

تأثیر miR-146a و miR-150 بر القای تمایز سلول‌های لنفوئیدی T در سلول‌های بنیادی خونساز

پرویز فلاح^۱، مسعود سلیمانی^۲، محسن حمیدپور^۳، مصطفی رضایی طاویرانی^۴، احمد قره‌باغیان^۵، احسان عارفیان^۶، کتایون احمدی^۷

چکیده

سابقه و هدف

میکرو RNAها، کلاسی از RNAهای کوچک غیر کدکننده هستند و اخیراً نشان داده شده است که نقشی اساسی در فرآیندهای مهم سلولی از جمله تکامل و تمایز از طریق تنظیم پس از ترجمه، ایفا می‌کنند. نقش این عناصر در رده سلول‌های خونساز نیز بررسی شده است و شواهد زیادی دال بر دخالت میکرو RNA های شماره ۱۵۰ (miR-150) و ۱۴۶ (miR-146a) در تمایز لنفوسیت‌های T وجود دارد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر افزایش بیان miR-150 و miR-146a در سلول‌های بنیادی خونساز و توانایی این دو میکرو RNA در تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های لنفوئیدی T بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، القای افزایش بیان دو miR-150 و miR-146a در سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف صورت گرفت. پس از هفت روز، فرآیند تمایز به لنفوسیت‌های T با مارکرهای CD4 و CD8 توسط روش فلوسیتومتری سنجیده شدند. هم چنین افزایش بیان این دو میکرو RNA با روش‌های RT-PCR و quantitative Real Time PCR بررسی شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف، یک هفته پس از آلودگی با ویروس خصوصیات لنفوسیت‌های T به ویژه لنفوسیت‌های T سائیتوتوکسیک را از خود نشان دادند، یعنی افزایش بیان مارکرهای CD4 و به ویژه CD8 در آن‌ها دیده شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف، با افزایش القای بیان miR-150 و miR-146a، توانایی تمایز به سمت لنفوسیت‌های T را دارند.

کلمات کلیدی: میکرو RNAها، miR-150 انسانی، miR-146a انسانی، سلول‌های بنیادی خونساز

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۹

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤل: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
- ۳- PhD هماتولوژی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۴- PhD بیوفیزیک - دانشیار مرکز تحقیقات پروتومیکس، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۵- PhD ایمونوهیاتولوژی بالینی - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۶- PhD ویروس شناسی - مرکز تحقیقات بن یاخته - تهران - ایران
- ۷- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بن یاخته - تهران - ایران

مقدمه

لنفوسیت‌های B در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و داخل بدنی (*in vivo*) شد (۱۲). هم چنین با روشی مشابه نشان داده شد که miR-223 طی فرآیند تمایز گرانولوسیتی افزایش می‌یابد و پیش‌سازهای پرومیلوسیتی را در انسان به سمت رده گرانولوسیتی پیش می‌راند (۱۳، ۱۲).

با استناد به بررسی‌های انجام شده مشخص شد که در حالت معمول برای تمایز سلول بنیادی خونساز به رده لنفوئیدی T، با افزودن فاکتورهای رشد خاص این رده در محیط کشت به سلول‌ها، این کار انجام می‌شود، با بررسی بیان میکرو RNAها مشخص شد در این روند دو miR-150 و miR-146a افزایش بیان داشته‌اند، اما هدف در مطالعه حاضر تمایز سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ به رده لنفوئیدی T فقط با القای بیان این دو میکرو RNA در سلول‌های بنیادی خونساز بدون افزودن فاکتور رشد به محیط کشت سلول‌ها بود (۱۴، ۱۵).

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ از خون بند ناف:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ از خون بند ناف جداسازی شده و ماهیت بنیادی آن‌ها تایید شد. به طور خلاصه یک نمونه خون بند ناف که به طور میانگین حاوی ۶۰ تا ۷۰ میلی‌لیتر خون با ماده ضد انعقاد CPDA بود، گرفته شد. در مرحله بعد ۳۰ میلی‌لیتر نمونه خون با ۱۰ میلی‌لیتر PBS (Phosphate buffer Saline) استریل رقیق شد (نسبت سه به یک). سپس خون رقیق شده به آرامی به ۳ میلی‌لیتر فایکول در فالكون ۱۵ افزوده شد، به طوری که خون به صورت یک لایه بر روی فایکول قرار بگیرد. به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۱۰۰ سانتریفوژ انجام شد. سلول‌های تک هسته‌ای مابین گلبول‌های قرمز که در پایین لوله رسوب کرده‌اند و مایع زرد رنگی که در بالای لوله است به صورت یک لایه جمع می‌شوند که با استفاده از پی‌پت پاستور این لایه را به داخل یک لوله فالكون تمیز منتقل کرده و با PBS یک بار شستشو دادیم. جداسازی سلول‌های CD133⁺ با استفاده از روش

امروزه سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی با توانایی خودسازی و تکثیر به همراه توانایی تمایز به رده‌های خونساز شناسایی می‌شوند. با بررسی‌های انجام شده بر روی مغز استخوان مشخص شد که سلول‌های اولیه‌ای در این بافت‌ها وجود دارند که قادر به ایجاد کلونی‌های خونساز در طحال موش اشعه دیده تا حد مرگ می‌باشند (۲، ۱). سلول بنیادی قادر است که پس از تقسیم متقارن، سلول‌های دختری ایجاد کند که یکی مشابه مادر و دیگری به سمت تمایز متعهد شود (۳). شاخصی که در انتخاب سلول‌های بنیادی خونساز به کار می‌رود، آنتی‌ژن CD133 است. اولین بار بین و همکارانش این مولکول سطحی را شناسایی کرده و خصوصیات آن را توصیف کردند (۴، ۵).

در کنار نقش اولیه فاکتورهای رونویسی ژن، در چند سال اخیر خانواده دیگری از عناصر تنظیمی در بیان ژن‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته و نشان داده شده است که نقشی تعیین کننده در تمایز رده‌های سلولی ایفا می‌کنند. این عناصر تنظیمی اپی ژنتیک، در گروه RNAهای کوچک غیر کدکننده قرار گرفته و میکرو RNA (miRNA) نام دارند (۶، ۷). میکرو RNAها، مولکول‌های RNA کوچک و تک رشته‌ای هستند که مکمل mRNA یک ژن کد کننده پروتئین دیگر می‌باشند و می‌توانند از بیان یک ژن و تولید پروتئین مربوطه جلوگیری کنند. میکرو RNA ابتدا در کرم *C. elegans* به شکل مولکول‌های RNA با طول ۲۳-۱۸ نوکلئوتید که مکمل بخش 3'-mRNA UTRهای هدف بودند، دیده شدند و شامل lin-4 و let-7 می‌باشند (۸، ۹).

در سال‌های اخیر با افزایش پیشرفت در زمینه روش‌های مولکولی و مطالعه‌های انجام شده بر روی میکرو RNAها، نقش این عناصر تنظیمی اپی ژنتیک در تمایز سلول‌های خونساز مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد که میکرو RNAها، سهم قابل توجهی در طول این فرآیند سلولی دارند (۱۱، ۱۰). اولین مورد در موش‌ها شرح داده شد، افزایش بیان نابه‌جای miR-181 در سلول‌های پروژنیتور خونساز، موجب افزایش

مخلوط حاضر به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۳۲۰۰ سانتریفوژ می‌گردد.

فاز رویی محصول سه فازی به دست آمده را برداشته، به میکروتیوب جدید منتقل کرده و به میزان دو برابر حجم آن اتانول سرد اضافه می‌شود.

مخلوط به دست آمده به آرامی تکان داده می‌شود و یک شبانه روز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردد. این مخلوط پس از یک شبانه روز انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌گردد.

مایع رویی دور ریخته می‌شود و به رسوب سفید رنگ ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۷۵٪ سرد اضافه می‌گردد و به خوبی ورتکس می‌شود تا رسوب از ته میکروتیوب جدا گردد.

مخلوط فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌گردد. اتانول روی رسوب دور ریخته می‌شود و در دمای اتاق قرار داده می‌شود تا رسوب تا حد امکان خشک شود. رسوب در ۲۰ میکرولیتر آب استریل حل می‌شود.

سپس غلظت RNA استخراج شده تعیین شده و نیمی از آن برای بررسی mRNA و بیان ژن و نیمی دیگر برای بررسی miRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واکنش پلی‌مریزاسیون معکوس (Reverse = RT transcriptase):

واکنش پلی‌مریزاسیون معکوس (RT) یکی از حساس‌ترین روش‌های تعیین میزان کم mRNA است که از نمونه‌های کوچک و محدود حاصل می‌شود. با این روش می‌توان نمونه‌های گوناگون و کوچک تا حد یک سلول را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و میزان mRNA ها را در نمونه‌های گوناگون با هم مقایسه نمود. به طور طبیعی از روش RT-PCR برای مشخص نمودن الگوی بیان ژن‌های مورد نظر در شرایط و تیمارهای متفاوت و هم چنین برای تعیین ساختار RNA استفاده می‌شود. باید توجه داشت که RT-PCR، روش پیچیده‌ای است که کلیه

جداسازی مغناطیسی سلول انجام شد (MACS = Magnetic Cell Sorting of human cells). برای جداسازی با MACS، سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده در مرحله قبل، با آنتی‌بادی‌ها علیه مولکول CD133 نشاندار شد که این مرحله مجاورت با آنتی‌بادی، ۳۰ دقیقه بود. سپس سلول‌ها شسته شده و روی ستون برده شدند. در این مرحله که ستون داخل آهن‌ربا قرار داده می‌شود، سلول‌های CD133⁺ داخل آن باقی مانده و CD133⁻ها خارج می‌شوند. در مرحله بعد ستون از آهن‌ربا خارج شده و یک بار با PBS شستشو انجام شد که نتیجه آن خروج سلول‌های CD133⁺ بود. سپس سلول‌های CD133⁺ جدا شده برای تکثیر در محیط کشت Stemsan بدون سرم، حاوی کوکتل تکثیر (expansion) قرار گرفتند. این کوکتل شامل Stem cell factor ۱۰۰ ng/mL، TPO و اینترلوکین ۳ با غلظت ۱۰ ng/mL بود. سلول‌های فوق مدت ۵ الی ۷ روز در این محیط تکثیر شدند، بعد از آن برای تایید مارکر CD133، فلوسیتومتری با آنتی‌بادی CD133 (Anti-CD133) انجام شد. سپس برای مرحله بعد یعنی تمایز، آن‌ها به محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) انتقال داده شدند.

استخراج Total RNA:

برای استخراج Total RNA از سلول، از کیت‌های استخراج RNA گوناگونی استفاده می‌شود. این کیت‌ها بر اساس اختلاف فاز فنل کلرفرم یا بر اساس قدرت تفکیک ستون‌های کوچک جداسازی کار می‌کنند. در ایران هر دو مورد قابل استفاده است. گرچه کیت‌هایی که بر اساس فنل کلرفرم کار می‌کند، دارای میزان تخلیص بالاتری هستند ولی RNA حاصل از ستون سالم‌تر می‌باشد. مراحل کار کیت‌های مبتنی بر فنل کلرفرم به صورت زیر می‌باشد:

یک میلی‌لیتر از محلول تیزول بر روی سلول‌ها ریخته می‌شود، به خوبی مخلوط می‌گردد و در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌شود.

مخلوط فوق به میکروتیوب منتقل می‌شود و به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلرفرم اضافه می‌گردد و با تکان دست به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی با مخلوط فوق آمیخته می‌شود.

گزنونوکلئازی، هر دو آنزیم را در خور اشتباه می‌کند. Km (ضریب میکائیلیس) این آنزیم‌ها برای سوبسترای dNTP خیلی بالاست. به همین دلیل باید برای اطمینان حاصل کردن از رونویسی کامل ترانسکریپت، غلظت بالایی از dNTP مصرف شود.

آنزیم سوم، DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت Taq است. این آنزیم توسط یک باکتری گرما دوست (*Eubacterium thermophilus*) ساخته می‌شود که در حضور Mn^{2+} از خود فعالیت RT نشان می‌دهد. مزیت مهم استفاده از این آنزیم این است که هر دو مرحله RT و PCR در یک تیوپ صورت می‌گیرد. ولی متأسفانه این آنزیم قادر است تنها ۱-۲ kb cDNA را بسازد که این میزان از کارایی Mo-MLV که حدود ۱۰ kb را تولید می‌کند، پایین‌تر است از طرف دیگر یون Mn^{2+} باعث کاهش کارایی ساخت DNA می‌شود و در نهایت Tth قادر نیست که از آغازگرهای اولیگو dTTP و راندوم هگزامر استفاده کند زیرا این آغازگرها در دمایی که آنزیم فعال است پایدار نمی‌باشند.

در فرآیند RT برای ساختن cDNA، به آغازگر احتیاج است. آغازگرهای آنتی‌سنس اختصاصی (Antisense specific primers)، قطعات الیگونوکلئوتیدهای شش‌تایی تصادفی (Random Hexamers)، و آغازگرهای الیگوتیمیدین (Oligo dTTP)، سه نوع آغازگری هستند که در فرآیند RT از آن‌ها استفاده می‌شود. انتخاب مناسب آغازگر و تعیین میزان مناسب غلظت آن در انجام صحیح فرآیند RT ضروری است.

آغازگر Reverse اختصاصی ژن، اکثراً به صورت اختصاصی به الگوی RNA متصل می‌شود و از به دست آمدن cDNA های دیگر مناطق جلوگیری می‌کند. استفاده از راندوم هگزامر یا آغازگرهای الیگوتیمیدین میزان mRNA های قابل تجزیه و تحلیل که از یک نمونه استخراج شده‌اند را به حداکثر می‌رساند، و بیشترین میزان cDNA ممکن از روی RNA ساخته می‌شود. در مواردی که RNA بسیار طولانی و گسترده باشد و یا ساختارهای ثانویه ایجاد شده در RNA زیاد باشد، راندوم هگزامرها به عنوان آغازگر توصیه می‌شوند.

عوامل فیزیکی و شیمیایی دخیل در آن به هم وابسته هستند لذا تکرارپذیری، حساسیت و ویژگی آزمایش به بهینه‌سازی روش و برقراری تعادل بین این عوامل بستگی دارد.

RNA نمی‌تواند به عنوان الگو در PCR استفاده شود پس اولین مرحله رونویسی معکوس از روی RNA و تولید cDNA می‌باشد. سپس این الگو با PCR به صورت نمایی تکثیر یافته و میزان آن افزایش می‌یابد.

ترانس کریپت‌ها، ساختارهای ثانویه‌ای را تشکیل می‌دهند که آنزیم پلی‌مراز معکوس (RT) قادر به باز کردن آن‌ها نیست پس cDNA در این موارد به طور مناسب ساخته نمی‌شود. این پدیده کیفیت RT-PCR را کاهش می‌دهد لذا سعی می‌شود که از طرق گوناگون از ایجاد آن جلوگیری شود.

آنزیم‌های رایج که در فرآیند رونویسی معکوس (RT) استفاده می‌شوند سه نوع هستند؛ یکی آنزیم رونویسی معکوس ویروس آوین میلوبلاستوزیس (AMV = Avian Myeloblastosis Virus) و دیگری آنزیم رونویسی معکوس ویروس ملونی مورین لوکمی (Mo-MLV = Moloney Murine Leukemia Virus) می‌باشند که تحت عنوان آنزیم‌های مزوفیل مطرح هستند.

آنزیم AMV نسبت به آنزیم Mo-MLV مقاوم‌تر بوده حتی تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد هم قادر است به طور مشخص فعالیت پلی‌مریزاسیون خود را حفظ کند. هم چنین این آنزیم مشکلاتی که ساختارهای ثانویه RNA ایجاد می‌کنند را از بین می‌برد. در مقابل آنزیم Mo-MLV و آنزیم‌های نوترکیب، فعالیت RNaseH ضعیفی را از خود نشان می‌دهند. به طوری که کاهش این فعالیت باعث می‌شود که آنزیم توانایی ماندگاری‌اش افزایش یافته قطعات cDNA بزرگتری را بسازد. لذا اگر هدف از فعالیت رونویسی معکوس (RT)، ساختن cDNA کامل از کل ترانس کریپت است، آنزیم Mo-MLV پیشنهاد می‌شود.

هر دو آنزیم به یک الگوی RNA یا DNA به همراه یک آغازگر DNA یا RNA که در سر 3' خود گروه هیدروکسیل حمل می‌کند نیاز دارند. فقدان نقش 5'→3'

miR-146a روی cDNA ساخته شده با دستورالعمل مربوط به Master Mix شرکت فرمتناز انجام گرفت (جدول ۱ و ۲).

تخلیص پلاسمیدها:

برای تخلیص پلاسمید از کیت شرکت فرمتناز استفاده شد. این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشای سیلیکاژل استوار است. دستورالعمل تخلیص پلاسمید در زیر آورده شده است:

کشت شبانه باکتری به حجم ۱۰ mL در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتیفریژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت به صورت کامل، رسوب باکتری‌ها در ۲۵۰ μL محلول سوسپانسیون کننده حل شده و به یک میکروتیوب منتقل شد. ۲۵۰ μL محلول لیز کننده به میکروتیوب اضافه و ۶-۴ بار به آرامی برگردانده شد تا به خوبی مخلوط شود. میکروتیوب به مدت حداکثر ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۳۵۰ μL محلول خنثی کننده به میکروتیوب افزوده و ۱۰-۶ بار به آرامی برگردانده شد تا به خوبی مخلوط گردید. بعد از آن در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتیفریژ شد. مایع رویی به آرامی به یک ستون تخلیص پلاسمید منتقل شد و سپس در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۶۰ ثانیه سانتیفریژ گردید و مایع خارج شده دور ریخته شد. به ستون، ۷۰۰ μL الکل ۸۰٪ اضافه و مانند مرحله قبل سانتیفریژ انجام شد، سپس ستون به مدت ۱ دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل سانتیفریژ شد.

مقدار ۵۰ μL بافر elution یا آب مقطر دو بار تقطیر به ستون اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتیفریژ شد، پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار دارد. غلظت پلاسمیدهای تخلیص شده در این مرحله ۳۰۰ ng/μL می‌باشد.

اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-150 با pRETROSUPER و هم‌چنین قطعه pri-mir-146a با pLEX-JRED: برای انجام واکنش اتصال آنزیمی، نسبت مولی قطعات

ساخت cDNA با استفاده از آنزیم Mo-MLV:

مراحل ساخت cDNA به صورت زیر می‌باشد:

در یک لوله فاقد RNase (RNase free)، ۱۰۰ ng تا ۴۰۰ ng از RNA توتال اضافه شد. ۲ μL از آغازگر راندوم هگزامر به آن اضافه گردید. حجم نهایی توسط آب مقطر فاقد RNase به ۲۰ μL رسید. مجموعه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس بلافاصله روی یخ قرار گرفت. بافر [5X] RT، به حجم ۶ μL اضافه شد. ۱۰ mM dNTPmix به میزان ۳ μL اضافه گردید. ۲۰۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس [M-Mul-V] معادل ۱ میکرولیتر اضافه شد. با آب مقطر فاقد RNase به حجم نهایی ۳۰ μL رسانده شد. به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت که سبب غیرفعال شدن آنزیم گردید. سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. محصول cDNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. برای بررسی بیان miR-150، با استفاده از کیت شرکت فرمتناز از روی Total RNA استخراج شده، cDNA ساخته شد.

جدول ۱: مقادیر مورد استفاده جهت انجام Real Time-PCR

مقدار (μL)	مواد
۰/۷۵	آغازگر جلوبرنده (۱۰ pmol)
۰/۷۵	آغازگر معکوس (۱۰ pmol)
۱۲/۵	Master Mix
۹	Di H ₂ O

جدول ۲: چرخه دمایی انجام Real Time-PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۹۵
۴۰ سیکل	۱۰ ثانیه	۹۵
	۴۵ ثانیه	۶۰

انجام Real Time-PCR برای بررسی بیان miR-150 و miR-146a:

واکنش Real Time-PCR برای بررسی بیان miR-150 و

اتصال آنزیمی، نسبت مولی قطعات وکتور و قطعه‌های ژنی مورد نظر به صورت یک به سه انتخاب شد که این واکنش با استفاده از آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل شرکت سیناژن انجام شد.

انتقال به میزبان باکتریایی *STBL4*:

در این تحقیق از روش الکتریکی جهت ترانسفورماسیون استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری کامپنت *STBL4* افزوده شد و بر روی محیط LB-Agar حاوی آمپی‌سیلین برای پلاسمید pRETRO-SUPER و هم چنین بر روی محیط LB-Agar حاوی کانامایسین و ژنومایسین برای پلاسمید pLEX-JRED منتقل گردید. تمام محیط‌های کشت به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ۲۴ ساعت بعد، از کلنی‌های به دست آمده برای پلاسمید یک کلنی برداشته شد و برای فرآیند تخلیص پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی سلول‌ها:

ابتدا سلول‌های تولید کننده ویروس که سلول‌های HEK (Human Embryonic Kidney) و HEK-GP بودند، کشت داده شدند. به این صورت که ۲۴ ساعت قبل از ترانسفورماسیون سلول‌ها با پلاسمید، حدود ۵ میلیون سلول HEK در یک پلیت ۱۰۰ میلیمتری برای لنتی ویروس و هم چنین همین مقدار از سلول HEK-GP برای رتروویروس کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده، DMEM به همراه ۱۰٪ FBS، ۲ mM ال - گلوتامین و Pen-Strep 1X بود. سپس سلول‌ها در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد حدود دو ساعت قبل از ترانسفورماسیون، محیط کشت روی سلول‌ها با محیط تازه که به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود تعویض محیط گردید.

تولید ویروس نوترکیب با استفاده از روش کلسیم فسفات: در این روش ابتدا DNA ها در محیط حاوی بافر فسفات به آرامی با کلرید کلسیم مخلوط شدند. به این

وکتور و insert به صورت ۳:۱ انتخاب شد (جدول ۳).

جدول ۳: مقادیر مورد استفاده جهت اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-146a به وکتور pRETRO-SUPER و هم چنین قطعه pri-miR-146a به وکتور pLEX-JRED

مواد	آزمایش (μL)
وکتور	۱۵
Insert	۲۰
T4 DNA ligase	۲
بافر 10 x	۵
di H ₂ O	۳
PEG	۵

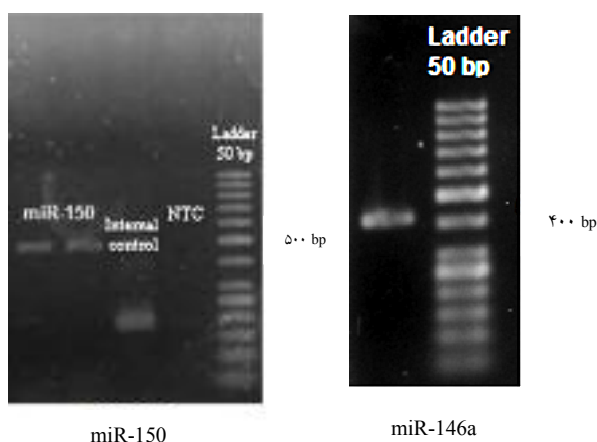
واکنش فوق یک ساعت در دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و آنزیم‌های واکنش سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیر فعال شدند.

کلونینگ *miR-146a* و *miR-150*:

به منظور کلون کردن قطعه ژنی *miR-146a*، از وکتور لنتی ویروسی pLEX-JRED (چون یک وکتور بیانی است و هم چنین پروتئین JRED را بیان می‌کند که می‌توان وجود آن را در سلول با میکروسکوپ فلورسانس بررسی کرد) و برای قطعه ژنی *miR-150* از وکتور رتروویروسی pRETRO-SUPER (یک وکتور بیانی) استفاده شد. بدین منظور ابتدا برای دو قطعه ژنی *miR-146a* و *miR-150*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد (جدول ۴). از طرف دیگر وکتورهای مورد نظر با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت فرمنتاز استخراج شدند. در ادامه قطعه *miR-146a* و وکتور pLEX-JRED با آنزیم‌های محدود کننده *MluI* و *XhoI* و قطعه *miR-150* و وکتور pRETRO-SUPER با آنزیم‌های محدود کننده *BglIII* و *HindIII* که متعلق به شرکت فرمنتاز بودند بریده شدند. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن واکنش اتصال برای هر قطعه با وکتور خاص خودش انجام شد. برای انجام واکنش

جدول ۴: مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر و تشخیص بیان قطعه‌های مورد نظر

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)
۱	pri-miR-146a	F: 5'-CCGCTCGAGCCACATCAGCCTTCCAGAC -3' R: 5'-CGACGCGTCTCACACTCCTTATACCTTCAG -3'	۴۱۶
۲	pri-miR-150	F: 5'-GGAAGATCTCCCTTGCTGGTTCTCTA TG-3' R: 5'-CCCAAGCTTGCAGGTACAATAGAA ACAGGT G-3'	۴۸۲
۳	miR-146a	5'- TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3'	۲۲
۴	miR-150	5'- TCTCCCAACCCTTGTTAC -3'	۱۷



شکل ۱: نتایج PCR قطعه‌های ژنی miR-146a و miR-150

آزمون فلوسیتومتری برای تایید فنوتیپ سلول‌های $CD133^+$:

در این مطالعه بعد از این که سلول‌های بنیادی خونساز $CD133^+$ با روش MACS جدا شدند و به مدت ۵ روز تکثیر یافتند، برای تایید فنوتیپ $CD133$ ، فلوسیتومتری انجام شد که ۹۵٪ ($RN2=0.95$) سلول‌ها، فنوتیپ $CD133$ را داشتند (شکل ۲). از آن جایی که وکتور pLEX-JRED پروتئین رنگی JRED (قرمز) را بیان می‌کرد، از این مزیت برای تایید ورود آن‌ها به سلول‌ها استفاده شد به طوری که بعد از ترانسفکت DNA ها به سلول‌های HEK برای تولید ویروس، از سلول‌ها با میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد (شکل ۳).

ارزیابی سلول‌های بنیادی خونساز بعد از انتقال ژن با میکروسکوپ فلوروسنت:

از سلول‌های بنیادی خونساز نیز ۲۴ ساعت بعد از

ترتیب کمپلکس DNA و کلسیم فسفات شکل گرفت. در مرحله بعد، ترکیب فوق به سطح سلول‌های HEK اضافه شد. میزان DNA مورد استفاده ۵-۱۰ μ gr بود. در ادامه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط رویی که حاوی ویروس بود جمع‌آوری شد. در انتها آن‌ها را با دور ۲۳۰۰۰ g به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اولترا سائریفوز کرده و تغلیظ انجام شد.

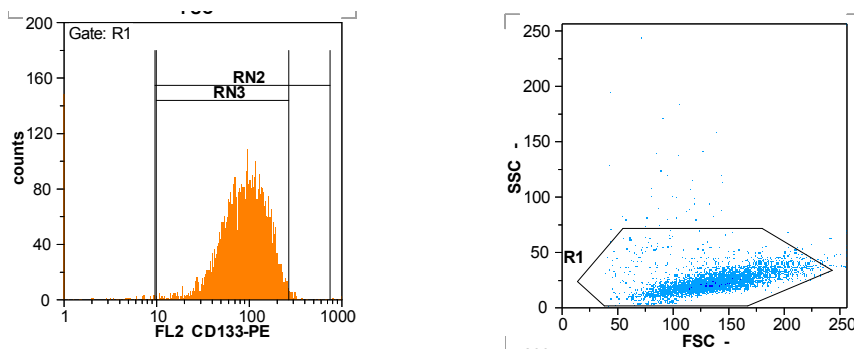
انتقال ژن miR-150 و miR-146a به سلول‌های بنیادی خونساز:

در نهایت 4×10^5 سلول بنیادی خونساز $CD133^+$ جدا شده در هر چاهک یک پلیت ۲۴ خانه تقسیم شد و وکتورهای ویروسی به محیط اضافه شدند. ابتدا رتروویروس که حاوی ژن miR-150 بود به سلول‌ها اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت لنتی ویروس که حاوی ژن miR-146a بود، اضافه شد. پس از اضافه شدن هر یک از ویروس‌ها، سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در انکوباتور با CO_2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با حرکات دورانی مخلوط شدند. پس از ۵ ساعت دوران متوقف شد و سلول‌ها حدود ۱۶ ساعت دیگر در مجاورت ویروس قرار گرفتند و تقریباً ۲۱ ساعت پس از برخورد با ویروس، محیط کشت آن‌ها تعویض شد.

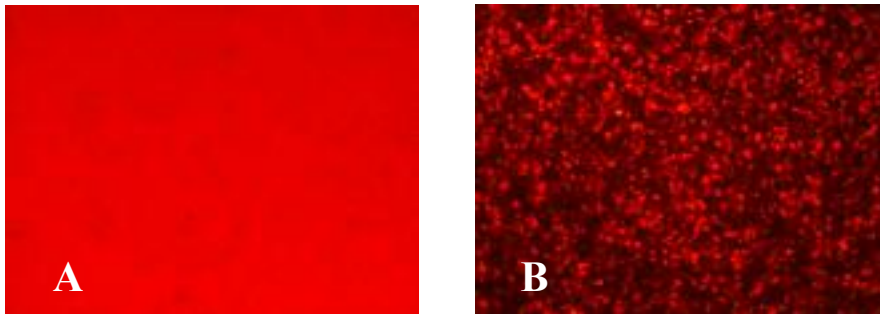
یافته‌ها

نتایج PCR برای قطعه‌های ژنی:

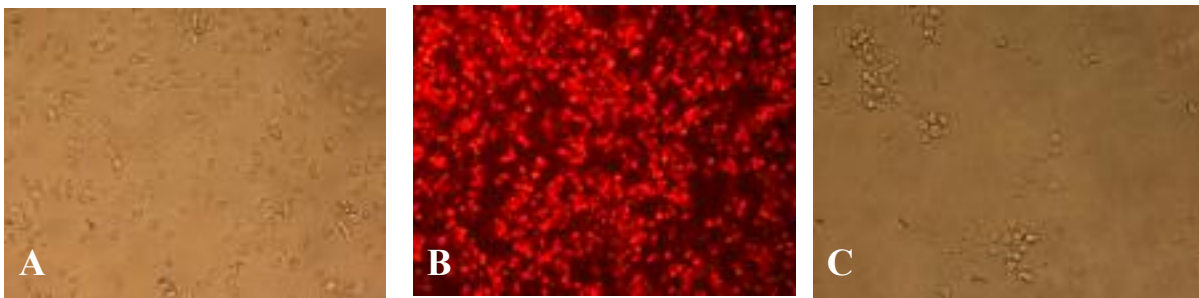
در شکل ۱ نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) برای قطعه‌های ژنی miR-150 (۴۸۲ جفت باز) و miR-146a (۴۱۶ جفت باز) نشان داده شده است.



شکل ۲: تایید فنوتیپ CD133 برای سلول‌های بنیادی خونساز جدا شده با روش MACS



شکل ۳: تصاویر سلول‌های HEK قبل (A) و بعد (B) از ورود DNA به آنها



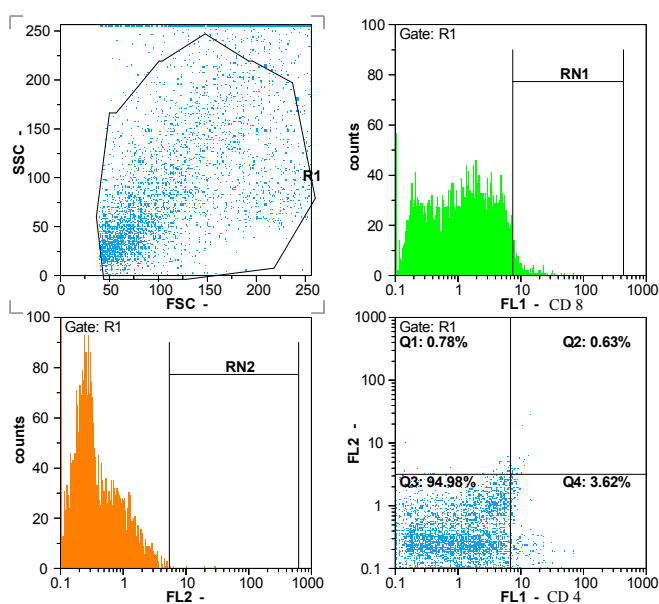
شکل ۴: سلول‌های بنیادی خونساز قبل (تصویر A)، ۲۴ ساعت بعد از انتقال ژن (تصویر B) و پس از هفت روز (تصویر C)

شده و سلول‌های کنترل پس از ۷ روز استخراج گردید. پس از بررسی‌های کمی و کیفی روی RNA استخراج شده، واکنش رونویسی معکوس و به دنبال آن واکنش Real Time-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای هر میکرو RNA صورت گرفت.

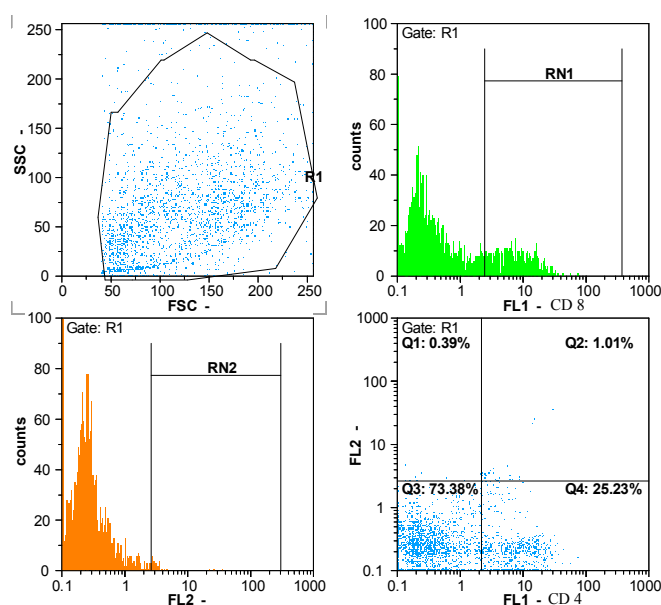
بررسی‌های انجام شده نشان داد که بیان هر دو miR-146a و miR-150 در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل (سلول‌هایی که با ویروس‌های بدون قطعه‌های مورد نظر مجاور شدند) افزایش داشته است

مجاور شدن با ویروس‌ها با میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد که تایید کننده ورود ویروس‌ها به داخل آنها می‌باشد (شکل ۴). هم چنین تصویر C، سلول‌های بنیادی خونساز را بعد از ۷ روز از انتقال ژن نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی خونساز حالت به هم چسبیده پیدا کرده‌اند.

بررسی بیان miR-150 و miR-146a از طریق RT-PCR: در مطالعه حاضر، نمونه‌های RNA از سلول‌های تیمار



شکل ۵: نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای CD8 و CD4 در روز ۷ در سلول‌های کنترل



شکل ۶: نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای CD8 و CD4 در روز ۷ در سلول‌های پس از انتقال ژن

مارکرهای CD4 و CD8 بررسی شدند، که این دو مارکر در سلول‌های کنترل (سلول‌های بنیادی خونسازی که با ویروس‌های فاقد قطعه‌های مورد نظر مجاور شدند) به میزان خیلی کمی بیان شدند اما در سلول‌های تیمار شده این دو مارکر افزایش داشتند (شکل‌های ۵ و ۶).

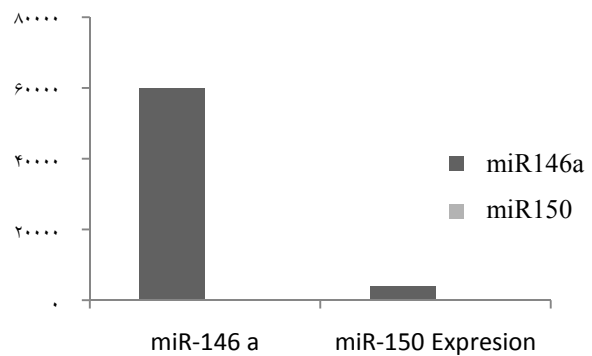
(میانگین برای miR-146a ۶۰۷۹۳ با انحراف معیار ۴۶۵ و برای miR-150 ۵۲۴۶ با انحراف معیار ۱۲۵) (نمودار ۱).

بررسی بیان مارکرهای CD4 و CD8 با فلوسیتومتری: در این پژوهش، سلول‌ها پس از هفت روز برای

پتانسیل تکامل پیش‌سازهای چند رده‌ای را تعیین می‌کنند (۱۹، ۱۴).

بعضی از این فاکتورهای رونویسی مانند SCL/Tall و AML 1 چند منظوره بوده و کمبودشان در تمایز کل سلول‌ها تاثیر می‌گذارد. از طرفی بیان برخی از فاکتورهای رونویسی دیگر از جمله C/EBP α و GATA 1، PU.1 و C/EBP α نسبت به یکدیگر به عنوان یک عامل تنظیم کننده و تعیین کننده سرنوشت تمایزی سلول به رده مونوسیتی در برابر رده گرانولوسیتی پیشنهاد می‌شود (۱۴). بدین ترتیب miRNA به عنوان نامزد مناسبی برای القای تنظیم فرآیندهای تکثیر و عامل تعیین کننده سرنوشت سلولی در سلول‌های مختلف و به ویژه در سلول‌های بنیادی محسوب می‌شود. این مولکول‌ها طی تکامل به شدت حفاظت شده‌اند و در خونسازی گونه‌های مختلف پستانداران نیز نقش بسیار اساسی دارند (۲۱، ۲۰). در مطالعه‌های انجام شده حدود ۳۳ miRNA در سلول‌های پیش‌ساز خونی شناخته شده و اظهار شده است که سرشماری از این مولکول‌ها در تمایز رده‌های مختلف خونسازی نقش مهمی دارند (۲۲، ۸). از جمله این miRNA ها می‌توان به miR-181 در تکامل لنفوسیت‌های B، miR-223 در گرانولوپوئز و miR-222 در miR-222 در تمایز اریترئوئیدی اشاره کرد. هم چنین کاهش سطح a، ۱۰۶ و miR-17-5p برای مونوسیتوپوئز ضروری می‌باشد (۲۴، ۲۳).

سلول‌های CD133⁺ به دلیل توانایی تکثیر و تمایز بیشتری که نسبت به سلول‌های CD34⁺ دارند (بنیادی‌تر هستند)، برای انجام این مطالعه انتخاب شدند (۵). سلول‌های CD133⁺ پس از جداسازی از خون بند ناف تکثیر شده و مجدداً از نظر فنوتیپ با روش فلوسیتومتری برای مارکر CD133 چک شدند. پس از اطمینان از فنوتیپ مورد نظر، با وکتور لنتی ویروسی و رترو ویروسی ساخته شده آلوده شدند و هفت روز پس از آلوده‌سازی با ویروس‌های نوترکیب، کل RNA که شامل mRNA و miRNA می‌باشد از آن‌ها استخراج شد و بررسی برای میزان بیان miR-150 و miR-146a روی آن‌ها صورت گرفت. سلول‌ها طی یک هفته تغییرات قابل توجهی از



نمودار ۱: نتیجه اندازه‌گیری کمی برای بررسی تغییرات بیان miR-146a و miR-150 با Real Time-PCR

بحث

تمایز سلول‌های پروژنیاتور چند قوه‌ای خون‌ساز، یک فرآیند چند مرحله‌ای می‌باشد که توسط سیستم پیچیده‌ای از فاکتورهای رونویسی که با یکدیگر تعامل دارند، کنترل می‌شود (۱۷، ۱۶). در سال‌های اخیر شبکه جدیدی از چرخه‌های تنظیمی در سطح mRNA مورد توجه قرار گرفته است که شامل یک کلاس از RNA های غیر کدکننده به نام microRNA است. ابتدا در سال ۱۹۹۰ دو گروه از محققین سعی در افزایش بیان ژن‌های پیگمان‌های رنگی در گل‌های گیاه پتونیا (Petonia) نموده‌اند که نتیجه کار تولید گیاهان بدون رنگ بود. تلاش‌های بعدی در توجیه علمی این موضوع منجر به کشف فرآیند تنظیمی RNA های تداخل‌کننده (RNAi) گردید و در سال ۱۹۹۳ اولین microRNA به نام lin-4 کشف شد. هفت سال بعد دومین microRNA به نام let-7 شناخته شد و شناسایی این RNA ها ادامه پیدا کرد (۱۸).

مطالعه‌های اخیر ثابت کرده‌اند که این گروه از RNA های کوچک، بسیاری از فرآیندهای تکامل از قبیل تنظیم بیان و خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری یا مهار ترجمه را انجام می‌دهند. به صورت اختصاصی در بافت‌های متفاوت بیان شده، بیش از ۳۰٪ از mRNA ها را کنترل کرده و مسیرهای سلولی را تنظیم می‌کنند (۱۹، ۱۴).

بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که بعضی از این فاکتورها حتی در HSC ها نیز بیان می‌شوند (اگر چه با غلظت پایین)، در مراحل ابتدایی رونویسی نقش دارند و

درصد بود و افزایش آن چشمگیر نبود. از طرفی میزان مارکر CD8 که در گروه کنترل ۳/۳ درصد بود در گروه آزمون ۲۵ درصد بود که افزایش آن چشمگیر و نشان‌دهنده لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک بود.

در مطالعه حاضر سعی بر آن شد تا با استناد به بررسی‌های انجام شده بر روی miRNA ها، با انتقال ژن‌های miR-150 و miR-146a به ترتیب توسط وکتورهای رترو ویروسی و لنتی ویروسی به سلول‌های پیش‌ساز CD133⁺، شرایط افزایش بیان miR-150 و miR-146a را فراهم کرده و میزان القای تمایز لنفوییدی T را در آن‌ها مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که با القای بیان میکرو RNA های ۱۴۶ و ۱۵۰ در سلول‌های بنیادی خونساز، توانایی تمایز آن‌ها به سمت رده لنفوییدی T وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با مساعدت‌های مالی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است که بدین وسیله از آن‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

خود نشان دادند، میزان بیان miR-150 و miR-146a نیز به ترتیب حدود ۸ و ۳/۵ برابر شد. در آزمون فلوسیتومتری که برای مارکرهای CD4 و CD8 انجام شد، افزایش بیان مارکرهای CD4 و به ویژه CD8 در سطح سلول‌ها مشاهده شد که نشان‌دهنده ایجاد خصوصیات لنفوییدی به خصوص لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T lymphocyte = CTL) در سلول‌های بنیادی خونساز آلوده شده با ویروس می‌باشد.

همان‌طور که گفته شد، هدف از انجام مطالعه حاضر، القای افزایش بیان miR-150 و miR-146a و بررسی تاثیر این تغییر در القای تمایز لنفوییدی T در سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف بود. بنابراین چنین انتظار می‌رفت که پس از آلوده شدن سلول‌ها با ویروس‌ها، شاهد افزایش بیان miR-150 و miR-146a نیز باشیم که پس از هفت روز وقتی miRNAs از سلول‌ها استخراج شدند و میزان بیان آن‌ها با استفاده از روش Real-Time PCR سنجیده شد، نتایج حاصل کاملاً همان نتایج مورد انتظار بود. به این ترتیب که افزایش بیان miR-150 و miR-146a صورت گرفت و بیان این میکرو RNA نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

هم‌چنین آزمون فلوسیتومتری پس از هفت روز برای مارکرهای CD4 و CD8 انجام شد که میزان مارکر CD4 در گروه کنترل ۰/۲ درصد و در سلول‌های تیمار شده ۱/۴

References :

- 1- Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* 2009; 113(16): 3655-65.
- 2- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-22.
- 3- Jan YN, Jan LY. Asymmetric cell division. *Nature* 1998; 392(6678): 775-8.
- 4- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12): 5002-12.
- 5- Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, DiRago L, Nicola NA, et al. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood* 2005; 105(9): 3480-7.
- 6- Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. AC133 + G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells *in vitro*. *Stem Cells* 2004; 22(5): 704-15.
- 7- Lin SL, Ying SY. Combinational therapy for potential HIV-1 eradication and vaccination. *Int J Oncol* 2004; 24(1): 81-8.
- 8- Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O, De Angelis FG, Marchioni M, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(50): 19849-54.
- 9- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;

- 431(7006): 371-8.
- 10- Appasani K, editor. Micro RNAs: fom basic science to disease biology. First ed. New York, USA: Cambridge University Press; 2008.
 - 11- Mukai HY, Motohashi H, Ohneda O, Suzuki N, Nagano M, Yamamoto M. Transgene Insertion in proximity to the c-myb gene disrupts erythroid-megakaryocytic lineage bifurcation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(21): 7953-65.
 - 12- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
 - 13- Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F. 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(50): 18081-6.
 - 14- Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779(11): 663-7.
 - 15- Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood* 2009; 114(23): 4761-70.
 - 16- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* 2006; 20(11): 1931-6.
 - 17- Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
 - 18- Lin SL, Chang D, Wu DY, Ying SY. A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(3): 754-60.
 - 19- Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006; 108(12): 3646-53.
 - 20- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, *et al.* A Minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP alpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123(5): 819-31.
 - 21- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12(12): 580-7.
 - 22- Cross MA, Enver T. The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7(5): 609-13.
 - 23- Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 89-101.
 - 24- Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8): 2419-33.

Original Article

Effect of miR-146a and miR-150 on T-cell lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells

Fallah P.¹, Soleimani M.², Hamidpour M.¹, Rezaei Tavirani M.^{1,3}, Gharehbaghian A.¹,
Arefian E.⁴, Ahmadi K.⁴

¹Paramedical Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Stem Cell Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Micro RNAs are a class of small non-coding RNAs which have been recently shown to play a crucial role in major cellular processes such as development and differentiation through post-transcriptional regulation. The role of these epigenetic elements has been also demonstrated in hematopoietic lineage differentiation and there is a large body of evidence that miR-150 and miR-146a are responsible for T lymphocyte differentiation. Our goal was to examine the effect of miR-150 and miR-146a overexpression in hematopoietic stem cells and its ability to differentiate these cells into a T lymphoid cell.

Materials and Methods

In this experimental study CD133⁺ stem cells were employed as hematopoietic stem cells and permanent overexpression of miR-150 and miR-146a was established. The differentiation progress was tracked by flowcytometry for lymphocyte markers such as CD4 and CD8. Moreover, expression of miR-146a and miR-150 by RT-PCR and quantitative real time PCR after 7 days was studied.

Results

The cells showed T lymphoid characteristics 7 days after transduction. CD4 and especially CD8 expression significantly increased.

Conclusions

In conclusion, miR-150 and miR-146a overexpression is an effective factor in T cytotoxic differentiation and they have the ability of directing CD133⁺ hematopoietic stem cells to express T lymphoid characteristics.

Key words: MicroRNAs, miR-150, human, miR-146a .human, Hematopoietic Stem Cells

Received: 6 Jul 2011

Accepted: 10 Dec 2011

Correspondence: Soleimani M., PhD of Hematology. Associate Professor of Tarbiat Modares University. P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821)88013030
E-mail: soleimani.masoud@gmail.com