

تأثیر عصاره بایکالین، فعال کننده $\text{PPAR}\gamma$ بر تمایز اریتروئیدی سلول‌های بنیادی خونساز CD133^+ بند ناف

پروانه عباسی^۱، کریم شمس اسنجان^۲، علی اکبر مؤثق پور^۳، پروین اکبرزاده لاله^۴، نیما دهدیلائی^۵

چکیده

سابقه و هدف

ریشه خشک شده گیاه بایکالین، اثرات ضد ویروسی و ضد سرطانی دارد. این مطالعه جهت آشکارسازی اثر عصاره این گیاه بر روند تمایز سلول‌های بنیادی خونساز CD133^+ به رده اریتروئیدی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، جهت تعیین اثر لیگاند های $\text{PPAR}\gamma$ (بایکالین و تروگلیتازون) بر روند تمایز سلول‌های بنیادی در حین اریتروپوئز، سلول‌های CD133^+ از خون بند ناف جدا شدند و پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف بایکالین، تروگلیتازون، سیتوکاین‌های اریتروپوئتین (EPO) و استم سل فاکتور (SCF)، در انکوباتور کشت سلولی قرار داده شدند. پس از ۹ روز بررسی تغییرات مورفولوژی توسط رنگ‌آمیزی رایت گیمسا، تغییرات درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای سطحی با فلوسیتومتری و ارزیابی کلنی‌های تشکیل شده در محیط نیمه جامد متیل سلولز انجام شد.

یافته‌ها

بررسی میکروسکوپی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ رایت گیمسا، نمایانگر بلوغ اریتروئیدی سلول‌های بنیادی CD133^+ در حضور سیتوکاین‌های SCF و EPO بود. بررسی فلوسیتومتری سلول‌ها نشانگر کاهش درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای اریتروئیدی گیرنده ترانسفرین (TfR) و گلیکوفورین A (GPA) در مجاورت تروگلیتازون و بایکالین بود ($p < 0/03$). اثر بازدارنده بر اریتروپوئز تروگلیتازون بیشتر از بایکالین بود. آزمایش سنجش کلنی نیز کاهش چشمگیر کلنی‌ها را در مجاورت تروگلیتازون و بایکالین نشان می‌دهد ($p < 0/02$).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که آگونیست‌های $\text{PPAR}\gamma$ ، تعدیل‌کننده روند تمایز سلول‌های بنیادی CD133^+ به رده اریتروئیدی بوده و نقش مهمی در تنظیم روند اریتروپوئز نرمال به عهده دارند. لذا با توجه به استفاده این عصاره گیاهی جهت درمان برخی بیماری‌ها، باید اثر بازدارندگی آن بر اریتروپوئز طبیعی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بایکالین، اریتروپوئز، سلول‌های بنیادی خونساز، PPAR گاما

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۵

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات خون و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تبریز - تبریز - ایران - صندوق پستی: ۵۱۳۳۵
- ۳- PhD هماتولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران
- ۴- دکترای بیوتکنولوژی دارو - استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران
- ۵- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران

مقدمه

گیاه اسکوتلاریا بایکالالزیزس جورجی (*Scutellaria baicalensis georgi*)، یک گیاه گل دار چند ساله از خانواده Lamiaceae می باشد که در ژاپن، چین، کره و نیز به صورت سازگار شده با شرایط اروپای مرکزی مثل آلمان و لهستان کشت داده می شود (۱).

ریشه خشک شده این گیاه *Radix scutellariae*، مقادیر بالایی از فلاونوئیدها شامل بایکالین (۵ و ۶ دی هیدروکسی ۸- متوکسی فلاون) بیشتر از ۱۴٪، بایکالین (۵ و ۶ و ۷ تری هیدروکسی فلاون) بیشتر از ۷٪ و گونین (۵ و ۷ دی هیدروکسی ۸- متوکسی فلاون) ۷٪ و ... دارد (۱). بایکالین، فلاونوئید اصلی یافت شده در *Scutellaria radix* می باشد. در تعدادی از مطالعه ها اثرات ضد سرطانی و حفاظتی بایکالین در برابر آسیب های بافتی و ارگان ها نشان داده شده است. تاکنون در مورد اثرات بایکالین بر سیستم عصبی و عضله - اسکلتی، تاثیرات ضد التهابی و آنتی اکسیدان، درمان بیماری های قلبی، فعالیت های ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد سرطانی، تاثیر آن بر توقف چرخه سلولی در فاز G1 و آپوپتوز سلول های سرطانی بررسی هایی انجام شده است (۸-۲). به علاوه اثرات ضد تکثیر آن در سرطان های مختلف نظیر ریه، هپاتوکارسینوما، پروستات و نیز سل لاین های سرطانی مختلف توسط گروه های تحقیقاتی مختلف نشان داده شده است (۹-۱۱). افزودن بایکالین به سل لاین اریترولوسمی K562، تمایز به سمت رده اریتروئیدی را مهار می کند و توانایی ایجاد کلنی را از طریق تاثیر بر مسیر سیگنالینگ Notch کاهش می دهد (۱۲).

بایکالین یکی از آگونیست های γ PPAR (γ proliferator-activated receptor) می باشد. γ PPAR یک فاکتور نسخه برداری فعال شونده توسط لیگاند، متعلق به سوپر فامیلی نوکلئوسپتورها است (۱۳). نوکلئوسپتورهای انسانی، خانواده ای متشکل از ۴۹ عضو بوده که درون هسته یا سیتوپلاسم یافت می شوند، مسئول پاسخگویی به هورمون های تیروئیدی یا استروئیدی می باشند و در کنترل توسعه، هموستاز و متابولیسم ارگانیزم نقش دارند (۱۴). نوکلئوسپتور γ PPAR در سطوح بالا در بافت های چربی

بیان شده و نقش اصلی در تمایز ادیپوسیت ها دارد (۱۵). علاوه بر آن، در بسیاری سل لاین های دیگر شامل هپاتوسیت ها، فیبروبلاست ها و سلول های اپی تلیال سینه و کلون نیز یافت شده است. در مورد بافت های هماتوپوئیتیک، بیان γ PPAR در سلول های استرومال مغز استخوان، سلول های پروژنیاتور $CD34^+$ ، سلول های مونوسیت / ماکروفاژ نرمال، لنفوسیت ها و نوتروفیل ها گزارش شده است که نشان می دهد γ PPAR، نقش حیاتی در اریترورژنر علاوه بر آدیپورژنر دارد (۱۶، ۱۷). علاوه بر این γ PPAR در فرآیندهای تکثیر HSC، استئوکلاستورژنر و تمایز به رده مونوسیتی نقش دارد (۱۸).

لیگاندهای γ PPAR اثرات تعدیل کننده ای بر تکثیر و تمایز سل لاین های سرطانی مختلف نشان داده اند و لذا بسیاری از آن ها کاربرد بالینی مختلف و گسترده ای پیدا کرده اند (۱۹).

لیگاندهایی مثل تروگلیتازون و پلی گلیتازون که به طور گسترده در درمان دیابت ملیتوس تیپ ۲ و مشتقات جدید آن که به علت اثرات آنتی پرولیفراتیو در درمان سرطان ها مورد استفاده قرار می گیرند، تکثیر سلول های پروژنیاتور اریتروئیدی اولیه را سرکوب و دچار تاخیر می کنند (۲۲-۲۰). تروگلیتازون مشابه سایر تiazolidazone ها TZD (پیگلایتازون و نوروزگلیتازون)، از طریق فعال سازی γ PPAR عمل می کند و از این طریق بر متابولیسم استخوان نیز تاثیر دارد (۲۳).

تروگلیتازون لیگاندی برای هر دو α PPAR و به طور قوی تر برای γ PPAR می باشد. عصاره گیاهی بایکالین فعال کننده γ PPAR است که به دلیل اثرات ضد سرطانی خود، مورد توجه در درمان بسیاری از بیماری ها است. فعال شدن γ PPAR می تواند منجر به کاهش تمایز رده اریتروئیدی شود لذا در این تحقیق اثرات این مولکول در تمایز، بقا و تکثیر سلول های بنیادی خونساز به رده اریتروئیدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی و نشاندار کردن سلول های $CD133^+$:

در این مطالعه تجربی، نمونه های خون بند ناف، پس از

تکمیل فرم رضایت‌نامه توسط مادران، از نوزادان زنان سالم و نرمال به طور تصادفی انتخاب شدند. به این منظور، از بند ناف‌های تازه در هنگام زایمان فول ترم و حداکثر تا چهار ساعت پس از آن استفاده شد. خون با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ (HES) (۶٪ HAES-steril، Freeflex) در غلظت نهایی ۲/۵٪، رقیق و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در لوله‌هایی با قطر ۱۲ میلی‌متر با قدرت ۵۰ g سانتیفریوژ شد. سپس لایه پلاسمایی حاوی سلول‌های تک هسته‌ای جمع‌آوری و پس از سانتیفریوژ، رسوب سلولی در محلول PBS سوسپانسیون شده به روی فایکول (ایران، بهار افشان) (۱/۰۷۷ g/mL) برده شد و با قدرت ۸۰۰ g به مدت ۳۵ دقیقه سانتیفریوژ گردید. سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای به دست آمده از فایکول، با آنتی‌بادی‌های CD133 مگنتیک مجاور شد و در دمای ۴-۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از شستشو، از سلول‌ها در حجم مناسب PBS سوسپانسیون تهیه شد. غنی‌سازی و جداسازی سلول‌های CD133⁺ با ستون (آلمان، میلتنی بیوتک) (۱۰۷) LS و به روش انتخاب مثبت انجام شد. پس از آماده‌سازی ستون با PBS و افزودن سلول‌ها، سلول‌های نشاندار نشده از ستون عبور کرده و خارج شدند. سپس ستون از جداکننده مگنتیک (Separator) خارج و سلول‌های نشاندار با جریان سریع شسته شد و بعد از سانتیفریوژ، با قدرت ۳۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در حجم ۵۰۰ میکرولیتر مایع به صورت سوسپانسیون در آمد.

کشت سلول‌های بنیادی خونساز (HSC):

سلول‌های CD133⁺ جدا شده در محیط کشت (آلمان، سیگما) IMDM حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور CO₂ ۵٪ تکثیر پیدا کردند. سیتوکاین‌های TPO ۱۰۰ ng/mL، SCF ۱۰۰ ng/mL و FLT3L ۱۰۰ ng/mL (کانادا، ونکوور، استم سل تکنولوژیس) و نیز پنی سیلین و ۱۰۰ U/mL پنی سیلین (جیبکو) جهت تکثیر این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های تکثیر یافته به منظور تمایز اریتروئیدی در محیط کشت IMDM در پلیت ۹۶ خانه‌ای در

حضور سیتوکاین‌های SCF ۲۰ ng/mL و EPO ۴/۵ U/mL کشت داده شدند و از روز چهارم هر سه روز یک بار محیط کشت کاملاً تعویض و سیتوکاین تازه افزوده شد. جهت بررسی اثرات آگونیست‌های PPAR γ از قبیل بایکالین (سیگما، آلمان) و تروگلیتازون (سیگما، آلمان) بر روند تمایز اریتروئیدی، تکثیر و تمایز سلول‌ها در حضور و فقدان این مواد سنجیده شد. بایکالین و تروگلیتازون در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به صورت محلول درآمدند و غلظت‌های مختلف بایکالین (۱، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومول) و نیز تروگلیتازون (۰/۱، ۱، ۳ و ۱۰ میکرومول) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تمایز سلولی با فلوسیتومتری:

جهت تعیین میزان تمایز اریتروئیدی، بیان CD71 (رِسپتور ترانسفرین (TfR)) و گلیکوپروتئین A (GPA) بر سطح سلول‌های تمایز یافته با کمک فلوسیتومتری بررسی شد. تعداد ۱۰^۵ سلول با PBS دو بار شستشو داده شد و سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی-GPA کنژوگه شده با FITC (دانمارک، داکو) و آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی-CD71 کنژوگه شده با PE (دانمارک، داکو) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای یخچال انکوبه شد و سپس با کمک فلوسیتومتری آنالیز شد.

ارزیابی توانایی تشکیل کلنی (CFU-assay):

توانایی سلول‌های HSC جهت ایجاد کلنی با افزودن آن‌ها به محیط متیل سلولز (MC) بر پایه IMDM بررسی شد. جهت تهیه محیط MC، ۲۶ گرم از MC (M-2۸۱، فیشر) اتوکلاو شده به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل (۹۰ درجه سانتی‌گراد - ۷۰ درجه سانتی‌گراد) افزوده شد. به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از تیغه مگنتیک به هم زده شد و سپس با افزودن تدریجی ۵۰۰ mL از محیط IMDM 2x به محیط، فرآیند تشکیل ژل آغاز شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۶ ساعت به طور کامل به صورت ژل در آمد. جهت بررسی توانایی تشکیل کلنی، ۱ × ۱۰^۴ سلول را در ۱۰۰ میکرولیتر محیط IMDM حل کرده و غلظت ۵۰ μ M بایکالین و ۳ μ M تروگلیتازون همراه با

یافته‌ها

بررسی مورفولوژیک سلول‌های تمایز یافته اریتروئیدی: جهت بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌های حاصل از تکثیر و تمایز $CD133^+$ به سلول‌های تمایز یافته رده اریتروئیدی، رنگ‌آمیزی رایت - گیمسا انجام شد و تمایز پیش‌سازها به رده‌های اریتروئیدی نیز مشاهده شد، که مورفولوژی تاییدی بر روند تمایزی این سلول‌ها می‌باشد (شکل ۱).

اثر بایکالین بر بیان رسپتور ترانسفرین (TfR) و گلیکوپروتئین ($A(GPA)$) بر سطح سلول‌های تمایز یافته در مقایسه با تروگلیتازون:

به منظور بررسی اثرات بایکالین به عنوان یکی از لیگاندهای $PPAR\gamma$ بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک جدا شده از خون بند ناف و تاثیر آن بر روند تمایز اریتروئیدی، سلول‌های $CD133^+$ با غلظت‌های مختلف بایکالین (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومول) و نیز تروگلیتازون (۱، ۰/۱) در محیط کشت IMDM حاوی ۲۰٪ FBS به مدت هفت روز انکوبه شدند و سپس بیان GPA و TfR با فلوسیتومتری بررسی شد. فلوسیتومتری در بیمارستان قاضی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با دستگاه فلوسیتومتری (BD، FACSCalibur) انجام شد. سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک $CD133^+$ در محیط کشت IMDM کنترل به همراه سیتوکاین‌های EPO و SCF به رده اریتروئیدی تمایز پیدا کردند که با تغییر در بیان GPA و

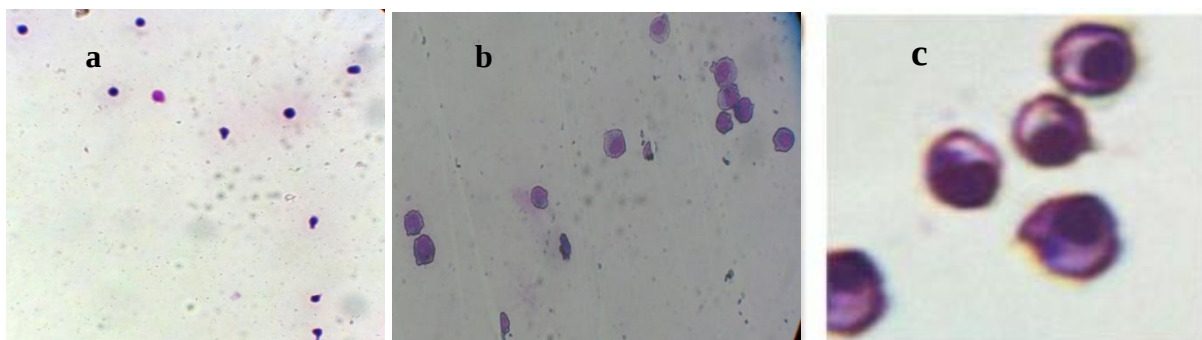
سیتوکاین‌های $rh\ EPO\ 4\ U/mL$ و $rh\ SCF\ 20\ ng/mL$ به ۱ میلی لیتر از محیط MC آماده شده اضافه شد. سپس این محیط با نیدل ۱۶ G به درون پلیت کشت سلولی ریخته شده و پلیت به مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 و در محیط مرطوب قرار داده شد. آزمایش سنجش کلنی در مقایسه با کنترل بدون حضور آگونیست‌ها انجام شد.

بررسی مورفولوژیک سلول‌های تمایز یافته اریتروئیدی: جهت بررسی تغییرات تمایزی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ رایت-گیمسا انجام گرفت و سپس بررسی میکروسکوپی سلول‌ها انجام پذیرفت.

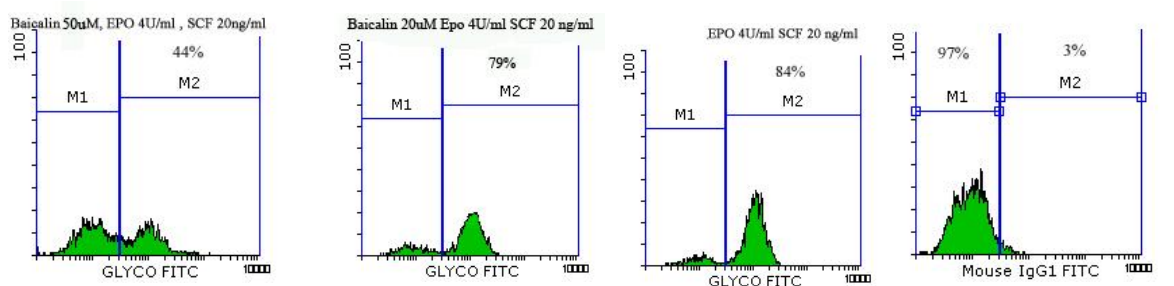
ارزیابی تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده از طریق فلوسیتومتری:

سلول‌های کشت داده شده در حضور آگونیست‌های $PPAR\gamma$ و تعداد سلول‌های زنده و مرده از طریق برداشت حجم ثابت از سوسپانسیون سلولی از این سلول‌ها و آنالیز آن از طریق فلوسیتومتری (Epics Elite ESP) انجام شد. از طریق نمودار خصوصیات سلولی در FS و SS، می‌توان تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده موجود در نمونه را محاسبه کرد (۲۴، ۲۵). همه داده‌ها به صورت $mean \pm SD$ گزارش شدند.

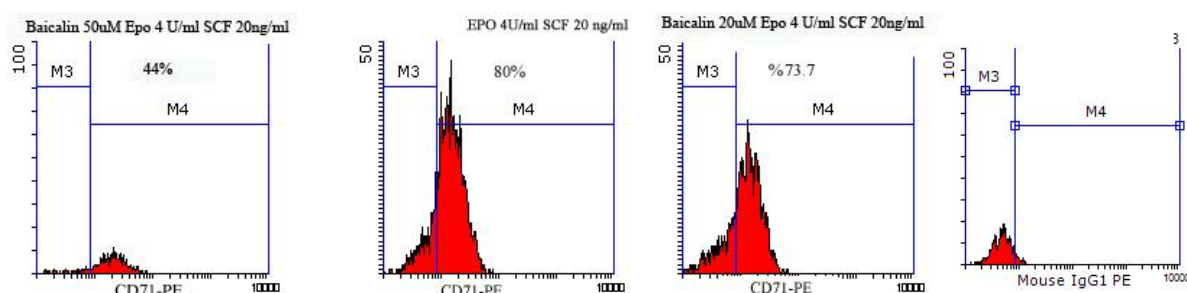
آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون t-Student در نرم‌افزار SPSS ۱۷ انجام شد.



شکل ۱: سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا در روز هفتم تمایز اریتروئیدی (a) HSC های جدا شده از بند ناف در روز صفر $\times 10$ (b) سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در روز هفتم تمایز بزرگ‌نمایی $\times 40$ (c) سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در روز هفتم تمایز بزرگ‌نمایی $\times 100$



a) Glycophorin A



b) Transferrin Receptor (CD71)

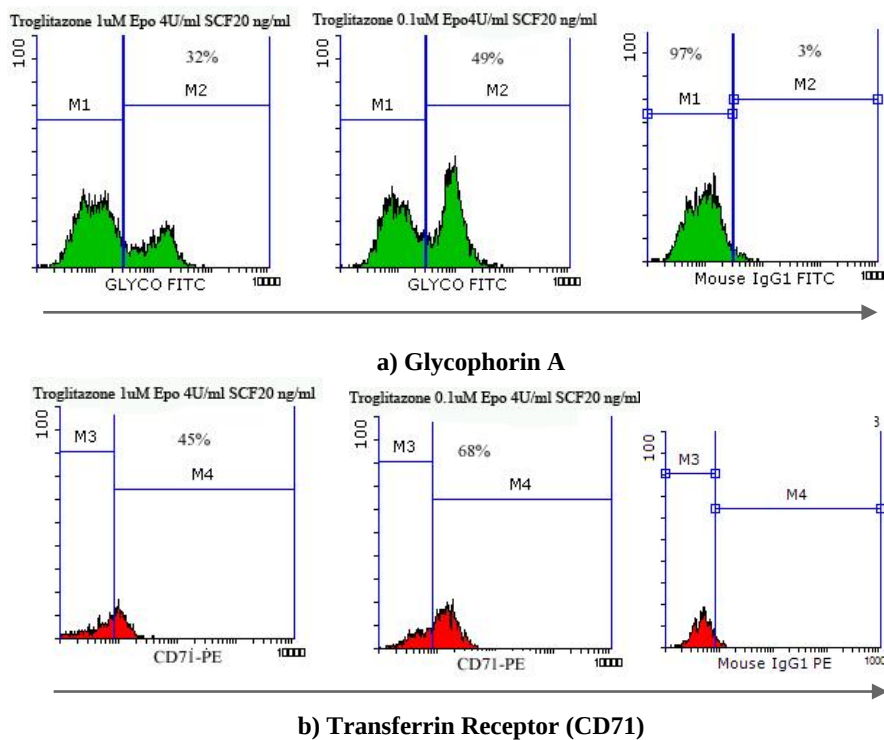
شکل ۲: بیان رستپورهای سطحی GPA (a) و CD71 (b) از طریق فلوسیتومتری در روز هفتم تمایز اریتروئیدی در محیط کشت IMDM حاوی سیتوکاین‌های EPO ۴/۵ U/mL و SCF ۲۰ ng/mL در غلظت‌های (۲۰ و ۵۰ میکرومول) بایکالین و در حضور کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

TfR همراه بود. میانگین درصد سلول‌ها، بیان‌کننده GPA در روز هفتم در غلظت ۱۰ میکرومول بایکالین مشابه نمونه کنترل و ۸۴ ± ۲ درصد بود (p=۰/۰۳، n=۳). هم چنین در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومول به ترتیب ۷۹/۵ ± ۴ و ۴۴ ± ۳ بوده که نشان‌دهنده کاهش معنادار تعداد سلول‌های عرضه‌کننده GPA به طور وابسته به دوز است (۳) (p<۰/۰۱، n=۳). علاوه بر آن در بررسی سلول‌های عرضه‌کننده TfR نیز کاهش میزان این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز مشاهده شد. میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده TfR در روز هفتم در بررسی فلوسیتومتری در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومول) به ترتیب ۸۰ ± ۵، ۷۳ ± ۵ و ۱۷ ± ۳ بود. درصد سلول‌های بیان‌کننده TfR همانند بیان GPA در غلظت ۱۰ میکرومول بایکالین مشابه نمونه کنترل بود (n=۳). در مقایسه، در تیمار با ترোগلیتازون به عنوان فعال‌کننده PPARγ در روز هفتم، میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکر اریتروئیدی GPA در غلظت ۱/۰ و ۱ میکرومول به ترتیب

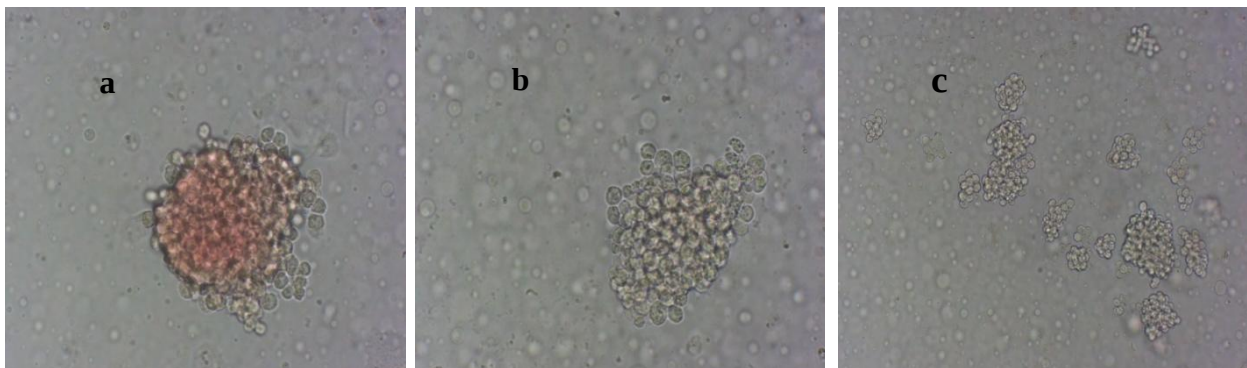
۴۹ ± ۳ و ۳۲ ± ۵ و مارکر CD71 به ترتیب ۶۸ ± ۴ و ۴۵ ± ۲ بود. بنابراین کاهش معنادار درصد سلول‌های بیان‌کننده رستپورهای سطحی در غلظت ۵۰ μM بایکالین و ۳ μM ترোগلیتازون روی داد (p<۰/۰۲، n=۳) و (p=۰/۰۱) (شکل ۲ و ۳).

اثر بایکالین بر توانایی تشکیل کلنی اریتروئیدی در محیط نیمه جامد متیل سلولز در مقایسه با ترোগلیتازون:

آزمون سنجش کلنی به منظور بررسی فعالیت عملکردی سلول‌های بنیادی خونساز انجام شد. غلظت‌هایی از بایکالین و ترোগلیتازون که سرکوب معنادار بیان رستپورهای سطحی را نشان دادند (غلظت ۵۰ μM بایکالین و ۳ μM ترোগلیتازون) انتخاب شد و همراه با سیتوکاین‌های rhEPO ۴ U/mL و rhSCF ۲۰ ng/mL در انکوباتور با ۵٪ CO₂ قرار داده شد. مقایسه با کنترل آزمون سنجش کلنی انجام شد (p=۰/۰۰۱، n=۳) (نمودار ۱). شکل ۴ تشکیل کلنی‌های اریتروئیدی را بعد از ۹ روز نشان



شکل ۳: بیان رسپتورهای سطحی GPA و CD71 از طریق فلوسیتومتری در روز هفتم تمایز اریتروئیدی در محیط کشت IMDM حاوی سیتوکاین‌های SCF ۲۰ ng/mL و EPO ۴/۵ U/mL در غلظت‌های مختلف تروگلیتازون (۱/۰، ۱ میکرومول) و در حضور آنتی‌بادی ایزوتیپیک کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

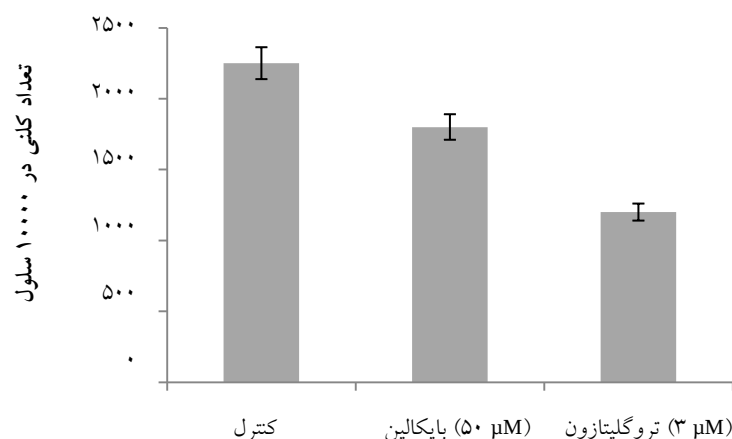


شکل ۴: کلنی‌های ایجاد شده پس از ۹ روز در محیط نیمه جامد متیل سلولز (a) کلنی‌های مختلف در بزرگ‌نمایی $\times 10$ (b) کلنی گرانولوسیتی با بزرگ‌نمایی $\times 40$ (c) کلنی اریتروئیدی با بزرگ‌نمایی $\times 40$

سلول‌های زنده شد. ارزیابی از طریق برداشت حجم ثابت از سوسپانسیون سلولی از همه غلظت‌های آگونیست‌ها و آنالیز آن‌ها از طریق فلوسیتومتری (Epics Elite ESP) انجام شد. از طریق هیستوگرام خصوصیات سلولی در FS و SS، تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده موجود در نمونه محاسبه شد، شد (۲۴، ۲۵).

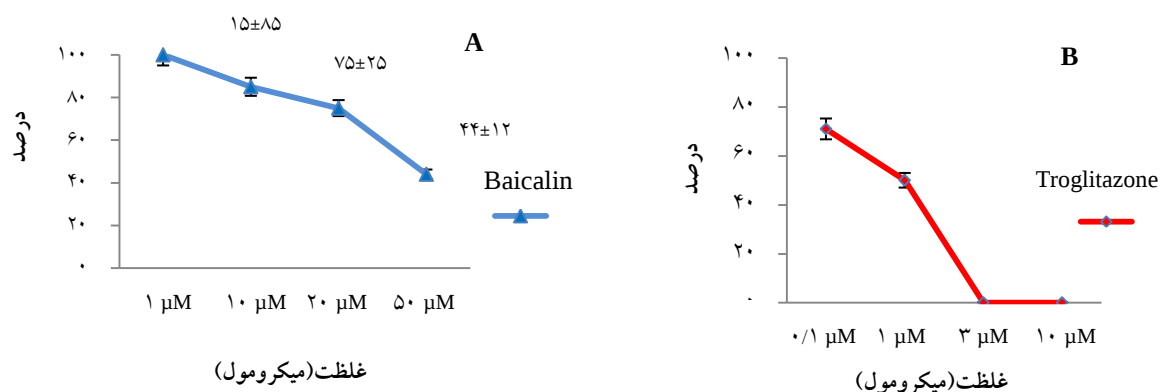
می‌دهد. ارزیابی تعداد سلول‌های زنده و غیر زنده با روش فلوسیتومتری:

مجاورت سلول‌های $CD133^+$ با آنتاگونیست‌های PPAR γ (باپکالین و تروگلیتازون) باعث کاهش تعداد



ارزیابی کلنی‌ها در ۹ روز

نمودار ۱: ارزیابی اثر بایکالین و تروگلیتازون بر توانایی تشکیل کلنی سلول‌های $CD133^+$. تعداد کلنی‌های تشکیل شده در روز نهم به ازای ۱۰۰۰۰ سلول اولیه در حضور غلظت ۵۰ میکرومول بایکالین و غلظت ۳ میکرومول تروگلیتازون با مدرج کردن پلیت کشت و شمردن زیر عدسی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مشخص شد ($p=0/001$, $n=3$).



شکل ۵: درصد سلول‌های زنده تیمار شده با بایکالین و تروگلیتازون در روز هفتم توسط آنالیز فلوسیتومتری. نمودار A غلظت‌های مختلف بایکالین و نمودار B غلظت‌های تروگلیتازون را نمایش می‌دهد. شمارش درصد سلول‌های زنده در غلظت ۵۰ میکرومول بایکالین و ۱ میکرومول تروگلیتازون کاهش معناداری نشان می‌دهد به ترتیب ($p=0/01$, $n=3$), ($p=0/02$, $n=3$).

مختلف، مطالعه‌های زیادی انجام شده است. لیگندهای $PPAR\gamma$ رشد سلولی را با القای آپوپتوز در سل‌لاین‌های لنفوما و لوسمیک انسانی مختلف سرکوب می‌کنند (۲۶)، هم چنین آگونیست‌هایی هم چون تروگلیتازون، پیوگلیتازون و تیازولیدین سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون انسانی و سلول سرطانی سینه می‌شوند (۲۸)، (۲۷). در مطالعه هیراس و همکارانش در سال ۲۰۰۰، نشان داده شد که لیگندهای سنتتیک $PPAR\gamma$ هم چون تروگلیتازون و پیازولیدازون سبب سرکوب تکثیر سلولی و بیان مارکرهای سطحی اریترئوئیدی GPA در سل‌لاین

پس از تیمار سلول‌های $CD133^+$ با غلظت ۱، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومول بایکالین، درصد نسبت سلول‌های زنده به مرده در روز هفتم به ترتیب ۱۰۰٪، ۸۵ ± ۱۱٪، ۷۵ ± ۲۶٪ و ۴۴ ± ۱۲٪ و در غلظت‌های ۰/۱، ۱ میکرومول تروگلیتازون درصد سلول‌های زنده ۹ ± ۷۱٪ و ۱۰ ± ۵۰٪ بود و در غلظت‌های ۳ و ۱۰ میکرومول، تمامی سلول‌ها مرده و قابل ارزیابی با فلوسیتومتری نبودند (شکل ۵).

بحث

تاکنون در مورد اثرات لیگندهای $PPAR\gamma$ بر سلول‌های

مطالعه‌ها نشان می‌دهند که لیگاندهای PPAR γ ، رشد سلول‌ها را در سل‌لاین‌های لوسمیک و لنفوما از طریق القای آپوپتوز سرکوب می‌کنند (۳۷، ۳۶، ۱۹). با این حال مطالعه ناواگاسا و همکارانش نشان داد که لیگاندهای PPAR γ ، تکثیر سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی را بدون کاهش قابلیت حیات و افزایش آپوپتوز، سرکوب می‌نمایند (۲۰).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاهش چشمگیر درصد سلول‌های بیان‌کننده رسپتورهای سطحی در غلظت ۵۰ μM بایکالین و ۳ μM تروگلیتازون مشاهده شد. کاهش میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای اریتروئیدی GPA و Tfr در روز هفتم نشان می‌دهد تعداد سلول‌های بیان‌کننده این مارکرها به طور معناداری به شیوه وابسته به دوز کاهش پیدا کرده که خود نمایانگر تاخیر بلوغ اریتروئیدی سلول‌های پیش‌ساز می‌باشد. درصد بیان Tfr همانند بیان GPA در غلظت ۱۰ میکرومول بایکالین، مشابه نمونه کنترل می‌باشد که نشان می‌دهد این غلظت تاثیری بر روند تمایز HSC و قابلیت حیات آن ندارد. در مقایسه، در تیمار با تروگلیتازون به عنوان فعال‌کننده PPAR γ در روز هفتم، میانگین درصد بیان مارکر اریتروئیدی GPA در غلظت ۰/۱ و ۱ میکرومول به ترتیب $3 \pm 49\%$ و $5 \pm 32\%$ و مارکر CD71 به ترتیب $4 \pm 68\%$ و $2 \pm 45\%$ بوده و هیچ سلول زنده‌ای در روز هفتم در غلظت ۳ و ۱۰ تروگلیتازون باقی نماند.

در این مطالعه مشاهده شد که میزان سلول‌های زنده پس از افزودن بایکالین به تدریج کاهش می‌یابد و تعداد این سلول‌ها در موارد افزودن آگونیست تروگلیتازون در مقایسه با بایکالین بیشتر می‌باشند. بنابراین مشاهده می‌شود همان‌طور که حساسیت سلول‌های سرطانی در برابر عصاره بایکالین متفاوت است، حساسیت سلول‌های نرمال مانند HSC در حین تمایز به رده اریتروئیدی نیز متفاوت می‌باشد (۳۵). تکثیر سلول‌ها در تروگلیتازون به میزان بیشتری در مقایسه با بایکالین مهار می‌شود و مهار تکثیر با افزایش مقدار این آگونیست‌ها افزایش می‌یابد. هم‌چنین با مقایسه میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای سطحی اریتروئیدی GPA و TFR، مشاهده شد که میزان سلول‌های

اریترولوسمی K562 می‌شوند (۲۹). هم‌چنین این لیگاندها باعث القای تمایز مونوسیتی در برخی سل‌لاین‌های سرطانی میلوزن می‌شوند (۲۹). در ادامه در مطالعه ناگاساوا و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نیز مشخص شد که تiazولیدازون‌ها بلوغ اریتروئیدی و تکثیر سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی اریتروئید (erythroid colony-forming cells) را در سلول‌های بنیادی خونساز جدا شده از خون محیطی، دچار تاخیر می‌کنند (۲۰). هم‌چنین مشخص شد به دنبال استفاده از تiazولیدازون‌ها در بیماران دیابتی، هموگلوبین و هماتوکریت در آن‌ها کاهش پیدا می‌کند (۳۰). در سال‌های اخیر نیز مشتقات سنتتیک جدیدتر و گلیتازون که اثرات آنتی‌پرولیفراتیو خوب و اثرات توکسیک کمتری دارند، به منظور درمان استفاده می‌شوند (۲۸). علاوه بر تروگلیتازون لیگاندهای طبیعی PPAR γ مثل dPGJ2، ۱۵، تکثیر سلولی ECFCs را سرکوب می‌کنند که بیانگر اثرات ضد تکثیری با واسطه PPAR γ است (۲۰). تاکنون در مورد اثرات آگونیست‌های مختلف PPAR γ در سل‌لاین‌های سرطانی و نیز اریتروپوئز، مطالعه‌های زیادی انجام شده است ولی برای اولین بار است که اثر بایکالین بر اریتروپوئز نرمال بررسی و اثر سرکوب‌کننده آن اثبات می‌شود. اثر ضد سرطانی بایکالین و نیز بایکالین توسط مطالعه‌های بسیاری اثبات شده است (۳۴-۳۱، ۲۴، ۱۱، ۶). پس از شکست نیمه گلیکوزید در محیط زنده، بایکالین تبدیل به بایکالین می‌شود. بایکالین سبب توقف در فاز G1 چرخه سلولی و آپوپتوز سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۱۱). در سلول‌های هیپاتومای انسانی، بایکالین سبب القای آپوپتوز و مهار تکثیر می‌گردد (۱۰). هم‌چنین بایکالین و بایکالین دارای اثرات بالقوه آنتی‌آزیوژنز می‌باشند (۳۳). اثرات ضد تکثیری بایکالین بر سل‌لاین‌های سرطانی مختلف توسط دانشمندان مختلف گزارش شده و در مطالعه‌ها تاکید شده که اثرات مهار رشد فلاونوئیدها از جمله بایکالین در بین سلول‌های سرطانی انسانی و نه در سلول‌های دیپلوئید نرمال مشاهده شده است (۱). با این حال در مطالعه هیم‌جی و همکاران در سال ۲۰۰۷، نشان داده شد که علاوه بر اثرات توکسیک و سمی بر سلول‌های سرطانی، بایکالین اثر توکسیک کمی بر سلول‌های نرمال دارد (۳۵). تعدادی از

بیان‌کننده این مارکرها در سلول‌های تیمار شده با بایکالین و نیز تروگلیتازون در مقایسه با کنترل کاهش پیدا کرده است و این کاهش به صورت وابسته به دوز می‌باشد. نتایج به دست آمده از آزمون سنجش کلنی حاکی از آن است که سلول‌های بنیادی $CD133^+$ جدا شده و تکثیر یافته، توانایی مناسب کمی و کیفی برای تمایز به سمت رده‌های مختلف سلولی از جمله رده اریثروئیدی را داشته و از این رو نتایج مربوط به سلول‌های بیان‌کننده مارکهای سطحی مربوط به این سلول‌ها را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در مقالات مختلف اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، فعالیت ضد التهابی و اثرات ضد توموری بایکالین در زمینه ایمنی ذاتی و نیز به عنوان راه حلی برای درمان تب،

بیماری‌های آلرژیک و التهابی، فعالیت ضد ویروسی، اثر ضد تکثیر بر سل‌لاین‌های مختلف و اثر بر درمان بیماری‌های نورودژنراتیو گزارش شده است (۳۸، ۱). لیکن در تمام این مطالعه‌ها، اثر توکسیک احتمالی این عصاره بر سلول‌های نرمال در نظر گرفته نشده است. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که بایکالین دارای اثرات قابل ملاحظه وابسته به دوزی بر روند خونسازی اریثروئید است و لذا باید در تجویز و مصرف آن، این اثرات جانبی و هم چنین دوز مورد استفاده آن مورد توجه قرار گیرد. این مساله به ویژه با توجه به منشا گیاهی بایکالین و نیز گزارش‌های متعدد مبنی بر اثرات ضد سرطانی آن و احتمال مصرف خودسرانه بایکالین توسط افراد جامعه حایز اهمیت می‌باشد.

References:

- 1- Blach-Olszewska Z, Lamer-Zarawska E. Come back to root-Therapeutic activities of *Scutellaria baicalensis* root in aspect of innate immunity regulation – Part I. *Adv Clin Exp Med* 2008; 17(3): 337-45. [Article in Polish]
- 2- Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(1): 57-68.
- 3- Krakauer T, Li BQ, Young HA. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett* 2001; 500(1-2): 52-5.
- 4- Zhao Y, Li H, Gao Z, Xu H. Effects of dietary baicalin supplementation on iron overload-induced mouse liver oxidative injury. *Eur J Pharmacol* 2005; 509(2-3): 195-200.
- 5- Mladenka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(6): 963-75.
- 6- Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett* 2000; 160(2): 219-28.
- 7- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276(2): 534-8.
- 8- Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, *et al.* Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett* 2006; 245(1-2): 269-74.
- 9- Du G, Han G, Zhang S, Lin H, Wu X, Wang M, *et al.* Baicalin suppresses lung carcinoma and lung metastasis by SOD mimic and HIF-1 α inhibition. *Eur J Pharmacol* 2010; 630(1-3): 121-30.
- 10- Li Y, Martin RC 2nd. Herbal medicine and hepatocellular carcinoma: applications and challenges. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 541209.
- 11- Ikezoe T, Chen SS, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. Baicalin is a major component of PC-SPES which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. *Prostate* 2001; 49(4): 285-92.
- 12- Wang AM, Ku HH, Liang YC, Hwu YM, Yeh TS. The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells. *J Cell Biochem* 2009; 106(4): 682-92.
- 13- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, *et al.* *Cell* 1995; 83(6): 835-9.
- 14- Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001; 276(40): 36863-4.
- 15- Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA. PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest* 2005; 115(8): 2244-56.
- 16- Greene ME, Pitts J, McCarville MA, Wang XS, Newport JA, Edelstein C, *et al.* PPAR γ : observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000; 62(1): 45-73.
- 17- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and

- chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995; 4(4-5): 281-99.
- 18- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, *et al.* PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007; 6(2): 137-43.
 - 19- Konopleva M, Andreeff M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2002; 9(4): 294-302.
 - 20- Nagasawa E, Abe Y, Nishimura J, Yanase T, Nawata H, Muta K. Pivotal role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in regulation of erythroid progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Hematol* 2005; 33(8): 857-64.
 - 21- Chou FS, Wang PS, Kulp S, Pinzone JJ. Effects of thiazolidinediones on differentiation, proliferation, and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2007; 5(6): 523-30.
 - 22- Wei W, Wan Y. Thiazolidinediones on PPARγ: The Roles in Bone Remodeling. *PPAR Res* 2011; 2011: 867180.
 - 23- Murphy CE, Rodgers PT. Effects of thiazolidinediones on bone loss and fracture. *Ann Pharmacother*; 41(12): 2014-8.
 - 24- Ma Z, Otsuyama K, Liu S, Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, *et al.* Baicalein, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood* 2005; 105(8): 3312-8.
 - 25- Kawano MM, Mihara K, Huang N, Tsujimoto T, Kuramoto A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood*; 85(2): 487-94.
 - 26- Konopleva M, Elstner E, McQueen TJ, Tsao T, Sudarikov A, Hu W, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(10): 1249-62.
 - 27- Ban JO, Kwak DH, Oh JH, Park EJ, Cho MC, Song HS, *et al.* Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. *Chem Biol Interact* 2010; 188(1): 75-85.
 - 28- Salamone S, Colin C, Grillier-Vuissoz I, Kuntz S, Mazerbourg S, Flament S, *et al.* Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur J Med Chem* 2012; 51: 206-15.
 - 29- Hirase N, Yanase T, Mu Y-m, Muta K, Umemura T, Takayanagi R, *et al.* Thiazolidinedione suppresses the expression of erythroid phenotype in erythroleukemia cell line K562. *Leuk Res* 2000; 24(5): 393-400.
 - 30- Berria R, Glass L, Mahankali A, Miyazaki Y, Monroy A, De Filippis E, *et al.* Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82(3): 275-81.
 - 31- Kubo M, Matsuda H, Tanaka M, Kimura Y, Okuda H, Higashino M, *et al.* Studies on *Scutellariae radix*. VII. Anti-arthritis and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoid components from *Scutellariae radix*. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 1984; 32(7): 2724-9.
 - 32- Fukutake M, Yokota S, Kawamura H, Iizuka A, Amagaya S, Fukuda K, *et al.* Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon. *Biol Pharm Bull* 1998; 21(8): 814-7.
 - 33- Liu JJ, Huang TS, Cheng WF, Lu FJ. Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Int J Cancer* 2003; 106(4): 559-65.
 - 34- Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5(2): 177-84.
 - 35- Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, *et al.* Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett* 2007; 245(1-2): 269-74.
 - 36- Zang C, Liu H, Posch MG, Waechter M, Facklam M, Fenner MH, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28(4): 387-97.
 - 37- Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* 2000; 165(12): 6941-8.
 - 38- Chen S, Ruan Q, Bedner E, Deptala A, Wang X, Hsieh TC, *et al.* Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines. *Cell Prolif* 2001; 34(5): 293

Original Article

The effect of Baicalin, a PPAR γ activator, on erythroid differentiation of CD133⁺ cord blood hematopoietic stem cells

Abbasi P.¹, Shams Asanjan K.^{2,3,4}, Movasaghpour A.A.¹, Akbarzadeh Laleh P.⁵, Dehdilani N.⁶

¹Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Hematology Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

⁴Tabriz Educational Regional Blood Transfusion Center, Tabriz, Iran

⁵Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁶Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Abstract

Background and Objectives

The effect of Baicalin, a PPAR γ activator, was investigated on erythroid differentiation of CD133⁺ cord blood hematopoietic stem cells.

Materials and Methods

The effect of PPAR γ agonists (Baicalin and Troglitazone) were evaluated in erythropoiesis. CD133⁺ cells were isolated from human cord blood using MACS technology and cultured in the medium containing PPAR γ agonists in a dose-dependent manner with SCF (20 ng/mL) and Epo (4.5 u/mL). The morphology of CD133⁺ cells, cell surface markers (Transferrin receptor and glycophorin A), and the formation of erythroid colony were assessed with microscopicanalysis, flow cytometry, and colony forming assay, respectively.

Results

Microscopic and flow cytometric analysis revealed the differentiation of CD133⁺ cord blood hematopoietic stem cells to erythroid lineage. Flow cytometry showed that both of the PPAR γ agonists were able to diminish significantly Transferrin receptor and glycophorin A positive cell population. The inhibitory effect of PPAR γ agonists on erythroid differentiation was dose-dependent. The colonies formation of erythroid was suppressed by both of PPAR γ agonists; hence, the effect of troglitazone was markedly higher. The inhibitory effect of Troglitazone on colonies formation of Erythroid was also markedly higher than Bicaline.

Conclusions

Our findings demonstrated that PPAR γ agonists modulates erythroid differentiation of CD133⁺ hematopoietic stem cell; therefore, they might play an important role in regulating normal erythropoiesis in vivo. The inhibitory effect of Baicalin on erythropoiesis should be noted because this herbal remedy mostly is used to treat a wide range of diseases.

Key words: baicalin, Erythropoiesis, Hematopoietic Stem Cells, PPAR gamma

Received: 6 Jan 2013

Accepted: 16 Jul 2013

Correspondence: Shams Asanjan K., PhD of Hematology and Blood Banking, Assistant Professor of Hematology Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences and Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine and Tabriz Educational Regional Blood Transfusion Center. P.O.Box: 51335, Tabriz, Iran. Tel: (+98411) 2871515; Fax: (+98411) 2871515
E-mail: k.shams@ibto.ir