

## Effect of Extracellular Matrix on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Insulin-Producing Cells

A. Farrokhi, M.Sc.<sup>1,2</sup>, E. Elahi, Ph.D.<sup>2</sup>, M.Pirouz, M.Sc.<sup>1</sup>, H. Jafary, M.Sc.<sup>1</sup>, H. Baharvand, Ph.D.<sup>1,3\*</sup>

1. Stem Cells Department, Cell Science Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran

2. School of Biology, Tehran University, Tehran, I.R. Iran

3. Developmental Biology Department, University of Sciences and Culture, Tehran, Iran

\* Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran

Email: Baharvand@royaninstitute.org

### Abstract

Received: 14/Nov/2007, Accepted: 25/May/2008

**Objective:** Evaluation of extracellular matrices (ECMs) effect on differentiation of embryonic stem cells (ESCs) to pancreatic  $\beta$ -cell.

**Materials and Methods:** Mouse ESC line, Royan B1, was subjected to differentiation into  $\beta$ -like cells in a three-step method: generation of embryoid bodies (EBs), spontaneous differentiation and induction by Nicotinamide onto different matrices including poly L-ornithine/laminin, gelatin, and two different dilution of matrigel (1:30, 1:100) and control group (no ECM). At the final step, differentiated cells were analyzed for expression of some pancreas-specific genes using "semi-quantitative RT-PCR", for detection of insulin and C-peptide presence in cells using "immunocytochemistry" and for the evaluation of the amount of secreted insulin in response to glucose Using "insulin secretion assay".

**Results:** The semi-quantitative RT-PCR analysis of differentiated cells on 1:30 matrigel coated-plates showed consistent higher expression of  $\beta$ -cell specific markers including Insulin I, Insulin II, Slc2a2 in comparison to the other ECMs. The results of immunostaining for C-peptide showed no significant differences between the experimental groups and finally insulin secretion assay revealed that differentiated cells on 1:30 matrigel coated-plates secreted more insulin in response to glucose in comparison to the other ECMs.

**Conclusion:** Our results suggest that type of ECM may influence ESC differentiation into insulin-secreting cells and 1:30 matrigel was more effective. However, the success rate of differentiation needs further investigations using other appropriate ECMs.

**Keywords:** Embryonic Stem Cell, Differentiation,  $\beta$ -Cell, Extracellular Matrix

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 250-259

## تأثیر ماده زمینه برون سلولی بر تمایز سلول‌های مولد انسولین از سلول‌های بنیادی جنینی موش

علی فرخی <sup>۱</sup>، M.Sc.، الهه الهی <sup>۲</sup>، Ph.D.، مهدی پیروز <sup>۳</sup>، M.Sc.، هانیه جعفری <sup>۱</sup>، M.Sc.، حسین بهاروند <sup>۳</sup>، Ph.D.

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی، تهران، ایران

۲. دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، تهران، ایران

۳. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

\* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: Email: Baharvand@royaninstitute.org

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۵

\* **هدف:** بررسی تأثیر ماده‌های زمینه برون سلولی مختلف (پلی-ال-اورنیتین/لامینین، ژلاتین و ماتریژل) بر افزایش بازده تمایز سلول‌های مولد انسولین از بن‌یافته‌های جنینی موش

\* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تمایز با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی موش رده سلولی Royan B1 انجام شد. سلول‌های بنیادی جنینی پس از تبدیل شدن به اجسام شبه جنینی و سپس تمایز خودبه‌خودی، به روی ماده‌های زمینه برون سلولی ژلاتین، پلی-ال-اورنیتین/لامینین و ماتریژل با دو غلظت ۱/۳۰ و ۱/۱۰۰ منتقل شدند و تحت القای تمایز جهت دار به سلول‌های مولد انسولین قرار گرفتند. بیان تعدادی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های پانکراسی از جمله انسولین (Ins) و گلوکز ترانسفراز در سلول‌های تمایز یافته با روش RT-PCR بررسی شد. سلول‌های تمایز یافته با آنتی‌بادی‌های ضد انسولین و پپتید-C به روش ایمنوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های انسولین مثبت و پپتید-C مثبت نیز محاسبه شد. همچنین سلول‌ها از نظر میزان ترشح انسولین در پاسخ به غلظت‌های ۳ میکرومتر و ۲۲ میکرومتر گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

\* **یافته‌ها:** سلول‌هایی که روی ماتریژل با رقت ۱/۳۰ تمایز یافته بودند، در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشترین میزان ترشح انسولین را در پاسخ به گلوکز دارا بودند همچنین نتایج بررسی کمی نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلی‌مرز افزایش بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بتا، Ins1، Ins2، Slc2a2 در این گروه را نشان می‌داد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی با آنتی‌بادی ضد پپتید-C تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد سلول‌های رنگ گرفته برای سلول‌های تمایز یافته روی هر سه گروه پلی-ال-اورنیتین/لامینین، ژلاتین و ماتریژل نشان نداد.

\* **نتیجه‌گیری:** القای تمایز بن‌یافته‌های جنینی موش به سلول‌های مولد انسولین روی ماده زمینه برون سلولی ماتریژل بیان ژن‌های شاخص سلول بتا را تحریک می‌کند و بر میزان ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز تأثیر مثبت دارد.

\* **کلیدواژگان:** سلول بنیادی جنینی، تمایز، سلول بتا، ماتریکس برون سلولی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۴، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۵۹-۲۵۰

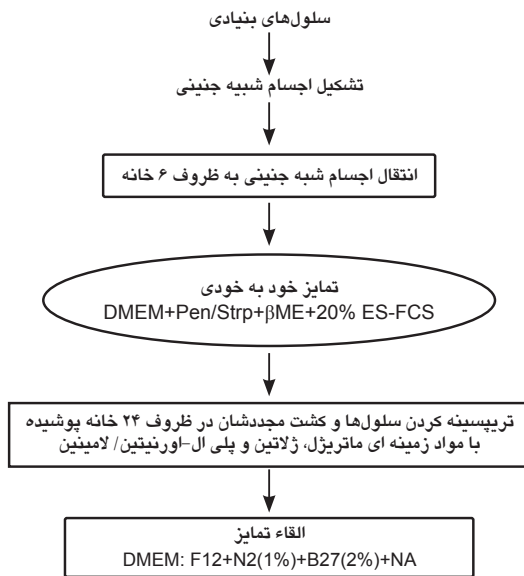
### مقدمه

لانگرهانس جدا شده، گزینه درمانی امیدوار کننده‌ای برای درمان این بیماری است. اما از مشکلات اصلی این روش‌ها رد ایمنولوژیک و محدودیت در تامین منابع پانکراس کامل یا جزایر لانگرهانس جدا شده انسانی برای پیوند است.

به همین دلیل محققان به دنبال منابع جدیدی از سلول‌های بتا هستند و تلاش‌های تحقیقاتی زیادی برای تولید بافت تولیدکننده انسولین برای پیوند در مدل‌های حیوانی و انسان متمرکز شده است. یک جایگزین برای پیوند عضو یا بافت، استفاده از منبعی از سلول‌های تجدید شونده است و تمایز سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز بزرگسالان یا جنینی به سلول‌های بتای پانکراسی مولد انسولین یکی از این روش‌ها است (۴). سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌هایی نامیرا هستند که قادرند به چندین دودمان سلولی تمایز یابند. مطالعات زیادی در زمینه تمایز این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های مولد انسولین انجام گرفته و استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان راهکاری بالقوه در درمان دیابت نوع ۱ مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های متفاوتی برای تولید سلول‌های مترشحه انسولین از

دیابت شیرین یک سندرم اختلال متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که میلیون‌ها نفر از مردم دنیا به آن مبتلا هستند. در واقع نوعی بیماری است که در آن غلظت قندخون بیشتر از حد طبیعی است. دیابت شیرین را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد: نوع ۱ و نوع ۲. دیابت شیرین نوع ۱ را دیابت وابسته به انسولین می‌نامند. این نوع دیابت، دیابت کم‌سالان است و در اثر عدم ترشح انسولین ایجاد می‌شود. اختلالی است که با تخریب خودایمن سلول‌های مولد انسولین در پانکراس مشخص می‌شود. دیابت نوع ۲ را که دیابت غیروابسته به انسولین می‌نامند بر اثر کاهش حساسیت بافت‌های هدف به اثرات متابولیک انسولین به وجود می‌آید. دیابت نوع ۲ می‌تواند به علت عوامل متعدد از مقاومت بافت‌های محیطی به اثرات انسولین تا عملکرد ناصحیح سلول‌های بتا ناشی از مرگ سلول‌های بتای پانکراسی باشد (۱-۳).

جایگزینی سلول‌های بتای پانکراسی از اهداف درمانی چندین دهه برای کاهش میزان مرگ و میر و پیشرفت دیابت نوع ۱ بوده است. پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل پانکراس کامل یا جزایر



شکل ۱: تصویری شماتیک از مراحل کار

برای آغاز تمایز، سلول‌های بنیادی به وسیله تربیسینه کردن به صورت تکی درآمدند و نیز از سلول‌های تغذیه کننده فیروبلاست موشی جدا شدند. پس از شمارش برای تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid Body; EB) سوسپانسیون از سلول‌ها در محیط کشت مخصوص سلول‌های بنیادی فاقد Leucemia Inhibitory Factor (LIF) تهیه شد. قطره گذاری روی سطح داخلی درب واژگون شده پلیت ۱۰ سانتی متری انجام شد. سپس درب به آرامی روی پلیت برگردانده شد و پلیت ۱۰ سانتی متری درون انکوباتور قرار داده شد. به طوری که در هر قطره (۲۰ میکرولیتری) تعداد ۵۰۰ سلول وجود داشته باشد. بعد از گذشت دو روز، اجسام شبه جنینی با استفاده از میکروسکوپ استریو به پلیت باکتریایی ۶ سانتی متری حاوی ۴ میلی لیتر محیط کشت مخصوص سلول‌های بنیادی فاقد LIF، منتقل و به مدت دو روز دیگر کشت داده شدند.

تعداد ۳۰ عدد از اجسام شبه جنینی ۴ روزه به ظروف کشت ۶ خانه (TPP) منتقل شدند و ۲ میلی لیتر محیط کشت مخصوص سلول‌های بنیادی فاقد LIF به هر خانه اضافه شد. بعد از یک روز انکوباسیون، محیط کشت حذف و ۲ میلی لیتر از محیط کشت تمایز خودبه خودی (جدول ۱) به هر خانه اضافه شد. در این مرحله ۸ روزه محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض می شد.

در این مطالعه از سه نوع ماتریکس استفاده شد: پلی ال-اورنیتین/لامینین، ژلاتین و ماتریزل (با دو غلظت متفاوت). در گروه کنترل از هیچ پوششی استفاده نشد.

برای پوشش با پلی ال-اورنیتین/لامینین به هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول پلی ال-اورنیتین ۱۶/۶ میکروگرم بر میکرولیتر اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. سپس محلول مورد نظر از روی سطح خانه جمع شد. از ۳۰۰ میکرولیتر محلول لامینین ۵ میکروگرم بر میکرولیتر استفاده شد و به مدت ۱ ساعت دیگر در انکوباتور انکوبه شد. برای پوشش با ژلاتین ۳۰۰ میکرولیتر محلول ژلاتین ۱ میکروگرم بر میلی لیتر و برای پوشش با ماتریزل، ماتریزل (Sigma, E 1270) مورد استفاده ۱۰۰ و ۳۰ برابر (در محیط کشت تمایز نهایی) رقیق شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور انکوبه شد.

سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی ارائه شده است (۸-۵). فاکتورهای مختلفی روی تمایز جهت دار بن‌یاخته‌های جنینی اثر می گذارند که از آن جمله می توان به ماده زمینه برون سلولی (Extra Cellular Matrix: ECM) اشاره کرد. ماتریکس برون سلولی، شبکه سازمان یافته‌ای متشکل از پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان و گلیکوپروتئین‌های متعدد از جمله لامینین‌ها، فیبرونکتین‌ها و کلاژن‌هاست. این مجموعه، چارچوب ساختاری و علائم زیستی را برای سلول‌هایی که دربر گرفته‌اند فراهم می آورد و فرایند تمایز سلولی را تنظیم می کنند. ماده زمینه برون سلولی در جنین پستانداران از مرحله دو سلولی تظاهر می یابد، هر چند ترکیب اجزای تشکیل دهنده آن و طرز قرارگیری و موقعیت فضایی آن نسبت به سلول در بافت‌های مختلف تفاوت دارد (۹). شواهد دال بر این است که وقتی سلول‌های جزایر پانکراسی شکل می گیرند، اندرکنش سلول جزیره ای با ماده زمینه برون سلولی و اندرکنش‌های سلول-سلول تجمع و تقسیم بندی بعدی سلول‌های جزیره ای را تنظیم می کنند. مطالعات اخیر نشان داده که سازماندهی انواع سلول‌های اندوکرینی به ساختارهای جزیره ای مناسب، می تواند به وسیله «اینترگرین‌ها»، گیرنده‌های غشایی که در سلول‌های جزیره ای و سلول‌های بتا بیان شده و به پروتئین‌های ماده زمینه برون سلولی متصل می شوند، تنظیم شود. اهمیت عملکردی اندرکنش سلول-ماده زمینه برون سلولی طی مطالعاتی که بر روی کشت سلول‌های جزیره ای انجام شده، نشان داده شده است. در این مطالعات سلول‌های جزیره ای جداسازی شده، بر روی سطوح پلاستیکی بدون ماتریکس توانایی ترشح انسولین بعد از تحریک با غلظت‌های فیزیولوژیک گلوکز را از دست می دهند. درحالی که وقتی سلول‌های جزیره ای بر روی ماتریکس برون سلولی کشت داده می شوند، عملکرد پاسخ به گلوکز را باز می یابند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ماتریکس برون سلولی نقش مهمی در تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بتا (۱۲-۱۰) کاردیومیوسیت‌ها (۱۳) دارد. ماتریکس برون سلولی با فراهم آوردن یک بستر مناسب نه تنها موجب اتصال بهتر سلول‌ها می شود بلکه بر بقا، تکثیر و تمایز سلول‌ها نیز تاثیرگذار است. از این رو به نظر می رسد نوع ماتریکسی که سلول‌ها روی آن کشت می شوند می تواند نقش مهمی در فراهم آوردن ریزمحیط تمایزی مناسب آنها داشته باشد. پاسخ تمایزی به ماتریکس‌های مختلف، وابسته به نوع سلول است. سلول‌ها، درون یا روی ماتریکس با یکدیگر ارتباط برقرار می کنند و بسیاری از اوقات حالت سه بعدی مشابه با بافت منشأ خودشان پیدا می کنند. در این مطالعه تاثیر ماده زمینه برون سلولی بر تمایز سلول‌های مولد انسولین از سلول‌های بنیادی جنینی موش، مورد ارزیابی قرار گرفته است. ماتریکس‌های مورد استفاده، ماتریزل، ژلاتین و پلی ال-اورنیتین/لامینین بوده‌اند.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی جنینی موش رده رویان B1 استفاده شد (۱۴).

### تمایز سلول‌های مولد انسولین از سلول‌های بنیادی جنینی

#### کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش

مراحل تمایز بر اساس روش بلیزوک و همکارانش (۱۵) با اندکی تغییرات انجام شد که به طور خلاصه در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: محیط‌های کشت مورد استفاده

محتویات	محیط کشت
KODMEM (10829-018)+2mM L-glutamin (25030-024)+0.1mM Non-essential amino acids (11140-035)+0.1mM $\beta$ -mercaptoethanol (sigma, M7522)+13.5% Fetal Calf Serum (10270-106)+50u/ml Penicillin+50 $\mu$ g/ml Streptomycine (15070-063)+1000u/ml Leukemia Inhibitory Factor (Chemicon, ESG1107)	محیط کشت سلول‌های بنیادی
DMEM (12800-116)+2mM L-glutamin (25030-024)+0.1mM Non-essential amino acids (11140-035)+0.1mM $\beta$ -mercaptoethanol (sigma, M7522)+20% Fetal Calf Serum (10270-106)+50u/ml Penicillin+50 $\mu$ g/ml Streptomycine (15070-063)+44mM NaHCO <sub>3</sub>	محیط کشت تمایز خود به خودی
DEMEM/F12 (12456-018)+2mM L-glutamin (25030-024)+1% N2 (17502-048) + 2% B27 (17504-044)+10mM Nicotin amide (sigma, N0636)+50u/ml Penicillin +50 $\mu$ g/ml Streptomycine (15070-063)	محیط کشت تمایز نهایی

به جز موارد مشخص شده همگی مواد از Gibco تهیه شده است؛ اعداد داخل پرانتز نشان دهنده شماره کاتالوگ محصول است.

پس از زمان‌های یاد شده برای هر کدام، محلول مورد نظر از روی سطح خانه جمع شد. در این مرحله ظروف کشت پوشانده شده قابل استفاده بودند. در پایان مرحله تمایز خودبه‌خودی، سلول‌ها با استفاده از روش آنزیمی و با استفاده از محلول آنزیم ۰/۰۵ درصد تریپسین/EDTA (Gibco, 25300) و بیپتاز کردن حتی‌الامکان به صورت تکی (Single Cell) درآمدند. سپس شمارش سلولی انجام شد و به هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه که قبلاً به وسیله ماتریکس‌های مختلف پوشش داده شده بود، تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول منتقل شد. سلول‌ها به مدت یک روز در همین محیط، کشت داده شدند. روز بعد سلول‌ها به کف ظروف کشت (و در حقیقت روی ماتریکس‌های موجود) چسبیده بودند. در این روز محیط قبلی با محیط تمایز نهایی (جدول ۱) جایگزین شد. مرحله تمایز نهایی ۱۸ روز به طول انجامید. در این مدت و به فاصله ۲ روز یک بار، دو سوم محیط کشت سلول‌ها با محیط تمایز نهایی جدید جایگزین شد. در پایان این مرحله سلول‌ها به روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

رنگ آمیزی با Ditzone (Sigma, I 9259) به کار گرفته شد. به منظور رنگ گرفتن هسته‌ها نیز رنگ (Propidium Iodide) PI به سلول‌ها اضافه شد و سپس نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه شدند. به منظور شمارش تعداد سلول‌های رنگ شده به وسیله آنتی‌بادی‌ها، به طور تصادفی زمینه‌های مختلفی از تمام قسمت‌های ظرف کشت حاوی سلول‌ها انتخاب شد و درصد سلول‌های رنگ پذیرفته (Positive) نسبت به کل سلول‌های زمینه گزارش شد.

#### رنگ آمیزی با Ditzone

ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از ماده (Ditzone) DTZ را در ۵۰ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl Sulphoxide) حل و به مدت چند دقیقه در دمای منهای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سلول‌ها در غلظت نهایی رنگ ۱۰ میکرومولار به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌هایی که در نتیجه این رنگ‌آمیزی به رنگ ارغوانی در آیند، ترشح‌کننده انسولین‌اند. پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌ها ۳ بار با PBS شستشو داده شدند و به آنها محیط کشت تمایز نهایی اضافه شد.

ایمنوسیتوشیمی و شمارش سلول‌های رنگ شده به وسیله آنتی‌بادی‌ها در ابتدا سلول‌های کشت شده در دمای آزمایشگاه ۲ بار با Phosphate Buffered Salin (PBS)+0.05% Tween 20 و هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس تثبیت سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و افزایش نفوذپذیری سلول‌ها با محلول Triton X-100 0.2% به مدت ۵۴ دقیقه در انکوباتور، انجام شد. آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی به مدت ۱ ساعت با سرم ۱۰ درصد کامل بز (Goat Whole Serum) پوشانده شدند. سپس محلول آنتی‌بادی اولیه رقیق شده در ۰/۵ درصد BSA و در PBS اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده در آب دیونیزه در تاریکی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد. آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده عبارت بودند از آنتی‌بادی موشی مونوکلونال علیه پپتید C- (Chemicon, CBL94) و آنتی‌بادی مونوکلونال علیه انسولین موشی (Sigma, I 2018). آنتی‌بادی IgG ضد موشی متصل به Fluorescence Isothiocyanate (FITC) که در بز تولید شده بود نیز به عنوان آنتی‌بادی ثانویه

بررسی بیان ژن‌ها به روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) و سنجش نیمه کمی آن (Semi-quantitative RT-PCR)

از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) برای ارزیابی بیان رونوشت‌های (Transcripts) خاص اندودرمی و پانکراسی استفاده شد. همچنین برای آنکه تغییر میزان بیان چند ژن مهم در گروه‌های مختلف نیز مورد ارزیابی قرار گیرد از روش سنجش نیمه کمی استفاده شد. در جدول ۲ نام ژن‌های مورد نظر نشان داده شده است.

در ابتدا با استفاده از کیت Nucleospin RNA II kit (740955; Macherey-Nagel, Germany) کل موجودی RNA از سلول‌های تمایز یافته استخراج شد و به منظور حذف آلودگی‌های DNA ژنومیک، تحت تیمار با Dnase I قرار گرفتند. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد. ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (K 1622 Fermentas) Revert Aid™ H-Minus First Strand cDNA Synthesis

جدول ۲: پرایمر های مورد استفاده در روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR)

Genes	Primer sequences (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	Size (bp)	Gene bank Code
<b>Ins 1 (Insulin I)</b>	ATC AGC AAG CAG GTC ATT GTT TAG TTC TCC AGC TGG TAG AGG G	58	343	NM_008386
<b>Ins 2 (Insulin II)</b>	CCT GCT GGC CCT GCT CTT AGG TCT GAA GGT CAC CTG CT	58	212	NM_008387
<b>Sst (somatostatin)</b>	TGC CTG AGG ACCTGCGACTA TCT CTG TCT GGT TGG GCT CG	60	257	NM_009215
<b>Gcg/ GLP-1 (Glucagon)</b>	CAG AGG AGA ACC CCA GAT CA TCA TGA CGT TTG GCA ATG T	58	205	NM_008100
<b>Slc2a2/ Glut2 (glucose transporter)</b>	GAG TTA CGT GAG CAT GAC TG TCA CAC ACT CTC TGA AGA CG	58	388	NM_031197
<b>Pcsk1/ PC1 (Proprotein convertase 1)</b>	GAA GGA AGG ATT GTG AAC TG AGC AGC CTG TCA TCT CTA TG	58	485	NM_013628
<b>Gata4</b>	CTC TAT CAC AAG ATG AAC GGC A CTG CTG TGC CCA TAG TGA GA	58	413	NM_008092
<b>Nestin</b>	TCG AGC AGG AAG TGG TAG G TTG GGA CCA GGG ACT GTT A	58	352	NM_016701
<b>Iapp/ amylin (Islet amyloid polypeptide)</b>	CTC TCT GTG GCA CTG AAC CA GAT TCC CTA TTT GGA TCC CC	58	221	NM_010491
<b>Isl1 ( islet 1)</b>	TAT CCA GGG GAT GAC AGG AAC GCT GTT GGG TGT ATC TGG GAG	64	256	NM_021459
<b>Cpa1 (Carboxypeptidase A1)</b>	CTG CTC AGA AAC TTA CCG TG CCA CTG GCT TGA TAG ATC GT	56	276	NM_025350
<b>β-Tubulin</b>	GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC	60	318	NM_011655

است که میزان بیان آن در شرایط مختلف تیمار سلولی ثابت در نظر گرفته شده و به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار می گیرد. به این ترتیب از سه تکرار مستقل آزمایش های سلولی، نمونه ها جمع آوری و ارزیابی شدند و در نهایت با آنالیز آماری، مقادیر بیان شده ژن ها برای نمونه های مختلف با هم مقایسه شدند.

#### بررسی میزان ترشح انسولین

ابتدا سلول ها با بافر کریس-رینگر که شامل ۱۲۰ میلی متر (NaCl)، ۵ میلی متر (KCl)، ۲/۵ میلی متر (CaCl<sub>2</sub>)، ۲۵ میلی متر NaHCO<sub>3</sub> Buffer، ۱۰ درصد BSA است، دوبار شست و شو شدند و سپس بافر حاوی گلوکز با غلظت ۳ میلی متر اضافه شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شدند. پس از این مدت، محیط روی سلول ها (Supernatant) برداشته شد و تا زمان بررسی میزان انسولین، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از آن سلول ها دو بار با بافر کریس-رینگر شست و شو داده شدند. در مرحله بعد، این بار سلول ها با بافر حاوی گلوکز با غلظت ۲۲ میلی متر مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شدند و مراحل، مانند قبل ادامه پیدا کرد. به منظور بررسی میزان ترشح انسولین توسط سلول ها از کیت سنجش انسولین موشی به روش ELISA (از شرکت DRG، EIL-3440) مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد.

#### روش آماری

نتایج حاصل با نرم افزار SPSS 13 و با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه و در سطح معنی داری  $p < 0.05$  بررسی شدند. در مورد داده های کمی، این داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای

نسخه برداری معکوس شد. در اینجا علاوه بر نمونه ای که تمام مواد لازم برای واکنش را دارا بود از نمونه کنترل منفی (RT<sup>-</sup>) که فاقد آنزیم RT بود نیز استفاده شد تا آلودگی احتمالی نمونه به DNA مورد ارزیابی قرار گیرد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای پی بردن به بیان ژن های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۷ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت شدند. سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (Uvidoc, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت.

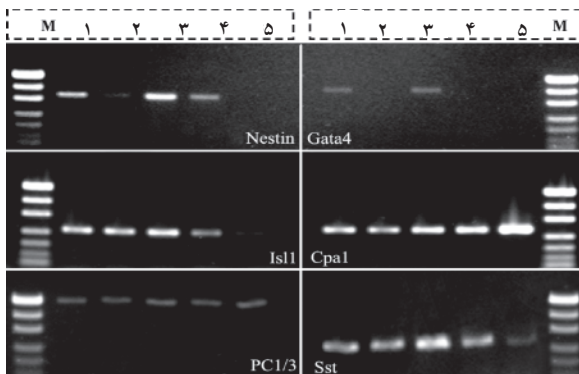
برای انجام سنجش نیمه کمی ژن های مورد نظر که  $\beta$ -Tubulin و *Insulin1*, *Insulin2*, *Slc2a2*, *IAPP*, *Glucagon* و واکنش زنجیره ای پلی مرز با شرایطی که از قبل برای این ژن ها تعیین شده بود انجام گرفت. این شرایط از لحاظ مقدار پرایمر مصرفی و تعداد سیکل های واکنش زنجیره ای پلی مرز به گونه ای بود که واکنش ها از لحاظ کینتیک قبل از فاز اشباع و در فاز نمایی باشند. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز و بعد از آن الکتروفورز محصولات و رنگ آمیزی ژل، با استفاده از سیستم عکس برداری از ژل Uvi Doc، از ژل و باندهای محصولات عکس گرفته شد. این تصاویر بر روی دیسکت ذخیره و به کامپیوتر انتقال داده شدند. باندهای مربوط به هر یک از نمونه ها با استفاده از نرم افزار Uvi Band Map دانسیتومتری و آنالیز شدند. مقادیر به دست آمده میزان محصولات PCR هر یک از نمونه ها را نشان می دادند. در مورد هر نمونه مقدار به دست آمده برای هر ژن، تقسیم بر مقدار به دست آمده برای ژن  $\beta$ -Tubulin برای همان نمونه شد، تا نرمالیزاسیون مقادیر صورت گیرد.  $\beta$ -Tubulin در زمره ژن های Housekeeping

معیار از میانگین (Mean±SEM) گزارش شدند.

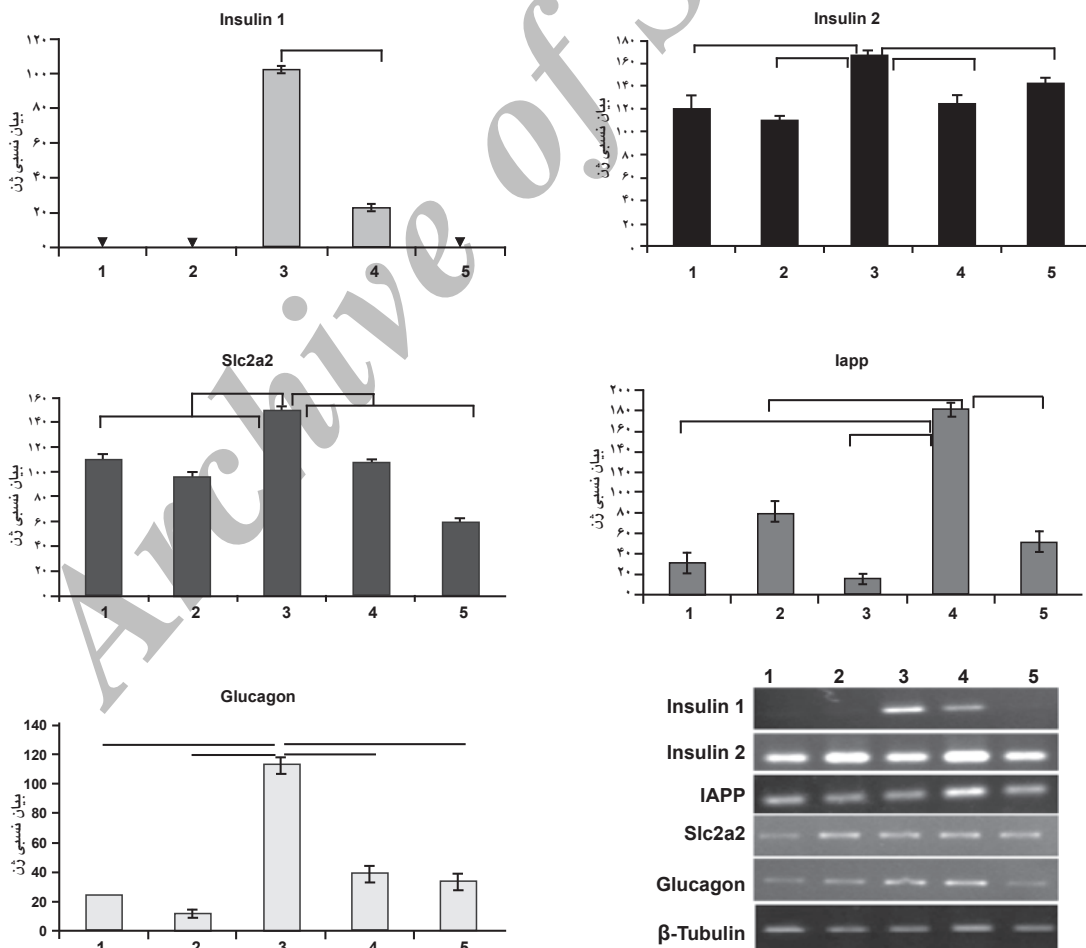
ارزیابی قرار گیرند.

### یافته‌ها

افزایش بیان ژن‌های *Slc2a2* و *Ins2*, *Ins1* در سلول‌هایی که بر روی ظروف پوشش داده شده با ماتریژل تمایز یافتند، بیان ژن‌های مختلف شاخص سلول‌های بتا و سلول‌های دیگر پانکراسی در پایان مرحله تمایز نهایی بررسی شد (شکل ۲ و ۳). ژن‌هایی که بیان آنها مورد بررسی قرار گرفت شامل ژن‌های شاخص سلول بتا (*Ins I*, *Ins II* و *IAPP*) و ژن رمزکننده پروتئین‌های غشایی سلول بتا که کانال عبور گلوکز از غشا را می‌سازند (*Slc2a2 or Glut2*)، ژن عملکردی مسیر پردازش مولکول انسولین در دستگاه گلیزی (*PC1/3*)، ژن شاخص بخش برون ریز پانکراس (*Cpt1*)، ژن *Isl1* که از فاکتورهای رونویسی لازم برای سلول‌های بتاست، ژن‌های شاخص سلول‌های آلفا (*Glucagon*) و دلتای پانکراسی (*somatostatin*) و از دو ژن *Nestin* و *Gta4* نیز به عنوان شاخص‌های سلول‌های مزواندودرمی و اکتودرمی استفاده شد تا جمعیت سلولی نهایی از لحاظ دارا بودن بقیه انواع سلول‌ها نیز مورد



شکل ۲: بیان ژن‌های *Nestin*, *Gata4*, *Isl1*, *Cpa1*, *PC1/3*, *Sst*.  
 1: poly-L ornithin/laminin, 2: Gelatin, 3: matrigel 1/30, 4: atrigel 1/100, 5: uncoated, M) DNA ladder



شکل ۳: بررسی بیان نیمه کمی ژن‌های *Ins1*, *Ins2*, *IAPP*, *Slc2a2*, *Glucagon* بین گروه‌های مختلف 1: poly-L ornithin /laminin(O/L), 2: Gelatin(gel), 3: matrigel 1/30(mat1/30), 4: matrigel 1/100(mat1/100), 5: uncoated, M- DNA ladder, داده‌ها به صورت Mean±SEM, p≤0.05 ارائه شده‌اند.

گروه ژلاتین ۰/۶۶±۰/۱۱، گروه ماتریژل ۰/۸۲±۰/۰۴ و گروه پلی ال-اورنیتین/لامینین ۰/۷۳±۰/۰۵ درصد کل سلول‌ها پپتید C- مثبت بودند. در مورد انسولین، تنها گروه پلی ال-اورنیتین/لامینین بود که به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) با ۱/۶۸±۰/۱۲ درصد سلول‌های انسولین مثبت بیشتر از سایر گروه‌ها بود. گروه ژلاتین ۱/۲۵±۰/۰۷ و ماتریژل ۱/۳۷±۰/۰۴ درصد، سلول‌های انسولین مثبت داشتند. به منظور شمارش درصد سلول‌های مثبت برای هر گروه، بیش از ۳۰۰۰۰ سلول از سه تکرار مستقل از هم شمارش شد (داده‌ها به صورت Mean±SEM ارائه شده‌اند).

**رنگ‌آمیزی سلول‌های حاوی انسولین در کشت به وسیله DTZ**  
رنگی DTZ است که به یون روی موجود در مولکول انسولین موجود در سلول متصل می‌شود (Chelate) و آنها را به رنگ قرمز در می‌آورد (۸). در پایان مرحله تمایز نهایی، سلول‌ها با DTZ رنگ‌آمیزی شدند. در بین سلول‌های موجود در کشت، سلول‌های حاوی انسولین به صورت اجتماعات سلولی سرخی، رنگ گرفتند (شکل ۴د).

**بررسی میزان ترشح انسولین**  
مهمترین ویژگی عملکردی (Functional) سلول‌های بتا در بدن، تنظیم میزان قندخون از طریق ترشح انسولین است. ترشح تنظیم شده برای آزادسازی مقادیر زیاد انسولین بعد از غذا لازم است. در پایان تمایز سلول‌های بنیادی به منظور بررسی توانایی سلول‌های شبه بتای تمایز یافته از این سلول‌ها، آزمون سنجش میزان انسولین ترشحي در پاسخ به دو غلظت مختلف (۳ میلی‌مولار، ۲۲ میلی‌مولار) گلوکز، از سلول‌های فاز تمایز نهایی به عمل آمد.

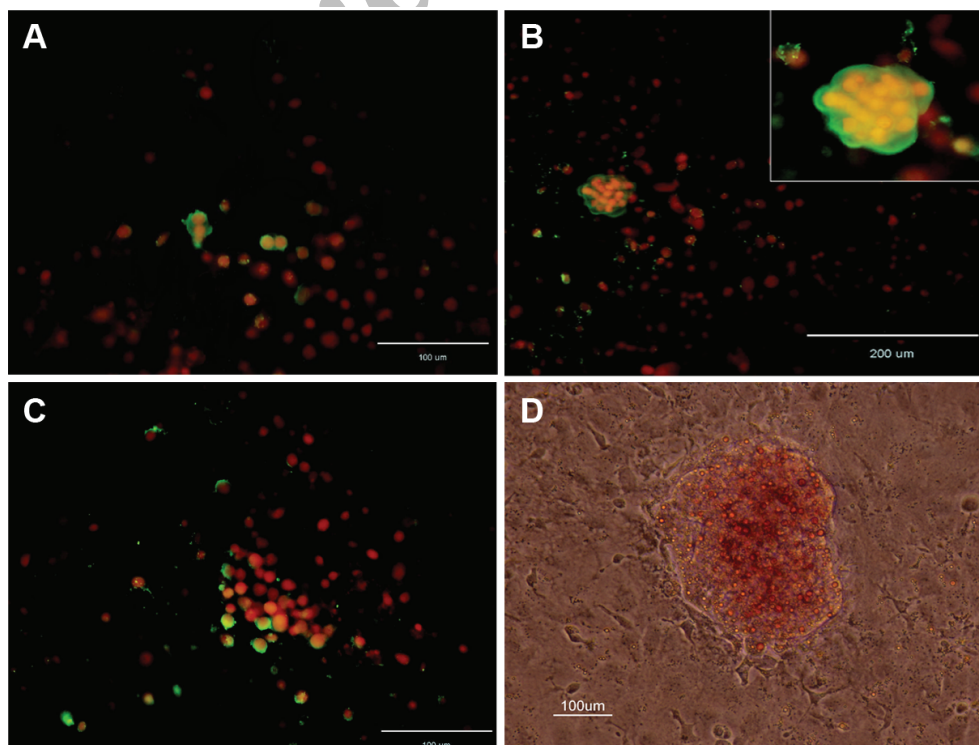
در سلول‌هایی که روی ژلاتین و پلی ال-اورنیتین/لامینین و نیز ظروف کشت پوشش داده نشده (گروه Un-coated) تمایز یافتند، بیان ژن‌های شاخص عمومی از جمله Slc2a2، PCI/3، IAPP، Isl1، Cpt1 نشان داده شد. اما بیان ژن اختصاصی سلول‌های بتا یعنی Ins I در اکثر تکرارهای سلولی حذف شد.

در سلول‌هایی که بر روی ظروف پوشش داده شده با ماتریژل تمایز یافته بودند همگی ژن‌های شاخص مورد مطالعه بیان شد که از همه مهم‌تر بیان بارز ژن‌های Ins I و Ins II، شاخص‌های اصلی سلول‌های بتاست. نتایج بررسی بیان نیمه کمی نیز نشان داد که در گروه Mat1/30 در سطح معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بیان ژن‌های Ins2، Ins1 و Slc2a2 نسبت به بقیه گروه‌ها افزایش یافته است. حتی در مورد ژن Glucagon نیز که شاخصه سلول‌های آلفای پانکراسی است، وضعیت به همین ترتیب بود.

به دلیل نتایج بهتر بررسی بیان ژن در گروه Mat1/30 نسبت به Mat1/100 برای ادامه کار و بررسی‌های بیشتر گروه Mat1/30 به عنوان گروه نماینده ماده زمینه ماتریژل استفاده شد.

**رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌ها به وسیله آنتی‌بادی علیه انسولین و پپتید C-**

کلیه سلول‌ها با PI رنگ‌آمیزی شده بودند که نشان دهنده هسته آنها بود. سلول‌های مثبت علاوه بر رنگ قرمز (موقعیت هسته)، در سیتوپلاسم خود رنگ سبز را پذیرفته بودند که نشان دهنده موقعیت سیتوپلاسمی انسولین و پپتید C- (شکل ۴A, B, C) بود. پس از شمارش تعداد سلول‌های مثبت برای پپتید C- تغییر و افزایش معنی‌داری بین گروه‌های مختلف دیده نشد به گونه‌ای که در



شکل ۴: رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌ها به وسیله آنتی‌بادی بر علیه پپتید C-؛ A: سلول‌ها بر روی ژلاتین، B: ماتریژل، C: پلی ال-اورنیتین/لامینین کشت داده شده‌اند. D: اجتماع سلولی رنگ پذیرفته با DTZ، دارای سلول‌های حاوی انسولین

جزایر پانکراسی است (۲۱).

برای بررسی از سه روش RT-PCR نیمه کمی، ایمونوسیتوشیمی و سنجش میزان ترشح انسولین استفاده شد که امکان مطالعه را به ترتیب در سه سطح RNA (رونویسی)، پروتئین (ترجمه) ژنهای اختصاصی و عملکرد سلولهای تمایز یافته فراهم می کرد.

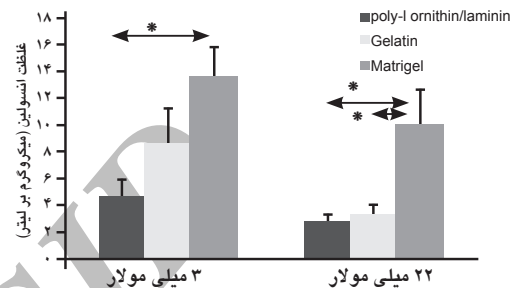
آنچه در تفسیر نتایج آنالیز بیان ژنی معیار اصلی قرار گرفت، بیان ژن کلیدی انسولین بود. انسولین هورمونی مهم در برقراری هموستازی است که در سلولهای بتای جزایر پانکراسی سنتز، ذخیره و ترشح می شود. پروتئین انسولین به صورت یک پیش ساز، پره پروانسولین سنتز می شود که در بین گونه های جانوری بسیار حفظ شده است (Highly Conserved). بر خلاف اغلب پستانداران، در موش ورت، انسولین از دو ژن مشابه ولی غیر آلفا که پروانسولین های ۱ و ۲ را رمز می کنند به وجود می آید. مطالعات نشان داده است که دو ژن پروانسولین، لا اقل تا اندازه ای، به صورت مستقل تنظیم می شوند. ژن *Ins I* تنها در سلولهای بتای پانکراسی موش بیان می شود و بیان آن موید حضور سلول شبه بتا در کشت است. ژن *Ins II* هم در سلول بتا بیان می شود و هم در تعدادی از سلولهای غیر پانکراسی (۲۴-۲۲). از این رو با وجود آنکه بررسی بیان یا عدم بیان این ژن ارزشمند است با این حال بیان آن را نمی توان به طور مطلق به سلولهای بتا نسبت داد.

آنچه که از داده های RT-PCR به دست آمد بیانگر حضور رونوشت های ژن انسولین ۱ تنها در گروه های ماتریژل بود. در گروه ماتریژل ۱/۳۰، در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ ) بیان ژنهای *Glucagon* و *Ins1*، *Slc2a2*، *Ins2* نسبت به بقیه گروه ها افزایش یافته بود. از طرفی گروه ماتریژل ۱/۳۰ نسبت به گروه ماتریژل ۱ درصد هم در وضعیت بهتری قرار داشت که نشان دهنده مناسب بودن این غلظت از ماتریژل برای پوشاندن کف ظروف کشت بود.

در بررسی های ایمونوسیتوشیمی که برای نشان دادن وجود پروتئین انسولین در سلولهای تمایز یافته انجام شد گروه پلی ال-اورنیتین/لامینین بیشترین میزان سلولهای مثبت را نشان می داد. اما این نکته نباید فراموش شود که محیط کشت مورد استفاده متداول در تمایز سلولهای بنیادی، حاوی افزودنی *N2* است که در خود غلظت بالایی (۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از انسولین دارد (ر.ک. مواد و روش ها) و از این رو احتمال جذب (Uptake) انسولین از محیط کشت توسط سلولها وجود دارد که تفسیر نتایج را با محدودیت مواجه می سازد. برای مرتفع ساختن این محدودیت می توان از آنتی بادی هایی استفاده کرد که اختصاصا پپتید C- را شناسایی می کنند و یا آنکه انسولین مورد استفاده در کشت را نشاندار کرد تا از انسولینی که خود سلول می سازد قابل تشخیص باشد. در این مطالعه، برای متمایز کردن انسولینهای ترشحاتی از انسولینهای جذبی از آنتی بادی های ضد پپتید C- نیز استفاده شد. با شمارش سلولهای پپتید C- مثبت، همه گروه های سلولهای رنگ گرفته داشتند اما تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف دیده نشد. داده های حاصل از رنگ آمیزی با DTZ نیز بیانگر حضور تجمعات رنگ گرفته در هر سه گروه بود (شکل ۴D).

نتایج حاصل از بررسی میزان ترشح انسولین نیز نشان داد که سلولهای کشت شده روی ماتریژل نسبت به بقیه گروه ها، در پاسخ به گلوکز، انسولین بیشتری ترشح کرده اند. البته برخلاف انتظار، مقدار انسولین ترشحاتی در غلظت ۲۲ میلی متر گلوکز بیشتر از ۳ میلی متر نبود که این مسئله یا بیانگر این است که سلولهای تمایز یافته دارای عملکرد طبیعی نیستند و نمی توانند متناسب با غلظت های مختلف

سلولهای تمایز یافته روی ماتریکس های مختلف پاسخ متفاوتی به گلوکز محیط نشان دادند به طوری که سلولهای کشت شده روی ماتریژل، در غلظت ۲۲ میلی مولار گلوکز در مقایسه با سلولهای کشت شده روی ژلاتین و پلی ال-اورنیتین/لامینین و در غلظت ۳ میلی مولار گلوکز در مقایسه با سلولهای کشت شده روی پلی ال-اورنیتین/لامینین افزایش معنی داری ( $p \leq 0.05$ ) در میزان ترشح انسولین نشان دادند (نمودار ۱).



نمودار ۱: A: میزان ترشح انسولین در بین گروه های مختلف در پاسخ به دو غلظت مختلف (۳ میلی مولار، ۲۲ میلی مولار) گلوکز \* داده ها به صورت  $p \leq 0.05$  Mean  $\pm$  SEM ارائه شده اند.

## بحث

بسیاری از سلولها در بافت های مختلف، حداقل به واسطه یک سطح با ماده زمینه برون سلولی در ارتباط هستند و تقریباً اولین ساختار مولکولی است که سلولهای بنیادی با آنها برهم کنش دارند و به نظر می رسد که برای برنامه ریزی تمایز آنها حائز اهمیت باشد (۱۶).

در حالت طبیعی، ماده زمینه برون سلولی جزایر پانکراسی را احاطه می کند و غشای پایه ای را تشکیل می دهد که سلولهای اندوکرینی را از مجاری پانکراسی جدا می کند. اگر چه اجزای مولکولی این غشای پایه هنوز به طور کامل مطالعه نشده، اما شواهدی وجود دارد که نشان می دهد بعضی از مولکولهایی که عموماً در غشای پایه اپیتلیالی یافت می شوند در رشد و تمایز سلولهای بتا نقش ایفا می کنند (۱۷).

در این مطالعه، تاثیر سه نوع ماده زمینه برون سلولی ماتریژل، ژلاتین و پلی ال-اورنیتین/لامینین بر تمایز سلولهای مولد انسولین از بن یاخته های جنینی موش بررسی شد. ماتریژل، عصاره پروتئینی محلول و استریل گرفته شده از غشای پایه سلولهای سارکومای موش (Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) است که اجزای اصلی آن لامینین (۶۰ درصد)، کلاژن (۳۰ درصد)، پروتئوگلیکانهای هیپاران سولفات (۸ درصد) و انتاکین یا نیدوزن (۱ درصد) است. همچنین حاوی انواع مختلفی از فاکتورهای رشد مانند  $TGF-\beta$ ،  $FGF-\beta$ ،  $EGF$  و... است (۱۸). ژلاتین، فرم واسرشت شده کلاژن در پردازش اسیدی (Acidic Process) یا بازی (Alkaline Process) است و اگر چه به هنگام بسته شدن فاقد ساختمان در هم تنیده منظم کلاژن است اما از لحاظ توالی اسید آمینه ای مشابه با کلاژن است. مطالعات قبلی نشان داده که کشت سلولهای اپیتلیالی پانکراس جنین موش، البته در حضور مزانشیم، روی کلاژن ۱- باعث تمایز آنها به سلولهای اندوکرینی می شود و ساختارهای جزیره ماندی را شکل می دهند (۱۹). مونسانو و همکارانش نیز نشان داده اند که کشت سلولهای اندوکرینی پانکراس رت در ماتریکس کلاژن باعث شکل گیری ساختارهای جزیره ماند شده است (۲۰). پلی ال-اورنیتین/لامینین نیز، شبکه ای از مولکولهای لامینین و پلی ال-اورنیتین است. لامینین از اجزای اصلی غشای پایه



و نشان داده شده که مسیرهای سیگنالینگ و بیان ژنی به واسطه اتصال سلول‌های بتا به ماده زمینه، فعال می‌شوند و بقای سلول‌های بتا را بهبود می‌بخشند (۳۵). تنوع در اجزای تشکیل دهنده ماده زمینه نیز یکی از راه‌های تنظیم رفتارهای سلولی است. ترکیب تشکیل دهنده ماده زمینه ایستا نیست و الگوی متغیری از بیان اجزای خاصی، در طول مراحل تکوین مشاهده می‌شود. وجود چنین منابعی از تغییرات مبین آن است که در یک زمان و مکان مشخصی، ماده زمینه، پتانسیل این را دارد که محیط اطلاعاتی خاصی را برای سلول فراهم کند (۹).

فاکتورهای رشد و مولکول‌های ماده زمینه از راه‌های مختلفی برهم کنش دارند که این یکی دیگر از مکانیسم‌هایی است که ماده زمینه می‌تواند ویژگی‌های سلولی را تحت تاثیر قرار دهد (۳۶). یکی از این راه‌ها، اتصال فاکتورهای رشد به مولکول‌های ماده زمینه و تحت تاثیر قرار گرفتن غلظت موضعی و فعالیت زیستی آنها است. مسئله دیگر اینکه، مولکول‌های ماده زمینه خودشان به تنهایی می‌توانند میتوژنیک باشند. به عبارتی برخی از پروتئین‌های ماده زمینه دارای فعالیت ذاتی فاکتور رشدی هستند. به عنوان مثال گزارش شده که لامینین، تناسین و ترومبوپوندین دارای چنین خاصیتی هستند (۳۹-۳۷). در هر حال، درک کامل این فرایندها نیازمند مطالعات بیشتر و بررسی اجزای تاثیرگذار ماده زمینه برون سلولی و مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی است.

### نتیجه گیری

با توجه به مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد فراهم آوردن ریزمحیط (Micro-Environment) مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند به طور موثری موجب تمایز به سلول‌های مولد انسولین شود. با توجه به مطالعات مختلف انجام شده بر روی کشت سلول‌ها و بافت‌های مختلف بر روی طیف وسیعی از مواد زمینه برون سلولی، و به دست آمدن این نتیجه که سلول‌های کشت داده شده وقتی در شرایطی مطلوب هستند که آنها بر روی ماده زمینه‌ای کشت شوند که بیشترین شباهت و نزدیکی را به ماده زمینه آن سلول در حالت طبیعی دارند (۲۹)، بنابراین به نظر می‌رسد کشت و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مولد انسولین روی ماده زمینه‌ای ماتریژل بازده بهتری دارد. همچنین بهتر است 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.

### تقدیر و تشکر

هزینه انجام این طرح توسط پژوهشکده رویان و شبکه سلول‌های بنیادی کشور تامین شده است.

### References

1. Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat-Waser R, Montanya E, Martin F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother*. 2001; 55:206-212.
2. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001; 414:782-787.
3. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia*. 2004; 47:499-508.

گلوکز انسولین ترشح کنند، یا اینکه بخشی از انسولین آزاد شده در مرحله اول (۳ میلی‌مولار)، انسولین‌های جذب شده از محیط کشت هستند و توسط سلول و در پاسخ به گلوکز ساخته نشده‌اند. با در نظر گرفتن این مسائل، آنچه که در این مطالعه مشاهده شد تاثیر مثبت کشت سلول‌ها روی ماتریژل بر میزان ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز بود (نمودار ۱). پرفتی و همکارانش نشان داده‌اند که کشت جزایر پانکراسی روی ظروف پوشیده با ماتریژل تاثیر بسیار خوبی بر حفظ فعالیت و عملکرد طبیعی سلول‌های بتا دارد. به گونه‌ای که توان ترشح انسولین این سلول‌ها در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز و نیز میزان رونویسی ژن‌های انسولین، گلوکاگون و سوماتوستاتین افزایش می‌یابد (۲۵).

مجموع مشاهدات، بیانگر تاثیر مثبت حضور ماده زمینه برون سلولی بر روند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مولد انسولین بود که این مطلب با گزارش‌های قبلی مبنی بر تاثیر مواد زمینه‌ای برون سلولی مختلف بر تمایز انواع دیگری از سلول‌ها، کشت جزایر پانکراسی و نیز افزایش توان ترشح انسولین سلول‌های بتای کشت شده مطابقت داشت (۲۸-۲۶). اینکه چگونه مواد زمینه برون سلولی به خصوص ماتریژل در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتا نقش ایفا می‌کنند کاملاً شناخته شده نیست اما از چند جنبه قابل بررسی است.

برهم کنش سلول-ماده زمینه، تاثیر مهمی بر ویژگی‌های سلولی از جمله تنظیم بیان ژن، ساختار اسکلت سلولی، تمایز و کنترل رشد سلولی دارد. اگر چه سلول‌ها به هنگام کشت، در هر حال به کف ظروف ساخته شده با مواد غیرارگانیک مانند سطوح پلاستیکی و شیشه‌ای می‌چسبند و رشد می‌کنند، اما بسیاری از انواع سلول‌ها نیازمند مولکول‌های ارگانیک برای چسبیدن کامل به سطوح ظروف کشت و انجام فرایند تمایزند (۲۹). نشان داده شده که انواع مختلفی از سلول‌ها، اگر روی سوبسترای اجزای مشابه ساختار ماده زمینه برون سلولی طبیعی همان سلول‌ها کشت شوند، بهتر رشد می‌کنند و نگهداری می‌شوند (۳۲-۳۰). ماتریژل همانند غشای پایه حاوی منبعی سرشار از پروتئوگلیکان‌ها و فاکتورهای رشد است که محیط مناسبی را برای حفظ شرایط طبیعی سلول‌ها فراهم می‌کند و به خاطر آنکه برگرفته از غشای پایه سلول‌های اپیتلیالی است مشابهت زیادی با غشای پایه جزایر پانکراسی دارد. بنابراین در محیط *in vitro* نیز شاید بتواند تمایز به سمت سلول‌های بتا را تقویت کند.

با کشت سلول‌ها روی ماتریکس، از فرایند آپوپتوزی خاصی که آنوکیس (Anoikis) نام دارد پیش‌گیری می‌شود (۳۳) و گزارش شده که برقراری دوباره ارتباط صحیح و مناسب سلول با ماده زمینه می‌تواند در کاهش مرگ سلولی نقش داشته باشد (۳۴). تاثیر این ویژگی ضد آپوپتوزی ماده زمینه روی کشت سلول‌های بتا نیز مطالعه

4. Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol*. 2004; 113: 3-13.
5. 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: 1389-1394.
6. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 2001; 50:1691-1697.
7. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA,

- Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000; 49:157-162.
8. Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating di-thizone. *Stem Cells*. 2002; 20: 284-292.
  9. Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993; 117: 1183-1198.
  10. Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes*. 2003; 52: 2007-2015.
  11. Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells*. 2005; 23: 656-662.
  12. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 7999-8004.
  13. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38: 495-503.
  14. 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: 76-81.
  15. 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: 1095-1104.
  16. Philp D, Chen SS, Fitzgerald W, Orenstein J, Margolis L, Kleinman HK. Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2005; 23: 288-296.
  17. Bosco D, Gonnelle-Gispert C, Wollheim CB, Halban PA, Rouiller DG. Increased intracellular calcium is required for spreading of rat islet beta-cells on extracellular matrix. *Diabetes*. 2001; 50:1039-1046.
  18. Yang JZ, Ho AL, Ajonuma LC, Lam SY, Tsang LL, Tang N, et al. Differential effects of Matrigel and its components on functional activity of CFTR and ENaC in mouse endometrial epithelial cells. *Cell Biol Int*. 2003; 27: 543-548.
  19. Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development*. 1996; 122: 439-447.
  20. Montesano R, Mouron P, Amherdt M, Orci L. Collagen matrix promotes reorganization of pancreatic endocrine cell monolayers into islet-like organoids. *J Cell Biol*. 1983; 97: 935-939.
  21. Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ, Harrison LC. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 1999; 48: 722-730.
  22. Giddings SJ, Carnaghi L. Rat insulin II gene expression by extraplacental membranes. A non-pancreatic source for fetal insulin. *J Biol Chem*. 1989; 264: 9462-9469.
  23. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 2458-2463.
  24. Dutton JR, Chillingworth NL, Eberhard D, Brannon CR, Hornsey MA, Tosh D, et al. Beta cells occur naturally in extrahepatic bile ducts of mice. *J Cell Sci*. 2007; 120: 239-245.
  25. Perfetti R, Henderson TE, Wang Y, Montrose-Rafizadeh C, Egan JM. Insulin release and insulin mRNA levels in rat islets of Langerhans cultured on extracellular matrix. *Pancreas*. 1996; 13: 47-54.
  26. Brun JF, Orsetti A. Secretory activity of the islands of Langerhans of newborn rats cultured in vitro on bovine corneal endothelial matrix. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1986; 180: 97-104.
  27. Kaiser N, Corcos AP, Tur-Sinai A, Ariav Y, Cerasi E. Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintenance of differentiated B-cell function. *Endocrinology*. 1988; 123: 834-840.
  28. Bosco D, Meda P, Halban PA, Rouiller DG. Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin. *Diabetes*. 2000; 49: 233-243.
  29. VanWinkle WB, Snuggs MB, Buja LM. Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1996; 32: 478-485.
  30. Hahn U, Cho A, Schuppan D, Hahn EG, Merker HJ, Riecken EO. Intestinal epithelial cells preferentially attach to a biomatrix derived from human intestinal mucosa. *Gut*. 1987; 28 Suppl: 153-158.
  31. Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC. Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem*. 1987; 166: 1-13.
  32. Kruk PA, Auersperg N. A line of rat ovarian surface epithelium provides a continuous source of complex extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1994; 30A: 217-225.
  33. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 1994; 124: 619-626.
  34. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis*. 2002; 7: 247-260.
  35. Hammar E, Parnaud G, Bosco D, Perriraz N, Maedler K, Donath M, et al. Rouiller DG, Halban PA. Extracellular matrix protects pancreatic beta-cells against apoptosis: role of short- and long-term signaling pathways. *Diabetes*. 2004; 53: 2034-2041.
  36. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol*. 1991; 113:981-986
  37. Panayotou G, End P, Aumailley M, Timpl R, Engel J. Domains of laminin with growth-factor activity. *Cell*. 1989; 56: 93-101.
  38. Majack RA, Cook SC, Bornstein P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 9050-9054.
  39. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*. 1986; 47: 131-139.