● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۴، ص ۳۴۰-۳۲۸، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به سلول‌های انسولین‌ساز

ایمان راد[۱]، علیرضا فارسی‌نژاد[۲*]، محمد امین عدالت‌منش[۳]

خلاصه

مقدمه: دیابت نوع یک یا دیابت وابسته به انسولین، یک بیماری خودایمنی است که در آن سلول‌های بتای پانکراس توسط سیستم ایمنی تخریب می‌شوند و تاکنون روش شناخته شده‌ای برای درمان آن یافت نشده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs) سلول‌های پر توان و خود تجدیدپذیر و قادر به تمایز بافت‌های مزودرمی هستند. این توانایی توجه محققین را به این سلول‌ها به عنوان ابزار درمانی جلب نموده است. هدف این مطالعه، بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose tissue-derived stem cells یا ASCs) انسان به سلول‌های انسولین‌ساز (Insulin-producing cells یا IPCs) با استفاده از حداقل عوامل تمایزی بود تا بتوان منبع سلولی مناسبی را جهت درمان بیماری دیابت تهیه نمود.

روش: ASCs توسط آسپیره لیپوساکشن جمع‌آوری شد و القای تمایز طی دو مرحله صورت گرفت. در مرحله پیش تمایز از محیط کم‌گلوکز حاوی نیکوتین آمید، بتامرکاپتواتانول و ۲۰٪ FBS (Fetal Bovin Serum) و در مرحله تمایز از محیط پرگلوکز، نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول بدون FBS استفاده گردید. بررسی تمایز سلول‌ها با استفاده از آزمایش مورفولوژی، رنگ‌آمیزی دیتیزون (Dithizone یا DTZ) و RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) انجام گرفت. برای ارزیابی عملکرد سلول‌های تمایز یافته، میزان ترشح انسولین آن‌ها با روش ELISA اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: در پایان مرحله تمایز، تغییرات مورفولوژیک با میکروسکوپ اینورت مشاهده شد. سلول‌های تمایز یافته با DTZ رنگ گرفت. نتایج آزمایش RT-PCR، ژن‌های انسولین، PDX-۱ (Pancreatic duodenal homeobox)، PAX-۴ و GLUT-۲ (Glucose transporter type 2) را بیان کرد. علاوه بر این، تولید انسولین در سلول‌های تمایز یافته به روش ELISA مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: ASCs انسان را می‌توان به کمک حداقل عوامل تمایزی به IPCs تبدیل نمود.

واژه‌های کلیدی: دیابت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، انسولین

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- استادیار، مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** farsinezhad239@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۷/۱۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۸/۲۴

مقدمه

دیابت اختلال متابولیک شایعی است که در آن بدن شخص بیمار توانایی تولید انسولین را از دست می‌دهد (دیابت نوع یک) و یا این که نسبت به انسولین مقاومت پیدا می‌کند (دیابت نوع دو یا دیابت ملیتوس). دیابت نوع یک نوعی بیماری خودایمنی وابسته به لنفوسیت‌های T و در برگیرنده ۱۰-۵ درصد از انواع دیابت است؛ در حالی که نوع دو آن ۹۵-۹۰ درصد موارد بیماری را به خود اختصاص می‌دهد و مقاومت پیش‌رونده به انسولین در نهایت ممکن است به تخریب سلول های بتای پانکراس و نقص کامل تولید انسولین در فرد مبتلا بینجامد (۳-۱). تلاش برای درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی تاکنون با موفقیت‌هایی همراه بوده است، اما عواملی مانند واکنش رد پیوند، محدودیت در یافتن اهدا کننده مناسب و نیاز به مصرف داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی، محققین را وادار نموده است تا برای درمان قطعی این بیماری به دنبال منابع در دسترس‌تر و کارامدتری از سلول‌های ترشح کننده انسولین باشند. از این‌رو، استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند جایگزین امیدوار کننده‌ای برای درمان بیماران مبتلا به دیابت باشد (۷-۴). از جمله مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی می‌توان به امکان پیوند اتولوگ، دسترسی آسان و عدم نیاز به استفاده از داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی اشاره کرد (۸).

در میان سلول‌های بنیادی بالغ، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSC) با درجاتی از موفقیت همراه بوده است. MSCs را می‌توان از بافت‌هایی مانند مغز استخوان، پرده آمنیوتیک، بافت عضله، پالپ دندان و یا بافت چربی جدا نمود (۱۳-۹). در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است؛ چرا که جدا کردن این سلول‌ها از بافت چربی آسان و عوارض آن برای بیمار کمتر است (۱۴، ۸).

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose tissue-derived stem cells یا ASCs) مانند سایر MSCs شاخص‌های سطحی همچون CD۴۴، CD۹۰ و CD۱۰۵ را بیان می‌کنند، شاخص‌های مربوط به سلول‌های خونی مانند CD۴۵، CD۱۴ ولی شاخص‌های مربوط به سلول‌های عروقی مانند CD۳۱ را در سطح خود بیان نمی‌کنند. گرچه مطالعات اخیر امکان تولید سلول‌های انسولین‌ساز (Insulin-producing cells یا IPCs) را از سلول‌های بنیادی جنینی نشان داده‌اند، اما نتایج به دست آمده هنوز رضایت بخش نیست و برخی از موانع مانند رد سیستم ایمنی بدن، تومور، محدودیت منبع و نگرانی های اخلاقی در مورد استفاده از آن‌ها هنوز هم حل نشده باقی مانده است (۱۵).

MSCs از نظر مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست‌ها، غیر خون‌ساز و چند قوه هستند و همچنین نگرانی‌های اخلاقی کمتری در مورد استفاده از آن‌ها وجود دارد (۱۶، ۱۵). این سلول‌ها قادر به تمایز انواع مختلفی از سلول‌ها می‌باشند. علاوه بر این با خاصیت تنظیم کنندگی سیستم ایمنی، واکنش‌های ایمنی را در پیوندهای آلوژن مهار می‌نمایند (۱۶). ASCs سلول های خود تجدیدپذیر بنیادی هستند که می‌توان آن‌ها را با استفاده از عمل لیپوساکشن به دست آورد. ASCs قادر به تمایز سلول‌های چربی، غضروف، عضله، استخوان و سلول‌های ترشح کننده انسولین هستند (۱۷). این سلول‌ها در مقایسه با MSCs سایر بافت‌ها توان تکثیری بیشتر و حفظ خاصیت چندتوانی (Pluripotency) در پاساژهای متعدد را دارند (۱۸، ۱۷، ۶).

امروزه تحقیقات پایه و مطالعات پیش‌بالینی در تلاش هستند که بر مشکلات ناشی از استفاده از MSCs فایق آیند تا از آن‌ها در درمان بیماران به صورت گسترده استفاده نمایند. تاکنون شیوه‌های مختلفی در ارتباط با تمایز ASCs به IPCs در حیوانات آزمایشگاهی به کار گرفته شده که نتایج آن امیدوار کننده بوده است (۱۴، ۶، ۱). MSCs در صورت تمایز به IPCs قادر خواهند بود تا تمام ژن‌های شاخص سلول‌های پانکراسی مانند انسولین، PDX-۱ (Pancreatic

duodenal homeobox)، PAX-۴ و GLUT-۲ (Glucose transporter type 2) را بیان نمایند. این تحقیق با هدف بررسی توانایی تمایز ASCs به IPCs به عنوان یک روش درمانی بالقوه و مؤثر در سلول درمانی طراحی و اجرا گردید تا از سلول‌هایی که علاوه بر خاصیت تنظیم کنندگی سیستم ایمنی به آسانی در دسترس هستند و احتمال رد پیوند آن‌ها بسیار کم است، برای نیل به این هدف استفاده نماید. شیوه القای تمایز MSCs که در این تحقیق به کار رفت، پیش‌تر بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با موفقیت آزمایش شده بود (۱۹)، اما تحقیقی در ارتباط با مؤثر بودن آن در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در دست نیست.

روش بررسی

در تحقیق حاضر ASCs انسان به روش هضم آنزیمی و پس از بررسی ایمونوفنوتیپی از نظر بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی و عدم بیان مارکرهای تمایزی جدا شدند. این کار به جهت بررسی توانایی تمایزی در محیط‌های مخصوص تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی انجام شد. این سلول‌ها در محیط تمایزی پایه به سلول‌های انسولینی تبدیل شد و پس از ارزیابی مورفولوژیک، رنگ‌آمیزی دیتیزون (Dithizone یا DTZ) و بررسی بیان ژن‌هایی که در سلول‌های پانکراسی بیان می‌شوند، با بررسی انسولین ترشح شده در محیط کشت به روش ELISA بر روی آن‌ها انجام و تمایز مورد تأیید قرار گرفت.

جداسازی و کشت MSC: به منظور جداسازی MSCs، از ۵۰ میلی‌لیتر بافت چربی حاصل از عمل لیپوساکشن استفاده گردید. نمونه‌های چربی در فالکون‌های استریل جمع‌آوری و بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه سه بار با محلول بافر فسفات (Phosphate buffer solution یا PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد. پس از هضم آنزیمی (کلاژناز ۰/۱ درصد سیگما)، نمونه‌ها به نسبت ۳ به ۱ با PBS رقیق و با سانتریفوژ [۱۲۰۰ دور در دقیقه (Revolutions per minute یا RPM) به مدت ۵ دقیقه] رسوبات سلولی ته‌نشین و به لوله دیگری منتقل گردید. در نهایت رسوبات سلولی در فلاسک‌های T۲۵ [حاوی ۵ میلی‌لیتر DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، ۱۰ ٪ FBS و ۱ ٪ آنتی‌بیوتیک] و با شرایط استاندارد کشت سلولی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ ٪ و دی‌اکسید کربن ۵ ٪) کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴-۳ روز یک‌بار تعویض می‌شد و هنگامی که سلول‌ها به میزان ۸۰ ٪ کف فلاسک را می‌پوشاندند، پاساژ سلولی صورت می‌پذیرفت.

فلوسایتومتری: برای بررسی هویت سلول‌های حاصل شده و تأیید بنیادی بودن آن‌ها، از سلول‌های کشت داده شده در پاساژ سوم برای انجام آزمایش فلوسایتومتری استفاده گردید. به همین منظور، از سه نوع آنتی‌بادی علیه شاخص‌هایی که در سطح MSCs وجود نداشت (CD۴۵، CD۳۱ و CD۱۴) و سه آنتی‌بادی علیه شاخص‌های مثبت آن‌ها (CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵) استفاده شد. برای فلوسایتومتری، سلول‌ها با تریپسینه کردن از کف فلاسک جدا گردید و پس از شستشو با PBS و شمارش آن‌ها با لام نئوبار، ۱۰۶ آن را در یک میلی‌لیتر PBS حل و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله دیگری منتقل گردید. ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه در لوله‌های جداگانه به سلول‌ها افزوده و ۳۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در پایان با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوتون به هر یک از لوله‌ها، نمونه‌ها با دستگاه فکس کالیبور (FACS Calibure) (شرکت BD) تحلیل گردید. جهت بررسی واکنش‌های غیر اختصاصی در این تحلیل، از آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل استفاده شد.

تمایز MSCs به سلول‌های استخوانی: برای بررسی قابلیت تمایزی ASCs، سلول‌های حاصل از پاساژ سه به مدت ۳ هفته در محیط تمایزی استخوان (محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Ascorbate-2-phosphate، ۱۰۰ نانومول دگزامتازون، ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول

فسفات و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین- ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین) کشت داده شد و محیط کشت سلول‌ها هفته‌ای یک بار تعویض گردید. در پایان ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی با آلیزارین قرمز (Alizarin red)، رسوبات کلسیم موجود در محیط زمینه را به رنگ قرمز درآورد که به عنوان نشانه‌ای از تمایز ASCs به سلول‌های استخوانی در نظر گرفته شد.

تمایز ASCs: سلول‌های حاصل از پاساژهای سه به مدت ۴-۳ هفته در محیط تمایزی چربی (محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکروگرم بر لیتر Ascorbate-2-phosphate، ۱۰۰ نانومول دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر لیتر ایندومتاسین و ۱۰۰ واحد پنی سیلین- ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین) کشت داده شد و در پایان با Oil red O به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید (۱۸).

تمایز MSCs به IPCs با استفاده از محیط تمایزی پایه: MSCs حاصل شده پس از پاساژ سه، طی دو مرحله تمایز داده شد. مرحله اول تحت عنوان پیش تمایز که با ۱۰ میلی‌مولار نیکوتین آمید و ۱ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول در محیط کشت کم‌گلوکز (L-DMEM یا Low-DMEM) به همراه ۲۰ درصد FBS و به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت و در مرحله دوم که تحت عنوان مرحله تمایز با ۱۰ میلی‌مولار نیکوتین آمید و در محیط کشت با غلظت گلوکز بالا (H-DMEM یا High-DMEM) طی ۲۶ روز و بدون افزودن FBS انجام شد. برای بررسی تمایز در این مرحله، رنگ‌آمیزی DTZ (Zinc-chelating dye) مورد استفاده قرار گرفت. DTZ با افزودن محلول DTZ ۱ درصد در DMSO (Dimethyl sulfoxide) به محیط کشت سلول‌ها به نسبت ۱:۱۰۰ و ۳۰ دقیقه انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. در انتها سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA (Ribonucleic acid)، سنتز cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) و انجام PCR (Polymerase chain reaction): استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده با نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول پس از القای تمایز و از سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته به عنوان گروه شاهد با استفاده از کیت Rima ZoI (طیف‌آرا فرایند) و با توجه به دستورالعمل کیت مربوط صورت گرفت. برای تهیه cDNA، ۱۰ میکرولیتر از محلول RNA در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری و پس از آن با ترکیب حاوی ۳ میکرولیتر بافر 3X PCR، ۰/۲ میکروگرم راندوم پرایمر، ۲۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱۰ میلی‌مولار dNTP (Nucleoside triphosphate) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس مخلوط گردید. محلول به دست آمده ابتدا ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای توقف واکنش، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

cDNA حاصل شده پیش از انجام PCR در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر بیورد مدل ۳۰۰۰۰ و پرایمرهای تهیه شده (جدول ۱) استفاده شد (۱۴). به این روش از مخلوطی شامل بافر PCR (۱۰X)، کلرید منیزیم (۱ میلی‌مولار)، dNTP (۲۰۰ میکرومولار)، پرایمر (۰/۱ میلی‌مولار از هر پرایمر)، آنزیم تگ پلیمراز (۱۰۰ نانوگرم) و cDNA با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. برنامه PCR بر مبنای واسرشت‌سازی (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمر (دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) و طویل شدن رشته (دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام گرفت. در نهایت با استفاده از دستگاه ژل‌داک، عکس محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تهیه شد.

جدول ۱. *توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی تمایز ASCs (Adipose tissue-derived stem cells) به IPCs (Insulin-producing cells)*

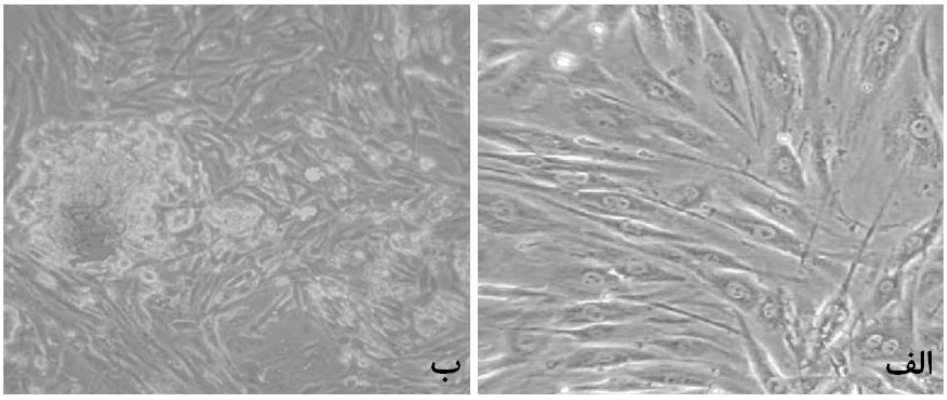
ژن	پرایمر	توالی	اندازه (کیلو دالتون)
انسولین	F	5’- ATC AAG CAG ATC ACT GTC CTT CT -3’	۱۴۳
	R	5’- GAG AGC TTC CAC CAG GTG TG -3’	
PDX–۱	F	5’- TCC CAT GGA TGA AGT CTA CC -3’	۲۴۶
	R	5’- TGT CCT CCT CCT TTT TCC AC -3’	
PDX–٤	F	5’- ATC CTT AAG GTA TCT AAT GGC TG -3’	۴۶۱
	R	5’- GCC ACT GAA TCA GGA TAC TGC -3’	
GLUT–۲	F	5’- AGT ACA ATG ACA GAA GAT AAG GTC -3’	۴۲۳
	R	5’- AGC TCC AAC TAA TGA CAG AAT G -3’	
Beta-actin	F	5’- CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC -3’	۴۶۷
	R	5’- AGT CCA TCA CGA TGC CAG TG -3’	

PDX: Pancreatic duodenal homeobox; GLUT-۲: Glucose transporter type 2

نتایج

تغییرات مورفولوژیک

در طی تمایز، تغییرات مورفولوژیک ASCs با میکروسکوپ اینورت (Nikon, Japan) مورد بررسی قرار گرفت. این سلول‌ها قبل از القای تمایز دارای مورفولوژی شبه فیبروبلاستی (دوکی شکل با استطاله‌های سیتوپلاسمی کوتاه) بودند. ASCs پس از تمایز به طور قابل توجهی از نظر مورفولوژی تغییر کرد و به شکل گرد و در تجمعات خوشه‌ای (شبیه به سلول‌های جزیره‌ای) مشاهده شد (شکل ۱).

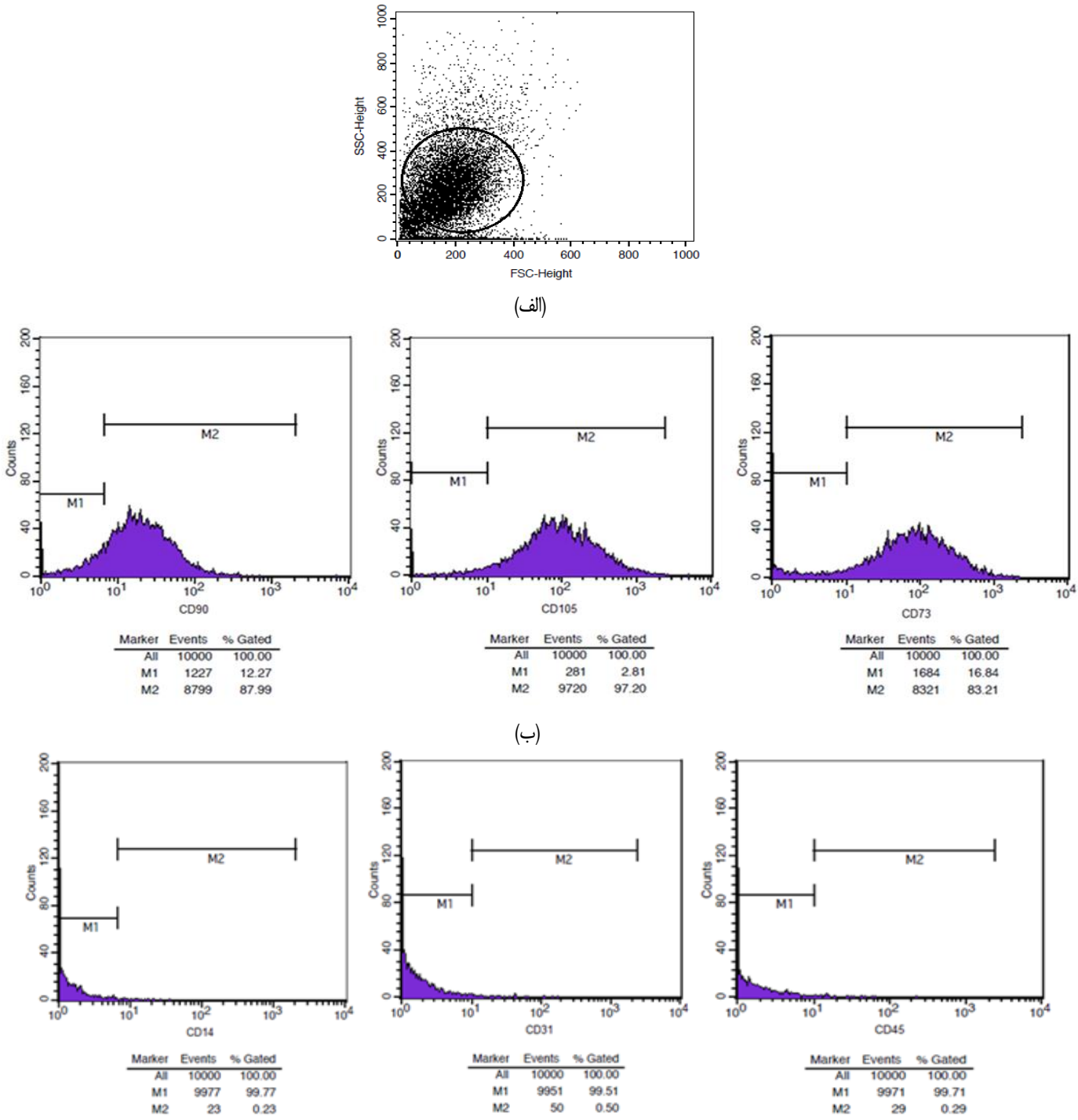


شکل ۱. *تغییرات مورفولوژیک ASCs (Adipose tissue-derived stem cells)*

الف: سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست قبل از تمایز و ب: سلول‌های تمایز یافته شبیه سلول‌های جزیره‌ای پس از تمایز به **IPCs (Insulin-producing cells)**

آزمایش فلوسایتومتری شاخص‌های سطحی ASCs

بررسی فنوتیپ سطح سلولی IPCs انسان در پاساژ سوم نشان داد که بیشتر سلول‌های استخراج شده شاخص‌های CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ را بیان کردند (شکل ۲، قسمت ب)، اما از نظر شاخص‌های CD۴۵، CD۳۱ و CD۱۴ منفی بودند (شکل ۲، قسمت ج). این نتایج خلوص نسبی MSCs به دست آمده را نشان می‌دهد.

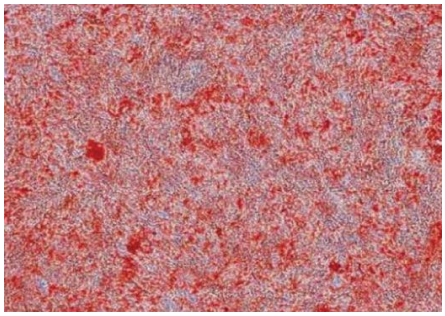


شکل ۲. *هیستوگرام فلوسایتومتری برخی از شاخص‌های اندازه‌گیری شده*

الف: برای تحلیل فلوسایتومتری، سلول‌ها بر اساس **FSC (Forward Scattering)** و **SSC (Side Scattering)** گیت شدند، ب: سلول‌های جداسازی شده مارکرهای **CD۱۰۵**، **CD۷۳** و **CD۹۰** را بیان کردند و ج: سلول‌ها از نظر بیان **CD۱۴**، **CD۳۱** و **CD۴۵** منفی هستند

تمایز به سلول‌های چربی و سلول‌های استخوانی

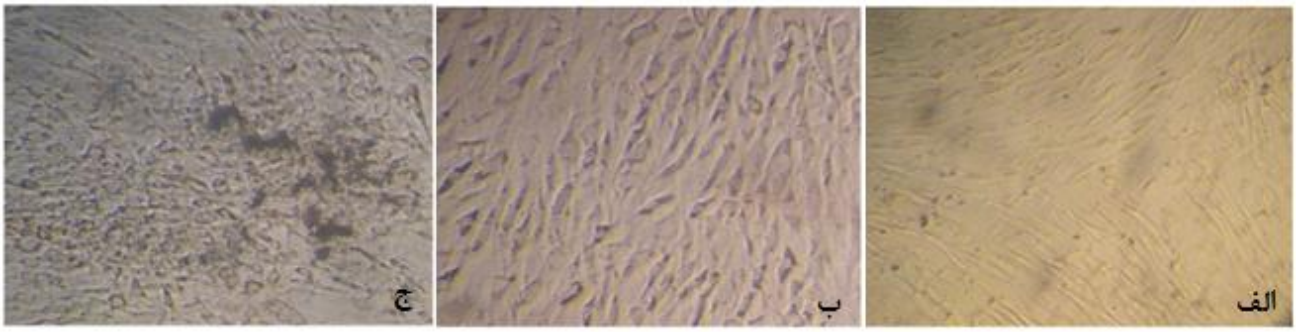
تمایز IPCs به بافت چربی پس از دو هفته با بررسی مورفولوژی و همچنین رنگ‌آمیزی قطرات چربی با رنگ oil red-O به اثبات رسید. بررسی تمایز MSCs به سلول‌های استخوانی نیز نشان داد که سلول‌های مزانشیمی به دست آمده از بافت چربی انسان قادر بودند طی دو هفته به سلول‌های استخوانی تبدیل شوند. این موضوع با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز که رسوبات کلسیم موجود در محیط زمینه را به رنگ قرمز در می‌آورد، به اثبات رسید (شکل ۳).



شکل ۳. *MSCs (Mesenchymal stem cells) تمایز یافته به سلول‌های استخوانی به همراه رسوبات کلسیم رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین قرمز*

رنگ‌آمیزی DTZ

از آن‌جا که سلول‌های بتای موجود در جزایر به دلیل وجود مقدار زیادی روی به خوبی با DTZ رنگ می‌گیرند (۲۰، ۱۹، ۱۴)، از این خاصیت استفاده و سلول‌های تمایز یافته با ماده مذکور رنگ‌آمیزی گردید. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، رنگ‌آمیزی سلول‌ها قبل از تمایز به صورت منفی، اما ۲۸ روز پس از تیمار شدن با مواد تمایز دهنده مثبت بود.



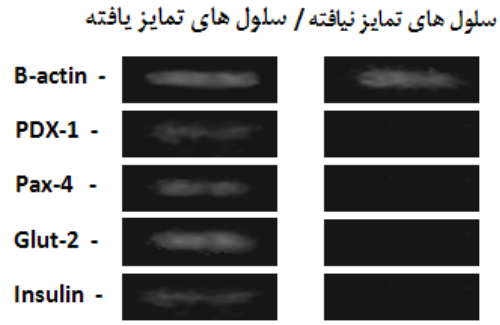
شکل ٤. *نتایج رنگ‌آمیزی DTZ (Dithizone)*

الف: سلول‌های تیمار نشده، ب: سلول‌های تیمار شده پس از ۱۴ روز و ج: سلول‌های تیمار شده پس از ۲۸ روز

بررسی بیان ژن‌های سلول‌های تمایز یافته

برای پاسخ به این سؤال که آیا ASCs پس از تمایز توانسته‌اند ژن‌هایی را بیان نمایند که در سلول‌های انسولین‌ساز پانکراسی وجود دارند؟، بیان ژن‌های مرتبط با مسیر تکامل و عملکرد IPCs در سلول‌های مورد مطالعه با تکنیک RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، بیان ژن بتا اکتین (Beta-actin) به عنوان ژن شاهد، گویای درستی شیوه انجام آزمایش است. پس از اتمام مراحل تمایز، تمام ژن‌های شاخص سلول‌های پانکراسی

مانند انسولین، PDX–۱، PAX–۴ و GLUT–۲ در MSCs تمایز یافته بیان شدند. در مطالعه حاضر از ASCs تمایز نیافته به عنوان نمونه شاهد منفی استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ASCs قادر به تمایز IPCs هستند.



شکل ۵. *بیان ژن‌های دخیل در تمایز به سمت سلول‌های بتای پانکراس بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در گروه سلول‌های تیمار شده در محیط القاگر تمایز و سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه شاهد منفی*

آزمایش ELISA

جهت تعیین میزان ترشح انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته در روز ۲۸ پس از القای تمایز، محیط کشت سلول‌های تمایز یافته با تکنیک ELISA مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج سه بار انجام ELISA نشان داد که سلول‌های تمایز یافته با ترشح ۰/۸ ± ۸/۵ واحد بر میلی‌لیتر انسولین نسبت به سلول‌های تمایز نیافته که فاقد ترشح انسولین بودند، توانستند به IPCs تمایز یابند.

بحث

استفاده از سلول های بنیادی جهت سلول درمانی یکی از مباحث اصلی تحقیقات مرتبط با کاربرد این سلول ها است. سلول های بنیادی علاوه بر قابلیت تکثیر و خودزایی، قادر هستند که در شرایط مناسب تمایز یابند و به انواع سلول‌های بالغ تبدیل شوند. مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cell یا ESC)، سلول‌های بنیادی القایی پر توان (Induced pluripotent stem یا IPS) و سلول‌های بنیادی بالغ (مانند سلول‌های موجود در مغز استخوان، پانکراس، کبد، خون بند ناف، ژله وارتون و جفت) می‌توانند به سلول های سازنده انسولین تمایز یابند (۲۳–۲۱). همه راهکارهای مطرح شده جهت کنترل بلند مدت قند خون و جایگزینی سلول‌های از کار افتاده و یا کم کار پانکراس با سلول‌های جدید انسولین‌ساز می‌باشد. در مطالعه Hayashi و همکاران، سلول‌های بنیادی جنینی موش با موفقیت به سلول‌های تولید کننده انسولین تمایز داده شد. در مطالعه آنان مشخص شد که می‌توان به کمک سلول‌های بنیادی، ساختارهای پانکراسی را تولید نمود (۲۴).

Lumelsky و همکاران گزارش کردند که سلول های بنیادی رویانی انسان را می توان در محیط کشت وادار به بیان فاکتور رونویسی PDX–۱ نمود (۲۵). آنها نشان دادند که کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسان در محیط فیبرونکتین، سلنیوم، ترانسفرین و فاکتور رشد فیبروبلاستی باعث تولید دسته‌جات سلولی مولد انسولین می‌شود (۲۵). با این حال، امروزه به دلیل خاصیت تومورزایی و مشکلات اخلاقی، استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی با محدودیت‌هایی روبه‌رو می‌باشد و تمایل چندانی به استفاده از آن‌ها وجود ندارد (۱۵، ۳). گروه پژوهشگر ایتالیایی نشان دادند که سلول‌های مولد انسولین را می توان از جزایر پانکراسی به دست آورد. مطالعه آنان نشان داد که MSCs

مشتق شده از جزایر پانکراسی، توانایی زیادی برای تولید سلول‌های عملکردی بتا دارند (۲۶).

Sun و همکاران در مطالعه خود توانستند MSCs مشتق از خون بند ناف انسان را طی سه مرحله به سلول های سازنده انسولین تمایز دهند (۲۲). Li و همکاران گزارش کردند که سلول‌های مولد انسولین را می‌توان از MSCs مشتق از مغز استخوان نیز به دست آورد. در تحقیق Li و همکاران ابتدا پیش تمایز با نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول القا شد و سپس تمایز نهایی با نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و فاقد سرم صورت گرفت و نتایج نشان داد که MSCs مشتق از مغز استخوان توانایی زیادی برای تولید سلول‌های عملکردی بتا دارند (۱۹). گرچه مغز استخوان به عنوان اولین منبع MSCs شناخته شده، اما نمونه‌گیری دشوار، حجم محدود و سلول‌های اندک، استفاده از آن را با مشکلات جدی روبرو ساخته است (۱۶).

گروهی از محققین گزارش کردند که با استفاده از اکتیوین A، سدیم بوتیرات، بتا ۲- مرکاپتواتانول، FGF (Fibroblast growth factor) و ITS (Insulin-Transferring Selenium) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی به سلول های اندودرم پانکراسی قابل انجام است (۲۷،۲۹). در حال حاضر شواهد قابل توجهی نشان می دهد که ASCs را می‌توان در آزمایشگاه به سلول‌های بتای انسولین‌ساز تمایز داد. به این ترتیب فرضیه استفاده از این سلول ها در توسعه برنامه های کاربردی سلول درمانی و توسعه دارو جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. سلول‌های بافت چربی را می توان به سرعت، راحتی و به مقدار زیاد و بدون عوارض از طریق ضایعات لیپوساکشن -که عمل آسان‌تری نسبت به نمونه‌گیری از مغز استخوان محسوب می‌شود- به دست آورد. علاوه بر این، سلول های بنیادی حاصل شده از بافت چربی به عنوان منبع جدید تولید IPCs اتولوگ در سلول درمانی دیابت نیز مطرح می باشد. با این وجود مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان شیوه تمایز سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت چربی انسانی و همچنین شیوه دقیق پیوند آن را برای درمان دیابت بیان نمود (۳۱، ۳۰).

در تحقیق حاضر ASCs وادار به تمایز IPCs گردید. در این روش که برگرفته از روش Li و همکاران (به نقل از طاها و هدایتی) (۱۷) برای تمایز MSCs مشتق از مغز استخوان به IPCs می‌باشد، سلول‌های بنیادی چربی در طی دو مرحله به سلول‌های بنیادی انسولین‌ساز تبدیل شد. نخست سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان استخراج گردید و پس از کشت و تکثیر، در پاساژ سوم تحت القای پیش تمایز قرار گرفت. در فاز اول، سلول‌ها با نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول در محیط DMEM کم‌گلوکز به مدت ۲ روز مرحله پیش القا را گذراندند. در فاز دوم تمایز، سلول‌ها با نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول در محیط DMEM با گلوکز بالا به مدت ۲۶ روز تیمار شدند تا مرحله تمایز آن‌ها کامل گردد. در مرحله پیش تمایزی FBS مورد استفاده قرار گرفت و در مرحله دوم تمایز، FBS از محیط کشت سلول‌ها حذف گردید. واضح است که گلوکز یک عامل رشد برای سلول‌های بتا می‌باشد و در مرحله پیش تمایزی که با گلوکز کم صورت می‌گیرد، القای تمایز اندوکرینی در MSCs مدنظر است (۳۲). در این روش، غلظت بالای گلوکز به عنوان محرک قوی جهت تمایز سلول‌های جزایر پانکراسی در مرحله دوم استفاده شد. نیکوتین آمید نیز القاگر مؤثری است که مانع تمایز سلول‌های بنیادی به انواع دیگر سلول‌ها و همچنین مرگ آن‌ها می‌گردد. بتامرکاپتواتانول نیز که به طور معمول به عنوان القاگر سلول‌های عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴)، در تحقیق حاضر به عنوان تقویت کننده اثر نیکوتین آمید مورد استفاده قرار گرفت.

در مطالعه حاضر از Exendin-4 که به عنوان مهار کننده آپاپتوز سلول‌های بتا در مطالعات دیگر (۱۶، ۱۴) استفاده گردیده بود، استفاده نشد. استفاده از نیکوتین آمید به طور

مؤثری باعث القای حداکثری تمایز و بلـوغ سـلول‌هـا در مرحله نهایی تمایز گردید. تحقیق حاضر نشان داد که MSCs می‌توانند به سلول‌های انسولین‌سازی تمایز یابند که از نظـر مورفولوژی به سلول‌های جزیره‌ای پانکراس شبیه هسـتند. نکته مهم‌تر این‌که نتـایج رنـگ‌آمیـزی DTZ و آزمـایش ELISA توانایی MSCs تمایز یافته در تولید انسولین را اثبـات نمود. علاوه بر این، تحقیق حاضر با روش RT-PCR نشان داد که عوامل رونویسی انسولین، PDX-۱ و GLUT-۲ که مرتبط با تکامل اندوکرینی پانکراس و عملکرد آن هستند نیـز در سلول‌های تمایز یافته بیان شده‌اند. همچنین نتایج حـاکی از آن بود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان را می‌توان به کمک دو عامـل بتامرکاپتواتـانول و نیکـوتین آمید، در غلظت‌های مختلفی از گلـوکز و همچنـین تغییـر میزان FBS موردنیاز به IPCs تبدیل نمود.

اگرچه تحقیق حاضـر بـا اسـتفاده از منبـع نامحـدود سلول‌های بنیادی که مشکلات رد ایمونولوژیک پیونـد را ندارند، شیوه‌ای کارامد، ساده و ارزان را برای سلول درمـانی بیماران مبتلا به دیابت ارایه نمود، اما تا زمانی کـه بررسـی دقیقی بر روی پیوند این سلول‌ها از نظر دوام، تولید انسولین، تثبیت قند خون و واکنش‌هـای ایمونولوژیـک رد پیونـد صورت نگرفته باشد، نمی‌توان آن را با اطمینان بـه عنـوان روش مناسبی برای تمایز سلول‌های بنیـادی بافـت چربـی معرفی نمود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشـیمی مشتق از چربی انسان را می‌توان در محیط آزمایشـگاه بـه سلول‌های انسولین‌سازی تبدیل نمود که از نظر مورفولوژی شبیه به سلول‌های جزیره‌ای پانکراس هستند و قابلیت ترشح انسولین را دارند. این سلول‌ها عوامل رونویسـی مـرتبط بـا تکامل و عملکرد سلول‌های پانکراسی را نیز بیان می‌نمایند. تحقیق حاضر افق روشنی از درمان بیماران مبتلا به دیابت را پیش روی محققان قرار می‌دهد، اما این نکته را باید مـدنظر داشت که برای استفاده درمانی از آن باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

References

1. Raslova K. An update on the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus: focus on insulin detemir, a long-acting human insulin analog. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 399-410.
2. Noguchi H. Pancreatic islet transplantation. *World J Gastrointest Surg* 2009; 1(1): 16-20.
3. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, et al. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2009; 35(2): 85-93.
4. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med* 2009; 4(2): 265-73.
5. The American Society forAesthetic Plastic Surgery. ASAPS/ASPS Position Statement on Stem Cells and Fat Grafting. *Aesthetic Surgery Journal* 2011; 31(6): 716-7.
6. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(2): 420-7.
7. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science

review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(6): 1936-46.

8. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129(6): 1277-90.
9. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106(2): 419-27.
10. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57(7): 1759-67.
11. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(4): 435-41.
12. Tyndall A, Walker UA, Cope A, Dazzi F, De BC, Fibbe W, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(1): 301.
13. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; 56(1): 1-8.
14. Moshtagh PR, Emami SH, Sharifi AM. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. *J Physiol Biochem* 2013; 69(3): 451-8.
15. Limbert C, Seufert J. In vitro (re)programming of human bone marrow stromal cells toward insulin-producing phenotypes. *Pediatr Diabetes* 2009; 10(6): 413-9.
16. Marappagounder D, Somasundaram I, Dorairaj S, Sankaran RJ. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters in vitro. *Cell Mol Biol Lett* 2013; 18(1): 75-88.
17. Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell* 2010; 42(4): 211-6.
18. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(2): 324-9.
19. Li X, Zhang Y, Qi G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* 2013; 65(3): 323-34.
20. Li L, Li F, Qi H, Feng G, Yuan K, Deng H, et al. Coexpression of Pdx1 and betacellulin in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 815-23.
21. Wang N, Adams G, Buttery L, Falcone FH, Stolnik S. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *J Biotechnol* 2009; 144(4): 304-12.
22. 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(4): 919-23.

23. Tsai PJ, Wang HS, Shyr YM, Weng ZC, Tai LC, Shyu JF, et al. Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Sci* 2012; 19: 47.

24. Hayashi KY, Tamaki H, Handa K, Takahashi T, Kakita A, Yamashina S. Differentiation and proliferation of endocrine cells in the regenerating rat pancreas after 90% pancreatectomy. *Arch Histol Cytol* 2003; 66(2): 163-74.

25. 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): 1389-94.

26. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50(8): 1691-7.

27. Zanini C, Bruno S, Mandili G, Baci D, Cerutti F, Cenacchi G, et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Pancreatic Islets and Bone Marrow into Islet-Like Cell Phenotype. *PLoS ONE* 2011; 6(12): e28175.

28. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-Like Clusters Derived from Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord for Transplantation to Control Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 2008; 3(1): e1451.

29. Chandra V, Swetha G, Muthyala S, Jaiswal A, Bellare J, Nair PD, et al. Islet-Like Cell Aggregates Generated from Human Adipose Tissue Derived Stem Cells Ameliorate Experimental Diabetes in Mice. *PLoS ONE* 2011; 6(6): e20615.

30. Lee J, Han DJ, Kim SC. In vitro differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(4): 547-51.

31. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005; 40(4): 229-42.

32. Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3342-9.

Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells Using Minimal Differentiation Factors

Iman Rad, M.Sc. [1], Alireza Farsinejad, Ph.D. [2*], Mohammad-Amin Edalatmanesh, Ph.D.[3]

1. Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Assistant Professor of Pathology, Stem Cell Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Assistant Professor, Department of Physiology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

* Corresponding author; e-mail: farsinezhad239@yahoo.com

(Received: 30 May 2014 Accepted: 15 Nov. 2014)

Abstract

Background & Aims: Type 1 diabetes, or insulin-dependent diabetes, is an autoimmune disease in which pancreatic beta cells are destroyed by the immune system. Hitherto, no definite treatment has been found for this condition. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent, self-renewing cells that have the ability to differentiate into mesodermal tissues. This ability has attracted the attention of researchers toward MSCs as therapeutic agents. The aim of this study was to inspect the in vitro differentiation of human adipose-derived tissue stem cells (hADSCs) into insulin producing cells (IPCs) using minimal differentiation factors to provide a source of cells for the purpose of diabetic cell therapy.

Methods: The hADSCs were obtained from liposuction aspirates and induced to differentiate into IPCs under a two-stage protocol. In the pre-induction stage, a combination of low-glucose DMEM medium, 20% (FBS), β-mercaptoethanol, and nicotinamide, and in the induction stage, high-glucose DMEM, β-mercaptoethanol, and nicotinamide without FBS was used. Differentiation was evaluated through morphological analysis, dithizone (DTZ) staining, and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In order to evaluate the performance of differentiated cells, insulin production level was measured.

Results: Morphological changes were observed using an inverted microscope at the end of the differentiation stage. Based on dithizone staining, differentiated cells were positive. Furthermore, RT-PCR confirmed the expression of insulin, pancreatic duodenal homeobox (PDX-1), paired box gene 4 (PAX-4), and glucose transporter type 2 (GLUT2) in differentiated cells. Moreover, insulin production by the IPCs was confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Conclusion: It can be concluded that hADSCs can differentiate into IPCs using minimal differentiation factors.

Keywords: Diabetes, Mesenchymal stem cells (MSCs), Adipose tissue, Insulin

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(4): 328-340