مقاله پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون بند ناف انسان به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین در محیط آزمایشگاهی

سیده معصومه نکوهی مدویی*[۱]، نگار آذرپیرا[۲]، لادن صادقی[۲]، سولماز کمالی فر[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، فارس، ایران.
۲- مرکز تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی، دانشکده علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: دیابت یکی از بیماری‌های مزمن عمده‌ی متابولیک می‌باشد. پیوند جزایر لانگرهانس روشی برای درمان دیابت است ولی به علت مشکلاتی مانند رد سیستم ایمنی و کمبود جزایر اهداء کننده محدود می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت تمایز به سلول‌های تولید کننده انسولین را دارا هستند. در این مطالعه، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان ($HUMSC_S$) به سلول‌های بتا، را بررسی می‌کنیم.

مواد و روش‌ها: نمونه بند ناف انسان بعد از اتمام زایمان (سزارین) از بیمارستان حافظ جمع آوری شد. $HUMSC_S$ تحت شرایط استریل در سه مرحله به مدت ۲۰ روز در مجاورت محیط کشت $DMEM\text{-}F_{12}$، رتینوئیک اسید، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، اگزندین-۴، نیکوتینیک اسید، سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک به سلول‌های تولید کننده انسولین (Islets) تمایز داده شد. از رنگ آمیزی DTZ برای حضور انسولین و از رونویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) برای شناسایی بیان ژن انسولین، PDX_1 و NGN_3 استفاده شد. همچنین ترشح انسولین توسط تست ایمونورادیومتریک ارزیابی شد.

نتایج: $HUMSC_S$ تحت شرایط فوق به تدریج از سلول‌های دوکی شکل فیبروبلاستی به سلول‌های اپیتلوئید و سرانجام به Islets تغییر شکل دادند. آزمایشات RT-PCR نشان داد که سلول‌ها نشان دهنده‌ی انسولین و ژن‌های PDX_1 و NGN_3 هستند و با استفاده از رنگ DTZ سلول‌های Islet-like cell به رنگ قرمز رویت و ترشح انسولین نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: $HUMSC_S$ دارای توانایی تمایز به Islet-like cells در محیط آزمایشگاهی است و شاید یک پتانسیل جدیدی برای سلول درمانی در دیابت باشد.

کلمات کلیدی: **سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ژله‌ی وارتون، تمایز سلول‌ها، انسولین**

مقدمه

موضوع حافظه و یادگیری از موارد با اهمیت در زندگی انسان است و تحقیقات درباره بهبود آن همچنان ادامه دارد. باکلوفن به عنوان اگونیست گیرنده‌های گابا بی سیستم گابا ارژیک را فعال می‌کند، فعالیت این سیستم تاثیر مهاری بر اجرای حافظه دارد (۱) و موجب مهار پیش سیناپسی نرون‌های موثر در حافظه و یادگیری می‌گردد (۲)؛ لذا تجویز باکلوفن با تخریب حافظه همراه می‌گردد (۳). از طرفی جینکو یک داروی گیاهی است که خواص متعددی داشته از جمله تأثیر مثبت آن بر بهبود حافظه در برخی موارد گزارش شده است (۴، ۵). در کنار خواص آنتی اکسیدانی به واسطهٔ اثر روی سلول‌های التهابی و مهار تولید اکسیژن و نیتروژن فعال از خود اثرات ضد التهابی نشان می‌دهد. عصاره Ginkgo تولید فرآورده‌های ناشی از تخریب و اکسیداسیون LDL را کاهش می‌دهد و در انواع نوروپاتی مانع از آسیب اکسیداتیو میتوکندری‌ها شده از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند و به همین دلیل می‌تواند اثرات مفیدی بر بیماری‌های دژنراتیو عصبی داشته باشد (۶-۸). جینکو یک عصاره مالتی فانکشنال است و

*نویسنده مسئول: سیده معصومه نکوهی مدویی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، فارس، ایران. تلفن: ۰۷۱۱۶۴۷۴۳۳۱ Email: masoomnekoei@yahoo.com

می‌تواند روی کم خونی مغز تاثیرات مطلوب بگذارد (۹) اگر چه نشان داده شد که جینکو به تنهایی موجب افزایش حافظه نمی‌شود (۱۰، ۱۱) ولی در کاهش فراموشی اهمیت دارد (۱۶-۱۲). برخی گزارشات نشانگر تداخل عملکرد جینکو با سیستم‌های نوروترانسمیتری می‌باشد (۵)، از جمله درباره تداخل عملکرد جینکو با سیستم کولی نرژیک (۱۷) آدرنرژیک (۱۸)، گزارشاتی ارائه گردیده است. گلوتامات و گاماآمینوبوتیریک اسید [3] دو ناقل شیمیایی هستند که با ارتباط سیناپسی گسترده در CNS مرتبط هستند. گلوتامات نوروترانسمیتر تحریکی اصلی در مغز و نخاع است در حالی که GABA مسئول اکثر ارتباطات مهاری در مغز است. GABA در مغز از تأثیر آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)بر گلوتامات ایجاد می‌شود (۱۹). گلوتامات نروترانسمیتری تحریکی است که دو نوع رسپتور متابوتروپیک (مکانیسم عمل با پیامبر ثانویه) و یونوتروپیک (که کانال‌های یونی هستند) دارد. مسیر GABA نیز نقش مهمی در رشد مغز دارد و تعادل سیستم گابارژیک و گلوتاماترژیک مدلینگ کورتکس مخ را با جایگزینی سلول‌های اصلی، هرمی و اینتر نورون‌ها تسهیل می‌کند (۱۹) استقرار سیستم گابارژیک و مهاجرت اینترنورون‌های گاباارژیک نقش حیاتی در رشد قسمت مهاری کورتکس بازی می‌کنند که سیستم تحریکی گلوتاماترژیک را کنترل می نمایند (۲۰).

در این تحقیق به منظور بررسی مکانیزم عملکرد جینکو بر روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مطرح در یادگیری و حافظه به تعیین تأثیر جینکو و آگونیست گابا (باکلوفن) بر رفتار شرطی اجتنابی غیر فعال (به عنوان یکی از روش‌های ارزیابی حافظه) در موش پرداخته شد. انجام این تحقیق علاوه بر ارائه اطلاعات در مبانی و اصول انجام یادگیری و حافظه، همچنین نگاهی به درمان‌های ترکیبی بر ترمیم حافظه دارد.

مواد و روش‌ها

به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون بند ناف انسان به سلول‌های تولید کننده انسولین به این ترتیب مراحل زیر انجام شده است.

آماده سازی بند ناف انسان: نمونه‌های بند ناف انسان به صورت ضد عفونی شده از نوزادان به دنیا آمده با شرایط کاملاً استریل و با رضایت مادران از بیمارستان حافظ شیراز جمع آوری شده است و برای بررسی و پژوهش به بخش پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز انتقال داده شد.

جدا سازی MSCs از ژله‌ی وارتون بند ناف انسان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش explant از ژله‌ی وارتون جدا شدند. به این صورت که با انتقال بند ناف به زیر هود و با برش دادن بند ناف به قطعات کوچک و بیرون آوردن ژله‌ی وارتون از میان بافت داخلی بند ناف و کشت دادن آن در پلیت به اندازه‌ی $1mm^2$ و با استفاده از محیط کشت H-DMEM، FBS%10 (Fetal Bovine Serum) و آنتی بیوتیک پرورش داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شد. بعد از یک هفته محیط کشت پلیت‌ها هر سه روز یک بار عوض می‌شد تا این که به ترتیب سلول‌ها از ژله‌ی وارتون بیرون آمده و سطح پلیت را پر کرده که گفته می‌شود ۷۰-۸۰٪ Confluent شده‌اند که در این زمان به وسیله‌ی Trypsin-EDTA سلول‌ها Subculture می‌شوند.

آنالیز فلوسایتومتری: برای مشخص شدن MSCs جدا شده از ژله‌ی وارتون بند ناف انسان از فلوسایتومتری استفاده می‌شود. در این روش از ۲۵۰۰۰۰ سلول استفاده شد، فلاسک T۷۵ که حاوی این سلول‌ها بود را بعد از شستشو با PBS و تریپسینه کردن، سانتریفیوژ کرده و بعد از شمارش با ۳-۲ میلی لیتر محلول PBS سانتریفیوژ شد و سوسپانسیون رویی دور ریخته و با استفاده از ۲۵۰ میکرولیتر PBS سلول‌ها هموژن گردید که در این مرحله از آنتی بادی‌های (Biolegen, USA) CD_{105}، CD_{90}، CD_{44}، IGg_1 استفاده شد و در هر لوله ۲ میکرولیتر از آنتی بادی‌ها ریخته و ۳۰ دقیقه در تاریکی گذاشته شد بعد از این، مرحله ۳-۲ میلی لیتر محلول شستشو استفاده و سانتریفیوژ شد و بعد از ریختن سوسپانسیون رویی به هر لوله ۳۰۰ میکرولیتر شستشواضافه گردید که بعد از هموژن کردن مارکرهای سطحی سلول‌ها با فلوسایتومتری بررسی شد.

رنگ آمیزی MSCs با رنگ گیمسا: با رنگ آمیزی MSCs می‌توان مورفولوژی سلول‌ها را بررسی کرد. به این صورت که سلول‌ها را با PBS شستشو داده و به نسبت ۱:۱ از Methanol و PBS به مدت ۲ دقیقه استفاده شد و بعد با استفاده از methanol

در ۱۰ دقیقه سلول‌ها را شستشو داده و بعد، از رنگ گیمسا به مدت ۲ دقیقه استفاده و ۲ مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد که سلول‌ها در این مرحله فیکس و رنگ شده‌اند که با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار داده شد.

تمایز MSCs بند ناف انسان به Islets در محیط آزمایشگاهی: سلول‌های MSCs در فلاسک ۷۵T وقتی ۹۰-۸۰٪ Confluent شدند آماده‌ی تمایز به سلول‌های جزیره مانند در سه مرحله در مدت ۲۰ روز می‌شوند.

مرحله اول: در این مرحله ۲۴ ساعت سلول‌ها در مجاورت محیط DMEM-F_{12} (Dulbecco Modified Eagle Medium-f12)، FBS 10% و آنتی بیوتیک و Retinoic acid 10^{-6}M (Sigma-Aldrich) قرار داده شد و بعد از این مرحله سلول‌ها به مدت ۲ روز در مجاورت محیط DMEM-F_{12}، FBS 10% و آنتی بیوتیک قرار داده شد.

مرحله دوم: Subculture کردن سلول‌ها به وسیله‌ی Trypsin-EDTA و انتقال ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر خانه از پلیت‌های 6-well که با ژلاتین آغشته شده است به مدت ۶ روز در مجاورت محیط DMEM-F_{12}، FBS 10% و آنتی بیوتیک Epidermal Growth Factor) (Sigma-Aldrich)، EGF 20ng/ml، Nicotinic acid 10mmol/l (Sigma-Aldrich) قرار داده شد.

مرحله سوم: سلول‌ها در این مرحله به مدت ۱۱ روز در مجاورت محیط DMEM-F_{12}، FBS 10% و آنتی بیوتیک و Exendin-4 (Sigma-Aldrich)10nmol/l قرار داده شد که تمام این مراحل با میکروسکوپ معکوس بررسی شده است.

روش مولکولیPCR و Real Time-PCR برای سلول‌های تمایز یافته: با استفاده از کیت، RNX-plus (Cinnagen, Iran) استخراج RNA انجام شد و cDNA ایجاد شده برای مراحل بعدی نگهداری شد. برنامه مورد استفاده برای سنتز cDNA در جدول شماره ۱ و تهیه master mix واکنش PCR در جدول شماره ۲ و برنامه PCR در جدول شماره ۳ و نام، توالی پرایمرها و اندازه‌ی محصولات PCR نیز در جدول شماره ۴ فهرست شده است.

روش کمی Real Time- PCR، با استفاده از کیت، SYBR EX Taq انجام شد و برنامه مورد استفاده برای سنتز cDNA در جدول شماره ۱ و تهیه master mix واکنش Real Time- PCR در جدول شماره ۵ و برنامه Real Time- PCR در جدول شماره ۶ فهرست شده است.

جدول شماره۱: برنامه cDNA سازی

زمان	دما
۹۰ دقیقه	۴۲ درجه سانتیگراد
۵ دقیقه	۸۵ درجه سانتیگراد

جدول شماره ۲: تهیه master mix واکنش PCR

مواد	غلظت	مقدار مورد نیاز
PCR buffer	10 x	2.5 µl
Mgcl2	50 mM	0.78 µl
dNTps	10 mM	0.5 µl
pFo	50 picomol/ µl	0.5 µl
pRo	50 picomol / µl	0.5 µl
Taq polymerase	unit/µl5	0.5 µl
D.W	-	9.5 µl

جدول شماره ۳: برنامه PCR

تعداد سیکل	زمان	دما
۱	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد
۴۰	۱ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد
۴۰	۱ دقیقه	۶۵ درجه سانتیگراد
۱	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد

جدول ۴: توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای تمایز MSCs به Islets

پرایمرها	توالی ها	TM	اندازه‌ی محصولات
PDX_1	F: GGATGAAGTCCAAAGCTCACGC R: CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC	71.6	92 bp
B- actin	F: GATCGGCGGCTCCATCCTA R: GACTCGTCATACTCCTGCTTGC	64	72 bp
Ngn_3	F: CAATCGAATGCACAACCTCA R: GGGAGACTGGGGAGTAGAGG	66	253 bp
Insulin	F: AGCCTTTGTGAACCAACACC R: GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	64	92 bp
OCT_4	F: CAGTGCCCGAAACCCACAC R: GGAGACCCAGCAGCCTCAAA	65.3	161 bp
PAX_4	F: GTGGGCAGTATCCTGATTCAGT R: TGTCACTCAGACACCTTTCTGG	66	308 bp
PAX_6	F: CCGAGAGTAGCGACTCCAG R: CTTCCGGTCTGCCCGTTC	61.7	239 bp
Glucagon	F: AGGCAGACCCACTCAGTGA R: AACAATGGCGACCTCTTCTG	60.1	225 bp
Glut-2	F: AGGACTTCTGTGGACCTTATGTG R: GTTCATGTCAAAAAGCAGGG	64	231 bp
Nanog	F: CAGAAGGCCTCAGCACCTAC R: ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC	65.3	111 bp

جدول شماره ۵: تهیه Real Time- PCR Master Mix

موادPCR	مقدار مورد نیاز
مخلوط PCR (syber)	10 µl
رنگDye	0/4 µl
pFo	0/5 µl
PRo	0/5 µl
D.W	6 µl
C DNA	2 µl

جدول شماره ۶: برنامه Realtime-PCR

تعداد سیکل	زمان	دما
۱	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد
۴۰	۱ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد
۴۰	۱ دقیقه	۶۵ درجه سانتیگراد
۱	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد

رنگ آمیزی اختصاصی با رنگ DTZ: رنگ آمیزی اختصاصی با دیتیزون روشی است که به طور اختصاصی سلول‌های تولید کننده انسولین را شناسایی می‌کند. بدین وسیله ابتدا ۸۰mg از پودر DTZ (Diphenylthiocarbazon) در ۱۰ml، دی متیل سولفاکسید (DMSO) حل شد و به وسیله‌ی PBS به حجم ۵۰ رسانده شد بعد از فیلتر کردن به ازای هر میلی لیتر از محیط

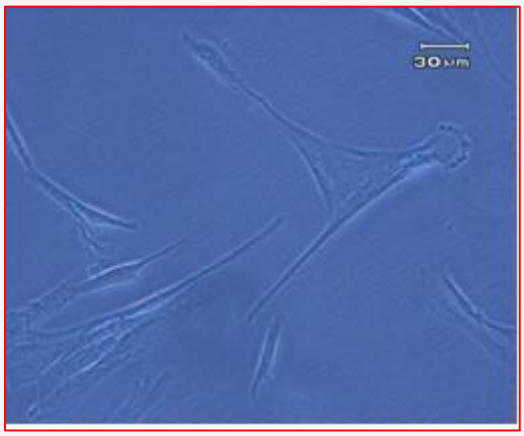
کشت ۵۰۰ میکرولیتر DTZ روی سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد.

آنالیز ایمونورادیومتریک: برای مشخص شدن میزان انسولین تولید شده به وسیله سلول‌های تمایز یافته از آنالیز الیزا به وسیله کیت، (Czech Insulin, IRMA) استفاده می‌شود.

آزمایش ایمونورادیومتریک انسولین یک نوع آزمایش ساندویچ است. به این صورت که آزمایش در تیوب‌های coated انجام می‌شود، سرم حاوی انسولین به این تیوب‌ها اضافه شده، انسولین به آنتی بادی‌ها متصل شده، آنتی بادی‌های ثانویه که متصل به I_{125} است به سرم اضافه می‌شود در این حالت انسولین بین دو آنتی بادی قرار گرفته که به این حالت ساندویچ گفته می‌شود. سپس در gamma counter، رادیواکتیویته آن اندازه‌گیری و به وسیله منحنی استاندارد بیان می‌شود.

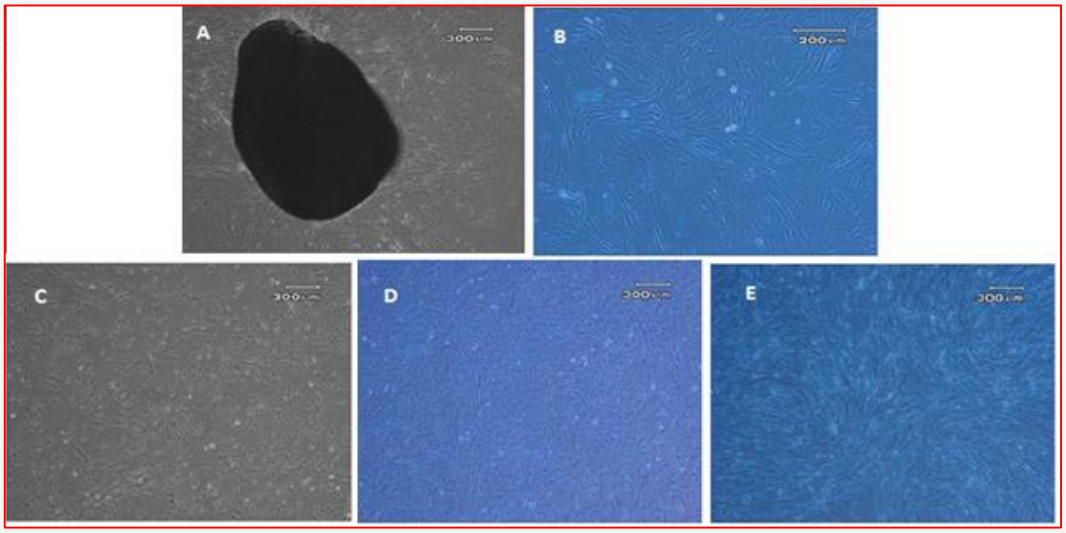
نتایج

نتایج حاصل از جداسازی MSCS از ژله‌ی وارتون بند ناف انسان: ژله‌ی وارتون بند ناف انسان به صورت explant کشت داده شد. در این روش بافت به قطعات mm21 کوچک شده و در پلیت مخصوص کشت سلول قرار داده شده و به آن محیط کشت اضافه می‌شود. بعد از یک هفته سلول‌ها از کناره‌های بافت جدا شدند) از مرحله‌ای که سلول‌ها بیرون آمده تا مرحله‌ای که ۹۰-۸۰ % confluentشدند (با میکروسکوپ معکوس عکس برداری شد (شکل شماره ۱ و ۲).



شکل شماره ۱: نمایی از یک سلول بنیادی مزانشیمی.

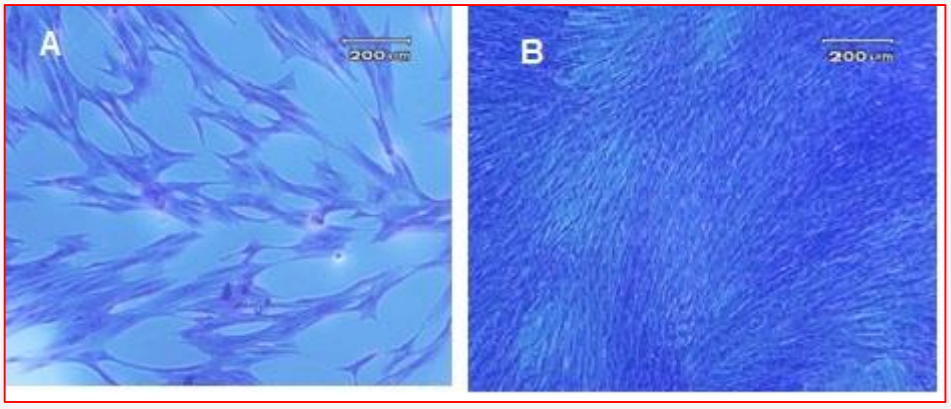
نتایج حاصل از فلوسایتومتری: جهت تأیید این موضوع، که سلول‌های جدا شده از ژله‌ی وارتون بند ناف انسان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند. در سطح این سلول‌ها، بیان مارکرهایی را بررسی کردیم. نتایج به دست آمده از آنالیز فلوسایتومتری (BD FACSCalibur, USA) این سلول‌ها، بیان مثبت مارکرهایCD105 ، CD90، CD44در سطح سلول‌ها



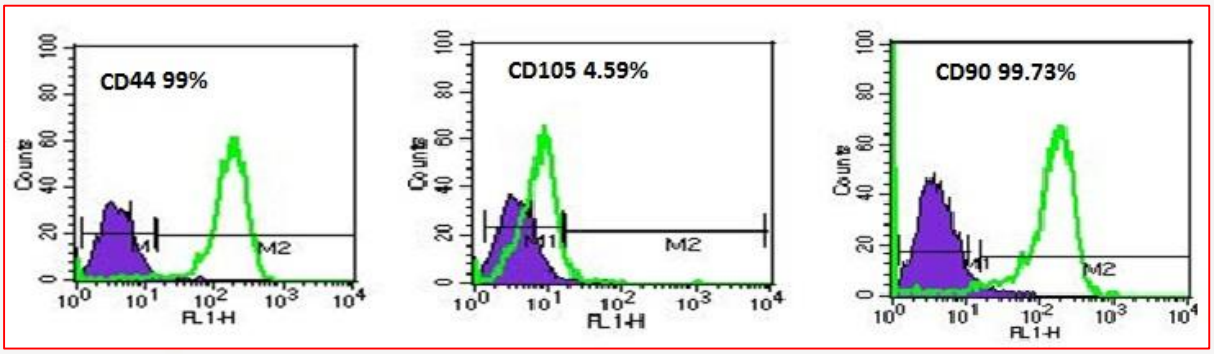
شکل شماره ۲: A : خارج شدن سلول‌ها از کناره‌های قطعه‌ی بافت ژله‌ی وارتون، B: سلول‌ها در اولین پاساژ بعد از گذشت ۲ روز، C: سلول‌ها در اولین پاساژ بعد از گذشت ۵ روز D: رسیدن سلول‌ها به مرحله ۸۰-۷۰٪ confluent، E: رسیدن سلول‌ها به مرحله ۹۰٪ confluent.

بررسی شد. این نتایج، با دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه سازگاری داشت (نمودار شماره ۱).

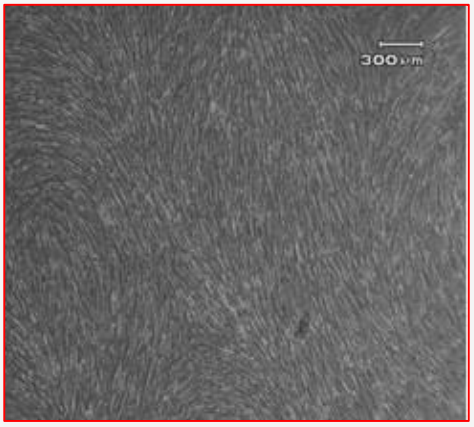
نتایج رنگ آمیزی سلول‌های MSCS با رنگGimsa : در ترکیب این رنگ ماده‌ی ثابت کننده‌ای وجود ندارد، پس در رنگ



شکل شماره ۳: A: سلول‌های MSCs رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا B: بافتی از سلول‌های MSCs رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا.



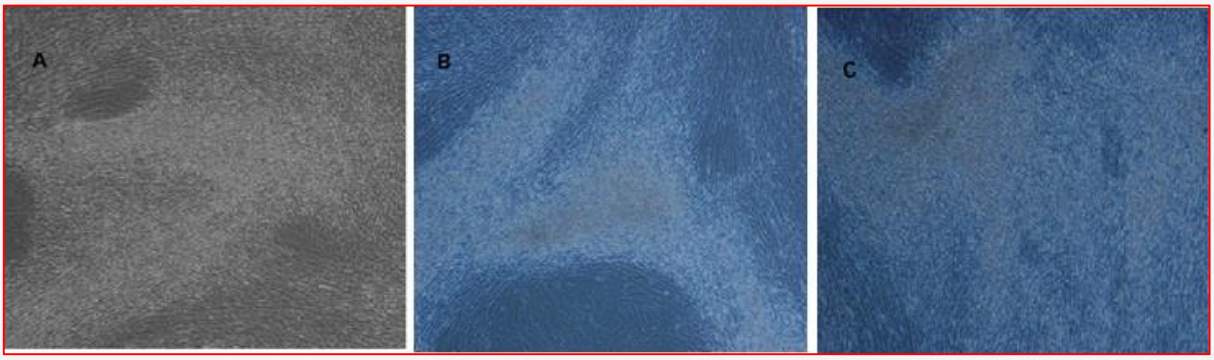
نمودار شماره ۱: آنالیز فلوسایتومتری بیان آنتی ژن CD44، CD105، CD99 در سطح MSCs مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان



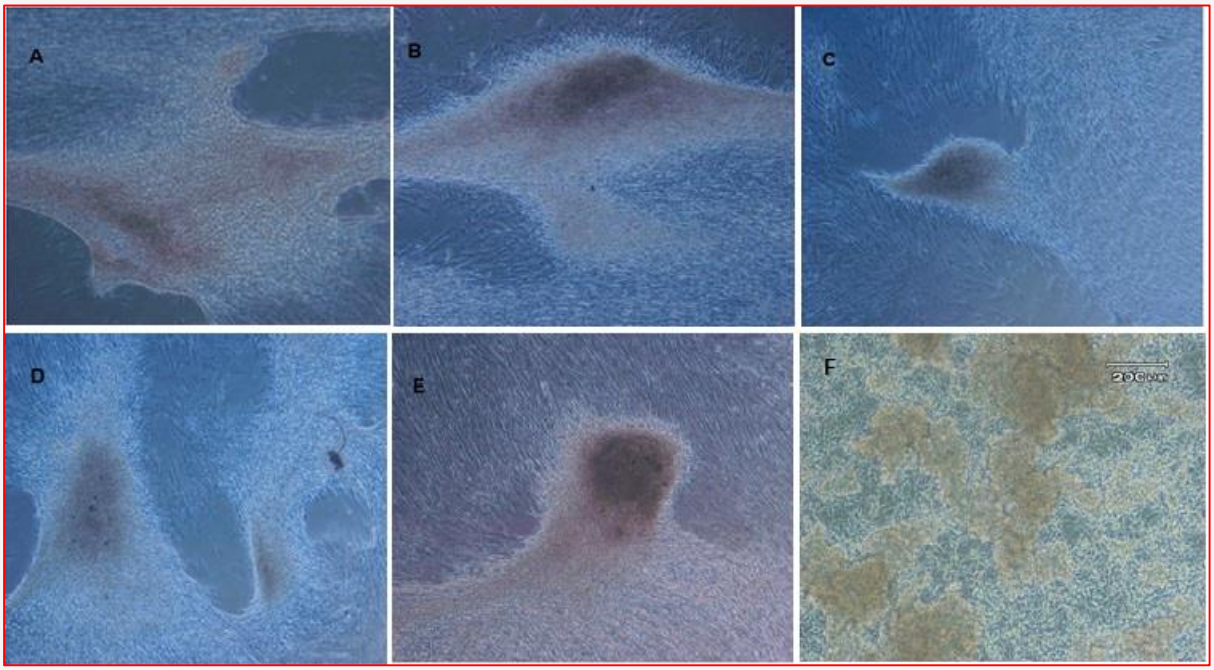
شکل شماره ۴: مرحله اول تمایز در مدت ۳ روز، سلول‌ها دوکی شکل‌اند.

آمیزی از گسترش نازکی از الکل متیلیک مطلق استفاده شد.در این روش سلول‌های MSCS رنگ آمیزی شد (شکل شماره ۳) .

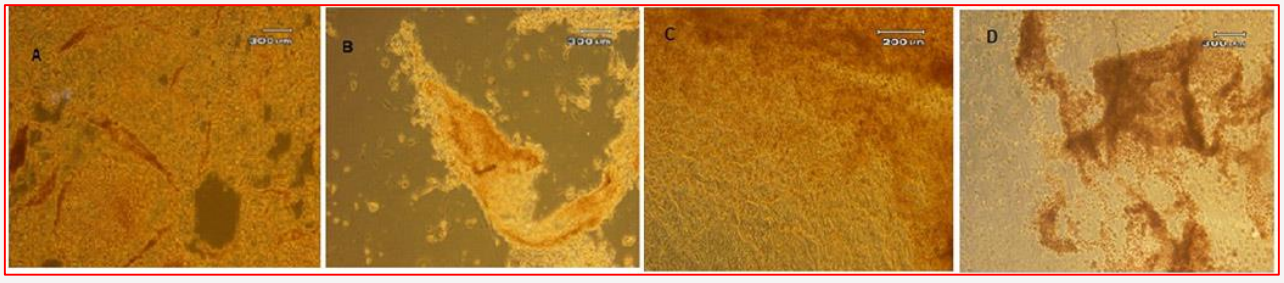
نتایج حاصل از تمایز MSCS ژله‌ی وارتون بند ناف انسان به‌Islets : مراحل تمایز در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت محیط رتینوئیک اسید، محیط کشتDMEM-F12 ، آنتی بیوتیک‌ها و FBS 10% قرار داده شد و بعد به مدت ۲ روز در مجاورت محیط کشت-DMEM F12، آنتی بیوتیک‌ها و FBS 10%قرار داده شد و به وسیله‌ی میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار داده شد. سلول‌ها در این



شکل شماره ۵: (A,B,C) مرحله دوم تمایز در ۶ روز، سلول‌ها به سمت اپیتلوئید پیشروی کرده‌اند.



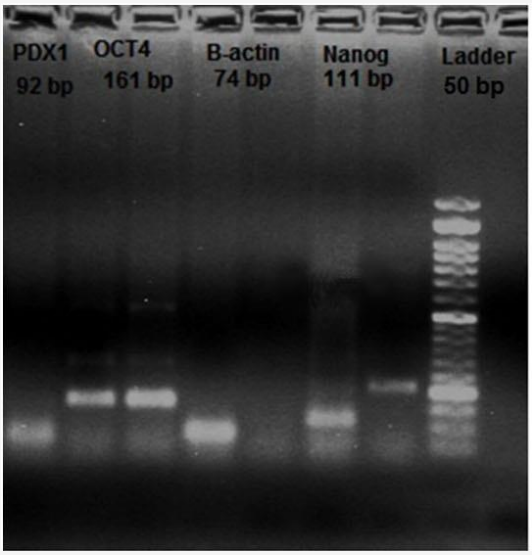
شکل شماره ۶: (A, B, C, D, E, F) مرحله سوم تمایز، سلول‌ها اپیتلوئید شده و کلونی‌های قهوه‌ای رنگی مشاهده می‌شود.



شکل شماره ۷: سلول‌های بنیادی مزانشیمی رنگ آمیزی شده با رنگ DTZ.

مرحله آماده تمایز شده‌اند ولی هنوز به شکل دوکی و فیبروبلاستی می‌باشند (شکل شماره ۴).

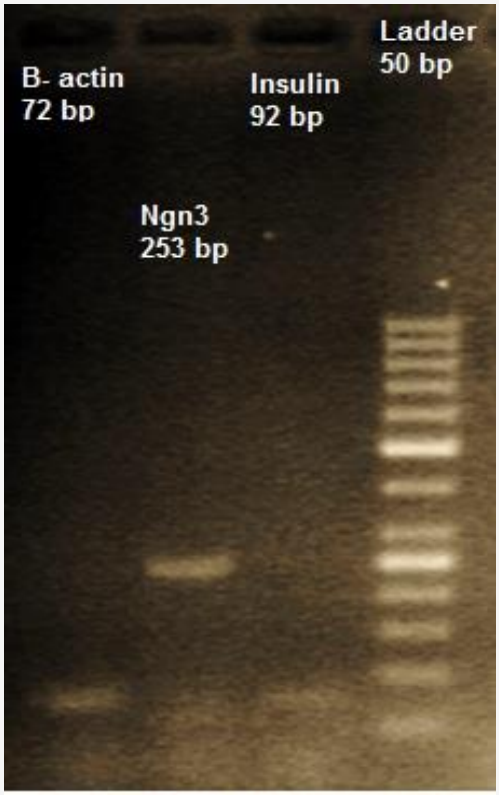
برای پیش برد بلوغ سلول‌های القاء شده از برخی فاکتورهای بالغ سازی مانند: نیکوتینیک اسید، فاکتور رشد اپیدرمی و اگزندین ۴ در کشت‌های بعدی استفاده شده است.



شکل۸: بیان ژن‌های PDX1، OCT_4، NANOG.

در مرحله دوم، سطح پلیت ها با ژلاتین پوشیده شد (برای چسبندگی و تغذیه ی سلول ها) و بعد از تریپسینه شدن، سلول ها در مجاورت محیط کشت DMEM-F12 همراه با10% FBS ، آنتی بیوتیک ها، فاکتور رشد اپیدرمی(EGF) ، Nicotinicacidدر مدت ۶ روز قرار داده شد و با میکروسکوپ اینورت بررسی شد. سلول ها در این مرحله کم کم از حالت دوکی و فیبروبلاستی خارج شده و به سمت اپیتلوئید حرکت کرده اند (شکل شماره ۵).

در مرحله ی سوم، سلول ها در مجاورت محیط کشت DMEM-F12همراه با10% FBS ، آنتی بیوتیک و Exendin-4 به مدت ۱۱ روز قرار داده شد و با میکروسکوپ اینورت بررسی شد. سلول ها از حالت دوکی خارج شده و تماماً کروی و اپیتلوئید شده و کلونی های قهوه ای رنگی ایجاد شده است (شکل شماره ۶). سوپ رویی سلول ها برای اندازه گیری میزان ترشح انسولین برداشته شد .



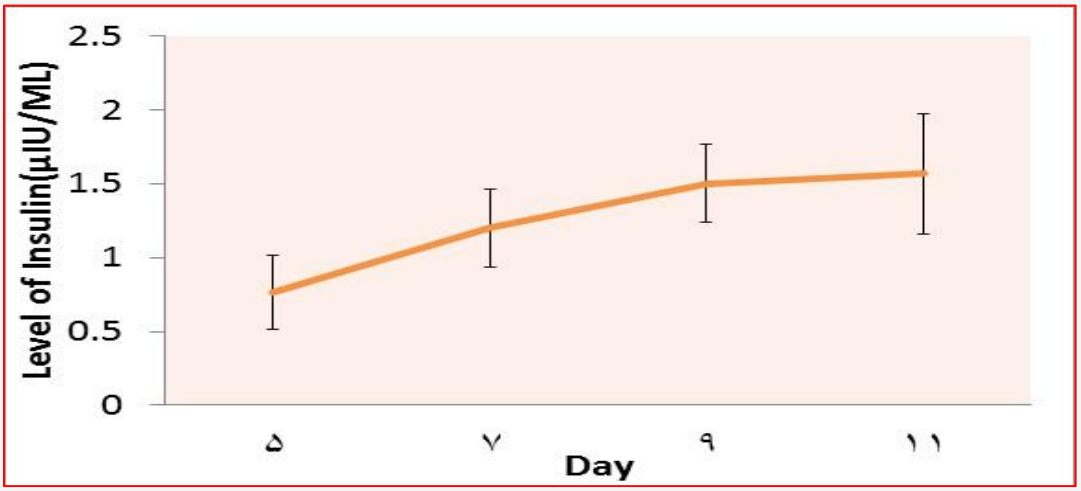
شکل۹: بیان آنتی ژن‌های NGN_3، Insulin.

نتایج حاصل از رنگ آمیزی اختصاصیDTZ : استفاده از رنگ DTZبرای مشخص شدن انسولین تولید شده، به این صورت که رنگ DTZ به گرانول های حاویZinc متصل شده و سلول ها به رنگ قرمز تبدیل می شوند (شکل شماره ۷).

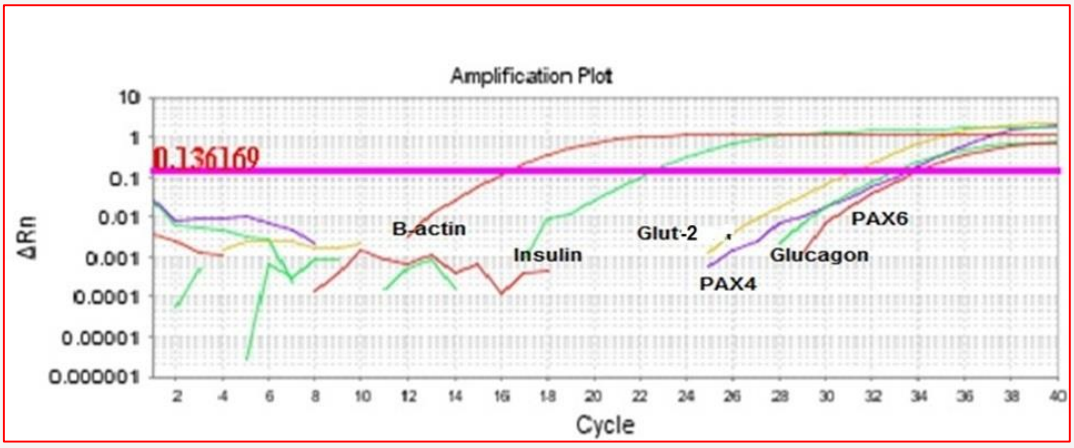
نتایج حاصل از آنالیز ایمونورادیومتریک: انسولین در سوپ رویی سلول‌های تمایز یافته ترشح شد که میزان ترشح انسولین از 5/0 -5/1 µIU/MLافزایش یافت (نمودار شماره ۲).

نتایج تجزیه و تحلیلPCR وReal Time- PCRبرای بررسی سلول‌های تمایز یافته: بیان ژن های مربوط به قسمت اندوکرین پانکراس با استفاده از PCR مانندPDX1 ،. NGN3، Insulin، OCT4، NANOGمشاهده شد (شکل۸،۹).

بیان ژن های مربوط به تمایز سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس مانند: NGN3، Insulin، Glucagon، Glut-2، PAX4، PAX6با استفاده از Real Time-PCR بررسی شد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۲: میزان ترشح انسولین (مرحله سوم از تمایز).



نمودار شماره ۳: بیان ژن‌های تولید شده در سلول‌های تولید کننده انسولین با استفاده از روش Real Time-PCR

بحث

اختلال ناشی از افزایش غلظت گلوکز خون، دیابت یا مرض قند نامیده می‌شود که معمول‌ترین و شایع‌ترین بیماری مرتبط با پانکراس می‌باشد. دیابت را به طور کلی به دو نوع دیابت ۱ و ۲ تقسیم بندی می‌کنند که دیابت نوع ۱ را دیابت ملیتوس وابسته به انسولین نیز می‌نامند. در این گروه از بیماران، پانکراس کارایی مناسب خود را از نظر تولید انسولین از دست داده است و از آنجایی که سلول‌های بدن در عدم حضور انسولین قادر به جذب گلوکز خون نمی‌باشند در این شرایط سطح گلوکز خون بالا رفته و در اصطلاح فرد مبتلا به دیابت ملیتوس شده است (۲۶، ۲۷).

تزریق انسولین به عنوان یک عامل درمانی برای افراد دیابتی نوع یک استفاده می‌شود ولی به دلیل تزریق مادام العمر انسولین و عوارض کشنده و اختلال در کیفیت زندگی نیازمند روش‌های درمانی برجسته است (۲۸). با این حال پیوند جزایر لانگرهانس یکی از درمان‌های امید بخش است که به طور مؤثری از بیماری دیابت جلوگیری می‌کند. اما متأسفانه پیوند جزایر لانگرهانس در

طول تاریخ به وسیله رد سیستم ایمنی و نیز کمبود اهدا کننده مختل شده است (۲۹، ۳۰).

سلول‌های بنیادی، دارای توانایی تمایز به سلول‌های تولید کننده انسولین هستند، که می‌تواند منبع امید بخش سلول‌های جزیره‌ای پانکراس باشند. به دلیل ویژگی‌های خاص سلول‌های بنیادی از قبیل، توانایی تکثیر بالا و قدرت تمایز به رده‌های مختلف سلولی از آن‌ها در کاربردهای بالینی نظیر مهندسی بافت، سلول درمانی و کاربردهای دارویی می‌توان استفاده کرد (۳۱). بنابراین سلول‌های بنیادی یک منبع ایده‌آل برای سلول درمانی، ژن درمانی و به عنوان ابزاری برای درمان‌های مادرزادی محسوب می‌گردد (۳۲). دانشمندان معتقدند سلول‌های بنیادی نه تنها در توسعه داروسازی، ناهنجاری شناسی جنین‌ها و مطالعه عملکرد ژن‌ها و همین طور در تولید موش‌های ترانس ژن نیز بسیار اهمیت دارند (۳۳).

از مهمترین سلول‌های بنیادی بالغ که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی MSCs اشاره کرد. امروزه MSCs براساس توانایی اتصال به سطح پلاستیک، توانایی تمایز به سلول‌های بافت‌های مختلف مزانشیمی و غیر مزانشیمی و بیان مجموعه‌ای از پروتئین‌ها، مولکول‌ها و آنتی ژن‌ها از سایر سلول‌ها جدا می‌شوند (۳۴).

در این آزمایش روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون به سلول‌های تولید کننده انسولین کار شده است که در سه مرحله به مدت ۲۰ روز تمایز صورت گرفته است.

در این آزمایش از رتینوئک اسید، فاکتور رشد اپیدرمی، اگزندین ۴ و نیکوتینیک اسید در محیط کشت DMEM-F_{12} همراه با FBS و آنتی بیوتیک استفاده شده است. رتینوئیک اسید (ویتامین آ)، مهمترین مولکول در رشد سریع پانکراس جنینی است که می‌تواند منجر به شکل گیری ژن PDX_1 شود (۳۵، ۳۶) و همین طور محیط کشت حاوی گلوکز فاکتور حیاتی برای تمایز سلول‌های بنیادی بالغ به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین است (۳۷، ۳۸). برای پیش برد بلوغ سلول‌های القاء شده از برخی فاکتورهای بالغ سازی مانند: نیکوتینیک اسید، فاکتور رشد اپیدرمی و اگزندین ۴ در کشت‌های بعدی استفاده شده است.

فاکتور رشد فیبروبلاستی (EGF) می‌تواند تعداد سلول‌های پیش ساز اندوکرینی تمایز نیافته را افزایش دهد. بعد از حذف EGF از محیط، سلول‌ها از حالت تمایز نیافته به سمت سلول‌های بتا تمایز می‌یابند (۳۹). نیکوتینیک اسید خانواده‌ای از نیکوتین آمید پلی سنتتاز مهار کننده‌ای است که می‌تواند شکل گیری سلول‌های جزیره‌ای را از سلول‌های اصلی پانکراس تفکیک و بلوغ سلول‌های بنیادی کبد را به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین تحریک کند (۴۰، ۴۱) و اگزندین ۴ یک آگونیست قوی GLP_1 است که برای تحریک سلول‌های بتا استفاده می‌شود.

برای بررسی بیان فاکتورهای رونویسی دخیل در تمایز پانکراس و نیز هورمون‌های مترشحه از رونویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) استفاده شد. پس از تمایز WJMSCs بند ناف انسان به Islet-like cells، بیان فاکتورهای رونویسی PDX1، NGN_3، PAX6، PAX4 و هورمون انسولین مشاهده شد. ژن NGN3یک فاکتور تعیین کننده سلول‌های اندوکرینی پانکراس است که در تکامل همه سلول‌های اندوکرینی پانکراس نقش دارد (۴۲-۴۳). ژن PDX_1 نقش اصلی در تکامل پانکراس و پتانسیل فراوانی برای تولید انسولین در سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس دارد (۴۴). از دیگر فاکتورهای رونویسی پانکراس می‌توان به PAX4 و PAX6 اشاره کرد. ژن PAX4 یکی از فاکتورهای رونویسی است که نقش مهمی در تمایز و توسعه سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس دارد و در ترشح گلوکاگون، انسولین و سوماتواستاتین دخیل است (۴۵). ژن PAX6 متعلق به خانواده‌ای از ژن‌هایی است که نقش حیاتی در تشکیل بافت‌ها و ارگان‌ها در طول توسعه جنینی دارد. در طول توسعه جنین، پروتئین PAX6 برای فعال کردن ژن‌هایی، دخیل در شکل‌گیری چشم‌ها، مغز و نخاع و لوزالمعده و تنظیم شکل گیری الگوی جنینی و تکثیر سلولی و تمایز در اندام‌زایی جنین نقش دارد (۴۶-۴۸). ژن‌های OCT4 و NANOG به عنوان نشانگر سلول‌های بنیادی تمایز نیافته است و قدرت و توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان می‌دهند (۴۹).

با توجه به تحقیقات گذشته Oh و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Ianus و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده‌ی مغز استخوان انسان در محیط آزمایشگاهی با استفاده از فاکتورهای رشد اپیدرمی، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، نیکوتین آمید، گلوتامین در محیط کشت DMEM-F_{12} انجام دادند توانستند این سلول‌ها را به سلول‌های

مولد انسولین برای درمان دیابت نوع یک تمایز دهند (۵۰، ۵۱) و Sachin و همکاران در سال ۲۰۱۰ سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف انسان را در محیط آزمایشگاهی با استفاده از FBS ، Insulin Transferin selenium (ITS)، نیکوتین آمید، Glucagon-like peptide (GLP_1) در محیط کشت α- MEM به سلول‌های مولد انسولین تمایز داده‌اند (۵۲).

تفاوت این آزمایش با تحقیقات این دانشمندان در منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مواد مورد استفاده شده می‌باشد و مراحل انجام تمایز مطالعه حاضر با مراحل تمایز این محققین نیز متفاوت بوده است.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب ما موفق به جداسازی جمعیت سلول‌های بنیادی چند توان شدیم که منشاء جنینی دارند و ممکن است در توانایی تکثیر و تمایز، نسبت به سلول‌های بالغ برتری داشته باشند. در مطالعه‌ی حاضر این سلول‌ها در سه مرحله به مدت ۲۰ روز به سلول‌های تولید کننده انسولین تمایز یافتند و آزمایشات نشان داد که این سلول‌ها بیان ژن‌های انسولین و PDX_1 و NGN_3 و ترشح انسولین در محیط را دارند.

بنابراین با توجه به این که استراتژی برای گسترش سلول‌های بتا و یا تأمین Islet-like cells مشتق شده از سلول‌های بنیادی در حال حاضر به عنوان گزینه‌های سلول درمانی مورد بحث است، این مطالعه می‌تواند راه‌گشا باشد.

تشکر و قدردانی

تشکر و قدردانی از زحمات بی دریغ و راهنمایی‌های حکیمانه استادان عزیزم سرکار خانم دکتر نگار آذرپیرا و سرکار خانم دکتر لادن صادقی و تشکر از پرسنل محترم بخش تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی و دوستان عزیزم خانم‌ها مریم بابایی و سرکار خانم دکتر عقدایی که در تمامی مراحل آزمایشات از حمایت بی دریغشان بهره مند بودم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research Clinical Practice. 2010;87(1):4–14.
2. Shoback, edited by David G. Gardner, Dolores. Greenspan's basic & clinical endocrinology (9th ed.). New York: McGraw-Hill Medical. 2011; p. 17.
3. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med. 2000; 343(4):230–238.
4. Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C. Islet transplantation: steady progress and current challenges. Curr Opin Organ Transplant. 2006; 11(1):7–13.
5. Nanji SA, Shapiro AM. Advances in pancreatic islet transplantation in humans. Diabetes Obes Metab. 2006; 8(1):15–25.
6. Gunnarsson R, Klintmalm G, Lundgren G, Wilczek H, Ostman J, et al. Deterioration in glucose metabolism in pancreatic transplant recipients given cyclosporin. Lancet. 1983; 2(8349):571–572.
7. Naftanel MA, Harlan DM. Pancreatic islet transplantation. PLoS Med. 2004; 1(3):58–75.
8. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes-a work in progress. N Engl J Med. 2004; 350(7):694–705.
9. 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.
10. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD,Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(25):16105–16110.
11. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH,Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(14):7999–8004.
12. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB,Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. Nat Med. 2000; 6(3):278–282.

13. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG,Petersen BE, et al. In vitro transdifferentiation of adulthepatic stem cells into pancreatic endocrine hormoneproducing cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(12):8078–8083
14. Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. PLoS Med. 2005; 2(4):347–356.
15. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. Lab Invest. 2004; 84(5):607–617.
16. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. J Clin Invest. 2003; 111(6):843–850.
17. Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulitis in type 1 diabetic mice. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 325(3): 665–669.
18. Ende N, Chen R, Reddi AS. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 321(1):168–171.
19. Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. J Vet Sci. 2006; 7(4):343-8.
20. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM,Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004; 22(7):1330–1337.
21. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. J Biomed Sci. 2004; 11(5):652–660.
22. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D , Morales L, et al. Matrix cells from wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003; 21(1):50–60.
23. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood. Stem Cells. 2008; 26(1):146-50.
24. Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behavior and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod Biomed Online. 2007; 15(6):708-18.
25. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M,Merchav S, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson's disease. Stem Cells. 2006; 24(3):781–792.
26. Ben Pansky. Anatomy of the pancreas; Emphasis on blood supply and lymphatic drainage. Inter J Gastrol Can. 1990; 7(1-3):101-108.
27. Stömmer P, Kraus J, Stolte M, Giedl J. Solid and cystic pancreatic tumors.Cancer. 1991; 67(6):1641-1991.
28. ShyrYM. Pancreas transplantation. J Chin Med Assoc. 2009; 72(1): 4-9.
29. Csire M, , Mikala G, Jákó J, Masszi T, Jánosi J, Dolgos J, et al. Persistent long-term Human Herpesvirus 6 (HHV-6) infection in a patient with Langerhans Cell Histiocytosis. Pathol Oncol Rese. 2007; 13(2):157-160.
30. Vardayan M, Parkin E, Grussner C,Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. Organ transplant. 2010; 15(1):124-130.
31. DonoghueK, Fisk N. fetal stem cells, Best Practice & Research. 2004; 18(6):852- 875.
32. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells. 2005; 23(1):2-9.
33. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD33-hematoietic and mesenchymal stem cell from various sources, stem cells. 2000; 18(1):1-9.
34. Romanov Y, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells:candidate MSC-like cells from umbilical cord, Stem Cells. 2003; 21(1):104-110.
35. Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNSdevelopment. Int Rev Cytol. 2001; 209:1–77.
36. 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):301–5.
37. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(8):2458–63.
38. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR,Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. Diabetes. 2004; 53(7):1721–32.
39. Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. Diabetes. 2001; 50(7):1571–9.
40. Yang L, Li S, Hatch H,Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99 (12):8078–83.
41. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes

using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. Nat Med. 2000; 6(3):278–82.
42. 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): 2447–2457.
43. Xu X,D'Hoker J, Stangé G, Bonné S, De Leu N, Xiao X , et al. “β Cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas”. Cell, vol. 2008; 132(2):197–207.
44. Sapir T, Shternhall K, , Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E, et al. “Cell-replacement therapy for diabetes: generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(22): 7964–7969.
45. Tamura T, Izumikawa Y, Kishino T,Soejima H, Jinno Y, Niikawa N. Assignment of the human PAX4 gene to chromosome band 7q32 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet,Cell Genet. 1994;66(2):132-4
46. Simpson TI, Price DJ. Pax6; a pleiotropic player in development. Bioessays.2002;24(11):1041–1051.
47. Sander M, Neubüser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. Genes Dev.1997; 11(13): 1662–1673
48. Heller RS, Stoffers DA, Liu A, Schedl A, Crenshaw EB 3rd,Madsen, OD et al. The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. Developmental biology. 2004; 268(1): 123–134.
49. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells". Nat. Genet. 2000; 24 (4): 372–6.
50. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. Lab Invest. 2004; 84(5):607-17.
51. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. J Clin Invest. 2003; 111(6):843-50
52.Kadam SS, Bhonde RR. Islet neogenesis from the constitutively nestin. expressing human umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. Islets. 2010; 2(2):112-20

Original Article

In-vitro Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells to Insulin-Producing Cells

Nekohi Madoei SM[1*], Azarpira N[2], Sadeghi L[2], Kamali Far S[1]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Fars, Iran.
2- Organ transplant research center, Namazi hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, Iran.

Received: 18 Aug 2014 Accepted: 04 Jan 2015

Abstract

Background & Objective: Diabetes is a major chronic metabolic disease in the world. Islet transplantation is a way to treat diabetes. Unfortunately, this method is restricted due to graft rejection and lack of donor islets. Mesenchymal Stem Cells (MSC_S) have the ability to differentiate into Insulin-Producing Cells (IPCs). In this study, Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells ($HUMSC_S$) were induced to differentiate into pancreatic β-like cells.

Materials & Methods: The samples were collected after cesarean section delivery at Hafez hospital. $HUMSC_S$ were cultured in sterile condition, in three steps for 20 days in DMEM-F_{12}, Retinoic Acid (RA), Epidermal Growth Factor (EGF), exendin-4, Fetal Bovine Serum (FBS), and antibiotic. Then, they were differentiated into IPC. DTZ staining employed for determining the presence of insulin and Reveres Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was done for identifying of gene expression including insulin, PDX1, and NGN3. The Insulin concentration was also evaluated by Immunoradiometric assay.

Results: $HUMSC_S$ gradually changed from fibroblast-shaped cells to epithelial-like cells and eventually to IPC under special conditions. RT-PCR experiments revealed that these cells expressed insulin, PDX1, and NGN3 genes. The cells became red color when stained with DTZ and the insulin secretion was confirmed.

Conclusion: $HUMSC_S$ have the ability to differentiate into islet-like cells in vitro and may be a new potential source for cell transplantation in diabetes treatment.

Keywords: **Wharton Jelly, Mesenchymal Stromal Cells, Cell Differentiation, Insulin**

*** Corresponding author: Seideh Masoomeh Nekohi Madoei**, Department of Biology, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Fars, Iran.
Tel:+987116474331
Email: masoomnekoei@yahoo.com