Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس بر بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت

افسون شریعت[۱]، رامین یعقوبی[۲*]، طلعت مختاری آزاد[۳]، محمد حسین کریمی[۲]، سید محمد مؤذنی[۴]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا- برج پژوهشی محمد رسول الله، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳- گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: برهمکنش گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس با پذیرنده‌های شبه تول بر سلول‌های دندریتیک منجر به پیام دهی اولیه و پاسخ ایمنی ذاتی می‌شود. هدف از این تحقیق، مطالعه اثرات گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس بر بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک گروه تیمار با این گلیکوپروتئین ویروسی در مقایسه با گروه کنترل بود.

مواد و روش‌ها: نمونه خون محیطی از ۵ فرد داوطلب سالم جمع آوری شد. پس از تولید سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت‌ها در روز پنجم کشت، نیمی از سلول‌های دندریتیک نابالغ با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس تیمار شدند و مابقی سلول‌ها بدون تیمار به سلول‌های دندریتیک بالغ القاء و به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند و بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک در این دو گروه با هم مقایسه گردید.

نتایج: در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B میزان بیان ژن پذیرنده شبه تول ۴ در سلول‌های دندریتیک به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). در حالی که اختلاف معنی داری در درصد بیان شاخص‌های CD83، CD86، CD1a و HLA-DR و غلظت سایتوکاین IL-23 مترشحه از سلول‌های دندریتیک در دو گروه تیمار و کنترل مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن پذیرنده شبه تول ۴ در سلول‌های دندریتیک تیمار با گلیکوپروتئین B نشان داد که تنها تماس سلولی جهت روشن ساختن پاسخ سلولی ضد ویروسی و فعالیت پذیرنده شبه تول ضروری است. بنابراین مطالعات بیشتر در مورد شاخص‌های سلولی موثر فوق در ساخت راه‌کارهای درمانی علیه سیتومگالوویروس می‌تواند نقش مهمی داشته باشد.

کلمات کلیدی: **گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس، شاخص‌های بلوغ سلول‌های دندریتیک، پذیرنده‌های شبه تول، اینترلوکین ۲۳**

مقدمه

سیتومگالوویروس متعلق به خانواده هرپس ویریده بوده و رایجترین پاتوژن فرصت طلب و عامل مهم مرگ و میر در بیماران مبتلا به نقص ایمنی از جمله گیرندگان پیوند می‌باشد. سیتومگالوویروس همانند سایر هرپس ویروس‌ها سبب ایجاد عفونت نهفته در میزبان می‌گردد (۱). در سیتومگالوویروس گلیکوپروتئین‌های پوشش از جمله گلیکوپروتئین B (Glycoprotein B, gB) با مشار کت کمپلکس سه گانه از گلیکوپروتئین‌های H، L و O واسطه اتصال و ورود ویریون‌ها به درون سلول میزبان هستند (۲، ۳). همچنین گلیکوپروتئین B در ادغام پوشش سیتومگالوویروس با سلول میزبان نقش اصلی دارد (۴) به علاوه، گلیکوپروتئین‌های B و H پاسخ‌های سلولی را روشن ساخته و سبب فعالیت پذیرنده‌های شبه تول (Toll like receptors, TLRs) می‌گردند (۵). TLR خانواده‌ای از پذیرنده‌های شناسایی کننده پاتوژن‌ها بوده که پاسخ‌های ایمنی ذاتی علیه ارگانیسم‌های مهاجم

* نویسنده مسئول: رامین یعقوبی، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا- برج پژوهشی محمد رسول الله، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. Email:rayaviro@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

از قبیل ویروس‌ها را آغاز می‌نمایند (۶، ۷). پیامدهای اولیه فعالیت TLRها شامل فعالیت فاکتور هسته‌ای NF-κB، ترشح سایتوکاین‌های التهابی، بلوغ سلول‌های دندریتیک و تنظیم بالای ملکول‌های محرک کمکی ایمنی می‌باشند (۸، ۹). TLR بر اساس ساختارهای ملکولی منحصربفرد بنام الگوهای ملکولی وابسته به پاتوژن (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs) میکروارگانیسم‌ها را شناسایی می‌کنند (۶). بنابراین گلیکوپروتئین‌های B و H پوشش ویروسی از جمله فعال کننده TLRها بوده به طوری که آنتی بادی علیه این گلیکوپروتئین‌ها سبب متوقف نمودن القاء انواع مارکرها از قبیل NF-κB شده و پاسخ سایتوکاین التهابی به سیتومگالوویروس را مهار می‌نماید (۱۰، ۱۱).

TLR بر روی سلول‌های دندریتیک (Dendritic cell, DCs) و ماکروفاژها بیان می‌شوند. سلول‌های دندریتیک آغازگران حیاتی و اساسی در ایمنی سلولی علیه عفونت سیتومگالوویروس هستند (۱۲). همچنین سلول‌های دندریتیک مهمترین سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن در تحریک پاسخ‌های لمفوسیت T و ایمنی زایی علیه ویروس‌ها می‌باشند (۱۳). از آنجا که واکسن مؤثری علیه سیتومگالوویروس وجود نداشته و کاربرد طولانی مدت داروهای ضد ویروسی نیز باعث سمیت زایی در میزبان می‌گردد (۵)، بنابراین مطالعه و بررسی شاخص‌های سلولی از جمله TLRها و برهمکنش آن‌ها با گلیکوپروتئین‌های پوشش سیتومگالوویروس جهت ایجاد روش‌های درمانی و واکسن‌های جدید علیه این ویروس از اهمیت خاصی برخوردار است.

در این مطالعه، اثرات گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس بر بلوغ، عملکرد و میزان بیان TLRها در سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار با این گلیکوپروتئین ویروسی در مقایسه با گروه کنترل ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها: این تحقیق از نظر رعایت اصول اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد تأیید قرار گرفت. ابتدا ۲۰mL نمونه خون تیمار شده با EDTA از ۵ فرد داوطلب سالم (با میانگین سنی ۳۵ سال) گرفته شد و این افراد قبل از تیمار با این گلیکوپروتئین ویروسی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

تولید سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت : لکوسیت‌ها از ۲۰ mL نمونه خون تیمار با EDTA از ۵ داوطلب سالم توسط سانتریفوژ روی لمفودکس (Lymphodex) (Inno-train, Germany) از طریق شیب غلظت جمع آوری گردید. بدین ترتیب که پس از بردن نمونه خون روی لمفودکس و سانتریفوژ با دور ۲۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سلول‌ها از فاز میانی جدا شدند. سپس منوسیت‌های +CD14 به وسیله انتخاب مثبت توسط ستون‌های مگنت LS با استفاده از سیستم MACS (Miltenyi Biotech, Germany) مطابق دستورالعمل موجود جدا گردیدند. بدین صورت که رسوب سلولی را در ۸۰µL بافر مگنت به ازاء 10^7 سلول مخلوط می‌کنیم. بافر مگنت، محلولی است که حاوی بافر فسفاته و ۰/۵٪ سرم گوساله (Fetal bovine serum, FBS) (Life technologies, USA) و محلول EDTA ۲ میلی مولار می‌باشد. سپس ۲۰ µL آنتی بادی CD14 MicroBead Human (Miltenyi Biotech, Germany) به ازاء 10^7 سلول به آن افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال، سلول‌ها با افزودن ۱mL-۲ بافر مگنت به ازاء 10^7 سلول شسته شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پس از آن سلول‌ها در ۳۰۰ µL بافر مگنت مخلوط گردیدند. به دنبال قرار دادن ستون مگنت در میدان مغناطیسی، سوسپانسیون سلولی روی ستون ریخته شد و ستون را با بافر شسته به طوری که سلول‌های غیر نشاندار با آنتی بادی از ستون عبور نموده و خارج می‌شوند. ستون را برداشته و آن را روی فالکون جدید قرار می‌دهیم. سپس با ریختن بافر روی ستون و وارد کردن سریع پیستون با فشار درون ستون، سلول‌های نشاندار جمع آوری می‌گردند. منوسیت‌های جدا شده در پلیت‌های کشت سلولی ۶ چاهکی در محیط RPMI (Invitrogen, USA) غنی سازی شده با ۴ mM ال-گلوتامین (Life technologies, USA)، 100IU/ mL پنی سیلین (Life technologies, USA)، ۱۰٪ سرم گوساله غیرفعال شده با حرارت (Life technologies, USA)، ۱٪ پیروات سدیم (Bioidea, Iran)، ۱٪ آمینواسید غیر ضروری (Life technologies, USA)، 1000IU/ mL فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت ماکروفاژ نوترکیب انسانی (GM-CSF; R&D Systems , UK) و 500 IU/ mL اینترلوکین ۴ نوترکیب انسانی (IL-4; R&D Systems, UK) در محیط مرطوب

www.SID.ir

Archive of SID

انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. هر ۳ روز یک بار ۲۰۰ µL از محیط با محیط تازه حاوی سایتوکاین‌های فوق تعویض گردید. جهت تولید سلول‌های دندریتیک بالغ، در روز پنجم کشت با افزودن ۱۰۰۰ IU/ mL فاکتور نوترکیب انسانی نکروز دهنده توموری آلفا (TNF-α; R&D Systems, UK) بلوغ القاء شد و سلول‌های دندریتیک پس از ۴۸ ساعت به فرم سلول‌های بالغ درآمدند.

تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس: منوسیت‌های جداشده توسط سیستم MACS از ۵ داوطلب سالم در پلیت‌های کشت ۶ چاهکی مطابق روش بالا کشت داده شدند (۱۴). در روز پنجم کشت، ۱ µg/mL آنتی ژن نوترکیب گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس انسانی (Sino Biological Inc, USA) به نیمی از سلول‌های دندریتیک نابالغ جهت ارزیابی اثرات این آنتی ژن ویروسی روی بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک افزوده شد (گروه تیمار با گلیکوپروتئین B). همچنین مابقی سلول‌های دندریتیک نابالغ بدون تیمار با آنتی ژن ویروسی مطابق روش بالا مستقیما به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل شدند (گروه کنترل).

آنالیز شاخص‌های سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت: سلول‌های دندریتیک بالغ جمع آوری و با آنتی بادی‌های منوکلنال رنگ شده به صورت فلورسنت رنگ آمیزی شدند. آنتی‌بادی‌های به کار رفته عبارت بودند از: PE-anti-CD14، FITC-anti-CD83، FITC-anti-CD86، FITC-anti-CD1a و FITC-anti-HLADR (eBiosciences, USA). سوسپانسیون سلولی با محلول آنتی بادی میکس شده و در تاریکی در دمای ۴ درجه به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس سلول‌ها در محلول بافر فسفاته مخلوط شده و یافته‌ها به ازای ۱۰۰۰۰ سلول با دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson, San Jose, USA) به دست آمد و نرم افزار FlowJo (Flexera Company, USA) جهت آنالیز مقدار بیان (Expression rate) و میانگین شدت فلورسنس (Mean fluorescence intensity, MFI) شاخص‌های سلول‌های دندریتیک مورد استفاده قرار گرفت.

بیان ژن‌های سایتوکاین IL-23 و TLRهای ۲ و ۴ : RNA توتال توسط RNX Plus (CinnaGen, Iran) از سلول‌های دندریتیک استخراج شد. نمونه‌های RNA با استفاده از ترانس کریپتاز معکوس (Vivantis, Malaysia) و راندوم هگزامر به طور معکوس رونویسی شد (۱۵) و مقدار ۱ µg از RNA توتال جهت تولید cDNA به کار رفت. پرایمرهای مورد استفاده جهت آنالیز رونوشت ژن‌ها شامل TLR-2 (NM_003264.3)، TLR-4 (NM_003266.3)، IL-23 (NM_016584.2) و β-actin (NM_001101.3) بودند که در جدول (۱) آمده است. نهایتا سطوح بیان mRNA ژن‌های IL-23، TLR2 و TLR4 در سلول‌های دندریتیک در افراد تیمار در مقایسه با گروه کنترل با روش real time PCR که قبلا توصیف شد تعیین گردید (۱۴). به طوری که واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ µL حاوی: 10 µL SYBR green Premix by Ex taq (Takara, Japan)، 0.4 µL SYBR Green Dye، 0.8 µL forward and 0.8 µL reverse primers (8pmol)، 6 µL H_2O و 2 µL cDNA انجام شد. سیکل

جدول ۱. توالی‌های پرایمر به کار رفته در Real-time PCR.

Gene	Primer	Sequence (5' -> 3')
TLR2	Forward Reverse	TCCGCCTCTCGGTGTCGGAA AAACGGTGGCACAGGACCCC
TLR4	Forward Reverse	TCAAGCCAGGATGAGGACTG CAGCAATGGCCACACCGGGA
IL-23	Forward Reverse	AGTGGAAGTGGGCAGAGATTC CAGCAGCAACAGCAGCATTAC
B-actin	Forward Reverse	GGCGGCACCACCATGTACCC GACGATGGAGGGGCCCGAC

www.SID.ir

Archive of SID

دمایی برای پرایمرها یکسان بود و شامل: واسرشت شدن اولیه در ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر در ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس دمای ۶۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه Step One Plus Real-Time (ABI, Step One Plus, USA) بود. مقدار سیکل آستانه (Cycle threshold, Ct) برای هر نمونه محاسبه و میانگین گرفته شد. مقدار میانگین سیکل آستانه (mean Ct) ژن‌های هدف در هر نمونه با استفاده از مقدار سیکل آستانه ژن β-actin جهت به دست آوردن مقدار ΔCt به حالت نرمال در آمد. سپس مقدار ΔCt به دست آمده با کنترل جهت محاسبه ΔΔCt نرمال شده و نهایتا میزان $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

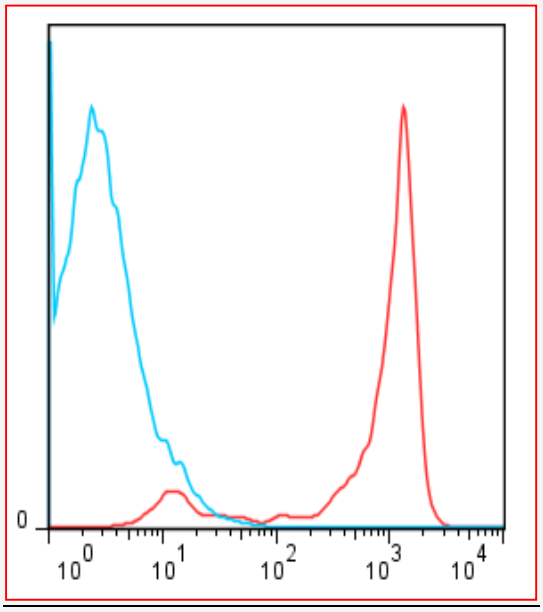
آنالیز آماری: اختلاف آماری بین گروه‌های مورد بررسی با استفاده از تست غیرپارامتریک Mann-Whitney U- test با نسخه ۵ نرم افزار Graph Pad (Prism, USA) آنالیز شدند. مقدار $2^{-\Delta\Delta Ct}$ توسط روش Livak جهت آنالیز سطوح بیان ژن‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. مقدار p-value <0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B و کنترل:

شکل (۱) گراف درصد بیان شاخص CD14 در منوسیت‌ها و کاهش قابل توجه درصد بیان این شاخص پس از تبدیل شدن منوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک بالغ را نشان می‌دهد. مقادیر Dot plot برای شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک در افراد تیمار و کنترل به عنوان نمونه آورده شده است (شکل‌های ۳ و ۲). درصد بیان شاخص‌های سلول‌های دندریتیک CD83، CD86، CD1a و HLA-DR در گروه تیمار با کنترل مقایسه گردید (نمودار ۱). همچنین میانگین شدت فلورسنس برای شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار و کنترل بررسی شد (نمودار ۲).

همان طور که در شکل‌های (۳ و ۲) آمده، درصد بیان شاخص‌های CD1a, CD86, CD83 و HLA-DR در سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار و کنترل با یکدیگر مشابه بوده و اختلاف



شکل ۱. گراف قرمز رنگ درصد بیان شاخص CD14 در سلول‌های منوسیت و گراف آبی رنگ درصد بیان این شاخص در سلول‌های دندریتیک بالغ را نشان می‌دهد. به طوری که درصد بیان این شاخص در سلول‌های دندریتیک بالغ کاهش قابل توجهی یافته است.

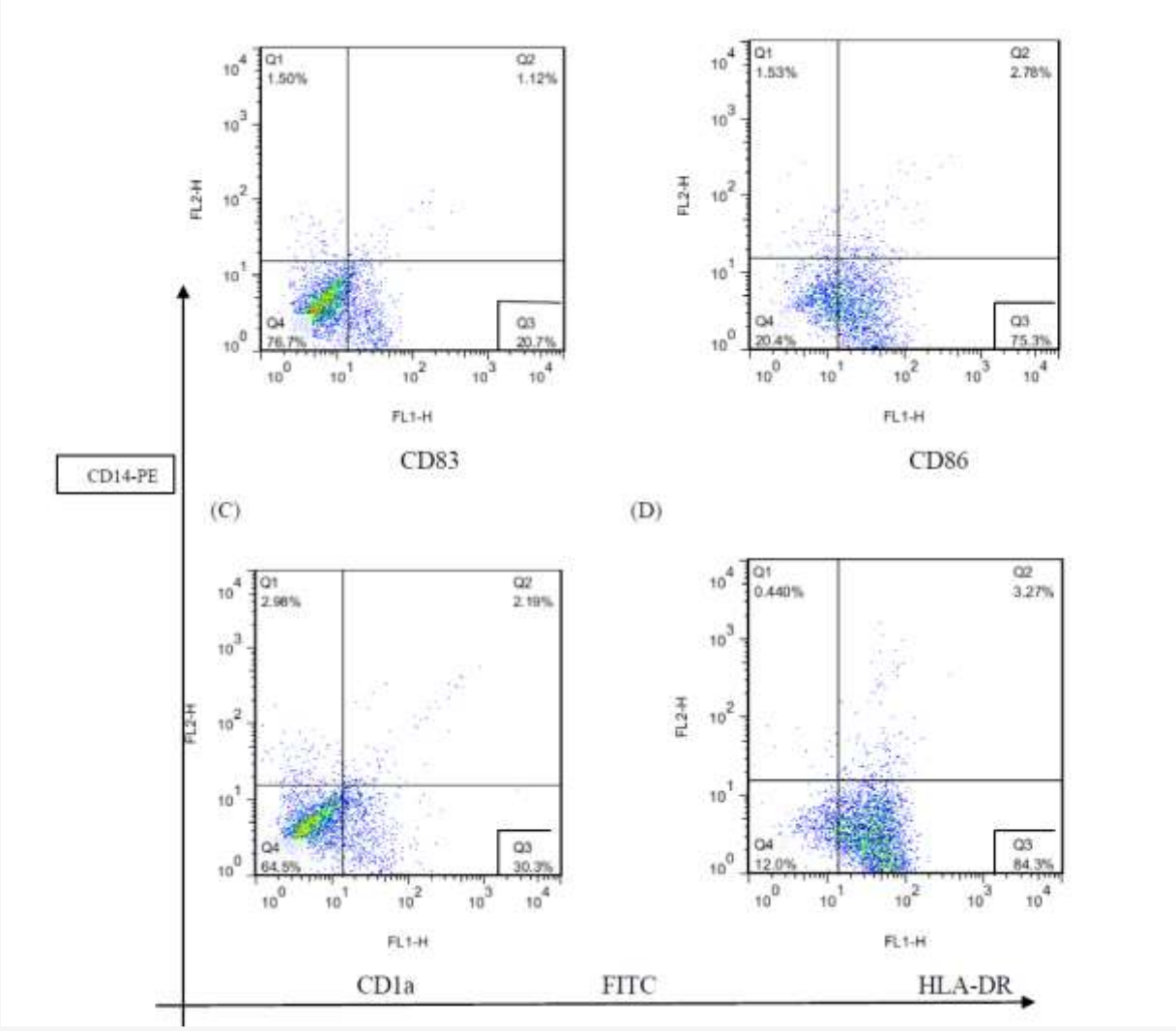
معنی داری بین آن‌ها دیده نشد ($p>0.05$) (نمودار ۱) (در دو گروه تیمار و کنترل درصد بیان شاخص‌های فوق به ترتیب حدود ۲۲٪، ۷۶٪، ۳۰٪ و ۸۵٪ به دست آمد).

همچنین اختلاف معنی داری در میانگین شدت فلورسنس شاخص‌های CD1a, CD86, CD83 و HLA-DR در سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار در مقایسه با کنترل وجود نداشت ($p>0.05$) (نمودار۲).

بیان ژن‌های سایتوکاین IL-23 و TLRها در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B و کنترل – میزان بیان ژن‌های IL-23 و TLR2 و TLR4 در سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار و داوطلبین سالم بررسی گردید (نمودار ۳). همان طور که در نمودار (۳A,B) نشان داده شده، سطوح بیان ژن‌های IL-23 و TLR2 در این گروه‌ها اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند در حالی که میزان ژن TLR4 در گروه تیمار ۲/۶ برابر بیشتر از این ژن در گروه کنترل بیان گردید ($p=0.007$) (نمودار ۳C).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. درصد بیان شاخص‌های سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس با روش فلوسیتومتری بررسی گردید. سطوح بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک عبارتند از: CD83 (23.9%)، CD86 (79.7%)، CD1a (32.8%) و HLA-DR (87.3%).

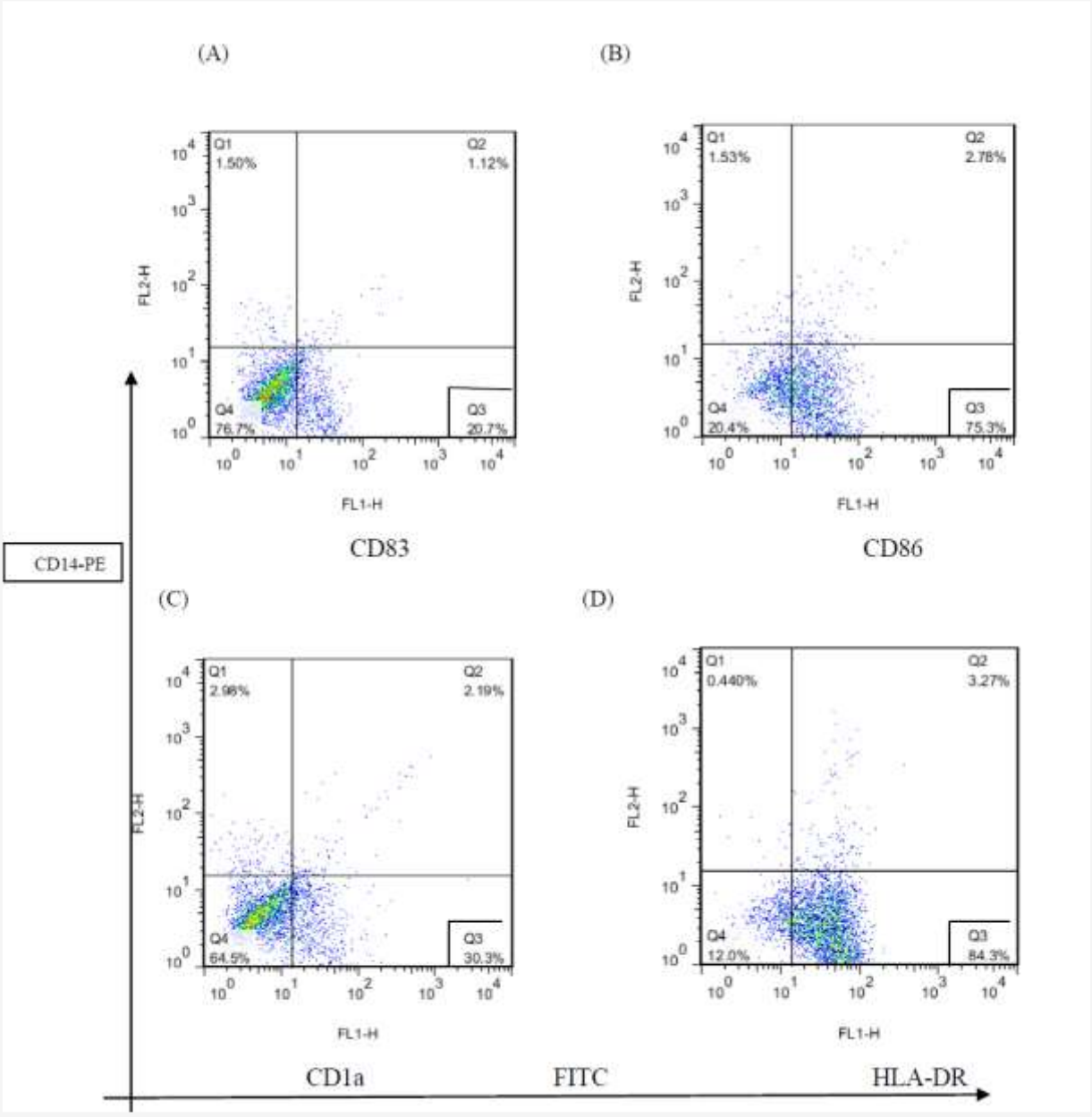
بحث و نتیجه‌گیری

سیتومگالوویروس به واسطه تحریک TLRها بر سلول‌های دندریتیک بسیاری از پاسخ‌های ایمنی ذاتی را القاء می‌نماید (۱۶). برهمکنش فرم‌های محلول گلیکوپروتئین‌های B و H سیتومگالوویروس با اجزاء سلول میزبان مانند TLRها، منجر به پیام دهی اولیه و فعالیت پاسخ ایمنی ذاتی قبل از همانندسازی ویروس می‌گردد (۱۷). با توجه به این که تا به حال اثرات گلیکوپروتئین سیتومگالوویروس بر نحوه بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک بررسی نشده است در این مطالعه اهمیت گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس بر بلوغ، عملکرد و میزان بیان TLRها در سلول‌های دندریتیک گروه تیمار با این گلیکوپروتئین ویروسی در مقایسه با گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

در یک تحقیق Moutaftsi و همکاران بیان کردند به دنبال عفونت سلول دندریتیک با ویریون سیتومگالوویروس در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

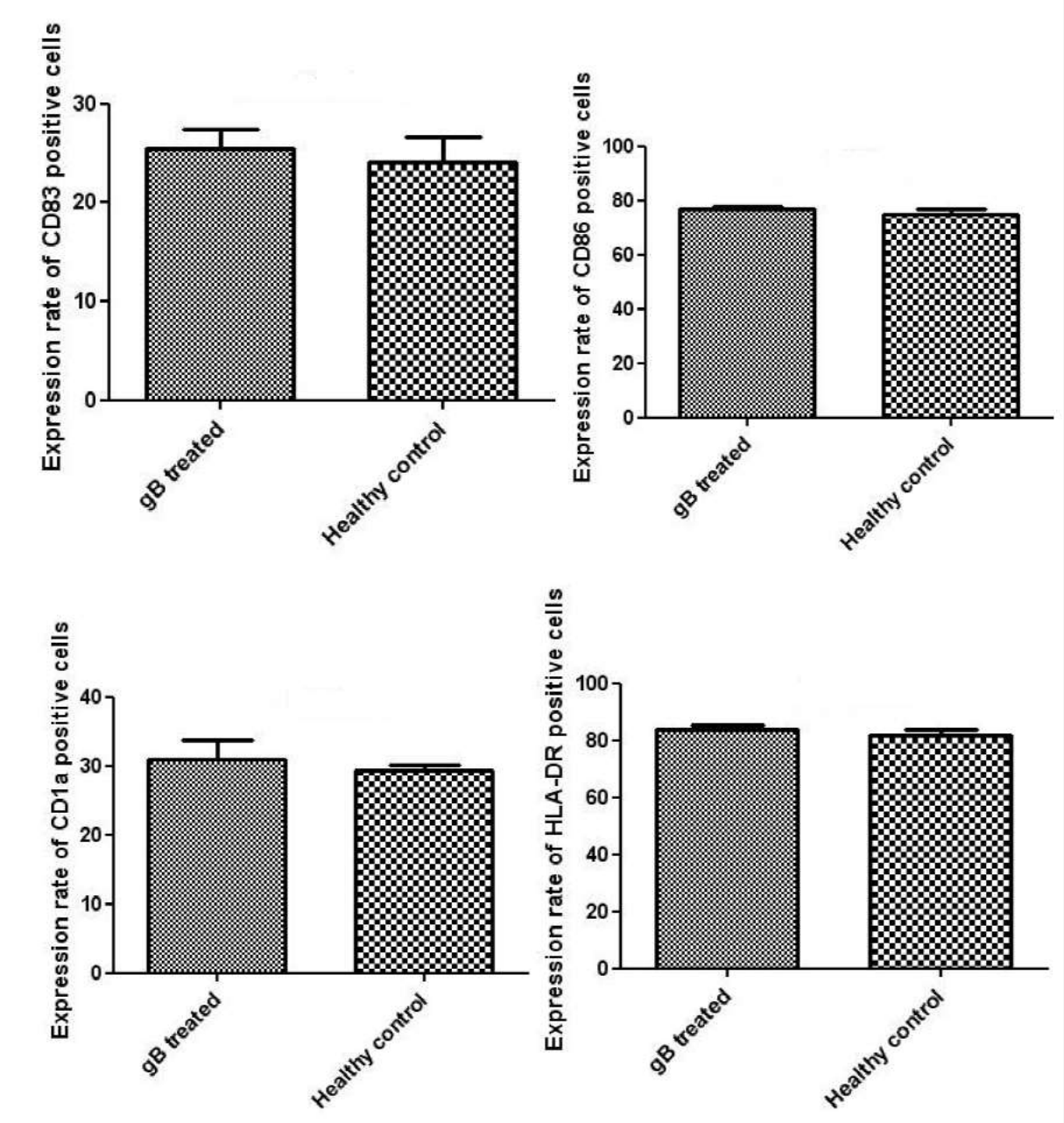


شکل ۳. درصد بیان شاخص‌های سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه کنترل با روش فلوسیتومتری بررسی گردید. سطوح بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک عبارتند از: CD83 (20.7%)، CD86 (75.3%)، CD1a (30.3%) و HLA-DR (84.3%).

آزمایشگاهی، از بلوغ این سلول‌ها ممانعت شده و عفونت ویروسی سبب تنظیم کم شاخص‌های بلوغ CD83 و CD86 بر سطح سلول‌های دندریتیک می‌گردد (۱۸). در آزمایش دیگری Gredmark و همکاران نشان دادند عفونت سلول دندریتیک با سیتومگالوویروس باعث بلوغ این سلول‌ها و تنظیم بالای شاخص‌های بلوغ می‌شود (۱۹). اما در یک مطالعه Boehme و همکاران نشان دادند در طی اتصال و ورود سیتومگالوویروس به درون سلول ملکول‌های گلیکوپروتئین B متعددی با سطح سلول در تماس بوده و بنابراین گلیکوپروتئین B محلول همانند گلیکوپروتئین B موجود در ویریون به سلول عرضه نمی‌گردد (۶).

www.SID.ir

Archive of SID



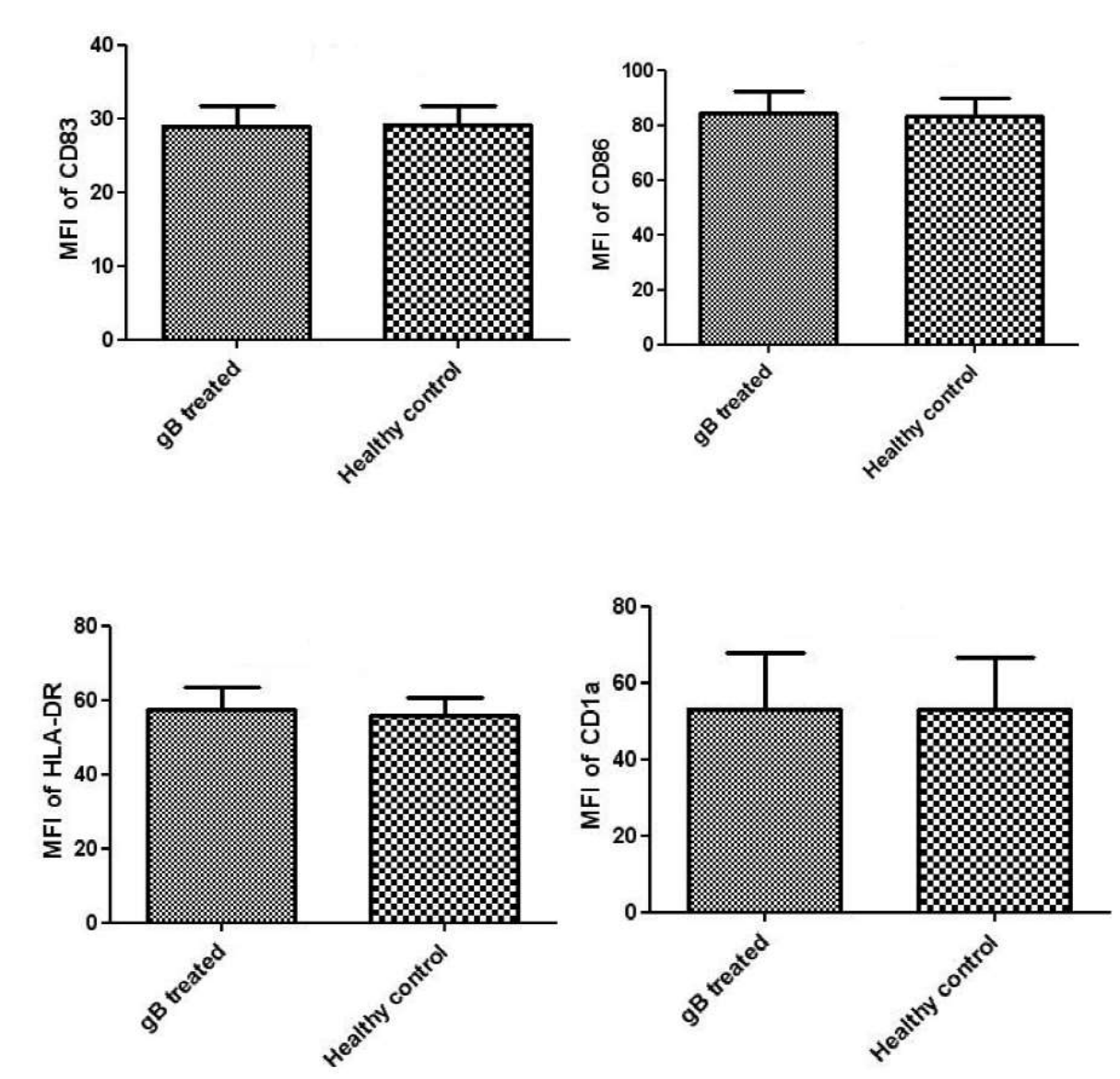
نمودار ۱. درصد بیان شاخص‌های سطحی CD83، CD86، CD1a و HLA-DR سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه‌های تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس و کنترل. اختلاف معنی داری در درصد بیان شاخص‌های سلول‌های دندریتیک بین گروه‌ها وجود نداشت. یافته‌ها بر اساس mean ± SE هستند.

به طور مشابهی در این تحقیق میزان بیان شاخص‌های CD83، CD86، CD1a و HLA-DR در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B محلول در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد.

همچنین Aggarwal و همکاران طی یک تحقیق عنوان کردند سایتوکاین IL-23 به دنبال عفونت سیتومگالوویروس در میزبان

www.SID.ir

Archive of SID

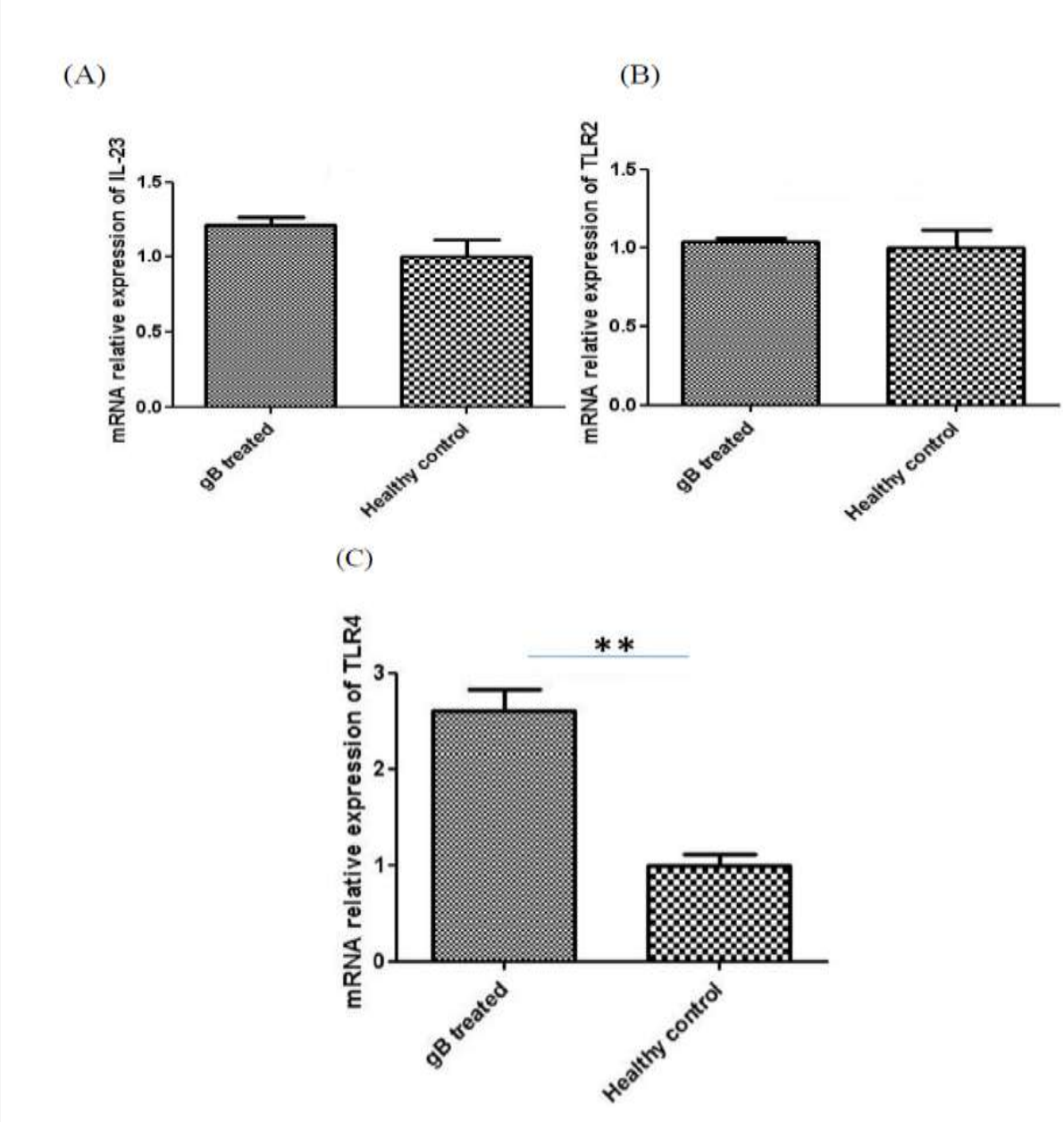


نمودار ۲. میانگین شدت فلورسنس (MFI) شاخص‌های سطحی CD83، CD86، CD1a و HLA-DR سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه‌های تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس و کنترل. تفاوت معنی داری در میانگین شدت فلورسنس شاخص‌های سلول‌های دندریتیک بین گروه‌ها مشاهده نگردید. یافته‌ها بر اساس mean ± SE هستند.

افزایش می‌یابد (۲۰). اما طی آزمایشی Compton و همکاران عنوان نمودند جهت فعالیت سلول دندریتیک میزان بالایی گلیکوپروتئین B موجود در ویریون سیتومگالوویروس مورد نیاز بوده و گلیکوپروتئین B محلول به تنهایی قادر به تحریک سایتوکاین‌های التهابی نمی‌باشد (۲۱). به طور مشابهی در این مطالعه سطوح سایتوکاین IL-23 مترشحه از سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B محلول در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳. میزان بیان ژن‌های IL-23، TLR2 و TLR4 در سلول‌های دندریتیک مشتق شده از منوسیت در گروه‌های تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس و کنترل با روش Real time PCR. سطوح بیان ژن‌های IL-23 و TLR2 در گروه‌ها اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (A,B) اما میزان بیان ژن TLR4 در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد (C). علامت ** تفاوت بسیار معنی دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد (**p<0.01). یافته‌ها بر اساس mean ± SE هستند

از طرف دیگر تحریک TLRها بر سلول‌های دندریتیک با فعالیت مسیرهای پیام دهی منجر به القاء ژن‌های ضدمیکروبی و سایتوکاین‌های التهابی می‌شود (۲۱). مسیرهای پیام دهی TLR برهمکنش بین حدواسط‌های اختصاصی درون سلولی را تحریک

www.SID.ir

Archive of SID

نموده که باعث آزادسازی فاکتور هسته‌ای NF-κB از مهارکننده آن و رونویسی از ژن‌های سایتوکاین‌های التهابی می‌گردد (۲۱). طی یک مطالعه Boehme و همکاران گزارش کردند TLR2 به عنوان یک گیرنده سطح سلول ترشح سایتوکاین پیش التهابی را در پاسخ به عفونت سیتومگالوویروس فعال می‌نماید (۶). در آزمایشاتی مجزا Compton، Brown و همکاران نشان دادند تحریک TLR2 توسط سیتومگالوویروس خصوصا به واسطه گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروسی از قبیل گلیکوپروتئین‌های H و B سبب فعالیت فاکتور هسته‌ای و ترشح سایتوکاین می‌گردد (۲۱، ۲۲).

گلیکوپروتئین‌های B و H مستقیما با TLR2 به عنوان یک حسگر عملکردی برای سیتومگالوویروس واکنش می‌دهند (۵). اما در این مطالعه اختلاف معنی داری در میزان بیان ژن TLR2 در گروه تیمار با گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد. همچنین Yew و همکاران طی یک بررسی عنوان نمودند سیتومگالوویروس قادر به فعالیت TLR4 و واسطه ترشح سایتوکاین در سلول‌های منوسیت انسانی است (۲۳). در یک آزمایش Dasari و همکاران نشان دادند گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس ادجوانت شده با TLR4 یا TLR9 می‌تواند جهت تهیه واکسن علیه ویروس به کار رود (۲۴). در طی ایجاد پاسخ ایمنی علیه سیتومگالوویروس متعاقب واکسیناسیون، TLR4 و TLR9 با القاء ایمنی ذاتی عرضه آنتی ژن به سلول‌های دندریتیک را تحریک می‌نمایند (۲۴). به طور مشابهی در این مطالعه نتایج نشان داد بیان ژن TLR4 در سلول‌های دندریتیک تیمار در مقایسه با کنترل افزایش قابل توجهی می‌یابد.

بنابراین از این مطالعه چنین نتیجه‌گیری می‌شود که گلیکوپروتئین B سیتومگالوویروس سبب افزایش بیان ژن TLR4 در سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار با این گلیکوپروتئین ویروسی شده و این مطلب بیانگر آن است که تنها تماس سلولی، نه لزوما ورود ویروس، جهت روشن ساختن پاسخ سلولی ضد ویروسی و فعالیت TLR می‌تواند مؤثر باشد. بنابراین مطالعات بیشتر در مورد شاخص‌های سلولی موثر فوق در ساخت راه‌کارهای درمانی و پیشگیری جدید بر علیه سیتومگالوویروس می‌تواند نقش اساسی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز و صندوق حمایت از پژوهشگران به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Mocarski ES, Shenk T, Pass R. “Cytomegaloviruses,” in Fields Virology .5th edition. Philadelphia Pa USA: KnipeD and Howley P Eds. Lippincott Williams and Wilkins. 2007. P. 2701–72.
2. Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. ProcNatlAcadSci USA.2004;101(43):15470–5.
3. Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. Integrin _v_3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. Nat Med. 2005;11(5): 515–21
4. Spindler N , Diestel U , Stump JD, Wiegers AK, Winkler TH, Sticht H, et al. Structural basis for the recognition of human cytomegalovirus glycoprotein B by a neutralizing human antibody. PLoSPathog.2014;10(10):1-15.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. J Immunol. 2006;177(10): 7094–102.
6. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by Toll-like receptors. J Virol. 2004;78(15): 7867–73.
7. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu RevImmunol. 2003;21(1): 335–76.
8. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat RevImmunol. 2004;4(7): 499–511.
9. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. Trends Immunol.2003; 24(10): 534–9.
10. Boehme KW, Singh J, Perry ST, Compton T. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. J Virol. 2004;78(3): 1202–11.
11. Simmen KA, Singh J, Luukkonen BG, Lopper M, Bittner A, Miller NE,et al. Global modulation of cellulartranscription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B.ProcNatlAcadSci USA. 2001; 98(13): 7140–5.
12. Sénéchal B, BoruchovAM, Reagan JL, Hart DN, Young JW. Infection of maturemonocyte derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. Blood.2004;103(11):4207-15.
13. Gredmark S, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits differentiation ofmonocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. J Virol. 2003; 77(20):10943–56.
14. Shariat A, Karimi MH, Mokhtariazad T, Moazzeni SM, Geramizadeh B, Malekhosseini SA, et al. Maturation state and function of monocyte derived dendritic cells in liver transplant recipients. Iran J Immunol. 2014;11(3):153-65.
15. Afshari A, Yaghobi R, Karimi MH, Darbooie M, Azarpira N. Interleukin-17 Gene Expression and Serum Levels in Acute Rejected and non-Rejected Liver Transplant Patients. . Iran J Immunol. 2014; 11(1):29-39.
16. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. "Virus entry and innate immune activation,".Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 325(1): 85–100.
17. Rossini G, Cerboni C, Santoni A, Landini MP, Landolfo S, Gatti D, et al. Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. MediatorsInflamm. 2012; 2012(1):1-16.
18. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2002; 99(8):2913-2921
19. Gredmark-Russ S, Söderberg-Nauclér C. Dendritic cell biology in human cytomegalovirus infection and the clinical consequences for host immunity and pathology. Virulence. 2012; 3(7):1–14.
20. Aggarwal S, Ghilard N, Xie M, Sauvage F, Gurney A. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of Interleukin-17. J Biol Chem. 2003; 278(3):1910–1914.
21. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and toll-like receptor 2. J Virol. 2003; 77(8):4588–96.
22. Brown RA, Gralewski JH, Razonable RR. The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. J Clin Infect Dis. 2009; 49(9):96-9.
23. Yew K, Carpenter C, Duncan RS, Harrison CJ. Human cytomegalovirus induces TLR4signaling components in monocytes altering TIRAP, TRAM and downstream interferon beta and TNF-alpha expression. PLoS One. 2012; 7(9):1-17.
24. Dasari V, Smith C, Schuessler A, Zhong J, Khanna R. Induction of innate immune signatures following polyepitope protein-glycoprotein B-TLR4&9 agonist immunization generates multifunctional CMV-specific cellular and humoral immunity.Hum VaccinImmunother. 2014;10(4):1064-77.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Evaluating the Effects of Cytomegalovirus Glycoprotein B on the Maturation and Function of Monocyte-derived dendritic cells

Shariat A[1], Yaghobi R[2*], Mokhtariazad T[3], Karimi MH[2], Moazzeni SM[4]

1- Department of Biology, College of Basic Sciences, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Shiraz Transplant Research Center, Mohammad rasoulallah Research Tower, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3- Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Received: 13 Jun 2015 Accepted: 17 Oct 2015

Abstract

Background & Objectives: Interaction of cytomegalovirus glycoprotein B with toll-like receptors of dendritic cells leads to early signaling and innate immune responses. The aim of this study is to evaluate the effects of cytomegalovirus glycoprotein B on the maturation and function of monocyte-derived dendritic cells in treated groups in comparison with control groups.

Materials & Methods: Blood samples were taken from 5 healthy volunteers. *Following the* generation of monocyte-derived dendritic cells on the fifth day of cell culture, half of the immature dendritic cells were treated with cytomegalovirus glycoprotein B, and the rest of them were induced to mature dendritic untreated cells and were used as the control group. The maturation and function of dendritic cells were evaluated in these two groups.

Results: The gene expression level of toll-like receptor-4 significantly increased in the group treated with glycoprotein B ($p < 0.05$), whereas there were no significant differences in the expression rates of CD83, CD86, CD1a, and HLA-DR and the secretion of IL-23 from monocyte-derived dendritic cells between the treated groups and the controls.

Conclusion: The increase in the gene expression of toll-like receptor-4 in monocyte-derived dendritic cells treated with cytomegalovirus glycoprotein B showed that cell contact is required to elicit cellular antiviral response and toll-like receptor activation. Thus, it is critical to recognize the viral and cellular determinants of the immune system in order to develop new therapeutic strategies against cytomegalovirus.

Keywords: **Cytomegalovirus glycoprotein B, Maturation markers of dendritic cells, Toll-like receptors, Interleukin 23.**

Corresponding author: RaminYaghobi, Shiraz Transplant Research Center, Mohammad rasoulallah Research Tower, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
E-mail: rayaviro@yahoo.com

www.SID.ir