Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

ORIGINAL ARTICLE

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Insulin Producing Cells Using the Extracts of Allium ursinum and Silybum marianum

Hossein Ranjbaran[1],
Saeid Abediankenari[2],
Mohammad Azadbakht[3],
Alireza Khalilian[4],
Marzei Momeninezhad Amiri[5],
Seyed Saeed Hosseini[6],
Atena Majidi[7]

[1]PhD Student in Immunogenetics., Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professor, Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD Student in Traditional Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] PhD Student in Traditional and Complementary Medicine , Traditional and Complementary Medicine Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 7, 2017 Accepted September 12, 2017)

Abstract

Background and purpose: Today, increased rate of demand for insulin is predictable due to increasing cases of diabetics in the world. Therefore, it is necessary to develop economic approaches and increasing the production of insulin for the future and medicinal plants could be regarded as a promising prospect for insulin production.

Materials and methods: The *Allium ursinum* and *Silybum marianum* were collected. Each herbarium was identified in School of Pharmacy affiliated with Mazandaran University of Medical Sciences and the extract was used by percolation with 70% ethanol extraction, after the solvent was evaporated by using the rotary. After the successful isolation of mesenchymal stem cells (MSCs), Wharton's jelly was derived and approved. Then, the mesenchymal stem cells were differentiated to pancreatic beta cells with two herbal extracts.

Results: Compared with the control group, there was a significant difference between the levels of insulin in the culture medium obtained from the two plants (P= 0.0001). In addition, via specific dithizone staining, the insulin producing cells (IPCs) were proven.

Conclusion: The extracts of *Allium ursinum* and *Silybum marianum* were found capable in inducing differentiation of the mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly into IPCs. *Allium ursinum* was seen with the highest rate of insulin production, while *Silybum marianum* had the lowest rate of insulin production, therefore, *Allium ursinum* could be more effective in treatment of diabetes.

Keywords: mesenchymal stem cells, insulin producing cells, *Allium ursinum, Silybum marianum*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (153): 1-12 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 153 مهر سال 1396 (12-1)

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سلول های تولید کننده انسولین توسط گیاه والک کوهی و خار مریم

حسین رنجبران[1]
سعید عابدیان کناری[2]
محمد آزاد بخت[3]
علیرضا خلیلیان[4]
مرضیه مومنی نژاد امیری[5]
سید سعید حسینی[6]
آتنا مجیدی[7]

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از سلول‌های بنیادی (Stem Cells)، که توانایی تمایز به سلول‌های بتا پانکراس را دارند، به‌عنوان روش جدیدی در درمان بیماری دیابت مورد استفاده قرار گرفته است. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی، افزایش تقاضا برای هورمون انسولین قابل پیش‌بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعه روش‌های ارزان و ظرفیت تولید بالای انسولین برای آینده ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از پتانسیل گیاهان دارویی، می‌تواند چشم‌انداز نوید بخشی برای تولید انسولین باشد.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری پیاز والک ودانه خار مریم در هرباریوم دانشکده داروسازی، و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از ژله وارتون (WJ-MSCs) و تمایز این سلول‌ها با استفاده از عصاره‌های گیاهی والک کوهی و خار مریم به سلول‌های بتای پانکراس ، سطح انسولین ترشح شده در مایع رویی کشت سلولی این دو گیاه با استفاده از کیت الیزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میزان سطح انسولین در سوپر ناتانت محیط کشت حاصل از این دو گیاه در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بوده است. ($P = 0/0001$) ترشح انسولین توسط والک کوهی 160 U/ML و در خار مریم U/ML 3/14 به‌دست آمده است. همچنین با کمک رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون، سلول‌های تولیدکننده انسولین مورد بررسی قرار گرفت.

استنتاج: والک کوهی و خار مریم هر دو توانایی القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs) را دارا می‌باشند. و بین این دو عصاره گیاهی، والک کوهی بیش‌ترین تولید انسولین و خار مریم کم‌ترین میزان تولید انسولین را داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت، در درمان دیابت استفاده از والک کوهی در مقایسه با خار مریم عصاره گیاهی موثرتری می‌باشد.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSCs)، سلول‌های تولیدکننده انسولین (IPCs)، دیابت، والک کوهی، خار مریم

مقدمه

مصرف گیاهان دارویی در جوامع مختلف رو به افزایش است.و به‌دلیل نگرانی از عوارض داروهای شیمیایی، کم اثر و بی اثر بودن بعضی از این داروها در مصارف طولانی مدت، استفاده از گیاهان دارویی به

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری و محمد آزاد بخت - ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشک و داروسازی ساری Email: abedianlab@yahoo.co.uk،azadbakhtm@hotmail.com
1. دانشجوی دکترای پژوهشی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استاد، فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. استاد، آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. دانشجوی دکترای طب سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
6. دانشجوی دکترای پژوهشی، مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
7. دانشجو داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1396/5/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1396/6/15 تاریخ تصویب : 1396/6/21

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

صورت جایگزین یا مکمل داروهـای شـیمیایی در حـال گسـترش مـی‌باشـد.البته اسـتفاده از داروهـای گیـاهی از ابتدای تمدن بشر رواج داشـته اسـت(2 ،1). در بعضـی از موارد نیز استفاده از داروهای گیاهی با عوارض کمتـر و اثر بخشی بیشتر به جای درمان‌های طب رایج، ثابت شده است(9 ،3).

دیابت شایع‌ترین اختلال متـابولیکی در جهـان محسـوب می‌شود و در این بیمـاری توانـایی تولیـد انسـولین دچـار اختلال مـی‌گـردد. بـروز دیابـت ممکـن اسـت بـه علـت کـاهش ترشـح انسـولین از سـلول‌هـای بتـای جزایـر لانگرهانس پانکراس، یا مقاومت به انسولین و یـا شـامل هر دو مورد باشد(10).بر اساس آمـار ارائـه شـده توسـط IDF(International Diabetes Federation)در سراسـر جهان 382 میلیون نفـر مبـتلا بـه دیابـت هسـتند کـه 8/3 درصـد آن بزرگسـالان هسـتند و اکثریـت آن‌هـا نیـز بـه دیابت نوع 2 مبـتلا هسـتند. و بـرآورد مـی‌شـود تـا سـال 2035 تعداد مبتلایان به دیابت به 592 میلیـون نفـر یعنـی حدود 10درصد از جمعیت بزرگسـالان جهـان را شـامل شـود(13 ،11). بـه طـور عمـده دیابـت بـه دو تیـپ 1 و 2 تقسیم می شـود. دیابـت تیـپ 1، اختلالـی اسـت کـه بـا تخریب خود ایمن سلول‌های بتـای پـانکراس بـه وجـود می‌آید. در دیابت تیپ 2 اغلب مقاومت پیش‌رونده بـدن به انسولین ایجاد می‌شود که در نهایـت ممکـن اسـت بـه تخریب سلول های بتای پانکراس و نقـص کامـل تولیـد انسولین منجر شود. هر چند تا به حال علت دقیق بیماری مشخص نشده است ولی شواهدی مبنی بـر تـاثیر عوامـل ژنتیکی و محیطی در القاء خود ایمنی وجود دارد(14). از طرفی تاکنون روش درمان قطعی برای دیابت پیدا نشـده اسـت، البتـه اسـتفاده از داروهـای خـوراکی و تزریـق انسـولین از درمـان‌هـای رایـج ایـن بیمـاری محسـوب می‌شود. هم‌چنین از روش پیوند پـانکراس و سـلول‌هـای جزایر لانگرهانس نیز استفاده می‌گردد.هر چند بـه دلیـل رشـد روز افـزون بیمـاری دیابـت و کمبـود افـراد اهـدا کننده، استفاده از پیوند پانکراس دچار محدودیت است.

در این راستا استفاده از سلول‌های بنیادی (Stem Cells) که توانایی تمـایز بـه سـلول‌هـای بتـا پـانکراس را دارنـد بـه‌عنـوان روش جدیـد، مـورد اسـتفاده قـرار گرفتـه می‌شـود(15). سـلول‌هـای بنیـادی، سـلول‌هـای تخصـص نیافته با قدرت تکثیر بـالا هسـتند کـه دارای دو ویژگـی اصلی شـامل، قابلیـت تمـایز (Differentiation) و خـود نوسـازی (Self-Renewal) مـی‌باشـند(16). سـلول هـای بنیادی می‌توانند تقسیم‌های مکرر انجام داده و خاصـیت چند توانگی (Multipotency) خود را نیز حفظ کرده و در صورتی که محرک خاصی به آن اضافه شود، قادرند به انواع گوناگون سلول‌های اختصاصی تمایز یابند(17).

سلول‌هـای پـانکراس در حـال تکـوین، فـاکتورهـایی را تولید می‌نمایـد کـه سـبب تمـایز سـلول‌هـای بنیـادی بـه سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شـوند(18). سـه شـرط اثبات هویت سلول‌های مزانشیمال از سایر سلول‌ها شـامل اتصال و چسبیدن سلول‌هـا بـه کـف فلاسـک در محـیط کشت، بیان بعضـی از مارکرهـا و عـدم بیـان مارکرهـای دیگر و قابلیت تمایز بـه سـلول‌هـای چربـی، اسـتخوان و غضروف می‌باشند. با توجه به این کـه تهیـه سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان بسـیار مشـکل اسـت و در بعضی از موارد ممکن است رعایـت مسـائل اخلاقـی صورت نگیرد، پژوهشـگران بـه دنبـال اسـتفاده از منـابع جایگزین، مانند خـون بنـد نـاف، ژلـه وارتـون و جفـت می‌باشـند(21 ،19). چـون ایـن بافـت‌هـا (بنـد نـاف و ژلـه وارتون پس از زایمان دور ریخته می‌شوند بنـابراین هـیچ گونه خطری برای نوزاد و مادر ایجـاد نمـی‌کننـد.امروزه گـرایش بـه سـمت اسـتفاده از ایـن منـابع بـه جـای مغـز استخوان می‌باشد.

لئـون-کوئینتـو (Leon- Quinto) و همکـاران در سـال 2004، تعدادی فاکتور اگزوژن را کشف کردنـد کـه در صورت استفاده اصولی قادر بـه القـا تمـایز هسـتند. ایـن سیسـتم شـامل روش کـار سـه مرحلـه‌ای انتخـاب تمـایز است، هم‌چنین این روش انتخابی با کاهش غلظت سـرم از 15 درصـد بـه 3 درصـد و اضـافه کـردن فاکتورهـای

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

انتخابی از قبیل نیکوتین آمید و Sonic hedgehog منجر به تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های پانکراس شده است(22، 23).

سگو (Segev) و همکاران در سال 2004، گزارش کردند که می‌توان با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسان، سلول‌های ترشح‌کننده انسولین را تولید کرد. این تغییرات در مرحله آخر تمایز با کاهش غلظت گلوکز در محیط، حذف bFGF و اضافه کردن نیکوتین آمید به کشت انجام شد(24).

آمور (Amour) و همکاران در سال 2005، تاکید کردند که استفاده ی منطقی از چندین فاکتور تمایزدهنده با تقلید از شرایط موجود زنده، می‌تواند به تولید سلول‌های بتای حقیقی با راندمان بالا کمک کند(25).

سیپیون(Sipione) و همکاران در سال 2004، هانسون و همکاران در سال 2004، و راجا گوپال (Rajagopal) و همکاران در سال 2003، در مطالعاتشان به این موضوع پرداختند که سلول‌های بنیادی پیوندی موجب بهبودی دیابت می‌شود.در این مطالعات آن‌ها گزارش کرده‌اند که مولدین اصلی انسولین/پروانسولین در محیط کشت، نورون‌ها و پیش‌سازهای عصبی هستند(28، 26).

در مطالعه دیگر در سال 2016، بر روی عصاره برگ Myrtusنشان داده شد به‌طور معنی‌داری باعث کاهش گلوکز سرم در موش‌های دیابتی شده است(29).

والک یکی ازگونه‌های سیر و به اصطلاح سیرکوهی می‌باشد. نام علمی آن Allium ursinum L و نام انگلیسی آن WildGarlic یا Board-Leaved Garlic و از خانواده Liliaceae محسوب می‌شود. والک بسیار ملایم‌تر و شیرین‌تر از سیر معمولی است و بیش‌تر مصرف دارویی دارد. والک دارای ترکیبات گوگردی است و خواص دارویی متعددی برای آن بیان شده است. اثرات ضد میکروبی، سیتوتوکسیک وآنتی‌اکسیدان نیز برای آن ذکر شده است. برای قرن‌ها والک در پزشکی سنتی استفاده شده است. با این حال، مطالعات در مورد ترکیب و فعالیت دارویی آن نسبتا جدید می‌باشد(30).

گیاه خار مریم از تیره کاسنی است که به نام علمی Silybum marianum(L)Gearthشناخته می‌شود. عصاره بذر این گیاه دارای ترکیبات زیادی است مانند:سیلی دیانین، سیلیبین A وB، آپی ژنین، سیلی کریستین، دی هیدرو سیلیبین، دی اکسی سیلی کریستین، دی اکسی سیلی دیانین و ... می‌باشد. عصاره دانه خشک خار مریم دارای 1 تا 4 درصد سیلی مارین است که شامل فلاونوئیدها از جمله سیلیبین A و B، دی هیدرو سیلیبین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است(31). مطالعات تایید می‌کند که سیلی مارین، پانکراس را از آسیب ناشی از مواد شیمیایی از جمله آلوکسان و سیکلو سپورین محافظت می‌نماید (جدول شماره 1) (33، 32).

جدول شماره 1: مشخصات (L) Allium ursinum L and Silybum marianum

ردیف	نام لاتین گیاه	نام علمی گیاه	نام طب سنتی گیاه	نام بومی گیاه	خاستگاه
1	Wild garlic	*Allium ursinum L*	والک کوهی	سیر جنگلی	رشته کوه‌های البرز
2	Milk thistle	*Silybum marianum(L)*	خرشف	خار مریم	سراسر جهان به ویژه ایران

تلاش‌های فراوانی جهت تولید سلول‌های مولد انسولین (IPCs)یا(Insulin producing cells ، در درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته است. تمایز سلول‌های بنیادی به IPCs یکی از روش‌های جدید در درمان دیابت به ویژه نوع یک به شمار می‌رود(34).

تاکنون تحقیقات زیادی جهت تولید سلول‌های بنیادی مزانشیمال و تمایز آن‌ها به سلول‌های بتای پانکراس با استفاده از مولکول‌های مختلف انجام شده است ولی موفق به تولید کامل سلول‌های بتای پانکراس نشده‌اند.لذا هدف از این پژوهش جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از ژله وارتون و تمایز آن‌ها با استفاده از دو عصاره گیاهی Allium ursinum L(والک کوهی) و Silybum marianum (L) (خار مریم) در محیط کشت سلولی به سلول‌های تولیدکننده انسولین (IPCs) می‌باشد تا از این طریق بتوان روشی نو در تولید

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

سلول‌های بتای پانکراس با هزینه کم‌تر و منابع بیش‌تر ترسیم نماییم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی(Experimental) ، بند ناف در هنگام زایمان توسط فوق تخصص زنان و زایمان در اتاق عمل مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) شهرستان ساری از جنین تازه به دنیا آمده جدا گردید. بند ناف در شرایط کاملا استریل به روش سزارین الکتیواز بیش از 8 مادر که فرم رضایت کتبی و آگاهانه را امضاء کردند به‌دست آمد. سپس بند ناف را در محیط کشت سلولیDMEM در ظرف استریل درب دار قرار داده و در مدت یک ساعت آن را به آزمایشگاه دانشکده پزشکی ساری با رعایت زنجیره سرما (دمای منفی 4 درجه سانتی گراد) انتقال داده شد. آنگاه در زیر هودلامینار در یک پلیت 10 میلی متری، کلیه لخته‌های خونی و عروق از بند ناف جدا و سپس به روش مکانیکی به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. به این قطعات کوچک بندناف که از آن سرخرگ و سیاهرگ خارج شده است و حاوی لایه ژلاتینی می‌باشند ژله وارتون می‌گوییم. سپس این ژله به دست آمده، در PBS در دور 1250 RPM به مدت 5 دقیقه شستشو داده شد. و 30 میلی‌لیتر از محلول کلاژناز (آمریکا، سیگما) به غلظت 1 میلی گرم در میلی‌لیتر به آن اضافه شد سپس در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد Co2 به مدت 1 ساعت انکوبه گردید. سپس ژله وارتون به دست آمده را به محیط کشت High Glucose-Dulbecco`sModified Eagle Medium (HG-DMEM)+ FBS(Fetal Bovine Serum)15%+Penicillin100U/ml+ Streptomycin)100µg/ml +2mMOL- L Glutamin)انتقال داده شد.

سپس محلول حاصل در همان شرایط قبل سانتریفوژ گردید، و به رسوب سلولی، محلول تریپسین 0/25 درصد که حاوی 1 میلی مولار EDTA است (آمریکا، سیگما) اضافه شد و در انکوباتور با شرایط قبلی به مدت 30 دقیقه انکوبه گردید. سپس رسوب سلولی را دو بار شستشو و سانتریفوژ کرده و از فیلتر با منافذ 70 میکرون عبور داده شد.به منظور لیز RBC های باقی‌مانده در نمونه، 2 میلی‌لیتر از محلول‌هاپیوتونیک کلرید آمونیوم (آمریکا، فارمین ژن) به نمونه افزوده و پس از10دقیقه مجددا شستشو گردید. رسوب سلولی حاصل که شامل سلول‌های جدا شده از بافت جفت است، به فلاسک T75 منتقل، و در محیط Dulbecco'sHG-DMEM-F12(آمریکا، جیبکو) همراه با FBS 15 درصد (آمریکا، جیبکو) کشت داده شد.سلول‌های مزانشیمی در مخلوط سلولی به کف فلاسک متصل شده و دوکی شکل شدند. پس از 24 ساعت با تعویض محیط کشت، سلول‌های معلق (غیر مزانشیمی) از محیط دور شد، و سلول‌های مزانشیمال با اتصال به کف فلاسک، پس از چند روز تشکیل کلنی داده و تکثیر شدند. زمانی که سطح فلاسک بیش از 90 درصد توسط سلول‌ها پوشیده شد، با استفاده از محلول تریپسین 0/25 درصد که حاوی 1 میلی مولار EDTA است، سلول‌ها از فلاسک جدا شده و تعداد 105 × 2 سلول مجددا در فلاسک T75 جدید و درون 10 ml محیط DMEM-F12HG- کشت داده شد. برای بررسی تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت، از میکروسکوپ اینورت استفاده گردید. هم‌چنین برای اثبات هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمال از بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمال مانندCD44 :، CD90، CD105و هم‌چنین CD34 ، HLA-DRاز روش فلوسایتومتری استفاده گردید. چون محیط کشت باید همواره از سلول‌های مرده پاکسازی شود. محیط کشت به دست آمده، هر 2 روز یک بار تعویض شد به این صورت پاساژهای متوالی از این سلول‌ها فراهم شده و نمونه‌ای از هر پاساژ، پس از افزودن محلولDMSO به همراه دکستران DEX40 (آلمان، کرایوشور) به نسبت 4 به 1، در ازت مایع فریز شد تا در شرایطی که نیاز به بررسی مجدد بر روی یک نمونه باشد، منبع سلولی قابل اطمینانی در دسترس قرار گیرد.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

نحوه تهیه عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی

والک از منطقه فولاد محله کیاسر شهرستان ساری و خار مریم از حوالی شهرستان نکاء جمع آوری گردید.نام علمی از روی هرباریوم تهیه شده، و مشخص گردید. پیاز والک و دانه خار مریم در سایه خشک شد. و هر کدام جداگانه به اندازه مش 355 پودر شدند و به روش پرکولاسیون با حلال اتانولی 70 درصد عصاره گیری و پس از تبخیر حلال با استفاده از دستگاه روتاری، سپس عصاره به دست آمده در دمای 20 - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

15 گرم از پودر تهیه شده هر یک از این دو گیاه را به 250 میلی‌لیتر حلال (اتانول-آب به نسبت7-1) اضافه گردید و به مدت 40 دقیقه در حمام آب 100 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس عصاره به کمک کاغذ صافی میلی پور چند بار صاف شد. حاصل استخراج توسط اسید کلریدریک اسیدی شده و توسط اتیل استات سه بار و هر بار با 100 میلی لیتر دکانته شد. حاصل استخراج اتیل استاتی توسط دستگاه دوار تقطیر در خلاء (rotary evaporator,EYELA Japanese N1000SW220V-IP)در دمای 40 درجه سانتی گراد خشک شد و در نهایت عصاره محتوی فلاونوئیدهای پیاز والک کوهی و دانه خار مریم تا زمان به کارگیری در دمای منفی 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(36، 35).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های تولیدکننده انسولین (IPCs) با استفاده از عصاره گیاهی والک کوهی و خار مریم

منبع سلولی به دست آمده به مدت 6 تا 10 دقیقه در انکوباتور قرار داده و سپس جهت تمایز آن‌ها با استفاده از دو عصاره گیاهی Allium ursinum L(والک کوهی) و(Silybum marianum (L (خار مریم)، به صورت مجزا در محیط کشت سلولی پس از حدود 28 روز، به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs)تبدیل شدند. به منظور بهینه‌سازی عصاره گیاهان تعیین شده در رقت‌های مختلف، در محیط کشت مورد بررسی قرار دادیم تا رقت اپتیمم آن‌ها رابه دست آوردیم. در این پژوهش از 300 میکروگرم در میلی‌لیتر از هر عصاره گیاه، در محیط کشت استفاده شد.

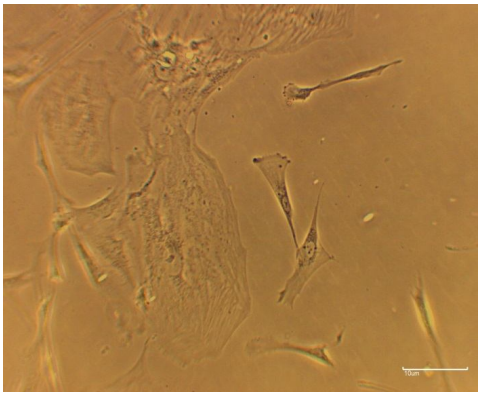
آن‌گاه به منظور تحریک تکثیر سلولی، افزودنی‌هایی مانند (Gibco)B27,(Gibco)N2 به محیط کشت اضافه، و برای بررسی مورفولوژی سلول‌های تمایزیافته از رنگ آمیزی دیتیزون (Dithizone) استفاده گردید. 50 میلی گرم دیتیزون (Merck) در 5 میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulphoxide) (sigma)حل، و به عنوان محلول استوک در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در هنگام استفاده دیتیزون با غلظت نهایی 10 میکرو مولار به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت 15 دقیقه در انکوباتور انکوبه شدند. سلول‌هایی که در نتیجه‌ی این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز در آمده‌اند سلول‌های تولید کننده انسولین می‌باشند. جهت شمارش سلول‌های تمایز یافته و سلول‌های تمایز نیافته از لام نئوبار استفاده گردید.برای هر نمونه 5 بار شمارش تکرار شد، به این صورت که سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بعد از سانتریفوژ با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری برای شمارش مشاهده شدند.

برای تعیین میزان ترشح انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته در روز 28 پس از تمایز، محیط کشت سلول‌های تمایز یافته با استفاده از کیت استاندار به روش الیزا (Demeditec, Germany) مورد آزمایش قرار گرفت. میزان ترشح انسولین پس از القاء به وسیله هر یک از دو عصاره گیاهی، به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. و هر نمونه سه بار اندازه‌گیری شد.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

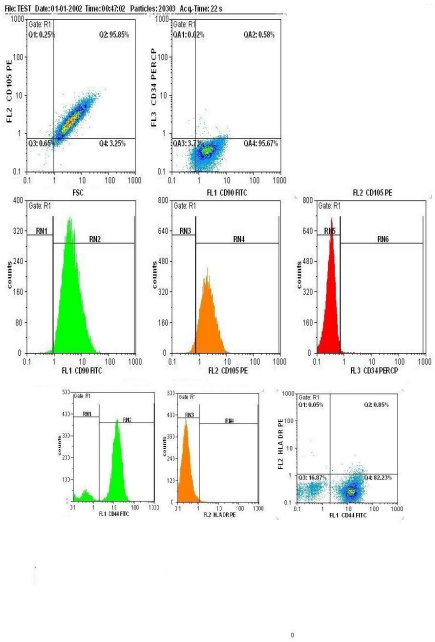
یافته ها

در بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون (WJ-MSCs)، 4 روز پس از قرار دادن قطعات ژله وارتون در محیط کشت، به تدریج سلول‌های بنیادی مزانشیمال از لبه‌های بافت شروع به جدا شدن کردند این سلول‌ها دوکی، فیبروبلاستی شکل و چسبیده به کف فلاسک بودند (تصویر شماره 1).و بعد از 6 روز کف فلاسک توسط MSCsپوشانده گردید.میزان جدا سازی سلول در هر سانتی متر مکعب محیط کشت سلولی 105 × 2بوده است.



تصویر شماره 1: سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون، به صورت دوکی و فیبروبلاستی شکل نشان می‌دهد که در حال جدا شدن از بافت ژله وارتون می‌باشند

در بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، به منظور بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از ژله وارتون، بیان مارکرهای سطحی با استفاده از فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند.نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای مزانشیمال CD44، CD90 و CD105 را به‌صورت مثبت بیان کرده است و از نظر بیان مارکر های خونی و آنتی‌ژن لکوسیتی انسانی CD34,HLA-DRمنفی هستند (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 2: نتیجه فلوسایتو متری سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون

میزان ترشح انسولین با استفاده از کیت الیزا

برای تعیین میزان ترشح انسولین توسط سلول‌های تمایزیافته در روز 28 پس از تمایز، محیط کشت سلول‌های تمایزیافته با کیت الیزا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های تمایز یافته نسبت به سلول‌های تمایز نیافته، توانایی تولید انسولین را دارند و هم‌چنین می‌توانند سلول‌های مولد انسولین ساز را بسازند (جدول شماره 2).

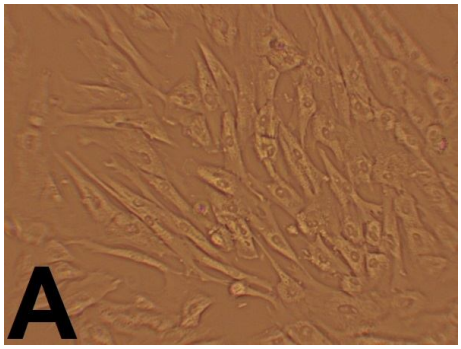
جدول شماره 2: مقایسه نتایج به دست آمده از روش آلیزا از نمونه‌های القاء یافته به سلول‌های بتای پانکراس نسبت به گروه کنترل (کنترل منفی)

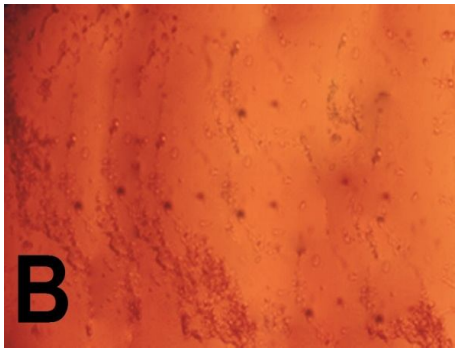
گروهها	ترکیب سلول بنیادی و گیاه	انسولین گروه تیمار U/ml	انسولین گروه کنترل U/ml
1	والک کوهی + سلول بنیادی مزانشیمال	160	0
2	خارمریم + سلول بنیادی مزانشیمال	14,3	0

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

اثبات هویت IPCs حاصل از تمایز WJ-MSCs با رنگ آمیزی دیتیزون ((DTZ

دیتیزون عامل متصل شونده به فلز روی می‌باشد. که به صورت انتخابی سلول‌های بتای پانکراس را به رنگ قرمز در می‌آورد(37).در این مطالعه با کمک رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون، سلول‌های تولید کننده انسولین به اثبات رسیدند. سلول‌های دوکی شکل MSCs تحت تاثیر عصاره گیاهی تغییر مرفولوژی دادند و به حالت کروی و خوشه‌ای و به صورت تجمعی (مانند جرایر لانگرهانس) به رنگ آجری قرمز در آمدند (تصویر شماره 3).





تصویر شماره 3: A: نشان‌دهنده‌ی مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی قبل از تأثیر عصاره گیاه والک کوهی می‌باشد. (تیمار نشده و کنترل منفی)، **B**: سلول‌های دیتیزون (DTZ) مثبت می‌باشند و توده سلولی خوشه‌ای شکل آجری مایل به رنگ قرمز را نشان می‌دهد که وجود سلول‌های انسولین ساز (IPCs) حاصل از MSCs تحت اثر القای عصاره گیاه والک کوهی را تاییدمی‌نماید. (تیمار شده)(100×)

بحث

در بیماری دیابت، بدن نمی‌تواند انسولین تولید کند یا به درستی از آن استفاده کند. اگر چه انسولین عموماً در باکتری یا مخمر برای استفاده تجاری تولید می‌شود اما در حال حاضر تحقیقات بر روی روش‌های دیگر تولید از جمله تولید پروتئین انسولین در گیاهان متمرکز شده است. امروزه مردم زیادی در جهان، به نوعی از دیابت مرتبط با انسولین رنج می‌برند. هم‌چنین تخمین زده شده است که در آینده‌ای نزدیک تعداد افراد مبتلا به دیابت دو برابر خواهد شد. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی در دنیا، افزایش تقاضا برای هورمون انسولین (با رشد 3 الی 4 درصد در سال) قابل پیش‌بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعه روش‌های ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را برای آینده ضروری می‌نماید. با توجه به پتانسیل بالای گیاهان برای تولید زیست دارو ها، با بهره‌گیری از زراعت مولکولی (Molecular farming)تولید و عرضه انسولین با استفاده از گیاهان نیز می‌تواند چشم‌انداز نوید بخشی برای جامعه بشری باشد.

فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات گیاهی پلی فنلی با خواص ضد دیابتی، ضد التهابی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی هستند که سبب حفاظت بدن در مقابل بیماری‌های اختلالات متابولیک و بیماری‌های کرونری می‌شوند. این ترکیبات پلی فنلی قادر هستند با تحریک ترشح انسولین، سبب ترمیم سلول‌های بتای پانکراس و مهار آپوپتوز شده و از پیشرفت دیابت قندی جلوگیری نمایند از فلاونوئیدها برای القاء تمایز سلولی نیز استفاده شده است(38).

وانگ (Wang) در سال 2011، و هم‌چنین Phuc و همکاران در سال 2011، موفق به تولید سلول‌های بتای پانکراس از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به دست آمده از خون بند ناف شدند که پس از تزریق به موش دیابتی توانستند سطح گلوکز خون را کاهش دهند. آن‌ها در

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

این مطالعه دریافتند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال دیواره‌ی سیاهرگ بند ناف نسبت به سلول‌های مزانشیمال ژله وارتون و خون بند ناف از توان تمایزی پایین‌تری بر خوردار هستند. این توان تمایزی کمتر، در تمایز این سلول‌ها به استخوان و چربی نیز مشاهده شد(40، 39).

ریکوار (Raikwar) و همکاران در سال 2013 گزارش کردند، بیان اکتوپیک Pancreatic Pdx-1 (homeobox Factor-1) andduodenalکه یک فاکتور رونویسی ضروری پانکراس است، منجر به افزایش تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شود(41).

در این مطالعه پس از جداسازی موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs) و تایید آن از طریق چسبیدن سلول‌های فیبروبلاستیک دوکی شکل به کف فلاسک، و بررسی CD مارکر های مثبت و منفی، در مرحله بعد، تمایز به سلول‌های بتای پانکراس، با دو عصاره گیاهی انجام گردید. و با اپتیمایز کردن غلظت آن‌ها در رقت‌های مختلف در محیط کشت توانستیم به تولید مناسب سلول‌های انسولین ساز (IPCs) دست پیدا کنیم. از نشانه‌های مهم عملکرد سلول‌های بتای پانکراس، ترشح انسولین است.از این جهت در این مطالعه، میزان ترشح انسولین در MSCs تمایز یافته به وسیله کیت ELISAمورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه به ترتیب میزان ترشح انسولین از دو عصاره گیاهی مورد استفاده جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs) به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs) که با استفاده از کیت الیزا بررسی شدند، L Allium ursinum(والک کوهی) با u/ml 160و Silybum marianum (L) (خار مریم) با u/ml 14,3 می باشند.

به‌طور خلاصه می توان گفت که این دو عصاره گیاهی قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون به IPCs هستند. و بین این دو عصاره گیاهی، والک کوهی بیش‌ترین تولید انسولین، و خار مریم کمترین میزان تولید انسولین را دارد.

پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی عملکرد IPCsبه دست آمده از این پژوهش و استفاده در کارهای درمانی و سل‌تراپی، پیوند این سلول‌ها به حیوانات مبتلا به دیابت و ارزیابی بهبود و طبیعی شدن سطح گلوکز خون در این مدل‌های آزمایشگاهی بررسی شوند و اثر بخشی آن در مقایسه با انسولین رایج و حیوانی، مورد توجه قرار گیرد. با توجه به نقش موثری که محیط داخل بدن می‌تواند در مقایسه با محیط خارج از بدن بر روی تمایز داشته باشد، این موضوع ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاهی والک کوهی (Allium ursinum L) و خار مریم Silybum (marianum L) دارای تأثیرات مثبت بر روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از ژله وارتون (WJ-MSCs) به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPCs) می‌باشند. و هم‌چنین در این مطالعه مشخص گردید تولید انسولین به وسیله عصاره گیاهی والک کوهی به مراتب بیشتر از عصاره گیاهی خار مریم می‌باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه به شماره طرح 1462-93 در مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک دانشکده پزشکی ساری می‌باشد. بدین وسیله از زحمات سرکار خانم دکتر زهرا رحمانی و پرسنل اتاق عمل مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) ساری که در تهیه بند ناف نوزادان همکاری صمیمانه داشته‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

References

1. Dattner AM. From medical herbalism to Phytotherapy in dermatology: back to the future. Dermatol. There. 2003; 16(2): 106 - 113.
2. Fong HH. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. Integer Cancer There. 2002; 1(3): 287 - 293.
3. Vahedi Larijani L, Ghasemi M, AbedianKenari S, Naghshvar F.Evaluating the effect of four extracts of avocado fruit on esophageal squamous carcinoma and colon adenocarcinoma cell lines in comparison with peripheral blood mononuclear cells.Acta Med Iran. 2014;52(3):201-205.
4. Husseini HF, Darvishzadeh F, Heshmat R, Jafariazar Z, Raza M, Larijani B. The clinical investigation of Citrullus colocynthis (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. Phytother Res. 2009; 23 (8): 1186 - 1189.
5. AbedianKenari S, Ghasemi M, Kim YJ.Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+ T cells proliferation.Iran Biomed J. 2011;15(1-2):1-5.
6. Thatte UM, Rege NN, Phatak SD, Dahanukar SA. The flip side of Ayurveda. J Postgrad Med. 1993; 39 (4): 179 - 182.
7. Rege NN, Thatte UM, Dahanukar SA. Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in Ayurvedic medicine. Phytother Res. 1999; 13(4):275 - 291.
8. Parab S, Kulkarni R, Thatte U. Heavy metals in herbal T medicines. Indian J Gastroenterol. 2003; 22(3): 111 -112.
9. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from Nigella sativa against murine cytomegalovirus infection. Int J Immunopharmacol. 2000; 22 (9): 729 - 740.
10. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus .Diabetes Care 36(Suppl 1):S67-74.
11. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2013. Accessed at: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf
12. Janson SP, Fall K, Brus O, Magnuson A , Wändell P , Östgren CJ ,et al. Prevalence and incidence of diabetes mellitus: a nationwide population-based pharmaco-epidemiological study in Sweden. Diabetes Med .2015;32(10): 1319-1328.
13. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I ,Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas. Diabetes Res Clin Pract. 2014;103(2): 137–149.
14. Maclaren N, Atkinson M. Is insulin dependent diabetes mellitus environmentally induced N Engl J Med. 1992;327(5): 348-349.
15. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ , Lither land SA , Atkinson MA , et

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

al. In vivo and in vitro characterization of insulin- producing cells obtained from murine bone marrow.Diabetes.2004; 53(7):1721-1732.

16. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. Science 2000; 287(5457):1427-1430.
17. Abediankenari S, Ghasemi M. Generation of immune inhibitory dendritic cells and CD4+T regulatory cells inducing by TGF-beta.Iran J Allergy Asthma Immunol. 2009 ;8(1):25-30. (Persian)
18. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cell: flip side of the coin. Cancer Res.2009; 69(4):1255-1258.
19. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS.Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications-a systematic review of the literature. Open Orthop J 2011;5Suppl 2:242-248.
20. Lee OK, Kuo TK,Chen WM , Lee KD , Hsieh SL, Chen TH.Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103(5):1669-1675.
21. Vater C, Kasten P, Stiehler M.Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. Acta Biomater 20011; 7(2):463-477.
22. Leon- Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells .Diabetologia, 2004.47(8): 1442-1451.
23. Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI.Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (pdx-1and Nkx 6.1).J Histochem Cytochem .1998;46(6): 707-715.
24. 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): 265-274.
25. D`Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm .Nat Biotechnol .2005; 23(12): 1534 –15 41.
26. Sipione S , Eshpeter A , Lyon JG , Korbutt GS , Bleackley RC . Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. Diabetologia. 2004;47(3): 499-508.
27. Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MC,et al. Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells.Diabetes .2004 ; 53(10): 2603-2609.
28. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA .Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake.Science .2003;299(5605): 363.
29. Panjeshahin MR, Azadbakht M, Akbari N. Antidiabetic Activity of Different Extracts of Myrtus Communis in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.2016. 23(2):183-190.
30. Danuta Sobolewska, Irma Podolak, and Justyna Makowska-Wąs (2013). Allium ursinum: botanical, phytochemical and

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:11 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

pharmacological overview. Phytochem Rev. 2015; 14(1): 81–97.

31. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine. Berlin: Springer. 1997.
32. Soto CP, Perez BL, Favari LP, Reyes JL.Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998; 119(2): 125- 129.
33. Von Schonfeld J,Weisbrod B,Muller MK.Silibinin,a plant extract with antioxidant andmembrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporine A toxicity. Cell Mol Life Sci. 1997; 53(11-12): 917-920.
34. Tanhaye Kalate Sabz F, Farokhi F, Delirezh N, Chapari H. In-vitro differentiation of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. Tehran Univ Med J. 2011; 69(4): 211-217. (Persian).
35. Markham KR. Techniques of flavonoid identification. 3rd ed. New York: Academic Press; 1982.
36. Rahman A. Studies in Natural Products Chemistry. Stud Nat Prod Chem 2005; 30(1): 1-10.
37. Shiroi 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 dithizone. Stem Cells .2002; 20(4): 284-292.
38. Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. J Neurochem 2004; 90(5):1144-1155.
39. Wang HS,Shyu JF,Shen WS,Hsu HC,Chi TC,Chen CP, et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. Cell Transplant .2011;20(3):455-466.
40. Phuc PV,Nhung TH,Loan DT,Chung DC, Ngoc PK.Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim .2011;47(1):45-63.
41. Raikwar SP.ZavazavaN.Differentiation and lineage commitment of murine embryonic stem cells into insulin producing cells.Metods Mol Biol.2013;1029:93-108.