

## بررسی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی

### مشتق شده از مغز استخوان موش

الهام علیمرادی، سجاد سی سخت نژاد\* و حسن اکرمی

کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

### چکیده

تیموکوئینون (Thymoquinone) ماده فعال برخی از گیاهان دارویی می‌باشد. علی‌رغم مطالعات گسترده در زمینه اثرات زیستی و درمانی تیموکوئینون، هیچ‌گونه پژوهشی در رابطه با اثر این ترکیب بر سلول‌های بنیادی انجام نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* دخیل در پتانسیل تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells=MSCs) مشتق شده از مغز استخوان موش در سطح رونویسی می‌باشد. سلول‌های MSC از مغز استخوان موش‌های نژاد NMRI جدا شدند و پتانسیل بنیادینگی آنها توسط تست‌های تمایزی به سمت سلول‌های استخوان و چربی تایید شد. نتایج حاصل از آزمون  $3-(4,5\text{-Dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-diphenyltetrazolium bromide=MTT}$  نشان داد که غلظت  $IC_{50}$  (Half-maximal inhibitory concentration) در بازه زمانی ۲۴ ساعت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بعلاوه، در غلظت‌های مساوی و کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند، بنابراین بررسی بیان ژن‌های، سلول‌ها با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیموکوئینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند. نتایج بدست آمده از مطالعه بیان ژن‌های توسط Real-time PCR نشان دهنده کاهش حدود ۰/۶۵۵ و ۰/۶۱۵ برابری (۳۴/۵ و ۳۸/۵ درصدی) بترتیب برای ژن‌های *iNos* و *Cox-1*، در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود ( $P<0.05$ ). در نتیجه، این مطالعه نشان می‌دهد که تیموکوئینون قابلیت اثر بر پتانسیل تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های MSC را دارد. همچنین این مطالعه چشم‌انداز خوبی را برای مطالعات بیشتر در این زمینه و استفاده از این ترکیب برای اثر بر قابلیت‌های سلول‌های MSC در سلول درمانی را فراهم کرده است.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تیموکوئینون، تنظیم سیستم ایمنی، بیان ژن

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۳۳۴۲۷۴۵۴۵، پست الکترونیکی: s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir و ssisakhtnezhad@gmail.com

### مقدمه

سلول‌های MSC از لحاظ ریخت‌شناسی شبیه سلول‌های فیبروبلاست هستند، دارای اتصالات انعطاف‌پذیر و نشانگرهای سطحی از قبیل CD73، CD106، CD105، CD44 و CD29 را بیان می‌کنند. همچنین نشانگرهای مربوط به سلول‌های خونی شامل CD45، CD31، CD11b، CD34 در این سلول‌ها بیان نمی‌شوند (۱۶). از مهم‌ترین ویژگی‌های این سلول‌ها که باعث شده امروزه طرفداران زیادی را به خود اختصاص دهند، می‌توان به حالت

سلول‌های MSC بدلیل ویژگی‌های منحصر به فردی که دارند به عنوان یکی از پرکاربردترین سلول‌های بنیادی بافتی می‌باشند که بیش از ده سال است به‌صورت گسترده جهت مطالعات و کاربرد در زمینه فراهم آوردن امکان درمان بیماری‌های مختلفی مانند اختلالات سیستم عصبی مرکزی، کبد، کلیه، انفارکتوس میوکارد، بیماری‌های خودایمنی و خیلی از سرطان‌ها بکار برده می‌شوند (۲).

اخیراً محققان از فاکتورهای خارجی برای بهبود عملکرد سلول‌های MSC استفاده می‌کنند. بنابراین تاثیر ترکیبات طبیعی و شیمیایی مختلف بر ویژگی‌های سلول‌های MSC تحت شرایط آزمایشگاهی و در داخل بدن موجود زنده مورد بررسی قرار گرفته است. تیموکوئینون یکی از ترکیبات زیست‌فعال موجود در گیاه سیاه دانه، به ویژه در دانه‌های آن، می‌باشد. این ترکیب اولین بار توسط کروماتوگرافی بر روی لایه نازک ژل سیلیکا از این گیاه استخراج شد. مطالعات انجام شده بر روی خواص زیستی تیموکوئینون، در آزمایشگاه و نیز در داخل بدن موجود زنده، نشان دهنده اثرات گسترده دارویی و درمانی این ترکیب می‌باشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که تیموکوئینون دارای خواص تنظیم سیستم ایمنی، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، آنتی‌هیستامین، ضد توموری می‌باشد. بنابراین پتانسیل‌های درمانی بالقوه‌ای برای درمان خیلی از بیماری‌های انسان مانند بیماری‌های التهابی و سرطان است (۶). با این وجود، نیاز به مطالعات بالینی در این زمینه وجود دارد.

علی‌رغم مطالعات مختلفی که بر روی اثرات زیست‌شناختی تیموکوئینون در حیطه‌های مختلف انجام شده است، اما تاکنون در رابطه با اثر آن بر رفتارهای سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های MSC و اثر آن بر خاصیت تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی این سلول‌ها، هیچ‌گونه مطالعه‌ای انجام نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر تیموکوئینون بر پتانسیل تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های MSC جدا شده از مغز استخوان موش، از طریق بررسی اثر آن بر بیان موثر در پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC، شامل ژن‌های *iNos* و *Cox-1*، در سطح رونویسی می‌باشد.

### مواد و روشها

آماده‌سازی محلول تیموکوئینون: جهت آماده‌سازی غلظت‌های مختلف تیموکوئینون (۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱،

خودنوزایی، چندتوانی (۱)، تمایز به رده‌های مزودرمی (استخوان، چربی، غضروف)، اندودرمی و اکتودرم، توزیع گسترده در بیشتر بافت‌ها از جمله استخوان، چربی، ماهیچه، بندناف، شش و پالپ‌دندان، تنظیم سیستم ایمنی (۴)، مهاجرت (۱۸)، ترمیم و احیای سلول‌ها و بافت‌های آسیب‌دیده و توانایی توسعه در محیط کشت اشاره کرد (۲۷). سلول‌های MSC دارای توانایی مهاجرت به سمت بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشند، که به کمک انواع سایتوکین‌ها و فاکتورهای التهابی آزاد شده از بافت آسیب‌دیده یا تومور می‌توانند به محل آسیب هدایت شده و با ترشح فاکتورهای مختلف موجب ترمیم و بهبود آسیب یا بیماری شوند (۱۰ و ۲۶). علاوه بر نقش سلول‌های MSC در تولید انواع مختلف فاکتورها جهت القاء ترمیم و بازسازی بافت‌ها، اصلی‌ترین اثر درمانی سلول‌های MSC ناشی از عملکردهای تنظیم سیستم ایمنی و حفظ هموستازی ایمنی می‌باشد، که این عمل تحت تاثیر شرایط محیطی و اثر غلظت‌های متفاوت ترکیبات التهابی در جهت سرکوب یا فعال‌سازی سیستم ایمنی صورت می‌گیرد (۱۱).

مطالعات قبلی حاکی از آن هستند که برای کاربردهای درمانی، تعداد زیادی از سلول‌های MSC نیاز است؛ اما تعداد سلول‌های MSC در بافت کم می‌باشد، بنابراین استخراج و گسترش این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه جهت بکارگیری در زمینه درمان ضروری است. بطورکلی، در مقایسه با سلول‌های MSC تازه جدا شده، سلول‌های حفظ شده در کشت پتانسیل کاربردی پایین‌تری دارند (۲۳). در این ارتباط نشان داده شده است که فاکتورهای خارجی می‌توانند بر بیان گیرنده‌های سطحی و دیگر فاکتورهای داخلی در سلول‌های MSC نقش داشته باشند، که در نتیجه آن بر روی ویژگی‌ها و عملکردهای آن اثر می‌گذارند (۲۴). بنابراین ارزیابی دقیق و کنترل شدید ویژگی‌های سلول‌های MSC کشت شده برای حفظ توان کاربردی در سلول درمانی و پزشکی بازساختی مهم می‌باشد.

سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده و محیط کشت آنها جهت حذف سلول‌های شناور تعویض شد. بعد از انجام اولین تعویض محیط کشت، تا زمانی که سلول‌ها کاملاً کف فلاسک را پر کنند، هر دو روز یکبار محیط کشت آنها تعویض شد. بعد از ۷-۱۰ روز سلول‌ها به تراکم ۸۰-۹۰ درصد رسیده، با استفاده از محلول تریپسین (۰/۲۵ درصد) - EDTA (۱ میلی‌مولار) (بایو اید، ایران) پاساژ داده شدند. سلول‌های MSC کشت داده شده هر روز با استفاده از میکروسکوپ فاز معکوس بررسی شدند. برای تایید هویت و خلوص سلول‌های MSC جدا شده از بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی مثبت (CD44، CD90 و CD105) و منفی (CD34 و CD45) استفاده شد (۲۵).

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی:** جهت تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان موش، از تست تمایز آنها به سمت سلول‌های استخوانی استفاده شد. برای این کار ۲۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. بعد از اینکه سلول‌ها به تراکم حدود ۹۰ درصد رسیدند، محیط کشت سلول‌ها با محیط القایی تمایز استخوانی (شامل DMEM-HG، ۱۰ درصد سرم،  $1 \times 10^{-3}$  میکرومول بر میلی-لیتر دگزامتازون (اسوه، ایران)، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۲-فسفات (سیگما، آلمان) و  $0/1 \times$  پنی سیلین / استرپتومایسین) تعویض شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز با محیط کشت تمایز استخوان تیمار شدند و در این مدت محیط القایی تمایز استخوان هر سه روز یکبار تعویض می‌شد. بعد از سه هفته، سلول‌های تمایز یافته با متانول ۱۰ درصد تثبیت و در ادامه با آلزارین رد S (Alizarin-red S) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت رسوب کلسیم توسط استئوبلاست‌ها بوسیله میکروسکوپ فاز معکوس (CETI، انگلیس) مورد بررسی قرار گرفت. تست تمایز استخوان حداقل در ۳ تکرار مستقل انجام شد.

۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقدار ۱۰ میلی‌گرم از تیموکوئینون خالص (سیگما، آلمان) در ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide=DMSO) (مرک، آلمان) به شکل تازه حل شد و قبل از انجام آزمایش‌ها با محیط کشت کامل جهت فراهم کردن غلظت‌های مناسب رقیق‌سازی شد. در این مطالعه جهت بررسی اثر تیمارهای مختلف، بقاء هر گروه با کنترل مربوطه (فاقد تیموکوئینون) که حاوی مقادیر یکسانی از دی متیل سولفوکساید بود مقایسه شد. همچنین، در این پژوهش، محلول‌های تیموکوئینون برای هر بار استفاده به شکل کاملاً تازه تهیه و در شرایط دور از نور مورد استفاده قرار گرفتند.

**حیوانات آزمایشگاهی:** در این تحقیق از موش‌های جوان (۴-۸) هفته‌ای نژاد NMRI جهت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. این موش‌ها از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه و اخذ تاییدیه از کمیته اخلاق کار با حیوانات با کد تصویب (۱۰-۱-۳۹۵) تهیه شدند.

**استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش:** موش‌ها با استفاده از جابه‌جایی مهره‌های گردنی اتونازی شدند. جهت جداسازی سلول‌های MSC، استخوان‌های فمور و تیبیا جدا و مغز استخوان آنها از طریق اسپیراسیون بطور کامل استخراج شد و در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium-High Fetal bovine glucose=DMEM-HG حاوی ۱۵ درصد serum=FBS (گیبکو، اسکاتلند)، محلول ۱ x پنی‌سیلین / استرپتومایسین (بایو اید، ایران)،  $3/7$  گرم بر لیتر بیکربنات سدیم و دو میلی‌مولار ال-گلوتامین (سیگما، آلمان) در فلاسک‌های T25 کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت ۹۰ درصد به مدت ۳ روز انکوبه شدند. ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی:**

جهت تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده، از تمایز آنها به سمت سلول‌های چربی استفاده شد. برای اینکار سلول‌های MSC پاساژ ۳ با تراکم حدود ۹۰ درصد به مدت ۳ هفته در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم،  $1 \times 10^3$  میکرومول بر میلی‌لیتر دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۲-فسفات، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایندومتاسین (سیگما، آلمان) و  $0.1 \times$  پنی‌سیلین / استرپتومایسین کشت داده شدند. در این مدت محیط القایی تمایز چربی، هر سه روز یکبار تعویض شد. بعد از ۲۱ روز سلول‌های تمایز یافته با فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و سپس سلول‌ها با استفاده از رنگ اوایل رد (Oil-O red O) جهت مشخص شدن واکوئل‌های لیپیدی رنگ‌آمیزی شدند. بعد از رنگ‌آمیزی وجود واکوئل‌های لیپیدی در سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فاز معکوس مورد بررسی قرار گرفت. تست تمایز استخوان حداقل در ۳ تکرار مستقل انجام شد.

**بررسی اثر تیموکوتینون بر بقاء سلول‌های MSC:** جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف تیموکوتینون بر بقاء سلول‌های MSC مشتق شده از مغز استخوان در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از آزمون MTT (سیگما، آلمان) استفاده شد. این آزمون یک روش رنگ‌سنجی می‌باشد که بر اساس احیاء و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم و تشکیل کریستال‌های ارغوانی رنگ نامحلول فورمازان صورت می‌گیرد. بمنظور انجام این آزمون ۱۱ هزار سلول MSC در خانه‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و پلیت‌های حامل سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف تیموکوتینون (۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار و برای هر غلظت حداقل سه تکرار گذاشته شد. اثر تیموکوتینون بر بقاء

سلول‌های MSC با استفاده از رنگ‌سنجی تترازولیوم در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار ارزیابی شد. جهت انجام این آزمون، به کلیه نمونه‌های تیمار شده با تیموکوتینون و نمونه‌های کنترل که تنها حاوی دی‌متیل سولفوکسید با غلظت‌های مشابه نمونه‌های تیمار بودند (غلظت DMSO در نمونه‌های تیمار و کنترل کمتر از یک درصد بود)، محلول MTT (۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات) اضافه و تحت شرایط قبلی انکوبه شد. پس از گذشت ۴ ساعت از انکوباسیون، کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان که از نمک تترازولیوم زرد رنگ توسط آنزیم‌های میتوکندریایی سلول‌های فعال متابولیک ایجاد شده‌اند، با ۱۵۰ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید حل شدند. نهایتاً جذب نوری کلیه خانه‌های پلیت (شامل نمونه‌های تیمار شده و بدون تیمار) توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و از پلیت‌ها نیز عکس گرفته شد. آزمون MTT برای هر کدام از غلظت‌های تیموکوتینون در تکرارهای سه‌تایی و حداقل در شش تکرار مستقل انجام شد. نهایتاً درصد سلول‌های زنده در مقایسه با سلول‌های کنترل در تیمارهای مختلف از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد بقاء سلول‌های MSC} = (\text{میانگین جذب سلول‌های MSC تیمار شده با تیموکوتینون در هر خانه} / \text{میانگین جذب سلول‌های کنترل}) \times 100$$

**بررسی اثر تیموکوتینون بر بیان ژن‌های دخیل در پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC:** در این مطالعه، سلول‌های MSC با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیموکوتینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس بمنظور بررسی کمی اثر تیموکوتینون بر بیان ژن‌های دخیل در پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC (شامل دو ژن *iNos* و *Cox-1*) از تکنیک کمی Real-time PCR استفاده شد. جهت آنالیز بیان ژن‌ها در سطح رونویسی، RNA تام سلول‌های MSC تیمار شده با تیموکوتینون و کنترل با

تایید اختصاصیت آغازگرها توسط NCBI-Primer BLAST برای ژن‌های هدف، از طریق شرکت دنایست آسیا جهت سنتز به شرکت میکروژن کره سفارش داده شد. واکنش Real-time PCR به شکل تکرارهای دوتایی برای هر ژن در حجم‌های ده میکرولیتر با استفاده از برنامه شاتل دو مرحله‌ای به صورت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ سیکل انجام شد. در این مطالعه، ژن  $\beta$ -actin به عنوان استاندارد و کنترل، جهت نرمالایز کردن سطح بیان رونویسی ژن‌های مربوطه، استفاده شد. در پایان روش آستانه نسبی  $C_t$  (۱۵) برای ارزیابی کمی بیان ژن‌ها در سلول‌های MSC تیمار شده با تیموکوئینون در مقایسه با نمونه‌های کنترل استفاده شد.

استفاده از کیت RNX-Plus (سینا کلون، ایران) استخراج شد. جهت حذف آلودگی‌های احتمالی DNA، RNAهای تام استخراج شده با آنزیم RNase-free DNase I (کیاژن، آمریکا) تیمار شدند. در مرحله بعد یک میکروگرم از هر کدام از RNAهای تیمار شده با DNase، با استفاده از آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (فرمنتاز، آلمان) و طبق دستورالعمل کیت به cDNA تبدیل شدند. در ادامه تکنیک Real-time PCR با استفاده از کیت سایبرگرین (تاکارا، ژاپن) بمنظور بررسی کمی بیان ژن‌های مورد بررسی در سلول‌های MSC تیمار شده با تیموکوئینون در مقایسه با سلول‌های کنترل استفاده شد. سنش کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن‌های مورد مطالعه انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های *iNOS* و *Cox-I* توسط نرم افزار Allele ID طراحی شدند. پس از

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن‌های <i>iNOS</i> و <i>Cox-I</i> با استفاده از روش Real-time PCR.				
منبع	توالی آغازگر	نام آغازگر	کد دسترسی به توالی	ردیف
(۵)	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	<i>B-actin</i>	NM_007393	۱
	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'			
-	5'-CTCAGCCAAGCCCTCACCTAC-3'	<i>iNos</i>	NM_010927	۲
	5'-CTCCAATCTCTGCCTATCCGTCTC-3'			
-	5'-TGTTCCGAGCCCAGTTCCAATA TC-3'	<i>Cox-I</i>	NM_008969	۳
	5'-CAACCCCATAGTCCACCAGCAT AG-3'			

0.05 به عنوان سطح معنی دار جهت یافتن تفاوت‌های معنی‌دار در نظر گرفته شد.

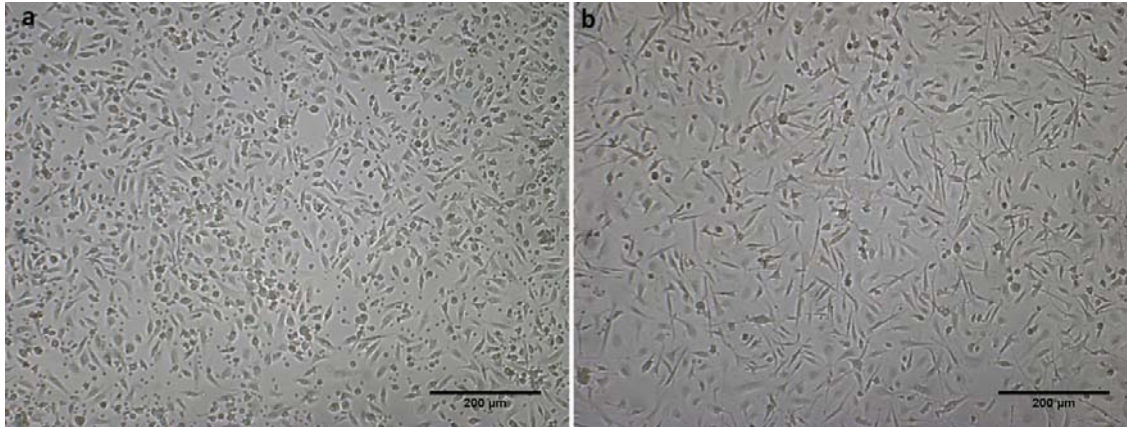
### نتایج

استخراج و گسترش سلول‌های MSC: در این مطالعه، سلول‌های MSC از مغز استخوان موش استخراج و در

آنالیز آماری: جهت انجام آنالیز آماری از نرم افزار SPSS، نسخه ۲۰ استفاده شد. جهت آنالیز داده‌های بیانی و بررسی معنادار بودن تغییرات رونویسی ژن‌های مورد بررسی در نمونه‌های تیمار شده با تیموکوئینون در مقایسه با نمونه‌های کنترل از روش Student's t-test استفاده شد. کلیه داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند و مقدار  $P <$

از گذشت ۷-۱۰ روز به تراکم ۱۰۰-۸۰ درصد رسیدند، که پاساژ داده شدند. در نهایت از سلول‌های MSC پاساژ ۳ (شکل 1b) برای مطالعات بعدی استفاده شد.

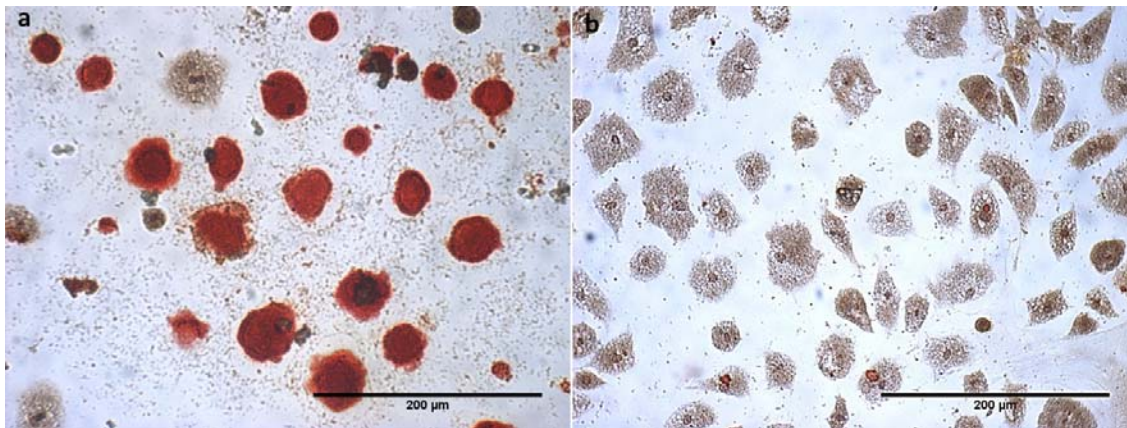
فلاسک‌های T25 کشت داده شدند. سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان به کف فلاسک چسبیدند و در شرایط مناسب کشت داده شدند (شکل 1a). سلول‌های MSC بعد



شکل ۱- کشت اولیه و سلول‌های MSC حاصل از مغز استخوان موش. کشت اولیه حاصل از مغز استخوان موش، ۷۲ ساعت پس از کشت و تعویض محیط کشت (a). سلول‌های MSC مشتق شده از مغز استخوان موش در پاساژ ۳ (b).

آلیزارین رد سلول‌های استخوانی حاصل از تمایز سلول‌های MSC به رنگ قرمز مشاهده شدند، که نشان دهنده رسوب کلسیم توسط این سلول‌ها می‌باشد (شکل 2a)، اما در سلول‌های کنترل هیچ‌گونه رسوب کلسیمی مشاهده نشد (شکل 2b).

پتانسیل تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های استخوانی: توانایی استخوان‌زایی سلول‌های MSC بوسیله ارزیابی تمایز آنها به سمت سلول‌های استخوانی بررسی شد. سلول‌های MSC با استفاده از محیط القایی استخوان‌زایی به سمت استخوان تمایز یافتند. پس از رنگ‌آمیزی با

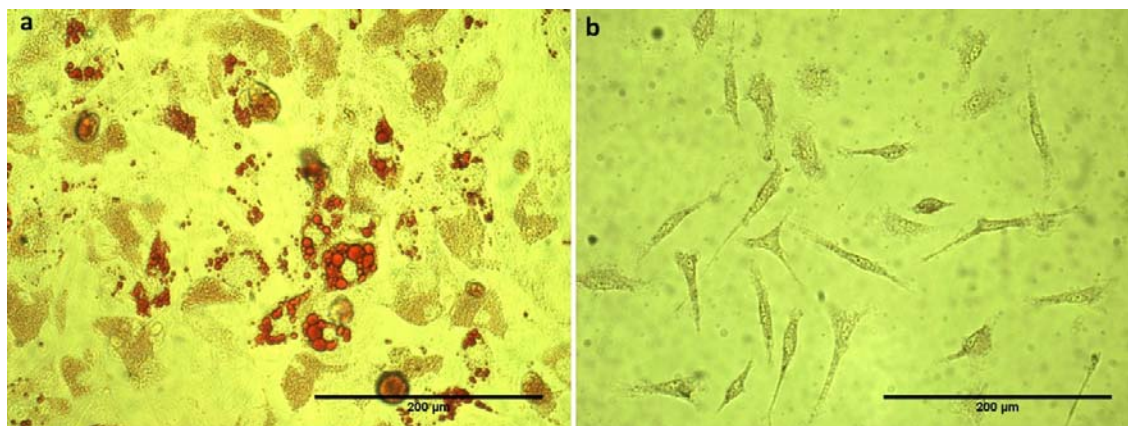


شکل ۲- تمایز سلول‌های MSC جدا شده از مغز استخوان موش به سلول‌های استخوانی. رنگ قرمز نشان دهنده رسوب کلسیم توسط استئوبلاست‌ها می‌باشد (a). رسوب کلسیمی در سلول‌های MSC کشت داده شده در محیط کشت نرمال مشاهده نمی‌شود (b).

تمایز پیدا کردند. پس از گذشت سه هفته از کشت سلول‌های MSC در محیط القایی تمایز چربی، سلول‌ها با Oil-red O رنگ‌آمیزی شدند. نتایج حاصل از مشاهدات

پتانسیل تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های چربی: نتایج حاصل از تست تمایز چربی نشان داد که سلول‌های MSC کشت شده در محیط القایی تمایز چربی به سمت چربی

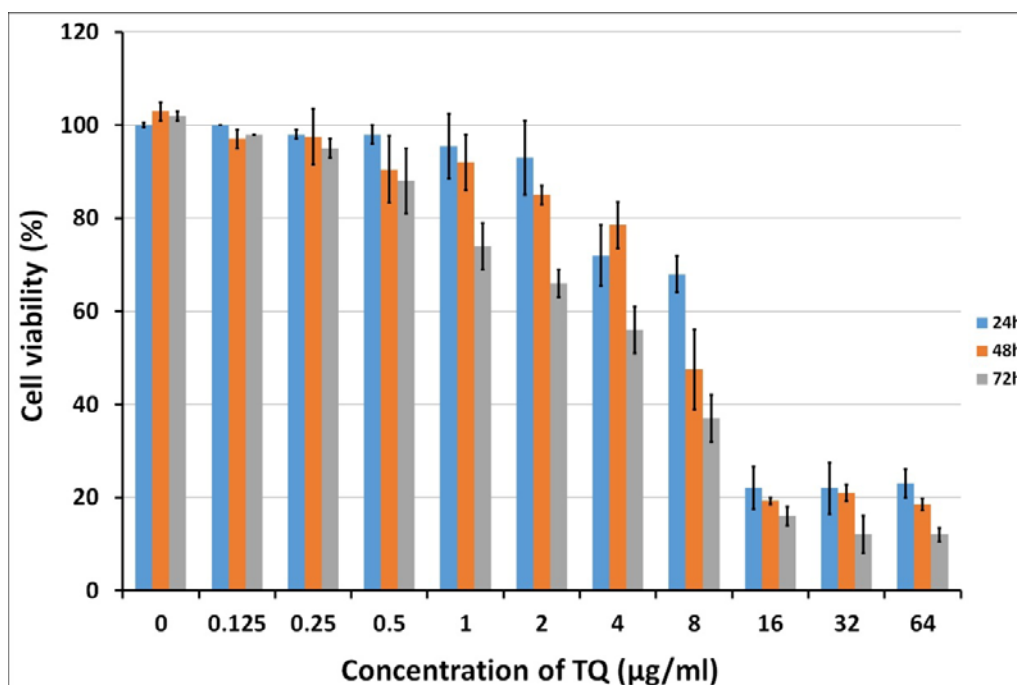
میکروسکوپی حاکی از وجود واکوئل‌های لیپید در سلول‌های تمایز یافته (شکل 3a) بودند، اما این واکوئل‌ها در نمونه‌های کنترل مشاهده نشدند (شکل 3b).



شکل ۳- تمایز سلول‌های MSC جدا شده از مغز استخوان موش به سلول‌های چربی. واکوئل‌های قرمز رنگ چربی در سلول‌های MSC تمایز یافته به سلول‌های چربی قابل مشاهده می‌باشند (a)، اما این واکوئل‌ها در سلول‌های MSC کنترل قابل مشاهده نیستند (b).

زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین در غلظت‌های کمتر یا مساوی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده بودند (شکل ۴). بنابراین در ادامه، از غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ارزیابی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های مورد بررسی در سلول‌های MSC استفاده شد.

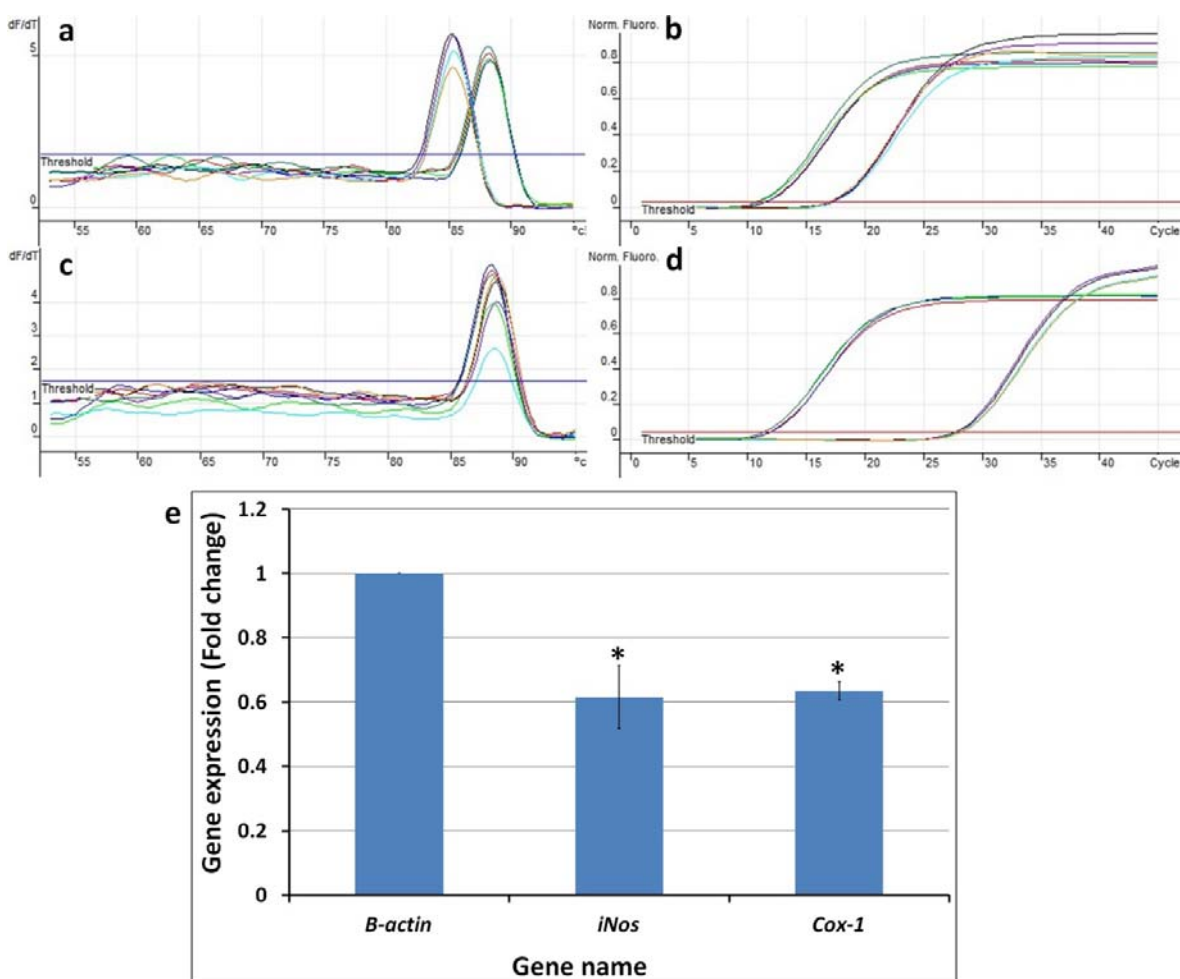
بررسی سمیت تیموکوئینون بر سلول‌های MSC: در این مطالعه، از آزمون MTT جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف تیموکوئینون بر بقاء سلول‌های MSC در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که  $IC_{50}$  سلول‌های MSC در بازه زمانی ۲۴ ساعت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در بازه‌های



شکل ۴- بررسی میزان بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور غلظت‌های مختلف تیموکوئینون با سطح معناداری  $P < 0.05$ .

بررسی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های سلول‌های MSC: بعد از تعیین  $IC_{50}$  و غلظتی که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های MSC زنده بودند، سلول‌های MSC با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیموکوئینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های تیمار و کنترل صورت گرفت. در ادامه بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در نمونه‌های تیمار شده با تیموکوئینون و نمونه‌های کنترل مورد بررسی گرفت. نمودار ذوب و منحنی تکثیر مربوط به یکی از نمونه‌ها مورد بررسی برای ژن‌های

بررسی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های سلول‌های MSC: بعد از تعیین  $IC_{50}$  و غلظتی که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های MSC زنده بودند، سلول‌های MSC با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیموکوئینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های تیمار و کنترل صورت گرفت. در ادامه بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در نمونه‌های تیمار شده با تیموکوئینون و نمونه‌های کنترل مورد بررسی گرفت. نمودار ذوب و منحنی تکثیر مربوط به یکی از نمونه‌ها مورد بررسی برای ژن‌های



شکل ۵- آنالیز بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در سلول‌های تیمار شده یا تیموکوئینون نسبت به سلول‌های کنترل بدون تیمار. نمودار ذوب (a) و منحنی تکثیر (b) ژن *iNos* در مقایسه با *B-actin* به عنوان ژن استاندارد. نمودار ذوب (c) و منحنی تکثیر (d) ژن *Cox-1* و نیز *B-actin* به عنوان ژن استاندارد. نمودار آنالیز بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در سلول‌های تیمار شده یا تیموکوئینون نسبت به سلول‌های کنترل (e). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از معیار بیان شده اند. تفاوت معنی دار بین بیان ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده با تیموکوئینون در مقایسه با سلول‌های کنترل بدون تیمار با (\*) نشان داده شده است ( $P < 0.05$ ).



## بحث

ایمن و موثر جهت درمان بیماری‌های انسان کمک کنند (۴).

گزارش شده است که مولکول‌های مختلفی نظیر iNOS، Indoleamine 2,3-dioxygenase=IDO، TGF- $\beta$ ، PGE2 و گالکتین در عملکرد سرکوب سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC نقش دارند. *iNos* در سلول‌های MSC موش و IDO در سلول‌های MSC انسان نقش مهمی در سرکوب سیستم ایمنی دارند. همچنین این سلول‌ها به تنهایی دارای توانایی مهار سیستم ایمنی نمی‌باشند، بلکه در ترکیب با سایتوکین‌های التهابی مانند TNF- $\alpha$ ، IFN- $\gamma$ ، IL-1b و یا IL-1 $\alpha$  فعال می‌شوند (۱۱). TGF- $\beta$  با مهار *iNos* در موش و IDO در انسان موجب مهار سرکوب سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC می‌شود. در مطالعه‌ای که در این زمینه صورت گرفت مشخص شد که TGF- $\beta$  از طریق مسیر سیگنالینگ وابسته به SMAD موجب مهار رونویسی *iNos* در سلول‌های MSC موش و در نتیجه مهار سرکوب سیستم ایمنی سلول‌های MSC می‌شود (۲۹). فاکتورهای هسته‌ای مانند NF- $\kappa$ B و AP-1 نقش مهمی در کنترل فعالیت *iNos* در سطح رونویسی دارند. در این رابطه NF- $\kappa$ B موجب القاء رونویسی تعداد زیادی از ژن‌های التهابی از جمله *iNos* می‌شود. *iNos* نیز موجب تولید مقادیر زیادی از NO در طولانی مدت می‌شود. NO دارای اثر سمی در مقابل پاتوژن‌های تهاجمی سیستم ایمنی می‌باشد و باعث القاء التهاب می‌شود. با این حال در مطالعات مختلف گزارش شده است که بیان بالای *iNos* در سلول‌های MSC و به دنبال آن تولید بیش از حد NO موجب ایجاد فنوتیپ پیش‌التهابی و اثرات پاتوژنیک می‌شود (۴). فعالیت بیش از حد NO موجب تولیدگونه‌های نیتروژن فعال و آنیون سوپراکسید می‌شود که در پی آن باعث آسیب‌های اکسیداتیو در ترکیبات بیولوژیک و تنظیم ژن می‌شود. بنابراین مهار فعالیت یا بیان *iNos* ممکن است نقش مهمی در درمان بیماری‌های التهابی داشته باشد (۲۰). در این ارتباط نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد که

در این مطالعه برای اولین بار اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های دخیل در پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعاتی که در سال‌های اخیر صورت گرفته نشان می‌دهند که اصلی‌ترین اثر درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ناشی از توانایی آنها در تنظیم سیستم ایمنی بدن موجود زنده می‌باشد (۳۰). بنابراین با توجه به قابلیت‌ها و توانایی‌های سلول‌های MSC به ویژه پتانسیل تنظیم کنندگی سیستم ایمنی توسط آنها و نیز اثرات زیستی متنوع تیموکوئینون، در این مطالعه بررسی اثر این ترکیب بر خواص تنظیم کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های MSC مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، اثر تیمار تیموکوئینون بر بیان دو ژن *iNos* و *Cox-1* که دخیل در پتانسیل تنظیم کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های MSC می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت.

پتانسیل تنظیم کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های MSC، بوسیله مولکول‌هایی همانند سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی تحریک می‌شود. همچنین ارتباطات سلول-سلول نقش مهمی در این فرآیند دارند (۱۰ و ۲۶). کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های ترشح شده بوسیله بافت‌های آسیب دیده، منجر به جذب سلول‌ها MSC به سمت محل آسیب و ترمیم آن می‌شوند (۷). علاوه بر این، عملکرد تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC تحت تاثیر شرایط محیطی و اثر غلظت‌های متفاوت ترکیبات التهابی قرار می‌گیرد (۱۱). این تغییر مفهومی، پیامدهای مهمی برای کاربردهای بالینی سلول‌های MSC می‌تواند به‌مراه داشته باشد. در این ارتباط، امروزه توجه زیادی به استراتژی‌های جدید جهت القاء یک‌دست فنوتیپ‌های پیش‌التهابی (MSC1) و یا ضدالتهابی (MSC2) از سلول‌های MSC می‌شود. پیش‌بینی می‌شود که MSC1 و MSC2 می‌توانند به سلول‌درمانی

می‌باشد. افزایش بیان *Cox-1* در سرطان سلولی فلسی (Squamous cell carcinoma) و آدنوکارسینومای سرویکس انسان پیشنهاد می‌کند که هر دو آنزیم COX یا محصولات آنها ممکن است تنظیم‌کننده تومورزایی و بیان فاکتورهایی مرتبط با نئوپلازی سلول‌ها باشند. در این ارتباط استفاده از مهارکننده‌های انتخابی مختلف جهت مهار *Cox-1* موجب تضعیف و مهار سرطان در مسیر وابسته به این آنزیم می‌شود (۹). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد که تیموکوئینون می‌تواند بیان ژن *Cox-1* را در سلول‌های MSC مشتق شده از مغز استخوان موش کاهش دهد. بنابراین با توجه به اینکه محصول این ژن در ارتباط با فنوتیپ ضدالتهابی و القاء پتانسیل فعال‌کنندگی سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است تیموکوئینون از طریق کاهش بیان ژن *Cox-1*، باعث القاء فنوتیپ ضدالتهابی و در نتیجه مهار شدن سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC شود.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه تاثیر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های دخیل در پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی سلول‌های MSC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر کاهش بیان ژن‌های *iNos* و *Cox-1* در سلول‌های MSC تیمار شده با تیموکوئینون است. بنابراین می‌توان از تیموکوئینون جهت القاء ویژگی‌های پاسخ‌های سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC و درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی استفاده کرد. بعلاوه با توجه به مطالعات قبلی و نیز مطالعه حاضر، از نظر مکانیسمی می‌توان پیشنهاد کرد که تیموکوئینون ممکن است از طریق کاهش بیان *iNos* و در نتیجه کاهش تولید NO و همچنین از طریق کاهش بیان *Cox-1* و متعاقباً کاهش بیان پروستوگلاندین‌ها باعث القاء فنوتیپ ضدالتهابی (MSC-2) و در نتیجه مهار شدن سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC شود. با این وجود، جهت تایید

تیموکوئینون باعث کاهش بیان ژن *iNos* در سلول‌های MSC تیمار شده با این ترکیب می‌شود. بنابراین از مطالعات قبلی و نیز مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که شاید تیموکوئینون از طریق افزایش بیان ژن *iNos* مانع از تولید بیش از حد NO و در نتیجه مهار تولیدگونه‌های نیتروژن فعال و آنیون سوپر اکسید می‌شود، هرچند که این احتمال باید در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین می‌توان بیان کرد که ممکن است تیموکوئینون از طریق کاهش بیان *iNos* باعث کاهش تولید NO و در نتیجه القاء فنوتیپ پیش‌التهابی (MSC1) و فعال شدن سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC شود؛ هر چند که در این ارتباط نیاز به انجام مطالعات بیشتر و دقیق‌تری می‌باشد.

سیکلوآکسیژنازها آنزیم‌های اصلی در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین می‌باشند. در سال‌های اخیر دو ایزوفرم از این آنزیم‌ها به نام‌های COX-1 و COX-2 شناسایی شده است. طی مطالعات مختلف، بیان هر دو ایزوفرم در سلول‌های MSC و نقش آنها در تولید پروستوگلاندین‌ها نشان داده شده است (۱۴ و ۲۱). پروستوگلاندین‌ها نه تنها در القاء فنوتیپ پیش‌التهابی و در نتیجه فعال شدن سیستم ایمنی توسط سلول‌های MSC نقش دارد، همچنین در القاء تکثیر این سلول‌ها نیز نقش دارند (۱۴). علاوه بر این، مطالعات حاکی از آن هستند که COX-1 نقش مهمی در سرطان‌زایی دارد. علی‌رغم مشاهده بیان COX-1 در بسیاری از سرطان‌ها مانند پروستات (۱۷)، سینه (۱۲)، سرویکس (۲۲)، تخمدان (۲۸)، سر و گردن (۸) و کبد (۱۳)، افزایش سطح بیان این آنزیم تنها در برخی از سرطان‌های مانند سرویکس (۲۲)، تخمدان (۲۸)، سر و گردن (۸) گزارش شده است. همچنین برخی گزارشات در رابطه با افزایش بیان این آنزیم در موش‌های آزمایشگاهی مبتلا به سرطان ریه گزارش شده است (۳). بعلاوه مهار بیان COX-1 منجر به کاهش خطر سرطان شده است (۱۹). افزایش تومورزایی در سلول‌های اندوتلیال پیوند زده به موش اغلب در ارتباط با افزایش بیان *Cox-1*

و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسولین محترم آن ستاد به خاطر فراهم آوردن این حمایت تشکر و قدردانی نمایند. همچنین نویسندگان این مقاله از خانم‌ها مژده حیدری و مریم یزدانی به خاطر کمک‌هایی که کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

دقیق‌تر مکانیسم اثر تیموکوئینون بر رفتارها و عملکرد سلول‌های MSC، به ویژه بر پتانسیل تنظیم سیستم ایمنی این سلول‌ها، مطالعات بیشتری لازم است.

### تشکر و قدردانی

این پروژه تحقیقاتی بوسیله گرنِت ستاد توسعه فناوری‌های سلول بنیادی حمایت شده است (شماره گرنِت: REP208)

### منابع

1. Abdi R., Fiorina P., Adra C.N., Atkinson M. and Sayegh M.H. 2008. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Diabetes*, 57: 1759-1767.
2. Barminko J., Gray A., Maguire T., Schloss R. and Yarmush M. 2013. Mesenchymal stromal cell mechanisms of immunomodulation and homing. *Mesenchymal Stem Cell Therapy*: Springer.
3. Bauer A.K., Dwyer-Nield L.D. and Malkinson A.M. 2000. High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. *Carcinogenesis*, 21:543-50.
4. Bernardo M.E. and Fibbe W.E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13: 392-402.
5. Campagnolo P., Hong X., Di Bernardini E., Smyrnias I., Hu Y. and Xu Q. 2015. Resveratrol-induced vascular progenitor differentiation towards endothelial lineage via MiR-21/Akt/ $\beta$ -catenin is protective in vessel graft models. *PLoS One*, 10: e0125122.
6. Darakhshan S., Bidmeshkipour A., Colagar A.H. and Sisakhtnezhad S. 2015. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*, 95: 138-158.
7. Dittmer J. r., Oerlecke I. and Leyh B. 2011. Involvement of mesenchymal stem cells in breast cancer progression. *Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis*: IntechOpen
8. Erovic B.M., Woegerbauer M., Pammer J., Selzer E., Grasl M. and Thurnher D. 2008. Strong evidence for up-regulation of cyclooxygenase-1 in head and neck cancer. *European Journal of Clinical Investigation*, 38: 61-66.
9. G Perrone M., Scilimati A., Simone L. and Vitale P. 2010. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 3769-3805.
10. Jacobs S.A., Roobrouck V.D., Verfaillie C.M. and Van Gool S.W. 2013. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunology and Cell Biology*, 91: 32-39.
11. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., and Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105: 4120-4126.
12. Kundu N., Yang Q., Dorsey R. and Fulton A.M. 2001. Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *International Journal of Cancer*, 93: 681-686.
13. Lampiasi N., Fodera D., D'Alessandro N., Cusimano A., Azzolina A., Tripodo C., Florena A.M., Minervini M.I., Notarbartolo M., Montalto G. and Cervello M. 2006. The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 17: 245-252.
14. Lee B.C., Kim H.S., Shin T.H., Kang I., Lee J.Y., Kim J.J., Kang H.K., Seo Y., Lee S., Yu K.R., Choi S.W. and Kang K.S. 2016. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. *Science Report*, 6: 26298.
15. Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25: 402-408.
16. Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21: 216-225.

17. Madaan S., Abel P.D., Chaudhary K.S., Hewitt R., Stott M.A., Stamp G.W. and Lalani E.N. 2000. Cytoplasmic induction and overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *BJU International*, 86:736-41.
18. Marquez-Curtis L.A. and Janowska-Wieczorek A. 2013. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *BioMed Research International*, 2013.
19. Muscat J.E., Chen S.Q., Richie J.P., Altorki, N.K., Citron M., Olson S., Neugut A.I., Stellman S.D. 2003. Risk of lung carcinoma among users of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Cancer*, 97: 1732-1736.
20. Pan M.H., Hong H.M., Lin C.L., Jhang A.Z., Tsai J.H., Badmaev V., Nagabhushanam K., Ho C.T. and Chen W.J. 2011. Se-methylselenocysteine inhibits lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation and iNOS induction in RAW 264.7 murine macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55: 723-732.
21. Remacha A.R., Barrachina L., Alvarez-Arguedas S., Ranera B., Romero A., Vázquez F.J., Zaragoza P., Yañez R., Martín-Burriel I. and Rodellar C. 2015. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165: 107-118.
22. Sales K.J., Katz A.A., Howard B., Soeters R.P., Millar R.P. and Jabbour H.N. 2002. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Research*, 62: 424-432.
23. Shao H., Xu Q., Wu Q., Ma Q., Salgueiro L., Wang J., Eton D., Webster K.A. and Yu H. 2011. Defective CXCR4 expression in aged bone marrow cells impairs vascular regeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15: 2046-2056.
24. Sisakhtnezhad S., Alimoradi E. and Akrami H. 2017. External factors influencing mesenchymal stem cell fate in vitro. *European Journal of Cell Biology*, 96: 13-33.
25. Sisakhtnezhad S., Heidari M. and Bidmeshkipour A. 2018. Eugenol enhances proliferation and migration of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57: 166-174.
26. Timmers L., Lim S. K., Hofer I. E., Arslan F., Lai R.C., van Oorschot A.A., Goumans M.J., Strijder C., Sze S.K., Choo A., Piek J.J., Doevendans P.A., Pasterkamp G. and de Kleijn D.P. 2011. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Research*, 6: 206-214.
27. Wei X., Yang X., Han Z., Qu F., Shao L. and Shi Y.F. 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34: 747-754.
28. Wilson A.J., Fadare O., Beeghly-Fadiel A., Son D.S., Liu Q., Zhao S., Saskowski J., Uddin M.J., Daniel C., Crews B., Lehmann B.D., Pietenpol J.A., Crispens M.A., Marnett L.J. and Khabele D. 2015. Aberrant over-expression of COX-1 intersects multiple pro-tumorigenic pathways in high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 6: 21353-21368.
29. Xu C., Yu P., Han X., Du L., Gan J., Wang Y. and Shi Y. 2014. TGF- $\beta$  promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *The Journal of Immunology*, 192: 103-109.
30. Zhao Q., Ren H. and Han Z. 2016. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2: 3-20.

## Studying the effect of Thymoquinone on the expression of *iNos* and *Cox-1* genes in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Alimoradi E., Sisakhtnezhad S. and Akrami H.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

### Abstract

Thymoquinone (TQ) is an active compound of some medicinal plants. Although different biological and pharmaceutical activities of TQ are well known, its effect on stem cells has not been clarified yet. Therefore, this study was aimed to investigate the effect of TQ on the expression of *iNos* and *Cox-1* genes, which are involved in immunomodulatory potential of mouse mesenchymal stem cells (MSCs), at transcript level. MSCs were isolated from young NMRI mice and their potency was confirmed using the differentiation assay into osteoblasts and adipocytes. The results of MTT assay indicated that the median inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) values of TQ on the MSCs were 8  $\mu\text{g/ml}$  at 24h and 4  $\mu\text{g/ml}$  at 48 and 72h after treatment. In addition, more than 90% of TQ-treated MSCs were alive after treatment with concentrations  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  of TQ for 24h. The results of gene expression analysis by real-time PCR showed that *iNos* and *Cox-1* down-regulated 0.655 and 0.615 fold (38.5 and 34.5%), respectively, in the TQ-treated MSCs compared to the untreated MSCs ( $P < 0.05$ ). In conclusion, this study demonstrates that TQ influences immunomodulatory potential of MSCs. Furthermore, this study provides a good perspective for further efforts in the field and for the use of this compound to affect MSCs capabilities in cell therapy.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, Thymoquinone, Immunomodulation, Gene expression