرتوانی است که در سلول‌های اپی‌بلاست و تمایزیافته مشاهده می‌شود (۳, ۴). در همهٔ موارد دیگر، یعنی در SC بزرگ‌سالان و غیره، سطح بالای AP با فرایند تمایز همراه است (۵).

ZFP145 یکی دیگر از عوامل دخیل در اسپرماتوژنز است که در مراحل اولیهٔ سلول‌های بنیادی مشاهده‌شده است. اطلاعات اندکی دربارهٔ سازوکارهای مولکولی وجود دارد که چگونه و تحت چه سازوکارهای پیامرسانی، اسپرماتوگونیها (سلول‌های زایای بیضه) خودتجدیدشوندگی را اعمال می‌کنند و یا به اسپرم بالغ تمایز مییابند. راجع به برخی ژن‌ها اطلاعات بسیار اندکی موجود است و ممکن است شناخت کامل و درک سازوکار هرکدام از این ژن‌ها، این حلقههای گم‌شده از مسیرها را کامل کند. علاوه بر این، مشخص‌شده است که پروتئین ZFP145، کدکنندهٔ ژن سرکوب‌کنندهٔ رونویسی ZBTB16، نقش مهمی در اسپرم‌زایی دارد (۶, ۷). بیان ZFP145 به گنوسیتها و اسپرماتوگونی تمایزنیافته محدود می‌شود و در لولههای اسپرم‌ساز جهش‌یافته که بدون این سلول‌های تمایزنیافته بودند، وجود ندارد (۸). موش‌های بدون ZFP145 با افزایش سن، دچار از دست دادن تدریجی اسپرماتوگونی میگردند که با افزایش آپوپتوز و از دست دادن ساختار لولهها همراه است؛ اما بدون ایجاد نقص در تمایز و یا از دست دادن سلول‌های سرتولی که به‌عنوان پشتیبان هستند (۹). ZBTB16 در غدد جنسی نر در طول دورهٔ جنینی موش و پس از تولد بیان می‌شود. بیان ZBTB16 با گذشت زمان کاهش می‌یابد و به اسپرماتوگونی محدود میگردد. موش‌های نر بدون بیان ZBTB16 که یک سرکوب‌کنندهٔ رونویسی است، کاهش تدریجی سلول های زاینده را به علت کاهش جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نشان می‌دهند. این امر احتمالاً به سبب بیان تنظیم‌نشدهٔ ژن‌هایی است که نقش انتقال میان خودنوسازی اسپرماتوگونی و تمایز را کنترل می‌کنند (۱۰).

ZBTB16 بر مسیرهای پیام‌رسانی متنوعی ازجمله چرخهٔ سلولی، تمایز، مسیرهای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده و همچنین در رشد و بیولوژی آن‌ها نقش اصلی دارد (۱۱). فرایندهایی ازجمله اسپرم‌زایی و نگهداری سلول‌های بنیادی جزو فرایندهایی هستند که این ژن در تنظیم و رخ دادن آن‌ها مؤثر است (۱۲, ۱۳). از نظر مورفولوژیکی، هم نئوپلازی سلول‌های زایا و هم اسپرماتوگونی به‌صورت سلول‌های زایای بزرگ ظاهر می‌شوند (۱۴). در بیضه‌ها، ZBTB16 به‌طور اختصاصی در اسپرماتوگونی تمایزنیافته بیان می‌گردد. مطالعات نشان دادهاند که ZBTB16 برای افزایش خودتجدیدشوندگی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز عمل می‌کند و نقش کلیدی در حفظ اسپرماتوژنز طبیعی دارد (۱۵). ناباروری در موشهای ZBTB16-null به علت اختلال در خودتجدیدشوندگی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و به دنبال آن، از میان رفتن سلول‌های اسپرماتوگونی مشاهده می شود (۱۶, ۱۷). ZBTB16 یک سرکوب‌کنندهٔ رونویسی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

شناخته‌شده است که نقش کلیدی در اسپرم‌زایی طبیعی دارد (۱۸, ۱۹).

همان‌طور که اشاره شد، بررسی بیان ژن‌های دخیل در فرایند پیچیدهٔ اسپرماتوژنز می‌تواند کمک بزرگی در زمینهٔ درک سازوکارهای دخیل در این فرایند و تنظیم آن‌ها طی مسیرهای سیگنالینگ باشد. ازآنجاکه امروزه ناباروری بر اساس آمار روزبه‌روز فراوان‌تر می‌گردد که علل گوناگونی دارد، بسیاری از محققان در تلاش‌اند تا بتوانند با درک کاملی از این سازوکارها، راه درمانی اساسی پیدا کنند تا با تنظیم کنترل‌شده و درمان مسیرهای آسیب‌دیده بتوانند ناباروری افراد را درمان کنند. سلول‌درمانی یکی از راههای درمانی است که امروزه برای درمان ناباروری انجام میشود. سلولهای بنیادی شبه‌جنینی یکی از منابع جدید سلولهای بنیادی پرتوان است که اخیراً کشف شده است و ویژگیهایی شبیه سلولهای بنیادی جنینی دارد. چنانچه بتوان از این ردهٔ سلولی به‌عنوان منبع سلولهای بنیادی برای سلول‌درمانی استفاده کرد، با توجه به دسترسی آسان به این ردهٔ سلولی، می‌تواند مسیر این روش درمانی را به‌ویژه در زمینهٔ ناباروری مردان تسهیل کند. هدف از این مطالعه بررسی بیان دو ژن ZBTB16 و ZFP و همچنین آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، جنینی و شبه‌جنینی (ES-like) است.

مواد و روش‌ها

هضم آنزیمی و کشت سلول‌های بیضه: همهٔ مراقبت‌های حیوانی مطابق با تأیید دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل و طبق کد اخلاق ir.ausmt.rec.1400.29 صورت گرفت. در اولین مرحله، سلول های بیضه از سو یه های موش نمو نه‌برداری گرد ید؛ سپس نمو نه در محلول نمکی بافر فسفات یا PBS (Invitrogen, USA) قرار داده شد. در مرحلهٔ بعد، لوله‌های ا سپرم ساز بی ضه از کپ سول بی ضه جدا گردید. بافت حا صل که در این میان تخریب شده ا ست، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محلول بافری HBSS (Laboratories GmbH Co. USA) که یون Ca و Mg دارد، به همراه آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ DNAse (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) ، کلاژناز تیپ IV (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و دیسپاز (با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) قرار گرفت؛ سپس عملکرد این آنزیم‌ها در سرم جنین گاوی متوقف گردید. در ادامه، محلول به‌دست‌آمده برای به‌دست آوردن سوسپانسیون تک‌سلولی پیپتاژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول و خارج کردن محلول سطحی، نمونه‌ها با محلول DMEM/F12 (DMEM/Nutrient Mixture F-12) شسته گردید؛ سپس محلول از فیلتر عبور داده و سانتریفیوژ شد. محلول رویی خارج گردید و سلول های باقی‌مانده در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونیا کشت داده شدند. سوسپانسیون سلول‌های بیضهٔ هضم‌شده روی ظروف کشت حاوی ژلاتین قرار گرفت. گفتنی است، تقریباً $۱۰^{۵} \times ۰/۵$–۰/۲ سلول در هر ۳/۸ سانتیمتر مربع موجود است. سلول‌های کشت‌شده در محیط GSC موش شامل محیط stemPro-34، ۱ درصد مکمل N2 (Invitrogen, USA)، ۱ درصد L-گلوتامین (PAA, USA)، ۰/۱ درصد β-mercaptoethanol (Invitrogen, USA)، ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر D-گلوکز (Sigma Aldrich, USA)، ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (Sigma Aldrich, USA)، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (PAA, USA)، ۱ درصد ویتامین‌های NEAA MEM (PAA, USA) ، ۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر پروژسترون (Sigma Aldrich, USA)، ۱ درصد آمینواسیدهای غیرضروری (PAA, USA)، ۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر استرادیول (Sigma Aldrich, USA)، ۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر EGF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر LIF (Millipore, USA)، ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر FGF (Sigma Aldrich, USA)، ۸ نانوگرم/میلی‌لیتر GDNF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ۱ میکرولیتر/میلی‌لیتر DL- لاکتیک اسید (Sigma Aldrich, USA) و پروژسترون (۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر)، 1 ES-FBS درصد و استرادیول (۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) کشت داده شدند (۲۰, ۲۱).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

کشت سلول‌های ES-like: پس از کشت سلول‌های بیضهٔ نوزاد و بالغ موش در محیط کشت GS، کلونی‌های سلولی اسپرماتوگونی نوع I، به‌صورت دستی در کشت اولیه و یا پس از کشت فرعی اولیه روی لایه تغذیه‌کننده (MEF)، انتخاب شدند. مشخص گردیده است که کلونی‌های ES-like، در یک بازه زمانی بین ۱۲۵-۴۰ روز پس از شروع کشت، از این سلول‌های اسپرماتوگونی تولید می‌شوند. در مرحلهٔ بعد، سلول‌های تکی از کلونی‌های ES-like پس از تریپسینه شدن تحت شرایط محیط ES موش به‌دست آمد که شامل محیط با گلوکز بالا (بسته به حجم محلول)، FBS 15 درصد، محلول MEM NEAA 1 درصد، مرکاپتواتانول ۰/۱ درصد، L-گلوتامین ۱ درصد، Pen-Strep 1 درصد و LIF (۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) است. کلونی‌های ES-like که رشد کردند، هر ۴-۳ روز یک‌بار پاساژ داده شدند. این سلول‌ها حدود ۴ تا ۵ روز پس از شروع کشت، حجم فراوانی از فلاسک را اشغال کردند. سلول‌های mESC و ES-like پس از شستن با PBS و اضافه کردن تریپسین-EDTA (به مدت ۳ دقیقه)، به یک لایهٔ تغذیه‌کنندهٔ MEF جدید منتقل شدند (درنهایت، تریپسین-EDTA با ۱۵ درصد FBS غیرفعال گردید) (۲۲)

سلول‌های TSCs (تغذیه‌کنندهٔ استرومایی بیضهٔ موش): پس از هضم آنزیمی بیضه، سلول‌های بیضه در حضور محلول DMEM با ۴۵۰۰ میلی‌گرم/لیتر گلوکز (بسته به حجم محلول)، FBS 20 درصد، MEM NEAA (۰/۱ میلی‌مولار)، گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، بتا مرکاپتواتانول ۰/۱ درصد، Pen-Strep 1 درصد و bFGF (۱۰ نانوگرم)، روی فلاسک‌های کشت بافت T-75 کشت داده شدند. سلول‌های TSC از بافت بیضهٔ موش بالغ با سن ۴ تا ۸ هفته تولید گردید. در پاساژ ۳-۲ سلول TSC برای غیرفعال‌سازی میتوزی از میتومایسین C (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده شد (مراحل بالا در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 صورت گرفت).

پردازش بافت برای ایمونوهیستوشیمی (IMH): در این مرحله، نمونه‌برداری بافت بیضه از موشهای نر انجام گردید؛ سپس در PBS شسته شد و در پارافورمالدیید ۴ درصد برای حدود ۲۴ ساعت، در دمای اتاق تثبیت گردید؛ سپس بیضهٔ دهیدراته‌شده در Paraplast Plus قالب‌گیری شد و پس از آن، بلوک‌های بافت بیضه با میکروتوم با ضخامت حدود ۱۰ میکرومتر بریده گشت. برش‌های حاصل روی اسلایدهای Superfrost Plus قرار گرفت و در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه، برش‌ها با استفاده از گزیلل پارافین‌زدایی گردید و سپس در یک سری کاهشی اتانول، هیدراته شد. پس از آن، آنتی‌ژن‌ها با واسطهٔ گرما و بافر سیترات سدیم، pH 6 (۱۰ میلی‌مولار) یا EDTA، pH 8 (۱ میلی‌مولار) در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه احیا گردید؛ سپس آن‌ها که متصل نشده‌اند، با سرم ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد در PBS ۸۹/۷ درصد غیرفعال می‌شوند. نمونهٔ حاصل با آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید؛ سپس این روند برای آنتی‌بادی‌های ثانویهٔ نشان‌دار نیز تکرار شد. برای رنگ‌آمیزی هسته از DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) به مقدار ۰/۲ میکروگرم/میلی‌لیتر به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق استفاده گردید و بعد نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با Poly vinyl alcohol (Mowiol®) فیکس شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, BX51, Japan) و کونفوکال (Zeiss LSM 700) بررسی سلول‌های نشان‌دارشده صورت گرفت و سپس تصاویر با دوربین LSM-TPMT Zeiss به‌دست آمد.

تجزیه‌وتحلیل بیان ژن در سیستم Fluidigm Biomark: برای این آزمایش، چیپهای Fluidigm برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های ZBTB16 و ZFP استفاده گردید. در هر نمونه، با استفاده از میکروپیپت یا میکرومانیپلاتور حدود ۱۰۰ سلول به‌صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف برداشته شد و به‌سرعت منجمد و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید (ژن خانه‌دار GAPDH که برای کنترل استفاده شد). این سنجش در فرایندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس که mRNA به cDNA رونویسی می شود، صورت میگیرد. در این فرایند، به‌طور اختصاصی توالی مدنظر در یک لولهٔ آزمایشگاهی تکثیر گردید و تعداد رونوشت‌های مدنظر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

با استفاده از Real-Time PCR TaqMan روی quantitative PCR (qPCR) BioMark Real-Time مشخص شد. عمل رونویسی معکوس در دمای ۵۰ درجهٔ سانتیگراد (به مدت ۱۵ دقیقه) با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام گرفت (که با حرارت دادن به ۹۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه غیرفعال گردید). cDNA در دمای ۹۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه دناتوره شد. پس از آن، عمل تقویت محصولات در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد (به مدت ۴ دقیقه به مدت ۱۴ سیکل) انجام گرفت. محصولات تقویت‌شده رقیق گردید و سپس با Universal PCR Master Mix در یک سیستم BioMark تجزیه‌وتحلیل شد. هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز گردید.

رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز: سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های ESC و سلول‌های ES-like با استفاده از NBT/BCIP (NBT:4-Nitro blue tetrazolium chloride و BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) در TMN-Puffer، رنگ‌آمیزی شد. این آزمایش در pH=9.5 صورت گرفت؛ سپس با استفاده از آب دیونیزه این رنگ‌آمیزی متوقف گردید و با ۴ درصد PFA تثبیت شد. پس از شستشو، قالب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از ژلاتین گلیسرول کایزر صورت گرفت. درنهایت، سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

تجزیه‌وتحلیل مجموعه ژن‌ها و ایجاد شبکهٔ PPI: برای بررسی ارتباطات ژن‌های مؤثر بر تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز، مطالعات in silico انجام شد. در این بخش، از پایگاه‌های دادهٔ موجود همچون COREMINE و NCBI استفاده و سپس از STRING و Cytoscape استفاده گردید و با جداسازی ژن‌های دارای تأثیرگذاری بر فرایند اسپرماتوژنز و ارتباط مستقیم با آلکالین فسفاتاز، شبکهٔ ارتباطی آن‌ها رسم شد. برای بررسی‌های بیوانفورماتیکی، ژن‌های تأثیرگذار در اسپرماتوژنز ابتدا از NCBI استخراج گردید و همچنین ژن‌های دارای نقش در تنظیم بیان و فعالیت آلکالین فسفاتاز توسط COREMINE شناسایی شد و در STRING (v 11.5) برای ساخت شبکه PPI استفاده گردید. از نرم‌افزار Cytoscape vol.3.9.1 (http://www.cytoscape.org/) برای ایجاد و تجزیه‌وتحلیل شبکه PPI استفاده شد.

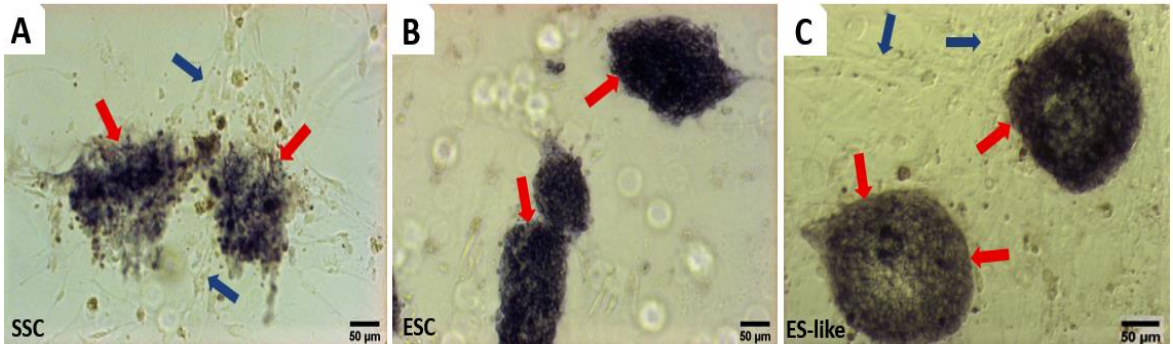
در ادامه، نقش‌های بیولوژیکی ژن‌ها و محل بیان آن‌ها در شبکهٔ PPI گروه‌های همسایه دارای نقش تنظیم‌کنندگی بیشتر بر یکدیگر و در ارتباط مستقیم با آلکالین فسفاتاز جدا گردید؛ سپس ارتباط ژن های عملکردی با استفاده از تجزیه‌وتحلیل STRING Enrichment در نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. چندین ارتباط عملکردی مرتبط با داده‌های ما نیز (بدون در نظر گرفتن مقدار FDR) بررسی گردید و در شبکهٔ ارتباطی حاصل نشان داده شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: در این بخش با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.26، میانگین بیان ژن‌ها در گروه‌ها محاسبه گردید و گروه‌ها با استفاده از آنالیز one-way ANOVA و سپس با آزمون Tukey، پس از T-Test ارزیابی شدند. بیان ژن‌ها با آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney مقایسه گردید. درصورتی‌که در نتایج مقدار $P<0.05$ به‌دست آمد، تفاوت میان گروه‌ها از نظر آماری قابل‌اعتماد در نظر گرفته شد؛ سپس بیان ژن‌ها در جمعیت‌های سلولی آزمایش و تجزیه‌وتحلیل گردید و با استفاده از برنامه‌نویسی R و پکیج Pheatmap، نمودارهای Heatmap و دندروگرام آن‌ها رسم شد.

یافته‌های پژوهش

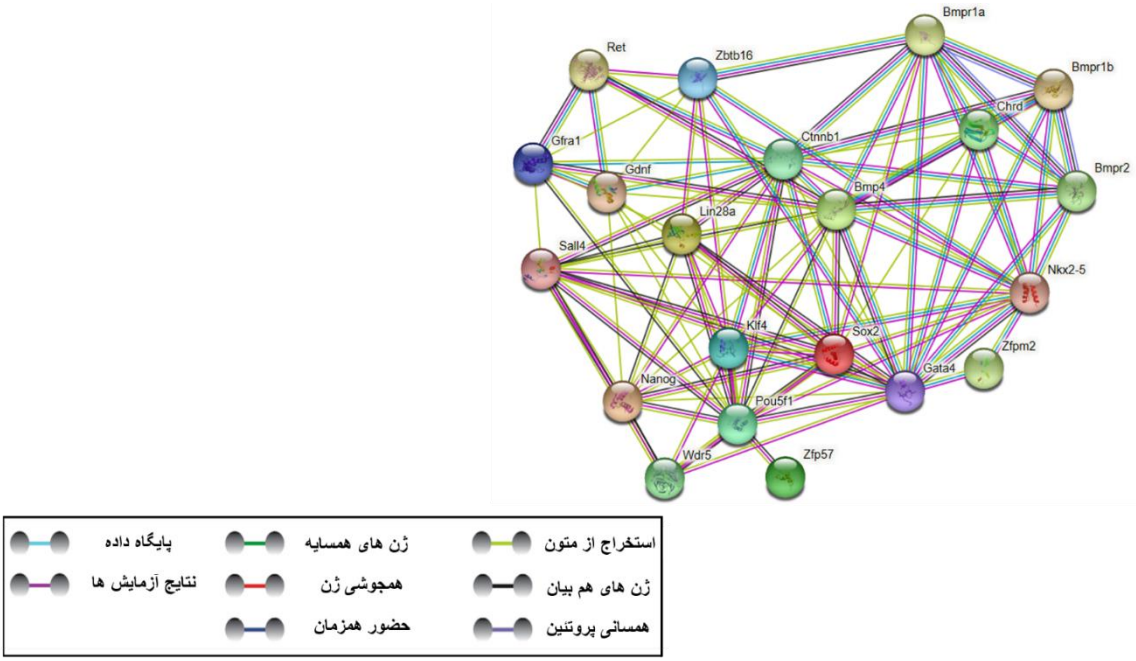
در ادامه، پس از طی مراحل جداسازی، کشت و آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز نمونه‌ها صورت گرفت. با توجه به شکل شمارهٔ ۱ مشاهده می شود که در سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های ES-like و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان آلکالین فسفاتاز مثبت است. در اطراف تصاویر سلول‌های فیبروبلاست، اپی‌بلاست و تمایزیافته‌ها را می‌بینیم که بیان ندارند و منفی هستند. درحالی‌که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تا حدی برای AP مثبت بودند که رنگ‌آمیزی ضعیف‌تر را نشان می‌دهند، سلول‌های ES-like رنگ‌آمیزی شدید مشابهی را برای AP در مقایسه با mESCs نشان دادند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]



شکل شمارهٔ ۱. بیان آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like (پیکان قرمز) و سلول‌های سرتولی و سلول‌های فیبروبلاست با بیان منفی (پیکان آبی)

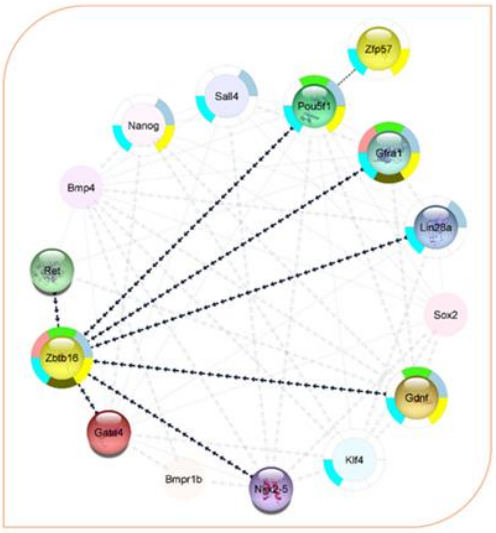
بر ا ساس نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی و برر سی شبکهٔ ارتباط پروتئینی، آلکالین فسفاتاز با ژن‌هایی همچون، Lin28، Gfra1، Sall4، Ret، Nanog، Sox2، Oct4، Klf4، Gata4، BMP4، ZBTB16 و ZFP ارتباط مستقیم دارد و فعالیت آن تحت کنترل ژن‌های نامبرده است (شکل‌های شمارهٔ ۲ و ۳).



شکل شمارهٔ ۲. آنالیز شبکهٔ ارتباطی پروتئین–پروتئین ژن‌های اصلی دخیل در تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز. این شبکهٔ ارتباطی با توجه به نقش هریک از ژن‌ها و با استفاده از منابع مختلف که تأثیر و ارتباط این ژن‌ها را مشخص می‌کنند، رسم شده است (جدول راهنمای خطوط).

در مرحلهٔ بعدی، ژن‌های با تأثیر مستقیم بر یکدیگر از میان ژن‌های بالا جدا شدند که بر ا ساس این، شبکهٔ ارتباطی آن‌ها رسم گردید. در این شبکه، ژن‌های Pou5f1، ZFP، Gfra1، Lin28، ZBTB16 و Gdnf بیشترین ارتباط را باهم دارند که در این مقاله به بررسی سه مورد از آن‌ها پرداخته شد. در این شکل محل دقیق بیان هریک از این عوامل نیز مشخص‌شده است که در راهنمای شکل شمارهٔ ۳ قابل‌مشاهده است؛ همچنین مشخص گردید که بیان Oct4 حلقهٔ اتصال ارتباط میان دو ژن ZBTB16 و ZFP است. Oct4 کنترل‌کنندهٔ فعالیت و نقشهای این دو ژن است و از این طریق می‌تواند تأثیر خود را بر مسیرهای پیام‌رسانی بگذارد.

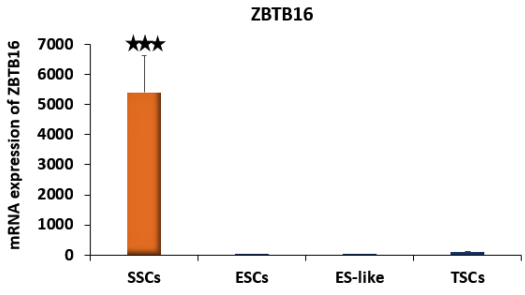
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]



Term names	description	FDR value	Color
BTO:0000535	Germ cell	2.15E-10	
BTO:0000958	Spermatogonium	2.45E-8	
BTO:0004982	Gonocyte	6.9E-4	
BTO:0000081	Reproductive system	8.2E-4	
BTO:0001235	Seminiferous tubule	0.0028	
BTO:0000082	male reproductive system	0.0197	

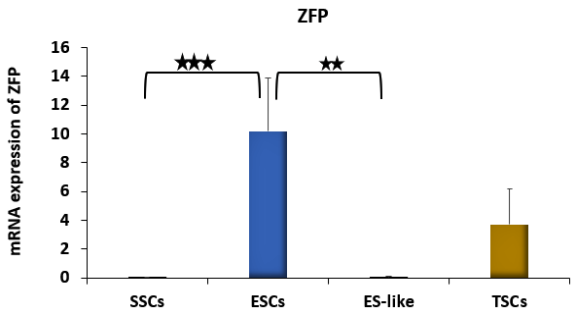
شکل شمارهٔ ۳. شبکهٔ ارتباطی ژن‌های ZFP و ZBTB16. نحوهٔ تأثیر آن‌ها و تنظیم هریک بر دیگری توسط خطوط درون شبکه و همچنین محل بیان هر ژن در سلول‌ها و غدد جنسی (در جدول راهنما) مشخص‌شده است.

در ادامه، با بررسی آزمون PCR Fluidigm، بیان ژن‌های ZBTB16 و ZFP در سه ردهٔ سلولی سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های ES-like و سلول‌های بنیادی اسپرم ساز سنجیده شد. بدین منظور، بیان ژن ZBTB16 بررسی گردید که بر اساس مشاهدات، بیان این ژن در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌شدت بالا است و نسبت به دو ردهٔ دیگر، معنی‌داری فراوانی ($P<0.01$) دارد (شکل شمارهٔ ۴). سلول‌های بنیادی جنینی و ES-like نیز بیان مثبتی دارند؛ اما مانند ژن پیشین، سطح بیان آن‌ها بسیار پایین است و همچنین سلول‌های TSC نیز بیان مثبتی را نشان می‌دهند.



شکل شمارهٔ ٤. بیان mRNA ژن ZBTB16 در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like. بیان ژن ZBTB16 در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان بسیار بالا و معنی‌داری ($P<0.001$) نسبت به دیگر جمعیت‌های سلولی دارد.

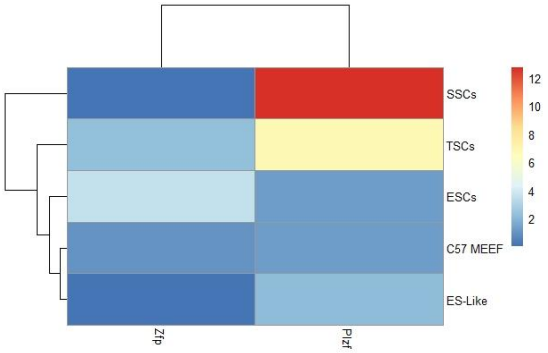
در ادامه، بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که ژن ZFP در سلول بنیادی جنینی بیان مثبت و معنی‌داری ($P<0.05$) نسبت به دو ردهٔ دیگر دارد (شکل شمارهٔ ۵). سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و ES-like نیز دارای بیان مثبت هستند؛ اما گفتنی است، بیان آن‌ها در سطح بسیار پایینی مشاهده شده است. نمونهٔ سلول TSC نیز بیان مثبتی را نشان میدهد که این موضوع بیانگر حضور این ژن در سلول‌های تمایزیافته و تمایزنیافتهٔ اسپرماتوگونی است؛ درنتیجه، این ژن می‌تواند در روند تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم ساز نیز نقش داشته باشد.



شکل شمارهٔ ۵. بیان mRNA ژن ZFP در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like. ژن ZFP در سلول‌های بنیادی جنینی به‌طور معنی‌داری نسبت به رده‌های سلولی سلول‌های ES-like ($P<0.01$) و همچنین سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ($P<0.001$) بیان‌شده است.

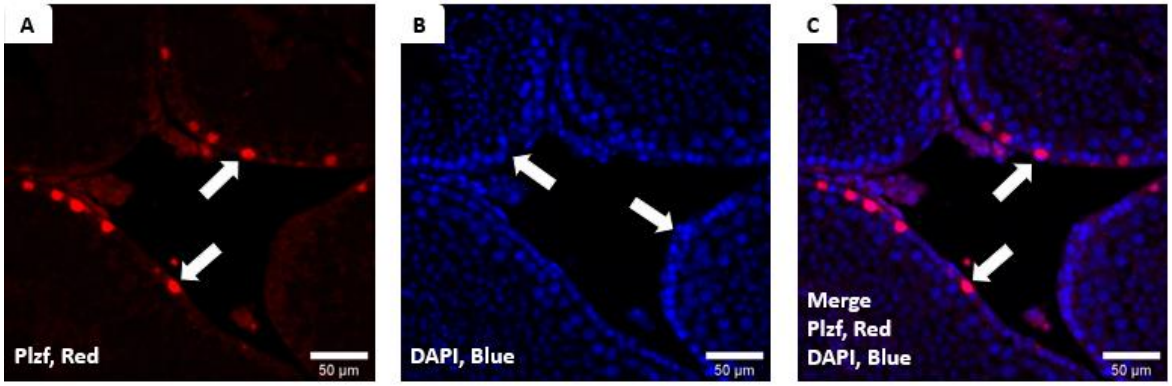
همچنین برای مقایسهٔ بهتر بیان ژن‌های ZBTB16 و ZFP در جمعیت‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول های ES-like، نمودار Heatmap و دندروگرام آن‌ها رسم گردید (شکل شمارهٔ ۶). در این نمودار نیز شباهت و نزدیکی سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like از نظر بیان این دو ژن عامل پرتوانی، قابل‌مشاهده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]



شکل شمارهٔ ٦. نمودار Heatmap و دندروگرام بررسی بیان ژن‌های ZBTB16(Plzf) و ZFP در جمعیت‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like. بیان‌های بیشتر با رنگ قرمز و بیان‌های اندک با رنگ آبی مشخص شده‌اند.

پس از بررسیهای بیشتر، با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بیان پروتئین ZBTB16 بررسی شد که یکی از ژن‌های حیاتی در فرایند اسپرماتوژنز است و همچنین نقش تنظیم‌کننده بر فعالیت آلکالین فسفاتاز دارد (شکل شمارهٔ ۷). علاوه بر این، هسته‌های سلول‌های موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز با استفاده از رنگ‌آمیزی مخصوص هسته‌ای رنگ‌آمیزی گردید و در ادامه، تفاوت بیان هسته‌ای و سیتوپلاسمی پروتئین ZBTB16 بررسی شد. همان‌طور که مشخص است، بیان ZBTB16 در لوله‌های اسپرم ساز بیشتر سیتوپلاسمی است.



شکل شمارهٔ ۷. الگوی بیان ژن (Plzf) ZBTB16 در لوله‌های اسپرم‌ساز موش توسط میکروسکوپ کونفوکال UV؛ A. نشان‌دهندهٔ رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین ZBTB16 (پیکان سفید نشان‌دهندهٔ بیان ژن Plzf) است؛ B. رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI نشان‌دهندهٔ هستهٔ سلول‌ها (آبی‌رنگ، پیکان سفید) و C. تصویر همپوشانی Merge شده که تفاوت بیان هسته‌ای و سیتوپلاسمی پروتئین ZBTB16 را نمایان می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

ناباروری یکی از مشکلات اصلی ادامهٔ نسل و بقای بشر است. علل فراوانی وجود دارد که موجب به‌وجود آمدن این اتفاق می‌شوند. اختلالات ژنتیکی، آسیبهای وارده به اندامهای تولیدمثل، اشعههای مضر، نحوهٔ زندگی و حتی رژیم غذایی ازجمله عوامل بروز این بیماری هستند. یکی از آسیبهایی که تحت این عوامل ایجاد می‌شود، تولید نکردن و یا تولید ناقص اسپرم در مردان است. اسپرم بالغ طی فرایند اسپرماتوژنز از سلول‌های بنیادی اسپرم ساز بیضه تولید می‌گردد. این فرایند بسیار سازمان‌یافته است و تا امروز سازوکارهای مولکولی و پیامرسانیهایی که وظیفه هدایت و کنترل آن را بر عهده دارند، تماماً شناخته نشده‌اند. با درک کامل عوامل تأثیرگذار و استفاده از این عوامل برای درمان ناباروری می‌توان راهی قطعی برای درمان این بیماری به‌دست آورد. آلکالین فسفاتاز یکی از عوامل تأثیرگذار در اسپرماتوژنز است. در این مطالعه، بیان آن در سه رده از سلول‌های بنیادی موش بررسی گردید. بر اساس نتایج مشاهده‌شده، بیان این آنزیم در سلول‌های بنیادی اسپرمساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی (ES-like) مثبت است و با توجه به منفی بودن بیان آن در سلولهای تمایزیافتهٔ مشاهده شده در نتایج آزمایش‌ها، احتمالاً در حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند (۲۳). سازوکار مربوط به تغییر بیان EAP (جنینی) و GCAP (سلول‌های جنسی) در تودهٔ داخلی بلاستوسیست ICM (inner cell mass)، نسبت به بیان آلکالین فسفاتاز غیراختصاصی بافتها (TNAP)، در سایر سلول‌های پرتوان و سلول‌های PG هنوز درک نشده‌اند. در سایر مطالعات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

مشاهده‌شده است که فعالیت TNAP طی روند تمایز افزایش می‌یابد، با وجود اینکه سایر نشانگرهای پرتوانی کاهش می‌یابند (۳). بااین حال، سلول های PG سطوح بالایی از Oct4، Nanog و TNAP را بیان می کنند (۲۴). متأسفانه اهمیت فعالیت AP برای سلول‌های پرتوان و دیگر سلول‌های بنیادی هنوز به‌طورکلی نامشخص است.

در ادامه مطالعه، به بیان ژن ZBTB16 و ZFP پرداخته گردید که هر دوی این ژنها، در هر سه ردهٔ سلولهای بنیادی جنینی، شبه‌جنینی و اسپرمساز، بیان مثبت داشتند. تجزیه‌وتحلیل ریزآرایهٔ اسپرماتوگونی جداشده از موش ZFP145-null، پیش از انحطاط بیضه، تغییراتی را در مشخصات بیان ژن‌های مرتبط با اسپرم‌زایی نشان داده است. نتایج مشاهده شده ZBTB16 را به‌عنوان یک عامل رونویسی اختصاصی اسپرماتوگونی در بیضه معرفی می کند که برای تنظیم خودنوسازی و نگهداری محیط اطراف سلول های بنیادی لازم است. ZBTB16 در غدد جنسی نر در طول جنین‌زایی موش و پس از تولد بیان می شود. ژوزه کاستویا و همکاران در آزمایش‌های خود با تجزیه‌و تحلیل ایمونوهیستوشیمی، ZBTB16 را در بیضهٔ موش بررسی کردند که بر اساس بیان آن‌ها در بیضهٔ موش پس از تولد، بیان این پروتئین در یک هفتگی به اوج خود میرسد و در گنوسیتها و اسپرماتوگونیها قرار میگیرد. در این مرحله از رشد، هنگامی که بیان ZBTB16 در بالاترین حد است، گنوسیتها از توقف چرخهٔ سلولی خود خارج و وارد موج تکثیر می‌شوند. بیان ZBTB16 به اسپرماتوگونی محدود می گردد. این موضوع بدون وجود رنگ‌آمیزی ZBTB16 در جهش یافته هایی که بدون این سلول ها هستند، با هیبریداسیون درجا نشان داده شده است (۱۷). در ادامه، برای درک نوع اسپرماتوگونی که ZBTB16 را بیان می کند، برش‌های بیضهٔ رنگ‌آمیزی‌شده با ZBTB16 را بررسی کردند. بیان ZBTB16 به اسپرماتوگونی‌ها محدود می‌شود (۱۵, ۱۷). در ادامه، گروه Filipponi نشان دادند که ZBTB16 مستقیماً رونویسی Kit را سرکوب می کند که نشانهٔ تمایز اسپرماتوگونی است؛ همچنین افزایش چشمگیر در بیان Kit نیز در اسپرماتوگونی تمایزنیافتهٔ موش ZBTB16 منفی یافت می‌شود؛ بنابراین، پیشنهاد می کنند که یکی از سازوکارهایی که ZBTB16 از طریق آن مجموعه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را حفظ می کند، سرکوب مستقیم بیان Kit است (۲۵)؛ همچنین پیشنهادشده است که غیرفعال شدن ZBTB16 باعث افزایش تکثیر اسپرماتوگونیوم و به دنبال آن کاهش سریع بخش اسپرماتوگونی درحال‌توسعه می گردد. ژن ZFP انواع مختلفی دارد و ZFP-29 یکی از آن‌ها است که سطح بالایی از رونویسی را در بیضهٔ موش بالغ نشان می‌دهد و ممکن است در توسعهٔ اسپرم‌ها نقش داشته باشد. یکی دیگر از این ژن‌ها، ZFP-4 است که در بیضهٔ موش بالغ بیان می‌شود. ZFP-37 یک پروتئین اختصاصی است که در سلول‌های زایای مردانه بیان می گردد (۲۷, ۲۸).

همان‌طور که گفته شد، ژن ZFP انواع مختلفی دارد و ZFP-29 یکی از آن‌ها است که سطح بالایی از رونویسی را در بیضهٔ موش بالغ نشان می‌دهد و ممکن است در توسعهٔ اسپرم‌ها نقش داشته باشد. یکی دیگر از این ژن‌ها، ZFP-4 است که در بیضهٔ موش بالغ بیان می‌شود. پاول دنی و آلن اشورس نیز در مطالعات خود، ZFP-29 را در بیضهٔ موش بالغ بررسی و مشاهده کردند که بیان مثبت دارد (۲۷). در بیضه، ZFP-29 در اولین سلول‌های حاصل پس از میوز که اسپرماتیدهای گرد هستند، بیشتر بیان می گردد (۲۸). در مطالعات حسینی و همکاران نشان داده‌شده است که ZFP145، به‌عنوان سرکوب‌کنندهٔ رونویسی ZBTB16، نقش مهمی در اسپرم‌زایی دارد (۲۹). بیان ZFP145 به گنوسیتها و اسپرماتوگونی تمایزنیافته محدود می‌شود و در لولههای اسپرمساز جهش‌یافته که بدون این سلول‌ها بودند، وجود نداشت. موش‌های بدون ZFP145 با افزایش سن، دچار از دست دادن تدریجی اسپرماتوگونی شدند (۳۰, ۳۱). این مطالعات تأییدکنندهٔ نقش این دو ژن بر فرایند اسپرمزایی و ارتباط آن‌ها با یکدیگر هستند.

با توجه به مطالعات بررسی شبکهٔ پروتئین–پروتئین دو ژن ZBTB16 و ZFP بر اساس نتایج، این دو ژن که در تنظیم بیان و فعالیت آلکالین فسفاتاز دخیل هستند، جزو ژن‌های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

تنظیم‌کنندهٔ اسپرماتوژنز هستند و در سلول‌های جنسی و بیضه، در مراحل مختلف این فرایند، میزان بیان متفاوتی دارند؛ همچنین این ژن‌ها با برخی دیگر از ژن‌های دخیل در این مسیر مرتبط‌اند و موجب تنظیم میزان بیان و فعالیت یکدیگر می‌شوند. ژن‌هایی ازجمله Gdnf، Ret، Nanog، Klf4، Sox2، Pou5f1، ZBTB16(ZBTB16)، ZFP، Bmpr1b، BMP و GATA جزو این شبکهٔ ارتباطی مستقیم هستند؛ همچنین مشخص شد که بیان Oct4 حلقهٔ اتصال ارتباط میان دو ژن ZBTB16 و ZFP است و با بیان خود در کنترل مسیرهای پیام‌رسانی تحت کنترل، این دو ژن را مدیریت می‌کند؛ درنتیجه، بررسی بیان این ژن‌ها و نقش هریک بسیار کمک‌کننده است تا سازوکار پیام‌رسانی اسپرماتوژنز به‌طور کامل درک گردد.

در انتها می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که ژن‌های ZBTB16 و ZFP در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و سلول‌های بنیادی جنینی که جزو سلول‌های پرتوان هستند، بیان مثبت دارند و در سلول‌های سرتولی و سلول‌های فیبروبلاست حضور ندارند و چنانچه حضور داشته باشند، سطح بیان آن بسیار پایین است. با توجه به مطالب یاد شده می‌توان امیدوار بود که در آینده‌ای نزدیک بتوان از سلول‌های ES-like که ویژگی‌های مشابه بسیاری با سلول‌های بنیادی جنینی دارند، به‌عنوان منبعی بسیار مهم و قابل‌دسترسی برای درمان بیماریها به کمک سلول‌درمانی، به‌منظور درمان ناباروری و اصلاح اسپرماتوژنز ناقص استفاده کرد. با توجه به بررسیهای صورت‌گرفته و نتایج آزمایش‌ها می‌توان به این جمع‌بندی رسید که آلکالین فسفاتاز یکی از عوامل نمایان‌کنندهٔ سلول‌های بنیادی پرتوان است و در سلول‌های تمایزیافته بیان آن کاهش می‌یابد؛ همچنین مشخص شد، این آنزیم به همراه ژن‌های ZBTB16 و ZFP جزو عامل‌های دارای بیان مثبت در سلول‌های بنیادی هستند. این ژن‌ها که در سلول‌های بنیادی اسپرمساز بیان می‌شوند، می‌توانند به‌عنوان نشانگری برای تشخیص این ردهٔ سلولی استفاده گردند. بیان ZBTB16 و ZFP در سلول‌های تمایزیافته و تمایزنیافته نشان‌دهندهٔ نقش آن در هدایت سلول‌های بنیادی به‌سوی تمایز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل (طبق طرح با شماره ۸۱۹۱۳) و همچنین دانشگاه هایدلبرگ آلمان (طبق قرارداد همکاری MOU) تشکر و قدردانی میکنند، که در انجام این مطالعه همکاری های لازم در جهت تسهیل امور مربوط به اجرای آزمایش‌ها را انجام داده و ما را در پیشبرد مطالعات و همکاری های طرفین یاری رساندند.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع و اعتراضی ندارند، و موافق انتشار مقاله هستند.

کد اخلاق: IR.AUSMT.REC.1400.29

References

1. 1. Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. Cell Mol Life Sci 2019;76:2681-95. doi: 10.1007/s00018-019-03101-9.
2. 2. Al-Rashida M, Iqbal J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. Mini Rev Med Chem 2015;15:41-51. doi: 10.2174/1389557515666150219113205.
3. 3. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. Stem Cells Int 2015;2015:628368. doi: 10.1155/2015/628368.
4. 4. Sato M, Saitoh I, Kiyokawa Y, Iwase Y, Kubota N, Ibano N, et al. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of Cell Maturation: Towards a New Paradigm. Cells 2021;10:3338. doi: 10.3390/cells10123338.
5. 5. Pham HT, Ono M, Hara ES, Nguyen HTT, Dang AT, Do HT, et al. Tryptophan and kynurenine enhances the stemness and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. Materials 2021;14:208. doi: 10.3390/ma14010208.
6. 6. Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells. Cell (Yakhteh) 2020;22:60. doi: 10.22074/cellj.2020.6532.
7. 7. Azizi H, Niazi Tabar A, Mohammadi A. Experimental investigation of Ki67, POU5F1, and ZBTB16 expression in the pig and mouse

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

testicular cells using immunocytochemistry and RT-PCR. J Ilam Uni Med Sci 2020;28:1-10. doi: 10.29252/sjimu.28.5.1.
8. 8. Wei BH, Hao SL, Yang WX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and proliferation in mammals. Histol Histopathol 2022:37: 825-38. doi: 10.14670/HH-18-461.
9. 9. Fukuda K, Makino Y, Kaneko S, Shimura C, Okada Y, Ichiyanagi K, et al. Transcriptional states of retroelement-inserted regions and specific KRAB zinc finger protein association are correlated with DNA methylation of retroelements in human male germ cells. Elife 2022;11:e76822. doi:10.7554/eLife.76822.
10. 10. Shen Z, Chen M, Gao Y, Dong F, Cen C, Wu H, et al. The function of Foxo1 in spermatogonia development is independent of PI3K/PTEN signaling. FASEB J 2022;36:e22522. doi: 10.1096/fj.202200640RR.
11. 11. Xiao GQ, Li F, Unger PD, Katerji H, Yang Q, McMahon L, et al. ZBTB16: a novel sensitive and specific biomarker for yolk sac tumor. Mod Pathol 2016;29:591-8. doi: 10.1038/modpathol.2016.46.
12. 12. Xiao GQ, Sherrod AE, Hurth KM. ZBTB16: A new biomarker for primitive neuroectodermal tumor element/Ewing sarcoma. Pathol Res Pract 2019;215:152536. doi: 10.1016/j.prp.2019.152536.
13. 13. Damjanov I. Testicular Germ Cell Tumors: Serological and Immunohistochemical Diagnosis. Acta Med Acad 2021;50:58-70. doi: 10.5644/ama2006-124.326.
14. 14. Azizi H, Asgari B, Skutella T. Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis. Cell J (Yakhteh) 2019;21:281. doi: 10.22074/cellj.2019.6068.
15. 15. Zhou W, Shao H, Zhang D, Dong J, Cheng W, Wang L, et al. PTEN signaling is required for the maintenance of spermatogonial stem cells in mouse, by regulating the expressions of PLZF and UTF1. Cell Biosci 2015;5:1-10. doi: 10.1186/s13578-015-0034-x.
16. 16. Cao D, Snir OL. Ovary-II Germ Cell Tumors and Sex Cord Tumors. Practical Gynecologic Pathology: Springer 2021:263-82. doi: 10.1007/978-3-030-68608-6_10.
17. 17. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet 2004;36:653-9. doi: 10.1038/ng1367.
18. 18. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. Cell Stem Cell 2012;10:284-98. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.004.
19. 19. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. Stem Cell Res 2018;29:207-14. doi: 10.1016/j.scr.2018.04.009.
20. 20. Azizi H, Hamidabadi HG, Skutella T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. Cell J (Yakhteh) 2019;21:186. doi: 10.22074/cellj.2019.5802.
21. 21. Azizi H, Skutella T, Shahverdi A. Generation of mouse spermatogonial stem-cell-colonies in a non-adherent culture. Cell J (Yakhteh) 2017;19:238. doi: 10.22074/cellj.2016.4184.
22. 22. Azizi H, Conrad S, Hinz U, Asgari B, Nanus D, Peterziel H, et al. Derivation of pluripotent cells from mouse SSCs seems to be age dependent. Stem Cells Int 2016;2016:8216312. doi: 10.1155/2016/8216312.
23. 23. González F, Boué S, Belmonte JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. Nat Rev Genet 2011;12:231-42. doi: 10.1038/nrg2937.
24. 24. O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells 2008;26:1109-16. doi: 10.1634/stemcells.2007-0801
25. 25. Fukuda K, Makino Y, Kaneko S, Shimura C, Okada Y, Ichiyanagi K, et al. Potential role of KRAB-ZFP binding and transcriptional states on DNA methylation of retroelements in human male germ cells. Elife 2022;11:e76822. doi: 10.7554/eLife.76822.
26. 26. Harchegani AB, Dahan H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Effects of zinc deficiency on impaired spermatogenesis and male infertility: the role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Hum Fertil 2018:23:5-16. doi: 10.1080/14647273.2018.1494390.
27. 27. Denny P, Ashworth A. A zinc finger protein-encoding gene expressed in the post-meiotic phase of spermatogenesis. Gene 1991;106:221-7. doi: 10.1016/0378-1119(91)90202-m.
28. 28. Looman C, Mark C, Åbrink M, Hellman L. MZF6D, a novel KRAB zinc-finger gene expressed exclusively in meiotic male germ cells. DNA Cell Biol 2003;22:489-96. doi: 10.1089/10445490360708892.
29. 29. Hosseini R, Marsh P, Pizzey J, Leonard L, Ruddy S, Bains S, et al. Restricted

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

expression of a zinc finger protein in male germ cells. J Mol Endocrinol1994;13:157-65. doi: 10.1677/jme.0.0130157.

30. 30. Zhang S, Qiu W, Wu H, Zhang G, Huang M, Xiao C, et al. The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis. Biochem J 2001;359:721-7. doi: 10.1042/0264-6021:3590721.
31. 31. Kolesnichenko M, Vogt PK. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α-actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. Cell Cycle 2011;10:771-5. doi: 10.4161/cc.10.5.14829.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]