

Effect of Interferon- γ on Expression of *CD39* and *CD73* Genes in the Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells

Rahimzadeh M¹, Pirdel L*²

1. Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Medicine, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

*Corresponding author. Tel: +984533728020, Fax: +984533715514, E-mail: lpirdel@iauardabil.ac.ir

Received: Jan 5, 2018 Accepted: Mar 11, 2018

ABSTRACT

Background & objectives: Mesenchymal stem cells have been known as hypo-immunogenic and immunosuppressive cells. Exposure of mesenchymal stem cells to interferon ($\text{IFN-}\gamma$) may influence their immunomodulatory properties. In the present study, the expression level of adenosine producing *CD39* and *CD73* ectonucleotides as an immunosuppressant were evaluated in Wharton's Jelly- derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) in the presence and absence of $\text{IFN-}\gamma$.

Methods: In this experimental study, MSCs were isolated, cultured, and propagated from Wharton's jelly obtained from human umbilical cord. The phenotypic characterization of these cells was performed via analysis of their surface markers using flow cytometry. Then, the cultured mesenchymal stem cells were treated with $\text{IFN-}\gamma$. After 24 hours, the expression levels of *CD39* and *CD73* genes were analyzed using qPCR in control and $\text{IFN-}\gamma$ -treated cells.

Results: Flow cytometric analysis of stem cells revealed morphological similarity to fibroblastic cells and expression of *CD105* and *CD73* markers in these cells. The results of qPCR showed that the expression level of *CD39* was significantly increased in $\text{IFN-}\gamma$ -treated cells compared to non-treated cells, while there was no significant difference in *CD73* expression level between control and $\text{IFN-}\gamma$ - treated cells.

Conclusion: The results indicated the possible role of $\text{IFN-}\gamma$ in development of the immunoregulatory capacity of mesenchymal stem cells through expression of target genes. However this should be studied precisely.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells; Interferon Gamma; Adenosine; *CD39*; *CD73*

اثر اینترفرون گاما بر بیان ژن‌های CD39 و CD73 در سلول‌های بنیادی مزاننشیمی مشتق از ژله وارتنون بند ناف انسانی

مریم رحیم زاده^۱، لیلا پیردل^{۲*}

۱. گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲. گروه پزشکی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۷۲۸۰۲۰ فاکس: ۰۴۵۳۳۷۱۵۵۱۴ پست الکترونیک: lpirdel@iauardabil.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزاننشیمی به عنوان سلول‌های با ایمونوژنیسیته پایین و تعدیل کننده ایمنی شناخته شده‌اند. مواجهه سلول‌های بنیادی مزاننشیمی با اینترفرون گاما (IFN- γ) ممکن است ویژگی‌های تعدیل کنندگی این سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه حاضر، میزان بیان اکتونوکلوئوتیدازهای CD39 و CD73 تولید کننده آدنوزین به عنوان مهار کننده ایمنی در سلول‌های بنیادی مزاننشیمی مشتق از ژله وارتنون کشت شده در حضور و غیاب INF- γ بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزاننشیمی از ژله وارتنون بندناف انسان استخراج، کشت و تکثیر داده شدند. شناسایی فنوتیپ این سلول‌ها از طریق آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی آنها صورت گرفت. سپس سلول‌های بنیادی مزاننشیمی کشت داده شده با اینترفرون گاما تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان CD39 و CD73 با استفاده از روش qPCR در سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با IFN- γ بررسی شدند.

یافته‌ها: آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی با مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاستی نشان‌دهنده بیان مارکرهای سطحی CD105 و CD73 در این سلول‌ها بود. داده‌های qPCR نشان داد که بیان CD39 در مواجهه با IFN- γ نسبت به حالت بدون مواجهه به صورت معنی‌داری افزایش یافته است، در حالی که بعد از تیمار با IFN- γ در سطح بیان CD73 بین سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نقش احتمالی اینترفرون گاما در ایجاد ظرفیت تعدیل ایمنی سلول‌های بنیادی مزاننشیمی را نشان می‌دهد که ممکن است از طریق بیان ژن‌های هدف نمایان شود و این می‌بایست مورد مطالعه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزاننشیمی، اینترفرون گاما، آدنوزین، CD39، CD73

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۵

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزاننشیمی (MSC)^۱، سلول‌های چند توانی هستند که از قدرت خود تجدید شونده برخوردار بوده و در عین حال می‌توانند به انواع دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت متمایز گردند [۲، ۱]. ویژگی

^۱ Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

ایمنی‌زایی پایین این سلول‌ها از یک‌سو و خاصیت تعدیل کنندگی ایمنی (ایمونومدولاتوری) آنها از سوی دیگر به همراه سهولت استخراج و کشت آنها از بافت‌های مختلف، کاربرد این سلول‌ها به عنوان یک منبع مناسب برای استراتژی‌های درمانی را فراهم آورده است [۳]. عملکرد تنظیم کنندگی سیستم ایمنی MSCها بر اثر تماس مستقیم با سلول‌های هدف و یا با واسطه ترشح فاکتورهای محلول نظیر IL-10،

TGF- β 1، پروستاگلندین E2 (PGE2)، فاکتور رشد سلول‌های کبدی (HGF) و آنزیم IDO [۹-۱۰] اعمال می‌شود و ممکن است نقش بسیار حائز اهمیتی در جهت افزایش ماندگاری عضو پیوندی و جلوگیری از ایجاد بیماری‌های خود ایمنی و بیماری‌های آلرژیک بر عهده داشته باشد [۱۳-۱۰].

به تازگی مطالعات نشان داده‌اند که عملکرد ایمونومدولاتوری MSCها منشأ ذاتی ندارد و MSCها این عمل را به واسطه ترشح سایتوکاین‌های التهابی مانند IFN- γ و یا به همراه سایتوکاین‌های دیگری نظیر TNF- α ، IL-1 α و IL-1 β که از لکوسیت‌های فعال شده تولید می‌شوند، اعمال می‌کنند [۱۵، ۱۴]. اینترفرون گاما (IFN- γ) به عنوان یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های سیستم ایمنی (۱۶) توسط سلول‌های ایمنی ذاتی از قبیل سلول‌های NK و سلول‌های ایمنی اکتسابی مانند لنفوسیت‌های CD4⁺ T (Th1) و CD8⁺ در پاسخ به تحریکات آنتی‌ژنیک و ایمونولوژیک تولید می‌شود [۱۷]. نشان داده شده است که در حضور اینترفرون گاما سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر سلول T را مهار می‌کنند بطوری‌که سلول‌های فاقد گیرنده IFN- γ فعالیت سرکوب ایمنی خود در مقابل تکثیر سلول T را از دست خواهند داد [۱۸]. فاکتور محلول دیگری که پیشنهاد می‌شود در عملکرد سرکوب ایمنی MSCها نقش مهمی ایفا می‌کند، آدنوزین است [۱۹]. سطح آدنوزین خارج سلولی در طی یک واکنش التهابی یا آسیب بافتی از طریق فعالیت‌های آنزیمی CD39 و CD73 می‌تواند افزایش یابد [۲۰]. CD39 (اکتو نوکلئوزید تری فسفات دی فسفوهیدرولاز یا NTPDase-1) و CD73 (اکتو-۵ نوکلئوتیداز) اکتونوکلئوتیدازهای غشائی هستند که به ترتیب ATP/ADP را به AMP و سپس AMP را به آدنوزین تبدیل می‌کنند و بدین ترتیب یک محیط پیش التهابی مشتق از ATP را به یک محیط ضد التهابی القاشده با آدنوزین سوق می‌دهند [۲۱، ۲۲]. آدنوزین

ابزار مورد استفاده سلول‌های T تنظیمی (T reg) و سلول‌های MSC، برای سرکوب ایمنی از طریق تماس سلولی در شرایط التهابی بشمار می‌رود [۲۳، ۲۴]. علاوه بر این، فعالیت مهاری آدنوزین تولید شده از سلول‌های توموری سبب فرار از مراقبت ایمنی و تسریع رشد سلول‌های توموری می‌شود [۲۵، ۲۶]. با اینکه آدنوزین می‌تواند پاسخ‌های التهابی و سلول‌های T کمکی نوع یک (Th1) و سلول‌های T کمکی نوع هفده (Th17) را در مدل موشی بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD)^۱ [۲۷] و بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (MS)^۲ [۲۸] در نتیجه افزایش تکثیر سلول‌های T کمکی نوع دو (Th2) و سلول‌های T تنظیمی (T reg) تعدیل نماید، مطالعه انجام شده توسط کانتر و همکاران مشخص کرد که تولید آدنوزین در لنفوسیت‌های B مراکز زایای فولیکول‌های لنفاوی برای تولید پلاسماسل‌های با عمر طولانی و ایجاد ایمنی هومورال نیز لازم است [۲۹].

تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر تیمار با اینترفرون گاما بر سطح بیان ژن‌های CD39 و CD73 صورت گرفت و فرض بر این بوده که این تیمار سایتوکاینی ممکن است یک راه برای تحریک فعالیت تعدیل‌کنندگی ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتنون^۳ به عنوان ابزار تنظیم‌گر سیستم ایمنی باشد.

روش کار

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی ژله وارتنون

بندناف انسانی

بندناف نوزادان سالم پس از دریافت رضایت‌نامه از مادر و انجام عمل سزارین جمع‌آوری شد و تحت شرایط استریل در داخل سرم فیزیولوژی از بیمارستان به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد.

¹ Graft Versus Host Disease (GVHD)

² Multiple Sclerosis (MS)

³ Wharton's Jelly-Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs)

فیکواریترین (PE)^۴ ضد نشانگر CD105 به هر میکروتیوب اضافه شده و برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. سپس دو بار با PBS حاوی FBS ۲ درصد، شستشو داده شدند. جهت حذف واکنش‌های غیراختصاصی از آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل استفاده شد. سپس سلول‌ها با دستگاه فلو‌سایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA و انجام RT-PCR

استخراج RNA از سلول‌های بنیادی تیمار شده با IFN- γ (۲۰ ng/ml) برای مدت ۲۴ ساعت و نیز سلول‌های کنترل با استفاده از کیت One Step-RNA (Bio Basic) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. با توجه به پروتکل کیت لیز سلول‌ها انجام شد. بعد از لیز شدن کامل سلول‌ها، استخراج به کمک کلروفرم و ایزوپروپانول انجام می‌گیرد تا رسوب RNA به دست آید. در نهایت پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ RNA حاصل در آب حل گردید. تعیین غلظت و خلوص RNA بر اساس نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ (OD260/280) نانومتر با دستگاه نانودراپ صورت گرفت. یکپارچگی و سلامت (کیفیت) RNA استخراجی نمونه‌ها با الکتروفورز بر روی ژل اگارز سنجیده شد. جهت حذف هر گونه باقیمانده DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراجی با DNase I تیمار شدند.

سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت PrimeScriptTM RT Reagent (Takara, Japan) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت. واکنش RT-PCR با cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده از سلول‌های مزانشیمی به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر در دمای بهینه اتصال پرایمرها با ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، ۱ میکرولیتر cDNA با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. کلیه پرایمرهای مربوط از

سپس برای ضد عفونی کردن در معرض الکل ۷۰٪ بمدت ۳۰ ثانیه قرار گرفت و بدنال آن، شستشو با بافر PBS^۱ دو بار تکرار گردید. جداسازی سلول‌های بند ناف انسانی به روش کشت قطعه‌ای بافت صورت گرفت. بدنال به قطعات کوچک بریده شده و پس از جداسازی عروق خونی، تکه‌های ژله وارنون به آرامی برداشته شدند و به محیط کشت DMEM-LowGlucose (Gibco, UK) حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو^۲ (FBS) (Gibco, UK) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, UK) و آمفوتریسین B (Sigma, USA) در داخل فلاسک‌های کشت سلولی T25 در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. محیط کشت فلاسک‌ها هر ۳ تا ۴ روز یکبار به مدت دو هفته تعویض شدند. پس از اینکه تراکم سلولی به ۸۰-۷۵ درصد رسید، سلول‌ها بوسیله مخلوط ۰/۲۵ درصد از Gibco, UK) Trypsin-EDTA از کف ظروف کشت کنده شده و به منظور استفاده در آزمایش‌های بعدی پاساژ داده شدند. این مرحله به عنوان پاساژ صفر در نظر گرفته شد.

آنالیز فلو‌سایتومتری سلول‌های بنیادی ژله وارنون انسانی

برای بررسی مارکرهای سطح سلولی CD73 و CD105 سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تایید آنها توسط فلو‌سایتومتری از سلول‌های کشت داده شده در پاساژهای ۳ تا ۵ استفاده گردید. بعد از شستشوی سلول‌های تریپسینه شده با PBS و شمارش سلولی، غلظت آنها به تعداد $10^6 \times 1-2$ سلول در هر میلی‌لیتر رسید و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به لوله‌ها منتقل، سپس ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کنژوگه شده با فلورسئین ایزوتیوسیانیات (FITC)^۳ ضد نشانگر CD73 و یا

^۱ Phosphate Buffered Saline

^۲ Fetal Bovine Serum (FBS)

^۳ Fluorescein Isothiocyanate (FITC)

^۴ Phycoerythrin (PE)

شرکت Bioneer کره جنوبی خریداری شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>CD39</i>	F: AAGTGAAGAGTTGGCAGACAG R: GGGACTATGCTGAACCACC
<i>CD73</i>	F: TGTGGGAATCGTTGGATA R: TCTACTTCAGGTTGTAATGC
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC

بعد از مرحله دناتوراسیون اولیه که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد، تکثیر قطعات در ۳۵ سیکل با دماهای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای مناسب به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. دمای طولی سازی نهایی نیز ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند و باندهای ایجاد شده با استفاده از اشعه UV و به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

Quantitative Real Time-PCR (qPCR)

بیان کمی ژنهای *CD39* و *CD73* در نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با یا بدون IFN- γ با استفاده از کیت SYBR Premix (Tli Rnase H Plus) (Takara, Japan) Ex Tag II طبق پروتوکول شرکت سازنده انجام شد. برای انجام qPCR از دستگاه ترمال سایکلر (Giagen, Rotor-Gene 6000 (Netherlands) استفاده شد. مخلوط واکنش محتوی ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Revers (۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر SYBR Master Mix، ۲ میکرولیتر cDNA و ۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر برای رساندن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. برنامه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای مناسب به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲

درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و تنظیم دمای ذوب در بازه دمایی ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت تشکیل نمودار منحنی ذوب بود. برای آزمایش qPCR حداقل ۳ تکرار برای هر نمونه استفاده شد. نتایج ارزیابی عملکرد آزمایش qPCR با استفاده از منحنی استاندارد ژن‌های مورد نظر و مرجع ترسیم و همچنین عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب بررسی شد. نهایتاً داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌ها نسبت به ژن گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)^۱ با استفاده از روش Ct^{-۲} مورد آنالیز قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل های آماری

تجزیه و تحلیل نتایج به وسیله نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۵/۰۴) انجام گرفت. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری من ویتنی^۲ انجام شد. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و *p* کمتر از ۰/۰۵ معنی دار محسوب گردید.

یافته ها

بررسی مورفولوژی و ایمونوفنوتایپ سلول‌های

بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان

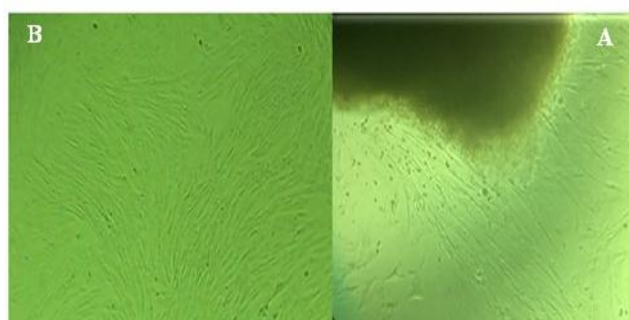
پس از قرار دادن قطعات ژله وارتون برای مدت ۱۲- ۱۰ روز در محیط کشت، جوانه‌های سلولی از کناره‌ها شروع به رشد کردند و یک هفته بعد از آن کف پلیت را پوشاندند. طی کلیه مراحل، سلول‌های استرومایی بند ناف با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند که سلول‌های شبه فیبروبلاستی با زوایدی به اطراف کشیده و چسبیده به بستر فلاسک کشت بودند. زمانی که ۸۰ درصد از کف فلاسک کشت توسط سلول‌های چسبیده فیبروبلاستی شکل اشغال شدند،

¹ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)

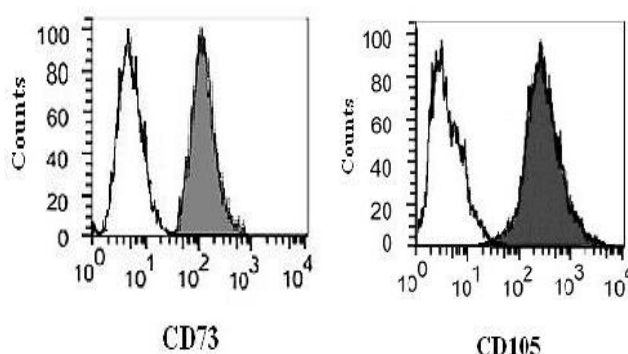
² Mann-Whitney

وارتون بند ناف انسانی بود (شکل ۲). البته در بیشتر مطالعات مارکرهای CD45، CD34، CD105، CD90 و CD73 برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند و لیکن در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت مالی فقط مارکرهای CD105 و CD73 مورد بررسی قرار گرفت.

پاساژ داده شدند و سلول‌های زنده به چند فلاسک تقسیم شدند. نتیجه اولین پاساژ بعد از کشت، تولید رده سلولی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان بود (شکل ۱). برای اثبات بنیادی بودن سلول‌ها بررسی فلوسایتومتری انجام گرفت و نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان‌دهنده بیان مارکرهای سطحی CD105 و CD73 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله



شکل ۱. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بند ناف انسانی (WJ-MSCs) در حال جدا شدن از کناره‌های قطعه بافتی کشت داده شده (A). تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی با مورفولوژی شبه فیبروبلاستی پس از حذف قطعه بافتی اولیه در انتهای پاساژ صفر (B)



شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی CD73 و CD105 سلول‌های بنیادی ژله وارتون انسانی.

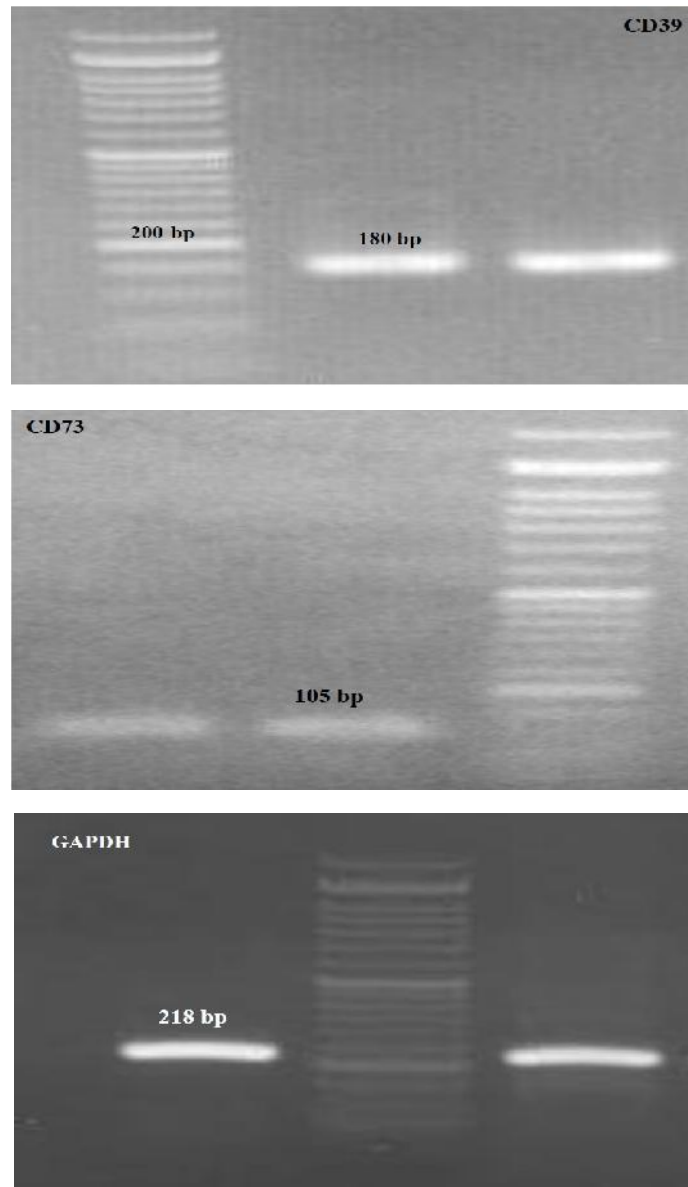
الکتروفورز نیز بررسی شد. در ادامه نمونه‌های RNA خالص‌سازی شده که از کیفیت مطلوبی برخوردار بودند جهت سنتز cDNA به کار گرفته شدند. نمونه‌های cDNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون که در معرض تیمار با یا بدون IFN- γ قرار گرفته بودند توسط واکنش رونویسی معکوس سنتز شدند. بعد از سنتز cDNA، روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های GAPDH، CD39 و CD73 انجام شد و نتایج

نتایج RT-PCR و qPCR

سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون تیمار شده از نظر بیان ژن‌های CD39 و CD73 با سلول‌های گروه کنترل مقایسه شدند. بدین منظور، ابتدا مقدار و کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده از هر دو سلول‌های تیمار شده و کنترل بر اساس اندازه‌گیری نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. علاوه بر اندازه‌گیری جذب نوری، کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل

CD39 و CD73 در دو گروه تیمار شده و کنترل با استفاده از روش qPCR مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین بیان ژن مرجع GAPDH به عنوان کنترل داخلی برای هر دو گروه اندازه گیری شد.

با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب باندهایی در ۲۱۸ bp، ۱۸۰ bp و ۱۰۵ bp مشاهده شد (شکل ۳). سپس نمونه‌های cDNA سنتز شده برای بررسی بیان نسبی ژن‌های



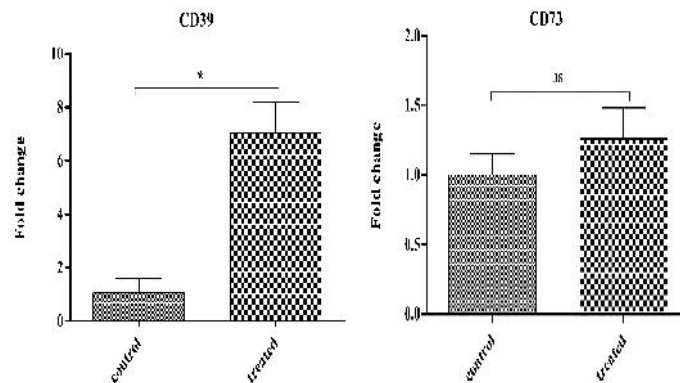
شکل ۳. محصول تکثیر cDNA های سنتز شده با پرایمرهای GAPDH، CD39 و CD73 بر روی ژل آگارز الکتروفورز

اختصاصی پرایمرها در تکثیر اختصاصی قطعات ژنی موردنظر و عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر غیراختصاصی برای هر ژن منحنی ذوب رسم شد. پیک مشاهده شده در منحنی ذوب پرایمر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر

نتایج ارزیابی عملکرد آزمایش qPCR با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده برای ژن‌های مورد نظر و مرجع میزان R^2 را حدود ۰/۹۹ و شیب خط را حدود ۳/۳- نشان داد. به سبب عدم اختصاصیت رنگ فلورسنس سایر گرین، برای اطمینان از عملکرد

معنی‌داری افزایش داشت و این ممکن است تعدیل بیان ژنی تحت تیمار با سایتوکاین γ -IFN را نشان دهد. درحالی‌که بیان ژن CD73 در سلول‌های WJ- MSC تیمار شده با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۱).

اختصاصی بود. از نسبت سیکل آستانه (Ct) ژن موردنظر با ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر با روش 2^{-Ct} به دست آمد. نتایج حاصل مشخص کرد که میانگین میزان بیان نسبی ژن CD39 نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده (کنترل) به طور



نمودار ۱. بیان ژن‌های CD39 و CD73 در سلول‌های WJ- MSC تیمار نشده (کنترل) و سلول‌های WJ- MSC بعد از ۲۴ ساعت تیمار با سایتوکاین γ -IFN. نمودار ۱. *; $p < 0.05$

دیگر برای فعالیت تعدیل ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی عمل می‌کند یا خیر، مورد توجه قرار گرفته است. بر این اساس در این مطالعه ابتدا سلول‌های مزانشیمی با شباهت زیادی به سلول‌های فیبروبلاستی از ژله وارتن بند ناف انسان جداسازی شدند که به سهولت و سرعت رشد کرده و تکثیر داده شدند. در ادامه برای تعیین هویت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکنیک فلوسایتومتری آنالیز شدند که نتایج بیان مارکرهای CD73 و CD105 را نشان داد.

در بررسی ویژگی ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مطالعه انجام شده توسط سالدانا آرائوژو نشان داد که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با افزایش بیان CD39 و CD73 بر سطح سلول‌های MSC و آدنوزین تولید شده از این سلول‌ها سبب مهار تکثیر لنفوسیت‌های T می‌شود (۳۲). ساتلر و همکاران نیز با مطالعه بر روی سلول‌های MSC موشی دریافتند که بیان

بحث

بر اساس شواهدی که تا کنون بدست آمده است، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قابلیت تکثیر و تمایز به سایر رده‌های سلولی، ایمونوژنیسته پایین و عملکرد تعدیل‌کنندگی ایمنی برخوردار هستند (۳۰، ۳۱). اگر چه بسیاری از یافته‌ها نقش سرکوب ایمنی این سلول‌ها را چه در محیط *in vitro* و چه در محیط *in vivo* تایید می‌کنند، افزایش اطلاعات ما از مکانیسم‌های مسئول تنظیم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و فاکتورهای موثر بر آنها می‌تواند ما را در جهت استفاده صحیح و بهینه از این روش‌ها کمک نماید. در این مطالعه، اثر سایتوکاین التهابی اینترفرون گاما بر تغییرات در سطح بیان ژن‌های CD39 و CD73 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتن بندناف انسان مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که آدنوزین به عنوان یک تنظیم‌گر ایمنی عملکرد دارد، این که آیا اینترفرون گاما در جهت افزایش آنزیم‌های تولیدکننده آدنوزین به عنوان یک مکانیسم احتمالی

CD39/CD73 جزء مهمی در عملکرد تنظیم ایمنی این سلول‌ها بشمار می‌رود (۳۳). مشخص شده است که سلول‌های بنیادی خون‌ساز همچنین با کاهش تولید $IL-1\beta$ از سلول‌های اندوتلیال سینووزوئیدی کبد به شیوه وابسته به CD39 و مهار التهاب عروقی، روند بازسازی کبدی بدنبال هیپاتکتومی را سرعت می‌بخشند (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر، خاصیت تنظیم ایمنی سلول‌های MSC مشتق از سرطان سرویکس (CeCa-) (MSC) بیان‌کننده اکتونوکلتوتیدازهای CD73 و CD39 بر مهار تکثیر، فعال‌سازی و فعالیت‌های اجرایی سلول‌های T کشنده با واسطه آدنوزین گزارش شده است (۳۵).

اینترفرون گاما در پیشبرد عملکرد ایمونومدولاتوری سلول‌های MSC و متعاقباً مهار تکثیر سلول‌های T یا سلول‌های کشنده طبیعی (NK) نقش دارد که ممکن است مربوط به تولید آدنوزین در اثر برهم‌کنش باشد (۳۶). یافته‌های تسه و همکاران همچنین نشان داد که سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان انسان حتی بعد از این که $IFN-\gamma$ اضافه شده به محیط باعث افزایش بیان MHC-II و ICAM-1 بر سطح سلول‌های بنیادی می‌شود، قادر به تحریک پاسخ تکثیری سلول‌های T نیستند (۳۷).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن CD39 در سلول‌های WJ-MSC بعد از ۲۴ ساعت تیمار با $IFN-\gamma$ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون تیمار نشده (کنترل) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد در حالی که مقایسه میزان بیان ژن CD73 بین سلول‌های کنترل و تیمار شده تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در آزمایش مشابهی توسط پراسانا و همکاران عدم تغییر در بیان مارکر CD73 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و ژله وارتون تحت تیمار با $IFN-\gamma$ و یا $TNF-\alpha$ گزارش شده است (۳۸). عدم تغییر بیان CD73 ممکن است ناشی از دوز کم $IFN-\gamma$ یا ناکافی بودن مدت زمان تیمار با این سایتوکاین باشد. احتمال دیگر

این است که $IFN-\gamma$ به تنهایی ناتوان از تقلید شرایط التهابی *in vivo* بوده تا موجب تغییر در بیان ژن CD73 شود که نیاز است مورد بررسی قرار گیرد. همچنین احتمال می‌رود که این ژن در تعدیل ایمنی تحت شرایط التهابی به طور فعال دخالت نداشته باشد که نیاز است مورد بررسی قرار گیرد. فعالیت CD39 در حضور $IFN-\gamma$ منطبق با مشاهداتی است که افزایش سطح $IFN-\gamma$ و آدنوزین خارج سلولی در شرایط مزمن التهابی را نشان می‌دهند و ممکن است فنوتیپ التهابی ماکروفاژهایی که در معرض $IFN-\gamma$ بوده‌اند تحت تاثیر واقع شود (۳۹). نتایج مطالعه‌ای نشان داده است که در موش‌های CD39-null پاسخ‌های $Th1/IFN-\gamma$ تشدید شده و با آسیب شدیدتری در بیماری التهابی روده همراه می‌شود (۴۰). با این حال در مطالعه‌ای دیگر، افزایش بیان CD39 در میکروگلیاها کاهش تولید $IFN-\gamma$ و جلوگیری از القاء بیان IDO را مشخص کرد که این تاثیری معکوس بر روند آسیب نوروها با واسطه کوئینولینیک اسید (QUIN) در بیماران دیابتی داشت (۴۱). مطالعه هم‌کشتی سلول‌های کشنده طبیعی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بندناف انسان عدم تغییر در میزان بیان CD39 و افزایش چشمگیر در بیان CD73 بر سطح سلول‌های کشنده طبیعی را نشان داد که گمان می‌رود این سلول‌ها برای تبدیل AMP به آدنوزین نیازمند مواجهه با MSCها باشند (۴۲). در مطالعه لی و همکاران همچنین نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدست آمده از مغز استخوان انسان می‌توانند به طور موثر پاسخ سلول‌های $Th17$ را از طریق تولید آدنوزین با واسطه CD39/CD73 مهار کنند (۴۳).

مطالعه حاضر فقط با هدف بررسی بیان ژن‌های CD39 و CD73 در مواجهه با $IFN-\gamma$ که به عنوان یکی از بازیگرهای مهم در محل التهاب بشمار می‌رود انجام شده است. اما به طور حتم بررسی مکانیسم اثر $IFN-\gamma$ بر تولید و عملکرد فاکتورهای مهاری از جمله

بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارزون بندناف انسان در اثر قرار گرفتن در معرض یک سایتوکاین التهابی شناخته شده همچون IFN- γ را مطرح سازد و احتمال دستیابی به اهداف درمانی جدید بر اساس این اکتونو کلتوتیداز در همراهی با توانایی تمایزی بالقوه این سلول‌ها برای درمان بیماری‌هایی که به واسطه سیستم ایمنی ایجاد می‌شوند را پیشنهاد نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین محترم معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ابراز می‌دارند. لازم به ذکر است که در انجام این تحقیق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل و بیمارستان سبلان اردبیل نیز همکاری صمیمانه داشته‌اند.

آدنوزین از جمله سوالاتی است که نیاز است به آن پاسخ داده شود در حالی که در مطالعه حاضر میزان تولید این مولکول در مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندازه‌گیری نشده و نیاز به بررسی دارد. همین‌طور مکانیسم‌های عملکردی تولید آدنوزین از طریق مسیر CD39/CD73 بر چگونگی تعدیل پاسخ‌های ایمنی توسط سلول‌های MSCs و نیز تاثیر احتمالی استفاده از این سلول‌های تیمار شده با IFN- γ و دیگر سایتوکاین‌های التهابی از قبیل TNF- α ، IL-1 و IL-17 در تماس با سلول‌های سیستم ایمنی و اثر دوز این سلول‌های بنیادی مزانشیمی باید مورد بررسی قرار گرفته و بهتر شناخته شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعات مربوط به بررسی نقش مهارتی اکتونو کلتوتیدازهای CD39 و CD73 بر سلول‌های سیستم ایمنی، نتایج حاصل از این مطالعه ممکن است نقش احتمالی بیان ژن CD39 در میانجیگری رفتارهای سرکوبگر ایمنی توسط سلول‌های

References

- 1-Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998 Jul;176(1):57-66.
- 2-Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr ;284(5411):143-7.
- 3-Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
- 4-Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007 Nov;262(5):509-25.
- 5-Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008 Feb;251(2):131-6.
- 6-Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb ;2(2):141-50.
- 7-Kong QF, Sun B, Bai SS, Zhai DX, Wang GY, Liu YM, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J Neuroimmunol.* 2009 Feb ;207(1-2):83-91.
- 8-DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2009 Oct;15(10):2795-806.

- 9-Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.
- 10-Dugast AS, Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. *Clin Exper Immunol*. 2009 Apr;156(1):25-34.
- 11-Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int*. 2009 Apr;22(4):365-76.
- 12-Ko JH, Lee HJ, Jeong HJ, Oh JY. Ly6C(hi) monocytes are required for mesenchymal stem/stromal cell-induced immune tolerance in mice with experimental autoimmune uveitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Dec 9;494(1-2):6-12.
- 13-Chan CK, Lin TC, Huang YA, Chen YS, Wu CL, Lo HY, et al. The modulation of Th2 immune pathway in the immunosuppressive effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a murine asthmatic model. *Inflamm Res*. 2016 Oct;65(10):795-801.
- 14-Kapranov NM, Davydova YO, Galtseva IV, Petinati NA, Drize NI, Kuzmina LA, et al. Effect of Priming of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells with Interferon gamma on Their Immunomodulating Properties. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Oct;82(10):1158-68.
- 15-Shin TH, Kim HS, Kang TW, Lee BC, Lee HY, Kim YJ, et al. Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis*. 2016 Dec ;7(12):e2524.
- 16-Chen YM, Yang WK, Whang-Peng J, Tsai CM, Perng RP. An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer. *Lung cancer*. 2001 Jan;31(1):25-30.
- 17-Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Apr;13(2):95-109.
- 18-Holan V, Hermankova B, Bohacova P, Kossl J, Chudickova M, Hajkova M, et al. Distinct Immunoregulatory Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells: Role of the Cytokine Environment. *Stem Cell Rev*. 2016 Dec;12(6):654-63.
- 19-Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004 Apr; 22:657-82.
- 20-Kerkela E, Laitinen A, Rabina J, Valkonen S, Takatalo M, Larjo A, et al. Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. *Stem Cells*. 2016 Mar;34(3):781-90.
- 21-Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013 Jun;19(6):355-67.
- 22-Roberts V, Stagg J, Dwyer KM. The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2014 Feb;5:64.
- 23-Kinsey GR, Huang L, Jaworska K, Khutsishvili K, Becker DA, Ye H, et al. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Sep;23(9):1528-37.
- 24-Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol*. 2013 Jan;91(1):12-8.
- 25-Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trend Immunol*. 2012 May;33(5):231-7.
- 26-Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013 Apr ;32(14):1743-51.
- 27-Lim JY, Park MJ, Im KI, Kim N, Jeon EJ, Kim EJ, et al. Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model. *Cell Transplant*. 2014 Apr;23(6):703-14.
- 28-Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007 Aug ;110(4):1225-32.

- 29-Conter LJ, Song E, Shlomchik MJ, Tomayko MM. CD73 expression is dynamically regulated in the germinal center and bone marrow plasma cells are diminished in its absence. *PloS one*. 2014 Mar; 9(3):e92009.
- 30-Tan K, Zheng K, Li D, Lu H, Wang S, Sun X. Impact of adipose tissue or umbilical cord derived mesenchymal stem cells on the immunogenicity of human cord blood derived endothelial progenitor cells. *PloS one*. 2017;12(5):e0178624.
- 31-Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*. 2008 Jan ;111(1):430-8.
- 32-Saldanha-Araujo F, Ferreira FI, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RH, Covas DT, et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*. 2011 Jul;7(1):66-74.
- 33-Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, et al. Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant*. 2011 Sep; 20(8):1221-30.
- 34-Schmelzle M, Duhme C, Junger W, Salhanick SD, Chen Y, Wu Y, et al. CD39 modulates hematopoietic stem cell recruitment and promotes liver regeneration in mice and humans after partial hepatectomy. *Ann Surg*. 2013 Apr;257(4):693-701.
- 35-de Lourdes Mora-Garcia M, Garcia-Rocha R, Morales-Ramirez O, Montesinos JJ, Weiss-Steider B, Hernandez-Montes J, et al. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *J Transl Med*. 2016 Oct ;14(1):302.
- 36-Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):386-98.
- 37-Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb ;75(3):389-97.
- 38-Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*. 2010 Feb ;5(2):e9016.
- 39-Cohen HB, Ward A, Hamidzadeh K, Ravid K, Mosser DM. IFN- prevents adenosine receptor (A2bR) upregulation to sustain the macrophage activation response. *J Immunol*. 2015 Oct; 195(8):3828-37.
- 40-Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, et al. From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep; 106(39):16788-93.
- 41-Hu P, Hunt NH, Arfuso F, Shaw LC, Uddin MN, Zhu M, et al. Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Quinolinic Acid Expression in Microglia and Müller Cells of Diabetic Human and Rodent Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Oct; 58(12):5043-5055.
- 42-Chatterjee D, Tufa DM, Baehre H, Hass R, Schmidt RE, Jacobs R. Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood*. 2014 Jan;123(4):594-5.
- 43-Lee JJ, Jeong HJ, Kim MK, Wee WR, Lee WW, Kim SU, et al. CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function. *Purinergic signal*. 2014 Jun;10(2):357-65.