

بررسی تاثیر کوئرستین بر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی پیش ساز عصبی ناحیه زیر بطنی (SVZ) مغز رت های بالغ

علی ابراهیمی^۱، کاظم پریور^۲، نسیم حیاتی رودباری^۳، اکرم عیدی^۲

۱- دانشجوی دکترای زیست شناسی علوم جانوری، گرایش سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی جانوری، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. K.parivar1941@gmail.com

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: وجود سلول های بنیادی پیش ساز عصبی در بخش هایی از مغز بالغین، امید به درمان و بازیابی نقص ها و بیماری های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی و دژنراتیو مانند پارکینسون، آلزایمر و ام اس را بالا برده است. از طرفی کمک به تسریع تکثیر و تمایز این سلول ها با دیدگاه درمانی بحث پیشرو دیگری است که این امیدها را بیشتر می کند. کوئرستین یک فلاونوئید گیاهی است که اثرات متعدد ترمیمی، مهارتی و حفاظتی آن بر روی برخی از بیماری ها از جمله آسیب های عصبی، جبران استرس های اکسیداتیو، مهار سرطان و نیز روند های زیستی سلول از قبیل تمایز و تکثیر، بررسی و اثبات شده است. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر توام این ماده بر روند تکثیر و تمایز سلول های زیر بطنی (SVZ) مغز موش های بالغ در وضعیت وابسته به دوز می باشد.

روش کار: ابتدا با استخراج سلول های بنیادی عصبی از SVZ و تولید نوروسفر، غلظت های ۱، ۵ و ۱۵ میکرومولار کوئرستین به محیط های کشت افزوده شد تا پس از یک هفته تاثیر تکثیری و تمایزی آن با کنترل مقایسه گردد. بعد از تعیین هویت سلولی از طریق بررسی بیان ژن و بررسی وضعیت بقاء سلولی از طریق آزمون MTT، شمارش و نیز کمی سازی تصاویر سلولی به وسیله نرم افزار ImageJ، معنی داری اختلافات از طریق نرم افزار SPSS بررسی گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان تاثیر تمایزی در غلظت های مختلف متفاوت است. به طوری که غلظت ۱۵ میکرومولار کم ترین تاثیر تمایزی را دارد. از غلظت ۵ میکرومولار و بالاتر، تاثیر تمایزی افزایش یافته ولی مهار تکثیر نیز اتفاق می افتد. در غلظت ۱۵ میکرومولار بیشترین مهار مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: کوئرستین، ناحیه زیربطنی (SVZ)، تمایز، تکثیر.

مقدمه

اما با شناخت برخی روش های درمانی و ترمیمی امیدها برای جبران این قبیل آسیب ها بالاتر رفته است. از این میان شناخت منابع جبران سلولی مانند سلول های پیش ساز عصبی در نواحی درونی مغز از قبیل ناحیه زیر بطنی (SVZ) و هیپوکمپ به عنوان جدیدترین یافته ها، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. برای یک ترمیم نورنی مناسب سه فرآیند مورد نیاز است. اول این که نوروژن آسیب دیده

ترمیم آسیب های وارده به سیستم عصبی، به ویژه اعصاب مرکزی، همواره یکی از دغدغه های علوم بازساختی و پزشکی بوده است. هنوز بخش زیادی از این آسیب ها جبران ناپذیر هستند. بخشی از این نقص ها نیز منشاء درون زاد از قبیل فرسودگی و زایل شدن یا تخریب توسط سیستم ایمنی (اتوایمیون) دارند. تفکر غالب در دهه های قبل عدم امکان جبران در این نقایص بوده است.

مانند سلول درمانی و مهندسی بافت می باشد. به طوری که پایین ترین سطوح ترمیمی و بازساختی برپایه سلول های بنیادی هنوز در این سیستم اتفاق می افتد. امروزه استفاده از روش های تحریکی و استفاده از ترکیبات موثر بر روند تکثیر و تمایز در تسریع ترمیم و بازسازی یک امر مرسوم در علوم سلول درمانی و مهندسی بافت می باشد. کوثرستین از فلاونوئیدهای گیاهی است که به خاطر اثرات درمانی متعدد آن در سطح وسیعی از بیماری ها از قبیل اختلالات التهابی، قلبی- عروقی و سرطان بررسی شده است (۹). هم چنین تحقیقات اخیر که بر روی نقش و تاثیر حمایتی آن بر اختلالات و نقایص عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر (۱۰)، آسیب های مغزی و صدمات نخاعی تمرکز داشته اند (۲۲). Russo و همکاران در ۲۰۱۲ دریافتند که کوثرستین از طریق جلوگیری از اکسیداسیون کلسترول در برابر بیماری های قلبی عروقی محافظت می کند. دریافت منظم رژیم غذایی غنی از کورستین در سالمندان مانع از CHD می شود. یافته های دانشمندان نشان می دهد که کوثرستین اثرات محافظتی در برابر بیماری های قلبی عروقی مانند آترواسکلروز، ایسکمی حاصل از آسیب های برگشتی، سمیت قلبی و فشار خون بالا را نشان می دهد (۲۱). Guillermo Gormaz و همکاران، ۲۰۱۵ دریافتند اثر ضد التهابی کورستین نقش کلیدی در کاهش عوامل خطر ساز قلبی عروقی مانند فیبرینوژن و پروتئین واکنشی C انسانی را دارد. بر اساس گزارش آن ها توانایی کوثرستین در مهار تکثیر و مهاجرت سلول های عضلانی صاف آئورت، تجمع پلاکتی همراه با مهار فسفوریلاسیون پروتئین MAP-کیناز، آن را به عنوان یک کاندید مناسب برای پیشگیری از اختلالات قلبی و عروق پیشنهاد می کند (۱۲). Johari و همکاران، ۲۰۱۲ گزارش کردند که کوثرستین علیه طیف وسیعی از ویروس ها مانند ویروس *T-lymphotropic* انسان، *Japanese encephalitis*، و ویروس *dengue virus type 2* از طریق

اطلاعات دقیق و به موقعی از میزان و مکان آسیب کسب نماید (۴). دوم این که نوروآنژیوپاتی جدیداً از طریق حفظ تعادل میان عوامل تحریکی و مهارتی به رشد مناسب و ذاتی خود دست یابد (۱۶)، و سوم این که نوروآنژیوپاتی دیده بتواند با کسب اطلاعات از محیط به اندام هدف متصل شده و کارکرد اولیه خود را بازیابد (۱۳). با این دید هر کدام از این مراحل پیچیدگی های مختص به خود را داشته و با تاثیر پذیری از جنبه های مختلف امکان تسریع یا تقلیل را دارد. از طرف دیگر جبران بخشی از آسیب ها نیازمند وجود پیش سازهای مناسب و فراهم شدن امکان تکثیری و تمایزی آن ها می باشد. امروزه مشخص شده است که سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی (NSCs) در مغز پستانداران بالغ وجود داشته و در طول حیات به پویایی مغز آن ها کمک می کنند (۶). دو ناحیه مهم نروژنیک در مغز پستانداران بالغ وجود دارد که سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی (NSCs) در آن ها ساکن هستند، یکی ناحیه زیر بطنی (SVZ) که در موقعیت جانبی بطن ها قرار دارد و دیگری ناحیه از شکج دنداندار هیپو کمپ (SGZ) می باشد (۲). بر اساس یافته های Chen و همکارانش (۲۰۱۵)، خوش بینی در خصوص امکان استفاده از درون زایی (نروژنز) سلول های پیش ساز عصبی در ترمیم مغز ایجاد گردید (۸). از آن زمان یافته های فراوانی در این زمینه منجر به افزایش دانش بشری در خصوص سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی (NSCs) بالغین و درون زایی آن ها شده است (۷). کشف این سلول ها در سیستم عصبی مرکزی پستانداران که تا مدت ها تصور می شد فاقد هر گونه قدرت ترمیم و بازسازی هستند، امیدهای تازه ای را برای درمان بیماری های دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی نظیر ام اس، پارکینسون، آلزایمر، سکته های مغزی و ضایعات نخاعی ایجاد کرده است (۲۴). با این وجود هنوز روند بازسازی و ترمیم در سیستم عصبی مرکزی به عنوان بغرنج ترین مساله در علم پزشکی نوین و نیز علوم بنیادی

رت های لوئیس بالغ با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم پس از تزریق درون صفاقی کتامین-زایلین بی هوش و با کشیدگی و دررفتگی گردن کشته شدند و به سرعت مغز آن ها خارج گردید. مغز در داخل سرم فیزیولوژی حاوی پنی سیلین - استرپتومایسین، در شرایط استریل جهت اخذ سلول های پیش ساز عصبی به شرح زیر تشریح گردید. ابتدا ناحیه لوب بویایی جدا شد. مغز با یک برش عرضی از سطح شکمی - میانی به دو قسمت قدامی و خلفی تقسیم گردید. از ناحیه قدامی قسمت زیر بطنی، ابتدا تیغه میانی یا سپتوم دو بطن جداسازی شده و کنار گذاشته شد. سپس بدون برداشتن جسم مخطط و جسم پینه ای لایه نازکی از دیواره بطن طرفی برداشته و در یک پتری دیش حاوی pbs سرد قرار داده شد. جهت جداسازی سلول ها ابتدا با اسکالپل بافت حاصل کاملاً کوبیده و ریز شد. بافت قطعه شده با استفاده از سمپلر چندین بار پیتاژ شده و سپس به درون فالكون ۱۵ حاوی ۳ میلی لیتر تریپسین ۰/۰۲ درصد منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه نگه داری شد. سپس با افزودن محیط کشت به مقدار دوبرابر حجم تریپسین اثر آن خنثی شده و محتویات لوله جهت جداسازی سلول ها با دور ۱۵۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته و سلول های ته نشین شده به درون فلاسک T25 فیلتردار، حاوی محیط کشت منتقل گردید. پس از اطمینان از وجود سلول های در زیر میکروسکوپ (شکل ۱)، محیط کشت حاوی سلول به انکوباتور منتقل و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵% CO₂ و رطوبت کشت داده شد. پس از ۴ روز از شروع کشت، اولین گروه سلول های نورو سفیر ملاحظه گردید (شکل ۲).

پاساژ سلولی

اولین پاساژ سلولی بعد از ۱۳ روز از شروع کشت و با پرشدن فلاسک انجام گرفت (شکل ۳). و برای بار دوم نیز

خواص ضد عفونی کنندگی و ضد رونویسی آن موثر است. کوئرستین هم چنین ویروس هیپاتیت C را با مسدود کردن فعالیت پروتئین NS پروتئاز مهار می کند (۱۴). Ohnishi و همکاران، ۲۰۱۵ گزارش دادند که کوئرستین علیه ویروس آنسفالومیوکارڈیت و ویروس هرپس سیمپلکس با تقویت القای TNF و در نتیجه افزایش تولید IFN- β اقدام می کند (۱۸). هم چنین مطالعات بیشتر در شرایط *In vivo* روشن کرده اند که کوئرستین علیه ویروس آنفلونزای A و ویروس *porcine diarrhea epidemic* موثر است (۱۸). YueLiu و همکارانش (۲۰۱۷) که تاثیر کوئرستین را بر تکثیر و مهاجرت سلول های *glioblastoma* انسانی U251 بررسی کردند. به هر حال هنوز اطلاعات اندکی در خصوص مکانیسم های دخیل در این نقش های کوئرستین یافت شده است (۲۸). تحقیق حاضر قصد دارد تا اثر کوئرستین را بر روی تکثیر و تمایز سلول های ناحیه زیر بطنی رت های بالغ در شرایط آزمایشگاهی بررسی کند.

مواد و روش ها

محلول تیمار

پودر زرد رنگ کوئرستین تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ در DMSO حل شده و با غلظت 0.1 mol/L به عنوان ترکیب ذخیره تهیه گردید. برای تهیه غلظت های مورد نیاز در زمان استفاده از محیط کشت به عنوان رقیق کننده استفاده و به میزان لازم محلول کاربردی تهیه شد.

محیط کشت

DMEM/f12 (Dulbecco's Modified Eagle's (Sigma, Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) که به وسیله Aldrich) ۴.۵% FBS, 10% glucose, 1-1 g Penicillin و ۱% fetal bovine serum (Gibco) و streptomycin (Gibco) و فاکتورهای رشد bFGF، EGF، تکمیل و هم آوری شده بود.

منبع سلولی و نحوه اخذ سلول

مدت ۲ دقیقه و چرخه های باز شدن ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۴ ثانیه. گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصولات واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵% مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تکثیر و تمایز

بقا سلولی با تست MTT بررسی گردید. میزان تکثیر سلول ها با شمارش سلولی در هر یک از چهار محیط مختلف انجام شد. به طوری که مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۹۰ میکرو لیتر تریپان بلو مخلوط نموده و مقدار ۱۰ میکرو لیتر از آن را بر روی هموسیترمنت منتقل و عمل شمارش سلولی انجام شد. برای تعیین میزان تمایز یابی از روی شکل ظاهری سلول ها نیز از نرم افزار ImageJ استفاده گردید. بدین صورت که بلندترین زایده سلولی به عنوان آکسون در نظر گرفته و تعداد و طول آن ها ملاک بر پیشرفت تمایز تلقی شد (۵).

سنجش بیان ژن، روش Real-Time PCR

بیان کمی mRNA ژن های عصبی مورد مطالعه در نمونه های حاصل از cDNA به دست آمده از سلول های کشت داده شده تحت شرایط تمایز عصبی بعد از یک هفته بررسی گردید. مراحل انجام آزمایش و نحوه ساخت مسترمیکس و برنامه دمایی واکنش مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت انجام گردید. اما به طور خلاصه ابتدا cDNA ساخته شده را با DEPC به نسبت ۱ به ۲ رقیق کرده و سپس فلوسیتومتری انجام گرفت. تمام مراحل بر روی یخ اتفاق افتاد. بعد از آن به تعداد نمونه ها از هر گروه کشت در میکروتیوب جداگانه در محلول ترمال سایکلر قرار گرفت (جدول ۲).

تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده جهت بررسی معناداری نتایج از طریق نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون

تکرار گردید. قطر مناسب نورسفرها برای انجام پاساژ به طور متوسط ۱۵۰ میکرون می باشد (۹).

تیمار با کوئرستین

بعد از دومین پاساژ و یک دست شدن سلول ها، آن ها به چهار گروه، شامل گروه کنترل (Co)، که محیط آن تنها شامل محیط کشت و ترکیبات حمایتی فوق بود (Q1)، حاوی محیط کشت، ترکیبات حمایتی و ۱ میکرومولار محلول کوئرستین، (Q5)، حاوی محیط کشت، ترکیبات حمایتی و ۵ میکرومولار محلول کوئرستین و (Q15)، که حاوی محیط کشت، ترکیبات حمایتی و ۱۵ میکرومولار محلول کوئرستین بود، تقسیم گردید (۱۴). تیمار با تعویض محیط کشت رویی به میزان ۴ میلی لیتر پس از هر ۲، ۳ و ۲ روز تجدید شد. در پایان و پس از ۷ روز هویت یابی سلولی انجام و بررسی وضعیت تمایز و تکثیر با روش های PCR، MTT assay و آنالیز ظاهری با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت. نتایج کمی و کیفی با استفاده از نرم افزار توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون One way ANOVA و تست Tukey بررسی گردید و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان گردید. در تمامی آنالیزها مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار (significant) در نظر گرفته شد.

هویت یابی سنجش بیان ژن، روش Real-Time PCR

با استفاده از روش PCR و بیان نستین و MAP2 پیش ساز عصبی بودن یا تمایز یابی به مرحله عصبی در سلول ها تایید شد. برای این منظور، RNA کل سلول ها در هر چهار گروه با استفاده از دستورالعمل RNX-plus و Synagen جدا شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفتومتری برای آماده سازی cDNA، تک زنجیره ای با ۰/۵ میکروگرم RNA با استفاده از آغازگرهای الگو (جدول ۱) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ادامه واکنش PCR با باز شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به

سطح بیان در محیط Q15 مشاهده می گردد (شکل ۴). نمودار ۲ اطلاعات مربوط به میانگین طول آکسون های محاسبه شده توسط نرم افزار Image J می باشد. بر این اساس نیز بالاترین میزان تمایز یابی را در Q15 مشاهده می شود. از نظر تکثیر، تفاوت معناداری بین گروه های کنترل و Q1 مشاهده نمی شود (نمودار ۲). اما شمارش تعداد سلول ها به صورت تصادفی نشان از تاثیر مهاری تکثیر با افزایش دوز در محیط Q5 و بالاتر حالت کشندگی در محیط Q15 دارد (نمودار ۳). اختلاف این دو محیط با گروه شاهد معنا دار است. آزمون بقا (MTT assay) نیز این موضوع را تایید می نماید (نمودار ۴).

One way ANOVA و تست Tukey بررسی گردید و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان گردید. در تمامی آنالیزها مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار (significant) در نظر گرفته شد.

نتایج

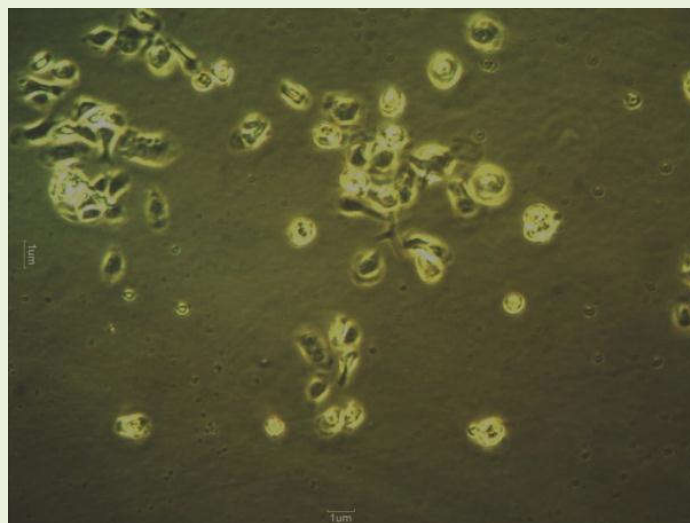
با توجه به محل اخذ سلول ها از موقعیت SVZ و انتظار پیش ساز عصبی بودن آن ها، نتایج RT-PCR بیان نستین را در همه آن ها تایید کرد (شکل ۱، ۲، ۳). اما میزان بیان MAP2 مطابق با میزان تمایز یابی در چهار محیط طبق نمودار ۱ متفاوت بود. زیرا MAP2 تنها در سلول های عصبی بالغ بیان می گردد. بر اساس این نمودار بیشترین

جدول ۱- توالی پرایمرهای بکار رفته و اندازه آن ها.

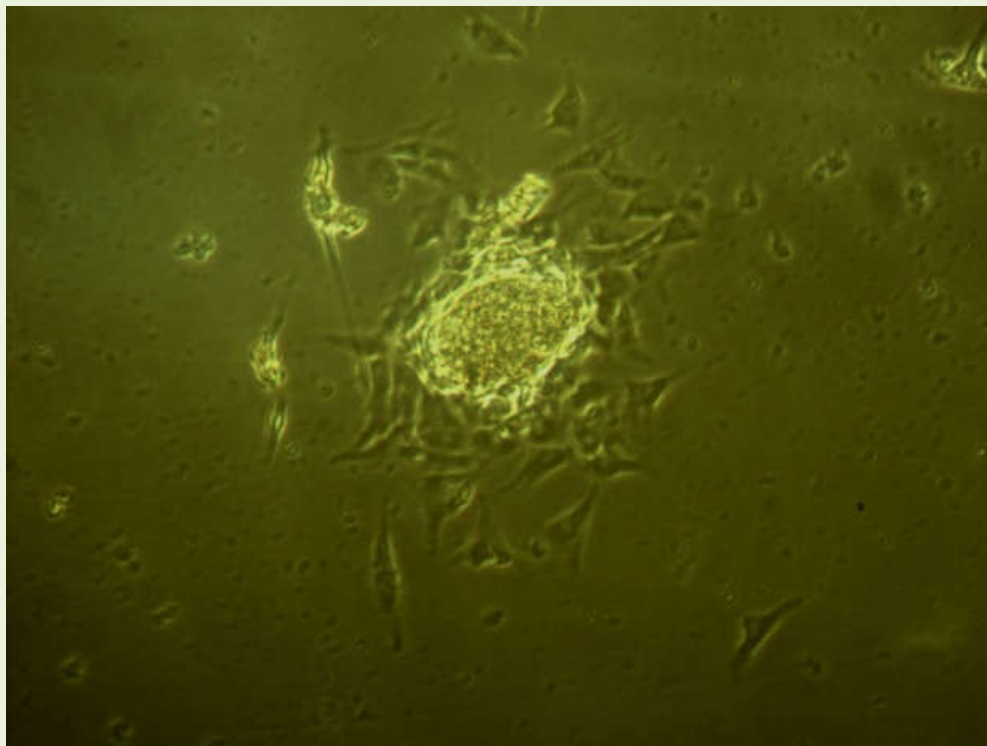
Name	Sequences (5' → 3')	PCR fragment length (bp)
1 MAP2 forward	AGT TCC AGC AGC GTG ATG	97
2 MAP2 reverse	CAT TCT CTC TTC AGC CTT CTC	96
3 Nestin forward	GAA GGT GAA GGG CAA ATC TG	
4 Nestin reverse	CCT CTT CTT CCC ATA TTT CCT G	

جدول ۲- مراحل واکنش Real-Time PCR اجرا شده برای بررسی بیان مارکرهای عصبی

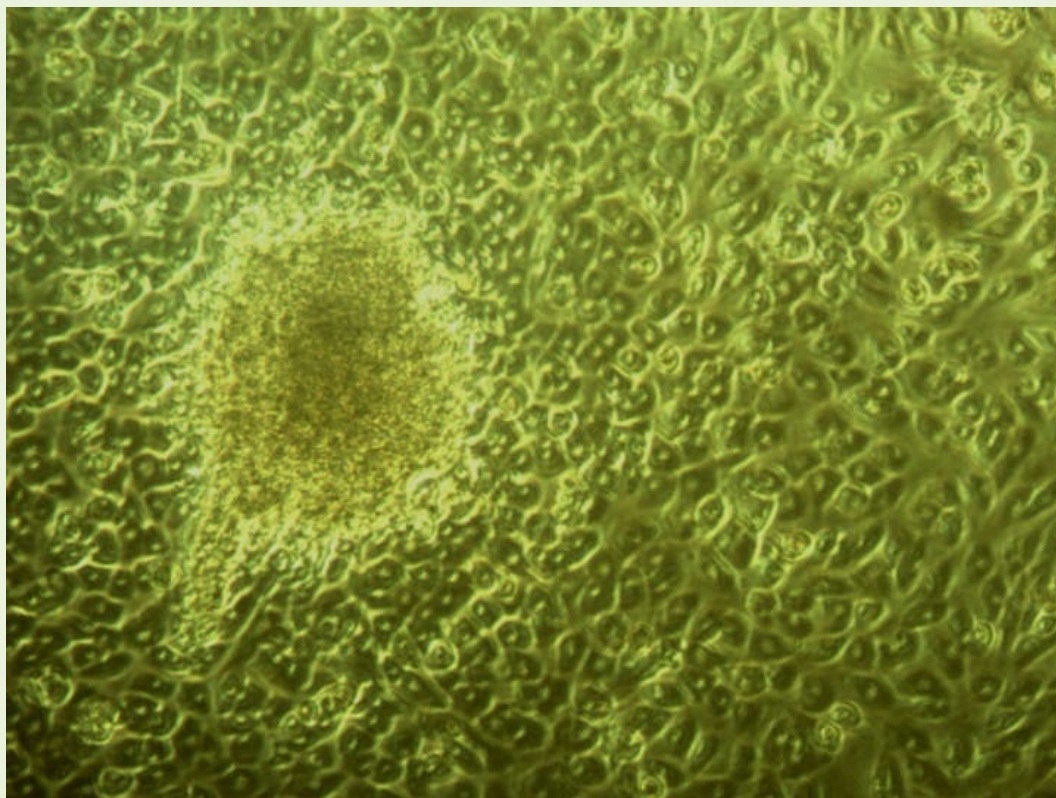
مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	سیکل
دنا توره اولیه	۹۵	۳۰	۱
دنا توره	۹۵	۵	۳۰ - ۴۵
اتصال آغازگر و گسترش	۶۰	۳۰	



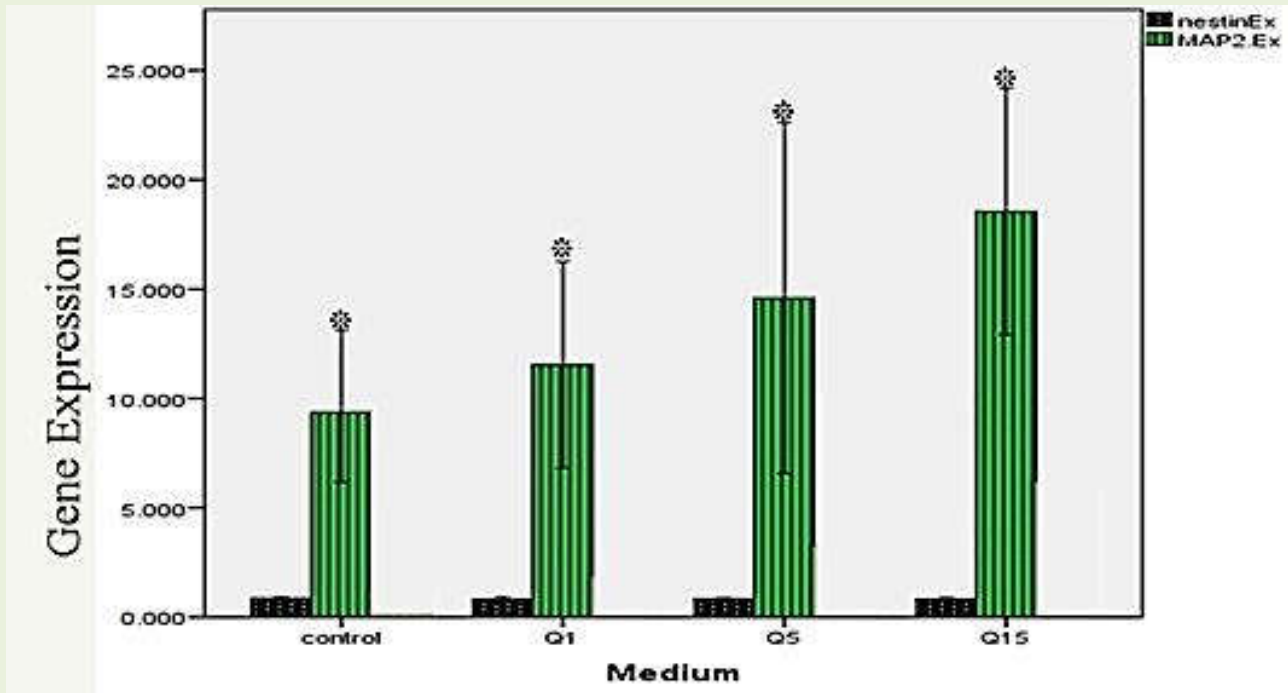
شکل ۱- مشاهده اولین سلول های استخراج شده از SVZ.



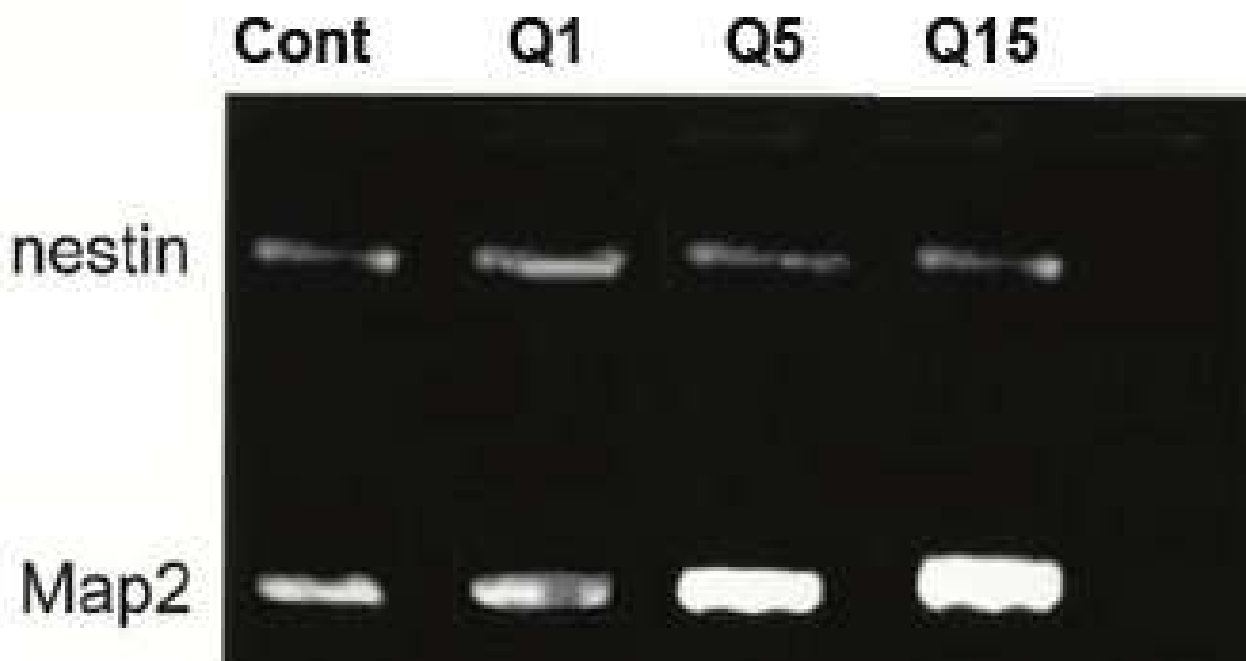
شکل ۲-۱ اولین اجتماع نوروسفیر پس از ۴ روز از شروع کشت.



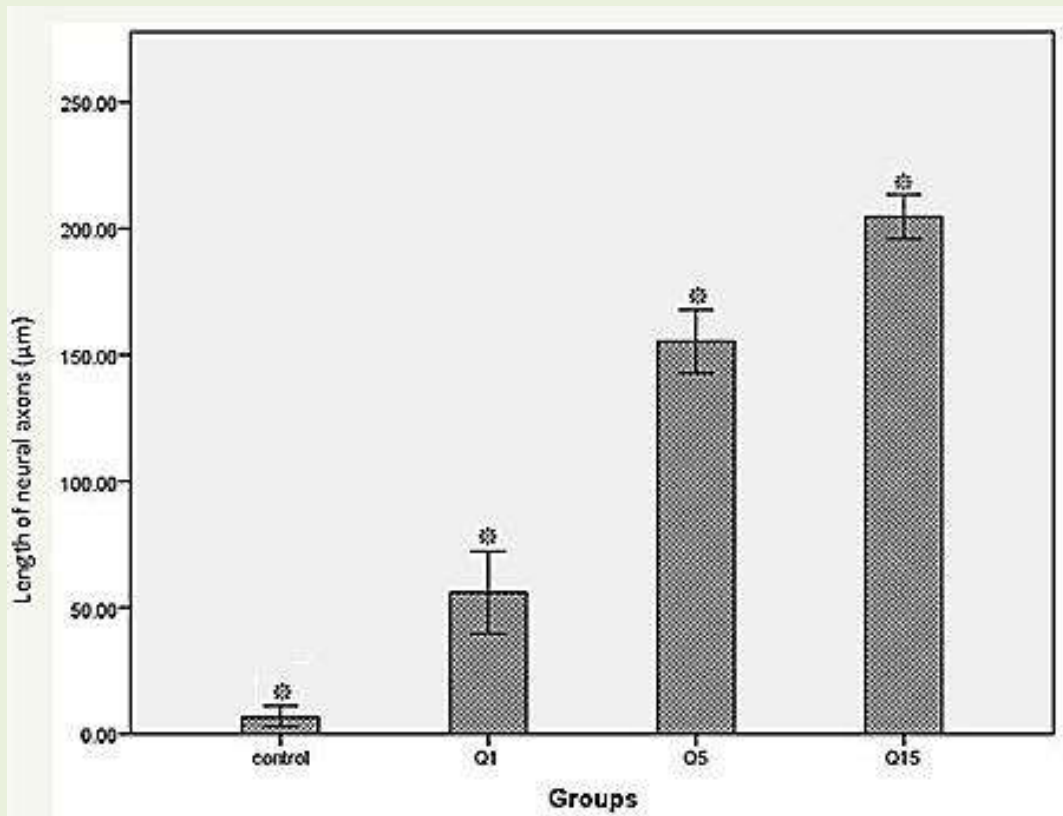
شکل ۳- وضعیت نوروسفیرها در روز ۱۳ پس از کشت.



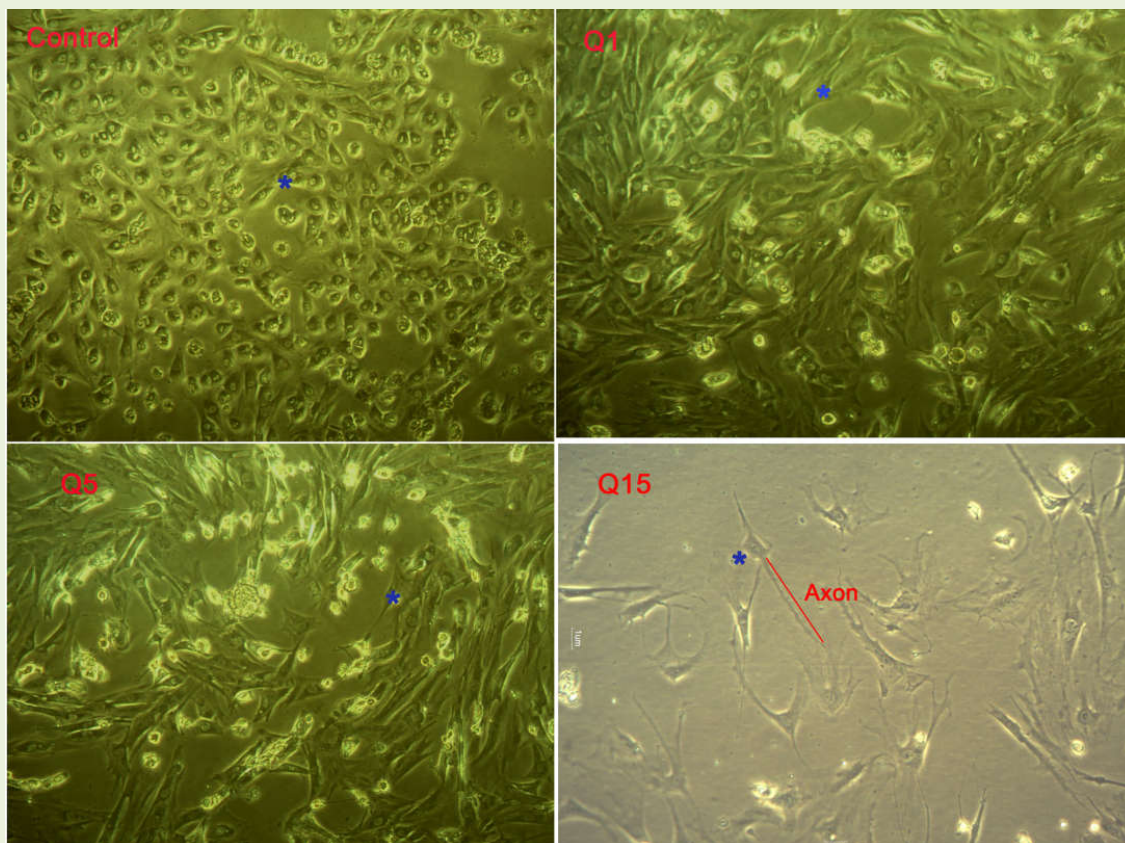
نمودار ۱- میزان بیان nestin و MAP2 در گروه های مختلف. هم چنان که مشخص است نستین در تمام گروه ها به صورت یکسان بیان شده است ولی MAP2 تفاوت معنی داری را در گروه ها نشان می دهد.



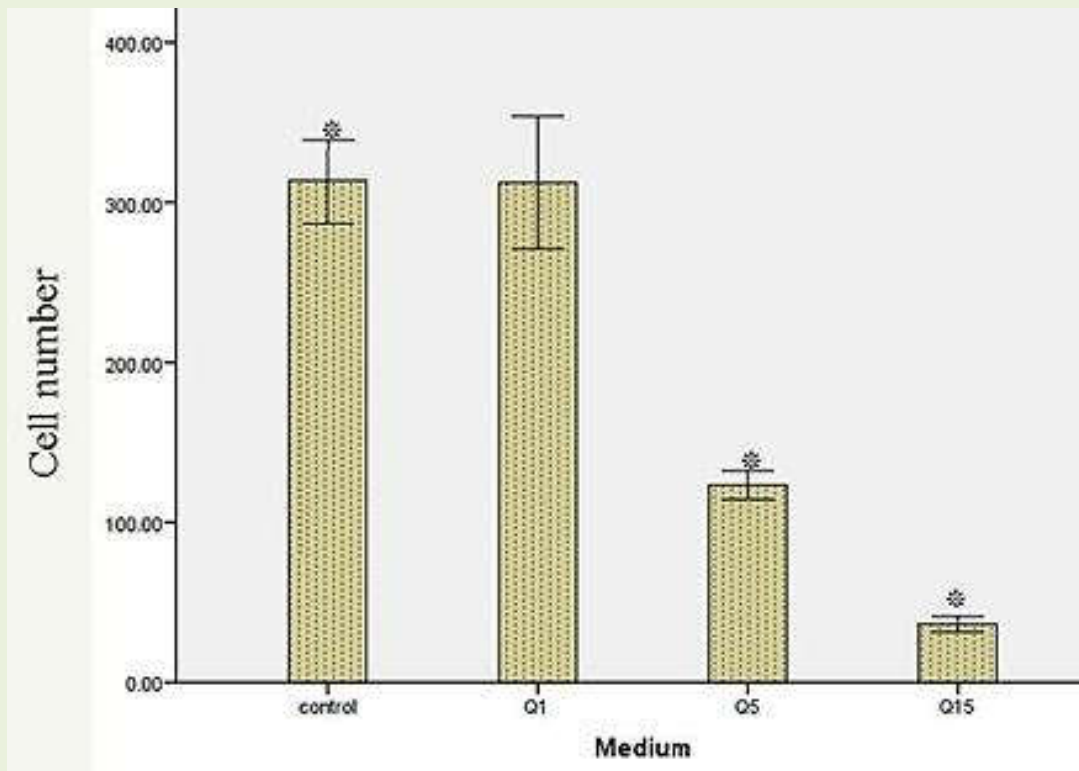
شکل ۴- الگوی بیان ژن در تصویر الکتروفورز.



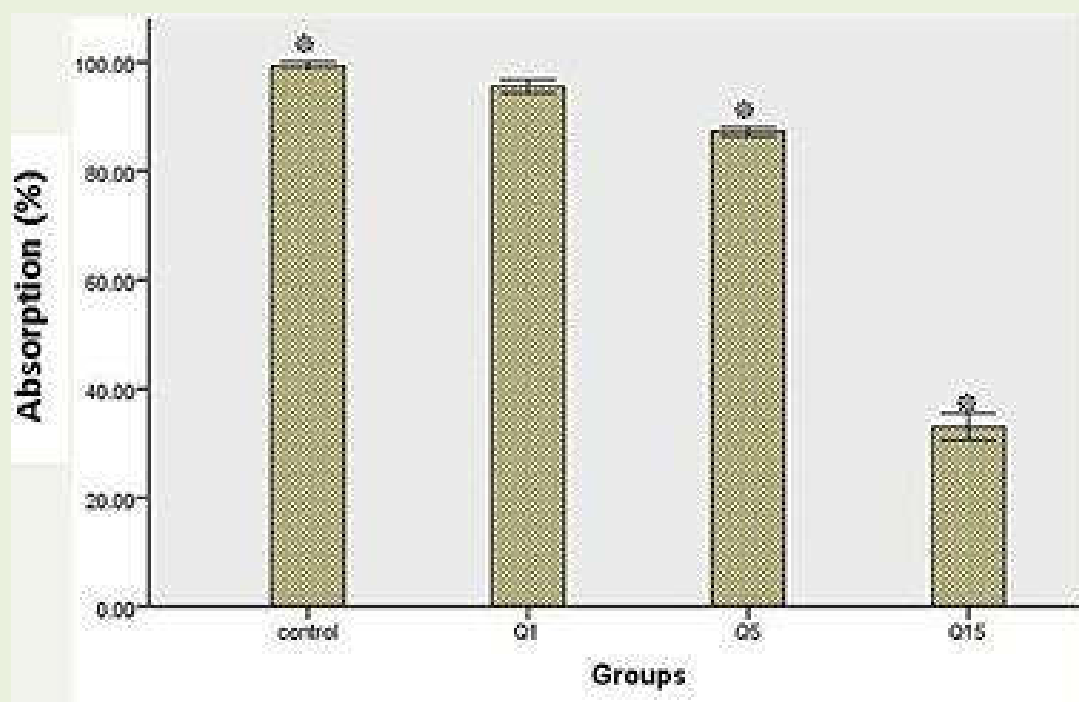
نمودار ۲- مقایسه طول آکسون بر اساس میزان تمایز با استفاده از نرم افزار ImageJ. بر این اساس نیز بیشترین تمایز یابی در محیط Q15 قابل مشاهده است.



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ اینورت از وضعیت تکثیر و تمایز در سلولها در چهار محیط کشت متفاوت.



نمودار ۳- نمودار شمارش تصادفی سلولها در چهار محیط کشت. بر این اساس نیز تفاوت معناداری از نظر تکثیر در بین گروه کنترل و محیط های Q5 و Q15 مشاهده می شود.



نمودار ۴- مقایسه میزان بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT. مهار تکثیر در محیط با کوئرستین ۵ و ۱۵ میکرومولار معنادار است

بحث و نتیجه گیری

NIE-115 را در وضعیتی وابسته به دوز اثبات کردند. آن-ها مسیر مولکولی این تاثیر را وابسته به افزایش غلظت

CHEN Ming-Ming و همکارانش (۲۰۱۵) تاثیر کوئرستین بر تمایز یابی عصبی در سلول های رده ی

ما نیز با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر از رو هفتم قابل تمیز بوده و تا روز ۱۳ بدون تغییر نشان داد. دلیل اثر مهاری این فلاونوئید بر تکثیر سلول ها، بر اساس یافته های Ilyary و همکاران، از مسیر مولکولی Bax/Bcl2 می باشد (۱۳). Bcl-2 و Bax دو عضو اصلی خانواده Bcl-2 هستند که نقش اساسی در پیشرفت تومور دارند. Bax، مولکول پیش برنده آپوپتوز از طریق نفوذپذیر کردن غشای خارجی میتوکندری در پاسخ به تنش های مختلف سلولی است که باعث مرگ سلول می شود. در مقابل، Bcl-2 به عنوان یک عضو اصلی ضد آپوپتوز عمل می کند و با مهار فعالیت Bax از آپوپتوز جلوگیری می کند. Bax می تواند با Bcl-2 همودایمر یا هترو دایمر ایجاد کند. وقتی غلظت Bcl-2 در سلول ها زیاد باشد، Bax تمایل به تشکیل هترو دایمر دارد، و این یک سیگنال زنده ماندن برای سلول ها است. در مقابل، وقتی سطح Bax افزایش یابد، همودایمر ایجاد می کند و باعث افزایش آپوپتوز سلول می شود. این بدان معنی است که نسبت Bax به Bcl-2 حساسیت سلول به آپوپتوز را تعیین می کند. در یافته های آن ها مشخص شد که نسبت Bcl-2 / Bax در تیمار با کوئرستین، در ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر کاهش یافته است. پس در نتیجه کوئرستین احتمالاً با تعدیل سطح Bcl-2 باعث مرگ سلولی می شود. جالب توجه است که اخیراً نشان داده شده است که کوئرستین مستقیماً به حوزه BH3 پروتئین های Bcl-2 و Bcl-xL در سلول های Jurkat انسانی متصل می شود. مطالعه ساختاری نشان داده است که کوئرستین به روشی مشابه با آنتاگونیست تقلیدی BH3 به Bcl-xL متصل می شود که شواهدی برای مکانیسم بالقوه آپوپتوز ناشی از کوئرستین را ارائه می دهد. هم چنین آن ها کاهش بیان MMP2 و MMP9 را به عنوان عوامل پیش برنده سرطان در سلول های تیمار شده با کوئرستین اثبات کردند (۲۸). Nakajima و همکارانش (۲۰۱۶) اعلام کردند که کوئرستین تمایز یابی سلول های رده ی PC12

cAMP دانستند. بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است cAMP در فرایند بازسازی عصبی از طریق تنظیم بیان پایین دستی ژن Gap-43 دخیل است. این تنظیم از طریق مسیر سیگنال IL-6/cAMP به گیرنده مربوطه متصل می شود و Janus kinase (JAK) را فعال می کند و سپس STAT3 فسفریله شده و با ورود به هسته Gap-43 را بیان می کند. از آن جایی که Gap-43 در باز آرایشی اکتین دخیل است، افزایش بیانی آن باعث رشد و افزایش طول آکسون می گردد. اما آن چه مطالعات نشان داده است این است که mRNA مربوط به Gap-43 در آکسون موجود نیست و برای فراهم شدن میزان کافی از آن به طور متوسط ۳ روز زمان لازم است. بر اساس یافته های آن ها کوئرستین در غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر به میزان بالایی بیان cAMP را پس از دو ساعت و بیان Gap-43 را پس از دو روز شروع تیمار، افزایش داد (۷). Chen Ming-Ming و همکارانش (۲۰۱۵) تاثیر مثبتی را از نظر تکثیر وابسته به غلظت کوئرستین از روز ۴ به بعد در این لاین سلولی گزارش نکردند (۸). بر اساس یافته های ما نیز تاثیر تمایزی کوئرستین بر روی سلول های بنیادی عصبی با منشأ SVZ مورد تایید قرار گرفت ولی بیشترین تاثیر تمایزی در روز ۱۳ دیده شد و پس از آن بدون تغییر باقی ماند. این تفاوت زمانی نیز می تواند به دلیل نوع سلول ها و نیز روش تولید سلول های پیش ساز عصبی از طریق مسیر تولید نوروسفر باشد (۷). بر اساس یافته های YueLiu و همکارانش (۲۰۱۷) که تاثیر کوئرستین را بر تکثیر و مهاجرت سلول های glioblastoma انسانی U251 بررسی کردند (۲۸). اثر مهاری آن در وضعیت وابسته به زمان و دوز مورد تایید قرار گرفت. بر اساس یافته های آنان کم ترین سطح غلظتی لازم برای بروز مهار تکثیر این رده ی سلولی در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت گزارش گردید. در حالی که سطوح غلظتی کمتر بدون تاثیر مهاری و دارای اثر تکثیری می باشد. تاثیر مهاری این ماده در تحقیق

به عصبی را تحریک می کند. آن ها دلیل این عملکرد کوئرستین را از طریق فعال کردن کوترانسپورتر Na/K/2Cl معرفی کردند(۱۵). بر اساس یافته های این پژوهش نیز غلظت های ۵ میکرومولار و بالاتر کوئرستین تمایز یابی سلولهای SVZ را تسریع می کند. Palazzolo و همکارانش(۲۰۱۲) ابراز داشتند که فلاونوئید ایزو کوئرستین تطویل زواید نورونی را از طریق کاهش فعالیت RhoA افزایش می دهد(۱۹). با کنار هم قرار دادن این اثرات به همراه برخی دیگر از مهم ترین تاثیرات کوئرستین مانند تاثیر آنتی اکسیدانی (Alrawaiq و همکارانش؛ ۲۰۱۴ (۳) ، Ademsun؛ ۲۰۱۵ (۱) و

Robazkiewicz همکاران؛ ۲۰۰۹ (۲۰)) و تاثیر ضد التهابی Zhang و همکاران؛ ۲۰۱۱ (۲۹)، Testa و همکاران، ۲۰۱۴ (۲۷)، Sun و همکاران؛ ۲۰۱۵ (۲۵)، Sharma، ۲۰۰۷ (۲۳) و ... می توان این ماده را به عنوان یکی از مهم ترین ترکیبات دارویی در تسریع ترمیم آسیب های عصبی که همراه با شرایط استرس سلولی از جمله التهاب و حضور گروه های اکسیداتیو می باشد، پیشنهاد کرد. این وضعیت در برخی از بیماری های دستگاه عصبی مرکزی مانند: تروما، M.S.، آلزایمر و پارکینسون بسیار شایع است.

منابع

1. Ademosun, A.O., Oboh, G., Bello, F., Ayeni, P.O. (2015). Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase activities, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 4 (2015), doi:http://dx.doi.org/10.1177/2156587215610032.
2. Allison, M., Bond, M., Hongjun, S. (2015). Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. *Cell Stem Cell*, 17(4); 385–395 .
3. Alrawaiq, N.S., Abdullah, A. (2014). A review of flavonoid quercetin: metabolism: bioactivity and antioxidant properties. *Int. J. PharmTech Res*, 6; 933–941.
4. Ambron, RT., Walters, ET. (1996). Priming events and retrograde injury signals. A new perspective on the cellular and molecular biology of nerve regeneration, [*J. Mol Neurobiol*, 13(2); 61-79.
5. Boots, AW., Haenen, GR., Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. [*J. Eur J Pharmacol*, 585(2-3); 325-337 .
6. Bischoff, SC. (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. [*J. Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11(6); 733-740.
7. Chen, M., Yin, Z., Zhang, L., Liao, H. (2015). Quercetin promotes neurite growth through enhancing intracellular cAMP level and GAP-43 expression. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(9); 0667-0672.
8. Chen, ZL., Yu, WM., Sidney, S. (2007). Peripheral regeneration. [*J. Annu Rev Neurosci*, 30; 209-233.
9. Cho, JY., Kim, IS., Jang, YH. (2006). Protective effect of quercetin, a natural flavonoid

- against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. [*J. Neurosci Lett*, 404(3); 330-335.
10. Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F. (2003). Neuroprotection by flavonoids, [*J. Braz J Med Biol Res*, 36(12); 1613-1620.
 11. Golmohammadi, MG., Sagha, M., Azari, H., Najafzadeh, N. (2011). Isolation of neural stem and progenitor cells from the adult mouse brain using the neurosphere assay. *Journal of Ardabil Univ Med Sci*, 11(3); 246-258.
 12. Guillermo Gormaz J., S. Quintremil, R. (2015). Cardiovascular disease a target for the pharmacological effects of quercetin. *Curr. Topics Med. Chem.*, 15; 1735–1742.
 13. Ilary, A., Esther, U., Xavier, N. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. [*J. Prog Neurobiol*. (2); 98- 106.
 14. Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M.R., Abubakar, S., Zandi, K. (2012). Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus. *Int. J. Mol. Sci.*, 13; 16785–16795.
 15. Nakajima, K.I., Niisato, N., Marunaka, Y. (2011). Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻-cotransporter. *Cell. Physiol. Biochem.*, 28; 147–156.
 16. Namiko, A., Valeria, C. (2008). Nerve injury signaling. [*J. Curr Opin Neurobiol*, 18(30); 276-283.
 17. Natarajan, S., Pandima, D. K., Nabavi, Se. F. (2011). Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Journal of Ardabil Univ Med. Sci*, 11(3); 246-258.

18. Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S. (2015). Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7; 2345–2358.
19. Palazzolo, G., Horvath, P., Zenobi-Wong, M. (2012). The flavonoid isoquercitrin promotes neurite elongation by reducing RhoA activity. *PLoS One*, 7; e49979.
20. Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A., Bartosz, G. (2007). Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell. Biol. Int.*, 31; 1245–1250.
21. Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Russo, G.L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.*, 83; 6–15.
22. Schültke, E., Kamencic, H., Zhao, M. (2005). Neuroprotection following fluid percussion brain trauma: a pilot study using quercetin. [J]. *J Neurotrauma*, 22(12); 1475-1484.
23. Sharma, V., Mishra, M., Ghosh, S., Tewari, R., Basu, A., Seth, P. (2007). Modulation of interleukin-1b mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res. Bull.*, 73; 55–63.
24. Shu-Ting, Ch. (2014). Oral and intraperitoneal administration of quercetin decreased lymphocyte DNA damage and plasma lipid peroxidation induced by TSA in vivo. *BioMed Research International*, 1155(10); 2133-2143.
25. Sun, G.Y., Chen, Z., Jasmer, K.J., Chuang, D.Y., Gu, Z., Hannink, M. (2015). Quercetin attenuates inflammatory responses in BV-2 microglial cells: role of MAPKs on the nrf2 pathway and induction of heme oxygenase-1. *PLoS One*, 10; e0141509.
26. Taupin, P. (2011). Neurogenesis, NSCs, pathogenesis and therapies for Alzheimer's disease. *Front Biosci.*, (Schol Ed) 3; 178-190.
27. Testa, G., Gamba, P., Badilli, U., Gargiulo, S., Maina, M., Guina, T. (2014). Loading into nanoparticles improves quercetin's efficacy in preventing neuroinflammation induced by oxysterols. *PLoS. One.*, 9; e96795.
28. Yue, L., Zhen-Gang, T., Yi, L., Xin-Guo, Qu., Wei, L., Guo-Bin, Wang, C. (2017). Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92; 33–38.
29. Zhang, M., Swarts, S.G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y. (2011). Antioxidant properties of quercetin oxygen transport to tissue XXXII. *Springer*, 283–289.



The Study of The Effect of Quercetin on the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells of Sub-Ventricular Zone(SVZ) in the Adult Rats.

A. Ebrahimi¹, **K. Parivar**², N. Hayatie Roodbari³, A. Eidi²

1. Ph.D Candidate in Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. **K.parivar1941@gmail.com**

3. Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received:2020.14.10

Accepted: 2020.20.12

Abstract

Introduction & Objective: The presence of neural precursor stem cells (NSCs) in some parts of the adult brains and the potency of these types of cells for the acceleration of the proliferation and differentiation processes with a therapeutic viewpoint is another beneficial facet of the application of neural precursor stem cells in cell biology. Quercetin, as an herbal flavonoid, has been extensively investigated and shown to have numerous effects on some cell-lines and disorders. We aimed to investigate the impact of quercetin, on proliferation and differentiation of NSCs derived from the subventricular zone (SVZ) of the adult rat brains.

Material and Methods: The isolated SVZs were mechanically minced into pieces through repeated pipetting in phosphate-buffered saline, incubated with 0.25% trypsin and treated with trypsin inhibitor; then centrifuged to obtain the cell suspension. The obtained cell suspension was cultured for one week to achieve neurospheres. When the cells reached confluence of 70-80%, they were sub-cultured for three passages and in the third passage, quercetin was treated with the cultured cells at the concentrations of 1, 5, and 15 μM . Methods such as Real time-PCR, MTT assay and ImageJ software, have been used to validate differentiation and proliferation of cells.

Results: The results indicated that the differentiation rate of NSCs is affected by various concentrations of quercetin in a dose-dependent manner so that 1 μM quercetin had the least, and 15 μM quercetin showed the most effects on cell differentiation. However, 1 μM quercetin exhibited no significant cell toxicity, the most antiproliferative potential showed when treated with 15 μM concentration quercetin.

Keywords: Quercetin, Sub-Ventricular Zone (SVZ), Differentiation, Proliferation.