القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت، بر روی لایه تغذیه‌ای سلول‌های اپیتلیال انسان

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

میثم گنجی‌بخش[1*]
وحید نجاتی[1]، معصومه اسدی[1]
نوروز دلیرژ[2] ، فرح فرخی[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های دندریتیک (DC) قادر به القای پاسخ ایمنی بر علیه تومور می‌باشند و امروزه علاقه فزاینده‌ای در به‌کارگیری این سلول‌ها در ایمونوتراپی تومور وجود دارد. در میان راه‌کارهای ارایه‌شده برای درمان سرطان، استفاده از سلول های دندریتیک جایگاه ویژه‌ای یافته است و محققین تلاش می‌کنند با تحقیقات بیش‌تر به سلول‌های دندریتیک کارآمدتری در شرایط آزمایشگاه دست پیدا کنند. این تحقیق به منظور تولید سلول‌های دندریتیک کارآمد برای استفاده در امر تحقیقات و ایمونوتراپی تومور انجام شده است. ***روش بررسی:*** بخشی از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) که به پلاستیک می‌چسبند در حضور اینترلوکین-۴ (IL-4) و محرک گرانولوسیت (GM-CSF) به‌مدت پنج روز و به‌مدت دو روز نیز با TNF-α, PLY-IC و سلول‌های اپیتلیال (A375)، کشت داده شد. سپس بر روی سلول‌های تمایزیافته بررسی مورفولوژیک، تعیین فنوتیپ، قدرت بیگانه‌خواری مورد ارزیابی قرار گرفت؛ همین‌طور توانایی سلول‌های تولیدشده در واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن و میزان سایتوکین‌های تولیدشده مورد سنجش قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** سلول‌های دندریتیک تولیدشده با این روش دارای مقادیر بالای بیان مولکول‌های سطحی CD80، CD83، CD86، HLA-DR و مقدار پایین بیان مولکول سطحی CD14 بودند هم‌چنین این سلول‌های دندریتیک دارای توانایی فاگوسیتوز مناسب و قدرت تحریک بالای لنفوسیت‌های T بودند و قادر به ترشح مقادیر بالایی از سایتوکین IL-12 بودند که نشان‌دهنده بلوغ کامل سلول‌های دندریتیک تولیدشده می‌باشد. ***نتیجه‌گیری:*** سلول‌های اپیتلیال پوست منجر به تولید سلول‌های دندریتیکی کارآمدتر با توانایی ایمونوتراپی تومور و هم‌چنین باعث تولید سلول‌های دندریتیک از نوع یک (DC1) در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند.

کلمات کلیدی: سلول دندریتیک، مونوسیت، سلول اپیتلیال، بلوغ سلول.

*نویسنده مسئول: ارومیه، جاده نازلو، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی: ۵۷۱۵۹۱۵۱۹۹ تلفن: ۰۹۳۵-۹۶۸۹۹۸۵
E-mail: meysam_ganjy@yahoo.com

مقدمه

در قرن اخیر، با تغییرات بنیادی شیوه زندگی، رفته‌رفته بیماری‌ها نیز تغییرات عمیقی داشته و انسان‌ها شاهد بیماری‌های نوظهوری چون سرطان و ایدز شدند. بدین‌جهت درمان این بیماری‌های کشنده، در راس تحقیقات علمی قرار گرفت و دانشمندان بسیاری را به خود مشغول نموده است. در میان راه‌کارهای ارایه‌شده برای درمان سرطان، استفاده از سلول‌های دندریتیک Dendritic Cells (DC) جایگاه ویژه‌ای یافته و محققین تلاش می‌کنند با تحقیقات بیش‌تر، به سلول‌های دندریتیک کارآمدتری در شرایط آزمایشگاه دست پیدا کنند.[1-3] بعد از اثبات کارآیی این سلول‌ها در درمان سرطان، دانشمندان دریافتند که چگونه این سلول‌ها را به بهترین نحو و با بهترین کارایی در محیط کشت تولید کنند.[4] باید به این نکته توجه داشت که سلول‌های دندریتیک بالغ در فعال کردن سلول‌های T دست نخورده بیش‌تر موثر می‌باشند و روش‌های مختلفی برای تولید سلول‌های دندریتیک بالغ وجود دارد. زیر مجموعه‌های مختلف سلول‌های دندریتیک، انواع مختلف پاسخ‌های ایمنی را تحریک می‌کنند که توانایی سلول‌های دندریتیک در برانگیختن پاسخ Th1 نسبت به Th2 به ماهیت محرک

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

فعال‌کننده سلول‌های دندریتیک و یا سایتوکین‌هایی که توسط خود سلول‌های دندریتیک و یا در اطراف در حین تماس این سلول با سلول T تولید می‌شود، بستگی دارد. مشاهدات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های دندریتیک، سایتوکین‌های القاکننده Th1 را فقط در فاصله زمانی محدودی پس از فعال شدن تولید می‌کند، که ممکن است مشکلاتی را در کاربرد نهایی سلول‌های دندریتیک بالغ جهت واکسیناسیون علیه سرطان مطرح کند. این نگرانی‌ها باعث می‌شود که دانشمندان به‌دنبال سلول‌های دندریتیک مناسب در واکسیناسیون سرطان باشند تا بهترین منبع و بهترین عامل بلوغ سلول دندریتیک، جهت ایمونوتراپی سرطان به‌کار گرفته شود.[۴] امروزه به‌منظور استفاده از سلول‌های دندریتیک برای ایمونوتراپی سرطان، آن‌ها را از سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان و یا مونوسیت‌های خون محیطی تولید می‌کنند. تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای $CD34^+$ مستلزم بیوپسی و تهیه مغز استخوان و یا تزریق G-CSF به‌منظور افزایش تعداد آن‌ها در خون محیطی می‌باشد و هر دوی این روش‌ها، به تیمار اضافی نیاز دارد و خطراتی را برای بیمار به‌همراه دارد.[۵] برای رفع این مشکل در ابتدا دانشمندان سلول‌های دندریتیک را با روش‌های بسیار پیچیده جداسازی می‌کردند که نه‌تنها تعداد به‌دست‌آمده برای کاربرد درمانگاهی کافی نبود، بلکه امکان دست‌کاری‌های آزمایشگاهی این سلول‌ها از جمله مجاورسازی آن‌ها با آنتی‌ژن‌های اختصاصی توموری به‌منظور راه‌اندازی پاسخ اختصاصی، وجود نداشت، بنابراین امروزه تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بهترین روش ازدیاد و انجام مطالعات روی این سلول‌ها می‌باشد.[۶] سلول دندریتیک (سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن) از سلول‌های ریشه‌ای $CD34^+$ مغز استخوان منشا گرفته و به‌صورت سلول‌های نابالغ به بافت‌های مختلف مهاجرت و در آن‌ها مستقر می‌شوند آن‌ها بعد از دریافت آنتی‌ژن و عوامل پیش‌التهابی ضمن این‌که فرآیند بلوغ را آغاز می‌کنند، مهاجرت به گره لنفاوی را نیز شروع و تا رسیدن به این محل به سلول دندریتیک بالغ با دندانه‌های سیتوپلاسمی زیاد و بیان بالای مولکول MHC I, II و کمک تحریکی CD80 و CD86 تبدیل و توانایی تحریک لنفوسیت‌های T دست‌نخورده را پیدا می‌کند.[۷] ولی از آنجایی‌که این سلول‌ها کم‌تر از ۱٪ گلبول‌های سفید خود محیطی انسان را تشکیل می‌دهند، دست‌یابی به تعداد کافی از آن‌ها برای کاربردهای تحقیقاتی و درمانی با محدودیت مواجه بود، تا این‌که تولید انبوه این سلول‌ها را از مونوسیت‌های خون محیطی، با استفاده از سایتوکین‌های GM-CSF، IL-4 و TNF-α ابداع گردید.[۸] سلول‌های دندریتیک هنگام مهاجرت از بافت‌های محیطی به بافت لنفاوی با محیط‌های کوچک استرومایی که از ماتریکس خارج سلولی، فاکتورهای محلول و انواع مختلفی از سلول‌ها نظیر سلول‌های اپیتلیال، فیبروبلاست، ماکروفاژ، مونوسیت و اندوتلیال و غیره تشکیل شده، تماس می‌یابد. شواهد زیادی وجود دارد که این محیط‌های کوچک استرومایی نقش مهمی را در تنظیم عملکرد سلول‌های دندریتیک ایفا می‌کنند. هم‌چنین باید توجه داشت که سلول‌های اپیتلیال علاوه بر داشتن نقش سد فیزیکی در برابر آنتی‌ژن‌ها دارای عملکردهای دیگری هم‌چون ترشح سایتوکین و کموکین‌ها می‌باشند. هم‌چنین به‌عنوان یک مدیلاتور در التهاب مجاری هوایی ایفای نقش می‌کنند. این سلول‌ها قادر به تولید انواعی از سایتوکین‌های التهابی و یا کموکین‌ها مانند: GM-CSF، IL-1ß، IL-6، IL-8، TGF، Cotaxin می‌باشند[۹و۱۰] و با توجه به این‌که در حال حاضر از سلول‌های دندریتیک برای القا و بررسی پاسخ ایمنی در مدل‌های حیوانی و انسان استفاده می‌گردد و به‌دلیل وجود تفاوت‌های فیزیولوژیک از یک طرف و ناهمگون بودن سلول‌های توموری انسان و فشار ناشی از درمان در القای این ناهمگونی باعث گردیده تا نتایج مطالعات به‌عمل آمده بر روی مدل‌های حیوانی به‌طور دقیق در مورد انسان قابل انطباق نباشد. از طرف دیگر استفاده بالینی از واکسیناسیون با سلول‌های دندریتیک بدون انجام مطالعات پیش‌بالینی، ضمن این‌که خطراتی را برای بیمار در بر دارد، به‌دلیل پیچیدگی عوامل مؤثر در پاسخ ایمنی میزبان، تجزیه و تحلیل نتایج حاصل به‌آسانی میسر نخواهد بود.[۱۱] هدف از انجام این تحقیق، تولید سلول‌های دندریتیک کارآمد، به‌منظور استفاده در امر تحقیقات و ایمونوتراپی تومور، در نظر گرفته شد. به‌منظور تحقق این امر تاثیر تماس مستقیم سلول‌های اپیتلیال پوست انسان بر تمایز و عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق‌شده از مونوسیت‌های خون محیطی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد، تا زمینه برای انجام آزمایشات بالینی و بهبود کیفیت سلول‌های دندریتیک فراهم گردد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی- پژوهشی به‌منظور تولید سلول‌های دندریتیک

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

انسانی مناسب ایمونوتراپی تومور از تیرماه سال ۱۳۸۸ تا شهریور ۱۳۸۹ در Clean room پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت. تمام مراحل کار، به‌صورت استریل، در فضای Clean room به‌انجام رسیده است و تمام مراحل مربوط به دست‌کاری‌های سلولی از جمله کشت، برداشت، اضافه کردن مواد، تهیه سوسپانسیون سلولی، قسمت عمده‌ای از آزمایش‌های مختلف و غیره زیر هود دارای جریان هوای لامینار به‌انجام رسید. ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) از نمونه خون افراد داوطلب استخراج گردید. برای این منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر خون هپارینه (۲۰۰U/ml) با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPNI-1640 (Gibco Co., UK) رقیق گردید سپس خون رقیق‌شده به‌آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق‌نشده بود قرار گرفت و مجموعه خون رقیق‌شده و فایکول با سرعت ۸۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق‌شده جمع شده بودند به‌آرامی جمع‌آوری گردید و PBMC به‌دست آمده به‌منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت ۴۵۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجددا با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این‌بار به‌منظور حذف پلاکت‌ها، PBMC با سرعت ۲۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌دست‌آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید.[۶] سلول‌های PBMC به تعداد ۴×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر و به‌مقدار پنج میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰g/ml) و FBS (۱۰٪) به‌مدت دو ساعت در شرایط دمای ۳۷ °C، CO_2 (۵٪) و رطوبت (۹۰٪) انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام، جدا شده و از فلاسک خارج گردیدند. تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های چسبنده تحت تاثیر سایتوکین‌های GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم این سلول‌ها در حضور سلول‌های اپیتلیال (A375)، به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل شدند. به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دادند محیط کشت جدید به اضافه GM-CSF (۱۰۰۰U/ml) و IL-4 (۵۰۰U/ml) (Sigma Co., USA) اضافه و به‌مدت پنج روز کشت داده شد (مرحله اول). در روز سوم مجددا مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید. در روز پنجم سلول‌های دندریتیک نابالغ تولیدشده با استفاده از بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) برداشت به فلاسک دیگری، که کف آن از سلول‌های اپیتلیال (A375) پوشیده شده بود (با تراکم ۸۰٪) منتقل گردیدند[۱۲] و به آن‌ها TNF-α (۱۰ml/ng)، MCM (۲۵٪) و POLY-IC (۲۰ng/ml) (Sigma Co., USA) به‌عنوان عوامل بلوغ و عصاره سلول‌های سرطانی (k562) به‌عنوان آنتی‌ژن اضافه گردید. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12 به‌وسیله کیت الایزا (Peprotech Co., USA) مورد سنجش قرار گرفتند. سلول‌های اپیتلیال A355 از بانک سلولی ایران تهیه گردیدند و در فلاسک کشت سلولی T75 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰g/ml) و FBS (۱۰٪) در شرایط دمای ۳۷ °C، CO_2 (۵٪) و رطوبت (۹۰٪) کشت داده شدند.

فنوتیپ سلول‌های دندریتیک تولیدشده از لحاظ بیان مولکول‌های CD83، CD14، CD80، HLA-DR و CD86 به‌وسیله استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد نشان‌گرهای سطحی (DAKO Co., Denmark) با دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibor (Becton Dickinson Co., USA) سنجش و نتایج حاصل با نرم‌افزار CellQuest آنالیز شد. توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک تولیدشده با استفاده از بید لاتکس فلورسانت (کونژوگه با FITC) (Sigma Co., USA) و دستگاه فلوسایتومتری در دو حالت نابالغ (روز پنجم) و حالت بالغ (روز هفتم) ارزیابی شد. هم‌چنین به‌منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولیدشده (سلول‌های محرک) از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ‌دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن، انجام گرفت که برای این منظور تعداد $۱۰^{۵}$ لنفوسیت با نسبت‌های مختلف (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به‌مدت پنج روز در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد در محیط کشت RPMI-1640، به اضافه ۱۰٪ سرم AB^{+} انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °C، (۵٪) CO_2 و ۹۰٪ رطوبت کشت داده شدند. سپس در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱/۵µCi متیل تیمیدین نشان‌دار شده

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

با [^{3}H] (Amersham Co., UK) اضافه و به‌مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید و سپس میزان تکثیر لنفوسیت‌های T با استفاده از دستگاه Cell harvester (ICN Co., -UK) و دستگاه شمارش‌گر بتا (Wallac-Finland) سنجش شد. میزان ترشح IL-12 و IL-10 از سلول‌های دندریتیک حاصل‌شده به‌وسیله کیت الایزا ارزیابی شد. هم‌چنین میزان ترشح IL-4 و INF-γ توسط لنفوسیت‌های T که با سلول‌های دندریتیک تحریک شده بودند به‌کمک کیت الایزا سنجش شد. در این تحقیق، در گروه کنترل، تولید سلول‌های دندریتیک بدون استفاده از تماس سلول‌های اپیتلیال انجام گرفت و در گروه دیگر (تیمار ۱) تولید سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر تماس مستقیم سلول‌های اپیتلیال (A375) انجام پذیرفت و نتایج با برنامه SPSS ویراست ۱۷ بررسی شد. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین بیان شد و برای مقایسه نتایج فنوتیپ از آزمون One Way ANOVA استفاده شد و به‌منظور آنالیز تفاوت بین حالت‌های بالغ و نابالغ سلول‌ها در فاگوسیتوز، آزمون Student's t-test انجام شد. به‌منظور مقایسه تفاوت‌های بین گروهی، آزمون One Way ANOVA و Tukey's test انجام شد و در تمامی یافته‌ها P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. هم‌چنین نتایج تست الایزا با نرم‌افزار CUREXPERT 0.7 آنالیز شد.

یافته‌ها

با بررسی پنج نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیک، درصد بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مشخص گردید که نتایج آن به‌صورت میانگین درصد بیان مولکول‌ها، در جدول ۱ ارایه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود میزان بیان CD14 از مقدار ۱۵/۲۴٪ در گروه کنترل به مقدار ۹/۲۴٪ در تیمار ۱ کاهش یافته ولی دارای اختلاف معنی‌دار، نسبت به هم نیستند و میزان بیان مولکول CD80 از ۲۶/۳۵٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۵۳/۶۶٪ در تیمار ۱ افزایش یافته که این افزایش دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد. هم‌چنین میزان بیان مولکول CD83 از ۳۶/۵۸٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۵۹/۳۶٪ در تیمار ۱ افزایش یافته که این افزایش نیز دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد و میزان بیان مولکول CD86 از ۲۴/۹۸٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۴۷/۱۴٪ در تیمار ۱ افزایش یافته است و نیز میزان بیان مولکول HLA-DR از ۵۶/۲۵٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۸۹/۷۸٪ در تیمار ۱ افزایش یافته است که این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشند (جدول ۱).

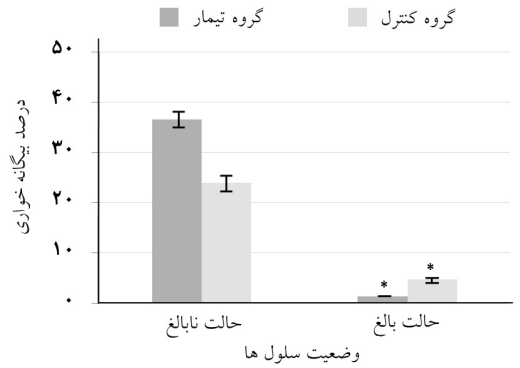
قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک نابالغ با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری به‌دست‌آمده نشان داد که میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه‌خواری انجام داده‌اند در مورد گروه کنترل در حالت نابالغ (روز پنجم) ۲۴/۱۳٪ بوده است و در حالت بالغ این مقدار به ۴/۵۶٪ کاهش یافته است و این مقادیر با وجود P=۰/۰۴۹ اختلاف معنی‌دار با هم‌دیگر دارند. هم‌چنین در مورد تیمار ۱ میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه‌خواری انجام داده‌اند در حالت نابالغ ۳۶/۶۸٪ بوده است و این مقدار در حالت بالغ به ۱/۲۴٪ کاهش یافته است و این مقادیر نیز با P=۰/۰۳۸ اختلاف معنی‌دار با هم‌دیگر دارند اما بین گروه کنترل و تیمار ۱ از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار مشاهده نمی‌شود (نمودار ۱). به‌منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولیدشده در تیمار ۱ و گروه کنترل، توانایی آن‌ها در القای واکنش لوکوسیتی آلوژنیک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولیدشده در تیمار ۱ دارای توانایی بیش‌تر در القای تکثیر سلول‌های آلوژن نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه کنترل می‌باشند (نتایج به‌صورت میانگین Count Per Minute (CPM) در نمودار ۲ نمایش داده شده است)، اما تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که توسط سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار ۱ تحریک شده بودند از طریق مایع رویی جمع‌آوری شده در تست

جدول-۱: میانگین درصد بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیک تولیدشده در گروه کنترل و تیمار ۱

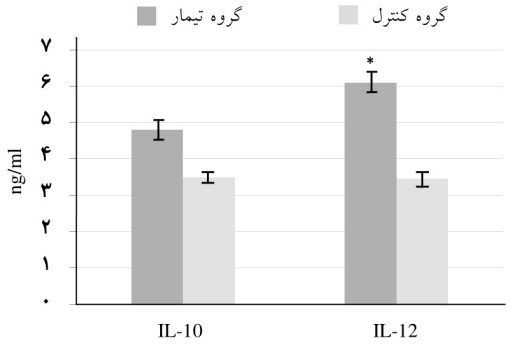
	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
گروه کنترل	۱۵/۲۴	۲۶/۳۵	۳۶/۵۸	۲۴/۹۸	۵۶/۲۵
تیمار ۱	۹/۲۴	۵۳/۶۶	۵۹/۳۶	۴۷/۱۴	۸۹/۷۸
P	۰/۰۷۱	*۰/۰۳۹	*۰/۰۴۸	*۰/۰۴۸	*۰/۰۳۴

* وجود اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۵) آزمون آماری مورد استفاده در جدول One Way ANOVA می‌باشد.

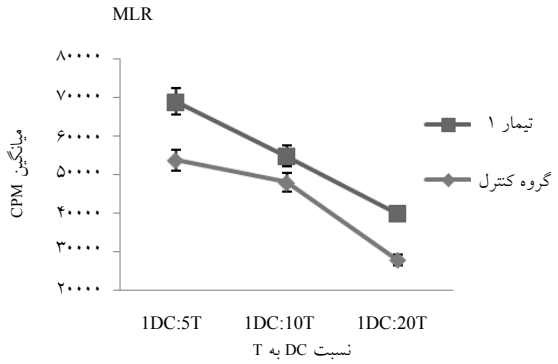
Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018



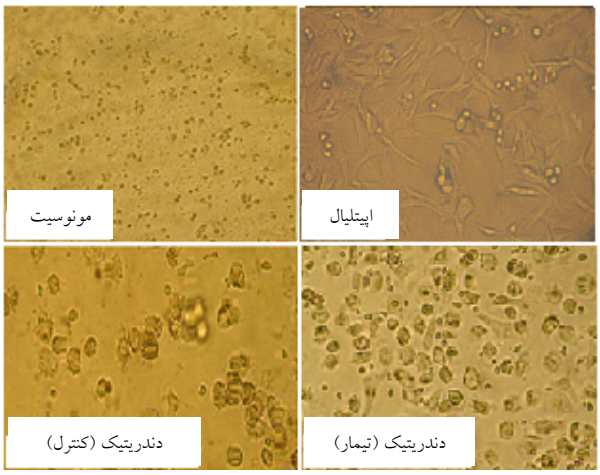
نمودار-۱: میانگین درصد بیگانه‌خواری در سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار ۱ در حالت نابالغ و بالغ (* وجود اختلاف معنی‌دار بین حالت بالغ و نابالغ P<۰/۰۵)



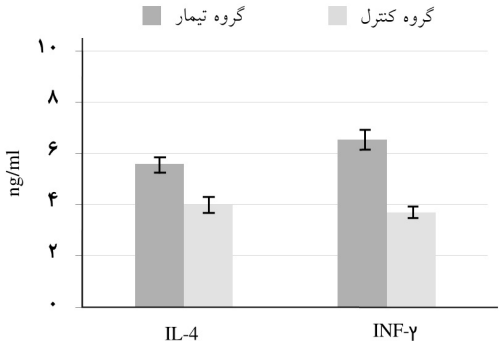
نمودار-۴: میانگین میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12 از سلول‌های دندریتیک در حالت بالغ (* وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل P<۰/۰۵)



نمودار-۲: مقایسه میانگین نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشان‌دار در گروه کنترل و تیمار ۱



شکل-۱: سلول‌های دندریتیک (کنترل و تیمار)، **سلول‌های اپیتلیال و مونوسیت‌های خون** (۴۰۰ x) (عکس‌برداری با میکروسکوپ معکوس)



نمودار-۳: میانگین میزان ترشح سایتوکین‌های IL-4 و IFN-γ از لنفوسیت‌های T که توسط سلول‌های دندریتیک تحریک شده بودند

MLR، به‌وسیله کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آن‌ها بر حسب ng/ml در نمودار ۳ نشان داده شده است. میزان IL-12 و IL-10 ترشح شده از سلول‌های دندریتیک در روز هفتم کشت از طریق مایع رویی این سلول‌ها به‌وسیله تست الایزا مورد سنجش قرار گرفت که میانگین نتایج آن‌ها بر حسب ng/ml در نمودار ۴ آورده شده است و مشاهده گردید که در مورد ترشح IL-12، بین گروه کنترل و تیمار ۱ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P=۰/۰۴۹). هم‌چنین مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده به‌وسیله میکروسکوپ

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف بررسی شد و مشاهده گردید که سلول‌های دندریتیک از مونوسیت‌ها بزرگ‌تر شده بودند و زوایه سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند (شکل ۱).

بحث

به‌تازگی سلول‌های دندریتیک به‌دلیل مجموعه وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه تقویت پاسخ‌های ایمنی و یا کنترل آن‌ها، نظر محققین را به خود جلب نموده است. تولید و القای بلوغ در این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی نه‌تنها کاربردهای زیادی در زمینه ایمنی‌درمانی سرطان‌ها و اختلالات سیستم ایمنی هم‌چون بیماری‌های خود ایمنی دارد، بلکه امکان درک بیش‌تر مکانیسم‌های حاکم بر سیستم ایمنی در شرایط داخل بدن را نیز فراهم می‌آورد.[۱۳] سلول دندریتیک ایده‌آل برای ایمونوتراپی باید بتواند بعد از بلوغ و به‌عنوان یکی از مشخصه‌های اصلی بلوغ، سلول‌های T اختصاصی را در نهایت توان تحریک کند که ابزارهای آن برای این امر، مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD40، CD80/86، مولکول‌های چسبندگی و سایتوکین‌هایی مثل IL-12 می‌باشد. از طرفی سلول‌های دندریتیک بالغ می‌بایست دارای مقادیر کاهش‌یافته‌ای از CD14 بر سطح خود باشند. همان‌گونه که در نتایج ملاحظه گردید میزان بیان مولکول CD14 در تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است که این کاهش در واقع در حین بلوغ و به‌واسطه کاهش نسخه‌برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد.[۱۴] سلول‌های دندریتیک به‌واسطه تماس با سلول‌های اپیتلیال بلوغ می‌یابند[۱۵] و یکی از نکات مورد بحث در مورد سلول‌های دندریتیک بالغ، افزایش بیان MHC II در سطح این سلول‌ها می‌باشد که در مطالعه حاضر، بیان این مولکول در قالب سنجش میزان بروز HLA-DR در سطح سلول‌های تولیدشده مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که ملاحظه گردید میزان بیان این مولکول در سطح سلول‌های دندریتیک تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته است که این مسئله می‌تواند به‌واسطه تماس با سلول‌های اپیتلیال می‌باشد. یکی از ویژگی‌های مهم سلول دندریتیک ایده‌آل برای ایمونوتراپی، بیان بالای مولکول‌های CD80 و CD86 در سطح این سلول‌ها می‌باشد و همان‌طور که در نتایج ملاحظه گردید میزان بیان مولکول‌های CD80 و CD86 در تیمار ۱ به‌میزان چشمگیری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که این مسئله نویددهنده القای بلوغ در سلول‌های DC به‌وسیله سلول‌های اپیتلیال می‌باشد. یکی دیگر از شاخص‌های مورد بحث در سلول‌های دندریتیک، میزان بیان مولکول CD83 در سطح این سلول‌ها می‌باشد، این نشان‌گر جزو ابرخانواده ایمونوگلوبولین‌ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله‌ای از ابهام است. البته به‌نظر می‌رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی‌تاثیر نباشد.[۱۶] با توجه به نتایج به‌دست‌آمده این نظریه مطرح می‌گردد که سلول‌های دندریتیک تیمار ۱ از لحاظ شاخص‌های فنوتیپی دارای مولفه‌های بهتری نسبت به سلول‌های گروه کنترل می‌باشند. این نتایج با گزارش Andrew که عنوان کرد سلول‌های اپیتلیال باعث تحریک بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌شوند هم‌خوانی دارد.[۱۷]

ویژگی مورد بحث بعدی قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک است. انتظار می‌رود سلول‌های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه‌خواری و تمامی ویژگی‌های لازم برای اخذ آنتی‌ژن از جمله گیرنده‌های سطحی لازم برای این کار را از دست داده و در عوض قدرت عرضه آنتی‌ژن و در نهایت تحریک سلول‌های T را تقویت کنند. سلول‌های دندریتیک تیمار ۱ از این لحاظ نیز نسبت به گروه کنترل برتری نشان دادند و این سلول‌ها در حالت نابالغ دارای توانایی بیش‌تر در فاگوسیتوز ذرات لاتکس بید فلورسانت (کونژوگه با FITC) نسبت به گروه کنترل بودند و هنگامی که بالغ شدند توانایی فاگوسیتوزشان به‌شدت کاهش یافت.[۱۸] در مورد قدرت تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T به‌وسیله سلول‌های دندریتیک (MLR)، همان‌گونه که مشاهده گردید سلول‌های DC در تیمار ۱ لنفوسیت‌ها را بیش‌تر تحریک کرده بودند و سبب تکثیر بیش‌تری شده بودند. لذا می‌توان گفت که افزایش تحریک نیز به‌واسطه بلوغ بیش‌تر و بیان HLA-DR بالاتر و بیان مولکول‌های کمک تحریکی بیش‌تر مثل CD80, CD86 توسط سلول‌های دندریتیک تیمار ۱ می‌باشد.[۱۹] Atsuta نیز گزارش کرد که دو نوع سلول اپیتلیال برانشیال و آلوئولار از طریق تولید IL-15 می‌توانند باعث القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک شوند و توانایی تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T به‌وسیله سلول‌های دندریتیک را افزایش دهند.[۲۰] سلول‌های دندریتیک می‌توانند عملکرد لنفوسیت‌های T تنظیم‌کننده را کنترل نمایند. این سلول‌ها از طریق ترشح سایتوکین‌های IL-12 و اینترفرون‌های کلاس I

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

و II نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. اگر سلول‌های دندریتیک در طی بلوغ به‌سمت DC1 حرکت کنند میزان تولید IL-12 نسبت به IL-10 بیش‌تر خواهد بود و برعکس اگر میزان تولید IL-10 نسبت به IL-12 بیش‌تر باشد سلول‌های دندریتیک به‌سمت DC2 خواهند رفت. DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن‌های داخل سلولی موثر است و DC2 در تولید آنتی‌بادی و مبارزه با پاتوژن‌های خارج سلولی ایفای نقش می‌کند.[۲۱و۲۲] همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده گردید نسبت IL-12 به IL-10 در تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است بنابراین سلول‌های دندریتیک تولیدشده در تیمار ۱ از نوع DC1 می‌باشند. لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی‌ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سایتوکین‌ها می‌پردازند و بر اساس نوع، مقدار و مسیر عرضه آنتی‌ژن و نیز محیط ظریف اطراف سلول‌های T به‌همراه تحریکات سایر سلول‌ها دو نوع سلول T یعنی Th1 و Th2 به‌وجود می‌آیند که هر کدام از آن‌ها انواع خاصی از سایتوکین‌ها را ترشح می‌کنند. IFN-γ به‌عنوان سایتوکین شاخص Th1 و IL-4 به‌عنوان سایتوکین شاخص Th2 شناخته می‌شود. فعال شدن هر یک از این سلول‌ها به تقویت بیش‌تر بازوی سلولی و یا هومورال سیستم ایمنی می‌انجامد که در ایمونولوژی تومور القای پاسخ Th1 و به تبع آن تقویت ایمنی سلولی با واسطه سایتوکین‌هایی چون IFN-γ، IL-12 و غیره با تقویت پاسخ ضد توموری، تحلیل تومور و بهبود بیماری همراه است، بنابراین آگاهی از نوع سایتوکین‌های تولیدشده در پاسخ به تحریک سیستم ایمنی با آنتی‌ژنی خاص به اتخاذ تصمیم در مورد روند پاسخ ایمنی و بهبود بیماری کمک به‌سزایی می‌کند.[۲۳و۲۴] بر این مبنا، در این مطالعه سنجش IL-4 و IFN-γ به‌عنوان نمایندگان تیپ‌های سایتوکینی Th1 و Th2 مورد سنجش قرار گرفت و چون نسبت IFN-γ به IL-4 در تیمار ۱ بیش‌تر بود، این‌طور استنباط می‌شود که سلول‌های دندریتیک تیمار ۱ لنفوسیت‌های T را به‌سمت Th1 پلاریزه کرده‌اند.

Rimoldi گزارش کرد که سلول‌های اپیتلیال روده بر روی عملکرد سلول‌های دندریتیک موثرند.[۲۵] Sierro گزارش کرد که سلول‌های اپیتلیال روده از طریق CCL20، باعث فعالیت سلول‌های دندریتیک و مهاجرت آن‌ها می‌شوند.[۲۶] با توجه به این‌که امروزه پژوهشگران در پی بهبود کیفیت سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی هستند، پیشنهاد می‌شود تاثیر عوامل بلوغ دیگر بر روی عملکرد سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین تاثیر عوامل بلوغ فوق در عرضه سایر آنتی‌ژن‌ها از جمله آلرژن‌ها مورد بررسی کامل قرار گیرد. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که سلول‌های اپیتلیال پوست، باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌گردند و باعث بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌شوند. هم‌چنین باعث تولید DC1 در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند، بنابراین می‌توان از این سلول‌ها در ایمونوتراپی تومور استفاده کرد، برای اثبات بیش‌تر نیاز به مطالعات بیش‌تری وجود دارد.

References

1. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5(4):296-306.
2. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995;55(5):1099-104.
3. Li YL, Wu YG, Wang YQ, Li Z, Wang RC, Wang L, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo. *World J Gastroenterol* 2008;14(46):7127-32.
4. Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol* 2009;5(3):379-90.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000;18:767-811.
6. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. *Cell Immunol* 2009;257(1-2):23-31.
7. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90(4):1458-70.
8. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360(6401):258-61.
9. Stoeck M, Kromer W, Gekeler V. Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines. *Immunobiology* 1998;199(1):14-22.
10. Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, et al. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp Med* 2000;191(1):157-70.
11. Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol* 2009;5(3):379-90.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

12. Kanto T, Kalinski P, Hunter OC, Lotze MT, Amoscato AA. Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 2001;167(7):3773-84.
13. Regamey N, Obregon C, Ferrari-Lacraz S, van Leer C, Chanson M, Nicod LP, et al. Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37(1):75-84.
14. Bitton RJ. Cancer vaccines: a critical review on clinical impact. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6(1):17-26.
15. Stick SM, Holt PG. The airway epithelium as immune modulator: the LARC ascending. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(6):641-4.
16. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* 2002;168(6):2599-602.
17. Thorley AJ, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3alpha)-induced dendritic cell migration. Cell Mol Biol 2005;32(4):262-7.
18. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Grégoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. *Cancer Res* 1999;59(14):3329-32.
19. Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klüter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods* 2003;275(1-2):57-68.
20. Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(5):571-82.
21. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159(10):4772-80.
22. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154(10):5071-9.
23. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161(3):1083-6.
24. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154(10):5071-9.
25. Rimoldi M, Chieppa M, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:66-74.
26. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13722-7.

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 11, February 2012: 686-694

Inducing maturation of monocyte-derived dendritic cells on human epithelial cell feeder layer

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:48 IRST on Wednesday September 26th 2018

Meysam Ganji Bakhsh M.Sc.[1*]
Vahid Nejati Ph.D.[1]
Masoumeh Asadi M.Sc.[1]
Nowruz Delirezh Ph.D.[2]
Farah Farokhi Ph.D.[1]

1- Department of Biology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: February 22, 2011 Accepted: May 07, 2011

Abstract

Background: Nowadays, dendritic cells (DCs) have a special place in cancer treatment strategies and they have been used for tumor immunotherapy as they can induce immune response against tumor cells. Researchers have been trying to generate efficient dendritic cells in vitro; therefore, this research was done to generate them for use in research and tumor immunotherapy.

Methods: This study took place at Urmia University in 2010-2011 years. In this study plastic adherent monocytes were incubated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) for five days. Finally, fully matured and stable DCs were generated by 48 hours of incubation in a monocyte conditioned medium (MCM) containing tumor necrosis factor-α (TNF-α) and epithelial cells. Phenotypic and functional analysis were carried out by using anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, and anti-CD83 monoclonal antibodies, and by determining their phagocytic activity, mixed lymphocyte reaction (MLR) and cytokine production, respectively.

Results: Dendritic cells were produced with high levels of surface molecule, i.e. of CD80, CD83, CD86, HLA-DR, expression and low levels of CD14 expression. Dendritic cells showed efficient phagocytosis and ability to stimulate T-lymphocytes. Moreover, dendritic cells could secrete high levels of interleukin-12 (IL-12) cytokine which was depictive of their full maturation. Measurement of the produced cytokines showed the generation of type-1 dendritic cells (DC1).

Conclusion: Our study showed that skin epithelial cells could induce maturation of monocyte-derived dendritic cells (DCs). This feeder layer led to the production of efficient dendritic cells with the ability to be used for tumor immunotherapy.

Keywords: Cell maturation, dendritic cells, epithelial cells, monocyte.

* Corresponding author: Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, P.O. Box 5715915199, Nazlou Road, Urmia, Iran.
Tel: +98-935-9689985
E-mail: meysam_ganjy@yahoo.com