بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان اسب

عباس پرهام*، فاطمه نظری، ادهم فانی ملکی

بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

گروه پژوهشی سلول های بنیادی و رویانی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Parham@um.ac.ir

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که پتانسیل خودنوزایی وتمایز به سلول-های سیستم عضلانی - اسکلتی را دارا می‌باشند. از آنجاییکه این سلول‌ها MHC-II را بیان نکرده و MHC-I را نیز به میزان کمتری بیان می‌کنند، لذا در شرایط پیوند سلولی سیستم ایمنی را کمتر تحریک نموده و یا حتّی آن را سرکوب می‌نمایند و این موضوع سبب شده تا این سلول‌ها به عنوان کاندید مناسبی برای درمان پیوند سلولی مدنظر باشند. از طرف دیگر، به نظر می‌رسد سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در بافت‌های مختلف بدن، از نظر پروفایل بیان ژنی خود تفاوت‌هایی با یکدیگر داشته باشند. بنابراین در این مطالعه وضعیت و میزان بیان ژن MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اخذ شده از بافت چربی و مغز استخوان اسب مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و مغز استخوان ۳ رأس اسب جدا شدند و تا پاساژ سوم در آزمایشگاه کشت شدند. در ادامه، RNA سلول‌های پاساژ سوم استخراج گردید و پس از سنتز cDNA، میزان بیان ژن MHC-I با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان رونوشت MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از هر دو منبع شبیه یکدیگر بوده و تفاوتی بین آن‌ها وجود ندارد. لذا می توان این چنین استنباط نمود که احتمالا میزان تحریک سیستم ایمنی توسط این سلول ها در بدن حیوان گیرنده پیوند تفاوتی با یکدیگر نداشته باشد.

کلمات کلیدی

ژن MHC-I، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسب.

مقدمه

به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی[1] از جمله خودنوزایی، پتانسیل تمایزی بالا و خاصیت تعدیل ایمنی و از طرفی ظرفیت پایین غضروف های مفصلی و تاندون‌ها در ترمیم ضایعات، تا کنون

[1] Mesenchymal stem cells (MSCs)

مطالعات بسیاری بر روی این سلول‌ها به عنوان راه درمان بیماری های مفصلی در اسب انجام شده است (۱, ۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اسب تا کنون از بافت‌های متعددی از جمله مغز استخوان، چربی، ماتریکس بندناف و خون محیطی و خون بند ناف و غیره جداسازی شده اند (۳). از این میان مغز استخوان و بافت چربی منابع اصلی مورد استفاده در آزمایشات کلینیکیِ درمان با این سلول‌ها بوده‌اند (۴). علی‌رغم وجود شباهت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشاء مغز استخوان و بافت چربی، تفاوت‌هایی در خصوص ویژگی‌های زیست شناختی، تکثیری، ایمنی زایی و تمایزی آن‌ها گزارش شده است. همچنین، این سلول‌ها در پروفایل بیان ژنی متفاوت از یکدیگرند (۵). از آنجایی‌که این تفاوت‌ها در سطوح مختلف بیان ژن قابل ردیابی هستند، استفاده از روش‌های آنالیز کمی بیان ژن همانند Quantitative Real time RT-PCR (qPCR) در شناسایی بهتر این سلول‌ها خصوصاً در مورد تفاوت‌های ایمونولوژیک آن‌ها و مقایسه این منابع نقش بسیار مهمی دارد.

اغلب مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشاء خودی[1] (اتولوگ) انجام شده است (۶) و کارایی این نوع درمان در اسب‌ها به صورت کلینیکی به اثبات رسیده است (۷). اما به طور معمول درمان‌های داخل مفصلی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ ۴ هفته به طول می‌انجامد که مدت زمان لازم برای جداسازی، شناسایی و تکثیر این سلول‌هاست (۸). بنابراین استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشاء ناهمسان از نظر ژنتیکی یا غیر خودی[2] (آلوژن) می‌تواند با حذف این فاصله زمانی نقش بسیار مهمّی در درمان جراحات مفصلی اسب داشته باشد. علاوه بر این، وجود دو خصوصیت تعدیل ایمنی و ایمنی زایی کمتر در این سلول‌ها این باور را به وجود آورده است که این سلول‌های آلوژن می توانند با کارآیی برابری در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ مورد استفاده قرار گیرند (۹). اما اطّلاعاتی در خصوص اطمینان و کارآیی درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن در اسب‌ها وجود ندارد (۱۰). بنابراین مطالعه در مورد جنبه‌های مختلف ایمنی زایی و ایمونوبیولوژی این سلول‌ها ضروری به نظر می رسد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در عین ایمنی‌زایی کمتر، خاصیت تعدیل ایمنی نیز دارند (۱۱). به علت عدم بیان مولکول اصلی سازگاری بافتی نوع II یا MHC-II، آنتی ژن کواستیمولیتوری CD86 و بیان پایین MHC-I توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب، در صورت پیوند این سلول‌ها با منشاء آلوژن پاسخ ایمنی چندانی ایجاد نمی‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق فاکتورهای ضد التهابی و مهار فاکتورهای پیش التهابی بر روی لنفوسیت‌های T اثر می‌گذارند (۱۲). این سلول‌ها همچنین از تکثیر لنفوسیت های T در انسان اسب و موش،جلوگیری می کنند (۱۰) و نقش مهاری در بلوغ سلول‌های دندریتیک و تمایز لنفوسیت-های B دارند (۱۳).

با این وجود گفته می‌شود سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ ایمنی زایی کاملاً مصون[3] نیستند و می‌توانند پاسخ لنفوسیت‌های T را برانگیزانند (۱۴) و بهتر است این سلول‌ها را هایپوایمونوژنیک دانست (۱۵). اخیرا

[1] Autologous
[2] Allogeneic or allo-MSCs
[3] Immunprivileged

اثبات شده است این سلول‌ها پس از پیوند قادر به ساخت سایتوکین‌های التهابی بوده و می‌توانند در روندهای التهابی و افزایش پاسخ سلول‌های ایمنی نقش داشته باشند (۱۶). همچنین گزارش شده است این سلول‌ها به لیز شدن در برابر سلول‌های کشنده طبیعی حساس هستند (۱۷). از طرفی بیان MHC-I بر روی این سلول‌ها می تواند در رد پیوند آن‌ها موثر باشد. آنتی‌ژن MHC-I مولکولی است که بر سطح تمام سلول های هسته‌دار بیان می‌شود و می‌تواند در ارتباط با لنفوسیت‌های CD8+ T[1] و سلول‌های کشنده طبیعی موجب رد پیوند سلول‌های آلوژن گردد (۱۸). بررسی MHC-I ، به علّت اهمیت آن در انجام یک درمان موفق مهم است. بنابراین در این مطالعه میزان بیان ژن MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب با دو منشاء مغز استخوان و بافت چربی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار:

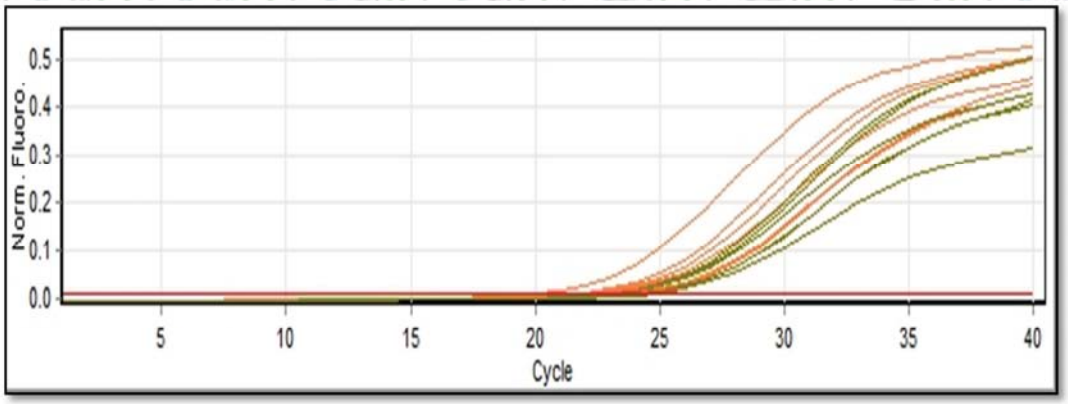
سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان و بافت چربی مربوط به سه مادیان سالم نژاد دو خون با سنین ۶، ۹ و ۱۰ سال استحصال شد. این سلول‌ها با استفاده از خصوصیات ظاهری، روندهای تمایزی و آنالیزهای مولکولی در سطح پروتئین‌های داخل سلولی و سطح سلولی شناسایی و تا پاساژ سوم کشت شدند. سلول‌های پاساژ سوم به منظور استخراج RNA، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت (High Pure RNA Isolation (Roche, Germany انجام شد. کیفیت RNA و کمّیت و خلوص RNA آن به وسیله ژل الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ٪۱و با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. میزان ۱ میکروگرم از RNA استخراجی، با استفاده از پرایمر Oligo dT و کیت (AccuPower® RT Premix) حاوی آنزیم نسخه برداری معکوس[2] از نوع M-MLV[3]، برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه کارآیی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ، منحنی استاندارد رسم گردید. سپس به منظور بررسی کمّی میزان رونوشت ژن MHC-I، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی یا qPCR انجام گرفت. در پایان واکنش، اختصاصیت در تکثیر محصولات حین واکنش، عدم حضور پرایمر دایمر و محصولات ناخواسته با استفاده از منحنی ذوب و الکتروفورز ژل آگارز محصولات qPCRمورد بررسی قرار گرفت. فلورسنتی که توسط دستگاه Real time PCR در هر چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جذب می‌شود متناسب با محصولات تولید شده بوده و مقادیر CT، که از تقاطع خط آستانه با منحنی تکثیر بدست می‌آید، به صورت معکوس متناسب با مقادیر رونوشت اولیه ژن هدف در نمونه است. مقادیر CT به نرم افزار Excel منتقل شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در ژل الکتروفورز RNA استخراجی حضور باندهای ۲۸s و ۱۸s نشان دهنده کیفیت مناسب و عدم تخریب RNA بود. اسپکتروفتومتری[4] نمونه RNA با استفاده از دستگاه Nano Drop 2000، علاوه بر تایید خلوص

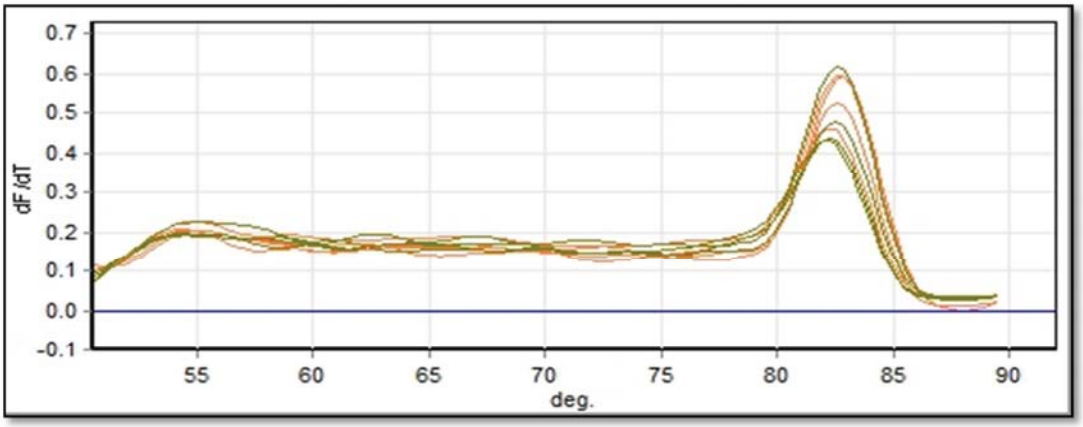
[1] $CD8^+$ T lymphocyte
[2] Reverse Transcriptase
[3] Molony Murine Leukemia Virus
[4] Spectrophotometry

نمونه، غلظت RNA را مشخص نمود. ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معمول ، نشان دهنده اتصال صحیح آغازگر، تکثیر قطعه مورد نظر و عدم تکثیر قطعات ناخواسته بود. منحنی استاندارد به دست آمده واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در زمان واقعی برای رقّت‌های متوالی cDNA، نشان از کارآیی مناسب واکنش داشت (E=100%, R2=0.97). نگاره ۱ منحنی تکثیر مربوط به نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

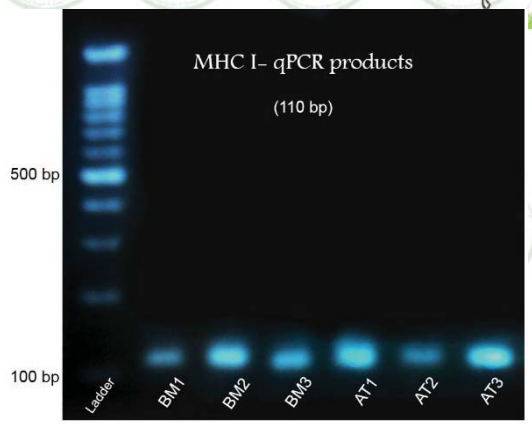


نگاره ۱: منحنی های تکثیر مربوط به ژن MHC-I در نمونه‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشاء مغز استخوان و بافت چربی را نشان می‌دهد.

منحنی ذوب (نگاره ۲) و الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان واقعی بر روی ژل (نگاره ۳) اختصاصی بودن تکثیر محصولات حین این واکنش را ثابت نمود.

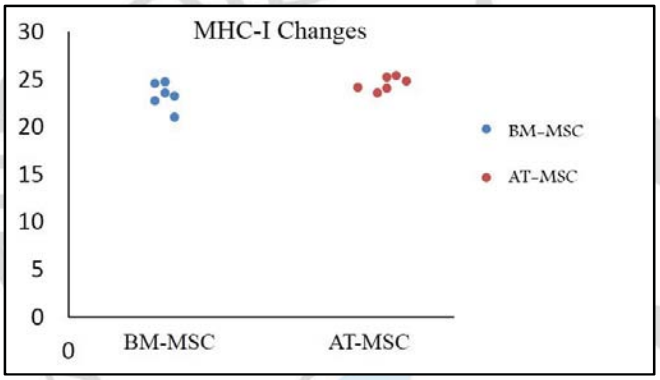


نگاره ۲: وجود یک پیک در منحنی ذوب، اختصاصی بودن تکثیر محصولات حین واکنش، عدم حضور پرایمر دایمر و محصولات ناخواسته را نشان می-دهد.



نگاره ۳: تصویر ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و اختصاصی بودن تکثیر محصولات حین واکنش و عدم حضور محصولات ناخواسته را نشان می‌دهد.BM مخفف Bone marrow و نشان دهنده محصولات واکنش زنجیره ای پلی‌مراز مربوط به مغزاستخوان ۳ اسب و AT مخفف Adipose tissue و نشان دهنده محصولات واکنش زنجیره ای پلی‌مراز در زمان واقعی مربوط به بافت چربی ۳ اسب است.

CT های بدست آمده از منحنی‌های تکثیر برای نمونه‌های بافت چربی و مغز استخوان تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته و نشان از عدم تفاوت در بیان ژن MHC-I در دو دسته سلول داشت (نگاره ۴).



نگاره ۴: نمودار پراکندگی مقادیر CT در دو دسته سلول بنیادی مزانشمی با منشاء مغز استخوان و چربی را نشان می‌دهد. این مقادیر در دو دسته سلول تفاوت مشخصی را نشان نداد.

بحث و نتیجه گیری

به علّت ویژگی‌های منحصر بفرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تاکنون مطالعات بسیاری بر روی درمان بیماری‌های ارتوپدیک در اسب با استفاده از این سلول‌ها انجام گرفته است (۱). یکی از این ویژگی‌ها، ایمنی زایی کم این سلول‌هاست (۱۹). اما از آنجایی‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در عین ایمنی زایی کم و تعدیل ایمنی، قادر به ایجاد پاسخ ایمنی هستند، این خصوصیّت همچنان مورد بحث باقی مانده است. یکی از دلایلی که موجب می‌شود این سلول‌ها کاملاً از نظر ایمنی زایی مصون نباشند بیان ژن MHC-I است. این

مولکول به عنوان ارائه دهنده آنتی ژن، در رد پیوند دارای نقش است. بنـابراین بررســی کمّـی و نسـبی ژن MHC-I به عنوان مولکولی که به میزان کم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب با منابع جداسـازی بافـت چربی و مغز استخوان بیان می شوند می‌تواند به شناسایی بهتر جنبه‌های ایمنی شناختی این سلول‌ها کمک کند. گیرنده‌های لنفوسیت‌های T (TRC)، قادر به شـناسایی مولکـول‌هـای MHC-I بیگانـه هسـتند (۲۰). سلول‌های کشنده طبیعی نیز در مواجهه با سلول‌های آلوژن به علت نیافتن مولکـول‌هـای MHC-I مخـتص رسپتورهای خود موجب لیز سلول‌های پیوندی آلوژن می‌شوند (۱۸). علاوه براین MHC-I، به همراه انـواعی مختلفی از مولکول‌های چسبنده همانند CD106، ICAM و اینگرین‌ها، گیرنده‌هـایی بـر سـطح سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی هستند که رسپتور خود را بر روی لنفوسیت‌های T می‌یابند و پاسخ ایمنی ایجاد می‌کنند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده میزان رونوشت برابر ژن MHC-I در این دو دسـته سـلول اسـت. در برخی از مطالعات گزارش شده است سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی خاصیت سرکوب ایمنی بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دارند (۲۱). بنابراین، به نظر می رسد اگرچه سلول‌هـای بنیادی مزانشیمی بافت چربی توانایی بیشتری در سرکوب سیستم ایمنی دارند، با توجه به نتـایج حاصـل در این مطالعه، احتمالا از نظر ایمونوژنسیتی تفاوت چندانی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ندارند.

منابع

1. Frisbie D, Smith R. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. Equine veterinary journal. 2010;42(1):86-9

2. Schnabel LV, Fortier LA, McIlwraith CW, Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how ,and when? The Veterinary Journal. 2013;197(3):570-7.

3. Radtke CL, Nino-Fong R, Gonzalez BPE, Stryhn H, McDuffee LA. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue–and periosteal tissue–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow–and adipose tissue–derived mesenchymal stem cells. American journal of veterinary research. 2013;74(5):790-800.

4. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi H, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cellular Physiology and Biochemistry. 2004;14(4-6):311-24.

5. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyk C, et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. The Veterinary Journal. 2013;195(1):98-106.

6. Smith RKW, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. PloS one. 2013;(9)8:75-69.
7. Godwin E, Young N, Dudhia J, Beamish I, Smith R. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. Equine veterinary journal. 2012;44(1):25-32.
8. Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW, Werpy NM. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. American journal of veterinary research. 2009;70(2):203-9.
9. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far&quest. Immunology and cell biology. 2013;91.۵۱-۴۰:(۱)
10. Ranera B, Antczak D, Miller D, Doroshenkova T, Ryan A, McIlwraith W, et al. Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes. Equine veterinary journal. 2015.
11. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. Journal of internal medicine. 2007;262(5):509-25.
12. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-22.
13. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. haematologica. 2008;93(9):1301-9.
14. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. Blood. 2006;108(6):2114-20.
15. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. Diabetes. 2008;57(7):1759-67.
16. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. Trends in molecular medicine. 2012;18(2):128-34.
17. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem cells. 2006;24(1):74-85.
18. Li XC, Raghavan M. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens. Current opinion in organ transplantation. 2010;15(4):499.
19. Sato T, Hidaka K, Iwanaga A, Ito M, Asano M, Nakabeppu Y, et al. Impairment of cardiomyogenesis in embryonic stem cells lacking scaffold protein JSAP1. Biochemical and biophysical research communications. 2005;338(2):1152-7.
20. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annu Rev Immunol. 2006;24:419-66.

21. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell biology international. 2008;32(4):384-93.