

توانایی تمایز سلول CD133⁺ خون بند ناف به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین

فاضل صحرائین سامانی^۱، مرضیه ابراهیمی^۲، طاهره زندیه^۳، منیره محمد^۴، ناصر اقدمی^۵، حسین بهاروند^۶

چکیده

سابقه و هدف

تولید سلول‌های اندوکرینی و جزایر انسولین‌ساز، از جمله اهداف درمان دیابت می‌باشد. مشخص شده است که سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف قادر به بیان فاکتورهای رونویسی جنینی هم چون SSEA-4 و OCT4 هستند و لذا می‌توانند کاندید مناسبی برای درمان دیابت محسوب شوند. در این مطالعه سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف به منظور تمایز به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف با استفاده از روش MACS جدا شدند و در محیط کشت تمایزی (حاوی DMEM/F12، Nicotinamid، bFGF، N2 supplement B27) به مدت ۹ روز قرار گرفتند. از روش ایمونوسیتوشیمی، برای بررسی بیان پروتئین‌های انسولین و پپتید-C، از RT-PCR برای بررسی بیان ژن‌های انسولین، گلوکاگون، PDX1 و NKX6/1 و از الیزا برای تعیین عملکرد سلول‌های تمایز یافته استفاده شد.

یافته‌ها

سلول‌های CD133⁺ مشتق از خون بند ناف در انتهای مرحله تمایزی، پروتئین انسولین و پپتید-C را بیان کردند. سلول‌های تمایز یافته، قادر به بیان ژن‌های NKX6/1، PDX1، انسولین و گلوکاگون نبودند و هم چنین توانایی پاسخ به تیمارهای مختلف گلوکز (۵ و ۲۷ میلی مولار) را نداشتند.

نتیجه‌گیری

سلول‌های CD 133⁺ قادر به تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز در محیط آزمایشگاه می‌باشند اما توانایی لازم برای ترشح انسولین را نداشته و نیازمند سیگنال‌های مناسب از محیط زنده هستند.

کلمات کلیدی: خون بند ناف، سلول‌های ترشح‌کننده انسولین، دیابت قندی تیپ I

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۱/ ۵/۱۱

- ۱- کارشناس ارشد علوم سلولی تکوینی - گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤل: PhD ایمونولوژی - استادیار گروه زیست پزشکی ترمیمی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران - صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵
- ۳- PhD بیوتکنولوژی - دانشیار گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران
- ۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی - گروه زیست پزشکی ترمیمی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران
- ۵- PhD ایمونولوژی - استادیار گروه زیست پزشکی ترمیمی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران
- ۶- PhD علوم سلولی تکوینی - استاد گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی - پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - پژوهشگاه رویان - تهران - ایران

مقدمه

دیابت نوع I، نتیجه حمله اتوایمیون علیه سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس بوده که منجر به از دست رفتن ۷۰٪ توده سلول‌های بتا می‌شود. این در حالی است که دیابت نوع II در نتیجه عدم پاسخ‌گویی سلول‌های هدف به انسولین ترشحی ایجاد گردیده و در مراحل بعد بیماری به کاهش ۵۰٪ توده سلول‌های بتا می‌انجامد (۱، ۲). این بیماران نیازمند مصرف مستمر داروهای کاهش‌دهنده قند خون، از جمله انسولین می‌باشند اما مقداری از انسولین تزریق شده در این بیماران توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک از بین می‌رود. پیوند کامل پانکراس و یا پیوند جزایر جدا شده از افراد با مرگ مغزی به همراه استفاده از سرکوبگرهای ایمنی غیر استروئیدی از روش‌های دیگر درمان در افراد دیابتی می‌باشد، اگر چه کمبود افراد دهنده و نتایج طولانی مدت ناشی از سرکوبگرهای ایمنی در این بیماران از جمله محدودیت‌های این روش درمانی به شمار می‌رود (۳). اخیراً با توجه به پیشرفت در زمینه سلول‌های بنیادی، امید است که با استفاده از این سلول‌ها بتوان به درمان قطعی دیابت کمک نمود.

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی پر توان (Pluripotent stem cells) هستند که قابلیت تمایز به سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و آندودرم) را دارا می‌باشند (۴). تمایز سلول‌های بنیادی موشی و انسانی از سال ۲۰۰۰ تا کنون با مطالعه تکوین سلول‌های انسولین‌ساز در بدن و بر اساس روش‌هایی از قبیل انتخاب سلول‌های نستین مثبت (بیان‌کننده نستین)، استفاده از بیان ژن‌های هدف و تمایز سلول‌های نستین منفی (عدم بیان نستین) به سلول‌های تولیدکننده انسولین انجام شده است (۹-۵). اما انسولین ترشحی در سلول‌های تمایز یافته در این نوع مطالعه‌ها، ناشی از جذب انسولین در سلول‌های آپوپتوز شده از محیط کشت بوده است (۱۰). هم چنین خطر تومورزایی، مشکلات اخلاقی و استفاده از داروهای سرکوب‌کننده بعد از پیوند نیز از جمله مشکلات استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی است که استفاده درمانی آن را با چالش مواجه می‌سازد (۱۱).

سلول‌های بنیادی بزرگسال به علت عدم وجود

مشکلات اخلاقی و خطر پایین تومورزایی، کاندیداهای مناسبی در درمان بیماران دیابتی می‌باشند. سلول‌های مشتق از مغز استخوان، سلول‌های مشتق از بافت‌های چربی، سلول‌های مشتق از بافت پانکراس و سلول‌های مشتق از خون بند ناف از جمله منابع مورد مطالعه برای تولید سلول‌های انسولین‌ساز بوده و هستند. سلول‌های بنیادی موجود در خون بند ناف انسان، جوانترین منابع سلول‌های بالغ با ویژگی‌های تلومراز بلند، خطر آلودگی و بررسی پایین، کاهش القای بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD) در مقایسه با سلول‌های مغز استخوان از جمله منابع ارزشمند برای سلول درمانی محسوب می‌شوند (۱۲). از سال ۲۰۰۴ تاکنون مطالعه روی توانایی تمایز سلول‌های جدا شده از خون بند ناف انسان و تمایز آن‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز مورد توجه قرار گرفته است. سلول CD133⁺ موجود در خون بند ناف، با بیان شاخص‌های بنیادی مثل SSEA-۴ و OCT4A از سلول‌های چند توان محسوب شده و کاندید مناسبی برای القای تمایز می‌باشد و به علت در دسترس بودن، از ابزار مناسب درمانی شناخته می‌شود (۱۴-۱۲). لذا در این مطالعه بر آن شدیم که تمایز سلول‌های CD133⁺ مشتق از خون بند ناف به سلول‌های انسولین‌ساز را در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های CD133⁺ از خون بند ناف با استفاده از روش MACS (Magnetic Activated Sorting):

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. خون بند ناف انسان از بانک عمومی خون بند ناف رویان تهیه گردید. به منظور جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و افزایش سرعت رسوب سلول‌های قرمز خون بند ناف، از محلول اتیل استارچ (HEAS) (Free flex) به نسبت یک به پنج استفاده شد. سپس پلاسما غنی از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف به آرامی توسط پلاسما اکسترکت جدا و به نسبت ۱ به ۳ به روی فایکول (Inno-Train) با چگالی ۱/۰۷۷g/cm^۲ منتقل گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰ g و بدون ترمز در دمای اتاق سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای (MNC) از فاز میانی فایکول و

تمایز سلول $CD133^+$ به سلول‌های انسولین ساز:

به منظور تمایز سلول‌ها از روش شیما و با کمی تغییرات استفاده شد (۱۷). به طور خلاصه تعداد 2×10^6 سلول $CD133^+$ به محیط DMEM با غلظت گلوکز بالا (4500 mg/L) حاوی 10% سرم گاوی (جیبکو)، به همراه 100 ng/mL اکتیوین A (R&D) به پلیت‌های ۲۴ خانه که با ژلاتین 1% پوشیده شده بودند، منتقل و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر، به منظور تولید سلول‌های اندودرم قطعی، میزان 10^{-6} M رتینوئیک اسید (سیگما) به سلول‌ها اضافه و ۲۴ ساعت دیگر کشت ادامه یافت. سپس به منظور تولید سلول‌های لوله گوارش خلفی، تعویض محیط صورت گرفت و محیط DMEM با غلظت گلوکز بالا همراه با 10% سرم گاوی و 30 ng/mL از bFGF اضافه و کشت به مدت ۳-۵ روز دیگر ادامه یافت.

در مرحله آخر، برای تولید پیش‌سازهای پانکراس، تعویض محیط انجام شد و محیط DMEM/F12 (جیبکو) به همراه 10 ng/mL bFGF، 10 mM Nicotinamid، 1% supplement B27 و 1% N2 (سیگما) به سلول‌ها اضافه و کشت به مدت ۵ روز دیگر ادامه یافت.

ایمونوسیتوشیمی:

سلول‌های حاصل از مرحله آخر تمایز با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو و سپس توسط پارافرم آلدئید 4% به مدت ۳۰ دقیقه و در یخچال تثبیت شدند. به منظور نفوذپذیری غشا، از 0.2% Tritonx-100 (مرک) به مدت ۷ دقیقه و در دمای محیط استفاده شد. برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی، سلول‌ها با سرم 10% بز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آنتی‌بادی اولیه C-PEPTIDE (کمیکون) با رقت $1/250$ و آنتی‌بادی اولیه انسولین (سیگما) $1/500$ مورد استفاده قرار گرفت. آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت یک شبانه روز در دمای 4°C و در تاریکی انکوبه شدند. به گروه ایزوتیپ نیز آنتی‌بادی اولیه زده نشد. سپس سلول‌ها یک بار با PBS حاوی Tween (0.05%) شستشو و ساتریفورژ شد. محیط رویی خارج و آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITC (سیگما) با

پلازما جدا و با 3 برابر محلول PBS همراه با 2 mM EDTA شستشو داده شد. سپس رسوب سلولی با استفاده از ساتریفورژ به مدت 10 دقیقه و دور 400 g تهیه گردید. برای جداسازی سلول‌های $CD133^+$ ، از روش جداسازی به روش بید مغناطیسی (MACS) و بر اساس دستور شرکت سازنده استفاده شد. به طور خلاصه، 100 میکرولیتر از محلول میکروبیید (میلتنی - بیوتک) و 300 میکرولیتر از محلول PBS حاوی 2 mM EDTA، به رسوب سلولی اضافه و به مدت 30 دقیقه در یخچال انکوبه شد (16°C ، 15°C). پس از $2-3$ بار شستشوی ستون با حجم 500 میکرولیتر از PBS، سوسپانسیون سلولی به حجم 500 میکرولیتر به ستون اضافه گردید. در مرحله بعد، ستون به میزان 5 بار با حجم 500 میکرولیتر از PBS شستشو داده شد تا سلول‌های نچسبیده به ستون جدا شوند. در پایان یک میلی‌لیتر از PBS به ستون اضافه و پس از جداسازی ستون از آهن‌ربا، سلول‌های چسبیده به ستون با فشار پیستون خارج شدند. سلول‌های حاصل حاوی سلول‌های $CD133^+$ بودند.

به منظور به دست آوردن خلوص بالاتر، سلول‌های فوق شسته شدند و به رسوب حاصل 20 میکرولیتر FcR Blocking، 20 میکرولیتر میکروبیید $CD133^+$ و 200 میکرولیتر PBS اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای 4°C انکوبه شد و مراحل عبور از ستون مجدداً تکرار شد (16°C ، 15°C). درصد سلول‌های زنده توسط تریپان‌بلو تعیین گردید. به منظور تعیین خلوص سلولی، سلول‌های $CD133^+$ خارج شده از ستون، شمارش شده و تعداد 1×10^6 سلول به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شد و با 3 میکرولیتر از آنتی‌بادی AC133/2 (میلتنی - بیوتک) به مدت $30-45$ دقیقه درون یخچال انکوبه گردید. از آنتی‌بادی Mouse IgG1-PE به عنوان کنترل ایزوتیپ استفاده گردید.

در انتها و پس از شستشوی سلول‌ها توسط بافر فسفات نمکی (PBS)، نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur مجهز به لیزر 488 nm قرائت شد. آنالیز داده‌ها با برنامه Cell Quest انجام شد.

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه

ژن	توالی آغازگر ۵' به ۳'	دمای آنیلینگ	طول bp
<i>GAPDH</i>	CTC ATT TCC TGG TAT GAC AAC GA CTT CCT CTT GTG TTGCT	۵۸	۲۲۴
<i>Glucagon</i>	CCA GAT CAT TCT CAG CTT CC GGC AAT GTT ATT CCT GTT CC	۵۶	۱۸۰
<i>Insulin</i>	AGC CTT TGT GAA CCA ACA CC GCT GGT AGA GGG AGC AGA TG	۶۰	۲۴۵
<i>PDX1</i>	GGA TGA AGT CTA CCA AAG CTC AC CCA GAT CTT GAT GTG TCT CTC G	۶۲	۱۸۰
<i>NKX۶/۱</i>	GTT CCT CCT CCT CTT CCT C AAG ATC TGC TGT CCG GAA AAA G	۵۸	۳۸۱
<i>Nanog</i>	AGC TAC AAA CAG GTG AAG AC GGT GGT AGG AAG AGT AAA GG	۵۸	۱۴۵
<i>OCT۴</i>	GTTCTATTTGGGAAGGTATTCAGC GTT ACA GAA CCA CAC TCG GA	۶۰	۳۲۳
<i>CD133⁺</i>	TAAGTACTATCGTCGAATGG TCAAGCAGTTTCAACATCAGC	۶۰	۳۱۰

شروع دناتوراسیون به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ °C، برای ادامه دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، برای آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (به طور میانگین) به مدت ۳۰ ثانیه و برای مرحله اکستنشن به مدت ۲۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و برای ۳۵ بار تکرار، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد (جدول ۱).

بررسی میزان ترشح انسولین با روش الایزا: سلول‌های تمایز یافته در مرحله آخر با بافر کریس-رینگر که شامل ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl، ۵ میلی‌مولار KCl، ۲/۵ میلی‌مولار CaCl₂، ۲۵ میلی‌مولار NaHCO₃ Buffer و ۱۰ درصد BSA است، دو بار شسته شدند و سپس با بافر حاوی گلوکز با غلظت ۳ میلی‌مولار در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۵ دقیقه تیمار شدند. سپس محلول رویی سلول‌ها برداشته شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه دیگر در مجاورت محلول کریس با غلظت ۵ mM و ۴۵ دقیقه دیگر نیز با غلظت ۲۷ mM قرار گرفتند و مجدد محلول رویی سلولی جمع‌آوری و در فریزر تا زمان آزمایش نگهداری شد.

میزان ترشح انسولین در محلول رویی سلول‌های تمایز یافته با استفاده از کیت الایزا (شرکت مرکودیا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه شد. نمونه استاندارد

رقت ۱/۲۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه شد. سلول‌ها دو بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. برای مشخص شدن هسته‌ها، از DAPI استفاده شد (۱۸).

بررسی بیان ژن‌های تولیدکننده انسولین در سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز توسط RT-PCR:

استخراج RNA با کیت Rneasy Micro از شرکت کیاژن و طبق روش پیشنهادی کیت انجام شد. غلظت RNA محاسبه و برای ساخت cDNA مطابق با دستور کیت (6110A) تاکارا اقدام شد. به این منظور ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر با ۱ میکرولیتر dNTP و ۱۰ میکرولیتر RNA (۰/۱۳ μg/μL) مخلوط و در دمای ۶۵ °C به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۱۲ میکرولیتر از cDNA با غلظت ۵۰ ng/μL، ۰/۵ میکرولیتر RNase Inhibitor، ۱ میکرولیتر RTase و ۴ میکرولیتر بافر ۵ X اضافه و حجم نهایی با آب دیپس به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ °C انکوبه و سپس در دمای ۴۲ °C به مدت یک ساعت انکوباسیون انجام شد. برای غیر فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، انکوباسیون ادامه پیدا کرد. از *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی و از سلول‌های بنیادی انسانی که به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز داده شده بودند به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. سپس به منظور

سلول‌های $CD133^+$ خالص شده به تعداد سلول‌های تک هسته‌ای که وارد ستون شده‌اند به دست آمد.

بررسی بیان ژن‌های بنیادی توسط RT-PCR نشان داد که ژن‌های $OCT4$ و $NANOG$ در این سلول‌ها بیان می‌شوند (شکل ۱). در بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های تمایز یافته مشخص گردید که ۴۸ ساعت پس از کشت، اجتماعات کوچکی از سلول‌ها، در ظروف کشت ظاهر می‌شوند که در مرحله دوم تشکیل دهنده اجتماعات شبه کلونی می‌باشند. به نظر می‌رسد که این اجسام شبه کلونی، حاصل تکثیر اجتماعات سلولی مرحله اول باشند (شکل B و A-2). با افزایش فاکتورهای نیکوتین آمید، B27 و N2 در مرحله سوم، اندازه این کلونی‌ها افزایش یافت (شکل C-2). در پاسخ به این پرسش که آیا سلول‌های تشکیل دهنده این کلونی‌ها، توان تولید انسولین را دارند، پروتئین‌های انسولین و پپتید C- به وسیله روش ایمونوسیتوشیمی و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد انسولین و ضد پپتید C- مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج نشان داد که اکثر سلول‌های بیان‌کننده دو پروتئین انسولین و پپتید C- در سیتوپلاسم سلول‌های موجود در کلونی‌های شبه‌جزیره‌ای وجود داشتند. به منظور کمی کردن نتایج ایمونوسیتوشیمی، ده تصویر به طور تصادفی در هر گروه شمارش و درصد سلول‌های مثبت تعیین گردید (۱۸). نتایج نشان داد که درصد سلول‌های بیان‌کننده انسولین در گروه آزمایش، $0.31 \pm 2.25\%$ و پپتید، $0.37 \pm 1.02\%$ بود (شکل B و A-3).

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه سلول‌های انسولینی با روش RT-PCR نشان داد که ژن‌های $PDX1$ ، $NKX6/1$ ، $GLOAGON$ و $INSULIN$ در گروه مورد مطالعه بیان نشدند (شکل B-3). نتایج به دست آمده از بررسی ترشح فعالانه انسولین نیز نشان داد که سلول‌های تمایز یافته در پاسخ به غلظت‌های بالاتر گلوکز (۲۷ میلی‌مولار)، مقادیر کمتری از انسولین را نسبت به غلظت‌های پایین‌تر گلوکز (۵ میلی‌مولار) ترشح می‌کنند (نمودار ۱). ترشح انسولین در سلول‌های $CD133^+$ مشتق از خون بندناف تمایز داده نشده (روز اول)، به عنوان گروه کنترل منفی نیز مشاهده نشد.

موجود در کیت با غلظت‌های $20-0$ ng/mL و نیز نمونه‌های آزمایش به طور جداگانه (هر کدام ۲۵ میکرولیتر) به خانه‌های پلیت ۹۶ تایی که با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد انسولین انسانی پوشیده شده اضافه گردید. سپس آنزیم کونژوگه رقیق شده را به هر خانه اضافه کرده، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوباسیون شد.

پس از ۶ بار شستشو توسط بافر شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB به هر خانه اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوباسیون گردید. با افزودن ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده، واکنش آنزیمی متوقف شد و میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه ELISA reader در طول موج 450 nm به دست آمد. در پایان غلظت انسولین موجود در نمونه‌های آزمایش به کمک نمودار استاندارد رسم گردید.

آنالیز داده‌ها:

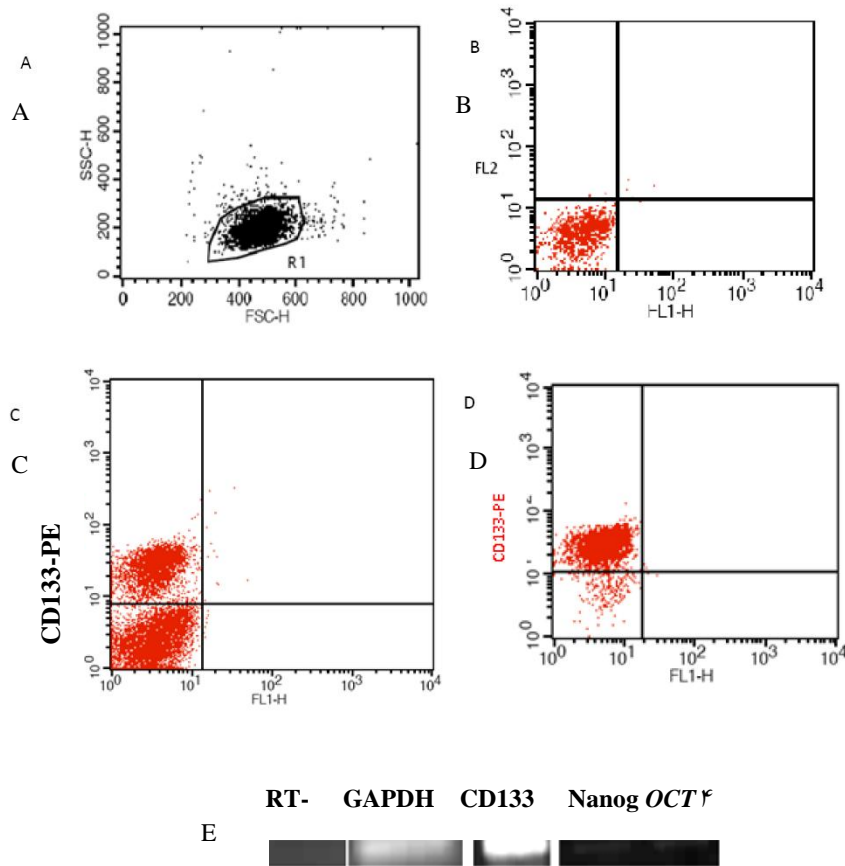
داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۸ به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p < 0.05$ به عنوان معناداری در نظر گرفته شد. هر کدام از آزمایش‌ها و روش‌های مورد استفاده در این مطالعه حداقل سه بار مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها

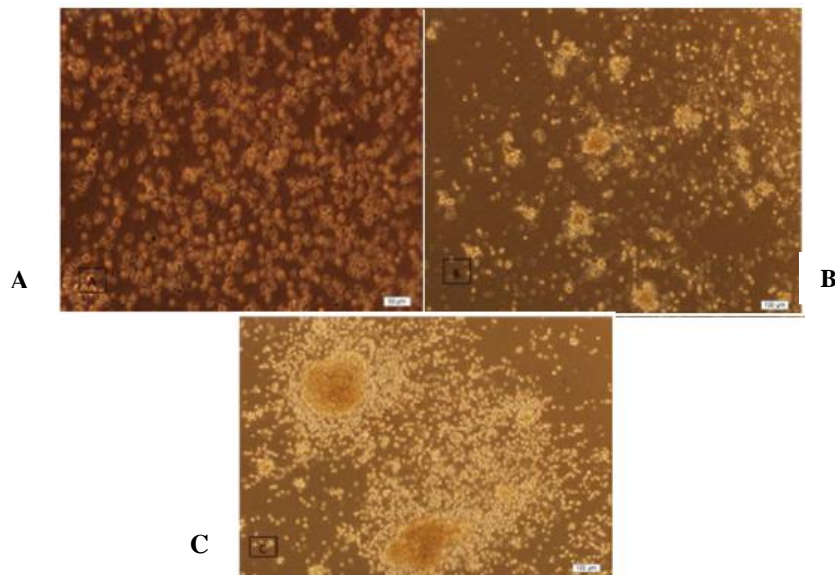
در این مطالعه سلول‌های $CD133^+$ از خون بند ناف با روش جداسازی توسط ذرات مغناطیسی (MACS) جدا شد. به منظور افزایش خلوص سلولی، سلول‌ها دو بار از روی ستون گذرانده شدند. نتایج نشان داد که از متوسط حجمی $93/82$ میلی‌لیتر خون بند ناف مورد آزمایش، میزان $10^6 \times 45/97 \pm 98/93$ سلول تک هسته‌ای جدا شد. درصد خلوص سلول‌های $CD133^+$ مشتق از سلول‌های تک هسته‌ای پس از یک بار عبور از ستون $13/19 \pm 47/07\%$ و پس از دو بار عبور از ستون $5/21 \pm 91/28\%$ بود. اگر چه تعداد سلول $CD133^+$ جدا شده پس از دومین عبور از ستون، به طور معناداری کاهش یافت اما میزان خلوص سلولی از 47% به 93% افزایش یافت (جدول ۲). درصد بازیافت سلول‌ها (Recovery) از محاسبه نسبت تعداد

جدول ۲: مشخصات خون بند ناف‌های مورد آزمایش

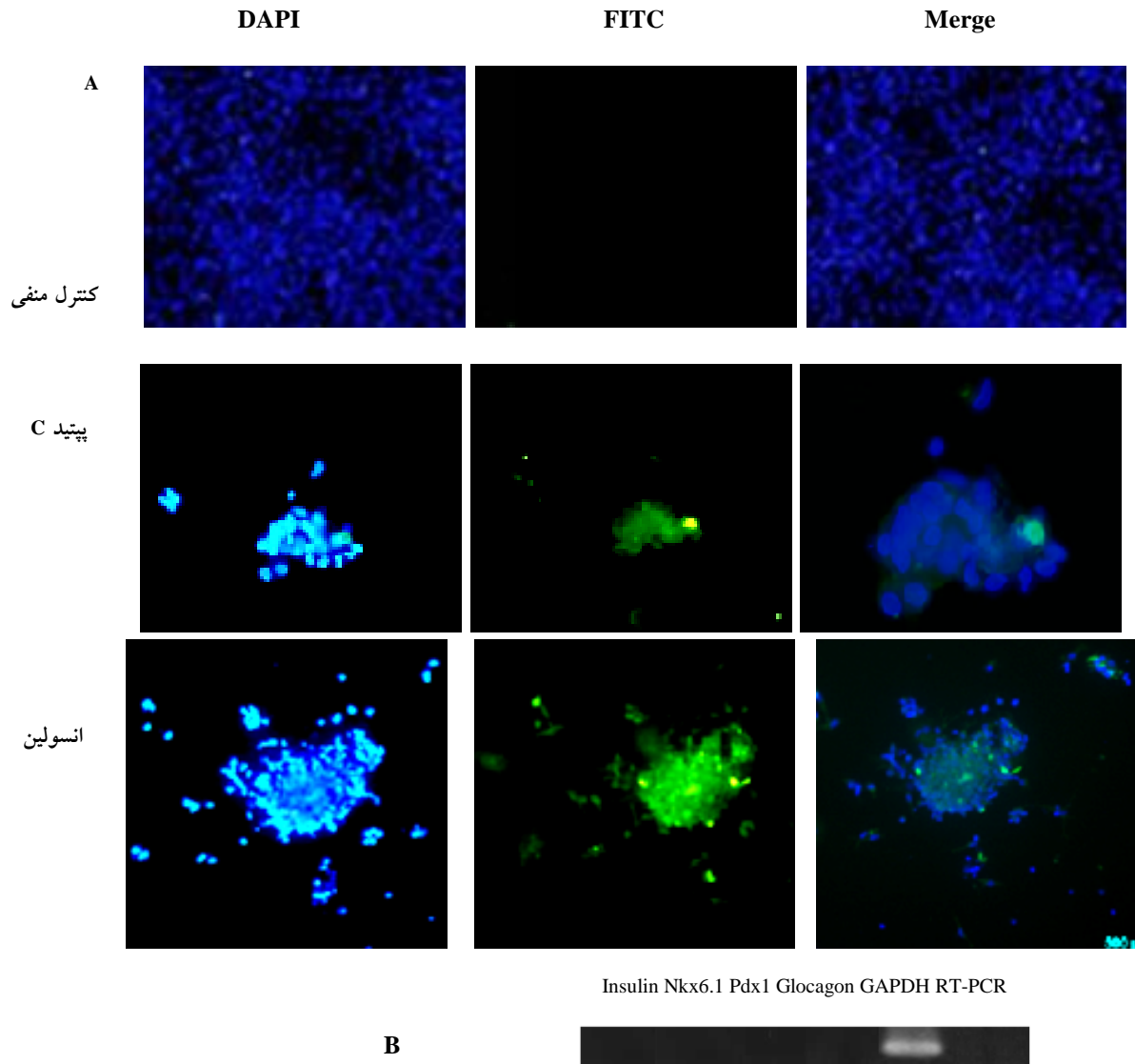
شماره	حجم (mL)	سلول‌های تک هسته‌ای (درصد)	زنده ماندن (درصد)	خلوص CD133 ⁺ (مرحله اول) (درصد)	شمارش (مرحله اول) (درصد)	خلوص CD133 ⁺ (مرحله دوم) (درصد)	شمارش (مرحله دوم) (درصد)	بازدهی (درصد)
۱	۱۰۰	۱۱۸	۱۰۰	۴۰/۱۷	۱۳۰	۸۴/۵۴	۱۰۰	۰/۸۴
۲	۹۴	۸۸	۹۸	۲۰/۳۲	۱۶۰	۸۰/۵۵	۱۰۰	۱/۱
۳	۹۰	۲۵۰	۹۷	۳۴/۹۴	۱۴۵	۹۵/۶۱	۱۲۰	۰/۴۸
۴	۸۷	۱۴۰/۷	۹۷	۶۲	۲۰۰	۸۹/۵۷	۱۵۰	۱/۰۷
۵	۱۰۰	۷۰	۹۸	۲۵	۵۰	۹۱/۲۸	۳۲/۴	۰/۴۶
۶	۸۶	۷۰	۱۰۰	۵۶/۶	۵۱	۹۲/۲۷	۴۰	۰/۵۷
۷	۶۶	۷۰	۹۹	۴۴/۳۷	۷۵	۹۹	۵۵	۰/۷۸
۸	۱۳۲/۵	۱۵۰	۹۸۵	۵۷/۳۷	۸۵	۹۳/۸۴	۷۰	۰/۴۶
۹	۱۱۱	۹۰	۹۵	۵۹/۹۷	۱۷۵	۸۰/۵۴	۱۲۵	۱/۳
۱۰	۱۰۹	۷۰	۹۴	۵۴/۳۵	۱۳۰	۹۶	۱۰۵/۶	۱/۵
۱۱	۱۰۶	۵۰	۹۷	۳۷/۳۴	۳۵	۸۹	۲۰	۰/۴
۱۲	۱۰۶	۷۰	۹۸	۵۱/۴۵	۵۰	۹۷	۳۰	۰/۴۲
۱۳	۸۹	۴۵	۹۹	۵۶/۹۸	۵۰	۸۸/۶	۳۵	۰/۷
۱۴	۱۰۱	۹۰	۹۹	۵۱/۴۵	۱۲۰	۹۵/۶	۹۵	۱/۰۵
۱۵	۹۰	۱۱۰	۱۰۰	۵۶/۹۹	۱۴۰	۸۹/۶	۱۰۵	۰/۹۵
۱۶	۶۵	۹۶	۹۵	۶۵/۲۵	۵۶	۹۲/۰۶	۳۶/۴	۰/۳۷
۱۷	۷۰	۸۷	۹۸	۳۵/۲	۵۴	۹۵/۰۷	۴۱	۰/۴۷
۱۸	۸۵	۹۵	۹۸	۴۲/۶	۶۴	۹۵/۳	۳۵	۰/۳۶
۱۹	۹۵	۱۲۰	۹۹	۳۵/۱	۷۰	۸۸/۹۸	۴۰	۰/۳
میانگین	۹۳/۸۲	۹۸/۹۳	۹۷/۸۴	۴۷/۰۷	۹۶/۸۴	۹۱/۲۸	۷۰/۲۸	۰/۷۱
انحراف معیار	۱۶/۴۲	۴۵/۹۷	۱/۷	۱۳/۱۹	۵۰/۵۹	۵/۲۱	۳۹/۹۹	۰/۳۵



شکل ۱: نتایج بررسی سلول‌های CD133⁺ قبل و بعد از جداسازی به روش فلوسایتمتری: (A) بررسی اندازه و گرانولوسیتی سلول‌های تک هسته‌ای (MNC) جدا شده با استفاده از شیب غلظت فایکول، (B) کنترل ایزوتایپ (Mouse IgG1-PE)، (C) سلول‌های CD133⁺ پس از یک بار عبور از ستون، (D) سلول‌های CD133⁺ پس از دو بار عبور از ستون، (E) بیان ژن‌های بنیادینگی در سلول‌های CD133 مثبت (GAPDH به عنوان کنترل داخلی می‌باشد).

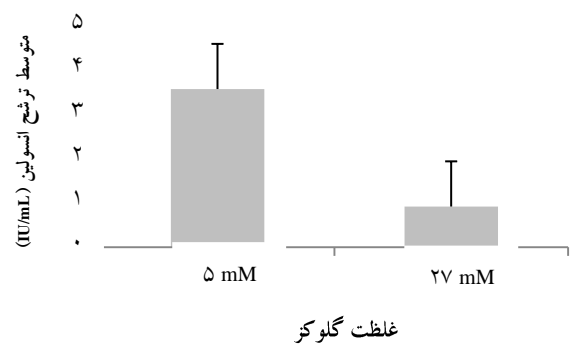


شکل ۲: تصاویر میکروسکوپی نوری مربوط به گروه مورد مطالعه: (A) مرحله اول، (B) مرحله دوم، (C) مرحله سوم بزرگ‌نمایی X ۱۰



شکل ۳: (A) بررسی پیتید C- و انسولین در گروه مورد آزمایش با روش ایمونوسیتوشیمی (بزرگنمایی X ۱۰). هسته‌ها با رنگ DAPI و شاخص‌های انسولین و پیتید-C با رنگ FITC رنگ‌آمیزی شده‌اند. (B) RT-PCR برای ژن‌های سلول‌های انسولین‌ساز

بحث
 سلول‌های بنیادی خونساز مستقر در خون بند ناف، با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد خود و نیز بیان برخی شاخص‌های بنیادینگی، از جمله منابع مورد توجه برای تولید سلول‌های انسولین‌ساز می‌باشند (۱۶). هم‌چنین جمعیتی از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف، شاخص‌های سلول‌های اندوکرینی پانکراس از قبیل *NGN3*، *ISL1*، *BRN4*، *PAX6* و *PDX1* را بیان می‌کنند که پس از تزریق به مدل‌های حیوانی، به سلول‌های



نمودار ۱: میزان ترشح انسولین در دو غلظت ۵ و ۲۷ میلی‌مولار

بیان‌کننده انسولین بیشتر از درصد سلول‌های بیان‌کننده پپتید-C بود که می‌تواند به سه دلیل باشد: ۱- نیمه عمر پپتید-C از نیمه عمر انسولین کمتر است، ۲- ممکن است مقداری از انسولین از محیط کشت جذب شده باشد، ۳- درصد سلول‌های بیان‌کننده پپتید-C از درصد سلول‌های بیان‌کننده انسولین کمتر باشد (۲۳، ۱۰).

بررسی بیان ژن‌های *GLOKAGON*، *PDX1*، *NKX6/1* و *INSULIN* توسط RT-PCR در این مطالعه حاکی از عدم بیان ژن‌های مربوط به مرحله آخر تمایز سلول‌های انسولینی بود که می‌تواند به دلیل کافی نبودن سلول‌ها از نظر تعداد برای انجام این آزمون باشد. هم‌چنین میزان بیوستز انسولین توسط مکانیسم‌های مختلف از جمله افزایش رونویسی ژن انسولین، افزایش ظرفیت شبکه *PreproInsulin mRNA* و افزایش ظرفیت شبکه آندوپلاسمی برای ساخت انسولین کنترل می‌شوند (۲۶-۲۴). این در حالی است که تخریب *mRNA* انسولین به طور مستمر صورت می‌گیرد. هم چنین میزان تجدیدپذیری *Preproinsulin mRNA* در سلول‌های بتای بالغ پایین است. گلوکز اصلی‌ترین تنظیم‌کننده انسولین بوده که از تخریب *mRNA* انسولین در سلول‌ها جلوگیری می‌کند. به طوری که نیمه عمر *mRNA* انسولین در غلظت کم گلوکز ۲۹ ساعت و در غلظت زیاد گلوکز ۷۷ ساعت گزارش شده است (۲۵). از راه‌کارهای مورد استفاده برای جلوگیری از تخریب *mRNA* انسولین در سال‌های اخیر، استفاده از پروتئین‌های متصل شونده به منطقه 3' UTR RNA به نام Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) برای ثبوت RNA می‌باشد (۲۷).

نتایج حاصل از سنجش فعالیت سلول‌های تمایز یافته در برابر غلظت‌های مختلف گلوکز نیز نشان داد که این سلول‌ها قادر به شناسایی غلظت‌های متفاوت گلوکز و ایجاد پاسخ مناسب در برابر آن نمی‌باشند، به این معنا که مقدار انسولین ترشحی در سلول‌های تمایز یافته در غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز بیش از ۲۷ میلی‌مولار گلوکز بود، که این مساله می‌تواند به دلایل زیر باشد:

- سلول‌های تمایز یافته دارای عملکرد طبیعی نیستند و نمی‌توانند متناسب با غلظت‌های مختلف گلوکز انسولین

ترشح‌کننده انسولین انسانی تمایز می‌یابند (۱۹). لذا در این مطالعه، سلول‌های $CD133^+$ خون بند ناف به منظور تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج این مطالعه که با استفاده از سلول‌های خالص شده $CD133^+$ خون بندناف صورت گرفت نیز نشان داد که این سلول‌ها، ژن‌های *OCT4* و *NANOG* را که از جمله ژن‌های بنیادی هستند بیان می‌کنند. در دو مطالعه جداگانه که توسط بال و مک گوکین بر سلول‌های خون بند ناف صورت گرفت، نیز نشان داده شده که این سلول‌ها ژن‌های *SOX1*، *SOX2*، *FGF4*، *REX1* و *OCT4*، *NANOG* را بیان می‌کنند (۲۰، ۱۶). از آن جا که هدف این مطالعه، بررسی توان تمایزی این سلول‌ها به سمت سلول‌های ترشح‌کننده انسولینی بود، لذا در مرحله بعد سلول‌های $CD133^+$ با استفاده از روش شای به منظور تولید سلول‌های اندودرم اصلی در تیمار با اکتیوین A و سپس رتینوئیک اسید قرار گرفتند (۲۱). به منظور تولید اندودرم پانکراس و پیش‌سازهای پانکراس نیز به محیط کشت این سلول‌ها *bFGF* اضافه شد و در نهایت تکثیر و رشد پیش‌سازهای پانکراس به واسطه فاکتورهای نظیر *B27*، *N2* و نیکوتین امید القا گردید.

نتایج میکروسکوپی نشان داد که در گروه مورد مطالعه، پس از مرحله اول شبه اجتماعی از سلول‌ها تشکیل گردید که پس از افزودن *bFGF*، دسته‌های سلولی با یکدیگر تشکیل کلونی داده و با افزودن فاکتورهای نظیر *B27* و نیکوتین‌آمید، کلونی‌ها بزرگ‌تر شدند. در مطالعه‌های پیشین نیز که روی تمایز سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف و سلول‌های $CD133^+$ و $CD34^+$ به سلول‌های انسولینی انجام شده، کلونی و اجتماعات سلولی مشاهده شده بود (۲۲، ۱۵). به این ترتیب تشکیل کلونی می‌تواند یکی از مراحل تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های انسولین‌ساز در نظر گرفته شود. این امر با بررسی بیان انسولین و پپتید-C که از شاخص‌های سلول‌های تمایز یافته انسولین‌ساز می‌باشند، توسط ایمنوسیتوشیمی مورد تایید قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های بیان‌کننده این دو شاخص در کلونی‌ها واقع شده‌اند. در این مطالعه، درصد سلول‌های

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه که با هدف تمایز سلول‌های CD133⁺ مثبت مشتق از خون بند ناف انسان انجام گرفت نشان داد که سلول‌های CD133⁺ مثبت مشتق از خون بند ناف انسان در روشی کوتاه، توانایی تمایز به سلول‌های تولیدکننده انسولین را دارا هستند.

این در حالی است که وجود پپتید - C در محیط کشت حاکی از سنتز انسولین در داخل سلول است. ژن‌های مراحل آخر تمایزی در سلول‌های انسولینی حاصل مشاهده نگردید. هم‌چنین سلول‌های انسولینی تمایز یافته به تیمار با غلظت‌های مختلف گلوکز پاسخ نداده و انسولین را ترشح نمی‌کردند. همه این نتایج نشان‌دهنده آن است که سلول‌های CD133⁺ در محیط آزمایشگاه قادر به شروع تمایز به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین می‌باشند، اما برای رسیدن به سلول‌های فعال ترشح‌کننده انسولین، نیازمند به سیگنال‌هایی از محیط زنده می‌باشند.

ترشح کنند.

- بخشی از انسولین آزاد شده در غلظت ۵ و ۲۷ میلی‌مولار، انسولین جذب شده از محیط کشت می‌باشند و توسط سلول و در پاسخ به گلوکز ساخته نشده‌اند. لذا پیشنهاد می‌گردد که برای رفع این محدودیت از کیت‌هایی استفاده شود که اختصاصاً پپتید - C را شناسایی می‌کنند و یا این که انسولین مورد استفاده را نشان‌دار کرده تا از انسولینی که توسط خود سلول ساخته می‌شود، قابل تشخیص باشد. هم‌چنین برای بهبود نتایج حاصل از تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز در محیط آزمایشگاه، انجام Quantitative Real Time PCR برای ژن‌های دخیل در تکوین پانکراس در مقاطع زمانی متعدد، تزریق سلول‌های حاصل از گروه مورد مطالعه به مدل‌های حیوانی جهت بررسی سطح قند خون، بررسی محتوای پروتئین انسولین و پپتید - C در سلول‌های تمایز یافته و انجام تمایز با طولانی‌تر کردن تیمار هر فاکتور القایی ضروری به نظر می‌رسد.

References :

- 1- Ashraf A, Abdullatif H, Hardin W, Moates JM. Unusual case of neonatal diabetes mellitus due to congenital pancreas agenesis. *Pediatr Diabetes* 2005; 6(4): 239-43.
- 2- Balasubramanyam A, Nalini R, Hampe CS, Maldonado M. Syndromes of ketosis-prone diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008; 29(3): 292-302.
- 3- Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, *et al.* Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51(7): 2148-57.
- 4- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5): 639-48.
- 5- Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, *et al.* Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(3): 998-1003.
- 6- Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(25): 16105-10.
- 7- Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A, Kania G, St-Onge L, Rupnik M, *et al.* Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol* 2004; 48(10):1095-104.
- 8- Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 2004; 22(3):265-74.
- 9- Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, *et al.* Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(8): 1940-53.
- 10- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003; 299(5605): 363.
- 11- Lock LT, Tzanakakis ES. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1399-412.
- 12- Denner L, Urban RJ. Critical issues for engineering cord blood stem cells to produce insulin. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(9):1251-4.
- 13- Suila H, Pitkänen V, Hirvonen T, Heiskanen A, Anderson H, Laitinen A, *et al.* Are globoseries glycosphingolipids SSEA-3 and -4 markers for stem cells derived from human umbilical cord blood? *J Mol Cell Biol* 2011; 3(2): 99-107.
- 14- Bhandari DR, Seo KW, Sun B, Seo MS, Kim HS, Seo YJ, *et al.* The simplest method for *in vitro* β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 2011; 82(3): 144-52.
- 15- Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappo J, Tilton RG, *et al.* Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif* 2007; 40(3): 367-80.
- 16- McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, *et al.* Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005; 38(4): 245-55.
- 17- Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 2007; 50(6): 1228-38.

- 18- Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2006; 48(5): 323-32.
- 19- Parekh VS, Joglekar MV, Hardikar AA. Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage. *Differentiation* 2009; 78(4): 232-40.
- 20- Baal N, Reisinger K, Jahr H, Bohle RM, Liang O, Münstedt K, *et al.* Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. *Thromb Haemost* 2004; 92(4): 767-75.
- 21- Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, *et al.* Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells* 2005; 23(5): 656-62.
- 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- Pirouz M, Baharvand H, Mohabbatkar H, Mohsenzadeh S, Nokhbeh M, Jafari H, *et al.* Simultaneous effect of extra cellular matrix and pancreas dynamic co-culture on differentiation of insulin producing cells from mouse embryonic stem cells. *Journal of Iranian Anatomical Sciences* 2007; 4(4): 331-4. [Article in Farsi]
- 24- Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem* 1985; 260(25): 13585-9.
- 25- Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem* 1985; 260(25): 13590-4.
- 26- Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, *et al.* Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(5-6): 782-93.
- 27- Fred RG, Welsh N. The importance of RNA binding proteins in preproinsulin mRNA stability. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 297(1-2): 28-33.

Original Article

Differentiation of human cord blood CD133⁺ cells into insulin secreting cells *in vitro*

Sahraneshin Samani F.¹, Ebrahimi M.², Zandieh T.¹, Mohamad M.²,
Aghdami N.², Baharvand H.¹

*1*Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

*2*Department of Regenerative Biomedicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The production of a sufficient number of pancreatic endocrine cells that function similarly to primary islets is one of the methods in treatment of diabetes. The CD133⁺ cells derived from cord blood (UCB-CD133) express some embryo specific markers such as SSEA-4 and OCT4 and so it can be a candidate for differentiation into insulin secreting cells. Therefore, here we attempt to determine the differentiation potential of UCB-CD133⁺ cells into insulin secreting cells *in vitro*.

Materials and Methods

UCB-CD133⁺ cells were isolated by MACS and differentiated into insulin secreting cells using the medium containing DMEM/F12, bFGF, Nicotinamid, and supplement B27 N2 for 9 days. The expression of insulin and c-peptide protein was detected by immunocytochemistry. The expression of insulin, Nkx6.1, Pdx1, and Glocagon genes was analyzed by RT-PCR; ELISA was performed to analysis the function of differentiated cells in different glucose concentrations (5 and 27 mM).

Results

Our results determined that UCB-CD133⁺ cells expressed insulin and c-peptide at protein level after 9 days of culture. However, the insulin, Nkx6.1, Pdx1, and Glocagon genes were not detected in differentiated cells and they could not respond to different concentrations of glucose.

Conclusions

We suggested that UCB-CD133⁺ cells can differentiate into insulin secreting cells *in vitro*; however, they are not functional and need to receive more signals *in vivo*.

Key words: Umbilical Cord Blood, Insulin-Secreting Cells, Diabetes Mellitus, Type 1

Received: 11 Jan 2012

Accepted: 1 Aug 2012

Correspondence: Ebrahimi M., PhD of Immunology. Assistant Professor of Department of Regenerative Biomedicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
P.O.Box: 19395-4644, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 23562000; Fax: (+9821) 22413790
E-mail: mebrahimi@royaninstitute.org