مقاله پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون انسانی به سمت سلول‌های تولید کننده انسولین با استفاده از لنتی وکتور miR-375

حسین سازگار[۱و۲]، نگار آذر پیرا[۳*]، اکبر وحدتی[۲]، محمد حسین کریمی[۳]، مسعود سلیمانی[۴]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاداسلامی، شیراز، ایران
۳- مرکز تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴- گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع ۱ یک بیماری خود ایمنی است که با اختلال در عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و کاهش ترشح انسولین همراه است. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) به سمت سلول‌های شبه بتا افق تازه‌ای را در درمان دیابت باز کرده است. MSCs را می‌توان از بند ناف استخراج و به سلول‌های تولید کننده انسولین تمایز داد. مشخص شده است که microRNAs (miRNAs) نقش‌های کلیدی در چندین مرحله تمایزی سلول‌های پانکراس ایفا می‌کنند.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف انسان را بعد از تولد جنین از ژله وارتون با کمک روش‌های کشت بافت و سلول جدا، تکثیر و با استفاده از روش فلوسایتومتری اصالت این سلول‌ها تایید شد. برای تمایز این سلول‌ها miR-375 با استفاده از لنتی وکتور به این سلول‌ها وارد و بیش بیان شد. بیش بیان PDX1 و انسولین به وسیله روش RT-PCR اندازه گیری گردید.

نتایج: در نهایت تغییرات مرفولوژیکی و بررسی بیان ژن‌های مارکر نشان داد که Human Umbilical Cord Derived Stem Cells (hUDSCs) را می‌توان با انتقال miR-375 با کمک وکتور ویروسی به سلول‌های تولید کننده انسولین تمایز داد.

نتیجه‌گیری: نتیجه این پژوهش، معرفی یک روش جدید و مقرون به صرفه بدون استفاده از سایر فاکتورهای تحریکی برای تمایز سلول‌های MSCs به سمت سلول‌های مولد انسولین است.

کلمات کلیدی: دیابت، hUDSCs، miR-375، وکتور لنتی ویروسی

مقدمه

دیابت نوع ۱ یا دیابت ملیتوس یک بیماری خود ایمنی است که با آسیب به سلول‌های بتا پانکراس، کاهش تولید انسولین و بالا رفتن سطح گلوکز خون همراه است. درمان رایج این نوع دیابت تزریق مداوم انسولین و یا پیوند سلول‌های پانکراس به فرد بیمار است. پیوند جزایر پانکراس دارای مشکلاتی مانند واکنش‌های ایمنی برعلیه بافت پیوندی، تعداد محدود اهدا کننده عضو و عمل جراحی دشوار است که استفاده از این روش را برای درمان بیماری بسیار محدود ساخته است. اخیراً استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان جایگزینی برای پیوند در درمان دیابت در مراحل آزمایشگاهی قرار دارد. سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) مشتق از بلاستوسیت (۱) و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌های مختلف بالغ (۲) می‌تواند به عنوان منبعی مناسبی برای تولید سلول‌های بتا مورد استفاده قرار گیرد (۳، ۴). ESCs سلول‌هایی همه توان هستند اما دارای محدودیت‌هایی مانند واکنش‌های ایمنی، تومورزایی و مشکلات اخلاقی در کاربرد هستند (۵). سلول‌های بنیادی بالغ را می‌توان از منابع مختلف مانند پوست (۶)، غدد بزاقی (۷)، کبد (۸)، طحال (۹)، مغز استخوان (۱۰) و بند ناف استخراج کرد. از میان آن‌ها سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف (Human Umbilical Cord Derived Stem Cells) یکی از بهترین و قابل دسترس ترین سلول‌ها برای کاربردهای کلینیکی است. hUDSCs به راحتی قابل استخراج بوده و هیچگونه محدودیت

* **نویسنده مسئول: نگار آذرپیرا**، مرکزتحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
Email: negarazarpira@yahoo.com

اخلاقی نیز در کاربرد آن‌ها وجود ندارد. hUDSCs یکی از بهترین گزینه‌ها برای جایگزینی سلول‌های جزیره‌ای در بیماران دیابتی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد زیرا این سلول‌ها توان تبدیل شدن به سلول‌های شبه بتا را دارند (۱۱). روش‌های مختلفی مانند استفاده از وکتورهای انتقال دهنده و محیط‌های کشت مختلف برای تولید سلول‌های ترشح کننده انسولین در حال بررسی می‌باشد (۱۲). MicroRNAs (miRNAs)، RNAهای کوچک، ۲۲ نوکلئوتیدی و non-coding هستند با فعالیت پس از رونویسی که با شکافتن یا جلوگیری از ترجمه mRNAها عمل می‌کنند. آن‌ها عملکردهای مهمی در فعالیت‌های سلولی مانند رشد و نمو، تمایز و مرگ سلولی ایفا می‌کنند (۱۳).

miRNA-375 در رشد و نمو پانکراس در zebrafish، موش و انسان دخالت دارد. در جنین zebrafish حذف miR-375 باعث عدم تشکیل بخش اندوکرین پانکراس می‌شود (۱۴). همچنین این miRNA برای هموستازی نرمال گلوکز و انطباق رشد سلول‌های β در مقاومت به انسولین در موش‌ها دخالت دارد (۱۵). در انسان miR-375 عموماً در جزایر بالغ بیان می‌شود و نقش کلیدی و مهمی در ایجاد سلول‌های تولید کننده هورمون ایفا می‌کند (۱۶-۱۸). بنابراین miR-375 را می‌توان به عنوان یک عامل اساسی در تولید سلول‌های شبه جزیره‌ای پانکراس مورد استفاده قرار داد. در این پژوهش از روشی بدون استفاده از فاکتورهای رشد برای تمایز سلول‌های hUDSCs به سلول‌های تولید کننده انسولین به کمک وکتور لنتی ویروسی برای بیش بیان miR-375 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و کشت hUDSCs

hUDSCs از بافت بند ناف بعد از تولد جداسازی شد. بافت بند ناف پس از دریافت رضایت از مادران باردار و رعایت قوانین اخلاقی از بیمارستان حافظ شیراز دریافت گردید. بافت چندین مرحله توسط PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو شد و به قطعات کوچکی حدود ۱-۲mm^2 بریده و در پلیت‌های ۱۰cm مخصوص کشت سلولی قرار داده شد و به ظروف، محیط کشت DMEM F12 حاوی ۱۰٪FBS و آنتی بیوتیک اضافه گردید. بعد از ۱۰-۷ روز سلول‌های دوکی شکل چسبنده‌ای از بافت‌های explant شده مهاجرت کرده و در کف ظرف گسترش یافتند. بعد از این که سلول‌ها به تراکم تقریبی ۷۰-۸۰٪ رسیدند، با استفاده از تریپسین EDTA (Ethylene Diamante Tetra Acetic Acid) از کف ظرف جدا و در نیتروژن مایع فریز گردیده تا در موقع نیاز مورد استفاده قرار گیرند.

آنالیز فلوسایتومتری

hUDSCs در پاساژ سوم جمع آوری و با آنتی بادی‌های نشان‌دار فلورسنت انسانی CD90 (Biolegend, USA)، CD45، CD133، CD44 و CD105 رنگ آمیزی شد. سپس سلول‌های نشان‌دار به وسیله فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

بسته بندی و تولید وکتور لنتی ویروسی حامل miR-375 (LV- miR-375)

وکتورهای لنتی ویروسی یک وسیله خاص و منحصربه فرد برای انتقال کارآمد و بیان دائم ژن مورد نظر به داخل سلول‌های پستانداران در محیط کشت سلول و در داخل بدن می‌باشد. از این وکتورها برای محدوده وسیعی از سلول‌های تقسیم شونده و غیرتقسیم شونده مثل سلول‌های نورونی می‌توان استفاده کرد. برای این منظور، ژن‌های لازم برای ساخت و بسته بندی ویروس ابتدا داخل وکتورهای جداگانه‌ای کلون شده و ژن مورد نظر نیز به همراه توالی‌های لازم برای بسته بندی ویروس داخل یک وکتور لنتی کلون گردید. سپس به وسیله روش کلسیم فسفات این وکتورها وارد سلول‌های HEK 293T شدند تا تمامی اجزاء لازم برای ساخت و بسته بندی ویروسی فراهم گردد. پس از بسته بندی، ذرات ویروسی که حاوی ژن مورد نظر در پیکره خود هستند، از سلول خارج می‌شوند. پلاسمیدهای بسته بندی ویروس (PsPAX2)، پروتئین‌های پوششی ویروس (pMD2.G) و وکتور حاوی ژن miR-375 که قبلاً در داخل باکتری کلون شده بود را با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (MN mega, Germany) از باکتری خارج و طبق پروتوکل بسته بندی لنتی ویروسی مرکز تحقیقات بن یاخته تهران به محیط لاین سلولی بسته بندی کننده ذرات ویروسی (HEK 293T) اضافه شد و هر ۱۰-۸ ساعت محیط کشت این سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود جمع آوری، تغلیظ و نگهداری شد.

ترانس داکت hUDSCs با وکتورلنتی ویروسی حامل miR-375 hUDSCs در پاساژ سوم (۱/۵ ×۱۰^5) در یک فلاسک

کشت پلاستیکی ۲۵ cm به همراه محیط کشت DMEM با ۱۰٪ FBS برای ۱۸ ساعت کشت داده شد. به محیط کشت سلول‌های مذکور ۱۵۰ µL، LV- miR-375 تغلیظ شده اضافه و برای ۱۶ ساعت سلول‌ها در این حالت انکوبه شدند. سلول‌های hUDSCs تیمار شده با LV- miR-375 جهت پایداری ترانس داکشن به مدت سه روز در معرض ۲/۵ µg/ml پرومایسین قرار گرفتند.

بررسی بیان مارکرهای ویژه سلول‌های شبه بتا به وسیله روش Real-Time

کل RNA از سلول‌های گروه تیمار و کنترل توسط کیت RNX-plus (Cinnagen, Iran) استخراج شد. سپس RNA به cDNA تبدیل گردید. برنامه استفاده شده برای سنتز cDNA در جدول ۱ و تهیه master mix واکنش Real Time- PCR در جدول ۲ و برنامه Real Time- PCR در جدول ۳ نمایش داده شده است. بیان ژن‌های pdx1 و Insulin به وسیله روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- برنامه cDNA سازی

زمان	دما
۶۰ دقیقه	۴۳ درجه سانتی گراد
۱ دقیقه	۸۵ درجه ساتی گراد

جدول ۲- تهیه Real Time- PCR Master Mix

مقدار مورد نیاز	مواد PCR
۱۰µl	مخلوط PCR (syber)
۰/۴µl	رنگ Dye
۰/۵ µl	pFo
۰/۵ µl	PRo
۶ µl	D.W
۲ µl	c DNA

جدول ۳- برنامه Real Time- PCR

تعداد سیکل	زمان	دما (سانتی گراد)
۱	۱۰ دقیقه	۹۵
۴۰	۱ دقیقه	۹۵
۴۰	۱ دقیقه	۶۵
۱	۱۰ دقیقه	۷۲

نتایج

نتایج جداسازی و تشخیص MSCs

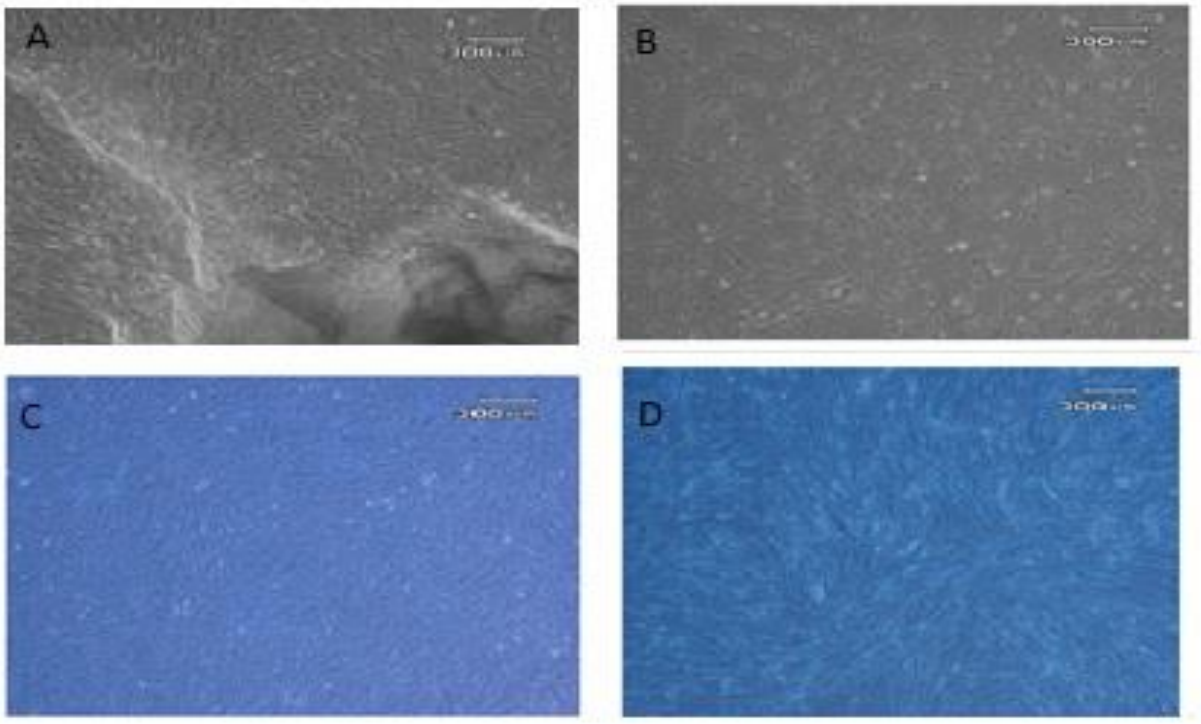
سلول‌های MSCS از لبه‌های قطعات ژله وارتون Explant شده مهاجرت کرده و به کف ظرف مخصوص کشت چسبیدند (شکل ۱). این سلول‌ها مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست (fibroblast-like morphology) داشته و بعد از ۷-۱۰ روز به تراکم ۸۰-۹۰٪ دست یافتند.

جهت تایید MSCS این سلول‌ها با آنتی بادی‌های نشان‌دار رنگ آمیزی شد. نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای CD45، CD34 و CD133 را بیان نمی‌کنند اما بیان بالایی از CD44، CD105 و CD90 را نشان دادند (شکل ۲).

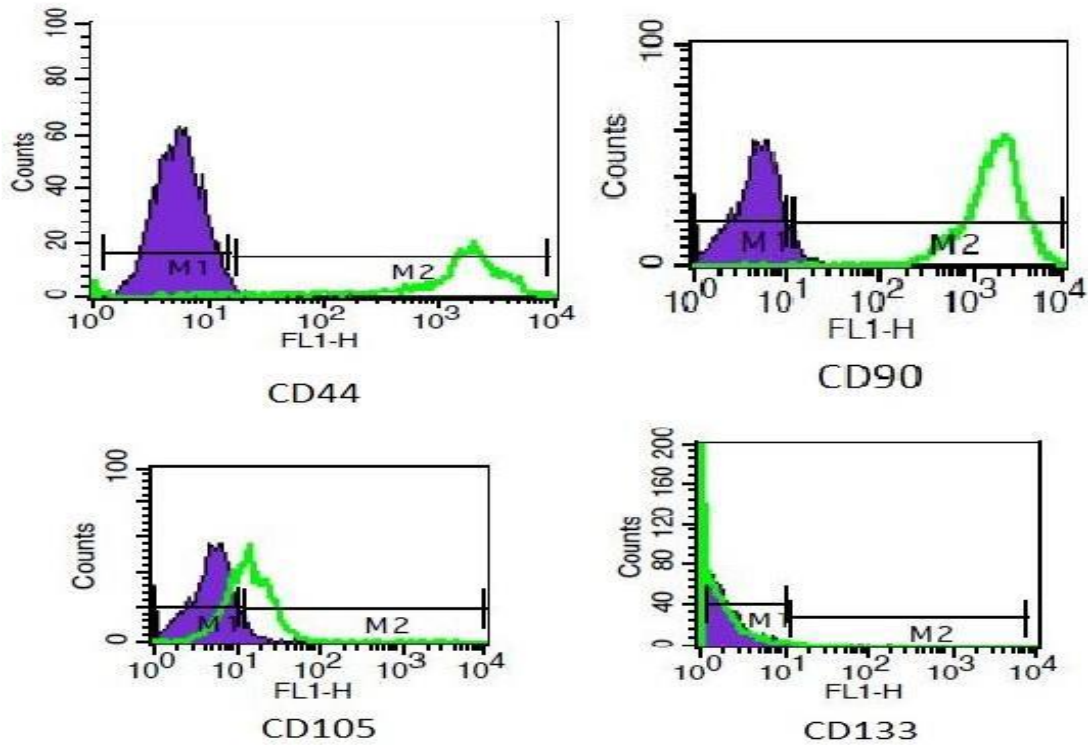
نتایج تولید ذرات لنتی ویروسی

طراحی وکتورهای لنتی ویروسی بر پایه ژنوم HIV-1 به نحوی صورت می‌گیرد که ایمنی لازم برای کار با آن‌ها در آزمایشگاه فراهم شود. به این منظور، ژن‌های مورد نیاز برای بسته بندی ویروس (psPAX2) و پروتئین‌های پوششی آن (pMD2.G) بر روی پلاسمیدهای کمکی جداگانه قرار داده شده است. برای تولید ذرات لنتی ویروسی باید وکتور حامل ژن مورد نظر و پلاسمیدهای کمکی به یک لاین سلولی بسته بندی کننده ذرات ویروسی انتقال یابند تا ژن مورد نظر کلون شده در بدنه وکتور حامل در ساختار ویروسی بسته بندی گردد. جهت تایید این که ژن ترانسفکت شده در سلول‌های HEK 293T بیان شده و نیز تایید بسته بندی پارتیکل‌های ویروسی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانس فکشن سلول‌های HEK 293T با میکروسکوپ فلورسنت بررسی و نتایج در شکل ۳ نمایش داده شده است.

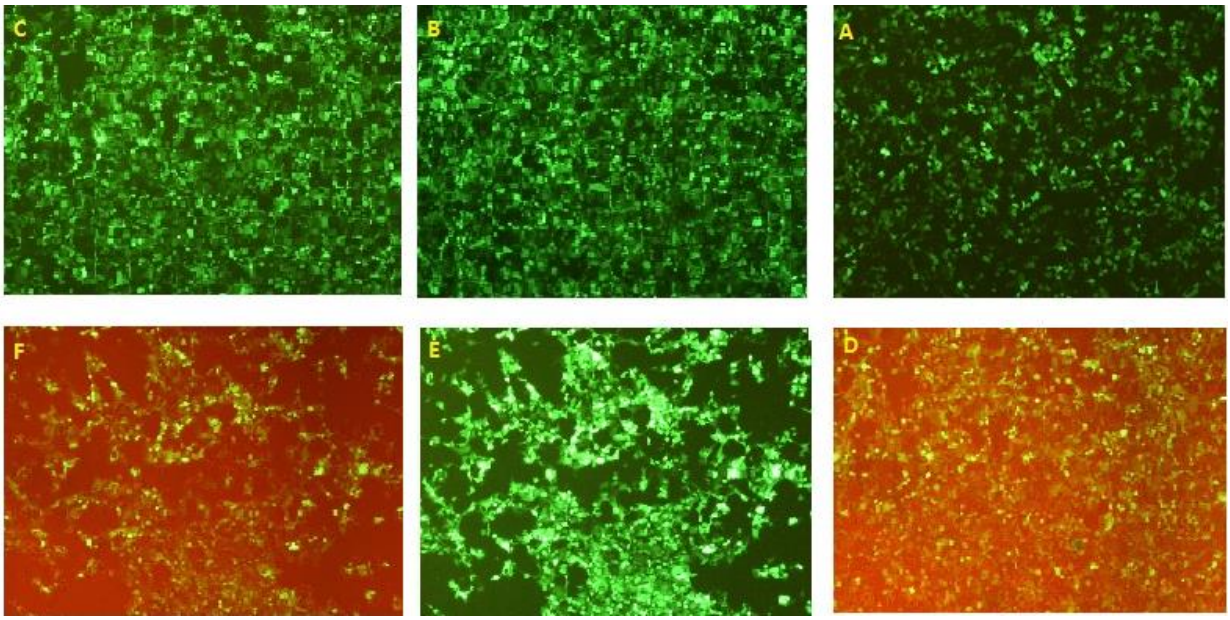
نتایج تغییرات ظاهری سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف انسان (hUDSCs) تیمار شده با وکتور ویروسی miR-375 جهت بررسی اثرات miR-375 بر روی hUDSCs تغییرات ظاهری در گروه کنترل و گروه‌های تیمار در روزهای ۰، ۷ و ۲۱ مورد مشاهده قرار گرفت. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، هیچ تغییر ظاهری از روز ۰ تا ۲۱ در گروه کنترل مشاهده نشد اما در گروه تیمار تغییرات مرفولوژیکی از روز ۳ تا ۲۱ دیده شد. از روز سوم بعد از تیمار، سلول‌های القا شده یک انتقال آشکار از مرفولوژی دو قطبی شبه فیبروبلاستی



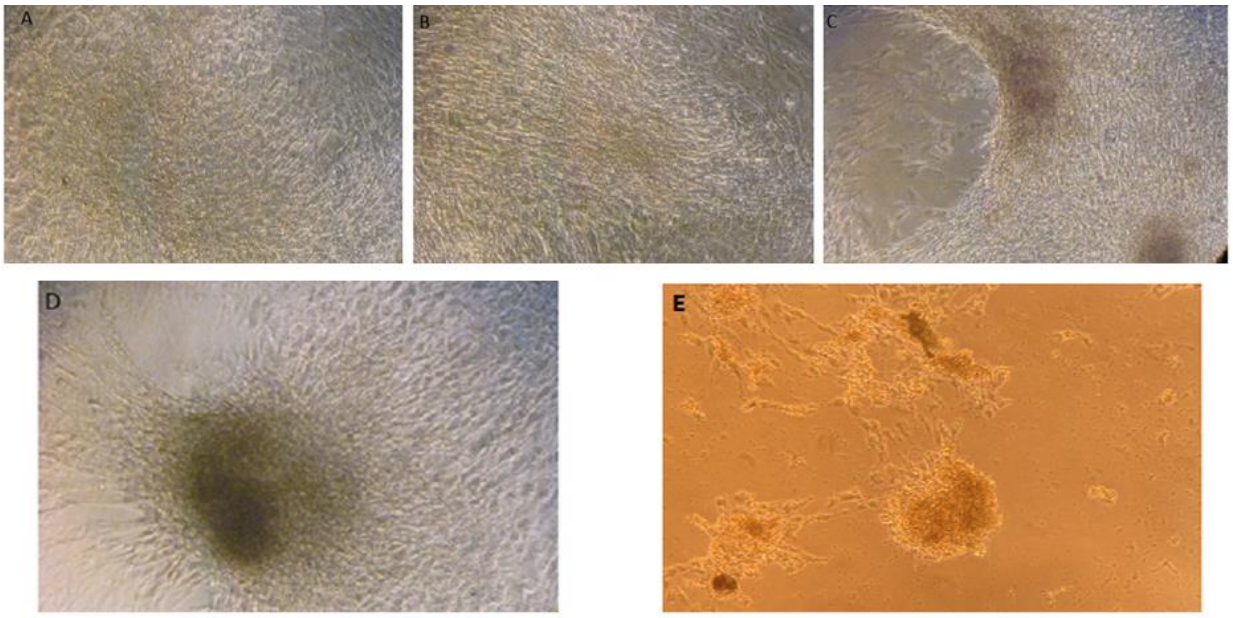
شکل ۱- A: مهاجرت سلول‌ها از لبه بافت و چسبیدن و گسترش در کف ظرف کشت B: تراکم سلولی حدود ۴۰-۳۰٪ C: تراکم سلولی حدود ۷۰-۸۰٪ D: تراکم سلولی حدود ۹۰٪



شکل ۲- آنالیز مارکرهای سطحی MSCS با روش فلوسایتومتری. این سلول‌ها مارکرهای CD45، CD34 و CD133 را بیان نمی‌کنند اما بیان بالایی از CD44، CD105 و CD90 را نشان می‌دهند.



شکل ۳- A: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های HEK-293، 24 ساعت بعد از ترانس فکشن. تصاویر B، C و D: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های HEK-293، 48 ساعت بعد از ترانس فکشن. تصاویر E و F: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های HEK-293، 48 ساعت بعد از ترانس فکشن.



شکل ۴- تغییرات مرفولوژیکی در سلول‌های تیمار شده با وکتور ویروسی miR-375. A: hUDSCs در روز ۰ B: شروع متراکم شدن سلول‌ها در روز سوم بعد از ترانس داکشن C: گرد و کروی شدن سلول‌ها و تراکم هر بیشتر سلول‌ها در روز ۷ D: شکل گیری تدریجی خوشه‌ها در روز ۱۰ E: ظاهر شدن خوشه‌های شبه جزیره‌ای در روز ۲۱

حضور سلول‌ها در ظرف کشت سرعت تکثیر گذاشتند. با ادامه حضور سلول‌ها در ظرف کشت سرعت تکثیر سلول‌ها کاهش و سلول دوکی شکل مزانشیمی کوتاه و کروی شدند. در ادامه برخی از خوشه‌های جدید شبه جزیره‌ای شروع به ظاهر شدن کردند. از روز پنجم بعد از تیمار سلول‌ها شروع به نزدیک شدن به یکدیگر و متراکم شدن کردند. بعد از ده روز پس از تیمار

اکثر سلول‌ها متراکم شدند. سلول‌های متراکم شده خوشه‌هایی شبیه جزایر پانکراسی را تشکیل دادند. در حالی که چنین خوشه‌هایی در سلول‌های گروه کنترل دیده نشد.

نتایج مربوط به بیان Transcription Factors ویژه سلول‌های جزیره‌ای

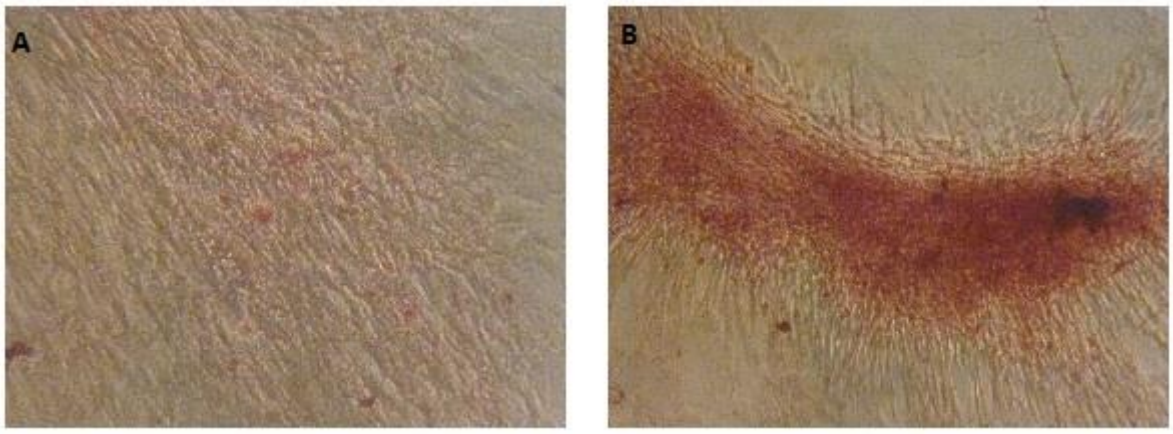
جهت تایید تمایز hUDSCs به سلول‌های شبه بتا (β- like cell) بعد از ترانس داکشن سلول‌ها با وکتور لنتی ویروسی miR-375 میزان بیان برخی از ژن‌های مارکر سلول‌های بتا مانند PDX1 و Insulin در روزهای ۰، ۷ و ۲۱ با کمک روش RT-qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداکثر بیان PDX1 در روز ۷ دیده می‌شود و بیان آن تا آخر دوره همچنان بالا باقی می‌ماند. در حالی که Insulin در پایان پژوهش (روز ۲۱) حداکثر بیان خود را نشان می‌دهد. افزایش بیان این ژن در سلول‌های تمایز یافته بیانگر این مطلب است که miR-375 توانایی القا hUDSCs به سمت β- like cell را دارد.

نتایج رنگ آمیزی DTZ

جهت مشخص شدن تمایز hUDSCs به سمت سلول‌های شبه جزیره‌ای سلول‌های ترانس داکت شده با وکتور لنتی ویروسی miR-375 و سلول‌های گروه کنترل در مراحل پایانی مطالعه با DTZ رنگ آمیزی شد. DTZ یک رنگ باند شونده با zinc است که به دلیل سطح بالای zinc به عنوان رنگ اختصاصی برای سلول‌های بتا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰). همانطور که در شکل ۵ نمایش داده شده است سلول‌های گروه کنترل رنگ نمی‌گیرند اما خوشه‌ها در گروه ترانس داکت شده به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

بحث و نتیجه گیری

دیابت ملیتوس یکی از بهترین کاندیداها جهت درمان با سلول یا Celltherape است که می‌توان سلول‌های ناتوان را با سلول‌های بتا عملکردی جایگزین کرد. از hUDSCs می‌توان به عنوان یک منبع مناسب جهت تولید یک بانک از سلول‌های بتا سالم استفاده کرد. لنتی ویروس‌ها این توانایی را دارند تا ترانس ژن‌ها را به طیف وسیعی از سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده انتقال دهند و بیان این ژن‌ها را برای مدت زمان طولانی حفظ کنند (۲۱). مطالعات نشان داده است که میزان بیان چندین MicroRNAs در طی رشد و تکثیر سلول‌های پانکراس انسان افزایش می‌یابند و ژن‌های درگیر در این فرآیندها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۲، ۲۳). MicroRNAs به دلیل اندازه کوچک، سنتز سریع، مقاومت به نوکلئازها و نیمه عمر و فعالیت بیولوژیکی بلند مدت، جایگزین مناسب برای فاکتورهای رشد و مهار کننده جهت استفاده در تمایز به انواع مختلف سلول‌ها هستند (۲۴). همچنین در مطالعه‌ای که توسط آذرپیرا و همکاران انجام شده نشان می‌دهد که MicroRNAs می‌توانند در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتا نقش ایفا کنند (۲۵). با توجه به این که می‌دانیم miR-375 در رشد و نمو جزایر پانکراس نقشی کلیدی ایفا می‌کند در این پژوهش ما یک روش جدید برای تمایز hUDSCs به سلول‌های شبه بتا تولید کننده انسولین با افزایش بیان miR-375 به کمک وکتور لنتی ویروسی حامل miR-375 بدون استفاده از هیچ فاکتور دیگر را مورد بررسی قرار دادیم. تغییرات ظاهری مشاهده شده در گروه افزایش بیان miR-375 (تیمار با LV miR-375) که همراه با نزدیک و فشرده شدن سلول‌ها به یکدیگر است نشان



شکل ۵- رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ DTZ، A: سلول‌های گروه کنترل که با DTZ رنگ نگرفته‌اند. B: خوشه‌های سلول‌های شبه بتا که با رنگ DTZ به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

دهنده تشکیل خوشه‌های شبه جزیره‌ای در انتهای طرح می‌باشد زیرا چنین مورفولوژی در سلول‌های طبیعی دیده نشده است. آنالیز نتایج RT–PCR نشان داد که الگوی بیان ژن‌های مارکر سلول‌های بتا در سلول‌های تیمار شده با وکتور مشابه تمایز در پانکراس انسان است (۲۶، ۲۷). pdx1 به صورت مشهود از روز ۷ تا انتهای مطالعه افزایش بیان دارد. بیان انسولین پیک بیانی خود را در روزهای پایانی نشان می‌دهد که بیانگر پیدایش سلول‌های شبه بتا بالغ است. هیچ تغییر قابل توجهی در سطح mRNA این مارکرها در hUDSCs نرمال دیده نمی‌شود. در نهایت ما یک روش موثر برای تولید سلول‌های شبه بتا در محیط آزمایشگاه به وسیله بیش بیان miR-375 در غیاب هرگونه فاکتور محرک دیگر را ارائه کردیم. نتایج ما نشان داد که افزایش بیان miR-375 در hUDSCs موجب هدایت این سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه بتا می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات پرسنل مرکز تحقیقات پیوند اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز و مرکز تحقیقات بن یاخته تهران کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science. 2001; 292(5520): 1389-1394.
2. Zulewski H, E.J. Abraham MJ, Gerlach PB, Daniel W, Moritz B, Muller M, Vallejo MK, Thomas and J.F. Habene. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. Diabetes. 2001; 50(3): 521-533.
3. Li Y, R. Zhang H, Qiao H, Zhang Y, Wang H, Yuan Q, Liu D, Liu L, Chen and X Pei. J. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. Cell Physiol. 2007;211(1): 36-44.
4. Moriscot C, F. de Fraipont M.J, Richard M. Marchand P, Savatier D, Bosco M, Favrot and P.Y. Benhamou. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. Stem Cells. 2005; 23(4): 594-603.
5. Lee K.D, T.K.C. Kuo J, Whang Peng Y.F, Chung C.T, Lin S.H, Chou J.R, Chen Y.P, Chen and O.K.S. Lee. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells.Hepatology. 2004; 40(6): 1275-1284.
6. Toma J.G, M. Akhavan K.J, L Fernandes F, Barnabe-Heider A, Sadikot D.R, Kaplan and F.D. Miller, Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat. Cell Biol. 2001; 3(9): 778-784.
7. Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, Endo F. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology. 2003. 38(1): 104-113.
8. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes. 2000. 49(2): 157-162.
9. Kodama S, Davis M, Faustman DL. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. Trends Mol. Med. 2005; 11(6): 271-276.
10. Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, Hassan HT. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). J.R. Soc. Med. 2004; 97(10): 465-471.
11. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PLOS One. 2008; 3(1): e1451.
12. Ohkubo Y1, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. Diab. Res. Clin. Pract. 1995; 28(2): 103-117.
13. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature, 2004;431(7006): 350-355. doi:10.1038/nature02871.
14. Kloosterman WP, AK Lagendijk RF, Ketting JD, Moulton RH, Plasterk. Targeted inhibition of miRNA

maturationwith morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. PLoSBiol. 2007; 5(8): e203. doi:10.1371/journal.pbio.0050203.
15. Poy MN, J Hausser M, Trajkovski M, Braun S, Collins P, Rorsman M, Zavolan M, Stoffel. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;106(14): 5813-5818. doi:10.1073/pnas.0810550106.
16. Correa-Medina M, V Bravo-Egana S, Rosero C, Ricordi H, Edlund J, Diez RL, Pastori. MicroRNA miR-7 is preferential expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. Gene Expr Patterns. 2009; 9(4): 193-199. doi:10.1016/j.gep. 2008.12.003.
17. Joglekar MV, VM Joglekar AA. Hardikar Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. Gene Expr Patterns. 2009; 9(2): 109-113. doi:10.1016/j.gep.2008.10.001.
18. Hinton A, I Afrikanova M, Wilson CC, King B, Maurer GW, Yeo A, Hayek AE, Pasquinelli. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2010;19(6): 797-807. doi:10.1089/scd2009.0224.
19. Shiroi A, M Yoshikawa H, Yokota H, Fukui S, Ishizaka K, Tatsumi Y, Takahashi. Stem Cells. 2002; 20: 284-292.
20. S hiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of Insulin Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc -ChelatingDithizone. Stem Cells. 2002;7(4):284-92.) 21. An DS, RP Wersto, ME Metzger, S Lu RG, Amado ISY. Chen and R.E. Donahue. J. Virol. 2000;74(3): 1286-1295.
22. Joglekar MV, VM Joglekar AA, Hardikar. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. Gene Expr Patterns. 2009; 9(2): 109-113.
23. Hinton A, I Afrikanova M, Wilson et al. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2010;19(6): 797-807.
24. Cook MS, R Blelloch. Small RNAs in germline development. Curr. Top. Dev. Biol. 2013;102: 159-205.
25. Azarpira N, A Shaer, M Karimi. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Insulin-Like Cell Clusters with miR-186 and miR-375 by using chemical transfection. Appl Biochem Biotechnol. 2015;13(1):68-75.
26. Oliver-Krasinski JM, DA Stoffers. On the origin of the β-cell. Genes Dev. 2008; 22(15): 1998-2021.
27. Liew CG. Generation of insulin producing cells from pluripotent stem cells: from the selection of cell sources to the optimization of protocols. Rev Diabet Stud. 2010; 7(2): 82-92.

Original Article

Differentiation of Mesenchymal Stem Cell toward the Insulin-like Cells with Lentivirus Vector Mir-375

Sazegar H [1, 2], Azarpira N [3*], Vahdati A[2], Karimi MH [3], Soleimani M[4]

1- Department Of Biology, Fars Science and Research Branch, Islamc Azad University, Fars, Iran
2- Department Of Biology, Shiraz branch, Islamc Azad University, Fars, Iran
3- Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4- Department of Hematology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 04 Oct 2015 Accepted: 04 Feb 2016

Abstract

Background & Objective: Type1 diabetes is characterized by autoimmune destruction of pancreatic β cells, leading to reduced insulin secretion. Differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into β-like cells offers new ways of diabetes treatment. MSCs can be insulated from the human umbilical cord tissue and differentiate into insulin-producing cells.

Material & Methods: Human umbilical cord–derived stem cells (hUDSCs) were attained after birth, selected by plastic adhesion, and considered by flow cytometric analysis. For the differentiation induction, miR-375 was lentivirally over expressed in hUDSCs.

Results: Meaningful that microRNAs (miRNAs) are the key players in several stages of pancreatic Differentiation, we have presented a novel and cost-effective strategy in which the over-expression of miR-375 promotes the pancreatic differentiation in hUDSCs in the absence of any other stimulator. The major expressions of PDX1 and insulin were identified by quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ($P < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, the Morphological assessment and the expression analysis of islet marker genes demonstrated that hUDSCs are able to differentiate into insulin-producing cells by transduction with lentiviral vector miR-375.

Keywords: Diabetes, HUDSCs, MiR-375, Lentiviral Vector

***Corresponding author: Negar Azarpira,** Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: negarazarpira@yahoo.com.