مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۲/ ۱۰۲-۹۱

مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان ژن هموباکس دئودنال 1 در سلول های تولید کننده انسولین، مشتق از سلول های بنیادی کارسینومای جنینی

اکرم منصوری بیدکانی[۱*]، دکتر فریبا اسماعیلی[۲،۱]، دکتر فریبا هوشمند[۳]، زهره حاجی شریفی[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲] پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۲ اصلاح نهایی: ۹۱/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: **درک عملکرد سلول های بتا در سطح مولکولی به احتمال زیاد توسعه تکنیک های تولید سلول های بتا را تسهیل می کند. این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن هومئوباکس دئودنال ۱ (*pdx-1*) در سلول‌های تمایز یافته طراحی و اجرا شد.**

روش بررسی: **این مطالعه بنیادی-کاربردی بر روی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های انسولین‌ساز انجام گرفت. محیط ثانویه حاصل از کشت پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش برای تمایز سلول‌های P19 استفاده شد. اجسام شبه جنینی (EBs) با کشت معلق ۲۴ ساعته سلول‌های P19 تشکیل شدند. برای القای تمایز، غلظت‌های متفاوت محیط ثانویه (۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪) به محیط کشت اضافه شد. جهت شناسایی سلول‌های تمایز یافته مشتق از EBs در شرایط آزمایشگاهی از رنگ آمیزی دیتیزون استفاده شد. تولید انسولین-پروانسولین و رسپتور بتای انسولین در این سلول ها به روش ایمنوفلورسنس تعیین و بیان ژن *pdx-1* به وسیله واکنش زنجیره پلی‌مراز-رونویسی معکوس ارزیابی شد. داده ها با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل شدند.**

یافته‌ها: **پس از هفت روز القا، دستجات سلولی تمایز یافته ظاهر شدند. اوج پاسخ‌گویی تمایزی مربوط به غلظت ۵۰٪ از محیط ثانویه بود. بیان ژن *pdx-1* در دستجات سلولی تمایز یافته مشاهده شد. بیان نشانگرهای انسولین-پروانسولین و رسپتور بتا در سلول‌های تمایز یافته به روش ایمنوفلورسنس اثبات شد.**

نتیجه‌گیری: **محیط ثانویه پانکراس باعث تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های انسولین ساز شد، لذا نتایج این مطالعه می تواند تولید سلول های بتا را از سلول های بنیادی تسهیل نماید.**

واژه های کلیدی: انسولین-پروانسولین، سلول‌های بنیادی، رسپتور بتا، ژن هومئوباکس دئودنال 1، محیط کشت ثانویه.

مقدمه:

دیابت نوع یک یا دیابت وابسته به انسولین به علت تخریب خود ایمنی سلول‌های بتای پانکراس به وجود می‌آید (۱). تا به امروز هیچ روش قطعی و اساسی برای معالجه این بیماری کشف نشده است. البته استفاده از انسولین تزریقی و پیوند درمانی (پیوند پانکراس یا جزایر لانگرهانس) از جمله راه های درمانی هستند که هر کدام مشکلات خاص خود را دارند. اخیراً نشان داده شده است که پیوند جزیره (Islet transplantation) به افراد مبتلا به دیابت نوع یک و مدل‌های جانوری این بیماری، تا حدودی باعث تنظیم قند خون در حد طبیعی می‌شود. جهت پیوند عضو به یک فرد بیمار، پانکراس چندین جسد مورد نیاز است. محدود بودن منبع بافتی

*نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۹۳۸۱۷۳۸۸۰۳۶،
E-mail:akram.mansouri1364@gmail.com

عضو دهنده از یک طرف و افزایش روزافزون متقاضی از طرف دیگر، استفاده از این روش درمانی را بسیار محدود کرده است. استفاده از سلول های بنیادی که دارای قدرت تکثیر و تمایز به سلول های انسولین ساز هستند، شاید بتواند نقص عملکرد سلول های بتا را به طور کامل و همیشگی جبران نماید (۲). سلول‌های کارسینومای جنینی یا سلول های EC (Embryonal carcinoma cells) از انواع سلول‌های بنیادی هستند که از توده سرطانی تراتوکارسینوما مشتق شده اند (۳). سلول های EC مانند دیگر سلول های بنیادی نامیرا بوده و قدرت تکثیر بالایی در محیط کشت دارند (۴). از انواع سلول‌های کارسینومای جنینی می توان رده سلولی P19 را نام برد. سلول های P19 از تراتو کارسینومای القا شده در موش نژاد C3H/He بدست آمده و دارای کاریوتیپ طبیعی هستند (۵). این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های شبه آندودرم، شبه نورواکتودرم یا سلول های شبه ماهیچه‌ای تمایز یابند (۶).

فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول های بنیادی جنینی اثر می‌گذارند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای محلول (Soluble factors) مختلف اشاره نمود. در طی مراحل جنین زایی پانکراس، پیام‌های سلولی، تمایز این اندام را تنظیم می‌کنند (۷). پانکراس در حال تکوین، فاکتورهایی را تولید می‌کند که باعث تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تولید کننده انسولین در محیط کشت می‌شود. محیط کشت ثانویه پانکراس (Pancreas conditioned medium=PCM) حاوی فاکتورهایی مانند فاکتور شبه انسولینی II (Insulin like growth factor II= IGFII) و فاکتور رشد عصب (Neural growth factors=NGF)، فاکتور رشد فیروبلاستی (fibroblastic growth factor= FGF)، اکتیوین و رتینوئیک اسید بوده و می‌تواند به تمایز سلول‌های بتای پانکراس کمک نماید (۸). در طی تکوین، آندودرم روده جلویی که برای ایجاد پانکراس اختصاصی شده است شروع به بیان فاکتور رونویسی *PDX-1* می‌کند. جوانه های پشتی و شکمی پانکراس دچار درون پیچ‌خوردگی شده و انشعابات اپی تلیومی آن ها پس از تکثیر به مزانشیم اطراف نفوذ می‌کند. همزمان سلول‌های اندوکرین شروع به تمایز می‌کنند تکوین سلول‌های بتا به وسیله پیام‌هایی از مزانشیم پانکراس افزایش می‌یابد. این پیام ها بر تکثیر زودرس سلول‌های پیش‌ساز پانکراتیک اثر مثبت دارند. سلول‌هایی که *pdx-1* را بیان می‌کنند تحت تاثیر مزانشیم اطراف پانکراس به سلول‌های بتا تکوین می‌یابند. ژن *pdx-1* در مراحل ابتدایی تکوین پانکراس، قبل از این‌که مزانشیم اطراف لوله گوارش تجمع یابد بیان می‌شود. در این مرحله از تکوین فاکتور FGF10 با اثر بر بیان ژن *ptf1a* (فاکتور رونویسی مورد نیاز برای تکمیل اختصاصی کردن پانکراس) مشخصات پانکراس را تکمیل می‌کند و این فرایند تا زمان بعد از تولد ادامه می‌یابد (۹).

با توجه به حضور فاکتورهای القا کننده تکوین در بافت پانکراس، در پژوهش حاضر اثر القایی محیط کشت ثانویه پانکراس بر تمایز سلول های بنیادی به سلول های تولید کننده انسولین (Insulin-producing cells= IPCs) مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول های حاصل از تمایز از نظر بیان فاکتورهای اختصاصی سلول های تولید کننده انسولین بررسی شدند.

روش بررسی:

در این پژوهش از نوزاد یک هفته‌ای موش کوچک آزمایشگاهی نژاد balb/c استفاده شد. موش باردار (در زمان انتهای بارداری) از لانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه شده و نوزادان پس از بدنیا آمدن مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا بافت پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش جدا سازی و با محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, 306-00303)، پنی سیلین، استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum, Gibco, A15-151) کشت داده شد. بدین منظور بافت پانکراس جدا سازی و خرد شده و در معرض تریپسین در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از سانتریفوژ و دور ریختن مایع رویی، این بافت

با محیط کشت RPMI-1640 کشت شد. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها چسبیده و شروع به تکثیر کردند. بعد از اینکه سلول‌های کشت داده شده به تراکم قابل قبولی رسیدند با دیتیزون (diphenylthiocarbozone) Merck, DX2370-3,DTZ (شرکت مرک آلمان) رنگ‌آمیزی شدند تا از پانکراس بودن بافت جداسازی شده اطمینان حاصل شود. محیط کشت رویی یا محیط ثانویه حاصل از کشت اولیه پانکراس جمع‌آوری و تا هنگام استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد.

جهت القای تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های انسولین‌ساز از دو روش، تمایز مستقیم و ایجاد سلول‌های نستین (Nestin) مثبت استفاده شد. در هر دو روش ابتدا با استفاده از کشت معلق از سلول های P19، EBs تهیه شد. سپس EBsها به ظروف کشت ژلاتینه منتقل شده و پس از چسبیدن و تکثیر سلولی در معرض غلظت های مختلف عامل القاگر قرار گرفتند. محیط القایی به صورت ترکیبی از محیط کشت پایه و محیط ثانویه پانکراس به نسبت های مختلف تهیه شد. محیط‌های القا شامل: محیط القای ۲۵ درصد (۷۵٪ محیط کشت α-MEM + ۲۵٪ محیط کشت ثانویه) (Gibco, 306-00304)، محیط القای ۵۰ درصد (۵۰٪ محیط کشت α-MEM + ۵۰٪ محیط کشت ثانویه)، محیط القای ۷۵ درصد (۷۵٪ محیط کشت ثانویه + ۲۵٪ محیط کشت α-MEM)، محیط القای ۱۰۰ درصد (فقط محتوی محیط کشت ثانویه) بودند. در مقابل همه گروه های آزمایش، یک گروه کنترل منفی محتوی محیط کشت α-MEM .و فاقد محیط کشت ثانویه در نظر گرفته شد. برای انتخاب سلول‌های نستین مثبت ابتدا EBs با محیط انتخابی فاقد سرم ITSF (Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement, Sigma, 11884) کشت داده شدند و سپس در معرض غلظت های مختلف عامل القاگر قرار گرفتند. در این محیط اکثر سلول‌ها می‌میرند و فقط سلول‌های بیان کننده نشانگر نستین (سلول های نستین مثبت) باقی می‌مانند.

به منظـــور تعیین بهتـــرین غلـــظت محیط کشت ثانویه برای تولید سلول های انسولین ساز، سلول‌های تمایز یافته تیمارهای مختلف با DTZ رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری و درشت نمایی ۱۰X شمارش شدند. جهت شمارش سلول‌های تمایز یافته (که با DTZ به رنگ قرمز ارغوانی در آمده بودند) و سلول‌های تمایز نیافته از لام نئوبار استفاده شد. به این صورت که سلول‌های هر تیمار پس از رنگ آمیزی، تریپسینه شده و بعد از سانتریفوژ شدن و ریختن مایع رویی با میکروسکوپ نوری برای شمارش مشاهده شدند. رنگ آمیزی و شمارش سلولی حداقل پنج بار تکرار شد. اعداد حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

برای بررسی بیان نشانگرهای پروانسولین و رسپتور انسولین در سلول‌های تمایز یافته سلول‌های حاصل از تمـــایز در ظروف ژلاتینه حاوی لامل کشت داده شدنـــد و به روش ایمنوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا سلول‌هـــا به مدت ۵ دقیقه با PBS (Phosphate-buffered saline) شستشو داده شدند. سپس تثبیت سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. جایگاه آنتی ژن‌های غیر اختصاصی با محلول بلاک کننده پوشانده شد. بعد از شستشو با محلول PBS، آنتی بادی اولیه ضد نشانگر انسولین-پروانسولین (Insulin-proinsulin, abcam, ab8304-100) یا ضد نشانگر رسپتور بتای انسولین (Insulin receptor beta, abcam, ab5371-50) اضافه و به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مرطوب نگهداری شد. در نهایت آنتی‌بادی ثانویه (AtiIgG, sigma,F9137) کونژوگه شده با FITC (Fluorescein isothiocyanate) در تاریکی اضافه و به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق در محیط مرطوب نگهداری شد. نمونه‌ها بعد از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در محلول PBS با میکروسکوپ ایمنوفلورسنس مشاهده شدند.

از روش RT-PCR برای ارزیابی بیان رونوشت خاص سلول‌های بتا استفاده شد. ابتدا کل RNA سلولی

استخراج شد. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. یک نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت سنتز cDNA (Fermentas, K1622) نسخه برداری معکوس شد. cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه (این سه مرحله در ۳۵ سیکل انجام شد)، طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. برای پی بردن به بیان ژن *pdx-1* در این تحقیق از پرایمرهای اختصاصی این ژن با مشخصات زیر استفاده شد:

Pdx-1 F: 5′-CCT-TCC-CgT-GGA- TGA-AAT-CC-3′
Pdx-1 R: 5′-GTC-AAG-TTC-AAC-ATC-ACT-GCC-3′

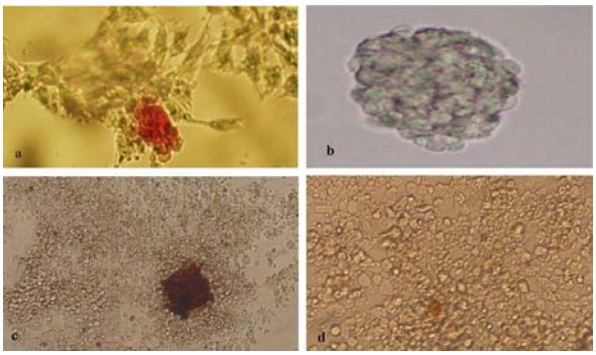
محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد جدا و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و تصویربرداری شد.

یافته‌ها:

در این مطالعه از تمام بافت پانکراس و از فاکتورهای احتمالی مترشحه از مزانشیم اطراف پانکراس به صورت محیط کشت ثانویه استفاده شد.

بعد از چندین بار کشت سلول های پانکراس و همچنین انجماد و ذوب، این سلول‌ها خصوصیات مورفولوژیکی خود را حفظ کردند و با DTZ رنگ شدند. سپس با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. سلول‌های بتای پانکراس به علت دارا بودن گرانول‌های محتوی انسولین به صورت اجتماعات سلولی، قرمز رنگ دیده شدند (تصویر شماره a ۱).

سلول‌های سرطانی جنینی P19 قادر به تشکیل اجسام شبه جنینی به روش کشت معلق بودند (تصویر شماره b۱). در پایان مرحله تمایز، سلول‌های حاوی انسولین به صورت دستجات سلولی قرمز، رنگ گرفتند. بنابراین محیط ثانویه حاصل از کشت پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش توانست به عنوان عامل القایی برای تمایز سلول های P19 به سلول های انسولین‌ساز عمل کند (تصویر شماره c ۱). سلوهای P19 در شرایط آزمایشگاه قادر به تمایز خود به خود به سلول‌های انسولین‌ساز بودند (تصویر شماره d ۱). اما میزان تمایز این سلول‌ها با اثر محیط ثانویه نسبت به تمایز خود به خود سلول‌های P19 به صورت معنی‌داری بیشتر ($P<0/05$) بود و مناسب‌ترین غلظت محیط القایی برای تمایز سلول‌های سرطانی جنینی P19 به سلول‌های انسولین‌ساز



تصویر شماره ۱: رنگ‌آمیزی دیتیزون (DTZ) و تغییرات مورفولوژیکی سلول های P19 پس از قرار گرفتن در معرض محیط کشت ثانویه پانکراس

a: بافت پانکراس موش یک هفته‌ای.

b: اجسام شبه جنینی.

c: رنگ آمیزی دیتیزون (DTZ) سلول‌های انسولین‌ساز. دستجات سلولی قرمز رنگ سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته از سلول‌های P19 تحت تأثیر محیط کشت ثانویه هستند، d: گروه کنترل منفی که در آن اجسام شبه جنینی بدون ماده القا کننده و به طور خودبه خودی تمایز یافته اند.

بزرگنمایی تصاویر a و b ،X۴۰ c و d X۱۰

جدول شماره ۱: اثر محیط کشت ثانویه بر تمایز سلول‌های P19

درصد سلول های تمایز یافته	غلظت محیط کشت ثانویه (درصد)
*۳٤/۲۰٤۰ ± ۱۱/۲۲۹٤۳	٪۲۵
*۸۲/۳۰٤۰ ± ۲۰/٦۳۳۳۱	٪۵۰
*۷۳/۱۰٤۰ ± ۱۷/٦۸۲۳۸	٪۷۵
*۵۷/۵۰٤۰ ± ۱۲/۵٤۵۰۳	٪۱۰۰
۱٤/۱۰٤۰ ± ۳/٤۹٦۰۳	کنترل

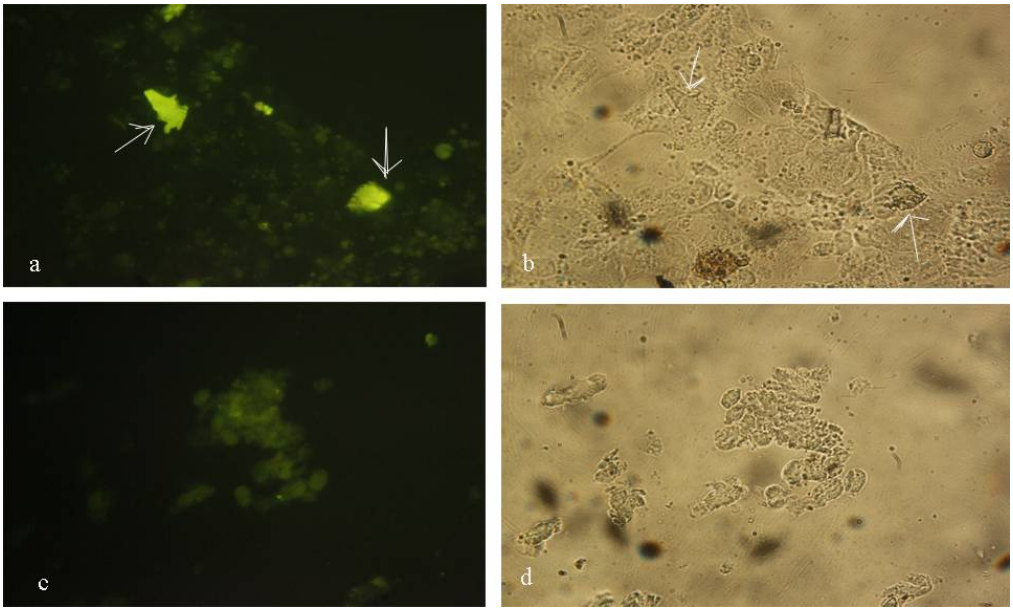
داده‌ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" می باشند.

**: تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) با گروه کنترل (اجسام شبه جنینی کشت داده شده بدون اثر محیط کشت ثانویه).*

غلظت ۵۰ درصد بود (جدول شماره ۱).

بر اساس نتایج به دست‌آمده محیط ثانویه قادر به القای بیان پروتئین انسولین-پروانسولین و رسپتور بتای انسولین در سلول‌های P19 بود (تصویر شماره ۲) و سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته در پژوهش حاضر این دو نشانگر اختصاصی سلول‌های بتا را بیان کردند.

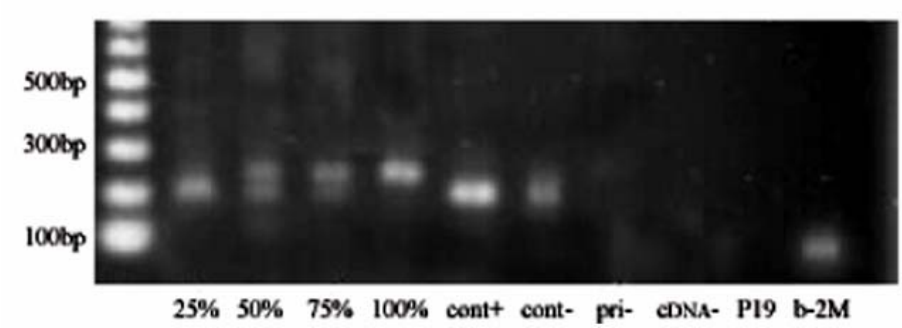
در این پژوهش در سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته با اثر محیط کشت ثانویه پانکراس، بیان ژن شاخص سلول های بتای بالغ در پایان مرحله نهایی تمایز تائید شد (تصویر شماره ۳). بیان ژن B2M، به عنوان ژن خانگی (Housekeeping gene) یا ژنی که در تمام سلول ها بیان می گردد در بافت پانکراس نشان داده



تصویر شماره ۲: بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های انسولین ساز در سلول های حاصل از تمایز به روش ایمنوفلورسنس

a. تصویر میکروسکوپی فلورسنس از سلول های تمایز یافته که بیان رسپتور بتای انسولین، نشانگر ویژه سلول های بتای پانکراس را در این سلول ها نشان می دهد، پیکان ها دو توده سلولی تمایز یافته با شدت فلورسنتی بالا را مشخص می کنند. تعداد زیادی سلول پراکنده با شدت فلورسنتی کمتر نیز در تصویر قابل مشاهده است، b. تصویر میکروسکوپی سلول های تمایز یافته از همان میدان دید با نور مرئی، c: تصویر میکروسکوپی فلورسنس از سلول‌های تمایز یافته که بیان انسولین -پروانسولین، نشانگر ویژه سلول های بتای پانکراس را در این سلول ها نشان می‌دهد، d. تصویر میکروسکوپی سلول‌های تمایز یافته از همان میدان دید با نور مرئی. بزرگنمایی ۲۵ X

شد. بـرای نمونه های PCR شده که به صورت جداگانه فاقد cDNA و پرایمر بودند باندی مشاهده نشد. این نتیجه نشان دهنده عملکرد صحیح برنامه PCR بکار گرفته شده می باشد. همچنین در سلول‌های تمایز یافته با اثر محیط ثانویه پانکراس در تمام گروه‌ها بیان ژن *pdx-1* نشان داده شد. گروه کنترل منفی یا سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از تمایز خود به خود سلول‌های P19 ژن *pdx-1* را به صورت ضعیف بیان کردند. اما سلول‌های P19 قادر به بیان این ژن نبودند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: بررسی بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های تمایز یافته. غلظت‌های مختلف محیط کشت ثانویه قادر به القای بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های کارسینومای جنینی P19 بودند.

pdx-1: ۲۳۰ bp
B-2M: ۹۸ bp

بحث:

در این پژوهش پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش کوچک آزمایشگاهی به طور کامل جداسازی و کشت داده شد. در طی این مدت محیط رویی این سلول ها به عنوان محیط کشت ثانویه جمع‌آوری و به عنوان عامل القایی استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که محیط کشت ثانویه پانکراس باعث القای تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی P19 به سلول‌های انسولین‌ساز می‌شود و مناسب‌ترین غلظت محیط کشت ثانویه پانکراس غلظت ۵۰ درصد بود. سلول‌های انسولین‌ساز حاصل قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی انسولین-پروانسولین و رسپتور بتای انسولین بودند. همچنین این سلول ها ژن *pdx-1* را بیان نمودند.

تشکیل جزایر بالغ پانکراس نیازمنـــد حرکت سلول های اندوکرین به خارج از اپی تلیوم، مهاجرت سلول ها از طریق ماتریکس خارج سلولی، بازآرایی سلولی و فرایند های اتصال سلولی است (۱۰). تکویـن سلول‌های بتا به مسیرهای پیـــام‌رســـانی، فاکتـــورهای رونویسی تنظیم کننده تمایز سلول، برهمکنش‌های بین مزانشیم-اپی‌تلیال و فاکتورهای ترشح شده از بافت‌های اطراف نیاز دارد (۱۱). پیام هایی از بافت‌های اطراف آندودرم پانکراس، تکوین جزایر لانگرهانس و بلوغ سلول های اندوکرین را تحریک می‌کند. لیگاندهای اعضای خانواده فاکتور رشد فیبروبلاستی مانند FGF2 و FGF10 به ترتیب از نوتوکورد (۱۲) و مزانشیم پشتی (۱۳) ترشح می‌شوند. این فاکتورها از طریق شروع و حفظ بیان فاکتورهای رونویسی نقش مهمی در اختصاصی شدن ساختار اولیه پانکراس دارند (۱۴،۱۳). در طی مراحل بعدی FGF10 ترشح شده از مزانشیم پانکراس باعث تحریک تکثیر و مهار تمایز سلول‌های پیش‌ساز پانکراسی به سلول‌های اندوکرین از طریق فعال‌سازی مسیر Notch می‌شود (۹). پیام‌های مولکولی ترشـــح شده از مزانشیـــم پانکراس، عروق خونی و سلول‌های ستیغ عصبی در حال مهاجرت برای شکل‌گیری جزایر

لانگرهانس مورد نیاز هستند. سلول‌های اندوتلیال عروق و فیبرهای عصبی نیز برای تنظیم سنتز هورمون در جزایر لانگرهانس بالغ مهم هستند (۱۵). چندین فاکتور در طی تکوین جنین از پانکراس ترشح می‌شود. از جمله این فاکتورها می‌توان FgF، اکتیوین و رتینوئیک اسید را نام برد که توسط ساختارهای اطراف پانکراس آینده مثل مزودرم ترشح می‌شوند (۱۶). مطالعات نشان می‌دهد غلظت فیزیولوژیک اکتیوین A باعث القای بیان ژن‌های *pdx-1* انسولین و گلوکاگون می‌شود. این فعال‌سازی نتیجه اثر مستقیم اکتیوین A در تحریک تمایز سلول‌های مزانشیم پانکراس است (۱۷). رتینوئیک اسید برای القای بیان ژن *pdx-1* در پیش‌سازهای آندودرمی پانکراس کافی است (۱۸). ریز محیط (Microenvironment) اطراف سلول نقش اساسی در شکل‌گیری سلول‌ها و برقراری ارتباط بین آن‌ها ایفا می‌کند (۱۹). پیام‌های محلول موجود در این ریز محیط مسئول بسیاری از رفتارهای سلولی مانند بقا، تکثیر و تمایز هستند (۲۰). به خوبی مشخص شده است که تکوین پانکراس شامل بر همکنش‌های سلولی است و این بر همکنش‌ها بین سلول‌های در حال تکوین و مزانشیم اطراف آن‌هاست. از آنجایی که تکوین پانکراس موش تا دو هفته اول بعد از تولد کامل نمی شود، احتمالاً قادر به تولید فاکتورهای لازم برای تمایز سلول های انسولین ساز در شرایط آزمایشگاهی است. از جمله این فاکتورها، فاکتور شبه انسولینی II و فاکتور رشد عصب را می‌توان نام برد (۹). نتایج پژوهش حاضر به خوبی نشان داد که محیط کشت ثانویه پانکراس احتمالاً به دلیل وجود چنین فاکتورهایی می تواند باعث القای تمایز سلول های بنیادی به سلول های تولید کننده انسولین شود. بر اساس گزارشی فاکتورهای محلول مترشحه توسط جوانه‌های پانکراس موش باعث کاهش تکثیر سلول‌های بنیادی تا ۴۰ درصد میزان طبیعی می‌شوند. همچنین این فاکتورها باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های اندوکرین پانکراس می‌شوند. نسبت زیادی از سلول‌های تمایز یافته، پروتئین‌های انتقال دهنده گلوکز-۲ و انسولین (پروتئین‌های ضروری برای روند تحریک و ترشح) را بیان می کنند. سلول های تمایز یافته حاصله فاکتور رونویسی *PDX-1* را بیان می کنند فاکتور *PDX-1* برای ادامه روند تحریک- ترشح بسیار مهم است. احتمالاً اصول مکانیسم‌هایی که تکوین سلول‌های بتای پانکراس را تنظیم می کند در طی تکامل حفظ می‌شود (۹). این یافته‌ها از تکوین سلول‌های بتا برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به کار برده شده است. بنابراین احتمال دارد سیگنال‌هایی از پانکراس جنینی موش باعث القا تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های شبه بتای ترشح کننده انسولین شود (۲۱).

در این پژوهش بیشترین تاثیر در القای فنوتیپ سلول های انسولین ساز در غلظت ۵۰ درصد محیط کشت ثانویه بود. غلظت مذکور علاوه بر بیان ژن فاکتور رونویسی *PDX-1* باعث بیان انسولین-پروانسولین و رسپتور بتای انسولین در این سلول‌ها شد. Du و همکارانش اثر فاکتور رشد عصب موجود در محیط کشت ثانویه عصب سیاتیک را بر تمایز عصبی سلول های بنیادی PC12 استفاده کردند. آن‌ها با استفاده از شمارش سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته اثر تمایزی این فاکتور را بررسی کردند (۲۲). Kuo و همکارانش با استفاده از آنالیزهای آماری داده‌های به‌دست آمده از سلول‌های بند ناف تمایز یافته با محیط کشت عصبی و سلول های تمایز یافته به صورت خود به خود، اثر تمایزی محیط کشت ثانویه عصبی را بر سلول‌های بنیادی مزانشمی به اثبات رساندند (۲۳). Irina و همکارانش در تحقیقی از محیط کشت ثانویه سلول‌های جوانه‌های ادراری به نسبت مساوی با محیط کشت پایه DMEM/F12 جهت تمایز سلول‌های مزانشیمی متانفروسی استفاده کردند (۲۴).

در پژوهش حاضر مورفولوژی سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته تحت اثر محیط کشت ثانویه پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش با رنگ‌آمیزی

دیتیزون در این سلول ها مشاهده شد و هر چهار غلظت محیط القـــایی استفاده شده باعث تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز شد. مورفولوژی توصیف شده سلول‌ها ی انسولین‌ساز حاصل از این پژوهش، پیش از این نیز توسط برخی محققین گزارش شده است. بر اساس این گزارش‌ها رنگ آمیزی دیتیزون به صورت انتخابی باعث قرمز رنگ شدن سلول‌های بتای پانکراس شد (۲۵). دیتیزون ماده ای متصل شونده به فلز روی است که به علت محتوای بالای این فلـــز در گرانـــول های محتوی انسولین سلول های بتا باعث قرمز رنگ شدن این سلول‌ها می شود. جزایر پانکراس گونه‌های حیوانی مثل موش و همچنین جزایر لانگرهانس انسان به علت محتوای بالای فلز روی در گرانول‌های ترشحی انسولین با این رنگ آمیزی قرمز رنگ می شوند. مقدار این فلز در مقایسه با بافت‌های دیگر در سلول‌های بتای پانکراس بیشتر است. Akira و همکارانش این رنگ آمیزی را برای جداسازی سلول‌های انسولین‌ساز مشتق شده از اجسام شبه جنینی نیز به کار بردند و بیان نمودند که رنگ آمیزی دیتیزون برای جداسازی جزایر پانکراتیک انســان از جسد دهنـــده و مقایسه بافت پانکراس با بافت‌های دیگر مناسب است و فلز روی در سلول‌های بتای پانکراسی برای بسته بندی انسولین، مورد نیاز است. این فلز همچنین به صورت فلز روی یونیزه و آزاد در فضای خارج گرانولی به عنوان نگه دارنده گرانول عمل می کند (۲۶).

فاکتور *PDX-1* به عنوان فاکتور تنظیم کننده تشکیل بخش اندوکرین و اگزوکرین پانکراس است (۲۷). این فاکتور برای تمایز سلول‌های بتا و حفظ فنوتیپ این سلول‌ها مورد نیاز است. همچنین در سلول‌های بتای بالغ باعث افزایش بیان انسولین و دیگر ژن‌های درگیر در حس گلوکز و متابولیت‌های دیگر مثل انتقال دهنده گلوکز-۲ و گلوکوکیناز می‌شود (۲۷). احتمالاً در پژوهش حاضر اثر محیط کشت ثانویه منجر به بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های P19 شده و در این سلول‌ها ژن *pdx-1* متعاقباً مسیر تمایزی را به سمت سلول‌های انسولین‌ساز پیش برده است. Natsuki و همکارانش با روش RT-PCR نشان دادند که با انتقال وکتورهای حامل ژن *pdx-1* به درون سلول‌های پیش‌ساز کبدی بالغ، mRNA این فاکتور در این سلول‌ها بیان شده و باعث تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شود (۲۸).

Hsiao-Yun و همکارانش سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را به سلول های انسولین‌ساز تمایز دادند سپس بیان ژن‌های انسولین، انتقال دهنده گلوکز-۲ و پروانسولین را در سلول ها ی تمایز یافته با استفاده از تکنیک های RT-PCR و ایمنوهیستوشیمی تائید کردند (۲۹). Mio و همکارانش در پژوهشی دیگر با روش ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR وجود نشانگرهای انسولین-۱ و انسولین-۲ را در بافت پانکراسی در شرایط آزمایشگاه مشخص کردند (۳۰).

در مطالعه حاضر بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نشان داد که سلول های تمایز یافته توانستند ژن اختصاصی سلول های بتای پانکراس یعنی ژن *pdx-1* را در تمامی گروه های القایی بیان نمایند.

در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای با روش RT-PCR بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته از سلول‌های مزانشیم مغز استخوان با تاثیر عصاره پانکراس، به عنوان فاکتور رونویسی خاص سلول‌های بتا مورد بررسی قرار گرفت (۳۱). Nadya و همکارانش نیز با ایجاد سلول های نستین مثبت در مسیر تمایز سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی و با استفاده از تکنیک RT-PCR وجود ژن *pdx-1* در سلول‌های انسولین‌ساز حاصل را شناسایی کردند (۳۲). با توجه به اثر محیط کشت ثانویه بر بیان ژن *pdx-1* و عملکرد این ژن در تولید انسولین توسط سلول های بتا می توان سیستمی را در شرایـــط *in vitro* طـــراحی کرد که به وسیلـه آن فاکتورهای دیگری که همراه فاکتور *PDX-1* برای ترشح انسولین همکاری می کنند را مورد مطالعه قرار داد. به علاوه می‌توان با جدا سازی هر یک از فاکتورهای موجود در محیط کشت ثانویه پانکراس

نوزاد موش یک هفته‌ای در شرایط *in vitro* نحوه‌ی تاثیر هر یک از این فاکتورها را بر تمایز سلول‌های انسولین‌ساز به طور جداگانه بررسی نمود. لذا پیشنهاد می شود برای بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته و استفاده آن‌ها در کارهای درمانی، این سلول‌ها به حیوانات مدل دیابتی پیوند و سپس بهبود و طبیعی شدن سطح گلوکز خون در این مدل‌های آزمایشگاهی مطالعه شود.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد غلظت های مختلف میحط کشت ثانویه باعث القای بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های کارسینومای جنینی و تمایز این سلول‌ها به سلول های ترشح کننده انسولین می‌شوند. غلظت ۵۰ درصد محیط کشت ثانویه در تمایز این سلول‌ها موثرتر است. نتایج این مطالعه می تواند در توسعه تکنیک های تولید سلول های بتا کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است. بدین وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند قدردانی می شود.

منابع:

1. Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani Sk. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. Dev Growth Differ. 2006 Jun; 48(5): 323-32.

2. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. Diabetes. 2004; 53(7): 1721-32.

3. Przyborski SA, Christie VB, Hayman MW, Stewart R, Horrocks GM. Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans. Stem Cells Dev. 2004 Aug; 13(4): 400-8.

4. Mansergh FC, Wrides MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. Biochem Cell Biol. 2000; 78(5): 613-28.

5. McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male murine embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. Dev Biol. 1982 Feb; 89(2): 503-8.

6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature. 1981 Jul; 292(5819): 154-6.

7. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki JI. Regulated expression of *pdx-1* promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. Diabetes. 2004 Apr; 53(4): 1030-7.

8. Vaca P, Franz M, Josefina V, Juan R, Genoveva B, Bernat S. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin secreting cells by fetal soluble factors. Stem Cells. 2006 Feb; 24(2): 258-65.

9. Jacquemin PY, Kashima Y, Rousseau GG, Lemaigre FP, Zaret KS. An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. Dev Biol. 2006 Feb 1; 290(1): 189-99.

10. Pulkkinen M. Role of epidermal and fibroblast growth factors in pancreatic development. HBGS. 2003; 54: 1-59

11. Wessells N, Cohen H. Early pancreas organogenesis: Morphogenesis, tissue interactions and mass effects. Dev Biol. 1967; 15: 1-15.

12. Dessimoz J, Opoka R, Kordich J, Grapin-Botton A, Wells J. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*. Mech Dev. 2006 Jan; 123(1): 42-55.

13. Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, et al. FGF10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. Development. 2001 Dec; 128(24): 5109-17.

14. Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. Development. 1998 Mar; 125(6): 1017-24.

15. Tingxia G, Matthias H. Stem cells to pancreatic -cells: new sources for diabetes cell therapy. Endocr Rev. 2009 May; 30(3): 214-27.

16. Nestor V, Alfredo S, Juan AR, Enrique R. differentiation of emberyonic stem cells using pancreatic bud-conditioned medium gives rise to neuoectoderm-derived insulin-secreting cells. Cell Reprogram. 2011 Feb; 13(1): 77-84.

17. Wiles M, Johansson B. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. Exp Cell Res. 1999 Feb; 247(1): 241-8.

18. Kawahira H, Ma N, Tzanakakis E, McMahon A, Hebrok M. Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. Development. 2003 Oct; 130(20): 4871-9

19. Domenech M, Yu H, Warrick J, Badders N, Meyvantsson I, Alexander C, et al. Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics. Integr Biol (Camb). 2009. 1(3): 267-74.

20. Brolen G, Heins N, Edsbagge J, Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induces differentiation of human embryonic stem cells into insulin- producing ß-cell–like cells. Diabetes. 2005 Oct; 54(10): 2867-74.

21. Denis D, Luis H. Insights into extrinsic and intrinsic signals controlling murine pancreas development, growth and maintenance. Zoo Biol J. 2007; 38(69): 1-159.

22. Du Ch, Yang De, Zhang P, Deng Lei, Jiang B. Neuronaldifferentiation of PC12 cells induced by sciatic nerve and optic. Chin Med J. 2010 Feb; 123(3): 351-5.

23. Kuo Ch Ch, Kuo F Ch, Yu Sh F, Shing HL. Islet-like clusters derived from mesenshimal stem cells of heuman umbilical cord for transplantation to control typ 1 diabets. PLoS ONE 2008; 3(1): 1-9.

24. Irina D, Lee F, James H, Alan O. Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme. Development. 1996 Dec; 122(12): 4159-67.

25. Shiroi A, Ueda S, Ouji Y, Saito K, Moriya K, Sugie Y, et al. Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. World J Gastroenterol. 2005 Jul; 11(27): 4161-6.

26. Akira S, Masahide Y, Hiroshi Y, Hiroshi F, Shigeaki I, Kouko T, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. Stem Cells. 2002; 20(4): 284-92.

27. Hideaki K, Takeshi M, Dan K, Taka-aki M. Pleiotropic roles of *pdx-1* in the Pancreas. Int Medi and Ther. 2008; 4: 1-17.

28. Natsuki N, Tomonori S, Toshihiro M, Tomoya K, Eiji Y, Jun-ichi M, et al. *In vitro* induction of adult hepatic progenitor cells into insulin-producing cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun; 318(3): 625-30.

29. Hsiao-Yun L, Chih-Chien. T, Ling-Lan Ch, Shih-Hwa Ch, Shih-Chieh H. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating AKT and ERK. Biom Sci. 2010; 17: 56-66.

30. Mio N, Tatsuo S, Hitoshi O, Makoto A. Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells *in vitro*. Differentiation. 2007 Jan; 75(1): 1-11.

31. Kyung S, Jun-Seop Sh, Jae-Jeong L, Young Soo K, Seung-Bum K, Chan-Wha K. *In vitro* trans-dierentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun; 318(3): 625-30.

32. Nadya L, Olivier B, Pascal L, Ivan V, Rea R, Ron M. Differentiation of embryonicstem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science. 2001 May; 292(5520): 1389-94.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2013 Apr, May; 15(1): 91-102.

Original article

Evaluation of *pdx-1* gene expression in insulin producing cells, derived from embryonal carcinoma stem cells

Mansouri-Bidekani A (MSc)[1*], Esmaeili F (PhD)[1,2], Houshmand F (PhD)[3], Hajisharifi Z (MSc)[1]

[1]Biology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 2/Aug/2012 Revised: 6/Oct/2012 Accepted: 9/Apr/2012

Background and aims: Understanding β-cell function at the molecular level will likely facilitate the development of β-cells manufacture techniques. The aim of the present study was to investigate the pancreatic and duodenal homeobox 1 (*pdx-1*) gene expression into DTZ-stained cellular clusters originating from emberyonal carcinoma cells.

Methods: This implemental -fundamental study was accomplished on differentiation of stem cells into insulin producing cells (IPCs). The conditioned medium of cultured pancreas from one-week newborn mouse was used for differentiation of P19. EBs formed by a 24h suspension culture of P19 EC cells. In order to induce the difrentiation,, different concentrations of conditioned medium (25%, 50%, 75% and 100%) were added to culture medium. Dithizone staininig was used for detecting the differentiated cells derived from EBs *in vitro*. Insulin-proinsulin production and insulin receptor beta were determined by immunofluorescence. The expression of *pdx-1* gene was also analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Data were analyzed using one way ANOVA and Dunkana test.

Results: Differentiated cell clusters appeared after approximately 7 days induction. The peak response of differentiation was at the concentration of 50% conditioned medium. Expression of *pdx-1* gene was observed in the differentiated cell clusters. Expression of insulin-proinsulin and insulin receptor beta markers in the differentiated cells was confirmed by immunofluorescence.

Conclusion: The pancreas conditioned medium could influence P19 cells differentiation into insulin producing cells. So findings of this study could facilitate producing the β-cells.

Keywords: **β receptor, Conditioned medium, Stem cells, Insulin-proinsulin, *pdx-1*.**

Cite this article as: Mansouri-Bidekani A, Esmaeili F, Houshmand F, Hajisharifi Z. Evaluation of *pdx-1* gene expression in insulin producing cells, derived from embryonal carcinoma stem cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Apr, May; 15(1): 91-102.

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept, Faculty of basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00989387388036, E-mail:akram.mansouri1364@gmail.com