Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

Original Article

Study on the role of *miR-124-3p* on the expression of neuronal and non-neuronal genes in the hair follicle stem cells

Mokabber H[1,2], Najafzadeh N[3*], Edalatmanesh MA[1,2], Mohammadzadeh-Vardin M[3]

1- Department of Biology, Faculty of of Sciences, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, I.R. Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I.R. Iran.
3- Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R. Iran.

Received: 2019/12/8 | Accepted: 2020/07/8

Abstract:

Background: Hair follicle stem cells (HFSCs) can be differentiated into neurons and glial cells. Different miRNAs regulate the proliferation and differentiation of HFSCs. So, this study aimed to evaluate the exact role of *miR-124-3p* on the expression of non-neuronal genes (*CCND1* (*cyclinD*1), *Tlx* (*NR*2*E*1*)* and *RCOR*2 (*CoREST*)) *and* neuronal genes (*DLK*1, *MAP*2, and *NeuN* (*Rbfox* 3)).

Material and Methods: This experimental study was performed on the stem cells isolated from the bulge region of mouse vibrissa hair follicles. The hair follicle stem cells differentiated into neuronal cells. Then, the cells transfected with *miR-124-3p* mimic and inhibitor. The mRNA levels of non-neuronal and neural genes were detected by real-time PCR (RT-PCR).

Results: The results showed that neural induction and *miR-124-3p* mimic transfection significantly increased mRNA expression levels of neuronal genes *MAP*2, *Rbfox*3 and *DLK*1, but transfection with the *miR-124-3p* inhibitor increased mRNA level of non-neural genes *CCND1* (82.71) and *NR2E1* (962.07), respectively.

Conclusion: These results show that *miR-124-3p* may promote neuronal differentiation of HFSCs by inhibiting non-neural genes *CCND*1 and *NR2E1*.

Keywords: Hair follicle stem cells, Neural differentiation, *miR-124-3p, CCND*1, NR2E1, *RCOR*2

***Corresponding Author:**
Email: nowruz30@gmail.com
Tel: 0098 935 691 2462
Fax: 0098 453 353 4703

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 332-341

Please cite this article as: Mokabber H, Najafzadeh N, Edalatmanesh MA, Mohammadzadeh-Vardin M. Study on the role of *miR-124-3p* on the expression of neuronal and non-neuronal genes in the hair follicle stem cells. ***Feyz*** 2020; 24(3): 332-41.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

بررسی نقش *miR-124-3p* در بیان ژن‌های عصبی و غیرعصبی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو

هاله مکبر[۲،۱]، نوروز نجف‌زاده[۳*]، محمّدامین عدالت‌منش[۲،۱]، محمّد محمّدزاده وردین[۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی فولیکول مو، قابلیت تمایز به سلول‌های نورونی و گلیال را دارند. میکروآرناهای مختلف، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو را تنظیم می‌کنند. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی نقش دقیق *miR-124-3p* بر روی بیان ژن‌های غیرعصبی (*cyclinD1*) *CCND1*، (*Tlx*) *NR2E1*، (*CoREST*) *RCOR2*) و ژن‌های عصبی (*DLK1*، *MAP2* و *NeuN*) *Rbfox3*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر به‌صورت تجربی بر روی سلول‌های بنیادی جداشده از ناحیه بالج فولیکول‌های موی لب فوقانی موش انجام شد. سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سلول‌های نورونی تمایز داده شدند. همچنین، بخشی از میکروآرناهای تقلیدکننده (Mimic) و مهارکننده (Inhibitor) مربوط به *miR-124-3p* به سلول‌های بنیادی فولیکول مو انتقال داده شدند. سطوح بیان ژن‌های غیرعصبی و عصبی توسط روش real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد القای تمایز نورونی و استفاده از میکروآرناهای تقلیدکننده *miR-124-3p*، سطح بیان ژن‌های عصبی *MAP2*، *Rbfox3* و *DLK1* را به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌دهد؛ ولی انتقال مهارکننده *miR-124-3p* به داخل سلول‌ها، باعث افزایش معنی‌دار ۸۲/۷۱ و ۹۶۲/۰۷ برابری در سطوح mRNAی ژن‌های غیرعصبی *CCND1* و *NR2E1* گردید.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که *miR-124-3p* با مهار ژن‌های غیرعصبی *CCND1* و *NR2E1* ممکن است منجر به افزایش تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی فولیکول مو، تمایز نورونی، *miR-124-3p*، *CCND1*، *NR2E1*، *RCOR2*

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

مقدمه

پوست حاوی جمعیت‌های مختلف سلول‌های بنیادی است که در لایه قاعده‌ای اپیدرم و ناحیه بالج (Bulge) فولیکول مو قرار دارند [۲،۱]. سلول‌های بنیادی فولیکول مو برای نخستین‌بار در ناحیه بالج فولیکول‌های مو شناخته شده‌اند [۳]. سلول‌های بنیادی فولیکول مو چند توان هستند و قابلیت تمایز یافتن به نورون‌ها، آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های شوآن، کندروسیت‌ها، عضله صاف، آدیپوسیت‌ها و استئوسیت‌ها را دارند. پتانسیل تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی فولیکول مو، تا حد زیادی وابسته به فاکتورهای رشد می‌باشد.

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

۳. آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

اردبیل، آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

تلفن: ۰۹۱۰۴۰۷۵۷۰۰ **دورنویس:** ۰۴۵۳۳۵۳۴۷۰۳

پست الکترونیک: nowruz30@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۴/۱۸

فاکتورهای رشد عصبی متعددی از قبیل نوروتروفین-۳، فاکتور رشد مشتق از سلول‌های گلیال و فاکتور رشد مشتق از مغز برای القای تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سلول‌های عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرند [٤]. میکروآرناها نوعی از RNAهای غیرکُدکننده طبیعی کوچک حدود ۲۲-۲۰ نوکلئوتیدی و به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن در سطح پس از رونویسی هستند که با اتصال به ناحیه غیرقابل ترجمه‌ی 3 (3UTR) مولکول‌های mRNA منجر به تجزیه mRNA یا مهار ترجمه‌ی آن می‌شوند [٥]. طبق تحقیقات، میکروآرناها هم در تنظیم روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی و هم در کنترل سرنوشت و رفتار سلول‌های بنیادی نقش بسیار مهمی دارند [٦]. میکروآرناها نقش بسزایی در روند تمایز عصبی سلول‌های بنیادی ایفا می‌کنند [۷]. میکروآرناهایی مانند *miR-125b* و *miR-205* به‌طور معمول بیان بالایی در سلول‌های بنیادی ناحیه بالج فولیکول مو و در سلول‌های قاعده‌ای اپیدرم دارند و با مهار روند تمایز، منجر به افزایش میزان تکثیر سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌شوند [۹،۸]. با این‌حال، مکانیزم‌هایی که تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو را تحت تأثیر قرار می‌دهند، هنوز مشخص نیست. در طی تمایز عصبی، سطح بیان برخی میکروآرناها از جمله *miR-9*، *Let-7b*،

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

miR-124-3p و *miR-137* افزایش می‌یابد و باعث مهار بیان فاکتورهای رونویسی *ptbp1* و *Sox9* می‌شود [۵]. در مطالعات قبلی نشان داده شده که سطح بیان *miR-124-3p* و *Let-7b* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو بعد از تمایز به سلول‌های نورونی افزایش می‌یابد؛ همچنین *miR-124-3p* با هدف‌گیری ژن‌های *Sox9* و *Ptbp1* در طی تمایز نورونی میزان بیان آن‌ها را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر افزایش بیان *miR-124-3p* باعث افزایش بیان پروتئین‌های عصبی MAP2 و NeuN در سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌شود [۱۰]. بر این اساس، با توجه به این‌که تاکنون تأثیر *miR-124-3p* بر سطح بیان ژنی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو بررسی نشده است، این مطالعه به منظور بررسی بیشتر نقش *miR-124-3p* در تنظیم بیان ژن‌های عصبی و غیرعصبی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

مقاله حاضر، بخشی از نتایج پایان‌نامه دکترای تخصصی با کد ۱۶۳۳۰۵۱۷۹۴۱۰۱۵ است و این مطالعه تجربی روی ۳۰ موش سوری ماده انجام گرفت. موش‌های ماده (۵-۳ هفته، ۱۲ گرم) از مؤسسه رازی (تهران، ایران) خریداری شد. موش‌ها در یک دوره ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها مطابق دستورالعمل‌های کمیته اخلاقی تحقیقات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شد. نمونه‌های بافتی از ناحیه لب فوقانی موش‌ها برداشته شد و نواحی بالج فولیکول‌های موی آن‌ها جداسازی گردید.

جداسازی و کشت فولیکول‌های موی لب فوقانی موش

جهت جداسازی نواحی بالج فولیکول‌های موی موش از روش تعدیل‌شده Kobayashi استفاده شد [۱۱،۳]. پس از بیهوشی کامل موش و برداشتن لب فوقانی، نمونه‌ها در محیط کشت DMEM/F12 حاوی پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین B قرار گرفتند و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در زیر میکروسکوپ پس از پاکسازی کامل رشته‌های فیبری و بافت همبند اطراف فولیکول مو، به آرامی فولیکول‌های مو جداسازی شدند. پس از شستشوی فولیکول‌های مو با بافر PBS، دو برش عرضی در بالا و پایین ناحیه برآمدگی حاوی سلول‌های بنیادی زده شد و کپسول اطراف ناحیه بالج فولیکول مو به‌صورت طولی بریده شد. قطعات کوچک نواحی بالج در فلاسک‌های کشت T25 پوشش داده‌شده با کلاژن در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد پایه فیبروبلاستی (R2625, Sigma-Aldrich)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد اپیدرمی (E4127,Sigma-Aldrich)، 10^{-9} مولار کلراتوکسین (C8052, Sigma, Aldrich;)، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیدروکورتیزون، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انسولین، ۱ درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین در انکوباتور به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. پس از آن، سلول‌ها پاساژ داده شدند و سلول‌های پاساژ سوم به منظور تمایز عصبی مورد استفاده قرار گرفتند.

تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو

حدود ۶۰ هزار سلول بنیادی فولیکول مو درون های‌پلیت‌های کشت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. این سلول‌ها به مدت ۱۰ روز در معرض محیط کشت عصبی دارای DMEM/F12، ۵ درصد سرم گاوی، ۱ میکرومول رتینوئیک اسید تمام ترانس، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد مشتق از مغز (248-BD025,R&D)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF) و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) قرار گرفتند. محیط سلول‌ها هر سه روز تعویض شد. سلول‌ها پس از گذشت ۱۰ روز، به منظور انجام real-Time PCR توسط محلول ترایزول جمع‌آوری شدند [۱۲].

انتقال *miR-124-3p* به سلول‌های بنیادی فولیکول مو و گروه‌های تیمار

به منظور انجام روند انتقال ژن میکروآرنای موردنظر، سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۱۲ چاهکی کشت داده شدند. برای افزایش یا کاهش سطح بیان *miR-124-3p*، از تقلیدکننده میکروآرنا (miR-124-3P, #MSY0000134; Qiagen, Valencia, California) و مهارکننده میکروآرنا (MIN0000134; Qiagen) استفاده شد و از محلول انتقال‌دهنده موسوم به HiPerFect (Qiagen) که جزو لیپید کاتیونی است، انتقال تقلیدکننده و مهارکننده میرنا طبق روش شرکت کیاژن انجام شد [۱۳]. در این روش که جزو روش‌های انتقال غیرویروسی است، سلول‌ها با محلولی انکوبه می‌شوند که باعث ورود قطعه اگزوژن موردنظر به درون سلول می‌شود.

گروه‌های مورد مطالعه به شرح ذیل بودند:

۱) کنترل

۲) تمایز نورونی (محیط DMEM/F12 حاوی ۵ درصد سرم، ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد مشتق از مغز، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمال)

۳) تقلیدکننده

۴) مهارکننده

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

۵) تقلیدکننده / تمایز نورونی پروفایل (نمایه) بیان *miRNA*

RNAی کل سلولی با استفاده از محلول ترایزول استخراج شد. به این‌صورت که بر روی نمونه‌های سلولی، مقدار یک میلی‌لیتر ترایزول ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به درون میکروتیوب افزوده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤°C با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. در این مرحله سه لایه مشاهده شد. پس از انتقال لایه بالایی حاوی RNA به میکروتیوب جدید، ایزوپروپرانول سرد با نسبت یک‌به‌یک به آن افزوده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، میکروتیوب موردنظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤°C با دور ۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد که در این مرحله رسوب RNA قابل مشاهده است. محلول رویی پس از اتمام سانتریفیوژ تخلیه شد و جهت شستشوی رسوب RNA، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به آن افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤°C و دور ۷۵۰۰g سانتریفیوژ شد. در نهایت پس از برداشتن مایع رویی و خشک کردن نسبی رسوب RNA با قرار دادن در مجاورت هوا در زیر هود به‌مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه با در باز، مقدار ۳۵ میکرولیتر آب DEPC به محتویات درون میکروتیوب به منظور غیرفعال کردن DNase اضافه گردید. غلظت کل mRNA با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز یک مرحله‌ای (Cat# BON209001 BON - miR miRNA) صورت گرفت. ابتدا میکروآرناها، طی واکنش پُلی‌آدنیلاسیون طویل شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از RNAی پلی‌آدنیله، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ۱۰ میکرومول پرایمر Bon-RT، ۱۰۰ میلی‌مول از dNTP mix و ۲ میکرولیتر از بافر 10xRT برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات مذکور طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد [۱٤،۱۰].

جدول شماره ۱- برنامه دمایی ترمال سایکلر جهت سنتز cDNA

تعداد سیکل	زمان	دما
۱	۵ دقیقه	۵۵ درجه سانتی‌گراد
۱	۱۰ دقیقه	۲۵ درجه سانتی‌گراد
۱	٦۰ دقیقه	٤۲ درجه سانتی‌گراد
۱	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد

جدول شماره ۲- سیکل دمایی واکنش PCR برای miRNA

تعداد سیکل	زمان	دما
۱	۱۲۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
٤۰	۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
٤۰	۳۰ ثانیه	٦۰ درجه سانتی‌گراد

واکنش real-time PCR در حجم کل ۲۰ میکرولیتر و مطابق با شرایط زیر انجام شد. توالی پرایمرهای مورد مطالعه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول شماره ۳- توالی‌های پرایمر برای ژن‌های مورد مطالعه

نام پرایمر	پرایمر فوروارد	پرایمر معکوس
miR-124-3p	UAA GGC ACG CGG UGA AUG CC	GAG CAG GGT CCG AGG T
MAP2	CTGGACATCAGCCTCACTCA	AATAGGTGTGCCCTGACCTG
Rbfox3	CAACATCCCCTTCCGGTTC	TGACCTCAATTTTCCGTCCC
RCOR2	CCAAGGGCATGTACCTGAGT	GGCTGCTATTGGTCTGCTTC
DLK1	AGCTGGCGGTCAATATCATC	AGCTCTAAGGAACCCCGGTA
NR2E1	ATGCCCCGTAGACAAGACAC	CGGAAGTAGAGAGCCACCTG
CCND1	GCGTACCCTGACACCAATCT	ATCTCCTTCTGCACGCACTT
GAPDH	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG

اندازه‌گیری بیان ژن توسط real-time PCR

پس از استخراج RNAی کل سلول‌ها توسط ترایزول، cDNA با استفاده از کیت PCR دو مرحله‌ای ویوانتیس سنتز شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. واکنش کمّی PCR با استفاده از مستر میکس سیبر گرین (EURx, Ltd, Gdañsk, Poland) و دستگاه PCR مارک روشه Roche انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

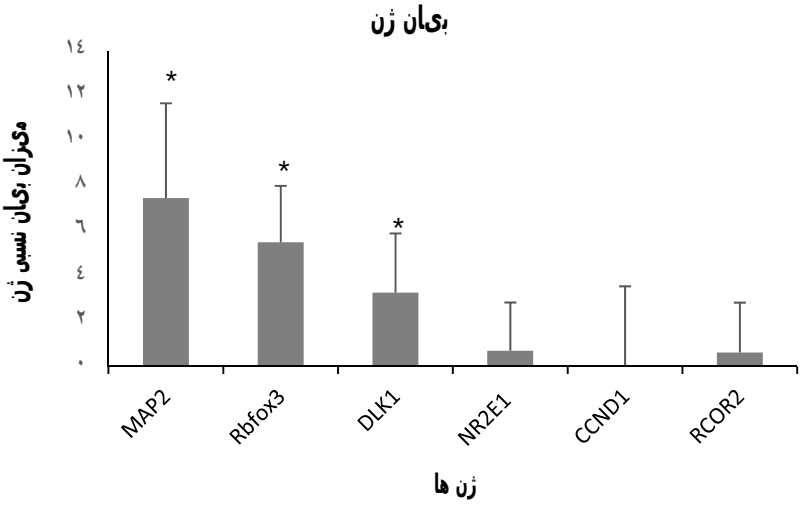
Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

جهت بررسی آماری داده‌ها و محاسبه میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌ها از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [۱۵] و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۳ استفاده شد. اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون آماری T Student و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه موسوم به ANOVA One-way تعیین شد و تمامی نتایج به‌صورت ($\overline{X} \pm SD$) گزارش گردید. برای تمام محاسبات آماری انجام‌شده، مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد ($P<۰/۰۵$).

نتایج

بررسی بیان ژن‌های هدف پس از القای تمایز عصبی

در این مطالعه تغییرات سطح بیان ژن‌ها و تنظیم‌کننده تمایز عصبی هدف یعنی *MAP2*، *Rbfox3* یا *NeuN* و *DLK1* و همین‌طور ژن‌های هدف غیرعصبی سرکوب‌کننده تمایز نورونی شامل *RCOR2*، *NR2E1* و *CCND1* در سلول‌های بنیادی، ۱۰ روز پس از القای تمایز عصبی با روش real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. طبق آنالیز داده‌ها سطح mRNA ژن‌های عصبی *MAP2*، *Rbfox3* و *DLK1* به‌دنبال القای تمایز نورونی، افزایش بیان قابل توجه و معنی‌دار ۷/٤، ۵/۵ و ۳/۲۷ برابری در سلول‌های تمایزیافته در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل نشان دادند؛ در حالی‌که میزان بیان mRNA ژن‌های غیرعصبی هدف، یعنی *CCND1*، *NR2E1* و *RCOR2* در سلول‌های بنیادی تیمارشده با محیط تمایز نورونی بسیار اندک و غیرمعنادار بود (شکل شماره ۱).

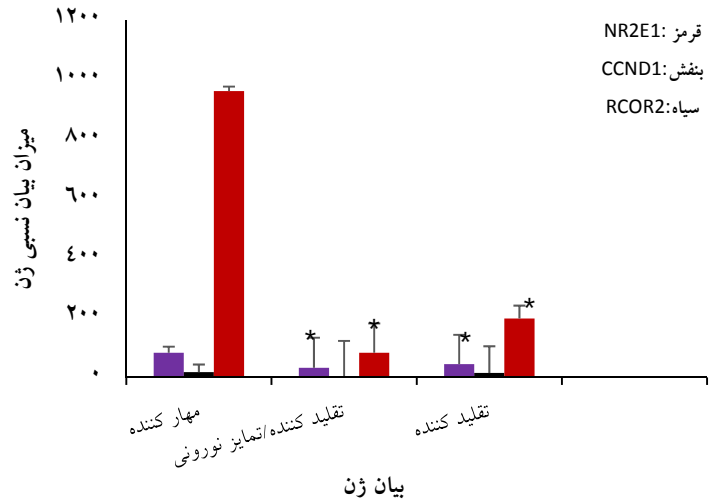


شکل شماره ۱- سطح بیان ژن‌های هدف در سلول‌های بنیادی فولیکول مو بعد از القای تمایز عصبی: میزان بیان mRNA ژن‌های عصبی *MAP2*، *Rbfox3* و *DLK1* متعاقب القای تمایز عصبی افزایش یافت؛ ولی تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های هدف غیرعصبی مشاهده نگردید.
*$P<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل در نظر گرفته شده است.

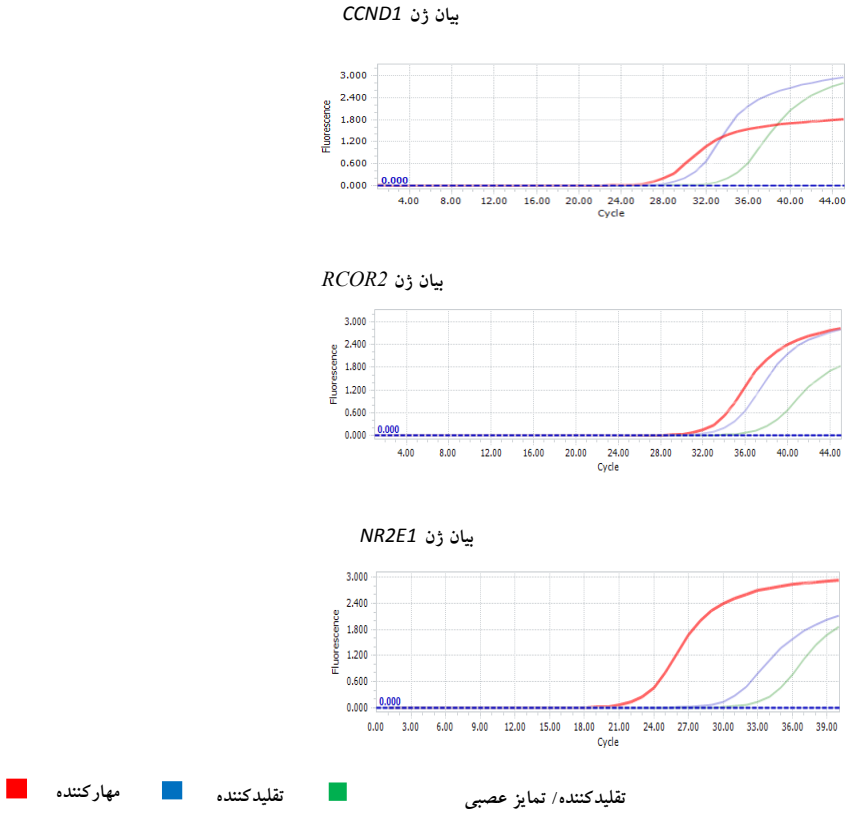
نقش *miR-124-3p* در تنظیم بیان ژن‌های غیرعصبی *CCND1*، *RCOR2* و *NR2E1* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو

فرض در این مطالعه این بود که *miR-124-3p* می‌تواند میزان بیان ژن‌های غیرعصبی *CCND1*، *RCOR2* و *NR2E1* را در طی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، متعاقب انتقال میکروآرنا *miR-124* و سپس القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو، بیان ژن‌های دخیل در تکثیر سلولی و سرکوب‌کننده رونویسی، ژن‌های غیرعصبی *CCND1*، *RCOR2* و *NR2E1* را مورد مطالعه قرار دادیم. نتایج حاصل از PCR نشانگر این بود که به‌دنبال انتقال تقلیدکننده *miR-124-3p* به سلول‌های بنیادی فولیکول موی تحت کشت، ژن‌های غیرعصبی به میزان بسیار اندکی بیان شدند؛ ولی انتقال مهارکننده *miR-124-3p* به درون همان سلول‌ها باعث افزایش معنی‌دار به ترتیب ۸۲/۷۲ و ۹٦۲/۰۷ برابری در سطوح mRNAی ژن‌های *CCND1* و *NR2E1* گردید (شکل شماره ۲ و ۳).

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020



شکل شماره ۲- تأثیر *miR-124-3p* روی سطوح بیان ژن‌های غیرعصبی هدف در سلول‌های بنیادی فولیکول مو پس از انتقال تقلیدکننده و مهارکننده *miR-124-3p*: ۷۲ ساعت پس از انتقال مهارکننده *miR-124-3p*، سطوح بیان mRNAی دو ژن *CCND1* و *NR2E1* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو افزایش معناداری یافت؛ ولی انتقال تقلیدکننده *miR-124-3p* منجر به کاهش سطح بیان هر سه ژن هدف غیرعصبی شد. *$P<0/05$ اختلاف معنی‌دار کاهش بیان ژن را در مقایسه با گروه مهارکننده نشان می‌دهد.



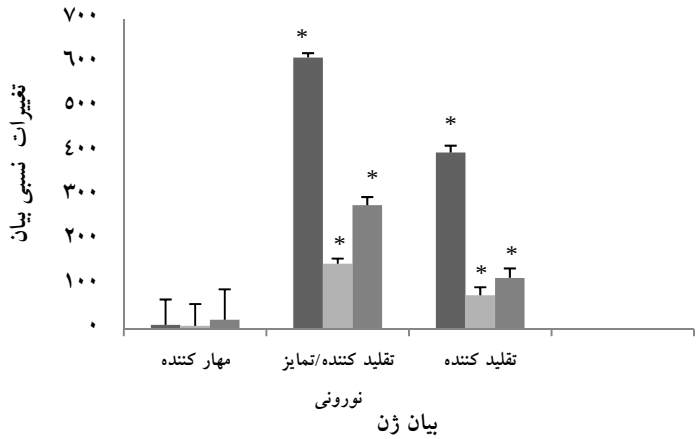
شکل شماره ۳- منحنی‌های تکثیر محصولات real-time PCR برای ژن‌های *CCND1*، *NR2E1* و *RCOR2*، ۷۲ ساعت پس از انتقال تقلیدکننده و مهارکننده به سلول‌های بنیادی فولیکول مو

miR-124-3p باعث افزایش تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌شود.

به‌منظور ارزیابی نقش *miR-124-3p* در تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو، تأثیر افزایش یا کاهش سطح بیان *miR-124-3p* بر روی تمایز عصبی را بررسی نمودیم. در گروه‌های تقلیدکننده و مهارکننده تغییرات بیان ژن‌های عصبی و غیرعصبی آشکار بود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد در دو گروه تقلیدکننده و تقلیدکننده / تمایز عصبی، سطح بیان ژن‌های عصبی *MAP2* و

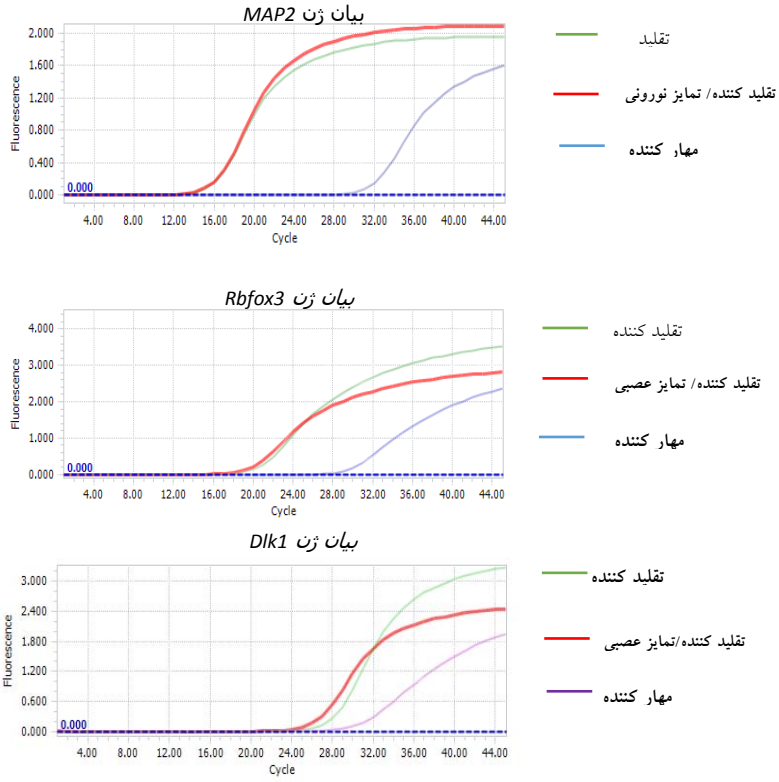
Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

Rbfox3 و *DLK1* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان بیان ژن *DLK1* در گروه تقلیدکننده / تمایز عصبی به‌ترتیب ۱۱۶/۱۶ و ۲۸۰/۱۳۹ شد و میزان بیان *MAP2* در گروه‌های تقلیدکننده و تقلیدکننده / تمایز عصبی به ترتیب به میزان ۳۹۸/۹۳ و ۶۱۳/۱۰۹ افزایش یافت. همچنین میزان بیان ژن *Rbfox3* هم در دو گروه تقلیدکننده و تقلیدکننده / تمایز عصبی به ترتیب ۱۷/۷۷ و ۱۴۸/۰۵ افزایش یافت، ولی در گروه مهارکننده هر سه ژن عصبی به میزان بسیار اندک و غیرمعنی‌داری بیان شدند (شکل شماره ٤).



شکل شماره ٤- تأثیر *miR-124-3p* بر سطوح بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی فولیکول مو پس از انتقال تقلیدکننده و مهارکننده miR-124-3p: ۷۲ ساعت پس از انتقال تقلیدکننده *miR-124-3p*، سطوح بیان mRNAی ژن‌های *Rbfox3*، *MAP2* و *DLK1* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو افزایش معنی‌داری یافت، ولی بعد از انتقال مهارکننده *miR-124-3p* باعث کاهش غیرمعنی‌دار سطح بیان هر سه ژن هدف عصبی شد. $^{*}P<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار بیان ژن در مقایسه با گروه کنترل در نظر گرفته شده است.

منحنی‌های تکثیر محصولات real-time PCR هم نشانگر افزایش میزان بیان ژن‌های تمایز نورونی متعاقب انتقال ژن‌های تقلیدکننده و مهارکننده miR-124-3p به درون سلول‌های بنیادی فولیکول مو در شرایط آزمایشگاهی بودند (شکل شماره ٥).



شکل شماره ٥- منحنی‌های تکثیر ژن‌های *MAP2* (الف)، *Rbfox3* (ب) و DLK1 (ج) بعد از انتقال تقلیدکننده و مهارکننده *miR-124-3p-3p*

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

بحث

در مطالعه حاضر نشان دادیم که میکروآرناهای عصبی *miR-124-3p* باعث افزایش تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند. طبق مطالعات داستان و همکارانش سلول‌های بنیادی فولیکول مو مشابه سلول‌های بنیادی جنینی هستند و پتانسیل تکثیری و تمایزی بالایی در شرایط آزمایشگاهی دارند [۱۶]. El-Seady و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند سلول‌های بنیادی فولیکول مو قادر به تولید جمعیت زیادی از دودمان‌های گلیال و نورونی متعاقب انکوباسیون با فاکتورهای رشد اگزوژن هستند [۱۷]. در این مطالعه، آنالیز نتایج real-time PCR نشانگر افزایش سطح بیان ژن‌های عصبی *DLK1*، *Rbfox3* و *MAP2* در سلول‌های بنیادی فولیکول موی تحت کشت با محیط تمایز عصبی متشکل از فاکتورهای رشد اگزوژن بود که با مطالعات قبلی همسو بود. سلطانی و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که *MAP2* در فرآیندهای مهم مرتبط با بلوغ نورون‌ها اعم از گسترش و انشعاب نوریت‌ها و همچنین برای متوقف کردن تقسیم سلولی از اهمیت بالایی برخوردار است [۱۸،۱۹]؛ از طرف دیگر Mullen و همکاران در سال ۱۹۹۲ اظهار کردند که پروتئین NeuN یا Rbfox3 هم در هسته و سیتوپلاسم اغلب نورون‌های سیستم عصبی مرکزی پستانداران یافت می‌شود و به‌عنوان مارکر نورونی در مطالعات مربوط به تمایز نورونی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۹]. بنابراین در تحقیق حاضر همان‌طور که انتظار می‌رفت در راستای مطالعات پیشین، ژن‌های *MAP2* و *Rbfox3* متعاقب تمایز نورونی و سپس انتقال ژن *miR-124-3p* به درون سلول‌های بنیادی فولیکول مو، سطح بیان بالاتری را نشان دادند. ما در مطالعه قبلی تأثیر انتقال ژن *miR-124-3p* را به سلول‌های بنیادی فولیکول مو در سطح بیان پروتئین‌های نورونی MAP2 و NeuN بررسی کرده بودیم؛ اما در این مطالعه نشان دادیم که این میکروآرناها در سطح بیان ژن هم می‌توانند تمایز نورونی را تحت تأثیر قرار دهند. یکی دیگر از نتایج این مطالعه، افزایش میزان بیان ژن عصبی *DLK1* بعد از تمایز نورونی و انتقال ژن *miR-124-3p* به سلول‌های تحت کشت بود. در همین زمینه، مطالعه Surmucz و همکاران در سال ۲۰۱۲ حاکی از آن بود که *DLK1* باعث افزایش تمایز عصبی در سلول‌های پیش‌ساز عصبی می‌شود؛ همچنین این ژن با مهار *Delta1* و *Jagged* و *Hes1* در مسیر سیگنالینگ Notch، باعث سرکوب تکثیر سلولی هم می‌شود [۲۰]. مطالعه دیگری نیز که توسط Hitoshi و همکارانش انجام شد، بیانگر نقش تنظیمی بسیار مهم مسیر سیگنالینگ Notch در تکثیر و حفظ جمعیت سلول‌های بنیادی عصبی بود. در حالی‌که غیرفعال‌سازی این مسیر سیگنالینگ باعث افزایش روند تمایز نورونی سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود [۲۱]. همسو با این مطالعات، نتایج ما نیز حاکی از افزایش بیان ژن *DLK1*، متعاقب القای تمایز نورونی و انتقال تقلیدکننده *miR-124-3p* به سلول‌های بنیادی فولیکول مو بود. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که *miR-124-3p* نقش بسیار مهمی در تمایز عصبی سلول‌های بنیادی دارد. از جمله در مطالعه‌ای Makeyev و همکاران نشان دادند که *miR-124-3p* با کاهش بیان پروتئین PTBP1 باعث تمایز سلول‌ها به نورون‌های بالغ می‌شود [۲۲]. در همین راستا در مطالعه دیگری Jiang و همکاران نشان دادند که *miR-124-3p* با افزایش بیان *βIII*-tubulin باعث افزایش تمایز نورونی و رشد زواید نورونی در سلول‌های بنیادی گوش داخلی می‌شود [۲۳]. در این مطالعه، استفاده از مهارکننده *miR-124-3p* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو منجر به کاهش بیان ژن‌های نورونی و عصبی و در مقابل باعث افزایش بیان ژن‌های غیرعصبی *CCND1* و *NR2E1* در این سلول‌ها گردید. ژن‌های غیرعصبی *CCND1* به‌عنوان تنظیم‌کننده سیکل سلولی و *NR2E1* به‌عنوان تنظیم‌کننده تکثیر سلول و مهار تمایز سلول‌های بنیادی نورونی می‌باشند. مشابه مطالعه ما، Jiao و همکارانش نشان داده‌اند که *miR-124-3p* باعث سرکوب بیان ژن‌های *CCND1* در سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود و افزایش بیان *miR-124-3p* باعث افزایش بیان *βIII*-tubulin و کاهش بیان GFAP در سلول‌های بنیادی عصبی می‌گردد [۲۴]. همچنین، موندانی‌زاده و همکارانش گزارش داده‌اند که سطح بیان *miR-124-3p* در طی نورون‌زایی (نوروژنزیس) سلول‌های بنیادیِ مزانشیمیِ مشتق از چربی با هدف قرار دادن mRNAی *Sp1* افزایش می‌یابد [۲۵]. در مطالعه دیگری توسط Zhao در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که *let-7b* با اتصال به ناحیه 3´UTR در mRNAی *TLX* و *cyclinD1* باعث سرکوب بیان این دو ژن می‌شود و به‌عنوان تنظیم‌کننده بالادستیِ بسیار مهم تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی ایفای نقش می‌کند. علاوه بر *let-7b*، *miR-9* نیز به‌واسطه تشکیل لوپ فیدبکی تنظیمی با *TLX*، هدف‌گیری و سرکوب بیان آن در نهایت باعث تنظیم روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی نورونی می‌شود [۲۶]. همسو با مطالعات مشابه انجام‌شده، نتایج مطالعه ما نیز نشان داد ژن‌های غیرعصبی *CCND1* و *NR2E1* به‌عنوان ژن‌های هدفِ غیرمستقیم *miR-124-3p* در روند تمایز نورونی سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌باشد و سرکوب آن‌ها منجر به پیشرفت نورون‌زایی می‌گردد. از طرف دیگر طبق مطالعه Saez و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی نورون‌زایی، کمپلکس عصبی REST و یکی از کورسپتورهای

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

بسیار مهم آن یعنی *RCOR2* نقش بسیار مهمی در تکثیر سلول‌های عصبی دارند و در طی تمایز عصبی میزان بیان RCOR1 و RCOR2 کاهش می‌یابد [۲۷]؛ اما در مطالعه حاضر، میزان بیان *RCOR2* بعد از انتقال تقلیدکننده و مهارکننده *miR-124-3p* تغییری پیدا نکرد و چنین به‌نظر می‌رسد که این ژن احتمالاً تحت تأثیر *miR-124* قرار نمی‌گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه ما برای نخستین‌بار نشان داد که *miR-124-3p* از جمله میکروآرناهای عصبی مؤثر در روند تمایز عصبی (نورونی و گلیالی) سلول‌های بنیادی فولیکول مو در شرایط آزمایشگاهی است؛ به‌طوری‌که با هدف‌گیری ژن‌های غیرعصبی *CCND1* و *NR2E1* در سلول‌های بنیادی فولیکول مو، منجر به مهار روند تکثیر و پیشرفت تمایز نورونی سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌گردد.

تشکر و قدردانی

فرآیند اجرای پایان‌نامه در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شده است، بنابراین از تمامی افرادی که در آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی اردبیل ما را در انجام این مطالعه یاری رسانده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References:

[1] Najafzadeh N, Nobakht M, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Rat hair follicle stem cells differentiate and promote recovery following spinal cord injury. ***NRR*** 2013; 8(36): 3365.

[2] Jaks V, Kasper M, Toftgård R. The hair follicle—a stem cell zoo. ***Exp Cell Res*** 2010; 316(8): 8-1422.

[3] Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. ***PNAS*** 1993; 90(15): 7391-5.

[4] Najafzadeh N, Esmaeilzade B, Dastan Imcheh M. Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation. ***WJSC*** 2015; 7(5): 866.

[5] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. ***Science*** 2007; 318(5858): 1931-4.

[6] Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, et al. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. ***Curr Biol*** 2006; 16(10): 1041-9.

[7] Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 2009; 10(2): 116

[8] Shenoy A, Blelloch RH. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 2014; 15(9): 565

[9] Schneider M. MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. ***Br J Dermatol*** 2012; 166(1): 22-8.

[10] Mokabber H, Najafzadeh N, Mohammadzadeh Vardin M. miR-124 promotes neural differentiation in mouse bulge stem cells by repressing Ptbp1 and Sox9. ***J Cell Physiol*** 2018; 1–10.

[11] Sagha M, Najafzadeh N. Highly efficient neural differentiation of CD34-positive hair-follicle-associated pluripotent stem cells induced by retinoic acid and serum-free medium. InMultipotent Stem Cells of the Hair Follicle 2016 (pp. 161-172). Humana Press, New York, NY.

[12] Najafzadeh N, Sagha M, Tajaddod SH, Golmohammadi MG, Oskoui NM, Deldadeh Moghaddam M. In vitro neural differentiation of CD34+ stem cell populations in hair follicles by three different neural induction protocols. ***In Vitro Cell Dev Biol Anim*** 2015; 51(2): 192-203.

[13] Lim JY, Park SI, Oh JH, Kim SM, Jeong CH, Jun JA, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. ***J Neurosci Res*** 2008; 86(10): 2168-78.

[14] Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, Um M, et al. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. ***Mol Cell Biol*** 2009; 29(19): 5290-305.

[15] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. ***Nature Protocols*** 2008; 3(6): 1101.

[16] Dastan M, Najafzadeh N, Abedelahi A, Sarvi M, Niapour A. Human platelet lysate versus minoxidil stimulates hair growth by activating anagen promoting signaling pathways. ***Biomed Pharmacother*** 2016 ; 84: 979-86.

[17] El Seady R, Huisman MA, Löwik CW, Frijns JH. Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia. ***Biochem Biophys Res*** 2008; 376(2): 358-62.

[18] Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, et al. Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. ***Am J Pathol*** 2005; 166(6): 1841-50

[19] Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. ***Development*** 1992; 116(1): 201-11.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:33 +0430 on Friday August 21st 2020

[20] Surmacz B, Noisa P, Risner-Janiczek JR, Hui K, Ungless M, Cui W, et al. DLK1 promotes neurogenesis of human and mouse pluripotent stem cell-derived neural progenitors via modulating Notch and BMP signalling. ***Stem Cell Rev Rep*** 2012; 8(2): 459-71.
[21] Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. ***Genes Dev*** 2002; 16(7): 846-58.
[22] Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124-3p promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. ***Mol Cell*** 2007; 27(3): 435-48.
[23] Jiang D, Du J, Zhang X, Zhou W, Zong L, Dong C, et al. miR-124-3p promotes the neuronal differentiation of mouse inner ear neural stem cells. ***Int J Mol Med*** 2016; 38(5): 1367-76.
[24] Jiao S, Liu Y, Yao Y, Teng J. miR-124-3p promotes proliferation and differentiation of neuronal stem cells through inactivating Notch pathway. ***Cell Bioscience*** 2017;7(1):68.
[25] Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. ***J Cell Biochem*** 2015; 116(6): 943-53.
[26] Zhao C, Sun G, Li S, Lang M-F, Yang S, Li W, et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. ***PNAS*** 2010; 107(5): 1876-81.
[27] Saez JE, Gomez AV, Barrios AP, Parada GE, Galdames L, Gonzalez M, et al. Decreased Expression of CoREST1 and CoREST2 Together with LSD1 and HDAC1/2 during Neuronal Differentiation. ***PLoS One*** 2015; 10(6): e0131760.