مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی پانزدهم، شماره‌ی ۴، صفحه‌های ۴۰۱ ـ ۳۹۵ (آبان ۱۳۹۲)

مقاله‌ی پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی به سلول‌های انسولین-ساز با استفاده از عصاره‌ی پانکراس در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه ابراهیمی هفشجانی[۱]، فریبا اسماعیلی[۲]، فریبا هوشمند[۳]

۱) مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۲) گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ۳) گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرضیه ابراهیمی هفشجانی؛ e-mail: ebrahimi.marzeh@yahoo.com

چکیده

مقدمه: دیابت نوع ۱ در نتیجه‌ی تخریب خودایمنی سلول‌های بتای جزایر پانکراس ایجاد می‌گردد. تاکنون پژوهش‌های گسترده‌ای برای تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی انجام گرفته است. سلول‌های کارسینومای جنینی P19 سلول‌هایی پرتوان هستند که می‌توانند به انواع سلول‌هایی از سه لایه جنینی تمایز یابند. در پژوهش حاضر تمایز سلول-های P19 به سلول‌های انسولین‌ساز با استفاده از عصاره‌ی پانکراس موش مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: اجسام شبه‌جنینی به دست آمده از سلول‌های P19 در محیط حاوی ۰/۰۳سرم همراه با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی پانکراس به مدت ۱۴-۷ روز کشت داده شد. رنگ‌آمیزی دیتیزون برای شناسایی سلول‌های انسولین‌ساز استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی انسولین-پروانسولین و گیرنده‌ی بتای انسولین برای ایمنوفلورسنس استفاده شد. محتوای انسولین سلولی و انسولین ترشح شده توسط سلول‌های تمایز یافته در پاسخ به غلظت ۵/۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز با استفاده از کیت الایزا اندازه‌گیری گردید. یافته‌ها: سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پانکراس به رنگ‌آمیزی دیتیزون پاسخ مثبت داده و به صورت اجتماعات سلولی قرمز ارغوانی مشاهده شدند. ایمنوفلورسنس بیان نشانگرهای سلول‌های بتا (انسولین ـ پروانسولین و گیرنده‌ی بتای انسولین) را در این سلول‌ها نشان داد. سلول‌های به دست آمده از تمایز توانایی تولید و ترشح انسولین را داشتند، این سلول‌ها در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز محیط انسولین بیشتری ترشح کردند. نتیجه‌گیری: سلول‌های P19 در حضور عصاره‌ی پانکراس به سلول‌هایی با قابلیت تولید و ترشح انسولین تمایز می‌یابند. این سلول‌ها می‌توانند به تنش‌های گلوکز محیط به صورت افزایش ترشح انسولین پاسخ دهند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی، عصاره‌ی پانکراس، سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین

دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۲۳- دریافت اصلاحیه: ۹۲/۲/۲۸- پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۶

مقدمه

دیابت نوعی بی‌نظمی متابولیک ناشی از نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو مورد است. افزایش قند خون، آسیب‌های جبران‌ناپذیری به سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی و شبکیه‌ی چشم وارد می‌کند.[۱] تنها راه کنترل عوارض دیابت نوع ۱ جبران کمبود انسولین است. امروزه پیوند پانکراس کامل یا پیوند جزایر لانگرهانس به افراد دیابتی از دیگر روش‌های درمان دیابت می‌باشد. محدود بودن منبع بافتی عضو دهنده، مشکلات رد پیوند، لزوم استفاده از داروهای تضعیف کننده‌ی سیستم ایمنی و افزایش روز افزون متقاضی، استفاده از این روش را بسیار محدود نموده است.[۲] پژوهش‌های گسترده‌ای به منظور یافتن راهی که بدن فرد دیابتی خود بتواند انسولین تولید نماید، انجام گرفته است. یکی از راه‌های رسیدن به این هدف سلول‌درمانی است. جایگزینی سلول‌های بتای آسیب دیده با سلول‌های بتای سالم می‌تواند راه حل مناسبی باشد.[۲] منابع متعددی از سلول‌ها با پتانسیل تولید انسولین می‌توانند برای

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

پیوند مورد استفاده قرار گیرند. مهم‌ترین منبع برای این جایگزینی، سلول‌های بتای پانکراس افراد سالم است؛ اما محدودیت منابع این سلول‌ها و مشکلات ایمنولوژی سبب گردیده به منابع دیگری مانند انواع سلول‌های بنیادی توجه شود. سلول‌های بنیادی پانکراسی و غیر پانکراسی می‌توانند مهم‌ترین منبع برای تمایز سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین باشند. تاکنون تلاش‌های گسترده‌ای در زمینه‌ی تمایز سلول-های بنیادی مختلف به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین و سپس پیوند این سلول‌ها به مدل‌های جانوری دیابتی انجام شده است. تراتوکارسینوماها تومورهایی هستند که در اثر پیوند جنین یک تا هفت روزه‌ی موش به اندام‌هایی غیر از رحم به وجود می‌آیند. سلول‌هایی که از این تومور جدا می-شوند به عنوان سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی شناخته می‌شوند.[۳] این سلول‌ها از نظر ویژگی‌های شکل‌شناسی، بیوشیمی و ایمنولوژی بسیار شبیه سلول‌های بنیادی جنینی هستند. سلول‌های P19 از جمله سلول‌های EC هستند که مانند سایر اجداد سلولی تراتوکارسینومایی نامیرا و فناناپذیرند. این سلول‌ها به سرعت در محیط کشت تکثیر می‌یابند. تمایز سلول‌های بنیادی موش و انسان به سلول‌های اندوکرین پانکراس از سال ۲۰۰۰ شروع شد. گروه‌های مختلف پژوهشی با روش‌های گوناگون و با استفاده از فاکتورها و محیط‌های مناسب تکوین پانکراس سعی در تمایز بهتر سلول‌های بنیادی به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین داشتند. Lumelsky در سال ۲۰۰۰ با مشاهده شباهت تکوین سیستم عصبی مرکزی و پانکراس، به منظور تمایز سلول-های اندوکرین از روش تکوین سلول‌های عصبی یاری گرفت.[۳] از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ گروه‌های مختلف با استفاده از بیان مداوم ژن pax4،[۴] مهار کننده‌های مسیر سیگنالی PIK3،[۵] تمایز خودبه‌خودی،[۶] استفاده از محیط‌های غنی‌سازی سلول‌های نستین مثبت[۷] و نستین منفی[۸] از سلول-های بنیادی، سلول‌های نستین مثبت را تولید کردند. با وجود این، هیچیک از سلول‌های به دست آمده تمام نشانگرهای سلول‌های انسولین‌ساز را بیان نمی‌کردند.[۹] عصاره‌ی پانکراس موش صحرایی حاوی فاکتورهای پروتئینی است که تکوین و تمایز سلول‌های بتای پانکراس را القا می‌نماید.[۱۰] دانشمندان با تاثیر عصاره‌ی پانکراس بر سلول‌های بنیادی مختلف نقش آن را در تمایز سلول‌های بتا بررسی کردند. تیمار سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان با عصاره‌ی پانکراس جدا شده از موش در محیط حاوی گلوکز بالا بیان ژن انسولین را در این سلول‌ها طی یک هفته حدود ۴٪ افزایش داد.[۱۱] با توجه به تاثیر فاکتورهای موجود در عصاره‌ی پانکراس در حال تکوین در القای تمایز و تکثیر سلول‌های بتا، در این پژوهش از عصاره‌ی پانکراس به عنوان عامل القا کننده‌ی تمایز سلول‌های بنیادی تراتوکارسینومایی P19 به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره پانکراس: در پژوهش حاضر از موش کوچک آزمایشگاهی نژاد بالبسی BALB/C استفاده شد. پانکراس از نوزاد موش جداسازی و سپس در حضور ممانعت کننده پروتئاز[i]، توسط دستگاه هموژنایزر، هوموژنیزه شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی که محتوی مجموع پروتئین‌هاست جمع‌آوری و غلظت پروتئینی با استفاده از تکنیک بردفورد[ii] تعیین شد.

کشت سلول: در پژوهش حاضر از سلول‌های تراتوکارسینومایی رده P19 استفاده گردید. این سلول‌ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انسیتو پاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. سلول P19 در محیط کشت α-MEM,[iii] حاوی ده٪ FBS[iv]، پنی‌سیلین (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، و استرپتومایسین (۵۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کشت شد.[۱۲]

اولین گام در القای تمایز، تشکیل اجسام شبه جنینی[v] است. به این منظور سلول‌های P19 به مدت ۲۴ ساعت در پتری دیش‌های فاقد خاصیت چسبندگی کشت داده شدند. اجسام شبه جنینی به دست آمده به پتری دیش‌های شش خانه‌ای ژلاتینه‌ی ویژه‌ی کشت سلول انتقال یافتند. این سلول‌ها به مدت هفت تا چهارده روز با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی پانکراس تیمار شدند.

رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون: به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته از رنگ‌آمیزی اختصاصی

i -Phenylmethyl sulfonyl fluoride: PMSF, Sigma, product number: PI329-98-6
ii- Bradford reagent, Sigma, product number: B6916
iii- Gibco, cat: 11900-073
iv- Fetal bovine serum
v- Embryoid bodies: EB

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

دیتیزون استفاده شد. با افزودن ۵۰ میلی‌گرم پودر دیتیزون[i] به ۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید[ii] محلول استوک دیتیزون تهیه گردید. به منظور تهیه‌ی محلول کار ۱۰ میکرولیتر محلول استوک به یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. محلول کار به طور مستقیم به سلول‌ها اضافه، و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس شستشوی سلول‌ها با محلول HBSS[iii] انجام گرفت.

تعیین بهترین غلظت عصاره‌ی پانکراس برای القای فنوتیپ سلول‌های انسولین ساز: برای تعیین غلظتی از عصاره‌ی پانکراس که در آن درصد بیشتری از سلول‌های بنیادی به سلول‌های انسولین ساز تمایز می‌یابند، بعد از رنگ‌آمیزی دیتیزون سلول‌ها تریپسینه و با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. یافته‌های به دست آمده از شمارش سلول‌ها در جدول ۱ ارایه شده است.

ایمنوفلورسانس: در پژوهش حاضر از آنتی‌بادی‌های اولیه‌ی انسولین-پروانسولین[iv] و گیرنده‌ی بتا[v] استفاده شد. آنتی‌بادی IgG کونژوگه با FITC: activated cell sorting Fluorescence FITC, Sigma, cat: F9137 به عنوان آنتی‌بادی ثانویه در نظر گرفته شد. برای انجام ایمنوفلورسانس سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پانکراس به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۴٪ پارافرمآلدئید انکوبه شدند، پس از شستشو با فسفات بافر سالین[vi] سلول‌ها با محلول بلاک کننده حاوی ۰/۰۳ تریتون ۱۰۰X و ۰/۰۱۰ سرم نرمال بزدر PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شدند. سلول‌ها به مدت دو ساعت با آنتی‌بادی‌های اولیه و پس از شستشو با PBS به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در نهایت نمونه‌ها توسط گلیسرول ۷۰٪ روی لام چسبانده و توسط میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شدند.

اندازه‌گیری میزان انسولین ترشح شده و انسولین درون سلولی به روش الایزا: به منظور ردیابی انسولین ترشحی توسط سلول‌های تمایز یافته تحت اثر عصاره‌ی پانکراس، محیط کشت این سلول‌ها با محیط بدون سرم محتوی ۰/۵٪ سرم آلبومین گاوی تعویض و به مدت سه ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری، و تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. برای بررسی توانایی تولید و ترشح انسولین در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز، این سلول‌ها به مدت دو ساعت در معرض غلظت کم گلوکز و یک شبانه روز در معرض غلظت بالای گلوکز قرار گرفتند. در هر دو مورد محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و تا انجام آزمون الایزا در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان انسولین درون سلولی بعد از تریپسینه کردن، سلول‌ها در حضور ترکیب اتانول و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال سونیکیت شدند. میزان انسولین درون سلولی و انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت‌های ۵/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلوکز در نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط کیت الایزا[vii] اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژیک: اجسام شبه جنینی هفت تا چهارده روز با استفاده از عامل القایی عصاره پانکراس تیمار شدند، سپس تحت رنگ آمیزی اختصاصی دیتیزون قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی، سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از اجسام شبه جنینی به رنگ قرمز ارغونی درآمدند (شکل ۱، A). در گروه کنترل منفی یعنی اجسام شبه جنینی تیمار نشده با عصاره نیز تعداد محدودی سلول قرمز به طور پراکنده مشاهده گردید (شکل ۱، B).

تعیین بهترین غلظت عصاره‌ی پانکراس برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتای پانکراس: سلول‌های رنگ آمیزی شده توسط دیتیزون تریپسینه، و سپس با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. برای هر غلظت شمارش کمینه با پنج بار تکرار انجام گرفت. یافته‌های به دست آمده از شمارش سلول‌ها در جدول ۱ ارایه گردیده است. بررسی‌ها نشان داد عصاره‌ی پانکراس در القای فنوتیپ سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین در سلول‌های P19 اثر مثبت دارد؛ زیرا درصد تمایز در تمام گروه‌ها با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌دار نشان داد. با افزایش غلظت عصاره، درصد تمایز به صورت خطی افزایش یافت. درصد سلول‌های تمایز یافته در گروه کنترل منفی ۱/۶±۷/۹ است. این درصد در سلول‌های

i- Merck, cat:K6453055
ii- Dimethyl sulfoxide: DMSO
iii- Hank's balanced salt solution
iv - Mouse monoclonal proinsulin+insulin Receptor beta abcam, cat: ab8304-50
v- Mouse monoclonal abcam, cat: ab8304-100
vi- Phosphate-buffered saline
vii- Alpco, cat: 80-insmsu-E01

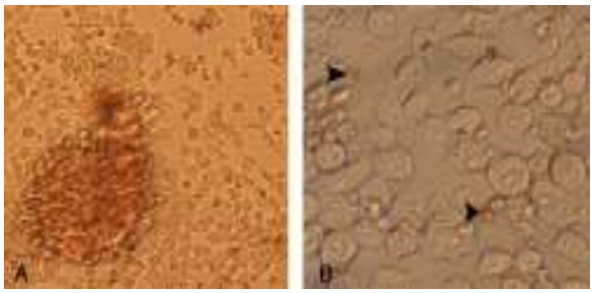
[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پانکراس به ۱/۲± ۳۹/۷ رسید. افزایش غلظت بیشتر از این حد سبب افزایش معنی‌داری در درصد سلول‌های تمایز یافته نشد.

جدول ۱- یافته‌های به دست آمده از شمارش سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره‌ی پانکراس

غلظت عصاره پانکراس (میکروگرم در میلی‌لیتر)	درصد سلول‌های تمایز یافته
۰	۷/۹±۱/۶ b, c, d, e
۵۰	۲۳/۵±۱/۸ e d, a, c,
۱۰۰	۳۱/۴±۰/۸۳ a, b, d, e
۲۰۰	۳۹/۷±۱/۲ a, b, c
۳۰۰	۴۱/۵±۱/۵ a, b, c

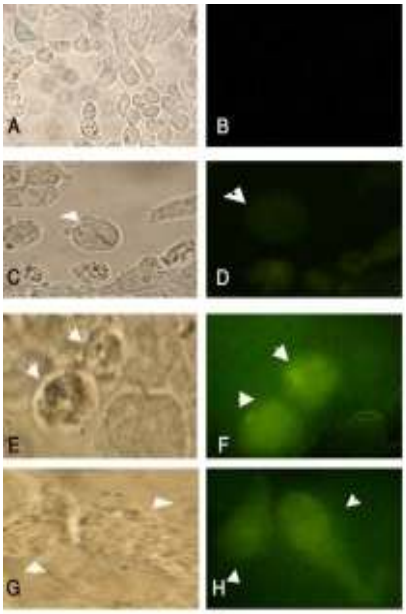
جدول ۱- غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پانکراس به عنوان عامل القا کننده سلول‌های P19 به سلول‌های بتا پانکراس به کار برده شد. غلظت صفر عصاره‌ی پانکراس به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. در این گروه اجسام شبه جنینی به دست آمده از سلول‌های P19 در معرض هیچ‌گونه عامل القا کننده‌ای قرار نگرفتند. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار است. a: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی.b: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پانکراس، c: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پانکراس، d: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پانکراس، e: اختلاف معنی‌دار ا نسبت به گروه تیمار شده با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پانکراس P<۰/۰۵.



شکل ۱- سلول‌های دیتیزون مثبت. تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ اختصاصی دیتیزون A: توده سلولی قرمز رنگ سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از سلول‌های P19 را تحت اثر القایی عصاره پانکراس نشان می‌دهد. این سلول‌ها به دیتیزون پاسخ مثبت داده‌اند (۴۰ X). B: در گروه کنترل منفی یعنی اجسام شبه جنینی که در معرض عصاره پانکراس قرار نگرفته‌اند و دچار تمایز خود به خودی شده‌اند تعداد محدودی سلول دیتیزون مثبت به صورت پراکنده وجود دارد (۱۰۰ X).

ردیابی بیان نشان‌گرهای اختصاصی سلول‌های بتا در سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر عصاره‌ی پانکراس:

سلول‌های P19 بعد از ده روز تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی پانکراس از نظر بیان نشان‌گرهای انسولین ـ پروانسولین و گیرنده‌ی بتای انسولین که ویژه سلول‌های بتا هستند مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش چهار گروه مورد بررسی قرار گرفت. گروه اول شامل سلول‌های تیمار شده با عصاره بود که با هیچ‌یک از آنتی‌بادی‌های اولیه تیمار نشدند (شکل ۲، A) (شکل ۲، B). همان میدان دید با نور فلورسنت را نشان می‌دهد. گروه دوم شامل سلول‌های کنترل منفی است که تحت تاثیر عصاره قرار نگرفته‌اند. در این گروه تعداد کمی از سلول‌ها خاصیت فلورسنتی از خود بروز می‌دهند (شکل ۲، C). همان میدان دید با نور فلورسنت در شکل ۲، D نشان داده شده است. وجود این سلول‌ها نشان‌دهنده‌ی تمایز خود به خودی سلول-های P19 به سلول‌های بتای پانکراس است. گروه سوم گروه تیمار شده با عصاره بود که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه‌ی ضد نشانگر انسولین ـ پروانسولین به کار رفت (شکل ۲، E). همان میدان دید با نور فلورسنت در شکل ۲، F نشان داده شده است. گروه چهارم شامل سلول‌هایی است که با عصاره‌ی تیمار شده و آنتی‌بادی اولیه‌ی ضد نشانگر گیرنده‌ی بتای انسولین در آن‌ها به کار رفت (شکل ۲، G). همان میدان دید با نور فلورسنت در شکل ۲، H نشان داده شده است.



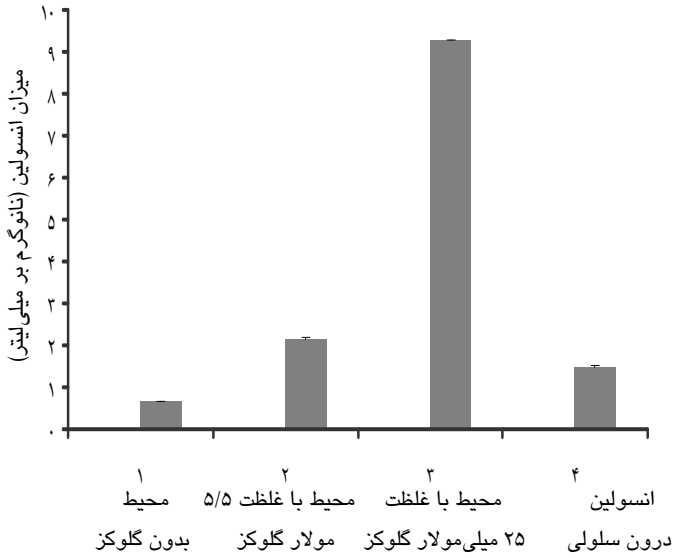
شکل ۲- تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین به دست آمده از تمایز سلول‌های

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

P19 تحت تاثیر عصاره پانکراس نوزاد موش، A: سلول‌های تیمار شده با عصاره بدون آنتی‌بادی اولیه (۱۰۰X). B: همان میدان دید با نور فلورسنت (۱۰۰X). C: سلول‌های تیمار نشده با عصاره که در معرض آنتی‌بادی انسولین ـ پروانسولین قرار گرفته اند (۴۰۰X). D: همان میدان دید با نور فلورسنت (۴۰۰X). E: سلول‌های تیمار شده با عصاره که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه انسولین ـ پروانسولین استفاده شده است (۱۰۰۰X). F: همان میدان دید با نور فلورسنت (۱۰۰۰X). G: سلول‌های تیمار شده با عصاره که در آن‌ها از آنتی‌بادی اولیه‌ی رسپتور بتا انسولین استفاده شده است (۱۰۰۰X). H: همان میدان دید با نور فلورسنت نوک پیکان نشان‌دهنده‌ی سلول‌های تمایز یافته است (۱۰۰۰x).

بررسی قابلیت ترشح انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته در پاسخ به گلوکز به روش الایزا:

در پژوهش حاضر به منظور بررسی توانایی تولید و ترشح انسولین در پاسخ به افزایش گلوکز محیط سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره‌ی پانکراس با غلظت ۵/۵ میلی‌مولار گلوکز و غلظت ۲۵ میلی مولار گلوکز تیمار شدند. میزان انسولین ترشح شده در پاسخ به هر دو غلظت گلوکز و انسولین ترشح شده بدون اثر تحریک کنندگی گلوکز و همین‌طور میزان انسولین ذخیره شده‌ی درون سلولی با استفاده از کیت الایزا اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه بار این اندازه‌گیری انجام گرفت و در پایان آنالیز آماری داده‌ها توانایی این سلول‌ها را در ترشح انسولین تایید نمود. شکل ۳ یافته‌های به دست آمده از اندازه‌گیری میزان انسولین نمونه‌ها را با استفاده از کیت الایزا نشان می‌دهد.



نمودار ۳- یافته‌های به دست آمده از آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که با افزایش میزان گلوکز محیط میزان انسولین ترشح شده و انسولین درون سلولی سلول‌های تمایز یافته افزایش می‌یابد. a: اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط بدون گلوکز. b: اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط ۵/۵ میلی‌مولار گلوکز. c: اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط ۲۵ میلی‌مولار گلوکز. d: اختلاف معنی‌دار نسبت به انسولین درون سلولی P<۰/۰۵.

بحث

در پژوهش حاضر نشان داده شد یک هفته بعد از تیمار اجسام شبه جنینی با عصاره‌ی پانکراس تعدادی از سلول‌ها مورفولوژی سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین را نشان می‌دهند. رنگ‌آمیزی دیتیزون برای تایید فنوتیپ سلول‌های بتا در این سلول‌ها انجام گرفت. دیتیزون ماده‌ای متصل شونده به فلز روی است. مقدار این فلز در گرانول‌های محتوی انسولین در پانکراس بسیار بالا است. در این پژوهش نیز از این ویژگی فلز روی برای شناسایی سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های کارسینومای جنینی P19 استفاده گردید. کلونی‌های قرمز رنگ مشاهده شده در تمام غلظت‌ها نشان‌دهنده‌ی سلول‌های P19 تمایز یافته به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین است. مشاهده‌ی سلول‌های دیتیزون مثبت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره و هم‌چنین در گروه کنترل منفی گواه ویژگی پرتوان بودن سلول‌های P19 و قابلیت تمایز این سلول‌ها به سلول‌هایی از سه لایه جنینی است. حضور سلول‌های قرمز رنگ پراکنده در گروه کنترل منفی نشان‌دهنده‌ی این حقیقت است که اجسام شبه جنینی به دست آمده از سلول‌های P19 توانایی تمایز خود به خود به سلول‌های بتای پانکراس را دارند. افزایش تعداد سلول‌های تمایز یافته در حضور غلظت‌های مختلف عصاره بیانگر این است که فاکتورهای محلول موجود در عصاره‌ی پانکراس نقش مهمی در تمایز سلول‌ها بنیادی به سلول بتا پانکراس دارند. عصاره‌ی پانکراس موش صحرایی حاوی فاکتورهای پروتئینی است که تکوین و تمایز سلول‌های بتای پانکراس را القا می‌کند.[۱۰] از جمله فاکتورهای موجود در این عصاره می‌توان به فاکتورهای رشد فیبروبلاستی[i] هومئوباکس دئودنال پانکراسی-۱[ii] نوروژنین۳[iii]، فاکتور هسته‌ای هپاتوسیت۱[iv]، Ptf1a یا bHLH و فاکتور Hlxb9 اشاره کرد. از این رو، عصاره‌ی تهیه شده از پانکراس محتوی فاکتورهای لازم برای تکوین پانکراس

i- Fibroblast growth factor FGF
ii- Pancreatic duodenal homoeobox-1 Pdx1
iii- Neurogenin 3:Ngn3
iv- Hepatic nuclear factor: Hnf1

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

است و می‌تواند به عنوان عامل القایی در نظر گرفته شود.[۱۰] چویی و همکاران با استفاده از عصاره‌ی پانکراس سلول‌های مزانشیمی را به سلول‌های بتای پانکراس تمایز دادند.[۱۳،۱۴] رنگ‌آمیزی دیتیزون حضور سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین را در میان سلول‌های مزانشیمی تیمار شده تایید نمود. اندازه‌گیری میزان انسولین ترشح شده در این سلول‌ها بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت بیست و پنج میلی‌مولار گلوکز به مدت یک ساعت توانایی این سلول‌ها را در پاسخ دادن به افزایش گلوکز محیط نشان داد.[۱۴] شیروی و همکاران برای تشخیص سلول‌های بنیادی تمایز یافته به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین از رنگ‌آمیزی دیتیزون استفاده کردند. آن‌ها حضور سلول‌های دیتیزون مثبت را در میان سلول‌های بنیادی جنینی گزارش نمودند. سلول‌های انسولین‌ساز تولید شده در پژوهش حاضر از نظر بیان نشانگرهای سلول‌های بتا مانند انسولین ـ پروانسولین و گیرنده‌ی بتای انسولین مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از روش ایمنوفلورسنس بیان این دو نشانگر ویژه‌ی سلول‌های بتا در سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پانکراس ردیابی و سلول-های بیان کننده این دو ژن تشخیص داده شدند. بیان ژن گیرنده‌ی بتا برای عملکرد طبیعی سلول‌های بتا لازم است. این ژن مسئول ترشح انسولین در پاسخ به افزایش گلوکز محیط می‌باشد.[۱۵] بیان این دو نشانگر در سلول‌های تراتوکارسینومایی تیمار شده با عصاره‌ی پانکراس تایید می‌نماید که این سلول ها قادرند به افزایش غلظت گلوکز محیط پاسخ دهند. سان و همکاران با استفاده از تکنیک ایمنوفلورسنس حضور پروانسولین و پپتید c– را در ساختارهای شبه جزیره‌ای سازنده‌ی انسولین به دست آمده از سلول‌های مزانشیم مغز استخوان ردیابی کردند.[۱۶] در پژوهش حاضر به منظور بررسی توانایی سلول‌های بنیادی تراتوکارسینومایی به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین، این سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی پانکراس تیمار شدند. سپس میزان انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت‌های متفاوت گلوکز، و هم‌چنین میزان انسولین درون سلولی با استفاده از کیت الیزا اندازه‌گیری شد. اندازه-گیری انسولین ترشح شده و انسولین درون سلولی اجسام شبه جنینی بدون تیمار با عصاره‌ی پانکراس نشان داد که در میان این سلول‌ها تعدادی سلول با عملکردی مشابه سلول بتا پانکراس وجود دارد. این سلول‌ها توانایی تولید انسولین را داشته و نسبت به تغییرات غلظت گلوکز محیط واکنش نشان دادند. میزان انسولین ترشح شده در محیط محتوی ۲۵ میلی‌مولار گلوکز به طور معنی‌داری بیشتر از انسولین تولید شده در محیط با غلظت ۵/۵ میلی‌مولار گلوکز است. از سوی دیگر، میزان انسولین ترشح شده در محیط فاقد گلوکز به طور معنی‌داری کمتر از محیط‌های دارای گلوکز می‌باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد اجسام شبه جنینی به دست آمده از سلول‌های P19 توانایی تمایز خود به خودی به سلول‌های بتا را دارند. این سلول‌ها قادرند به سلول‌هایی با توانایی پاسخ‌دهی به تنش‌های گلوکز محیط تمایز پیدا کنند. شیروی و همکاران نشان دادند اجسام شبه جنینی به دست آمده از سلول‌های بنیادی جنینی حتی بدون این که با ژن‌های پیش‌برنده‌ی تمایز سلول‌های بتا مانند Nk2.2 ترانسفکت شوند، توانایی تمایز به سلول‌های دیتیزون مثبت را دارند.[۱۷] در پژوهش حاضر نشان داده شد تیمار اجسام شبه جنینی با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی پانکراس سبب افزایش درصد سلول‌های تمایزیافته به سلول انسولین ساز شد. به علاوه، این سلول‌ها مشابه سلول‌های بتای بالغ عمل کرده و در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز محیط، انسولین بیشتری ترشح نمودند. در پژوهشی توسط چویی و همکاران تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌هایی با عملکرد سلول-های بتا با استفاده از عصاره‌ی پانکراس بررسی گردید. آن‌ها نشان دادند تعداد دسته‌جات شبه جزیره‌ای در میان سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با عصاره‌ی پانکراس به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است.[۱۳] این دسته‌جات تمام هورمون‌های بخش اندوکرین پانکراس را تولید کردند. استفاده از تکنیک‌های مولکولی مانند RT-PCR و ایمنوسیتوشیمی بیان نشانگرهای سلول‌های بتا را در این سلول‌ها تایید نمود. بر اساس یافته‌های پژوهش چویی افزایش انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز تایید کننده‌ی تاثیر غلظت گلوکز در میزان بیان ژن انسولین است.[۱۴] در پژوهش حاضر افزایش چشمگیر انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز تایید کننده‌ی یافته‌های ارایه شده توسط یانگ مبنی بر تاثیر غلظت گلوکز در میزان بیان ژن انسولین می‌باشد. بر اساس مطالعات یانگ و همکاران گلوکز از راه افزایش فسفریلاسیون ژن Pdx1 و اتصال این فاکتور به پروموتور ژن انسولین سبب افزایش بیان این ژن گردید.[۱۸]

یافته‌های پژوهش حاضر که با هدف تعیین اثر عصاره‌ی پانکراس نوزاد موش کوچک آزمایشگاهی بر تمایز سلول‌های

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

کارسینومای جنینی رده P19 انجام گرفت، نشان داد سلول-های P19 در روشی کوتاه مدت قابلیت تمایز به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین را دارند. مزیت این روش ساده و کم هزینه بودن آن است؛ به طوری که سلول‌های P19 بدون افزودن فاکتورهای رشد گران قیمت و یا استفاده از روش-های پیچیده و طولانی انتخاب سلول‌های نستین مثبت به خوبی به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافتند.

سپاسگزاری: این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد تحت عنوان تولید سلول‌های ترشح کننده‌ی انسولین از سلول‌های بنیادی با استفاده از عصاره‌ی پانکراس در پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه شهرکرد می‌باشد. به این وسیله از تمام افرادی که زمینه‌ی انجام این پژوهش را فراهم نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Ramsay RC, Goetz FC, Sutherland DE, Mauer SM, Robison LL, Cantrill HL, et al. Progression of diabetic retinopathy after pancreas transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1988; 318: 208-14.
2. 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: 1389-94.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Scies 1981; 78: 7634-8.
4. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 998-1003.
5. Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. PLoS Med 2005; 2: e103.
6. Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A, Kania G, St-Onge L, Rupnik M, et al. Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. Int J Dev Biol 2004; 48: 1095-104.
7. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing clusters. Stem Cells 2004; 22: 265-74.
8. Kania G, Blyszczuk P, Wobus AM. The generation of insulin-producing cells from embryonic stem cells--a discussion of controversial findings. Int J Dev Biol 2004; 48: 1061-4.
9. Jiang J, Eshpeter M, Korbutt G, Fisk G, Majumdar AS. Generation of Insulin Producing Isletâ Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2007; 25: 1940-53.
10. Kim YS, Lee JJ, Shin JS, Kim HJ, Kim CW. Enhancement of mouse pancreatic regeneration and HIT-T15 cell proliferation with rat pancreatic extract. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309: 528-32.
11. 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: 607-17.
12. MacPherson PA, McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. Methods 1995; 7: 238-52.
13. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing - cells in mouse pancreas. Nature 1997; 387: 406-9.
14. Choi K S, Shin J S, Lee J, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. Biochem Biophys Res Commun 2005; 330: 1299-305.
15. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. Development 1996; 122: 1409-16.
16. Xu YX, Chen L, Hou WK, Lin P, Sun L, Sun Y, et al. Mesenchymal stem cells treated with rat pancreatic extract secrete cytokines that improve the glycometabolism of diabetic rats. In Transplant Proc 2009; 41: 1878-84.
17. Shiroi A, Ueda S, Ouji Y, Saito K, Moriya K, Sugie Y, et al. Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2. 2 gene transfer. World J Gastroenterol 2005; 11: 4161-6.
18. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius J G, Petersen BE, et al. 'In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 8078-83.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

Original Article

Differentiation of Embryonal Carcinoma Stem Cells into Insulin-Producing Cells by Using Pancreas Extract in Vitro

Ebrahimi Hafshejani M[1], Esmaeili F[2], Houshmand F[3]

[1]Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, [2]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, & [3]Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran

e-mail: ebrahimi.marzeh@yahoo.com

Received: 13/03/2013 **Accepted**: 27/05/2013

Abstract

Introduction: Type I diabetes mellitus results from the autoimmune destruction of the β cells in pancreatic islets. Currently, extensive research is being conducted on the generation of insulin-producing cells (IPCs) from stem cells. P19 embryonal carcinoma cells are multipotent and can differentiate into cell types of all three germ layers. In this study, the differentiation of P19 cells into IPCs by using mouse pancreas extract (MPE) was investigated. Materials and Methods: Embryoid bodies (EBs) obtained from P19 cells were cultured in medium containing 3% fetal bovine serum, supplemented by concentration of 50, 100, 200,300 µg/mL MPE for 7-14 days. Dithizone (DTZ) staining was used to detect IPCs derived from EBs in vitro. Mouse monoclonal insulin-proinsulin and monoclonal insulin receptor beta antibodies were used for immunoflourescence. Insulin content from the cells and insulin secreted by differentiated cells in response to concentrations of 5.5 and 25 mM glucose were measured using ELISA kits. Results: DTZ-positive cells showed purple-red clusters. immunoflourescence indicated expression of Beta cell markers (insulin-proinsulin and insulin receptor beta) in these cells. Increasing glucose concentration, caused more insulin to be secreted by differentiated cells. Conclusions: P19 cells can in the presence of pancreas extract differentiate to cell producing and secreting insulin cells. Differentiated cells can increase insulin secretion in response to increasing glucose medium.

Keywords: Embryonal carcinoma cells, Pancreatic extract, Insulin-producing cells

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]