

دانشور

پزشکی

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

نویسندگان: فریبا اسماعیلی^۱، نواز خرازیان^۲، فریبا هوشمند^۳ و سمیه منصورزاده^{۴*}

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

۴. 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 لگومیناسه، توانایی دارد قند خون را کاهش دهد؛ اغلب این مطالعات بر تأثیر عصاره گیاه بر میزان گلوکز ناشتا متمرکز شده‌اند؛ تا به امروز، تحقیقی درخصوص ارزیابی توانایی این گیاه در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بتای پانکراس در شرایط آزمایشگاهی انجام نشده‌است. مطالعه حاضر به منظور بررسی آثار احتمالی تروفیک عصاره گیاه یونجه (MSE) بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به سلول‌های انسولین‌ساز (IPCs) انجام شده‌است.

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

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 مشاهده شد. سلول‌های تمایز یافته نسبت به سه آنتی‌بادی C - پپتید، انسولین - پروانسولین و رسپتور انسولین بتا پاسخ ایمنی دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که MSE به‌طور مؤثری توانست باعث القای تمایز MSCs به سلول‌های IPC شود. از آنجاکه سلول‌های MSC به‌طور گسترده در دسترس بوده، به راحتی کشت می‌شوند، ابزار آزمایشگاهی ارزشمندی را برای مطالعه تمایز سلول‌های بتای پانکراس فراهم می‌کنند.

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

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و دوم - شماره ۱۱۵
اسفند ۱۳۹۳

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

مقدمه

بیماری دیابت، مشتمل بر مجموعه‌ای از بیماری‌های مزمن بوده، از اختلال در متابولیسم گلوکز ناشی می‌شود. منشأ بروز بیماری دیابت نوع ۱، کاهش سطح انسولین پلازما 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 جلب کرده‌است. مطالعات اخیر نشان‌داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان به دست می‌آیند، نه تنها به تبارهای مزودرمی، بلکه به سایر تبارهای سلولی تمایز می‌یابند؛ بنابراین امکان تولید سلول‌های مولد انسولین از این سلول‌ها وجود دارد. براساس مطالعات پیشین، سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان می‌توانند به سلول‌های بالغ تمایز یافته‌ای تبدیل شوند که توانایی دارند، انسولین تولید کنند (۳)؛ به‌منظور تمایز این سلول‌ها می‌توان از محرک‌هایی مختلف استفاده کرد. عواملی گوناگون وجود دارند که با توجه به عملکردشان در تکوین طبیعی پانکراس استفاده می‌شوند (۴)؛ از جمله این عوامل، «عامل (فاکتور) رشد اپیدرمی، عامل رشد ترانسفورمینگ بتا، عامل رشد فیبروبلاستی اسیدی، عامل رشد شبه‌انسولینی و انکوستاتین» را می‌توان نام برد؛ این نکته که «در چه زمانی و با چه غلظتی می‌باید از این عوامل در فرایند تمایز استفاده کرد؟»، حایز اهمیت است (۵). تحقیق‌هایی محدود در خصوص دیابت نوع ۱ با استفاده از گیاهان دارویی در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌اند. مطالعات نشان می‌دهند که آلکالوئید گیاهی کنوفیلین، تمایز سلول‌های اندوکرین پانکراس نوزاد خوک را به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین القای کند (۶). عصاره متانولی برگ و کالوس گیاه *Gymnema sylvestre* L به‌طور قابل ملاحظه‌ای تولید سلول‌های بتا را

در موش‌های صحرایی دیابتی افزایش می‌دهد؛ عصاره این گیاه به احتمال می‌تواند به‌عنوان داروی گیاهی برای درمان دیابت قندی وابسته به انسولین به‌کار رود (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 قابل توجهی کاهش می‌دهد (۸)؛ به‌طوری‌که براساس باوری قدیمی، دم‌کرده برگ یونجه در شمال آفریقا در درمان دیابت نوع ۱، مورد استفاده قرار می‌گرفت (۹). عصاره متانولی یونجه حاوی فلاونوئید است؛ بررسی‌ها نشان می‌دهند، 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 توزیع شده‌اند. 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 پرداخته شده‌است؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت هشت تا دوازده روز با این عامل القایی تیمار شدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی دیتیزون، القای فنوتیپ سلول‌های تولیدکننده انسولین در سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با عصاره تأیید شد. با به‌کارگیری روش ایمنوفلورسنس نشان‌داده شد که سلول‌های تمایز یافته 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 انجام شد. برگ و گل گیاه از یکدیگر جداسازی و به‌صورت سایه خشک در دمای آزمایشگاه، خشک شد. برگ‌ها و گل‌های

پیتاژهای مکرر، سلول‌ها هموژنیزه و به فلاسک کشت منتقل شدند؛ فلاسک‌ها در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO₂ قرار گرفته، پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تعویض شد؛ به تدریج، طی پاساژهای بعدی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص شدند. به منظور 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 به مدت ده روز تیمار شدند.

اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی

در این پژوهش به‌منظور اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده، تمایز آنها به سلول‌های استخوانی انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان استخراج می‌شوند، به همراه سلول‌های فیروبلاست، سلول‌های خونی و سلول‌های بخش استرومای مغز استخوان هستند؛ طی [انجام] پاساژ دوم، بیشتر سلول‌های فیروبلاست که به همراه سلول‌های مزانشیمی هستند از محیط کشت جدای می‌شوند ولی باز هم، کلونی‌هایی از سلول‌های فیروبلاست باقی می‌مانند؛ سلول‌های فیروبلاست، توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی، چربی و سلول‌های دودمان مزودرمی را ندارند؛ بنابراین با تمایز دادن سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی و استخوان می‌توان آنها را از هم تفکیک کرد چراکه سلول‌های فیروبلاست در محیط تمایزی سلول‌های چربی یا استخوان از میان می‌روند و قابلیت تمایز به این سلول‌ها را ندارند.

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 تهیه شد؛ سپس به‌منظور جداسازی مخلوط عصاره و متانول از یکدیگر از دستگاه Rotary evaporator استفاده شد. 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 طولانی مدت، 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 استفاده شد. میزان جذب محلول‌های استاندارد کاتشین در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. با رسم منحنی استاندارد براساس میزان جذب محلول‌های کاتشین، غلظت عصاره به‌دست آمد؛ همچنین پس از به‌دست آوردن غلظت فلاونوئید، مقدار ۱۰۰ 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 ۳ ماهه استفاده شد. حیوان مورد نظر از مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه شد؛ این حیوان در حیوان‌خانه دانشگاه آزاد شهرکرد، تحت شرایط استاندارد نور، دما و تغذیه نگهداری می‌شود. 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 تخلیه شدند؛ پس از سانتریفیوژ در دور ۲۵۰۰ rpm و دورریختن مایع رویی با استفاده از محیط کشت تازه و

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

در پژوهش حاضر به منظور اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی استخراج شده، تمایز آنها به سلول‌های چربی انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی که از مغز استخوان استخراج می‌شوند، 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 حذف می‌شوند ولی باز هم، کلونی‌هایی از سلول‌های فیبروبلاست باقی می‌مانند؛ کلونی‌های باقی‌مانده، توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی را ندارند. سلول‌های فیبروبلاست با قرار گرفتن در محیط‌های تمایزی ویژه چربی و استخوان از میان می‌روند؛ بنابراین با این روش می‌توان ضمن از بین بردن کلونی‌های موجود فیبروبلاست، تراکمی بالا از سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل کرد.

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 تمایز یافتند، از دو روش بررسی «مورفولوژی و ایمنوفلورسنس» استفاده شد.

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 قرمز رنگ، نشان‌دهنده سلول‌هایی هستند که تحت تأثیر عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ یونجه به سلول‌های انسولین‌ساز، متمایز شده‌اند. ۵۰ میلی‌گرم پودر دیتیزون با ۵ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl Sigma, D2650)

(sulphoxide)، مخلوط شده، رنگ استوک به دست آمد. به منظور تهیه محلول کار دیتیزون ۱۰ میکرولیتر محلول استوک به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض رنگ قرار گرفتند؛ پس از شستشو با بافر HBSS (Hank's balanced salt solution)، سلول‌ها با میکروسکوپ، مشاهده و تصویربرداری شدند. شمارش سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی دیتیزون: پس از رنگ‌آمیزی دیتیزون، ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، روی لام نئوبار قرار گرفته، با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شد؛ سپس سلول‌های سفیدرنگ (سلول‌های تمایز نیافته) و سلول‌های قرمز رنگ (سلول‌های تمایز یافته با استفاده از القاگر عصاره یونجه) شمارش شدند؛ اعداد حاصل از شمارش در جداولی تنظیم و تجزیه و تحلیل آماری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

مقادیر به دست آمده به صورت \pm Standard Deviation Means گزارش شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و روش دانکن استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

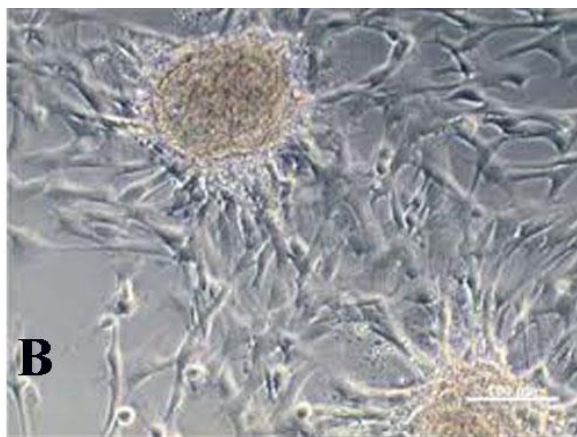
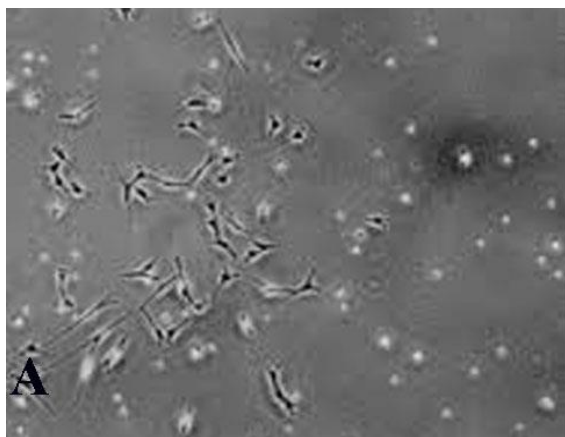
بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتا به روش ایمنوفلورسنس: برای بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های انسولین‌ساز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته با عصاره گیاهی از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد؛ به این منظور، سلول‌های کشت شده روی لامل پس از ده روز تیمار با عصاره، ۵ دقیقه با PBS (phosphate-buffered saline) ایمنوهیستوشیمی شستشوداده شدند. تثبیت نمونه‌ها با استفاده محلول ۴ درصد پارافمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق صورت گرفت. 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 قرار داده شد؛ پس از شستشوی نمونه‌ها، با

یافته‌ها

جداسازی و بررسی مورفولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

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

PBS، آنتی‌بادی اولیه ضد انسولین - پروانسولین (Sigma, ab8304-100) یا آنتی‌بادی اولیه ضد رسپتور بتای انسولین (Sigma, ab537-50) به آنها افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در محیط مرطوب و تاریک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی ثانویه (Sigma, F9137) جفت شده با FITC (fluorescein isothiocyanate) تیمار شدند. نمونه‌ها پس از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در زیر میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفتند. قابل اشاره است، در این تحقیق از سه آنتی‌بادی اولیه استفاده شد که برای دو آنتی‌بادی رسپتور انسولین و انسولین پروانسولین از آنتی‌بادی ثانویه FITC استفاده شد که رنگ سبز به وجود آمد اما برای آنتی‌بادی اولیه c - پپتید CY5 به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد که رنگ قرمز ایجاد کرد.



شکل ۱. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش

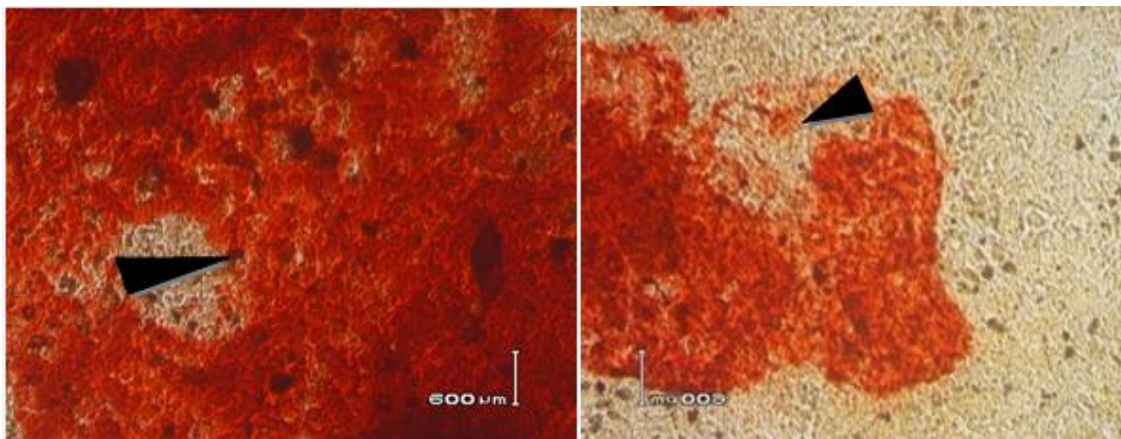
(A) در روزهای اول کشت سلول، سلول‌ها حالت منفرد دارند و (B) سلول‌های بنیادی استخراج شده با تراکم بالاتر، چهارده روز پس از کشت؛ این سلول‌ها کلونی تشکیل داده و مورفولوژی شبیه سلول‌های فیروبلاست پیدایمی کنند. بزرگ‌نمایی: ۱۰۰X A، ۴۰۰X B

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان

پاساژ ندارند، حذف کرد. پس از گذشت ده روز که تراکم سلولی افزایش یافت، سلول‌ها به پلیت شش خانه‌ای انتقال داده شدند. سلول‌ها طی مدت ۲۱ روز برای تمایز به سلول‌های استخوانی در معرض محیط کشت ویژه تمایزی قرار گرفتند؛ سپس، سلول‌های تمایز یافته رنگ‌آمیزی شدند و از آنها تصویربرداری شد (شکل ۲).

در تحقیق حاضر، سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان پس از دو هفته به تراکم بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیدند؛ پس از این مدت، پاساژ را انجام داده، به مدت ده روز به سلول‌ها اجازه داده شد که تراکمشان به اندازه ۸۰ درصد برسد. با انجام پاساژ می‌توان سلول‌های فیروبلاست را که توانایی تحمل

سلولی‌شان تغییر کرده، ترشح رسوبات کلسیمی را آغاز می‌کنند؛ با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، این ماتریکس سلولی به رنگ قرمز دیده می‌شود (شکل ۲ A).



شکل ۲. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استخوان سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوانی با رنگ‌آمیزی

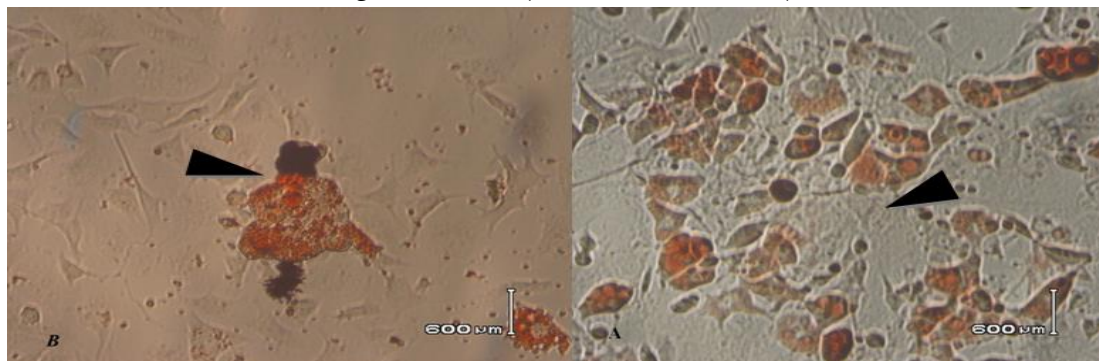
آلیزارین رد

رسوبات کلسیمی در این رنگ‌آمیزی به صورت توده قرمز رنگ مشخص شده‌اند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

تمایز به سلول‌های چربی در معرض محیط کشت ویژه تمایزی قرار گرفتند؛ سپس، سلول‌های تمایز یافته رنگ‌آمیزی شدند و از آنها تصویربرداری شد (شکل ۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی که در شرایط آدیپوژنیک قرار می‌گیرند، درون سیتوپلاسم سلول، واکوئل‌های چربی تشکیل می‌شوند؛ پس از مدت پانزده روز، تجمع واکوئل‌های چربی در سلول قابل رؤیت است. در رنگ‌آمیزی آیل رد، این واکوئل‌ها به رنگ قرمز دیده شدند که نشان‌دهنده تمایز به سمت سلول‌های چربی است (شکل ۳ A).

در این تحقیق، سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان، پس از دو هفته به تراکم بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیدند. پس از اینکه تراکمی بالا از سلول‌ها حاصل شد، پاساژ انجام شد و به مدت ده روز به سلول‌ها اجازه داده شد که به کف ظرف بچسبند و تراکمشان به اندازه ۸۰ درصد برسد. با انجام پاساژ، بسیاری از کلونی‌های تشکیل شده از فیروبلاست را می‌توان از محیط کشت حذف کرد؛ پس از گذشت ده روز که تراکم سلولی افزایش یافت، به پلیت شش‌خانه‌ای انتقال داده شدند؛ سلول‌ها طی مدت پانزده روز برای



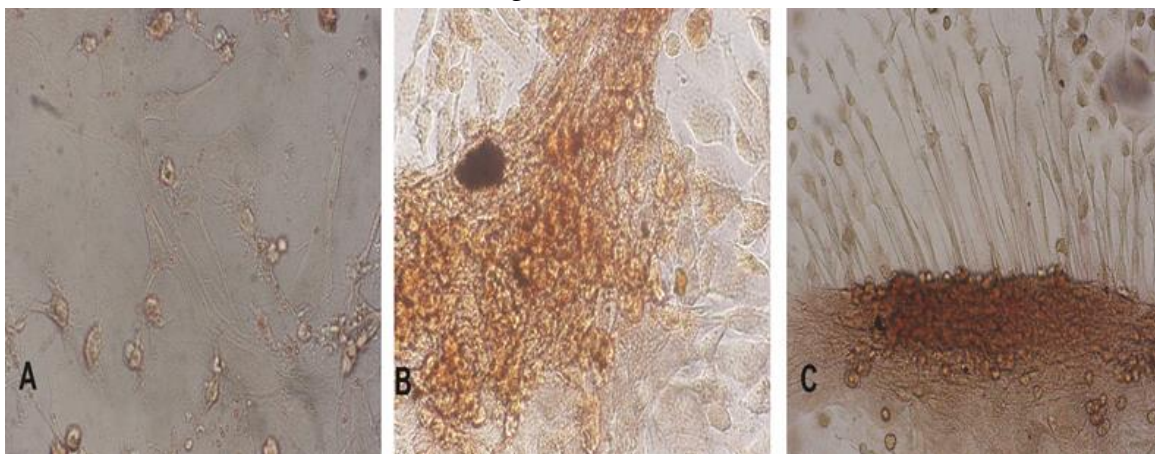
شکل ۳. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های چربی با رنگ‌آمیزی آیل رد

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

رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از رنگ‌آمیزی دیتیزون به رنگ قرمز درآمدند (شکل ۴ C,B). در گروه کنترل منفی، یعنی سلول‌هایی که با عصاره برگ و گل یونجه تیمار نشده بودند، نیز تعدادی معدود سلول قرمز وجود داشت که نشان‌دهنده تمایز خودبه‌خودی تعدادی از سلول‌ها به سلول‌های بتای پانکراس است (شکل ۴ A). همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، تعداد سلول‌های تمایز یافته که به رنگ قرمز درآمدند، در گروه تیمار شده با عصاره برگ و گل یونجه، به مراتب بیشتر از گروه کنترل است.

برای این منظور ابتدا به سلول‌های پاساژ دوم اجازه داده شد که به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد برسند. پس از هفت تا چهارده روز تیمار با عامل القایی عصاره برگ و گل یونجه، سلول‌های مزانشیمی تمایز یافتند؛ سپس این سلول‌ها تحت رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون قرار گرفتند. دیتیزون ماده‌ای متصل‌شونده به فلز روی است؛ مقدار این فلز در گرانول‌های محتوی انسولین در پانکراس، بسیار بالاست؛ به همین دلیل برای شناسایی اختصاصی بودن سلول‌های تولیدکننده انسولین از این رنگ‌آمیزی استفاده شد. سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ اختصاصی دیتیزون.

رنگ‌آمیزی دیتیزون گروه‌های تیمار و گروه کنترل (گروه تیمار نشده) با کمک لام نئوبار شمارش شدند؛ برای هر گروه، شمارش با پنج‌بار تکرار انجام گرفت؛ سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و روش دانکن، تفاوت میان گروه‌های مختلف بررسی شد و نتایج حاصل در جدول ۱ تنظیم شدند؛ با توجه به نتایج حاصل، درصد سلول‌های تمایز یافته 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 (۴۵/۸۱±۲/۹) به دست آمد. داده‌ها به صورت میانگین ± SEM هستند؛ در

(A) در گروه کنترل منفی، یعنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در معرض عصاره پانکراس قرار نگرفته‌اند و به تمایز خودبه‌خودی، دچار شده‌اند. تعداد کمی سلول دیتیزون مثبت به صورت پراکنده وجود دارد که پیکان‌ها نشانه این سلول‌ها هستند (X ۲۰۰)؛ (B) سلول‌های قرمز رنگ یا سلول‌های دیتیزون مثبت نشان‌دهنده سلول‌های تمایز یافته حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیم که تحت اثر القای عصاره برگ یونجه قرار گرفته‌اند (X ۲۰۰) و (C) سلول‌های قرمز رنگ یا سلول‌های دیتیزون مثبت نشان‌دهنده سلول‌های تمایز یافته حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیم که تحت اثر القای عصاره گل یونجه قرار گرفته‌اند (X ۲۰۰).

به منظور بررسی اثر القایی عصاره یونجه بر تمایز سلول‌های مزانشیمی، سلول‌های سفید و قرمز حاصل از

به یک میزان، باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آنها به سمت پانکراس می‌شود.

ایمنوفلورسنس

در این روش، به منظور بررسی بیان عوامل اختصاصی سلول‌های تولیدکننده انسولین، آنتی‌بادی‌های اولیه ضد نشانگر انسولین - پرو انسولین، C - پپتید و ضد نشانگر رسپتور بتای انسولین به طور جداگانه استفاده شدند. 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). به منظور رنگ‌آمیزی افتراقی، این سلول‌ها با هوخست رنگ‌آمیزی و هسته‌های آنها با رنگ آبی، مشخص شدند (شکل ۵ A).

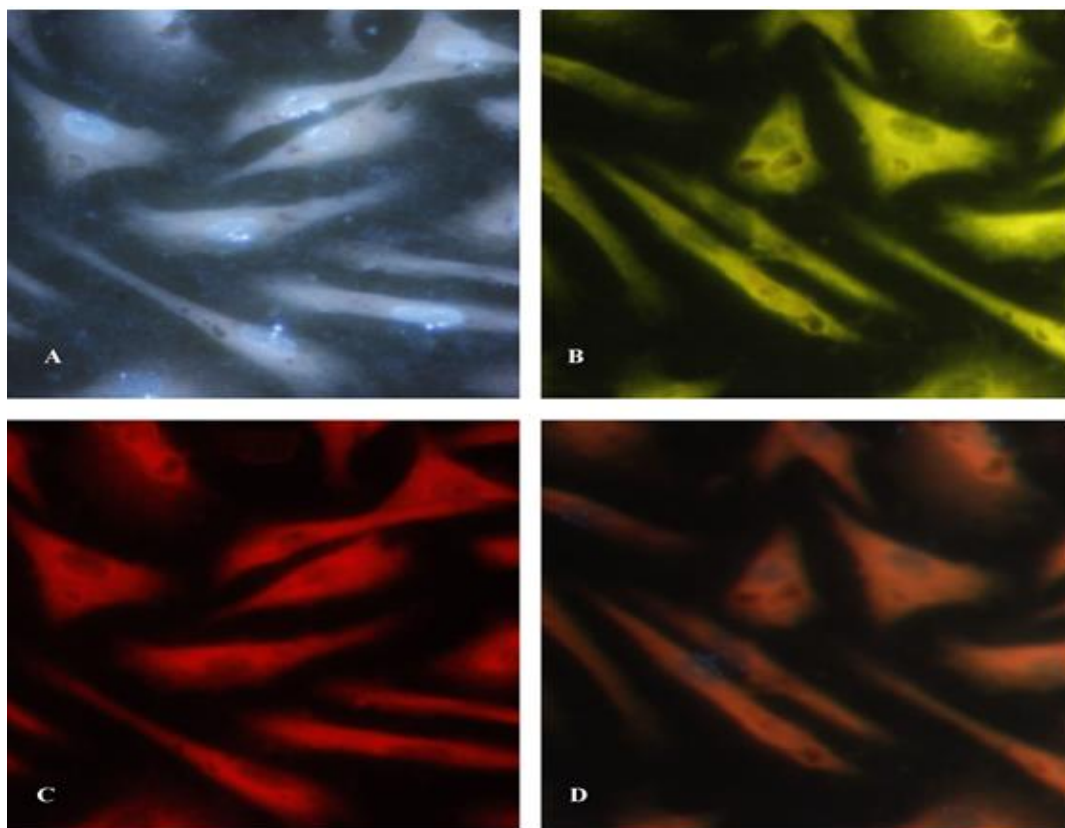
این آزمون آماری، سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. اثر عصاره برگ و گل گیاه یونجه بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های

انسولین‌ساز

گروه‌ها	درصد سلول‌های تمایز یافته
کنترل	$11/8 \pm 0/11$
برگ	$4/81 \pm 2/9$
گل	$28/3 \pm 4/8$

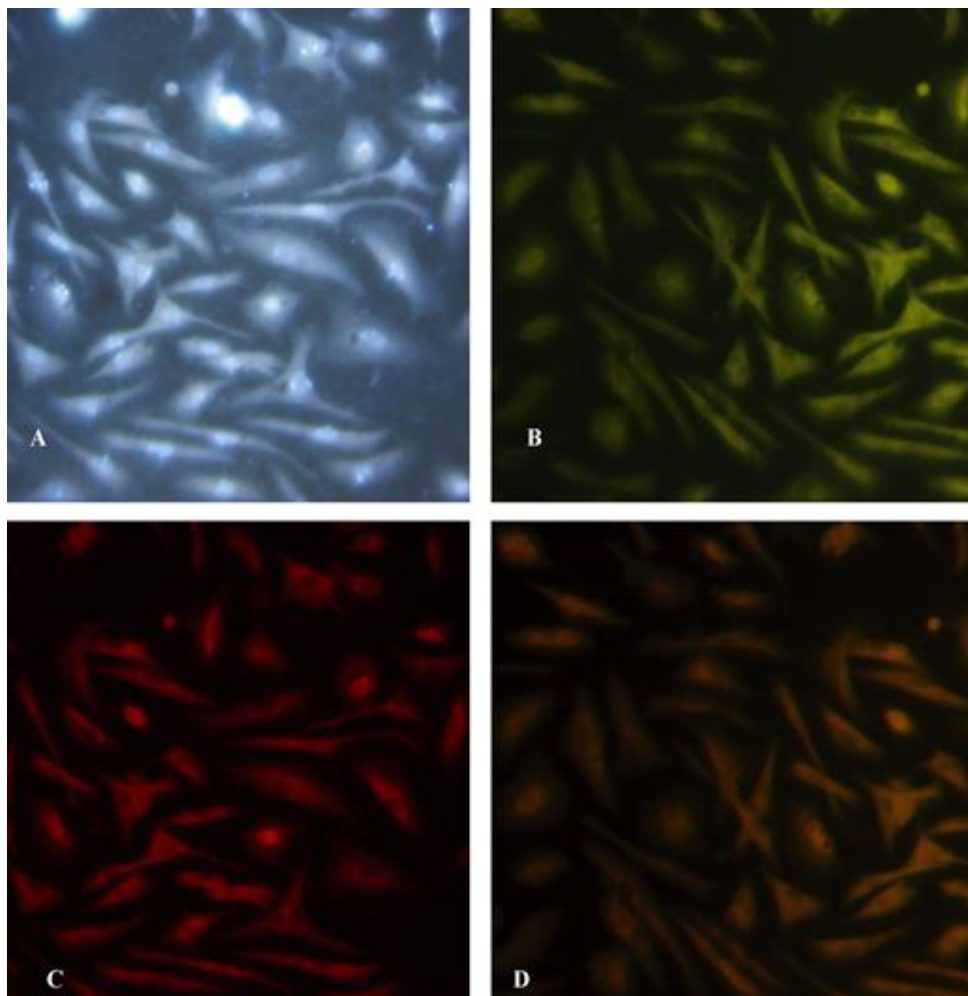
داده‌ها به صورت «میانگین \pm انحراف معیار» هستند و نشان می‌دهند که تفاوتی معنی‌دار ($P < 0.05$)، میان گل و برگ با گروه کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت داده شده بدون تأثیر عصاره یونجه) وجود دارد. ولی از لحاظ آماری، تفاوتی معنی‌دار، میان عصاره برگ با عصاره گل وجود ندارد و به طور تقریبی،



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

گل یونجه، قادر به بیان پروتئین رسپتور بتای انسولین (شکل ۶ B) و C- پپتید بودند (شکل ۶ C)؛ به منظور رنگ‌آمیزی افتراقی، این سلول‌ها با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی و هسته‌های آنها با رنگ آبی، مشخص شدند (شکل ۶ A).

A) سلول‌های مزانشیمی که با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی شده‌اند؛ هسته این سلول‌ها در این شکل به خوبی مشخص است؛ B) بیان آنتی‌بادی انسولین- پروانسولین و C) بیان آنتی‌بادی C- پپتید سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از اثر عصاره برگ و



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

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

بحث

تحقیق‌ها نشان داده‌اند که برخی از گیاهان دارویی، نقشی مهم در کنترل دیابت قندی دارند. تحقیق‌هایی محدود در خصوص درمان دیابت با استفاده از گیاهان دارویی در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌اند. مطالعات صورت گرفته روی آلکالوئید گیاهی کنوفیلین اثبات کرد که این آلکالوئید، تمایز سلول‌های اندوکرین پانکراس نوزاد خوک را به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین القامی کند (۱۳). عصاره متانولی برگ و کالوس گیاه *Gymnema sylvestre*، به‌طور قابل ملاحظه‌ای، تولید سلول‌های بتا رادر موش‌های صحرایی دیابتی افزایش می‌دهد و می‌تواند به‌طور بالقوه به‌عنوان داروی گیاهی برای درمان دیابت قندی وابسته به انسولین به‌کار رود (۱۴). تأثیر ترکیب‌های فعال زیستی استخراج شده 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 توزیع شده‌اند (۱۶). ایزوفلاون جنیستین^۱، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، سبب افزایش ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز در جزایر پانکراسی کشت شده موش می‌شود؛ درحالی‌که غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میکرومولار، ترشح انسولین را از جزایر پانکراسی موش مهار می‌کنند (۱۷). تیمار نهفته‌ای موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱، با فلاونوئیدهای جنیستین و دایدزئین^۲، هیپرگلیسمیا را توسط افزایش سطح انسولین پلازما مهار کرد. فلاونوئید اپی‌گالو کاتشین ژالات^۳، قادر است به‌واسطه مهار فعال‌سازی عامل (فاکتور) هسته‌ای-کاپا بی^۴، از مرگ سلولی القا شده با سیتوکین‌ها^۵ در سلول‌های بتای پانکراسی جدا شده از موش جلوگیری کند (۱۸).

دیابت نوع ۱ از جمله بیماری‌های دارای عوارض خطرناک در دنیا محسوب می‌شود؛ 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؛ با اینکه تزریق مداوم انسولین، باعث تنظیم قند خون افراد مبتلا می‌شود، باز هم، بیماری‌هایی که به دلیل کمبود انسولین در بدن اتفاق افتاده‌اند، درمان نشده، باقی می‌مانند. با پیشرفت روزمره علم، روش‌های درمانی جدیدی، مانند پیوند پانکراس و پیوند سلول‌های جزایر پانکراس برای این بیماری به‌دست آمده‌اند. با اینکه در ابتدا با پیوند زدن، دیگر به انسولین برون‌زاد نیاز نبود، 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 استفاده کرد (۱۰). دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است؛ این بیماری در نتیجه ناتوانی بدن در تولید یا مصرف انسولین پدید می‌آید (۱۱)؛ از طرف دیگر در هنگام عمل پیوند برای اینکه فرد مبتلا، دچار رد پیوند نشود، از داروهای سرکوب‌کننده ایمنی استفاده می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که می‌توان از سلول‌های بنیادی برای درمان دیابت نوع ۱ استفاده کرد چراکه این سلول‌ها توانایی بالقوه‌ای برای تمایز به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین دارند؛ انسولین، هورمونی پلی‌پپتیدی است که سلول‌های بتای پانکراس، آن را سنتز و ترشح می‌کنند. وظیفه اصلی انسولین، کاهش قند خون است؛ بالا بودن قند خون در درازمدت، آسیب‌هایی جبران‌ناپذیر به دستگاه عصبی، چشم، کلیه و سیستم قلب و عروق وارد می‌کند (۱۲).

¹ - Genistein

² - Daidzein

³ - Epigallocatechin gallate: EGCG

⁴ - Nuclear factor- kappa B: NF-κB

⁵ - Cytokines

وجود سلول‌های انسولین‌ساز، وجود فلز روی به‌عنوان یکی از معیارهای مناسب در نظر گرفته شده‌است. چن^۱ و همکارانش، رنگ‌آمیزی دیتیزون را چندبار تکرار کردند. در سلول‌هایی که با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تیمارشده بودند، تعداد سلول‌های قرمز رنگ اندکی دیده می‌شد (۲۰)؛ به ترتیب هر چه بر میزان عصاره افزوده شد، تعداد سلول‌های قرمز رنگ بیشتری دیده شدند. بررسی‌های ایمنوفلورسنس که به منظور ردیابی بیان پروتئین انسولین و پرو انسولین، C - پپتید و پروتئین گیرنده بتای انسولین انجام گرفتند، نشان دادند 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 دیده نشد. پروانسولین، پلی‌پپتیدی ۸۶ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی ۹۳۹۰ است که در سلول‌های بتای پانکراس سنتز می‌شود. پروانسولین، مولکول پیش‌ساز انسولین است که با جدا شدن یک قطعه ۲۳ اسید آمینه‌ای از مولکول پره پروانسولین در شبکه آندوپلاسمی زبر سلول‌های بتا پانکراس ایجاد می‌شود. 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، به صورت ساختارهای هگزامری در گرانول‌های ترشحی سلول بتا ذخیره می‌شوند؛ این گرانول‌ها در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز خون، محتویات خود را به درون خون آزاد می‌کنند (۲۱). فعال‌سازی گیرنده انسولین در سلول‌های بتا، باعث القای فسفوریلاسیون گیرنده بتا و فسفوریلاسیون تیروزین پروتئین سوپسترای گیرنده انسولین-۱^۲ می‌شود؛ سپس پروتئین‌های پیام‌رسان دیگر نیز فعال می‌شوند؛ فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز، نمونه‌ای از این پروتئین پیام‌رسان است که فعالیت آن،

بررسی‌های صورت گرفته روی عصاره اتانولی یونجه نشان دادند که اگر عصاره اتانولی این گیاه را به مدت چهارده روز به موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ تزریق کنند، میزان گلوکز و لیپید خون در آنها کاهش می‌یابد اما هیچ تغییری در سطح انسولین ایجاد نمی‌شود؛ بنابراین، عصاره اتانولی این گیاه با اثرگذاری منفی روی فعالیت آنزیم گلوکز ۶-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 یافت می‌شود. تانن موجود در عصاره متانولی برگ‌های یونجه از طریق مهار بیان ژن پروتئین تیروزین فسفاتاز یک بی، جذب گلوکز خون را بدون القا کردن تولید چربی در سلول‌های چربی 3T3-L1 افزایش می‌دهد.

به‌منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های انسولین‌ساز در این پژوهش از عصاره گیاهی برگ و گل یونجه به‌عنوان عامل القاگر استفاده شده‌است. فنوتیپ سلول‌های انسولین‌ساز مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت اثر عامل القاگر عصاره برگ و گل یونجه به وسیله رنگ‌آمیزی دیتیزون اثبات شد. روی فلزی است که در سلول‌های بتای پانکراس، بیشتر از هر بافت دیگری در بدن یافت می‌شود؛ این فلز که سوپسترای رنگ دیتیزون است، روی گیرنده‌های سلولی بتای پانکراس قرار دارد (۱۹). رنگ‌آمیزی دیتیزون به صورت انتخابی، باعث قرمز رنگ شدن سلول‌های بتای پانکراس می‌شود. پیش از این نیز، آکیرا و همکارانش، مورفولوژی توصیف شده سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از این پژوهش را گزارش کرده بودند (۲۰). دیتیزون، ماده‌ای متصل‌شونده به فلز روی است که به دلیل محتوی بالای این فلز در گرانول‌های محتوی انسولین سلول‌های بتا، باعث قرمز رنگ شدن این سلول‌ها می‌شود؛ این رنگ‌آمیزی، روشی آسان برای شناسایی اختصاصی سلول‌های تولیدکننده انسولین از سلول‌های بنیادی تمایز نیافته است؛ در واقع، در این روش برای پی بردن به

¹ - Chen

² - IRS-1: insulin receptor substra-1

تبادل و زیکول‌ها را به عنوان اثر متابولیکی خاص انسولین تنظیم می‌کند (۲۲).

هورمون انسولین با اتصال به گیرنده‌های هتروتترامری موجود در غشای سلول‌های هدف، آثار متابولیکی خود را اعمال می‌کند. گیرنده انسولین از دو زیرواحد آلفا و دو زیرواحد بتا تشکیل شده است. اتصال انسولین به زیرواحدهای آلفا، موجب اتوفسفریلاسیون زیرواحدهای بتا و به راه‌انداختن آبشار فسفریلاسیون داخل سلولی می‌شود. بیشترین مقدار پروانسولین به انسولین و پپتید C تبدیل می‌شود. انسولین و پپتید C به میزانی برابر به درون خون ترشح می‌شوند. شکل فعال و عملکردی این مولکول، انسولین است که در اختیار سلول‌های بدن به خصوص سلول‌های کبدی قرار می‌گیرد؛ در این پژوهش، همچنین، وجود رسپتور بتای انسولین روی سلول‌های تمایز یافته بررسی شد (۲۳). رسپتور انسولین، نوعی گیرنده تیروزین کیناز است (۲۴) که در بافت پانکراس، بیشتر از سایر بافت‌ها دیده می‌شود؛ بنابراین، ردیابی آن به منظور بررسی نشانگرهای اختصاصی در سلول‌های تمایز یافته، اهمیتی بسزا دارد (۲۵). در این پژوهش، بیان نشانگرهای انسولین- پروانسولین و رسپتور بتای انسولین در سلول‌های تمایز یافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ و گل یونجه با استفاده از روش ایمونوفلورسنس تأیید شد؛ در این بررسی از آنتی‌بادی‌های اولیه ضد انسولین - پروانسولین، C - پپتید و ضد رسپتور بتای انسولین استفاده شد. /ومزوا/ و همکارانش به منظور تمایز سلول‌های کارسینومای آسینار پانکراس به سلول‌های تولیدکننده انسولین از ترکیب گیاهی دیگری به نام کنوفیلین استفاده کردند؛ 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 ایمونوفلورسنس، حضور انسولین در سلول‌های تمایز یافته با کنوفیلین اثبات شد (۲۶)؛

پیش از این، ایوانا، برونل^۱، سان^۲ و زالزمن از زمره محققانی بودند که با استفاده از روش ایمونوفلورسنس، توانستند حضور نشانگرهای سلول بتا از جمله پروانسولین، انسولین، پپتید C و عوامل رونویسی Pdx-1 و Nkx6.1 را در سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی به اثبات برسانند. برونل و همکارانش با استفاده از روش ایمونوفلورسنس، بیان نشانگرهای سلول بتا از جمله پروانسولین، پپتید C و عوامل رونویسی Pdx-1 و Hnf3β را در سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان اثبات کردند. آنها با پیوند زدن سلول‌های بنیادی جنینی انسان به پانکراس موش، توانستند سلول‌های انسولین‌ساز تولید کنند (۲۷). دانیل و همکارانش با روش ایمونوسیتوشیمی، توانستند پروتئین‌های Pdx-1 و انسولین را در سلول‌های تمایز یافته تحت اثر محلول ترشح شده توسط سلول‌های بتای در حال تکوین تشخیص دهند. سان و همکارانش به کمک روش ایمونوفلورسنس، بیان انسولین و پپتید C را در سلول‌های انسولین‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی بند ناف ردیابی کردند (۲۸).

یکی از سازوکارهایی که ماده القاگر از طریق آن، اثر خود را بر تمایز سلول‌های بنیادی اعمال می‌کند، تغییر در بیان برخی ژن‌های بخش اندوکرین و اگزوکرین پانکراس است؛ تغییر بیان ژن توسط فلاونوئیدها بیش از این نیز گزارش شده است. با توجه به اهمیت عامل (فاکتور) Pdx-1 در تکوین سلول‌های بتا و بخش اگزوکرین پانکراس، پژوهش‌هایی در زمینه این عامل انجام شده‌اند؛ 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

گلوکوکیناز می شود.

سپاس و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مالی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد (به ریاست خانم دکتر بهناز صفار) انجام شده است؛ بدین وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری کردند، قدردانی می شود.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می رسد که کشت و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های تولیدکننده انسولین تحت اثر عصاره برگ و گل یونجه، بیشتری بازدهی دارد. برای بررسی عملکرد سلول های تمایز یافته و استفاده آنها به عنوان روش درمانی، می توان این سلول ها را به حیوان های مدل دیابتی پیوند زد و سپس، بهبود و طبیعی شدن سطح گلوکز خون را مورد بررسی قرارداد.

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 differentiation 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, Malgorzata, 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, Ziyat 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.

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 antilipolysis in rat adipocytes. studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem*. 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, Ogata T, Kojima I, Koyano T, Kowithayakorn T, Pang H, and Kam T. Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003; 57: 341-350.
27. Brolen G, Heins N, Edsbacke 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.

Evaluation of differentiation induction of mesenchymal stem cells into pancreatic beta cells by methanolic extract of *Medicago sativa* L.

Fariba Esmaeili¹, Navaz Kharazian², Fariba Houshmand³, Somayeh Mansourzadeh^{4*}

1. Department of Biology, School of Basic Sciences, Esfehan University, Esfehan, Iran.
2. Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Physiology, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
4. Research Institute of Biotechnology, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

* E-mail: mansooradehs@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: β cell replacement therapy by pancreatic islet transplantation has become a promising treatment for type 1 diabetes. *Medicago sativa* L (Lucerne) from leguminosae family is known to exhibit hypoglycaemic activity both in animal and human studies. Most of these studies were concentrated on the effects of plant extracts on fasting glucose levels. Until now no researches have been carried out to evaluate the potential of this plant on *in vitro* differentiation of stem cells into pancreatic β cells. The present study was done to examine the possibility of trophic effects of *Medicago sativa* L. extract (MSE) on differentiation of insulin-producing cells (IPCs) from mesenchymal stem cells (MSCs).

Materials and Methods: Mouse MSCs were isolated and cultured as monolayers. The cells allowed becoming confluent and their identification was confirmed by adipogenic and osteogenic induction tests. In order to induce differentiation of MSCs into IPCs, given concentration of MSE was added to culture medium. Dithizone (DTZ) staining was used to detect IPCs derived from MSCs *in vitro*. DTZ-positive cells were counted and statistically analyzed using SPSS. Pancreatic β cell-specific proteins were determined by immunofluorescence.

Results: MSE treatment had dramatic effects on differentiation of MSC cells into IPCs. Morphological studies using DTZ documented crimson red cell clusters similar to islet. The differentiated cells were immunoreactive for proinsulin, insulin, C-peptide and insulin receptor beta.

Conclusion: The results showed that MSE could efficiently induce IPCs differentiation of MSCs. Since, MSC cells are widely available and easily cultured; they would provide a valuable experimental tool for studying pancreatic β cell differentiation.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Insulin-producing cells, Pancreatic β cell differentiation, Insulin-proinsulin, C-peptide