جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۶، جلد ۷، شماره ۳، تابستان۹۳، صفحه ۱ تا ۱۲

بررسی نقش TNF-α در تغییر الگوی بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

رزیتا ضیایی[۱]، **مریم آیت اللهی**[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.

٤-مربی گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان. ایران.

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

تاریخ دریافت:۹۳/٤/۲۵ تاریخ پذیرش:۹۳/٦/۱۵

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-α میزان بیان CXCR4 را افزایش می دهد. در این مطالعه میزان تغییر بیان CXCR4 در MSCs مغز استخوان انسان تحت تاثیر سایتوکاین التهابی TNF-α 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-α با غلظت های ng/ml ۱و۱۰ در زمان های ۲، ۱۰، ۲٤ و ٤۸ 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 اکتین بود. نهایتاً تغییر بیان در سلول های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از روش لیواک ($۲^{-\Delta\Delta Ct}$) تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: در MSCs تیمار شده با TNF-α ۱ ng/ml در زمان‌های ۲، ۱۰، ۲٤ و ٤۸ ساعت میزان بیان به ترتیب:۳۲، ٦٤، ۲۵٦ و ۳۲ برابر و در تیمار با ۱۰ ng/ml در زمان های مشابه، به ترتیب: ۱٦، ۳۲، ۵۱۲ و ۳۲ برابر شد. بیشترین میزان بیان ژن CXCR4 در مجاورت با TNF-α در مدت زمان ۲٤ ساعت و در غلظت ۱۰ ng/mlمشاهده گردید.

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

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی،گیرنده کموکاینی CXCR4، فاکتور نکروز دهنده تومورα، 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 می‌باشند(۱۲،۱۵،۳۲). منبع اصلی سلول های بنیادی مزانشیمی در بزرگسالان مغز استخوان است. جمعیت این سلول ها در مغز استخوان معادل ۰/۰۱-۰/۰۰۱درصد از سلول های تک هسته ای می‌باشند (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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بالینی سلول درمانی و همچنین 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 می‌نمایند که هیچ یک مارکر اختصاصی این سلول ها نمی‌باشند. 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 (SH2)، CD44، CD90 (Thy-1)، CD73 (SH3 / 4، CD71، Stro - 1، CD106 (VCAM - 1)، CD116 (ALCAM)، ICAM-1 و CD29 را بیان می کنند (۷،۲۲). اخیراً GD2، CD271 و CD200 به عنوان مارکرهای خاص سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان شناخته شده اند (۶،۹،۲۰،۳۳). 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(۱۶،۲۵،۲۷). 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 می‌نمایند 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-گردد(۷). مطالعات اخیر مشخص نموده که سایتوکاین های التهابی مانند IL -1B، TNF- α و برخی از مولکول های چسبنده مانند CD44، اینتگرین α4β1 و گیرنده های کموکاینی از جمله CXCR4 و لیگاند آن SDF-1 یا CXCL 12 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 مارپیچی 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 میانجی‌گری 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(۱۰،۱۴). هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر سیتوکاین‌های التهابی TNF-α بر الگوی بیان ژن گیرنده کموکاینی CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان است.

مواد و روش‌ها

جدا سازی و کشت سلول های بنیادی انسانی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی پس از اخذ رضایت نامه، از استخوان لگن افراد دهنده سالم در محدوده سنی ۱۹-۴۵ سال در بیمارستان نمازی شیراز آسپیره و به آزمایشگاه سلول های بنیادی مرکز تحقیقات پیوند اعضا منتقل گردید. هر نمونه با ۱۰۰۰mg/L محیط کشت DMEM به نسبت ۱:۱ رقیق شد سلول های تک هسته ای با استفاده ازفایکول از سایر لایه ها جدا شد. سپس محیط کشت اضافه و سانتریفیوژ گردید. سوسپانسیون 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 دی اکسید کربن انکوبه شد. پس از ۷ روز با چسبیدن سلول ها به کف ظرف، محیط کشت عوض و سلول های غیر چسبنده جدا گردید. پس از آن هر ۴-۳ روز با محلول شستشوی PBS (phosphate buffer salin)، شستشو و تعویض می شد. پس از ۱۴ روز که سلول ها به تراکم لازم(۸۰-۷۰ درصد) رسیدند اولین پاساژ انجام شد. برای پاساژ سلولی ابتدا محیط کشت دور ریخته و سلول ها با محلول شستشو، شستشو داده، سپس به سلول ها تریپسین اضافه و مدتی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شدند. سلول های جدا شده از کف ظرف جمع آوری و به فلاسک های محتوی محیط کشت تازه منتقل و هر ۵-۴ روز پاساژهای متوالی تا ۴ پاساژ انجام گردید.

تمایز به بافت چربی و استخوان

به منظور بررسی توان تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به بافت استخوانی و بافت چربی از سلول های پاساژ۴ استفاده شد(۲۹). سلول ها به مدت ۳ هفته در محیط کشت استئوژنیک قرار داده شدند. این محیط حاوی ۱۰-۸ mol/L دگزامتازون، ۱۰ mmol/L گلیسرول فسفات، ۳/۷ gr/L بی کربنات سدیم ۰/۰۵ gr/L اسید اسکوربیک بود.۲ بار در هفته محیط کشت تعویض می‌گردید. نهایتاً استئوژنزیز توسط رنگ آمیزی آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تمایز به بافت چربی، سلول های پاساژ چهار به مدت ۳ هفته در محیط کشت آدیپوژنیک قرار گرفتند. محیط کشت آدیپوژنیک شامل ۱mmol/L هیدروکورتیزون، ۰/۰۵gr/L اسید اسکوربیک، ۰/۰۵ gr/L ایندومتاسین و ۱۰-۶mol/L 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، سلول های بنیادی شناسایی شدند. برای این کار از سلول های پاساژ سوم با تراکم بیش از ۸۰ درصد استفاده شد. ابتدا سلول ها تریپسینه و سپس سانتریفوژ گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. مرحله شستشو و سانتریفیوژ مجدداً تکرار گردید. سپس سلول ها با ایزو تیوسیانات فلورسنت (FITC) متصل به آنتی بادی های CD45، CD11b، CD34، CD31، CD105، CD166 نشان‌دار و به مدت ۳۰ دقیقه به همراه نمونه کنترل در محیط تاریک قرار داده شدند. سلول های 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 بادی های ایزوتایپ کنترل به منظور حذف واکنش های غیر اختصاصی استفاده شد(۲۹).

تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی پاساژ چهارم با تراکم 5×10^{3} Cells/mL در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم، با TNF - α در دوزهای ۱ng/mlو ۱۰ng/ml در زمان های ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند(۱۸). پس از گذشت مدت زمان های در نظرگرفته شده، سلول ها

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 قرارگرفت.

آنالیز الگوی بیان ژن CXCR4

استخراج mRNA و سنتز cDNA

جهت بررسی سطح بیان ژن CXCR4 درسلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با TNF - α، از سلول های پاساژ چهارم استفاده شد. در ابتدا مقدار ۵۰۰µL 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 ۱۰۰۰µL RNX Plus به ۱۰۰µL سوسپانسیون سلولی اضافه و مخلوط شد. به مخلوط حاصل مقدار ۵۰µL کلروفرم سرد اضافه گردید و با دور ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و فاز آبی جدا و ۱۰۰۰µL ایزوپروپانول سرد به آن افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ۲۴ ساعت نگهداری گردید. بعد از این مدت نمونه ها سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه محلول درون میکروتیوپ ها، ۱۰۰۰µL اتانول سرد به آن‌ها اضافه و با دور ۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن ۱۳µL آب DEPC به آن افزوده و مخلوط گردید. سنتز cDNA از mRNA استخراج شده با استفاده از ترکیبی شامل: ۱µL پرایمر رندوم هگزامر، dNTPs۱µL ، ۱µL آنزیم نسخه بردار معکوس M-Mulv (Moloney Murine Leukemia Virus)، ۰/۶۵µL مهار کننده ریبونوکلئاز، ۷/۳µL آب مقطر، ۲µL بافر و ۱۰µL mRNA با حجم نهایی ۲۳µL 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(جدول۱).

جدول۱ - 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`

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: ۰/۴µL رنگ، ۱۰/۸µL آب مقطر، ۰/۴µL پرایمر جلوبرنده و ۰/۴ µL پرایمر معکوس، ۲µL cDNA، و ۶µL پره میکس و ترکیب PCR برای بررسی بیان ژن بتا اکتین شامل ۰/۴µL رنگ، ۶/۸µL آب مقطر، ۰/۴µL پرایمر جلو برنده و ۰/۴µL پرایمر معکوس، ۲µL cDNA، و ۱۰µL پره میکس بود. برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت انجام RT-PCR برای ژن CXCR4 عبارت بود از: دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ثانویه ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه‌سانتی گراد، مرحله اتصال و طویل سازی ۲۰ ثانیه ۶۳ درجه سانتی گراد در۴۰ سیکل. برنامه دستگاه برای ژن بتااکتین 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.

تحلیل آماری

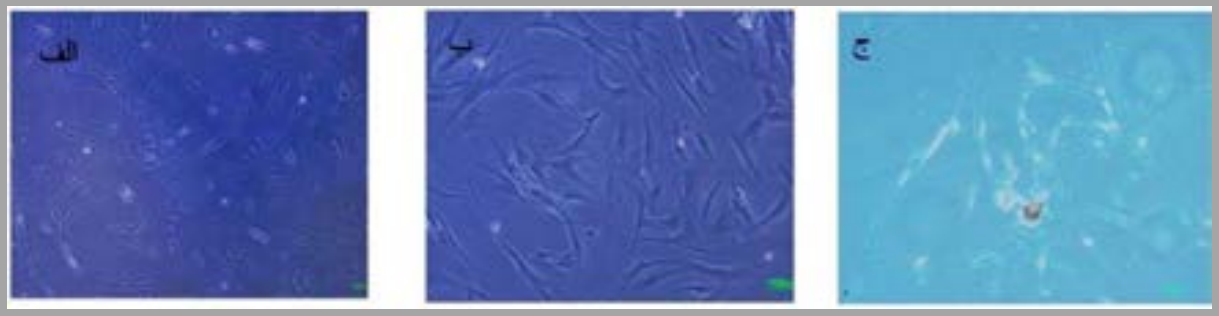
با استفاده از روش Real Time PCR برای هر نمونه یک Ct(Cycle threshold) به دست آمد. Ct به دست آمده از نمونه ها به همراه Ct به دست آمده برای ژن بتااکتین توسط فرمول زیر آنالیز شد.

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

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 شدند و بعد ۱۵ روز یک لایه چسبنده به دست آمد (شکل۱-الف). پس از مدتی کلنی های فیبروبلاست تشکیل شده و کف ظرف را پوشاندند(شکل۱- ب). سلول های مغز استخوان به سرعت یک لایه سلول های باریک و فیبروبلاست 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 کوچک‌تر (شکل۱-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 فیبروبلاست مانند خود را حفظ کردند.



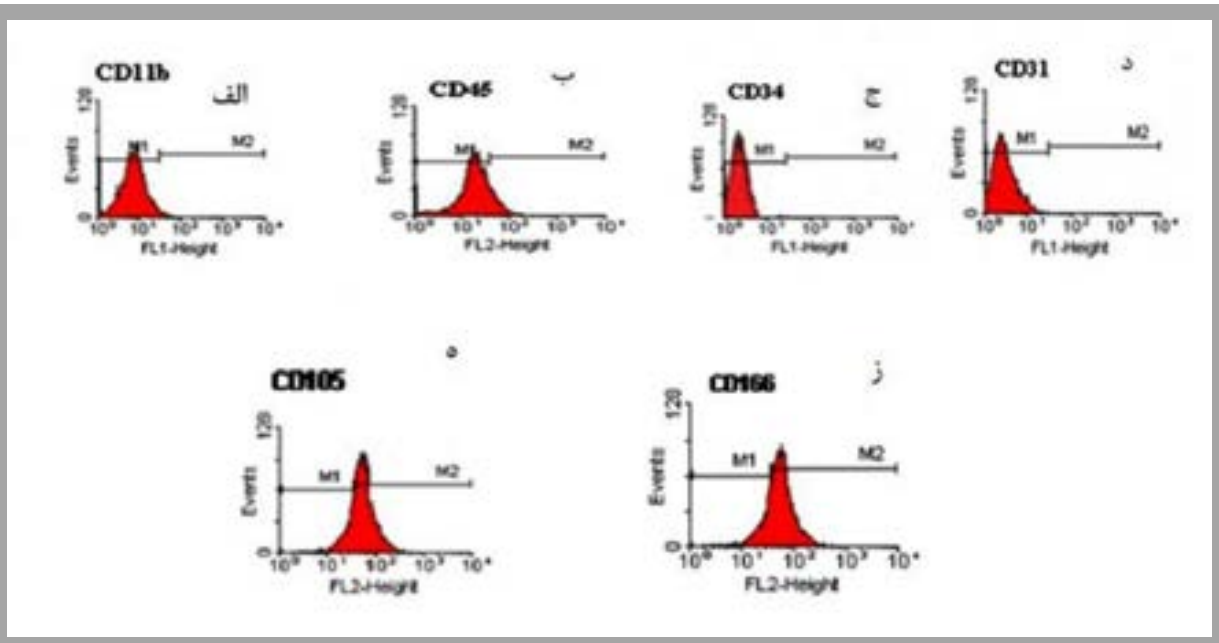
شکل۱-جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان. الف : پس از ۷-٦ تا هفت روز لایه چسبنده، ب: ظاهر شدن سلول های فیبروبلاست مانند، ج: در ادامه کشت هر دو نوع سلول دوک مانند و سلول های پهن دیده شدند. مقیاس ۱۰۰um.

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

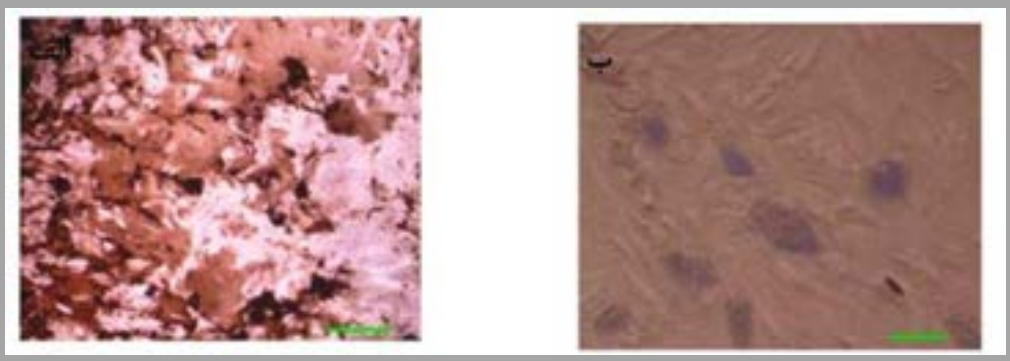
نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان نسبت به بیان مارکر CD11b، CD45، CD34 و CD31 منفی هستند (نمودار۲الف-د). در حالی که نسبت به بیان مارکر CD105 و CD166 انسانی مثبت بودند (نمودار۲- ه،ز). نتایج به دست آمده وجود سلول های بنیادی مزانشیمی را اثبات کرد. تجزیه و تحلیل 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 و CD31، منفی و برای CD105 و CD166 انسانی مثبت بود.

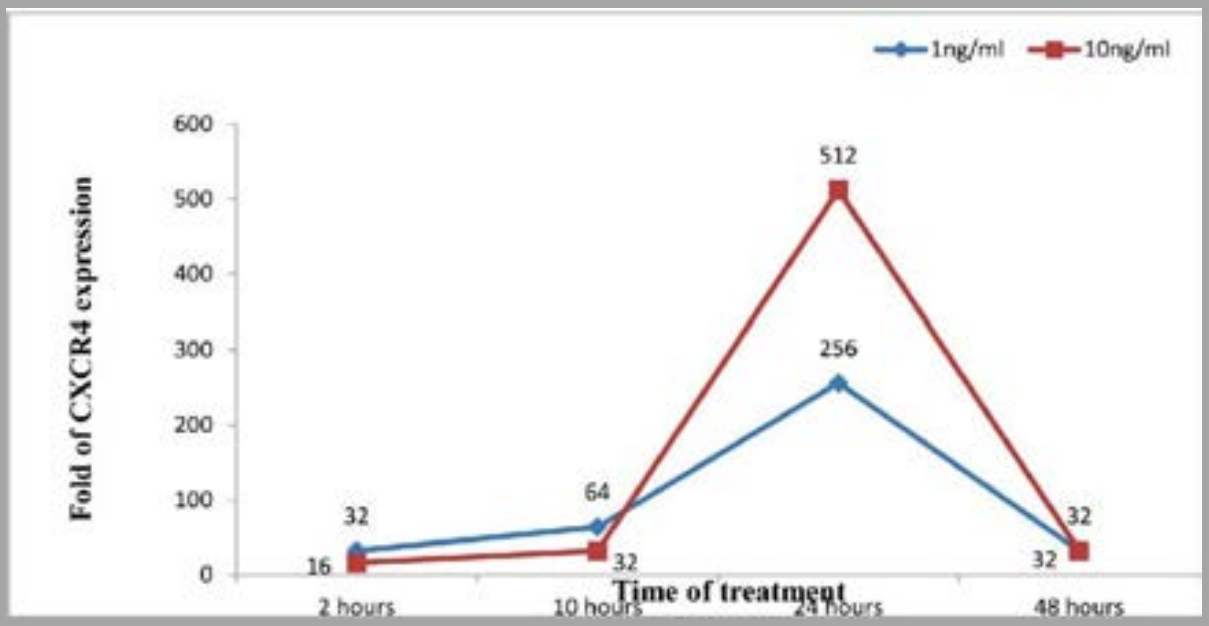
نتایج تمایز استخوان و چربی

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 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(شکل۲-ب).



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 ۵۰μm.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مولکولی، بیان ژن CXCR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α 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-α (۱ng/mlو ۱۰ng/ml) مقدار $۲^{-\Delta\Delta Ct}$، در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت افزایش زیادی داشت به ترتیب: $۲^{-\Delta\Delta Ct}$= ۲۵۶ و $۲^{-\Delta\Delta Ct}$= ۵۱۲. از طرف دیگر، در مقایسه کل نتایج، مشاهده شد که بالاترین سطح بیان ژن CXCR4 در تیمار با TNF-α ۱۰ng/ml در ۲۴ ساعت، اتفاق می‌افتد ($۲^{-\Delta\Delta Ct}$= ۵۱۲) (نمودار۲)(جدول ۲).



نمودار۲-مقایسه غلظت TNF-α بر بیان ژن CXCR4 در سلول های تیمار شده در سلول های بنیادی مزانشیمی هم مقدار ۱ng/ml و هم ۱۰ ng/ml TNF-α بیان CXCR4 را در سطح mRNA افزایش داد، اما ۱۰ ng/ml TNF-α 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-پویتیک 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 مانندPDGF، VEGF، IGF-1، IL-8، پروتئین مورفوژنیک استخوان(BMP-4 وBMP-7) پاسخ کموتاکسی ویژه-ای می‌دهند (۵،۱۷،۲۹). هر چند مکانسیم 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 لوکوسیت‌ها 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. TNF- ۱ ng/ml α **در مدت زمان ۲، ۱۰، ۲٤ و ٤۸ ساعت بیان ژن CXCR4 را به ترتیب ۳۲، ٦٤، ۲٥٦ و ۳۲ برابر در مقایسه با سلول های بنیادی مزاشیمی تیمار نشده افزایش داد.** TNF-α ۱۰ ng/ml **در مدت زمان ۲، ۱۰، ۲٤ و ٤۸ ساعت بیان ژن CXCR4 را به ترتیب ۱٦، ۳۲، ٥۱۲ و ۳۲ برابردر مقایسه با سلول های بنیادی مزاشیمی تیمار نشده افزایش داد.**

وضعیت تیمار	Ct CXCR4	Ct β-actin	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
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	-	-

از طرف دیگر سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بزرگی هستند که در بستر مویرگ ها به جا می مانند و این خصلت به آن‌ها 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 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 درمطالعات دیگر نیزتایید شده است. وین و همکاران (۳۴)، گزارش کرده اند که بخش کوچکی از

سلول های بنیادی مزانشیمی CXCR4 را بیان و مهاجرت این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی کمک می‌کند.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 (۱،۲۷،۳۱). 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 CXCR4 در سلول های سرطان معده که توسط TNF-α القا شده اند افزایش می یابد. هم‌چنین لموری(۸)، نشان داد که IFN -γ و IFN -1β کموکاین ها و گیرنده های کموکاینی را در سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی به سمت افزایش بیان تنظیم می‌کنند. اوه و همکارانش(۲۴)، مشاهده کردند که بیان CXCR4 در سلول های آستروگلیوما انسانی تیمار شده با TNF- α و IL -1β 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 می‌دهد. 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 می‌یابد. این عوامل می توانند باعث پیشرفت آبشار سیگنالی سیتوکاین ها در سلول شوند که بر الگوی بیان ژن موثرخواهد 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(۱۳،۱۸،۲۷،۳۶). پیش از مطالعه حاضر، کولب و همکارانش (۱۸)، سلول های سرطان تخمدان را با ۱ ng/ml ، ۱۰ ng/ml و ng/ml ۱۰۰ TNF-α در زمان های متفاوت انکوباسیون تیمار و مشخص گردید که بیشترین میزان بیان CXCR4 در TNF-α ۱۰ ng/ml و مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت رخ داده است. هم‌چنین نشان دادند که بین فاکتور رونویسی NF- kB 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

مشتق از مغز استخوان انسان وابسته به زمان و دوز افزایش دهد. TNF-α در هر دو دوز ۱ng/ml و ۱۰ng/ml می تواند بیان CXCR4 را در سطح mRNA افزایش دهد. بالاترین سطح بیان ژن CXCR4 در مقدار TNF-α ۱۰ng/ml بود که بیان CXCR4 تا دو برابر بیش از TNF-α ۱ ng/ml افزایش داد. یافته های به دست آمده نشان داد که زمان مطلوب تیمار با TNF-α برای افزایش بیان CXCR4 ، ۲۴ساعت بود. این یافته ها نشان می دهد که کنترل عوامل محیطی هم از نظر 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 هم‌چنین با تشکر از دکتر نسرین شکرپور در مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان نمازی برای همکاری در تنظیم مقاله.

منابع

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-α. 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, 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 Physio, 189; 54-63.

13. Han, Y., Wang, J., He, T., Ransohoff, RM. (2001). TNF-α down-regulates CXCR4 experssion in primer murin asttrocytes. Brain Research, 888; 1-10.

14. Hemeda, 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. Cytotherapy, 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 never 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-a 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). Comparsion 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 astroglioma 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-α-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-a in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. BMC Cancer, 10; 419.