

تمایز سلول‌های آندودرم قطعی از سلول‌های پرتوان القاشده انسانی با استفاده سیگنالینگ مولکولی

الهام حویزی^{۱*} (M.Sc)، محمد نیونی^۱ (Ph.D)، محمد معصومی^۲ (Ph.D)، کاظم پریور^۱ (Ph.D)

۱- دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی

۲- پژوهشگاه ملی ژنتیک و بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی حیوانات آبری

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر توانایی جای‌گزین ساختن سلول‌های تخریب‌شده بتای تولیدکننده انسولین به‌وسیله سلول‌های جدید تولیدکننده انسولین برای درمان مناطق آسیب‌دیده در بیماری دیابت یک پتانسیل درمانی قابل قبول محسوب می‌شود. نظریه تولید سلول‌های القاشده انسانی از سلول‌های بیماران دیابتی و تمایز آن‌ها به سلول‌های تولیدکننده انسولین، دریچه جدیدی از امید برای به کار بردن این سلول‌ها در درمان بیماری دیابت بدون نگرانی از رد پیوند توسط سیستم ایمنی و مشکلات اخلاقی باز کرده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های پرتوان القاشده انسانی (hiPS) از سلول‌های استرومایی چشم مشتق شده و سپس به مدت ۵ روز در ظروف نجسب کشت تا اجسام جنینی (EBs) تشکیل و سپس با استفاده از Activin A و Wnt3a به سلول‌های آندودرم قطعی تمایز داده شدند.

یافته‌ها: بیان مارکرهای آندودرمی FoxA2 و Sox17 در سطح mRNA با استفاده از qRT-PCR بررسی و بیان این مارکرها در سطح پروتیین با رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی تأیید گشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های آندودرم قطعی می‌توانند تحت تیمار Activein A و Wnt3a از سلول‌های hiPS تولید شده و هم‌چنین می‌توانند به عنوان پیش‌سازهایی برای درمان بیماری‌های کبدی و دیابت به کار روند.

واژه‌های کلیدی: آندودرم، اکتیوین‌ها، تمایز سلولی

مقدمه

امروزه بیماری‌های وابسته به اندام‌های آندودرمی میلیون‌ها نفر را در کشور ما درگیر نموده‌اند [۱، ۲]. برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های هر یک از این اندام‌های آندودرمی (پانکراس، کبد، شش، تیروئید و...) می‌بایست از مرحله آندودرم قطعی بگذریم. آندودرم قطعی (Definitive endoderm) در آمینون داران در زمان گاسترولاسیون به وجود می‌آید [۳، ۴]. امروزه تلاش‌های

فراوانی برای معرفی پروتوکول‌های کارآمد در تمایز به آندودرم قطعی انجام گرفته است. Amour و هم‌کارانش نشان دادند که سلول‌های آندودرم قطعی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند به آندودرم لوله گوارش جلویی، آندودرم پانکراسی، پیش‌سازهای اندوکرینی و سرانجام به سلول‌های اندوکرین تولیدکننده هورمون تمایز یابند [۵].

لقای اولیه آندودرم و مزودرم با مکانیسم‌های مشابه‌ای ایجاد می‌شود و سپس فاکتورها و برهم‌کنش‌های سلولی

این مقصود مورد استفاده قرار گیرد نشان‌دهنده ضرورت انجام این مهم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های **hiPS**. سلول‌های پرتوان القا شده انسانی که توسط ژن‌های القاء‌کننده پرتوانی شامل Oct4, Sox2, Klf2 و c-Myc با استفاده از سیستم لنتی ویروس‌ها تولید شدند (تهیه شده در مرکز تحقیقاتی بن‌یاخته) به صورت معمول بر روی سلول‌های فیروبلاست موشی که به عنوان یک لایه سلولی تغذیه‌کننده (MEF) (Mouse Embryonic Fibroblast) محسوب می‌شوند. سلول‌های MEF برای کشت سلول‌های پرتوان القا شده مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های MEF فاکتورهای مورد نیاز برای رشد و حفظ پرتوانی سلول‌های پرتوان القا شده را ترشح می‌کنند. لایه تغذیه‌کننده جمعیتی از سلول‌های MEF می‌باشد که به واسطه مایتوما یسین C غیر فعال شده‌اند. سلول‌های MEF از بانک سلولی مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته تهیه گردید. در زمان مورد نیاز فلاسک‌های حاوی MEF با تراکم حدود ۷۰-۸۰٪ به مدت ۲ ساعت در غلظت ۱۰ مایتوما یسین تیمار شده و پس از با PBS شستشو و آماده گردیدند. سپس سلول‌های hiPS در محیط DMM/F12 (Gibco-آمریکا) حاوی ۱۰٪ (SR) Knock Out Serum (Gibco-آمریکا)، ۵٪ (Replacement Gibco-آمریکا)، ۵٪ (FBS) fetal bovine serum، ال-گلوتامین با غلظت ۲ mM (Gibco-آمریکا)، بتامراکاپتواتانول با غلظت ۱/۱ mM (Gibco-آمریکا)، اسیدهای آمینه‌های ضروری با غلظت ۱ mM (Sigma-آمریکا)، پنی‌سیلین ۱٪ (Gibco-آمریکا) و bFGF (Gibco-آمریکا) با غلظت ۱۰ ng/ml در فلاسک کشت داده شدند. محیط کشت سلولی به صورت روزانه تعویض و معمولاً بعد از ۸ روز با استفاده از کلان‌ناز نوع چهار (Gibco-آمریکا) با غلظت ۱ mg/ml پاساژ داده شدند. به منظور نگهداری سلول‌های پرتوان القا شده انسانی این سلول‌ها در دوره‌های معینی (هر هفت روز) پاساژ داده شدند. کلنی‌ها معمولاً در روز هفتم یعنی وقتی که قطر آن‌ها به حدود

باعث تنظیم تولید آندودرم و مزودرم می‌شود که مهم‌ترین سیگنال موثر در این فرایند Activin A می‌باشد [۶-۸]. در سال ۲۰۰۸ Kroon و همکارانش و در سال ۲۰۱۲ Schulz و همکارانش در طی پروتوکل تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های بتای پانکراسی موفق به تولید سلول‌های آندودرم قطعی با استفاده از Activin A و Wnt3a شدند [۹، ۱۰]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۳ Engert و همکارانش تایید کردند که مسیر سیگنالینگ Wnt3a به واسطه تنظیم بیان ژن Sox17 در تشکیل و تمایز سلول‌های آندودرم قطعی ضروری است [۱۱]. برای تولید سلول‌های آندودرم قطعی از گذشته تا به امروز از منابع سلولی مختلفی استفاده شده که هر کدام مشکلات خاصی به همراه داشته‌اند [۱۲، ۱۳]، یکی از جدیدترین منابع سلولی که امروزه به دلیل مزیت‌های فراوان مطرح است سلول‌های پرتوان القا شده انسانی می‌باشند. سلول‌های hiPS بر اساس توان تمایزی خود سلول‌هایی پرتوان (pluripotent) می‌باشند که به طور بالقوه قابلیت تمایز به غالب یا همه سلول‌های تشکیل‌دهنده بدن را دارا می‌باشند [۱۴، ۱۵]. استفاده از این سلول‌ها از این جهت مورد توجه می‌باشد که با دست داشتن سلول‌های بالغ فرد بیمار، با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آن‌ها می‌توان سلول بنیادی به دست آورد و با تمایز این سلول‌ها می‌توان برای سلول درمانی همان فرد بیمار، بدون نگرانی از مسئله رد پیوند استفاده کرد [۱۶-۲۳].

هدف از انجام این تحقیق تولید با بازده بالای سلول‌های آندودرم قطعی از سلول‌های hiPS، به عنوان یک منبع جدید سلولی، با استفاده از غلظت‌های مناسبی از Activin A و Wnt3a می‌باشد که در آینده می‌تواند به عنوان پیش‌سازهایی برای تولید بافت‌های مشتق شده از آندودرم مخصوصاً سلول‌های بتای انسولین به منظور سلول درمانی در بیماران دیابتی و سلول‌های کبدی برای درمان بیماری‌های کبدی به کار رود و از آن‌جایی که سلول درمانی امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های درمانی مطرح است، بدیهی است بررسی و یافتن هر روش یا منبع سلولی جدیدی که بتواند برای نیل به

Human Sox17 1:20 (Polyclonal Goat IgG, R&D, AF1924, USA), Human FoxA2 1:500 (Polyclonal Rabbit IgG, Millipore, AB4125, USA) قرار گرفتند. در

مرحله بعد سلول‌ها با محلول PBS شستشو و سپس به مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی‌بادی‌های ثانویه شامل Alexa fluor 488 donkey anti-goat (Gibco, A-11058, 1:200) و Alexa fluor 594 donkey anti-rabbit (Gibco, A-21207, 1:200) قرار گرفتند و بعد از شستشو، برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها، با رنگ DAPI به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. برای کمی‌سازی نتایج، ابتدا از ۵ میدان تصادفی از چاهک‌ها رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنس عکس‌برداری شد. سپس تعداد هسته‌های رنگ‌شده شمارش گردید و بعد تعداد سلول‌های رنگ‌شده شمارش شد. در نهایت میانگین تعداد سلول‌های رنگ‌شده نسبت به میانگین هسته به دست آمد و به صورت درصد بیان گردید.

استخراج RNA و انجام qRT-PCR. الگوی بیان mRNA ژن‌های مختلف درگیر در تکوین آندودرم قطعی با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA سلول‌ها با استفاده از QIAzol لیز شدند و برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription Kit (ساخت شرکت سیناژن، ژاپن) استفاده شد برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با ۱۰ میکرولیتر از Power SYBER Green master mix (ساخت شرکت سیناژن، ژاپن) و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) مخلوط گشت. Ct هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار StepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن HPRT انجام گرفت و هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

بررسی‌های آماری. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver.12) و آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey به صورت (Mean±SE) مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گرفت و تفاوت‌های با $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

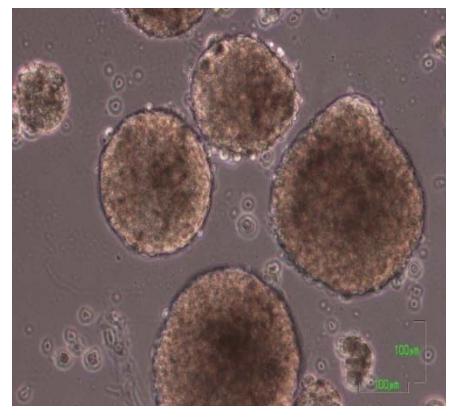
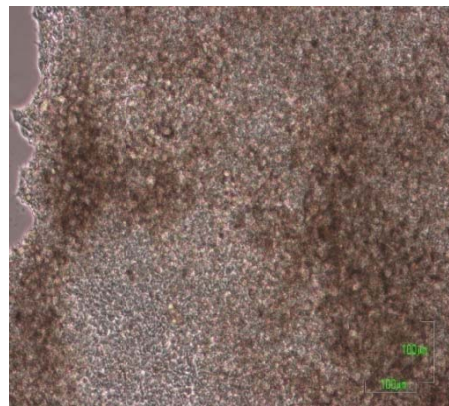
۲-۱/۵ میلی‌متر رسید پاساژ داده می‌شدند، البته اگر وضعیت کلنی‌ها خوب بود در روز ششم پاساژ و برعکس اگر کوچک بودند روز هشتم پاساژ داده می‌شدند. معمولاً پاساژ به صورت ۱ به ۳ انجام شد.

تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی. بعد از این‌که حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد سلول‌ها پاساژ و از سلول‌های MEF جدا شده و حدود 5×10^4 cells/cm² سلول در ظروف شش‌خانه نجسب به مدت ۲ تا ۵ روز هم‌راه با محیط کشت کامل قرار داده شد تا اجسام جنینی (EBs) تشکیل گردد سپس سلول‌ها با محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ SR، ۵٪ FBS، ال-گلوتامین با غلظت ۲ mM، بتامرکاپتوتانول با غلظت ۱/۱ mM، اسیدهای آمینه‌های ضروری با غلظت ۱ mM و پنی‌سیلین ۱٪ در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای پوشش داده شده با ماتریزل ۱٪ قرار داده شدند و ۲۴ ساعت بعد این محیط با محیط کشت تمایزی DMEM/F12 حاوی ۲/۰٪ SR، ال-گلوتامین با غلظت ۲ mM، بتامرکاپتوتانول با غلظت ۱/۱ mM، اسیدهای آمینه‌های ضروری با غلظت ۱ mM، پنی‌سیلین ۱٪ و Activin A (Stemgent-آمریکا) با غلظت ۱۰۰ ng/ml و Wnt3a (Stemgent-آمریکا) با غلظت ۲۵ ng/ml جای‌گزین شده بعد از دو روز محیط کشت تعویض و سلول‌ها در ادامه به مدت ۴ روز در مجاورت Activin A با غلظت ۱۰۰ ng/ml قرار داده شدند.

بررسی ایمونوفلوروسنت. یک هفته بعد از تیمار و تمایز، سلول‌های تمایز یافته و نمونه کنترل (اجسام جنینی که به مدت ۷ روز در محیط کشت فاقد فاکتورهای تمایزی کشت داده شد به عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد) با پارافرمالدهید ۴٪ (PFA, Sigma-Aldrich) به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند سپس با PBS شستشو و به‌وسیله ۰/۱٪ (TX-100 in PBS (TBST) (Merck-آلمان) نفوذپذیر و سپس به مدت ۱ ساعت در محلول بلوکینگ (شامل ۱٪ PBS/BSA + ۵٪ Goat serum قرار داده شدند سپس به مدت ۱۲ ساعت در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه شامل

نتایج

توان تمایزی سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که Activin A و Wnt3a با غلظت‌های معین سبب تمایز سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های آندودرم قطعی می‌شود. در تحقیق حاضر برای بررسی توان تمایزی سلول‌های hiPS با کارایی بالا، اجسام جنینی حاصل از کشت سوسپانسیون (شکل ۱) در پلیت‌های پوشیده شده با ماتریزل قرار داده و در مجاورت محیط تمایزی حاوی Activin A و Wnt3a به مدت یک هفته تیمار شدند.



شکل ۱. الف - مورفولوژی اجسام جنینی حاصل از سلول‌های تمایز نیافته hiPS با بزرگنمایی ۱۰X

درصد کمی فاکتورهای رونویسی بیان شده در سلول‌های کشت داده شده، تعداد آنتی‌ژن‌های مثبت، در ۲۰ زمینه تصادفی در تصاویر مربوط به بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی شمارش و نمودار آن رسم گردید (شکل ۳). درصد بیان Foxa2+، Sox17+ در نمونه‌های تیمار شده با Wnt3a/Activin A به ترتیب در حدود ۵ و ۸ برابر نسبت به نمونه‌های کنترل بیش‌تر بوده است، که نشان‌دهنده افزایش بیان فاکتورهای رونویسی اختصاصی آندودرم قطعی یعنی Sox17 و Foxa2 در سطح پروتیین می‌باشد (شکل ۲).

شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس برای مارکرهای آندودرم قطعی شامل SOX17 و FOXA2 ۷ روز بعد از تیمار سلول‌های hiPS با استفاده از فاکتورهای Activin A/Wnt3a که نشان‌دهنده بیان این مارکرهای آندودرمی در مقایسه به حالت کنترل می‌باشد. رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت گروه‌های تیمار شده، برای پروتیین‌های Sox17 (سبز رنگ) و FOXA2 (قرمز رنگ) می‌باشد. هسته سلول‌ها توسط DAPI به رنگ آبی رنگ آمیزی شده‌اند با بزرگنمایی ۱۰X (Scale bar: 100μm)

بررسی بیان mRNA مارکرهای آندودرمی در سلول‌های تمایزیافته با استفاده از qRT-PCR. بیان mRNA ویژه سلول‌های آندودرم قطعی شامل Sox17 و FoxA2 در روز هفتم بعد از تمایز در سلول‌های تمایزیافته ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است بیان مارکرهای آندودرمی در سلول‌های تمایزیافته در محیط کشت تمایزی به

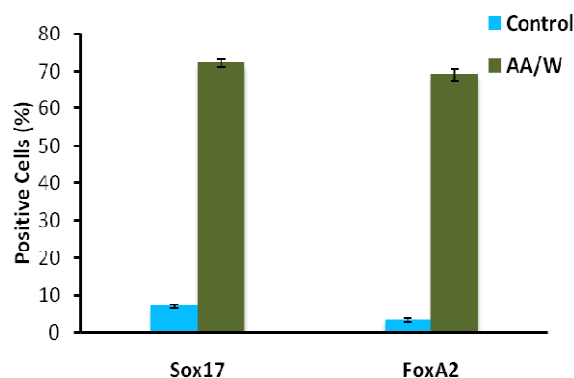
برای تعیین تمایز سلول‌های آندودرم قطعی از اجسام جنینی حاصل از سلول‌های hiPS، بیان مارکرهای آندودرمی شامل FoxA2، Sox17 بررسی شد. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های آندودرمی تمایزیافته برای هر دو ژن در روز هفتم بعد از تمایز مثبت ارزیابی شد (شکل ۲).

بحث و نتیجه گیری

ما در تحقیق حاضر توان تمایزی سلول‌های hiPS را به سلول‌های آندودرم قطعی با استفاده از سیگنالینگ Activin A و Wnt3a مورد بررسی قرار دادیم. نتایج ایمونوسیتوشیمی نشان‌دهنده بیان مارکرهای آندودرم قطعی شامل Sox17 و FoxA2 بوده که در مقایسه با نمونه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین بیان این مارکرهای آندودرمی در سطح mRNA با استفاده از روش qRT-PCR بررسی شد که نتایج حاصل از آن تاییدکننده افزایش بیان ژن‌های Sox17 و FoxA2 در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. امروزه سلول درمانی امیدهای فراوانی را برای درمان انواع بیماری‌ها ایجاد نموده است. تاکنون از منابع مختلفی از سلول‌ها بنیادی یا پروژنیاتور برای سلول درمانی در مدل‌های حیوانی استفاده شده است. اما هر کدام محدودیت‌هایی را داشته‌اند. با ظهور بحث تولید سلول‌های بنیادی پرتوان (iPSCs) از سلول‌های تمایز یافته بالغ موشی توسط Yamanaka (۲۰۰۶) دریچه جدیدی از امید برای به کار بردن سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها بدون نگرانی از رد پیوند توسط سیستم ایمنی باز شده است [۱۶]. در سال ۲۰۰۷ برای اولین بار سلول‌های iPS از سلول‌های بالغ انسانی به دست آمد. در ژوئن ۲۰۰۷ چندین گروه تحقیقاتی در دانشگاه‌های معتبر دنیا به صورت جداگانه و موفقیت‌آمیزی reprogramming سلول‌های فیبروبلاست موشی را به سلول‌های iPS نشان دادند. این سلول‌ها اغلب به وسیله وکتورهای رتروویروسی با چهار فاکتور Sox2, Oct4, Klf و c-Myc به وجود آمدند و بعد از تزریق این سلول‌ها به بلاستوسیسست موش‌های کایمریک (chimeric) تولید شد [۱۴, ۲۴, ۲۵].

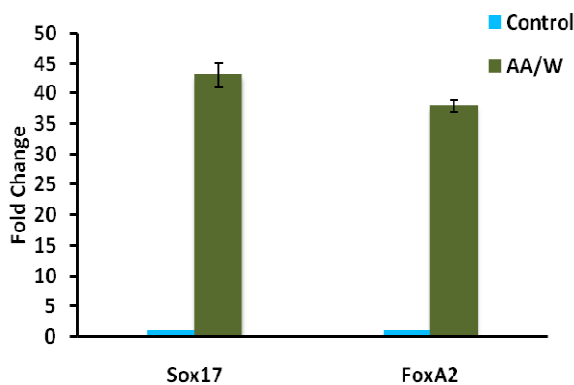
این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی جنینی توان تمایز به تمام سلول‌های بدن یک موجود را دارند و استفاده از این سلول‌ها به علت امکان تهیه آن‌ها از بدن فرد بیمار و در نتیجه عدم دفع پیوند و عدم وجود مشکلات اخلاقی به سرعت گسترش یافته است و مطالعات زیادی برای تمایز سلول‌های iPS به انواع مختلف سلول‌ها، از جمله سلول‌های بتا،

طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است که نشان‌دهنده اثرگذاری قابل توجه استفاده فاکتورهای تمایزی بر سلول‌های hiPS در طی مسیر تمایزی بوده است.



شکل ۳. شمارش درصد کمی بیان مارکرهای آندودرم قطعی شامل SOX17 و FOXA2 روز ۷ بعد از تیمار با Activin A/Wnt3a با رنگ آمیزی ایمونوفلوروسانس (*P<0.05, ***P<0.001).

در این مطالعه بیان mRNA ژن‌های Sox17 و FoxA2 در سلول‌های hiPS تمایز نیافته بسیار ناچیز و قابل چشم‌پوشی گزارش شد (شکل ۴).



شکل ۳. آنالیز بیان ژن‌های آندودرم قطعی مشتق شده از سلول‌های hiPS کشت داده شده در پلیت‌های پوشیده شده با ماتریزل با روش Real-time quantitative PCR (Q-PCR) شامل SOX17 و FOXA2 را در مقایسه با نمونه کنترل ۷ روز بعد از تیمار با Activin A/Wnt3a نشان می‌دهد. میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به میزان HPRT نرمال شده است و سپس نسبت میزان بیان ژن در سلول‌های hiPS گزارش گردیده است. در این آزمایش سلول‌های hiPS تیمار نشده به مدت ۷ روز بدون فاکتور تمایزی کشت داده شده و به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده اند. علامت * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (p<0.05) در مقایسه با تمام گروه‌های دیگر است (n=3).

هیپاتوسیت‌ها، سلول‌های عصبی و قلبی تا به امروز گزارش گردیده است [۲۶-۲۹].

در این مطالعه ما برای آغاز مسیر تمایزی بر تشکیل اجسام جنینی از سلول‌های iPS تاکید داشتیم. تشکیل اجسام جنینی به دلیل این‌که سبب افزایش تمایز به سلول‌های مختلف می‌گردد و هم‌چنین به دلیل تقلید از تخصص‌یابی لایه‌های جنینی در طی جنین‌زایی دارای اهمیت است [۳۱،۳۰].

پیش‌رفت‌های اساسی در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی به مشتقات آندودرمی که بر اساس تحقیقات بیولوژی تکوینی به‌دست آمده روشن ساخته که تمایز به آندودرم قطعی اولین و مهم‌ترین مرحله در تکوین اندام‌های آندودرمی از جمله پانکراس، کبد، شش‌ها، روده و تیموس می‌باشد [۳۲،۱۸،۹،۶،۲]. در سال ۲۰۰۶ در آمریکا Amour و هم‌کارانش با استفاده از فاکتور Activin موفق به تمایز سلول‌های جنینی انسانی به سلول‌های آندودرم قطعی گشتند سپس این سلول‌های پیش‌ساز را به سلول‌های بتای پانکراسی تمایز دادند [۷].

در طول مسیرهای تمایزی، برای بهبود بخشیدن به روند تمایز استفاده از انواع فاکتورهای تمایزی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها استفاده از سیگنالینگ Activin A و Wnt3a می‌باشند که توان تمایزی این فاکتورها در بسیاری از مطالعات مورد تایید قرار گرفته است. در طی سال‌های اخیر محقق هم‌واره به دنبال یافتن فاکتورهای مختلف تمایزی با کارایی بالا و صرفه اقتصادی بوده‌اند. تخریب جای‌گاه فعال هر دوی wingless و wnt یا مسیرهای سیگنالینگ TGF- β از تشکیل خط اولیه و به دنبال آن اشتقاق مزودرم و آندودرم قطعی در موش جلوگیری می‌کند [۳۲،۹،۶]. Nodal، عضوی از خانواده‌ی بزرگ TGF- β ، برای تخصص‌یابی دودمان‌های زاینده در طول گاسترولاسیون از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Smad که از طریق اتصال Nodal، به رسپتورش اتفاق می‌افتد ضروری و لازم شناخته شده است. آندودرم قطعی در حضور سطوح بالایی از سیگنالینگ Nodal ساخته شده و تخصص می‌یابد و در حالی

که سطوح پایین سیگنالینگ Nodal سبب تخصص‌یابی مزودرم می‌شود [۸].

پروتیین Nodal به عنوان یک منبع برای فعالیت‌های بیولوژیکی در دسترس نیست اما Activin A عضو دیگری از سوپر خانواده TGF- β ، می‌تواند برای اهداف مورد نظر استفاده گردد زیرا Activin A با Nodal آنالوگ است و می‌تواند به رسپتورهای Nodal به صورت یک‌سان متصل شود. یکی از پیش‌رفت‌های عمده در زمینه تولید آندودرم از سلول بنیادی از این کشف ایجاد شده که لیگاند Activin A از خانواده TGF- β با فسفوریله کردن Smad 2 و Smad 3 می‌تواند عیناً در مسیر پیام‌رسانی Nodal را در سلول‌های بنیادی جنینی به راه انداخته و موجب تولید آندودرم قطعی از سلول‌های بنیادی جنینی موشی و انسانی گردد. بنابراین تاثیر قاطع مسیر پیام‌رسانی TGF- β در تولید آندودرم در *in vitro* تأیید شده است [۳۴،۳۳،۲۱].

مسیر پیام‌رسانی Wnt یکی دیگر از مسیرهایی است که مشخص شده است تحریک آن موجب افزایش میزان تمایز آندودرم می‌گردد. اتصال Wnt به گیرنده سطحی‌اش که frizzled نام دارد باعث فعال شدن پروتئینی به نام dishevelled می‌گردد. این پروتئین با مهار پروتئین گلیکوژن سنتازکیناز β -3 (GSK-3 β) موجب حرکت بتاکاتین به هسته گردیده که در آن‌جا به عنوان یک کمک فعال‌کننده رونویسی عمل می‌کند و موجب بیان ژن‌های مربوط به تمایز می‌گردد [۳۵،۸،۴].

در این تحقیق برای اولین بار نشان داده شد که سلول‌های hiPS در شرایط کشت بر ماتریزل و با استفاده از پروتوکل تمایزی Activin A و Wnt3a می‌توانند به سلول‌های آندودرم قطعی با کارایی بالا تمایز یابند. پس می‌توان از این سلول‌ها به عنوان منبعی جدید، قابل دسترس و جای‌گزینی برای سلول‌های بنیادی جنینی بدون نگرانی از مسئله رد پیوند و مشکلات اخلاقی در تحقیقات بعدی استفاده کرد. هم‌چنین سلول‌های آندودرم تولیدشده با کارایی بالا می‌توانند به عنوان پیش‌سازی مناسب برای تمایز به سلول‌های پانکراسی و

pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2012; 7: e37004.

[11] Engert S, Burtcher I, Liao WP, Dulev S, Schotta G, Lickert H. Wnt/beta-catenin signalling regulates Sox17 expression and is essential for organizer and endoderm formation in the mouse. *Development*. 2013; 140: 3128-3138.

[12] Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; 85: 635-678.

[13] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 91-116.

[14] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.

[15] Noguchi H. Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes. *World J Stem Cells* 2009; 1: 36-42.

[16] Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009; 460: 49-52.

[17] Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, Zhou XY, Lin G, Lu GX. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 737-749.

[18] Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454: 646-650.

[19] Ghasemi-Mobarakeh L, Morshed M, Karbalaie K, Fesharaki MA, Nematollahi M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. The thickness of electrospun poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds influences cell proliferation. *Int J Artif Organs* 2009; 32: 150-158.

[20] Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 15768-15773.

[21] Hosoya M, Kunisada Y, Kurisaki A, Asashima M. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. *Int J Dev Biol* 2012; 56: 313-323.

[22] Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 2009; 19: 1233-1242.

[23] Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M, Baharvand H. Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS One* 2011; 6: e27925.

[24] Ohmine S, Squillace KA, Hartjes KA, Deeds MC, Armstrong AS, Thatava T, et al. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. *Ageing (Albany NY)* 2012; 4: 60-73.

[25] Christodoulou C, Longmire TA, Shen SS, Bourdon A, Sommer CA, Gadue P, et al. Mouse ES and iPS cells can form similar definitive endoderm despite differences in imprinted genes. *J Clin Invest* 2011; 121: 2313-2325.

[26] Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 98: 379-386.

[27] Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials* 2011; 32: 5615-5624.

[28] Chayosumrit M, Tuch B, Sidhu K. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. *Biomaterials* 2010; 31: 505-514.

[29] Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 2008; 22: 3435-3448.

[30] Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mater Sci Eng: C* 2010; 30: 1204-1210.

[31] Hosoya M. Preparation of pancreatic beta-cells from human iPS cells with small molecules. *Islets* 2012; 4: 249-252.

[32] Jiang W, Sui X, Zhang D, Liu M, Ding M, Shi Y, Deng H. CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 609-617.

[33] Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-

هیپاتویستی در جهت سلول درمانی برای بیماری دیابت و بیماری‌های کبدی محسوب گردند. این تحقیق نیز مانند هر تحقیق دانشجویی دیگر دارای کاستی‌هایی بوده که به علت محدودیت زمان و بودجه می‌باشد در ادامه این تحقیق می‌توان از سایر روش‌ها از جمله وسترن بلات و یا بررسی با سایر روش‌ها برای تایید بیش‌تر سلول‌های تمایز یافته استفاده کرد و در پایان این تحقیق پیشنهاد می‌کنیم که می‌توان از سلول‌های آندودرمی تولید شده به عنوان پیش‌سازی مناسب برای تمایز به سلول‌های پانکراسی و هیپاتوسیستی استفاده کرد و سلول‌های تمایز یافته را در شرایط کشت *in vivo* مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از مرکز ستاد سلول‌های بنیادی و دانشگاه علوم پزشکی تهران بواسطه حمایت‌هایشان برای انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

- [1] Bi D, Chen FG, Zhang WJ, Zhou GD, Cui L, Liu W, Cao Y. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 46-52.
- [2] Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 483-493.
- [3] Sherwood RI, Jitianu C, Cleaver O, Shaywitz DA, Lamenza JO, Chen AE, et al. Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm. *Dev Biol* 2007; 304: 541-555.
- [4] Hansson M, Olesen DR, Peterslund JM, Engberg N, Kahn M, Winzi M, et al. A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2009; 330: 286-304.
- [5] McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, et al. Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 2007; 25: 29-38.
- [6] D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1534-1541.
- [7] D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-1401.
- [8] Mfopou JK, Chen B, Matezel I, Sermon K, Bouwens L. Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells. *Gastroenterology* 2010; 138: 2233-2245.
- [9] Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 443-452.
- [10] Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, et al. A scalable system for production of functional

during mouse definitive endoderm differentiation revealed by microRNA profiling. PLoS One 2011; 6: e27965.

[35] Payne C, King J, Hay D. The role of activin/nodal and Wnt signaling in endoderm formation. Vitam Horm 2011; 85: 207-216.

producing cells from human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res 2012; 8: 274-284.

[34] Fu S, Fei Q, Jiang H, Chuai S, Shi S, Xiong W, et al. Involvement of histone acetylation of Sox17 and Foxa2 promoters

Derivation of definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells using signaling molecules

Elham Hoveizi (M.Sc)^{*1}, Mohammad Nabiuni (Ph.D)¹, Mohammad Massumi (Ph.D)², Kazem Parivar (Ph.D)¹

1 – Dept. of Biology, Biological Science Faculty, Kharazmi University (TMU), Tehran, Iran

2 - National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Animal and Marine Biotechnology, Tehran, Iran

(Received: 13 May 2013; Accepted: 8 Sep 2013)

Introduction: In recent years, the idea of being able to replace the destruction of insulin-producing beta cells of the pancreas by introducing new cells to repair the damaged areas has become an accepted potential treatment for Diabetes mellitus. The idea to generate pluripotent stem (iPS) cells specific from diabetic patient and differentiate to insulin-producing cells has opened a new window to using of iPS cells as new source for cell therapy of diabetes without being worried about the immunological rejection or ethical issues.

Materials and Methods: In the present study, iPS cells were directly generated from the human conjunctive-stromal cells and they were subjected to embryoid body formation for 5 days and differentiated to definitive endoderm cells using Activin A and Wnt3a.

Results: Differentiated cells were subjected to qRT-PCR using primers for FoxA2 and Sox17 genes as marker of definitive endoderm.

Conclusion: To confirm the result in the level of protein the immunocytochemistry will be undertaken. In conclusion the result of this study can clarify the effect of Activein A and Wnt3a in definitive endoderm derivation of iPS and will utilize these cells as precursors for cell therapy for hepatic and diabetes disease.

Keywords: Endoderm, Activins, Cell Differentiation

Corresponding author: Fax: +98 21 88848940 Tel: +98 9163447408
e.hoveizi@yahoo.com

How to cite this article:

Hoveizi E, Nabiuni M, Massumi M, Parivar K. Derivation of definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells using signaling molecules. *koomesh*. 2014; 15 (2) :212-219
URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-2004-1&slc_lang=en&sid=1