



بررسی مقایسه‌ای پروفایل بیان ژن‌های MHC-I، CD90 و CD29 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغزاستخوان و بافت چربی اسب

فاطمه نظری^۱، عباس پرهام^{۱،۲}، ادهم فانی ملکی^۱

^۱گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲گروه پژوهشی بیولوژی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹ اسفند ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲۰ اردیبهشت ماه ۱۴۰۰

doi: 10.22059/jvr.2020.293443.2997

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.12.2>

چکیده

زمینه مطالعه: تاکنون مطالعات بسیاری بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان راه درمان بیماری‌های اسکلتی - عضلانی در اسب انجام شده است. مغز استخوان و بافت چربی منابع اصلی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اسب بوده‌اند. علی‌رغم وجود شباهت زیاد سلول‌های این دو منبع، تفاوت‌هایی نیز در ویژگی‌های زیست‌شناختی، تکثیری، تحریک ایمنی و تمایز آن‌ها وجود دارد و هنوز توافقی بر سر این که کدام منبع برای ایجاد بانک سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن مناسب‌تر است، وجود ندارد. از آنجایی که برخی از این تفاوت‌ها در سطح بیان ژن قابل‌ردیابی هستند، استفاده از روش آنالیز کمی بیان ژن (qPCR) در شناسایی بهتر این سلول‌ها و مقایسه این منابع توصیه می‌شود.

هدف: بررسی مقایسه‌ای میزان رونوشت ژن‌های Major Histocompatibility Complex-I (MHC-I)، Cluster of Differentiation-90 (CD90) و CD29 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان اسب که به ترتیب ژن‌های مؤثر در ایمنی‌زایی و نشانگرهای شناسایی مؤثر در استئوژنز و لانه‌گزینی در این سلول‌ها می‌باشند.

روش کار: برای این منظور، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان ۳ رأس اسب مورد استفاده قرار گرفت. RNA تام سلول‌های پاساژ سوم استخراج گردید و پس از سنتز cDNA، میزان بیان ژن‌های مورد بررسی، با روش qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج این مطالعه مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی میزان برابری از ژن MHC-I و میزان بیشتری از ژن‌های CD90 و CD29 را در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیان می‌کنند که در خصوصیات بیولوژیک آن‌ها از جمله در مهاجرت و توان تمایز تأثیر گذار می‌باشند.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج به دست آمده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان و بافت چربی اسب از نظر الگوی بیان ژنی تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند که مؤید تفاوت‌های عملکردی آن‌ها می‌باشد. تفاوت‌هایی که باید در درمان‌های مبتنی بر سلول مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسب، CD29، MHC-I، CD90

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: عباس پرهام، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران و گروه پژوهشی بیولوژی سلول‌های بنیادی و پزشکی

بازساختی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

پست الکترونیکی: parham@um.ac.ir

مقدمه

این منابع، مغز استخوان و بافت چربی منابع اصلی مورد استفاده در سلول درمانی در اسب‌ها بوده‌اند (۲،۳). این سلول‌ها در عین شباهت‌هایی که دارند در زمینه‌های مختلف همچون تکثیر، تمایز،

یکی از کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی در دامپزشکی، استفاده از این سلول‌ها در درمان جراحات ارتوپدیک اسب است (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی تقریباً در اغلب بافت‌های بالغ وجود دارند. در میان

از بیماری فرد یا حیوان از معایب استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ است (۱۲). سلول‌های بنیادی آلوگ (Allo- MSCs) علاوه بر صرفه‌جویی در زمان، از افراد سالم اخذ می‌شوند (۱۳). با وجود این که تعدیل ایمنی و ایمنی‌زایی کمتر در سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان دهنده کارایی برابر این سلول‌ها با سلول‌های اتولوگ است، گفته می‌شود سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ ایمنی‌زایی کاملاً مصون نیستند و می‌توانند پاسخ لنفوسیت‌های T را برانگیزند و بهتر است این سلول‌ها را هیپوایمونوژنیک دانست و متأسفانه اطلاعاتی از اطمینان و کارایی درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن در اسب‌ها وجود ندارد و هدف اصلی در پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه پیوند، مولکول‌های سازگاری نسجی (MHC) بیان شده بر سطح سلول‌های دهنده است (۱۴، ۱۵). مطالعات نشان داده‌اند سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ بافت چربی و مغز استخوان پاسخ‌های ایمنی بر ضد MHC را فعال می‌کنند (۱۳). برخی مطالعات گزارش کرده‌اند سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب MHC-II را بیان نکرده است (۱۶) یا به میزان کم بیان می‌کنند (۱۷)، در واقع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیان MHC-II هتروژن می‌باشند. بنابراین می‌توان گفت MHC-I مهم‌ترین آلوآنتی ژن پیوندی در این سلول‌ها است. MHC-I مولکولی است که بر سطح تمام سلول‌های هسته‌دار بیان می‌شود و می‌تواند در ارتباط لنفوسیت‌های $CD8^+$ T و سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوسیت‌های B موجب رد پیوند سلول‌های آلوژن گردد (۱۸). بنابراین به نظر می‌رسد خصوصیات تعدیل ایمنی در این سلول‌ها مانع از رد پیوند آن‌ها نمی‌شود و این مسئله نشان‌دهنده یک خطر در درمان با Allo- MSCs است و می‌تواند کارایی سلول درمانی و تکرار درمان با این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و نشان‌دهنده ضرورت بیشتر مطالعه در مورد جنبه‌های مختلف ایمنی‌زایی و ایمونوبیولوژی Allo- MSCs در اسب‌ها است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن‌های MHC-I، CD90 و CD29 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان اسب بود که محصولات این ژن‌ها به ترتیب در ایمنی‌زایی، استئوژنز و لانه‌گزینی مؤثر می‌باشند.

مواد و روش کار

جداسازی سلول‌ها، کشت و تعیین هویت آن‌ها: سلول‌های مورد مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و بافت چربی مربوط به سه مادین سالم نژاد دو خون با سن ۳، ۶ و ۹ سال بودند که قبلاً گرفته شده و تعیین هویت شده بودند (۱۹، ۲۰). سلول‌های

ایمنی‌زایی و سرکوب ایمنی و بیان نشانگرهای شناسایی تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند. به طور کلی شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به وسیله ترکیبی از ویژگی‌های فیزیکی، مورفولوژیکی، فنوتیپی و عملکردی انجام می‌شود و به علت محدودیت در دسترسی به آنتی‌بادی‌های مختص گونه اسب و عدم واکنش برخی آنتی‌بادی‌های انسانی با مارکرهای اسبی، مجموعه‌ای از مارکرهای مثبت شامل CD90، CD29، CD105، MHC-I و تعدادی از مارکرهای منفی همانند CD14، CD11b، CD34، CD45، CD79 و CD19 در سطح mRNA شناسایی می‌شوند (۴). CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان نشانگر بنیادی بودن مورد توجه است (۵). CD90 با سلول‌های استئوپروژنی‌تور مرتبط بوده (۶) و همراه با CD146، کلاژن نوع I و III، استئوپنتین یا OPN و استئونکتین یا OCN در استئوژنز نقش دارد (۷). گزارش شده است سلول‌های بنیادی مزانشیمی که بیان بالاتری از CD90 دارند، از توان تمایزی بالاتری در تمایز به استخوان برخوردار می‌باشند (۸). بنابراین CD90 می‌تواند به‌عنوان نشانگری مؤثر در مهندسی بافت استخوان به‌منظور جداسازی جمعیت‌هایی که قابلیت استخوان‌سازی بالاتری دارند، مورد استفاده قرار گیرد و گفته می‌شود سلول‌های بنیادی با بیان بالای CD90 کاندیدی مناسبی برای کاربردهای درمانی می‌باشند. CD29 نقش مهمی در مهاجرت درون تنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد (۹). CD29 جزء β برخی از مولکول‌های اینترگرین بوده و در ارتباط با زیر واحدهای مختلف α به لیگاند‌های لامینین، کلاژن، فیبرونکتین، اپیلیگرین سلول را به ماتریکس خارج سلول مرتبط ساخته و از طریق مولکول اتصال عروق یا VCAM-1 (CD49d، CD29) و با واسطه P-selectin سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به سلول‌های اندوتلیوم عروق متصل کرده و از این طریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی گام‌های ابتدایی خروج از عروق را طی می‌کنند. VLA-4 اینترگرینی است که CD49d یا $\alpha 4$ به‌عنوان جزء α آن بوده و CD29 جزء β آن است. ترکیبات CD29 با زیر واحدهای α بر روی اغلب سلول‌ها یافت می‌شوند در حالی که VLA-4 تنها بر روی لنفوسیت‌های B و T، سلول‌های تیغه عصبی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان می‌شود و در رابطه با مهم‌ترین گیرنده خود یعنی VCAM-1 سبب اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی به اندوتلیوم عروق می‌گردد (۱۰). مسئله پذیرش سلول پیوند شده یکی از چالش‌های اساسی سلول درمانی است. اغلب مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ خودی (اتولوگ) انجام شده است و کارایی این نوع درمان در اسب‌ها به صورت بالینی به اثبات رسیده است (۱۱). زمان بر بودن اخذ سلول و تکثیر آن برای هر بیمار به صورت جداگانه و امکان اثرپذیری سلول‌ها

سبز به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای محاسبه کارایی واکنش، برای تمام ژن‌ها منحنی استاندارد رسم گردید. به این منظور، ابتدا مخلوطی از نمونه‌های cDNA رقیق شده، تهیه گردید. این مخلوط به‌عنوان رقت ۱ در نظر گرفته شد و از آن تا ۵ رقت متوالی تهیه گردید. هرکدام از رقت‌ها به‌عنوان نمونه واکنش qPCR، استفاده شدند. همچنین به منظور اثبات اختصاصیت اتصال پرایمر و وجود یک محصول در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی، منحنی ذوب رسم گردید و محصولات واکنش بر روی ژل رانده شدند.

انتخاب ژن رفرنس: برای به دست آوردن نتایج قابل اطمینان

و معتبر در بررسی تغییرات بیان ژن‌ها به‌صورت نسبی داده‌ها باید نرمال شوند. برای نرمال کردن داده‌ها و حذف سهم تغییرات غیر واقعی از تغییرات بیولوژیک واقعی ژن‌ها، از ژن مرجع استفاده شد که دقیق‌ترین و بهترین راه است. ژن مرجع مناسب باید در تیمارها و شرایط متفاوت یا در بافت‌ها و سلول‌های متفاوت، به میزان یکسان بیان شود. بنابراین ثبات بیان سه ژن B2M (Beta-2 microglobulin)، ACTB (Actin, beta) و GAPDH که ژن‌های پرکاربرد در بررسی‌های کمی بیان ژن در سلول‌های بنیادی جداسازی شده از مغز استخوان و بافت چربی اسب می‌باشند (۲۱)، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی ثبات بیان ژن مرجع طبق کار لیواک و اشمیتگن در سال ۲۰۰۸ از فرمول 2^{-CT} استفاده شد. در محاسبه fold change با استفاده از فرمول 2^{-CT} نیز شروط استفاده از روش comparative CT method برقرار است. برای استفاده از روش comparative CT method به منظور ارائه نتایج باید کارایی دو ژن هدف و مرجع به هم نزدیک بوده و در محدوده‌ای از ۱۰ درصد کارایی ۲ قرار گیرند و زمانی این شرط محقق می‌شود که کارایی بین ۱/۸ تا ۲/۲ قرار گیرد (۲۲).

رسم منحنی استاندارد: با استفاده از رقت‌های متوالی به‌عنوان

نمونه در واکنش qPCR، منحنی استاندارد مربوط به ژن‌ها، که در آن لگاریتم رقت‌ها در محور X و C_T ها در محور عمودی قرار دارند، توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Series Q Software 2.1.0 مربوط به دستگاه Real-Time (Qiagen, Germany) رسم گردید. با استفاده از شیب این خط، کارایی واکنش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Efficiency of the Reaction} = \left[10^{\left(-\frac{1}{\text{slope}}\right)} \right] - 1$$

پاساژ سوم مربوط به هر اسب در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA و انجام مراحل بعدی ذخیره شده بودند.

استخراج RNA: برای استخراج RNA، از کیت High Pure

RNA Isolation (Roche, Germany) استفاده شد و مراحل بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. کیفیت RNA، به‌وسیله ران کردن RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. کمیت و خلوص RNA نیز با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت.

ساخت cDNA: ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت

cDNA (AccuPower® RT Premix) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. یک مرحله از نرمالایز کردن تفاوت بین نمونه‌ها در این سطح، با استفاده از برداشت مقادیر برابر از RNA استخراج شده نمونه‌های مختلف برای ساخت cDNA انجام شد.

طراحی و آماده‌سازی آغازگرها: آغازگرهای مورد نیاز برای

این ژن‌ها، به‌منظور انجام qPCR، طبق توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI و با استفاده از نرم افزار Primer Premier (version 6.0, Premier Biosoft International) طراحی شدند. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. ابتدا با استفاده از گرادیان دمایی، دمای اتصال بهینه برای هر ژن مشخص شد و سپس ارزیابی صحت عملکرد آغازگرهای ژن‌های مورد نظر، با استفاده از سنجش اختصاصی عمل کردن آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و بررسی محصولات این واکنش به وسیله الکتروفورز ژل آگارز، صورت گرفت. علاوه بر این، برای اطمینان از انجام واکنش رونویسی معکوس و ساختن cDNA، تمام ۶ نمونه cDNA با استفاده از آغازگر ژن GAPDH در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمول، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همراه با بررسی همزمان

پیشرفت واکنش (Real-Time Polymerase Chain Reaction):

به‌منظور ارزیابی کمی نسبی میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه، qPCR از روی cDNA انجام شد. در این واکنش از Maxima SYBR® Green qPCR master Mix (Thermo Scientific) استفاده شد. واکنش در شرایط دمایی زمانی شامل ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در مرحله اول و سپس مرحله دوم با ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشتگی مجدد در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله هم سرشتگی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶/۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه مرحله جمع آوری نور فلئورسنت

بررسی بیان کمی نسبی ژن‌ها: به منظور بررسی کمی نسبی و مقایسه میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه در دو دسته سلول بنیادی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی انجام گرفت. فلورسنسی که توسط دستگاه Real time PCR در هر چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جذب می‌شد متناسب با محصولات تولید شده بود و مقادیر C_T ، که از تقاطع خط آستانه با منحنی تکثیر به دست آمد، به صورت معکوس متناسب با مقادیر رونوشت هدف اولیه در نمونه بود؛ اما این تناسب تنها در سیکل‌های ابتدایی فاز تصاعدی در PCR برقرار بود. این موضوع در انتخاب محل خط آستانه برای تعیین مقادیر C_T ، مورد توجه قرار گرفت. مقادیر C_T به نرم افزار Excel منتقل شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. وجود یک پیک در منحنی ذوب، نشان‌دهنده اختصاصیت در تکثیر محصولات حین واکنش و در واقع نشان دهنده عدم حضور پرایمر - دایمر و محصولات ناخواسته بود. در مورد همه ژن‌های مورد مطالعه، منحنی‌های تکثیر نشان دهنده تکثیر یک محصول بود. **تصویر ۱**، منحنی‌های ذوب مربوط به ژن‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. به منظور اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل رانده شدند. ژل الکتروفورز محصولات واکنش در **تصویر ۲** دیده می‌شود.

بررسی تغییرات ژن‌های مرجع و آنالیز داده‌ها: مقادیر سیکل‌های آستانه مربوط به بیان ژن‌های مرجع (ACTB, GAPDH) و B2M) مورد بررسی بین دو گروه سلولی بنیادی مزانشیمی با منشأ مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ بافت چربی ثبات نداشتند، اما نوسان بیان ژن MHC-I بسیار محدود بود و به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت. به عبارت دیگر، میزان بیان این ژن در دو گروه سلولی برابر بود.

نتایج تغییرات در میزان رونوشت ژن‌های CD29 و CD90 بر اساس ژن مرجع MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در **تصویر ۳** نشان داده شده است. بر اساس آزمون آماری مشخص شد که میزان بیان رونوشت ژن CD29 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیشتر است ($P < 0.05$)؛ اما این آزمون تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان ژن CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به مغز استخوان نشان نداد ($P = 0.132$) هر چند که میزان بیان در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به مغز استخوان بیشتر بود.

آنالیز آماری بیان ژن‌ها: با توجه به وجود تفاوت در میزان کارایی واکنش برای ژن‌های هدف و مرجع و همچنین مزیت‌های روش آنالیز Pfaffl بر روش Comparative C_T method (delta C_T) از جمله محاسبه و به‌کارگیری کارایی واکنش‌ها در محاسبات، داده‌ها با استفاده از روش Pfaffl مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا داده‌ها به نرم‌افزار اکسل منتقل شده و در فرمول مربوطه قرار گرفتند.

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{Ttarget}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta C_{Tref}(control-sample)}}$$

با استفاده از این روش نسبت بیان ژن‌های هدف با استفاده از کارایی واکنش‌ها و تفاضل مقادیر سیکل آستانه مربوط به نمونه‌های بافت چربی از مقادیر سیکل آستانه مربوط به نمونه‌های مغز استخوان (که به‌عنوان بافت کنترل یا کالیبراتور فرض گردید) نسبت به ژن مرجع MHC-I تعیین شد. داده‌های به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون Mann-Whitney (به دلیل توزیع غیرنرمال) آنالیز شدند و $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

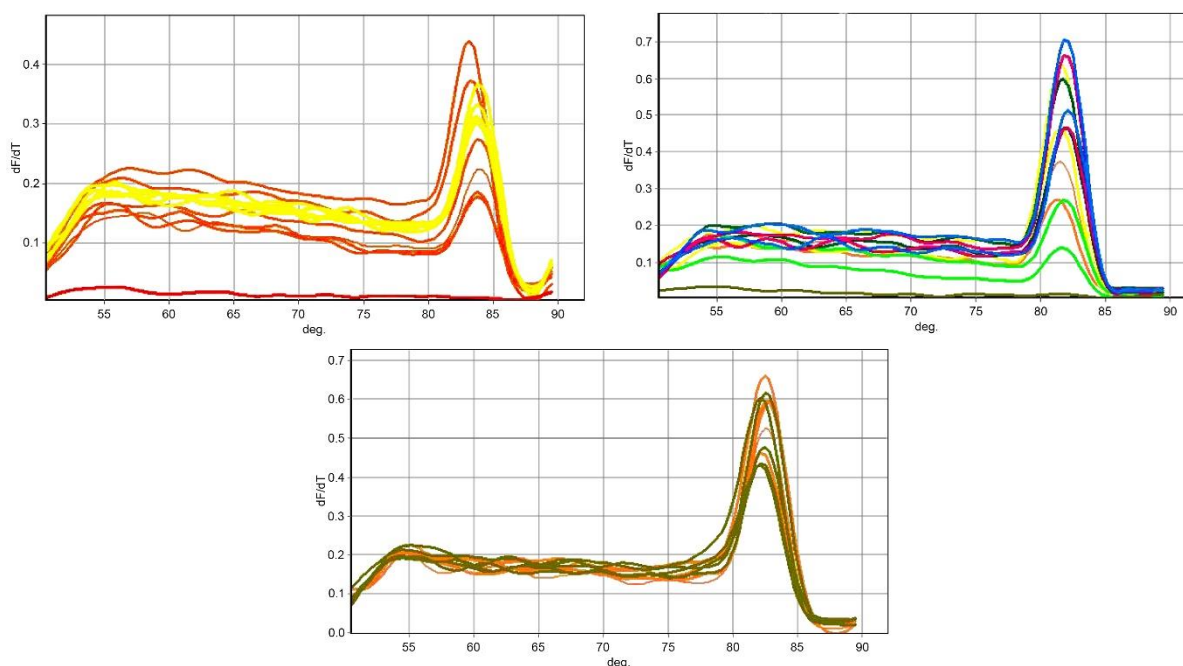
نتایج

بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده و عدم آلودگی به DNA ژنومی: نتایج نانودراپ و حضور باندهای ۲۸S و ۱۸S در راندن RNA استخراجی بر روی ژل آگارز نشان‌دهنده کیفیت مناسب و عدم تخریب RNA بود. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به نمونه‌های دارای آلودگی به Genomic DNA و نمونه‌های استخراج شده با کیت High Pure نشان‌دهنده این بود که با DNase treatment انجام شده طی مراحل استخراج RNA آلودگی به DNA از بین رفته است.

بررسی صحت عملکرد آغازگرها با ارزیابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های مختلف، نشان‌دهنده اتصال صحیح آغازگرها، تکثیر قطعات مورد نظر و عدم تکثیر قطعات ناخواسته بود. علاوه بر این، بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تمام نمونه‌های cDNA و با استفاده از آغازگر GAPDH، نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی ژنومی، صحت انجام واکنش رونویسی معکوس و ساخته‌شدن cDNA برای هر ۶ نمونه RNA بود.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگرهای ژن‌های مورد مطالعه.

نام ژن	GenBank Accession Numbers	توالی	دمای اتصال آغازگر	طول قطعه تکثیرشده (از cDNA)	ردیف
CD29	XM_001492665	F:AATCGGGACAAGTTACCTCA R: CTTCCAAATCAGCAGCAAT	۵۶/۵	۲۳۴ bp	۱
MHC-I	NM_001123381	F: CTGGGTCTCCCTGTCGTTG R: CCTGGGCACTGTCACTG	۵۶/۵	۱۱۰ bp	۲
CD90	XM_001503225	F: AGAATACCACCGCCACA R: GGATAAGTAGAGGACCTTGATG	۵۶/۵	۱۵۵ bp	۳

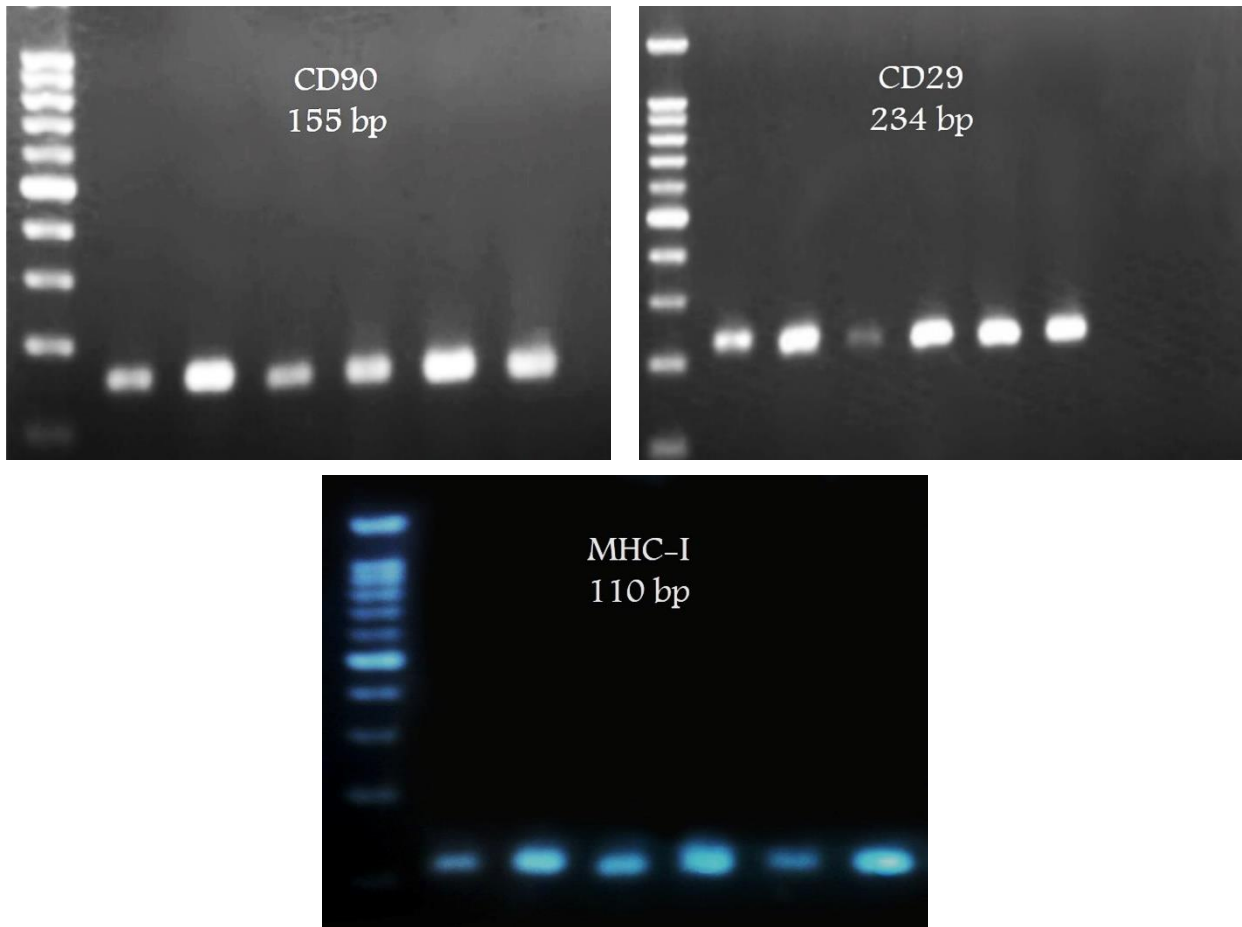


تصویر ۱. منحنی‌های ذوب مربوط به ژن‌های مورد مطالعه. وجود یک پیک در منحنی ذوب، نشان‌دهنده اختصاصی بودن تکثیر محصولات در حین واکنش است و در واقع نشان‌دهنده عدم حضور پرایمر - دایمر و محصولات ناخواسته است. تصویر ۱-الف مربوط به ژن CD90 تصویر ۱-ب مربوط به ژن CD29 و تصویر ۱-ج مربوط به ژن MHC-I است.

در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی اسب تفاوتی ندارد ولی میزان بیان ژن CD29 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بیشتر از سلول‌های مغز استخوان بود. همچنین میزان بیان ژن CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بیشتر از مغز استخوان بود، هر چند که این تفاوت معنی‌دار نبود. عدم ثبات بیان ژن‌های مرجع شامل GAPDH، ACTB و B2M در دو گروه سلولی بنیادی مزانشیمی با منشأ مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ بافت چربی، قبلاً مورد ارزیابی قرار گرفته بودند و مشخص شده بود که از ثبات برخوردار نمی‌باشند. (۲۴).

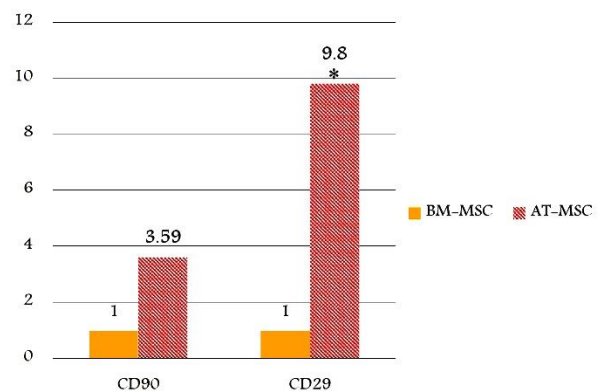
بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلورژن منبع سلولی امیدوار کننده‌ای در درمان جراحات ارتوپدیک اسب‌ها می‌باشند. این سلول‌ها از منابع متفاوتی جداسازی می‌شوند و بافت چربی و مغز استخوان منابع اصلی این سلول‌ها می‌باشند. (۲۲)، اما هنوز بر سر این که کدام منبع برای ایجاد بانک سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلورژن مناسب‌تر است توافقی وجود ندارد (۲۳). می‌توان از روش qPCR با بررسی‌های کمی نشانگرها و مشخصات مولکولی خاص سلول‌های بنیادی با منبع جداسازی متفاوت به منظور پیش‌بینی رفتارهای بیولوژیک آن‌ها استفاده کرد (۲۵). در مطالعه حاضر مشخص شد که بیان ژن MHC-I



تصویر ۲. ژل الکتروفورز، محصولات تولید شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی را نشان می‌دهد. وجود تنها یک باند اختصاصی بیانگر تأیید واکنش و تکثیر یک محصول است. تصویر ۲-الف مربوط به ژن CD90، تصویر ۲-ب مربوط به ژن CD29 و تصویر ۲-ج مربوط به ژن MHC-I است.

علیرغم فواید استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلون در درمان صدمات مفصلی اسب‌ها شواهدی وجود دارد مبنی بر این‌که این سلول‌ها در انسان، موش و اسب هم در شرایط درون تنی و هم برون تنی ایمونوژنیک می‌باشند (۲۶). عامل اصلی در رد پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ناسازگاری بین مولکول‌های MHC متعلق به سلول بنیادی مزانشیمی فرد دهنده و گیرنده است (۲۷). با توجه به این‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب در مورد بیان MHC-II هتروژن می‌باشند و سلول‌های مورد مطالعه در این مطالعه بیانی از این مولکول نداشتند (بر اساس آزمایش تعیین هویت سلول‌ها)، بنابراین مولکول MHC-I نقش مهمی در شناسایی و رد پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد. لنفوسیت‌های T، B و سلول‌های کشنده طبیعی قادر به شناسایی مولکول MHC-I سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلون در محیط برون تنی می‌باشند و می‌توانند عاملی در رد پیوند این سلول‌ها در



تصویر ۳. مقادیر نسبت بیان مربوط به ژن‌های CD90 و CD29 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان نشان می‌دهد که به ترتیب برابر با ۳/۵۹ ($P > 0.05$) و ۹/۸ ($P < 0.05$) بودند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از نظر بیولوژیک حائز اهمیت است.

استاندارد فعلی درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انسان، شامل تزریقات متعدد و با روش‌های تجویز مختلف است. در اسب نیز تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی عوارض حادی در پی ندارد (۳۱) و می‌تواند به‌صورت مطمئن و در ترکیب با سلول درمانی موضعی برای بهبود آسیب‌های درماتولوژیک و بهبود تاندون‌های آسیب دیده مورد استفاده قرار گیرد. در تجویز داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مسئله لانه‌گزینی یا homing و مهاجرت به بافت هدف وجود دارد که مرحله اتصال به دیواره عروق در این روند تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله مولکول‌های چسبندگی است. CD44، CD49d، و CD29 مولکول‌های چسبندگی می‌باشند. که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان می‌شوند و در رابطه با گیرنده‌های P-selectin و VCAM-1 و یا پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی موجب اتصال به سلول‌های اندوتلیوم و یا ارتباط با ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. این مولکول‌ها مهم‌ترین مولکول‌های مؤثر در لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند. از بین این مولکول‌ها، در حالی که نقش CD29 در مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به اثبات رسیده است، در نقش سایر مولکول‌ها تردید وجود دارد (۳۲). در مطالعه حاضر، بررسی کمی میزان رونوشت ژن CD29 نشان از تفاوت معنی‌دار در میزان رونوشت این مولکول در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به مغز استخوان داشت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی mRNA ژن CD29 را حدود ۹/۸ برابر بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت مغز استخوان بیان کردند. تفاوت در بیان mRNA مولکول‌های چسبندگی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی می‌تواند نشان دهنده ویژگی‌های متفاوت این سلول‌ها در لانه‌گزینی باشد که دارای پیامدهای مهمی در درمان‌های مبتنی بر سلول است (۳۳). با توجه به نقش مهم CD29 در لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که احتمالاً سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در مهاجرت به بافت صدمه دیده بهتر عمل می‌کنند. اما با توجه به نقش سایر عوامل مؤثر در لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل گیرنده‌های کموکاین و پروتئازها برای قضاوت بهتر در خصوص مهاجرت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منابع مختلف نیاز است تا این عوامل نیز بررسی گردند. میزان رونوشت بیشتر CD29 به عنوان فراوان‌ترین اینتگرین بیان شده بر سطح

محیط درون تنی باشند (۲۸). مطالعه حاضر بیان ژن MHC-I در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تفاوت مشخصی را نشان نداد تا حدی که این ژن به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌های سایر ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر اثر مهم میزان بیان ژن MHC-I، تحریک سیستم ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط درون تنی تحت عوامل دیگری نیز می‌باشد. علاوه بر تعداد سلول‌های تزریقی به محل، شرایط عفونی بودن یا ایسکمیک بودن محیطی که سلول‌ها به آن وارد می‌شوند نیز مهم است. وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط التهابی مثل تحریک توسط IFN- γ قرار بگیرند، ویژگی سرکوب ایمنی در آن‌ها افزایش می‌یابد و از سوی دیگر بیان بیشتری از مولکول‌های MHC-I خواهند داشت که موجب افزایش لیز با واسطه لنفوسیت‌های CD8⁺ T خواهد شد. برخی مطالعات با توجه به محیط پذیرنده و اثر IFN- γ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را ایمونوژنیک‌تر دانسته‌اند (۲۹). بنابراین، برای قضاوت در مورد تحریک سیستم ایمنی توسط این سلول‌ها و مقایسه این ویژگی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط درون تنی، علاوه بر توجه به سطوح اولیه بیان ژن MHC-I نیاز است تا به عوامل دیگری همانند محیطی که سلول‌ها به آن وارد می‌شوند، نیز توجه شود. در نهایت، باید توجه داشت که به منظور مقایسه دقیق ایمنی‌زایی در این سلول‌ها توجه و بررسی واسطه‌های تعدیل ایمنی نیز ضروری به نظر می‌رسد. CD90 یا Thy-1 به عنوان یک نشانگر بنیادی بودن سلول مورد توجه است و نقش آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت واضح مشخص نشده است. می‌توان با هدف رسیدن به فنوتیپی که بر اساس آن بتوان رفتار سلولی را پیش‌بینی کرد، از نشانگرهای سطحی برای پیش‌بینی توانایی تمایزی بهره برد و در واقع به منظور رسیدن به تمایز بهتر به بافت مورد نظر بدون کشت سلول‌ها در محیط آزمایشگاه به جمعیتی هموژن رسید (۲۹). برخی مطالعات با تقسیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به دو دسته CD90⁺ و CD90⁻ و با بررسی و مقایسه رنگ‌آمیزی خاص بافت استخوان و همچنین بیان ژن‌های نشان دهنده تمایز به استخوان اثبات کرده‌اند که تمایز به استخوان در سلول‌های CD90⁺ بیشتر از CD90⁻ است (۳۰). در مطالعه حاضر، بیان این ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، هرچند تفاوت ۳/۶ برابری بیان در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به

اسب در بیان برخی از ژن‌ها مشابه و در بیان برخی متفاوت از یکدیگر می‌باشند و این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت‌های اساسی بین این سلول‌ها باشد چرا که تفاوت در الگوی بیان ژنی، بر خصوصیات رفتاری، توان تمایزی و مهاجرت سلول‌ها بسیار تأثیرگذار است. تفاوت‌هایی که می‌تواند منجر به رفتار و واکنش‌های متفاوت این سلول‌ها در شرایط درون و برون تنی و متعاقباً تفاوت در کارایی درمان‌های مبتنی بر سلول شود که بایستی به‌طور جد در پروتکل‌های سلول‌درمانی مورد توجه قرار گیرد. بر اساس داده‌های حاصل شده در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که سلول‌های با منشأ بافت چربی برای سلول‌درمانی از ارجحیت بیشتر برخوردار باشند.

سیاسگزاری

از دانشگاه فردوسی مشهد برای تامین مالی این مطالعه تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از جنبه دیگری نیز قابل توجه است. به‌علت نقش مهم CD29 در سیگنالینگ مربوط به رفتارهای سلولی همچون تکثیر، ممکن است میزان رونوشت بالاتر CD29، نشان دهنده اتصال مؤثرتر سلول بنیادی مزانشیمی بافت چربی به فیبرینوژن پوشاننده کف فلاسک و توجیه کننده سرعت بالای تقسیم در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط آزمایشگاه باشد. همچنین انتظار می‌رود در صورت تزریق داخلی مفصلی این سلول‌ها اتصال به بافت پذیرنده بهتر بوده و این اتصال بهتر، کیفیت تکثیر و تمایز این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. حتی برخی معتقدند با کشت همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های اندوتلیال میزان بیان CD29 در آن‌ها افزایش یافته و در پی آن انتقال سیگنال‌های سلولی، سازمان‌دهی اسکلت سلولی و مهاجرت این سلول متأثر می‌شود (۲۱).

نتیجه‌گیری: بنابراین با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان

References

- Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C.N., Atkinson, M., Sayegh, M.H. (2008). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 57, 1759-1767. <https://doi.org/10.2337/db08-0180>
- Al-Nbaheen, M., Ali, D., Bouslimi, A., Al-Jassir, F., Megges, M., Prigione, A., Adjaye, J., Kassem, M., Aldahmash, A. (2013). Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep*, 9, 32-43. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9365-8>
- Aldridge, V., Garg, A., Davies, N., Bartlett, D.C., Youster, J., Beard, H., Kavanagh, D.P., Kalia, N., Frampton, J., Lalor, P.F. (2012). Human mesenchymal stem cells are recruited to injured liver in a β 1-integrin and CD44 dependent manner. *Hepatology*, 56, 1063-1073. <https://doi.org/10.1002/hep.25716>
- Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*, 32, 252. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
- Berglund, A.K., Fisher, M.B., Cameron, K.A., Poole, E.J., Schnabel, L.V. (2017). Transforming growth factor- β 2 downregulates major histocompatibility complex (MHC) I and MHC II surface expression on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells without altering other phenotypic cell surface markers. *Front Vet Sci*, 4, 84. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00084>
- Bocelli-Tyndall, C., Bracci, L., Schaeren, S., Feder-Mengus, C., Barbero, A., Tyndall, A., Spagnoli, G.C. (2009). Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann Rheum Dis*, 68, 1352-1359. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.094003>
- Broeckx, S.Y., Seys, B., Suls, M., Vandenberghe, A., Mariën, T., Adriaensen, E., Declercq, J., Van Hecke, L., Braun, G., Hellmann, K. (2019). Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells are an effective treatment for degenerative joint disease in horses. *Stem Cells Dev*, 28, 410-422. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0061> PMID: 30623737
- Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*, 21, 1045-1056. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.115> PMID: 20565251
- De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G.R., Van Soom, A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, 75, 1431-1443. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.008>
- De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Fraser, J.K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*, 89, 267-270. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(03)00108-1)
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., Galipeau, J. (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*, 106, 4057-4065. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1004>

12. Gebler, A., Zabel, O., Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*, 18, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004>
13. Gimble, J.M., Katz, A.J., Bunnell, B.A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100, 1249-1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
14. Godwin, E., Young, N., Dudhia, J., Beamish, I., Smith, R. (2012). Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*, 44, 25-32. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x>
15. Hosoya, A., Hiraga, T., Ninomiya, T., Yukita, A., Yoshida, K., Yoshida, N., Takahashi, M., Ito, S., Nakamura, H. (2012). Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol*, 137, 733-742. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0928-1>
16. Ip, J.E., Wu, Y., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R.E., Dzau, V.J. (2007). Mesenchymal stem cells use integrin $\beta 1$ not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*, 18, 2873-2882. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0166> PMID: 17507648
17. Kawamoto, K., Konno, M., Nagano, H., Nishikawa, S., Tomimaru, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Obayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. (2013). CD90-(Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Dis Markers*, 35, 573-579. <https://doi.org/10.1155/2013/392578> PMID: 24282338
18. Ke, C., Chen, J., Guo, Y., Chen, Z.W., Cai, J. (2015). Migration mechanism of mesenchymal stem cells studied by QD/NSOM. *BBA-Biomembranes*, 1848, 859-868. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2014.12.013>
19. Alipour, F., Parham, A., Mehrjerdi, H.K., Dehghani, H. (2015). Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell J*, 16, 456-465. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.491> PMID: 25685736
20. Zahedi, M., Parham, A., Dehghani, H., Mehrjerdi, H.K. (2017). Stemness signature of equine marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells*, 10, 93. <https://doi.org/10.15283/ijsc.16036> PMID: 28222255
21. Yamamoto, M., Nakata, H., Hao, J., Chou, J., Kasugai, S., Kuroda, S. (2014). Osteogenic potential of mouse adipose-derived stem cells sorted for CD90 and CD105 in vitro. *Stem Cells Int*, 2014, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2014/576358>
22. Padmanabhan, S. (2014). *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. (1sted.), Academic Press, Elsevier, London, p. 207-228.
23. Poitz, D.M., Stölzel, F., Arabanian, L., Friedrichs, J., Docheva, D., Schieker, M., Fierro, F.A., Platzbecker, U., Ordemann, R., Werner, C., Bornhäuser, M., Strasser, R. H., Ehninger, J., Illmer, T. (2013). MiR-134-mediated $\beta 1$ integrin expression and function in mesenchymal stem cells. *BBA-Mol Cell Res*, 1833, 3396-3404. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.003>
24. Nazari, F., Parham, A., Maleki, A.F. (2015). GAPDH, β -actin and $\beta 2$ -microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose-and marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anim Sci Technol*, 57, 18. <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0050-8> PMID: 26290738
25. Ranera, B., Antczak, D., Miller, D., Doroshenkova, T., Ryan, A., McIlwraith, C., Barry, F. (2016). Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes. *Equine Vet J*, 48, 253-260. <https://doi.org/10.1111/evj.12414>
26. Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martín-Burriel, I. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunop*, 144, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.033>
27. Rees, J., Wilson, A., Wolman, R. (2006). Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology*, 45, 508-521. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ke1046>
28. Roemeling-van Rhijn, M., Reinders, M.E., Franquesa, M., Engela, A.U., Korevaar, S.S., Roelofs, H., Genever, P.G., IJzermans, J.N., Betjes, M.G., Baan, C.C., Weimar, W., Hoogduigin, J. (2013). Human allogeneic bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells induce CD8+ cytotoxic T cell reactivity. *J Stem Cell Res Ther*, S6:004, 1-7. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.S6-004> PMID: 24729944
29. Reinders, M.E., Roemeling-van Rhijn, M., Khairoun, M., Lievers, E., de Vries, D.K., Schaapherder, A.F., Wong, S.W., Zwaginga, J.J., Duijs, J.M., van Zonneveld, A.J., Hoogduigin M.J., Fibbe, W.E., de Fijter, J.W., van Kooten, C., Rabelink, T.J., Roelofs, H. (2013). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with end-stage renal disease are suitable for autologous therapy. *Cytotherapy*, 15, 663-672. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.010>
30. Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R.J., Bistrián, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J., Henschler, R. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108, 3938-3944. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098> PMID: 16896152
31. Petrov, A., Beer, M., Blome, S. (2014). Development and validation of a harmonized TaqMan-based triplex real-time RT-PCR protocol for the quantitative detection of normalized gene expression profiles of seven porcine cytokines. *PloS One*, 9, e108910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108910> PMID: 25268123
32. Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J.B., Fortier, L.A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/s13047-014-0040-2>
33. Wiesmann, A., Bühring, H.-J., Mentrup, C., Wiesmann, H.-P. (2006). Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med*, 2, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-2-8>



Comparative Analysis of the Expression of MHC-I, CD90, and CD29 in Equine Adipose-Derived and Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Fatemeh Nazari¹, Abbas Parham^{1,2}, Adham Fani Maleki¹

¹ Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

doi [10.22059/jvr.2020.293443.2997](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.293443.2997)

Received: 27 February 2021, Accepted: 10 May 2021

Abstract

BACKGROUND: Several studies have reported the application of mesenchymal stem cells (MSCs) for the treatment of equine musculoskeletal disorders. Bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) are the main sources for isolation of MSCs. Although the MSCs derived from various sources have similarities, certain differences have been reported in terms of biological, proliferative, immunological, and differentiative characteristics. They are also different concerning gene expression profiles. So, comparative gene expression analysis on mRNA level via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) is believed to be of great value for better characterization of MSCs from different sources.

OBJECTIVES: We conducted the current study to evaluate gene expression analysis of MHC-I, CD90, and CD29 genes in equine AT- and BM-derived MSCs, which are effective on immunogenicity, osteogenesis and homing, respectively.

METHODS: For this purpose, BM- and AT-derived MSCs of three mares were utilized. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized. Subsequently, the expression level of the target genes was analyzed with qPCR.

RESULTS: The result of gene expression in these cells revealed that expression of MHC-I was invariant ($P>0.05$) and the expression of CD29 was different between AT- and BM-derived MSCs ($P<0.05$). Although the expression value of CD90 was invariant ($P=0.132$), the expression level of this gene was 3.59 folds higher in AT-MSCs compared to that in BM-MSCs, which could have important biological effects on migration and differentiation potentials.

CONCLUSIONS: Our results suggested that MSCs isolated from AT and BM probably preserve tissue-specific gene expression differences, which might contribute to different functional potentials and have important implications for cell-based therapies.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Equine, CD90, MHC-I, CD29

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: parham@um.ac.ir Tel/Fax: 051-38805600

How to cite this article:

Nazari, F., Parham, A., Fani Maleki, A. (2021). Comparative Analysis of the Expression of MHC-I, CD90, and CD29 in Equine Adipose-Derived and Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Vet Res*, 76(2), 250-259. <https://doi.org/10.22059/jvr.2020.293443.2997>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Details of the primers used for the analysis.

Figure 1. Melting curves of the analyzed genes. Only one peak in the curve shows that the amplification is specific and there is no primer dimer and unspecific products. A) CD90, B) CD29, and C) MHC-1.

Figure 2. Representative gel electrophoresis depicts the size of all the generated qPCR products. Only one band confirms that the amplified product is specific. A) CD90, B) CD29, and C) MHC-1.

Figure 3. Expression ratios of CD90 and CD29 in adipose-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) relative to bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSC) were 3.59 ($P>0.05$) and 9.8 ($P<0.05$), respectively.