Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:37 IRST on Tuesday December 27th 2016

BRIEF REPORT

Evaluation of Human Leukocyte Antigen-G and Interleukin-10 Expression in HIV Positive Patients and Healthy Subjects

Versa Omrani-Nava[1],
Saeid Abediankenari[2],
Jamshid Yazdani Charati[3],
Yousef Yahyapour[4],
Saeideh Sadat Shobeiri[1],
Masoud Mohammadi[1],
Hossein Ranjbaran[2],
Siavash Abedi[5]

[1] MSc Student in Immunology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biostatistics, Health Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[5] Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 20, 2015 ; Accepted November 7, 2016)

Abstract

Background and purpose: HILA-G is an immunomodulatory molecule and alteration of its expression is prevalent during viral infections. HLA-G expression in HIV-positive patients has been inconsistent between different studies and some suggest that Interleukin-10 (IL-10) influences the expression of HLA-G. The aim of this research was to investigate the expression of IL-10 in HIV-positive patients and its relation with TCD4+ lymphocytes.

Materials and methods: In a case-control study, 20 HIV-positive patients, attending the Behavioral Consultation Center affiliated with Mazandaran University of Medical Sciences, were selected and 20 healthy volunteers were also enrolled. Expression of HLA-G was determined by Real-Time PCR. $TCD4^+$ count and IL-10 concentration were evaluated by flow cytometry and ELISA, respectively.

Results: HLA-G gene expression was significantly different between the two groups ($P<0.05$). IL-10 concentration increased in patients and a revers relation was seen between $TCD4^+$ cell count and IL-10 ($r= -0.4$, $P= 0.1$).

Conclusion: The results showed that the expression of HLA-G is deregulated during HIV infection and IL-10 could be considered as a biomarker of disease progression.

Keywords: HLA-G, HIV, IL-10

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(143): 230-234 (Persian).

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:37 IRST on Tuesday December 27th 2016

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۳ آذر سال ۱۳۹۵ (۲۳۴-۲۳۰)

بررسی بیان آنتی ژن لکوسیت انسانی-G و اینترلوکین-۱۰ در بیماران مبتلا به HIV در مقایسه با گروه کنترل

ورسا عمرانی نوا[۱]
سعید عابدیان کناری[۲]
جمشید یزدانی چراتی[۳]
یوسف یحیی پور[۴]
سعیده سادات شبیری[۱]
مسعود محمدی[۱]
حسین رنجبران[۲]
سیاوش عابدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: HLA-G، یک مولکول تنظیمی سیستم ایمنی است که تغییرات بیان آن در عفونت‌های ویروسی شایع است. بیان HLA-G در بیماران مبتلا به ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) متناقض بوده و برخی افزایش بیان این مولکول در این بیماران را ناشی از تاثیر اینترلوکین-۱۰ (IL-10) بیان کرده‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی همزمان بیان آن‌ها در بیماران HIV مثبت و رابطه احتمالی آن‌ها با لنفوسیت‌های $TCD4^+$ بوده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی بر روی ۲۰ بیمار HIV^+ مراجعه‌کننده به مرکز مشاوره رفتاری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ۲۰ فرد سالم در سال ۴-۱۳۹۳ صورت گرفته است. شمارش سلول‌های $TCD4^+/\mu l$ بیماران به روش فلوسایتومتری انجام شد. بیان ژن HLA-G به وسیله Real-Time PCR بررسی شد و از آزمون الایزا برای تعیین غلظت IL-10 استفاده شد.

یافته‌ها: بیان ژن HLA-G در دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). غلظت IL-10 در بیماران افزایش داشت و رابطه معکوس بین شمارش $TCD4^+$ و غلظت IL-10 مشاهده شد ($p=۰/۱$، $r=۰/۴$).

استنتاج: نتایج نشان می‌دهد بیان ژن HLA-G در بیماران HIV^+ از تنظیم خارج شده است و IL-10 می‌تواند شاخصی از پیشرفت بیماری HIV باشد.

واژه های کلیدی: HLA-G، HIV، IL-10

مقدمه

آنتی‌ژن لکوسیت انسانی- G (HLA-G)، پروتئینی غیر کلاسیک از مجموعه سازگاری بافتی اصلی بوده که در تعدیل پاسخ‌های ایمنی موثر است. محصولات پیرایش متناوب این آنتی‌ژن، ایزوفرم های متصل به غشاء و محلول هستند که در این میان ایزوفرم‌های غشایی HLA-G1,G5، مانند پروتئین‌های کلاسیک، توانایی عرضه پپتید به سلول T را دارند و از طریق تقابل با گیرنده‌های سطح سلول‌های کشنده طبیعی، اثرات

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران- دانشکده پزشکی Email: abedianlab@yahoo.co.uk
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱۷

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:37 IRST on Tuesday December 27th 2016

مهاری متفاوتی مانند سرکوب پاسخ‌های تکثیری و القای مرگ برنامه‌ریزی شده را میانجیگری می‌کند(۳-۱). IL-10 به همراه HLA-G، نقش مهمی در ایجاد تعادل بین پاسخ‌های التهابی و تنظیمی سیستم ایمنی، به خصوص در مواجهه با ویروس‌ها دارد و القای بیان آن به عنوان یک مکانیسم فرار از پاسخ‌های موثر ایمنی شناخته شده است(۵-۳).

مطالعات HLA-G در بیماران HIV^+ دارای تناقض هستند و برخی گزارش‌ها افزایش HLA-G در بیماران را ناشی از اثر IL-10 دانسته‌اند(۷،۶). هدف از این مطالعه، بررسی بیان HLA-G و IL-10 با لنفوسیت‌های $TCD4^+$ بیماران در مقابل گروه کنترل بوده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، ۲۰ بیمار HIV^+ مراجعه‌کننده به مرکز مشاوره دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ و ۲۰ فرد سالم، پس از اخذ رضایت آگاهانه، وارد مطالعه شدند. عفونت‌های ویروسی، بارداری و دریافت درمان ضد ویروسی معیارهای خروج از مطالعه بودند. پس از گرفتن ۵ سی‌سی خون از هر فرد، تعداد لنفوسیت های $TCD4^+$ بیماران به روش فلوسایتومتری تعیین گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) با استفاده از فایکول ۱/۰۷۷ جدا شدند و RNA تام سلول‌ها با استفاده از کیت استاندارد (ایران ,SinaClon) استخراج شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت (AccuPower, south Korea) انجام شد و بیان ژن HLA-G به روش Real-Time PCR (سایبر گرین) در شرایط دمایی خاص (جدول شماره ۱) با استفاده از توالی پرایمرهای اختصاصی ژن HLA-G شامل: F: 5'-CTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAG-3 و R: 5' CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT-3' و هم‌چنین برای ژن EF1 (کنترل داخلی) F: 5'-CTGAACCATCCAGGCCAAAT-3' و R: 5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT-3' بررسی گردید. سطح IL-10 به روش الایزا با استفاده از کیت (ebioscience, Germany) اندازه‌گیری شد.

تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS با سطح معنی‌داری $p <$ ۰/۰۵ صورت گرفت.

جدول شماره ۱: شرایط دما و مخلوط واکنش PCR

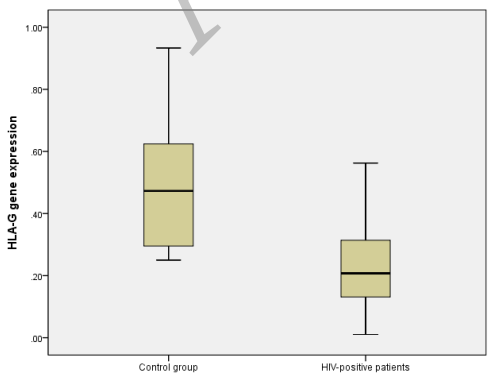
شرایط PCR		مخلوط واکنش PCR	
95° (۱۰ دقیقه، ۱ تکرار)	فعال سازی آنزیمی	F: 0.6µl R: 0.6µl	پرایمر
95° (۳۰ ثانیه، ۴۰ تکرار)	دناتوراسیون	2µl	cDNA
59° (۳۰ ثانیه، ۴۰ تکرار)	هیبریداسیون	6.8µl	آب مقطر
72° (۴۵ ثانیه، ۴۰ تکرار)	طویل سازی (Extension)	10µl	Master Mix

یافته ها و بحث

اطلاعات دموگرافیک دو گروه به همراه یافته‌های آزمایشگاهی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج داده‌های Real-time PCR به صورت $2^{-\Delta CT}$ تفسیر شد که کاهش بیان HLA-G در گروه بیماران نسبت به کنترل را نشان می‌دهد (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۲: اطلاعات دموگرافیک و یافته های آزمایشگاهی

متغیر	گروه بیمار	گروه کنترل	سطح معنی داری
سن	۳۴/۶ (CI 95% 30.83 - 38.37)	۳۳/۹ (30.66 - 37.14)	-
جنس مرد تعداد (درصد)	(۷۰) ۱۴	(۷۵)۱۵	-
زن تعداد (درصد)	(۳۰) ۶	(۲۵) ۵	
بیماری های عفونی	-	-	-
دارو درمانی	-	-	-
میانگین شمارش سلول های CD4	515/µl (395- 606)	-	-
میانگین بیان ژن HLA-G($2^{-\Delta ct}$)	0.25	1.54	۰/۰۰۰۱
میانگین غلظت IL-10	10.4 (5.79-15.1)	6.1 (5.66-6.54)	۰/۰۹



نمودار شماره ۱: بیان ژن HLA-G در سلول‌های تک هسته‌ای بیماران در مقابل گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کم‌تر است (P<0.05). نمودار براساس $2^{-\Delta CT}$ ارائه شده و خطوط افقی نشان‌گر متوسط بیان ژن هستند

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:37 IRST on Tuesday December 27th 2016

میانگین غلظت IL-10 در بیماران بالاتر از گروه کنترل بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p =۰/۰۹۷). هم‌چنین بین غلظت IL-10 و تعداد سلول‌های CD4 در بیماران همبستگی متوسط منفی وجود دارد (r =۰/۴۱۷) که معنی‌دار نبود (p =۰/۱). ارتباطی بین بیان HLA-G با غلظت IL-10 و یا شمارش سلول های CD4 مشاهده نشد. کاهش بیان پروتئین های MHC کلاسیک به منظور مهار عرضه آنتی ژن و فرار از سیستم ایمنی در شرایط پاتولوژیک متعدد از جمله عفونت‌های ویروسی مشاهده شده است. از آن‌جایی که این کاهش سبب فعال شدن سلول NK و لیز سلول‌های آلوده می‌شود، لذا ویروس ممکن است از طریق افزایش مولکول‌های غیر کلاسیک، سلول NK را مهار کند(۹۸). با این وجود مطالعات در زمینه مولکول HLA-G در عفونت با HIV متناقض هستند. گزارشات اولیه در بیماران HIV^+ که تحت درمان داروهای ضد رتروویروسی فعال (HAART) بودند، نشان داد که افزایش HLA-G در مقایسه با افراد سالم به دلیل سطح بالای سایتوکاین‌های Th2 از قبیل IL-10 و نه صرفاً عفونت HIV می‌باشد(۶). به این دلیل در این مطالعه، غلظت IL-10 نیز بررسی شد. مطالعات بعدی نشان داد که HAART باعث القای HLA-G بر سطح مونوسیت‌های بیماران می‌شود و نقش مخدوش‌کنندگی دارد(۱۰). در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد که ایزوفرم HLA-G1 نقش مهمی در عرضه پپتید آنتی‌ژنی ویروس به سلول‌های $TCD8^+$ دارد و ویروس HIV باعث کاهش بیان آن می‌شود(۹). برخی آلل‌ها و پلی مورفیسم‌های HLA-G با کاهش غلظت آن در پلاسمای بیماران HIV مثبت در ارتباط هستند(۱۱). جالب توجه است که مشابه نتایج این تحقیق، بیان کم‌تر HLA-G ناشی از پلی مورفیسم‌های ذکر شده با بیان بالاتر IL-10 در PBMCs فعال شده با لیپو پلی ساکارید نیز همراه بوده است(۱۲). سطوح افزایش یافته IL-10 در این مطالعه، می‌تواند بیان MHC کلاس II را سرکوب کند، مانع از تولید سایتوکاین‌ها توسط ماکروفاژها شود و پاسخ‌های ایمنی را به الگوی Th2 ترویج نماید(۱۳). در این مطالعه، در راستای حذف عوامل مداخله گر، افراد مورد بررسی دارو درمانی نشده و غیر باردار(۱) بودند. در نتیجه، بیان HLA-G و IL-10 در طی عفونت با HIV از تنظیم خارج شده و IL-10 می‌تواند به عنوان شاخص پیشرفت بیماری مورد توجه قرار گیرد.

تعداد کم بیماران وعدم بررسی پلی مورفیسم از محدودیت‌های این تحقیق بوده است. بنابراین، تحقیقات بعدی در جمعیت بزرگ‌تری از بیماران به همراه ژنوتایپینگ می‌تواند در بررسی نقش بارزتر HLA-G در بیماران HIV^+ و اهداف درمانی کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان نامه خانم ورسا عمرانی نوا به شماره ۱۲۲۰-۹۳ بوده است. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Abediankenari S, Farzad F, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB. HLA-G5 and G7 Isoforms in Pregnant Women. Iran J Allergy Asthma Immunol 2015; 14(2): 217-221.
2. Shobeiri SS, Abediankenari S, Rahmani Z , Hossein Nataj H, Azadeh H . Evaluation of NK cell level and HLA-G1 expression in peripheral blood in threatened-abortion. Tehran Univ Med J 2015; 73(2): 93-100.
3. Hassannia H, Abediankenari S, Ghaffari J. FOXP3 and TGF-β gene polymorphisms in allergic rhinitis. Iran J Immunol 2011; 8(4): 218-25.
4. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+ T cells proliferation. Iran Biomed J 2011; 15(1-2): 1-5.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:37 IRST on Tuesday December 27th 2016

5. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol 2008; 180(9): 5771-5777.
6. Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. AIDS 2002; 16(3): 347-351.
7. Abediankenari s , Ghasemi M. Generation of immune inhibitory dendritic cell and $CD4^+$ T regulatory cell inducing by TGF- β. Iran J Allergy Asthma Immunol 2009; 8(1): 25-30.
8. Shobeiri SS, Rahmani Z, Hossein Nataj H, Ranjbaran H, Mohammadi M, Abediankenari S. Uterine Natural Killer Cell and Human Leukocyte Antigen-G1 and Human Leukocyte Antigen-G5 Expression in Vaginal Discharge of Threatened-Abortion Women: A Case-Control Study. J Immunol Res 2015; 2015: 6.
9. Derrien M, Pizzato N, Dolcini G, Menu E, Chaouat G, Lenfant F, et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. J Gen Virol 2004; 85(Pt 7): 1945-1954.
10. Cabello A, Rivero A, Garcia MJ, Lozano JM, Torre-Cisneros J, Gonzalez R, et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. Hum Immunol 2003; 64(11): 1045-1049.
11. Lajoie J, Massinga Loembe M, Poudrier J, Guedou F, Pepin J, Labbe AC, et al. Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. Hum Immunol 2010; 71(2): 182-185.
12. Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, et al. The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. Immunogenetics 2005; 57(3-4): 172-181.
13. Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. Immunity 1997; 7(6): 861-871.

Archive of SID

www.SID.ir