Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره سوم، شماره ۴/ ۱۹-۹/ زمستان ۱۳۸۰

ماستوسیتهای برآمده از محیط کشت حاوی اینترلوکین -۳ موجب سلول کشی طبیعی سلولهای سرطانی می‌شوند

دکتر هدایت‌اله شیرزاده

چکیده:

سلولهای سلول کش طبیعی (Natural Cytotoxic= NC) به عنوان یکی از بازوهای سیستم ایمنی ذاتی نابود کننده سرطان در انسان و حیوانات مطرح هستند. شاخص NC-1.1 نیز به عنوان یکی از رسپتورهای موجود بر سطح این سلولها گزارش شده است. علیهذا هویت این سلولها و نیز نقش رسپتور یا رسپتورهای موجود بر آنها به خوبی مشخص نیست. از طریق کشت سلولهای طحال موش در آزمایشگاه و با استفاده از آنتی‌بادی ضد رسپتور NC-1.1 این مطالعه بر آن است تا به سؤالات فوق پاسخ دهد. سلولهای طحال موش از نژاد CBA در محیط کشت حاوی اینترلوکین -۳ (IL-3) پرورش داده شد و خاصیت سلول کشی طبیعی آن در مراحل مختلف رشد به روش آزمایش سلول کشی (Cytotoxic assay) بررسی شد. هویت این سلولها با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا و آلسین بلو (Alcian blue) نیز با استفاده از پروتئاز اختصاصی ماستوسیتها تعیین گردید. به علاوه رسپتورهای سطحی این سلولها به کمک روش فلوسیتو متری در مراحل مختلف رشد در محیط کشت مشخص گردید. سلولهای پرورش یافته در محیط کشت حاوی Mouse Mast Cell Line, IL-3 (MCL) نامیده شدند. این سلولها درشت و دانه دار (گرانولار) بوده و سیتوپلاسم فراوان داشتند. ۹۰ درصد این سلولها با رنگ آمیزی اختصاصی ماستوسیتها موسوم به آلسین بلو رنگ شدند. همچنین با استفاده از cDNA وجود پروتئاز mMCP-5 اختصاصی ماستوسیتها تائید گردید. به علاوه مشخص گردید که این سلولها فاقد رسپتورهای مخصوص سلولهای ماکروفاژ، B، T و NK (Natural Killer Cell) هستند، ولی دارای رسپتور CD32/CD16 شاخص بخش FC آنتی‌بادی و نیز رسپتور NC-1.1 که میانجی سلول کشی طبیعی این سلولها در از بین بردن سلولهای توموری WEHI-164 که یک نوع فیبروسارکوما است می‌باشند. این خاصیت با افزایش عمر سلولها در محیط کشت تقویت می‌گردد. نتیجه این که سلولهای پرورش یافته در محیط کشت حاوی IL-3 ماستوسیتهایی هستند که فاقد شاخصهای سلولهای ماکروفاژ، B، T و NK بوده و با کسب رسپتور NC-1.1 سلول کشی طبیعی را بر علیه فیبرو سارکومای WEHI-164 برقرار می‌کنند.

واژه های کلیدی: ایمنی ذاتی، فیبروسارکوما، اینترلوکین -۳، سلول کشی طبیعی، ماستوسیت.

مقدمه:

سلول کشی طبیعی با واسطه سلولی (Natural Cell Mediated Cytotoxicity= NCMC) مکانیسم عمده ایمنی ذاتی سلولی علیه عفونتهای ویروسی و ارگانیزمهای داخل سلولی و سرطان محسوب می‌شود. کشندگی طبیعی (natural killing) و سلول کشی طبیعی (natural cytotoxicity) از عوامل مهم مکانیسم NCMC محسوب می‌شوند (۲۶). سلول کشی طبیعی بر علیه فیبروسارکومای ایجاد شده توسط

استادیار گروه ایمونولوژی و میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد: شهرکرد - رحمتیه - دانشکده پزشکی - تلفن: (۲۴۳۶) ۳۳۳۵۶۵۴ - ۰۳۸۱.

www.SID.ir

Archive of SID

۳ متیل کلانترن (3-Methylcholantrene) در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) توسط سلولهای مختلف سیستم لنفو- هموپوئیتیک (lymphohemopietic) در مراحل به خصوصی از تمایز آنها رخ می‌دهد (۴،۲). در اوایل دهه ۱۹۸۰ نشان داده شد که کشت سلولهای طحال موش به مدت یک شب در محیط کشت حاوی IL-3 خاصیت کشندگی سلولی را افزایش می‌دهد (۱۵) و IL-3 باعث ادامه حیات سلولهای طحال موش در محیط کشت تا ۴۴ هفته می‌گردد (۵). علاوه بر این ثابت شده است که سلولهای طحال و مغز استخوان موش که توسط میتوژن کونکاناوالین A (Concanavalin-A) فعال شده‌اند در محیط کشت غنی از IL-3 به ماستوسیتهایی تمایز می‌یابند که فنوتیپ سطحی $CD90^-$ Ig^- $CD11b^-$ $CD45^-$ FCR^+ Ia^+ IgE^+ را بروز می‌دهند (۲۷). علاوه بر این گزارش شده است که کشت سلولهای مغز استخوان موش در محیط حاوی IL-3 به ماستوسیتهایی با خاصیت NC (۹) و نیز به سلولهای چند هسته‌ای که مشابه استئوکلاستها بودند تمایز می‌یابند.

منوکلونال آنتی‌بادی IC4 پروتئینی را در سطح برخی از سلولهای چند هسته‌ای موش شناسایی می‌نماید که NC-1.1 نامیده شده است. این رسپتور بیشترین سلول کشی طبیعی سلولها را سازماندهی می‌نماید (۲۴،۱۱،۲). همچنین نشان داده شده که تجویز این آنتی‌بادی به موش (*in vivo*) عمل سلول کشی سلولهای حیوان را حدود ۷۰ درصد کاهش می‌دهد و همچنین تجویز آن به حیوان موجب افزایش رشد برخی از انواع تومورهای پیوند شده (۲۳) و نیز افزایش قدرت سرطان‌زایی برخی از مواد شیمیایی می‌گردد (۳). مطالعات بعدی نشان داده است که NC-1.1 رسپتوری است که بر روی سلولهای سلول کش طبیعی وجود دارد و به لیگاندهای موجود بر روی برخی از سلولهای توموری اتصال برقرار می‌نماید (۱۱،۳).

مقاله حاضر پژوهشی است که بر روی یک رده سلولی بنام MCL (Mast Cell Line) انجام شده که برای رشدشان به IL-3 نیازمند هستند. این سلولهای از طریق کشت سلولهای طحال موش از نژاد CBA در محیط کشت حاوی IL-3 به دست آمده‌اند. با استفاده از NC-1.1 به عنوان یک شاخص (Marker) یا رسپتور برای سلولهای سلول کش طبیعی، بروز این رسپتور را بر حسب طول عمر سلولها در محیط کشت و نیز ناپدید شدن همزمان رسپتورهای دیگر بر روی این سلولها و نیز نقش آنها در کشتن سلولهای توموری WEHI-164 مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه مرفولوژی این سلولها توسط روشهای ایمونوشیمی و بیوشیمی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها:

مایع رویی حاصل از محیط کشت سلول WEHI-3B که حاوی اینتر لوکین -۳ بود را با محیط کشت (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) مخلوط و برای کشت سلولهای MCL مورد استفاده قرار گرفت.

سلولهای طحال موش از نژاد CBA و در سن ۷ هفتگی به طور استریل استخراج و به صورت سوسپانسیون سلولی در آمده و با غلظت ۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی لیتر در محیط کشت حاوی IL-3 در فلاسکهای ۷۵ سانتیمتر مربعی کشت داده شد فلاسکها در ۳۷°C با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۰ درصد رطوبت نگهداری گردیدند و هر دو روز یکبار نیمی از محیط کشت تجدید گردید تا سلولها مواد غذایی لازم را دریافت نمایند. بعد از یک دوره سه روزه (Lag phase) سرعت رشد و تکثیر سلولها در محیط کشت افزایش یافت به طوری که در هفته چهارم زمان دو برابر شدن آنها به ۷۲ ساعت رسید. بین هفته ۴ تا ۶ سلولها دچار مرگ ناگهانی (Crisis) شدند و اکثر آنها مردند. سلولهای باقی مانده شروع به تکثیر نموده و به مدت حدود ۴۰ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

تلاشهای مکرر برای کلون کردن این سلولها که از هفته ۱۲ آغاز شد بی نتیجه بود چون هر گاه تعداد سلولها از ۳۰۰ سلول در هر چاهک ظرف آزمایش کمتر می‌شد تکثیرشان متوقف و نهایتاً سلولها می‌مردند. حتی با استفاده از محیط کشت حاوی میتومایسین C-(Mitomycin-C) همراه با سلولهای طحال و تیموس به عنوان سلولهای تغذیه کننده (feeder cells) و نیز استفاده از آگار نرم (soft agar) موفقیتی در کلون نمودن سلولها حاصل نگردید.

منوکلونال آنتی‌بادیهای مورد استفاده:

در این مطالعه از منوکلونال آنتی‌بادیهای زیر استفاده گردید. آنتی‌بادی ضد NC-1.1 (IgGI) و آنتی‌بادی ضد (Ly60)، کلون 2B6F2 (IgG2)، توسط آزمایشگاه Dr.C.Smart تهیه گردیدند (۲۴،۱۶) آنتی‌بادی ضد پروتئاز ماستوسیت (mMCP-5) از Dr.P.McNiel's (۱۸) و آنتی‌بادی ضد NK-1.1 کلون PK136 (IgG2b) از Dr.G.Koo دریافت شد (۱۳). آنتی‌بادی ضد FCRII/III (آنتی CD32/CD16)، کلون 2.4G2 (IgGI)، توسط Dr.P.Lalor از انستیتو تحقیقات پزشکی Walter & Eliza Hall Institute ملبورن استرالیا دریافت و آنتی‌بادی ضد TNF-α انسانی کلون، 47 (IgGI)، (۲۱) توسط Dr.D.Rathjen از پپتید تکنولوژی سیدنی استرالیا خریداری شد. آنتی‌بادیهای تجارتی عبارت بودند از آنتی‌بادی IgM کونژوگه شده با FITC (Tago, Burlingame، آمریکا) آنتی‌بادی ضد Thy1.2 کونژوگه شده با فیکواریترین (CD90,IgG2a) و آنتی‌بادی ضد Lyt.2 کونژوگه شده با فیکواریترین (CD8,IgG2a) از شرکت فارمین ژن ساندیگو خریداری گردیدند و آنتی‌بادی ضد L3T4 (anti-CD4, IgG2b) کونژوگه شده با FITC از شرکت بکتون دیکنسون آمریکا خریداری شدند. همچنین آنتی‌بادی Mac-1 کلون M1/70.15 (CD11b.IgG2b) کونژوگه شده با بیوتین توسط شرکت کالتگ سانفرانسیسکو آمریکا تهیه گردید.

بیوتینه کردن (Biotinylation of MoAb) و کونژوگه کردن منوکلونال آنتی‌بادی با FITC (FITC Conjugation of MoAb)

روشهای ارائه شده توسط Harlow و Lane (۱۰) در مورد بیوتینه کردن آنتی‌بادی و نیز کونژوگه کردن آن با FITC با جزئی تغییراتی مورد استفاده قرار گرفت.

سیتوتوکسیتی همراه با آزاد سازی کرومیوم ۵۱:

۵۱ کرومیوم رلیز سیتوتوکسی سیتی اسی (51Cr release cytotoicity assay) سلول کشی طبیعی و کشندگی طبیعی سلولها در دوره‌های مختلف کشت به وسیله روش آزاد سازی کرومیوم پنجاه و یک (رادیو اکتیو) از سلولهای توموری YAC-1 و WEHI-164 کشته شده تعیین گردید (۲۴). اختصاراً سلولهای کشت داده شده در محیط کشت حاوی IL-3 را به تعداد cell/ml-1×10^7 با سلولهای توموری (که قبلاً با کرومیوم ۵۱ رادیو اکتیو شده بودند) YAC-1 برای تعیین کشندگی طبیعی و با WEHI-164 برای تعیین عمل سلول کشی طبیعی به نسبتهای ۱/۵:۱ تا ۵۰:۱ از سلول مورد آزمایش با سلولهای توموری فوق مجاور در دمای $37^{\circ}C$ در حضور ۵۰ درصد دی اکسید کربن و ۹۰ درصد رطوبت نگهداری شدند. تعداد سلولهای توموری در هر یک از چاهکهای ظرف آزمایش 1×10^4 سلول‌بود. پس از ۱۸ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی هر چاهک را جمع‌آوری کرده و میزان رادیواکتیویته محلول را که ناشی از رها شدن کرومیوم رادیواکتیو از سلولهای توموری کشته شده بود توسط گاما کانتر (Counter Gamma-Cobra) اندازه‌گیری گردید. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد لیز اختصاصی محاسبه گردید و برای مقایسه آزمایشات انجام شده مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

$$\text{درصد لیز اختصاصی} = \frac{\text{cpm خودبخودی - cpm نمونه مورد آزمایش}}{\text{cpm خودبخودی - cpm کل}} \times 100$$

نتایج به Lytic Unit (LU) برای 10^8 سلول طحال برگردانده شد.

یک LU عبارت است از تعداد سلولهای عملگری که لازم است تا ۲۰ درصد از 10^4 سلول هدف را لیز نماید که از روی شیب منحنی درصد لیز اختصاصی (Specific lysis) نسبت سلول عملگر به هدف (E:T Ratio) محاسبه گردید.

برای تعیین اثر آنتی‌بادیهای ضد NC-1.1 بر توقف یا کاهش سلول کشی سلولهای MCL آنتی‌بادی ضد NC-1.1 (MoAb1C4) را با سلولهای MCL مجاور نموده و پس از یک ساعت سلولها را شسته و آنها را در ظرفهای آزمایش ۹۶ چاهکی به نحوی که در بالا ذکر گردید با سلولهای توموری مجاور شدند.

آنالیزهای ایمونوهیستولوژی (Immuno Histological Analysis):

سلولهای MCL پس از شستشو با PBS (Phosphate buffered Saline) بر روی لامهای پوشیده شده از ژلاتین سیتوسانتریفوژ شد و پس از خشک شدن در هوای آزمایشگاه به مدت ده دقیقه با استون و یا ۳۰ دقیقه با محلول کارنوی (Carnoy's solution) (۶۰ درصد متانول، ۳۰ درصد کلروفرم، ۱۰ درصد اسید استیک گلاسیال) ثابت شدند. سلولها یا (الف) به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ضد mMCP-5 به غلظت g/ml ۲۰ (۱۸) در شرایط اتاق رنگ آمیزی شدند. سپس به وسیله آنتی‌بادی ضد خرگوشی بز کونژوگه شده با بیوتین (Biotin-Conjugated goat anti- rabit Ig) و پراکسیداز کونژوگه شده با استرپت آویدین (Streptavidin) و هیدروژن پراکسید DAB قابل رؤیت شدند یا (ب) با آلسین بلو (Alcian blue) رنگ آمیزی شده و برای مشاهده گرانولهای ماستوسیت رنگ آمیزی زمینه (Counterstain) با نوکلئرفاست رد (Nuclear fast red) انجام شد. یا (ج) به تنهایی با رایت گیمسا رنگ آمیزی گردید.

ایمونوبلاتینگ (Immunoblotting):

برای تهیه لیز شده سلولی (Cell lysate) 10^7 سلول MCL را در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی یک درصد تریتون ۱۰۰ (Tryton X-100) و یک دهم درصد SDS ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ نگهداری شدند سپس با سونیفیر (Sonifier) با ۱۰ پالس سونیکیت (Senicat) گردیدند. بیست میکرولیتر از لیزایت (2×10^6 سلول) را با مقدار مساوی از رانینگ بوفر (running buffer) SDS-PAGE مخلوط و با پلی اکریل آماید (Polyacrylamide) ده درصد الکتروفورز گردید. پروتئین الکتروفورز شده به کاغذ P.V.D.F منتقل شده و بلات (Blot) حاصل به مدت یک شب در محلول دو درصد BSA/TBS قرار گرفت تا محلهای غیر اختصاصی آن مسدود گردند. سپس با ۲ میکروگرم در میلی لیتر آنتی‌بادی ضد mMCP-5 تأئید گردیدند. در پایان با ایمونوگلوبولین ضد خرگوشی بز کونژوگه شده با بیوتین و یا پراکسیداز کونژوگه شده با استرپت آویدین و هیدروژن پراکسیداز DAB قابل رؤیت گردیدند.

RNA بلاتینگ (RNA-blotting):

RNA سلولهای MCL با استفاده از روش Chomszynski و Secchi (۵) جدا گردید. بیست میکروگرم از نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز - فورمالدئید ۱/۳ درصد (Agaros formaldehyde) الکتروفورز شدند و به روش واکیوم بلاتینگ (Vacum blotting) بر روی غشاهای نایلونی (Nylon membrans) انتقال داده شدند. بلاتهای RNA حاصل با پروبهای DNA Gene-Specific c متصل شده به dCTP [32-P] مخصوص پروتئاز ماستوسیتهای موش 2-(mMCP) و mMCP-5 (۱۷) به مدت یک ساعت در دمای ۶۸°C با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از محلول Quikhyb hybridization مجاور و سپس اتورادیوگراف گردیدند.

بررسی خاصیت بیگانه خواری سلولهای MCL: (Phagocytosis of sheep Red Blood Cells)

برای تعیین این که آیا سلولهای MCL ماکروفاژند یا خیر آزمایش زیر انجام گردید:

به طور اختصار گلبول قرمز خون گوسفند را به غلظت ۵×۱۰^{۸} در هر میلی لیتر خون را با ۱۰ درصد ایمونوگلوبولین موشی تهیه شده بر علیه گلبولهای قرمز خون گوسفند مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C مجاور گردیدند. گلبولهای قرمز را که بدین نحو اپسونیزه (Opsonized) شده بودند به نسبت مساوی با سلولهای MCL و یا سلولهای صفاق موش (به عنوان کنترل مثبت) مخلوط کرده و بر روی روتاتور گذاشته و با سرعت یک دور در دقیقه در دمای ۳۷°C به آرامی مخلوط شدند.

پس از ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیونهای سلولی را برداشته و پس از دو بار شستن با محلول سرد HBSS در شرایط اتاق، سلولها بر روی لامهای پوشیده شده از ژلاتین سیتوسانتریفوژ شدند و برای مشاهده عمل بلع گلبولهای قرمز خون گوسفند توسط دو گروه سلول مذکور مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند.

آنالیز فلوسیتومتریک (Flow Cytometric Analysis):

سلولهای MCL را در هفته‌های ۲، ۴، ۵، ۹، ۱۲ و ۱۶ کشت سلولی، شسته و تعداد آنها در محلول PBS حاوی ۱ درصد سرم گوساله به ۵×۱۰^{۵} سلول در هر میلی لیتر رسانده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را در هر لوله مخصوص فلوسیتومتری ریخته و به هر یک ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد رسپتور FC (CD32/CD16) برای مسدود کردن شاخص FC اضافه گردید. لوله‌ها تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. پس از شستن سلولها با PBS و سانتریفوژکردن با دور g ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مربوطه اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در روی یخ مجدداً سلولها را با PBS شسته و این بار ۱۰۰ میکرولیتر محلول رقیق شده کمپلکس

جدول شماره ۱: فنوتیپ سلولهای طحال موش بر حسب زمان در محیط کشت حاوی اینتر لوکین -۳

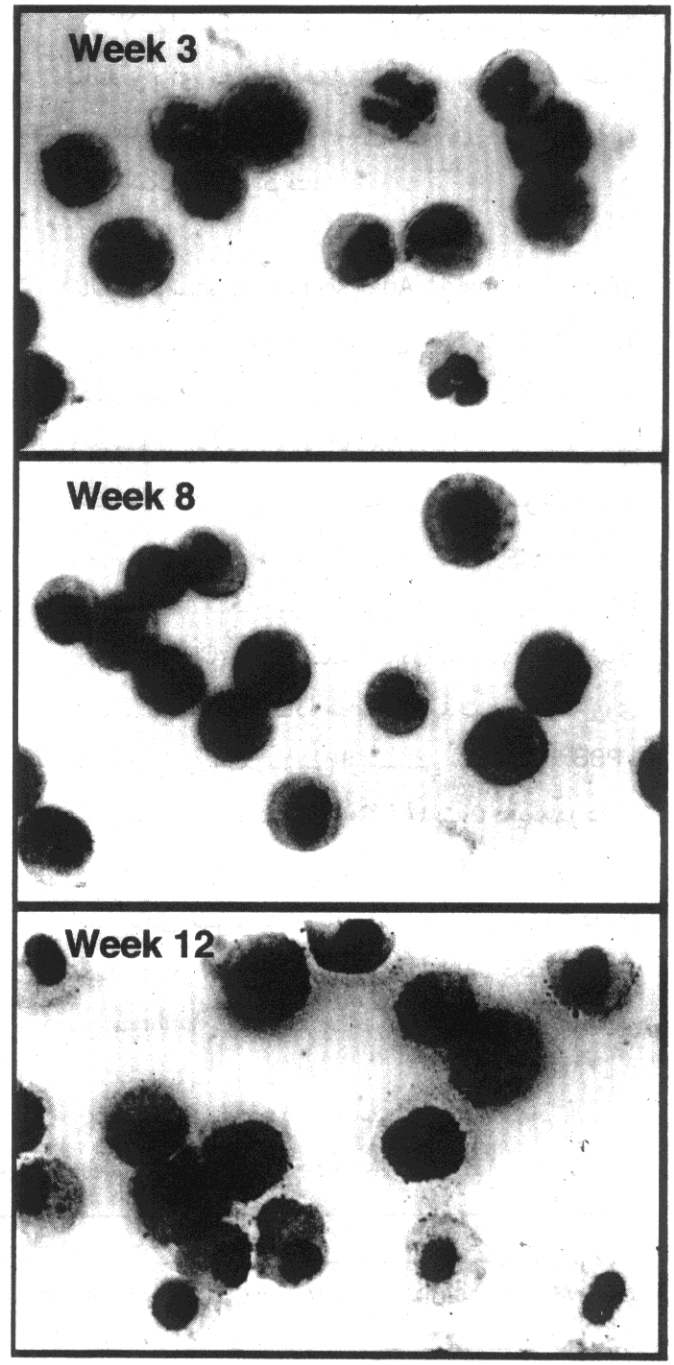
زمان کشت بر حسب هفته	رسپتورهای سطحی سلول*								
	NC-1.1	NK-1.1	Ly60	CD90	CD4	CD8	CD11b	IgM	CD16/CD32	TNF-α
۱	۱۱±۱	۵±۱	۱۱±۳	۲۶±۴	۳	۴	۱۴	۱۱±۱	۸۱±۵	۰
۴	۱۷±۳	۱	۹±۱	۱	۰	۱	۶±۴	۲±۲	۷۶±۲۰	۰
۵	۵۲±۳	۰	۱	۱	۰	۱	۲±۲	۰	۹۶	ND**
۹	۳۹±۶	۱	۵±۵	۰	۰	۰	۲±۲	۰	۸۴	ND
۱۲	۴۹±۱	۲±۲	۰	۰	۰	۱	۳	۱	۸۸	۰
۱۶	۴۸±۵	۱	۱	۱	۱	۱	۳	۰	۸۶±۴	ND

*میانگین درصد سلولهای مثبت ±SEM حداقل دو آزمایش، اندازه گیری شده با فلوسیتومتری.

**ND انجام نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۱: *تصویر سلولهای MCL پس از ۳، ۸ و ۱۲ هفته کشت در محیط حاوی IL-3، رنگ آمیزی شده با رایت گیمسا.*

استرپت آویدین FITC (Streptavidin-FITC) به لوله‌ها

جدول شماره ۲: نتایج آزمایشات تیپیک جهت تعیین اثر منوکلونال آنتی بادی 1C4 بر سلول کشی طبیعی سلولهای MCL بر حسب زمان کشت

سلول کشی بر حسب لیتیک یونیت به ازاء هر 10^8 سلول			
زمان کشت بر حسب هفته	کنترل	1C4 تأثیر داده‌ها	کاهش بر حسب لیتیک یونیت (٪)
۲	۱۱۱۱	۷۶۹	۳۰
۴	۲۱۷۳	۹۴۳	۵۷
۸	۱۳۸۹	۵۵۵	۶۰
۱۶	۱۰۰۰۰	۱۷۸۶	۸۲

اضافه گردید و مجدداً هر لوله به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. پس از شستن سلولها ۲۵۰ میکرولیتر PBS به هر لوله اضافه و در دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شدند.

نتایج:

فنوتیپ و مرفولژی سلولها MCL.

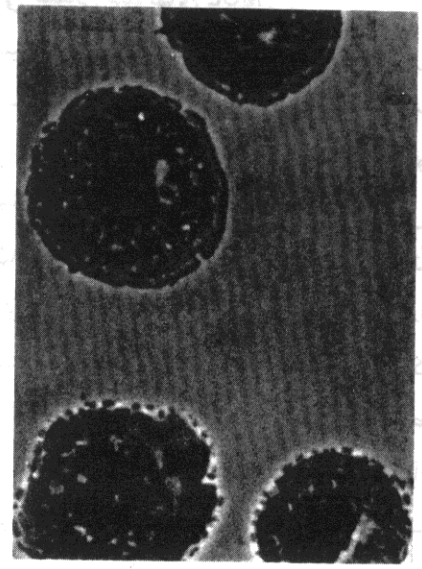
با استفاده از منوکلونال آنتی‌بادیهای موجود بر علیه شاخصهای مختلف سلولهای هموپوئیتیک (hemopoietic) از جمله سلولهای T (CD8,CD4,CD90) سلولهای B (IgM)، سلولهای NK (NK-1.1)، ماکروفاژها (CD11b) و سلولهای سلول کش طبیعی (NC-1.1)، CD32/CD16، Ly6c و TNF-α و فنوتیپ سلولهای MCL در مراحل مختلف رشد مورد بررسی قرار گرفت.

همانگونه که در جدول شماره ۱ آمده است بعد از دو هفته این سلولها مقدار ناچیزی از غالب شاخصها را به جز CD32/CD16 به مقدار ۸۱ درصد و CD90 به مقدار ۲۶ درصد بروز دادند.

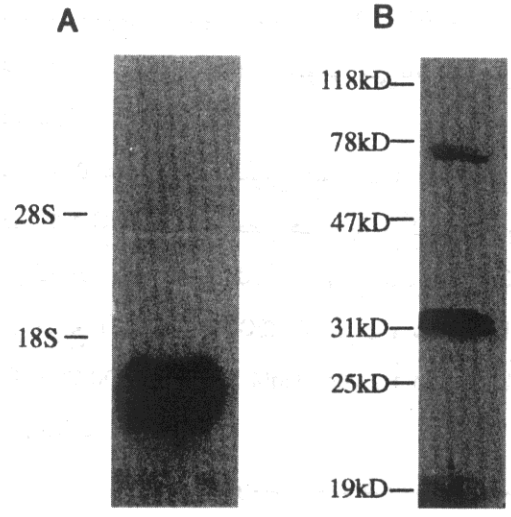
در هفته پنجم شاخص NC-1.1 به میزان ۵۲ درصد افزایش یافته و به طور همزمان سایر شاخصها به جز

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۲: *تصویری از سلولهای MCL پس از ۱۲ هفته در محیط کشت که توسط آلسین بلو رنگ آمیزی شده است.*



تصویر شماره ۳: *بروز mMCP-5 بر روی سلولهای MCL پس از ۲۸ هفته کشت. در بخش A، ۲۰ میکروگرم از RNA الکتروفورز شده و سپس با cDNA اختصاصی برای mMCP-5 ثابت گردید. در بخش B، سلول لیز شده پس از الکتروفورز با آنتی‌بادی ضد mMCP-5 ثابت گردیده است.*

CD32/CD16 ناپدید گردیدند. این الگوی بروز شاخصهای سطحی در طول مطالعه بدون تغییر باقی ماند.

از نظر مرفولوژی این سلولها تغییراتی را بر حسب طول عمرشان در محیط کشت نشان دادند. به طوری که در هفته سوم این سلولها نابالغ و از نظر تقسیم سلولی فعال و چند هسته‌ای بودند در صورتی که در هفته ۱۲ عمدتاً تک هسته‌ای و دارای دانه‌های درشت حاوی گرانول بودند (تصویر شماره ۱).

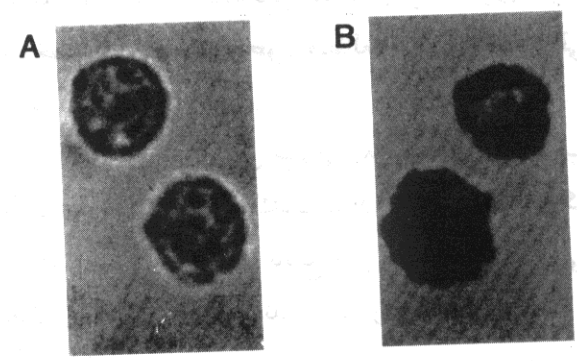
در هفته دوازدهم، ۹۵ درصد سلولها را سلولهای تک هسته‌ای بزرگ با سیتوپلاسم فراوان و همراه با گرانولهای هتروژن بی شباهت به ماکروفاژها و ماستوسیتها، ۲ درصد بلاست، ۲ درصد میلوبلاست/پرومیلوبلاست/ میلوسیت و ۱ درصد متامیلوسیت/نوتروفیل بودند. به علاوه بیش از ۹۰ درصد این سلولها به شدت با Alcian blue رنگ آمیزی اختصاصی موسین ماستوسیتها (۲۵) رنگ گرفتند. تصویر شماره ۲ مثالی از این رنگ آمیزی می‌باشد. به علاوه این سلولها گلبولهای قرمز گوسفند را در مقایسه با کنترل مثبت نمی‌بلعند. نتایج نشان داده‌اند که بیش از ۹۵ درصد سلولهای طحال موش CBA بعد از ۱۲ هفته در محیط کشت IL-3 حاوی مرفولوژی ماستوسیتها را داشته‌اند.

اختصاصات بیوشیمیایی ماستوسیتها:
(Biochemical Characterization of Mast Cells)

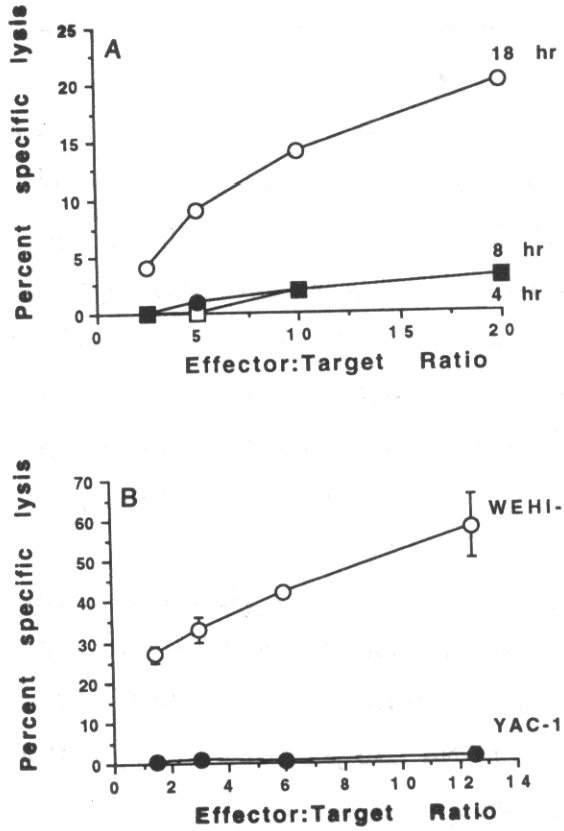
وقتی RNA کل به وسیله cDNA اختصاصی ژن mMCP بررسی گردید این ژن در قالب mRNA به میزان ۱ کیلو بیس (Kb-1) مشخص گردید، (تصویر A۳) که به صورت پروتئینی به وزن 31-KDa که با ایمونوگلوبولین اختصاصی ضد mMCP-5 به روش ایمونوبلاتیگ بر روی سلولهای لیز شده واکنش داده شد، تائید گردید (تصویر B۳). همچنین بررسی ایمونوشیمی وجود گرانولها را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۴: *رنگ آمیزی سلولهای MCL به روش ایمونوپراکسیداز با استفاده از IgG نرمال خرگوش (A) و آنتی‌بادی ضد mMCP-5 (B).*



تصویر شماره ۵: *سلولهای MCL کشت داده شده در محیط حاوی IL-3 سینتیک مشخصی را بر علیه سلولهای توموری W6H1-164 نشان می‌دهد (A). این سلولها سلول کشی طبیعی را بر علیه W6H1-164 نشان می‌دهند ولی تأثیری بر سلولهای توموری YAC-1 ندارند (B).*

سلول کشی طبیعی سلولهای MCL:

بررسیهای سلول کشی به عمل آمده بر روی سلولهای MCL نشان داد که این سلولها ظرف ۱۸ ساعت حداکثر سلول کش طبیعی خود را علیه سلولهای توموری W6H1-164 (حساس به NC) نشان می‌دهند (تصویر A۵). این سلولها در عین حال هیچگونه تأثیری بر سلولهای توموری YAC-1 (حساس به NK و مقاوم به NC) نداشته‌اند (شکل B۵). در این بررسیها منوکلونال آنتی‌بادی IC4 (ضد NC-1.1) عمل سلول کشی طبیعی سلولهای MCL را در هفته چهارم کشت به میزان ۵۷ درصد و در هفته ۱۶ کشت به میزان ۸۲ درصد کاهش دادند (جدول شماره ۲).

بحث:

کشت لکوسیتهای طحال موش CBA در محیط کشت حاوی IL-3 به تمایز سلولهایی منجر گردید که ماستوسیتهای وابسته به IL-3 یا MCL نامیده شدند. ۵۰ درصد این سلولها پروتئینی موسوم به NC-1.1 که مسئول سلول کش طبیعی (NC) در موش می‌باشد را بروز می‌دهند (۱۱،۲۴).

پس از ۵ هفته کشت سلولی همزمان با افزایش بروز رسپتور NC-1.1 سایر شاخص ها ناپدید گردیدند به طوری که فنوتیپ سطحی ثابت و نهایی سلولهای MCL در این موقع NC-1.1 و CD32/CD16 مثبت و شاخصهای CD90، CD8/CD4، CD11b، sIgM، Ly6c، NK-1.1 تماماً منفی بوده است.

این فنوتیپ مشابه فنوتیپی است که پس از کشت سلولهای مغز استخوان موش در محیط کشت حاوی ConA به دست آمده است (۲۷).

ظهور رسپتور NC-1.1 در این سلولها پیشنهاد می‌کند که IL-3 سلولهای بنیادی (stem cells) طحال را در جهت تمایز به ماستوسیتهایی با قدرت لیز سلولهای توموری حساس به سلول کشی طبیعی تحریک می‌نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

همانگونه که قبلا نشان داده‌ایم عمل سلول کشی طبیعی (NC) سلولهای نرمال طحال موش CBA با LU20 بین 140-500 بوده است (۲۴).

در این مطالعه کشت سلولهای طحال موش CBA در محیط کشت حاوی IL-3 باعث افزایش سلول کشی طبیعی ظرف ده هفته می‌شود که این افزایش با ازدیاد طول دوره کشت سلولی بیشتر شده به طوری که پس از ۱۶ هفته کشت تا ۲۰ برابر سلولهای کشت نشده رسید (جدول شماره ۲).

همان گونه که قبلاً گزارش شده (۷) و ما نیز در این مطالعه مشاهده نمودیم، کشت سلولهای طحال در محیط کشت غنی از IL-3 باعث از بین رفتن خاصیت کشندگی سلولهای کشنده طبیعی (NK)، در از بین بردن سلولهای توموری YAC-1 در کمتر از دو هفته می‌شود. این خود تائیدی است بر نقش IL-3 در تکثیر و تمایز سلولهای NC است و نه NK.

تا به امروز ماستوسیتهایی که توسط IL-3 از سلولهای طحال موش حاصل شده باشند گزارش نشده است در مقابل گزارش شده است که سلولهای مغز استخوان موش در محیط کشت حاوی IL-3 نه ماستوسیتها یا شبه ماستوسیتهایی تبدیل می‌شوند که عمل سلول کشی طبیعی را دارا بوده و ژنهای زنجیره بتا (β-chain) رسپتور سلولهای T را باز سازی نمی‌کند (۱۲،۹) و این سلولها تا چهار ماه در محیط کشت دوام داشته‌اند (۹).

از نظر مرفولوژی سلولهای MCL شبیه ماکروفاژ و یا ماستوسیت بودند. آزمایشات بیگانه خواری (Phagocytosis studies) نشان داد که این سلولها ماکروفاژ نبوده و در مقایسه با سلولهای کنترل قادر به بلع گلبولهای قرمز گوسفند (SRBC) نیستند. این نتایج با عدم بروز شاخص CD11b که مخصوص ماکروفاژها می‌باشد تائید گردید (جدول شماره ۱).

حال آنکه نتایج رنگ آمیزی با آلسین بلو (Alcain blue) و نیز بررسی وجود پروتئاز mMCP-5 در سطح مولکولی و نیز پروتئینی ماستوسیت بودن آنها تائید گردیده است.

به طور اختصار ما نشان داده‌ایم که کشت لکوسیتهای طحال موش CBA در حضور IL-3 منجر به تمایز گروهی از ماستوسیتهای نابالغ می‌گردد که MCL نامیده شدند. اگر چه تقریباً تمام سلولهای MCL ماستوسیت بودند ولی آنها را نمی‌توان به عنوان یک رده سلولی خالص (Cell line) تلقی کرد. در واقع ضرورت حضور بیش از ۳۰۰ سلول در هر چاهک ظرف کشت سلول، حکایت از واکنش بین دو یا بیشتر سلولهای مشخصی دارد که برای زنده ماندن یکدیگر لازم هستند. به علاوه تنها ۵۰ درصد سلولها رسپتور NC-1.1 را داشته‌اند. که حکایت از وجود حداقل دو گروه سلولی با منشاء ماستوسیت دارد.

به علاوه این سلولها رسپتوری برای TNF-α ندارد (جدول شماره ۱) لذا احتمالاً مکانیسمی که برای سلول کشی خود به کار می‌برند از طریق TNF-α نمی‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود پژوهش بیشتری در زمینه فاکتور یا فاکتورهای مؤثر در سلول کشی این سلولها به عمل آید. علیرغم توجه سایر منابع علمی بر این که سلول کشی طبیعی را با TNF-α در کشتن سلولهای توموری برابر می‌دانند ما اعتقاد داریم که تعریف سلول کشی طبیعی (NC) نیازمند توضیح بیشتری می‌باشد. استنتاج ما این است که مکانیسم سلول کشی طبیعی (NC) بایستی ابتدائا بر حسب اثرات متقابل رسپتور - لیگاند و نه رخدادهای سیتوتوکسیک آنها تعریف گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسنده از همکاریهای بی دریغ Dr.C.Smart و پروفسور R.Burton از دانشگاه نیوکاسل استرالیا در انجام این پژوهش و نیز وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به خاطر کمک مالی تشکر می‌نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1- Barton BE.; Mayer R. IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. J Immunol, 143: 3211-16, 1989.

2- Brien JH.; Smart YC.; Farrelly ML.; Burton RC. Phenotype and morphology of murine NC-1.1+ natural cytotoxic cells. Immunol Cell Biol, 72: 161-8, 1994.

3- Burton RC.; Smart YC. Natural cytotoxic cells mediate immunosurvivalance against 3-methylcholanthrene and mineral oil carcinogenesis in mice. Natural Immunity, 13: 227-32, 1994.

4- Bykowsky MJ.; Stutman O. The cells responsible for murine natural cytotoxic (NC) activity: a multi-lineage system. J Immunol, 13(7): 1120-6, 1986.

5- Chomczynski P.; Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162: 156-9, 1987.

6- Clarke GR.; Shirzadeh H.; Pang G.; Beagley KW.; et al. TNF-α is not the sole mediator of WEHI-164 tumor cell killing in natural cytotoxicity. Cytokine, 9: 254-62, 1997.

7- Djeu JY.; Lanze E.; Pastore S.; Hapel AJ. Selective growth of natural cytotoxic but not natural killer effector cells in interleukin-3. Nature, 306: 788-91, 1983.

8- Gordon JR.; Galli SJ. Mast cells as a source of bouth preformed and immunologically inducible TNF-α cachectin. Nature, 346: 274-6, 1990.

9- Ghiara P.; Boraschi D.; Villa L.; Scapigliati G.; et al. *In vitro* generated mast cells excpress natural cytotocicity against tumour cells. Immunology, 55: 317-24, 1985.

10- Harlow E.; Lane D. In: Antibodies: Alaboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: USA, 319: 319-58,1988.

11- Holmgreen SP.; Wang X.; Clarke GR.; Noltorp RS.; et al. Phosphorylation of the NC-1.1 receptor and regulatio of natural cytotoxicity by protein kinase C and cyclic GMP-dependent protein kinase. J Immunol, 158: 2035-41, 1997.

12- Jadus MR.; Schmunk G.; Djeu JU.; Parkman R. Morphology and lytic mechanisms of interleukin 3-dependent natural cytotoxic cells: tumour necrosis factor as a possible mediator. J Immunol, 137: 2774-83, 1986.

13- Koo GC.; Peppard JR. Establishment of monoclonal anti-NK-1.1 antibody. Hybridoma, 3: 301-3, 1984.

14- Lee JC.; Hapel AG.; Ihle JN. Constitutive production of a unique lymphokine (IL3) by the WEHI-3 cell line. J Immunol, 128: 2393-8, 1982.

15- Lattime EC.; Pecoraro GA.; Stuman O. The activity of natural cytotoxic cells is augmented by interleukin-2 and interleukin-3. J Exp Med, 157: 1070-5, 1983.

16-Martiniello R.; Smart YC.; Burton RC. Monoclonal antibody 2B6-F2 identifies a subset of murine natural killer cells with receptors for YAC-1 and WEHI-164 targets. Cell Immunol, 156: 155-69, 1994.

17- McNeil HP.; Austen KF.; Somerville LL.; Gurish MF.; et al. Molecular cloning of the mouse mast cell protease-5 gene: a novel secretory granule protease exporessed early in the differentiation of serosal mast cells. J Biol Chem, 266: 20316-22, 1991.

18- McNeil HP.; Frenkel DP.; Austen KF.; Friend DS.; et al. Translation and granule localization of mouse mast cell protease-5. Immunodetection with specific antipeptide Ig. J Immunol, 149(7): 2466-72, 1992.

www.SID.ir

Archive of SID

19- Ortaldo JR.; Mason LH.; Mathieson BJ.; Liang SM.; et al. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. Nature, 321: 700-1, 1986.

20- Richards AL.; Okuno T.; Takagaki Y.; Djeu JY. Natural cytotocic cell- specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/ mast cells- relationship to TNF. J Immunol, 141(28): 3061-6,1988.

21- Rathjen DA.; Cowan K.; Furphy LJ.; Aston R. Antigen stucture of human tumour necrosis factor, recognition of distinct regions of TNF-α by different tumour cell receptors. Mol Immunol, 28: 79-86, 1991.

22- Serafin WE.; Reynolds DS.; Rogelj S.; Lane WS.; et al. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. J Biol Chem, 265: 423-9, 1990.

23- Smart YC.; Farrelly ML.; Burton RC. Correlation of growth of tumours in NC-cell-depleted mice with NC- and NK-cell-mediated lysis *in vitro*. Int J Cancer, 50: 817-21, 1992.

24- Smart YC.; Stevenson KL.; Farrelly ML.; Burton RC.; et al.Production of monoclonal allo-antibody to murine natural cytotoxic cells. Immunol Cell Biol, 68: 277-84, 1990.

25- Smith A.; Bruton J. A colour atlas of histological staining techniques. Wolfe Medical Publication Ltd, London, 1997.

26- Stutman O.; Dien P.; Wisun RE.; Lattime EC. Natural cytotoxic cells against solid tumour in mice: blocking of ctyotoxicity by D mannose. Proc Natl Acad Sci, USA, 77: 2895-8, 1980.

27- Tertian G.; Yung YP.; Guy-Grand D.; Moore MA. Long-term *in vitro* culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor -dependent culture technique. J Immunol, 127: 788-94, 1981.

28- Wright SC.; Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. J Immunol, 138: 1791-8, 1987.

www.SID.ir