فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۲۱، جلد ۶، شماره ۲، بهار۹۲، صفحه ۱ تا ۹

بررسی الگوی بیان ژن گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-IR) تحت تأثیر فاکتور نکروز تومور-آلفا (TNF-α) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

زینب صحرائیان[۱]، **مریم آیت الهی**[۲]، رامین یعقوبی[۳]
۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشجوی دکتری زیست شناسی تکوینی، دانشکده علوم پایه، شیراز. ایران.
۲-استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز. ایران. ayatollmb@yahoo.com
۳-دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز. ایران.
تاریخ دریافت:۹۱/۱۱/۵ تاریخ پذیرش:۹۲/۱/۱۷

چکیده

مقدمه و هدف: نارسایی‌های حاد کبدی از جمله بیماری‌های مهم کبدی محسوب می‌شوند که خطر مرگ و میر آن‌ها بسیار بالا می‌باشد. پیشنهاد شده است که سلول درمانی جایگزین مناسبی به جای پیوند کل کبد، در درمان نارسایی‌های حاد کبدی می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از مهم‌ترین سلول‌ها در زمینه سلول درمانی هستند که از منابع مختلفی از جمله مغز استخوان به‌دست می آیند. فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-I) پس از اتصال به گیرنده خود (IGF-IR) در ترمیم بافت کبد تأثیر به‌سزایی دارد. ما در این تحقیق به بررسی الگوی بیان ژن IGF-IR در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان تحت تأثیر فاکتور نکروز تومور-آلفا (TNF-α) پرداخته شده است.

روش‌کار: پس از استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از حدود ۵ میلی‌لیتر مغز استخوان افراد دهنده سالم مراجعه کننده به بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان نمازی شیراز (پس از اخذ رضایت‌نامه)، سلول‌ها جداسازی و کشت شدند. شناسایی آن‌ها با شیوه فلوسایتومتری انجام گرفت. سلول‌های پاساژ چهارم با مقدار ۱ ng/mL در زمان‌های مختلف (۲، ۱۰ ، ۲۴ و ۴۸ ساعت) تحت تأثیر فاکتور التهابی TNF-α تیمار شدند. میزان بیان ژن IGF-IR در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α با روش Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به بیان مارکر CD90 مثبت بودند، در حالی‌که نسبت به بیان مارکرهای CD45 وCD80 منفی می‌باشند. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمارشده با TNF-α نسبت به گروه کنترل افزایش بیان ژن IGF-IR مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن IGF-IR در گروه سلولی تیمارشده با ng/mL ۱ فاکتور التهابی به مدت ۱۰ ساعت به‌دست آمد.

نتیجه گیری: الگوی افزایش بیان ژن IGF-IR در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان تحت تأثیر TNF-α، از یک رفتار وابسته به زمان تبعیت می‌کند. این نتیجه می‌تواند در آینده در زمینه سلول درمانی نارسایی‌های حاد کبدی کاربرد کلینیکی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان انسان، گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-IR)، فاکتور نکروز تومور-آلفا (TNF-α).

مقدمه

نارسایی‌های حاد کبدی (Acute Liver Failure, ALF) از جمله بیماری‌های مهم کبدی محسوب می‌شوند که پیشرفت بسیار سریعی داشته ومشخصه آن ایجاد اختلال شدید در عملکرد کبد و از دست رفتن هموئوستازی متابولیک طبیعی و نقص سیستمیک اندام کبد می‌باشد (۱۶). علیرغم پیشرفت‌های درمانی اخیر نارسایی‌های حاد کبدی هنوز به عنوان یک بیماری مهلک مطرح می‌باشد. خطر مرگ و میر این بیماری بسیار بالا (۱۰۰ -۳۰ درصد) می‌باشد. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که حدود ۲۰ میلیون نفر از

مردم جهان از بیماری‌های سیروز کبدی و یا سرطان کبد رنج می برند(۳۲،۱۲).در مطالعات مختلف پیشنهاد شده است که سلول درمانی جایگزین مناسبی به جای پیوند کل کبد، در درمان نارسایی‌های حاد کبدی می-باشد و سرعت مرگ و میر افراد منتظر دریافت پیوند را کاهش می‌دهد (۲۵،۱۸). از جمله مزیت‌های این روش درمانی عبارت است از امکان انجام دستکاری ژنتیکی جهت تصحیح اشتباهات متابولیسمی ارثی، امکان منجمد کردن سلول‌ها برای استفاده در آینده، تزریق بدون نیاز به عمل جراحی و امکان به‌دست آوردن این سلول‌ها از فرد بیمار و پیشگیری از خطر پس زدن پیوند و عدم نیاز به سرکوب سیستم ایمنی به صورت مادام العمر می‌باشد (۲۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی(Mesenchymal Stem Cells, MSCs) یکی از مهم‌ترین گزینه‌ها در زمینه سلول درمانی هستند که از منابع مختلفی از جمله مغز استخوان به‌دست می-آیند. مطالعات نشان داده است که سلول درمانی اتولوگ تکنیک درمانی مناسبی محسوب می‌شود (۲۰). اولین بار توسط ایسمن در سال ۱۹۶۵ درمان نارسایی کبدی با کمک بافت زنده کبد انجام گرفت (۱۳).اخیراً تلاش‌های زیادی در جهت درمان بیماری-های حاد کبدی به صورت *In vitro* و *In vivo*توسط محققین مختلف صورت گرفته است.جین و همکاران پیشنهاد کردند موش‌های دچار نارسایی حاد کبدی که پیوند سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان را به صورت ترکیبی با فاکتور رشد کبدی دریافت کرده بودند، بهبود عملکرد و بافت کبد را نشان دادند (۲۳). مطالعات مختلف پتانسیل درمانی MSCs مشتق از مغز استخوان در درمانبرخی از بیماری‌ها را تأیید نموده اند. این سلول‌ها اولین بار توسط فریدنستین در سال ۱۹۶۶ کشف شدند (۱۵).MSCs دارای ظرفیت چند توان می‌باشند،سریعاً به کف ظرف چسبیده و دارای ویژگی-های منحصر به فرد هستند. آن‌ها قادرند به دودمان‌های مزودرمی وغیر مزودرمی شامل سلول‌های استخوان، چربی، غضروف، ماهیچه، قلب، فیبروبلاست، میوفیبروبلاست، سلول‌های اپی‌تلیال و عصبی تمایز یابند. تمایز این سلول‌ها به سایر رده‌های سلولی، نشان دهنده پتانسیل تمایزی بالای آن‌ها می‌باشد (۶،۳۱،۳۰). از طرف دیگر، از جمله هورمون‌هایی که در ترمیم کبد مؤثرند، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin Like Growth Factor-I , IGF-I) می‌باشد.این فاکتور یک هورمون پروتئینی است که از نظر توالی پپتیدی، شبیه انسولین می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده اند که ۹۰٪ از IGF-Iتولید شده در بدن از کبد منشأ می‌گیرد (۲۴). این فاکتور می‌تواند رشد، تکثیر و جلوگیری از مرگ سلول‌ها را تنظیم کند (۲۸). فاکتور IGF-I اعمال خود در ترمیم کبد را از طریق اتصال به گیرنده اختصاصی خود (IGF-IR) اعمال می‌کند. در نتیجه این اتصال، چندین مسیر از جمله فسفاتیدیل اینوزیتول-۳-کیناز به صورت آبشاری در سلول فعال می‌شوند (۳۳). مکانیسم‌های تنظیم ترمیم کبد به‌طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته و نشان داده شده است که وابسته به سیتوکین‌هایی مانند اینترلوکین-۶ و فاکتور نکروز تومور-آلفا (Tumor Necrosis Factor-α ,TNF-α) می‌باشند (۱۰،۱۴). TNF-αیک سیتوکین التهابی چند عملکردی است که اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کارزول و همکاران شناسایی شد (۸). این سیتوکین توسط گروهی از سلول‌ها خصوصاً ماکروفاژها تولید و ترشح می‌شود. TNF-α به عنوان یک میانجی کلیدی در پاسخ ایمنی در محل التهاب می‌باشد (۲۲). همه ویژگی‌های عملکردی TNF-α از طریق اعضاء اختصاصی خانواده گیرنده‌های TNF-α اجرا می‌شود. این گیرنده‌ها چندین مسیر سیگنال درون سلولی را راه اندازی می‌کند (۱۹). برآیند فعال شدن این مسیرها

ترمیم کبد می‌باشد. در تحقیقات گزارش شده است که در طول ترمیم کبد پس از جدا کردن بخشی از کبد، تولید TNF-α افزایش می‌یابد که منجر به پیشبرد تکثیر هپاتوسیت‌ها می‌شود (۳۶). در این تحقیق الگوی بیان ژن IGF-IR در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان تحت تأثیر TNF-α مورد بررسی قرار گرفت. افزایش بیان ژن IGF-IRمی‌تواند در ارتباط با پروسه ترمیم بافت کبد بعد از آسیب باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری از مغز استخوان، جداسازی و کشت

پس از اخذ رضایت‌نامه، MSCs مشتق از مغز استخوان از استخوان لگن افراد دهنده سالم و ترجیحاًجوان (سن ۳۰-۱۷ سال)، در بیمارستان نمازی شیراز، آسپیره و سریعاً به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء این بیمارستان منتقل شد. در ابتدا هم حجم نمونه مغز استخوان، محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (Fetal bovine serum, FBS)، یک درصد ال-گلوتامین و یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین، پنی سیلین به آن اضافه شد. با استفاده از فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای از سایر لایه‌ها جدا و به آن محیط کشت اضافه شد. سپس سانتریفیوژ گردید. سوسپانسیون سلولی را در محیط کشت (حاوی ۱۰ درصد سرم FBS) در فلاسک T25 به طور یکنواخت کشت و در داخل انکوباتور (دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن) قرار داده شد.پس از حدود ۷ روز سلول‌ها با خاصیت چسبندگی خود به کف ظرف چسبیدند، در این مرحله محیط کشت موجود در سطح سلول‌ها تعویض گردید. در مراحل بعدی هر از ۴-۳ روز با محلول شستشو (phosphate buffered saline, PBS) شستشو و سپس تعویض محیط کشت انجام شد.پس از حدود ۱۲ روز از شروع کشت اولیه، با رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد، پاساژ سلولی انجام گرفت. برای انجام پاساژ سلولی، پس از دور ریختن محیط کشت روی سلول‌ها و شستشوی آن‌ها با محلول شستشو، تریپسین روی سطح سلول‌ها ریخته شد. بعد از طی مدت کوتاهی در دمای۳۷درجه سانتی‌گراد، با گرد و کنده شدن سلول‌ها از کف ظرف، سلول‌ها جمع-آوری و به فلاسک‌های جدید حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند (۳).

آنالیز فلوسایتومتری

جهت شناسایی MSCs از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. از سلول‌های پاساژ سوم با تراکم بیش از ۸۰ درصد جهت انجام فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، سانتریفیوژ گردید.سپس سلول‌ها با بافر شستشو و مجدداً سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، FBS به رسوب سلولی اضافه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مجدداً مرحله شستشو و سانتریفیوژ را تکرار شد. در مرحله بعد سلول‌ها با ایزوتیوسیانات فلورسنت متصل به آنتی‌بادی‌های CD45، CD80 و CD90 نشان‌دار شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شدند. نمونه کنترل نیز در کنار سایر نمونه‌ها قرار داده شد. محلول موجود با بافر، شستشو داده و سپس سانتریفیوژ شد. محلول رویی با پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شد. نهایتاً پس از قرار دادن در دستگاه فلوسایتومتر، رسم نمودارهای مورد نظر صورت گرفت. جهتحذفواکنش‌هایغیراختصاصی ازآنتیبادی‌هایایزوتیپکنترلاستفادهشد (۳).

تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول‌هایMSCs در پاساژ چهارم با تراکم 5×10^{3}Cells/mL در محیط کشت حاوی ۱۰٪سرم، تحت تأثیر غلظت ng/mLTNF-α۱ در مدت زمان‌های

مختلف ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از زمان‌های متفاوت قرار گرفته بودند، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

بیان ژن IGF-IR

استخراج mRNA و سنتز cDNA

بررسی سطوح بیان ژن IGF-IR با کمک MSCs تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α در مرحله پاساژ چهارم انجام گرفت. مقدار ۷۰۰µL بافر شستشو (PBS) به MSCsاضافه شد. استخراج mRNA نمونه سلولی، با کمک کیت استخراج RNX plus (سیناژن-ایران) بر اساس دستور کار مندرج در کیت انجام شد که به‌صورت مختصر ذکر می‌گردد. ابتدا به ۲۰۰µL سوسپانسیون سلولی مقدار۱۰۰۰µLمحلول RNX-plus اضافه و مخلوط شد. سپس مقدار ۱۰۰µL کلروفرم سرد به آن اضافه گردید و با دور ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن فاز آبی، مقدار ۱۰۰۰µL ایزوپروپانول سرد به آن افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس سانتریفیوژ شد. محلول درون میکروتیوب خالی شد و در مرحله بعد مقدار۱۰۰۰µL اتانول ۷۵ درصد سرد به آن افزوده شد. سپس به مدت ۸ دقیقه، دور ۸۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول درون میکروتیوب خالی و سپس جهت جمع شدن کامل RNA درب میکروتیوب را بسته و به مدت ۱۰ ثانیه میکروفیوژ گردید. نهایتاً مقدار۲۵µL آب مقطر به آن افزوده و مخلوط گردید.جهت سنتز cDNA از mRNA استخراج شده از MSCs از ترکیبی با حجم نهایی ۲۳µL به شرح زیر استفاده گردید. این ترکیب شامل مقدار۱µL dNTPs، ۱µLآغازگر هگزامررندوم، ۱µL ازآنزیم نسخه بردار معکوس(Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase)، ۰/۶۵µL مهارکننده۰ریبونوکلئاز، ۷/۳۵µL آب مقطر، ۲µL بافر و ۱۰µL mRNAمی‌باشد.

Real Time-PCR

طراحی آغازگرهای IGF-IR وبتا-اکتین(نسخه ۶) با کمک نرم افزارهای Blast از NCBI و اولیگو انجام گرفت. توالی آغازگرهای گیرنده IGF-I و بتا اکتین در جدول۱ آورده شده است. بیان نسبی ژن IGF-IR و بتا-اکتین با کمک سایبر گرین طبق دستورالعمل مورد بررسی قرار گرفتند. ترکیب PCR جهت تعیین بیان نسبی ژن IGF-IR شامل ۰/۴µL رنگ، ۶µL آب مقطر، ۰/۸µL آغازگرهای جلوبرنده و معکوس، ۲µL cDNAو ۱۰µL مخلوط اولیه می‌باشند. ترکیب مخلوط واکنشPCR جهت تعیین بیان نسبی ژن بتا-اکتین شامل ۰/۴µL رنگ، ۶/۸µL آب مقطر، ۰/۴µL آغازگرهای جلوبرنده و معکوس، ۲µL cDNA و ۱۰µL پری میکس می باشند. ضمناً غلظت آغازگرهای مورد استفاده ۱۰ پیکومول بوده است.برنامه دمایی و زمانی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام *RT-PCR* به‌صورت دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ثانویه ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه مرحله اتصال پرایمر در ۶۰/۳ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه مرحله طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد برای ۳۵ سیکل در نظر گرفته شد.

جدول ۱-مشخصات آغازگر های گیرنده IGF-I و بتااکتین

	آغازگر معکوس	آغازگر جلوبرنده
IGF-IR	5'-TCCCAAACGACCCCTGCCCA-3'	5'-TCTGCCCGTCGCTGTCCTGT-3'
بتا اکتین	5'-GACGATGGAGGGGCCGACT-3'	5'-GGGCGGCACCACCATGTACC-3'

تحلیل آماری

با کمک تست RT -PCR برای هر نمونه یک Ct (Cycle threshold) به‌دست آمد . در واقع Ct عبارت است از سیکلی که در آن، فلورسانس خط آستانه را قطع می کند. Ct به‌دست آمده از نمونه‌ها با کمک Ct به‌دست آمده برای ژن بتا – اکتین توسط فرمول زیر نرمالیزه گردید.

$$\Delta Ct\ (experimental) = Ct\ (Treated\ MSCs) - Ct\ (\beta\text{-}Actin))$$

$$\Delta Ct\ (control) = Ct\ (untreated\ MSCs) - Ct\ (\beta\text{-}Actin))$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (experimental) - \Delta Ct\ (control)$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = r$$

نتایج

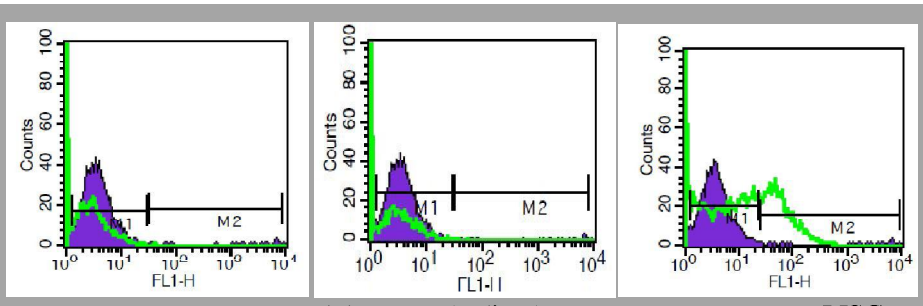
نتایج مربوط به کشت اولیه سلول‌ها

پس از کشت اولیه سلول‌ها، MSCs به طور روزانه با کمک میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار می-گیرند. براساس این مشاهدات، از بین هزاران سلول موجود، در روزهای دوم و سوم سلول‌های بسیار کمی در کشت اولیه فیبروبلاستی و دوکی شکل شده و به کف ظرف می‌چسبند. کلنی‌های بزرگ سلولی با گذشت زمان رشد نموده (شکل۱– الف) و مدتی پس از آغاز کشت، کلنی‌ها در محیط پخش شده و به صورت تک لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل، کف ظرف را پوشاندند(شکل۱– ب). بعد از مشاهدات میکروسکوپی، ملاحظه شد که به طور فزاینده‌ای بر تعداد سلول‌های چسبنده افزوده می‌شود. این سلول‌ها در طی دوره رشد، ریخت شناسی فیبروبلاستی خود را حفظ نمودند.

نتایج مربوط به فلوسایتومتری

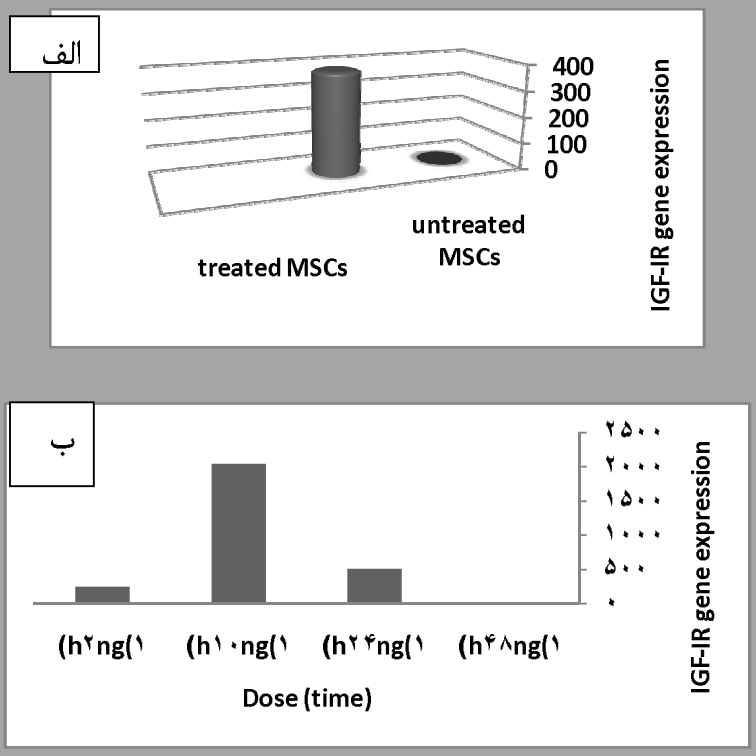
نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها نسبت به بیان مارکرهای CD45 و CD80 منفی می‌باشد (نمودار۱– الف و ب)، در حالی‌که نسبت به بیان مارکر CD90 مثبت بوده اند(نمودار۱– ج). نتایج به‌دست آمده ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به اثبات می‌رساند. نتایج آنالیز فلوسایتومتری بر اساس نقطه اتصال نمودار ایزوتایپ با نمودار آنتی بادی اختصاصی به‌دست آمد.

شکل۱– جداسازی و کشت MSCs مشتق از مغز استخوان انسان. الف) کلونی‌های منفرد سلولی شامل سلول‌های شبه فیبروبلاستی. ب) کشت اولیه MSCs مشتق از مغز استخوان انسان با سلول‌های دوکی شکل.



نمودار۱- شناسایی MSCs مشتق از مغز استخوان انسان. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان نشان داد که این سلول نسبت به بیان مارکرهای CD80 و CD45 منفی (الف و ب) و نسبت به بیان مارکر CD90 مثبت می‌باشند (ج). افزایش بیان ژن IGF-IR تحت تأثیر TNF-α در MSCs

نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که بیان ژن IGF-IR در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان در گروه‌های تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α با یک‌دیگر متفاوت بودند. میزان بیان ژن در گروه‌های تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر می‌باشند (نمودار۲- الف). مقایسه میزان بیان این ژن در گروه‌های سلولی تیمار شده با ng/mLTNF-α۱ ، نشان داد که مقدار $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ برای زمان‌های ۲، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۵۶، ۲۰۴۸، ۵۱۲ و ۳۲ می‌باشد پس بیشترین میزان بیان ژن مذکور در زمان ۱۰ ساعت پس از تیمار اتفاق می‌افتد (نمودار۲- ب). هم‌چنین نتایج آنالیز داده‌های به‌دست آمده شامل Ct، ΔCt، ΔΔCt و $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ در جدول ۲ آورده شده است.



نمودار۲- تفاوت در سطوح بیان ژن IGF-IR در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α. الف) تفاوت در سطح بیان ژن IGF-IR در MSCs تیمار نشده در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با TNF-α. ب) مقایسه بیان ژن IGF-IR در MSCs تیمار شده با ng/mL۱ در زمان های مختلف.

جدول ۲- سطوح بیان ژنهای IGF-IR وبتا-اکتین در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با TNF-α

دوز و زمان تیمار	Ct IGF-IR	Ct بتااکتین	ΔCt	ΔΔCt	$۲^{-ΔΔCt}$
۱ng/mL-۲ساعت	۳۰	۲۲	۸	-۷	۲۵۶
۱ng/mL-۱۰ساعت	۲۱	۱۸	۳	-۱۲	۲۰۴۸
۱ng/mL-۲٤ساعت	۲۶	۲۰	۶	-۹	۵۱۲
۱ng/mL-٤۸ساعت	۳۲	۲۲	۱۰	-۵	۳۲
تیمار نشده (کنترل)	۳۷	۲۲	۱۵	-	-

بحث و نتیجه گیری

امروزه با توجه به محدودیت شدید اندام قابل پیوند، سلول درمانی جایگزین مناسبی به جای پیوند کل اندام محسوب می‌شود. در دهه اخیر، MSCs مشتق از مغز استخوان به عنوان یک منبع مهم برای سلول درمانی در پزشکی مطرح می‌باشند. مطالعات پیش بالینی و بالینی نشان داده است که پیوند این سلول‌ها در درمان برخی از بیماری‌ها مانند نارسایی‌های قلبی، مغزی، استخوانی و کبدی مؤثر می‌باشند (۳۵، ۴). با توجه به اهمیت MSCs در پیوند سلولی، روش‌های زیادی جهت بهبود پتانسیل درمانی آن‌ها صورت گرفته است. یکی از این شیوه‌ها تحت تأثیر قرار دادن این سلول‌ها با فاکتورهایی از جمله سیتوکین‌ها می‌باشد.پتانسیل درمانی MSCsمورد استفاده در ترمیم استخوان با کمک برخی سیتوکین‌های خاص به عنوان فاکتورهای محیطی در سلول‌های کشت داده شده، بهبود یافت (۹). در شرایط پاتوفیزیولوژیکی، چندین سیتوکین از جمله TNF-α در اطراف محل آسیب دیده افزایش می‌یابند. اثرات این سیتوکین‌ها بر روی سلول‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (۲،۵،۷). وانگ و همکاران دریافتند که سیتوکین‌های التهابی مثل TNF-α قادر به افزایش دادن حساسیت MSCs نسبت به کیموکین‌ها می‌باشند (۲۱). در مقاله دیگری نیز بر این نکته تأکید شده است که بیان مولکول چسبنده بین سلولی-۱ تحت تأثیر TNF-α در سلول‌های اندوتلیال افزایش می‌یابد (۲۷). گوآنگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که تولید اینترلوکین-۶ در MSCs تحت تأثیر TNF-α و اینترفرون گاما افزایش می‌یابد (۱۷). در تحقیق دیگری، تیمار سلول‌های هپاتوسیت باng/mLTNF-α۲۰ انجام شد و نتایج نشان داد که میزان بیان ژن اینترلوکین-۸ حدود ۱۰ برابر افزایش داشت (۲۹). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که TNF-α تکثیر هپاتوسیت‌ها را در حضور فاکتورهای رشد پیش می‌برد(۱). راه اندازی مسیر بیان ژن توسط TNF-α از طریق اتصال این فاکتور التهابی به گیرنده اختصاصی خود و به دنبال آن فعال-سازی فسفولیپاز Cمی‌باشد. سپس به دنبال آن هیدرولیز فسفاتیدیل‌کولین، تولید دی آسیل گلیسرول و فعال سازی پروتئین کیناز Cاتفاق می‌افتد. این مسیر زمانی‌که TNF-α القاء فاکتور نسخه برداری NF-κB(nuclear factor- kappa B) را فعال می‌کند، راه اندازی می‌شود. اتصال NF-κB به پروموتور ژن مربوطه، منجر به روشن شدن ژن و بیان آن می‌گردد (۳۴). برخی دانشمندان نشان دادند که تزریق داخل صفاقی TNF-α به موش-های سالم منجر به القاء شدید NF-κB شبیه همان حالتی که پس از تخریب بخشی از کبد به‌وجود می-آید، می‌شود (۱۱-۲). در این تحقیق به بررسی تغییرات سطح بیان ژن IGF-IR در گروه‌های MSCs تیمارشده با TNF-α در مقایسه با گروه سلولی تیمار نشده با کمک تکنیک RT-PCR پرداخته شد.

نتایج ما نشان داد که تأثیر TNF-α بر میزان بیان ژن IGF-IR در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان طبق یک الگوی وابسته به زمان می‌باشد. حداکثر میزان بیان این ژن در سلول‌های MSCs تیمارشده باng/mL۱فاکتور التهابی TNF-α به مدت ۱۰ ساعت به‌دست آمد. القاء آزمایشگاهی MSCs با TNF-α می‌تواند به عنوان یک شیوه مؤثر در افزایش پتانسیل درمانی این سلول‌ها در سلول درمانی مطرح باشد.الگوی افزایش بیان ژن گیرنده IGF-I در MSCsمشتق از مغز استخوان انسان تحت تأثیر فاکتور التهابی TNF-α ممکن است در سلول درمانی در جهت بهبود بیماری ALF مؤثر باشند.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم تا از سرکار خانم دکتر گرامی‌زاده و سرکار خانم دکتر عقدایی که در مرکز تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه تشکر نماییم.

منابع

1.Albrecht, J. (1997). Regulation of cyclindependen kinase inhibitor gene expression in hepatic regeneration. Hepatology, 25; 557-563.
2.Akerman, P., Cote, P., Yang, S. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-a ilihihit hirer regenemation after partial hepatectomy. Anm.J. Pimysiol, 263; 579-585.
3.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, 4(1); 1-8.
4.Bao, X. (2011). Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. Brain Res, 1367; 103-13.
5.Billiau, A. (1996). Interferon-gamma: Biology and role in pathogenesis. Adv Immunol, 62; 61-130.
6.Billon, N., et al. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. Development .,134, 2283-2292.
7.Bradley, J. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol,214; 149-160.
8.Carswell, E., Old, L., Kassel, R. (1975).An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. proceedings of the national academy of science, 72 (9) ; 3666-3670.
9.Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenic proteins (BMPs). J Bone Surg Am, 85; 1544-1552.
10. Cressman, D., Greenbaum, L., Angelis, R. (1996).Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science, 274; 1379-1383.
11. Diehl, A., Yimi, M., Fleckenstcin, J. (1994). Tumor necrosis factor-α induces e-jun durimig the regenerative response to liver imijumy. Am. J. Pimaiol, 267; 552-561.
12. Dietreich, D. (2005) . Strategies for management of HCV/HIV coinfection. 3rd ed. PDR., 101-113.
13. Eiseman, B., Liem, D., Raffucci, F. (1965). Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. Ann Surg, 162; 329-345.
14. Fausto, N., Laird, A., Webber, E. (1995). 1.Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. FASEB J, 9; 1527-1536.
15. Friedenstein, A., Gorskaja, J., Kulagina, N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, 4; 267-274.
16. Gronthos, S., Zannettino, A., Hay, S. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci, 116; 1827-1835.
17. Guang, W. (2009). C/EBPb mediates synergistic upregulation of gene expression by interferon-c and tumor necrosis factor-α in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. stem cells, 27; 942-948.
18. Han, B., Lu, Y., Meng, B. (2009).Cellular loss after allogenichepatocyte transplantation. Transplantation, 87;1-5.
19. Hehlgans, T., Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily. Immunology, 115; 1-20.

20. Hemming, A. (2003).Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. Ann Surg, 237.

21. Hwang, J. (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. J Korean Med Sci, 24; 547-554.

22. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. (1999). The immune system in health and disease. J. Immunobiology., New York, N.Y : Garland Publishers.

23. Jin, S., Meng, X., Sun, X. (2011). Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration induced by transfusion of bone marrow mononuclear cells in a murine acute liver failure model. J Hepatobiliary Pancreat Sci,18; 397-405.

24. Jones, J., Clemmons, D. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins. biological actions. Endocr Rev, 6; 3-34.

25. Kobayashi, N., Noguchi, H., Fujiwara, T. (2000). Establishment of a highly differentiated immortalized adult human hepatocyte cell line by retroviral gene transfer. Transplant Proc, 32; 2368-2369.

26. Kocken, M., Borel Rinkes, I., Bijma, A. (1996).Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. Transplantation, 62; 358-364.

27. Look, D., Rapp, S., Keller, B. (1992). Selective induction of intercellular adhesion molecule-1 by interferon gamma in human airway epithelial cells. Am. J. Physiol, 263; L79-L87.

28. Ohlsson, C., Mohan, S., gren, K. (2009).The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. The endocrine society, 30(5); 494-535.

29. Osawa, Y., Nagaki, Y., Banno, Y. (2001). Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor-α-induced hepatocyte apoptosis. J. Cell. Physiol, 187; 374-385.

30. Prockop, D. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science, 276; 71-74.

31. Rahilly, R., Muller, F. (2007). The development of the neural crest in the human. J Anat, 211; 335-351.

32. Rozga, J. (2006) .Liver support technology-an update. Xenotransplantation, 13; 380-389.

33. Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J. (1988). Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor-I receptor. J Biol Chem, 263; 11486-11492.

34. Thomas, M. (2000). Effects of TNFa on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells In Vitro.Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 22; 685-692

35. Volarevic, V., Arsenijevic, N., Lukic, M. (2011). Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. Stem Cells, 29; 5-10.

36. Yamada, Y., Kirillova, J., Peschon, A. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I TNF receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94; 1441-1446.