ORIGINAL ARTICLE

Effect of flavonoids of extract of cichorium intybus L. leaf on induction of P19 stem-cells differentiation to insulin-producing cells

Maryam Ebrahiminia[1],
Fariba Esmaeili[2],
Navaz Kharazian[2],
Fariba Houshmand[3],
Marzieh Ebrahimi[1]

[1] MSc, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received April 23, 2013; Accepted November 27, 2013)

Abstract

Background and purpose: Regarding the effective role of plant flavonoids in the prevention and treatment of diabetes mellitus, in this investigation, induction of P19 stem cells differentiation into insulin producing cells by flavonoids of methanol extract of Cichorium intybus L. leaf was examined.

Materials and methods: Initially, flavonoids of methanol extract of Cichorium intybus L. leaf were concentrated. The P19-derived embryonic bodies were cultured in α-MEM (Minimum Essential Medium) containing 15% fetal bovine serum for three days. To induce the differentiation, the cells treated with the concentrations of 50, 100 and 200 µg/ml of flavonoids of methanol extract of Cichorium intybus L. leaf for 12 days. Untreated P19 cells and embryonic bodies were used as controls. Dithizone staining, immunoflorecence and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used to demonstrate the differentiated cells.

Results: Differentiated P19 cells by different concentrations of extract shown positive reaction to dithizone staining. Most percentage of positive dithizone cells was reached in concentration of 100 µg/ml. Immunoflorecence method showed that differentiated P19 cells were able to express the pancreas beta cell-specific markers. Pdx-1 gene expression in the cells was demonstrated by RT-PCR technique.

Conclusion: The flavonoids of methanol extract of Cichorium intybus L. leaf are able to induce differentiation of P19 stem cells to insulin producing cells.

Keywords: Methanol extract, flavonoid, Cichorium intybus L. leaf, P19 cells, insulin-producing cells, Pdx-1 gene, pancreas beta cells

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 93-100 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۰۰-۹۳)

اثر فلاونوئید تام موجود در عصاره متانولی برگ کاسنی بر القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به سلول‌های انسولین‌ساز

مریم ابراهیمی‌نیا[1]
فریبا اسماعیلی[2]
نواز خرازیان[2]
فریبا هوشمند[3]
مرضیه ابراهیمی[1]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نقش مؤثر فلاونوئیدهای گیاهی در پیشگیری و درمان دیابت قندی، در این پژوهش القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به سلول‌های انسولین‌ساز تحت تأثیر فلاونوئید تام عصاره متانولی برگ کاسنی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره متانولی از فلاونوئیدهای برگ گیاه کاسنی تهیه و سپس تعیین غلظت شد. اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies یا EB) حاصل از کشت معلق سلول‌های P_{19} در محیط کشت α-MEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو به مدت سه روز کشت داده شدند. به منظور القای تمایز این سلول‌ها، به مدت ۱۲ روز با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فلاونوئید تام عصاره متانولی برگ کاسنی تیمار شدند. سلول‌های P_{19} و اجسام شبه جنینی تیمار نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. از تکنیک‌های رنگ‌آمیزی دیتیزون (Dithizone یا DTZ)، ایمنوفلورسنس و RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) جهت شناسایی سلول‌های تمایز یافته استفاده شد.

یافته‌ها: سلول‌های P_{19} تمایز یافته با غلظت‌های مختلف عصاره نسبت به رنگ‌آمیزی دیتیزون پاسخ مثبت دادند. بیشترین درصد سلول‌های دیتیزون مثبت در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره حاصل شد. روش ایمنوفلورسنس نشان داد که سلول‌های P_{19} تمایز یافته قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتای پانکراس هستند. بیان ژن Pdx-1 (Pancreatic duodenal homeobox-1) در این سلول‌ها توسط تکنیک RT-PCR به اثبات رسید.

استنتاج: فلاونوئید تام عصاره متانولی برگ کاسنی قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به سلول‌های انسولین‌ساز است.

واژه های کلیدی: فلاونوئید تام عصاره متانولی برگ کاسنی، سلول‌های P_{19}، سلول‌های انسولین‌ساز، ژن Pdx-1، سلول‌های بتای پانکراس

مقدمه

سلول‌های بتا، سلول‌های ترشح کننده هورمون انسولین هستند که حدود ۸۰-۶۰ درصد سلول‌های جزیره لانگرهانس را تشکیل می‌دهند. Pdx-1 (Pancreatic duodenal homeobox-1)، عضوی از خانواده عوامل رونویسی هومئودمین است که برای تکوین پانکراس و تنظیم بیان ژن انسولین در سلول‌های بتای بالغ لازم است (۱). تخریب خودایمنی سلول‌های بتای پانکراس موجب بروز دیابت قندی نوع یک می‌شود. پیوند پانکراس و یا جزایر پانکراسی از جمله روش‌های درمانی این نوع دیابت هستند که به دلیل وجود مشکلاتی مانند کمبود نسبی اهدای پانکراس، خطر انتقال عفونت یا رد پیوند، با محدودیت‌هایی روبه‌رو است. از این رو تلاش‌های گسترده‌ای بر روی تولید

مولف مسئول: مریم ابراهیمی‌نیا- قائمشهر: پل هوایی، خیابان شهید رمضان‌پور، اندیشه ۳۴.
۱. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
E-mail: ebrahiminia.maryam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۵/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۶

سلول‌های مولد انسولین (Insulin producing cells یا IPCs) و درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته است. در این راستا، تمایز سلول‌های بنیادی به IPCs یکی از روش‌های نوین درمان دیابت به ویژه دیابت نوع یک می‌باشد (۲).

سلول‌های P_{19} گروهی از سلول‌های بنیادی هستند که از تراتوکارسینومای اولیه القا شده در سویه‌های C۳H/He موش مشتق می‌شوند (۳). این سلول‌ها به نسبت راحت کشت می‌شوند، به سرعت تکثیر می‌یابند و قادر هستند تحت تأثیر عوامل القایی به سلول‌های گوناگون مشتق از سه لایه زایای جنینی تمایز پیدا کنند (۴، ۳). تاکنون از عوامل مختلفی مانند آلکالوئیدهای گیاهی کنوفیلین (Conophylline) و سیکلوپامین (Cyclopamine) جهت تمایز سلول‌های بنیادی به IPCS استفاده شده است (۵). در این مطالعه از فلاونوئید تام عصاره متانولی برگ گیاه دارویی کاسنی (FCE یا Flavonoids of cichorium intybus L. Leaf Extract) جهت القای تمایز سلول‌های P_{19} به IPCs استفاده شد.

گیاه دارویی کاسنی با نام علمی Cichorium intybus L. از مهم‌ترین گیاهان تیره Compositae است و به دلیل دارا بودن خواص متنوعی مانند آنتی‌هپاتوتوکسیسیتی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی و ضد دیابتی مصرف گسترده‌ای در ایران و سایر کشورها دارد (۶). این گیاه دارویی، علفی و یک ساله با ریشه‌ای قطور و برگ‌های متناوب می‌باشد که در اطراف رگبرگ میانی آن کرک‌های فراوانی وجود دارد (۷). برگ کاسنی حاوی فلاونوئیدهای اپی‌ژنین، کوئرستین و لوتئولین است (۸).

فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات پلی‌فنلی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی و ضد دیابتی هستند که موجب حفاظت بدن در مقابل بیماری‌های کرونری و اختلالات متابولیک می‌شوند (۹). این ترکیبات پلی‌فنلی قادر هستند با تحریک ترشح انسولین، مهار آپوپتوز و بازسازی سلول‌های بتای پانکراسی از ایجاد و پیشرفت دیابت قندی جلوگیری کنند که به مواردی از آن‌ها اشاره می‌گردد. تیمار نه هفته‌ای موش‌های مبتلا به دیابت نوع یک، فلاونوئیدهای جنیستئین و دایدزئین هیپرگلیسمی را توسط افزایش سطح انسولین پلاسما مهار می‌کند (۱۰). فلاونوئید اپی‌گالوکاتشین ژالات، قادر است به واسطه مهار فعال‌سازی فاکتور هسته‌ای کاپا B، از مرگ سلولی القا شده با سیتوکین‌ها در سلول‌های بتای پانکراسی جدا شده از موش جلوگیری کند (۱۱). فلاونوئید کوئرستین به واسطه تقویت تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مهار پروکسیداسیون لیپیدی و محافظت سلول‌های بتا توانست از ایجاد هیپرگلیسمی و عوارض دیابت در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین ممانعت کند (۱۲).

اگرچه فلاونوئیدها به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی به طور عمده و گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما از این ترکیبات پلی‌فنلی برای القای تمایز سلولی نیز استفاده شده است (۱۳). تاکنون از فلاونوئیدها جهت تمایز سلول‌هایی مانند سلول‌های PC_{12} به سلول‌های عصبی، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به استئوبلاست‌ها و سلول‌های سرطانی خون به گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها استفاده شده است، اما مطالعه‌ای در زمینه اثر این ترکیبات فنلی گیاهی بر القای تمایز سلول‌های بنیادی به IPCs صورت نگرفته است (۱۵-۱۳). با توجه به مطالب مذکور، تصمیم گرفته شد تا اثر این گروه از ترکیبات فعال زیستی گیاهی بر القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به IPCs بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه FCE: برگ‌های گیاه کاسنی مورد نیاز از ارتفاع ۲۰۰۰ متری منطقه شهرکرد جمع‌آوری و پس از خشک شدن در دمای اتاق به صورت پودر درآورده شد. ۱۵۰ گرم از پودر برگ گیاه به ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول افزوده، به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس عمل تغلیظ عصاره تا حد خشک شدن توسط دستگاه تقطیر در خلأ (rotary evaporator, EYELA Japanese N1000SW220V-1P) و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. عصاره خشک شده حاصل در آب مقطر حل شد. محلول به دست آمده جهت جداسازی کلروفیل از سایر محتویات عصاره چند

بار با کاغذ صافی فیلتر گردید. نبود ذرات سبز مایل به سیاه رنگ کلروفیل در پشت کاغذ صافی نشان دهنده جدایی کلروفیل از سایر اجزای عصاره است. با استفاده از حلال بوتانول و دکانتور، کاروتن از عصاره حاوی فلاونوئید مجزا شد. بوتانول موجود در عصاره حاوی فلاونوئید با کمک دستگاه تقطیر در خلأ تقطیر گردید. سپس عصاره حاصل در آب مقطر حل و با کمک دستگاه تقطیر در خلأ تا حد خشک شدن تغلیظ شد. در نهایت عصاره محتوی فلاونوئیدهای برگ کاسنی در متانول حل و تا زمان به کارگیری در یخچال معمولی نگهداری شد (۱۷، ۱۶).

۲- کشت و تکثیر سلول‌های P_{19} و تهیه اجسام شبه جنینی: رده سلولی P_{19} به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شد. جهت رشد و تکثیر این سلول‌ها از محیط کشت α-MEM (Gibco, cat: ۱۹۰۰-۰۷۳) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (Sigma, cat: ۱۰۲۷۰-۱۰۶) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Sigma, cat: S۱۲۷۷) و پنی‌سیلین (Sigma, cat: P۳۰۳۲) استفاده شد. سلول‌های P_{19} به شکل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies یا EB) تحت تأثیر عامل القایی موردنظر قرار گرفتند. جهت تهیه EB، سلول‌های P_{19} (با تراکم ۱×۱۰^{۸} سلول در هر میکرولیتر) به ظروف دارای خاصیت چسبندگی کم انتقال داده شدند و پس از سه روز به پتری دیش‌های ژلاتینه حاوی محیط کشت α-MEM به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی منتقل شدند (۱۸).

۳- القای تمایز در سلول‌های P_{19} با استفاده از FCE: EBها پس از انتقال به ظروف ژلاتینه به بستر کشت چسبیدند و به تدریج سلول‌ها از اطراف آن‌ها به صورت شعاعی تکثیر پیدا کردند. EBها پس از تکثیر، در چهار گروه آزمایشی با محیط کشت α-MEM به همراه ۳ درصد سرم جنین گاوی با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از FCE به مدت ۱۲ روز تیمار شدند. جهت اثبات تمایز سلول‌های P_{19} به IPCs تحت اثر FCE، از روش‌های رنگ‌آمیزی دیتیزون (Dithizone یا DTZ)، ایمنوفلورسنس و RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) استفاده شد (۱۹).

۴- رنگ‌آمیزی دیتیزون: جهت انجام این رنگ‌آمیزی، ابتدا محلول استوک دیتیزون پس از حل کردن ۵۰ میلی‌گرم از پودر دیتیزون (Merck,cat: K۶۴۵۳۰۵۵) در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید تهیه شد. محلول حاصل پس از فیلتراسیون، در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت تهیه محلول کار دیتیزون، ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت α-MEM فاقد سرم اضافه شد. پس از تخلیه محیط رویی گروه‌های سلولی موردنظر و شستشو با PBS، ۱ میکرولیتر از محلول کار را به ظرف کشت محتوی سلول اضافه کرده، به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ CO_2 درصد قرار داده شدند. پس از این مدت سلول‌ها از محیط کشت خارج و به آرامی سه مرتبه با HBSS (Hank's balanced salt solution) شستشو داده شدند. در مرحله آخر به هر خانه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰).

۵- تعیین بهترین غلظت FCE جهت القای تمایز در سلول‌های P_{19} به IPCs: به منظور تعیین بهترین غلظت عصاره گیاهی جهت القای تمایز سلول‌های P_{19} به IPCs، سلول‌های هر تیمار پس از رنگ‌آمیزی، تریپسینه و سپس سانتریفیوژ شدند. مایع رویی هر گروه با ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید تعویض شد. تعداد سلول‌های بی‌رنگ و قرمز حاصل از رنگ‌آمیزی دیتیزون با کمک لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ نوری با پنج بار تکرار مورد شمارش قرار گرفت (۱۹).

۶- روش ایمنوفلورسنس: برای بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی IPCs در سلول‌های P_{19} تمایز یافته، از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد. بدین منظور EBهای کشت شده در ظروف ژلاتینه پس از پایان دوره تیمار، ۵ دقیقه با PBS (Phosphate buffered saline) ایمنوهیستوشیمی شستشو داده شدند. تثبیت نمونه‌ها با محلول ۴ درصد پارافرمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق صورت گرفت. شستشوی نمونه‌ها با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. محلول مسدود کننده حاوی ۱۰ درصد سرم نرمال بز

(مسدود کننده محل‌های اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی اولیه) و ۰/۳ درصد تریتون X-۱۰۰ محلول در PBS (نفوذپذیر کننده غشای سلول نسبت به آنتی‌بادی) به نمونه‌ها اضافه و ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با PBS، آنتی‌بادی اولیه ضد انسولین- پروانسولین (proinsulin + insulin, abcam, cat: ab۸۳۰۴-۵۰) و یا آنتی‌بادی اولیه ضد رسپتور بتای انسولین (receptor beta, abcam, cat: ab۸۳۰۴-۱۰۰) به آن‌ها افزوده شد و به مدت دو ساعت در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دوباره نمونه‌ها در محیط تاریک با PBS شسته گردید و آنتی‌بادی ثانویه (AntiIgG, Sigma, cat: F۹۱۳۷) جفت شده با FITC (Flurorescein isothiocyanate) به آن‌ها افزوده شد و دو ساعت در محیط مرطوب و تاریک با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در زیر میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

روش RT-PCR: RNA (Ribonucleic acid) کل سلول‌های P_{19} تیمار شده با عصاره گیاهی، از سلول‌های P_{19} و EB تیمار نشده استخراج شد. برای تبدیل RNA استخراج شده به cDNA از کیت EU-Fermentas استفاده گردید. cDNA حاصل شده طی واکنش زنجیری پلیمرازی (۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) تکثیر شد. اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

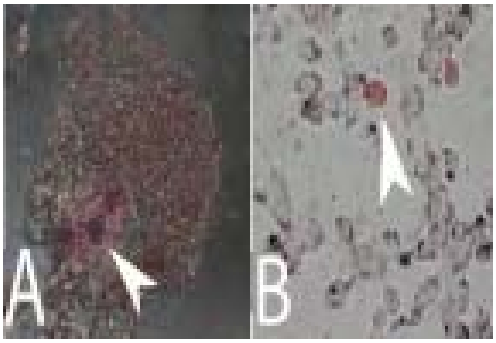
5′-CCT-TCC-CGT-GGA-TGA-AAT-CC-3′: Pdx-1F
Pdx-1R: 5′-GTC-AAG-TTC-AAC-ATC-ACT-GCC-3′

محصول واکنش PCR به ژل ۱ درصد آگارز منتقل و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید، تحت تأثیر اشعه فرابنفش قرار گرفت و از آن تصویربرداری شد (۲۱).

تحلیل آماری: مقادیر حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها آزمون χ^2 مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأیید هویت IPCs حاصل از تمایز سلول‌های P_{19} با رنگ‌آمیزی دیتیزون: دیتیزون عامل متصل شونده به فلز روی است که به صورت انتخابی سلول‌های بتای پانکراس را به رنگ قرمز درمی‌آورد (۲۰). در این پژوهش القای مرفولوژی IPCs در سلول‌های P_{19} تمایز یافته با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر FCE به کمک رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون اثبات شد (تصویر شماره ۱). سلول‌های چند ضلعی P_{19} تحت تأثیر عصاره گیاهی تغییر مرفولوژی دادند و حالت کروی پیدا کردند. این سلول‌ها طی دوره تمایز، تجمعات سلولی را ایجاد کردند. IPCs حاصل بعد از انجام رنگ‌آمیزی به صورت تجمعات سلولی قرمز رنگ مشاهده شدند (تصویر شماره ۱، قسمت A). در گروه EB تیمار نشده با عصاره توسط رنگ‌آمیزی دیتیزون تعداد کمی از سلول‌ها به رنگ قرمز درآمدند (تصویر شماره ۱، قسمت B). این امر نشان دهنده تمایز خود به خودی درصد کمی از سلول‌های P_{19} به IPCs بود.



تصویر شماره ۱: شناسایی IPCs (Insulin producing cells) با کمک رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون

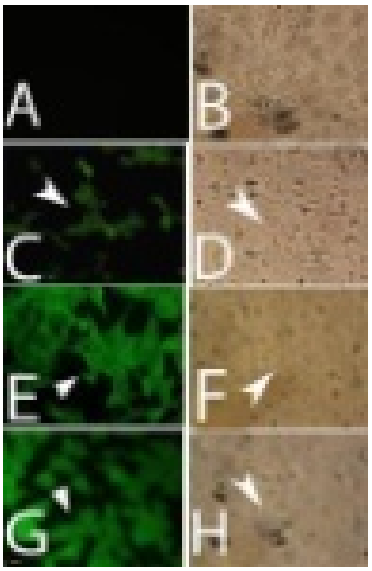
A: اثر مثبت FCE (Flavonoids of cichorium intybus L. Leaf Extract) بر القای فنوتیپ IPCs در سلول‌های بنیادی P_{19} (دسته‌جات سلولی تمایز یافته در واکنش به دیتیزون به رنگ قرمز درآمده‌اند)، B: سلول‌های دیتیزون مثبت پراکنده حاصل از تمایز خود به خودی سلول‌های P_{19} (IPCs توسط پیکان نشان داده شده است) (شکل‌ها با بزرگ‌نمایی X۴۰۰)

تعیین بهترین غلظت FCE جهت القای تمایز: نتایج حاصل از تحلیل آماری شمارش سلول‌های سفید و قرمز حاصل از رنگ‌آمیزی دیتیزون گروه‌های تیمار و شاهد نشان داد که درصد سلول‌های تمایز یافته دیتیزون مثبت در تمام گروه‌ها با

گروه شاهد منفی تفاوت معنی‌داری داشتند؛ بنابراین FCE در القای تمایز سلول‌های P_{19} به IPCs اثر مثبت دارد. بیشترین درصد IPCs مشتق از سلول‌های بنیادی P_{19} در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۲/۱ ± ۹۳/۳ درصد و سپس در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۵/۸ ± ۷۹/۴ درصد حاصل شد. افزایش غلظت عصاره به بیشتر از این حد (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سبب افزایش تعداد سلول‌های تمایز یافته نشد (۱۰/۹ ± ۵۲/۱ درصد). غلظت صفر FCE به عنوان گروه شاهد منفی در نظر گرفته شد (۳/۶ ± ۴/۲ درصد). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید.

بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول بتا در سلول‌های P_{19} تمایز یافته با روش ایمنوفلورسنس (تصویر شماره ۲): انسولین- پروانسولین و رسپتور بتای انسولین از جمله نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتای پانکراس هستند. سلول‌های P_{19} تمایز یافته با FCE به علت بیان نشانگرهای مذکور در زیر نور فلورسنت به رنگ سبز مشاهده شدند (تصویر شماره ۲، قسمت‌های G و E). تعداد معدودی از سلول‌های موجود در گروه EB تیمار نشده با عصاره گیاهی (شاهد منفی) به علت تمایز خود به خودی به IPCs در زیر نور فلورسنت به رنگ سبز درآمدند (تصویر شماره ۲، قسمت C). در این روش از سلول‌های P_{19} تمایز یافته با عصاره گیاهی که در معرض آنتی‌بادی اولیه ضد انسولین- پروانسولین قرار نگرفتند، به عنوان شاهد داخلی استفاده شد (تصویر شماره ۲، قسمت A).

ارزیابی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های P_{19} تمایز یافته با روش RT-PCR: در این مطالعه بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های P_{19}، EB تیمار نشده با عصاره و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی با کمک روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، قادر به بیان ژن Pdx-1 هستند (تصویر شماره ۳). در مورد بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های P_{19}، گروه شاهد منفی و EB تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، باندی مشاهده نشد. این امر نشان دهنده عدم توانایی این گروه‌های سلولی در بیان ژن Pdx-1 است. در این آزمایش از بافت پانکراس به عنوان شاهد مثبت ژن Pdx-1 و از نمونه‌های فاقد پرایمر و فاقد cDNA برای نشان دادن عملکرد صحیح پرایمر استفاده شد. همچنین بیان ژن خانگی B2M به عنوان شاهد داخلی مورد بررسی قرار گرفت.



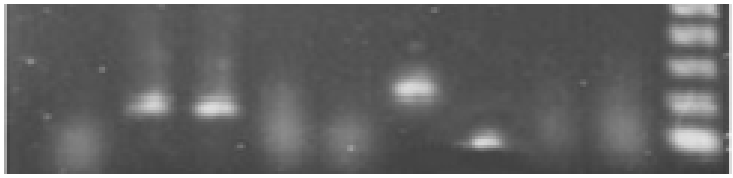
تصویر شماره ۲: ردیابی نشانگرهای اختصاصی IPCs (Insulin producing cells) در سلول‌های P_{19} تمایز یافته به روش ایمنوفلورسنس

A: تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول های P_{19} تمایز یافته با عصاره که توسط آنتی‌بادی اولیه تیمار نشده است (گروه شاهد داخلی)، C: سلول‌های بیان کننده نشانگر انسولین- پروانسولین حاصل از تمایز خود به خودی سلول‌های P_{19} (گروه شاهد منفی) در زیر نور فلورسنس، E: بیان نشانگر انسولین- پروانسولین در سلول های P_{19} تمایز یافته با عصاره، G: بیان رسپتور بتای انسولین در سلول‌های تمایز یافته با عصاره، B، D، F و H: به ترتیب تصویر نور مرئی از همان میدان دید در A، C، E و G هستند (سلول‌های بیان کننده نشانگرهای اختصاصی سلول بتا با پیکان نمایش داده شده است) (شکل‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰۰X)

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که FCE سبب القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به IPCs می‌شود و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مناسب‌ترین غلظت جهت القای تمایز سلولی بود. IPCs حاصل قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی انسولین- پروانسولین و رسپتور بتای انسولین بودند. همچنین این سلول‌ها ژن Pdx-1 را بیان کردند.

Pushparaj و همکاران در پژوهش خود فعالیت‌های ضد دیابتی و هیپولیپیدمیک عصاره اتانولی گیاه کاسنی در رت‌های



تصویر شماره ۳: بیان ژن Pdx-1 (Pancreatic duodenal homeobox-1) در سلول‌های $P_{۱۹}$ تمایز یافته با FCE (Flavonoids of cichorium intybus L. Leaf Extract)
(غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره قادر به القای بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های $P_{۱۹}$ هستند) (B-2M: ۹۸,Pdx-1:bp۱۹۸bp)

دیابتی شده با استرپتوزوتوسین را به اثبات رسانیدند (۲۲). در مطالعه دیگری که توسط Muthusamy و همکاران صورت گرفت، اثر ضد دیابتی کاسنی به ترکیب پلی‌فنلی تانن نسبت داده شد. این ترکیب فعال زیستی توانست از طریق مهار بیان ژن پروتئین تیروزین فسفاتاز بی یک جذب گلوکز خون را بدون القای تولید چربی از سلول‌های چربی ۳T۳-L۱ افزایش دهد (۲۳). فلاونوئیدها گروه دیگری از ترکیبات پلی‌فنلی با منشأ گیاهی هستند که خاصیت ضد دیابتی‌شان به اثبات رسیده است (۹). مطالعاتی در زمینه تأثیر فلاونوئیدها در اصلاح بیماری‌زایی دیابت در حیوانات دیابتی شده با دارو انجام شده است (۱۲-۱۰)، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر این ترکیبات فنلی گیاهی بر القای تمایز سلول‌های بنیادی به IPCs مورد بررسی قرار نگرفته است.

در پژوهش کنونی نشان داده شد که افزایش غلظت فلاونوئیدی عصاره از ۵۰ به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با افزایش تعداد سلول‌های تمایز یافته به IPCs همراه بود. تعداد سلول‌های تمایز یافته در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به حداکثر رسید. افزایش غلظت عصاره به بیش از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش تعداد سلول‌های تمایز یافته به IPCs شد. نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته توسط Elliott و همکاران در زمینه اثر وابسته به غلظت فلاونوئیدها بر روی سلول مطابقت دارد. Elliott و همکاران نشان دادند که در شرایط آزمایشگاهی، فلاونوئید جنیستئین با غلظت ۲۵ میکرومول بر لیتر قادر است آپوپتوز القا شده با سدیم فلوراید را در جزایر لانگرهانس انسان مهار کند؛ در حالی که در غلظت‌های بیش از ۲۵ میکرومول بر لیتر موجب القای آپوپتوز می‌شود (۲۴).

اگرچه فلاونوئیدها به طور عمده بر اساس خاصیت آنتی‌اکسیدانی‌شان عمل می‌کنند، اما آن‌ها می‌توانند از طریق تأثیرگذاری بر آبشارهای داخل سلولی و تنظیم بیان ژن نیز اثرات بیولوژیک خود را بر سلول‌ها اعمال کنند (۹). در پژوهش حاضر FCE با اثرگذاری بر بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های $P_{۱۹}$ موجب پیشبرد تمایز این سلول‌ها به سمت IPCs شده است. Pdx-1 تنظیم کننده اصلی تکوین پانکراس می‌باشد و در تمایز سلول‌های پیش‌ساز پانکراسی به سمت سلول‌های بتا نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۱). Nakajima-Nagata و همکاران با روش RT-PCR نشان دادند که با انتقال وکتورهای حامل ژن Pdx-1 به درون سلول‌های پیش‌ساز کبدی بالغ، mRNA این فاکتور در این سلول‌ها بیان شده، باعث تمایز این سلول‌ها به سمت IPCs می‌شود (۲۵). به دو دلیل احتمال دارد که FCE با فعال‌سازی مسیر ERK (Ectracellular signal-regulated kinase) موجب القای بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های $P_{۱۹}$ شده باشد. اول این‌که فلاونوئیدها برای القای تمایز سلولی به واسطه تحریک مسیر ERK به زمان زیادی نیاز دارند و دوم این‌که فعال‌سازی این مسیر توسط فلاونوئیدها به روش وابسته به غلظت صورت می‌گیرد (۱۳).

انسولین- پروانسولین و رسپتور بتای انسولین از جمله نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتا هستند که با روش ایمنوفلورسنس حضورشان در IPCs حاصل از این پژوهش به اثبات رسید. Brolen و همکاران نیز جهت اثبات بیان نشانگرهای سلول بتا (از جمله پروانسولین و پپتید C در IPCs حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان) از روش ایمنوفلورسنس استفاده کردند (۲۶).

به طور خلاصه می‌توان گفت که FCE قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی P_{19} به IPCs است. به منظور بررسی عملکرد IPCs به دست آمده از این پژوهش و استفاده در کارهای درمانی، پیوند این سلول‌ها به حیوانات مبتلا به دیابت و ارزیابی بهبود و طبیعی شدن سطح گلوکز خون در این مدل‌های آزمایشگاهی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت مالی پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه شهرکرد (به ریاست خانم دکتر بهناز صفار) انجام شده است. بدین وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

References

1. Santana A, Ensenat-Waser R, Arribas MI, Reig JA, Roche E. Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. J Cell Mol Med 2006; 10(4): 866-83.
2. 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): 211-7. (Persian).
3. MacPherson PA, McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells: A source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. Methods 1995; 7(3): 238-52.
4. Baharvand H, Kazemi Ashtiani S. Embryonic stem cell: concepts and potentials. Cell Journal 2005; 27(3): 178-93. (Persian).
5. Roche E, Jones J, Arribas MI, Leon-Quinto T, Soria B. Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. Bioorg Med Chem 2006; 14(19): 6466-74.
6. Ghannadi AR, Minaiyan M, Abed AR. Kasni (Cichorium intybus L.). J Islamic Iran Trad Med 2011; 1(4): 365-72. (Persian).
7. Shokrollahi M, Najafzadeh Varzi H, Razi Jalali MH, Hamidi Nejat H, Khajeh F. A comparison of the Nematocidal effects of hydro-alkolic extract of Chicory and albendazole in mouse (white Syrian mouse). Journal of Veterinary Microbiology 2010; 6(1): 61-8. (Persian).
8. Sareedenchai V, Zidorn C. Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. Biochemical Systematics and Ecology 2010; 38(5): 935-57.
9. Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardévol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. Compr Rev Food Sci F 2008; 7(4): 299-308.
10. Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, Lee MK. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. Diabetes Metab Res Rev 2008; 24(1): 74-81.
11. Han MK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. Exp Mol Med 2003; 35(2): 136-9.
12. Abd El-backy A. Quercetin protective action on oxidative stress, sorbitol, insulin resistance and â-cells function in experimental diabetic rats. Int J Pharm Stud Res 2011; 2(2): 11-8.
13. 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): 1144-55.
14. Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, Zhang JC, Yang MS, Yao XS. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from Epimedium koreanum Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. Phytomedicine 2008; 15(1-2): 55-61.
15. Wang ZJ, Zhang Q, Li TJ, Zhao XH. A possible molecular mechanism of two flavones and two flavonols on the induction of differentiation in a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33). J Med Plants Res 2011; 5(13): 2652-64.
16. Markham KR. Techniques of flavonoid identification. 3rd ed. New York, NY: Academic Press; 1982.
17. Rahman A. Foreword. Stud Nat Prod Chem 2005; 30(1): 1-10.
18. Fathi F, Torihi T, Mola SJ, Movahedin M, Sadeghizadeh M. Producing embryoid bodies from embryonal stem cells using silconized petri dishes. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2003; 8(2): 1-13. (Persian).
19. Mansouri-Bidekani A, Esmaeili F, Houshmand F, Hajisharifi Z. Evaluation of pdx-1 gene expression in insulin producing cells, derived from embryonal carcinoma stem cells. J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15(1): 91-102. (Persian).
20. 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): 284-92.
21. Soleimani Mehranjani M, Hashemi Tabar M, Momeni HR, Bahramzade S. Effect of metformin

on the Pdx-1 gene expression during development of mouse pancreas. Iran J Endocrinol Metab 2010; 12(3): 300-6. (Persian).
22. Pushparaj PN, Low HK, Manikandan J, Tan BK, Tan CH. Anti-diabetic effects of Cichorium intybus in streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2007; 111(2): 430-4.
23. Muthusamy VS, Anand S, Sangeetha KN, Sujatha S, Arun B, Lakshmi BS. Tannins present in Cichorium intybus enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. Chem Biol Interact 2008; 174(1): 69-78.
24. Elliott J, Scarpello JH, Morgan NG. Differential effects of genistein on apoptosis induced by fluoride and pertussis toxin in human and rat pancreatic islets and RINm5F cells. J Endocrinol 2002; 172(1): 137-43.
25. Nakajima-Nagata N, Sakurai T, Mitaka T, Katakai T, Yamato E, Miyazaki J, et al. In vitro induction of adult hepatic progenitor cells into insulin-producing cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 318(3): 625-30.
26. Brolen GK, Heins N, Edsbagge J, Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. Diabetes 2005; 54(10): 2867-74.