مقاله تحقیقی

تمایز بن‌یاخته‌های جنینی موش به سلولهای مولد انسولین

حسین بهاروند .Ph.D*، هانیه جعفری .M.Sc*، محمدمعصومی .M.Sc*، باقر لاریجانی .Ph.D**، سیدمحمداکرمی .Ph.D**، سپیده ملامحمدی .B.Sc*

*گروه پژوهشی سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

**مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ وصول: دی ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۸۳

چکیده

هدف: تمایز بن‌یاخته‌های (سلولهای بنیادی) جنین موشی (رویان B1) به سلولهای مولد انسولین

مواد و روشها: در این مطالعه از بن‌یاخته‌های جنین موشی رویانB1 (مشتق از موش نژاد C57BL/6) استفاده شد. با استفاده از روش تمایز مستقیم بن‌یاخته‌های جنینی بعد از تشکیل اجسام شبه جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین پیش برده شدند. به‌دنبال آن با استفاده از محیط کشت انتخابی، سلولهای بیان کننده نستین (Nestin) انتخاب شدند. در مرحله نهایی نیز ابتدا با استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF: basic Fibroblas Grousth Factor) سلولهای مذکور تکثیر و سپس با افزودن نیکوتین آمید، القای تمایز به سوی سلولهای مولد انسولین انجام شد. سلولهای حاصل مورد ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، RT-PCR و سنجش میزان ترشح انسولین با استفاده از رادیوایمونواسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته وجود سلولهای بیان کننده انسولین، گلوکاگون، سوماتوستاتین و پلی‌پپتید پانکراسی را نشان داد. در ضمن RT-PCR (Revers Transcription Polymerase Chain Reaction) سلولها، تجلی انسولین و گلوکاگون را در مرحله نهایی تمایز مشخص نمود. با افزودن گلوکز به محیط کشت، انسولین از سلولهای تمایز یافته رها شد که البته با افزایش غلظت گلوکز، میزان رهایش انسولین نیز بیشتر نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که امکان تمایز جنینی به سلولهای مولد انسولین وجود دارد ولی به نظر می‌آید که این سلولها، سلولی بتای حقیقی نیست.

کلید واژه‌ها: بن‌یاخته‌های جنین موشی، سلولهای مولد انسولین، تمایز

مقدمه

دیابت ملیتوس، که حدود ۵-۲ درصد مردم دنیا به آن مبتلا هستند، نوعی بیماری است که در آن غلظت قندخون بیشتر از حد طبیعی است. دیابت را به دو دسته تقسیم می‌کنند: تیپ I و تیپ II. تیپ I را دیابت وابسته به انسولین IDDM[1] نیز می‌نامند. این نوع دیابت با فقدان انسولین همراه است و شروع آن ممکن است ناگهانی و همراه با نشانه‌های شدید باشد. تنها درمان این نوع دیابت، تزریق انسولین است [۱]. تیپ II را دیابت غیروابسته به انسولین NIDDM می‌نامند[2]. این نوع دیابت معمولاً افراد سالمند را که غالباً اضافه وزن دارند گرفتار می‌کند [۲]. غلظت انسولین ممکن است در خون این افراد در ابتدا بالا باشد اما در نهایت کاهش می‌یابد. این نوع دیابت در آغاز ملایم است و نشانه‌های آن ممکن است به طرز غافلگیر کننده‌ای شدت یابد.

پیوند سلولهای مترشح انسولین برای درمان افراد مبتلا به

آدرس مکاتبه: گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان صندوق‌پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email: Baharvand50@yahoo.com

1. Insulin Dependent Diabetes Melliuts
2. Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus

تیپ I یک روش مؤثر و مفید است [۳]، اما معمولاً نمونه‌های بافتی مناسب کمی می‌توان پیدا کرد که مناسب فردگیرنده باشد. برای پیوند لازم است که پانکراس فرد دهنده هم خوب عمل کند و هم اندازه آن با اندازه پانکراس فردگیرنده تقریباً یکسان باشد [۴]. هر فردی متناسب با وزن خود تعداد مشخصی جزایر پانکراسی دارد که اندازه جزایر لانگرهانس نیز متناسب با وزن افراد است. از مشکلات دیگر این روش درمانی، عمر کوتاه جزایر لانگرهانس است [۵]. یکی دیگر از روشهای درمانی، تغییرات ژنتیکی است که در دودمانهای سلولی نامیرا روی می‌دهند به‌طوری‌که آنها را تبدیل به سلولهای مولد انسولین می‌کنند اما این روش دارای محدودیتهایی نیز است، یکی از مشکلات توموری بودن این سلولها است که به راحتی نمی‌توان در درمان افراد مبتلا استفاده کرد [۶]. مشکل دیگر ناپایداری ژنی است که باعث تمایز نادرست این سلولها به سمت دیگر انواع سلولی می‌شود [۷]. یک راه درمانی جدید و موفق استفاده از بن‌یاخته‌های جنینی[1] است [۸].

بن‌یاخته‌های جنینی از دسته سلولهای بنیادی پرتوانی[2] می‌باشد که توانایی تبدیل به انواع سلولها از جمله سلولهای ماهیچه‌ای [۹] عصبی [۱۰]، خونی [۱۱] و غیره را دارند. بن‌یاخته‌های جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست به‌دست می‌آیند [۱۲]. از جمله خصوصیت مهم دیگر این سلولها، تقسیمات متوالی و پی‌درپی آنها است به طوری‌که می‌توانند بعد از این تقسیمات متوالی باز خصوصیت پرتوانی خود را حفظ کنند [۱۳]. از جمله سلولهایی که از بن‌یاخته‌های جنینی به‌دست آورده‌اند سلولهای مترشح انسولین است [۱۴ و ۱۵]. در محیط آزمایشگاه برای به‌دست آوردن سلولهای مولد انسولین از بن‌یاخته‌های جنینی، از اجسام شبه جنینی[3] استفاده می‌کنند. اجسام شبه جنینی در واقع ساختارهای کروی از سلولها هستند که سلولهای آن ژنهای سه لایه جنینی اکتودرم، مزودرم، اندودرم را بیان می‌کنند [۱۶]. سلولهای مولد انسولین که از بن یاخته‌های جنینی در محیط آزمایشگاه به‌دست می‌آیند، می‌توانند دیابت القاء شده در موش را درمان کنند[۱۷]. اولین تجربه موفقیت‌آمیز تمایز بن یاخته‌های جنینی به سلولهای مترشح انسولین در سال ۲۰۰۰ [۱۸] انجام گرفت. سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به درمان دیابتی که در موش به علت تزریق استرپتوزومایسین حاصل شده بود، بودند. در مطالعه دیگری، توانستند بن‌یاخته‌های جنینی موش را به طور خودبه‌خودی بدون انتخاب روش خاصی به سلولهای مولدانسولین تبدیل کنند، در این روش درصد کمی از سلولهای تمایز یافته قادر به ترشح انسولین بودند (۰/۱ درصد)[۱۶]. در کار دیگری نیز از بن‌یاخته‌های جنینی موفق شدند تعداد زیادی سلول مولد انسولین تهیه کنند. اساس این روش، برمبنای انتخاب سلولهای پیش‌ساز نستین مثبت بود. نستین یک فیلامنت بینابینی است که در سلولهای پیش ساز عصبی یافت می‌شود. البته به‌تازگی یافته‌اند که نستین در سلولهای پانکراس نابالغ که هورمون ترشح نمی‌کنند هم بیان می‌شود. این دسته سلولها در نهایت به سلولهای مولد انسولین و گلوکاگون تبدیل می‌شوند [۱۴].

با تغییرات ژنتیکی که در روش دیگر در سلولها به وجود آوردند و نیز تغییراتی در روش به‌کارگرفته شده قبلی موفق شدند سلولهایی با کارآیی بسیار بالا تولید کند[۴]. بنابراین این مطالعه به منظور تمایز بن‌یاخته‌های جنینی موش به سلولهای مولد انسولین انجام شد تا بتوان راه دیگری برای درمان دیابت یافت.

مواد و روشها

کشت بن‌یاخته‌های جنینی

در این مطالعه از بن‌یاخته‌های جنین رویان B1[4] مشتق از موش نژاد C57BL/6 استفاده شد. این سلولهای دارای کاریوتیپ طبیعی، الکالین فسفاتاز مثبت و دارای مورفولوژی ES[5] بودند [۱۹].

سلولهای فوق روی فیبروبلاستهای جنینی موش و در محیط کشت Knock out D-MEM (Gibco) که شامل افزودنیهای زیر بود کشت شدند: سرم جنین گوساله ۲۰ درصد (Fetal Calf Serum)، ال - گلوتامین ۲mM(Gibco)، اسیدهای آمینه غیرضروری ۱ درصد (Gibco)، بتا - مرکاپتواتانل ۰/۱mM (Sigma)، پنی‌سیلین ۱۰۰iu/ml (Gibco)، استرپتومایسین ۱۰۰μg/ml (Gibco)، فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (ESGRO)[6].

1. Embryonic Stem Cell
2. Pluripotent
3. Embryoid Body
4. Royan B_1
5. Embryonic stem cell
6. Leukemia Inhibitory Factor

تمایز بن‌یاخته‌های جنینی

در ابتدا بن‌یاخته‌های جنینی موشی تکثیر یافته در قطرات آویزان که در هر قطره ۵۰۰ سلول قرار داشت به مدت دو روز در محیط کشت، بدون LIF، کشت داده شدند. در پایان دو روز اجسام شبه جنینی تشکیل شده به پلیت باکتریایی (Ginger) به مدت دو روز به‌صورت سوسپانسیون در محیط کشت مزبور کشت داده شدند. بعد از دو روز، سی عدد جسم شبه جنینی به یک خانه از ظرف ۶ خانه (TPP) منتقل شدند تا اجسام جنینی به کف ظرف چسبیده و رشد کنند. محیط در این مرحله همان محیط کشت فوق است. انتخاب سلولهای پیش‌ساز انسولینی براساس روش Lumelsky [۱۴] و همکارانش در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت. روز بعد که اجسام شبه جنینی به کف پلیت چسبیدند محیط کشت Dulbecc's MEM/Nut MIX F12(Gibco) با افزودنیهای زیر جایگزین محیط قبلی شد: انسولین (Fluka) با غلظت ۵μg/ml، فیبرونکتین (Sigma) ۵μg/ml، سدیم سلنایت (Sigma) ۳۰nM، آپو - ترانسفرین (Sigma) ۵۰μg/ml، در این مرحله، محیط کشت هر دوروز یکبار تعویض شد. طول مدت این مرحله ۶ روز است. در این مرحله ایمونوسیتوشیمی برای بررسی تجلی نستین انجام شد.

در روز ۸+۴، با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ ۰/۵۳mM(Gibco)EDTA، اجسام شبه جنینی به صورت تک‌سلولی درآمده و در پلیت ۲۴ خانه (TPP) که از قبل با کاور اسلیپهایی[1] که پوشیده از پلی - لامی‌نین (invitrogen)۱μg/ml و پلی - ال - اورنی تین (Sigma)۱۵μg/ml بودند کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله DMEM/F12 به همراه افزودنیهای زیر بود: لامی‌نین ۱μg/ml، B27 (Gibco) ۲ درصد، N2(Gibco) ۱ درصد، bFGF (Sigma)۱۰ng/ml. در پایان این مرحله سلولهای پیش‌ساز بخش اندوکرینی پانکراس تکثیر شدند و آماده‌اند تا وارد مرحله نهایی که تمایز آنها است وارد شوند. در این مرحله محیط کشت به صورت یک روز در میان تعویض شد. مدت کشت ۶ روز است. N_2 شامل انسولین ۵۰۰μg/ml، ترانسفرین ۱۰mg/ml، پروژسترون ۰/۶۳μg/ml، پوترسین ۱/۶۱۱mg/ml و سلنایت ۰/۵۲μg/ml است.

در روز ۱۴+۴ محیط کشت DMEM/F12 به همراه افزودنیهای زیر جایگزین محیط قبلی شد و یک روز در میان محیط کشت عوض شد: B27 ۲ درصد، N2 ۱ درصد، نیکوتینامید (Sigma)۱۰mM، سرم جنین گوساله ۱۰ درصد. در پایان روز ۲۱+۴ سلولها مورد ارزیابی ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند.

ایمونوسیتوشیمی

برای ارزیابی سلولهای تمایز یافته، در روز ۲۱+۴، سلولها با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شده سپس با ترتیون x۱۰۰ (۰/۲ درصد) به مدت ۵ دقیقه نفوذپذیر شدند. بعد از نفوذپذیرشدن، سلولها با سرم بز ۱۰ درصد به مدت یک ساعت تیمار داده شد. سپس از آنتی‌بادیهای مونوکلونال اولیه انسولین (Sigma ۱:۱۰۰)، گلوکاگون (Sigma ۱:۵۰۰)، سوماتوستاتین (Chemicon ۱:۱۰۰)، PP (Chemicon ۱:۱۰) استفاده شد.

سپس سلولها دوبار با PBS[2] شستشو شدند. برای شناسایی از Ab[3] ثانویه استفاده شد. آنتی‌بادی ثانویه‌ای که در طی ایمونوسیتوشیمی مورد استفاده قرار گرفت به ترتیب زیر بود:
Flourecence isothiocyanate (FITC) - Conjugated anti-mouse IgG - Flourecence isothiocganate (FITC) - Conjugated anti-Rabbit IgG

سلولها یک ساعت با Ab ثانویه تیمار شدند. بعد از تیمار با Ab ثانویه، سلولها دوبار با PBS شسته و سپس ارزیابی شدند.

ارزیابی ترشح انسولین

سلولها در روز ۲۲+۴ مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. ابتدا سلولها دوبار با بافر کربس - رینگر[4] که شامل ۱۲۰mM)Nacl، ۵mM)Kcl، ۲/۵mM)Cacl2، ۱۰(Mgcl$_2$) mM، 25mM)$NaHCO_3$ Buffer و BSA ۰/۱ درصد است. دوبار شستشو شد و سپس به سلولها بافر به همراه ۰/۱ درصد BSA و نیفیدیپین (۵mM) اضافه شد. سلولها به مدت سی‌دقیقه انکوبه شده و بعد محیط رویی جمع‌آوری شد [۲۰]، به سلولها دوباره بافر کربس - رینگر به همراه BSA ۰/۱ درصد اضافه شد. سلولها ۵ دقیقه انکوبه شده و محیط رویی آنها جمع‌آوری شد. درمرحله بعدی سلولها به مدت ۵ دقیقه با

1. Cover slipp
2. Dulbeco's Phosphate Buffered Salin
3. Antibody
4. Krebs-Ringer

بافرکربس ـ رینگر به همراه BSA و گلوکز (5mM) یا (50mM) انکوبه شدند و ۵ دقیقه بعد محیط رویی برای ارزیابی میزان ترشح انسولین جمع‌آوری شد. ارزیابی توسط کیت Source INS - IRMA Kit Bio انجام شد.

RT-PCR

در ابتدا با استفاده از محلول RNX-plus^{TM} (سیناژن)، کل موجودی RNA سلولی از بن‌یاخته‌های جنینی موشی رویان B1 و سلولهای تمایز یافته به سلولهای مولد انسولین استخراج شد. قبل از انجام نسخه‌برداری معکوس، نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با DNase I (104132,Roch) قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد.

۲ میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته و با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (K 1622 Fermentas) Revert AidTMH Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس انجام شد. سپس روی cDNA تولیدشده PCR صورت گرفت؛ برای این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند: (۵۰ng/μl) cDNA ۲μl، PCR Buffer(AMS)(۱۰×) ۲/۵μl، MgCl2(۵۰mM) ۰/۷۵μl، dNTPmix(۱۰mM) ۰/۵μl از هر پرایمر (۱۰μM) ۱μl، SmarTaq μl(۵unit/۱μl) ۰/۵ (سیناژن، TA8110C) و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵μl رسانده شد. برای پی‌بردن به بیان ژنهای مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای زیر استفاده شد:

نام	توالی	اندازه	آنلینگ
انسولین	5′CCTGCTGGCCCTGCTCTT3′ 5′AGGTCTGGAGGTCACCTGCT3′	۲۱۲	۵۷°C
گلوکاگون	5′CAGAGGAGAACCCCAGATCA3′ 5′TCATGACGTTTGGCAATG3′	۲۰۲	۶۱°C
α-آمیلاز ۲A	5′TTCTGCTGCTTTCCCTCATT3′ 5′CATTGTTCACCTTGTCACC3′	۳۰۰	۵۵°C
کربوکسی پپتیداز A	5′GGCAACCAAGAGTTATGGAA3′ 5′CCAGGTCATAAACCCAGCT3′	۵۲۱	۵۵°C
۴-Oct	5′GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC3′ 5′CATACTCGAACCACATCCTTCTCT3′	۳۱۷	۷۰°C
β-توبولین	5′GGAACATAGCCGTAAACTGC3′ 5′TCACTGTGCCTGAACTTACC3′	۳۱۷	۶۰°C

شرایط PCR به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳ : Tm درجه سانتی‌گراد)، ۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد، ۳) هر Annealing۴۵ ثانیه، با توجه به پرایمرهای هر ژن که در بالا ذکر شده است. ۴) Extension سیکل: ۴۵ درجه سانتی‌گراد ثانیه (۷۲ درجه سانتی‌گراد)، ۵) Extension زمانی: ۱۰ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت شدند.

یافته‌ها

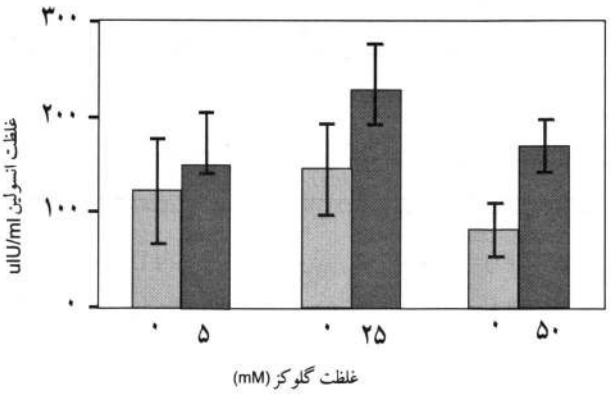
مراحل تولید سلولهای مولد انسولین از بن‌یاخته‌های جنینی به ۵ مرحله قابل تقسیم است که [۱۴ و ۲۰]. مرحله اول، تکثیر بن‌یاخته‌های جنینی با حضور سلولهای تغذیه کننده و LIF که در محیط کشت خاص خود صورت می‌گیرد؛ با حذف LIF و تشکیل اجسام شبه جنینی، بن‌یاخته‌های جنینی می‌توانند به هر یک از انواع سلولی تمایز پیدا کنند، اجسام شبه جنینی، ساختارهای پیچیده‌ای هستند که متناسب با تعداد سلول تشکیل دهنده آن به سمت یک نوع خاص از سلولها پیش می‌روند؛ مرحله دوم، تولید اجسام شبه جنینی [۱۰]؛ مرحله سوم، انتخاب سلولهای نستین مثبت می‌باشد که سلولها در محیط فاقد سرم کشت داده می‌شوند و تنها سلولهای نستین مثبت در محیط باقی مانده و بقیه سلولها می‌میرند [۴] ؛ مرحله چهارم، تکثیر سلولهای پیش ساز اندوکرینی پانکراس است. در این مرحله سلولهایی که باقی مانده‌اند با استفاده از فاکتور رشد bFGF شروع به تکثیر می‌کنند و مرحله پنجم القای تمایز و سلولهای مولد انسولین با استفاده از فاکتور خاص نیکوتین آمید است.

bFGF باعث بلوغ و تمایز سلولهای پیش‌ساز مولد انسولین می‌شود [۷]. نقش فاکتورهای خارجی که در تشکیل سلولهای بخش اندوکرینی پانکراس دخالت می‌کنند از اهمیت زیادی . برخوردار است. از آن جمله نیکوتین آمید است [۲۱] نیکوتین آمید بازدارنده پلی سنتاز (ریبوز ـ ADP) است که باعث تمایز و افزایش تعداد سلولهای بتا می‌شود. نیکوتین آمید در بیان ژن NKx6.1 (ژن مؤثر در تمایز نهایی سلولهای مولد انسولین) نقش

بسیاری دارد [۲۲] بقای سلولهای مولد انسولین پانصد هزار برابر در حضور نیکوتین آمید زیادتر می‌شود [۲۳].

با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی معلوم شد که با استفاده از روش فوق هر ۴ دسته سلولهای α β γ و pp بخش اندوکرین پانکراس تولید شده‌اند (اشکال D,C,B,A).

نتایج RT-PCR معلوم کرد که سلولهای تمایز یافته حاصل قادر به بیان ژنهای انسولین، گلوکاگون، کربوکسی پپتیداز و آمیلاز می‌باشند (شکل ۲). انسولین و گلوکاگون از شاخصهای سلولهای اندوکرینی پانکراسی‌اند در حالی که کربوکسی پپتیداز و آمیلاز از دسته آنزیمهای شاخص بخش اگزوکرینی پانکراس‌اند. در حالی که این سلولها نمی‌توانند ژن Oct-4 راکه از ژنهای شاخص بن یاخته‌های جنینی است بیان کنند. سلولها در روز ۲۲+۴ از نظر ترشح انسولین ارزیابی شدند. در غلظتهای مختلف گلوکز ۲۵mM و ۵۰mM، میزان ترشح انسولین سنجیده شد مقادیر ترشح انسولین از سلولهای مولد انسولینی را در روز ۲۲+۴ می‌توانید در نمودار ۱ ملاحظه کنید. در غلظتهای مختلف گلوکز، میزان ترشح انسولین چندان فرقی نمی‌کند.



نمودار ۱. ارزیابی ترشح انسولین بعد از افزودن گلوکز با استفاده از روش رادیوایمونواسی. ستون سفید رنگ غلظت انسولین را زمانی که هنوز گلوکزی به محیط اضافه نشده است، نشان می‌دهد ولی ستون تیره رنگی که در کنار آن است، غلظت انسولین را در غلظتهای متفاوت گلوکز (۵mM, ۲۵mM, ۵۰mM) نشان می‌دهد.

بحث

توانایی تبدیل بن‌یاخته‌های جنینی به انواع مختلفی از سلولها امکان جدیدی را در روشهای درمانی برخی بیماریها برای محققین فراهم می‌سازد. به طور مثال بیماری پارکینسون، که نتیجه تخریب نورونهای دوپامنیرژیک در منطقه‌ای خاص در مغز است، و یا دیابت که در آن سلولهای مولد انسولین تخریب می‌شوند، با استفاده از سلولهای حاصل از تمایز بن‌یاخته‌های جنینی درمان می‌شوند [۲۴]. از جمله مراحل مهم در استفاده از بن‌یاخته‌های جنینی برای درمان بیماریها طراحی یک روش موفق برای تبدیل بن‌یاخته‌های جنینی به آن سلولهای تمایز یافته خاص است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بن‌یاخته‌های جنینی رویان B1 قابلیت زیادی برای تبدیل به سلولهای مولد انسولین دارند.

برای تولید سلولهای مولد انسولین از بن‌یاخته‌های جنینی از دو روش کلی استفاده می‌شود: روش اول تمایز مستقیم است که در آن با اضافه کردن فاکتورهای رشد و القا گرها، بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین پیش می‌روند، با استفاده از همین روش دانشمندان موفق شده‌اند سلولهای چربی، ماهیچه‌ای صاف، ماهیچه‌ای اسکلتی و خونساز از بن‌یاخته‌ها بسازند. تولید سلولهای اندودرمی از بن‌یاخته‌های جنینی تا اندازه‌ای مشکل است، توالی اتفاقاتی که برای بن‌یاخته‌ها رخ میدهد، نیز فاکتورهای رشد دخیل، واکنشهای سلول ـ سلول و فاکتورهای خارج سلولی که در تشکیل سلولهای اندودرمی دخالت دارند هنوز احتیاج به مطالعات بیشتری دارد. تولید اجسام شبه جنینی شرایط مناسبی را برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای اندودرمی، مزودرمی، اکتودرمی به‌وجود می‌آورد. در اجسام شبه جنینی بن‌یاخته‌ها در وضعیت مناسبی قرار می‌گیرند؛ به‌طوری که از نظر واکنشهای سلول ـ سلول و تولید فاکتورهای رشد شرایط مناسبی را برای تمایز به‌وجود می‌آورند [۱].

در روش به‌کارگرفته شده در این مطالعه، با استفاده از یک روش چند مرحله‌ای ابتدا سلولهای نستین مثبت و بعد پیش سازهای سلولهای مولد انسولین تکثیر شده و در فاز آخر نیز سلولهای مولد انسولین نابالغ تمایز نهایی پیدا می‌کنند.

نستین یک پروتئین فیلامنت بینابینی است که به طور معمول در پیش سازهای سلولهای عصبی یافت می‌شود. چون

نستین در تعدادی از سلولهای پانکراسی نابالغ که قادر به ترشح هورمون نیستند، بیان می‌شود و در مراحل بعدی این سلولها قادر به ترشح انسولین و گلوکاگون می‌شوند، به همین دلیل برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین، روشی به کار گرفته شد که در آن ابتدا تعداد سلولهای نستین مثبت افزایش پیدا کند. مطالعات انجام گرفته جدید راجع به اینکه آیا واقعاً سلولهای نستین مثبت، سلولهای پیش‌ساز بخش اندوکرین پانکراسی‌اند یا نه با تردید برخورد می‌کنند [۲۵]. پیش سازهای سلولهای جزایر پانکراسی که نستین مثبت هستند ممکن است در عصب‌زایی و اطراف جزایر لانگرهانس پانکراس دخالت داشته باشند [۲۶].

روش دیگر انتخاب سلولی است که در آن فقط سلولهای مترشح انسولین باقی می‌مانند. در روش قبلی مخلوطی از سلولها به دست می‌آید که برای پیوند مناسب نیستند. با استفاده از انتخاب ژنتیکی، تنها سلولهایی می‌مانند که فنوتیپ خاصی را بیان می‌کنند. به بن‌یاخته‌های جنینی ژن کایمری حامل ناحیه تنظیم کننده بیان ژن انسولین و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک وارد می‌کنند. سلولهایی که پروموتوژن انسولین آنها بیان می‌شود، در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک می‌توانند باقی بمانند [۱].

روش جدید دیگری که برای تولید سلولهای مولد انسولین انجام شده است و می‌توان گفت ترکیبی از دو روش فوق است دارای سه مرحله است. درمرحله اول به بن‌یاخته‌های جنینی موشی پلاسمید حاوی پروموتوژن NKx6.1 و ژن مقاوم به نئومایسین وارد می‌کنند. در فاز دوم این سلولها را تحت‌تأثیر فاکتورهایی قرار می‌دهند که در تشکیل بخش اندوکرین پانکراس دخالت دارند، ابتدا در این فاز مقدار FCS را از ۱۵ درصد به ۳ درصد کاهش می‌دهند و بعد سلولها را با آنتی‌بادی سونیک هیچاک[1] و نیکوتینامید تیمار می‌کنند. در فاز سوم با استفاده از محیط کشت حاوی نئومایسین فقط سلولهایی می‌ماند که ژن انسولین را بیان می‌کنند. سلولهای حاصل بعد از پیوند به موش دیابتی قادر به درمان آن شدند و در عین حال نشانه‌ای از توموری شدن سلولها نیز دیده نشد [۲۳].

مهمترین نقش سلولهای بتای پانکراسی ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز است. در مطالعه صورت گرفته با استفاده از تکنیک RT-PCR نشان داده شد که سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به بیان ژنهای بخش اندوکرین پانکراس (انسولین، گلوکاگون) هستند. با استفاده از ایمونوسیتوشیمی معلوم شد که هرچهار دسته سلولهای بخش اندوکرینی تولید شده‌اند (α، β، γ، pp). این سلولها قادر به ترشح انسولین نیز هستند، اما لازم است این سلولها مقدار انسولینی معادل مقدار طبیعی آن در شرایط *in vivo* تولید کنند و در عین حال، ترشح آن تنظیم شده باشد. سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به ترشح تنظیم شده نیستند. می‌توان گفت که ممکن است این وضعیت نتیجه دو عامل زیر باشد: اول آنکه چون سلولها در مرحله نهایی تمایزشان از محیط کشت حاوی غلظت گلوکز بالا استفاده شده است، بنابراین حساسیت این سلولها نسبت به مقادیر مختلف گلوکز از بین رفته است [۷ و ۲۰]. Assady S. و همکارانش در تمایز جنینی بن یاخته‌های جنینی به سلولهای مولد انسولین نیز همین نکته را متذکر شدند. آنها از روش تمایز خودبه‌خودی بن یاخته‌های جنینی به سلولهای مولد انسولین استفاده کردند، در دو غلظت متفاوت ۵/۵mM و ۲۵mM گلوکز سلولها مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در این دو غلظت مقدار ترشح انسولین یکسان دیده شد [۷]. در کار دیگری که توسط Shiroi A. و همکارانش [۱۶] صورت گرفت، بن‌یاخته‌های جنینی موشی ابتدا به صورت اجسام شبه جنینی کشت شدند و سپس به ظروف ژلاتینه منتقل شدند. بعد از کشت بیست و هشت روزه، سلولها مورد ارزیابی ترشح انسولین قرارگرفتند. در غلظتهای بالای گلوکز، هیچ افزایشی در ترشح انسولین مشاهده نشد. محیط مورد استفاده تا مرحله نهایی تمایز سلولها حاوی غلظت گلوکزی معادل ۴/۵mg/ml بود. و دوم آنکه ممکن است این سلولها، سلولهای بتای حقیقی نباشند [۲۵]. سلولهای بتا دارای خصوصیات منحصر به فردی هستند از آن جمله: ۱) سنتز و ذخیره انسولین و پلی‌پپتید آمیلوئید جزایر[2]، ۲) ترشح تنظیم شده انسولین، ۳) اگزوسیتوز، ۴) ترشح انسولین که با تحریک گلوکز صورت می‌گیرد، ۵) گلوکوژئونز، ۶) متابولیسم چربی [۲۷]. انسولینی که به محیط کشت ترشح می‌شود ممکن است در نتیجه جذب انسولین از محیط کشت توسط سلول و بعد

1. anti-sonic hedgehog
2. Islet Amyloid Poly Peptide

رهایی آن به محیط کشت باشد [۲۵]، البته هنوز معلوم نیست که چگونه چنین اتفاقاتی در مطالعات گذشته [۱۴ و ۲۰] باعث گرفتن جواب مثبت از سلولهای مولد انسولین شده است. این احتمال وجود دارد که سلولهایی که انسولین ترشح می‌کنند در نهایت بعد از یک کشت طولانی‌مدت به سلولهای عصبی تبدیل شوند [۲۵].

بن‌یاخته‌های جنینی انسان و موش دارای توانمندیهای زیادی هستند از جمله خصوصیات مهم آن این است که می‌توانند به طور نامحدودی تکثیر شوند که این خصوصیت بن‌یاخته‌ها می‌تواند بعد از پیوند به حیوانات مدل آزمایشگاهی مشکل ساز شود. طی تمایز بن‌یاخته‌ها به سلولهای مولد انسولین، تعدادای از سلولها به‌صورت تمایز نیافته باقی می‌مانند، این دسته سلولها پتانسیل توموری شدن پیدا می‌کنند، این‌طور به نظر می‌رسد که در راهکارهای پیشنهادی برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سلولهای مولد انسولین چون از فاکتورهای رشد خارج سلولی استفاده می‌شود؛ هیچ راه حلی برای به‌دست نیاوردن سلولهای توموری وجود ندارد، البته می‌توان گفت روش انتخاب سلولی که برای تمایز بن‌یاخته‌ها استفاده می‌شود، چون در آن یک ژن مقاوم به دارو تحت کنترل پروموتورژن مورد نظر قرار می‌گیرد و سلولهایی که فقط خصوصیت دلخواه را دارند، می‌توانند در محیط حاوی دارو رشد کنند و تا اندازه‌ای سلولهای تمایز یافته غیردلخواه و توموری در آن حذف می‌شوند، روش تقریباً مناسبی است؛ اما این روش بازده کمی دارد. طراحی یک روش که بتوان فقط در طی آن جزایر پانکراسی را تولید کرد و آنها را تا بلوغ نهایی پیش برد به‌طوری‌که برای درمان دیابت مناسب شود مسئله مهمی است که اگر حل شود قدم بزرگی برای درمان دیابت برداشته شده است.

ظهور ابزار و تجهیزات جدید در زمینه سلولی و مولکولی به طور حتم می‌تواند کمک شایانی به پیشرفت تحقیقاتی که در زمینه تمایز بن‌یاخته‌های جنینی صورت می‌گیرد، کند. امید است که در سایه این پیشرفت بتوان عملاً به کاربرد کلینیکی سلولهای مولد انسولین تمایز از بن‌یاخته‌ها نزدیک شد [۲۸].

تقدیر و تشکر

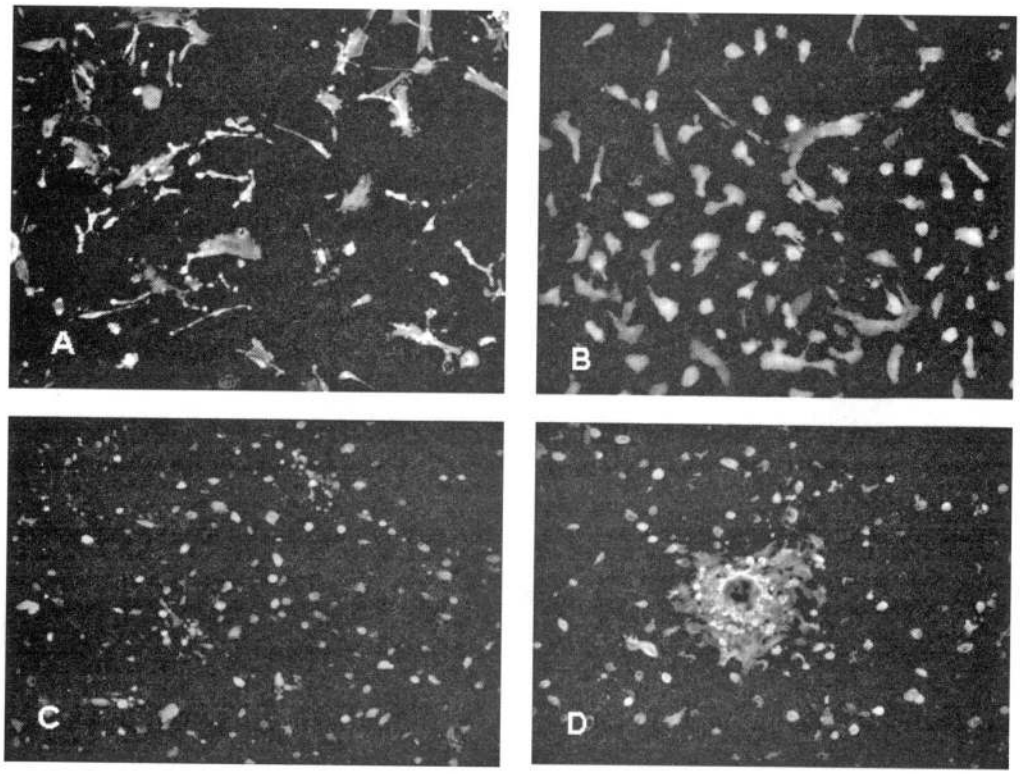
این مطالعه براساس طرح تمایز سلولهای بنیادی جنینی موشی به سلولهای مولد انسولین، مشترک بین پژوهشکده رویان و مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران است. این مطالعه به صورت مشترک از سوی هر دو مرکز و شبکه پزشکی مولکولی است. بدینوسیله نویسندگان مقاله از مسئولین هر دو مرکز و ریاست محترم شبکه پزشکی مولکولی کشور قدردانی می‌نمایند.

References

1. **Soria B, Skoudy A, Martin F.** From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. Diabetologia 2001; 407-15.
2. **Ianus A, Holz G, Theise N, Hussain M.** In vivo derivation of glucose- competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. J Clin Invest 2003; 111: 843-50.
3. **Soria B.** In vitro differentiation of pancreatic β-cells. Differentiation 2001; 68: 205-19.
4. **Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus A.** Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin - producing cell. PNAS 2003; 100: 998-1003.
5. **Hori Y, Rulifson I, Isai B, Heit J, Cahoy J, Kim S.** Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. PNAS 2002; 99: 16105-10.
6. **Hourd N, Rousseau G, Lemaigre F.** HNF-6-independent differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. Diabetologia 2003; 46: 378-85.
7. **Assadys S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J. Skorecki K, Tzukerman M.** Insulin production by Human embyronic stem cells. Diabetes 2001; 50: 1691-7.
8. **Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat- Waser R, Montanya E, Martin F, Soria B.** Stem cells and diabetes. Biomed Pharmacother 2001; 55: 206-12.
9. **Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Young HT, Anisimor SV, Wobus AM.** Differentiation of pluripotent

embryonic stem cells into cardiomycytes. Circ Res 2002; 91: 189-201.

10. **Rolletschek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M, Wobus AM.** Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting-factors. Mech Dev 2001; 105: 93-104.
11. **Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S.** FIK1- positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 2000; 408: 92-6.
12. **Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht- Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter M, Itskovitz-Eldor J.** Differences between human and mouse emryonic stem cells. Dev Biol 2004; 269: 360-80.
13. **Levenberg S, Huang N, Lavik E, Rogers A, Itskovitz-Eldor J, Langer R.** Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. PNAS 2003; 100: 12741-6.
14. **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.
15. **Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B.** In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin- producing cells. Diabetologia 2004; 47: 1442-51.
16. **Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, Takahashi Y.** Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc- chelating dithizone. Stem Cells 2002; 20: 284-92.
17. **Zhou X, Gruss P.** Taking stock of pancreatic stem cells. Klinik & Forschung 2002; 8: 51-2.
18. **Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig J.A, Martin F.** Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin- induced diabetic mice. Diabetes 2000; 49: 157-62.
19. **Baharvand H, Matthaei KI.** Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40: 67-81.
20. **Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Dldor J.** Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. Stem Cells 2004; 22: 265-74.
21. **Stoffel M, Vallier L, Pedersen R.** Navigating the pathway from embryonic stem cells to beta cells. Seminars in Cell & Developmental Biology 2004; 15: 327-36.
22. **Vaca P, Berna G, Martin F, Soria B.** Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells. Transplant Proce 2003; 35: 2021-3.
23. **Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B.** In vitro directed differentiationof mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. Diabetologia 2004; 47: 1442-51.
24. **Czyz J, Wiese C, Rolleschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wbous A.** Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. Biol Chem 2003; 384: 1391-409.
25. **Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbutt G, Bleackley R.** Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. Diabetologia 2004; 47: 499-508.
26. **Chun Meng Shi, Tian-Min Cheng.** Differentiation of dermis- derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro. World J Gastroenterol 2004; 10: 2550-2.
27. **Weir G.** Can we make surrogate β-cells better than the original? Seminars in cell & Developmental Biology 2004; 15: 347-57.
28. **Blyszczuk P, Wobus M.** Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. J Biotechnol 2004; 113: 3-13.



شکل ۱. تولید پانکراس از بن‌یاخته‌های جنینی سلولهای بخش اندوکرینی با روش تمایز مستقیم. با تکنیک ایمونوسیتوشیمی می‌توان ثابت کرد سلولهای مولد انسولین (A)، سلولهای مولد گلوکاگون (B)، سلولهای مولد سوماتوستاتین (C)، سلولهای مولد پلی‌پپتید پانکراسی (D) تولید شده‌اند.

شکل ۲. نتایج RT-PCR نشان داد که سلولهای تمایز یافته قادر به بیان ژنهای بخش اندوکرینی (انسولین، گلوکاگون) و ژنهای بخش اگزوکرینی (کربوکسی پپتیداز -A و α ـ آمیلاز 2A) هستند.