

## افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک توسط اجزای پروتئینی در مقایسه با عصاره تام لیستریامونوسایتوژنز در ایمونوتراپی مدل تجربی تومور

نویسندگان: سمانه عرب<sup>۱</sup>، معصومه معتمدی<sup>۲</sup>، معصومه خمیس‌آبادی<sup>۱</sup>، زهرا غفلی<sup>۳</sup>، طاهره ابوفاضلی<sup>۳</sup>، رضا میرزائی<sup>۴</sup>، دکتر جمشید حاجتی<sup>۵\*</sup>

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران

۳- کارشناس، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۵- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

E-mail: [hajatij@sina.tums.ac.ir](mailto:hajatij@sina.tums.ac.ir)

\* نویسنده مسئول: دکتر جمشید حاجتی

### چکیده

**مقدمه و هدف:** استفاده از سلول‌های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن‌های توموری در جایگاه یک اقدام درمانی برای مقابله با تومورها پیشنهاد شده است. به منظور افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک از عواملی گوناگون، نظیر لیگاند مولکول‌های TLR و فراورده‌های باکتریایی استفاده می‌شود. در این مطالعه از عصاره تام و اجزای پروتئینی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز برای القای بلوغ سلول‌های دندریتیک استفاده شده است.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های مغز استخوان موش Balb/c به مدت ۵ روز در حضور IL-4 و GM-CSF کشت داده شدند. در روز پنجم به سلول‌های دندریتیک نابالغ، لیزات توموری و سپس اجزای پروتئینی یا عصاره تام باکتری لیستریا مونوسایتوژنز اضافه شد. به منظور بررسی میزان بلوغ، بیان مولکول‌های CD80، CD86 و MHC-II، روی سلول‌ها در روز هفتم بررسی شد؛ پس از القای تومور در موش‌ها با استفاده از رده سلولی WEHI-164،<sup>۱۰</sup> سلول دندریتیک بالغ به صورت زیر جلدی به آنها تزریق شد. رشد تومور، میزان بقا و قدرت کشندگی سلول‌های طحالی در گروه‌های مورد مطالعه بررسی گردید.

**نتایج:** در موش‌های واکنش‌دهنده با سلول‌های دندریتیک که با اجزای پروتئینی بالغ شده بودند، تأخیر در رشد تومور و بقای بیشتر مشاهده شد؛ همچنین در این موش‌ها فعالیت کشندگی سلول‌های طحالی در مقایسه با مابقی گروه‌ها بالاتر بود. در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام و اجزای پروتئینی نسبت به گروه کنترل، افزایش فعالیت سیتوتوکسیسیته و تأخیر در رشد تومور مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** اجزای پروتئینی باکتری لیستریا در مقایسه با عصاره تام، توانایی بالاتری برای افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی مدل موشی تومور دارند.

**واژگان کلیدی:** ایمونوتراپی، سلول دندریتیک، تومور، لیستریا مونوسیتوژنز

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال هیجدهم - شماره ۹۲  
اردیبهشت ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۹  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۸۹/۱۲/۲۵  
پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۷

## مقدمه

سلول‌های دندریتیک (DC۱)، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC۲) هستند که فعال‌شدن سلول‌های T را برای آغاز پاسخ ایمنی تنظیم می‌کنند (۱). این سلول‌ها مولکول‌های MHC، کمک‌تحریکی و مولکول‌های چسبان را بیان می‌کنند (۱). سلول‌های دندریتیک به عنوان آغازگر و تنظیم‌کننده قوی پاسخ ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضدآنتی‌ژن‌های توموری فعالیت می‌کنند (۲). با توجه به نقش مهم سلول‌های دندریتیک در راه‌اندازی پاسخ ضدتوموری، از طریق برداشت، پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌های توموری به لنفوسیت‌های T، ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است (۲). سلول‌های دندریتیک قادرند پاسخ لنفوسیت‌های T را به سمت سلول‌های Th1 یا Th2 هدایت کنند (۱، ۳). سلول‌های Th1 با تولید IFN- $\gamma$  در بروز پاسخ ضدتوموری نقشی مهم دارند؛ درحالی‌که سلول‌های Th2 با تولید IL-10 و IL-4 در مهار فعالیت سیتولیتیک (که در دفاع ضد-توموری بسیار حائز اهمیت است) مؤثرند. در مطالعات گوناگون نشان داده شده‌است که موفقیت در ایمونوتراپی سرطان به ایجاد پاسخ Th1 نیازمند است (۴).

با افزودن ترکیب‌های مختلف به محیط کشت DC از جمله IL-1، TNF- $\alpha$ ، IL-6 و لیگاند‌های TLR<sup>۳</sup> مانند LPS، CPG و Poly(I:C) می‌توان نوعی مناسب از سلول‌های دندریتیک را برای ایجاد پاسخ Th1 و در نتیجه، نوع مناسب پاسخ ایمنی به منظور از بین بردن تومور در میزبان ایجاد کرد (۵، ۶). به احتمال فراورده‌های میکروبی از طریق اتصال به رسپتورهای شناساگر الگو (PRR<sup>۴</sup>) همچون TLR افزایش بیان سطحی مولکول‌های MHC و کمک‌محرک بر سلول‌های دندریتیک باعث می‌شوند (۷). لیستریا مونوسایتوژنز باکتری گرم مثبت داخل سلولی اختیاری است و مانند سایر باکتری‌های داخل سلولی

توانایی دارد که باقی‌مانده، تکثیر شود (۹). سلول‌های دندریتیک از طریق مولکول‌های PRR اجزای مختلف این میکروب را شناسایی کرده، پس از دریافت پیام‌های تحریکی بالغ می‌شوند؛ این سلول‌ها سایتوکاین‌هایی مانند IL-1 و IL-12 را تولید می‌کنند (۱۰)؛ همچنین سلول‌های دندریتیک آنتی‌ژن‌های لیستریا را به هر دو مسیر پردازش آنتی‌ژنی وارد می‌کنند و در نتیجه موجب القای هم‌زمان سلول‌های TCD4+ و TCD8+ را موجب می‌شوند (۱۱).

لیستریا مونوسایتوژنز باکتری گرم مثبت داخل سلولی اختیاری است و مانند سایر باکتری‌های داخل سلولی توانایی بقا و تکثیر در داخل سلول‌ها را دارد [۹]. سلول‌های دندریتیک از طریق مولکول‌های PRR اجزاء مختلف این میکروب را شناسایی کرده و پس از دریافت پیام‌های تحریکی بالغ می‌شوند. این سلول‌ها سایتوکاین‌هایی مانند IL-1 و IL-12 را تولید می‌کنند [۱۰]. همچنین سلول‌های دندریتیک آنتی‌ژن‌های لیستریا را وارد هر دو مسیر پردازش آنتی‌ژنی می‌کنند و در نتیجه موجب القاء هم‌زمان سلول‌های TCD4+ و TCD8+ می‌شوند [۱۱]. (تکراری)

از آنجاکه در مطالعه پیشینی که همین گروه انجام دادند (۱۲)، مشخص شد که عصاره تام باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از توانایی بالایی در القای پاسخ ضد-توموری سلول‌های دندریتیک در مدل موشی فیبروسارکوما بهره‌مند است؛ لذا هدف از انجام این مطالعه، مقایسه اجزای پروتئینی موجود در قسمت‌های گوناگون جسم باکتری و عصاره تام باکتری لیستریا در افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در مقابله با تومور است.

## مواد و روش کار

### حیوانات ورده سلولی

موش‌های Balb/c ماده ۶-۸ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط مناسب نگهداری شدند. سلول‌های WEHI-164 (فیبروسارکوما موش Balb/c) و

1- Dendritic cell  
2- Antigen Processing Cell  
3- Toll-like receptor  
4- pattern recognition receptor

جداسازی اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوزنز  
جداسازی اجزای پروتئینی محلول لیژشده باکتری با  
استفاده از کیت استخراج پروتئین ( Qproteome Bacterial Protein Prep Kit, QIAGEN) و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. غلظت پروتئین در محلول حاصل با روش برادفورد محاسبه و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اثبات عدم آلودگی این محلول با DNA از روش الکتروفورز DNA، روی ژل گاروز یک درصد حاوی اتدیوم بروماید استفاده شد.

#### تولید سلول‌های دندریتیک

برای تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای مغز استخوان موش استفاده شد (۱۳). به‌طور خلاصه، پس از کشتن موش Balb/c استخوان ساق و ران جدا و با استفاده از محیط ناقص (RPMI1640 بدون سرم) محتویات داخل استخوان‌ها خارج شد و برای ازبین‌بردن گلبول‌های قرمز از آب مقطر و بافر فسفات ۱۰ x استفاده شد؛ این سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI1640 حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماکسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله (Gibco, USA) و در حضور ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر IL-4 و ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر GM-CSF (Bender Medsystem) کشت داده شدند. روز سوم، سلول‌های غیرچسبان جدا شده، پس از افزودن محیط کشت تازه، در پلیت‌های شش‌خانه‌ای کشت داده شدند. در روز پنجم، 100 میکروگرم لیفات تومور به‌ازای هر ۱۰<sup>۶</sup> سلول اضافه شد؛ پس از ۶ تا ۷ ساعت برای بالغ‌کردن سلول‌های دندریتیک، ۷۰ میکروگرم عصاره تام لیستریا یا ۷۰ میکروگرم اجزای پروتئینی لیستریا به‌ازای ۱۰<sup>۶</sup> سلول اضافه و در نهایت، سلول‌های دندریتیک غیرچسبان جدا و برای ایمونوتراپی استفاده شدند.

#### ارزیابی وضعیت بلوغ سلول‌های دندریتیک

فوتوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم و هفتم توسط فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی‌های

CT-26 (کارسینوما کولون موش Balb/c) در محیط کشت (RPMI1640 (Sigma,Steinheim,Germany) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماکسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال شده جنین گوساله (Gibco,Grand Island, USA) کشت داده شد.

#### تهیه لیفات توموری

۲۱ روز پس از تزریق زیرجلدی سلول‌های توموری به موش‌های Balb/c، تومورهای ایجاد شده خارج و به صورت مکانیکی خرد و له شدند؛ سپس سوسپانسیون توموری پنج تا هفت بار منجمد (در ازت مایع) و ذوب (در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد) شدند. سوپ رویی حاصل از سانتریفیوژ (10 min, 900g) جدا و از فیلتر ۰٫۲ میکرومتری گذرانده شد (۸). غلظت پروتئین در محلول به‌دست‌آمده با روش برادفورد تعیین و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### تهیه عصاره تام لیستریا مونوسیتوزنز

باکتری لیستریا مونوسایتوزنز (ATCC 1060) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. بعد از کشت در محیط BHI<sup>۱</sup> نوع باکتری با بررسی مورفولوژی کلونی، مورفولوژی میکروب، انجام آزمایش حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه و آزمایش کمپ با استافیلوکوک اورئوس تأیید شد. برای تهیه لیفات از سونیکاتور استفاده گردید (پنج بار به مدت ۲ دقیقه با قدرت ۵)؛ پس از عبور محلول حاصل از فیلتر ۰٫۲ میکرومتری، غلظت پروتئین محلول با روش برادفورد محاسبه شد. محلول به‌دست‌آمده تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲).

مورد استفاده قرار گرفتند. درصد لیز سلول‌های توموری با استفاده از کیت بررسی تولید آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) (Roche Applied Science) و طبق پروتکل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد (۸).

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی تفاوت میانگین مقادیر به دست آمده میان گروه‌ها از آزمون‌های آماری Student's t test و One-Way ANOVA استفاده شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 11.5 انجام و  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### نتایج

##### تأثیر اجزای پروتئینی لیستریا بر بلوغ سلول‌های دندریتیک

فئوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم و هفتم با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه ضد مولکول‌های CD11c، CD40، CD80، CD86 و MHCII تعیین شد. شکل شماره ۱ فئوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم را در مقایسه با ایزوتایپ کنترل نشان می‌دهد؛ همان‌طور که در شکل مشخص است، حدود ۷۰ درصد سلول‌ها مارکر CD11c را بیان می‌کنند. در روز هفتم پس از برخورد سلول‌های دندریتیک با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا، مطابق شکل ۱، بروز این مولکول‌ها در سطح سلول‌های دندریتیک در هر دو گروه افزایش می‌یابد. جدول شماره ۱، میزان بروز مارکرهای سطحی را در سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ نشان می‌دهد. اگرچه از نظر آماری میان گروه عصاره تام و اجزای پروتئینی تفاوتی قابل ملاحظه دیده نمی‌شود، ولی گروه اجزای پروتئینی، مارکرهای بلوغ را در سطح بالاتری عرضه کرده‌اند.

مونوکلونال کنژوگه با FITC ضد مولکول‌های MHCII، CD80، CD86 و CD40 (BD PharMingen, San Diego, CA) و آنتی‌بادی مونوکلونال کنژوگه با PE ضد CD11c (CA) (BD PharMingen, San Diego, CA) تعیین شد. در همه آزمایش‌ها از یک آنتی‌بادی مونوکلونال با ایزوتیپ یکسان در جایگاه ایزوتیپ کنترل استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار WINMDI مورد بررسی قرار گرفت.

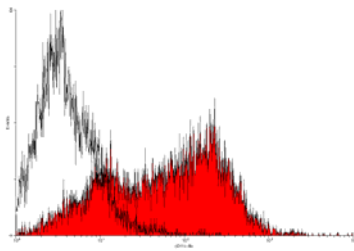
##### ایجاد تومور و ایمونوتراپی

$10^6 \times 1,5$  سلول WEHI-164 در حجم ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت ناقص به صورت زیرجلدی به پهلوی راست ۱۵ موش Balb/c تزریق شد. در روز هفتم پس از تزریق سلول‌های توموری، تعداد  $10^6$  سلول دندریتیک بالغ شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوژنز در اطراف تومور تزریق شد؛ به گروه کنترل نیز ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات تزریق شد. سرعت رشد تومور از طریق اندازه‌گیری قطر تومور و میزان بقاء بر اساس درصد حیوانات در هر گروه درمانی که در زمان معین به نقطه پایان آزمایش نرسیده باشند، مشخص شد. نقطه پایان آزمایش هنگامی که قطر تومور به ۴۰۰ میلی-متر مربع می‌رسید در نظر گرفته شد. قطر تومور بر حسب میلی‌متر مربع (طول × عرض) یک‌روز در میان با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد.

##### بررسی قدرت کشندگی سلول‌های طحالی

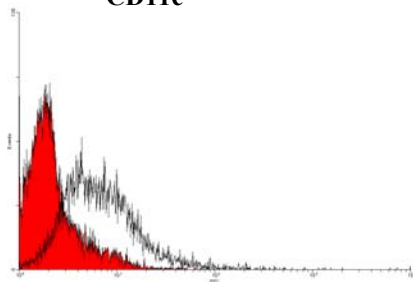
در روز بیست و یکم، پس از ایجاد تومور، سلول‌های طحالی موش‌های درمان شده (از هر گروه ۳ موش) و موش‌های کنترل به عنوان سلول‌های عملکردی (effector) جدا شدند؛ سلول‌های توموری (WEHI-164 و CT-26) نیز در جایگاه سلول‌های هدف (Target)

(الف)

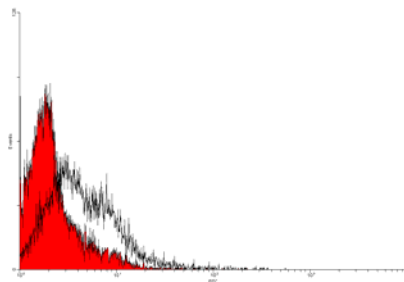


CD11c

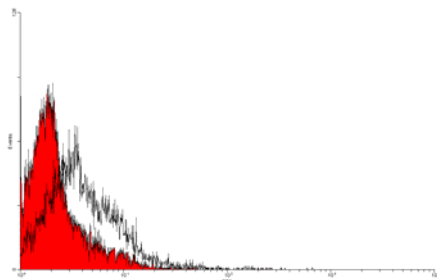
(ب)



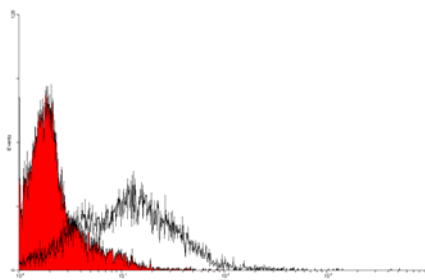
MHC-II



CD86

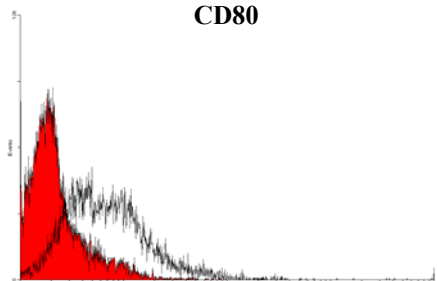


CD80

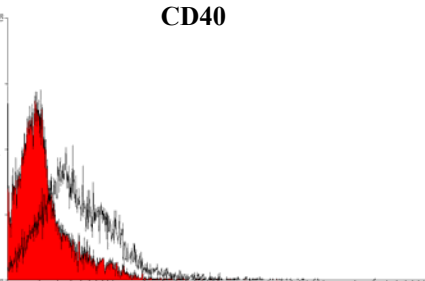


CD40

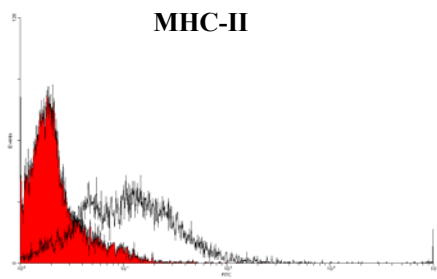
(ج)



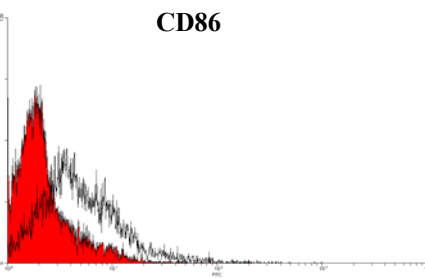
MHC-II



CD86



CD80



CD40

شکل ۱. الف. بروز مارکر CD11c در سطح سلولهای دندریتیک نابالغ (توخالی) در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (توپر). ب. بروز مارکر های بلوغ در سطح سلول های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام لیستریا (توخالی) در مقایسه با سلولهای دندریتیک نابالغ (توپر). ج. بروز مارکر های بلوغ در سطح سلول های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتئینی لیستریا (توخالی) در مقایسه با سلولهای دندریتیک نابالغ (توپر).

جدول ۱. درصد سلول‌های دندریتیک بروزدهنده مارک‌های بلوغ در پی مواجهه شدن با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا در مقایسه با سلول‌های دندریتیک نابالغ

II MHC		CD86		CD80		CD40		سلول دندریتیک
%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	
۲۴	۴,۴	۱۵,۴	۳,۱	۲۳,۵	۶,۴	۱۵,۴	۲,۴	نابالغ
۵۰,۹	۳,۸	۳۵	۲,۹	۶۹,۴	۵	۳۰,۷	۳,۷	بالغ شده با عصاره تام لیستریا
۵۲,۵	۴	۳۶,۶	۳	۶۸,۷	۱۳,۳	۳۶	۳,۴	بالغ شده با اجزاء پروتئینی لیستریا

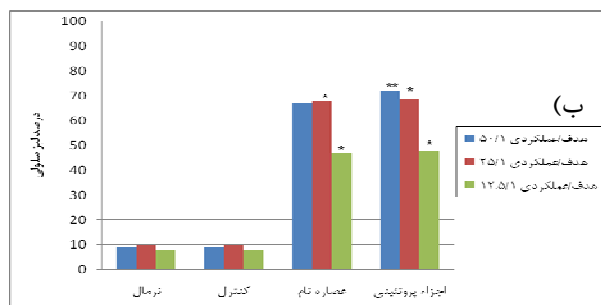
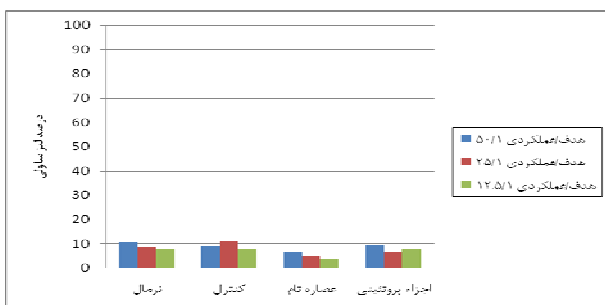
شکل شماره ۲، دو هفته پس از تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا به موش‌های توموری شده با سلول‌های WEHI-164، سلول‌های طحالی جدا با سلول‌های توموری WEHI-164 یا CT-26 در سه نسبت سلول‌های هدف به عملکردی کشت داده شدند. درصد لیز سلول‌های توموری با کیت LDH سنجیده شد. گروه کنترل، PBS دریافت کردند: الف) درصد لیز سلولی ضد رده سلولی WEHI-164. ب) درصد لیز سلولی ضد رده سلولی CT-26. هر گروه شامل ۳ رأس موش بوده، \*Pv کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با گروه‌های کنترل و نرمال. \*\*Pv کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با گروه‌های عصاره تام، کنترل و نرمال بوده- است.

#### الف) القای پاسخ سیتوتوکسیک توسط سلول‌های دندریتیک بالغ- شده با اجزای پروتئینی

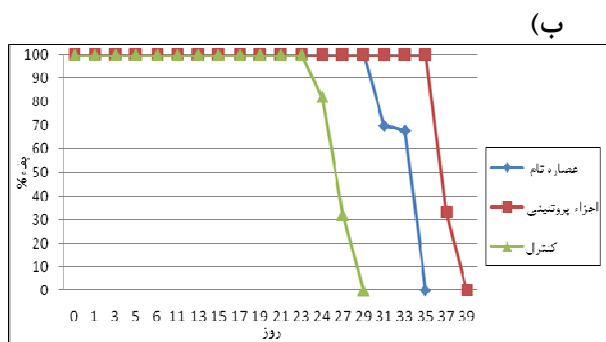
به منظور ارزیابی القای ایمنی اختصاصی ضد تومور، فعالیت کشنده سلول‌های طحالی موش‌های درمان شده بررسی شد. سلول‌های طحالی با سلول‌های توموری WEHI-164 در نسبت‌های ۱:۱۲/۵، ۱:۲۵ و ۱:۵۰ به مدت ۶ ساعت کشت داده شدند و قدرت کشندگی سلول‌ها با استفاده از کیت LDH بررسی شد؛ همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده، درصد لیز سلولی در دو نسبت ۱:۱۲/۵ و ۱:۲۵ در گروه‌های عصاره تام و اجزای پروتئینی لیستریا از بقیه گروه‌ها بالاتر است و این تفاوت از بعد آماری، معنی دار است ( $P < 0.05$ ). در نسبت ۱/۵۰ اختلافی معنی دار در درصد لیز سلولی میان گروه اجزای پروتئینی با مابقی گروه‌ها مشاهده شد؛ همچنین در همه گروه‌ها، درصد لیز سلولی برای سلول‌های توموری نا مرتبط CT-26 کمتر از ۱۵ درصد به دست آمد.

(ب)

(الف)



شکل شماره ۲، بیانگر این تفاوت در سرعت رشد است. پس از محاسبه درصد بقای موش‌های درمان شده، مشخص شد که بقای موش‌ها در گروه اجزای پروتئینی نسبت به گروه‌های دیگر بالاتر است. میزان بقا در روز ۳۶ در گروه اجزای پروتئینی ۱۰۰ درصد و در سایر گروه‌ها ۰ درصد محاسبه شد. شکل شماره ۲ نتایج حاصل را نشان می‌دهد.



شکل ۳. سرعت رشد تومور و میزان بقاء در گروه‌های مختلف. سلول‌های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام و یا اجزاء پروتئینی لیستریا به موش‌های توموری تزریق گردید. الف. قطر تومور یک روز در میان توسط کولیس اندازه‌گیری و سرعت رشد بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه گردید. ب. زمانی که قطر تومور به بیش از ۴۰۰ میلی‌متر مربع رسید، به عنوان نقطه پایان (End point) در نظر گرفته شد. میزان بقاء به صورت درصد حیواناتی که به نقطه پایان نرسیده بودند در مقاطع زمانی مختلف محاسبه شد. گروه کنترل، PBS دریافت کردند. هر گروه شامل ۳ راس موش می‌باشد.  $Pv^*$  کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با سایر گروه‌ها.

### بحث

نقش سلول‌های دندریتیک در ایجاد و جهت‌دهی پاسخ ایمنی در مقام مهم‌ترین سلول عرضه‌کننده آنتی‌ژن اثبات شده است (۱۴). کشف مکانیسم‌های مؤثر در کارآمدتر کردن این سلول‌ها تحولات فراوانی در زمینه ایمونوترابی سرطان موجب شده است (۱۵)؛ از جمله روش‌هایی که برای افزایش کارایی این سلول‌ها استفاده شده است استفاده از ترکیب‌های گوناگون برای تحریک بلوغ، عرضه موثرتر آنتی‌ژن‌های توموری و تحریک مناسب‌تر سلول‌های سیتوتوکسیک ذکر کردنی است (۱۶). در مطالعه حاضر از عصاره تام و اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوژنز برای افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در ایمونوترابی مدل موشی تومور استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که اجزای پروتئینی لیستریا در مقایسه با عصاره تام توانایی بالاتری در القای پاسخ سیتوتوکسیک و کاهش سرعت رشد تومور دارند. با توجه به اینکه لیستریا القای پاسخ به سمت Th1 را موجب می‌شود در برخی مطالعات به‌نهایی به عنوان حامل آنتی‌ژن‌های توموری و عامل تقویت‌کننده آثار واکسن به‌کاررفته است (۱۸، ۱۹). در مطالعه فردمن نشان داده شد که لیستریا مونوسایتوژنز که آنتی‌ژن gag از ویروس ایدز را بارز می‌کند، به ایجاد پاسخ CTL قوی

کاهش سرعت رشد تومور در پی تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با اجزای پروتئینی لیستریا سرعت رشد تومور با اندازه‌گیری قطر تومور در هر ۴۸ ساعت محاسبه شد؛ نتایج به دست آمده نشان داد که تفاوتی معنی‌دار میان رشد تومور در گروه اجزای پروتئینی با سایر گروه‌ها وجود دارد. ( $P < 0.05$ ).

شکل شماره ۳، سرعت رشد تومور و میزان بقاء در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد: سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا را که به موش‌های توموری تزریق شده، الف) قطر تومور یک-روز در میان، با کولیس اندازه‌گیری و سرعت رشد بر-حسب میلی‌متر مربع محاسبه شد؛ ب) زمانی که قطر تومور به بیش از ۴۰۰ میلی‌متر مربع رسید، نقطه پایان (End point) در نظر گرفته شد. میزان بقاء به صورت درصد حیواناتی که به نقطه پایان نرسیده بودند در مقاطع زمانی مختلف محاسبه شد. گروه کنترل، PBS دریافت کردند. هر گروه شامل ۳ راس موش بوده،  $Pv^*$  کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با سایر گروه‌ها بوده است.

پروتئینی لیستریا نیز در این مطالعه مشاهده شد؛ این کاهش در سرعت رشد تومور را می‌توان به افزایش بیان مولکول‌های کمک‌تحریکی و افزایش تولید IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده نسبت داد.

در مطالعه حاضر با مقایسه اجزای پروتئینی با عصاره تام لیستریا مشخص شد که اجزای پروتئینی توانایی بالاتری در القاء بروز مولکول‌های کمک‌تحریکی بر روی سلول‌های دندریتیک و در نتیجه کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقا دارند؛ از آنجاکه عصاره تام مخلوطی از اجزای پروتئینی و غیرپروتئینی مانند اسیدهای نوکلئیک است لذا به احتمال، اجزای غیرپروتئینی نظیر اسیدهای نوکلئیک با القای پاسخ‌های تنظیمی و سرکوب‌کننده پاسخ Th1، کاهش کارایی ایمنی تراپی تومور را سبب می‌شوند. در چندین مطالعه، نتایج مرتبط با القای پاسخ‌های تنظیمی توسط اسیدهای نوکلئیک مانند CpG گزارش شده است (۲۴، ۲۵). اجزای پروتئینی احتمالاً به علت فقدان اسیدهای نوکلئیک و در نتیجه فقدان عوامل تحریک‌کننده پاسخ‌های تنظیمی، کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقا در موش‌های مبتلا به تومور فیروسارکوما را موجب شده است. در مطالعه‌های متعددی، دخالت اجزای پروتئینی باکتری لیستریا در تحریک سلول‌های دندریتیک تأیید شده است. در مطالعه‌ای، باکتری لیستریا مونوسیتوزنز جهش‌یافته فاقد سم پروتئینی لیستریولیزین O، قادر به تحریک سلول‌های دندریتیک برای بروز مولکول‌های MHC و کمک‌تحریکی نبودند (۲۶). در مطالعه دیگری مشخص شد که جزء پروتئینی لیستریولیزین O قادر به انحراف پاسخ‌های Th2 به Th1 در مدل موشی آلرژیک است (۲۷). در مطالعات انجام‌شده فقط به لیستریولیزین O به عنوان مسئول تحریک سلول‌های دندریتیک اشاره شده است

سلول‌های T سایتوتوکسیک بازوی عملکردی مهمی در پاسخ ضدتوموری هستند (۲۸). سایتوتوکسیسیته به

ضد ویروس منجر می‌شود (۲۰)؛ همچنین در مورد تومورهایی مانند پاپیلوما و ملانوما نیز، لیستریا از طریق افزایش تولید IFN $\gamma$  و افزایش قدرت سیتولیتیک CTL‌ها سبب افزایش طول عمر و کاهش متاستازها در موش‌های مبتلا به تومور را سبب شده است (۲۱، ۲۲)؛ لذا در مطالعات گوناگون از لیستریا به عنوان عامل تحریک سیستم ایمنی برای درمان تومور استفاده شده است.

یکی از شرایط اولیه برای تحریک مناسب سیستم ایمنی برای درمان تومور، بروز مناسب و کافی انواع مولکول‌های دخیل در روند عرضه آنتی‌ژن و تحریک سلول‌های T، بر سطح سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن در طی روند بلوغ آنهاست (۶). در مطالعه قبلی (۱۲) مشخص شد که سلول‌های دندریتیک مواجه‌شده با عصاره تام لیستریا میزان بالاتری مولکول‌های کمک‌تحریکی را در مقایسه با گروه کنترل بیان می‌کنند؛ در همین زمینه برزوزا (۲۳) نشان داده‌اند که لیستریا موجب می‌شود بروز مولکول‌های کمک‌تحریکی در سطح سلول‌های دندریتیک، در مقایسه با گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ افزایش یابد؛ در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با لیستریا میزان بالاتری مولکول‌های کمک‌تحریکی بیان می‌کنند؛ در ضمن در مطالعه پیشین مشخص شد که عصاره تام لیستریا به‌طور معنی‌داری افزایش تولید IL-12 را توسط سلول‌های دندریتیک در مقایسه با گروه کنترل باعث می‌شود؛ لذا این نتایج، تأییدکننده این موضوع است که لیستریا قادر به القای بلوغ سلول‌های دندریتیک است. در مطالعات گذشته (۷، ۱۲) با بررسی اثر لیستریا روی ایمونوتراپی تومور با سلول‌های دندریتیک، کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقای در پی تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام لیستریا مشاهده شد. کاهش در سرعت رشد تومور در گروه سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام و اجزای



شناخت، در نهایت می‌توان از آن در مقام یک لیگاند مؤثر برای القای بلوغ سلول‌های دندریتیک و ایمونوترایی استفاده کرد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله، نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۳۳۱۳ است.

واسطه این سلول‌ها القای مرگ برنامه‌ریزی شده را در سلول‌های هدف موجب می‌شود؛ این کار از طریق ترشح پرفورین، گرانزیم، اتصال Fas و Fas ligand به یکدیگر انجام می‌گیرد (۲۸)؛ فعال شدن این سلول‌ها با پاسخ بالینی مناسب به واکسن و از بین رفتن تومور ارتباط دارد (۲۹)؛ به همین دلیل در این مطالعه، سلول‌های طحالی موش - های درمان شده از نظر قدرت کشندگی مورد بررسی قرار گرفتند. گروه اجزای پروتئینی پاسخ بهتری را نشان دادند؛ در ضمن، این پاسخ اختصاصی سلول‌های توموری بود که موش‌ها بدان مبتلا شده بودند و ضد سلول‌های توموری نامرتبط پاسخی حاصل نشد. این نتیجه ثابت کرد که پاسخ قوی سلول‌های T سایتوتوکسیک با پاسخ *in vivo* در این مطالعه هم‌خوانی دارد.

لیستریا مونوسیتوزنز باکتری داخل سلولی است که اجزای مختلف آن با سلول‌های دندریتیک و از طریق رسپتورهای سطح سلولی مثل TLR2 و TLR9 شناسایی می‌شود (۳۰-۳۲). TLR2 به ترکیب‌های دیواره سلولی مانند اسید لیپوتیکوئیک و پپتیدوگلیکان باکتری متصل می‌شود (۳۳)؛ همچنین TLR9، CpG غیرمتمیله را شناسایی می‌کند (۳۴)؛ اتصال این رسپتورها به لیگاند خود بلوغ سلول‌های دندریتیک را موجب می‌شود. با توجه به توانایی بالاتر اجزای پروتئینی در القای بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش کارایی ایمنی ترایی، به احتمال، لیگاندهایی در این مجموعه پروتئینی وجود دارد که از طریق اتصال به رسپتورهای شناساگر الگو (PRR) بر سطح یا داخل سلول‌های دندریتیک، القای بلوغ این سلول‌ها را سبب می‌شوند.

### نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که اجزای پروتئینی لیستریا مونوسیتوزنز در مقایسه با عصاره تام قادر به ایجاد پاسخ ضد توموری بهتری است؛ بنابراین اگر بتوان به طور دقیق‌تر و خالص‌تری اجزای پروتئینی را تفکیک کرد و جزء مؤثر این مجموعه پروتئینی را

## منابع

- 1- Bousso, P., T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(9): p. 675-84.
- 2- Figdor, C.G., et al., Dendritic cell immunotherapy: mapping the way, 2004, Nature Publishing Group. p. 475-480.
- 3- Guernonprez, P., et al., Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 621-67.
- 4- Ikeda, H., et al., The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci*, 2004. 95(9): p. 697-703.
- 5- McIlroy, D. and M. Gregoire, Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother*, 2003. 52(10): p. 583-91.
- 6- Morse, M.A., et al., Dendritic cell maturation in active immunotherapy strategies. *Expert Opin Biol Ther*, 2002. 2(1): p. 35-43.
- 7- Khamisabadi, M., et al., Listeria monocytogenes activated dendritic cell based vaccine for prevention of experimental tumor in mice. *Iran J Immunol*, 2008. 5(1): p. 36-44.
- 8- Motamedi, M., et al., Improvement of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with components of *Toxoplasma gondii*. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. 16(10): p. 1393-8.
- 9- Zenewicz, L.A. and H. Shen, Innate and adaptive immune responses to Listeria monocytogenes: a short overview. *Microbes Infect*, 2007. 9(10): p. 1208-15.
- 10- Pamer, E.G., Immune responses to Listeria monocytogenes. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(10): p. 812-23.
- 11- Reinicke, A.T., et al., Dendritic cell cross-priming is essential for immune responses to Listeria monocytogenes. *PLoS One*, 2009. 4(10): p. e7210.
- 12- M. Motamedi, S.A., N. Khansari, SM. Moazeni, M. Vodjgani, AH. Keyhani, Z. Gheflati, T. Aboofazeli, J. Hadjati, Effect of Listeria Monocytogenes on Tumor Immunotherapy with Dendritic Cells. *yakhteh*, 2007(32).
- 13- Inaba, K., et al., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 1992. 176(6): p. 1693-702.
- 14- van de Ven, R., et al., The ABC of dendritic cell development and function. *Trends Immunol*, 2009. 30(9): p. 421-9.
- 15- Kadowaki, N. and T. Kitawaki, Dendritic cell-based tumor immunotherapy. *Rinsho Ketsueki*, 2009. 50(5): p. 358-63.
- 16- Strome, S.E., et al., Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1884-9.
- 17- Moschella, F., et al., Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1194: p. 169-78.
- 18- Paterson, Y., P.D. Guirnalda, and L.M. Wood, Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 22(3): p. 183-9.
- 19- Singh, R. and Y. Paterson, Listeria monocytogenes as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*, 2006. 5(4): p. 541-52.
- 20- Friedman, R.S., et al., Induction of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by Listeria monocytogenes and a hyperattenuated Listeria strain engineered to express HIV antigens. *J Virol*, 2000. 74(21): p. 9987-93.
- 21- Gunn, G.R., et al., Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol*, 2001. 167(11): p. 6471-9.
- 22- Bruhn, K.W., et al., Characterization of anti-self CD8 T-cell responses stimulated by recombinant Listeria monocytogenes expressing the melanoma antigen TRP-2. *Vaccine*, 2005. 23(33): p. 4263-72.
- 23- Brzoza, K.L., A.B. Rockel, and E.M. Hiltbold, Cytoplasmic entry of Listeria monocytogenes enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. *J Immunol*, 2004. 173(4): p. 2641-51.
- 24- Mellor, A.L., et al., Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol*, 2005. 175(9): p. 5601-5.
- 25- Moseman, E.A., et al., Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2004. 173(7): p. 4433-42.
- 26- Yamamoto, K., et al., Listeriolysin O, a cytolysin derived from Listeria monocytogenes, inhibits generation of ovalbumin-specific Th2 immune response by skewing maturation of antigen-specific T cells into Th1 cells. *Clin Exp Immunol*, 2005. 142(2): p. 268-74.
- 27- Yamamoto, K., et al., Listeriolysin O derived from Listeria monocytogenes inhibits the effector phase of an experimental allergic rhinitis induced by ovalbumin in mice. *Clin Exp Immunol*, 2006. 144(3): p. 475-84.
- 28- Andersen, M.H., et al., Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 2006. 126(1): p. 32-41.
- 29- Karanikas, V. and A. Germenis, Tumor specific CD8+ T cells in patients with lung cancer and healthy individuals. *J Buon*, 2009. 14 Suppl 1: p. S153-7.
- 30- Shen, Y., et al., Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophages. *Infect Immun*. 78(6): p. 2857-67.
- 31- Janot, L., et al., CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of Listeria monocytogenes infection. *J Infect Dis*, 2008. 198(1): p. 115-24.
- 32- Huang, B., et al., Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res*, 2007. 67(9): 4346-52.
- 33- Wetzler, L.M., The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine*, 2003. 21 Suppl 2: S55-60.
- 34- Miyake, K., Nucleic acid-sensing Toll-like receptors: beyond ligand search. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(7): p. 782-5.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
Seventeenth Year,  
No.92  
April, May  
2011*

Received: 8/2/2011

Last revised: 15/3/2011

Accepted: 17/3/2011

## Increased efficacy of dendritic cells by protein components compared to total extract of *Listeria monocytogenes* in experimental tumor immunotherapy

Samaneh Arab<sup>1</sup>, Masoumeh Motamedi<sup>2</sup>, Masoumeh Khamisabadi<sup>1</sup>, Zahra Gheflati<sup>1</sup>, Tahereh Aboofazeli<sup>1</sup>, Reza Mirzaei<sup>1</sup>, Jamshid Hajati<sup>1\*</sup>

1. Immunology Department, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Immunology Department, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Iran.

E-mail: hajatij@sina.tums.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** Using dendritic cells (DCs) loaded with tumor antigens as a therapeutic strategy against tumors has been proposed. In order to increase the efficacy of DCs, a variety of factors such as TLR ligand molecules and bacterial products are used. In this study, the protein components of the bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) for induction of dendritic cell maturation were used.

**Materials and Methods:** Bone marrow cells of Balb/c mice in the presence of IL-4 and GM-CSF were cultured for 5 days. On day 5, tumor lysate and then protein components or total extract of LM was added to immature DCs. In order to survey the maturation status of DCs, on day 7, the expression of CD80, CD86 AND MHC-II on the cell surface was evaluated. After induction of tumors in mice using WEHI-164 cell line, 10<sup>6</sup> mature dendritic cells subcutaneously injected. Tumor growth rate, survival rate and cytotoxic activity of spleen cells were evaluated in the studied groups.

**Results:** In mice vaccinated with protein components matured-DCs, delayed tumor growth rate and increased survival were seen. In addition, in these mice, the cytotoxic activity of spleen cells was higher compared to other groups. In all groups receiving protein components or total extract mature-DCs, increased cytotoxic activity and decreased tumor growth rate were seen compared to controls.

**Conclusion:** *Listeria monocytogenes* protein components compared to total extract have higher ability to increase the efficacy of DCs for tumor immunotherapy in mouse model.

**Key words:** Immunotherapy, Dendritic cell, Tumor, *Listeria monocytogenes*