

قابلیت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بند ناف و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین در محیط خارج بدن

ریحانه خوش‌چهره^{۱،۲}، دکترمرضیه ابراهیمی^{۱،۲}، دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد^۱، دکتر ناصر اقدمی^۲،
دکترحسین بهاروند^{۱،۲}

(۱) پژوهشکده‌ی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، (۲) گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، (۳) گروه زیست‌پزشکی ترمیمی و سلول درمانی، پژوهشکده‌ی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، دکتر مرضیه ابراهیمی؛
e-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در مناطق مختلفی از بدن مانند مغز استخوان و بندناف وجود دارند، سلول‌هایی چندتوان هستند که قابلیت تغییر و تمایز به انواع مختلفی از سلول‌ها، از جمله سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین، هرچند با بازدهی کم، را دارا می‌باشند. هدف این پژوهش، مقایسه‌ی توانمندی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از دیواره‌ی سیاهرگ بند ناف و مغز استخوان در تمایز به دسته‌های شبه جزیره‌ای پانکراس می‌باشد. مواد و روش‌ها: **BM-MSCs** و **UC-MSCs** از دهندگان سالم تهیه و کشت داده شدند. سلول‌های پاساژ سوم که از بیان بالای **CD90**، **CD73**، **CD105**، **CD44** و بیان بسیار پایین **CD34**، **CD11b** و **CD45** برخوردار بودند، در حضور ترکیبات القاکننده به سلول‌های شبه جزیره‌ای تمایز داده شدند. سلول‌های انسولین و پپتید-**C** مثبت توسط روش ایمونوسیتوشیمی و ترشح انسولین در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز توسط روش الیزا ارزیابی گردیدند. **Quantitative RealTime PCR** به منظور ارزیابی کمی بیان انسولین، **Glut2**، **Nkx6.1** و **Nkx2.2** در سطح **mRNA** مورد استفاده قرار گرفت. یافته‌ها: یافته‌های این پژوهش نشان داد تنها **BM-MSCs** قادرند به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین تمایز یابند. سلول‌های بیان‌کننده‌ی انسولین و پپتید-**C** به ترتیب $15/8 \pm 2/6\%$ و $13/5 \pm 5/5\%$ از کل سلول‌های تمایز یافته را تشکیل دادند. بیان ژن‌های انسولین و **Glut2** نیز در پایان تمایز افزایش ۲۰ برابری را نسبت به روز صفر تمایز در سلول‌های تمایز یافته نشان داد. هرچند این سلول‌ها در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز، انسولین را به درستی ترشح نکردند. نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تنها سلول‌های **BM-MSC** در مقایسه با سلول **UC-MSC**، قادرند به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین تمایز یابند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف، سلول‌های انسولین ساز

دریافت مقاله: ۹۰/۲/۲۰ - دریافت اصلاحیه: ۹۰/۴/۲۱ - پذیرش مقاله: ۹۰/۴/۲۳

مقدمه

سلول درمانی و جایگزینی سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین با سلول‌های بتا دارای عملکرد از اهداف بزرگ درمان دیابت نوع ۱ و در بسیاری موارد دیابت نوع ۲ می‌باشد.^۱ اگرچه پیوند جزایر پانکراسی با استفاده از روش ادمونتون^۲ در مقایسه با پیوند کل پانکراس، به لحاظ تکنیکی راحت‌تر بوده و سبب حالت ناخوشی کمتری می‌شود^۳ با این وجود، پیوند جزایر راه حل مناسبی برای درمان دایمی مبتلایان به دیابت با مزایای طولانی مدت در تمام بیماران دیابتی نیست، علاوه بر این، دهندگان پانکراس نیز بسیار محدود می‌باشند.^۴ از سوی دیگر استفاده از جزایر زئوژنیک مانند جزایر لانگرهانس خوک با رد شدن آنها توسط سیستم ایمنی همراه است^۵ و خطر انتقال عفونت از حیوانات به انسان نیز دور از انتظار نمی‌باشد.^۶

با توجه به مشکلات روش‌های درمانی رایج مانند تزریق انسولین یا پیوند جزایر لانگرهانس (شامل تعداد کم افراد دهنده و احتمال رد پیوند)، تلاش‌های گسترده‌ای روی تولید سلول‌های مولد انسولین و درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته است. در این راستا، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی یا بزرگسال به سلول‌های بتای پانکراسی مولد انسولین یکی از روش‌های نوین درمان دیابت، به ویژه دیابت نوع ۱ است.^۷

پژوهش‌های زیادی بر تولید سلول‌های مولد انسولین (IPCs)^۱ از سلول‌های بنیادی جنینی صورت گرفته که از جمله‌ی آنها می‌توان به پژوهش‌های مربوط به لوملسکی و همکاران در سال ۲۰۰۱^۸، د آمئور و همکاران در سال ۲۰۰۶^۹ و بهاروند و همکاران در سال ۲۰۰۶^{۱۰} اشاره کرد، که یافته‌های تمام آن‌ها تولید سلول‌های ترشح‌کننده‌ی انسولین از سلول‌های بنیادی جنینی بوده، هرچند که میزان ترشح انسولین این سلول‌ها در پاسخ به تغییرات گلوکز خون چندان رضایت بخش نبوده است. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی دارای مشکلاتی از جمله محدودیت‌های اخلاقی در بکارگیری آنها و شکل‌گیری تراوما بعد از پیوند سلول‌های تمایز یافته به حیوان دیابتی است.^۸ در نتیجه سلول‌های بنیادی بزرگسال که از نظر قابلیت تمایزی سلول‌هایی چند

توان هستند، می‌توانند گزینه‌ی دیگری برای استفاده در درمان دیابت به روش سلول درمانی باشند.

پژوهش‌های متعددی در رابطه با تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان^{۱۱} به سلول‌های مولد انسولین صورت گرفته که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به پژوهش‌های موريسکات و همکاران در سال ۲۰۰۵^{۱۱}، اوه و همکاران در سال ۲۰۰۴^{۱۲}، کارنیل و همکاران در سال ۲۰۰۷^{۱۳} و سان یو و همکاران در سال ۲۰۰۷^{۱۴} اشاره نمود، که در تمام این موارد پژوهش‌گران موفق به تولید سلول‌های مولد انسولین از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان شده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دسته سلول‌های بنیادی بالغ بوده و توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی و قابلیت سرکوب سیستم ایمنی را دارا می‌باشند.^{۱۵} این سلول‌ها را می‌توان از مغز استخوان، بافت چربی، سینوویوم، خون بند ناف، کبد جنینی، مایع آمنیوتیک، بندناف و یا سلول‌های دور عروقی مشتق از ژل وارتنون جدا نمود.^{۱۶-۱۹}

پس از اولین پیوند موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بندناف^{۱۱} در سال ۱۹۸۸، خون بندناف به یک منبع مهم برای سلول‌های بنیادی انسانی برای درمان نارسایی‌های خونی و ژنتیکی تبدیل شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نابالغ‌تر بوده و نسبت به سلول‌های جنینی بالغ‌تر است. این سلول‌ها دارای Nanog, Oct4 و SEAA4 که از شاخص‌های ویژه‌ی سلول‌های بنیادی جنینی هستند، می‌باشند.^{۲۰،۲۱} به این ترتیب به نظر می‌رسد که خون بند ناف و دیواره‌ی سیاهرگ بندناف به علت در دسترس بودن، روش‌های استخراج بدون درد، ریسک پایین‌تر آلودگی ویروسی و کاهش احتمال رد پیوند، جایگزین مناسبی برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در مقایسه با مغز استخوان باشد.^{۲۲}

در رابطه با تمایز سلول‌های مشتق از بندناف نیز مطالعات جالب توجهی صورت گرفته است. کئوچینگ چائو و همکاران در سال ۲۰۰۸، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را که از ژل وارتنون بند ناف گرفته بودند، به دسته‌های سلولی شبه جزیره‌ای بالغ تمایز دادند. این سلول‌ها قابلیت ترشح انسولین در محیط‌های خارج و داخل بدن را داشتند.^{۲۳} علاوه بر این بوسان و همکاران در سال ۲۰۰۷، و Feng Gao و همکاران

ii - Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs)

iii - Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs)

i - Insulin producing cells

و پاساژ سوم برای بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین مورد استفاده قرار گرفت.

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده برای ارزیابی سلول‌های مزانشیم مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) و سیاهرگ بندناف (UC-MSCs)ⁱⁱ در جدول ۱ نشان داده شده است. به منظور تهیه‌ی نمونه برای فلوسیتومتری، سلول‌ها در پاساژ سوم توسط تریپسین ۰/۵٪ جدا و حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شدند، سپس با آنتی‌بادی‌های مورد نظر به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. از دستگاه فلوسیتومتری Bectin Dekenson از شرکت FACS Calibour برای بررسی بیان و از نرم‌افزار WinMDI نسخه‌ی ۲/۹ به منظور آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

جدول ۱- فهرست آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این پژوهش

نام آنتی‌بادی	رنگ	شرکت	کد
	کونژوگه	سازنده	ماده
Anti Human-CD105	PE	R&D	FAB10971-P
Anti Human-CD90	FITC	Dako	R7275
Anti Human-CD73	PE	BD	550257
Anti Human-CD44	PE	BD	550989
AntiHuman-CD34/45	PE/FITC	BD	341071
Anti Human-CD11b	PE	Abcam	Ab8879
Anti Rat-CD90	FITC	BD	554894
Anti Rat-CD44	FITC	BD	550974
Anti Rat-CD45	PE	BD	554878
Anti Rat-CD11b	PE	BD	554862
Anti-human Insulin	-	SIGMA	I2018
Anti-human C-Peptide	-	Chemicon	CBL94

برای بررسی پتانسیل تمایزی، سلول‌های BM-MSCs و UC-MSCs در آزمایشگاه به سلول‌های استخوانی تمایز داده شدند. به این ترتیب که سلول‌های به دست آمده از پاساژ ۳ در پلیت ۳ سانتی‌متری کشت داده شدند و پس از رسیدن به انباشتگی ۷۰-۸۰٪، محیط القاکننده‌ی تمایز استخوان که

در سال ۲۰۰۸ توانستند از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بندناف، سلول‌های ترشح‌کننده‌ی انسولین تولید کنند.^{۲۰،۲۴} در سال ۲۰۱۰ نیز وانگ و همکاران موفق به تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومای بندناف شدند که پس از تزریق به موش دیابتی توانستند سطح گلوکز خون را کاهش دهند.^{۲۵} علاوه بر این، Phuc و همکاران در سال ۲۰۱۱ توانستند با استفاده از روش Gao و همکاران، MSC به دست آمده از بانک خون بندناف را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز دهند.^{۲۶} با این وجود، تاکنون پژوهشی پیرامون بررسی توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از دیواره‌ی سیاهرگ بند ناف (به عنوان یکی از منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، به سلول‌های انسولین‌ساز گزارش نشده است. با توجه به مشکلات موجود در رابطه با تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان که از آن جمله کمبود بازدهی تمایز و عملکرد نامطلوب سلول‌های به دست آمده از تمایز می‌باشد، پژوهش حاضر توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از دیواره سیاهرگ بندناف به سلول‌های انسولین‌ساز را بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

بندناف پس از زایمان از مادران بارداری سالم فاقد دیابت بارداری و فشار خون که HCV، HBS، HIV بودند، جدا شد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس روش رومانو و همکاران^{۲۵} جدا گردید. پس از پاساژ اول، سلول‌ها به محیط α -MEMⁱ دارای سرم جنین گاو (۲۰٪) منتقل شده و محیط آنها هر ۷-۴ روز تعویض گردید. سلول‌ها در پاساژ سوم برای بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین مورد استفاده قرار گرفتند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان از بانک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مرکز سلول درمانی پژوهشگاه رویان تهیه شد و در محیط α -MEM دارای سرم جنین گاو (۱۵٪)، L - گلوتامین (۲٪)، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استروپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین کشت شدند. هر ۳ روز محیط عوض شد

ii- Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs)

i- Minimum essential medium (MEM)

دارای ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۰/۱ میلی‌واحد در میلی‌لیتر دگزامتازون و ۱۰ میلی‌واحد در میلی‌لیتر بتا گلیسرول فسفات بود، به آنها اضافه شد و به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. هر ۳-۴ روز محیط تعویض گردید. پس از تثبیت سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪، رنگ آمیزی با محلول آلیزارین رد صورت گرفت.

برای تمایز به چربی مانند استخوان، سلول‌ها در پلیت ۳ سانتی‌متری کشت داده شدند و زمانی‌که تراکم سلول‌ها به ۸۰-۷۰٪ رسید، محیط القاکننده‌ی چربی که دارای ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۰/۱ میلی‌واحد در میلی‌لیتر دگزامتازون و ۱۰۰

میلی‌واحد در میلی‌لیتر ایندومتاسین بود، به آنها اضافه گردید. محیط کشت سلول‌ها هر ۳-۴ روز یکبار عوض شد. در روز ۲۱ کشت سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با فرمالدئید ۴٪ تثبیت شدند و پس از شستشو با الکل ۷۰٪، از رنگ اوایل رد که از ۳ حجم محلول استوک (۰/۵٪) اوایل رد در ایزوپروپیل الکل ۹۹٪) و ۲ حجم آب مقطر تشکیل یافته بود، برای رنگ آمیزی استفاده گردید.

قابلیت تمایز سلول‌های BM-MSCs و UC-MSCs به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین توسط سه روش مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- مراحل مختلف و مواد به کار رفته در سه روش تمایزی مورد استفاده در پژوهش

نام برنامه	مرحله‌ی ۱	مدت زمان (روز)	مرحله‌ی ۲	مدت زمان (روز)	مرحله‌ی ۳	مدت زمان (روز)
Gao et al ۳۳(2008)	H-DMEM(10%),RA (1uM/ml)	۱	ECM,L-DMEM(10%), NAD(10mM),EGF (20ng/ml)	۶	L-DMEM(10%), Exendin-4(10nmol/L)	۶
Chao et al ۳۳ (2008)	H-DMEM(10%) Neural conditioned medium	۲ ۷	DMEM/F12(10%) NAD(10mM),B27 (2%),Insulin(10ng/ml)	۶	DMEM/F12(10%), NAD,B27,Insulin, SCM(1:1)	۱۴
Shi et al ۳۴(2005)	H-DMEM(10%), ActivinA(100ng/ml) H-DMEM(10%), RA(1uM/ml)	۱ ۱	H-DMEM(10%), bFGF(10ng/ml)	۳-۵	DMEM/F12,N2(1%), B27(2%),NAD(10mM),bFGF(10ng/ml)	۳-۵

بیان انسولین و پپتید - C در سلول‌های تمایز یافته و نیز بافت پانکراس انسانی توسط رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام ایمنوهیستوشیمی، ابتدا پارافین توسط محلول گزلیول حذف گردید و آگیری از برش‌های بافتی توسط غلظت‌های متفاوت از اتانول (۱۰۰٪، ۹۶٪ و ۷۰٪) صورت گرفت، سپس برش‌ها توسط آب مقطر شستشو شدند. احیا آنتی‌ژنی با استفاده از محلول تریس ۲۰ میلی‌مولار دارای تریسین ۱٪ و کلرید کلسیم (۰/۱٪)، و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. برش‌های بافتی با استفاده از محلول ۰/۲٪ تریتون X-۱۰۰ به مدت ۱ ساعت

در دمای اتاق نفوذپذیر شدند و پس از دو بار شستشو با محلول ۰/۵٪ PBS/Tween با افزودن بافر ۱۰٪ بلوک کننده‌ی سرم بز به مدت ۴۰ دقیقه بلوک شدند تا از اتصالات غیر اختصاصی آنتی‌بادی جلوگیری شود. به منظور افزایش آنتی‌بادی‌های اولیه، لام‌ها ۲ بار با محلول ۰/۵٪ PBS/Tween شستشو شدند، سپس آنتی‌بادی اولیه علیه آنتی ژن انسولین انسانی به نسبت ۵۰۰:۱ و پپتید - C انسانی به نسبت ۲۵۰:۱ در PBS به آنها اضافه گردید، و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس لام‌ها شستشو و به آنها آنتی‌بادی ثانویه Goat anti FITC rabbit در رقت ۱۰۰:۱ اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۱

ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. هسته‌ی سلول‌ها توسط DAPI رنگ شد و یافته‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل DP72 بررسی گردید. برای اجرای ایمنوسیتوشیمی ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تثبیت شدند و پس از ۲ بار شستشو توسط PBS/Tween (۰/۵٪)، با استفاده از محلول ۰/۲٪ تریتون X-۱۰۰ نفوذپذیر شدند. بقیه‌ی مراحل، مشابه‌ی مراحل

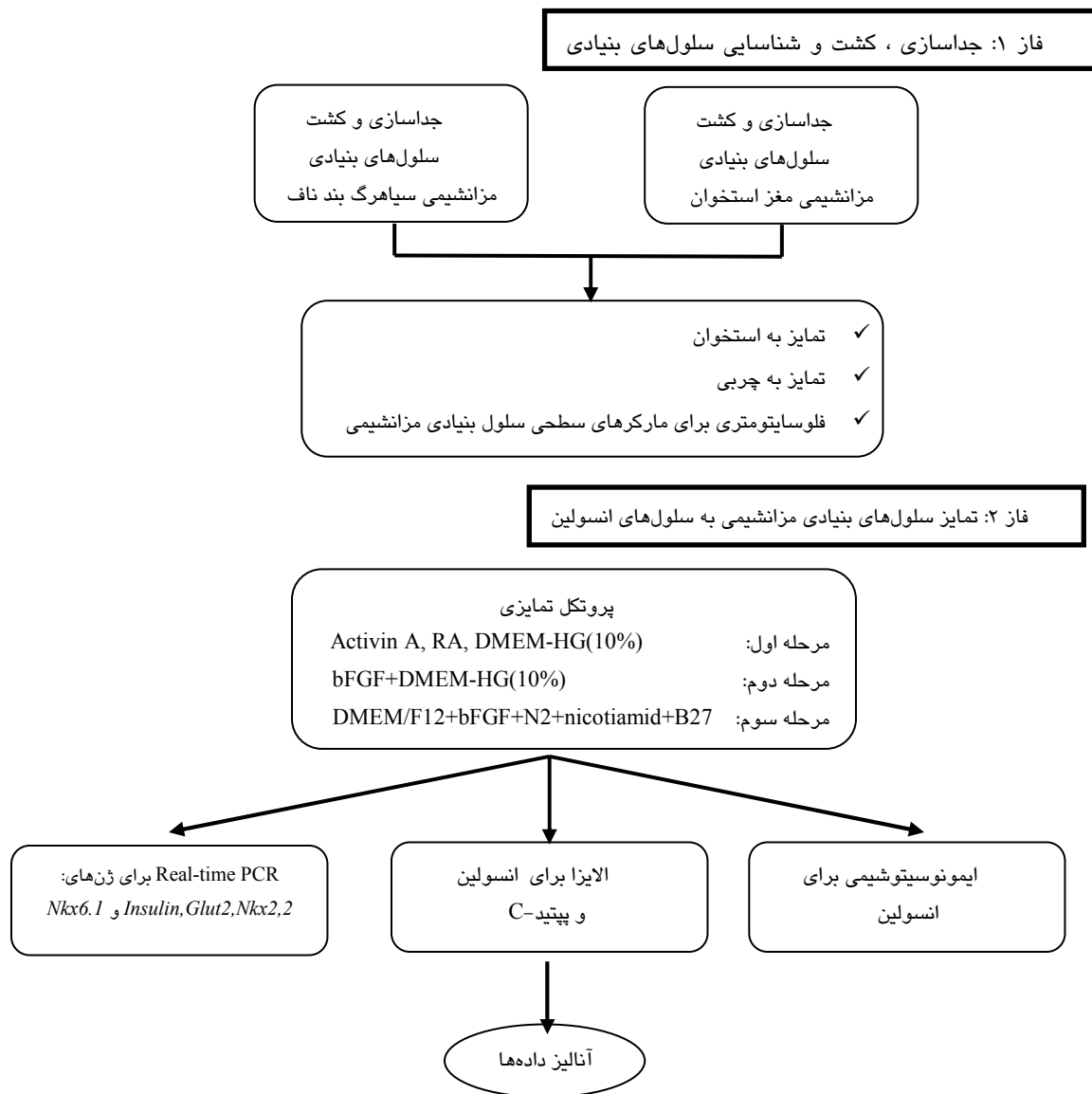
ایمنوهایستوشیمی انجام شد. به منظور کمی کردن یافته‌ها، تعداد ۱۰ زمینه از تمام قسمت‌های ظرف کشت دارای سلول‌ها انتخاب شد و درصد سلول‌های رنگ پذیرفته (positive) نسبت به کل سلول‌های زمینه محاسبه گردید. به منظور بررسی بیان ژن‌های ویژه‌ی مسیر تکوین سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین (جدول ۳)، از روش Real Time PCR استفاده گردید.

جدول ۳- ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

ژن	توالی پرایمر	دمای Annealing
GAPDH	F: 5' CTC ATT TCC TGG TAT GAC AAC GA3' R: 5' CTT CCT CTT GTGTTGCT3'	60
Insulin	F: 5' AAGAGGCCATCAAGCAGATCA 3' R: 5' CAGGAGGCGCATCCACA 3'	60
Glut2	F: 5' GTTTGAGGATTCTTGAGTGTG 3' R: 5' GGAAATGTCAAAGGAGACGAT	60
Nkx2.2	F: 5' CGATATTGTCAGCCGCTCTTCTAA 3' R: 5' TGCCACCAGTTGTCAGAA 3	60
Nkx6.1	F: 5' GACAAAGACGGGAAGAGAA 3' R: 5' GGAACCAGACCTTGACCT 3	60

ابتدا RNA توسط ستون استخراج RNA، ساخت شرکت TaKaRa براساس دستورالعمل کیت استخراج گردید، سپس cDNA با استفاده از RNA استخراج شده و Random Hexamer و توسط کیت TaKaRa سنتز شد. Real Time PCR روی cDNA تولید شده و به منظور بررسی کمی افزایش تعداد نسخه‌های ژن مورد نظر به صورت زیر انجام گرفت. ۱ میکرولیتر از هر پرایمر جدول ۳، ۶ میکرولیتر از SYBR Green Master Mix (ساخت شرکت TaKaRa) و ۱۰ میکرولیتر آب اضافه شد. از نمونه‌ی الگو نیز ۲ میکرولیتر به مجموعه‌ی یاد شده اضافه گردید. واکنش Real Time PCR به کمک دستگاه Corbett Research و برای هر نمونه به صورت دپلیک انجام شد. در نهایت آنالیز داده‌ها با استفاده از روش $\Delta\Delta C_t$ صورت گرفت. از GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی تمایز با PBS فاقد یون‌های کلسیم و منیزیم شستشو داده

شدند و به مدت ۶۰ دقیقه با محلول ۵ میلی‌مول گلوکز در Krebs Ringer در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند، در پایان محیط رویی سلول‌ها برداشته و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سلول‌ها با محلول ۲۷/۵ میلی‌مول گلوکز در Krebs Ringer به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند، محیط رویی سلول برداشته شد و تا زمان بررسی میزان انسولین و پپتید - C، در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. میزان ترشح انسولین و پپتید - C در هر مرحله به روش الیزا (شرکت Mercodia) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. یافته‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه، در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ مورد بررسی قرار گرفت. تمام داده‌ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند.



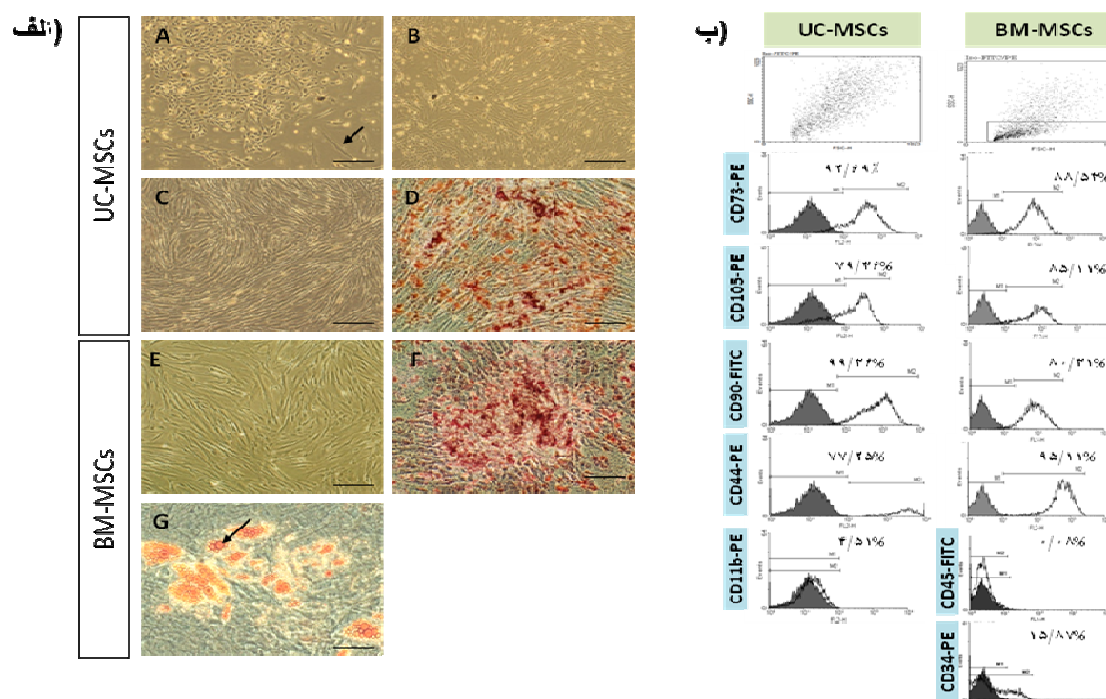
تصویر شماتیکی از مراحل انجام کار

یافته‌ها

از سلول‌های شبه مزانشیمی شد (شکل ۱: الف-C) که بسیار مشابه با سلول‌های سلول‌های BM-SCs بودند (شکل ۱: الف-E) هر دو سلول قابلیت تمایز به سلول‌های استخوانی را داشتند (شکل ۱: الف-D و F)، در حالی‌که تنها مزانشیم مغز استخوان توان تمایز به سلول‌های چربی را داشت (شکل ۱: الف-G).

بررسی شاخص‌های ویژه سلول‌های مزانشیمی در هر دو گروه نشان داد هیچ اختلاف معنی‌داری بین دو گروه BM-SCs و UC-SCs در مورد بیان *CD73*, *CD105*, *CD44* و *CD90* وجود ندارد و هر دو گروه *CD34*, *CD11b* و *CD45* را در مقادیر پایین بیان کرده و یا اصلاً بیان نمی‌کردند (شکل ۱: ب).

در سلول‌های جدا شده از بندناف، برخی از سلول‌ها طی ۴۸ الی ۷۲ ساعت به کف ظرف چسبیدند که سلول‌های اندوتلیال دیواره‌ی سیاهرگ بندناف بخش زیادی از سلول‌های چسبیده را تشکیل دادند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظاهری دوکی پس از یک هفته قابل مشاهده بودند (شکل ۱: الف-A). با استفاده از محیط DMEM-LG با غلظت پایین گلوکز و سرم ۱۵٪ سلول‌های اندوتلیال به تدریج طی پاساژهای اول و دوم، حذف شدند (شکل ۱: الف-B). تعویض محیط سلول‌ها با محیط α -MEM که ۲۰٪ آن را سرم جنین گاو تشکیل می‌داد، سبب تشکیل کلنی‌های مواجی



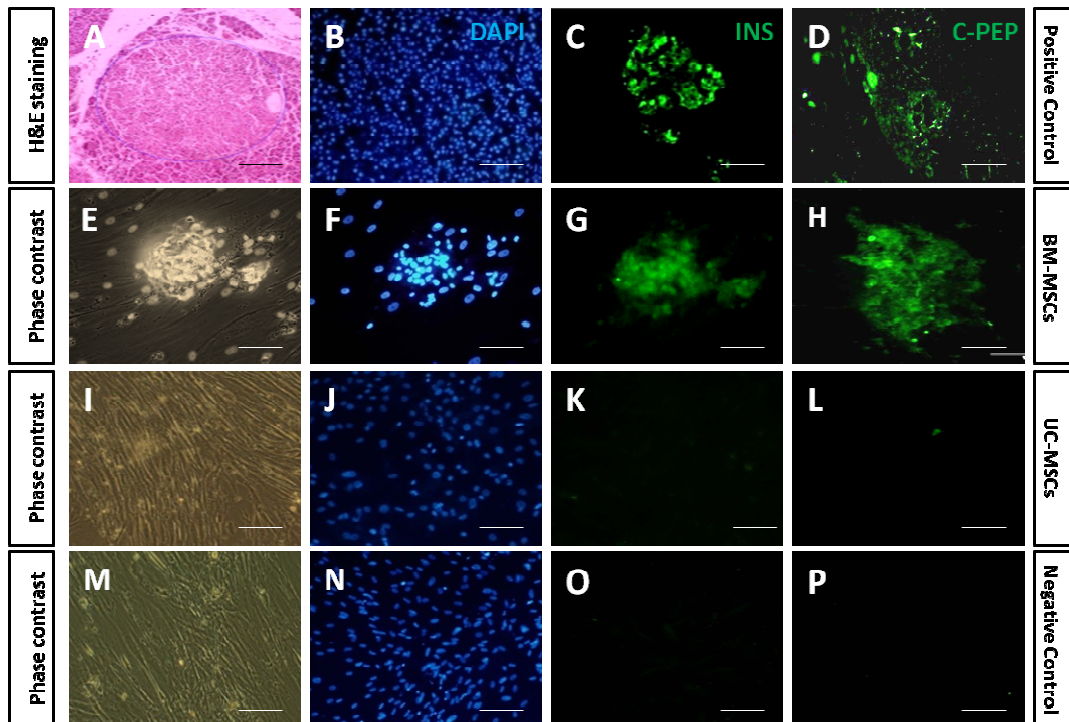
شکل ۱: الف: A سلول‌های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف (UC-MSC) (پیکان سیاه)، در هفته اول کشت، B: همین سلول‌ها در پاساژ اول، C: کلنی‌های موج UC-MSC در پاساژ دوم، D: تمایز UC-MSC به استخوان. رسوب کلسیمی توسط آلیزارین رد به رنگ قرمز مشخص شده است. E: کلنی‌های موج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSC) در پاساژ سوم، F: رنگ‌آمیزی آلیزارین رد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و G: رنگ‌آمیزی چربی در سلول‌های تمایز یافته BM-MSC (واکول‌های چربی با پیکان سیاه مشخص شده‌اند). شکل ۱: ب: درصد بیان شاخص‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو گروه UC-MSC و BM-MSC (بزرگنمایی عکس‌ها ۱۰X می‌باشد).

به فلوروکروم FITC نشان داد که هر دو این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته و در شبه جزایر بیان می‌شوند (شکل ۲-G و H). شمارش سلول‌های تمایز یافته و کمی نمودن یافته‌ها (در ماده و روش آمده است) نشان داد که $15/8 \pm 2/6$ و $12/5 \pm 5/5$ ٪ از سلول‌ها انسولین و پپتید c را بیان می‌کنند. سلول‌های UC-MSCs با روش‌های به کار رفته قدرت تمایز نشان ندادند که در اشکال ۲-K و L نشان داده است. از نمونه‌ی بافت پانکراس انسانی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (اشکال ۲-A الی D) و از سلول‌های BM-MSCs قبل از تمایز، به عنوان کنترل منفی استفاده شد (شکل‌های ۲-M الی P).

قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های تولید کننده انسولین از سه روش تمایزی که در قسمت ماده و روش توضیح داده شد، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۴ و شکل ۲ نشان داده شده است، تنها سلول‌های BM-MSCs و با استفاده از روش Shi و همکاران، به سلول‌های ترشح کننده‌ی انسولین تمایز یافتند. این سلول‌ها، در ابتدای تمایز از ظاهری دوکی و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالایی برخوردار بودند، اما پس از گذشت ۱۲ روز و در پایان مرحله‌ی تمایز، دسته‌های شبه جزیره‌ای را تشکیل دادند که نسبت هسته به سیتوپلاسم در آنها کاهش یافته بود (شکل ۲-E). رنگ آمیزی اختصاصی پروتئین‌های انسولین و پپتید C توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی متصل

جدول ۴- یافته‌های تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین از سه روش تمایزی

نوع سلول	روش تمایزی	مدت زمان تمایز (روز)	نتیجه‌ی تمایز			رفرنس
			ایمونوسیتوشیمی	الایزا	RT-PCR	
BM-MSCs	Shi و همکاران (۲۰۰۵)	۱۲	+	+	+	۲۷
UC-MSCs			-	-	-	
BM-MSCs	Chao و همکاران (۲۰۰۸)	۲۸	-	-	-	۲۳
BM-MSCs	Gao و همکاران (۲۰۰۸)	۱۵	-	-	-	۲۴

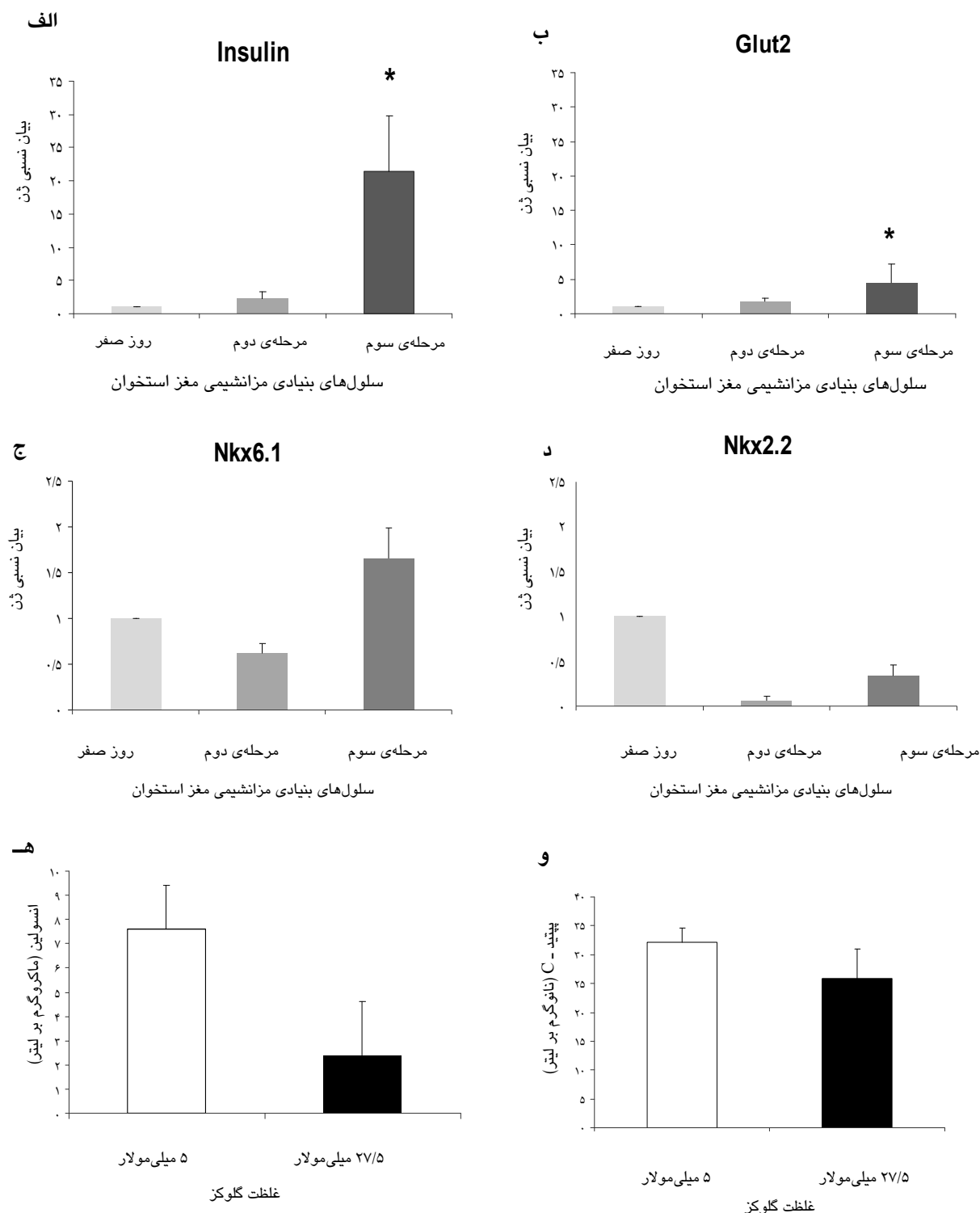


شکل ۲: A: رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بافت پانکراس انسان، جزیره‌ی لانگرهانس داخل دایره مشخص شده است، B: رنگ آمیزی هسته‌ی بافت پانکراس، C: بیان نشانگر انسولین در بافت پانکراس، D: بیان نشانگر پپتید - C در بافت پانکراس، E: نمای میکروسکوپ فاز کنتراست از دسته سلول‌های شبه جزیره‌ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز داده شده به سلول‌های انسولین ساز، F: رنگ آمیزی هسته‌ی سلول‌های تمایز یافته مغز استخوان، G: بیان نشانگر انسولین در سلول‌های تمایز یافته مغز استخوان، H: بیان نشانگر پپتید - C در سلول‌های تمایز یافته مغز استخوان، I: نمای میکروسکوپ فاز کنتراست از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف تمایز داده شده به سلول‌های انسولین ساز، J: رنگ آمیزی هسته‌ی سلول‌های تمایز داده شده بندناف، K: عدم بیان نشانگر انسولین سلول‌های تمایز داده شده بندناف، L: عدم بیان نشانگر پپتید - C در سلول تمایز داده شده بندناف را نشان می‌دهد، M: نمای میکروسکوپ فاز کنتراست از نمونه‌ی کنترل منفی، N: رنگ آمیزی هسته‌ی نمونه‌ی کنترل منفی، O: نمونه‌ی کنترل منفی نشانگر انسولین، P: نمونه‌ی کنترل منفی نشانگر پپتید - C. آنتی‌بادی ثانویه متصل با رنگ فلورسنت (FITC) بوده و برای رنگ آمیزی هسته‌ها از رنگ DAPI استفاده شده است (تمام تصویرها با بزرگنمایی $\times 10$ نمایش داده شده است).

به منظور بررسی کمی بیان ژن‌های Insulin، Nkx6.1، GLUT2 (Slc2a2) و Nkx2.2 در مسیر تمایز سلول‌های BM-MSCs به سلول‌های انسولین ساز، در سه مقطع زمانی روز صفر تمایز، پایان مرحله‌ی دوم تمایز و پایان مرحله‌ی سوم (مرحله‌ی نهایی) تمایز، از روش Real Quantitative Time PCR استفاده شد. از GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

بر اساس یافته‌های به دست آمده که در شکل ۳- الف، ب، ج، د نشان داده شده، بیان ژن انسولین در مرحله‌ی سوم تمایز نسبت به روز صفر ۲۰ برابر افزایش یافت که این

افزایش معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). این اختلاف معنی‌دار در رابطه با بیان انسولین، بین مرحله‌ی دوم و سوم تمایز نیز وجود داشت ($P \leq 0.05$). بیان GLUT2 (ژن مربوط به گیرنده‌ی اختصاصی گلوکز) نیز مانند انسولین، در مرحله‌ی سوم تمایز نسبت به روز صفر و همچنین بین مرحله‌ی دوم و سوم تمایز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0.05$). در مورد بیان ژن‌های Nkx6.1 و Nkx2.2 هیچ اختلاف معنی‌داری بین مراحل مختلف تمایزی مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۳- الف، ب، ج، د، ه و ویافته‌های بررسی بیان ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR برای بیان ژن‌های انسولین، Nkx6.1، Nkx2.2 در سه مقطع زمانی و غلظت انسولین و پپتید C

بتا نشان می‌دهد. ه: سنجش میزان ترشح پپتید - C، و: سنجش میزان ترشح انسولین را در مرحله‌ی پایانی تمایز در دو غلظت مختلف ۵ میلی‌مول و ۲۷/۵ میلی‌مول گلوکز را در

روز صفر تمایز، پایان مرحله‌ی دوم تمایز و پایان مرحله‌ی سوم (مرحله‌ی نهایی). تمایز را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز داده شده به سلول‌های

سلول‌های بنیادی مغز استخوان برخوردار هستند. برخی پژوهش‌ها نیز تغییر در مورفولوژی و فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سیاهرگ بندناف را به دنبال افزایش تعداد پاساژها و نیز کاهش پتانسیل تمایز به چربی را در محیط خارج از بدن گزارش کرده‌اند. به این ترتیب می‌توان گفت که اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی چند توان هستند، با این وجود سلول‌های جدا شده از بافت‌های مختلف می‌توانند قابلیت‌های تمایزی متنوعی را به نمایش بگذارند.^{۲۲}

در ادامه‌ی این پژوهش، سلول‌های مزانشیمی استخوان و سیاهرگ بندناف به منظور تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز مورد بررسی قرار گرفتند. Shi و همکاران (۲۰۰۵) توانستند سلول‌های بنیادی جنینی انسان را با استفاده از برنامه‌ی سه مرحله‌ای، به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز دهند. در ادامه دنیر و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از روش Shi، سلول‌های بنیادی خونساز که از دسته‌ی سلول‌های بنیادی بزرگسالان می‌باشند را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز دادند.^{۲۳} Chao و همکاران (۲۰۰۸) و Gao و همکاران (۲۰۰۸) نیز از سلول‌های بنیادی بزرگسالان به منظور تولید سلول‌های انسولین‌ساز استفاده کرده و توانستند این سلول‌ها را در محیط خارج بدن ایجاد کنند. بنابراین هر سه روش در دو گروه UC-MSCs و BM-MSCs مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده نشان داد که تنها سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان قادر هستند که به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یابند و از تمام روش‌های موجود نیز تنها روش Shi برای القا تمایز موثر بوده است. مقایسه‌ی ترکیبات به کار گرفته شده در هر سه روش تمایزی، نشان داد هر سه روش تمایزی از محیط کشت DMEM با غلظت بالای گلوکز در آغاز تمایز استفاده کرده‌اند که در تغییر تمایزی سلول‌های بنیادی بالغ به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین موثر است،^{۲۴،۲۵} و تمایز سلول اندوکرینی پانکراس را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی فعال می‌کند.^{۲۶}

هرچند که غلظت بالای گلوکز به تنهایی نمی‌تواند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین القا کند،^{۱۴} بنابراین برای پیش بردن بلوغ سلول‌های القا شده، فاکتورهای بلوغ مانند نیکوتین آمید، اکسندین-۴، B27 و N2 ضروری است که در محیط کشت هر سه روش تمایزی استفاده شده است، اما دو ترکیب اصلی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز داده شده به سلول‌های بتا نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت مختلف گلوکز مشاهده نشد ($P > 0.05$). تمام داده‌ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند.

بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته از راه بررسی میزان ترشح انسولین و پپتید - C با روش الایزا به منظور بررسی توانایی دسته‌های شبه جزیره‌ای تمایز یافته در تولید انسولین، آزمون سنجش میزان انسولین و پپتید - C در پاسخ به دو غلظت مختلف ۵ میلی‌مول و ۲۷/۵ گلوکز میلی‌مول، از سلول‌های فاز نهایی تمایز به عمل آمد. یافته‌ها نشان داد میزان ترشح انسولین و پپتید - C در پاسخ به غلظت ۲۷/۵ میلی‌مول گلوکز نسبت به غلظت ۵ میلی‌مول گلوکز کاهش نشان داد، اگرچه این کاهش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (شکل ۳: ه، و).

بحث

با توجه به این‌که تاکنون پژوهشی پیرامون بررسی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از دیواره‌ی سیاهرگ بندناف به سلول‌های انسولین‌ساز صورت نگرفته است، در این پژوهش سلول‌های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بند ناف به منظور بررسی توانایی آن‌ها در تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز جداسازی و کشت داده شدند.

پژوهش‌های صورت گرفته نشان داده که اگر سلولی واجد قابلیت چسبندگی به کف ظرف کشت بوده، ظاهر دوکی شکل داشته و دارای شاخص‌های CD105+، CD73+، CD90+، CD44+، CD11b-، CD45- و CD34- باشد، همچنین قابلیت تمایز به رده‌های مزودرمی استخوان، غضروف و چربی را داشته باشد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار می‌گیرد.^{۲۸-۳۱} در پژوهش حاضر نیز سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده از دیواره‌ی سیاهرگ بندناف، ویژگی چسبندگی به کف ظرف کشت، ظاهر دوکی شکل، بیان شاخص‌های ویژه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و قابلیت تمایز به استخوان را دارا بودند، اما تمایز به چربی در این سلول‌ها مشاهده نشد. همچنین توان تمایزی آن‌ها به سمت سلول‌های غضروفی مورد بررسی قرار نگرفت. در پژوهش‌های مشابهی که در رابطه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بندناف صورت گرفته نیز نشان داده شده که سلول‌های مزانشیمی خون بندناف از توان تمایزی پایینی برای سلول‌های چربی نسبت به

که این سه روش تمایزی را در مراحل اولیه از یکدیگر متمایز می‌کند، اکتیوین A و رتینوئیک اسید است. اکتیوین A جز اعضا خانواده‌ی TGF- β است که در غلظت بالا در القا تشکیل اندودرم موثر است و برای شکل‌گیری مزودرم و اندودرم در طی گاسترولاسیون ضروری می‌باشد.^{۲۶،۲۷} kubo و همکاران،^{۲۸} هم‌چنین McLean و همکاران^{۲۹} گزارش کرده‌اند که اکتیوین A می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به اندودرم قطعیⁱ را القا کند، ترشح انسولین را در کشت جزایر پانکراسی انسانی بهبود بخشد^{۴۰} و طی تکوین و ترمیم سلول‌های بتا در موش‌های نوزاد دیابتی، تمایز سلول‌های بتای پانکراس را تنظیم کند.^{۴۱}

رتینوئیک اسیدⁱⁱ (RA) نیز از جمله مولکول‌های موثر در پیام‌دهی است که در الگودهی قدامی - خلفی مزودرم و نورواکتودرم و در تنظیم الگوی تمایز اندودرم جنینی به خصوص شکل‌گیری جوانه‌های اولیه‌ی پانکراس در مهره داران نقش ایفا می‌کند^{۴۲} و می‌تواند بیان انسولین را در سلول‌های بتای پانکراسی بهبود بخشد.^{۴۲،۴۳} ترکیب اکتیوین با RA در تمایز ناحیه‌ی اکتودرم فرضی در بلاستولای زنبوپوس و نیز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به پیش‌ساز پانکراسی مانند Pdx1، hnf3 α و hnf3 β و سلول‌های انسولین مثبت موثرند^{۴۴،۴۵} و به عبارت بهتر ترکیبی از اکتیوین A و RA در القا تمایز بسیار اثربخش‌تر از بکارگیری هر کدام از این عوامل به تنهایی است. بنابراین یکی از دلایل عدم تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های انسولین ساز به دو روش Gao و Chao، عدم بکارگیری اکتیوین A در روش Chao و عدم بکارگیری اکتیوین A و RA در روش Gao در مراحل اولیه تمایز است که سبب می‌شود متعهد شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت اندودرم قطعی و در ادامه‌ی رده اندوکرینی به خوبی صورت نگیرد. هرچند به منظور مقایسه‌ی دقیق‌تر این سه روش و بررسی دیگر دلایل عدم موفقیت دو روش Gao و Chao به پژوهش‌های بیشتری نیاز می‌باشد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف به روش Shi نشان داد که برخلاف سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، دو پروتئین انسولین و پپتید - C در سلول‌های تمایز یافته از سیاهرگ بندناف در سطح پروتئین و mRNA بیان نشده و این سلول‌ها توان تمایزی پایینی دارند.

i- Definitive endoderm

ii- Retinoic Acid

برخلاف آنچه که در این پژوهش به دست آمد، سایر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از ژل وارتون بند ناف قدرت تمایز به دسته‌های شبه جزیره بیان‌کننده‌ی انسولین و گلوکاگون را داشته و به دنبال تزریق به موش‌های صحرایی دیابتی موجب کاهش گلوکز خون در حیوان شدند.^{۲۳،۴۵} هم‌چنین Gao و همکاران در پژوهشی که بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از خون بند ناف صورت گرفت، نشان دادند که ۳/۶۳ تا ۲/۲۵٪ از سلول‌ها در پایان تمایز انسولین را بیان می‌کردند و در سال ۲۰۰۹ با تزریق سلول‌های تمایز یافته به موش‌های دیابتی قابلیت تولید انسولین این سلول‌ها را ثابت کردند.^{۴۶} در سال ۲۰۱۰ نیز وانگ و همکاران موفق به تولید سلول‌های انسولین ساز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومای بندناف شدند که پس از تزریق به موش دیابتی توانستند سطح گلوکز خون را کاهش دهند.^{۴۵} علاوه بر این، Phuc و همکاران در سال ۲۰۱۱ توانستند با استفاده از روش Gao و همکاران، MSC به دست آمده از بانک خون بندناف را به سلول‌های انسولین ساز تمایز دهند.^{۴۶} به این ترتیب به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دیواره‌ی سیاهرگ بندناف از توان تمایزی پایین‌تری نسبت به سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون و خون بندناف داشته باشند که این توان تمایزی کمتر در تمایز این سلول‌ها به استخوان و چربی هم مشاهده شده بود.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های انسولین‌ساز به روش Shi، نشان داد که ۱۵/۸±۲/۶ و ۱۳/۵±۵/۵٪ از سلول‌ها به ترتیب انسولین و پپتید - C را بیان می‌کنند و به صورت دسته‌های شبه جزیره‌ای با هسته‌های کوچک‌تر از سیتوپلاسم ظاهر می‌شوند. یافته‌های به دست آمده از بررسی مغز استخوان نشان داد که این یافته، نشانه‌ای از تمایز این سلول‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز بود. سلول‌های تمایز یافته به صورت هسته‌ی سلول‌های تمایزنیافته مغز استخوان که ظاهری دوکی شکل داشتند، به خوبی قابل مشاهده بودند. بررسی‌های بین ژنی نیز نشان داد که تمایز به سمت سلول انسولین‌ساز به درستی صورت گرفته و ژن‌های انسولین و GLUT2 در پایان مرحله‌ی سوم نسبت به روز صفر تمایز، در سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) افزایش یافت. در مسیر تکوین پانکراس، بیان ژن انسولین و GLUT2 (ژن مربوط به گیرنده‌ی گلوکز در سطح سلول بتا) تنها در سلول بتای تمایز

گلوکز (۵ میلی‌مول و ۲۷/۵ میلی‌مول) قرار گرفتند. یافته‌های به دست آمده از این بررسی نشان داد هیچ اختلاف معنی‌داری بین ترشح انسولین و پپتید - C در پاسخ به غلظت ۵ میلی‌مول و غلظت ۲۷/۵ میلی‌مول گلوکز وجود نداشت ($P > 0.05$). در کل می‌توان گفت سلول‌های تمایز یافته دارای عملکرد طبیعی نبوده و نمی‌توانند متناسب با غلظت‌های مختلف گلوکز، انسولین را ترشح کنند که این می‌تواند به دلیل فقدان گیرنده‌ی گلوکز در حد طبیعی و یا عدم بلوغ سلول‌های تمایز یافته باشد. از سوی دیگر با توجه به سایر پژوهش‌های انجام شده فعالیت سلول‌های تمایز یافته در شرایط (in vivo) می‌تواند عملکرد درست سلول‌ها را بهتر نشان دهد.

در نهایت یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تنها سلول BM-MSC در مقایسه با سلول UC-MSC، قادر است به سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین تمایز یابد. در این پژوهش سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از سیاهرگ بند ناف به عنوان سلول‌های شبه مزانشیمی معرفی می‌گردیدند که پتانسیل لازم برای تمایز به سلول‌های چربی و انسولین‌ساز را نداشته و توان تمایزی پایینی برای تولید سلول‌های استخوان ساز داشتند. از سوی دیگر، مشخص گردید تنها روش Shi به طور خاص به علت کاربرد اکتیوین و رتینوئیک اسید، تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان القا می‌کند، هرچند این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه دارای عملکرد پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز نمی‌باشند. نیاز به پژوهش‌ها پیرامون این رابطه در مدل حیوانی، با توجه به نقش موثری که محیط داخل بدن (In vivo) می‌تواند در مقایسه با محیط خارج از بدن (In vitro) روی تمایز داشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

یافته قابل شناسایی است.^{۳۷} Nkx2.2 و Nkx6.1 نیز ژن‌های دیگری بودند که بیان آن‌ها در هیچ‌یک از مراحل تمایز نسبت به روز صفر، افزایش معنی‌داری را نشان نداده بود ($P > 0.05$). در واقع پژوهش‌های تکوینی پانکراس نشان داد بیان ژن Nkx6.1 تنها در سلول‌های در حال تکوین پانکراس قابل شناسایی است و Nkx2.2 نیز از ژن‌های دخیل در کامل شدن تمایز سلول‌های بتای پانکراسی است.^{۳۶} در پژوهشی که Oh و همکاران روی تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انجام دادند نیز همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، بیان Nkx2.2 و Nkx6.1 در روز پایانی تمایز مشاهده نشد و بیان آن‌ها تنها تا روز هفتم تمایز ادامه داشت، سلول‌های تمایز یافته‌ی به دست آمده از روش این گروه پس از تزریق به موش دیابتی نیز توانستند انسولین را بیان کنند.^{۳۲}

از نشانه‌های مهم عملکرد سلول‌های بتا، ترشح انسولین است، از این رو در این پژوهش میزان ترشح انسولین و پپتید - C در سلول‌های بنیادی مغز استخوان تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد پس از تمایز سلول‌ها قادر به ترشح انسولین و پپتید - C بودند. از آنجا که در محیط کشت سلول‌ها، انسولین نیز به منظور تمایز اضافه شد، بنابراین بخشی از انسولین ترشح شده مربوط به انسولین‌های جذب شده از محیط کشت توسط سلول‌ها در طی تمایز است که پس از تعویض محیط با محیط عاری از انسولین به محیط جدید ترشح شده است. با این وجود تشخیص پپتید - C ترشحاتی در محیط رویی سلول‌ها بی‌تردید بیانگر سنتز پروتئین انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته بود که یافته‌های به دست آمده از روش ایمونوسیتوشیمی را تایید می‌کند. همچنین برای بررسی عملکرد سلول تمایز یافته، سلول‌های فاز نهایی تمایز در معرض غلظت‌های متفاوتی از

References

- Limbert C, Páth G, Jakob F, Seufert J. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79: 389-99.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt 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: 230-8.
- Nanji SA, Shapiro AM. Advances in pancreatic islet transplantation in humans. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 15-25.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-9.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003; 299: 411-4.
- Stock PG, Bluestone JA. Beta-cell replacement for type I diabetes. *Annu Rev Med* 2004; 55: 133-56.
- Scharfmann R. Alternative sources of beta cells for cell therapy of diabetes. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 595-600.
- 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.
- 9- D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-401.
- 10- Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2006; 48: 323-32.
- 11- Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, et al. 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: 594-603.
- 12- 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.
- 13- Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 2007; 25: 2837-44.
- 14- Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 771-6.
- 15- Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: 650-5.
- 16- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bel-lantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-402.
- 17- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23: 220-9.
- 18- Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19: 1450-6.
- 19- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 32-45.
- 20- Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 919-23.
- 21- Zhao Y, Wang H, Mazzone T. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2454-64.
- 22- Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: 1679-90.
- 23- 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: e1451.
- 24- Gao F, Wu DQ, Hu YH, Jin GX, Li GD, Sun TW, et al. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl Res* 2008; 151: 293-302.
- 25- Wang HS, Shyu JF, Shen WS, Hsu HC, Chi TC, Chen CP, et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant* 2011; 20: 455-66.
- 26- Phuc PV, Nhung TH, Loan DT, Chung DC, Ngoc PK. Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47: 54-63.
- 27- Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells* 2005; 23: 656-62.
- 28- Duggal S, Brinchmann JE. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2908-15.
- 29- Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, et al. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 2011; 55: 181-7.
- 30- Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1206-18.
- 31- Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1179-83.
- 32- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25: 1384-92.
- 33- Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappel J, Tilton RG, et al. Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif* 2007; 40: 367-80.
- 34- Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2458-63.
- 35- 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: 1721-32.
- 36- Hill CS. TGF-beta signalling pathways in early *Xenopus* development. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 533-40.
- 37- Kumar M, Jordan N, Melton D, Grapin-Botton A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol* 2003; 259: 109-22.
- 38- Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 2004; 131: 1651-62.
- 39- McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, et al. Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 2007; 25: 29-38.
- 40- Florio P, Luisi S, Marchetti P, Lupi R, Cobellis L, Falaschi C, et al. Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 231-4.
- 41- Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I. Activin A and beta-cellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells

- in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 2004; 53: 608-15.
- 42- Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 2001; 209: 1-77.
- 43- Stafford D, Prince VE. Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr Biol* 2002; 12: 1215-20.
- 44- Cai J, Yu C, Liu Y, Chen S, Guo Y, Yong J, et al. Generation of homogeneous PDX1(+) pancreatic progenitors from human ES cell-derived endoderm cells. *J Mol Cell Biol* 2010; 2: 50-60.
- 45- Wu LF, Wang NN, Liu YS, Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009 ; 15: 2865-73.
- 46- Crossley JA, Berry E, Aitken DA, Connor JM. Insulin-dependent diabetes mellitus and prenatal screening results: current experience from a regional screening programme. *Prenat Diagn* 1996; 16: 1039-42.

Original Article

In-vitro Potential of Human Bone Marrow and Umbilical Cord Vein Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Insulin Producing Cells

Khoshchehreh R^{1,2}, Ebrahimi M^{1,3}, Baghban EslamiNejad M¹, Aghdami N³, Baharvand H^{1,2}

¹Stem Cell Biology and Technology Royan Institute, ²Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, ³Department of Regenerative Medicine, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Tehran, I.R. Iran

e-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

Received: 10/05/2011 Accepted: 14/07/2011

Abstract

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow are multi potent cells that have the capacity to trans-differentiate into a variety of cell types including insulin islet cells. However the efficiency is low. The aim of this study is to explore the potential of Marrow and Umbilical cord vein MSC to differentiate into functional islet like cells in vitro. **Materials and Methods:** BM-MSCs and UC-MSCs were obtained from healthy donors and were cultured. MSCs with high CD90, CD73, CD105, CD44 and very low CD34 and CD45 expression were differentiated into Islet-like cells, under defined conditions. Insulin and c-peptide positive cells were evaluated with immune-florescence and insulin release after glucose challenge was tested by ELISA. QRT-PCR was done to detect expression of insulin, Glut2, Nkx6.1 and Nkx2.2 at mRNA level. **Results:** Our results showed that only BM-MSC can be differentiated to insulin secreting cells. About 15.8%±2.6 and 13.5%±5.5 of cells were positive for insulin and c-peptide, respectively. Our results revealed that expression of Insulin and Glut2 upregulated 20 fold changes at mRNA level. However they were not functional when treated by different concentration of glucose. **Conclusion:** Our results showed that only Human BM-MSCs, compared to umbilical cord vein MSCs, are able to differentiate into insulin producing cells in vitro.

Keywords: Bone marrow mesenchymal stem cells, Umbilical cord vein mesenchymal stem cells, Insulin producing cells