

اثر اپی نفرین بر بیان ژن CXCR4 در سلول‌های بنیادی خونساز CD34⁺ خون بند ناف

فخرالدین صبا^۱، الهام روشنند^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 - اپی نفرین - بر بیان ژن CXCR4 طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، بعد از جداسازی سلول‌های CD34⁺ خون بند ناف ۲۰ نوزاد سالم در انتهای هفته ۳۶ بارداری با روش MACs (Magnetic Cell Sorting of human cells)، سلول‌های با دوز ۱۰ میکرومولار اپی نفرین 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 آدرنژیک سلول‌های CD34⁺ با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

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

نتیجه‌گیری

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

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

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۳- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۱۱

۴- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۵- PhD ایمونوهماولوژی بالینی - استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۶- PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - 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) تاثیر در افزایش خروج HSCs از مغز استخوان نخواهد داشت (۴-۶). 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 اپی نفرین، نوراپی نفرین 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 $\beta 2$ بیشترین اثر عصبی را بر روی این سلول‌ها دارد (۹). با این وجود انواع $\beta 1$ ، $\beta 3$ و α نیز حایز اهمیت هستند، اگر چه داده‌های اندکی در این زمینه وجود دارد. از اوایل سال ۲۰۰۰ مطالعات 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 گرادینت 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 $CD34^+$ به طرف لیگاند مترشح می‌شود (۱۳). استفاده از آنتی‌بادی‌های مهارنده SDF-1 یا CXCR4 منجر به کاهش حرکت HSCs متعاقب تزریق محرک‌هایی مثل AMD3100 (Plerixafor) 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

جهت نمونه کنترل (Isotype Control) به جای آنتی‌بادی CD34-PE، از محلول کنترل منفی (Mouse IgG₁) 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 $10^3 \times 250$ 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 پروپرانولول و از ۳ بازه زمانی ۱، ۳ و ۵ ساعت استفاده شد (۳، ۶). سلول‌ها در ۳ چاهک با اپی‌نفرین ۱۰ میکرومولار و در ۳ چاهک دیگر با اپی‌نفرین 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 کزازول 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 ۱۳۲۰۰ rpm 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 ۱۲۰۰۰ rpm 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

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 ۳۰۰ G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی با PBS (phosphate buffered saline) پیتاژ شد و به آرامی به نسبت ۱ به ۲ بر روی محلول قندی فایکول (Ficol) ریخته شد و در دور ۴۵۰ G 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 ۳۰۰ G 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 (۱۰ ng/mL) می‌باشد، نگهداری شدند.

فلوسیتومتری:

جهت تعیین خلوص سلول‌های CD34⁺ جدا شده، از فلوسیتومتری استفاده شد. برای این منظور حدود $10^3 \times 5-4$ سلول CD34⁺ به لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محیط کشت رویی دور ریخته شد و به رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد. بعد از اضافه کردن حدود ۵-۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال CD34-PE به سوسپانسیون سلولی، ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد.

به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm 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 کیزول جداسازی شد. در ادامه، ساخت cDNA و اکشن رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت (فرمتاز، ۱۶۲۲ K) و ۱ μL آغازگر ۱۸ اولیگو (dT) انجام شد. در ادامه و اکشن PCR با ۲ μM dNTP، ۱ μg cDNA، بافر PCR (فرمتاز) ۱X، ۰/۷۵ mM MgCl₂، ۱ μL Tag DNA، ۱ U/۲۵ پلی‌مراز فرمتاز و ۰/۵ میکرومول از آغازگرهای ژن‌های اختصاصی گیرنده‌های β آدرنژیک در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد 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 آدرنژیک

AGTGGCTTGCTGATGTTCTCT	ADRβ1-F	bp
ATGCTTCTCCCTTCCCTAA	ADRβ1-R	۱۴۶
CTGTGACTTCTTACGAACCAAG	ADRβ2-F	bp
GATTTGTCAATCTTCTGGAGCTGC	ADRβ2-R	۱۳۲
CTTTGCCAACGGCTCGAC	ADRβ3-F	bp
TGGAGGGTAGAGTGTACACGC	ADRβ3-R	۱۳۵

اجرای qRT-PCR:

qRT-Real Time PCR یک روش بسیار قوی است که برای بررسی بیان کمی ژن مورد نظر استفاده می‌شود. در

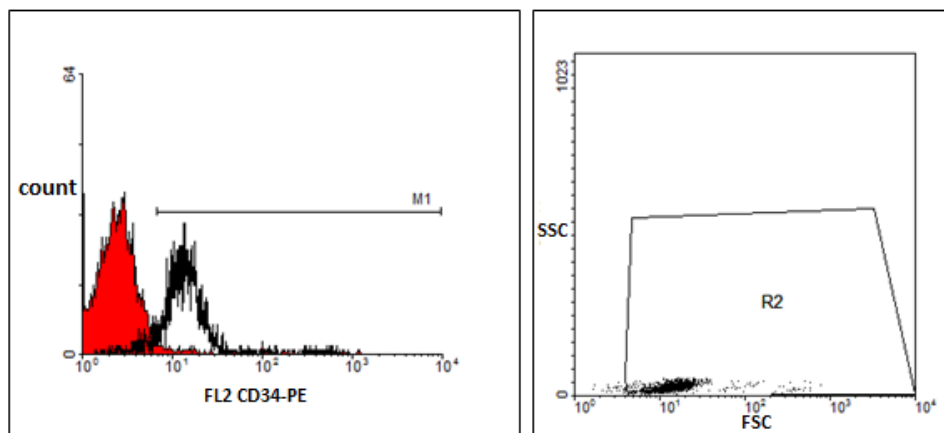
مطالعه حاضر از روش دو مرحله‌ای SYBR Green استفاده شد به این صورت که ابتدا از RNA ژنومی cDNA تهیه و سپس در تیوب جداگانه cDNA را به DNA دو رشته‌ای مبدل کردیم.

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 و برگشت CCTGGCGTCGTCATTAGTAGTG (5' to 3')، آغازگر رفت TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC (5' to 3')، آغازگر رفت CXC4R4 : GGTCCATGGTTACCAGAAGA (5' to 3') و آغازگر برگشت CXC4R4 (5' to 3') : GTC ATC. کیت Power SYBER Green PCR Master Mix (شرکت ABI) خریداری شد. ۰/۷۵ μL از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت SYBR Green ۱۰ μL، ddH₂O ۶/۵ μL، ۱۰ μmol و ۲ μL cDNA با رقت ۰/۱ به تیوب‌های ویژه اضافه شد. و اکشن تکثیری بر طبق الگوی دمایی خاص، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، خوانش پلیت‌ها و ۴۰ مرتبه تکرار مراحل از مرحله ۲ در داخل دستگاه Step-one ABI اجرا گردید.

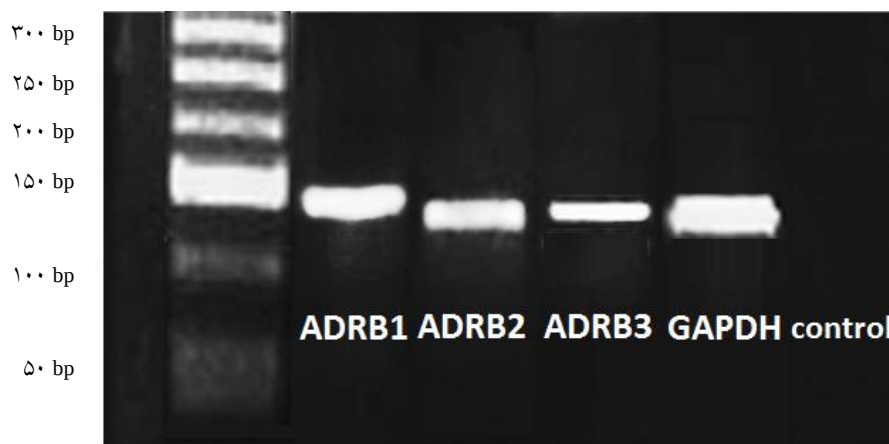
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

پروفایل بیان ژنی به طور نسبی و با روش ۲-ΔΔCt 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 ۰/۰۵ < p گزارش شدند.



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



شکل ۲: بیان کیفی انواعی از رسپتورهای β آدرنرژیک در HSCs. هر سه نوع رسپتور ADRB1، ADRB2 و ADRB3 توسط HSCs بیان می شود. control و GAPDH جهت صحت آزمایش گذاشته شد.

یافته ها

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 می دهد.

بیان گیرنده های β آدرنرژیک در سلولهای خونساز $CD34^+$:

جهت اثبات بیان رسپتورهای β آدرنرژیک از روش

RT-PCR استفاده شد. بررسی های RT-PCR نشان داد که هر ۳ گیرنده ژن β آدرنرژیک (β_1 ، β_2 و β_3) در سلولهای $CD34^+$ جدا شده از بند ناف دارای بیان می باشد (شکل ۲).

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

اپی نفرین منجر به افزایش معناداری در بیان ژن CXCR4 شد به طوری که افزایش در ساعت های ۱، ۳ و ۵ به نسبت کنترل معنادار می باشد (نمودار ۱). بیشترین بیان CXCR4، را می توان در ساعت ۱ مشاهده کرد ولی افزایش بیان ساعت ۱ نسبت به ساعت ۳ و ۵ معنادار

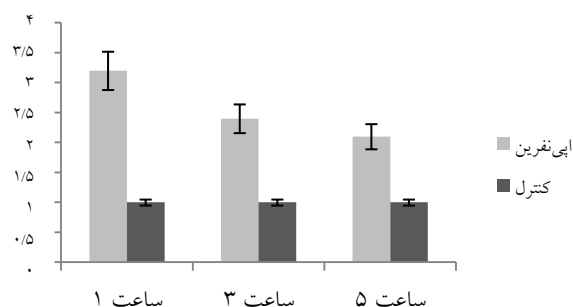
نمی باشد.

می کند و هر ۳ نوع گیرنده β آدرنژیک را مهار می کند. بنابراین تنها گیرنده های آلفا آدرنژیک در دسترس اپی نفرین باقی می مانند. افزودن ۱ میکرومولار پروپرانولول به سلول های خون ساز $CD34^+$ نیم ساعت قبل از تیمار با اپی نفرین، منجر به خنثی شدن اثر اپی نفرین بر بیان CXCR4 شد و در هر ۳ بازه زمانی، مقدار CXCR4 با نوع کنترل برابری می کرد (نمودار ۲).

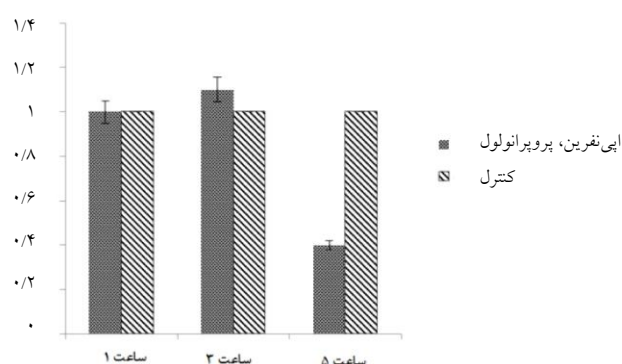
بحث

از HSCs خون محیطی جهت پیوند مغز استخوان به منظور درمان بسیاری از بیماری های خونی از جمله لوسمی ها استفاده می شود (۱۵). بنابراین امروزه تلاش زیادی جهت تسهیل ورود این سلول ها از مغز استخوان به خون محیطی و افزایش تعداد آن ها در گردش خون صورت گرفته است. یکی از بزرگترین چالش ها، مقاومت برخی اهداکنندگان سلول های بنیادی مغز استخوان به فاکتورهای تحریک کننده مثل G-CSF است به طوری که بعد از ۵ روز تزریق G-CSF، هم چنان سطح پایینی از $CD34^+$ در خون محیطی وجود دارد (۱۶). بر این اساس شناخت مولکول های دخیل در خروج سلول های بنیادی از مغز استخوان، یکی از مسائل اساسی در جهت بهبود پیوند است (۱۶). در این راستا سیستم عصبی، به عنوان اصلی ترین سیستم تنظیم کننده بدن، دارای نقش اساسی در حرکت سلول های $CD34^+$ می باشد و داده های زیادی در این زمینه وجود دارد (۱۷، ۵، ۴).

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



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



نمودار ۲: تاثیر هم زمان پروپرانولول ۱ میکرومولار و اپی نفرین ۱۰ میکرومولار در بیان ژن CXCR4 در ساعت های ۱، ۳ و ۵: مقدار بیان ژن CXCR4 در هر ۳ بازه زمانی با نوع کنترلی برابری می کند. نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت (mean $\pm$ SD) می باشند. ساعت اول ($۱ \pm ۰/۱$)، ساعت سوم ($۱ \pm ۰/۱$)، ساعت پنجم ($۰/۴ \pm ۰/۰۵$)

اپی نفرین می تواند بر روی گیرنده های α و β آدرنژیک اثر بگذارد از این رو جهت تعیین نوع گیرنده دخیل در عملکرد اپی نفرین جهت افزایش CXCR4 از مهارکننده های β آدرنژیک (پروپرانولول) استفاده شد. پروپرانولول به صورت یک آنتاگونیست اختصاصی β آدرنژیک عمل

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 اپی نفرین 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 کاتکول‌آمین‌ها 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 پروژنیوتورهای 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 کاهش بیان SDF-1 شده که در نهایت به خروج HSCs از مغز استخوان می‌انجامد.

در سال ۲۰۰۶ کاتایاما به صورت *In vitro* و *In vivo* 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 CXCL12 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 کاتکول‌آمین‌ها انجام می‌دهد و این فرضیه با داده‌های حاصل از این تحقیق هم راستا می‌باشد.

در سال ۲۰۰۷، اسپیکل، نشان داد که کاتکول‌آمین‌ها با واسطه سیگنالینگ Wnt، منجر به مهاجرت و لانه‌گزینی سلول‌های $CD34^+$ می‌شوند. تیم اسپیکل 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 اپی نفرین 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 β_3 بر عهده دارند که بر روی SDF-1 اثر می‌گذارد (۳). با این حال هنوز بر روی تغییرات

در سال ۲۰۱۱، گرگ و همکارانش بر روی اثر شوک و آسیب‌های بافتی در حرکت پروژنیوتورهای 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 اپی نفرین را در مغز استخوان افزایش می‌دهد؛ کاتکول‌آمین‌های افزایش یافته با تحریک گیرنده‌های β آدرنژیک، 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 عادل و محمد حسین مقدسی تشکر نمایم.

شبهانه 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 مندر بر عملکرد گیرنده‌های $\beta 2$ و $\beta 3$ متعاقب تزریق G-CSF به موش‌ها مطالعه کرد. آن‌ها نشان دادند که نقش اصلی را $\beta 2$ بر عهده دارد به طوری که مهار گیرنده $\beta 2$ منجر به مهار حرکت HSCs می‌شود (۴). این یافته‌ها، با نتایج تحقیق حاضر در مورد عملکرد تحریک‌کننده گیرنده‌های عصبی آدرنژیک 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 آدرنژیک می‌باشد.

در سال ۲۰۱۱، دار و همکارانش به بررسی اثر نوراپی نفرین بر روی SDF-1 در موش‌ها پرداختند. این گروه نشان دادند که به دنبال تزریق نوراپی نفرین، ترشح SDF-1 از مغز استخوان به خون محیطی افزایش یافته و هم‌زمان از مقدار آن در مغز استخوان کاسته می‌شود. در واقع این گروه بر اصل فرآیند حرکت شیب غلظتی HSC 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 کاتکول‌آمین اپی نفرین، 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 پروژنیوتورهای خون‌ساز، شرایط را برای خروج این سلول‌ها از مغز استخوان هموار می‌کند.

References :

- 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.
- Montgomery M, Cottler-Fox M. Mobilization and collection of autologous hematopoietic progenitor/stem cells. *Clin Adv Hematol Oncol* 2007; 5(2): 127-36.
- Méndez - Ferrer S, Battista M, Frenette P. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452(7186): 442-7.
- 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.
- Spiegel A, Kalinkovich A, Shvitiel 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, Shvitiel 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 Immunol* 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, Shvitiel 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 potentially 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.

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

¹Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Pediatric 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 μ M Epinephrine and 1 μ M Propranolol. 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