Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره چهارم، شماره ۱/ ۳۷-۳۳/ بهار ۱۳۸۱

فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α) تأثیری بر سلول کشی ماستوسیتهای پرورش یافته در مجاورت اینترلوکین-۳ ندارد

دکتر هدایت‌اله شیرزاده*

چکیده:

کشت طولانی مدت سلولهای طحال موش از نژاد CBA در محیط کشت حاوی اینترلوکین-۳ منجر به ماستوسیتهایی می‌شود که (Mouse Mast Cell Line= MCL) نامیده می‌شوند. این سلولها هیچکدام از رسپتورهای مخصوص سلولهای NK,B,T و ماکروفاژها را دارا نمی‌باشند. بر عکس رسپتور NC-1.1 راکه مؤثر در سلول کشی طبیعی (Natural Cytotoxicity= NC) می‌باشد بروز می‌دهند. از آنجایی که اغلب منابع علمی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) را به عنوان واسطه اصلی سلول کشی طبیعی بر علیه تومور می‌دانند و سلولهای MCL نیز رسپتور TNF-α ندارند، این مطالعه برای تعیین نقش احتمالی TNF-α در کشتن فیبروسارکومای WEHI-164 توسط سلولهای MCL انجام گرفت. سلولهای MCL و نیز سلولهای طحال موش از نژاد F1 (CBA×C57BL/6) (کنترل مثبت) را به طور مجزا با آنتی‌بادی ضد TNF-α برای مسدود نمودن اثر NC آنها اضافه و سپس این سلولها در آزمایش سنجش سلول کشی (Cytotoxicity assay) با سلولهای توموری WEHI-164 رادیو اکتیو شده مجاور شدند. همچنین برای تعیین این که آیا سلولهای MCL اساساً دارای ژن مولد TNF-α هستند یا خیر mRNA ژن TNF-α آنها هم به صورت غیر تحریک شده و هم تحریک شده توسط سلولهای توموری WEHI-164 با روش RT-PCR ارزیابی گردیدند. نتایج نشان داد که سلول کشی طبیعی سلولهای MCL بر عکس سلولهای طحال موش از نژاد F1 (CBA×C57BL/6) توسط آنتی‌بادی ضد TNF-α متوقف نمی‌گردد. به علاوه نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که TNF-α به طور بنیادی در این سلولها مشاهده نمی‌شود ولی پس از مجاورت با سلولهای توموری WEHI-164 فاکتور مذکور را به طور گذرا پس از ۳۰ دقیقه بر انگیخته و سپس ناپدید می‌شود. نتیجه اینکه خاصیت سلول کشی طبیعی سلولهای MCL از طریق مکانیسمی دیگر غیر از تأثیر TNF-α انجام می‌شود و احتمالاً فاکتور و یا فاکتورهای دیگری در این امر دخالت دارند.

واژه های کلیدی: ماستوسیت، اینترلوکین-۳، فاکتور نکروز دهنده تومور، سلول کشی طبیعی.

مقدمه:

سلول کشی طبیعی با واسطه سلولی (Natural Cell Mediated Cytotoxicity= NCMC) مکانیسم عمده ایمنی ذاتی سلولی علیه عفونتهای داخل سلولی و سرطان محسوب می‌شود و کشندگی طبیعی و سلول کشی طبیعی از عوامل این مکانیسم محسوب می‌شود (۱۲). فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (Tumour Necrosis Factor Alpha= TNF-α) را به عنوان عامل مؤثر در این پدیده پیشنهاد کرده‌اند و گواه این قضیه لیز شدید سلولهای فیبروسارکومای ایجاد شده توسط ۳-میتل کلانترن (3-Methylcholantrene) موسوم به WEHI-164 حساس به سلول کشی طبیعی توسط TNF-α موش و نیز فرم نو ترکیب

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

www.SID.ir

Archive of SID

(Recombinant) انسانی آن می‌باشد (۲). ضمناً روند سلول کشی طبیعی و لیز سلولهای توموری WEHI-164 حساس به سلول کشی طبیعی در محیط آزمایشگاه مشابه می‌باشد (۷،۴). از طرفی سلول کشی وابسته به سلولهای طحال موش بر علیه WEHI-164 توسط آنتی‌بادی ضد TNF-α متوقف می‌شود (۶،۵). از آنجایی که این اطلاعات عمدتاً از آزمایشات انجام شده بر روی سلولهای طحال موش به دست آمده است که ممکن است توسط گروههای سلولی مختلفی که قادر به تحریک ترشح TNF-α در شرایط مختلف می‌باشند انجام گیرد و عمل NC توسط بخش کوچکی (۵٪) از مجموع سلولهای طحال انجام می‌شود (۱۱،۱)، اطلاعات به دست آمده از آنها می‌تواند با تورش همراه باشد. در این مطالعه با استفاده از سلولهای MCL که اکثریت آنها ماستوسیت هستند (۱۰)، محقق سعی دارد تعیین نماید آیا فاکتور TNF-α واسطه مؤثر بر NC این سلولها در لیز فیبروسارکومای WEHI-164 می‌باشد یا خیر؟

مواد و روشها:

سنجش آزاد سازی کرومیوم ۵۱:

(^{51}Cr release cytotoxicity assay):

با استفاده از روش آزاد سازی کرومیوم پنجاه و یک (رادیو اکتیو) سلول کشی طبیعی سلولهای MCL بر علیه سلولهای توموری WEHI-164 تعیین گردید (۱۰). به طور اختصار 1×10^{7} سلول در میلی لیتر از سلولهای کشت داده شده در محیط کشت حاوی IL-3 را با سلولهای توموری WEHI-164 که قبلاً با کرومیوم ۵۱ رادیو اکتیو (^{51}Cr-labelled) نشاندار شده بودند برای تعیین عمل سلول کشی طبیعی آنها به نسبتهای ۱/۵:۱ تا ۱:۵۰ با سلولهای توموری فوق مجاور شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت نگهداری شدند. تعداد سلولهای توموری در هر یک از چاهکهای ظرف آزمایش 1×10^{4} سلول بود. 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 (Cobra Gamma Counter) اندازه‌گیری گردید.

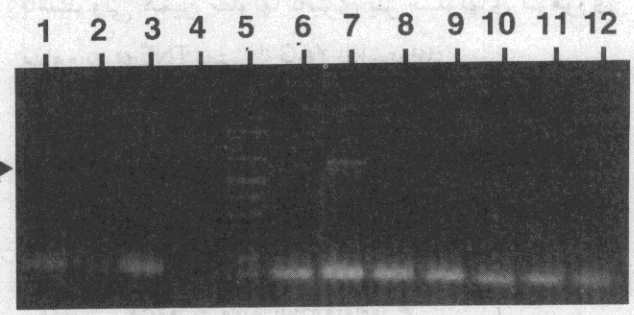
برای تعیین اثر آنتی‌بادیهای ضد TNF-α بر توقف یا کاهش سلول کشی سلولهای MCL و سلولهای طحال موش F1 (CBA×C57BL/6) (به عنوان کنترل مثبت) آنها را با آنتی‌بادی ضد TNF-α مجاور نموده و پس از یک ساعت سلولها را شسته و در ظرفهای آزمایش ۹۶ چاهکی به نحوی که در بالا ذکر گردید با سلولهای توموری مجاور شدند.

تهیه RNA (*RNA preparation*):

RNA سلول با استفاده از RNAzol B طبق دستورات شرکت تولید کننده جدا گردید. به طور اختصار، سلولهای MCL از محیط کشت سلولی جدا و در محلول RNAzol B به آرامی لیز شدند. به نسبت $\frac{1}{10}$ به حجم سلولهای لیز شده کلروفرم اضافه و مدت ۱۵ ثانیه ورتکس (Vortex) شدند. پس از سانتریفوژ شدن با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه و در چهار درجه سانتیگراد محلول رویی به لوله‌های دیگر انتقال داده شد و حجم مساوی ایزوپروپانول (Isopropanol) به آن اضافه و سپس به مدت یک شب در چهار درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از سانتریفوژ کردن با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب RNA با اتانول ۷۵ درصد جمع‌آوری و خشک گردید. RNA خشک شده در ۳۸/۵ میکرولیتر محلول یک میلی مول EDTA و ۱/۶ میکرولیتر محلول پنج مول کلرور سدیم حل و سپس با اتانول ته نشین گردید. پس از سانتریفوژ شدن با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۴۵ دقیقه رسوب RNA با آب حاوی ۸۰ درصد اتانول ۱ درصد دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) و یک دهم واحد در

www.SID.ir

کتابخانه منطقه‌ای علوم و تحقیقات شیراز
Archive of SID



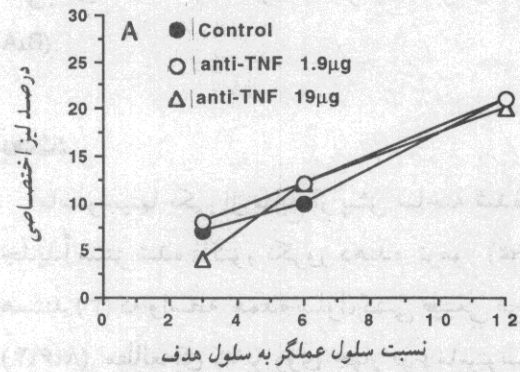
تصویر شماره ۱: سینتیک mRNA، TNF-α سلولهای MCL پس از مجاورت با سلولهای WEHI-164 به روش RT-PCR تعیین گردیده است. ستون ۱- سلولهای MCL را به تنهایی نشان می‌دهد، ستون ۲- سلولهای WEHI-164 و ستون ۳، ۴ کنترل منفی (نمونه آب پس از ترجمه معکوس) ستون ۵ نردبان DNA و ستون ۱۲-۶ به ترتیب مخلوط سلولی واکنش داده شده در زمانهای ۰، ۳۰ دقیقه و ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۸ ساعت.

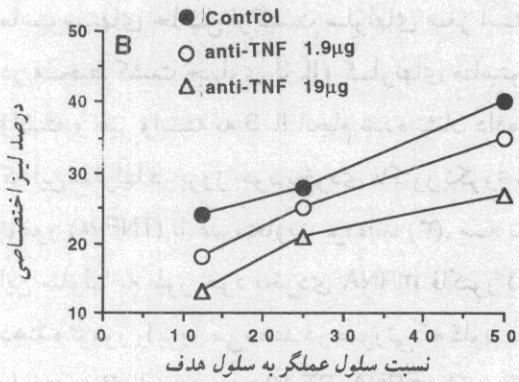
میکرولیتر RNasin شستشو داده شد و پس از خشک شدن در ۹/۵ میکرولیتر آب حاوی DEPC حل گردید.

نمونه‌های RNA را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (۲).

نتایج:

برای تعیین نقش TNF-α در سلول کشی طبیعی سلولهای MCL این سلولها را ابتدا با سلولهای توموری WEHI-164 مجاور کرده و سپس mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α) به روش RT-PCR بررسی گردید. همانگونه که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور به طور خود بخودی (Constitutive) در این سلولها مشاهده نمی‌شود. ولی هنگامی که با سلولهای توموری WEHI-164 مجاور شدند mRNA فاکتور مذکور به طور گذرا پس از ۳۰ دقیقه





نمودار شماره ۱: آنتی‌بادی ضد TNF-α به مقدار ۱/۹ و ۱۹ میکروگرم تأثیری بر سلول کشی طبیعی سلولهای MCL بر علیه سلولهای توموری WEHI-164 ندارد (A). در صورتی که سلولهای طحال موش F1 (CBA×C57BL/6) به عنوان کنترل ۵۰ درصد سلول کشی طبیعی را متوقف می‌نماید (B).

بر انگیخته شده و سپس ناپدید می‌گردد.

با استفاده از ژن G3PDH house keeping پایداری cDNA (integrity) برای هر کدام از نمونه‌های مورد استفاده کنترل گردید. به هر حال القاء mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور تولید هیچگونه TNF-α قابل اندازه‌گیری را چه به شکل پروتئین غشایی و چه به صورت محلول (Soluble) به دنبال نداشته است. به علاوه عمل سلول کشی طبیعی این سلولها بر عکس سلولهای طحال موش F1 (CBA×C57BL/6) توسط

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌بادی ضد TNF-α متوقف نگردید (نمودار شماره ۱ A،B).

بحث:

ماستوسیتها یکی از منابع از پیش ساخته شده و نیز جدیداً سنتز شده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α) هستند (۳) که واسطه عمده سلول کشی طبیعی می‌باشد (۴،۶،۸). مطالعه‌ای که بر روی چهار نوع ماستوسیتهای کشت داده شده از قبیل ماستوسیتهای صفاق موش، ماستوسیتهای حاصل از کشت سلولهای مغز استخوان در محیط کشت حاوی IL-3 و کلونهای ماستوسیت وابسته و غیر وابسته به IL-3 انجام شده نشان داده است که این سلولها در بروز خود بخودی فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α) با هم متفاوت بوده‌اند (۳). سه نوع از این سلولها به طور خود بخودی mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور را بروز می‌دهند در صورتی که کلون سلولی وابسته به IL-3 موسوم به PT-18، mRNA فاکتور فوق را بروز نداده و در نتیجه قادر به سنتز این سیتوکین نمی‌باشد. در اثر تحریک با IgE و آنتی ژن، سلولهای PT-18 پس از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه حاوی mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور در حد قابل تشخیص شده و پس از ۶۰ دقیقه TNF-α را تولید و آزاد نموده‌اند (۳).

اختلاف در تولید خود بخودی TNF-α توسط ماستوسیتهای مختلف بستگی به درجه بلوغ آنها دارد. سلولهای PT-18 از نظر ساختمانی (Ultrastructural) ماستوسیتهای نابالغ بوده‌اند (۳).

القاء پیام TNF-α توسط سلولهای MCL به دنبال تحریک با سلولهای توموری WEHI-164 سینتیکی شبیه به سلولهای PT-18 داشتند. اگر چه وجود موقتی و گذرای mRNA، سنتز پروتئین TNF-α را در حد قابل تشخیص به دنبال نداشته است.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داده‌اند که سلولهای MCL قادرند سلول کشی طبیعی بالایی بر علیه سلولهای توموری WEHI-164 حساس به TNF-α داشته باشند ولی همین سلولها تأثیری بر سلولهای توموری مقاوم به TNF-α یعنی YAC-1 نداشته‌اند.

جریان سلول کشی طبیعی سلولهای MCL شبیه به فرایند لیز سلولهای WEHI-164 توسط TNF-α می‌باشد. به هر حال در این مطالعه فقط به طور گذرا mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور، آنهم پس از تقابل (Interaction) سلولهای MCL با WEHI-164 القاء گردید. ولی پروتئین TNF-α تشخیص داده نشد. به علاوه عدم تأثیر آنتی‌بادی ضد TNF-α بر سلول کشی طبیعی سلولهای MCL نشان می‌دهد که TNF-α واسطه سلول کشی طبیعی این سلولها نمی‌باشد.

پژوهشهای انجام شده بر روی سلولهای وابسته و غیر وابسته به IL-3 و استفاده از آنتی‌بادیهای پلی کلونال و منوکلونال ضد TNF-α در توقف سلول کشی طبیعی آنها نتایج متضادی داشته‌اند. Richard و همکارانش (۹) دریافتند که آنتی‌بادی ضد TNF-α عمل سلول کشی طبیعی سلولهای وابسته به IL-3 و سلولهای لوسمی بازوفیلیک رات (RBL-2H3) را به طور کامل مسدود می‌کند. در صورتی که Wright و Bonavida (۱۳) نشان داده‌اند که سلول کشی سلولهای U 937 حساس به TNF توسط فاکتورهایی وابسته ولی مجزا از TNF-α انجام می‌شود.

به طور اختصار ما نشان داده‌ایم که کشت لکوسیتهای طحال موش CBA در حضور IL-3 منجر به تمایز گروهی از ماستوسیتهای نابالغ می گردد که MCL نامیده شدند. این سلولها سلول کشی طبیعی را بر علیه سلولهای توموری WEHI-164 عهده‌دار بوده و مکانیسمی که برای این سلول کشی به کار می‌برند TNF-α نمی‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که فاکتور یا فاکتورهای سلول کش طبیعی دیگری نظیر Fas ligand و یا فاکتورهایی که تاکنون مشخص نشده‌اند در این امر دخالت داشته باشند.

استنتاج ما این است که مکانیسم سلول کشی طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID

MCL بایستی در ابتدا بر حسب اثرات متقابل رسپتور لیگاند و نه رخدادهای سیتوتوکسیک متعاقب آنها تعریف گردد.

تشکر و قدردانی:

نگارنده از دانشگاه نیوکاسل استرالیا و دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر کمکهای مالی تشکر می‌نماید.

References:

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

2- Clarke GR.; Shirzadeh H.; Pang G.; Beagley KW.; et al. TNF-α is not the sole mediato of WEHI-164 tumour cell killing in natural cytotoxicity, Cytokine, 9(4): 254-62, 1997.

3- Gordon JR.; Galli SJ. Mast cells as a course of both preformed and immunologically inducible TNF-α/cachection. Nature. 346: 274-6, 1990.

4- 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.

5- Lattime EC.; Stuman O. Thymic lymphomas mediate non-MHC-restricted. TNF-dependent lysis of the murine sarcoma WEHI-164. Cell Immunol, 136: 69-79, 1987.

6- Ortaldo JR.; Mason LH.; Mathieson BJ.; Liang SM.; et al. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. Nature, 312: 700-2, 1986.

7- Patek PQ.; Lin Y.; Collins JL. Natural cytotoxic cells and tumor necrosis factor activate similar lytic mechanisms. J Immunol, 138: 1641-6, 1987.

8- Patek PQ.; Lin Y. Natural cytotoxic activity is not necessarily mediated by the release of tumor necrosis factor. Immunology, 67: 509-13, 1989.

9- Richard AL.; Okuno T.; Takagaki Y.; Djeu JY. Natural cytotoxic cell specific cytotoxic factor produced by IL3-dependent basophilic/mast cell. J Immunol. 141: 3061-6, 1988.

10- Shirzadeh H.; Clarke GR.; McNeil HP.; Wang H.; et al. An IL-3-induced splenic NC-1.1 mast cell line mediates natural cytotoxicity independent of TNF-α. Cell Immunol, 174: 147-54, 1996.

11- Smart YC.; Stevenson KL.; Fareelly ML.; Brien JH.; et al. Production of a monoclonal allo-antibody to murine natural cytotoxic cells. Immunol Cell Biol, 68: 277-84, 1990.

12- Stutman O. Cancer. In: Nelson DS(ed.). Natural immunity. Academuic press. Sydney: Austrelia, 749-94, 1989.

13- 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 and tumor necrosis factor. J Immunol, 138: 1791-8, 1987.

www.SID.ir