دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ودوم–شماره ۱۱۵
اسفند ۱۳۹۳

دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۱۱/۲۱
پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸

بررسی القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتای پانکراس به‌وسیله عصاره متانولی یونجه

نویسندگان: فریبا اسماعیلی[1]، نواز خرازیان[2]، فریبا هوشمند[3] و سمیه منصورزاده[4]*

۱. دانشیار گروه فیزیولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه اصفهان، ایران
۲. دانشیار گروه سیستماتیک گیاهی پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد، ایران
۳. دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران
٤. دانشجوی فیزیولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول: سمیه منصورزاده E-mail: mansooradehs@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: جایگزینی سلول‌های بتا به‌وسیله پیوند جزایر پانکراس، نویدبخش درمان دیابت نوع ۱ است. در مطالعات جانوری و انسانی، مشخص شده‌است که گیاه یونجه (*Medicago sativa.L*) از خانواده لگومینیاسه، توانایی‌دارد قند خون را کاهش‌دهد؛ اغلب این مطالعات بر تأثیر عصاره گیاه بر میزان گلوکز ناشتا متمرکز شده‌اند؛ تابه‌امروز، تحقیقی درخصوص ارزیابی توانایی این گیاه در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتای پانکراس در شرایط آزمایشگاهی انجام‌نشده‌است. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی آثار احتمالی تروفیک عصاره گیاه یونجه (MSE) برتمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به سلول‌های انسولین‌ساز (IPCs) انجام‌شده‌است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های MSCs موش، جداسازی و به‌صورت تک‌لایه کشت‌داده‌شدند؛ سلول‌های یادشده پس از تلاقی، با استفاده از آزمایش‌های القای بافت چربی و استخوانی، شناسایی و تأییدشدند؛ به‌منظور القای تمایز در این سلول‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز، غلظتی مشخص از MSE به محیط کشت اضافه شد. رنگ‌آمیزی دیتیزون (DTZ) به‌منظور بررسی سلول‌های IPCs مشتق از MSCs در شرایط آزمایشگاهی استفاده‌شد. سلول‌های DTZ مثبت شمارش و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه‌وتحلیل‌شدند. حضور پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بتای پانکراس با استفاده از ایمنوفلورسنس تعیین‌شد.

نتایج: تیمار با MSE تأثیری چشمگیر بر تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های IPCs داشت. در بررسی مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از DTZ دستجات سلولی قرمز ارغوانی مشابه جزایر لانگرهانس مشاهده‌شد. سلول‌های تمایزیافته نسبت‌به سه آنتی‌بادی C – پپتید، انسولین – پروانسولین و رسپتور انسولین بتا پاسخ ایمنی دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دادند که MSE به‌طور مؤثری توانست باعث القای تمایز MSCs به سلول‌های IPC شود. ازآنجاکه سلول‌های MSC به‌طور گسترده در دسترس بوده، به‌راحتی کشت‌می‌شوند، ابزار آزمایشگاهی ارزشمندی را برای مطالعه تمایز سلول‌های بتای پانکراس فراهم‌می‌کنند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های تولیدکننده انسولین، تمایز سلول‌های بتای پانکراس، انسولین- پروانسولین، C- پپتید.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری دیابت، مشتمل‌بر مجموعه‌ای از بیماری‌های مزمن بوده، از اختلال در متابولیسم گلوکز ناشی می‌شود. منشأ بروز بیماری دیابت نوع ۱، کاهش سطح انسولین پلاسما به دلیل تخریب سلول‌های بتای پانکراس است (۱). پانکراس، اندامی است که درمان بیماری‌های مربوط به آن، یکی از اهداف اصلی استفاده از سلول‌های بنیادی است (۲). ویژگی‌های سلول‌های بنیادی در نوسازی و امکان تمایز به انواع بافت‌ها، توجه دانشمندان را برای استفاده از آنها در تولید سلول‌های ترشح‌کننده انسولین به خود جلب‌کرده‌است. مطالعات اخیر نشان‌داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان به‌دست‌می‌آیند، نه‌تنها به تبارهای مزودرمی، بلکه به سایر تبارهای سلولی تمایزمی‌یابند؛ بنابراین امکان تولید سلول‌های مولد انسولین از این سلول‌ها وجوددارد. براساس مطالعات پیشین، سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان می‌توانند به سلول‌های بالغ تمایزیافته‌ای تبدیل‌شوند که توانایی‌دارند، انسولین تولیدکنند (۳)؛ به‌منظور تمایز این سلول‌ها می‌توان از محرک‌هایی مختلف استفاده‌کرد. عواملی گوناگون وجوددارند که با توجه به عملکردشان در تکوین طبیعی پانکراس استفاده‌می‌شوند (٤)؛ ازجمله این عوامل، «عامل (فاکتور) رشد اپیدرمی، عامل رشد ترانسفورمینگ بتا، عامل رشد فیبروبلاستی اسیدی، عامل رشد شبه‌انسولینی و انکوستاتین» را می‌توان‌نام‌برد؛ این نکته که «در چه زمانی و با چه غلظتی می‌باید از این عوامل در فرایند تمایز استفاده‌کرد؟»، حایز اهمیت است (۵). تحقیق‌هایی محدود درخصوص دیابت نوع ۱ با استفاده از گیاهان دارویی در شرایط آزمایشگاهی انجام‌شده‌اند. مطالعات نشان‌می‌دهند که آلکالوئید گیاهی کنوفیلین، تمایز سلول‌های اندوکرین پانکراس نوزاد خوک را به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین القامی‌کند (٦). عصاره متانولی برگ و کالوس گیاه Gymnema *sylvestrve* L به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تولید سلول‌های بتا را در موش‌های صحرایی دیابتی افزایش‌می‌دهد؛ عصاره این گیاه به‌احتمال می‌تواند به‌عنوان داروی گیاهی برای درمان دیابت قندی وابسته به انسولین به‌کاررود (۷). عصاره گیاهان دارویی یونجه (*Medicago sativa. L*) و شنبلیله (*Trigonella foenum greocum*) در موش‌های صحرایی غیردیابتی و دیابتی، سطح گلوکز خون را پس از مصرف غذا به‌طور قابل‌توجهی کاهش‌می‌دهد (۸)؛ به‌طوری‌که براساس باوری قدیمی، دم‌کرده برگ یونجه در شمال آفریقا در درمان دیابت نوع ۱، مورد استفاده قرارمی‌گرفت (۹). عصاره متانولی یونجه حاوی فلاونوییید است؛ بررسی‌ها نشان‌می‌دهند، فلاونوئیدها در کاهش قند خون افراد دیابتی و غیردیابتی، نقشی مهم دارند؛ فلاونوئیدها گروهی از ترکیب‌های فعال زیستی با منشأ گیاهی هستند که در ریشه، برگ و سایر اندام‌های گیاهی توزیع‌شده‌اند. در پژوهش حاضر به بررسی القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های تولیدکننده انسولین، تحت تأثیر عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ و گل یونجه پرداخته‌شده‌است؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌مدت هشت تا دوازده روز با این عامل القایی تیمارشدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی دیتیزون، القای فنوتیپ سلول‌های تولیدکننده انسولین در سلول‌های مزانشیمی تیمارشده با عصاره تأییدشد. با به‌کارگیری روش ایمنوفلورسنس نشان‌داده‌شد که سلول‌های تمایزیافته با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ و گل یونجه قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی سلول بتای پانکراس هستند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه دارویی یونجه: مرحله رویشی و زایشی یونجه در فصل بهار و تابستان است؛ بنابراین جمع‌آوری آن در این فصول انجام‌شد. برگ و گل گیاه از یکدیگر جداسازی و به‌صورت سایه خشک در دمای آزمایشگاه، خشک شد. برگ‌ها و گل‌های

Archive of SID

www.SID.ir

خشک‌شده با هاون چینی به‌صورت پودر درآمدند. عصاره برگ و گل خشک این گیاه با استفاده از بافر استخراج متانول خالص در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد تهیه‌شد؛ سپس به‌منظور جداسازی مخلوط عصاره و متانول از یکدیگر از دستگاه Rotary evoporator استفاده‌شد. با کمک آب مقطر با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و بافر استخراج بوتانول خالص در دمای ۸۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، فلاونوئید از مابقی ترکیب‌های موجود در عصاره، خالص‌سازی و سپس برای ماندگاری طولانی‌مدت، مقداری متانول خالص به آن، اضافه شد.

تعیین غلظت عصاره متانولی فلاونوئیدهای یونجه با استفاده از محلول‌های استاندارد کاتشین: برای تعیین غلظت عصاره متانولی فلاونوئیدهای برگ و گل یونجه از محلول‌های استاندارد فلاونوئید کاتشین استفاده‌شد. میزان جذب محلول‌های استاندارد کاتشین در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری‌شد. با رسم منحنی استاندارد براساس میزان جذب محلول‌های کاتشین، غلظت عصاره به‌دست‌آمد؛ همچنین پس از به‌دست‌آوردن غلظت فلاونویید، مقدار۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برگ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گل به‌ازای هر ۳۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت، اضافه شد.

استخراج، تکثیر و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی و القای تمایز در آنها: در تحقیق حاضر از موش کوچک آزمایشگاهی نژاد balb/c جنس نر به سن حدود ۳ماهه استفاده‌شد. حیوان مورد نظر از مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه‌شد؛ این حیوان در حیوان‌خانه دانشگاه آزاد شهرکرد، تحت شرایط استاندارد نور، دما و تغذیه نگهداری‌می‌شود. استخوان‌های فمور و تیبیای موش، خارج و پس از بریدن دو سر استخوان با استفاده از روش فلش اوت، سلول‌های مغز استخوان به درون لوله فالکون تخلیه‌شدند؛ پس از سانتریفیوژ در دور ۲۵۰۰rpm و دورریختن مایع رویی با استفاده از محیط کشت تازه و پیپتاژهای مکرر، سلول‌ها هموژنیزه و به فلاسک کشت منتقل‌شدند؛ فلاسک‌ها در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 قرارگرفته، پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تعویض‌شد؛ به‌تدریج، طی پاساژهای بعدی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص شدند. به‌منظور القای تمایز، سلول‌ها با محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low-glucose) (Gibco, 306-0034) به همراه ۳ درصد سرم جنین گاو (Fetal bovine serum, Sigma, 10270-106) و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی فلاونوئیدهای گل و برگ یونجه، به‌طور جداگانه به‌مدت ده روز تیمارشدند.

اثبات بنیادی‌بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی

در این پژوهش به‌منظور اثبات بنیادی‌بودن سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده، تمایز آنها به سلول‌های استخوانی انجام‌شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان استخراج‌می‌شوند، به همراه سلول‌های فیبروبلاست، سلول‌های خونی و سلول‌های بخش استرومای مغز استخوان هستند؛ طی [انجام] پاساژ دوم، بیشتر سلول‌های فیبروبلاست که به همراه سلول‌های مزانشیمی هستند از محیط کشت جدامی‌شوند ولی باز هم، کلونی‌هایی از سلول‌های فیبروبلاست باقی می‌مانند؛ سلول‌های فیبروبلاست، توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی، چربی و سلول‌های دودمان مزودرمی را ندارند؛ بنابراین با تمایزدادن سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی و استخوان می‌توان آنها را از هم تفکیک‌کرد چراکه سلول‌های فیبروبلاست در محیط تمایزی سلول‌های چربی یا استخوان ازمیان‌می‌روند و قابلیت تمایز به این سلول‌ها را ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

در پژوهش حاضر به‌منظور اثبات بنیادی‌بودن سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده، تمایز آنها به سلول‌های چربی انجام‌شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی‌که از مغز استخوان استخراج‌می‌شوند، به همراه سلول‌های خونی، استرومای مغز استخوان، سلول‌های پیش‌ساز خونی، سلول‌های رتیکولار و سلول‌های فیبروبلاست هستند؛ طی [انجام] پاساژ دوم، بیشتر سلول‌های فیبروبلاست که به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند، از محیط کشت حذف‌می‌شوند ولی باز هم، کلونی‌هایی از سلول‌های فیبروبلاست باقی می‌مانند؛ کلونی‌های باقی‌مانده، توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی را ندارند. سلول‌های فیبروبلاست با قرارگرفتن در محیط‌های تمایزی ویژه چربی و استخوان ازمیان‌می‌روند؛ بنابراین با این روش می‌توان ضمن ازبین‌بردن کلونی‌های موجود فیبروبلاست، تراکمی بالااز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل‌کرد.

ارزیابی سلول‌های حاصل از تمایز تحت اثر عامل القایی عصاره متانولی فلاونوئیدهای گل و برگ یونجه:

در این پژوهش برای شناسایی سلول‌های انسولین‌ساز که در شرایط آزمایشگاهی تمایزیافتند، از دو روش بررسی «مورفولوژی و ایمنوفلورسنس» استفاده‌شد.

بررسی مورفولوژیکی سلول‌های حاصل از تمایز با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون (DTZ): دیتیزون (Dithizone, Merck, K6453055822) عامل متصل‌شونده به فلز روی است؛ این فلز برای بسته‌بندی هورمون انسولین در سلول‌های بتا لازم است. پس از انجام رنگ‌آمیزی دیتیزون، توده‌های سلولی قرمزرنگ، نشان‌دهنده سلول‌هایی هستند که تحت تأثیر عصاره متانولی (فلاونوییدی) برگ یونجه به سلول‌های انسولین‌ساز، متمایز شده‌اند. ۵۰ میلی‌گرم پودر دیتیزون با ۵ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl Sigma, D2650 sulphoxide,)، مخلوط شده، رنگ استوک به‌دست‌آمد. به‌منظور تهیه محلول کار دیتیزون ۱۰ میکرولیتر محلول استوک به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض رنگ قرارگرفتند؛ پس از شستشو با بافر HBSS (Hank's balanced salt solution)، سلول‌ها با میکروسکوپ، مشاهده و تصویربرداری‌شدند.

شمارش سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی دیتیزون: پس از رنگ‌آمیزی دیتیزون، ٤٠ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، روی لام نئوبار قرارگرفته، با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش‌شد؛ سپس سلول‌های سفیدرنگ (سلول‌های تمایزنیافته) و سلول‌های قرمزرنگ (سلول‌های تمایزیافته با استفاده از القاگر عصاره یونجه) شمارش‌شدند؛ اعداد حاصل از شمارش در جداولی تنظیم و تجزیه‌وتحلیل آماری شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

مقادیر به‌دست‌آمده به‌صورت Standard Deviation ± Means گزارش‌شدند. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و روش دانکن استفاده‌شد. مقدار $P < ۰.۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری درنظرگرفته‌شد.

بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتا به روش ایمنوفلورسنس: برای بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های انسولین‌ساز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزیافته با عصاره گیاهی از روش ایمنوفلورسنس استفاده‌شد؛ به این منظور، سلول‌های کشت‌شده روی لامل پس از ده روز تیمار با عصاره، ۵ دقیقه با PBS (phosphate-buffered saline) ایمنوهیستوشیمی شستشوداده‌شدند. تثبیت نمونه‌ها با استفاده محلول ٤ درصد پارافرمالدئید به‌مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق صورت‌گرفت. محلول بلاک‌کننده حاوی ۱۰ درصد سرم نرمال بز و ۰/۳ درصد تریتون X-۱۰۰ محلول در PBS به نمونه‌ها اضافه و ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرارداده‌شد؛ پس از شستشوی نمونه‌ها، با

Archive of SID

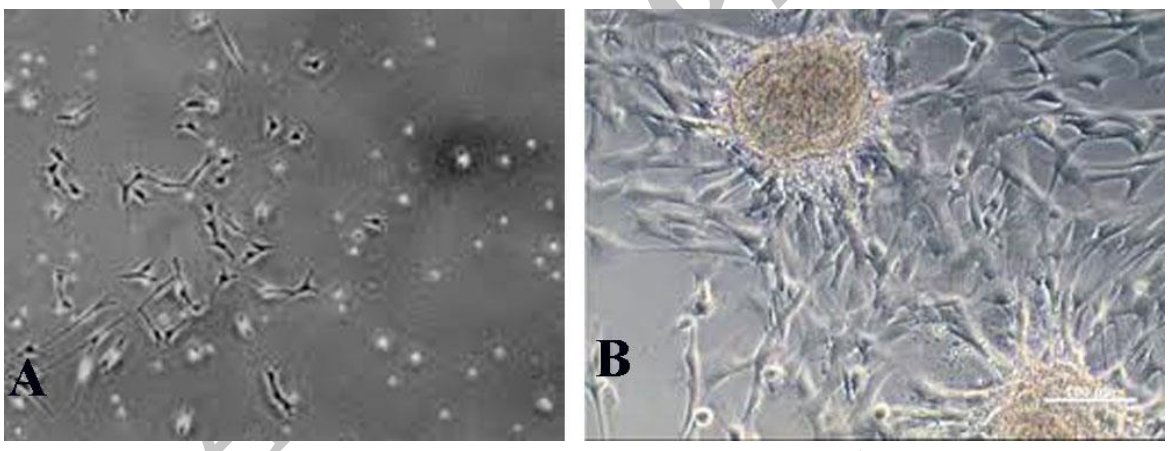
www.SID.ir

PBS، آنتی‌بادی اولیه ضدانسولین- پروانسولین (Sigma, ab8304-100) یا آنتی‌بادی اولیه ضدرسپتور بتای انسولین (Sigma, ab537-50) به آنها افزوده‌شد و به‌مدت ۲ ساعت در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شدند. سلول‌ها به‌مدت ۲ ساعت در محیط مرطوب و تاریک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی ثانویه (Sigma, F9137) جفت‌شده با FITC (flurorescein isothiocyanate) تیمارشدند. نمونه‌ها پس از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در زیر میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرارگرفتند. قابل‌اشاره است، در این تحقیق از سه آنتی‌بادی اولیه استفاده‌شد که برای دو آنتی‌بادی رسپتور انسولین و انسولین پروانسولین از آنتی‌بادی ثانویه FITC استفاده‌شد که رنگ سبز به‌وجودآمد اما برای آنتی‌بادی اولیه- c – پپتید CY5 به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده‌شد که رنگ قرمز ایجادکرد.

یافته‌ها

جداسازی و بررسی مورفولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از موش نر بالغ نژاد balb/c به‌دست‌آمدند؛ این سلول‌ها، دارای خاصیت چسبندگی به ظروف پلاستیکی و توانایی تشکیل کلونی در شرایط آزمایشگاهی هستند (شکل ۱)؛ در ابتدای استخراج، این سلول‌ها کروی‌شکل بوده (شکل ۱ A) و پس از گذشت یک هفته به شکل دوکی و کشیده درآمدند (شکل۱B)؛ شکل ظاهری این سلول‌ها مشابه سلول‌های فیبروبلاست است؛ با این تفاوت که سلول‌های فیبروبلاست، قابلیت تحمل پاساژهای متوالی و نیز توانایی تمایز به دودمان‌های مختلف سلولی را ندارند.



شکل ۱. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان موش

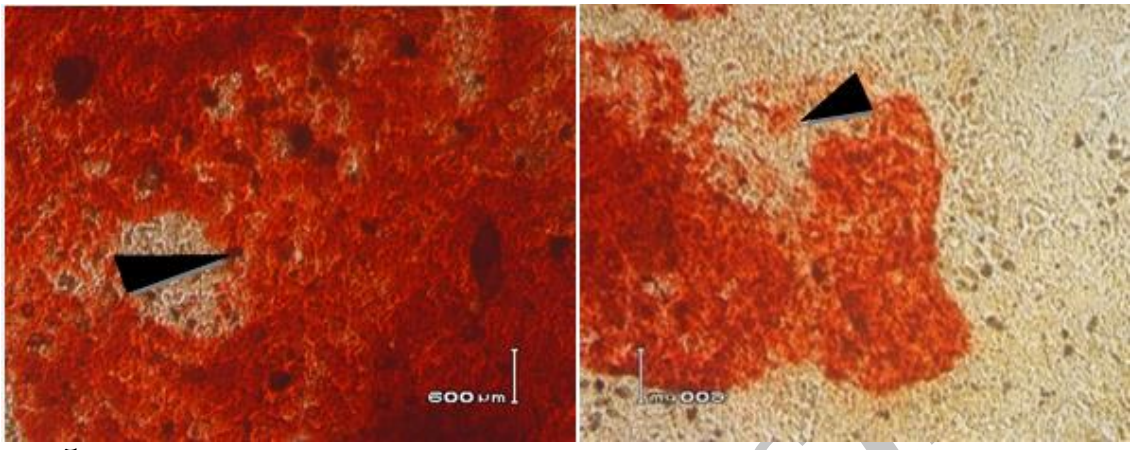
A) در روزهای اول کشت سلول، سلول‌ها حالت منفرد دارند و B) سلول‌های بنیادی استخراج‌شده با تراکم بالاتر، چهارده روز پس از کشت؛ این سلول‌ها کلونی تشکیل‌داده و مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست پیدامی‌کنند. بزرگ‌نمایی: A ۱۰۰X، B ۴۰۰X

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان

در تحقیق حاضر، سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان پس از دو هفته به تراکم بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیدند؛ پس از این مدت، پاساژ را انجام‌داده، به‌مدت ده روز به سلول‌ها اجازه‌داده‌شد که تراکمشان به اندازه ۸۰ درصد برسد. با انجام پاساژ می‌توان سلول‌های فیبروبلاست را که توانایی تحمل پاساژ ندارند، حذف‌کرد. پس از گذشت ده روز که تراکم سلولی افزایش‌یافت، سلول‌ها به پلیت شش‌خانه‌ای انتقال‌داده‌شدند. سلول‌ها طی مدت ۲۱ روز برای تمایز به سلول‌های استخوانی در معرض محیط کشت ویژه تمایزی قرارگرفتند؛ سپس، سلول‌های تمایزیافته رنگ‌آمیزی‌شدند و از آنها تصویربرداری‌شد (شکل۲).

www.SID.ir

سلول‌های استخوانی تمایزیافته با محلول رنگی آلیزارین رد رنگ‌آمیزی‌شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی‌که در شرایط استئوژنیک قرارمی‌گیرند، ماتریکس سلولی‌شان تغییرکرده، ترشح رسوبات کلسیمی را آغازمی‌کنند؛ با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، این ماتریکس سلولی به رنگ قرمز دیده‌می‌شود (شکل۲ A).

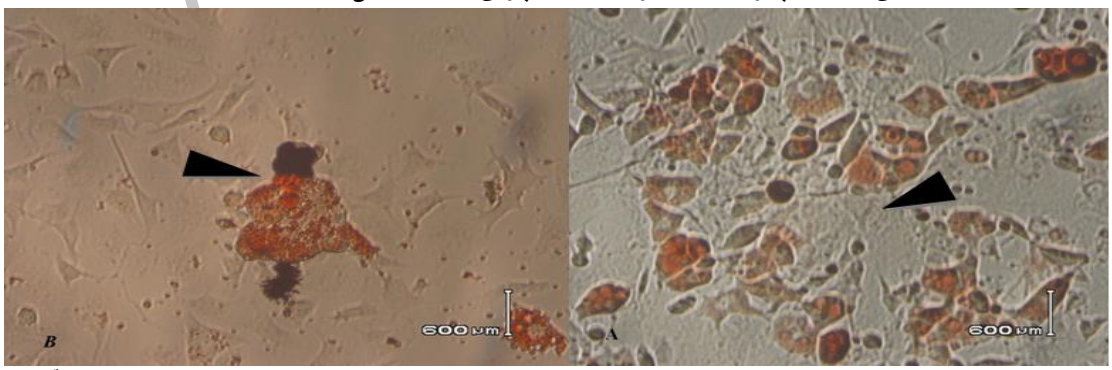


شکل ۲. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استخوان سلول‌های تمایزیافته به سلول‌های استخوانی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

رسوبات کلسیمی در این رنگ‌آمیزی به‌صورت توده قرمزرنگ مشخص شده‌اند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

در این تحقیق، سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده از مغزاستخوان، پس از دو هفته به تراکم بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیدند. پس از اینکه تراکمی بالا از سلول‌ها حاصل‌شد، پاساژ انجام‌شد و به مدت ده روز به سلول‌ها اجازه‌داده‌شد که به کف ظرف بچسبند و تراکمشان به اندازه ۸۰ درصد برسد. با انجام پاساژ، بسیاری از کلونی‌های تشکیل‌شده از فیبروبلاست را می‌توان از محیط کشت حذف‌کرد؛ پس از گذشت ده روز که تراکم سلولی افزایش‌یافت، به پلیت شش‌خانه‌ای انتقال‌داده‌شدند؛ سلول‌ها طی مدت پانزده روز برای تمایز به سلول‌های چربی در معرض محیط کشت ویژه تمایزی قرارگرفتند؛ سپس، سلول‌های تمایزیافته رنگ‌آمیزی‌شدند و از آنها تصویربرداری‌شد (شکل ۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی‌که در شرایط آدیپوژنیک قرارمی‌گیرند، درون سیتوپلاسم سلول، واکوئل‌های چربی تشکیل‌می‌شوند؛ پس از مدت پانزده روز، تجمع واکوئل‌های چربی در سلول قابل‌رؤیت است. در رنگ‌آمیزی آیل رد، این واکوئل‌ها به رنگ قرمز دیده‌شدند که نشان‌دهنده تمایز به سمت سلول‌های چربی است (شکل۳ A).



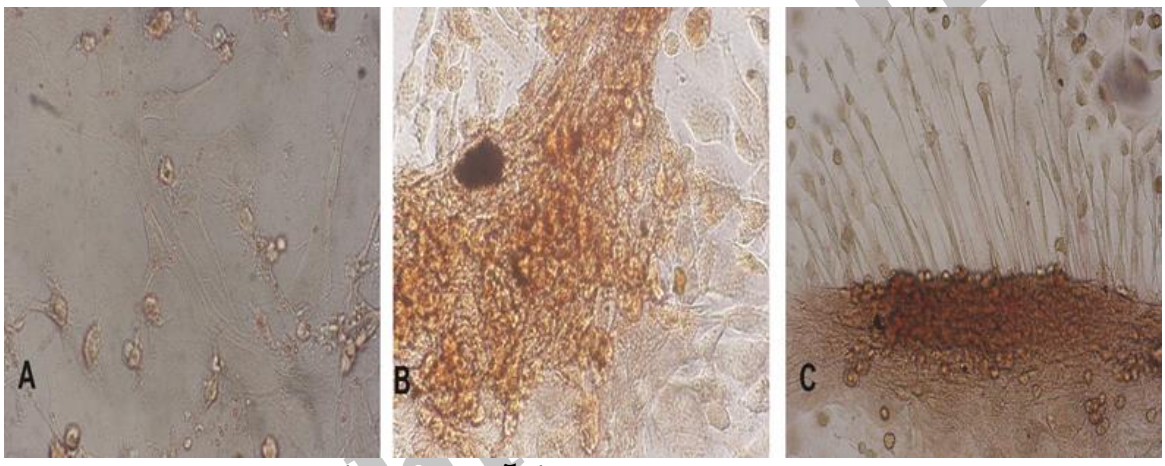
شکل ۳. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی سلول‌های تمایزیافته به سلول‌های چربی با رنگ‌آمیزی آیل رد

که سر پیکان، محل واکوئل‌های چربی را نشان‌می‌دهد. شکل A (40 X) و شکل B (100 X)

Archive of SID
www.SID.ir

رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون

برای این منظور ابتدا به سلول‌های پاساژ دوم اجازه‌داده‌شد که به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد برسند. پس از هفت تا چهارده روز تیمار با عامل القایی عصاره برگ وگل یونجه، سلول‌های مزانشیمی تمایزیافتند؛ سپس این سلول‌ها تحت رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون قرارگرفتند. دیتیزون ماده‌ای متصل‌شونده به فلز روی است؛ مقدار این فلز در گرانول‌های محتوی انسولین در پانکراس، بسیار بالاست؛ به همین دلیل برای شناسایی اختصاصی‌بودن سلول‌های تولیدکننده انسولین از این رنگ‌آمیزی استفاده‌شد. سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از رنگ‌آمیزی دیتیزون به رنگ قرمز درآمدند (شکل ٤ C,B). در گروه کنترل منفی، یعنی سلول‌هایی که با عصاره برگ و گل یونجه تیمارنشده‌بودند، نیز تعدادی معدود سلول قرمز وجودداشت که نشان‌دهنده تمایز خودبه‌خودی تعدادی از سلول‌ها به سلول‌های بتای پانکراس است (شکل ٤ A). همان‌گونه‌که در شکل ۲ نشان‌داده‌شده‌است، تعداد سلول‌های تمایزیافته که به رنگ قرمز درآمده‌اند، در گروه تیمارشده با عصاره برگ و گل یونجه، به‌مراتب بیشتر از گروه کنترل است.



شکل ٤. تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با رنگ اختصاصی دیتیزون.

A) در گروه کنترل منفی، یعنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در معرض عصاره پانکراس قرارنگرفته‌اند و به تمایز خودبه‌خودی، دچار شده‌اند. تعداد کمی سلول دیتیزون مثبت به‌صورت پراکنده وجوددارد که پیکان‌ها نشانه این سلول‌ها هستند (X ۲۰۰)؛ B) سلول‌های قرمزرنگ یا سلول‌های دیتیزون مثبت نشان‌دهنده سلول‌های تمایزیافته حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیم که تحت اثر االقای عصاره برگ یونجه قرارگرفته‌اند (۲۰۰x) و C) سلول‌های قرمزرنگ یا سلول‌های دیتیزون مثبت نشان‌دهنده سلول‌های تمایزیافته حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیم که تحت اثر القای عصاره گل یونجه قرارگرفته‌اند (۲۰۰x).

به‌منظور بررسی اثر القایی عصاره یونجه بر تمایز سلول‌های مزانشیمی، سلول‌های سفید و قرمز حاصل از رنگ‌آمیزی دیتیزون گروه‌های تیمار و گروه کنترل (گروه تیمارنشده) با کمک لام نئوبار شمارش‌شدند؛ برای هر گروه، شمارش با پنج‌بار تکرار انجام‌گرفت؛ سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و روش دانکن، تفاوت میان گروه‌های مختلف بررسی‌شد و نتایج حاصل در جدول ۱ تنظیم‌شدند؛ با توجه به نتایج حاصل، درصد سلول‌های تمایزیافته که به دیتیزون پاسخ مثبت دادند، در تمام گروه‌ها با گروه کنترل منفی، تفاوتی معنادار داشت؛ بنابراین، عصاره متانولی فلاونوئیدهای برگ و گل یونجه در القای تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های تولیدکننده انسولین، اثر مثبت دارد. بیشترین درصد سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت اثر القایی عصاره برگ (۲/۹±٤٥/۸۱) به‌دست‌آمد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± SEM هستند؛ در

www.SID.ir

این آزمون آماری، سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ درنظرگرفته‌شد.

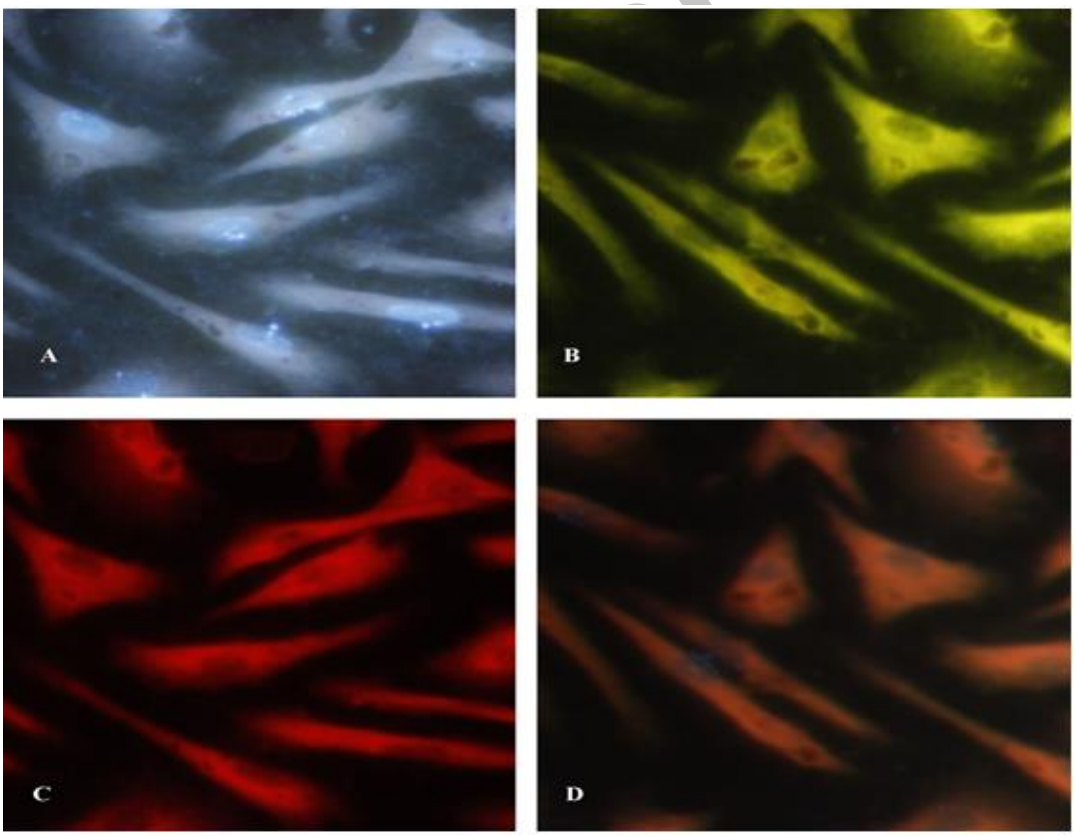
جدول۱. اثر عصاره برگ وگل گیاه یونجه بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های انسولین‌ساز

گروه‌ها	درصد سلول‌های تمایزیافته
کنترل	۱۱/ ۸ ± ۰/۱۱
برگ	۴/۸۱ ± ۲/۹
گل	۲۸/۳ ±۴/۸

داده‌ها به‌صورت «میانگین± انحراف معیار» هستند و نشان‌می‌دهند که تفاوتی معنی‌دار (P<0.05)، میان گل و برگ با گروه کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت‌داده‌شده بدون تأثیر عصاره یونجه) وجوددارد .ولی از لحاظ آماری، تفاوتی معنی‌دار، میان عصاره برگ با عصاره گل وجودندارد و به‌طور تقریبی، به یک میزان، باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آنها به سمت پانکراس می‌شود.

ایمنوفلورسنس

در این روش، به‌منظور بررسی بیان عوامل اختصاصی سلول‌های تولیدکننده انسولین، آنتی‌بادی‌های اولیه ضد نشانگر انسولین – پرو انسولین، C – پپتید و ضد نشانگر رسپتور بتای انسولین به‌طور جداگانه استفاده‌شدند. سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از اثر عصاره برگ و گل یونجه، قادر به بیان پروتئین انسولین-پروانسولین (شکل ۵ B) و C– پپتید بودند (شکل ۵ C). به‌منظور رنگ‌آمیزی افتراقی، این سلول‌ها با هوخست رنگ‌آمیزی و هسته‌های آنها با رنگ آبی، مشخص شدند (شکل ۵ A).

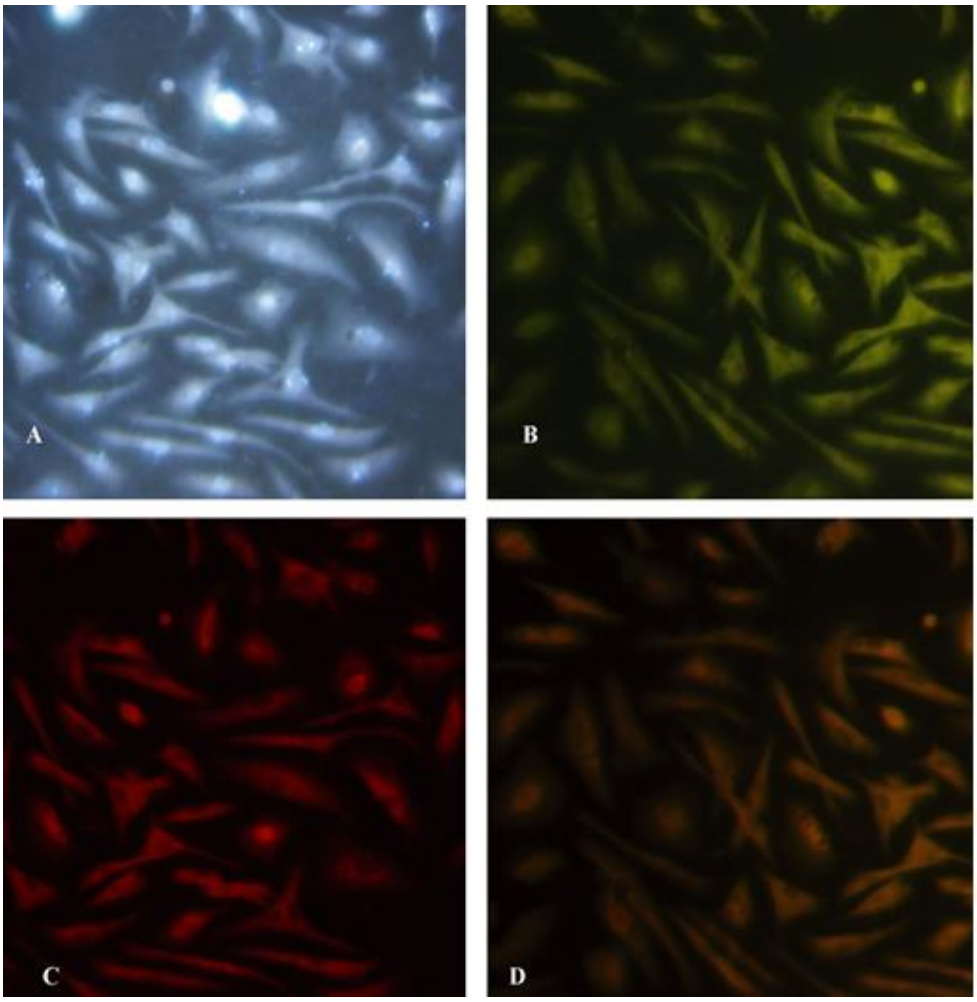


شکل ۵. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های تولیدکننده انسولین تحت تأثیر عصاره فلاونوییدی یونجه

www.SID.ir

A) سلول‌های مزانشیمی که با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی‌شده‌اند؛ هسته این سلول‌ها در این شکل به‌خوبی مشخص است؛ B) بیان آنتی‌بادی انسولین- پروانسولین و C) بیان آنتی‌بادی C – پپتید

سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از اثر عصاره برگ و گل یونجه، قادر به بیان پروتئین رسپتور بتای انسولین (شکل ٦ B) و C- پپتید بودند (شکل ٦ C)؛ به‌منظور رنگ‌آمیزی افتراقی، این سلول‌ها با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی و هسته‌های آنها با رنگ آبی، مشخص شدند (شکل ٦ A).



شکل ۶. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های تولیدکننده انسولین تحت تأثیر عصاره فلاونوییدی یونجه

A) سلول‌های مزانشیمی که با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی‌شده‌اند؛ هسته این سلول‌ها در این شکل به‌خوبی مشخص است؛ B) بیان آنتی‌بادی انسولین رسپتور بتا؛ C) بیان آنتی‌بادی C –پپتید و D) عکس تلفیقی که ادغامی از سه عکس پیشین است.

www.SID.ir

بحث

دیابت نوع ۱ ازجمله بیماری‌های دارای عوارض خطرناک در دنیا محسوب‌می‌شود؛ اختلال‌های ناشی از این بیماری، حتی با مصرف دارو و درمان همچنان باقی می‌مانند. از درمان‌های مرسوم دیابت نوع ۱، تزریق منظم و همیشگی انسولین است؛ بااینکه تزریق مداوم انسولین، باعث تنظیم قند خون افراد مبتلا می‌شود، باز هم، بیماری‌هایی که به دلیل کمبود انسولین در بدن اتفاق‌افتاده‌اند، درمان‌نشده، باقی می‌مانند. با پیشرفت روزمره علم، روش‌های درمانی جدیدی، مانند پیوند پانکراس و پیوند سلول‌های جزایر پانکراس برای این بیماری به‌دست‌آمده‌اند. بااینکه در ابتدا با پیوندزدن، دیگر به انسولین برون‌زاد نیازنبود، چندین سد عمده، مانع از پیشرفت این روش درمانی شده‌اند؛ برای انجام پیوند، همواره می‌باید فرد دهنده‌ای باشد که بتوان از سلول‌های جزایر پانکراس یا بافت پانکراس وی استفاده‌کرد (۱۰). دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن در کشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه است؛ این بیماری درنتیجهٔ ناتوانی بدن در تولید یا مصرف انسولین پدیدمی‌آید (۱۱)؛ ازطرف‌دیگر در هنگام عمل پیوند برای اینکه فرد مبتلا، دچار رد پیوند نشود، از داروهای سرکوب‌کننده ایمنی استفاده‌می‌شود. مطالعات اخیر نشان‌می‌دهند که می‌توان از سلول‌های بنیادی برای درمان دیابت نوع ۱ استفاده‌کرد چراکه این سلول‌ها توانایی بالقوه‌ای برای تمایز به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین دارند؛ انسولین، هورمونی پلی‌پپتیدی است که سلول‌های بتای پانکراس، آن را سنتز و ترشح‌می‌کنند. وظیفه اصلی انسولین، کاهش قند خون است؛ بالابودن قند خون در درازمدت، آسیب‌هایی جبران‌ناپذیر به دستگاه عصبی، چشم، کلیه و سیستم قلب و عروق واردمی‌کند (۱۲).

تحقیق‌ها نشان‌داده‌اند که برخی از گیاهان دارویی، نقشی مهم در کنترل دیابت قندی دارند. تحقیق‌هایی محدود درخصوص درمان دیابت با استفاده از گیاهان دارویی در شرایط آزمایشگاهی انجام‌شده‌اند. مطالعات صورت‌گرفته روی آلکالوئید گیاهی کنوفیلین اثبات‌کرد که این آلکالوئید، تمایز سلول‌های اندوکرین پانکراس نوزاد خوک را به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین القامی‌کند (۱۳). عصاره متانولی برگ و کالوس گیاه *Gymnema sylvestrve*، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای، تولید سلول‌های بتا رادر موش‌های صحرایی دیابتی افزایش‌می‌دهد و می‌تواند به‌طور بالقوه به‌عنوان داروی گیاهی برای درمان دیابت قندی وابسته به انسولین به‌کاررود (۱٤). تأثیر ترکیب‌های فعال زیستی استخراج‌شده از این گیاهان در کاهش قند خون، بیشتر از داروهای شیمیایی است (۱۵). فلاونوئیدها، گروهی از ترکیب‌های فعال زیستی با منشأ گیاهی هستند که در ریشه، برگ و سایر اندام‌های گیاهی توزیع‌شده‌اند (۱٦). ایزوفلاون جنیستئین[1]، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، سبب افزایش ترشح انسولین تحریک‌شده با گلوکز در جزایر پانکراسی کشت‌شدهٔ موش می‌شود؛ درحالی‌که غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میکرومولار، ترشح انسولین را از جزایر پانکراسی موش مهارمی‌کنند (۱۷). تیمار نُه‌هفته‌ای موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱، با فلاونوئیدهای جنیستئین و دایدزئین[2]، هیپرگلیسمیا را توسط افزایش سطح انسولین پلاسما مهارکرد. فلاونوئید اپی‌گالو کاتشین ژالات[3]، قادر است به‌واسطه مهار فعال‌سازی عامل (فاکتور) هسته‌ای-کاپا بی[4]، از مرگ سلولی القاشده با سیتوکین‌ها[5] در سلول‌های بتای پانکراسی جداشده از موش جلوگیری‌کند (۱۸).

[1] - Genistein
[2] - Daidzein
[3] - Epigallocatechin gallate: EGCG
[4] - Neuclear factor- kappa B: NF-κB
[5] - Cytokines

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی‌های صورت‌گرفته روی عصاره اتانولی یونجه نشان‌دادند که اگر عصاره اتانولی این گیاه را به‌مدت چهارده روز به موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ تزریق‌کنند، میزان گلوکز و لیپید خون در آنها کاهش‌می‌یابد اما هیچ تغییری در سطح انسولین ایجادنمی‌شود؛ بنابراین، عصاره اتانولی این گیاه با اثرگذاری منفی روی فعالیت آنزیم گلوکز ٦-فسفاتاز کبدی، سبب کاهش آزادسازی گلوکز از کبد به درون جریان خون می‌شود (۱۹). تانن، ترکیبی پلی‌فنولی با وزن مولکولی ۳۰۰۰ تا ۵۰۰ دالتون است که در تعداد زیادی از گیاهان یافت‌می‌شود. تانن موجود در عصاره متانولی برگ‌های یونجه از طریق مهار بیان ژن پروتئین تیروزین فسفاتاز یک بی، جذب گلوکز خون را بدون القاکردن تولید چربی در سلول‌های چربی 3T3-L1 افزایش‌می‌دهد.

به‌منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های انسولین‌ساز در این پژوهش از عصاره گیاهی برگ و گل یونجه به‌عنوان عامل القاگر استفاده‌شده‌است. فنوتیپ سلول‌های انسولین‌ساز مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت اثر عامل القاگر عصاره برگ و گل یونجه به‌وسیله رنگ‌آمیزی دیتیزون اثبات‌شد. روی، فلزی است که در سلول‌های بتای پانکراس، بیشتر از هر بافت دیگری در بدن یافت‌می‌شود؛ این فلز که سوبسترای رنگ دیتیزون است، روی گیرنده‌های سلولی بتای پانکراس قراردارد (۱۹). رنگ‌آمیزی دیتیزون به‌صورت انتخابی، باعث قرمزرنگ‌شدن سلول‌های بتای پانکراس می‌شود. پیش از این نیز، *آکیرا* و همکارانش، مورفولوژی توصیف‌شده سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از این پژوهش را گزارش‌کرده‌بودند (۲۰). دیتیزون، ماده‌ای متصل‌شونده به فلز روی است که به دلیل محتوی بالای این فلز در گرانول‌های محتوی انسولین سلول‌های بتا، باعث قرمزرنگ‌شدن این سلول‌ها می‌شود؛ این رنگ‌آمیزی، روشی آسان برای شناسایی اختصاصی سلول‌های تولیدکننده انسولین از سلول‌های بنیادی تمایزنیافته است؛ درواقع، در این روش برای پی‌بردن به وجود سلول‌های انسولین‌ساز، وجود فلز روی به‌عنوان یکی از معیارهای مناسب درنظرگرفته‌شده‌است. چن[1] و همکارانش، رنگ‌آمیزی دیتیزون را چندبار تکرارکردند. در سلول‌هایی که با غلظت ۵۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر عصاره تیمارشده‌بودند، تعداد سلول‌های قرمزرنگِ اندکی دیده‌می‌شد (۲۰)؛ به‌ترتیب هرچه بر میزان عصاره افزوده‌شد، تعداد سلول‌های قرمزرنگ بیشتری دیده‌شدند.

بررسی‌های ایمنوفلورسنس که به‌منظور ردیابی بیان پروتئین انسولین و پرو انسولین، C – پپتید و پروتئین گیرنده بتای انسولین انجام‌گرفتند، نشان‌دادند که سلول‌های تیمارشده با عصاره برگ و گل یونجه، قادر به تولید پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بتای پانکراس بودند. روند تولید پروتئین‌های اختصاصی در سلول‌های گروه منفی دیده‌نشد. پروانسولین، پلی‌پپتیدی ۸٦ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی ۹۳۹۰ است که در سلول‌های بتای پانکراس سنتزمی‌شود. پروانسولین، مولکول پیش‌ساز انسولین است که با جداشدن یک قطعهٔ ۲۳ اسید آمینه‌ای از مولکول پره پروانسولین در شبکه آندوپلاسمی زبر سلول‌های بتا پانکراس ایجادمی‌شود. در ساختمان پروانسولین، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی A و B توسط یک قطعه پپتیدی به نام پپتید C به یکدیگر متصل شده‌اند؛ این مولکول پیش‌ساز با انتقال به دستگاه گلژی به انسولین و پپتید C شکسته می‌شود؛ سپس، مولکول‌های انسولین با فلز روی به یکدیگر متصل شده، به‌صورت ساختارهای هگزامری در گرانول‌های ترشحی سلول بتا ذخیره‌می‌شوند؛ این گرانول‌ها در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز خون، محتویات خود را به درون خون آزادمی‌کنند (۲۱). فعال‌سازی گیرنده انسولین در سلول‌های بتا، باعث القای فسفوریلاسیون گیرنده بتا و فسفوریلاسیون تیروزین پروتئین سوبسترای گیرنده انسولین-۱[2] می‌شود؛ سپس پروتئین‌های پیام‌رسان دیگر نیز فعال می‌شوند؛ فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز، نمونه‌ای از این پروتئین پیام‌رسان است که فعالیت آن،

[1] - Chen
[2] - IRS-1: insulin receptor subestra-1

Archive of SID
www.SID.ir

تبادل وزیکول‌ها را به‌عنوان اثر متابولیکی خاص انسولین تنظیم‌می‌کند (۲۲).

هورمون انسولین با اتصال به گیرنده‌های هتروتترامری موجود در غشای سلول‌های هدف، آثار متابولیکی خود را اعمال‌می‌کنند. گیرنده انسولین از دو زیرواحد آلفا و دو زیرواحد بتا تشکیل‌شده‌است. اتصال انسولین به زیرواحدهای آلفا، موجب اتوفسفریلاسیون زیرواحدهای بتا و به‌راه‌انداختن آبشار فسفریلاسیون داخل‌سلولی می‌شود. بیشترین مقدار پروانسولین به انسولین و پپتید C تبدیل‌می‌شود. انسولین و پپتید C به میزانی برابر به درون خون ترشح‌می‌شوند. شکل فعال و عملکردی این مولکول، انسولین است که در اختیار سلول‌های بدن به‌خصوص سلول‌های کبدی قرارمی‌گیرد؛ در این پژوهش، همچنین، وجود رسپتور بتای انسولین روی سلول‌های تمایزیافته بررسی‌شد (۲۳). رسپتور انسولین، نوعی گیرنده تیروزین کیناز است (۲٤) که در بافت پانکراس، بیشتر از سایر بافت‌ها دیده‌می‌شود؛ بنابراین، ردیابی آن به‌منظور بررسی نشانگرهای اختصاصی در سلول‌های تمایزیافته، اهمیتی بسزا دارد (۲۵). در این پژوهش، بیان نشانگرهای انسولین- پروانسولین و رسپتور بتای انسولین در سلول‌های تمایزیافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ و گل یونجه با استفاده از روش ایمنوفلورسنس تأییدشد؛ در این بررسی از آنتی‌بادی‌های اولیه ضدانسولین – پروانسولین، C – پپتید و ضدرسپتور بتای انسولین استفاده‌شد. *اومزاوا* و همکارانش به‌منظور تمایز سلول‌های کارسینومای آسینار پانکراس به سلول‌های تولیدکننده انسولین از ترکیب گیاهی دیگری به نام کنوفیلین استفاده‌کردند؛ کنوفیلین، نوعی آلکالوئید گیاهی است که با ایجاد تغییر مورفولوژیکی شبه‌نورونی و القای بیان ژن انسولین در سلول‌های کارسینومایی آسینار پانکراس، موجب تمایز آنها به سلول‌های انسولین‌ساز می‌شود. با کمک روش ایمنوفلورسنس، حضور انسولین در سلول‌های تمایزیافته با کنوفیلین اثبات‌شد (۲٦)؛ پیش از این، *ایوانا*، *برولن*[1]، *سان*[2] و *زالزمن* از زمرهٔ محققانی بودند که با استفاده از روش ایمنوفلورسنس، توانستند حضور نشانگرهای سلول بتا ازجمله پروانسولین، انسولین، پپتید C و عوامل رونویسی Pdx-1 و Nkx6.1 را در سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی به‌اثبات‌برسانند. *برولن* و همکارانش با استفاده از روش ایمنوفلورسنس، بیان نشانگرهای سلول بتا ازجمله پروانسولین، پپتید C و عوامل رونویسی Pdx-1 و Hnf3β را در سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان اثبات‌کردند. آنها با پیوندزدن سلول‌های بنیادی جنینی انسان به پانکراس موش، توانستند سلول‌های انسولین‌ساز تولیدکنند (۲۷). *دانیل* و همکارانش با روش ایمنوسیتوشیمی، توانستند پروتئین‌های pdx-1 و انسولین را در سلول‌های تمایزیافته تحت اثر محلول ترشح‌شده توسط سلول‌های بتای در حال تکوین تشخیص‌دهند. *سان* و همکارانش به کمک روش ایمنوفلورسنس، بیان انسولین و پپتید- C را در سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی بند ناف ردیابی‌کردند (۲۸).

یکی از سازوکارهایی که ماده القاگر از طریق آن، اثر خود را بر تمایز سلول‌های بنیادی اعمال‌می‌کند، تغییر در بیان برخی ژن‌های بخش اندوکرین و اگزوکرین پانکراس است؛ تغییر بیان ژن توسط فلاونوییدها بیش از این نیز گزارش‌شده‌است. با توجه به اهمیت عامل (فاکتور) pdx-1 در تکوین سلول‌های بتا و بخش اگزوکرین پانکراس، پژوهش‌هایی درزمینه این عامل انجام‌شده‌اند؛ pdx-1 EP300، عامل تنظیم‌کننده تشکیل بخش اندوکرین و اگزوکرین است؛ این عامل برای تمایز سلول‌های بتا و حفظ فنوتیپ این سلول‌ها، مورد نیاز است؛ همچنین در سلول‌های بالغ بتا، باعث افزایش بیان انسولین و دیگر ژن‌های درگیر در تنظیم گلوکز و متابولیت‌های دیگر، نظیر انتقال‌دهنده گلوکز-۲ و

[1] - Brolen
[2] - Sun

Archive of SID

www.SID.ir

گلوکوکیناز می‌شود.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش به‌نظرمی‌رسد که کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های تولیدکننده انسولین تحت اثر عصاره برگ و گل یونجه، بیشتری بازدهی‌دارد. برای بررسی عملکرد سلول‌های تمایزیافته و استفاده آنها به‌عنوان روش درمانی، می‌توان این سلول‌ها را به حیوان‌های مدل دیابتی پیوندزد و سپس، بهبود و طبیعی‌شدن سطح گلوکز خون را مورد بررسی قرارداد.

سپاس و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مالی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد (به ریاست خانم دکتر *بهناز صفار*) انجام‌شده‌است؛ بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری‌کردند، قدردانی‌می‌شود.

منابع

1. Yuhua D, LuZ W. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transfected with Human Insulin Genes Can Secrete Insulin Stably. Annals of Clinical & Laboratory Science. 2000; 4: 36- 2.
2. Attali M, stetsyuk V, Basmacio gullari A. control of cell differention by the pancreatic mesenchyme. Diabetes. 2007; 50: 56- 1248
3. Pandy S. stem cell transplantation a future for diabetic patient pharmaceutical. Sciences. 2010; 13: 68-70.
4. Ye Chena J A, Li-Xin Xiang a, and Xue ,Jun Dongb G. Mesenchymal stem cells A promising candidate in regenerative medicine. Biochemistry & Cell Biology. 2008; 40: 815-820.
5. Baharvand H, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes and panceratic in 2D and 3D culture systems in vitro. Int J Dev Biol . 2006; 50: 645-652.
6. Kawakami M, Hirayama A,Tsuchiya K,Ohgawara H N, and Umezawa K. promotion of {beta} cell differentiation by the alkaloid conophylline in porcine pancreatic endocrine cell. Biomedicine& Pharmacotherapy. 2010; 64: 226-231.
7. Ahmed B, Rao. in vitro callus and in vivo leaf extract of gymnema sylvestre stimulate beta cells regeneration and anti diabetic activity in wistar rats. Phytomedicine international jornal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 2010; 17: 1033-1039.
8. Hanna Winiarska M, Małgorzata, Borowska, Teresa, Bobk, Iewicz, Kozłowska, Piotr. Gorecki, Alina Mscisz, Przemysław M, Mrozikiewicz. The effects of plant extracts of Medicago sativa and Trigonella foenum-graecum on postprandial glucose levels in type 2 diabetic rats. Medical Sciences. 2001; 60: 60-707.
9. Alison M, Peter R, Flatt. Pancreatic and extra pancreatic effects of the traditional anti diabetic plant. Medicago sativa (lucerne). British Journal of Nutrition. 1997; 78: 325-334.
10. Maguire A, Wallenstein Ej, Novik E, Sharma N, Pedersen H. Control of hepatic differentiation via cellular aggregation in an alginate microenvironment. Biotechnol Bioeng. 2007; 98: 631-644.
11. Pandey S. Stem cell transplantation a future for dabetic patient. Pharmaceutical Sciences. 2010; 13: 68-70.
12. Lewis C, Weiler M, Tejman Yarden N, Ziv N, Mazar J, Chaimovitz C, and Douvdevani A. Involvement of graft-derived interleukin-15 in islet allograft rejection in mice. Cytokine. 2006; 34: 106-113
13. Kawakami M, Hirayama A,Tsuchiya K, Ohgawara H M, and Umezawa K. promotion of {beta} cell differentiation by the alkaloid conophylline in porcine pancreatic endocrine cells. Biomedicine& Pharmacotherapy. 2010; 64: 226-231.
14. Ahmed B, Rao A. In vitro callus and in vivo leaf extract of gymnema sylvestre stimulate beta-cells regeneration and anti-diabetic activity in wistar rats. Phytomedicine international jornal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 2010; 17: 1033-1039.
15. Bnouham M, Ziyyat A, Mekhfi H, Tahri A, and Legssyer A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity-A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). International Journal of Diabetes and Metabolism. 2006; 14: 1-8.
16. Estany S, Palacio JR, Barnadas R, Sabes M, Iborra A, and Martinez P. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and α-tocopherol on endometrial cells in culture. Reproductive Immunology. 2007 :75: 1-10.
17. Jonas J, Plant T, Gilon P, Detimary P, Nenquin M, and Henquin J. Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. Br pharmacol. 1995; 114: 872-880.
18. Han M. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. Exp mol med. 2003 : 35: 136-139.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Pushparaj P, Low H K, Manikandan J, Tan B H and Tan C. Anti-diabetic effects of Cichorium intybus in streptozotocin-induced diabetic rats. Ethnopharmacology. 2007:111: 430-434.
20. Akira Sh, Shigehiko U, Yukiteru O, Ko S, Shigeaki I, Masahide Y. Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. Parasitology. 2005. 11(27): 4161-4166
21. Chen L, Wang, L, Song J,Chen Xu. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. Clinical & Investigative Medicine. 2008; 31(6): 328-337.
22. Dodson G, and Steiner D. The role of assembly in insulin biosynthesis. Macromolecular assemblages. 1998; 8:189-194.
23. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O. Essential role of phos-phatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipoly-sis in rat adipocytes. studies with a selective inhibitor wortmannin. J Biol C hem. 1994; 269: 3568–3573.
24. Ward C, and Lawrence M. Ligand-induced activation of the insulin receptor a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. Bio essays. 2009;31: 422-434.
25. Dhahir F, Cook D, Self C. Amplified Enzyme-Linked Immunoassay of Human Proinsulin in Serum (Detection Limit: 0,1 pmol/L). Clinical Chemistry. 1992; 38(2): 227-237.
26. Umezawa K, Hiroki A, Kawakami M, Naka H, Ogta T, Kojima I, Koyano T, Kowithayakorn T, Pang H, and Kam T. Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cwlls by conophylline. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2003; 57: 341-350.
27. Brolen G, Heins N, Edsbagge J, and Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing β-cell-like cells. Diabetes. 2005; 54: 2867-2874.
28. Sun B, Roh K, Lee S, Lee Y, and Kang K. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet –like structure. Biochemical and Biophysical research communications. 2007; 354: 919-923.

Archive of SID

www.SID.ir