Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):601-608

The effects of Nanocurcumin on Expression Induction of Transcription Factors Involved in Hematopoietic Stem Cell Differentiation to Precursor Myeloid Cells

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mortazavi Farsani S.S.[1] *MSc,*
Sadeghizadeh M.*[1] *PhD,*
Shirzad H.[1] *PhD,*
Najafi F.[2] *PhD*

How to cite this article
Mortazavi Farsani S.S, Sadeghizadeh M, Shirzad H, Najafi F. The effects of Nanocurcumin on Expression Induction of Transcription Factors Involved in Hematopoietic Stem Cell Differentiation to Precursor Myeloid Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):601-608.

ABSTRACT

Aims Hematopoietic stem cells are responsible for the production of blood cells in the bone marrow. During the process of differentiation, these cells commitment to two precursor cell lines include myeloid and lymphoid cells. Various blood cells, excluded lymphocytes, generates from myeloid cells. Some patients with severe anemia or thrombocytopenia receive hematopoietic stem cell through transplantation. Finding a potential component for inducing differentiation of hematopoietic stem cells before transplantation, could be an appropriate strategy for the acceleration of blood cells production in recipient persons. Various studies indicate the ability of Curcumin for inducing of cell differentiation. This component can alter many of cellular mechanisms.

Material and methods The aim of this project was to evaluate the effects of Nanocurcumin on mRNA expression levels of GATA1, GATA2, c-Myb and Hhex genes and alteration of cellular ROS in umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells. Nanocurcumin was synthesized from Curcumin, Oleic acid, and PEG400. The rate of Nanocurcumin delivery into the cells was also evaluated.

Findings Our results show that intracellular ROS and expression levels of GATA1, c-Myb, and Hhex transcription factors were significantly increased after treatment with Nanocurcumin ($p<0.05$). These transcription factors involve in myeloid differentiation.

Conclusion Enhancement of these transcription factors expression making Nanocurcumin a potential candidate for applying in myeloid differentiation media and basic and clinical studies.

Keywords Hematopoietic stem cells; Myeloid Differentiation; Nanocurcumin

CITATION LINKS

[1] Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem ... [2] Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell ... [3] Determinants of lymphoid-myeloid lineage ... [4] Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking ... [5] Enhancer and transcription factor dynamics during myeloid differentiation reveal an ... [6] The order of expression of transcription factors ... [7] GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors ... [8] Hhex induces promyelocyte self-renewal and cooperates ... [9] Transcriptional regulation of Hhex in hematopoiesis and hematopoietic ... [10] The homeobox gene Hhex regulates the earliest stages of definitive ... [11] Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of ... [12] A low level of reactive oxygen species selects for primitive ... [13] Curcumin mediated suppression of nuclear factor-κB promotes ... [14] Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing ... [15] Generation of stable ARE-driven reporter system for monitoring ... [16] Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for ... [17] Dendrosomal curcumin significantly suppresses ... [18] Dendrosomes as novel gene ... [19] Bioavailability of curcumin: Problems and ... [20] Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the ... [21] Changes in the cell surface markers during normal ... [22] Identification of 6-benzylthioinosine as a myeloid leukemia ... [23] Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles promote ... [24] Mapping gene expression patterns during myeloid differentiation using the EML ... [25] Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal ... [26] Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: Induction of apoptosis ... [27] Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through ... [28] The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene Scl/Tal1 during ... [29] Hhex is required at multiple stages of adult hematopoietic stem and progenitor ...

[1]Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Resin & Additives Department, Institute for Color Science & Technology, Tehran, Iran

**Correspondence*
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884409
Fax: +98 (21) 82884717
sadeghma@modares.ac.ir

Article History
Received: December 18, 2018
Accepted: February 2, 2019
ePublished: December 21, 2019

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر نانوکورکومین در القای بیان فاکتورهای رونویسی درگیر در تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی

سیده‌سحر مرتضوی‌فارسانی MSc
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
مجید صادقی‌زاده* PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
هادی شیرزاد PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
فرهود نجفی PhD
گروه رزین و مواد افزودنی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی رنگ، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سلول‌های بنیادی خون‌ساز در مغز استخوان وظیفه تولید سلول‌های خونی را بر عهده دارند. طی فرآیند تمایز، این سلول‌ها به دو رده سلولی پیش‌ساز، شامل رده میلوئیدی و لنفوئیدی متعهد می‌شوند. انواع سلول‌های خونی به استثنای لنفوسیت‌ها از رده میلوئیدی مشتق می‌شوند. برخی بیماران دچار کمبود پلاکت یا کم‌خونی شدید تحت پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز قرار می‌گیرند. یافتن ترکیبی که موجب پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز قبل از پیوند به فرد بیمار می‌شود، می‌تواند روش مناسبی برای تولید سریع‌تر سلول‌های خونی در فرد گیرنده باشد. بسیاری از مطالعات، قابلیت کورکومین در القای تمایز سلولی را نشان داده‌اند. این ترکیب می‌تواند بسیاری از مکانیزم‌های سلولی را تحت تاثیر قرار دهد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به بررسی اثر نانوکورکومین روی بیان ژن‌های *GATA1*، *GATA2*، *c-Myb* و *Hhex* در سلول‌های بنیادی خون‌ساز استخراج‌شده از خون بند ناف و نیز تغییر میزان ROS در این سلول‌ها پرداخته شد. نانوکورکومین از کورکومین و نانوحامل اولئیک‌اسید و PEG400 ساخته شده است. همچنین میزان نفوذ نانوکورکومین به این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که نانوکورکومین می‌تواند سبب افزایش سطح ROS درون سلولی و نیز القای بیان ژن‌های *GATA1*، *c-Myb* و *Hhex* به‌صورت معنی‌دار شود ($p<0/05$). این فاکتورهای رونویسی در تمایز میلوئیدی دخیل هستند. **نتیجه‌گیری:** افزایش بیان این فاکتورهای رونویسی توسط نانوکورکومین نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند کاندید مناسبی برای استفاده در محیط‌های کشت تمایز میلوئیدی باشد و به‌منظور مطالعات پایه و کلینیکی به کار برده شود.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی خون‌ساز، تمایز میلوئیدی، نانوکورکومین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳
*نویسنده مسئول: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

سلول‌های خونی وظایف متعددی در بدن ما بر عهده دارند، این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs) منشا می‌گیرند که کمتر از ۰/۱% از سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان را شامل می‌شوند. به‌طور کلی سلول‌های بنیادی خون‌ساز به دو نوع سلول پیش‌ساز میلوئیدی و لنفوئیدی متعهد می‌شوند. سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی خود به دو پیش‌ساز مگاکاریوسیت- اریتروسیت (MegE) و گرانولوسیت- مونوسیت (GM) تمایز می‌یابند و درنهایت انواع سلول‌های خونی بالغ میلوئیدی را ایجاد می‌کنند[1, 2].

فرآیندهای مولکولی و فاکتورهای رونویسی مختلفی در تکوین و متعهدشدن سلول‌های بنیادی خون‌ساز درگیر هستند. از جمله فاکتورهای رونویسی که برای تعهد HSCها به سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی نقش دارند می‌توان فاکتورهای رونویسی GATA و فاکتورهای مرتبط به آن مانند FOG-1، PU.1، c-Myb و CEBPA را نام برد. این فاکتورها تصمیم نهایی سلول‌های بنیادی خون‌ساز برای متعهدشدن را تعیین می‌کنند[3-5]. اگرچه سطح پایینی از بیان این فاکتورها در سلول‌های بنیادی وجود دارد، اما افزایش آنها در رده‌های میلوئیدی مشاهده می‌شود[6, 7]. همچنین مطالعات نشان داده است که *Hhex* یک فاکتور رونویسی تنظیمی قابل توجه است که در تمایز سلول‌های HSC به رده میلوئیدی نقش دارد[8]. در لوکوس *Hhex* ناحیه حفاظت‌شده غیرکدکننده‌ای (ECR) یافت شده است که به فاکتورهای رونویسی Pu.1، Fhi1، SCL، GATA2 و Ets1/2 متصل می‌شود[9, 10]. علاوه بر مطالعات انجام‌شده در مورد فاکتورهای رونویسی درگیر در فرآیند تمایز HSCها، اهمیت ROS درون سلولی به‌عنوان یک سیگنال مهم در تکوین و تمایز میلوئیدی سلول‌های HSC نشان داده شده است[11, 12].

کورکومین در مطالعات متعددی برای القا تمایز استفاده شده است[13, 14]. این ترکیب گیاهی از ریشه گیاه کورکومالونگا به دست می‌آید و تومریک نیز نامیده می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که غلظت کمتر از ۱۰میکرومولار نانوکورکومین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند اما غلظت بالاتر از ۱۰میکرومولار آن ROS درون سلولی را افزایش می‌دهد[15, 16].

در این پژوهش به بررسی تاثیر نانوکورکومین در تغییر بیان فاکتورهای رونویسی GATA1، GATA2، c-Myb و Hhex در سلول‌های بنیادی خون‌ساز، پرداخته شده است. نانوکورکومین از ترکیب کورکومین و نانوحامل اولئیک‌اسید و PEG400 در مطالعات قبلی آزمایشگاه ما ساخته شده است. این نانوحامل ترکیبی ایمن است که خاصیت محلول‌شدن، پایداری زیستی و جذب سلولی کورکومین را افزایش می‌دهد[17-19].

هدف این مطالعه بررسی اثر نانوکورکومین به‌عنوان یک ترکیب ایمن در القای بیان فاکتورهای رونویسی مورد نیاز در تعهد سلول‌های بنیادی خون‌ساز به رده میلوئیدی است. از آنجایی که سلول‌های خونی شامل گرانولوسیت‌ها، مگاکاریوسیت و اریتروسیت از این رده منشا می‌گیرند، شناسایی یک داروی مکمل گیاهی بدون اثرات جانبی، برای افراد دچار کم‌خونی یا با کمبود سطح پلاکت ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

مواد: در مطالعه تجربی حاضر محیط کشت StemMACS (میلتنی‌بیوتک؛ آلمان)، نمونه‌های خون بند ناف انسانی (سازمان انتقال خون؛ ایران)، RiboX (GeneAll Biotechnology؛ کره)،

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (تاکارا؛ ژاپن)، مسترمیکس PCR (سیناکلون؛ ایران) و سایبرگرین (بیوفکت؛ کره) خریداری شدند. آنتی‌بادی‌ها شامل آنتی CD38-PE، آنتی CD34-FITC، آنتی CD41-FITC و آنتی CD61-FITC (میلتنی‌بیوتک؛ آلمان) نیز فراهم شدند.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ از خون بند ناف: در این پژوهش از خون بند ناف انسانی به‌عنوان منبع برای سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده شد. نمونه‌های خون بند ناف از سازمان انتقال خون ایران تهیه شدند. به‌منظور جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ از خون بند ناف، ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNC) جدا شد. نمونه‌های خون بند ناف در فالکون‌های ۵۰میلی‌لیتری تقسیم شد و هم‌حجم آنها بافر PBS حاوی EDTA با غلظت ۲میلی‌مولار و آلبومین سرم گاوی (BSA) ۰/۵% (وزنی:حجمی) و هیدروکسی‌اتیل‌استارچ (HES) ۲۰% (حجمی:حجمی) اضافه شد. فالکون‌ها به‌مدت ۲۰دقیقه تا یک‌ساعت در دمای محیط نگه داشته شد، پس از گذشت این مدت‌زمان، فاز رویی را برداشته و به فالکون جدید حاوی فایکول انتقال داده شد و سانتریفوژ با دور ۴۰۰g به‌مدت ۲۵دقیقه انجام شد. پس از سانتریفوژ سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌صورت یک تک‌لایه سفیدرنگ در وسط محلول مشاهده می‌شوند. این لایه سفیدرنگ به دقت برداشته شده و به فالکون جدید انتقال یافت. پس از سانتریفوژ به‌مدت ۱۰دقیقه با دور ۳۰۰g رسوب سلولی با استفاده از PBS شست‌وشو داده شد. به‌منظور جداکردن سلول‌های $CD34^+$ از دیگر سلول‌های تک‌هسته‌ای، از تکنیک MACS استفاده شد. ستون‌های MACS از شرکت میلتنی‌بیوتک آلمان تهیه شدند. درنهایت خلوص سلول‌های استخراج‌شده و نیز بازدهی استخراج از طریق فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD34-FITC، CD38-PE، CD41-FITC و CD61-FITC مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی جذب نانوکورکومین توسط سلول‌های بنیادی خون‌ساز: یکی از مزایای نانوکورکومین نسبت به کورکومین، جذب سلولی بالای آن است که در سلول‌های مختلف در آزمایشگاه ما مورد بررسی قرار گرفته است[20]، در این پژوهش نیز جذب سلولی نانوکورکومین برای سلول‌های بنیادی خون‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور به تعداد 10^4 سلول در هر چاهک از یک پلیت ۲۴خانه در حضور محیط کشت StemMACS، کشت داده شد. نمونه تحت تیمار با نانوکورکومین با غلظت ۱۵میکرومولار قرار گرفت. پس از گذشت ۵ساعت سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسنت (اولمپیوس؛ ژاپن) با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری شد.

تیمار سلول‌های بنیادی خون‌ساز در حضور نانوکورکومین: سلول‌های بنیادی خون‌ساز جداسازی‌شده از خون بند ناف در یک فرآیند دومرحله‌ای کشت داده شدند، در ابتدا تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت StemMACS عاری از سرم در حضور لیگاند Flt1 و SCF که غلظت هر کدام ۵۰نانوگرم بر میلی‌لیتر بود، به‌مدت ۳ روز کشت داده شد. در مرحله دوم 2×10^5 سلول در هر چاهک یک پلیت ۴۸خانه در محیط کشت StemMACS بدون سرم حاوی فاکتور سلول بنیادی (SCF) با غلظت ۵۰نانوگرم بر میلی‌لیتر، اینترلوکین ۳ (IL3) با غلظت ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر در حضور و عدم حضور نانوکورکومین با غلظت ۱۵میکرومولار در دمای ۳۷°C به‌مدت ۷ روز کشت داده شد. هر دو روز یک‌بار نصف محیط کشت تعویض شد.

بررسی تغییر میزان ROS سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تیمار با نانوکورکومین: همان‌گونه که توضیح داده شد، گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در مگاکاریوپویزیز ایفا می‌کنند و از سوی دیگر کورکومین در غلظت بالای ۱۰میکرومولار اکسیدان است. به همین منظور در این مطالعه به بررسی تغییرات میزان ROS درون سلولی در سلول‌های بنیادی خون‌ساز استخراج‌شده از خون بند ناف تحت تیمار با نانوکورکومین، پرداخته شد. در این فرآیند از رنگ‌آمیزی با ماده شیمیایی دی‌کلروفلورسئین دی‌استات (H_2DCF-DA) و سپس فلوسایتومتری استفاده شد. H_2DCF-DA یک ترکیب غیرفلورسنت است که می‌تواند به درون سلول نفوذ کند. اگر درون سلول ROS وجود داشته باشد این ترکیب را به DCF تبدیل می‌کند. DCF بسیار فلورسنت بوده و در طول موج ۴۸۸نانومتر نشر دارد. بنابراین تغییرات فلورسنت در ترکیب H_2DCF-DA می‌تواند بیانگر تغییر میزان ROS درون سلولی باشد. در این پژوهش سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ مستخرج از خون بند ناف پس از تکثیر در محیط کشت Stem MACS به‌مدت ۷ روز در حضور نانوکورکومین دندروزومی با غلظت نهایی ۱۵میکرومولار کشت داده شدند. گروه کنترل بدون تیمار با دارو در نظر گرفته شد. همچنین به یک گروه از هر سلول آب‌اکسیژنه با غلظت ۲۵۰میکرومولار اضافه و به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس این سلول‌ها در معرض H_2DCF-DA با غلظت ۱۰میلی‌مولار قرار گرفت و به‌مدت ۴۵دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. بعد از انکوباسیون با استفاده از فلوسایتومتری FACS Calibur میزان فلورسنت ساطع‌شده در طول موج ۴۸۸نانومتر بررسی شد. نتایج از طریق نرم‌افزار Flowing software 2.5.1 آنالیز شدند و معنی‌داربودن نتایج با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism 7 مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای بررسی بیان فاکتورهای رونویسی مهم در تمایز میلوئیدی شامل *GATA1*، *GATA2*، *Hhex* و *c-Myb* و *GAPDH* (به‌عنوان کنترل داخلی) در سطح mRNA در سلول‌های HSC پس از تیمار با نانوکورکومین، بعد از گذشت ۷ روز از تیمار سلولی در حضور نانوکورکومین، استخراج RNA با استفاده از محلول RiboX انجام شد. غلظت و خلوص RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد، همچنین برای اطمینان از صحت RNA استخراج‌شده الکتروفورز نمونه در ژل آگارز انجام شد. به‌منظور سنتز cDNA مقدار یک‌میکروگرم از RNA تحت تیمار با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (RT) (تاکارا؛ ژاپن) قرار گرفت. برای اطمینان از cDNA ساخته‌شده، با نمونه‌های cDNA واکنش PCR از طریق

www.SID.ir

Archive of SID

پرایمرهای ژن خانه‌زاد *GAPDH* انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های *GATA1*، *GATA2*، *Hhex* و *c-Myb* با استفاده از RT-PCR کمی (Real time RT-PCR): RT-PCR کمی از طریق دستگاه StepOne Real-Time PCR (ایالات متحده) با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای این ژن‌ها و سایبرگرین انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

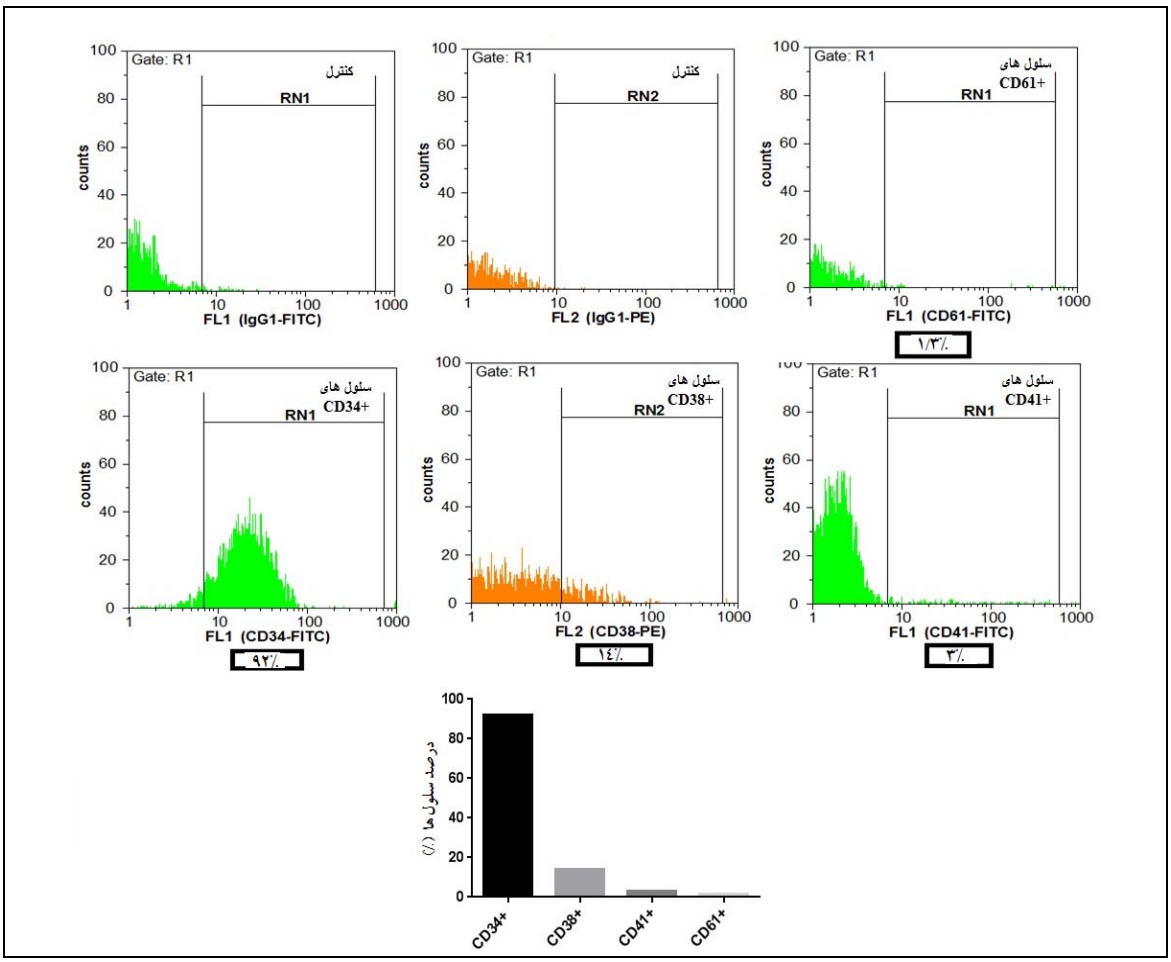
جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای بررسی بیان ژن‌های مورد نظر

ژن	پرایمر پیشرو	پرایمر معکوس
GATA2	GGCGTCAAGTACCAAGTGTCAC	CTCCCGGCCTTCTGAGCAGGAG
c-Myb	GAGCTTGTCCAGAAATATGGTCCGAAG	GGCTGCCGCAGCCGGCTGAGGGAC
GAPDH	CCGAGCCACATCGCACAG	GGCAACAATATCCACTTTACCAG
GATA1	TGGGATCACACTGAGCTTGCCA	GGCCTCAGCGTCCCTGTAGTAG
HHEX	CAGGTGAGATTCTCCAACG	TGACCTGTCTCTCGCTGAG

تیمارهای ۷روزه نانوکورکومین و نمونه کنترل (در حضور IL-3 و SCF اما بدون نانوکورکومین) هر کدام سه‌بار تکرار شدند. برنامه چرخش دمایی به‌صورت ۹۵°C به‌مدت ۱۰دقیقه، سپس ۴۰ سیکل ۹۵°C به‌مدت ۳۰ثانیه، ۶۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه، درنهایت ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه انجام شد. نتایج با استفاده از روش دلتا- دلتا CT محاسبه شد و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism آنالیزهای آماری برای تعیین میزان معنی‌داری نتایج صورت گرفت.

یافته‌ها

بازدهی جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز از خون بند ناف: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ از نمونه‌های خون بند ناف دریافت‌شده از سازمان انتقال خون ایران، میزان خلوص این سلول‌ها از طریق فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD34-FITC، CD38-PE، CD41-FITC و CD61-FITC مورد بررسی قرار گرفت. مارکر CD34 ویژه سلول‌های HSC است و عدم بیان CD38، CD41 و CD61 نشان می‌دهد که سلول‌های HSC به سمت بالغ‌شدن پیش نرفته‌اند. فنوتیپ به‌دست‌آمده از سلول‌های جداسازی‌شده به‌صورت $CD34^+$ (۹۲%)، $CD38^+$ (۱۴%)، $CD41^+$ (۳%) و $CD61^+$ (۱/۳%) هستند (نمودار ۱). بنابراین سلول‌های استخراج‌شده، سلول‌های بنیادی اولیه بوده و برای انجام تست‌های بعدی مناسب هستند.



نمودار ۱) جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز از خون بند ناف انسانی؛ نتایج نشان می‌دهد که ۹۲% سلول‌های جداشده مارکر CD34 را بیان می‌کنند و سلول‌های بیان‌کننده CD38، CD41 و CD61 پایین است. بنابراین این اطمینان وجود دارد که سلول‌های جداسازی‌شده به‌صورت نابالغ هستند.

www.SID.ir

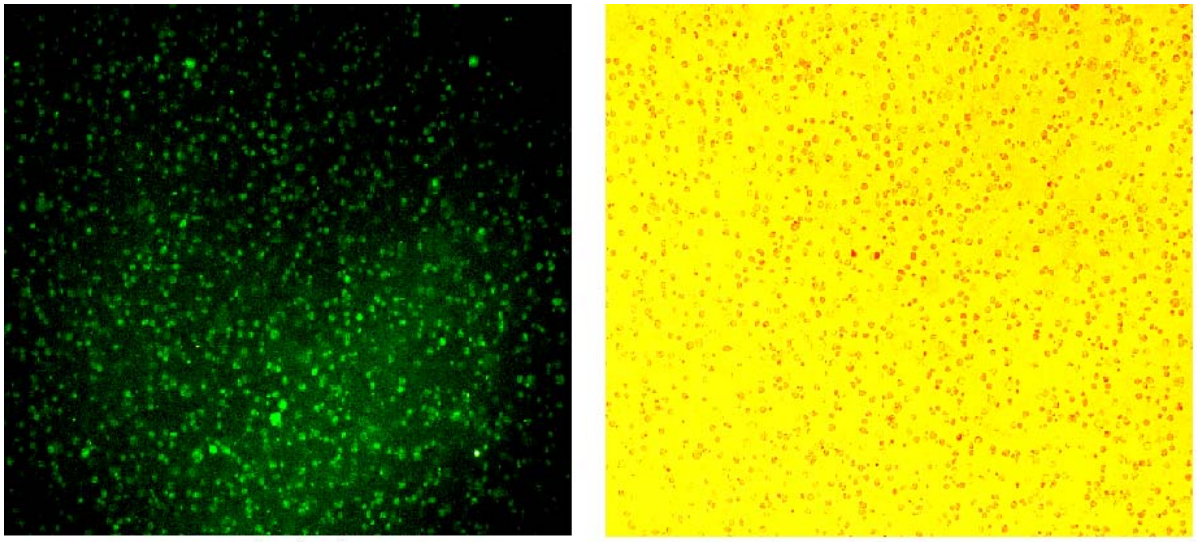
Archive of SID

دریافت نانوکورکومین توسط سلول‌های بنیادی خون‌ساز: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تیمار با نانوکورکومین با غلظت ۱۵میکرومولار نشان می‌دهد که نانوکورکومین بعد از گذشت ۵ساعت توسط این سلول‌ها جذب می‌شود (شکل ۱). با توجه به این نتیجه و نتایج مطالعات قبلی گروه ما، نانوحامل مورد استفاده در ساخت نانوکورکومین (OA400)، به کورکومین کمک می‌کند، که وارد سلول شود.

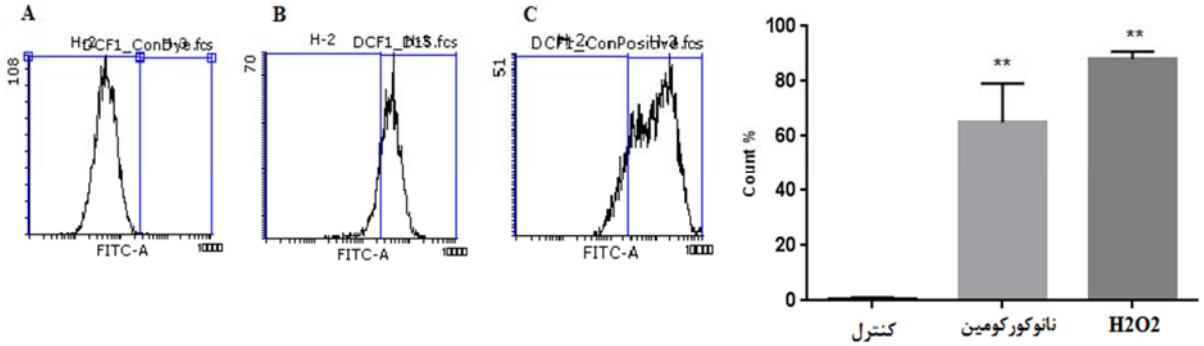
افزایش ROS در سلول‌های تیمارشده با نانوکورکومین: در این مطالعه نیز پس از بررسی میزان ROS سلولی مشخص شد که در سلول‌های بنیادی خون‌ساز، پس از تیمار با نانوکورکومین میزان ROS درون سلولی افزایش می‌یابد (نمودار ۲).

تغییر بیان ژن‌های *GATA1*، *c-Myb*، *Hhex* و *GATA2* تحت تاثیر نانوکورکومین: پس از تکثیر و سپس تیمار سلول‌های بنیادی با استفاده از نانوکورکومین، استخراج RNA از سلول‌های تیمارشده (در محیط کشت حاوی IL-3، SCF و نانوکورکومین) و نمونه کنترل (در حضور IL-3 و SCF بدون نانوکورکومین) انجام شد. نتایج نانودراپ نسبت جذب ۲۶۰A به ۲۸۰A در نمونه‌ها را بین ۲-۱/۵ نشان داد. بنابراین RNAهای استخراج‌شده از نظر خلوص مناسب هستند. همچنین الکتروفورز آگارز با غلظت ۱/۵% نشان داد که شکستگی RNA رخ نداده است. پس از سنتز cDNA واکنش PCR با استفاده از ژن خانه‌زاد *GAPDH* صحت سنتز cDNA را نشان داد.

پس از انجام RT-PCR کمی منحنی‌های ذوب به‌دست‌آمده بیانگر اختصاصیت تکثیر توالی ژن‌های مورد نظر است. آنالیز نتایج که با استفاده از روش دلتا- دلتا CT انجام شد و در آن از *GAPDH* برای نرمال‌کردن نتایج استفاده شد، نشان داد که بیان ژن‌های *GATA1*، *c-Myb* و *Hhex* در سطح mRNA در نمونه‌هایی که در حضور نانوکورکومین کشت داده شده‌اند، نسبت به نمونه نرمال به‌صورت معنی‌دار با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ افزایش یافته است. بیان GATA2 نیز افزایش نشان می‌دهد اما آنالیزهای آماری نشان می‌دهد که افزایش آن به‌صورت معنی‌دار نیست (نمودار ۳).



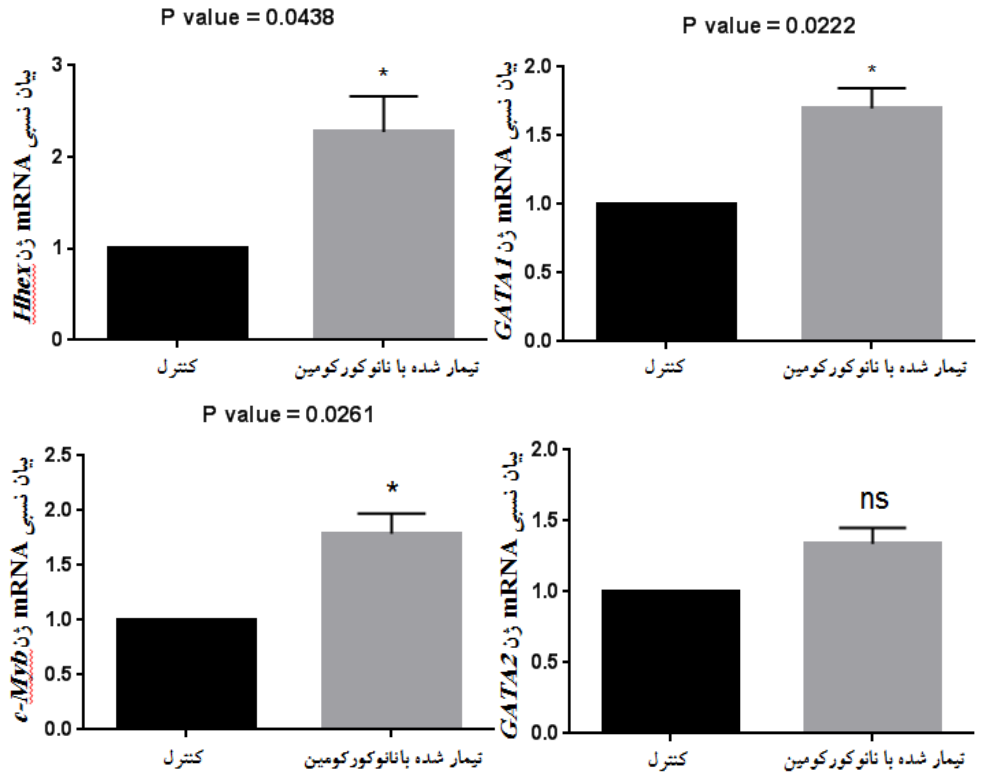
شکل ۱) تصویر میکروسکوپ نوری و فلورسنت از سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تیمار با نانوکورکومین؛ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های تحت تیمار با نانوکورکومین با غلظت ۱۵میکرومولار، گرفته شده است. این تصویر نشان می‌دهد که بیش از ۹۰% سلول‌ها نانوکورکومین را جذب کرده‌اند (بزرگ‌نمایی مورد استفاده ۴X است).



نمودار ۲) تغییر میزان ROS در سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تیمار با نانوکورکومین ۱۵میکرومولار؛ A) نمونه کنترل بدون تیمار با نانوکورکومین، B) نمونه تیمار شده با نانوکورکومین ۱۵میکرومولار، C) سلول‌های تیمارشده با آب‌اکسیژنه که به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. نمودار تغییر میزان ROS نشان می‌دهد که نانوکورکومین به‌صورت معنی‌دار میزان ROS را نسبت به سلول‌های تیمارنشده، افزایش داده است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳) بررسی بیان ژن‌های *GATA1*، *c-Myb*، *Hhex* و *GATA2* در نمونه‌های سلول‌های بنیادی خون‌ساز در حضور و عدم حضور نانوکورکومین؛ نمونه‌های کنترل در محیط کشت حاوی SCF و IL-3 کشت داده شده‌اند. نمونه‌های تیمارشده در همین محیط کشت با اضافه‌کردن غلظت ۱۵میکرومولار نانوکورکومین رشد کرده‌اند. مدت‌زمان رشد و متعهدشدن سلول‌ها ۱۴ روز است. آنالیز نتایج با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد و ژن *GAPDH* برای نرمال‌سازی نتایج به کار رفت. معنی‌داربودن تغییر بیان ژن‌ها با استفاده از ستاره روی نمودارها نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید انواع سلول‌های خونی توسط سلول‌های HSC در مغز استخوان فرآیند پیچیده‌ای است و مدیران اصلی آن فاکتورهای رونویسی هستند. طی خون‌سازی سلول‌های HSC به سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی و لنفوئیدی تمایز می‌یابند و درنهایت از هر رده، چندین سلول بالغ خونی ایجاد می‌شود. در طول این فرآیند بیان ژن‌های بسیاری از جمله مارکرهای سطحی سلول، تغییر می‌کند که سبب تغییر مورفولوژی یا عملکرد سلول‌ها در هر مرحله می‌شود. این تغییرات به محققان کمک می‌کند که سلول‌های بالغ را با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطحی سلول از سلول‌های نابالغ تمییز دهند[21]. در این مطالعه نیز سلول‌های بنیادی خون‌ساز با استفاده از آنتی‌بادی مگنتیک علیه مارکر CD34 از خون بند ناف استخراج شد، این مارکر مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز نابالغ Long-term انسانی است. این گروه از سلول‌های بنیادی خون‌ساز قدرت بازسازی و خودتجدیدشوندگی بالا و طولانی مدتی دارند. این سلول‌ها سپس به Short-term HSC (ST-HSC) تبدیل می‌شود که قابلیت خودتکثیرشوندگی در آنها کاهش یافته است و می‌توانند برای مدت کوتاه ویژگی خودبازسازی داشته باشند. در نمونه استخراج‌شده درصد سلول‌های دارای مارکرهای CD38، CD41 و CD61 پایین بود که بیانگر این است که سلول‌های بنیادی استخراج‌شده، به سمت متعهدشدن به سلول‌های پیش‌ساز نرفته‌اند.

مطالعات گذشته از برخی ترکیبات برای القای تمایز میلوئیدی در سلول‌های سرطانی که در آنها تمایز متوقف شده است، پرداخته‌اند. به‌عنوان مثال در یک مطالعه از ۶-بنزیل‌تیواینوزین (6BT) برای این منظور استفاده شده است. همچنین از ترکیب ترانس‌رتینوئیک‌اسید (ATRA) برای القای تمایز میلوئیدی سلول‌های سرطانی AML استفاده شده است[22]. مزیت نانوکورکومین نسبت به این ترکیبات ایمن‌بودن و عدم اثرات جانبی این ترکیب است. *گولوویزنینا* و همکاران نشان داده‌اند که وزیکول‌های خارج سلولی به‌دست‌آمده از سلول‌های استرومایی مزانشیمی قادر هستند تعهد به سمت رده سلولی میلوئیدی را در سلول‌های بنیادی خون‌ساز از طریق فعال‌کردن سیگنال‌دهی مسیر کلاسیک NFκB و نیز بیان ژن‌های پایین‌دست آن، همچنین افزایش بیان فاکتورهای رونویسی دخیل در تمایز میلوئیدی القا کنند[23]. از آنجایی که نانوکورکومین بسته به غلظت آن قادر به فعال‌کردن موقت مسیر NFκB است، به نظر می‌رسد این مسیر در عملکرد این ترکیب موثر باشد.

عملکرد ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی در تنظیم تعهد، تکثیر و تمایز نهایی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در بسیاری از مطالعات مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قرار گرفته است. فاکتورهای رونویسی که بیان آنها در این مطالعه اندازه‌گیری شد شامل *GATA1*، *GATA2*، *c-Myb* و *Hhex* هستند که در مراحل اولیه متعهدشدن سلول به سمت رده میلوئیدی نقش دارند، اما برخی از فاکتورهای رونویسی مانند CEBP و PU.1 که قبلاً به آنها اشاره شد مرحله نهایی تمایز میلوئیدی را پیش می‌برند[24]. در این مطالعه نشان داده شد که نانوکورکومین با القای بیان فاکتورهای *GATA1*، *Hhex* و *c-Myb* احتمالاً در پیشروی مراحل ابتدایی تصمیم به تمایز سلول بنیادی خون‌ساز به رده میلوئیدی، نقش ایفا می‌کند.

از آنجایی که میزان ROS، سیگنال مهمی برای عملکرد و شروع تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز است[25] و نانوکورکومین بسته به میزان غلظت می‌تواند ROS سلولی را تغییر دهد[26] (غلظت بالاتر از ۱۰میکرومولار میزان ROS را افزایش و کمتر از ۱۰میکرومولار ROS را کاهش می‌دهد) و در این پژوهش از غلظت ۱۵میکرومولار این ترکیب استفاده شد. این امکان وجود دارد که یکی از عوامل موثر در القای بیان فاکتورهای رونویسی مرتبط با تمایز میلوئیدی توسط نانوکورکومین، افزایش میزان ROS درون سلولی باشد. مطالعات مختلفی از افزایش ROS برای القای تمایز مگاکاریوسیتی استفاده کرده‌اند. در سال ۲۰۱۴ *نورحیاتی* و همکاران از تولید استرس‌اکسیداتیو اندوژنوس با استفاده از اشعه ماورابنفش نزدیک برای تمایز مگاکاریوسیتی در سلول K562 استفاده کردند. در این مطالعه افزایش استرس‌اکسیداتیو همراه با تیمار با PMA مورد بررسی قرار گرفت. اشعه UV نزدیک سبب افزایش بیان ژن *p21* شد که یک مهارکننده سیکل سلولی است. همچنین میزان سلول‌های با پلوئیدی بالا (8N و 16N) و سلول‌های بیان‌کننده CD41 (مارکر مگاکاریوسیتی)، در حضور اشعه UV افزایش نشان می‌دهد[27].

با وجود این که گزارش‌هایی مبنی بر نقش Hhex در تمایز میلوئیدی موجود است و این فاکتور می‌تواند سبب پایداری سلول‌های بنیادی خون‌ساز و رده میلوئیدی شود[28]، برخی مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که Hhex عملکرد چندانی در تنظیم تمایز به رده‌های سلولی ندارد و تنها در مراحل ابتدایی تولید سلول بنیادی خون‌ساز نقش ایفا می‌کند[29]. مطالعه حاضر افزایش بیان این فاکتور رونویسی را در سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تیمار با نانوکورکومین، همراه با افزایش بیان فاکتورهای دخیل در تمایز به سمت رده میلوئیدی نشان می‌دهد. بنابراین این امکان وجود دارد که این فاکتور رونویسی در متعهدشدن به سمت میلوئید نیز نقش مهمی داشته باشد.

مطالعات قبلی گروه ما نشان داده است که جذب سلولی نانوکورکومین نسبت به کورکومین در سلول‌های سرطانی چسبنده، بسیار بالاتر است[20]، در این پژوهش نیز دریافت بالای نانوکورکومین (۹۰%) توسط سلول‌های بنیادی خون‌ساز غیرچسبنده مشاهده شد.

با توجه به نتایج حاصل‌شده نانوکورکومین به‌عنوان یک ترکیب جدید و ایمن می‌تواند کاندید خوبی برای افزایش فاکتورهای مورد نیاز برای تمایز میلوئیدی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط آزمایشگاه محسوب شود. بنابراین می‌توان از آن برای تحقیق‌های پایه به‌منظور بررسی مکانیزم تمایز میلوئیدی استفاده کرد، علاوه بر این استفاده از نانوکورکومین برای القای تمایز پیش از پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز توصیه می‌شود.

کورکومین ترکیبی است که بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله مسیرهایی مانند NFκB، MAPKها و غیره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیزم عمل این ترکیب در روند افزایش بیان فاکتورهای مورد نیاز برای القای تمایز به رده میلوئیدی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی: از گروه هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت‌مدرس بابت کمک‌های ایشان برای جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سیده‌سحر مرتضوی‌فارسانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)؛ هادی شیرزاد (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۵%)؛ فرهود نجفی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۵%)

منابع مالی: پژوهش حاضر توسط دانشگاه تربیت‌مدرس تهران و پژوهشگاه رویان تهران از نظر مالی و تجهیزات آزمایشگاهی، مورد حمایت قرار گرفته است.

منابع

1- Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. Immunity. 2007;26(6):726-40.

2- Chao MP, Seita J, Weissman IL. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1 January, 2008, United States. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. pp. 439-449.

3- Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. Annu Rev Immunol. 2006;24:705-38.

4- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(22):12355-8.

5- Pundhir S, Bratt Lauridsen FK, Schuster MB, Jakobsen JS, Ge Y, Schoof EM, et al. Enhancer and transcription factor dynamics during myeloid differentiation reveal an early differentiation block in Cebpa null progenitors. Cell Rep. 2018;23(9):2744-57.

6- Iwasaki H, Mizuno SI, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. Genes Dev. 2006;20(21):3010-21.

7- Iwasaki H, Mizuno SI, Wells RA, Cantor AB, Watanabe S, Akashi K. GATA-1 converts lymphoid and

www.SID.ir

Archive of SID

BB. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. Mol Pharmaceutics. 2007;4(6):807-18.
20- Tahmasebi Birgani M, Erfani Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. Prog Biol Sci. 2015;5(2):143-58.
21- Attar A. Changes in the cell surface markers during normal hematopoiesis: A guide to cell isolation. Global J Hematol Blood Transfus. 2014;1(1):20-8.
22- Wald DN, Vermaat HM, Zang Sh, Lavik A, Kang Z, Peleg G, et al. Identification of 6-benzylthioinosine as a myeloid leukemia differentiation-inducing compound. Cancer Res. 2008;68(11):4369-76.
23- Goloviznina NA, Verghese SC, Me Yoon Y, Taratula O, Marks DL, Kurre P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles promote myeloid-biased multipotent hematopoietic progenitor expansion via toll-like receptor engagement. J Biol Chem. 2016;291(47):24607-17.
24- Du Y, Campbell JL, Nalbant D, Youn H, Bass AC, Cobos E, et al. Mapping gene expression patterns during myeloid differentiation using the EML hematopoietic progenitor cell line. Exp Hematol. 2002;30(7):649-58.
25- Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C, et al. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. Antioxid Redox Signal. 2014;21(11):1605-19.
26- Woo JH, Kim YH, Choi YJ, Kim DG, Lee KS, Bae JH, et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: Induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-X L and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. Carcinogenesis. 2003;24(7):1199-208.
27- Nurhayati RW, Ojima Y, Nomura N, Taya M. Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation. Cell Mol Biol Lett. 2014;19(4):590-600.
28- Wilson NK, Miranda-Saavedra D, Kinston S, Bonadies N, Foster SD, Calero-Nieto F, et al. The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene Scl/Tal1 during early embryonic hematopoietic development. Blood. 2009;113(22):5456-65.
29- Goodings C, Smith E, Mathias E, Elliott N, Cleveland SM, Tripathi RM, et al. Hhex is required at multiple stages of adult hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. Stem Cells. 2015;33(8):2628-41.
myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. Immunity. 2003;19(3):451-62.
8- Jackson JT, Ng AP, Shields BJ, Haupt S, Haupt Y, McCormack MP. Hhex induces promyelocyte self-renewal and cooperates with growth factor independence to cause myeloid leukemia in mice. Blood Adv. 2018;2(4):347-60.
9- Migueles RP, Shaw L, Rodrigues NP, May G, Henseleit K, Anderson KG, et al. Transcriptional regulation of Hhex in hematopoiesis and hematopoietic stem cell ontogeny. Dev Biol. 2017;424(2):236-45.
10- Paz H, Lynch MR, Bogue CW, Gasson JC. The homeobox gene Hhex regulates the earliest stages of definitive hematopoiesis. Blood. 2010;116(8):1254-62.
11- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med. 2006;12(4):446-51.
12- Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood. 2007;110(8):3056-63.
13- Buhrmann C, Mobasheri A, Matis U, Shakibaei M. Curcumin mediated suppression of nuclear factor-κB promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. Arthritis Res Ther. 2010;12(4):R127.
14- Zhuang W, Long L, Zheng B, Ji W, Yang N, Zhang Q, et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. Cancer Sci. 2012;103(4):684-90.
15- Motahari P, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, Sabri Sh, Zolghadr F. Generation of stable ARE-driven reporter system for monitoring oxidative stress. DARU J Pharm Sci. 2015;23:38.
16- López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. Mol Nutr Food Res. 2008;52(Suppl 1):S103-27.
17- Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. Int Immunopharmacol. 2012;12(1):226-34.
18- Sadeghizadeh M, Ranjbar B, Damaghi M, Khaki L, Sarbolouki MN, Najafi F, et al. Dendrosomes as novel gene porters-III. J Chem Technol Biotechnol. 2008;83(6):912-20.
19- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal

www.SID.ir