مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر تقویت‌کننده رتینوئیک اسید بر تمایز سلول‌های مزانشیمال مشتق شده از مغز استخوان رت به سلول‌های بتا و ترشح انسولین

بهنوش میلادپور[1*]، مرضیه شفقت[2]، مژده اوجی[3]، فاطمه زال[2]، فاطمه خواجه[3]

۱- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳- دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمال از انواع بافت‌های adult انسان مشتق می‌شود و خودسازی و تمایز به انواع سلولی را تقویت می‌کند. رتینوئیک اسید (RA) برای توسعه جنینی پانکراس ضروری است. اثر RA در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان (BMMSCs)، به سلول‌های بتا موردمطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مغز استخوان رت‌ها، با استفاده از روش flashing، تهیه شدند و با روش فلوسیتومتری مارکرهای سطحی BMMSCs تائید شدند. BMMSCs در چهار گروه تیمار گردیدند ۱) عصاره پانکراس رت یا RPE(250µg/ml)، ۲) RPE (250µg/ml) + RA (10µM)، ۳) گروه بدون تیمار ۴) گروه الکل ۰.۱٪ به‌عنوان حامل و گروه RA (10µM) به‌عنوان کنترل. ترشح انسولین با روش ELISA ارزیابی شد. بیان انسولین با روش RT-PCR تعیین گردید.

نتایج: نتایج حاصل از RT-PCR نشان دادند که انسولین در گروه RPE و RPE + RA بیان شد. ترشح انسولین با تست ویلکاکسون در گروه RPE + RA به‌طور معنی‌داری بیش از گروه RPE است ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که RA تمایز سلول‌های BMMSCs را به سلول‌های تولیدکننده انسولین تقویت می‌کند و ترشح انسولین در این سلول‌ها را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: رتینوئیک اسید، تمایز، سلول‌های بتا، BMMSCs

مقدمه

دیابت تیپ یک، یک نوع بیماری خود ایمنی است که به دلیل تخریب سلول‌های بتا ایجاد می‌گردد. در حال حاضر پیوند پانکراس و یا جزایر لانگرهانس، یکی از راه‌های درمان این بیماری است. متأسفانه پس زدن پیوند و همچنین کمبود اهداکننده، این روش درمانی را با مشکل روبرو کرده است. در سال‌های اخیر دانشمندان به استفاده از سلول‌های بنیادی و تمایز آن به سلول‌های بتای تولیدکننده انسولین، علاقه‌مند شده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال، توانایی تبدیل‌شدن به تعداد زیادی از سلول‌های مختلف را دارا هستند و برخلاف سلول‌های بنیادی امبریونیک، مشکلاتی نظیر تومور زایی، که مشکلات اخلاقی ناشی از استفاده آن‌ها است در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمال صدق نمی‌کند. مغز استخوان یک منبع بسیار غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال است. Choi و همکاران، نشان دادند که عصاره پانکراس، یا rat pancreatic extract (RPE)، به دلیل داشتن فاکتورهای رشد مختلف و متعدد، توانایی تمایز دادن سلول‌های بنیادی مزانشیمال را به سلول‌های بتا دارا است (۱-۵).

acid (RA)، ترکیبی است که نقش مهمی در تمایز سلول‌های بتا دارد (۶) و در ارتباط با PDX1 بوده که مارکر معروف سلول‌های پیش ساز پانکراس و همچنین تمایز به سلول‌های بتا

*نویسنده مسئول: بهنوش میلادپور، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
Email:miladpour90@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-1978-1201

است. RA به‌عنوان پیام‌رسان که در توسعه اکتودرم و مزودرم در مهره‌داران دخالت دارد عمل می‌کند. همچنین در تشکیل جوانه‌های پانکراسی در مراحل ابتدایی امبریوژنزیس نقش مهمی ایفا می‌کند. RA بیان انسولین را در سلول‌های بتای پانکراس و همچنین رده سلولی INS-1 افزایش می‌دهد (۷-۹). در مطالعه‌ای که Moriya و همکاران انجام دادند، نشان داده شد که ترکیب اکتیوین A و RA سبب القای تبدیل اکتودرم بلاستولا به سلول‌های تولیدکننده انسولین، می‌شود (۸، ۱۰، ۱۱). اگرچه پیوند سلول‌های بتا روش بسیار کارآمدی است، هنوز چالش‌های زیادی برای تولید سلول‌های بتا به میزان زیاد، هم ازنظر تعداد و هم ازنظر ترشح انسولین وجود دارد. دانشمندان روش‌های زیادی را بیان نموده‌اند که در آن‌ها از فاکتورهای رشد متعدد مرحله‌به‌مرحله با دوزهای خاص استفاده می‌شود و سلول‌ها را به‌طور برنامه‌ریزی‌شده طی هر مرحله متمایز می‌نمایند که می‌تواند یکی از آن‌ها رتینوئیک اسید باشد. در این‌که کدام فاکتور رشد در چه مرحله‌ای و با چه مقداری استفاده شود پروتکل‌های متعددی بیان شده است. در این مطالعه هدف، استفاده از عصاره پانکراس بوده است که خود شامل فاکتورهای رشد متعدد است و اینکه آیا اضافه نمودن رتینوئیک اسید کارایی تمایز سلول‌های بتا را ازنظر تعداد و میزان ترشح انسولین افزایش می‌دهد یا خیر؟

بر این اساس، در این مطالعه، تأثیر RA، بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق شده از مغز استخوان، به سلول‌های بتای تولیدکننده انسولین موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد شصت رت Sprague–Dawley، خریداری‌شده از مرکز مطالعات تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، موردمطالعه قرار گرفتند. کلیه رت‌ها در شرایط چرخه‌ای ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی نگهداری شدند. کلیه مراحل مطالعه، مورد تائید کمیته اخلاق قرار گرفت و پس از دریافت کد اخلاق اجرایی گردید.

تهیه RPE: شصت درصد از پانکراس رت (چهارماهه) برداشته شد و بعد از ۴۸ ساعت، رت‌ها کشته‌شده و پانکراس آن‌ها برداشت شد. سپس با استفاده از قرص‌های protease inhibitor tablets (Rocshe)، آن‌ها را هموژنیزه کرده و عصاره تهیه شد. مایع تهیه‌شده در ۳۰۰۰ rpm به مدت چهار دقیقه در دمای ۴ °C، سانتریفیوژ گردید، سپس در دور 12000 rpm به مدت بیست دقیقه سانتریفیوژ شد. درنهایت مقدار پروتئین سوپرنانت را پس از گذراندن از فیلتر ۰/۰۲۲، اندازه گرفته و در دمای 80°C-، برای استفاده‌های بعدی ذخیره شد (۴، ۵، ۸).

جداسازی و تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان رت: از رت‌های ماده شش‌ماهه برای این منظور استفاده شد، به‌این‌ترتیب که مغز استخوان از ناحیه تیبیا با روش flashing، در محیط DMEM LG, 10% FBS, 1% penstrep جدا شد. سپس سلول‌ها در ۲۰۰ g در دمای ۴°C، به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند و درنهایت رسوب سلولی را در محیط سوسپانسیون نموده و در پلیت‌های ده سانتی‌متری کشت داده شدند. سلول‌های رشد یافته بنیادی مزانشیمال مغز استخوان رت، سپس با استفاده از فلوسیتومتری موردبررسی سایتوکاین‌های مرتبط شامل: CD90, CD73, CD105, CD271, CD44, CD106, CD 45, CD 34, CD 144 قرارگرفته و تائید شدند.

تیمار سلول‌ها

بین پاساژ سوم تا پنجم $2\text{-}3\times10^5$ سلول در پلیت‌های شش‌خانه کشت داده شدند. این سلول‌ها پس‌ازاینکه به ٪۸۰ confluency رسیدند به پنج گروه تقسیم شدند. گروه اول: RPE (250 µg/ml)، گروه دوم: RPE (250 µg/ml) +RA(10µM)، گروه سوم: محیط کشت به‌تنهایی به‌عنوان کنترل، گروه چهارم: محیط کشت + اتانول ده درصد (به‌عنوان حامل RA) و گروه پنجم گروهی که در آن محیط کشت و RA(10µM) استفاده گردید. تیمار سلول‌ها با RA به مدت ۲۴ ساعت بود و پس‌ازآن تیمار سلول‌ها به مدت دو هفته ادامه یافت.

چالش ترشح انسولین: پس از دو هفته تیمار سلولی، تعداد (1×10^5 cells/well) سلول به مدت یک ساعت در مجاورت glucose free crebs ringer bicarbonate و یا KRB قرار داده شدند، سپس به مدت یک ساعت در مجاورت KRB حاوی گلوکز 20mM قرار گرفتند. مقدار انسولین ترشح‌شده در محیط کشت سلول‌ها با استفاده از کیت ELISA (Bioassay Technology Laboratoy kit) اندازه‌گیری شد (۱۲).

Reverse transcription (RT) and PCR: بیان انسولین توسط روش RT-PCR در گروه‌های مختلف بررسی و مقایسه گردید.

پرایمرهای مورداستفاده از شرکت متابیون آلمان تهیه و خریداری گردیدند. از ژن بتا – اکتین به‌عنوان ژن house keeping استفاده گردید (جدول ۱). آنالیز دیتا با استفاده از

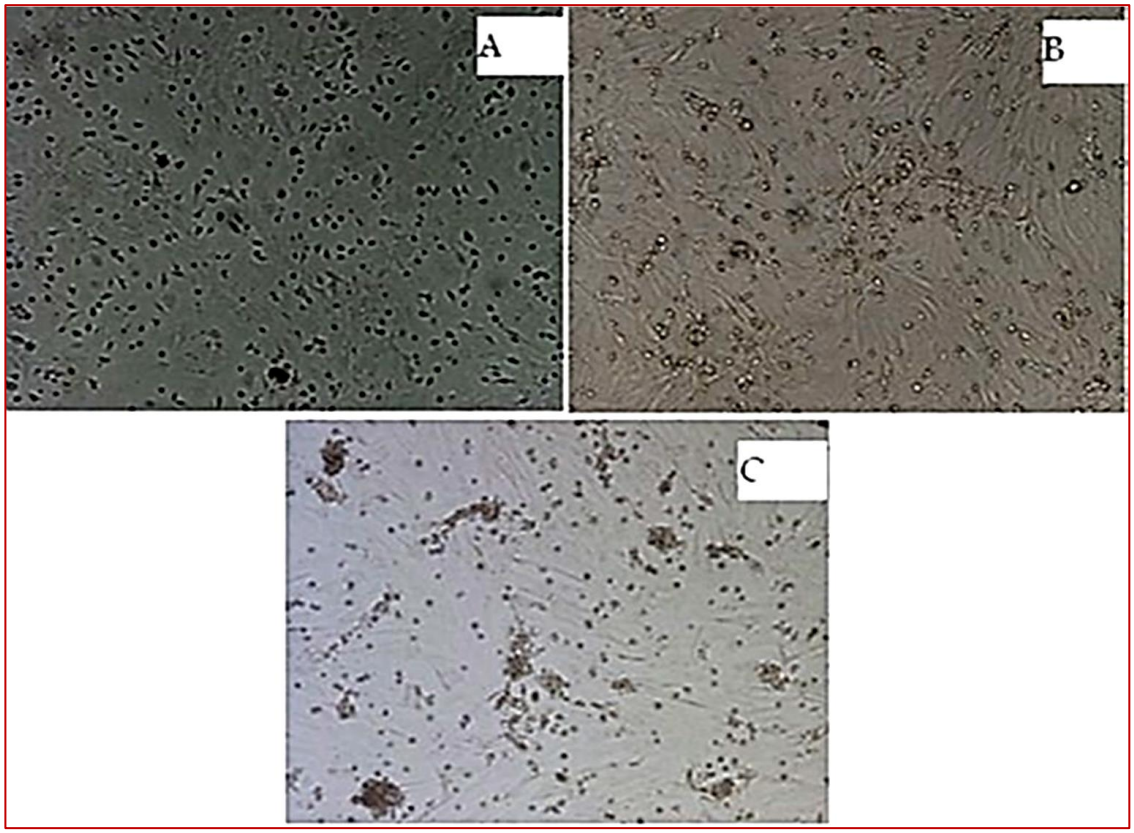
نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از Wilcoxon test انجام شد.

نتایج

پس از تیمار سلول‌ها با RPE و همچنین RPE+RA، تغییر مرفولوژی سلولی به‌صورت کلونی‌های سلولی مشاهده گردید (شکل ۱). این تغییرات مرفولوژیکی در سایر گروه‌ها مشاهده نگردید. نتایج حاصل از ترشح انسولین نشان‌دهنده وجود آن در گروه‌های تیمار شده با RPE و همچنین RPE+RA، بود درحالی‌که در سایر گروه‌ها ترشح انسولین مشاهده نشد. مقدار ترشح انسولین در گروه تیمار شده با RPE+RA، با استفاده از تست ویلکاکسون، به‌طور معنی‌داری (P-value<0.05)، بیشتر از

جدول ۱. پرایمرهای مورداستفاده جهت RT-PCR

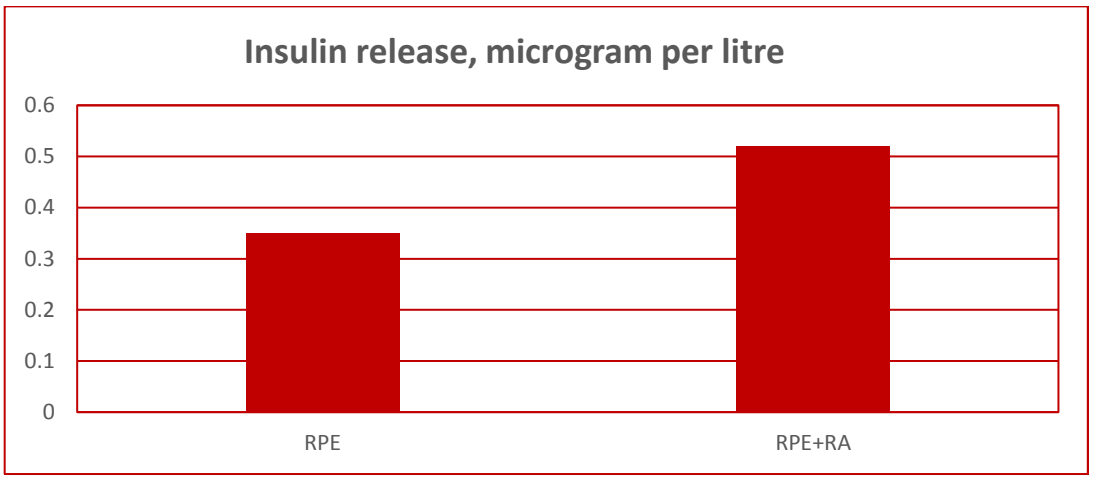
Gene		primer sequence(5'–3')	Size
Isl1	forward	CACAAACAGCCCGAGAAGACC	167bp
	reverse	TGAAACCAGACCCGGATGACT	
Beta - actin	forward	CCCATCTATGAGGGTTACGC	135bp
	reverse	TTTAATGTCACGCACGATTTC	



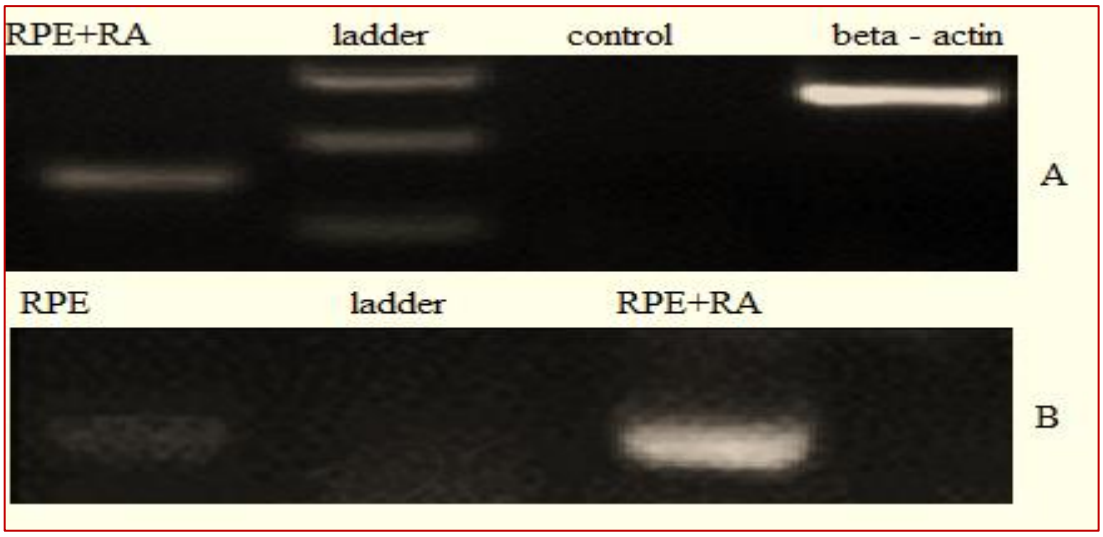
شکل ۱. کلونی شکل شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق شده از مغز استخوان، گروه A: گروهی که هیچ تیماری نداشتند، گروه B: گروه تیمار شده با RPE، گروه C: گروه تیمار شده با RPE+RA

مقدار آن در گروه تیمار شده با RPE به‌تنهایی بود (نمودار ۱). نتایج حاصل از RT-PCR نشان‌دهنده بیان انسولین در گروه‌های تیمار شده با RPE و RPE+RA بود (شکل ۲).

را از این سلول‌ها افزایش می‌دهد. هنوز هیچ مطالعه‌ای انجام نپذیرفته که اثر RA به همراه RPE را در این زمینه بررسی نماید. Jae و همکاران ثابت کردند که RA تمایز سلول‌های بنیادی



نمودار ۱. ترشح انسولین در گروه تیمار شده با RPE+RA به‌طور معنی‌داری بیش از گروه تیمار شده با RPE بود (P- value< 0.05)، Wilcoxon test.



شکل ۲. نتایج RT-PCR: A. بیان انسولین در گروه‌های RPE+RA و کنترل در مقایسه با بتا اکتین. B. بیان انسولین در گروه RPE+RA در مقایسه با گروه RPE.

بحث

این مطالعه جهت بررسی تأثیر RA بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان رت، به سلول‌های بنیادی انجام پذیرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که RA به همراه RPE، تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان را به سلول‌های بتا تقویت می‌کند و ترشح انسولین

مزانشیمال مشتق از مغز استخوان را در رت، به رده سلول‌های بتا القاء می‌کند و منجر به پیدایش سلول‌هایی می‌شود که توانایی ترشح انسولین را دارند که این تحقیق نتایج آنان را تائید می‌کند.

نشان داده شده که سیگنالینگ گیرنده‌های RA برای توسعه سلول‌های پیش ساز پانکراس نیاز است. Ostrom و همکاران

نشان دادند که RA به‌صورت ترتیبی سبب القاء ژن homeobox، Pax4 می‌شود که تولید سلول‌های بتا را تعیین می‌کند و سپس سبب تولید فاکتورهای رونویسی Bhlh، Ngn3، Bhlhb2 و NeuroD می‌شود که تولید سلول‌های اندوکرینی را تقویت می‌کند و درنهایت تولید سلول‌های بتای تولیدکننده انسولین را که پروتئین‌های Ipf1/Pdx1، Nkx6.1 و Hb9 را بیان می‌کنند، سبب می‌شود. بدین ترتیب RA در چندین مرحله اثر گذاشته و سبب تولید سلول‌های بتا می‌شود (۱۳). تمایز تمام سلول‌های اندوکرین پانکراس نیازمند آن است که Ngn3 (که ژن پرواندوکرینی است و RA سبب تولید آن می‌شود) به‌طور گذرا، در سلول‌های پیش ساز فعال گردد. کلاس‌های مختلف سلول‌های اندوکرینی در مراحل مختلف توسعه جنینی پانکراس، تولید می‌شوند و سلول‌های پیش ساز پانکراس اولیه را مجبور به بیان Ngn3 می‌کند. این وقایع سبب تولید سلول‌های تولیدکننده گلوکاگون و سپس سلول‌های تولیدکننده انسولین و در مراحل بعدی بقیه سلول‌های اندوکرینی می‌گردد (۱۴-۱۹).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر تقویت‌کننده RA، بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان رت، به سلول‌های تولیدکننده انسولین است. همچنین ترشح انسولین، در این سلول‌ها وقتی با RPE+RA تیمار می‌شوند نسبت به سلول‌هایی که تنها با RPE تیمار می‌شوند افزایش می‌یابد که این خود نشان‌دهنده اثر تقویتی RA بر میزان ترشح انسولین از سلول‌های بتا است. این مطالعه روش نوینی را برای تولید و تمایز کارآمد سلول‌های بتا پیشنهاد می‌دهد. هنوز مطالعات بیشتری موردنیاز است تا تأثیر رتینوئیک اسید را بر تمایز BMMSCs به سلول‌های تولیدکننده انسولین در شرایط *invivo* مورد ارزیابی و بررسی قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی فسا با کد ۹۲۱۱۴ تأمین مالی گردیده است. لذا نویسندگان کمال تشکر و قدردانی خود را از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان حضرت ولیعصر (عج) فسا اعلام می دارند و بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر اوجی به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان در طول این پروژه، تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Cooke DW, Plotnick L. Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. Pediatr Rev. 2008;29(11):374-84.
2. Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR, Abualhassan NS, Shapiro AJ. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 2014;7:211.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. science. 1999;284(5411):143-7.
4. Ding Y, Bushell A, Wood KJ. Mesenchymal stem-cell immunosuppressive capabilities: therapeutic implications in islet transplantation. Transplantation. 2010;89(3):270.
5. Xie H, Wang Y, Zhang H, Qi H, Zhou H, Li F-R. Role of injured pancreatic extract promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin-producing cells. PloS one. 2013;8(9):e76056.
6. Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. International review of cytology. 2001;209:1.۷۷-
7. Stafford D, Prince VE. Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. Current Biology. 2002;12(14):1215-20.
8. Moriya N, Komazaki S, Takahashi S, Yokota C, Asashima M. In vitro pancreas formation from Xenopus ectoderm treated with activin and retinoic acid. Development, growth & differentiation. 2000;42(6):593-602.
9. Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. Nature chemical biology. 2009;5(4):258.
10. Micallef SJ, Janes ME, Knezevic K, Davis RP, Elefanty AG, Stanley EG. Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. Diabetes. 2005;54(2):301.۵۰-

11. Shim J, Kim S, Woo D, Kim S, Oh C, McKay R, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. Diabetologia. 2007;50(6):1228-38.
12. Shin J-S, Lee J-J, Yang J-W, Kim C-W. Ethanol decreases basal insulin secretion from HIT-T15 cells. Life sciences. 2002;70(17):1989-97.
13. Öström M, Loffler KA, Edfalk S, Selander L, Dahl U, Ricordi C, et al. Retinoic Acid Promotes the Generation of Pancreatic Endocrine Progenitor Cells and Their Further Differentiation into β-Cells. PLoS ONE. 2008;3(7):e2841.
14. Apelqvist Å, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature. 1999;400(6747):877.
15. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. Development. 2000;127(16):3533-42.
16. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(4):1607-11.
17. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development. 2002;129(10):2447-57.
18. Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, et al. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. Developmental cell. 2007;12(3):457-65.
19. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. Nature genetics. 2000;24(1):36.

Original Article

Evaluation of Potential Effect of Retinoic Acid on the Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Beta Cells and Insulin

Miladpour B[1*], Shafaghat M[2], Owji M[3], Zal F[2], Khajeh F[3]

1. Departman of clinical biochemistry, Fasa University of Medical Sciences,Fasa, Iran
2. Departman of clinical biochemistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz,Iran
3. Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Received: 12 Oct 2018 Accepted: 03 May 2019

Abstract

Background & Objective: Mesanchymal stem cells (MSCs) derived from a variety of human adult tissues and potentiate to self-replicate and differentiate into different cell types. Retinoic acid (RA) is important in embryonic development of pancreas. The effect of RA on transdifferentiation of rat bone marrow mesanchymal stem cells (BMMSCs) into the beta cells was studied.

Materials & Methods: Rat BMMSCs were prepared by flashing method and confirmed by evaluating of BMMSCs surface markers. BMMSCs were treated in four groups by: 1) rat pancreatic extract (RPE) (250µg/ml) 2) RPE (250µg/ml) + RA (10µM), 3) no treated group as control and 4) ethanol 10% as vehicle and RA(10µM) as control. Insulin secretion was evaluated by ELISA assay. Insulin expression (RT-PCR) were determined.

Results: RT-PCR results showed that insulin expression in RPE and RPE + RA groups. Insulin releasing in group RPE + RA was significantly more than group 1, (p-value < 0.05), Wilcoxon test..

Conclusion: Our study showed that RA can promote differentiation of the BMMSCs into the insulin producing cells invitro.

Keywords: retinoic acid, differentiation, beta cells, BMMSCs

***Corresponding Author: Miladpour Behnoosh,** Departman of clinical biochemistry, Fasa University of Medical Sciences,Fasa, Iran
Email: miladpour90@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-1978-1201

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1457-1463