

بررسی اثر آگونیست β -آدرنرژیکی ایزوپروترونول بر بیان $miR-23a$ و $miR-886-3p$ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

هما زمانی^۱، دکتر سعید کاویانی جبلی^۲، دکتر امیر آتشی^۳، فاطمه پرهیزکار^۱

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه هماتولوژی kavianis@modares.ac.ir
دریافت: ۹۳/۳/۱۳ پذیرش: ۹۳/۶/۸

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون در مطالعات مختلفی به بررسی موبیلیزاسیون سلول‌های بنیادی خونساز به‌منظور پیوند و اهمیت سیگنال‌های β -آدرنرژیکی در القای این فرآیند، پرداخته شده است. با این وجود، اطلاعات کمی درباره‌ی نحوه‌ی اثر این سیگنال‌ها در موبیلیزاسیون سلول‌های بنیادی خونساز، موجود است. کموکاین $SDF-1$ که توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان تولید می‌گردد، در روند موبیلیزاسیون سلول‌های بنیادی خونساز، نقش کلیدی ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده که $miR-23a$ و $miR-886-3p$ در تنظیم بیان $SDF-1$ در سلول‌های مذکور، موثر هستند. در این تحقیق به‌منظور بررسی نقش $miR-23a$ و $miR-886-3p$ در فرآیند موبیلیزاسیون، میزان بیان کمی هر دو $miRNA$ مذکور در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با آگونیست β -آدرنرژیکی ایزوپروترونول، مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان جداسازی و کشت شده و پس از تایید فلوسیتومتری، تحت تیمار پیوسته با ۱۰۰ میکرومولار ایزوپروترونول قرار گرفتند. استخراج $Total RNA$ در ساعات ۱۲ و ۴۸ تیمار و همچنین از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده به‌عنوان کنترل، انجام گرفت. بیان کمی $miR-23a$ و $miR-886-3p$ با روش $Quantitative Reverse Transcriptase PCR$ سنجیده شد.

یافته‌ها: بیان $miR-886-3p$ در ساعات ۱۲ و ۴۸ تیمار افزایش داشت که در هر دو حالت، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). بیان $miR-23a$ نیز در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپروترونول در ساعت ۱۲ تیمار نسبت به حالت کنترل کاهش یافته و سپس در ساعت ۴۸ پس از تیمار، افزایشی معنی‌دار را نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: ایزوپروترونول بیان $miR-886-3p$ را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان، القا می‌کند. $miR-23a$ نیز علیرغم کاهش اولیه، تحت اثر القایی ایزوپروترونول قرار گرفته و لذا هر دو $miRNA$ مذکور می‌توانند، از عوامل دخیل در موبیلیزاسیون باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، $miR-886-3p$ و $miR-23a$ - ایزوپروترونول

مقدمه

مغز استخوان و همچنین بسیاری از ختلالات خودایمنی و ژنتیکی محسوب می‌شود (۱-۳). امروزه وجود HSC علاوه

پیوند Hematopoietic Stem Cell (HSC) روش درمانی مهمی برای انواع لوسمی و سندروم‌های نارسایی

۱- کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای تخصصی هماتولوژی، استادیار دانشگاه تربیت مدرس

بر مغز استخوان، درخون محیطی نیز به اثبات رسیده و با در نظر گرفتن امکان بهره‌گیری از این سلول‌ها، افق تازه‌ای در بحث پیوند پیش‌روی دانشمندان قرار گرفته است (۴ و ۵). در واقع با اینکه جایگاه اصلی HSC در بالغین، مغز استخوان است ولی این سلول‌ها قادرند در فرآیندی که با عنوان موبیلیزاسیون شناخته می‌شود، از مغز استخوان به خون مهاجرت نمایند (۶). به سبب سخت و تهاجمی بودن جداسازی مستقیم این سلول‌ها از مغز استخوان، ترجیح بر استفاده از سلول‌های خون محیطی برای پیوند می‌باشد و سعی در گسترش روش‌هایی است که بتوان HSC مغز استخوان را با قدرت بیشتری وارد خون محیطی کرد (۷ و ۸). موبیلیزاسیون سلول‌های $CD34^+$ می‌تواند با بهره‌گیری از دوزهای بالای داروهای شیمی‌درمانی و یا استفاده از G-CSF تقویت شود (۹). در مقالات متعددی به بررسی عوامل مختلف دخیل در موبیلیزاسیون پرداخته شده و در این میان به نقش پراهمیت سیستم عصبی در این فرآیند اشاره گردیده است (۱۰-۱۲). مطالعات عمده در این زمینه با کشف اثرات تنظیمی سیستم عصبی سمپاتیک در خروج HSC از مغز استخوان، از طریق سیگنالینگ نوراپی نفرین، مهار عملکرد استئوبلاست‌ها و کاهش بیان SDF-1، در شرایط معمول فیزیولوژیک و همچنین متعاقب به‌کارگیری G-CSF، آغاز گردید (۱۳). نوروترانسمیترهای کاتکول آمینی در همراهی با سایتوکاین‌های میلوئیدی، مستقیماً مهاجرت و توسعه‌ی HSC انسانی و به‌علاوه، تکثیر و موبیلیزاسیون سلول‌های پیش ساز موشی را *In Vivo* تنظیم می‌کنند و چنین اثراتی را از طریق گیرنده‌های آدرنژیکی مربوط به ویژه انواع β ، که بر سلول‌های مختلف وجود دارند، اعمال می‌نمایند (۱۴ و ۱۵). ایزوپروترونول یک آگونیست β -آدرنژیکی غیر انتخابی است که اثرات احتمالی آن و سایر آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های β -آدرنژیکی بر موبیلیزاسیون و بیان SDF-1 در موش‌ها، پیش‌تر مورد پژوهش قرار گرفته است (۱۶). ایزوپروترونول همچنین به عنوان

یک عامل دارویی در تحقیقات مرتبط با اختلالات قلبی و برخی فرآیندهای درمانی، کاربرد دارد (۱۷ و ۱۸). به‌کارگیری آگونیست‌های β -آدرنژیکی موجب کاهش بیان SDF-1 در مغز استخوان می‌شود (۱۴). SDF-1 کموکاین بالقوه‌ای برای HSC انسانی و موشی محسوب می‌شود (۱۴) و به‌عنوان یک پروتئین ترشحی توسط MSC^{CD146^+} و انواع دیگری از سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان می‌شود (۲۲-۱۹). تعاملات دوسویه SDF-1 و گیرنده‌ی آن CXCR4 که توسط سلول‌های مختلفی چون HSC بیان می‌شود، مهاجرت و لانه‌گزینی HSC را مستقیماً در مغز استخوان، تنظیم می‌نماید (۱۴). مطالعات نشان داده که در طی فرآیند موبیلیزاسیون HSC، SDF-1 دچار یک تغییرنوسانی می‌گردد؛ به این ترتیب که در ابتدا بیان آن در سلول‌های مزانشیمی به‌طور گذرا افزایش یافته و موجب القای برخی عوامل اجرایی موبیلیزاسیون همانند آنزیم MMP-9 می‌گردد و در ادامه با غیرفعال‌سازی آنزیم‌های پروتئولیتیکی تولید شده، بیان آن کاهش پیدامی‌کند (۲۳ و ۲۴) بیان کاهش‌یافته SDF-1 در MSC و استئوبلاست‌ها و از سوی دیگر، رهاسازی هموستاتیک این کموکاین از مغز استخوان به جریان خون، منجر به موبیلیزاسیون HSC می‌شود (۱۴) علاوه بر اثرات سیستم عصبی بر بیان SDF-1، بیان این کموکاین می‌تواند در مراحل مختلف و با تاثیر عوامل تنظیمی گوناگون هم‌چون فاکتورهای رونویسی و/یا RNA های کوچک (MicroRNAs یا miRNAs) کنترل شود (۲۵-۲۸). miRNA ها گروهی از RNA های عملکردی غیر کدکننده کوچک هستند که تقریباً ۲۲ نوکلئوتید طول دارند و بیان ژن هدف را در مرحله پس از رونویسی کنترل می‌کنند (۲۹). miRNA ها به‌طور معمول توسط RNA Polymerase II به صورت رونوشت‌های اولیه طویل (Primary miRNA یا Pri-miRNA) رونویسی می‌شوند (۳۰) سپس با انجام تقسیمات اندونوکلازی

به منظور جداسازی به لوله ۱۵ فالكون (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) حاوی فایکول به میزان هم‌حجم نمونه مغز استخوان برده‌شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰ g سانتریفوژ گردید. آنگاه لایه‌ی حاوی سلول‌های تک هسته‌ای روی فایکول برداشته شد و بعد از انجام شستشو با PBS به یک فلاسک T75 حاوی محیط کشت منتقل گردید که به‌صورت پایه شامل محیط DMEM است که با ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) غنی شده‌است (GIBCO-BRL). متعاقب شکل‌گیری کلنی‌های سلولی، این کلنی‌ها با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد (GIBCO-BRL) جدا و به فلاسک جدیدی منتقل گردیدند و به جهت تأیید مارکرهای سطحی، مورد ارزیابی‌های فلوسیتومتری قرار گرفتند.

فلوسیتومتری و تمایز به استخوان و چربی: برای ارزیابی بیان مارکرهای سطحی، سلول‌ها پس از تریپسینه‌شدن و جداسازی از فلاسک‌های کشت، مورد شمارش قرار گرفتند. سپس در آلبومین سرم گاوی ۳ درصد، به‌صورتی که میزان 10^5 سلول به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر موجود باشد، به حالت سوسپانسیون در آمدند. بعد از ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده درون لوله‌های آزمایش، به‌هر یک، آنتی‌بادی‌های مورد نظر شامل CD44, CD73, CD34 و ایزوتیپ کنترل آن‌ها (eBioscience, San Diego, CA, USA) اضافه‌شده و پس از ۴۵ دقیقه قرارگیری در یخچال و شستشو با PBS، آنالیز فلوسیتومتری (Partec, Munster, Germany) بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. جهت بررسی قابلیت تمایزی سلول‌های تکثیر شده به چربی و استخوان نیز، تعداد 10^4 سلول درون چاهک‌های پلیت ۴ خانه ریخته شد و متعاقب چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک، محیط تمایزی استخوان و چربی به آن‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۲۱ روز هر سه روز یک‌بار تعویض محیط با این محیط‌ها صورت گرفت. بعد از گذشت این زمان، سلول‌ها با پارا فرم آلدئید ۴ درصد فیکس شدند و پس از رنگ‌آمیزی با آلزارین قرمز (Alizarin Red)

متوالی توسط آنزیم‌های Dicer و Drosha RNase III ساختار بالغ و نهایی خود را به‌دست می‌آورند (۳۱). miRNA بالغ برای عمل خود در مجموعه‌ی RISC (RNA-Induced Silencing Complex) قرار گرفته اغلب به ناحیه ۳' UTR mRNA هدف متصل می‌شود و بسته به میزان مکمل‌بودن، یا ترجمه، پروتئین را مهار می‌کند و یا منجر به تجزیه‌ی mRNA می‌شود (۳۲ و ۳۳). miRNAها می‌توانند با هدف‌گیری ژن‌های گوناگون در انواع سلول‌ها مانند MSC، اثرات مهمی بر فرایندهای چرخه‌ی سلول همچون تکثیر و تمایز، داشته‌باشند. به‌طور مثال، افزایش بیان miR-210 می‌تواند بر تکثیر و بقای MSC مغز استخوان موش‌ها، تأثیر بگذارد (۳۴) مشخص گردیده که miR-23a و miR-886-3p نیز می‌توانند بیان SDF-1 را در سلول‌های استرومایی مغز استخوان انسان، کاهش دهند (۳۶ و ۳۵). باتوجه به اثرات این دو miRNA بر بیان SDF-1 می‌توان چنین فرض نمود که بیان miR-23a و miR-886-3p نیز می‌تواند مستقیماً تحت تنظیمات سیستم عصبی واقع شود و این دو miRNA از جمله عوامل دخیل در موبیلیزاسیون HSC باشند. به‌منظور آزمودن این فرضیه، در این مطالعه، در ابتدا Mesenchy Stem Cell (MSC) از مغز استخوان انسانی جدا سازی و کشت شد. سپس با آگونیست β -آدرنرژیکی ایزوپروترونول تیمار گردید و در نهایت، میزان بیان miR-23a و miR-886-3p در مرحله قبل و پس از تیمار با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: در این مطالعه سه نمونه‌ی مغز استخوان نرمال (مجوز اخلاق پزشکی به‌شماره ۵۲/۳۶۹۱ صادر شده از دانشگاه تربیت مدرس) از مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته تهیه شد. پس از رقیق‌سازی نمونه به نسبت ۱ به ۱ با PBS (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)،

Adaptor Primer شامل یک بخش Oligo dT (مکمل با دم Poly A ایجاد شده) به همراه توالی منحصر به فرد (Unique Sequence) انتهای ۵' قطعه، فرآیند رونویسی معکوس و ساخت cDNA miRNA صورت می‌گیرد. Unique Sequence موجود در انتهای ۵' cDNA ساخته شده، قابلیت استفاده از پرایمر منحصر به فرد Reverse (Universal Reverse Primer) موجود در کیت را برای ارزیابی‌های کمی بر روی تمامی انواع miRNA مورد نظر، فراهم آورده و تنها نیاز به طراحی پرایمرهای Forward می‌باشد.

Real Time PCR: بیان کمی miR-23a و miR-886-3p حاصل از نمونه‌های کنترل و تیمارشده ۱۲ و ۴۸ ساعته، با استفاده از miRNA QPCR Master Mix (Stratagene) به صورت سه بار تکرار مورد ارزیابی‌های Real Time PCR قرار گرفت. رنگ فلوروسنت EvaGreen موجود در Master Mix کیت مذکور، همانند SYBR Green یک رنگ متصل‌شونده به DNA دو رشته‌ای است که نیاز به استفاده از پروب‌های اختصاصی را برای شناسایی محصولات، رفع می‌نماید. توالی پرایمرهای Forward مورد استفاده برای سنجش بیان hsa-miR-23 و hsa-miR-886 به ترتیب CTCAAGCGGTTACCTCCTCATG و ATCACATTGCCAGGGATTT بوده و همچنین برای پرایمر Reverse نیز از همان Universal Reverse Primer موجود در کیت بهره‌گرفته شد. در این پژوهش، از U6 به عنوان کنترل داخلی و تست حضور cDNA استفاده شد که توالی پرایمر Forward آن به صورت AAATTGGAACGATACAGAGAAG است. **تحلیل آماری:** برای بررسی‌های آماری داده‌های به دست آمده از Real Time PCR، در ابتدا باروش $\Delta\Delta Ct$ میزان بیان miR-23a و miR-886-3p نسبت به U6 نرمال‌سازی شد و نتایج Quantitative Reverse Transcriptase PCR

جهت بررسی وجود رسوب کلسیم در تمایز به استخوان و Oil Red برای قطرات چربی داخل سلولی در تمایز به چربی، مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفتند.

تیمار سلول‌ها با Isoproterenol: ایزوپروترونول به صورت یک ویال ۱۰۰ میلی گرمی محتوی پودر Isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich) تهیه گردید. برای هربار تیمار سلولی، از غلظت ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت سلول‌ها استفاده شد. زمانی که سلول‌ها به همشاری (Confluency) ۸۵-۸۰ درصد رسیدند، به گروه‌های مختلف تقسیم شده و تحت تیمار پیوسته با ایزوپروترونول ۱۰۰ میکرومولار قرار گرفتند؛ به طوری که با تعویض محیط سلول‌ها، دارو نیز مجدداً به محیط کشت فلاسک اضافه می‌شد. در نهایت، یک گروه به عنوان کنترل در نظر گرفته شده و هیچ گونه تیماری بر روی آن انجام نگرفت و دو گروه دیگر نیز به مدت ۱۲ و ۴۸ ساعت تحت تیمار دارویی قرار گرفته و کشت شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA: پس از انجام مرحله تیمار سلولی، به منظور مقایسه بیان miR-23a و miR-886-3p در سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه کنترل و همچنین گروه‌های تیمارشده ۱۲ و ۴۸ ساعته، Total RNA با بهره‌گیری از RNXTM(plus) (CinnaGen Inc, Tehran, Iran) بر پایه اختلاف فاز فنل کلروفرم، استخراج گردید. برای ساخت cDNA از miRNA مستخرج از نمونه‌های کنترل و همچنین گروه‌های تیمارشده ۱۲ و ۴۸ ساعته نیز، از کیت High-Specificity miRNA QPCR Kit (Stratagene) استفاده شد. ساخت cDNA miRNA با استفاده از کیت مذکور، مبتنی بر دو مرحله مجزا از هم است. در نخستین مرحله، واکنش پلی آدنیلایسیون (Poly Adenylation) صورت گرفته و طول miRNA موجود در Total RNA استخراج شده، با اضافه شدن یک دم Poly A به انتهای ۳' آن، افزایش می‌یابد. در مرحله دوم نیز، با اتصال قطعه‌ی

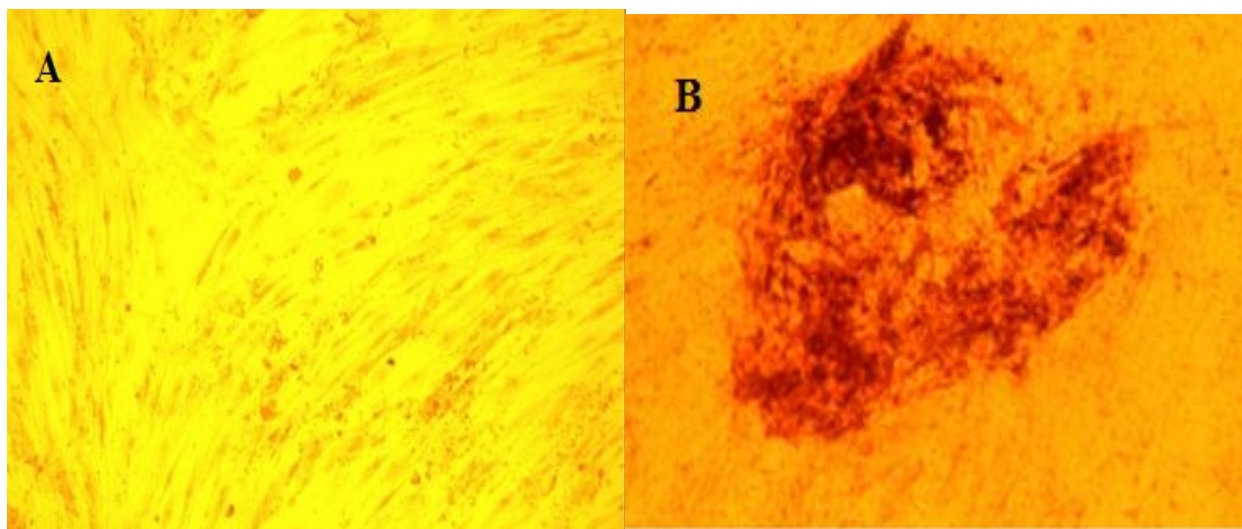
جدا شده انتخاب شد و آنالیز فلوسیتومتری انجام گرفت. نتایج به دست آمده، موید مثبت بودن این سلول‌ها برای مارکرهای رده‌ی مزانشیمی شامل (۹۲/۶۴ درصد) CD44 و (97/6 درصد) CD73 و همچنین منفی بودن آن‌ها برای مارکرهای رده‌خونی مانند (0/45 درصد) CD34 بود (شکل ۲).

اثر افزایشی ایزوپروترونول بر بیان miR-886-3p در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان miR-886-3p در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپروترونول افزایش پیدا می‌کند و به‌خصوص در ساعت ۴۸ پس از تیمار، این افزایش چشمگیر می‌نمود. بیان miR-886-3p در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپروترونول در ساعات ۱۲ و ۴۸ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده (کنترل) به ترتیب $3/5 \pm 0/43$ برابر و $75/23 \pm 4/79$ برابر بود و مقادیر به دست آمده در هر دو مورد به لحاظ آماری معنی‌دار بود (نمودار ۱).

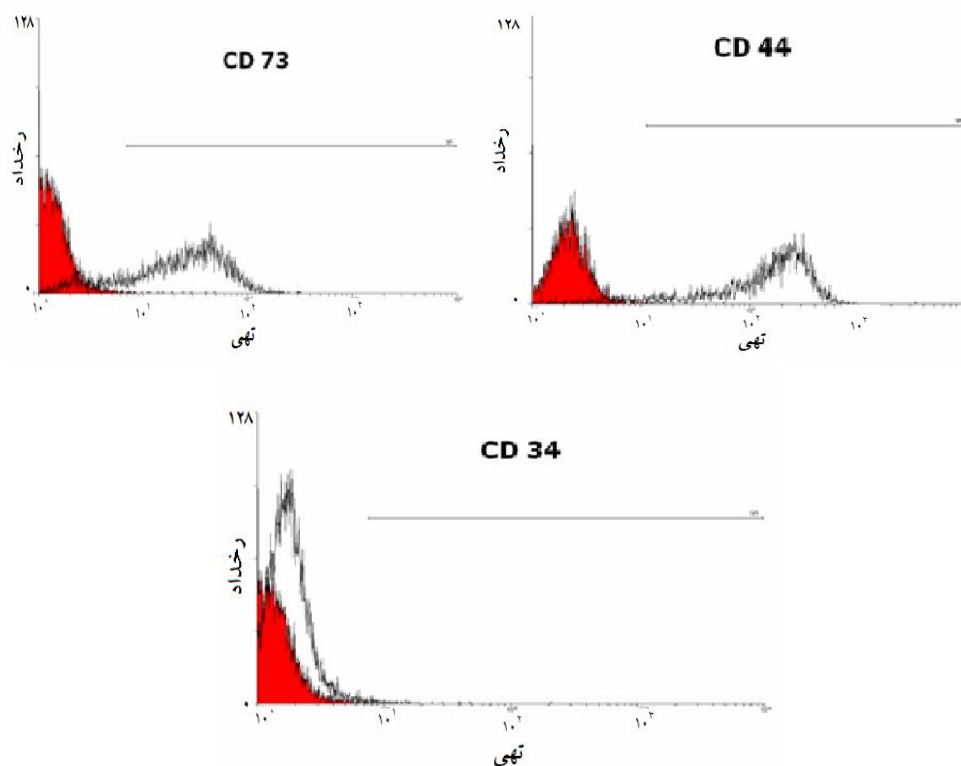
به صورت بیان‌نسی ژن، گزارش گردید. سپس با انتخاب روش آماری T-test، از نرم‌افزار Graph Pad و در نظر گرفتن $P < 0/05$ برای معنی‌داری نتایج، تحلیل آماری داده‌ها انجام گرفت. برای بررسی میزان اختلاف داده‌ها از میانگین شاخص پراکندگی انحراف معیار (SD) استفاده شد.

یافته‌ها

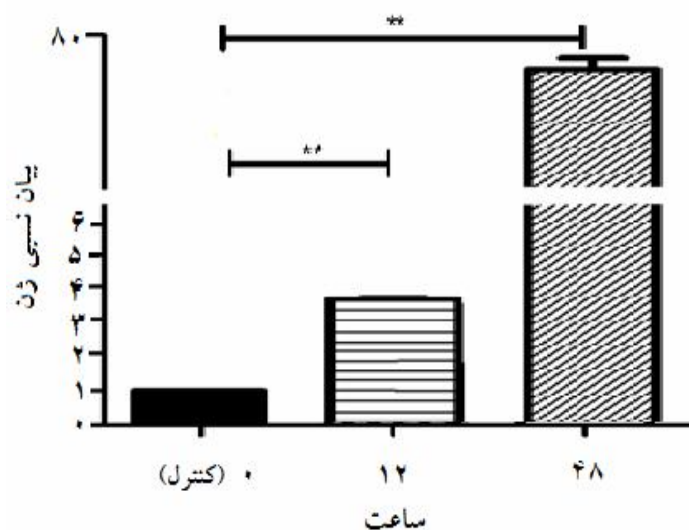
قابلیت تمایز سلول‌های جدا شده به استخوان و چربی: در هفته‌ی دوم تمایز با محیط تمایزی استخوان، کریستال‌های کلسیم با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز مشاهده شد که نشانه‌ی قابلیت تمایز این سلول‌ها به رده‌ی استئوبلاستی است. همچنین با گذشت حدود یک هفته از اضافه شدن محیط تمایزی چربی نیز، وجود واکوئل‌های چربی و تمایز سلول‌ها به رده آدیپوسیتی، با رنگ‌آمیزی Oil Red تایید گردید (شکل ۱).
تایید مارکرهای معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های جدا شده: پانلی از مارکرهای مثبت و منفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تایید ماهیت سلول‌های



شکل ۱؛ قابلیت تمایز سلول‌های جدا شده به استخوان و چربی شکل (A) رسوب کلسیم رنگ شده با رنگ آلیزارین قرمز را نشان می‌دهد که نشانگر تمایز به رده استخوانی است. شکل (B) واکوئل‌های چربی رنگ شده با رنگ Oil Red را نشان می‌دهد که مشخص کننده تمایز به سلول‌های چربی است.



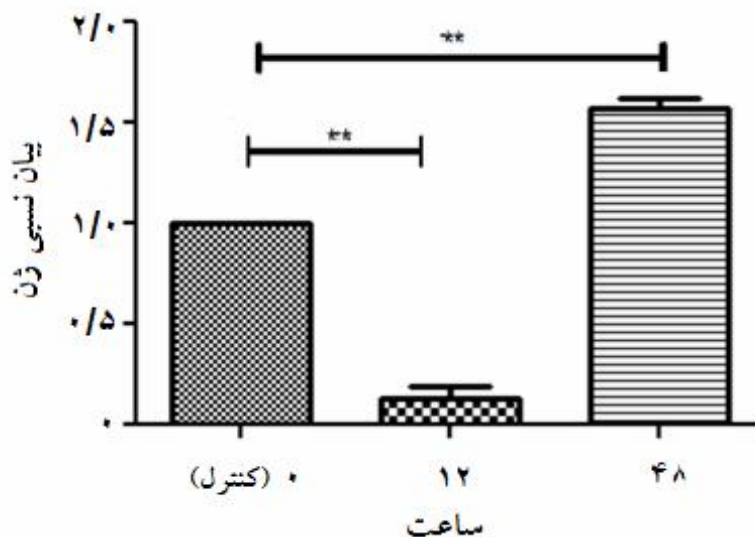
شکل ۲: مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده. سلول‌های جدا شده برای مارکرهای CD44 و CD73 مثبت و برای مارکر CD34 منفی هستند. گراف رنگی نشان دهنده ایزوتیپ است.



نمودار ۱: نتایج *miR-886-3p* Quantitative Reverse Transcriptase PCR در طول تیمار با ایزوپروترونول ۱۰۰ میکرومولار. بیان *miR-886-3p* در ساعات ۱۲ و ۴۸ تیمار با ایزوپروترونول، در مقایسه با شرایط کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).

در مقایسه با افزایشی که در همین ساعت برای miR-886-3p مشهود است، ناچیز به نظر می‌رسد. بیان miR-23a در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپروترونول در ساعات ۱۲ و ۴۸ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمارنشده (کنترل) به ترتیب $0/13 \pm 0/06$ برابر و $1/57 \pm 0/06$ برابر بود (نمودار ۲).

اثرات کاهشی و افزایشی ایزوپروترونول بر بیان miR-23a در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان؛ بیان miR-23a در طی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپروترونول در ساعت ۱۲ تیمار نسبت به حالت کنترل دچار کاهشی معنی‌دار گشته و سپس مانند miR-886-3p در ساعت ۴۸ پس از تیمار، افزایش پیدا می‌کند ولی این افزایش با وجود معنی‌داری،



نمودار ۲: نتایج *miR-23a Quantitative Reverse Transcriptase PCR* در طول تیمار با ایزوپروترونول ۱۰۰ میکرومولار بیان *miR-23a* در ساعات ۱۲ تیمار با ایزوپروترونول، در مقایسه با شرایط کنترل کاهش و در ساعت ۴۸ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که ایزوپروترونول باعث افزایش بیان miR-886-3p می‌شود. همچنین اثر القایی این آگونیست β -آدرنژیکی بر بیان miR-23a نیز در ساعت ۴۸ پس از تیمار، دیده شد. در مطالعات پیشین، اثرات سیستم عصبی برفرآیند موبیلیزاسیون HSC و بیان SDF-1 به عنوان یک عامل کلیدی این فرآیند، به فراوانی مورد بررسی قرار گرفته است. لوسک اولین بار در سال ۲۰۰۴ مدعی شد که در صورت نبود آنزیم‌های نوتروفیلی مانند الاستازها و متالوپروتئازها در مغز استخوان، حرکت HSC همچنان ادامه خواهد داشت و به این ترتیب پیشنهاد

دخالت مکانیسم‌های ثانویه به خصوص سیستم عصبی را مطرح کرد (۳۷) و این موضوع زمینه‌ی تحقیقات زیادی در راستای پررنگ کردن نقش این سیستم در خروج و لانه‌گزینی HSC گردید. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط مندز انجام شد، مشخص گردید که مقدار HSC خون محیطی در طول شبانه روز تغییر می‌کند. وی گزارش داد که ره‌ایش دوره‌ای HSC و بیان SDF-1 تحت تنظیم ترشحات شبانه‌روزی نورآدرنالین از سیستم عصبی سمپاتیک است و بر بیان SDF-1 اثر گذار می‌باشد. همچنین در اثر تیمار کشت مغز استخوان میلوئید اولیه موش‌ها با ایزوپروترونول، مهار بیان SDF-1 را به‌طور برجسته در سلول‌های استرومایی و

این دو miRNA از عوامل مداخله کننده در فرآیند موبیلیزاسیون باشند. نتایج به دست آمده فرضیهی مورد نظر را تایید کردند و ۴۸ ساعت پس از به کارگیری ایزوپروترونول، بیان هر دو miRNA مورد مطالعه، افزایش یافت که در این میان، افزایش بیان miR-886-3p قابل توجه بود. miR-23a نیز با وجود افزایشی که در ساعت ۴۸ پس از تیمار نشان داد، در ساعت ۱۲، کاهش بیان داشت که این امر را می توان با افزایش گذرای بیان mRNA هدف آن (SDF-1) تحت تاثیر آگونیست های β -آدرنژیکی هم چون ایزوپروترونول مرتبط دانست. هرچند نتایج حاصله از این مطالعه بیانگر اثراالقایی ایزوپروترونول بر بیان هر دو miRNA مورد بررسی است، با این حال چگونگی این اثر مشخص نیست. در این زمینه احتمالات متنوعی از جمله اثر ایزوپروترونول در فعال شدن برخی عوامل رونویسی که می توانند بر بیان miR-886-3p و miR-23a تاثیرگذار باشند و یا بروز انواع تغییرات اپی ژنتیکی برنواحی تنظیمی ژن های این دو miRNA، می تواند مطرح گردد که روشن شدن این مطلب خود نیازمند پژوهش های بیشتری است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می توان miR-886-3p را جز عوامل دخیل در موبیلیزاسیون در نظر گرفت زیرا تحت تاثیر عامل القاگر موبیلیزاسیونی ایزوپروترونول دچار افزایش بیان گردیده و با توجه به نقش شناخته شده آن در تنظیم SDF-1 سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، احتمالاً می تواند بیان SDF-1 را در سلول های مذکور کاهش دهد و بدین ترتیب موجب القای موبیلیزاسیون HSC به خون محیطی شود. در نتیجه امکان دارد miR-886-3p نیز از عوامل اجرایی موبیلیزاسیون باشد، و در طی این فرآیند دچار تغییر بیان شود. همچنین، با توجه به افزایش کم ولی معنی دار miR-23a در ساعت ۴۸ پس از تیمار، این miRNA را نیز

همچنین افزایش معنی دار پروژنیوتورهای ریزش شده به سوپرناتانت را مشاهده نمود (۱۶) شاهدهی دیگر بر ادعای تاثیر سیستم عصبی بر بیان SDF-1 و موبیلیزاسیون، مطالعه ای بود که در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت. در این مطالعه به اثر نوراپی نفرین بر روی SDF-1 پرداخته شد و با تزریق نوراپی نفرین به موش ها، شرایط استرسی را به آنها القا نموده و نشان دادند که به دنبال تزریق نوراپی نفرین، ترشح SDF-1 از مغز استخوان به خون محیطی افزایش یافته و هم زمان از مقدار آن در مغز استخوان کاسته می شود (۱۴) یافته های حاضر را می توان بر پایه ی اهمیت سیستم عصبی و آگونیست های β -آدرنژیکی بر بیان SDF-1 و موبیلیزاسیون HSC تفسیر کرد. از سوی دیگر، در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ انجام شد، نشان دادند که miR-886-3p بیان SDF-1 را در سلول های استرومایی مغز استخوان انسان کاهش می دهد. این گروه با بررسی دو رده ی سلولی HS27a و HS5 مشتق شده از کشت Primary مغز استخوان انسان که بیان متفاوتی از SDF-1 را نشان می دادند، دریافتند که miR-886-3p مستقیماً SDF-1 را هدف گیری می کند و بیان و عملکرد آن را کاهش می دهد. همچنین، سلول های استرومایی CD146^{hi} مغز استخوان، در مقایسه با گروه CD146^{lo} بیان بالایی از SDF-1 و در مقابل سطوح کمتری از miR-886-3p را بیان می کردند، که این موضوع می تواند نشانگر اثر تنظیمی این miRNA بر بیان SDF-1 در سلول های مذکور باشد (۳۵) همچنین در مطالعه ای دیگر که پیش از این در سال ۲۰۰۸ انجام گرفته بود، اثر مهار میR-23a نیز بر کاهش بیان SDF-1 در MSC های مشتق از مغز استخوان، مشخص گردید با توجه به این مطالب، احتمال اثر گذاری آگونیست β -آدرنژیکی ایزوپروترونول بر بیان miR-886-3p و miR-23a مطرح شده و چنین فرض شد که احتمالاً اثر این آگونیست های عصبی بر بیان SDF-1، از طریق miRNA های تنظیم کننده آن (مانند miR-886-3p و miR-23a)، صورت می گیرد و ممکن است

تاثیر ایزوپروترونول می‌تواند تنظیم‌کننده‌ی بیان SDF-1 در طی این فرآیند باشد.

می‌توان از جمله عوامل مداخله‌کننده در فرآیند موبیلیزاسیون در نظر گرفت و تغییرات بیانی آن متعاقب

References

- 1- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 75: 555-62.
- 2- Sykes M, Nikolic B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature*. 2005; 435: 620-7.
- 3- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1813-26.
- 4- Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001; 294: 1933-6.
- 5- Anderlini P, Körbling M. The use of mobilized peripheral blood stem cells from normal donors for allografting. *Stem cells*. 1997; 15: 9-17.
- 6- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008; 132: 631-44.
- 7- Levesque J-P, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13: 53-8.
- 8- Motabi IH, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev*. 2012; 26: 267-78.
- 9- Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1989; 74: 1905-14.
- 10- Dar A, Kalinkovich A, Netzer N, et al. AMD3100 signals via the nervous system, inducing release to the circulation of bone marrow SDF-1, which is crucial for progenitor cell mobilization. *Blood*. (ASH Annual Meeting Abstracts). 2006; 108: Abstract, 1315.
- 11- Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of β 2- and β 3-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1192: 139-44.
- 12- Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol*. 2007; 8: 1123-31.
- 13- Katayama Y, Battista M, Kao W-M, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006; 124: 407-21.
- 14- Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, et al. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 2011; 25: 1286-96.
- 15- Muthu K, Iyer S, He L-K, et al. Murine hematopoietic stem cells and progenitors express

- adrenergic receptors. *J Neuroimmunol.* 2007; 186: 27-36.
- 16- Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008; 452: 442-7.
- 17- Almquist A, Goldenberg IF, Milstein S, et al. Provocation of bradycardia and hypotension by isoproterenol and upright posture in patients with unexplained syncope. *N Engl J Med.* 1989; 320: 346-51.
- 18- Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146 multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol.* 2008; 36: 1035-46.
- 19- Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1331-9.
- 20- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004; 10: 858-64.
- 21- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006; 25: 977-88.
- 22- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002; 3: 687-94.
- 23- Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002; 109: 625-37.
- 24- Fedyk ER, Jones D, Critchley HOD, Phipps RP, Blieden TM, Springer TA. Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J Immunol.* 2001; 166: 5749-54.
- 25- Nakayama T, Mutsuga N, Tosato G. Effect of fibroblast growth factor 2 on stromal cell-derived factor 1 production by bone marrow stromal cells and hematopoiesis. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 223-35.
- 26- Lu MH, Li CZ, Hu CJ, et al. microRNA-27b suppresses mouse MSC migration to the liver by targeting SDF-1 alpha in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421: 389-95.
- 27- Solingen C, Boer HC, Bijkerk R, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc Res.* 2011; 92: 449-55.
- 28- Morenos L, Saffery R, Mechinaud F, et al. Evaluation of microRNA expression in patient bone marrow aspirate slides. *PloS one.* 2012; 7: e42951.
- 29- Wu L, Zhou H, Zhang Q, et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell.* 2010; 38: 465-75.
- 30- Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem.* 2010; 148: 381-92.

- 31- Budhu A, Ji J, Wang X. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol*. 2010; 3: 37.
- 32- Minayi N, Alizadeh S, Dargahi H, et al. The Effect of miR-210 Up-regulation on proliferation and survival of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cell. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2014; 8: 15.
- 33- Pillai MM, Yang X, Balakrishnan I, Bemis L, Torok-Storb B. MiR-886-3p down regulates CXCL12 (SDF1) expression in human marrow stromal cells. *PloS one*. 2010; 5: e14304.
- 34- Fierro F, Poitz D, Nolta JA, et al. MicroRNA mir-23a regulates SDF-1alpha expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Blood*. 2008; 112: 841.
- 35- Levesque J-P, Liu F, Simmons PJ, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 2004; 104: 65-72.

The Effect of β -Adrenergic Agonist Isoproterenol on miR-886-3p and miR-23a Expression in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Zamani H¹, Kaviani S¹, Atashi A¹, Parhizkar F¹

¹Dept. of Hematology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Kaviani S, Dept. of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E_mail: kavianis@modares.ac.ir

Received: 3 Jun 2014 **Accepted:** 30 Aug 2014

Background and Objective: Mobilization of Hematopoietic Stem Cells (HSCs) for transplantation and the importance of β -adrenergic signals in induction of this process have been well investigated. However, little is known about the role of β -adrenergic signals in mobilization of HSCs and factors influenced by these signals. The Chemokine Stromal Derived Factor -1 (*SDF-1*) which is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs), has a key role in mobilization of HSCs. In addition, *miR-886-3p* and *miR-23a* can regulate the expression of *SDF-1* in hMSCs. In this study, to investigate the role of *miR-886-3p* and *miR-23a* in mobilization process, expression of both miRNAs was evaluated in hMSCs treated by Isoproterenol (a β -adrenergic agonist).

Materials and Methods: hMSCs were isolated from human bone marrow and cultured. Following flowcytometric analysis, the cells were treated with 100 μ M isoproterenol. Total RNA was extracted at 12 and 48 hours post treatment, and also from untreated hMSCs as control. Then, *miR-886-3p* and *miR-23a* expression levels were quantified by quantitative Reverse Transcriptase PCR.

Results: The expression level of *miR-886-3p* increased significantly at 12 and 48 hours post treatment ($P < 0.05$). In addition, the expression level of *miR-23a* decreased at 12 hours post treatment and increased significantly at 48 hours post treatment ($P < 0.05$).

Conclusion: Isoproterenol induces *miR-886-3p* in hMSCs. MiR-23a is primarily decreased, and then increased due to treating with isoproterenol. So both miRNAs can contribute to mobilization process.

Key words: Mesenchymal Stem Cells - *miR-886-3p* - *miR-23a* - Isoproterenol