

بررسی نقش $TNF-\alpha$ در تغییر الگوی بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی

مزاننشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

رزیتا ضیایی^۱، مریم آیت الهی^۲، رامین یعقوبی^۳، زینب صحرائیان^۴، نصرت الله ضرغامی^۵

۱- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، شعبه بین الملل ارس. جلفا، ایران.

۲- دانشیار، دانشگاه علوم و پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز، ایران.
ayatollmb@yahoo.com.

۳- دانشیار، دانشگاه علوم و پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز، ایران.
۴- مربی گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۵- استاد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده علوم نوین، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

چکیده

مقدمه و هدف: مهاجرت و جایگزینی سلول در پیوند سلول مهم است و گیرنده CXCR4 نقش کلیدی در این فرآیند دارد. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) قادر به بیان CXCR4 نیستند اما تحریک آن ها با سایتوکاین های التهابی نظیر $TNF-\alpha$ میزان بیان CXCR4 را افزایش می دهد. در این مطالعه میزان تغییر بیان CXCR4 در MSCs مغز استخوان انسان تحت تاثیر سایتوکاین التهابی $TNF-\alpha$ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: MSCs مورد مطالعه به دو گروه مورد و شاهد تقسیم شدند. گروه شاهد سلول های تیمار نشده و گروه های مورد، سلول های تیمار شده با $TNF-\alpha$ با غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ ng/ml در زمان های ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. سپس mRNA ی سلول ها استخراج و cDNA آن ساخته و میزان بیان ژن CXCR4 با روش Real Time PCR بررسی گردید. ژن کنترل خانگی، بتا اکتینین بود. نهایتاً تغییر بیان در سلول های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از روش لیواک ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: در MSCs تیمار شده با $TNF-\alpha$ ۱ ng/ml در زمان های ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان بیان به ترتیب: ۳۲، ۶۴، ۲۵۶ و ۳۲ برابر و در تیمار با ۱۰ ng/ml در زمان های مشابه، به ترتیب: ۱۶، ۳۲، ۵۱۲ و ۳۲ برابر شد. بیشترین میزان بیان ژن CXCR4 در مجاورت با $TNF-\alpha$ در مدت زمان ۲۴ ساعت و در غلظت ۱۰ ng/ml مشاهده گردید.

نتیجه گیری: به نظر می رسد هم عامل زمان و هم غلظت $TNF-\alpha$ در بیان ژن CXCR4 در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان موثر است ولی زمان عامل مهم تری در تغییر بیان ژن CXCR4 در این سلول هاست.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، گیرنده کموکائینی CXCR4، فاکتور نکروز دهنده تومور α ، الگوی بیان ژن.

مقدمه

سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بنیادی غیر خون ساز هستند که در مغز استخوان و سایر بافت ها مانند بافت چربی، خون بندناف و پرزهای کوریونی جفت ساکن می باشند (۱۲، ۱۵، ۳۲). منبع اصلی سلول های بنیادی مزانشیمی در بزرگسالان مغز استخوان است. جمعیت این سلول ها در مغز استخوان معادل ۰/۰۱-۰/۰۱ درصد از سلول های تک هسته ای می باشند

(۲۶). سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند سلول

هایی نظیر خود را تولید کنند (self-renew) و به انواع مختلف سلول ها با منشا مزودرمی و غیر مزودرمی شامل استئوبلاست، سلول های غضروفی، سلول های چربی، سلول های اندوتلیال، قلب، سلول های کبدی و سلول های عصبی متمایز شوند (۲۳). توان سلول های بنیادی مزانشیمی در تکثیر و تمایز به بافت های مختلف، سبب شده که منبع مناسبی برای آزمایشات

گردد(۷). مطالعات اخیر مشخص نموده که سایتوکاین های التهابی مانند IL-1B، TNF- α و برخی از مولکول های چسبنده مانند CD44، اینترگرین $\alpha 4\beta 1$ و گیرنده های کموکاینی از جمله CXCR4 و لیگاند آن SDF-1 یا CXCL12 اجزای اساسی مهاجرت سلول ها به محل التهاب هستند(۳۵، ۲۸، ۱۹، ۵). کموکاین ها و گیرنده های آن ها عوامل مهمی هستند که به تنظیم مهاجرت سلولی کمک می کنند(۷). در میان کموکاین ها، SDF-1 نقش مهمی در مهاجرت و Homing سلول های بنیادی بازی می کند(۱۹). در مطالعات متعدد گزارش شده است که سلول های بنیادی مزانشیمی در پاسخ به CXCL12 یا SDF-1 مهاجرت می کنند(۲۹، ۱۶، ۵). CXCL12 تنها لیگاند شناخته شده گیرنده کموکاینی CXCR4 است که یک گیرنده هفت ماریچی غشایی متصل به پروتئین G می باشد(۱۱). ریو و همکارانش(۲۸) در مطالعه ای گزارش کرده اند که مهاجرت سلول های بنیادی خون بندناف انسان توسط SDF-1/CXCR4 میانجی گری می شود. پونته و همکارانش(۲۷) نشان دادند که تحریک سلول های بنیادی با سایتوکاین التهابی TNF- α پاسخ به SDF-1 و قابلیت مهاجرت این سلول ها را افزایش می دهد. هم چنین مطالعه دیگری نشان داده است که TNF- α لانه-گزینی سلول های بنیادی مزانشیمی را افزایش می دهد(۳۰). بنابر مطالعات انجام گرفته، سایتوکاین های التهابی اثر متفاوتی بر روی بیان سایر سایتوکاین ها و خاصیت مهاجرت سلول های بنیادی مزانشیمی می گذارند(۱۴، ۱۰). هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر سایتوکاین های التهابی TNF- α بر الگوی بیان ژن گیرنده کموکاینی CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان است.

مواد و روش ها

جدا سازی و کشت سلول های بنیادی انسانی

بالینی سلول درمانی و هم چنین استفاده در ترمیم و بازسازی انواع مختلف بافت به حساب آیند(۳۱، ۵، ۱). از نظر فنوتیپی سلول های بنیادی مزانشیمی تعدادی مارکرهای سلولی را بیان می نمایند که هیچ یک مارکر اختصاصی این سلول ها نمی باشند. این سلول ها مارکرهای سلول های بنیادی هماتوپویتیک از جمله CD45، CD34، CD14 و CD11 را بیان نمی کنند و در مقابل برخی مولکول های چسبنده نظیر CD105، CD90، CD44، (SH2)، CD73 (SH3 / 4، (Thy-1)، CD71، Stro-1، CD106 (VCAM-1)، CD116، ICAM-1، (ALCAM) و CD29 را بیان می کنند(۲۲، ۷). اخیراً GD2، CD271 و CD200 به عنوان مارکرهای خاص سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان شناخته شده اند(۳۳، ۲۰، ۹، ۶). جداسازی آسان، توانایی تمایز به چندین نوع سلول، شرکت در واکنش های سیستم ایمنی و عدم وجود مسایل اخلاقی مزایایی هستند که توجه دانشمندان را به استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی در پزشکی ترمیمی جلب کرده است(۱۹). از سوی دیگر، یک ویژگی کلیدی و بسیار مهم سلول های بنیادی برای شرکت در ترمیم بافت، توانایی مهاجرت به بافت های آسیب دیده هم در شرایط آزمایشگاهی و در داخل بدن است(۲۷، ۲۵، ۱۶). بر اساس شواهد موجود سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند در بافت ها به ویژه بافت های آسیب دیده یا ملتهب ساکن شوند. مکانیسم فرآیند Homing سلول های بنیادی مزانشیمی به بافت و گذر از اندوتلیوم به طور کامل شناخته نشده است، اما به نظر می رسد که بافت های آسیب دیده، گیرنده ها و یا لیگاندهای خاصی را بیان می نمایند که فرآیند مهاجرت و Homing سلول های بنیادی مزانشیمی را به محل جراحت تسهیل نموده و احتمالاً فرآیندی شبیه به مهاجرت لوکوسیت ها به بافت های ملتهب موجب می-

می‌گردید. نهایتاً استئوژنزیز توسط رنگ آمیزی آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تمایز به بافت چربی، سلول‌های پاساژ چهار به مدت ۳ هفته در محیط کشت آدیپوژنیک قرار گرفتند. محیط کشت آدیپوژنیک شامل ۱mmol/L هیدروکورتیزون، ۰/۰۵gr/L اسید اسکوربیک، ۰/۰۵gr/L ایندومتاسین و ۱۰mol/L-۶ دگزامتازون بود. تعویض محیط کشت ۲ بار در هفته انجام شد. سپس آدیپوژنزیز توسط رنگ آمیزی Oil Red O مورد بررسی قرار گرفت.

فلوسایتومتری

با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، سلول‌های بنیادی شناسایی شدند. برای این کار از سلول‌های پاساژ سوم با تراکم بیش از ۸۰ درصد استفاده شد. ابتدا سلول‌ها تریپسینه و سپس سانتریفیوژ گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. مرحله شستشو و سانتریفیوژ مجدداً تکرار گردید. سپس سلول‌ها با ایزو تیوسیانات فلورسنت (FITC) متصل به آنتی بادی‌های CD45، CD11b، CD34، CD31، CD105، CD166 نشان‌دار و به مدت ۳۰ دقیقه به همراه نمونه کنترل در محیط تاریک قرار داده شدند. سلول‌های نشان‌دار کاملاً با بافر شستشو داده و سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی با پارافرم آلدئید ۴ درصد تثبیت و در دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. از آنتی بادی‌های ایزوتایپ کنترل به منظور حذف واکنش‌های غیر اختصاصی استفاده شد (۲۹).

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ چهارم با تراکم 5×10^3 Cells/mL در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم، با 10 ng/ml و 1 ng/ml TNF- α در زمان‌های ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند (۱۸). پس از گذشت مدت زمان‌های در نظر گرفته شده، سلول‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی پس از اخذ رضایت نامه، از استخوان لگن افراد دهنده سالم در محدوده سنی ۱۹-۴۵ سال در بیمارستان نمازی شیراز اسپیره و به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات پیوند اعضا منتقل گردید. هر نمونه با ۱۰۰۰mg/L محیط کشت DMEM به نسبت ۱:۱ رقیق شد سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول از سایر لایه‌ها جدا شد. سپس محیط کشت اضافه و سانتریفیوژ گردید. سوپانسیون حاصل در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم FBS در فلاسک T25 به طور یکنواخت کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. پس از ۷ روز با چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، محیط کشت عوض و سلول‌های غیر چسبنده جدا گردید. پس از آن هر ۳-۴ روز با محلول شستشوی PBS (phosphate buffer salin)، شستشو و تعویض می‌شد. پس از ۱۴ روز که سلول‌ها به تراکم لازم (۷۰-۸۰ درصد) رسیدند اولین پاساژ انجام شد. برای پاساژ سلولی ابتدا محیط کشت دور ریخته و سلول‌ها با محلول شستشو، شستشو داده، سپس به سلول‌ها تریپسین اضافه و مدتی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شدند. سلول‌های جدا شده از کف ظرف جمع‌آوری و به فلاسک‌های محتوی محیط کشت تازه منتقل و هر ۴-۵ روز پاساژهای متوالی تا ۴ پاساژ انجام گردید.

تمایز به بافت چربی و استخوان

به منظور بررسی توان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت استخوانی و بافت چربی از سلول‌های پاساژ ۴ استفاده شد (۲۹). سلول‌ها به مدت ۳ هفته در محیط کشت استئوژنیک قرار داده شدند. این محیط حاوی 10 mol/L -۸ دگزامتازون، ۱۰ mmol/L گلیسرول فسفات، ۳/۷ gr/L بی‌کربنات سدیم، ۰/۰۵ gr/L اسید اسکوربیک بود. ۲ بار در هفته محیط کشت تعویض

دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ و فاز آبی جدا و ۱۰۰۰ μ L ایزوپروپانول سرد به آن افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ۲۴ ساعت نگهداری گردید. بعد از این مدت نمونه ها سانتیفریوژ شدند. پس از تخلیه محلول درون میکروتیوپ ها، ۱۰۰۰ μ L اتانول سرد به آن ها اضافه و با دور ۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه سانتیفریوژ شدند. پس از آن ۱۳ μ L آب DEPC به آن افزوده و مخلوط گردید. سنتز cDNA از mRNA استخراج شده با استفاده از ترکیبی شامل: ۱ μ L پرایمر رندوم هگزامر، ۱ μ L dNTPs، ۱ μ L آنزیم نسخه بردار معکوس M-Mulv (Moloney Murine Leukemia Virus)، ۰/۶۵ μ L مهار کننده ریبونوکلاز، ۷/۳ μ L آب مقطر، ۲ μ L بافر و ۱۰ μ L mRNA با حجم نهایی ۲۳ μ L صورت گرفت.

Real Time- PCR

ابتدا پرایمرهای ژن CXCR4 و ژن بتا اکتین با استفاده از نرم افزارهای Blast از NCBI و اولیگو نسخه ۶ طراحی و با غلظت ۵ پیکومول در فرآیند PCR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱ - مشخصات پرایمر های ژن CXCR4 و بتا اکتین

ژن	پرایمر جلوبرنده	پرایمر معکوس
CXCR4	5'-GGA CCT GTG GCC AAG TTC TTA GTT-3'	5'-ACT GTA GGT GCT GAA ATC AACCCA-3'
بتا اکتین	5'-GGG CGG CAC CACCAT GTA CC-3'	5'-GAC GAT GGA GGG GCC CGA CT-3'

ترموسایکلر جهت انجام RT-PCR برای ژن CXCR4 عبارت بود از: دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ثانویه ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال و طویل سازی ۲۰ ثانیه ۶۳ درجه سانتی گراد در ۴۰ سیکل. برنامه دستگاه برای ژن بتا اکتین شامل دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ثانویه ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال و طویل سازی ۲۰ ثانیه ۶۵ درجه سانتی گراد در ۴۰ سیکل بود.

جمع آوری و برای انجام مرحله آزمایش مولکولی جهت تعیین میزان بیان ژن CXCR4 با تکنیک Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. میزان بیان ژن CXCR4 در سلول های تیمار شده و تیمار نشده و هم-چنین، تفاوت در سطح بیان CXCR4 در گروه های مختلف سلولی که تحت تیمار با TNF- α در دوز و زمان های مختلف قرار گرفته بودند، مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز الگوی بیان ژن CXCR4

استخراج mRNA و سنتز cDNA

جهت بررسی سطح بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با TNF- α ، از سلول های پاساژ چهارم استفاده شد. در ابتدا مقدار ۵۰۰ μ L بافر شستشو (PBS) به سلول های بنیادی مزانشیمی اضافه شد. با استفاده از کیت استخراج RNX Plus (سینا ژن) و بر اساس دستورالعمل mRNA نمونه سلولی استخراج گردید. روش کار به این شرح بود: مقدار ۱۰۰۰ μ L RNX Plus به ۱۰۰ μ L سوسپانسیون سلولی اضافه و مخلوط شد. به مخلوط حاصل مقدار ۵۰ μ L کلروفورم سرد اضافه گردید و با دور ۱۴۰۰۰ در

با استفاده از روش سایبرگرین بیان ژن CXCR4 و بتا اکتین بررسی شد. ترکیب PCR استفاده شده جهت بررسی میزان بیان ژن CXCR4 به این شرح بود: ۰/۴ μ L رنگ، ۱۰/۸ μ L آب مقطر، ۰/۴ μ L پرایمر جلوبرنده و ۰/۴ μ L پرایمر معکوس، ۲ μ L cDNA و ۶ μ L پره میکس و ترکیب PCR برای بررسی بیان ژن بتا اکتین شامل ۰/۴ μ L رنگ، ۶/۸ μ L آب مقطر، ۰/۴ μ L پرایمر جلو برنده و ۰/۴ μ L پرایمر معکوس، ۲ μ L cDNA و ۱۰ μ L پره میکس بود. برنامه دستگاه

شدند و بعد ۱۵ روز یک لایه چسبنده به دست آمد (شکل ۱-الف). پس از مدتی کلتی های فیروبلاست تشکیل شده و کف ظرف را پوشاندند (شکل ۱-ب). سلول های مغز استخوان به سرعت یک لایه سلول های باریک و فیروبلاست شکل تولید می کنند. این سلول ها شامل دو نوع سلول هستند: ۱- سلول های بزرگ و مسطح، ۲- نوع سلول های دوکی شکل و کوچک تر (شکل ۱-ج). با گذشت زمان اندازه سلول ها افزایش یافته و به سلول های چند ضلعی با فیلامنت های مشخص در سیتوپلاسم تبدیل شدند و در طی دوره رشد ظاهر فیروبلاست مانند خود را حفظ کردند.

تحلیل آماری

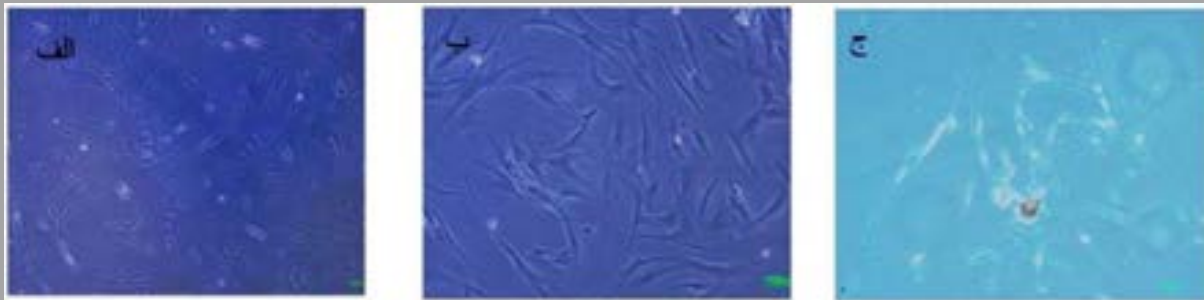
با استفاده از روش Real Time PCR برای هر نمونه یک Ct (Cycle threshold) به دست آمد. Ct به دست آمده از نمونه ها به همراه Ct به دست آمده برای ژن بتاآکتین توسط فرمول زیر آنالیز شد.

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{(\text{experimental})} &= Ct_{(\text{Treated MSCs})} - Ct_{(\beta\text{-Actin})} \\ \Delta Ct_{(\text{control})} &= Ct_{(\text{Untreated MSCs})} - Ct_{(\beta\text{-Actin})} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{(\text{experimental})} - \Delta Ct_{(\text{control})} \\ r &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

نتایج

نتایج کشت سلولی

به کمک میکروسکوپ معکوس سلول های روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از گذشت ۳ روز از کشت اولیه، سلول های چسبنده در کف ظرف نمایان



شکل ۱- جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان. الف: پس از ۲-۶ تا هفت روز لایه چسبنده، ب: ظاهر شدن سلول های فیروبلاست مانند، ج: در ادامه کشت هر دو نوع سلول دوک مانند و سلول های پهن دیده شدند. مقیاس ۱۰۰um.

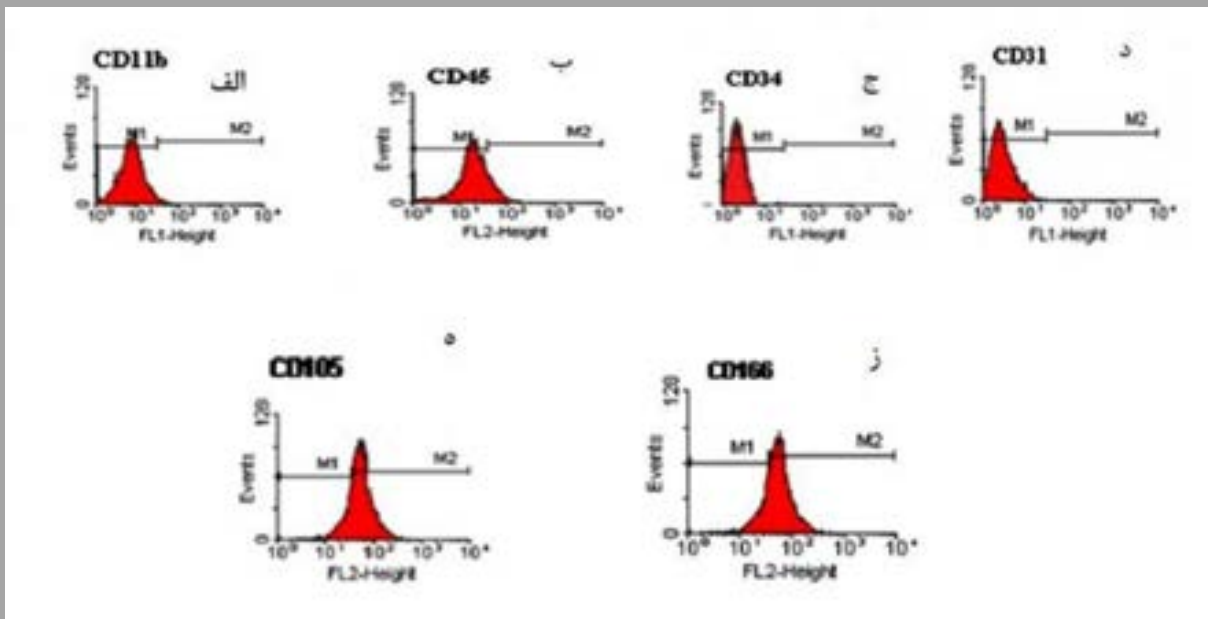
ارزیابی قابلیت زنده ماندن

در هر پاساژ، سلول ها شمارش شد و تعداد سلول های زنده توسط رنگ آمیزی تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفتند که بین ۹۸ و ۱۰۰ درصد نمونه ها زنده بودند.

تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری

نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان نسبت به بیان مارکر CD31، CD34، CD45، CD11b منفی هستند

(نمودار ۲الف-د). در حالی که نسبت به بیان مارکر CD105 و CD166 انسانی مثبت بودند (نمودار ۲-ه، ز). نتایج به دست آمده وجود سلول های بنیادی مزانشیمی را اثبات کرد. تجزیه و تحلیل نتایج فلوسایتومتری بر اساس نقطه برخورد نمودار ایزوتایپ با نمودار آنتی بادی اختصاصی صورت گرفت.

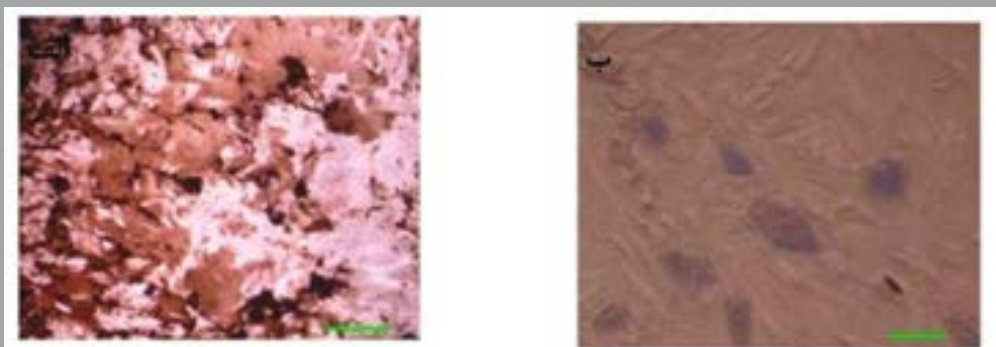


نمودار ۲- بررسی CD مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان نتایج برای CD11b، CD45، CD34، CD31، منفی و برای CD105 و CD166 انسانی مثبت بود.

نتایج تمایز استخوان و چربی

(شکل ۲-الف). برای تمایز سلول ها به چربی، سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت آدیپوژنیک انکوبه شدند. پس از ۳ هفته تجمع واکوئل های غنی از چربی در سلول ها دیده شد. در نهایت واکوئل های چربی ترکیب شدند و سلول پر از چربی شد (شکل ۲-ب).

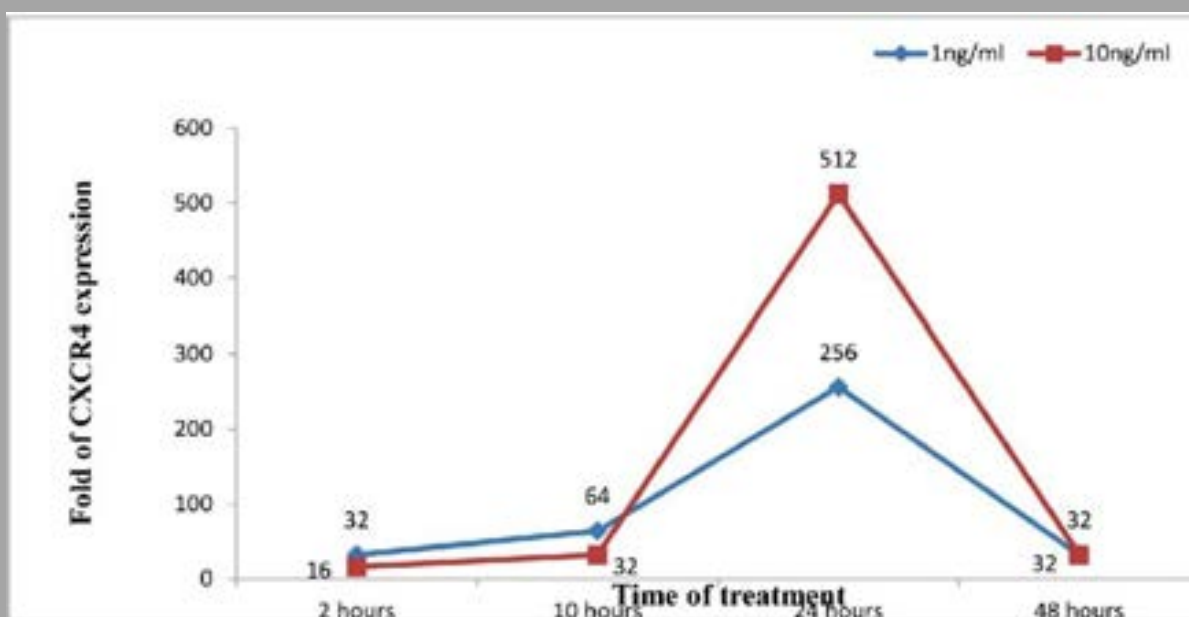
تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست ها در شرایط آزمایشگاهی با انکوبه کردن سلول های بنیادی تک لایه با محیط کشت استئوژنیک به مدت ۲-۳ هفته صورت گرفت. در سلول های بنیادی تجمع کلسیم در طول زمان دیده می شد. رنگ آمیزی آلیزارین رد وجود رسوب کلسیم در استئوسیت ها را تایید کرد



شکل ۳: تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان انسان در محیط آزمایشگاه. ت مایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استخوان و چربی بعد از پاساژ چهارم انجام شد. تمایز به استخوان با رنگ آمیزی آلیزارین رد مثبت بود (الف). قطره های چربی در سلول تمایز یافته (ب). مقیاس ۵۰ μm .

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مولکولی، بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با $TNF-\alpha$ با یکدیگر متفاوت بود. سطح بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده کمتر از همه گروه های تیمار شده در این مطالعه بود. مقایسه میزان بیان ژن CXCR4 در گروه های تیمار شده نشان داد که در هر دو دوز $TNF-\alpha$ (۱ ng/ml و ۱۰ ng/ml) مقدار $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت افزایش زیادی داشت به ترتیب: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 256$ و $2^{-\Delta\Delta Ct} = 512$. از طرف دیگر، در مقایسه کل نتایج، مشاهده شد که بالاترین سطح بیان ژن CXCR4 در تیمار با ۱۰ ng/ml $TNF-\alpha$ در ۲۴ ساعت، اتفاق می افتد ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 512$) (نمودار ۲) (جدول ۲).

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مولکولی، بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با $TNF-\alpha$ با یکدیگر متفاوت بود. سطح بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده کمتر از همه گروه های تیمار شده در این مطالعه بود. مقایسه میزان بیان ژن CXCR4 در گروه های تیمار شده نشان داد که در هر دو دوز $TNF-\alpha$ (۱ ng/ml و ۱۰ ng/ml) مقدار $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت افزایش زیادی داشت به ترتیب: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 256$ و $2^{-\Delta\Delta Ct} = 512$. از طرف دیگر، در مقایسه کل نتایج، مشاهده شد که بالاترین سطح بیان ژن CXCR4 در تیمار با ۱۰ ng/ml $TNF-\alpha$ در ۲۴ ساعت، اتفاق می افتد ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 512$) (نمودار ۲) (جدول ۲).



نمودار ۲-مقایسه غلظت $TNF-\alpha$ بر بیان ژن CXCR4 در سلول های تیمار شده

در سلول های بنیادی مزانشیمی هم مقدار ۱ ng/ml و هم ۱۰ ng/ml $TNF-\alpha$ بیان CXCR4 را در سطح mRNA افزایش داد، اما در $TNF-\alpha$ ۱۰ ng/ml در ساعت بیان CXCR4 را بیش از مقدار ۱ ng/ml، تا دو برابر افزایش داد.

بحث و نتیجه گیری

امروزه مکانیسم homing سلول های بنیادی هماتو-پویتییک به مغز استخوان و تنظیم کننده های کلیدی این فرآیند شناخته شده است، اما در مورد فرآیند homing و لانه گزینی (engraftment) سلول های بنیادی مزانشیمی اطلاعات کم و بحث برانگیزی وجود دارد (۵،۳۱). مطالعات متعددی که بر روی مهاجرت سلول های بنیادی مزانشیمی به محل آسیب و یا محل التهاب انجام گرفته به عوامل کموتاکسیک که توسط سلول های ایمنی تولید می شود متمرکز شده و توجه داشته

اند. بر اساس یافته ها سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی به برخی از فاکتور ها مانند VEGF، PDGF، IGF-1، IL-8، پروتئین مورفوژنیک استخوان (BMP-4) و BMP-7) پاسخ کموتاکسی ویژه ای می دهند (۵،۱۷،۲۹). هر چند مکانیسم مهاجرت و homing این سلول ها هنوز به درستی شناخته نشده است. به نظر می رسد که فرآیند مهاجرت و homing سلول های بنیادی مزانشیمی شبیه به لوکوسیت ها در سه مرحله tethering، rolling و transmigration اتفاق می افتد، اما هر دو

فرآیند در مولکول های درگیر روند مهاجرت با یک- دیگر تفاوت دارند. به عنوان مثال سلول های بنیادی مزانشیمی آنزیم فوکوزیل ترانسفراز ۴ و ۷ را بیان نمی- کنند و به همین دلیل از گیرنده های سلکتین E و P به عنوان مکانیسم tethering نمی توانند استفاده کنند و به جای آن ها از مولکول های چسبنده دیگر نظیر CD44، VLA-4 و VCAM استفاده می کنند(۱۷).

جدول ۲- نتیجه آزمایش در گروه شاهد و ۸ گروه مورد آزمایش

TNF- α بیان ژن CXCR4 را در سلول های مزانشیمی وابسته به زمان انکوباسیون و دوز TNF- α افزایش می دهد. ۱ ng/ml TNF- α در مدت زمان ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان ژن CXCR4 را به ترتیب ۳۲، ۶۴، ۲۵۶، ۳۲ برابر در مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده افزایش داد. ۱۰ ng/ml TNF- α در مدت زمان ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان ژن CXCR4 را به ترتیب ۱۶، ۳۲، ۵۱۲ و ۳۲ برابر در مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده افزایش داد.

وضعیت تیمار	Ct CXCR4	Ct β -actin	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
۱-۲ ساعت ng/ml	۳۲	۲۲	۱۰	۵	۳۲
۱-۱۰ ساعت ng/ml	۲۹	۲۰	۹	۶	۶۴
۱-۲۴ ساعت ng/ml	۲۷	۲۰	۷	۸	۲۵۶
۱-۴۸ ساعت ng/ml	۳۲	۲۲	۱۰	۵	۳۲
۱۰-۲ ساعت ng/ml	۲۹	۲۰	۱۱	۴	۱۶
۱۰-۱۰ ساعت ng/ml	۲۹	۱۹	۱۰	۵	۳۲
۱۰-۲۴ ساعت ng/ml	۲۶	۲۲	۶	۹	۵۱۲
۱۰-۴۸ ساعت ng/ml	۳۲	۲۲	۱۰	۵	۳۲
سلول های بدون تیمار	۳۷	۲۲	۱۵	-	-

مهاجرت و لانه گزینی دارد. در سلول های بنیادی مزانشیمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت مشاهدات مشخص نمود که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان CXCR4 را بسیار کم بیان می کنند. این نتیجه در مطالعات دیگر نیز تایید شده است. وین و همکاران (۳۴)، گزارش کرده اند که بخش کوچکی از

از طرف دیگر سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بزرگی هستند که در بستر مویرگ ها به جا می مانند و این خصلت به آن ها اجازه می دهد که در پاسخ به شیب کموکاینی از غشا اندوتلیال عروق عبور کرده و وارد بافت شوند(۵). در این مطالعه، الگوی تغییر بیان ژن گیرنده کموکاینی CXCR4 که نقش مهمی در

CXCR4 در سلول های سرطان معده که توسط TNF- α القا شده اند افزایش می یابد. هم چنین لموری (۸)، نشان داد که γ -IFN و β -1-IFN کموکاین ها و گیرنده های کموکاینی را در سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی به سمت افزایش بیان تنظیم می کنند. اوه و همکارانش (۲۴)، مشاهده کردند که بیان CXCR4 در سلول های آستروگلیوما انسانی تیمار شده با TNF- α و β -1-IL افزایش می یابد. هرچند مشاهده شده است که TNF- α بیان گیرنده کموکاینی را در بعضی از انواع سلول ها کاهش می دهد. آساگو و همکاران (۲)، مشاهده کردند که TNF- α بیان CXCR2 در لوکوسیت های پلی مورفونوکلئور کاهش می دهد. هان و همکارانش (۱۳)، نشان دادند که TNF- α بیان CXCR4 را در آستروسیت های اولیه موش کاهش می دهد. الگوی بیان ژن در سلول های بنیادی مزانشیمی همانند آستروسیت ها، لوکوسیت ها و سلول های سرطانی، تحت تاثیر دوزهای مختلف سایتوکاین و ریز فاکتورهای محیطی تغییر می یابد. این عوامل می توانند باعث پیشرفت آبشار سیگنالی سایتوکاین ها در سلول شوند که بر الگوی بیان ژن موثر خواهد بود و ژن های مختلف از جمله کموکاین ها، گیرنده های کموکاینی و مولکول های چسبنده را از طریق تاثیر بر فاکتورهای رونویسی تنظیم می کنند (۳۶، ۲۷، ۱۸، ۱۳). پیش از مطالعه حاضر، کولب و همکارانش (۱۸)، سلول های سرطان تخمدان را با ۱ ng/ml، ۱۰ ng/ml و ۱۰۰ ng/ml TNF- α در زمان های متفاوت انکوباسیون تیمار و مشخص گردید که بیشترین میزان بیان CXCR4 در ۱۰۰ ng/ml TNF- α و مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت رخ داده است. هم چنین نشان دادند که بین فاکتور رونویسی NF- κ B و TNF- α و بیان CXCR4 ارتباطی وجود دارد. در این مطالعه، نشان داده شد که TNF- α می تواند بیان CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی CXCR4 را بیان و مهاجرت این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی کمک می کند. در این مطالعه نشان داده شد که کمتر از ۱٪ از سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی CXCR4 را بیان می کنند. این یافته در مطالعه دیگری که توسط احمدیان کیا و همکارانش (۱)، تایید گردید، آن ها نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان ژن CXCR4 و CXCR6 را در سطح mRNA کم و یا غیر قابل تشخیص بیان می کنند. از طرف دیگر Sordi و همکارانش (۳۱)، نشان دادند که ۲۶٪ از سلول های بنیادی مغز استخوان انسان CXCR4 را بیان می کنند. بنابراین به نظر می رسد که میزان بیان گیرنده های کموکاینی در سلول های بنیادی مزانشیمی بحث برانگیز است (۳۱، ۲۷، ۱). با توجه به نقش مهم لیگاند و گیرنده SDF-1/CXCR4 در مهاجرت و لانه گزینی سلولی، بیان بالای گیرنده کموکاینی CXCR4 در سلول ها توانایی مهاجرت و لانه گزینی آن ها را برای کاربرد های بالینی افزایش و می تواند یک استراتژی برای بالا بردن پتانسیل سلول ها در سلول درمانی باشد. از سوی دیگر، سایتوکاین های التهابی و کموکاین های مختلفی در بخش آسیب دیده وجود دارد که می تواند باعث ایجاد و هدایت حرکت سلول های بنیادی مزانشیمی به بافت های آسیب دیده و ملتهب شود (۲۷). این سایتوکاین ها می توانند بیان ژن را در سلول های مختلف بسته به نوع و مرحله تمایز سلول تنظیم کنند (۱۳). TNF- α یک سایتوکاین التهابی است که می تواند هم بیان ژن در سلول و هم بیان مولکول های درگیر در فرآیند مهاجرت را تحت تاثیر قرار دهد (۳۰، ۲۷). اخیراً ثابت شده است که بیان ژن CXCR4 در سلول هایی که با سایتوکاین های کوکتایل نظیر HGF، FLT-3 لیگاند و SDF تیمار شده اند افزایش می یابد (۲۹). ژائو و همکاران (۳۶)، نشان دادند که بیان

دوز و هم از نظر زمان در آزمایشگاه می تواند در قابلیت مهاجرت سلول های بنیادی مزانشیمی و پیرو آن در استفاده از سلول های بنیادی در درمان های بر پایه پیوند سلول مهم باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از دکتر مهدخت حسین عقدایی برای همکاری در تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری، و هم چنین با تشکر از دکتر نسرین شکرپور در مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان نمازی برای همکاری در تنظیم مقاله.

1. Ahmadian Kia, N., Bahrami, AR., Ebrahimi, M., Matin, MM., Neshati, Z., Almohaddesin, MR. (2011). Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. *J Mol Neurosci*, 44; 178-85.
2. Asagoe, K., Yamamoto, K., Takahashi, A., Suzuki, K., Maeda, A., Takano, K. (1998-2012). Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by $TNF-\alpha$. *J Immunol*, 160; 4518-4525.
3. Ayatollahi, M., Soleimani, M., Geramizadeh, B., Imanieh, M.H. (2011). Insulin-like growth factor1 (IGF-I) improves hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 35; 1169-76.
4. Ayatollahi, M., Soleimani, M., Geramizadeh, B. (2012). Conditions to improve expansion of human marrow-derived mesenchymal stem cells based on the rat samples. *World J Stem Cells*, 26(4); 1-8.
5. Brooke, G., Tong, T., Levesque, J.P., Atkinson, K. (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells and Development*, 17; 929-940.
6. Bühring, HJ., Battula, VL., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., Vogel, W. (2007). Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci*, 1106; 262-271.
7. Chamberrlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells their phenotype,

مشتق از مغز استخوان انسان وابسته به زمان و دوز افزایش دهد. $TNF-\alpha$ در هر دو دوز ng/ml ۱۰ افزایش می تواند بیان CXCR4 را در سطح mRNA افزایش دهد. بالاترین سطح بیان ژن CXCR4 در مقدار $10\ ng/ml$ $TNF-\alpha$ بود که بیان CXCR4 تا دو برابر بیش از $1\ ng/ml$ $TNF-\alpha$ افزایش داد. یافته های به دست آمده نشان داد که زمان مطلوب تیمار با $TNF-\alpha$ برای افزایش بیان CXCR4، ۲۴ ساعت بود. این یافته ها نشان می دهد که کنترل عوامل محیطی هم از نظر

منابع

- differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25; 2739-2749.
8. Croitoru-Lamoury, J., Lamoury, FM., Zaunders, JJ., Veas, LA., Brew, BJ. (2007). Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J Interferon Cytokine Res*, 27; 53-64.
 9. Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111; 2631-2635.
 10. Fu, X., Han, B., Cai, S., Lei, Y., Sun, T., Sheng, Z. (2009). Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing. *Wound Repair Regen*, 17; 185-91.
 11. Gangadhar, T., Nandi, S., Salgia, R. (2010). The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer Biol Ther*, 9; 409-16.
 12. Gronthos, S., Franklin, DM., Leddy, HA., Robey, PG., Storms, RW., Gimble, JM. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189; 54-63.
 13. Han, Y., Wang, J., He, T., Ransohoff, RM. (2001). $TNF-\alpha$ down-regulates CXCR4 expression in primer murin astrocytes. *Brain Research*, 888; 1-10.
 14. Hameda, H., Jakob, M., Ludwig, AK., Giebel, B., Lang, S., Brandau, S. (2010). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-

alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 19; 693-706.

15. Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., Takashi, TA. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy*, 6; 543-53.

16. Ji, JF., He, BP., Dheen, ST., Tay, SS. (2004). Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*, 22; 415-27.

17. Kollar, K., Cook, MM., Atkinson, K., Brooke, G. (2009). Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *International Journal of Cell Biology*, Volume 2009, Article ID 904682, 8 pages.

18. Kulbe, K., Hagemann, T., Szlosarek, PW. (2005). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 65; 10355-10362.

19. Li, L., Jiang, J. (2011). Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured tissues and their signal transduction mechanisms. *Front Med*, 5; 33-9.

20. Martinez, C., Hofmann, TJ., Marino, R., Dominici, M., M. Horwitz, E. (2007). Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, 109; 4245-8.

21. Minguell, JJ., Erices, A., Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood), 226; 507-20.

22. Musia, RA., Bekchanova, ES., Sukhikh, GT. (2005). Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissue. *Bull Exp Biol Med*, 139; 504-9.

23. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., Silberstein, LE. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12; 126-131.

24. Oh, JW., Drabik, K., Kutsch, O., Choi, C., Tousson, A., Benveniste, EN. (2001). CXCR4 chemokine receptor 4 expression and function in human astrogloma cells. *The Journal of Immunology*, 166; 2695-2704.

25. Ortiz, LA., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., Phinney, DG. (2003). Mesenchymal stem cell

engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100; 8407-11.

26. Pittenger, MF., Mackay, AM., Beck, SC., Jaiswal, RK., Douglas, R., Mosca, JD. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284; 143-7.

27. Ponte, AL., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells*, 25; 1737-1745.

28. Ryu, CH., Park, SA., Kim, SM., Lim, JY., Jeong, CH., Jun, JA. (2010). Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 398; 105-10.

29. Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L. (2007). Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 92; 897-904.

30. Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20; 510-8.

31. Sordi, V., Malosio, ML., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106; 419-427.

32. Sylwia, B., Danuta, J., Marcin, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical application, 44; 215-30.

33. Ugo De, G., N. Cohen, E., Gao, H., Mego, M., Lee, BN., Lodhi, A. (2011). Mesenchymal stem cells expressing GD2 and CD271 correlate with breast cancer-initiating cells in bone marrow. *Cancer Biology & Therapy*, Landes Bioscience, 11; 812-815.

34. Wynn, RF., Hart, CA., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, CA., Wraith, JE. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly express functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104; 2643-2645.

35.Zhang, A., Wang, Y., Ye, Z., Xie, H., Zhou, L., Zheng, S. (2010). Mechanism of $TNF-\alpha$ -induced migration and hepatocyte growth factor production in human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 111; 469-75.

36.Zhao, C., Lu, X., Bu, X., Zhang, N., Wang, W. (2010). Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. *BMC Cancer*, 10; 419.

Archive of SID