تمایز سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت بر روی لایه‌ای از سلول‌های اندوتلیال به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده

کیکاوس غلامی[1*]
وحید نجاتی[1]، نوروز دلیرژ[2]
میثم گنجی‌بخش[1]، معصومه اسدی[1]

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

[*] نویسنده مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی: ۵۷۱۵۹۱۵۱۹۹
تلفن: ۰۹۱۴-۸۲۲۴۹۶۳
email: keyka.gholami@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی وابسته به مهاجرت لکوسیت‌ها از عرض سلول‌های اندوتلیال (EC) می‌باشد. سلول‌های دندریتیک (DCs) که نقش مهمی در شروع پاسخ‌های ایمنی سلولی دارند و در مسیر مهاجرت از بافت‌های محیطی به عقده‌های لنفاوی با سلول‌های اندوتلیال عروق لنفاوی تماس پیدا می‌کنند. در این تحقیق اثرات سلول‌های اندوتلیال چسبیده به سطح و غیرفعال بر روی خصوصیات فنوتیپی و عملکردی سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت. ***روش بررسی:*** بعد از جدا نمودن سلول‌های تک هسته‌ای از خون محیطی و کشت آن‌ها در محیط RPMI حاوی IL-4 (اینترلوکین-۴) FCS و GM-CSF (فاکتور محرک- گرانولوسیت و مونوسیت) به‌مدت پنج روز سلول‌های دندریتیک نابالغ ایجاد شد. این سلول‌ها همراه با فاکتورهای بلوغ (مایع رویی مونوسیت (MCM)، TNF-α و Poly I-C) بر روی سلول‌های اندوتلیال اضافه شد و به‌مدت ۴۸ ساعت، در محیط کشت RPMI کشت داده شد. هفت روز پس از کشت بلوغ سلول‌های کشت داده شده توسط دستگاه فلوسایتومتری، بتا کانتر و کیت الایزا بررسی شد. ***یافته‌ها:*** یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که سلول‌های اندوتلیال از طریق تماس سلول به سلول با سلول‌های دندریتیک ارتباط برقرار نموده و باعث مهار بلوغ در سلول‌های دندریتیک می‌گردد. این اثر به‌علت کاهش بیان CD83, CD86, CD80 و HLA-DR و افزایش بیان CD14 می‌باشد. آن‌ها هم‌چنین با مهار نمودن محرک‌های لنفوسیت‌های T موجب کاهش تکثیر آن‌ها می‌شوند. ***نتیجه‌گیری:*** براساس یافته‌های حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت، سلول‌های اندوتلیال که در مسیر مهاجرت سلول‌های دندریتیک قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بالقوه عملکرد و تمایز سلول‌های دندریتیک باشند.

کلمات کلیدی: سلول‌های دندریتیک، سلول اندوتلیال، مونوسیت، لایه تغذیه‌کننده.

مقدمه

سلول‌های دندریتیک Dendritic cells (DC) مهم‌ترین سلول‌های پردازش‌کننده آنتی‌ژن می‌باشند که نقش مهمی در شروع پاسخ‌های ایمنی خصوصاً در تحریک سلول‌های T دست نخورده دارند. آن‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان منشاء می‌گیرند[1] و حدود ۵-۲٪ از لکوسیت‌های خون را تشکیل می‌دهند.[2] عواملی نظیر عوامل میکروبی و واسطه‌های التهابی باعث القا بلوغ سلول‌های DC شده و منجر به افزایش بیان مولکول‌های HLA-DR، کمک تحریکی، تولید سایتوکین و ظرفیت مهاجرتی آن‌ها می‌شوند.[3] در بافت‌های لنفاوی، DC آنتی‌ژن را به لنفوسیت‌های $T\ CD4^+$ اختصاصی آنتی‌ژن عرضه می‌نمایند و موجب فعال شدن سلول‌های مذکور و القای پاسخ‌های ایمنی اولیه می‌شوند. سلول‌های TCD4 نیز به نوبه خود پاسخ سایر سلول‌های سیستم ایمنی، نظیر لنفوسیت‌های B، لنفوسیت‌های TCD8، سلول‌های Natural Killer (NK) و ماکروفاژها را تنظیم می‌کنند.[4] مهاجرت گلبول‌های تک‌هسته‌ای خون به داخل بافت‌ها توسط بیان مولکول‌های β_2-integrine (CD18, CD11) و β_1-integrine واقع بر سطح این سلول‌ها انجام گرفته و باعث اتصال آن‌ها به سلول‌های اندوتلیال می‌شود، که این اتصال در سلول‌های اندوتلیال تحریک‌شده با Tumor Necrosis Factor (TNF-α) افزایش پیدا می‌کند.[5] سلول‌های دندریتیک به‌طور مداوم از طریق عروق لنفاوی از بافت‌های محیطی به طرف لنفوسیت‌های T در عقده‌های لنفاوی ثانویه حرکت می‌کنند.[6] سلول‌های دندریتیک هنگام مهاجرت با ماتریکس خارج سلولی،

فاکتورهای‌محلول و انواع مختلف سلول‌ها (ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، اندوتلیال، اپی‌تلیال و غیره) تماس پیدا می‌کنند.[۷] تحقیقات نشان می‌دهد که سلول‌های اندوتلیال با تولید فاکتور مهارکننده رشد اندوتلیال عروق و مهارکننده رگ‌زایی باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شوند.[۸] در مطالعاتی که از کشت سلول‌های اندوتلیال در یک ماتریکس سه‌بعدی یا دوبعدی استفاده شده بود، مشاهده گردید که بلوغ سلول‌های دندریتیک مهار می‌شود،[۹] در حالی‌که سلول‌های اندوتلیال کشت‌شده با TNF-α باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شوند.[۱۰] شواهد روز افزونی وجود دارد که استرومای محیط‌های کوچک نقش مهمی را در تنظیم سلول‌های DC بازی می‌کنند. با توجه به این مفروضات، هدف این تحقیق بررسی تماس مستقیم سلول‌های اندوتلیال چسبیده به سطح و تحریک نشده با سایتوکین در حضور فاکتورهای بلوغ بر روی بلوغ و عملکرد سلول‌های DC می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات تحقیقی اصیل از تاریخ ۸۹/۰۱/۲۰ تا تاریخ ۸۹/۰۸/۳۰ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفته است. آنتی‌بادی‌های CD14 FITC، CD80 FITC، CD83 FITC، CD86 FITC، HLA-DR PE و بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC) از شرکت Sigma خریداری شد. کیت اندازه‌گیری سایتوکین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 از شرکت Peprotech خریداری شد.

کشت سلول: رده سلول‌های اندوتلیال ورید انسان Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) از انستیتو پاستور خریداری و در محیط کشت Hams-Dmem حاوی (۱۰٪) Fetal Bovine serum (FCS) کشت و بعد از پر شدن ۸۰٪ کف فلاسک، توسط تریپسین ۵٪ حاوی (۰/۲٪) Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) از کف فلاسک برداشته شد و در کرایوهای حاوی ۱۰٪ DMSO، محیط کشت ۴۵٪ و ۴۵٪ FCS به‌میزان حجم کلی ۱ml در تانک ازت در دمای ۱۹۶- تا موقع استفاده نگه‌داری شد.

کشت سلول‌های دندریتیک: برای به‌دست آوردن سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)، از سه نفر داوطلب با سرنگ آغشته به هپارین خون تهیه شد، سپس با همان حجم از محیط کشت RPMI رقیق گردید، و به‌آرامی روی فایکول برده شد، و با سرعت ۸۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مراحل بعدی برای حذف فایکول و پلاکت‌ها، محلول فوق به‌ترتیب با سرعت ۴۵۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۲۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه مجددا سانتریفوژ شد. از سلول‌های PBMC به‌دست آمده در مراحل قبل، تعداد $۱/۵–۳\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار پنج میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml) استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml)، 2ME ($۲/۵\times۱۰^{-۵}$ M) FBS (۱۰٪) به‌مدت دو ساعت در ۳۷ °C، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام جدا شدند، و به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند محیط کشت جدید همراه با فاکتورهای تمایز (۱۰۰۰U/ml) GM-CSF و (۵۰۰U/ml) IL-4 اضافه و کشت داده شد. در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید. عصاره سلول‌های توموری خون K562 که قبلاً به‌عنوان آنتی‌ژن تهیه شده بود، در روز چهار اضافه گردید. در روز پنجم فاکتورهای بلوغ TNF-α (۱۰ng/ml) و ۲۰ng/ml از Poly-riboinosinic: Polyribocytidylic acid (PLY-IC) و ۲۵٪ مایع رویی مونوسیت (MCM) جهت کمک به فرآیند بلوغ سلول‌های دندریتیک اضافه گردید، و تا ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور انکوبه شد (گروه کنترل). در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بافر Phosphate Buffered Saline (PBS) حاوی EDTA (۰/۵mM) برداشت و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت بیگانه‌خواری و تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و تولید سایتوکین‌ها مطالعه شد.

تهیه عصاره سلول‌های توموری از سوسپانسیون سلولی K562: سوسپانسیون سلول‌های توموری K562 به تعداد $۱۰–۱۱^{۶}$ سلول تهیه و دو بار با محیط کشت RPMI 1640 شسته شد. بعد از آخرین شستشو حجم سوسپانسیون سلولی به ۱/۵ml رسانده شد. سوسپانسیون سلولی چهار بار با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ °C هر کدام به‌مدت پنج دقیقه Freeze/thaw گردید. محصولات به‌دست آمده به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و مجدداً به‌مدت یک ساعت، با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ گردید و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲µm استریل گردید.

کشت هم‌زمان سلول‌های دندریتیک با سلول‌های اندوتلیال (Co culture): سلول‌های دندریتیک نابالغ تولید شده در گروه کنترل

در روز پنجم همراه با فاکتورهای بلوغ TNF-α (۱۰ng/ml) و ۲۰ng/ml از PLY-IC ۲۵٪ از MCM مستقیما بر روی تک لایه سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده اضافه شد و به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد (گروه تیمار). در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) برداشت و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت بیگانه‌خواری و تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و تولید سایتوکین‌ها مطالعه شد.

مطالعه میکروسکوپی: مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده از اولین مرحله کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تا مرحله نهایی برداشت سلول‌های دندریتیک بالغ به‌وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که جزییات تغییرات مورفولوژیک و ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک به‌دست آمده در بخش نتایج ارایه گردیده است.

بررسی فنوتیپ سطحی سلول به‌وسیله فلوسایتومتری: در روز هفتم کشت، اکثریت سلول‌های دندریتیک به سلول‌های اندوتلیال چسبیده بودند و تعداد کمی به‌حالت شناور در آمده بودند. با اضافه کردن بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) و انکوبه کردن در ۳۷ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه برداشت گردیدند و سلول‌های به‌دست آمده بعد از یک‌بار شستشو با بافر FACS در همین بافر که حاوی ۲٪ سرم موش بود به‌مدت ۴۵ دقیقه در ۴ °C انکوبه شد. در پایان زمان انکوباسیون سلول‌ها مجدداً با بافر FACS شستشو شده بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰Lμ مقدار ۱۰Lμ آنتی‌بادی مربوطه یا کنترل ایزوتیپ اضافه به‌مدت ۴۵ دقیقه در ۴ °C انکوبه گردیدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها یک‌بار با بافر Fluorescent Activation Cell Sortiny (FACS) شسته شده و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (Becton- Dickinson آمریکا) مورد آزمایش قرار گرفته نتایج حاصل با نرم‌افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

واکنش مختلط لکوسیتی آلوژن و اتولوگ: به‌منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه کنترل و گروه تیمار از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ‌دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن و اتولوگ به‌شرح زیر انجام گرفت. لنفوسیت‌های T آلوژن از PBMC افراد داوطلب و با خلوص بیش از ۸۰٪ تهیه گردید. تعداد 10^5 لنفوسیت T با سلول‌های دندریتیک در نسبت‌های مختلف (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) مخلوط و به‌مدت پنج روز در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد در محیط کشت RPMI-1640 به‌اضافه ۱۰٪ سرم AB انسانی در حجم ۲۰۰μl در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO2 کشت داده شد. خانه‌های حاوی سلول‌های دندریتیک، و خانه‌های لنفوسیت‌های T به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱μCi متیل تیمیدین نشان‌دار شده با $[^3H]$ (Amersham) اضافه و به‌مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید. سلول‌ها توسط دستگاه Cell Harvester (شرکت ICN– انگلستان) بر روی فیلتر نیتروسلولزی منتقل گردید. بخش‌های از فیلتر که حاوی سلول‌های برداشت شده بود جدا و در ویال مخصوص قرار گرفته مقدار ۲ml محلول سنتیلاسیون به هر ویال اضافه گردید. میزان تابش پرتو بتا از هر نمونه به‌مدت یک دقیقه توسط دستگاه شمارش‌گر بتا (شرکت Wallac, Finland) شمارش و ثبت گردید. تمامی آزمایشات به‌صورت سه‌تایی انجام و نتایج به‌دست آمده به‌صورت Count Per Minute (CPM) محاسبه و گزارش گردید.

اندازه‌گیری قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک: ۲۰μl از بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC) (Sigma) با غلظت $۲/۵\times۱۰^۸$ در هر میلی‌لیتر در ۵μl سرم AB^+ به‌مدت ۷/۵ دقیقه اپسونیزه (Opsonization) شد. سپس بید اپسونیزه شده با ۲۰μl از سلول‌های دندریتیک بالغ (روز هفت) با غلظت $۱/۲۵\times۱۰^۷$ در هر میلی‌لیتر مخلوط شده و با اضافه کردن ۶۰μl بافر مخصوص بیگانه‌خواری (PBS، ۵ mM گلوکز، $CaCl_2$ ۰/۹mM، $MgSO_4$ ۰/۵ mM و ۰/۵٪ FBS) به حجم کلی ۱۰۰μl رسید (در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد). میکروپلیت حاوی گروه تیمار به‌همراه گروه شاهد حاوی تمام مواد به‌جز بید لاتکس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها برداشت و به‌منظور خاموش شدن فلورسانت سطح سلول با بافر خاموش‌کننده Quenching Buffer (۰/۹٪ NaCl، بافر سیترات ۱۳μM و ترپیان بلو ۰/۲۵mg/ml) شسته شدند (سانتریفیوژ، ۳۰۰×g، ۱۰ دقیقه).

اندازه‌گیری سایتوکین: آزمایش مربوط به بررسی سایتوکین‌ها به‌صورت جداگانه به‌وسیله کیت اندازه‌گیری سایتوکین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 (Peprotech) طبق پروتکل کارخانه سازنده انجام گرفت. میزان تولید اینترفرون- گاما (IFN-γ) و IL-4 در مایع رویی تست MLR و میزان تولید IL-10 و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک مورد سنجش قرار گرفت. تغییر رنگ

پلیت با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (Awerness) و با طول موج ۴۰۵nm قرائت شد. متوسط OD به‌دست آمده محاسبه با استفاده از برنامه curve expert (version 0/7) مقدار IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 موجود در نمونه تعیین و به‌صورت ng/ml گزارش شد.

تمامی آزمایش‌ها سه‌بار تکرار شد و داده‌های به‌دست آمده به‌صورت Mean± SD بیان شدند و جهت تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way anyway) نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۷) و آزمون t-test استفاده گردید. سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. رسم نمودارها در فضای Excel (ویراست ۲۰۰۷) انجام گرفت. هم‌چنین نتایج تست الایزا توسط نرم‌افزار CUREXPERT 0.7 مورد آنالیز قرار گرفت. مقدار P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

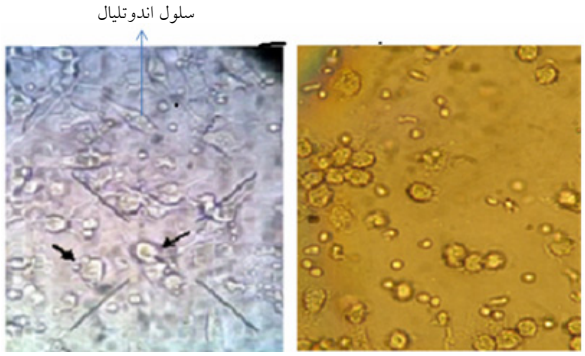
بررسی مورفولوژیکی: کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در دمای ۳۷ °C به‌مدت دو ساعت باعث شد تا اکثریت سلول‌ها که درصد بیشتر آن‌ها مونوسیت بودند به ته فلاسک بچسبند و بعد از سه روز کشت سلول‌های چسبنده در حضور IL-4, GM-CSF چسبندگی خود را از دست داده و شناور شدند. این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌ها شده و زواید سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند. این روند ادامه یافت تا این‌که در روز پنج با افزودن فاکتورهای بلوغ TNF-α, PLY-IC, MCM افزایش قابل ملاحظه اندازه سلول و تعداد زواید سیتوپلاسمی و روند شناور شدن آن‌ها دیده شد (گروه کنترل). در حالی‌که DC برداشت شده در روز هفتم در گروه تیمار (Co culture-EC) چسبنده، زواید سیتوپلاسمی کم و کروی‌شکل بودند (شکل ۱).

ویژگی‌های فنوتیپی سلول‌های دندریتیک: بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR، از نظر آماری در گروه‌های کنترل و تیمار با همدیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵)، که با علامت * نشان داده شده است (نمودار ۱). مشخص شد که میزان بیان CD80، CD86، CD83 و HLA-DR در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. فقط در مورد CD86 و HLA-DR تفاوت آماری معنی‌دار بر اساس P<۰/۰۵ وجود داشت. از طرف دیگر بیان CD14 در گروه تیمار نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد.

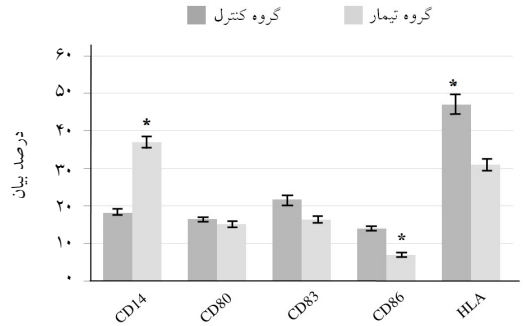
قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک: با روش فلوسایتومتری مشاهده گردید که درصد بیگانه‌خواری گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

سنجش تحریک لنفوسیت T(MLR): به‌منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار و گروه کنترل، توانایی آن‌ها در القای واکنش لوکوسیتی آلوژنیک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار دارای توانایی کمتری در القای تکثیر سلول‌های آلوژن نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه کنترل می‌باشند (نتایج به‌صورت میانگین cpm در نمودار ۳)، که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

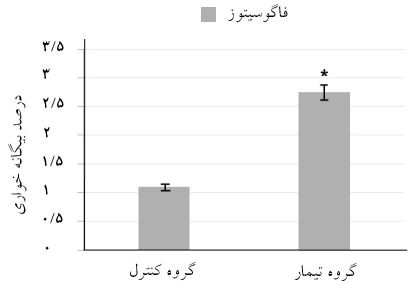
بررسی توانایی تولید سایتوکین‌ها توسط سلول‌ها: میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که در مجاورت سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و به‌مدت پنج روز قرار گرفته بودند (تست MLR)، به‌وسیله کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت. میزان ترشح IL-12 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود در حالی که میزان ترشح IL-10 در تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش



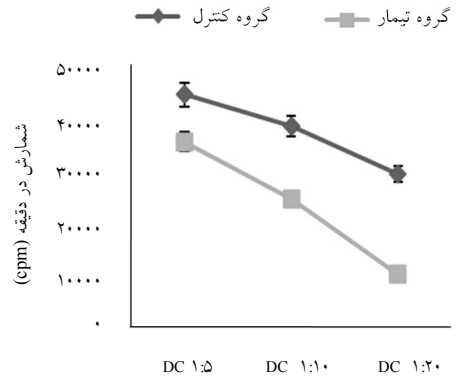
شکل-۱: مقایسه سلول‌های دندریتیک در گروه کنترل (A) و تیمار (B)



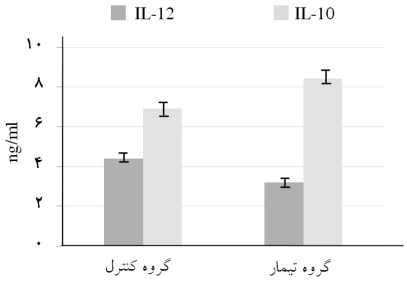
نمودار-۱: میانگین بیان نشانگرهای مولکولی در گروه کنترل و تیمار (* وجود اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل P<۰/۰۵)



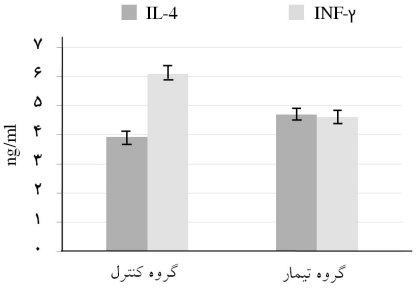
نمودار-۲: میانگین درصد فاگوسیتوز در گروه کنتـرل و تیمـار (* وجـود اخـتلاف معنی‌دار نسبت به کنترل P<۰/۰۵)



نمودار-۳: واکنش مختلط لنفوسیتی در رقت‌های مختلف DC در گـروه کنتـرل و تیمار



نمودار-۴: میانگین تولید سایتوکین‌ها در سلول‌های DC در گروه کنترل و تیمار



نمودار-۵: میانگین تولید سایتوکین‌ها در لنفوسیت‌های مجاورت شده با سلول‌های DC گروه کنترل و تیمار

یافته بود، همین‌طور نسبت IL-12 به IL-10 در تیمار نـسبت بـه گـروه کنترل کاهش یافته بود (نمودار ۴). نتایج نشان داد میزان ترشح INF-γ توسط لنفوسیت‌های T، در گروه تیمار نسبت به گروه کنتـرل کـاهش یافته و میزان IL-4 در گروه تیمار نسبت به کنترل افزایش نشان می‌داد، اما داده‌های سایتوکین‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند (نمودار ۵).

بحث

جمعیت‌های مختلفی از سلول‌های دندریتیک در بافت‌هـای مختلـف وجود دارد، که احتمالا به‌خاطر تغییر ماهیت آن‌ها از حالـت پـردازش کننده آنتی‌ژن به‌حالت ارایـه‌دهنـده آنتـی‌ژن مـی‌باشـد، کـه بیـشترین تعداد مولکول‌های MHC-II و مولکول‌های کمک تحریکـی لنفوسـیت T (HLA-DR, CD80, CD83) را در سطح خارجی خود بیان می‌کنند کـه به این فرایند بلوغ سلول‌های دنـدریتیک گوینـد.[۱۲و۱۱] ایـن تغییـر فـاز به‌عنوان یـک نقطه عطف در پاسخ ایـمنی به‌حساب می‌آید زیرا سلول دندریتیک نابالغ نه‌تنها نمی‌تواند به‌طور موثر لنفوسیـت T اولیه را تحریک کنند.[۱۴و۱۳] بلکه باعث پیـشرفت تحمل ایمنی خواهد شد.[۱۵] سلول‌های دندریتیک به‌طور مداوم از بافت‌های محیطی به مناطق لنفوسیت‌های T در عقده‌های لنفاوی ثانویه حرکت می‌کنند.[۶] هنگام حرکت DCs از بافت‌های محیطی به بافت‌های لنفاوی، با محیط‌های کوچک استرومای که از ماتریکس خارج سلولی، فاکتورهای محلول و انواع مختلف سلول‌ها (از قبیل ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، اندوتلیال، اپی‌تلیال و غیره) تشکیل شده تماس پیدا می‌کنند.[۷] در این میان سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی را در چسبیدن، مهاجرت و تمایز سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان دارند.[۱۶] اندوتلیوم از نظر متابولیکی کاملا تخصصی و فعال می‌باشد، و یک سد بین خون و بافت زیرین می‌باشد، و هم‌چنین نقش مهمی در انتقال پیام‌های التهابی و جذب سلول‌های سیستم ایمنی به مکان‌های التهاب دارند.[۹] در این مطالعه که از کشت هم‌زمان سلول‌های اندوتلیال چسبیده به سطح و تحریک نشده با سایتوکین‌های التهابی با سلول‌های دندریتیک نابالغ مشتق از مونوسیت به‌مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. نتایج در پایان روز هفتم نشان داد که سلول‌های دندریتیک به تک‌لایه سلول‌های اندوتلیال

چسبیده بودند، و دارای زواید سیتوپلاسمی کوتاه و کروی‌شکل بودند. از آنجا که سلول‌های دندریتیک بالغ را به‌عنوان سلول‌های دارای زواید سیتوپلاسمی بلند و حالت شناور و غیر چسبان تعریف می‌کنند.[۱۶] نتایج این تحقیق براساس بررسی مورفولوژیکی نشان‌دهنده سلول دندریتیک نابالغ می‌باشد که این نتایج با کارهای Jancic منطبق می‌باشد. وی نشان داد که نزدیک به ۸۰ درصد از سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت به‌طور محکم به سلول‌های اندوتلیال غیرفعال می‌چسبند.[۱۷] در بررسی نشان‌گرهای سلول‌های دندریتیک اضافه شده به تک‌لایه سلول‌های اندوتلیال با دستگاه فلوسایتومتری مشخص شد که سلول‌های دندریتیک سطح پایینی از مولکول‌های CD80، CD83، HLA-DR و سطح بالای از CD14 را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند (نمودار ۱) که این نتایج با کارهای Heiko Methe منطبق می‌باشد. وی نشان داد سلول‌های اندوتلیال که در داخل یک ماتریکس دو بعدی یا سه‌بعدی کشت داده شوند باعث مهار بلوغ سلول‌های دندریتیک از طریق مهار بیان CD80، CD83، HLA-DR می‌شوند. هم‌چنین نشان داد که سلول‌های اندوتلیال غیر چسبنده (سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده در محلول نمک) باعث افزایش بیان CD80، CD83، HLA-DR می‌شوند.[۹] از طرف دیگر نتایج حاصل از این تحقیق با کارهای Moldenhauer A در تضاد می‌باشد.[۱۸] این اختلاف احتمالا دو علت باشد. اول این‌که آن‌ها از سلول‌های دندریتیک مشتق از سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان (CD34) استفاده کرده‌اند (نه سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت). دوم این‌که از سلول‌های اندوتلیالی استفاده کرده بودند که قبلا توسط TNF-α تحریک شده بود. در حالی‌که در این مطالعه از سلول‌های اندوتلیال تحریک نشده و چسبیده به سطح به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده شد. گزارش شده که TNF-α باعث افزایش ترشح فاکتور مهارکننده رشد اندوتلیال عروق Vascular Endothelial Growth Inhibitor (VEGI) از سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با TNF-α می‌شود.[۸] در تحقیق دیگر توسط Fang Tian، مشاهده گردید که VEGI باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش بیان مولکول‌های کمک تحریکی CD83، CD80 و HLA-DR می‌شود.[۸] در ارزیابی تولید سایتوکین توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده با تک‌لایه سلول‌های اندوتلیال نتایج نشان داد که میزان IL-10 نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود، در حالی‌که میزان IL-12 در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود (نمودار ۴). IL-10 به‌طور عمده توسط ماکروفاژهای فعال‌شده و لنفوسیت‌های T تنظیمی تولید می‌شود، هم‌چنین این سایتوکین توسط سلول‌های دندریتیک تنظیمی ترشح می‌شود، که باعث القا لنفوسیت‌های T تحریک‌نشده به‌سمت لنفوسیت‌های T تنظیمی (T_H2) می‌شود.[۱۹] IL-12 را عامل محرک لنفوسیت‌های T و لنفوسیت‌های NK برای ترشح INF-y می‌دانند. IL-12 موجب پیش‌برد تمایز لنفوسیت‌های T یاور با نشان‌گر CD4 تحریک‌نشده به زیر گروه تولید کننده INF-y (TH1) می‌شود.[۲۰] منبع تولید IL-10 در این تحقیق ممکن که به‌خاطر تولید سلول‌های دندریتیک تولورژنی باشد که در اثر کشت هم‌زمان با سلول‌های دندریتیک نابالغ با سلول‌های اندوتلیال به وجود آمده باشند، که Yuk Yuen Lan نشان داد سلول‌های دندریتیک میلوییدی که از پیش‌سازهای مغز استخوان موش در حضور IL-10 و Transforming Growth Factor-β (TGF-β) به‌دست آمده باشند، در تحریک بعدی با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) سطح بالای از IL-10 در مقایسه با IL-12 تولید می‌کنند، هم‌چنین سطح پایینی از مولکول‌های CD83، CD80 و HLA-DR را نشان می‌دهند.[۲۱] دلیل دیگر برای این افزایش در تولید IL-10 در مقایسه با IL-12 می‌تواند ناشی از تولید آن از سلول‌های اندوتلیال باشد، که در تحقیق دیگری مشخص شد که Tang H دریافت که سلول‌های اندوتلیال بافت استرومای طحال از طریق ترشح IL-10، TGF-β و Nitric Oxide (NO) باعث تمایز سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان به‌سمت سلول‌های دندریتیک تولوروژن می‌شوند.[۲۲] در بررسی MLR سلول‌های دندریتیک حاصل از گروه کنترل و گروه تیمار مشخص شد که سلول‌های دندریتیک گروه تیمار توانایی کمتری در تحریک لنفوسیت‌های T و تکثیر آن‌ها دارند. بررسی مایع رویی تست MLR برای اندازه‌گیری IL-4 و INF-γ نشان داد که میزان IL-4 نسبت به INF-γ افزایش یافته بود (نمودار ۵). منبع سلولی IL-4 زیر گروه T_H2 تنظیمی از لنفوسیت‌های T فعال شده با نشان‌گر CD4 می‌باشد.[۲۳] از طرف دیگر اینترفرون- گاما سایتوکین شاخص زیر گروه لنفوسیت‌های T_H1 کمکی می‌باشد. اینترفرون- گاما سایتوکین اصلی فعال‌کننده ماکروفاژها است و عملکردهای مهمی در ایمنی ذاتی و ایمنی سلولی اکتسابی در مقابل میکروب‌های داخل سلولی دارد.[۲۴] با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری سایتوکین‌ها مشخص شد که لنفوسیت‌های T تحریک شده از نوع T_H2 تنظیمی می‌باشند. در این

مطالعه مشخص شد که سلول‌های دندریتیک نابالغ مشتق از مونوسیت (در روز پنجم) که با سلول‌های اندوتلیال چسبنده و غیرفعال به‌مدت ۴۸ ساعت کشت داده شوند (Co culture) باعث تولید سلول‌های دندریتیک تولوروژن می‌شود که از طریق ترشح IL-10 باعث تمایز لنفوسیت‌های T تحریک نشده به نوع TH2 تنظیمی می‌شوند. سلول‌های TH2 با ترشح IL-4 نقش مهمی در سرکوب و تنظیم سیستم ایمنی دارند. براساس نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه محققین دیگر با توجه به این‌که سلول‌های اندوتلیال اولین سلول‌های هستند که در پیوندهای آلوگرافت مورد تهاجم سیستم ایمنی قرار می‌گیرند. اگر این سلول‌ها به‌خاطر ایسکمی یا جراحی در حین پیوند از غشای پایه زیرین خود جدا شوند، نقش مهمی در فعال کردن سیستم ایمنی و دفع پیوند به‌عهده خواهند داشت. چون سلول‌های اندوتلیالی که چسبندگی خود را با غشای پایه از دست داده باشند یا توسط سایتوکین‌های التهابی تحریک شده باشند باعث القاء پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌شوند. برعکس این، سلول‌های اندوتلیال چسبیده و غیرفعال پاسخ‌های سیستم ایمنی را محدود می‌کنند.

References

1. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;282(5736):324-6.
2. Thomas DB, editor. Viruses and the Cellular Immune Response. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1993.
3. Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 2005;78(2):319-24. Epub 2005 Apr 4.
4. Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, Askonas BA. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J Exp Med* 1989;169(4):1255-64.
5. D'Amico G, Bianchi G, Bernasconi S, Bersani L, Piemonti L, Sozzani S, et al. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 1998;92(1):207-14.
6. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999;29(5):1617-25.
7. Dudda JC, Simon JC, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol* 2004;172(2):857-63.
8. Tian F, Grimaldo S, Fujita M, Cutts J, Vujanovic NL, Li LY. The endothelial cell-produced antiangiogenic cytokine vascular endothelial growth inhibitor induces dendritic cell maturation. *J Immunol* 2007;179(6):3742-51.
9. Methe H, Hess S, Edelman ER. Endothelial cell-matrix interactions determine maturation of dendritic cells. *Eur J Immunol* 2007;37(7):1773-84.
10. Moldenhauer A, Nociari M, Lam G, Salama A, Rafii S, Moore MA. Tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelium: an inducer of dendritic cell development from hematopoietic progenitors and myeloid leukemic cells. *Stem Cells* 2004;22(2):144-57.
11. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106(3):255-8.
12. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
13. Lu L, Woo J, Rao AS, Li Y, Watkins SC, Qian S, et al. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J Exp Med* 1994;179(6):1823-34.
14. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 1995;60(12):1539-45.
15. Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* 1996;62(5):659-65.
16. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-6.
17. Jancic C, Chuluyan HE, Morelli A, Larregina A, Kolkowski E, Saracco M, et al. Interactions of dendritic cells with fibronectin and endothelial cells. *Immunology* 1998;95(2):283-90.
18. Moldenhauer A, Nociari M, Lam G, Salama A, Rafii S, Moore MA. Tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelium: an inducer of dendritic cell development from hematopoietic progenitors and myeloid leukemic cells. *Stem Cells* 2004;22(2):144-57.
19. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929-79.
20. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 2003;24(4):207-12.
21. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, de Creus A, et al. "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol* 2006;177(9):5868-77.
22. Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. *Blood* 2006;108(4):1189-97. Epub 2006 Apr 20.
23. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503-29.
24. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 3, June 2011: 153-160

Differentiation of monocyte-derived dendritic cells on endothelial cells as feeding layer

Keykavos Gholami MD.[1*]
Vahid Nejati PhD.[2]
Nowruz Delirezh PhD.[3]
Meysam Ganji Bakhsh MD.[1]
Masoumeh Asadi MD.[1]

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

[*] Corresponding author: Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Postal Code: 5715915199 Urmia, Iran.
Tel: +98-914-8224963
email: keyka.gholami@yahoo.com

Received: January 12, 2011 Accepted: February 06, 2011

Abstract

Background: The innate and adaptive immune responses are dependent on the migration of leukocytes across endothelial cells. Dendritic cells (DCs) play an important role in the initiation of cellular immune responses during their migration from tissues into the lymph nodes where they interact with endothelial cells of lymphatic vessels. We investigated the effects of surface-adherent and non-activated endothelial cells on phenotypic and functional characteristics of dendritic cells.
Methods: Immature dendritic cells were generated from the isolation of peripheral blood mononuclear cells and their subsequent culture in DC-RPMI 1640 medium containing 10% FCS, interleukin-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for five days. On day five, a maturation factor (composed of monocyte-conditioned medium, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and poly I:C) was added to the RPMI medium where immature DCs were co-cultured with endothelial cell monolayer for 24 h. The maturation of harvested DCs on day seven was evaluated via flow cytometry, a beta-counter and an ELISA kit.
Results: This study showed that the endothelial cells interact with dendritic cells generated from peripheral blood monocytes via cell-to-cell interaction. This interaction inhibits the maturation of DCs via decrease in the expression of CD83, CD86, CD80, HLA-DR and up-regulation of CD14. The interaction also inhibits the stimulation of T-lymphocytes resulting in a decrease in their proliferation.
Conclusion: According to the findings of this study, it could be concluded that the endothelial cells can act as a potent regulator for DCs differentiation and function at the encounter made between them during the migration of DCs from tissues to lymph nodes.

Keywords: Dendritic cells, endothelial cells, feeder layer, monocyte.