مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۲۷/هفته‌ی سوم خرداد ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۳

مقایسه‌ی تمایز سلول‌های B به پلاسمابلاست در حضور محرک‌های Anti-human CD40 و Anti-IgM f(ab)`2 و یا لیپوپلی‌ساکارید (LPS) و Anti-human CD40 (در شرایط آزمایشگاه)

ساناز افشار قاسملو[۱]، نفیسه اسمعیل[۲]، مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۲]، عباس رضایی[۳]، رضا یزدانی[۴]، فایزه عباسی‌راد[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دگرگونی و تمایز سلول‌های B فعال شده به پلاسموسیت‌ها و همچنین، سلول‌های خاطره‌دار وابسته به پیام‌های حاصل از گیرنده‌ی سلول B می‌باشد. پیام‌های ناشی از گیرنده‌ی آنتی‌ژن و گیرنده‌های سیتوکاینی سطح سلول‌های B، سبب القای بروز عوامل رونوشت‌برداری خاصی می‌شوند که در نهایت این عوامل، تعیین کننده‌ی سرنوشت سلول B می‌باشند.

روش‌ها: جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMCs) با استفاده از گرادیان شیب غلظت و با استفاده از فایکول انجام گرفت و سپس، جداسازی سلول‌های B خالص با روش Magnetic-activated cell sorting (MACS) انجام شد. در مرحله‌ی بعد، برای تحریک و تمایز سلول‌های B به پلاسمابلاست‌ها، این سلول‌ها در محیط Roswell Park Memorial Institute1640 (RPMI1640) در حضور Purified anti- human CD40 antibody و Anti-IgM f(ab)`2 یا و Purified anti-human CD40 Antibody و لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharides یا LPS) کشت داده و سپس، پلاسمابلاست‌ها با استفاده از سه نشانگر +CD38، +CD27 و -IgM به روش فلوسایتومتری ارزیابی شد.

یافته‌ها: در محیط In vitro، با تحریک دایمی لنفوسیت‌های B از طریق Cross-link کردن گیرنده‌ی آن‌ها (B cell receptor یا BCR) و تحریک با Anti-human CD40 antibody و Anti-IgM f(ab)`2 و یا Anti-CD40 و LPS اغلب سلول‌های B زنده مانده بودند و حتی تمایز آن‌ها به رده‌ی دیگری از سلول‌های B (پلاسمابلاست‌های +CD38، +CD27 و -IgM) مشاهده شد. از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری در بیان نشانگرهای پلاسمابلاستی در سطح سلول‌ها در هر دو حالت تحریکی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های B این توانایی را دارند که در شرایط کشت In vitro و تحریک با محرک‌های متفاوت، همانند محیط In vivo به رده‌ی سلولی پلاسمابلاست تمایز یابند. با این وجود، برای دستیابی به بهترین شرایط جهت تمایز سلول‌های B، عواملی نظیر ماهیت تحریک، مدت زمان تحریک و استفاده از محرک‌های متفاوت که نقش مهمی دارند، باید مد نظر قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سلول‌های B، پلاسمابلاست، گیرنده‌ی فاکتور متمایز کننده‌ی سلول B، لیپوپلی‌ساکارید، فلوسایتومتری

ارجاع: افشار قاسملو ساناز، اسمعیل نفیسه، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، رضایی عباس، یزدانی رضا، عباسی‌راد فایزه. **مقایسه‌ی تمایز سلول‌های B به پلاسمابلاست در حضور محرک‌های Anti-human CD40 و Anti-IgM f(ab)`2 و یا لیپوپلی‌ساکارید (LPS) و Anti-human CD40 (در شرایط آزمایشگاه).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۷): ۴۴۶-۴۴۰

مقدمه

لنفوسیت‌های B، سلول‌هایی از سیستم ایمنی هومورال هستند که از سلول‌های بنیادین مغز استخوان به وجود می‌آیند، در مغز استخوان تکامل می‌یابند و در بافت‌های لنفاوی محیطی در جایگاه واکنش‌های متقابل لنفوسیت‌ها با آنتی‌ژن‌های بیگانه تجمع می‌یابند (۲-۱). لنفوسیت‌های B همراه با سیستم ایمنی سلولی، مکانیسم‌های دفاعی اختصاصی بدن را تشکیل می‌دهند و عملکرد اصلی آن‌ها، تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن می‌باشد. اعمال اصلی آنتی‌بادی‌ها نظیر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نفیسه اسمعیل
Email: nafesm5@gmail.com

خنثی‌سازی و حذف میکروب‌های عفونی و سموم میکروبی و همچنین، تسهیل و تسریع بخشیدن به فرایندهای فاگوسیتوز و فعال شدن سیستم کمپلمان می‌باشد (۴-۳).

آنتی‌بادی‌ها، به وسیله‌ی پلاسماسل‌ها در اندام‌های لنفاوی و مغز استخوان تولید می‌شوند و اعمال اجرایی خود را در نواحی دور از محل تولید خود انجام می‌دهند. پلاسماسل‌هایی که در اندام‌های لنفوئیدی باقی می‌مانند، عمر کوتاه‌تری نسبت به پلاسماسل‌هایی که در مغز استخوان هستند، دارند و در آن جا آنتی‌بادی تولید می‌کنند. پلاسمابلاست‌ها نیز سلول‌های ترشح کننده‌ی آنتی‌بادی در گردش هستند و پیش‌ساز پلاسماسل‌هایی می‌باشند که در مغز استخوان یا سایر بافت‌ها ساکن می‌شوند (۶-۵). پلاسمابلاست‌ها، با بیان بالای نشانگرهای سطحی CD38، CD138 و CD27، از سایر لنفوسیت‌های B متمایز می‌شوند (۸-۷).

پلاسماسل‌ها، آخرین مرحله از تمایز سلول‌های B می‌باشند و قدرت تکثیر و تقسیم ندارند. این سلول‌ها، در مغز استخوان برای مدت زمان طولانی زنده می‌مانند و آنتی‌بادی ترشح می‌کنند (۵). در نمای هیستولوژیک، پلاسماسل‌ها به شکل بیضوی با هسته‌ی خارجی و شبکه‌ی آندوپلاسمی گسترده با ریبوزوم‌های فراوان در سیتوپلاسم دیده می‌شوند (۹).

تحریک و فعال شدن لنفوسیت‌های B نیازمند دو پیام است. پیام اول اتصال گیرنده‌ی سطح سلول B (B cell receptor یا BCR) به آنتی‌ژن و پیام دوم که تقویت کننده‌ی پیام اول است، اتصال CD40 سطح سلول B با CD40L سطح سلول T می‌باشد که این دو فرایند، سبب آغاز پیام‌رسانی و تجمع و فعال شدن خانواده‌ای از تیروزین کینازها و فسفریلاسیون آن‌ها می‌شوند که پیامد کلی این وقایع در نهایت، القای بروز عوامل رونوشت‌برداری خاص و تعیین سرنوشت سلول B می‌باشد (۱۳-۱۰).

BCRها، گیرنده‌های آنتی‌ژن در سطح لنفوسیت B هستند که در واقع، یک مولکول ایمونوگلوبولین (Immunoglobulin یا Ig) متصل به غشا می‌باشند (۱۴).

BCR complex،یک کمپلکس چند پروتئینی است که بر سطح لنفوسیت‌های B بروز می‌یابد و با شناسایی آنتی‌ژن، پیام‌های فعال کننده را به درون سلول انتقال می‌دهد. کمپلکس BCR، شامل ایمونوگلوبولین غشایی (مسؤول اتصال به آنتی‌ژن) و پروتئین‌های Igα و Igβ (آغاز کننده‌های وقایع پیام‌رسانی) است. CD40 سطح سلول‌های B تحریک شده با آنتی‌ژن، با اتصال به CD40L سطح سلول‌های T، سبب فراخواندن پروتئین‌های سیتوزولی [Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors یا TRAFs] به سمت CD40 می‌شوند که در نهایت، منجر به فعال شدن عوامل نسخه‌برداری NF-κB (Nuclear Factor-κB) و AP-1 (Activator protein 1) و افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های B و سنتز و ترشح آنتی‌بادی می‌گردند. به عنوان نمونه، فراورده‌های میکروبی نظیر LPS در نقش آنتی‌ژن به پذیرنده‌های شبه Toll (Toll-like receptors یا TLRs) نظیر TLR4 متصل می‌شوند که قادر به شناسایی لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) است و با فراخوانی پروتئین‌های آداپتور و فعال شدن عوامل نسخه‌برداری مختلف نظیر NF-k B و AP-1، سبب تقویت پیام‌های پذیرنده‌ی سلول B و فعال شدن و تکثیرسلول‌ها می‌شود (۱۷-۱۵). به نظر می‌رسد، ترکیبات مختلفی که بر روی این دو پیام تأثیر می‌گذارند، می‌توانند توانایی تکثیر و تمایز سلول‌های B را نیز تغییر دهند.

این مطالعه، با هدف بررسی زنده بودن و تمایز سلول‌های B پس از جداسازی از سلول‌های خون محیطی به عنوان یک جمعیت خالص انجام شد؛ چرا که در مطالعات متعددی که بر روی این جمعیت سلولی انجام می‌گیرد، به سلول‌های زنده با توانایی تکثیر و تمایز نیاز است. همچنین، از ترکیب دو محرک LPS به همراه Anti-CD40 استفاده شد و تأثیر آن‌ها، با محرک‌های رایج مانند Anti-CD40 و Anti-IgM جهت تحریک و تمایز سلول‌های B مقایسه گردید.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMCs)، با جمع‌آوری ۱۰ سی‌سی خون از ۵ داوطلب سالم در لوله‌های حاوی Ethylen diamine tetraacetic acid (EDTA) صورت گرفت. در این روش جداسازی PBMCs، توسط شیب گرادیانت فایکول ۱/۰۷۷ انجام شد. ارزیابی تعداد سلول‌های زنده (Viability)، با استفاده از رنگ تریپان‌بلو و شمارش سلولی بر روی لام نئوبار انجام گردید.

برای جداسازی سلول‌های B خالص از روش Magnetic-activated cell sorting (MACS) استفاده شد و جداسازی طبق شیوه‌نامه‌ی موجود در کیت (Milteni Biotec, Germany) انجام شد. این شیوه‌ی جداسازی، بازده بسیار بالایی دارد و جمعیت سلول‌های B جدا شده دارای خلوص بالایی هستند. به PBMCهایی که جدا شده بودند، آنتی‌بادی CD19 اضافه شد و درصد خلوص سلول‌های B جدا شده، بالای ۹۰ درصد بود. سپس، سلول‌ها در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) (BioIdea, USA)، در حضور Fetal bovine serum (FBS) (BioIdea, USA) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین/استرپتومایسین (BioIdea, USA) در پلیت‌های کشت

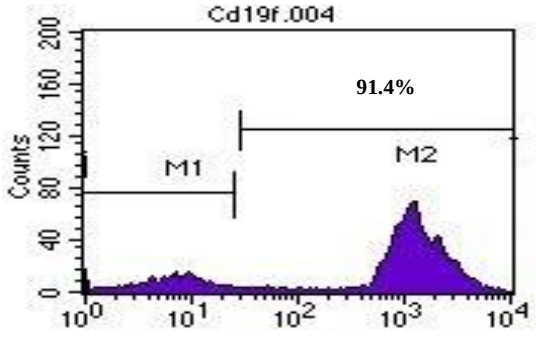
سلولی ۲٤ خانه‌ای کشت داده شدند و با Purified anti- human CD40 antibody (Biolegend) و Anti-IgM f(ab)`2 یا LPS تحریک شدند.

این محرک‌ها، به منظور تحریک سلول‌های B و تقویت پیام‌رسانی و در نهایت تمایز و دگرگونی سلول‌های B به سمت پلاسمابلاست‌ها، اضافه شدند. سپس، پلیت کشت سلول در شرایط استاندارد (CO_2 ۷-۵ درصد، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد) به مدت ۲٤ ساعت و ٤۸ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت، برای ارزیابی ریخت‌شناسی سلول‌های کشت داده شده، پلیت حاوی سلول با میکروسکوپ بررسی شد. دو روش تحریکی جهت بررسی دقت و صحت انجام آزمایش‌ها پنج بار تکرار گردید.

سوسپانسیون سلولی حاصل از کشت سلول‌های B جهت بررسی ویژگی‌های سلولی با روش فلوسایتومتری آماده شد. سرم بز، به عنوان مسدود کننده (Blocker) به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی آنتی‌بادی‌ها با گیرنده‌های سطح سلول و جلوگیری از ایجاد تداخل در نتایج فلوسایتومتری به سلول‌ها اضافه شد. سپس، نشانگرهای سطحی سلول‌های پلاسمابلاست، با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی این نشانگرها شامل PerCP antihuman CD38 (Biolegend)، anti-human CD27 PE (Biolegend) و Anti-human IgM FITC (eBioscince) رنگ‌آمیزی گردید. جهت حذف باندهای غیر اختصاصی و جلوگیری از نتایج کاذب، از ایزوتایپ‌های متناسب با آنتی‌بادی‌های سطحی استفاده شد. روش فلوسایتومتری، با استفاده از دستگاه FACS Calibur و آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار Cell Quest انجام شد.

یافته‌ها

در مطالعات مشابه با سایر محرک‌ها، زمان کشت ٤۸-۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفته است (۱۹-۱۸) و نتایج حاصل از کشت سلول‌های B با استفاده از محرک‌های Purified anti-human CD40 antibody و Anti-IgM f(ab)`2 یا LPS در مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که بهترین زمان جهت تمایز و تکثیر سلول‌های B، کشت سلول‌ها به مدت ۲٤ ساعت بود و پس از کشت ٤۸ ساعته، درصد بالایی از سلول‌ها دچار مرگ شده بودند و به همین دلیل، زمان ۲٤ ساعت زمان انتخابی در این مطالعه بود و تکرار آزمایش‌ها در مدت ۲٤ ساعت ادامه پیدا کرد. همان‌طور که گفته شد، برای جداسازی سلول‌های B خالص از روش MACS استفاده شد که در آن، درصد خلوص سلول‌های B جدا شده، بالای ۹۰ درصد بود (شکل ۱).



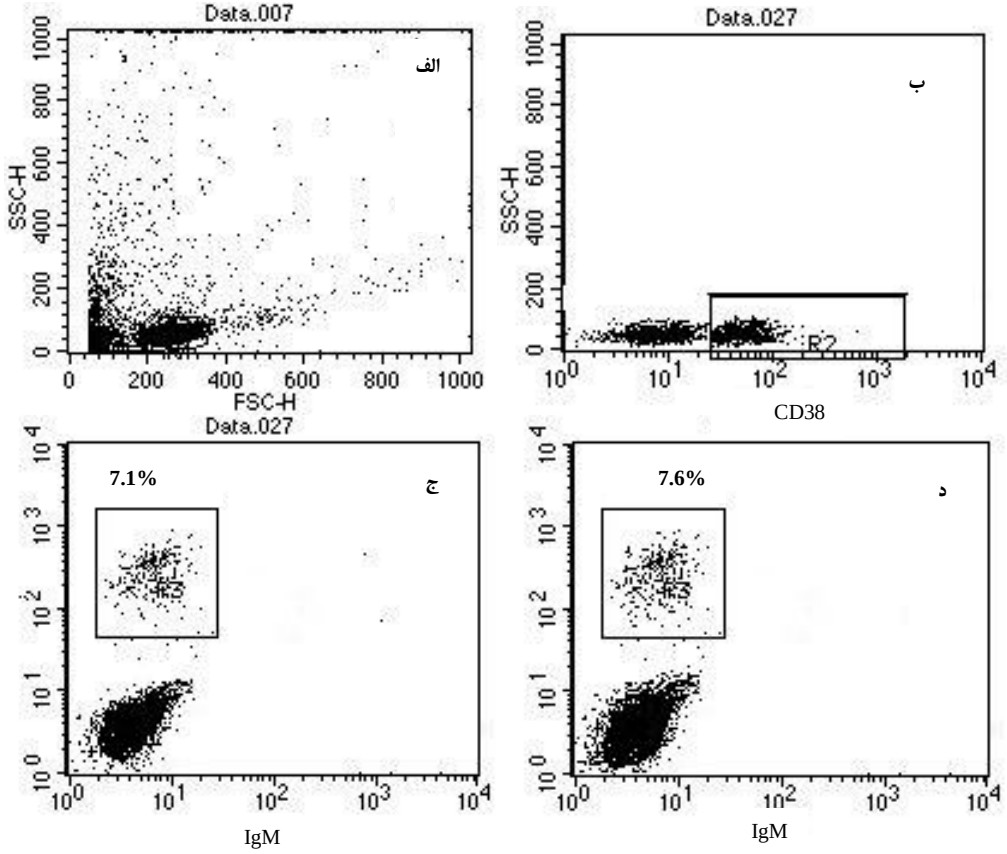
شکل ۱. لنفوسیت‌های +B CD19، با استفاده از تکنیک Magnetic-activated cell sorting (MACS) از Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) جدا شدند. خلوص سلول‌های B جدا شده با استفاده از آنتی‌بادی Anti-CD19 FITC به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت و میزان خلوص سلول‌ها بالای ۹۰ درصد به دست آمد.

همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده از روش فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی سلول‌ها با سه نشانگر PerCP antihuman CD38 (Biolegend) Anti-human CD27 PE (Biolegend) و Anti-human IgM FITC (eBioscience) مشخص گردید که انکوباسیون سلول‌های B به همراه عوامل محرک Anti-CD40 و Anti-IgM و یا LPS و Anti-CD40، تمایز این سلول‌ها به رده‌ی سلولی پلاسمابلاست را به دنبال دارد (۱۱)؛ به طوری که پس از انتخاب جمعیت سلول‌های B (شکل ۲. الف)، جمعیت سلول‌های CD38 مثبت در این جمعیت بار دیگر انتخاب گردید (شکل ۲. ب) و سپس، در این سلول‌های CD19 و CD38 مثبت، میزان بیان IgM و CD27 در هر دو حالت تحریکی Anti-CD40 و Anti-IgM و یا Anti-CD40 و LPS مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲. ج و د). در نهایت، جمعیت پلاسمابلاست به صورت +CD19، +CD38، IgM- و +CD27 در نظر گرفته شد.

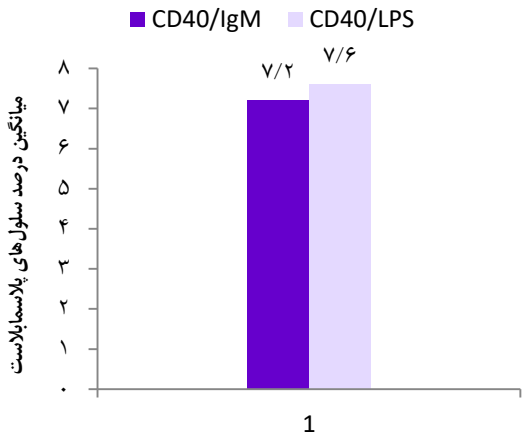
همچنین، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در بیان نشانگرهای پلاسمابلاستی در سطح سلول‌ها در هر دو حالت تحریکی Anti-CD40 و Anti-IgM و یا Anti-CD40 و LPS مشاهده نشد (شکل ۳).

بحث

هدف از انجام این مطالعه، تحریک سلول‌های B خون محیطی و تمایز آن‌ها به رده‌ی سلولی پلاسمابلاست در محیط In vitro با استفاده از محرک‌های متفاوت بود که برای نیل به این هدف، در مرحله‌ی کشت سلولی از محرک‌هایی نظیر Anti-CD40، LPS و Anti-IgM استفاده گردید.



شکل ۲. فنوتیپ پلاسمابلاست‌ها با استفاده از نشانگرهای -IgM، +CD27 و +CD38 در دو روش تحریکی با Anti-CD40 و Anti- IgM و یا Anti-CD40 و لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) مورد بررسی قرار گرفت. الف: نمودار جمعیت سلول‌های B جدا شده توسط مگنت که بر اساس اندازه و گرانول‌های داخل سلولی در FSC (Forward light scatter) و SSc (Side light scatter) گیت شدند. ب: سلول‌های بیان کننده‌ی نشانگر CD38 بار دیگر در جمعیت سلول‌های B گیت شدند. ج: بیان نشانگرهای سطحی CD27/IgM در روش تحریکی با Anti-CD40 و Anti-IgM در سلول‌های +CD19 و +CD38 ارزیابی شد و سلول‌های +CD27 و -IgM به عنوان جمعیت پلاسمابلاست گیت شدند. د: همچنین، بیان نشانگرهای +CD27 و -IgM نیز، در روش تحریکی با Anti-CD40، LPS ارزیابی شد و سلول‌های +CD27 و -IgM به عنوان جمعیت پلاسمابلاست گیت شدند.



شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های پلاسمابلاست در دو روش تحریکی با Anti-CD40 و AInti-IgM و یا Anti-CD40 و لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) (P > ۰/۰۵۰)

این محرک‌ها، به عنوان یک آنتی‌ژن وظیفه‌ی آغاز پیام‌رسانی را به واسطه‌ی اتصال متقاطع BCR بر عهده دارند.

در پی انتقال پیام توسط BCR، مسیرها و آداپتورهای مسیرهای پیام‌رسانی نظیر مسیر Ras-MAP کیناز، NF-KB، Phospholipase C (PLC) و Protein kinase C (PKC-β) فعال می‌گردند. این آبشارهای انتقال پیام، سبب فعال شدن تعدادی از عوامل نسخه‌برداری و القای بروز ژن‌هایی می‌شوند که در تکامل و تمایز رده‌های سلول B به سمت پلاسمابلاست و پلاسماسل نقش مهمی دارند (۲۰).

از آن جایی که شرایط ایده‌آل کشت و تحریک سلول‌ها در بررسی ویژگی‌های آن‌ها نقش به‌سزایی دارد، کسب چنین شرایطی با محرک‌های متفاوت و در زمان‌های بهینه، به طور قطعی در نتایج حاصل شده و پیشنهاد بهترین شرایط، تأثیر به‌سزایی دارد و چون سلول‌های B توسط محرک‌های متفاوتی تحریک و تمایز می‌یابند و از

سویی رده‌های تمایز یافته‌ی سلول‌های B به طور طبیعی در خون محیطی حضور ندارند یا درصد فوق‌العاده کمی از آن‌ها در خون محیطی وجود دارد، بررسی الگوهای متفاوت محرک‌ها و تأثیر آن‌ها در بقا و تمایز سلول‌های B، راه‌گشای محققین در استفاده از بهترین و کم‌هزینه‌ترین شرایط جهت کشت و تمایز این سلول‌ها خواهد بود.

لنفوسیت‌های B، به دلیل تولید آنتی‌بادی و همچنین، عملکردهای مهمی که در سیستم ایمنی هومورال دارند، همواره در مطالعات متعدد مورد توجه محققین بوده‌اند. از سوی دیگر، بررسی آنتی‌ژن‌ها و نشانگرهای CD (CD markers) سطح لنفوسیت‌ها در شرایط تحریکی متفاوت در پزشکی بالینی و ایمنی‌شناسی تجربی به منظور طبقه‌بندی لنفوسیت‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ارزیابی نشانگرهای CD، این امکان را برای محققین فراهم می‌آورد که رده‌های سلولی متفاوت سلول‌های B شرکت کننده در پاسخ‌های ایمنی را شناسایی و آن‌ها را از لحاظ خصوصیات، الگوی پاسخ‌دهی و عملکردهای اجرایی مورد تجزیه و تحلیل قرار دهند. از این رو، روش‌های جداسازی با خلوص بالا و همچنین، تحریک سلول‌های B همواره مورد توجه محققین بوده است؛ به این دلیل که الگوی بیان نشانگرهای سطحی و تمایز این سلول‌ها در بیماری‌ها و شرایط مختلف تحریکی متفاوت می‌باشد.

در مطالعه‌ی پیش رو، تحریک سلول‌های B تمایز نیافته پس از تخلیص با استفاده از محرک‌هایی نظیر LPS/Anti-CD40 و Anti-IgM/CD40 نشان داد که در هر دو حالت تحریک، سلول‌های B به سمت پلاسمابلاست متمایز شدند. از آن جایی که جمعیت ابتدایی قبل از تحریک سلول B تمایز نیافته بود و بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های پلاسمابلاست پس از تحریک، نشانگر تمایز سلول‌های B به سمت پلاسما بلاست بود، درصد سلول‌های پلاسمابلاست در دو روش تحریکی تفاوت آماری معنی‌داری نداشت.

نتایج حاصل از این بررسی، با برخی از مطالعات مشابه انجام شده هم‌خوانی نزدیکی دارد؛ به نحوی که در این مطالعات نیز با استفاده از محرک‌های متفاوت دیگری، سبب تحریک و تمایز لنفوسیت‌های B به رده‌ی سلولی پلاسمابلاست در محیط In vitro شده‌اند.

در مطالعه‌ی مشابهی، Nomura و همکاران، برای تحریک و تمایز لنفوسیت‌های B از Anti-CD40 و CD40 Anti-IgM و Interleukin-4 (IL-4) به عنوان محرک استفاده کردند (۲۱). همچنین، Saito و همکاران یک نوبت از IL-4 و IL-21 به همراه f(ab)`2 goat anti-Human IgG، و IgM و بار دیگر از ترکیب IL-4 و IL-21 به همراه Anti-CD40 برای تحریک و تمایز سلول‌های B استفاده کرده و نتایج مطلوبی به دست آورده‌اند (۲۲). در مطالعه مشابه دیگری نیز از LPS و Anti-μ f (ab)`2 به منظور تحریک سلول‌های B استفاده شده است (۲۳).

در این مطالعه، از ترکیب دو محرک LPS به همراه Anti-CD40 استفاده و نتیجه‌ی آن با محرک‌های رایج مانند Anti-CD40 و Anti-IgM جهت تحریک و تمایز سلول‌های B مقایسه گردید. همچنین، به منظور بررسی و ارزیابی پلاسمابلاست‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، از آنتی‌بادی‌های ضد نشانگرهای سطحی و مشخص شده‌ی پلاسمابلاست‌ها استفاده شد که نتایج در خور توجه و مناسبی نیز به دست آمد. این نشانگرها در سطح پلاسمابلاست‌ها به صورت CD38+++، CD27++ و IgM- بیان می‌شوند (شکل ۲). البته، می‌توان پیشنهاد نمود که در مطالعات بعدی، نشانگرهای CD138 و CD19 (بیان در سطح پلاسمابلاست CD138+++ و CD19-) به همراه CD38، CD27 و IgM نیز بررسی شود.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که محرک‌هایی نظیر IgM و CD40 یا LPS و CD40، سبب سرعت بخشیدن به فرایند تحریک لنفوسیت‌های B و در نهایت تمایز به رده‌ی سلولی پلاسمابلاست می‌شوند و استفاده از ترکیب هر کدام از این محرک‌ها، تفاوتی در تمایز و تحریک سلول‌های B ندارند. بنابراین، طبق نتایج حاصل از این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که هر دو روش تحریکی به منظور تمایز و تحریک سلول‌های B در مطالعات سلولی قابل استفاده هستند.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹٤٦۷۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از تمامی افرادی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود. همچنین، از شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت پشتیبانی مالی از مطالعه‌ی حاضر قدردانی می‌گردد.

References

1. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. Immunol Rev 2010; 238(1): 37-46.
2. Cooper MD. The early history of B cells. Nat Rev Immunol 2015; 15(3): 191-7.
3. Schenkein HA, Ruddy S. The role of immunoglobulins in alternative complement pathway activation by zymosan. I. Human IgG with specificity for Zymosan enhances alternative pathway activation by zymosan. J Immunol 1981; 126(1): 7-10.
4. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The humoral immune response. The distribution

and functions of immunoglobulin isotypes. In: Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, editors. Immunobiology. 5th ed. New York, NY: Garland Science; 2001.
5. Manz RA, Lohning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. Int Immunol 1998; 10(11): 1703-11.
6. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol 2015; 15(3): 160-71.
7. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. Cytometry B Clin Cytom 2008; 74(5): 261-71.
8. Maiga RI, Bonnaure G, Rochette JT, Neron S. Human CD38hiCD138(+) plasma cells can be generated in vitro from CD40-activated switched-memory B lymphocytes. J Immunol Res 2014; 2014: 635108.
9. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. Morphologie 2015; 99(325): 38-62.
10. Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. Annu Rev Immunol 2010; 28: 185-210.
11. Wortis HH, Teutsch M, Higer M, Zheng J, Parker DC. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(8): 3348-52.
12. Schilizzi BM, Boonstra R, The TH, de Leij LF. Effect of B-cell receptor engagement on CD40-stimulated B cells. Immunology 1997; 92(3): 346-53.
13. Hasler P, Zouali M. B cell receptor signaling and autoimmunity. FASEB J 2001; 15(12): 2085-98.
14. Wiesner M, Zentz C, Mayr C, Wimmer R, Hammerschmidt W, Zeidler R, et al. Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. PLoS One 2008; 3(1): e1464.
15. Boeglin E, Smulski CR, Brun S, Milosevic S, Schneider P, Fournel S. Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells. PLoS One 2011; 6(10): e25542.
16. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. Cell Mol Immunol 2013; 10(2): 103-6.
17. Xu H, Liew LN, Kuo IC, Huang CH, Goh DL, Chua KY. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. Immunology 2008; 125(2): 218-28.
18. Van BK, Herman J, Boon L, Waer M, Sprangers B, Louat T. Comparative In Vitro Immune Stimulation Analysis of Primary Human B Cells and B Cell Lines. J Immunol Res 2016; 2016: 5281823.
19. Patterson HC, Kraus M, Kim YM, Ploegh H, Rajewsky K. The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igalpha cytoplasmic domain. Immunity 2006; 25(1): 55-65.
20. Anbazhagan K, Rabbind SA, Isabelle P, Stella I, Celine AD, Bissac E, et al. Human pre-B cell receptor signal transduction: evidence for distinct roles of PI3kinase and MAP-kinase signalling pathways. Immun Inflamm Dis 2013; 1(1): 26-36.
21. Nomura J, Inui S, Yamasaki T, Kataoka S, Maeda K, Nakanishi K, et al. Anti-CD40 monoclonal antibody induces the proliferation of murine B cells as a B-cell mitogen through a distinct pathway from receptors for antigens or lipopolysaccharide. Immunol Lett 1995; 45(3): 195-203.
22. Saito T, Kitayama D, Sakamoto A, Tsuruoka N, Arima M, Hatano M, et al. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. Immunobiology 2008; 213(7): 545-55.
23. Moser JM, Upton JW, Gray KS, Speck SH. Ex vivo stimulation of B cells latently infected with gammaherpesvirus 68 triggers reactivation from latency. J Virol 2005; 79(8): 5227-31.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 35, No. 427, 3rd Week, June 2017

Received: 08.02.2017

Accepted: 12.04.2017

Comparison of B-Cells Differentiation to Plasmablasts at Presence of Anti-Human CD40 and Anti-Immunoglobulin M f (ab)'2 or Lipopolysaccharide and Anti-Human CD40 Stimulators (In-Vitro)

Sanaz Afshar-Qasemloo[1], Nafiseh Esmaeil[2], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi[2], Abbas Rezaei[3], Reza Yazdani[4], Faezeh Abbasi-Rad[1]

Original Article

Abstract

Background: Transformation and differentiation of activated B-cell to plasmacells and also memory cells depend on signaling from B-cell receptors. The signals from antigen and cytokine receptors on the surface of B cells lead to induce the expression of specific transcription factors, which finally determine the fate of B cells.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated via ficoll gradient and then purified B cells were separated using magnetic-activated cell sorting (MACS). Pure B cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) culture media at the presence of purified anti-human CD40 antibody and anti-immunoglobulin M f (ab)´2 or lipopolysaccharide (LPS) and anti-human CD40 antibody that induced B-cells differentiation to plasmablasts which was assessed with 3 markers (CD38+, CD27+, IgM-) and analyzed via flow cytometry.

Findings: In stimulation of B cells with purified anti-human CD40 antibody and anti-IgM f (ab)´2 or LPS through cross-linking B-cell receptor, the majority of B cells remained alive and differentiated to another lineage of B cells (plasmablast: CD38+, CD27+, IgM-). There was no significant statistical difference between expressions of plasmablast markers in two states of stimulation.

Conclusion: B cells can be stimulated and differentiated to plasmablasts in vitro similar to in vivo condition. However, to achieve the best outcome in the differentiation of B cells, we should consider the nature of stimulator, the time of incubation, and the type of stimulators.

Keywords: B-cells, Plasmablast, B-cell differentiation factor receptor, Lipopolysaccharides, Flow cytometry

Citation: Afshar-Qasemloo S, Esmaeil N, Ganjalikhani-Hakemi M, Rezaei A, Yazdani R, Abbasi-Rad F. **Comparison of B-Cells Differentiation to Plasmablasts at Presence of Anti-Human CD40 and Anti-Immunoglobulin M f (ab)'2 or Lipopolysaccharide and Anti-Human CD40 Stimulators (In-Vitro).** J Isfahan Med Sch 2017; 35(427): 440-6.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nafiseh Esmaeil, Email: nafesm5@gmail.com