

Evaluation of Human Leukocyte Antigen-G and Interleukin-10 Expression in HIV Positive Patients and Healthy Subjects

Versa Omrani-Nava¹,
Saeid Abediankenari²,
Jamshid Yazdani Charati³,
Yousef Yahyapour⁴,
Saeideh Sadat Shobeiri¹,
Masoud Mohammadi¹,
Hossein Ranjbaran²,
Siavash Abedi⁵

¹ MSc Student in Immunology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Biostatistics, Health Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Microbiology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁵ Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 20, 2015 ; Accepted November 7, 2016)

Abstract

Background and purpose: HLA-G is an immunomodulatory molecule and alteration of its expression is prevalent during viral infections. HLA-G expression in HIV-positive patients has been inconsistent between different studies and some suggest that Interleukin-10 (IL-10) influences the expression of HLA-G. The aim of this research was to investigate the expression of IL-10 in HIV-positive patients and its relation with TCD4+ lymphocytes.

Materials and methods: In a case-control study, 20 HIV-positive patients, attending the Behavioral Consultation Center affiliated with Mazandaran University of Medical Sciences, were selected and 20 healthy volunteers were also enrolled. Expression of HLA-G was determined by Real-Time PCR. TCD4⁺ count and IL-10 concentration were evaluated by flow cytometry and ELISA, respectively.

Results: HLA-G gene expression was significantly different between the two groups ($P < 0.05$). IL-10 concentration increased in patients and a revers relation was seen between TCD4⁺ cell count and IL-10 ($r = -0.4$, $P = 0.1$).

Conclusion: The results showed that the expression of HLA-G is deregulated during HIV infection and IL-10 could be considered as a biomarker of disease progression.

Keywords: HLA-G, HIV, IL-10

بررسی بیان آنتی ژن لکوسیت انسانی-G و اینترلوکین-۱۰ در بیماران مبتلا به HIV در مقایسه با گروه کنترل

ورسا عمرانی نوا^۱
سعید عابدیان کناری^۲
جمشید یزدانی چراتی^۳
یوسف یحیی پور^۴
سعیده سادات شبیری^۱
مسعود محمدی^۱
حسین رنجبران^۲
سیاوش عابدی^۵

چکیده

سابقه و هدف: HLA-G، یک مولکول تنظیمی سیستم ایمنی است که تغییرات بیان آن در عفونت‌های ویروسی شایع است. بیان HLA-G در بیماران مبتلا به ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) متناقض بوده و برخی افزایش بیان این مولکول در این بیماران را ناشی از تاثیر اینترلوکین-۱۰ (IL-10) بیان کرده‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی همزمان بیان آن‌ها در بیماران HIV مثبت و رابطه احتمالی آن‌ها با لئوسیت‌های TCD4⁺ بوده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۲۰ بیمار HIV⁺ مراجعه‌کننده به مرکز مشاوره رفتاری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و ۲۰ فرد سالم در سال ۴-۱۳۹۳ صورت گرفته است. شمارش سلول‌های TCD4⁺/μl بیماران به روش فلوسایتومتری انجام شد. بیان ژن HLA-G به وسیله Real-Time PCR بررسی شد و از آزمون الیزا برای تعیین غلظت IL-10 استفاده شد.

یافته‌ها: بیان ژن HLA-G در دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). غلظت IL-10 در بیماران افزایش داشت و رابطه معکوس بین شمارش TCD4⁺ و غلظت IL-10 مشاهده شد ($r = 0/4$, $p = 0/1$).

استنتاج: نتایج نشان می‌دهد بیان ژن HLA-G در بیماران HIV⁺ از تنظیم خارج شده است و IL-10 می‌تواند شاخصی از پیشرفت بیماری HIV باشد.

واژه‌های کلیدی: HLA-G، HIV، IL-10

مقدمه

غشاء و محلول هستند که در این میان ایزوفرم‌های غشایی HLA-G1, G5، مانند پروتئین‌های کلاسیک، توانایی عرضه پپتید به سلول T را دارند و از طریق تقابل با گیرنده‌های سطح سلول‌های کشنده طبیعی، اثرات

آنتی‌ژن لکوسیت انسانی-G (HLA-G)، پروتئینی غیر کلاسیک از مجموعه سازگاری بافتی اصلی بوده که در تعدیل پاسخ‌های ایمنی موثر است. محصولات پیرایش متناوب این آنتی‌ژن، ایزوفرم‌های متصل به

Email: abedianlab@yahoo.co.uk

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران - دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات ایمنونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۵. استادیار، مرکز تحقیقات ایمنونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱۷

بررسی گردید. سطح IL-10 به روش الایزا با استفاده از کیت (ebioscience, Germany) اندازه گیری شد. تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS با سطح معنی داری $p < 0.05$ صورت گرفت.

جدول شماره ۱: شرایط دما و مخلوط واکنش PCR

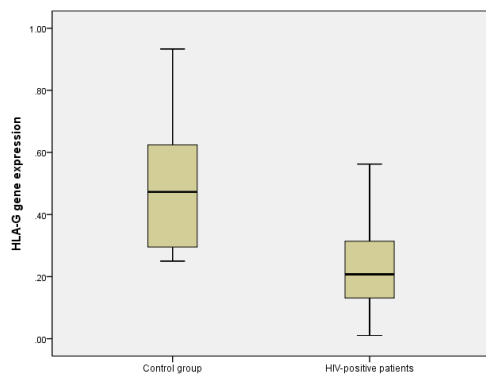
مخلوط واکنش PCR	شرایط PCR
برایمر F: 0.6µl R: 0.6µl	95° (۱۰ دقیقه، ۱ تکرار) فعال سازی آنزیمی
cDNA 2µl	95° (۳۰ ثانیه، ۴۰ تکرار) دنا تراسیون
آب مقطر 6.8µl	59° (۳۰ ثانیه، ۴۰ تکرار) هیپریداسیون
Master Mix 10µl	72° (۴۵ ثانیه، ۴۰ تکرار) طول سازی (Extension)

یافته‌ها و بحث

اطلاعات دموگرافیک دو گروه به همراه یافته‌های آزمایشگاهی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج داده‌های Real-time PCR به صورت $2^{-\Delta CT}$ تفسیر شد که کاهش بیان HLA-G در گروه بیماران نسبت به کنترل را نشان می‌دهد (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۲: اطلاعات دموگرافیک و یافته‌های آزمایشگاهی

متغیر	گروه بیمار	گروه کنترل	سطح معنی داری
سن	۳۴/۶	۳۳/۹	-
جنس مرد (تعداد (درصد))	(۷۰) ۱۴	(30.66 - 37.14)	-
جنس زن (تعداد (درصد))	(۳۰) ۶	(۷۵) ۵	-
بیماری‌های عفونی	-	-	-
دارو درمانی	-	-	-
میانگین شمارش سلول های CD4	515/µl (395- 606)	-	-
میانگین بیان ژن HLA-G ($2^{-\Delta CT}$)	0.25	1.54	۰/۰۰۰۱
میانگین غلظت IL-10	10.4 (5.79-15.1)	6.1 (5.66-6.54)	۰/۰۰۹



نمودار شماره ۱: بیان ژن HLA-G در سلول‌های تک هسته‌ای بیماران در مقابل گروه کنترل به طور معنی داری کم‌تر است ($P < 0.05$). نمودار بر اساس $2^{-\Delta CT}$ ارائه شده و خطوط افقی نشان‌گر متوسط بیان ژن هستند.

مهارتی متفاوتی مانند سرکوب پاسخ‌های تکثیر و القای مرگ برنامه‌ریزی شده را میانجی‌گری می‌کند (۱-۳). IL-10 به همراه HLA-G، نقش مهمی در ایجاد تعادل بین پاسخ‌های التهابی و تنظیمی سیستم ایمنی، به خصوص در مواجهه با ویروس‌ها دارد و القای بیان آن به عنوان یک مکانیسم فرار از پاسخ‌های موثر ایمنی شناخته شده است (۳-۵).

مطالعات HLA-G در بیماران HIV⁺ دارای تناقض هستند و برخی گزارش‌ها افزایش HLA-G در بیماران را ناشی از اثر IL-10 دانسته‌اند (۷،۶). هدف از این مطالعه، بررسی بیان HLA-G و IL-10 با لئوسیت‌های TCD4⁺ بیماران در مقابل گروه کنترل بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۲۰ بیمار HIV⁺ مراجعه‌کننده به مرکز مشاوره دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ و ۲۰ فرد سالم، پس از اخذ رضایت آگاهانه، وارد مطالعه شدند. عفونت‌های ویروسی، بارداری و دریافت درمان ضد ویروسی معیارهای خروج از مطالعه بودند. پس از گرفتن ۵ سی‌سی خون از هر فرد، تعداد لئوسیت‌های TCD4⁺ بیماران به روش فلوسایتومتری تعیین گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) با استفاده از فایکول ۱/۰۷۷ جدا شدند و RNA تام سلول‌ها با استفاده از کیت استاندارد (ایران SinaClon) استخراج شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت (AccuPower, south Korea) انجام شد و بیان ژن HLA-G به روش Real-Time PCR (سایبر گرین) در شرایط دمایی خاص (جدول شماره ۱) با استفاده از توالی پرایمرهای اختصاصی ژن HLA-G شامل: F: 5'-CTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAG-3 و R: 5' CCTTTC AATCTGAGCTCTTCTTTCT-3' هم‌چنین برای ژن EF1 (کنترل داخلی) F: 5'-CTGAACCATCCAGGCCAAAT-3' و R: 5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT-3'

HIV باعث کاهش بیان آن می‌شود (۹). برخی آلل‌ها و پلی مورفیسم‌های HLA-G با کاهش غلظت آن در پلاسمای بیماران HIV مثبت در ارتباط هستند (۱۱). جالب توجه است که مشابه نتایج این تحقیق، بیان کم‌تر HLA-G ناشی از پلی مورفیسم‌های ذکر شده با بیان بالاتر IL-10 در PBMCs فعال شده با لپو پلی ساکارید نیز همراه بوده است (۱۲). سطوح افزایش یافته IL-10 در این مطالعه، می‌تواند بیان MHC کلاس II را سرکوب کند، مانع از تولید سایتوکاین‌ها توسط ماکروفاژها شود و پاسخ‌های ایمنی را به الگوی Th2 ترویج نماید (۱۳). در این مطالعه، در راستای حذف عوامل مداخله‌گر، افراد مورد بررسی دارو درمانی نشده و غیر باردار (۱) بودند. در نتیجه، بیان HLA-G و IL-10 در طی عفونت با HIV از تنظیم خارج شده و IL-10 می‌تواند به عنوان شاخص پیشرفت بیماری مورد توجه قرار گیرد.

تعداد کم بیماران وعدم بررسی پلی مورفیسم از محدودیت‌های این تحقیق بوده است. بنابراین، تحقیقات بعدی در جمعیت بزرگ‌تری از بیماران به همراه ژنوتایپینگ می‌تواند در بررسی نقش بارزتر HLA-G در بیماران HIV⁺ و اهداف درمانی کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه خانم ورسا عمرانی نوا به شماره ۹۳-۱۲۲۰ بوده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Abediankenari S, Farzad F, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB. HLA-G5 and G7 Isoforms in Pregnant Women. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015; 14(2): 217-221.
2. Shobeiri SS, Abediankenari S, Rahmani Z, Hossein Nataj H, Azadeh H. Evaluation of NK cell level and HLA-G1 expression in peripheral blood in threatened-abortion. *Tehran Univ Med J* 2015; 73(2): 93-100.
3. Hassannia H, Abediankenari S, Ghaffari J. FOXP3 and TGF- β gene polymorphisms in allergic rhinitis. *Iran J Immunol* 2011; 8(4): 218-25.
4. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4⁺ T cells proliferation. *Iran Biomed J* 2011; 15(1-2): 1-5.

5. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180(9): 5771-5777.
6. Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS* 2002; 16(3): 347-351.
7. Abediankenari s , Ghasemi M. Generation of immune inhibitory dendritic cell and CD4⁺ T regulatory cell inducing by TGF- β . *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2009; 8(1): 25-30.
8. Shobeiri SS, Rahmani Z, Hossein Nataj H, Ranjbaran H, Mohammadi M, Abediankenari S. Uterine Natural Killer Cell and Human Leukocyte Antigen-G1 and Human Leukocyte Antigen-G5 Expression in Vaginal Discharge of Threatened-Abortion Women: A Case-Control Study. *J Immunol Res* 2015; 2015: 6.
9. Derrien M, Pizzato N, Dolcini G, Menu E, Chaouat G, Lenfant F, et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 7): 1945-1954.
10. Cabello A, Rivero A, Garcia MJ, Lozano JM, Torre-Cisneros J, Gonzalez R, et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. *Hum Immunol* 2003; 64(11): 1045-1049.
11. Lajoie J, Massinga Loembe M, Poudrier J, Guedou F, Pepin J, Labbe AC, et al. Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. *Hum Immunol* 2010; 71(2): 182-185.
12. Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, et al. The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* 2005; 57(3-4): 172-181.
13. Koppelman B, Neeffjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997; 7(6): 861-871.