

The Modulatory Role of Endogenous IL-24/mda-7 in Inflammatory Response of Human Hepatic Stellate Cell (HSC), LX2

Iman Jamhiri¹, Saber Zahri², Davood Mehrabani³, Zahra Khodabandeh⁴, Ramin Yaghobi⁵, Seyed Younes Hosseini^{6*}

1. Ph.D Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Professor, Ph.D in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3. Assistant Professor, Ph.D in Pathology, Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
4. Assistant Professor, Ph.D in Anatomy, Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
5. Associate Professor, Ph.D in Medical Virology, Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
6. Assistant Professor, Ph.D in Medical Virology, Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 9 Oct 2017, Accepted: 16 Dec 2017

Abstract

Background: High morbidity and limited therapies of hepatic fibro genesis are important factor for better understanding the molecular mechanisms of the disease. Advances in the understanding of the molecular behavior of hepatic stellate cells (HSC) allow the progress of a field dedicated to anti-fibrotic therapy. Melanoma differentiation associated gene-7 (IL-24/mda-7) as a gene induced during terminal differentiation in human melanoma cells, but the inflammatory response of cells to IL-24/mda-7 is not entirely cleared.

Materials and Methods: LX-2 cells (a human hepatic stellate cell) were treated by leptin (positive control), media (control negative), or were transfected by empty plasmid and pcDNA3.1/mda-7. The inflammatory state was evaluated through measuring the mRNA expression level of inflammatory molecule, IL-1 β . The role of IL-24/mda-7 modulation on inflammatory response was assayed using SOCS1 and SOCS3 gene expressions.

Results: The expression levels of IL-1 β , SOCS1 and SOCS3 were compared in LX-2 cell line groups. The expression of the IL-1 β in the transfected cells was higher than the control cell, but it was not significant. The results indicated that the expressions of SOCS1 and SOCS3 were up-regulated following pcDNA 3.1/mda-7 transfection into LX-2 cells compared to control plasmids (p=0.0179, p=0.0428).

Conclusion: The endogenous IL-24/mda-7 exhibited a significant modulatory effect on stellate cells. Therefore, IL-24/mda-7 and relevant signaling pathways could be employed as a target for fibrosis treatment.

Keywords: Human Hepatic Stellate Cells, IL-1 β , IL-24/mda-7, LX-2, SOCS1, SOCS3

*Corresponding Author:

Address: Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: hoseiniy@sums.ac.ir

نقش تنظیمی IL-24/mda-7 درون‌زاد بر پاسخ التهابی سلول‌های ستاره‌ای کبدی LX-2، (HSC)

ایمان جمهیری^۱، صابر زهری^۲، داود مهربانی^۳، زهرا خدابنده^۴، رامین یعقوبی^۵، سید یونس حسینی^{۶*}

۱. دانشجوی دکتری سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲. استاد، دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳. استادیار، دکتری پاتولوژی، مرکز تحقیقات فناوری‌های سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴. استادیار، دکتری آناتومی، مرکز تحقیقات فناوری‌های سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۵. دانشیار، دکتری ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پیوند اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۶. استادیار، دکتری ویروس‌شناسی پزشکی، گروه باکتری و ویروس، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۷، تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: میزان بالای بیماری فیروز کبدی و درمان‌های محدود آن عامل مهمی برای فهم بهتر مکانیسم‌های مولکولی این بیماری می‌باشد. پیشرفت در درک جنبه‌های مولکولی سلول‌های کبدی (HSC) یک زمینه‌ی اختصاصی در درمان فیروز کبدی فراهم می‌کند. ژن IL-24 (IL-24/mda-7) اولین بار به عنوان یک ژن تمایز دهنده انتهایی در سلول‌های ملونوما مطرح شد، اما پاسخ التهابی سلول‌ها به این ژن به طور کامل روشن نشده است.

مواد و روش‌ها: سلول LX-2 (سلول ستاره‌ای کبد انسان، HSC) با لپتین (کنترل مثبت) و محیط خالی (کنترل منفی) مواجه شدند. هم‌چنین این سلول‌ها با پلاسمید خالی (pcDNA 3.1) و وکتور حاوی ژن IL-24/mda-7 (pcDNA 3.1/IL-24/mda-7) ترانسفکت شدند. میزان التهاب این سلول‌ها با بررسی بیان ژن IL-1 β ، با کمک روش Real-time RT-PCR ارزیابی شد. هم‌چنین، نقش تنظیمی IL-24/mda-7 بر روی التهاب با بررسی بیان ژن های SOCS1 و SOCS3 مشخص شد.

یافته‌ها: سطح بیان IL-1 β ، SOCS1 و SOCS3 در گروه‌های سلولی اندازه‌گیری و مقایسه شد. هر چند سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید بیانی میزان بالاتری از IL-1 β را نشان دادند، اما این تفاوت نسبت به گروه کنترل معنادار نبود. نتایج نشان داد که بیان SOCS1 و SOCS3 در گروه سلولی که با pcDNA3.1/mda-7 ترانسفکت شده اند، نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری دارد (p = ۰/۰۴۲۸، p = ۰/۰۱۷۹).

نتیجه‌گیری: بیان درون‌زاد IL-24/mda-7 به طور معناداری باعث تنظیم مسیر التهابی در سلول‌های ستاره‌ای کبدی می‌گردد. بنابراین IL-24/mda-7 و مسیرهای سیگنالینگ مربوطه می‌توانند به عنوان یک هدف در درمان فیروز مورد توجه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سلول ستاره‌ای کبدی (HSC)، LX-2، IL-24/mda-7، IL-1 β ، SOCS1، SOCS3

*نویسنده مسئول: ایران، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه باکتری و ویروس

Email: hoseiniy@sums.ac.ir

مقدمه

فیروز کبدی بیماری می‌باشد که امکان دارد در هر سن رخ دهد و در نهایت می‌تواند منجر به سیروز کبدی گردد (۱). فیروز کبدی معمولاً در پی التهاب مزمن ایجاد می‌شود و در صورت ادامه‌دار شدن این التهاب، فیروز کبدی و در نهایت سیروز کبدی ایجاد می‌شود (۲). هپاتیت-های مزمن کبدی و هپاتیت‌های خودایمن از بیماری‌های خود ایمن کبد به حساب می‌آیند که مطالعات اشاره داشته‌اند القای سرکوب فعالیت ایمنی با کمک حذف عامل التهابی هم‌چون ویروس، می‌تواند منجر به توقف فرآیند فیروز کبدی و یا حتی معکوس شدن این فرآیند گردد (۳). درمان‌هایی که برای التهاب کبدی مزمن وجود دارد در مورد خصوصیت‌های ضد فیروزی طراحی نشده است، ولی استفاده از این درمان‌ها می‌تواند در کاهش کارسینومای هپاتوسلولار و فیروز کبدی دارای اهمیت باشد (۴، ۵). مسیرهای مولکولی در مورد ارتباط بین فیروز کبدی و التهاب کبدی مزمن در حال بررسی است و این زمینه می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در درمان مستقیم فیروز کبدی در نظر گرفته شود (۶). تعدیل مکانیسم‌های ایمنی در این درمان‌ها می‌تواند با کمک موادی که کاهش دهنده‌ی استرس اکسیداتیو، تعدیل فعال سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSC)، کاهش تکثیر میوفیبروبلاست‌ها و افزایش حذف ماتریکس خارج سلولی است، صورت گیرد (۴، ۶).

پروتئین IL-24 به همراه IL-10، IL-19، IL-20، IL-22، IL-26، IL-28 و IL-29 یک عضو از خانواده‌ی IL-10 می‌باشد. در ابتدا این پروتئین را به دلیل حضور در سلول‌های ملانوما، پروتئین-۷ وابسته به تمایز ملانوما (Mda-7) نام‌گذاری کردند. ژن IL-24/mda-7 بر روی کروموزوم ۱ قرار دارد و محصول این ژن با دو رپتور هترودایمر (IL-20R1/IL-20R2 و IL-22R1/IL-20R2) برهمکنش می‌دهد (۷، ۸). اتصال پروتئین IL-24/mda-7 با هر دو کمپلکس رپتوری، مشابه با دیگر اعضای خانواده‌ی IL-10 می‌تواند منجر به فعال شدن STAT3 گردد. پروتئین IL-24/mda-7

می‌تواند به طور طبیعی و تحت تاثیر محرک‌های مناسب در برخی رده‌های سلولی مثل ملانوسیت‌ها، کراتینوسیت‌های پوستی و منوسیت‌هایی که تحت تاثیر LPS قرار گرفته‌اند بیان شود. با این وجود، مکانیسم تنظیم و القا بیان به خوبی روشن نشده است (۹، ۱۰). از طرفی، IL-24/mda-7 به عنوان یک سیتوکاین پلئوتروپیک با اثرهای متفاوت در سلول‌های ایمنی، اپیتلیال و سرطانی معرفی شده است. از جمله این اثرها می‌توان مثلاً به پاسخ‌های ضد باکتریایی، ترمیم زخم، بازسازی بافت‌ها و اثرات ضد توموری اشاره کرد (۸).

گزارش‌های رو به رشدی نیز در مورد درمان دارویی موثر و داروهای که با آدنووایروس‌های بیان‌کننده‌ی IL-24/mda-7 همراه می‌شوند در کنترل سرطان‌های کبد، ریه، کلورکتال، سرویکس، سرطان سر و گردن و استئوسارکوما وجود دارد (۱۱، ۱۲). لازم به ذکر است که در مطالعات مختلف از رده‌ی سلولی LX-2 به عنوان مدل سلولی HSC استفاده شده است و نشان داده شده است که می‌توان این سلول‌ها را با کمک مواجهه با لپتین به سلول‌های فعال (فنوتیپ فیبروژنیک) تبدیل کرد (۱۳). در مطالعات مختلف، پروتئین IL-24/mda-7 به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی پاسخ ایمنی مطرح شده است. با این وجود نقش التهابی این سیتوکاین به خوبی در سلول‌های کبدی مشخص نشده است. در این مطالعه، با هدف بررسی اثرات التهابی IL-24/mda-7 در سلول‌های استیل کبدی و نقش تنظیمی آن، بیان ژن‌های IL-1 β ، SOCS1 و SOCS3 در رده‌ی سلولی مرتبط HSC (LX-2) مورد بررسی قرار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌ها: رده‌ی سلولی LX-2 (رده سلولی نامیرا HSC انسانی) از پروفیسور Friedman Scott (Mount Sinai school of medicine, New York, USA) به صورت هدیه دریافت شد. این سلول‌ها، در محیط کشت Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM Gibco USA) با ۷ درصد

شدن ۷۰ درصد سطح چاهک ها توسط سلول ها، ترانسفکشن صورت گرفت. ترانسفکشن با ۲/۵ میکروگرم DNA پلاسمیدی به همراه حجم دو برابر از Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Inc, USA) در محیط کشت خالی از FBS طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. پس از ۷ ساعت از ترانسفکشن، محیط کشت با محیط کشت کامل و تازه جایگزین شد و سلول ها پس از ۴۸ ساعت برای بررسی بیان ژن مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج RNA، سنتز CDNA، Real-Time RT-PCR، گروه های سلولی را جهت استخراج RNA تام، با کمک تریسین جمع آوری و سپس با کیت RNX-plus (سینازن) RNA سلول ها استخراج شد. یک میکروگرم از RNA استخراج شده با کمک کیت RevertAaid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) طبق دستورالعمل کیت جهت سنتز CDNA استفاده شد. واکنش real-time PCR (qRT-PCR) با کمک آنزیم RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon, Inc) و با استفاده از دستگاه applied Biosystems StepOne™ (USA) صورت گرفت.

جهت بررسی بیان ژن های هدف، جفت پرایمرهای $IL-1\beta$ ، SOCS1، SOCS3 به عنوان فاکتورهای التهابی و PGK به عنوان کنترل داخلی توسط نرم افزار آنالاین Primer-BLAST (NCBI) طراحی شد (جدول ۱). از آب به عنوان کنترل منفی واکنش PCR در هر دور از واکنش PCR برای هر ژن استفاده شد. مخلوط واکنش بر اساس پروتکل پیشنهادی آماده شد. برنامه زمانی - گرمایی دستگاه طبق مراحل زیر انجام شد؛ مرحله اول، واسرشته شدن مولکول های CDNA به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی بود و در مرحله آخر ضمن بررسی نمودار ذوب، محصولات توسط الکتروفورز در سطح ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

Fetal Bovine Serum (Sigma, St.Louis, USA) و در حضور پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) و استریتومایسین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند. سلول های LX-2 تا زمانی که به ۷۰ تا ۸۰ درصد از رشد مورد نظر برسند، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن گرماگذاری شدند. انتقال حامل ها به رده سلولی LX-2 (pcDNA 3.1/mda-7) در این مطالعه، حامل نو ترکیب pcDNA 3.1/mda-7 و حامل غیر نو ترکیب pcDNA 3.1 به باکتری DH5 α ترانسفورم شدند. حامل ها در مطالعه ی دیگری در آزمایشگاه ما تولید شده بودند و توضیحات کامل در مورد آماده سازی حامل ها در آن مطالعه آورده شده است (۱۴). باکتری های ترانسفورم شده در محیط لوریانی برانت (LB) حاوی آمپلی سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در داخل انکوباتور چرخان کشت داده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت NucleoBond® XtraMidi EF (Macherey-Nagel, German) انجام شد. به منظور تأیید وجود ژن بر روی وکتور pcDNA 3.1، از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های هضم کننده ی BamHI و XhoI به صورت تکی و دو تایی استفاده شد. محصولات استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی بوسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی گردید و به منظور تأیید نهایی تعیین توالی گردید (Macrogen, Korea). جهت انتقال حامل ها به رده سلولی از روش لیپوفکشن استفاده گردید. در این روش، وکتورهای آماده شده با کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون سلول های LX-2 ترانسفکت شدند. سلول ها به ۴ گروه تقسیم شدند. در گروه ۱ سلول های LX-2 بدون چالش خاص، گروه ۲ سلول های LX-2 کنترل مثبت دریافت کننده لپتین، گروه ۳ سلول های LX-2 ترانسفکت شده با pcDNA 3.1 خالی و گروه ۴ سلول هایی ترانسفکت شده با pcDNA 3.1/mda-7 حضور داشتند. برای ترانسفکشن، سلول های LX-2 در پلیت ۶-خانه (۱۰۵ × ۲/۵ سلول به ازای هر خانه) ریخته، پس از پر

جدول ۱. پرایمرهای Real-time PCR

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
IL-1 β	Forward: 5'-ATGGGATAACGAGGCTTATGTG-3' Reverse: 5'-CAAGGCCACAGGTATTTTGTG-3'	208
SOCS1	Forward: 5'-TTCGCCCTTAGCGTGAAGATGG-3' Reverse: 5'-TAGTGCTCCAGCAGCTCGAAGA-3'	125
SOCS3	Forward: 5'-AGACTTCGATTCCGGACCA-3' Reverse: 5'-GGAAACTTGCTGTGGGTGA-3'	131
PGK	Forward: 5'-TAAAGCCGAGCCAGCCAAAA-3' Reverse: 5'-CTCCTACCATGGAGCTGTGG-3'	116

طرفه انجام شد. در همه موارد، مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

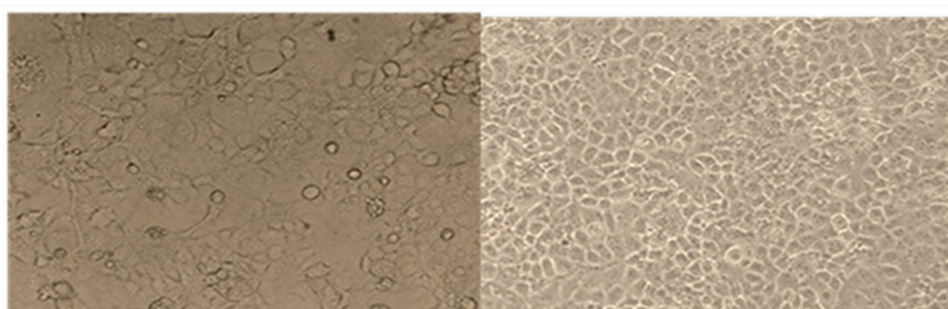
وکتورها، جهت تکثیر در باکتری *E. coli* و کولون شده و درستی فرآیند به روش هضم آنزیمی، الکتروفورز روی ژل آگارز و تعیین توالی تایید گردید.

از رده سلولی LX-2 که در معرض لپتین قرار گرفته بودند به عنوان کنترل مثبت القای التهاب و سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مقایسه این دو کنترل نشان داد که سلول‌های تیمار شده با لپتین دارای زوائد بلند شاخه دار نسبت به سلول‌های کنترل بود (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده ها براساس مقایسه چرخه آستانه (CT) انجام شد. منحنی تکثیر هر واکنش PCR با منحنی تکثیر ژن مرجع PGK مربوطه نرمالیز شد. در این مطالعه، اختلاف CT به دست آمده از نمونه های مورد آزمایش (سلول های تیمار شده با وکتورها و لپتین) و نمونه های کنترل محاسبه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع اندازه گیری شد.

تحلیل آماری

نتایج به دست آمده در این مطالعه، نتیجه حداقل سه تکرار است که میزان تغییرات به صورت میانگین \pm انحراف معیار محاسبه شد. آنالیز اطلاعات با نرم افزار Graph Pad Prism و با روش آماری آنوای یک



ب

الف

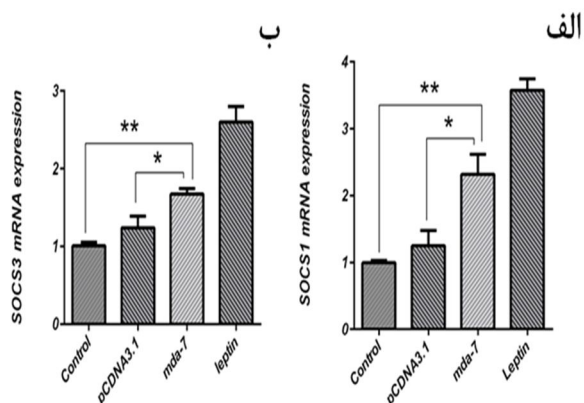
شکل ۱. ریخت شناسی سلولی با میکروسکوپ معکوس، سلول های نرمال (الف) و مواجه شده با لپتین پس از ۲۴ ساعت (ب) (بزرگ-نمایی، $\times 40$).

نشان می دهد (که بیان گر القای فرآیند التهابی در آن گروه است) اما این افزایش بیان در مقام مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (با $p=0/347$) رابطه‌ی معناداری نشان نمی دهد. هم چنین pcDNA3.1/mda-7 نسبت به گروه

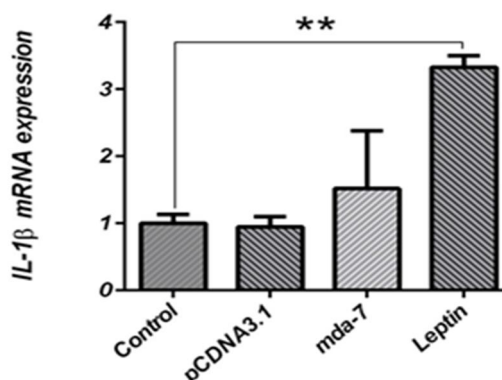
بررسی بیان ژن IL-1 β پس از اثر دادن وکتورها و لپتین و مقایسه آن‌ها با گروه سلولی کنترل نشان داد که بیان IL-1 β در گروه سلولی pcDNA 3.1/mda-7 نسبت به گروه سلولی کنترل به میزان ۱/۵۲ برابر افزایش بیان

نشان داد (۱/۶۷ برابر در مقابل ۱/۲۴ برابر) ($p=0.0428$). در این مطالعه، گروه سلولی که با لپتین مواجه شده بودند نیز به میزان ۳/۵۷ و ۲/۶۰ برابر نسبت به گروه کنترل به ترتیب افزایش بیان SOCS1 و SOCS3 از خود نشان دادند (شکل ۳).

pcDNA3.1 افزایش بیان از خود نشان می دهد، ولی بین این دو گروه نیز رابطه‌ی معناداری نشان داده نشد ($p=0.418$). لازم به ذکر است که در گروه سلولی کنترل مثبت که با لپتین مواجه شده بودند، افزایش بیان IL-1 β به میزان ۳/۳۲ برابر نسبت به گروه کنترل بود که معنادار بود ($p < 0.0001$) (شکل ۲).



شکل ۳. بیان ژن SOCS1 (الف) و SOCS3 (ب) با استفاده از روش qRT-PCR در بازه ی زمانی ۴۸ ساعت پس از تاثیر وکتورها و لپتین بر روی سلول های LX-2، هر کدام از ستون ها بیان گر میانگین \pm انحراف معیار می باشد و آنالیز اطلاعات با کمک روش آماری آنوای یک طرفه انجام شد. ($p < 0.05$; **, $p < 0.005$).



شکل ۲. بیان ژن IL-1 β با استفاده از روش qRT-PCR در بازه ی زمانی ۴۸ ساعت پس از تاثیر وکتورها و لپتین بر روی سلول های LX-2، هر کدام از ستون ها بیان گر میانگین \pm انحراف معیار و آنالیز اطلاعات با کمک روش آماری آنوای یک طرفه انجام شد ($p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد که سلول های مواجه شده با لپتین از ویژگی های مورفولوژیکی جدیدی برخوردار می شوند. لازم به ذکر است که در مطالعه قبلی نیز چنین نتایجی را مشاهده کردیم (۱۵). هم چنین نشان داده شد که پس از ارائه ژن Mda-7، بیان IL-1 β تفاوت معناداری از خود نشان نمی دهد، ولی بیان SOCS1 و SOCS3 به عنوان یک تنظیم کننده ی سایتوکاین های التهابی پس از ترانسفکشن Mda-7 در سلول های LX-2 به طور معنادار افزایش بیان پیدا می کند. بر اساس منابع و مطالعات موجود، بیان ژن های SOCS1 و SOCS3 می تواند در تنظیم سایتوکاین های التهابی و فاکتورهای رشد اهمیت داشته باشد و آبخارهای سیگنالی مربوط به التهاب را راه اندازی و یا متوقف کند (۱۶).

در مورد ژن SOCS1 و SOCS3 پس از اثر دادن وکتورها و لپتین و مقایسه آن ها با گروه سلولی کنترل نشان داده شد که بیان SOCS1 در گروه سلولی pcDNA3.1/mda-7 نسبت به گروه سلولی کنترل به میزان ۲/۳۱ برابر از خود به طور معناداری افزایش بیان نشان می دهد ($p=0.032$). از طرف دیگر، SOCS1 در گروه سلولی pcDNA3.1/mda-7 نسبت به گروه سلولی pcDNA3.1 به طور معناداری افزایش بیان نشان داد (۲/۳۱ برابر در مقابل ۱/۲۵ برابر) ($p=0.0179$). در مورد بیان ژن SOCS3 نیز نتایج تقریباً مشابه ای مشاهده شد. بیان ژن SOCS3 در گروه سلولی pcDNA3.1/mda-7 نسبت به گروه سلولی کنترل به میزان ۱/۶۷ برابر به طور معناداری افزایش بیان نشان داد ($p < 0.0001$). از طرف دیگر، SOCS3 در گروه سلولی pcDNA3.1/mda-7 نسبت به گروه سلولی pcDNA3.1 به طور معناداری افزایش بیان

حفاظتی و ضد التهابی در موکوس معده با کمک فعال سازی سیستم آبخاری JAK1/STAT3/SOCS3 بازی کند و به عنوان یک هدف بالقوه در درمان و تنظیم التهاب بیماران IBD در نظر گرفته شود (۱۰، ۲۱).

از طرف دیگر، در مطالعات مختلف اثرات آپاپتوزی و ضد سرطانی IL-24/mda-7 با کمک پروتئین‌های SOCS به اثبات رسیده است.

به طور مثال، در مطالعه‌ای که اثر این ژن بر روی سلول‌های کارسینومای کبدی (HepG2) صورت گرفت میزان آپاپتوز پس از ارائه این ژن به این سلول‌ها افزایش پیدا کرد (۲۲). از آن جایی که در این مطالعه میزان SOCS3 پس از اثر IL-24/mda-7 افزایش پیدا کرد، لازم به ذکر است که در چندین مطالعه نشان داده شده است که SOCS3 می‌تواند رابطه‌ی مستقیمی با آپاپتوز داشته باشد (۲۳، ۲۴).

در نتیجه افزایش بیان SOCS3 می‌تواند باعث افزایش آپاپتوز در سلول‌های اصلی ایجاد کننده‌ی فیروز کبدی گردد. در مورد اثرات آپاپتوزی IL-24/mda-7، این سایتوکاین با تاثیر بر دفسفریله کردن STAT3 و هم-چنین تاثیر بر افزایش بیان P53 می‌تواند بر میزان آپاپتوز سلولی نقش داشته باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی التهاب SOCS1 و SOCS3 در سلول‌های LX-2 پس از قرار گرفتن در معرض حامل‌های حاوی ژن IL-24/mda-7 افزایش بیان پیدا می‌کند، ولی در میزان بیان IL-1 β به عنوان یک سایتوکاین التهابی تفاوتی ایجاد نمی‌کند. با توجه به این که IL-24/mda-7 دارای اثرات بسیار متفاوتی با توجه به منبع سلولی، هدف و فاز پاسخ ایمنی می‌باشد، نقش اصلی این سایتوکاین نیاز به بررسی بیشتر IL-24/mda-7 و مسیرهای درگیر با این سایتوکاین دارد.

همان‌طور که نشان داده شد، در میزان بیان IL-1 β پس از ارائه IL-24/mda-7 تفاوت معناداری دیده نشد. چنین نتایجی که ارائه پروتئین IL-24/mda-7 ارتباط معناداری بر روی بیان IL-1 β از خود نشان نمی‌دهد، در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. به طور مثال، ارائه IL-24/mda-7 در رده‌ی سلولی اپیتلیال کلیه تاثیری در تغییر بیان IL-1 β نداشت (۱۷). با این وجود، مطالعات بیشتر در این زمینه با بررسی دیگر فاکتورهای التهابی، بازه‌های زمانی متفاوت و روش‌های مختلف بررسی بیان پروتئین هم‌چون وسترن بلات و ایمونوهیستوشیمی ضروری به نظر می‌رسد.

در این مطالعه با کمک آنالیز آنوای یک طرفه نشان داده شد که میزان SOCS3 تحت تاثیر IL-24/mda-7 افزایش بیان از خود نشان می‌دهد. در مطالعات دیگر نیز آشکار شده است که IL-24/mda-7 می‌تواند باعث افزایش بیان SOCS3 و در نتیجه کنترل التهاب گردد (۱۸). فاکتور SOCS3 به عنوان یک تعدیل کننده‌ی فیدبک منفی فعالیت STAT3 شناخته می‌شود که این کار را با مهار JAK‌های پائین دست سیگنال‌های سیتوکاینی انجام می‌دهد (۱۹). علاوه بر این، پروتئین STAT3 در انواع سرطان‌ها به طور پیوسته فعال می‌باشد که با کمک مهار فعال کننده‌های آپاپتوزی به بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی کمک می‌کند. علاوه بر این نشان داده شد که بیان SOCS1 پس از مواجهه با IL-24/mda-7 در سلول‌های سرطانی HCC می‌تواند دچار افزایش بیان گردد. در این سلول‌ها نشان داده شد که ارائه SOCS1 منجر به مهار فعال شدن (فسفریله شدن) STAT3 و در نتیجه باعث پائین آمدن سطح بیان پروتئین‌هایی که در بقا و تکثیر سلولی نقش مستقیم دارند نظیر cyclin، survivin و Bcl-X1 و D1 می‌گردد (۲۰).

هم‌چنین آشکار شده است که IL-24/mda-7 و رسپتورهایش در منطقه موکوسی ملتهب بیماری التهابی روده IBD به میزان بیشتری دیده می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که IL-24/mda-7 می‌تواند نقش

10. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, et al. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *The Journal of Immunology* 2009;183:687-95.
11. Liu Z, Xu L, Yuan H, Zhang Y, Zhang X, Zhao D. Oncolytic adenovirus-mediated mda-7/IL-24 expression suppresses osteosarcoma growth and enhances sensitivity to doxorubicin. *Molecular medicine reports* 2015;12:6358-64.
12. Wang Z, Lv J, Zhang T. Combination of IL-24 and cisplatin inhibits angiogenesis and lymphangiogenesis of cervical cancer xenografts in a nude mouse model by inhibiting VEGF, VEGF-C and PDGF-B. *Oncology reports* 2015;33:2468-76.
13. Khanizadeh S, Ravanshad M, Hosseini S, Davoodian P, Zadeh AN, Sarvari J. Blocking of SMAD4 expression by shRNA effectively inhibits fibrogenesis of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench* 2015;8:262.
14. Hosseini E, Hosseini SY, Hashempour T, Fattahi MR, Sadeghizadeh M. Effect of RGD coupled MDA-7/IL-24 on apoptosis induction in a hepatocellular carcinoma cell line. *Molecular medicine reports* 2017;15:495-501.
15. Jamhiri I, Hosseini SY, Mehrabani D, Khodabandeh Z, Yaghobi R, Dowran R, et al. The pattern of IL-24/mda-7 and its cognate receptors expression following activation of human hepatic stellate cells. *Biomedical Reports* 2017;7:173-8.
16. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in cell & developmental biology*: Elsevier; 2008. p. 414-22.
17. Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokony R, Veres-Székely A, Lippai R, et al. Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney and Blood Pressure Research* 2017;42:16-32.
18. Ross BX, Gao N, Cui X, Standiford TJ, Xu J, Fu-shin XY. IL-24 Promotes Pseudomonas

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند، کمال سپاس‌گزاری را دارند.

منابع

1. Deshmukh A, More U, Tilak M, Sontakke A, Deshmukh U. Role of Nitric Oxide in liver cirrhosis. *Indian J of basic and applied medical res* 2013;2:546-50.
2. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2011;25:195-206.
3. Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, et al. Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Annals of internal medicine* 2008;149:399-403.
4. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:2515-32.
5. Lok AS, Everhart JE, Wright EC, Di Bisceglie AM, Kim HY, Sterling RK, et al. Maintenance peginterferon therapy and other factors associated with hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C. *Gastroenterology* 2011;140:840-9. e1.
6. Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. *Saudi Journal of Gastroenterology* 2012;18:155.
7. Jiang H, Lin JJ, Su Z, Goldstein N, Fisher P. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 1995;11:2477-86.
8. Persaud L, De Jesus D, Brannigan O, Richiez-Paredes M, Huaman J, Alvarado G, et al. Mechanism of Action and Applications of Interleukin 24 in Immunotherapy. *International journal of molecular sciences* 2016;17:869.
9. Wang M, Liang P. Interleukin-24 and its receptors. *Immunology* 2005;114:166-70.

- aeruginosa Keratitis in C57BL/6 Mouse Corneas. *The Journal of Immunology* 2017;160:2087.
19. Harada D, Takigawa N, Kiura K. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer. *Cancers* 2014;6:708-22.
20. Liu L, Li W, Wei X, Cui Q, Lou W, Wang G, et al. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus-mediated SOCS1 for hepatocellular carcinoma. *Gene therapy* 2013;20:84-92.
21. Fonseca Camarillo G, Furuzawa Carballeda J, Granados J, Yamamoto F, Furusho J. Expression of interleukin (IL)- 19 and IL- 24 in inflammatory bowel disease patients: a cross sectional study. *Clinical & Experimental Immunology* 2014;177:64-75.
22. Bina S, Shenavar F, Khodadad M, Haghshenas MR, Mortazavi M, Fattahi M-R, et al. Impact of RGD Peptide Tethering to IL24/mda-7 (Melanoma Differentiation Associated Gene-7) on Apoptosis Induction in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:6073-80.
23. Shen M, Shi H. Estradiol and estrogen receptor agonists oppose oncogenic actions of leptin in HepG2 cells. *PloS one* 2016;11:e0151455.
24. Trindade-da-Silva CA, Reis CF, Vecchi L, Napimoga MH, Sperandio M, Matias Colombo BF, et al. 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 Induces Apoptosis and Upregulates SOCS3 in Human Thyroid Cancer Cells. *PPAR research* 2016;2016.
25. Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, Gaudin F, Maarof G, Marfaing-Koka A, de Revel T, et al. IL-24 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells engaged into the cell cycle through dephosphorylation of STAT3 and stabilization of p53 expression. *The Journal of Immunology* 2008;181:6051-60.