

واکنش سلول‌های دندریتیک تمایز یافته با سایتوکاین TGF- β 1 با سلول‌های TCD4⁺

*دکتر سعید عابدیان (Ph D) - یوسف یوسف‌زاده (Stu)^۱ - هادی حسن‌نیا (Stu)^۱

*نویسنده مسئول: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

پست الکترونیک: abedianlab@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۳

چکیده

مقدمه: سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که پیام‌های تنظیمی ضروری برای شروع پاسخ‌های ایمنی به وسیله لنفوسیت‌های T را فراهم می‌کنند. این سلول‌ها در تعامل با سلول‌های T تنظیمی (Regulatory) نقش مهمی در درمان بیماری‌ها دارند.

هدف: بررسی اثر سایتوکاین TGF- β 1 (Transforming growth factor β) در تمایز سلول‌های دندریتیک و نیز توانایی این سلول‌ها در گسترش سلول‌های T تنظیمی (T regulatory) در محیط کشت سلولی.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی از ۵ نفر داوطلب، نمونه‌گیری انجام شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی آنها با استفاده از محلول فایکول جدا شدند. سلول‌های دندریتیک از سلول‌های منوسیت خون محیطی با استفاده از سایتوکاین‌های TGF- β 1 \pm GM-CSF, IL-4 در مقابل شاهد تولید شدند و میزان تکثیر سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی با سلول‌های دندریتیک تولید شده ارزیابی شد. با استفاده از فلوسیتومتری، درصد سلول‌های T CD4⁺CD25⁺، CD14 و شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک تعیین شد.

نتایج: در این مطالعه سلول‌های دندریتیک در حضور سایتوکاین TGF- β 1 و بدون این سایتوکاین تولید شدند. میزان تکثیر سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی با سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF- β 1 در مقایسه با کنترل کاهش داشته‌است و به علاوه تعداد سلول‌های TCD25⁺ در محیط کشت سلولی حاوی سلول‌های دندریتیک تمایز یافته با TGF- β 1 افزایش ۲۷ درصدی داشته‌است (p<0.05).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مولکول‌های TGF- β 1 با اثر بر سلول‌های دندریتیک سبب ایجاد سلول‌هایی با توان مهار پاسخ‌های سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی شد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد که این سلول‌ها می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته ایمنی در محیط آزمایشگاهی داشته باشند.

کلید واژه‌ها: آزمون کشت مختلط لنفوسیت / سلول‌های دندریتی / عامل بقای رشد متغیر / لنفوسیت‌های تی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره نوزدهم شماره ۷۷، صفحات: ۱-۷

مقدمه

سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که نقش مهمی در سیستم ایمنی اختصاصی و ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. این سلول‌ها واسطه‌های کلیدی ایمنی وابسته به سلول‌های T محسوب می‌شوند که نقش مؤثری در شروع پاسخ‌های ایمنی در شرایط طبیعی و بیماری‌ها دارند (۱ و ۲). اگرچه سلول‌های دندریتیک بالغ، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن قوی در شروع پاسخ‌های ایمنی هستند، اما انواع معینی از آنها قدرت القاء تولرانس در پاسخ‌های ایمنی را دارند و این سلول‌ها با عرضه پپتید آنتی‌ژنیک همراه با MHC (Major Histocompatibility Antigen) باعث تولرانس در سلول‌های T می‌شوند، که بخشی از توانایی این سلول‌ها در آغاز پاسخ ایمنی ناشی از قدرت آنها در ارائه پیام‌های مهم تحریکی اختصاصی برای فعال‌شدن سلول T و تبدیل آنها از

حالت ناآزموده به انواع مختلف سلول عمل‌کننده‌است (۳). سلول‌های منوسیت خون محیطی از منابع مهم تولید سلول‌های دندریتیک محسوب می‌شوند. این سلول‌ها تحت اثر سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ و GM-CSF به سلول‌های دندریتیک نابالغ و سپس با اثر سایتوکاین TNF- α یا محرک‌های دیگر از قبیل لیپوپلی‌ساکارید به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل می‌شوند. شناسایی آنتی‌ژن و پردازش آنها سبب بروز تعداد زیادی از مولکول‌های کمک تحریکی از قبیل CD80, CD86, CD40 می‌شود که از عوامل القاکننده تولرانس یا تحریک سلول‌های T محسوب می‌شوند (۲).

سلول‌های T تنظیمی طبیعی دارای شاخص‌های CD4 و CD25، سلول‌هایی با توانایی تنظیم سیستم ایمنی هستند که نه تنها پاسخ‌های اتوایمیون را مهار می‌کنند بلکه سبب مهار بسیاری

- در یک لوله استریل به میزان نصف نمونه رقیق شده محلول فایکول 1.077 (بهار افشان) در شرایط کاملاً استریل ریخته شد.

- نمونه به آرامی با استفاده از یک پیپت پاستور روی فایکول اضافه و سپس در 40°C به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جدا کردن سلول‌های تک‌هسته‌ای سانتیفریوژ شد.

- پس از سانتیفریوژ از ۴ لایه ایجاد شده، لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای که بین فایکول در زیر و RPMI در بالا قرار داشت، جدا شد.

- سلول‌های تک‌هسته‌ای دوبار با RPMI شسته شد و پس از آخرین شستشو به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد سپس یک قطره از آن را برای شمارش استفاده شد.

۳- تولید سلول‌های دندریتیک از منوسیت‌های خون محیطی

- سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که با استفاده از فایکول جدا شده بود، برای تولید سلول‌های دندریتیک استفاده شد.

- سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به تعداد $3 \times 10^6 - 1/5$ سلول در هر میلی‌لیتر و به حجم 5ml در پنج فلاسک کشت T25 به‌طور جداگانه در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (50u/ml) استرپتومایسین ($50\ \mu\text{g/ml}$) و 10% سرم جنین گوساله (Gibco, USA) به مدت ۲ ساعت در 37°C حاوی 5% CO_2 انکوبه شد.

- بعد از پایان زمان انکوباسیون، سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دوبار شستشوی آرام جدا شده و به‌عنوان سلول‌های غیرچسبنده برای جداسازی سلول‌های T استفاده شد.

- به سلول‌های چسبنده که اکثریت آنها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند 1000 واحد در میلی‌لیتر $\text{TGF-}\beta$ (Bender med system, Austria) 1000 واحد در میلی‌لیتر GM-CSF (Bender med system, Austria) و 500 واحد در میلی‌لیتر اینترلوکین-۴ (Bender med system, Austria) اضافه شد و به مدت ۵ روز در محیط RPMI و در 37°C در کنار شاهد (فاقد $\text{TGF-}\beta$) کشت داده شد.

- LPS ($10\ \text{ng/ml}$) در روز پنجم به‌عنوان عامل بلوغ به هر دو گروه اضافه شد.

- در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از

از پاسخ‌های ایمنی پاتولوژیک و فیزیولوژیک به آنتی‌ژن‌ها و سبب افتراق سلول‌های خودی از غیرخودی (Self and Non self) نیز می‌شوند. در انسان تا ده درصد سلول‌های $\text{CD}4^{+}\text{T}$ خون محیطی، شاخص $\text{CD}25$ را بروز می‌دهند که تنها ۱-۲ درصد از آنها سطوح بالایی از این مارکر را بیان می‌کنند ($\text{CD}25$ bright cells) که فعالیت مهاری دارند (۴). این سلول‌ها در تعامل با سلول‌های دندریتیک نقش موثری در تولرانس ایمنی ایفا می‌کنند (۵). سلول‌های دندریتیک در محیط‌های کشت، شکل‌های مختلف و ویژگی‌های عملکردی متفاوتی را بروز می‌دهند که بستگی به حضور سایتوکاین‌های مختلف در محیط‌های کشت سلولی دارد (۷ و ۶). Dardalhon و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سایتوکاین $\text{TGF-}\beta 1$ همراه با اینترلوکین ۱۰ سبب تولید سلول‌های دندریتیک می‌شوند که نقش تنظیمی در پاسخ‌های ایمنی را دارند (۸). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که سایتوکاین $\text{TGF-}\beta 1$ ، سایتوکاینی مؤثر در تکثیر، تمایز، چسبندگی سلولی، گسترش اسکلتی، هموستاز و پاسخ‌های التهابی است که به‌عنوان مولکولی مؤثر در تنظیم پاسخ‌های ایمنی شناخته شده است (۹).

با توجه به مطالب فوق، مطالعه ما با هدف بررسی اثر سایتوکاین $\text{TGF-}\beta 1$ در تولید سلول‌های دندریتیک و نیز نقش این سلول‌ها در واکنش با سلول‌های T در کشت مختلط لکوسیتی، به‌منظور یافتن راه تازه‌ای برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته ایمنی پایه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

۱- انتخاب افراد

مطالعه از نوع تجربی بوده که از ۵ فرد بالغ داوطلب پس از معاینات دقیق بالینی و کسب رضایت آگاهانه میزان ۵۰-۴۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی از هر نفر در لوله‌های استریل حاوی ماده ضدانعقاد هپارین گرفته شد.

۲- جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)

- نمونه‌ها در دور 2000 (400g) به مدت ۵ دقیقه برای جداسازی پلاسما سانتیفریوژ شدند و سپس هم حجم گلبول‌های متراکم، محیط RPMI (Gibco, USA) افزوده تا رقیق شود.

- تغییرات رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط الیزا خوانده شد.

- تمامی آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام و نتایج به دست آمده به صورت $(Mean \pm SD)$ محاسبه و گزارش شد.

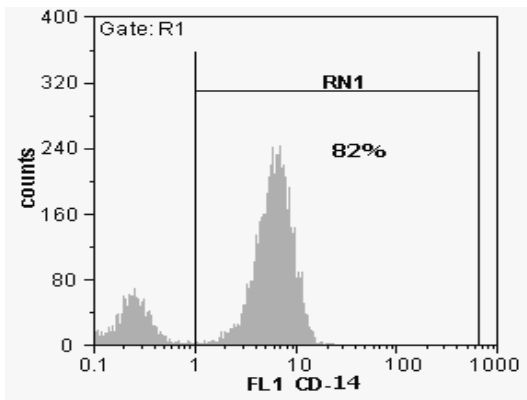
۶-آنالیز آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه و تحلیل آن‌ها، از آزمون Paired T-Test برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

۱- فلوسیتومتری

سلول‌های دندریتیک که از سلول‌های منوسیت $CD14^+$ تولید شده بودند (نمودار ۱)، علاوه بر فلوسیتومتری از نظر ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Invert) همواره بررسی شدند.



نمودار ۱: درصد سلول‌های منوسیت $CD14^+$ که برای تولید سلول‌های دندریتیک از آن‌ها استفاده شده است

آنالیز فلوسیتومتری در سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta 1$ در حالت نابالغ نشان می‌دهد که درصد بیان HLA-DR ۸۰ درصد و شاخص CD83 کمتر از یک درصد قبل از تحریک با لیپو پلی ساکارید بوده است، در حالی که بعد از تحریک با لیپو پلی ساکارید تظاهر سطحی مولکول‌های $CD83$ ، HLA-DR، $CD80$ افزایش معنی‌داری در سلول‌های دندریتیک بالغ در مقایسه با حالت نابالغ نشان داد ($p < 0.05$) که تظاهر $CD83$ و افزایش بیان HLA-DR نشان‌دهنده بلوغ سلول‌های

بافر فسفات حاوی ماده ترپسین - EDTA ۰/۵ میلی‌مولار برداشته و از نظر مورفولوژی و فنوتیپ مطالعه شدند.

۴- تعیین فنوتیپ سلول‌های دندریتیک به روش فلوسیتومتری - سلول‌های دندریتیک پس از یک بار شستشوی با بافر در شرایط سرما روی یخ قرار داده شدند.
- تعداد 5.0×10^3 عدد سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر آماده شده که مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مربوط (10 mg/ml) به همراه ایزوتیپ کنترل اضافه و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در $4^\circ C$ انکوبه شد.

- با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری Partec Pas درصد سلول‌های دارای شاخص CD14 در سطح سلول‌های منوسیت، شاخص‌های $CD4$ ، $CD25$ در سطح سلول‌های T و شاخص‌های $CD83$ ، $CD80$ ، $CD86$ ، HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیک با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال کنژوگه با FITC و PRE (Dako, Germany) بعد از واکنش مختلط لکوسیتی اتولوگ بررسی شدند.

۵- واکنش مختلط لکوسیتی اتولوگ

برای سنجش توانایی سلول‌های دندریتیک تولید شده (سلول‌های محرک) برای تکثیر لئوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) به شرح زیر انجام شد:

- لئوسیت‌های $CD4^+$ T از PBMC افراد با خلوص بیش از ۹۰٪ با استفاده از مگنتیک بید (Milteny roy, USA) تهیه شد.
- تعداد 1.0×10^6 لئوسیت T به صورت سه تایی با 1×10^4 سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta$ و بدون تأثیر از $TGF-\beta$ (شاهد) مخلوط و به مدت ۳ روز در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS در حجم μl ۲۰۰ در دمای $37^\circ C$ و پنج درصد CO_2 کشت داده شد.

- در روز سوم سوپرناتانت محیط کشت سلولی برداشت و ذخیره شد و سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر ماده رنگی 3-[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) به عنوان اندیکاتور به هر خانه اضافه شد (۱۰).

- پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای $37^\circ C$ انکوبه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl solfoxide) به هر خانه میکروپلیت اضافه شد.

جدول ۱: اثر سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta$ و شاهد بر روی تکثیر سلول‌های T اتولوگ در واکنش مختلط لکوسیتی که میزان جذب نوری حاصل از پروليفراسيون سلولی با استفاده از ماده MTT در طول موج ۵۵۰ نانومتر ارزیابی شد.

P value	میانگین \pm انحراف معیار از ۵ نمونه	واکنش مختلط لکوسیتی
0.03	141 \pm 5.53	سلول دندریتیک متأثر از $TGF\beta$ (۱/۱۰)
	182 \pm 30.02	سلول دندریتیک بدون تاثیر از $TGF\beta$ (۱/۱۰)

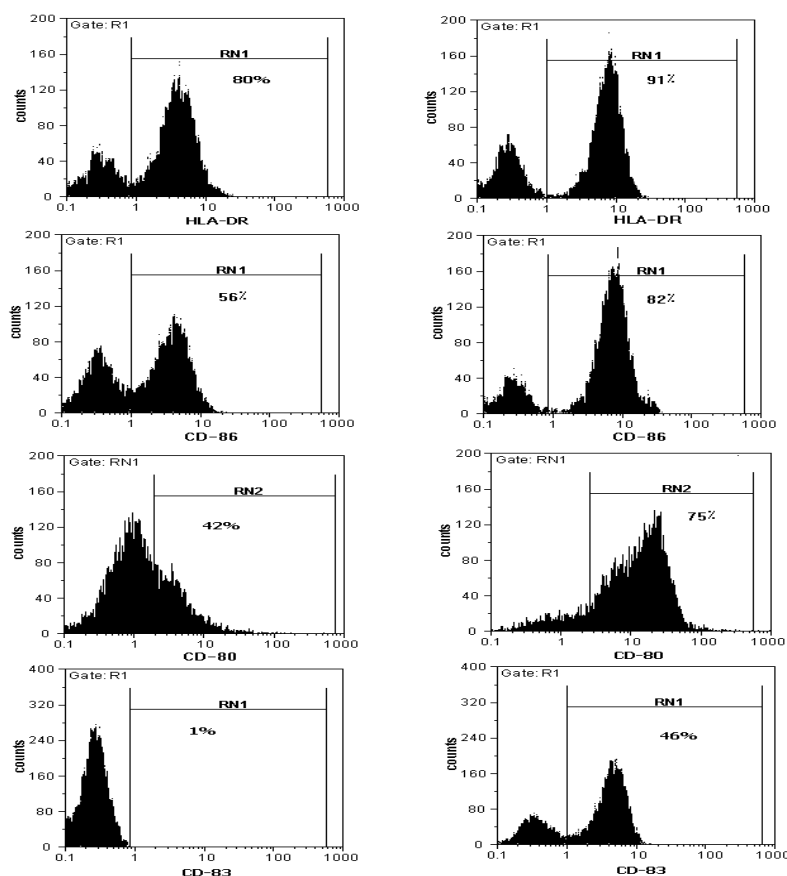
دندریتیک است. به علاوه نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول‌های $CD4^+CD25^+$ در واکنش مختلط لکوسیتی بین لئوسیت‌های T و سلول‌های دندریتیک متأثر از سایتوکاین $TGF-\beta$ در مقایسه با شاهد ۲۷ درصد بیشتر بوده است و اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$ - نمودار ۳).

۲- نتایج پروليفراسيون سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی

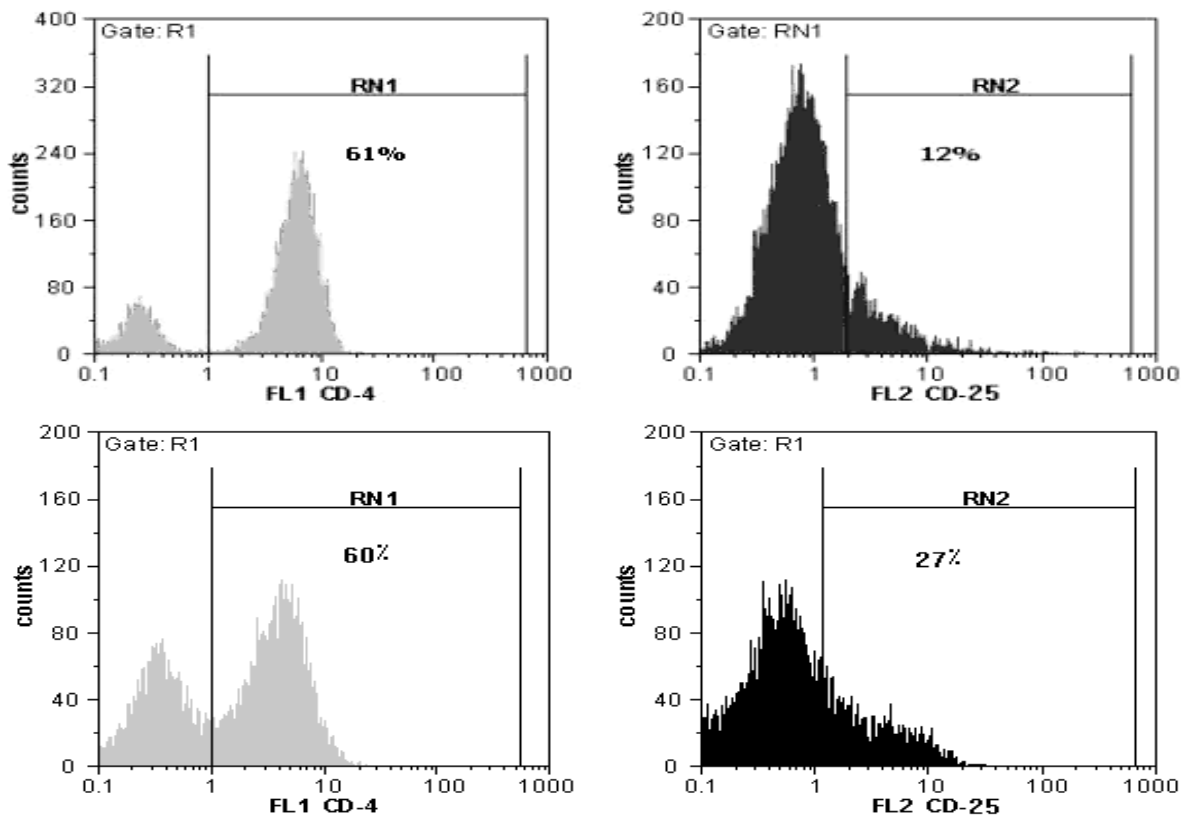
پاسخ تکثیری سلول‌های T در محیط کشت مختلط سلولی در حضور سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta$ با استفاده از ماده MTT به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش داشت ($p = 0.03$ ، جدول ۱).

Immature Dc

Mature Dc



نمودار ۲: منوسیت‌های خون محیطی در محیط کشت سلولی تحت اثر سایتوکاین‌های GM-CSF و IL-4 همراه با $TGF-\beta$ برای مدت ۵ روز کشت داده شدند. سپس برای بلوغ سلول‌های دندریتیک، محرک لیپوپلی ساکارید به مدت دو روز به محیط کشت سلول اضافه شد و سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال HLA-DR, CD86, CD80, CD83 به کتوزوگه به مواد فلوتورسانس، فنوتیپ سلول‌های دندریتیک در حالت بالغ (راست) و در حالت نابالغ (چپ) با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بررسی شد.



نمودار ۳: نتایج فلوسیتومتری حاصل از تعیین درصد سلول‌های $CD25^+$, $CD4^+$ T در واکنش مختلط لکوسیتی پس از واکنش با سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta$ (پایین) و بدون تاثیر از $TGF-\beta$ (بالا). تعداد سلول‌های $CD25^+$, $CD4^+$ T در دو گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری

بحث و نتیجه‌گیری

نقش مهاری در کشت مختلط لکوسیتی شد. در این راستا به منظور بررسی علت کاهش پاسخ تکثیری سلول T در کشت مختلط لکوسیتی بروز مولکول $CD4$, $CD25$ در سطح سلول‌های T به عنوان نمونه‌ای از مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی مطالعه و اندازه‌گیری شد (نمودار ۳). در مطالعه‌ای که آقای Fogel و همکاران با بررسی نقش مولکول $TGF-\beta$ در تولید سلول‌های دندریتیک و در نتیجه بررسی اثر این سلول‌ها بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در واکنش مختلط لکوسیتی انجام دادند نشان داده شد که سلول‌های دندریتیک متأثر از $TGF-\beta$ نقش مؤثری در کاهش پروليفراسیون سلول‌های تک‌هسته‌ای دارد (۱۱) که این تحقیق برخلاف مطالعه ما به طور اختصاصی در سطح سلول‌های $TCD4^+$ انجام نشده است؛ به طوری که نقش سلول‌های $TCD4^+$ در بروز بیماری‌ها از جمله بیماری‌های اتوایمیون ثابت شده است. به علاوه مطالعات دیگر نشان می‌دهند که آثار این سایتوکاین نقش مؤثری در ایمونولوژی پیوند و

از مهم‌ترین یافته‌های تحقیق حاضر تولید سلول‌های دندریتیک با توانایی کاهش پاسخ تکثیری در لئوسیت‌های T $CD4^+$ است. محققان حاضر در این بررسی اقدام به طراحی یک سیستم ایمنی نمودند که اجزای آن شامل سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به عنوان سلول‌های محرک (Stimulator) و لئوسیت‌های T به عنوان سلول‌های پاسخ‌دهنده (Responder) بود. برای این منظور سلول‌های منوسیت را از گردش خون محیطی و با استفاده از سایتوکین‌های مناسب به سلول‌های دندریتیک تبدیل شدند. در فاصله کشت سلولی، لیوپولی ساکارید به عنوان محرک در اختیار سلول‌های دندریتیک قرار داده شد و پس از حساس‌سازی سلول‌های دندریتیک، این سلول‌ها در مجاورت سلول‌های T به منظور مطالعه پاسخ ایمنی قرار گرفت.

در این تحقیق از مولکول $TGF-\beta 1$ به عنوان مداخله‌گر اصلی فرایند در کشت سلولی (تبدیل منوسیت به سلول دندریتیک) استفاده شد که این مولکول سبب ایجاد سلول دندریتیک با

TGF- β افزایش ۲۷ درصدی مولکول CD25 را داشته است که بروز این مولکول یکی از شاخص‌های مرتبط با سلول‌های T تنظیمی بوده که نقشی مؤثر در تعدیل پاسخ ایمنی دارد. بنابراین یافته‌های حاضر پیشنهاد می‌کند که احتمالاً برخی از آثار تنظیمی TGF- β بر سلول‌های دندریتیک همراه با گسترش سلول‌های T تنظیمی در کشت مختلط لئوسیتی می‌تواند سبب پیشگیری از بیماری اتوایمیون و جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته شود.

تشکر و قدردانی: این تحقیق به شماره ۸۷-۱۹ در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به تصویب رسیده است که مراتب قدردانی و تشکر خود را از آن معاونت محترم اعلام می‌داریم.

ایمونولوژی تومور دارد (۱۳ و ۱۲) به طوری که ارتباط این مولکول و بیماری‌های اتوایمیون و نقش آن در فروکش نمودن التهاب در برخی بیماری‌ها و حضور این مولکول‌ها به عنوان یک عامل تنظیمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۴).

مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر نشان داده است که TGF- β می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در بیماری مولتیپل اسکلروزیس از طریق بروز CD4, CD25 کاهش دهد؛ بنابراین منجر به کاهش دفعات بروز مجدد بیماری شود (۱۵). به علاوه مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که عدم وجود TGF- β در برخی از بافت‌ها می‌تواند با شدت اتوایمنی همراه باشد (۱۶ و ۱۷). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های T در واکنش مختلط لئوسیتی با سلول‌های دندریتیک متاثر از

منابع

- Banchereau J, Steinman R. Dendritic Cells and The Control Of Immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
- Mohammed Zadeh M, Lufting R. Dendritic Cell in the Fore- Front of Immunopathogenesis and Vaccine Development, Areview. *J Immune Based Therapies and Vaccines* 2004; 2: 2-10.
- Efron PA, Matsumoto T, Mcauliffe PF, et al. Major Hepatectomy Induces Phenotype Changes in Circulating Dendritic Cells and Monocytes. *J Clinical Immunology* 2009; 29(5):568-81.
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4+ CD25+Thymocytes and Peripheral T Cells Have Immune Suppressive Activity in Vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31(4):1247-54.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hatler DA. CD4+ CD25 High Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-53.
- Na Zhang, Xi-Yu Wu, Xian-Ping Wu, Xiao-Hua Fu et al. Relationship Between Age-Related Serum Concentrations Of TGF-B1 And TGF-B2 and Those of Osteoprotegerin And Leptin In Native Chinese Women. *Clinica Chimica Acta* 2009; 403(1-2):63-9.
- Rupen A, Lopa M. Liver Stem Cells and TGF-B in Hepatic Carcinogenesis. *Gstrointestinal Cancer Research* 2008; 2(4): 27-30.
- Dardalhon V, Awasthi A, Kown H, Galileos G, Gao W, Sobel R.A and Etal. IL-4 Inhibits TGF-B Induced Foxp3 T Cells and Together with TGF-B Generates IL-9+ IL-10+ Foxp3 (-) Effector T Cells. *Nat. Immunol* 2008; 9: 1347-1355.
- Efron PA, Moldawer LI. Sepsis and the Dendritic Cell. *Shock* 2003; 20:386-401.
- Mosman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Fogel-Petrovic M, Long JA, Misso NL, Foster PS, Bhoola KD, Thampson PJ. Physiological Concentrations of Transforming Growth Factor Beta1 Selectively Inhibit Human Dendritic Cell Fuction. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(14):1924-33.
- Schulz R, Vogel T, Dressel R, Krieglstein K. TGF-Beta Superfamily Members, Activin A and TGF-Beta1, Induce Apoptosis in Oligodendrocytes By Different Pathways. *Cell Tissue Res* 2008; 334(3):327-38.
- Ripamonti U, Ferretti C, Heliotis M. Soluble And Insoluble Signals And Induction Of Bone Formation: Molecular Therapeuticsd Recapitulating Development. *J Anat* 2006; 209(4): 447-68.
- Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation Of TGF-Beta Signaling By Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41(4) : 263-72.
- Maitra U, Davis S, Reilly CM, Li L. Differential Regulation of Foxp3 and IL-17 Expression in CD4 T Helper Cells by IRAK-1. *J Immunol* 2009; 182(9): 5763-9.
- Yu F, Chou CW, Chen CC. TNF-Alpha Suppressed TGF-Beta -Induced CTGF Expression By Switching The Binding Preference of P300 from Smad4 To P65. *Cell Signal* 2009; 21(6): 867-72.
- Peng R, Li Y, Brezner K, Litherland S, Clare-Salzler MJ. Abnormal Peripheral Blood Dendritic Cell Populations in Type 1 Diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1005: 222-5.

Differentiated Dendritic Cell with $TGF\beta$ in Reaction with $TCD4^+$

Abedian S.(Ph D)¹- Yousefzadeh Y.(Stu)¹- Hasannia H.(Stu)¹

*Corresponding Address: Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Sari, IRAN

E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

Received:30/May/2010 Accepted: 25/Sep/2010

Abstract

Introduction: Dendritic cells are professional antigen presenting cells that obtain necessary regulatory signals for T cells. T regulatory cells are effective cells in reaction with dendritic cells and have an important role in treating of diseases.

Objective: To evaluate the effect of $TGF-\beta$ (Transforming Growth Factor β) Cytokine in dendritic cell generation and capacity of these cells in regulatory T cells development in culture media.

Materials and Methods: In this experimental study, blood samples were obtained from 5 volunteers, then peripheral blood mononuclear cells were isolated by using Phicole Hypaque, dendritic cells of peripheral blood monocyte were produced by GM-CSF, IL-4 and $TGF-\beta$ in comparison with control group. Mixed leukocyte reaction was accessed in allogenic T cell and dendritic cell. The number of $CD4^+CD25^+$ T cells, $CD14^+$ and their surface markers were evaluated by Flowcytometry.

Results: In this study, dendritic cells produced in presence and without presence of $TGF-\beta$ cytokine. The proliferation level of T cells decreased in mixed leukocyte reaction with dendritic cell-treated $TGF-\beta$ in comparison with control group. In addition, the number of T $CD25^+$ cells increased 27 percent in culture media including dendritic cell-treated $TGF-\beta$ in comparison with control group ($p < 0.05$).

Conclusion: The $TGF-\beta$ molecule caused effect on the dendritic cells and produced cells with inhibiting of immune responses in mixed leukocyte reaction. So it concluded that, these cells can be have an important role in preventing of unwanted immune reaction invitro.

Key words: Dendritic Cells/ Lymphocyte Culture Test/ Mixed/ T- Lymphocytes/ Transforming Growth Factor Beta

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 77, Pages: 1-7