خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۱ شماره ۴ زمستان ۹۳ (۲۸۰-۲۷۱)
مقاله پژوهشی

اثر اپی‌نفرین بر بیان ژن CXCR4 در سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ خون بند ناف

فخرالدین صبا[۱]، الهام روشندل[۲]، مسعود سلیمانی[۳]، امیر آتشی[۴]، احمد قره‌باغیان[۵]، سعید آبرون[۶]، سعید کاویانی[۶]

چکیده

سابقه و هدف

امروزه از سلول‌های خونساز خون محیطی جهت درمان بسیاری از سرطان‌های خونی استفاده می‌شود. با این وجود، هنوز مکانیسم G-CSF به طور کامل مشخص نشده و اعتقاد بر این است که G-CSF بیشتر دارای عملکرد غیر مستقیم است. سرکوب سیستم عصبی، خروج سلول‌های خونساز به خون محیطی را حتی در حضور تزریق G-CSF متاثر می‌کند. ژن اصلی تنظیم‌کننده حرکت سلول‌های خونساز، CXCR4 است که به لیگاند SDF-1 متصل می‌شود. این مطالعه با هدف اثر کاتکول آمین اصلی سیستم عصبی- اپی‌نفرین- بر بیان ژن CXCR4 طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، بعد از جداسازی سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف ۲۰ نوزاد سالم درانتهای هفته ۳۶ بارداری با روش MACs (Magnetic Cell Sorting of human cells) ، سلول‌های با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌نفرین و ۱ میکرومولار پروپرانولول تیمار شدند و در بازهای زمانی ۱، ۳ و ۵ ساعت، ارزیابی ژن CXCR4 با استفاده از qRT-PCR انجام شد. بیان کیفی گیرنده‌های β آدرنرژیک سلول‌های $CD34^+$ با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

گیرنده‌های β آدرنرژیک بر روی سلول‌های $CD34^+$ بیان شدند. اپی‌نفرین منجر به افزایش معنادار CXCR4 در ساعت اول(۰/۵ ± ۳/۲)، سوم(۰/۴ ± ۲/۴) و پنجم(۰/۴ ± ۲/۴) شد. هم‌چنین مواجهه با پروپرانولول منجر به خنثی شدن اثر اپی‌نفرین در القای بیان CXCR4 گردید.

نتیجه گیری

G-CSF با افزایش ترشح اپی‌نفرین در مغز استخوان، به طور غیر مستقیم بر بیان ژن CXCR4 اثر دارد که چنین افزایشی به واسطه گیرنده‌های β آدرنرژیک صورت می‌گیرد و در نهایت به سمت SDF-1های ترشحی در خون محیطی حرکت می‌کنند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خون‌ساز، اپی‌نفرین، فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت، گیرنده CXCR4

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۳- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۴- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۵- PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۶- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران

مقدمه

جایگاه سلول‌های بنیادی خونساز (HSC = Hematopoietic Stem Cell) در بالغین، مغز استخوان می‌باشد؛ این سلول‌ها تولید انواعی از رده‌های خونی را بر عهده دارند(۱). یکی از ویژگی‌های بارز این سلول‌ها قدرت حرکت از مغز استخوان به خون محیطی و توانایی برگشت به داخل مغز استخوان است(۲). مطالعه‌ها نشان داده است حرکت HSC به صورت پیوسته و وابسته به متغیرهای شبانه‌روزی است؛ به طوری که روشنایی و یا تاریکی بر روی ورود HSC به خون محیطی یا ماندگاریشان در مغز استخوان تاثیر دارد(۳). تغییرات شبانه‌روزی توسط سیستم عصبی تنظیم می‌گردد(۳). مطالعه‌ها نشان داده است که کاتکول آمین‌ها نقش مهمی در خروج HSCs از مغز استخوان بازی می‌کنند؛ به طوری که حذف پایانه‌های عصبی در بستر مغز استخوان، منجر به کاهش شدید خروج HSC شده که در چنین شرایطی تزریق فاکتور تحریکی G-CSF (Growth-Colony Stimulating Factor) تاثیری در افزایش خروج HSCs از مغز استخوان نخواهد داشت(۶-۴). پایانه‌های عصبی به همراه شریان‌های عروقی به داخل مغز استخوان نفوذ کرده و ارتباط نزدیکی را با نیچ‌های استخوانی و اندوتلیالی ایجاد می‌کنند(۷). مهم‌ترین کاتکول آمین‌هایی که از پایانه‌های عصبی ترشح می‌شوند، شامل اپی‌نفرین، نوراپی‌نفرین و دوپامین هستند که بر روی انواعی از گیرنده‌های α و β اثر می‌گذارند(۸). گیرنده‌های α و β جزء گیرنده‌های جفت شونده به پروتئین G بوده و دارای مسیر سیگنالی cAMP/PKA (Protein Kinase A) می‌باشند(۸). مهم‌ترین گیرنده عصبی بر روی HSCs و استرومایی مغز استخوان، نوع β است و گفته می‌شود β۲ بیشترین اثر عصبی را بر روی این سلول‌ها دارد(۹). با این وجود انواع β۱ ، β۳ و α نیز حایز اهمیت هستند، اگر چه داده‌های اندکی در این زمینه وجود دارد. از اوایل سال ۲۰۰۰ مطالعه‌ها و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه عملکرد کاتکول آمین‌ها بر روی HSCs صورت گرفته است اما ارتباط بین سیستم عصبی با سایتوکاین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های چسبنده دخیل در حرکت HSC ، هنوز به طور کامل مشخص نشده و سؤال‌های بسیاری در این زمینه بدون پاسخ باقی مانده است.

یکی از مهم‌ترین مولکول‌های دخیل در خروج HSCs از مغز استخوان، CXCR4 است که به لیگاند خود SDF1 (Stromal Cell Derived-Factor1) متصل می‌شود(۱۰). مولکول CXCR4 بر روی انواعی از سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ یا $CD133^+$ مغز استخوان، خون محیطی و بند ناف بیان می‌شود(۱۱). ارتباط بین CXCR4 و SDF-1 در فرآیند حرکت HSC بسیار مهم بوده و قطع این ارتباط می‌تواند منجر به رها شدن HSCs از مغز استخوان به خون محیطی شود(۱۲). مطالعه‌ها بیانگر آن است که حرکت HSCs وابسته به غلظت CXCR4 و SDF1 می‌باشد به طوری که گرادیانت غلظتی بین این ۲ مولکول منجر به حرکت HSCs می‌گردد(۱۲). در ضمن حرکت HSCs ، SDF-1 توسط سلول‌های اندوتلیال مغز استخوان به خون محیطی ترشح شده و سبب جذب سلول‌های $CXCR4^+$ به طرف لیگاند مترشحه می‌شود(۱۳). استفاده از آنتی‌بادی‌های مهاری SDF-1 یا CXCR4 منجر به کاهش حرکت HSCs متعاقب تزریق محرک‌هایی مثل Plerixafor (AMD3100) و G-CSF به خون محیطی می‌شود(۱۳). با وجود افزایش بیان ژن CXCR4 به دنبال تزریق ۵ روزه G-CSF ، چنین تغییر بیانی در مواجهه مستقیم سلول‌های $CD34^+$ با G-CSF در شرایط آزمایشگاهی دیده نشده است(۱۴، ۱۰). بنابراین، این احتمال وجود دارد که G-CSF به واسطه مکانیسم‌های غیر مستقیم هم‌چون سیستم عصبی منجر به تغییر بیان ژن CXCR4 شود به علاوه، تاکنون عملکرد سیستم عصبی بر روی بیان ژن بسیار مهم CXCR4 بررسی نشده و تاثیری که این سیستم می‌تواند در شرایط *in vitro* بر روی این ژن داشته باشد مشخص نیست. بنابراین این تحقیق به بررسی این مساله پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از خون بند ناف نوزادان سالم:

در یک مطالعه تجربی، بعد از گرفتن رضایت‌نامه کتبی از والدین سالم، خون بند ناف از نوزادانشان گرفته شد و

در کیسه‌های خونی حاوی ضد انعقاد اسید سیترات دکستروز جمع‌آوری شد. جهت جداسازی سلول‌های $CD34^+$ در ابتدا لازم است که گلبول‌های قرمز رسوب داده شوند که برای این منظور از هیدروکسی اتیل استارچ(HES = Hydroxyethyl starch) استفاده شد. بدین صورت که HES به نسبت ۱ به ۵ با خون بند ناف مخلوط شد. بعد از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، مایع رویی جدا شده و در دور G ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی با PBS (phosphate buffered saline) پیپتاژ شد و به آرامی به نسبت ۱ به ۲ بر روی محلول قندی فایکول(Ficol) ریخته شد و در دور G ۴۵۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای که سلول‌های $CD34^+$ را نیز شامل می‌شوند، دارای چگالی کمتری نسبت به فایکول بوده لذا بر روی آن قرار می‌گیرند. گلبول‌های قرمز باقی‌مانده دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به فایکول هستند و در ته لوله رسوب می‌کنند. سپس مایع رویی که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای بود برداشته و با دور G ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت بر روی رسوب سلولی ایجاد شده آنتی‌بادی $CD34^+$ افزوده شد و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مخلوط سلولی از ستون‌های LS MACS عبور داده شد. در انتها سلول‌های چسبیده شده به ستون با PBS شسته شده و در محیط کشت Spam Stem که حاوی فاکتورهای رشد(TPO (۵۰ ng/mL)، SCF (۵۰ ng/mL) و Flt3-L (۱۰ng/mL) می‌باشد، نگهداری شدند.

فلوسیتومتری:

جهت تعیین خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده، از فلوسیتومتری استفاده شد. برای این منظور حدود 10^3 × ۵-۴ سلول $CD34^+$ به لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محیط کشت رویی دور ریخته شد و به رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد. بعد از اضافه کردن حدود ۱۰-۵ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال CD34-PE به سوسپانسیون سلولی، ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد. جهت نمونه کنترل(Isotype Control) به جای آنتی‌بادی CD34-PE ، از محلول کنترل منفی(Mouse IgG_1) استفاده گردید. لازم به ذکر است که در کنار کنترل ایزوتیپ، از کنترل تیمار نشده هم استفاده شد.

نحوه مواجهه سلول‌ها با اپی‌نفرین و پروپرانولول:

برای این منظور از پلیت‌های ۲۴ خانه استفاده شد. حدود 10^3 × ۲۵۰ سلول $CD34^+$ در هر پلیت کشت داده شد. دوز و زمان تیمار اپی‌نفرین و پروپرانولول بر اساس مطالعه‌های قبلی انتخاب شدند به طوری که از دوز ۱۰ میکرومولار برای اپی‌نفرین و ۱ میکرومولار برای پروپرانولول و از ۳ بازه زمانی ۱، ۳ و ۵ ساعت استفاده شد(۶، ۳). سلول‌ها در ۳ چاهک با اپی‌نفرین ۱۰ میکرومولار و در ۳ چاهک دیگر با اپی نفرین ۱۰ میکرومولار به همراه پروپرانولول ۱ میکرومولار تیمار شدند. هم‌چنین از ۳ چاهک به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج آزمایش حاصل حداقل ۳ بار تکرار می‌باشد.

استخراج RNA:

مراحل استخراج Total RNA شامل : ۱) یک میلی‌لیتر از محلول کیازول بر روی سلول‌ها ریخته شده، به خوبی مخلوط گردید و در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط فوق بعد از انتقال به میکروتیوب‌ها، اضافه شده و با تکان دست به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی مخلوط گردید. مخلوط حاضر به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۳۲۰۰ سانتریفوژ گردید. فاز رویی محصول ۳ فازی به دست آمده را برداشته، به میکروتیوب جدید منتقل کرده و به میزان یک برابر حجم آن اتانول سرد اضافه شد ، مخلوط به دست آمده به مدت ۱ شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به مدت ۴۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب سفید رنگ، ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۷۵٪ سرد اضافه گردید و جهت جداسازی رسوب از ته میکروتیوب به خوبی ورتکس شد. مخلوط حاصله

به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. اتانول روی رسوب دور ریخته شده و در دمای اتاق قرار داده شد تا رسوب تا حد امکان خشک شود. رسوب در ۲۰ میکرولیتر آب استریل حل شد. در نهایت غلظت RNA استخراج شده تعیین شد.

آنالیز RT-PCR:

برای بررسی بیان کیفی ژن‌ها از RT-PCR استفاده شد. برای این منظور، RNA سلول‌های مورد نظر با استفاده از محلول کیازول جداسازی شد. در ادامه، ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس(RT) با استفاده از کیت(فرمنتاز، K ۱۶۲۲) و ۱ µL آغازگر ۱۸ اولیگو(dT) انجام شد. در ادامه واکنش PCR با ۲ µM dNTP ، ۱ µg cDNA ، بافر PCR (فرمنتاز) X ۱، ۰/۷۵ µM $MgCl_2$ ، µL Tag DNA U/۲۵ ۱ پلی‌مراز فرمنتاز و ۰/۵ میکرومول از آغازگرهای ژن‌های اختصاصی گیرنده‌های β آدرنرژیک در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ(۵۸ درجه) به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ۳۵ سیکل انجام شد(جدول ۱).

در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۵٪ آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

جدول ۱: توالی آغازگر ژن‌های β آدرنرژیک

bp	ADRβ1-F	AGTGGCTTGCTGATGTTCCT
۱۴۶	ADRβ1-R	ATGCTTCTCCCTTCCCCTAA
bp	ADRβ2-F	CTGTGACTTCTTCACGAACCAAG
۱۳۲	ADRβ2-R	GATTTGTCAATCTTCTGGAGCTGC
bp	ADRβ3-F	CTTTGCCAACGGCTCGAC
۱۳۵	ADRβ3-R	TGGAGGGTAGAGTGTCACAGC

اجرای qRT-PCR:

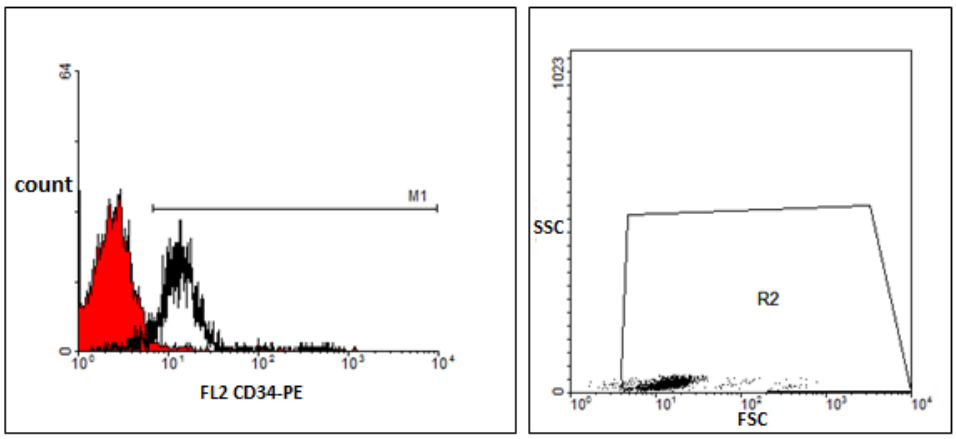
qRT-Real Time PCR یک روش بسیار قوی است که برای بررسی بیان کمی ژن مورد نظر استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر از روش دو مرحله‌ای SYBR Green استفاده شد به این صورت که ابتدا از RNA ژنومی cDNA تهیه و سپس در تیوب جداگانه cDNA را به DNA دو رشته‌ای مبدل کردیم.

سیستم آشکارکننده سایبرگرین به عنوان ساده‌ترین و شایع‌ترین و با صرفه‌ترین روش بر اساس توانایی در اتصال به شکاف کوچک DNA دو رشته‌ای و متعاقب آن افزایش فلورسانس تا ۲۰۰۰ برابر مقدار آزاد اولیه است. در این مطالعه ژن GAPDH به عنوان ژن Housekeeping انتخاب گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بود از آغازگر رفت ژن GAPDH (5'-3') : CCTGGCGTCGTCATTAGTAGTG ، آغازگر برگشت (5'to3'): TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC، آغازگر رفت CXCR4 : GGTCCATGGTTACCAGAAGA (5'to3') و آغازگر برگشت CXCR4 (5'to3'): GTC ATC TGC CTC ACT GAC GTTG. کیت Power SYBER Green PCR Master Mix (شرکت ABI) خریداری شد. ۰/۷۵ µL از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ µmol، ۶/۵ µL ddH2 ، ۱۰ µL SYBR Green و ۲ µL cDNA با رقت ۰/۱ به تیوب‌های ویژه اضافه شد. واکنش تکثیری بر طبق الگوی دمایی خاص، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، خوانش پلیت‌ها و ۴۰ مرتبه تکرار مراحل از مرحله ۲ در داخل دستگاه Step-one ABI اجرا گردید.

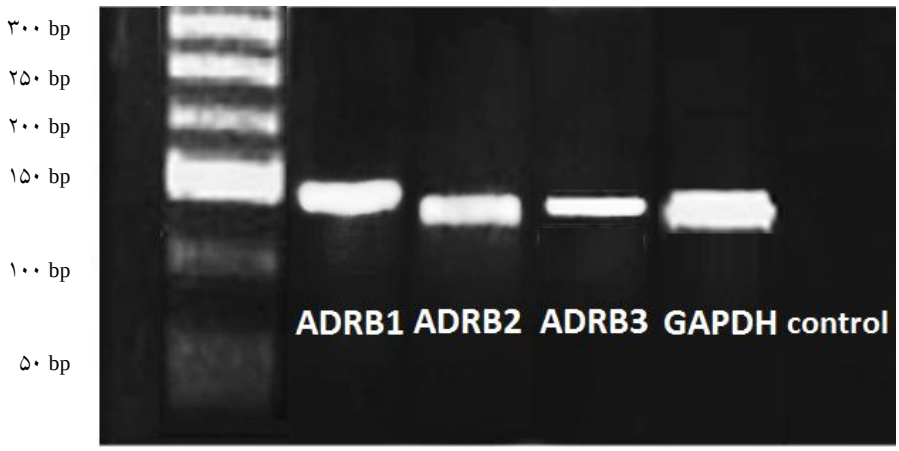
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

پروفایل بیان ژنی به طور نسبی و با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. سپس داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۹ مورد تحلیل آماری قرار گرفتند.

میانگین و خطای استاندارد میانگین محاسبه و سپس از طریق آزمون Paired Samples t-test ، میزان معناداری نتایج مشخص شد. داده‌ها به صورت خطای استاندارد میانگین ± انحراف معیار و در سطوح معناداری $p< ۰/۰۵$ گزارش شدند.



شکل ۱: نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای $CD34^+$ در سلول‌های خونساز جدا شده از بند ناف



شکل ۲: بیان کیفی انواعی از رسپتورهای β آدرنرژیک در HSCs . هر سه نوع رسپتورADRB1 ، ADRB2 و ADRB3 توسط HSCs بیان می‌شود. GAPDH و control منفی جهت صحت آزمایش گذاشته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از فلوسیتومتری:

بعد از جداسازی سلول‌های $CD34^+$ به منظور ارزیابی سلول‌های جدا شده و داشتن جمعیتی یکسان از سلول‌های $CD34^+$ ، روش فلوسیتومتری به کار گرفته شد. نتایج فلوسیتومتری که در شکل ۱ نشان داده شده است خلوص ۹۸٪ از سلول‌های $CD34^+$ را نشان می‌دهد.

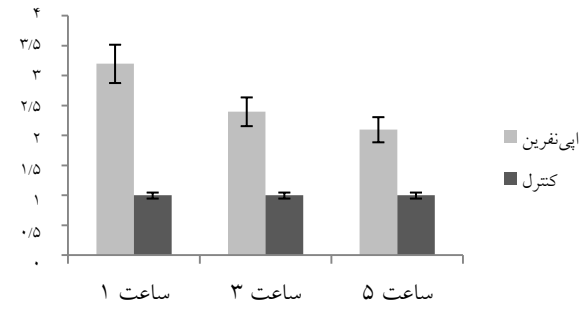
بیان گیرنده‌های βآدرنرژیک در سلول‌های خونساز $CD34^+$:

جهت اثبات بیان رسپتورهای بتا آدرنرژیک از روش RT-PCR استفاده شد. بررسی‌های RT-PCR نشان داد که هر ۳ گیرنده ژن β آدرنرژیک(β۱ ، β۲ و β۳) در سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از بند ناف دارای بیان می‌باشد(شکل۲).

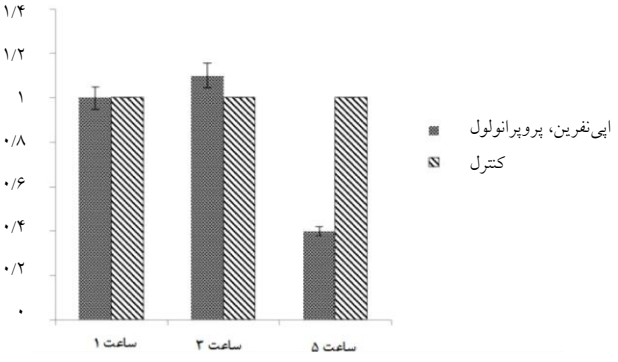
بررسی بیان کمی CXCR4 در سلول‌های تیمار شده با اپی‌نفرین و پروپرانولول:

اپی‌نفرین منجر به افزایش معناداری در بیان ژن CXCR4 شد به طوری که افزایش در ساعت‌های ۱ ، ۳ و ۵ به نسبت کنترل معنادار می‌باشد(نمودار ۱). بیشترین بیان CXCR4 ، را می‌توان در ساعت ۱ مشاهده کرد ولی افزایش بیان ساعت ۱ نسبت به ساعت ۳ و ۵ معنادار

نمی‌باشد.



نمودار ۱: میانگین چند برابر شدن بیان ژن CXCR4 در سلول‌های تیمار شده با اپی‌نفرین. در هر ۳ بازه زمانی افزایش بیان ژن CXCR4 دیده شد و نسبت به کنترل معنادار می‌باشند. مقدار p value برای هر ۳ بازه زمانی ۰/۰۵ است نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت(mean SD) می‌باشند. ساعت اول(۰/۵ ± ۳/۲)، سوم (۰/۴ ± ۲/۴) و پنجم(۰/۴ ± ۲/۲) شد.



نمودار۲: تاثیر هم زمان پروپرانولول ۱ میکرومولار و اپی‌نفرین ۱۰ میکرومولار در بیان ژن CXCR4 در ساعت‌های ۱، ۳ و ۵ ؛ مقدار بیان ژن CXCR4 در هر ۳ بازه زمانی با نوع کنترلی برابری می‌کند. نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت (mean ± SD) می‌باشند. ساعت اول(۰/۱ ± ۱)، ساعت سوم(۰/۱ ± ۱)، ساعت پنجم(۰/۰۵ ± ۰،۴)

اپی‌نفرین می‌تواند بر روی گیرنده‌های α و β آدرنرژیک اثر بگذارد از این رو جهت تعیین نوع گیرنده دخیل در عملکرد اپی‌نفرین جهت افزایش CXCR4 از مهارکننده‌های β آدرنرژیک(پروپرانولول) استفاده شد. پروپروانول به صورت یک آنتاگونیست اختصاصی β آدرنرژیک عمل می‌کند و هر ۳ نوع گیرنده β آدرنرژیک را مهار می‌کند. بنابراین تنها گیرنده‌های آلفا آدرنرژیک در دسترس اپی‌نفرین باقی می‌مانند. افزودن ۱ میکرو مولار پروپرانولول به سلول‌های خون‌ساز $CD34^+$ نیم ساعت قبل از تیمار با اپی‌نفرین، منجر به خنثی شدن اثر اپی‌نفرین بر بیان CXCR4 شد و در هر ۳ بازه زمانی، مقدار CXCR4 با نوع کنترل برابری می‌کرد(نمودار ۲).

بحث

از HSCs خون محیطی جهت پیوند مغز استخوان به منظور درمان بسیاری از بیماری‌های خونی از جمله لوسمی‌ها استفاده می‌شود(۱۵). بنابراین امروزه تلاش زیادی جهت تسهیل ورود این سلول‌ها از مغز استخوان به خون محیطی و افزایش تعداد آن‌ها در گردش خون صورت گرفته است. یکی از بزرگترین چالش‌ها، مقاومت برخی اهداکنندگان سلول‌های بنیادی مغز استخوان به فاکتورهای تحریک‌کننده مثل G-CSF است به طوری که بعد از ۵ روز تزریق G-CSF ، هم‌چنان سطح پایینی از $CD34^+$ در خون محیطی وجود دارد(۱۶). بر این اساس شناخت مولکول‌های دخیل در خروج سلول‌های بنیادی از مغز استخوان، یکی از مسائل اساسی در جهت بهبود پیوند است(۱۶). در این راستا سیستم عصبی، به عنوان اصلی‌ترین سیستم تنظیم‌کننده بدن، دارای نقش اساسی در حرکت سلول‌های $CD34^+$ می‌باشد و داده‌های زیادی در این زمینه وجود دارد(۱۷، ۵، ۴).

در مطالعه حاضر بیان گیرنده‌های β آدرنرژیک در سطح سلول‌های خونساز $CD34^+$ بند ناف مورد تایید قرار گرفت. اپی نفرین به عنوان یکی از کاتکول آمین های مهم سیستم عصبی بر روی انواعی از گیرنده‌های α و β اثر می‌گذارد(۱۷). در این بررسی نشان داده شد که سلول‌های $CD34^+$ تیمار شده با اپی‌نفرین، دارای بیان معناداری از ژن CXCR4 در هر ۳ بازه زمانی ۱، ۳ و ۵ نسبت به سلول‌های تیمار نشده هستند. با وجود افزایش نسبی در بیان ژن CXCR4 در ساعت اول، تفاوت معناداری بین بیان ساعت ۱ با ساعت‌های ۳ و ۵ به لحاظ آماری دیده نشد. گیرنده‌های آدرنرژیک اصلی درگیر در بیان ژن CXCR4 ،

β آدرنرژیک می‌باشد به طوری که در این مطالعه دیده شد، با مهار کردن گیرنده‌های β آدرنرژیک توسط پروپرانولول، تغییری در بیان ژن CXCR4 در دو گروه سلول‌های $CD34^+$ تیمار شده و تیمار نشده با اپی‌نفرین ایجاد نمی‌شود.

در سال ۲۰۰۲ پتیت نشان داد که با وجود کاهش بیان SDF-1 در مغز استخوان و افزایش ترشح این کموکاین به خون محیطی و هم چنین افزایش بیان CXCR4 در سلول‌های خونساز $CD34^+$ به دنبال تزریق ۵ روزه G-CSF ،تغییری در بیان CXCR4 سلول‌های خونساز $CD34^+$ بند ناف و مغز استخوان به دنبال تیمار مستقیم با G-CSF در شرایط آزمایشگاهی دیده نمی‌شود و فرض شد که G-CSF به واسطه مکانیسم‌های ثانویه مثل آنزیم‌ها و یا سایتوکاین‌های دیگر منجر به تغییر بیان CXCR4 در شرایط داخل بدن می‌گردد(۱۸). در این مطالعه نشان دادیم که چنین مکانیسم غیر مستقیمی می‌تواند در نتیجه کاتکول‌آمین‌ها باشد.

در سال ۲۰۰۴ لوسکیو برای اولین بار مدعی شد که در صورت نبود آنزیم‌های نوتروفیلی همانند الاستاز و متالوپروتئاز در مغز استخوان، هم چنان حرکت HSCs وجود دارد و لذا پیشنهاد دخالت مکانیسم ثانویه سیستم عصبی را مطرح کرد(۱۹).

در سال ۲۰۰۶ کاتایاما در شرایط *in vivo* به بررسی اثر G-CSF در ترشح کاتکول آمین‌ها پرداخت و یافته او نشان داد که G-CSF به صورت اختصاصی منجر به ترشح کاتکول‌آمین‌ها در مغز استخوان می‌شود و می‌توان گفت که G-CSF با افزایش فعالیت و ترشح کاتکول‌آمین‌ها، بر روی بیان ژن‌های مربوط به حرکت پروژنیتورهای خونی مثل CXCR4 اثر می‌گذارد(۶).

در سال ۲۰۰۵، سمراد و همکارانش نشان دادند که G-CSF فعالیت سلول‌های استئوبلاستی و بیان ژن CXCL12 را در این سلول‌ها مهار می‌کند. این گروه با تزریق G-CSF به موش‌ها نشان دادند که کاهش بیان SDF-1 در مغز استخوان، با مقدار خروج سلول‌های HSC ارتباط مستقیم دارد. آن‌ها هم چنین مشاهده کردند که سلول‌های استئوبلاستی دچار سرکوب شده و ارتباط آن‌ها با سلول‌های HSC محدود می‌شود. پیشنهاد این تیم تحقیقاتی آن بود که به علت نبود گیرنده‌های G-CSF بر روی سلول‌های استئوبلاستی، مکانیسم ثانویه‌ای هم چون سیستم عصبی می‌تواند دخالت داشته باشد(۲۰). در صورتی که یافته‌های مطالعه حاضر را در کنار یافته‌های گروه اخیر قرار دهیم، می‌توان فرض کرد که G-CSF با واسطه سیستم عصبی، منجر به افزایش بیان CXCR4 و کاهش بیان SDF-1 شده که در نهایت به خروج HSCs از مغز استخوان می‌انجامد.

در سال ۲۰۰۶ کاتایاما به صورت *In vivo* و *In vitro* اثبات کرد که مکانیسم اصلی حرکت سلول‌های HSC ، به واسطه سیستم عصبی است. آن‌ها نشان دادند که در صورت مهار سیستم عصبی در موش‌ها، G-CSF قدرت القای خروج HSCs را از مغز استخوان ندارد و سلول‌های استئوبلاست هم چنان به صورت محکم با HSC دارای ارتباط می‌باشد. علاوه بر این، بیان $CXCL_{12}$ نیز در سطح بالا باقی خواهد ماند. این گروه بیان ژن CXCR4 را مورد بررسی قرار نداده بودند(۶). با این حال می‌توان گفت که G-CSF عملکرد اصلی خود را از طریق کاتکول آمین‌ها انجام می‌دهد واین فرضیه با داده‌های حاصل از این تحقیق هم راستا می‌باشد.

در سال ۲۰۰۷، اسپیگل، نشان داد که کاتکول‌آمین‌ها با واسطه سیگنالینگ Wnt ، منجر به مهاجرت و لانه گزینی سلول‌های $CD34^+$ می‌شوند. تیم اسپیگل گزارش کردند که سلول‌های $CD34^+$ در هر ۳ منبع مغز استخوان، خون محیطی و بند ناف دارای گیرنده‌های آدرنرژیک و دوپامینی هستند و مواجهه آزمایشگاهی سلول‌های بند ناف با G-CSF ، منجر به افزایش بیان گیرنده‌های عصبی می‌شود(۱۷). یافته آن‌ها هم‌راستای یافته‌های این مطالعه بوده و می‌توان گفت که G-CSF با افزایش بیان گیرنده عصبی آدرنرژیک بر روی سلول‌های $CD34^+$ ، باعث القای عملکرد بیشتر کاتکول‌آمین اپی‌نفرین می‌شود.

در سال ۲۰۰۸، مندز نشان داد که مقدار HSCs خون محیطی در طول شبانه روز تغییر می‌کند و این مقادیر در انسان و موش بر عکس هم می‌باشد. آنها گزارش کردند که نقش اصلی را گیرنده‌های β۳ بر عهده دارند که بر روی SDF-1 اثر می‌گذارد(۳). با این حال هنوز بر روی تغییرات

شبانه روزی CXCR4 مطالعه‌ای انجام نشده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد سیستم عصبی نه تنها در شرایط استرسی مثل تزریق G-CSF دخالت دارد، بلکه در شرایط فیزیولوژی نیز در خروج HSCs نقش دارد.

در سال ۲۰۱۰ ، این بار مندز بر عملکرد گیرنده‌های β۲ و β۳ متعاقب تزریق G-CSF به موش‌ها مطالعه کرد. آن‌ها نشان دادند که نقش اصلی را β۲ بر عهده دارد به طوری که مهار گیرنده β۲ منجر به مهار حرکت HSCs می‌شود(۴). این یافته‌ها، با نتایج تحقیق حاضر در مورد عملکرد تحریک‌کننده گیرنده های عصبی آدرنرژیک همراستا است؛ ما نیز نشان دادیم که در شرایط آزمایشگاهی مهار گیرنده‌های β از افزایش بیان CXCR4 در مواجهه با اپی نفرین جلوگیری می‌کند و این امر تاییدی بر نقش گیرنده‌های β آدرنرژیک می‌باشد.

در سال ۲۰۱۱، دار و همکارانش به بررسی اثر نوراپی‌نفرین بر روی SDF-1 در موش‌ها پرداختند. این گروه نشان دادند که به دنبال تزریق نوراپی‌نفرین، ترشح SDF-1 از مغز استخوان به خون محیطی افزایش یافته و هم‌زمان از مقدار آن در مغز استخوان کاسته می شود. در واقع این گروه بر اصل فرآیند حرکت شیب غلظتیHSC تاکید کردند و بیان کردند که به دنبال افزایش غلظت SDF-1 در خون محیطی و کاهش آن در مغز استخوان، HSCs به سمت خون محیطی حرکت می‌کنند(۱۳). این تحقیق نیز نشان داد که کاتکول آمین اپی‌نفرین، منجر به افزایش بیان CXCR4 در سطح HSCs می‌شود که در صورت قرار دادن این یافته‌ها در کنار هم، می‌توان گفت که کاتکول‌آمین‌ها با افزایش غلظت SDF-1 در خون محیطی و افزایش بیان CXCR4 در پروژنیتورهای خون‌ساز، شرایط را برای خروج این سلول‌ها از مغز استخوان هموار می‌کند.

در سال ۲۰۱۱، گِرگ و همکارانش بر روی اثر شوک و آسیب‌های بافتی در حرکت پروژنیتورهای خونساز مطالعه کردند. یافته‌های این تیم نشان داد که آسیب‌های بافتی به خصوص شوک، منجر به خروج HSC خواهد شد که در این راستا مقدار G-CSF در سرم و MMP-9 در مغز استخوان افزایش می‌یابد. با این حال، تزریق β بلوکرهای عصبی به موش‌های آسیب‌دیده، از حرکت HSCs جلوگیری کرده و مانع از افزایش G-CSF و آنزیم‌های متالوپروتئاز با مکانیسم‌های نامشخص شده و این احتمال وجود دارد که سیستم عصبی و G-CSF دارای فعالیت فیدبک مثبت باشند(۲۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های به دست آمده همراه با مطالعه‌های قبلی می‌توان نتیجه گرفت که تزریق G-CSF ، بیان کاتکول‌آمین‌هایی هم چون اپی‌نفرین را در مغز استخوان افزایش می‌دهد؛ کاتکول‌آمین‌های افزایش یافته با تحریک گیرنده‌های β آدرنرژیک، بیان SDF1 را در مغز استخوان کاهش داده و ترشح آن را به خون محیطی افزایش می‌دهد از طرف دیگر بیان ژن CXCR4 بر روی HSCs را افزایش می‌دهد لذا سلول‌ها به طرف شیب غلظتی ایجاد شده SDF-1 در خون محیطی حرکت می‌کنند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی(شماره ثبت ۵۲۱۲۷۸۲۴) در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. هم چنین لازم است از آقایان احمد عادلی و محمد حسین مقدسی تشکر نماییم.

References :

1- Gillette JM, Lippincott-Schwartz J. Hematopoietic progenitor cells regulate their niche microenvironment through a novel mechanism of cell-cell communication. Commun Integr Biol 2009; 2(4): 305-7.
2- Montgomery M, Cottler-Fox M. Mobilization and collection of autologous hematopoietic progenitor/stem cells. Clin Adv Hematol Oncol 2007; 5(2): 127-36.
3- Méndez - Ferrer S , Battista M , Frenette P. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature 2008; 452(7186): 442-7.
4- Méndez-Ferrer S, Frenette P. Cooperation of beta(2) and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. Ann N Y Acad Sci 2010; 1192: 139-44.
5- Spiegel A, Kalinkovich A, Shivtiel S, Kollet O, Lapidot T. Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with

the microenvironment. Cell Stem Cell 2008; 3(5): 486-92.
6- Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, *et al*. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell 2006; 124(2): 407-21.
7- Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. Auton Autacoid Pharmacol 2003; 23(1): 1-25.
8- Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. Trends Cell Biol 2002; 12(6): 258-66.
9- Kalinkovich A, Spiegel A, Shivtiel S, Kollet O, Jordaney N, Piacibello W, *et al*. Blood-forming stem cells are nervous: Direct and indirect regulation of immature human CD34+ cells by the nervous system. Brain Behav Immun 2009; 23(8): 1059-65.
10- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, *et al*. G-csf induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immonol 2002; 3(7): 687-94.
11- Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood 1998; 91(12): 4523-30.
12- Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol 2002; 30(9): 973-81.
13- Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, Kalinkovich A, Itkin T, Ludin A, *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(8): 1286-96.
14- Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. Blood 2006; 108(3): 812-20.
15- Lemoli RM, de Vivo A, Damiani D, Isidori A, Tani M, Bonini A, *et al*. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-primed bone marrow is effective in supporting myeloablative chemotherapy in patients with hematologic malignancies and poor peripheral blood stem cell mobilization. Blood 2003; 102(5): 140-55.
16- To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. Blood 2011; 118(17): 4530-40.
17- Spiegel A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, *et al*. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. Nat Immunol 2007; 8(10): 1123-31.
18- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, *et al*. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immunol 2002; 3(7): 687-94.
19- Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, *et al*. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. Blood 2004; 104(1): 65-72.
20- Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, *et al*. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. Blood 2005; 106(9): 3020-7.
21- Baranski GM, Offin MD, Sifri ZC, Elhassan IO, Hannoush EJ, Alzate WD, *et al*. β-blockade protection of bone marrow following trauma: the role of G-CSF. J Surg Res 2011; 170(2): 325-31.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 11(4): 271-280

Original Article

Effect of epinephrine on the CXCR4 expression of human cord blood derived CD34$^+$ hematopoietic stem cells

Saba F.[1], Roshandel E.[2], Soleimani M.[1], Atashi A.[1], Gharehbaghian A.[2,3], Abroun S.[1], Kaviani S.[1]

[1]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Recently, circulating hematopoietic stem cells (HSC) have been used for the treatment of most types of leukemia. However, the G-CSF mechanism has not been known yet but it is believed that G-CSF is mostly effective by its indirect functions. The suppression of the nervous system affects G-CSF induced mobilization of HSC. The main gene involved in mobilization is CXCR4 that ligand to SDF-1. So, this study investigates the effect of the main catecholamine of nervous system-Epinephrin- on CXCR4 expression.

Materials and Methods

In this experimental study, isolated cord blood CD34$^+$ cell of 20 healthy newborn with MACs columns treated with 10 μM Epinephrine and 1 μM Proporanolol. Expression of CXCR4 has been investigated at 1, 3 and 5 hours with qRT-PCR. Receptors of beta adrenergic expression have been studied with RT-PCR.

Results

Beta adrenergic receptors are expressed on CD34$^+$ cells. Epinephrine led to significantly increased CXCR4 in hours 1 (3.2 ± 0.5), 3 (2.4 ± 0.4) and 5 (2.2 ± 0.4). Cells treated with propranolol, return increased CXCR4 induced by epinephrine.

Conclusions

It can be concluded that G-CSF affects the expression of CXCR4 through increasing secretion of epinephrine in bone marrow with on beta adrenergic receptors. Cells with increased CXCR4 mobilized to release SDF-1 in peripheral blood.

Key words: Hematopoietic Stem Cells, Epinephrine, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, CXCR4 Receptor

Received: 21 May 2013
Accepted: 10 Jun 2014

Correspondence: Soleimani M., PhD of Hematology. Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: *soleim_m@modares.ac.ir*