بررسی اثر تکثیر سلول‌های خون‌ساز $CD133^+$ جداشده از خون بند ناف در in vitro بر بیان MicroRNAهای شکل‌دهنده فرایند خون‌سازی

سعید شهرابی [۱](M.Sc)، سعید کاویانی [۱*](Ph.D)، مسعود سلیمانی [۱](Ph.D)، علی‌اکبر پورفتح‌اله [۲](Ph.D)، زهرا ذنوبی [۳](M.D)

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون‌شناسی

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی

۳- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مهدیه

چکیده

سابقه و هدف: یکی از راه‌های کنترل فرایند خون‌سازی، تنظیم به‌وسیله MicroRNAهای مختلف می‌باشد. این RNAهای کوچک تنظیم‌کننده با تغییر در بیان ژن‌ها در مرحله پس از رونویسی، توانایی کنترل مراحل مختلف خون‌سازی را دارا می‌باشند. درمان بیماری‌های مختلف با استفاده از سلول‌های $CD-133^+$ که از خون بند ناف جدا شده و در محیط آزمایش‌گاه تکثیر یافته‌اند در حال گسترش می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تغییرات ایجاد شده در بیان MicroRNAهای شرکت‌کننده در فرایند خون‌سازی در مراحل مختلف تکثیر این سلول‌ها در in vitro بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی خون‌ساز +CD133 خون بند ناف به روش MACS جدا گردید. این سلول‌ها پس از شمارش و تایید توسط فلوسیتومتری، جهت بررسی اثر تکثیر بر بیان MicroRNAها در دو گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. در گروه اول RNA این سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی استخراج گردید و در گروه دوم سلول‌ها ۱۲ روز پس از تکثیر در آزمایش‌گاه مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی بیان MicroRNAها از تکنیک qPCR Real time استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند که از مجموع ۲۳ عدد MicroRNA بررسی شده در دو مرحله قبل و بعد از تکثیر، بیان ۱۱ عدد از MicroRNAها بدون تغییر بود. در حالی که در مرحله قبل نسبت به مرحله بعد از تکثیر، بیان ۷ عدد از MicroRNAها با افزایش و بیان ۵ عدد از MicroRNAها هم با کاهش هم‌راه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان دادند که تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط آزمایش‌گاه سبب تغییر در بیان MicroRNAهای شرکت‌کننده در فرایند خون‌سازی می‌گردد. به‌طوری که این تغییرات سبب افزایش بیان MicroRNAهای مسئول تمایز و کاهش بیان MicroRNAهای شرکت‌کننده در همانندسازی این سلول‌ها می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: خون سازی، میکرو آر ان آ ها، سلول بنیادی خون ساز+CD133، خون جنین

مقدمه

در انسان سیستم خون‌ساز به واسطه توانایی در هموستاز بافتی به شدت کنترل می‌گردد. این هموستاز شامل تکثیر و همانندسازی سلول‌های اولیه خون‌ساز، تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عمل‌کردی و بالغ، پاسخ آن‌ها به تغییرات محیطی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد. برای کنترل هموستاز این سلول‌ها سیگنال‌های مختلفی را از محیط ریزمغذی اطراف خود در مغز استخوان دریافت می‌کنند که نتیجه پاسخ به این سیگنال‌ها همانندسازی و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های بالغ و عمل‌کردی می‌باشد [۲،۱].

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۳۱۱۲۲۵ نمابر: ۴۲۳۴۴۷- ۰۲۳۲

Email: kavianis@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۷

Archive of SID

www.SID.ir

با کشف MicroRNAها مشخص شد که این دسته از RNAهای تنظیم‌کننده دارای نقش اساسی در کنترل مراحل مختلف خون‌سازی می‌باشند [۳] MicroRNAها دسته‌ای از RNAهای کوچک غیر کدکننده با طول ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که تنظیم‌کننده mRNAهای هدف در مرحله پس از رونویسی از ژن می‌باشند [۴]. هر MicroRNA توانایی هدف‌گیری صدها mRNA را داشته و در مقابل هر mRNA هم می‌تواند به‌وسیله چندین MicroRNA مختلف تنظیم شود [۵] که این نشان‌دهنده اهمیت بسیار زیاد MicroRNAها در شبکه تنظیم بیان ژن می‌باشد. تخمین زده می‌شود که بیش از ۶۰ درصد از کل رونوشت‌های پستانداران تحت کنترل MicroRNAهای مختلف باشند [۶].

اولین MicroRNA در سال ۱۹۹۳ در C.Elegans کشف گردید [۷] و از آن زمان به بعد این حوزه از دانش به سرعت گسترش یافت به‌طوری که در حال حاضر ۱۴۲۴ MicroRNA مختلف انسانی در miRBas ثبت گردیده است. MicroRNA ها حدود یک درصد از ژن‌های انسانی یا گونه‌های دیگر را به خود اختصاص می‌دهند و بیوژنز آن‌ها تحت یک فرایند کنترل شده تکاملی انجام می‌گیرد [۸]. کددهی این مولکول‌ها به صورت ژن‌های منو و پلی‌سیسترونیکی که مستقل از ژن‌های دیگر بوده و یا در مناطق بین ژنی و یا در اینترون ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها قرار دارند انجام می‌گیرد [۹].

ژن MicroRNA توسط RNApol1 یا ۲ به صورت رونوشت اولیه (Pri-miRNA) رونویسی می‌شود که این رونوشت اولیه در مرحله بعد توسط ریزپردازش‌گر هسته‌ای که متشکل که متشکل از Dorosha و Pasha می‌باشد شکسته شده و تولید pre-miRNA با طول ۷۰ نوکلئوتید را می‌کند [۱۰]. این مولکول پس از پردازش هسته‌ای به کمک مولکول Exportin ۵ وارد سیتوپلاسم شده و در سیتوپلاسم با کمک آنزیم Dicer به MicroRNA بالغ تبدیل شده و وارد کمپلکس القاکننده خاموشی RNA (RISC) می‌گردد [۱۱].

اغلب مطالعاتی که تا کنون در ارتباط با نقش آن‌ها در فرایند خون‌سازی انجام گرفته است به مشخص کردن نقش آن‌ها در مراحل انتهایی فرایند خون‌سازی پرداخته است و نقش این مولکول‌ها در مراحل اولیه که شامل همانندسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌باشد به میزان زیادی نامشخص می‌باشد [۱۲]. با توجه به این مطالعات مشخص شده است که ۲۳ MicroRNA مختلف که شامل MicroRNAهای 125a, 125b, 196b, 520h, 29a, 223, 221, 15, 155, 181, 146 , 150, 34, 10A, 24, 222, 144, 16, 451, 424, 17-5P, 20a و 106a می‌باشد به صورت مستقیم در فرایند خون‌سازی دخالت دارند [۱۳]. برای بررسی اثر تکثیر in vitro سلول‌های بنیادی خون‌ساز بر بیان MicroRNAها درگیر در فرایند خون‌سازی, اکثر مطالعات انجام گرفته بر روی سلول‌های بنیادی خون‌ساز +CD34 بوده‌اند [۱۴]. در حالی که سلول‌های بنیادی خون‌ساز غنی از سلول‌های +CD133 می‌باشند [۱۵] و این سلول‌ها توانایی زیادی جهت همانندسازی خود و تولید سلول‌های خون‌ساز +CD34 را دارا می‌باشند [۱۶].

در حال حاضر برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌های خونی از سلول‌های +CD133 که از خون بند ناف جدا شده‌اند استفاده می‌شود که معضل اصلی در استفاده از این سلول‌ها کم بودن تعداد آن‌ها می‌باشد و برای افزایش تعداد این سلول‌ها از تکثیر in vitro استفاده می‌شود [۱۷]. با توجه به احتمال تغییر در بیان MicroRNAهای مختلف‌دار فرایند تکثیر in vitro این سلول‌ها, در این تحقیق به بررسی بیان این MicroRNAها در قبل و بعد از تکثیر در محیط آزمایش‌گاه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از کیسه‌های خون بند ناف موجود در آزمایش‌گاه خون بند ناف سازمان انتقال خون استفاده گردید. تمامی خون‌های استفاده شده در این تحقیق دارای گواهی رضایت از مادران جهت انجام تحقیق بودند.

جداسازی سلول‌های +CD133. برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از خون بند ناف, ابتدا این خون با محلول هیدروکسی اتیل‌استارچ به نسبت ۱ به ۲ رقیق گردید و پس از ۱ساعت قرارگیری در دمای آزمایش‌گاه مایع رویی با

Archive of SID
www.SID.ir

نسبت ۱ به ۲ بر روی محلول فایکول با غلظت ۱.۰۷۷ قرار داده شد. برای جداسازی سلول‌های مونونوکلئور از سانتریفوژبا دور ۴۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. برای شستشوی سلول‌های به دست آمده از محلول PBS حاوی EDTA استفاده شد. در انتها با استفاده از آنتی‌بادی ضد +CD133 که با ذرات آهن نشان‌دار شده و ستون MACS که در محفظه آهن‌ربایی قرار داشت سلول‌های +CD133 را جدا کردیم.

برای بررسی خلوص این سلول‌ها جهت مارکر CD133 از آنتی‌بادی CD133-PE و دستگاه فلوسیتومتری استفاده شد.

برای کشت این سلول‌ها از پلیت‌های۲۴ خانه استفاده گردید. محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق محیط Stem span به همراه فاکتورهای رشد Flt3 و Tpo و Scf بود که در هر خانه پلیت میزان ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به همراه ۱۰۰ نانوگرم از هر یک از فاکتورهای رشد استفاده شد. تعویض محیط کشت هم در مدت زمان ۱۲ روزه کشت، هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام شد.

برای استخراج total RNA از کیت ترایزول شرکت invitrogen به شماره ۱۵۵۹۶-۰۲۶ که بر اساس اختلاف فاز فنل و کلروفورم عمل می‌کند استفاده گردید.

برای انجام Quantitative real time polymerase chain reaction (qpcr) از کیت شرکت abm به شماره MA003 استفاده گردید و برای آنالیز اطلاعات به دست آمده از نرم‌افزار abm good این شرکت استفاده شد. برای بررسی بیان MicroRNAهای مختلف از فرمول $level= 2^{-\Delta\Delta C\ t}$ expression استفاده گردید که ΔCt هم به روش ΔCt= (Ct (GOI) - Ct (HKG)) محاسبه گردید. لازم به ذکر است که GOI= gene of interest or miRNA species و HKG= average Ct of housekeeping بودند.

برای بررسی چند برابر شدن اختلاف در بیان یک MicroRNA خاص هم از فرمول زیر استفاده گردید.

Fold Difference= Expression Level (Sample 1) / Expression Level (Sample 2)

لازم به ذکر است نمونه شماره ۱ سلول‌های +CD133 در قبل از تکثیر و نمونه شماره ۲ همان سلول‌ها پس از تکثیر ۱۲ روزه بودند. جهت بررسی روند تکثیر سلول‌هادر زمان ۱۲ روزه کشت از مطالعه‌ی میکروسکوپی این سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت استفاده شد. برای بررسی نتایج فلوسیتومتری از تست Paired samples استفاده شد و برای مقایسه دو گروه مورد مطالعه از نظر تغییر بیان MicroRNAs از آنالیز واریانس استفاده شد.

برای بررسی ژن‌های هدف هر کدام از MicroRNAهای مورد مطالعه از سایت target scan.org استفاده شد.

نتایج

سلول‌های بنیادی خون‌ساز +CD133 از خون بند ناف. از هر نمونه از خون بند ناف انسانی که حداقل ۸۵ میلی‌لیتر حجم داشت حدود ۱ میلیون سلول +CD133 جدا گردید. غلظت RNA استخراجی در قبل از تکثیر ۳۸۵ میکروگرم و غلظت RNA استخراجی بعد از تکثیر ۱۲ روزه ۱۰۳۵ میکروگرم بود (جدول۱). نتایج فلوسیتومتری نشان داد که درصد خلوص این سلول‌ها در مرحله قبل و بعد از تکثیر بیش از ۹۰ درصد بود (شکل ۱). کیفیت سلول‌های مورد مطالعه در دوره کشت با بررسی‌های میکروسکوپی نشان از عدم تغییر در مرفولوژی این سلول‌ها داشت (شکل ۲).

بیان MicroRNAهای مورد مطالعه در مرحله قبل و بعد از تکثیر. جدول ۱ نشان‌دهنده میزان بیان هر یک از MicroRNAهای مورد مطالعه در دو مرحله مورد بررسی و میزان اختلاف در بیان هر کدام از آن‌ها می‌باشد. از مجموع ۲۳ MicroRNA بررسی شده بیان ۵ MicroRNA با کاهش و ۷ MicroRNA با افزایش بیان همراه بودند (شکل ۳) در حالی که در بیان ۱۱ MicroRNA هم در دو مرحله اختلافی مشاهده نشد.

ژن‌های هدف هر MicroRNA شرکت‌کننده در فرایند خون‌سازی. جدول ۲ نشان‌دهنده ژن‌های هدف تعدادی از MicroRNAهای شرکت‌کننده در فرایند خون‌سازی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. سطوح بیانی MicroRNA های درگیر در فرایند خون‌سازی در مراحل قبل از تکثیر (مرحله ۱) و پس از تکثیر (مرحله ۲) و مقایسه بیان در دو مرحله

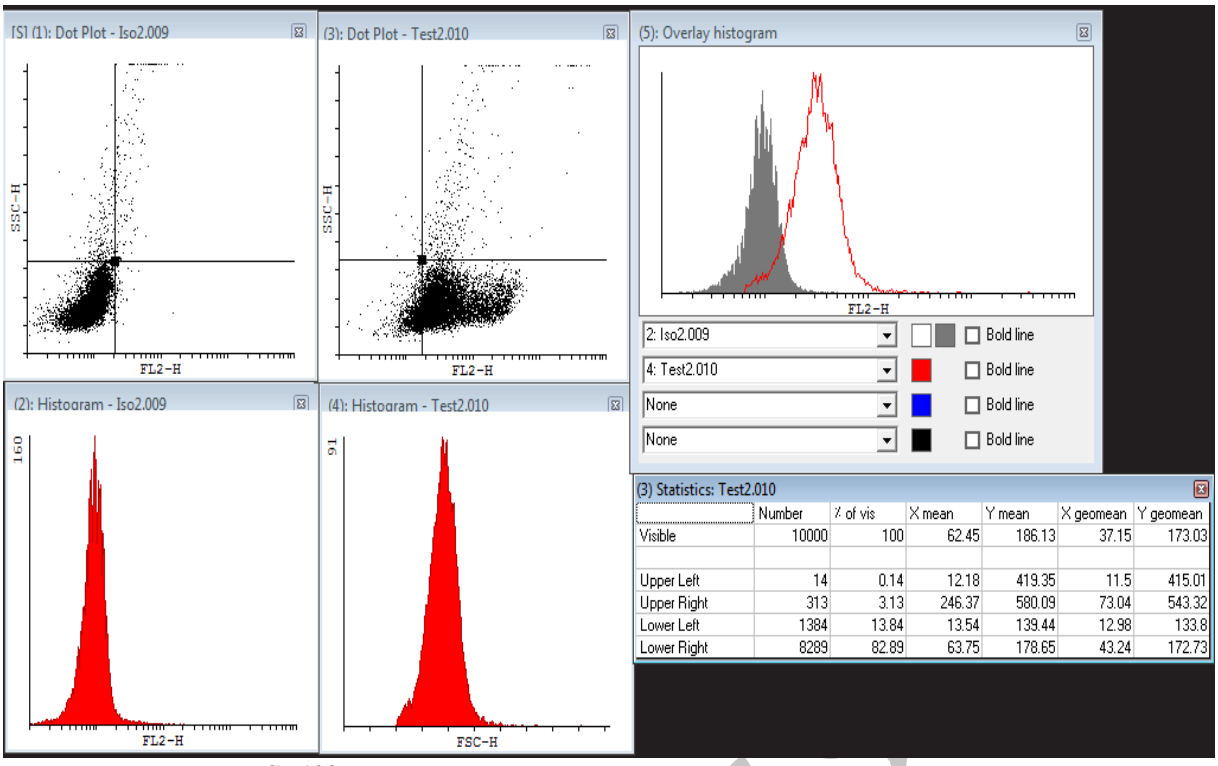
MicroRNA	سطح بیان قبل از تکثیر مرحله ۱	سطح بیان بعد از تکثیر مرحله ۲	چند برابری اختلاف در دو مرحله	میزان تغییردر مرحله ۱نسبت به مرحله ۲
125a	۲.۶۷	۰.۲۳	۱۱.۴۹	افزایش
125b	۰.۰۵	۰.۰۱	۶.۶۳۸۱۷	افزایش
196b	۰.۱	۰.۱۲	۰.۸۸۰۲۶	بدون تغییر
520h	۰.۰۰	۰.۰۱	۰.۹۶۷۰۶	بدون تغییر
29a	۰.۰۱	۰.۰۰	۲.۹۱۸۶۰	افزایش
223	۰.۵۷	۱.۸۱	۰.۳۱۸۱۵	کاهش
221	۰.۰۹	۰.۰۷	۱.۲۶۱۴۲	بدون تغییر
15	۰.۲۵	۰.۱۴	۱.۷۸۱۲۷	بدون تغنیر
155	۰.۰۳	۰.۰۵	۶.۳۴۴۸	بدون تغنیر
181	۰.۳۴	۰.۱۰	۳.۳۷۰۲۹	افزایش
146	۰.۴۶	۱.۸۱	۰.۲۵۲۶۷	کاهش
150	۰.۰۹	۰.۰۳	۳.۲۶۹۲۵	افزایش
34	۰.۰۳	۰.۰۲	۱.۶۹۱۱۰	بدون تغییر
10a	۰.۰۱	۰.۰۱۲	۰.۸۵۳۸۴	بدون تغییر
24	۰.۲۶	۰.۳۰	۰.۸۵۰۷۷	بدون تغییر
222	۴.۴۰	۰.۵۸	۷.۵۶۱۷۸	افزایش
144	۰.۰۲	۰.۰۴	۰.۶۲۶۰۶	بدون تغییر
16	۰.۰۳	۰.۱۲	۰.۲۳۰۹۹	کاهش
451	۰.۱۳	۰.۰۴	۳.۶۰۵۳۴	افزایش
424	۰.۲۰	۰.۲۵	۰.۴۳۴۳۱	بدون تغییر
17-5p	۲.۰۴	۲.۰۵	۰.۹۹۶۴۴	بدون تغییر
20a	۰.۹۹	۲.۵۹	۰.۳۸۲۵۶	کاهش
106a	۰.۰۵	۰.۵۷	۰.۰۸۹۵۷	کاهش

جدول ۲. عمل‌کرد و ژن‌های هدف تعدادی از microRNA های مورد مطالعه در فرایند خون سازی

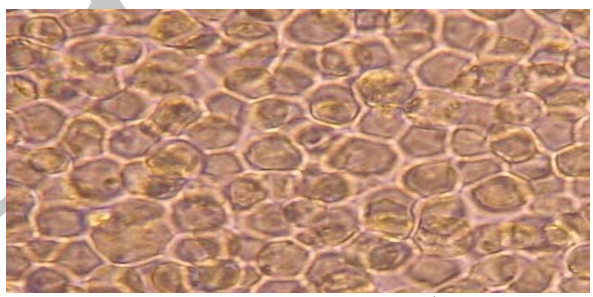
microRNA	ژن هدف	عملکرد
10a	HOXA1	تنظیم مگاکاریوپوئیزیس
5a	MYB	توقف تشکیل کلونی های اریتروئیدی ومیلوئیدی
24	ALK4	مهار اریتروپوئیزیس
29a	HBP1,FZD5,TPM1	افزایش تکثیر سلولهای پیش ساز
34a	CDK4,CDK6,MYB	دخالت در تمایز رده مگا کاریو سیتی
125b	BMF,KLF13	تکثیر سلولهای بنیادی خون ساز
130a	MAFB	تنظیم مگاکاریوپوئیزیس
142	PROM1	تاثیر بر تکثیر سلولهای +CD133
155	ETS-1,MEIS1	مهار تولید کلونی های اریتروئیدی ومیلوئیدی
221	KIT	مهار اریتروپوئیزیس
222	KIT	مهار اریتروپوئیزیس
223	LMO2,NFI-A	مهار رده اریتروئیدی و گرانولوسیتی
520h	ABCG2	افزایش تمایز سلولهای بنیادی خون ساز

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. نتیجه حاصل از بررسی سلول‌های بنیادی خون ساز از نظر بیان مارکر CD133



شکل ۲. سلول‌های $CD133^{+}$ تکثیر یافته در in vitro با بزرگنمایی ۱۰۰۰×

بحث و نتیجه‌گیری

تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز فرایند پیچیده و چندمرحله‌ای می‌باشد که توسط فاکتورهای رونویسی و توالی‌های نوکلوتیدی خاص که در حال تعامل با یک‌دیگر هستند کنترل می‌شود که MicroRNAها فاکتور کلیدی این زنجیره مولکولی پیچیده است که می‌تواند تکوین و تمایز را مهار یا تسریع کند [۱۸].

نتایج این بررسی نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز در in vitro موجب تغییر در بیان MicroRNAهای شرکت‌کننده در فرایند خون‌سازی می‌گردد. به طوری که سطح بیان MicroRNA های 125a, 125b, 29a, 181, 150, 222 و 451 در مرحله ۱ نسبت به مرحله ۲ با افزایش در بیان همراه می‌باشند در صورتی که MicroRNAهای 16, 223, 146, 20a, و 106a با کاهش بیان همراه می‌باشند. همان‌طوری که دیده شد این تغییرات سبب افزایش بیان در MicroRNAهای مسئول تمایز و کاهش بیان MicroRNAهای دخیل در همانندسازی می‌گردد. نتیجه این تغییرات موجب تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط کشت شده و قدرت همانندسازی آن‌ها به مقدار زیادی کاهش یافته است.

بررسی‌های مختلف نشان دادند که MicroRNAها نقش اساسی در کنترل فرایندهای تکثیر، تمایز و یک‌پارچگی سلولی دارند [۱۹]. در فرایند خون‌سازی آن‌ها با هدف‌گیری ژن‌های مختلف درگیر در خون‌سازی سبب کنترل همانندسازی سلول‌های بنیادی و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عمل‌کردی می‌شوند. از بین MicroRNAها تعدادی از آن‌ها در همانندسازی سلول‌های بنیادی و تعدادی هم در تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عمل‌کردی دخالت دارند. 125b MicroRNA با تغییر در بیان ژن‌های KLF13 و BMF سبب همانندسازی سلول‌های بنیادی می‌شود [۲۰]. در صورتی که 29a MicroRNA با تغییر در بیان ژن‌های TPM1 و FZP5 [۲۱] و 520h MicroRNA با اثر بر روی ژن ABCG2

Archive of SID

www.SID.ir

سبب ایجاد تمایز در آن‌ها می‌شوند [۲۲]. اکثر MicroRNAهای شرکت‌کننده در خون‌سازی در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عمل‌کردی دخالت دارند. به طوری که MicroRNAهای ۱۴۶ و ۱۵۰ با تاثیر بر ژن‌های CXCR4 و MYB بر ساخت رده پلاکتی موثر می‌باشند [۲۳] در صورتی که MicroRNAهای ۲۴ با اثر بر روی ژن ALK4 و ۲۲۲ با تاثیر بر ژن KIT بر ساخت رده اریتروئیدی موثر می‌باشند [۲۵،۲۴].

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که تکثیر in vitro سلول‌های بنیادی خون‌ساز +CD133 با تغییر در بیان MicroRNAهای مختلف سبب تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های متعهد شده خواهد شد که این نتایج با مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های بنیادی خون‌ساز +CD34 انجام گرفته است مطابقت دارد [۱۴]. یکی از بحث‌انگیزترین موضوعات روز در ارتباط با درمان بر پایه سلول‌های بنیادی خون‌ساز, افزایش سلول‌های اولیه با حداکثر توانایی در همانندسازی می‌باشد که در صورت امکان این مسئله از طریق جلوگیری از تغییر بیان MicroRNAهایی که سبب همانندسازی این سلول‌ها می‌گردد امکان‌پذیر می‌باشد. برای نیل به این هدف نیاز به مطالعات بعدی در این زمینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و در گروه خون‌شناسی این دانشگاه انجام گرفت. بدین‌وسیله بر خود لازم می‌دانیم از زحمات این عزیزان تقدیر و تشکر نمائیم.

منابع

[1] Rosa A, Ballarino M, Sorrenito A, Sthandier O, De Angelis FG, Marchinoi M, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR424 regulates human monocyte /macrophage differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 19849-19854.

[2] Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer : AML shows the way. Nat Rev Cancer 2003; 3: 89-101.

[3] Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs:key regulators of stem cells. Nat Rev Mol Cel Biol 2009; 10: 116-125.

[4] Hatfield S, Ruohla-Baker H. MicroRNA and stem cell function. Cell Tissue Res 2008; 331: 57-66.

[5] Desano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. AAPS J 2009; 11: 682-692.

[6] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNA are conserved targets of microRNAs. Genome Res 2009; 19: 92-105.

[7] Lee RC, Feinbauma RL, Ambors V. The C elegans heterochoronic gene Lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75: 843-854.

[8] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNA in animals. Nat Rev Mol cell Biol 2009; 10: 126-139.

[9] Susuki HI, Miyazono K. Dynamics of microRNA Biogenesis: crosstalk betbeen p53 network and microRNA processing pathway. J Mol Med 2010; 88: 1085-1094.

[10] Kim VN. MicroRNA biogenesis coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell BioL 2005; 6: 376-385.

[11] Marchison EP, Hannon GI. miRNAs on the move. miRNA biogenesis and the RNAi machinery. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 223-229.

[12] MerkerovaM, Vasikova A, Belickova M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. Stem Cell Dev 2010; 19: 17-26.

[13] Bissels U, Bosi A, Wagner W. MicroRNA are shaping the hematopoietic landscape. Haematologica 2012; 97: 160-167.

[14] Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, et al. Combined characterization of microRNA and MRNA profiles delineate early differentiation pathway of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cell 2011; 29: 874-857.

[15] Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie Y, Yamada T, Tani Y, et al. In vitro proliferation potential of AC 133 positive cells in peripheral blood. Stem Cell 2000; 18: 196-203.

[16] Boxall SA, Cook GP, Pearece D, Bonnet D, El-Sherbiny YM, Blundell MP, et al. Haematopoietic repopulating activity in human cord blood CD133+ quiescent cells. Bone Marrow Transplant 2009; 43: 627-635.

[17] Isidori A, Motta MR, Tani M, Terragna C, Zinzani P, Curti A, et al. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133(+) stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients results in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13: 1224-1232.

[18] Coskun E, von der Heide EK, Schlee C, Kühnl A, Gökbuget N, Hoelzer D, et al. The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloied leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia. Leuk Res 2011; 35: 208-213.

[19] O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, Baltimore D. MicroRNA enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long – term hematopoietic output. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 14235-14240.

[20] Ooi AG, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY. MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid- balance and lymphoid- biased subsets. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 21505-21510.

[21] Han YC, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y, Fan JB, et al. microRNA-29a induces aberrant self- renewal capacity in hematopoietic progenitors,biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. J Exp Med 2010; 207: 475-489.

[22] Liao R, Sun J, Zhang L, Lou G, Chen M, Zhou D, et al. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. J Cell Biochem 2008; 104: 805-817.

[23] Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, et al. A three – step pathway comprising PLZF/miR-146/CXCR4 controls megakaryopoiesis. Nat Cell Biol 2008; 10: 788-801.

[24] Wang Q, Huang Z, Xue H, Jin C, Ju XL, Han JD, Chen YG. MicroRNA MiR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type 1 receptor ALK4. Blood 2008; 111: 588-595.

[25] Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Boneci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down –modulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 18081-18086.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of in vitro expansion of CD133+ hematopoietic stem cells isolated from umbilical cord blood in expression of microRNAs involved haematopoiesis

Saeid Shahrabi (M.Sc)[1], Saeid Kaviani (Ph.D)[*1], Masoud Solimani (Ph.D)[1], Ali Akbar Porfatolah (Ph.D)[2], Zahra Zonubi (M.D)[3]

1 - Dept. of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 - Dept. of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3 - Mahdyeh Hospital, Shahed Bahashte University, Tehran, Iran

(Received: 18 Dec 2012; Accepted: 27 Apr 2013)

Introduction: Hematopoiesis is regulated by different microRNAs (miRNA). These small regulatory RNAs control hematopoiesis at different stages with changing in the expression of genes at post-transcriptional levels. Treatment of various diseases is increasing with using CD133+ hematopoietic cells isolated and in vitro expanded from the umbilical cord blood. This study was performed to show alteration of microRNAs levels involved in hematopoiesis in CD133+ hematopoietic cells isolated and invitro expanded from the umbilical cord blood.

Materials and Methods: Umbilical cord blood CD133+ hematopoietic stem cells were isolated by MACS and then the cells confirmed and counted by using flowcytometery and finally were divided into two groups .In the first group RNA was extracted from the cells and the cells in the second group were cultured invitro for 12 days and then these cells were used to assess micoRNAs expression using qPCR real time.

Results: The results showed that from 23 microRNAs, expression of 11 microRNAs was the same in two groups whereas expression of 7 and 5 microRNAs were respectively increased and decreased following in vitro culture**.**

Conclusion: Based on our results, in vitro expansion of the hematopoietic stem cells results in increased microRNAs levels which are responsible for differentiation and decreased microRNAs levels which are responsible for self- renewal.

Keywords: Hematopoiesis, MicroRNAs, Hematopoietic Stem Cells+CD133, Fetal Blood

Corresponding author: Fax: +98 232 4234447 Tel: +98 9121311225
Email: kavianis@modares.ac.ir

How to cite this article:
shahrabi S, kaviani S, Soleimani M, Pour fatollah A, Zonoubi Z. Effects of in vitro expansion of CD133+ hematopoietic stem cells isolated from umbilical cord blood in expression of microRNAs involved haematopoiesis. koomesh. 2013; 15 (1) :11-16
URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-719-1&slc_lang=fa&sid=1

نحوه ارجاع به این مقاله:

شهرابی سعید، کاویانی سعید، سلیمانی مسعود، پور فتح اله علی اکبر، ذنوبی زهرا. بررسی اثر تکثیر سلول‌های خون‌ساز CD133+ جداشده از خون بند ناف در in vitro بر بیان MicroRNAهای شکل‌دهنده فرایند خون‌سازی. کومش . ۱۳۹۲; ۱۵ (۱) :۱۱-۱۶

www.SID.ir