مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۱۹۸/هفته چهارم شهریورماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۵/۲۵

بررسی سیکل سلولی در لنفوسیت‌های T فعال‌شده‌ی انسانی توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD28 در شرایط In vitro با استفاده از فلوسایتومتری

الهه نوری جاوید[۱]، دکتر مرجان قراگوزلو[۲]، دکتر عباس رضایی[۳]

چکیده

مقدمه: تکثیر لنفوسیت T برای ایجاد پاسخ ایمنی اکتسابی ضروری است و توسط گیرنده سلول T و به کمک محرک‌ها (CD28) ایجاد می‌شود و باعث ورود سلول به سیکل سلولی و گسترش کلنی سلول‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی سیکل سلولی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD28 در زمان‌های انکوباسیون مختلف با استفاده از فلوسایتومتری بود.

روش‌ها: ۱۰ سی‌سی خون هپارینه از فرد داوطلب سالم تهیه شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی توسط سانتریفوژ بر روی فایکول جدا شدند. پس از آن سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴تایی کشت پوشیده با آنتی‌بادی Anti-CD3 با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و با حضور آنتی‌بادی Anti-CD28 با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت محلول فعال شدند و در محیط کشت کامل RPMI (Roswell park memorial institute medium) به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کشت داده شدند. سپس آنالیز سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری انجام گردید.

یافته‌ها: آنالیز سیکل سلولی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده با استفاده از نمودارهای هیستوگرام نشان داد که همه‌ی سلول‌های فعال‌شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در فاز G1 سیکل سلولی بودند ولی بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت سلول‌ها وارد فاز S و G2/M هم شده بودند.

نتیجه‌گیری: طول مدت تحریک لنفوسیت T از طریق گیرنده‌ی سلول T و به کمک محرک آن (CD28) برای خارج شدن سلول‌ها از فاز G0 و ورود آن‌ها به فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی بسیار مهم و ضروری می‌باشد. دوز سلول‌های تحریک‌شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت زمان کافی برای خروج سلول از فاز G1 وجود نداشت و همه‌ی سلول‌ها در فاز G1 مشاهده شدند، ولی بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت زمان کافی برای ورود سلول‌ها به فاز S و G2/M وجود داشت.

واژگان کلیدی: سیکل سلولی، سلول‌های T، فلوسیتومتری

مقدمه

تکثیر لنفوسیت T برای ایجاد پاسخ ایمنی آداپتیو ضروری است. تکثیر لنفوسیت T توسط سه نوع مولکول سطحی تنظیم می‌شود. مرحله‌ی اصلی شناسایی پپتید توسط گیرنده‌ی سلول T (TCR یا T cell receptor) و کمک محرک‌هایی همچون CD28 ایجاد می‌شود (۴-۱). تکثیر لنفوسیت‌های T که با درگیری گیرنده‌های سلول T و گیرنده‌های کمک تحریکی آغاز می‌شود موجب بیان و ترشح فاکتورهای رشد سلول T یعنی اینترلوکین ۲ (IL-2) و گیرنده‌ی آن می‌شود. IL-۲ با برهم‌کنش با گیرنده باعث فعال‌سازی چندین مسیر پیام‌دهی داخل سلولی و در نهایت ورود سلول به سیکل سلولی و گسترش کلنی سلول‌ها می‌شود. در شرایط In vivo با همکاری سایر مولکول‌های کمک تحریکی و سایتوکاین‌ها، آنتی‌ژن‌ها ممکن است باعث حفظ تکثیر سلول‌های T فعال شده

[۱] کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرجان قراگوزلو
Email: marjangh@gmail.com

شوند. میزان و طول مدت درگیری TCR و CD28 هر دو برای ترک فاز G0 سیکل سلولی ضروری هستند (۵). فعال‌سازی کامل سیگنال ۱ و ۲ در لنفوسیت‌های T باعث فعال‌سازی مولکول‌هایی در داخل سلول مانند انتقال‌دهنده‌های سیگنال و فعال‌کننده‌های نسخه‌برداری و آبشارهای پروتئین کینازی فعال شده با مایتوژن می‌شوند. این مولکول‌ها نقش مهمی در سیگنال‌های مشتق از سایتوکاین، سنتز پروتئین و گسترش سلول‌های T از طریق عبور از فاز G به فاز S سیکل سلولی دارند (۶). پیشرفت سیکل سلولی از طریق افزایش بیان در گروهی از پروتئین‌ها به نام سایکلین‌ها انجام می‌شود. این پروتئین‌ها وقتی به مقدار کافی در سلول وجود داشته باشند کینازهای وابسته به سایکلین‌ها (Cyclin-dependent kinase یا CDK) را که برای عبور از فاز G۱ به S ضروری هستند، فعال می‌کنند (۷).

هدف استراتژی‌های سرکوب ایمنی که در حال حاضر وجود دارد و در آینده خواهند آمد، جستجوی مولکول‌های جدیدی در این مسیر سیگنالینگ برای فعال‌سازی سلول‌های T مورد نیاز هستند، است (۶). تنها نسبت کمی از لنفوسیت‌های T به دست آمده از گردش خون یا ارگان‌های لنفوییدی، در شرایط In vitro به طور خود به خودی تقسیم می‌شوند، اما اکثریت آن‌ها توانایی ورود به سیکل سلولی را هنگامی به دست می‌آورند که در محیط کشت تحریک شوند. آنتی‌ژن‌های خاص به صورت محلول یا متصل به سطح سلول در شرایط In vitro لنفوسیت‌ها را تحریک می‌کنند (۸). آنتی‌بادی‌ها بر ضد CD۳ (Anti-CD3) عناصر اصلی در بسیاری از پروتکل‌های تکثیر سلول‌های T هستند. Anti-CD3 از طریق جزیی از کمپلکس گیرنده‌ی سلول T یعنی CD3 پیام تکثیر قوی را ارسال می‌کند (سیگنال ۱)، ولی در فقدان پیام‌های کمک تحریکی (سیگنال ۲) نتیجه‌ی تکثیر اغلب آپوپتوز یا آنرژی در سلول‌های T است (۹).

در سال های اخیر فلوسایتومتری روشی جدید، مفید و سریع برای تعیین مقدار نسبی DNA در نمونه های کلینیکی شده است. آنالیز سیکل سلولی توسط تعیین مقدار نسبی DNA یکی از کاربردهای فلوسایتومتری است و ترسیم هیستوگرام DNA یک تصویر ثابت از نسبت سلول‌ها در فازهای مختلف سیکل سلولی است (۱۲-۱۰). کیفیت هیستوگرام DNA از پهنای (Width) پیک DNA سلول‌ها در فاز G1 سیکل سلولی ارزیابی می‌شود که توسط ضریب ثابت تغییر (Coefficient variation یا CV) سرتاسر پیک اندازه گیری می‌شود (۱۳). فلوسایتومتری علاوه بر تعیین محتوای نسبی DNA سلول، توزیع سلولی را در فازهای مختلف سیکل سلولی نشان می‌دهد. در یک جمعیت سلولی در حال تکثیر سه فاز مختلف تشخیص داده می‌شود: G0/G1 که سلول‌ها در حالت تقسیم نیستند، S که فاز سنتز DNA است و نیز فاز G2/M. با توجه به این که فازهای G2 و M (میتوز) محتوای DNA یکسانی دارند، بر اساس تفاوت در محتوای DNA از هم قابل تشخیص نیستند (۱۴). یک ویژگی معمول آنالیز DNA برای سیکل سلولی یافتن سلول‌های دوتایی (Doublet) و تکی (Single) می‌باشد. با ترسیم نمودار نقطه‌ای Width (FL2W) در برابر Area (FL2A) می‌توان سلول‌های Doublet در فاز G1 را از سلول‌های تکی G2/M11 تشخیص داد (۱۲-۱۱) (شکل ۱). چندین رنگ فلورسنت وجود دارند که قابلیت اتصال به DNA را دارند. پروپیدیوم

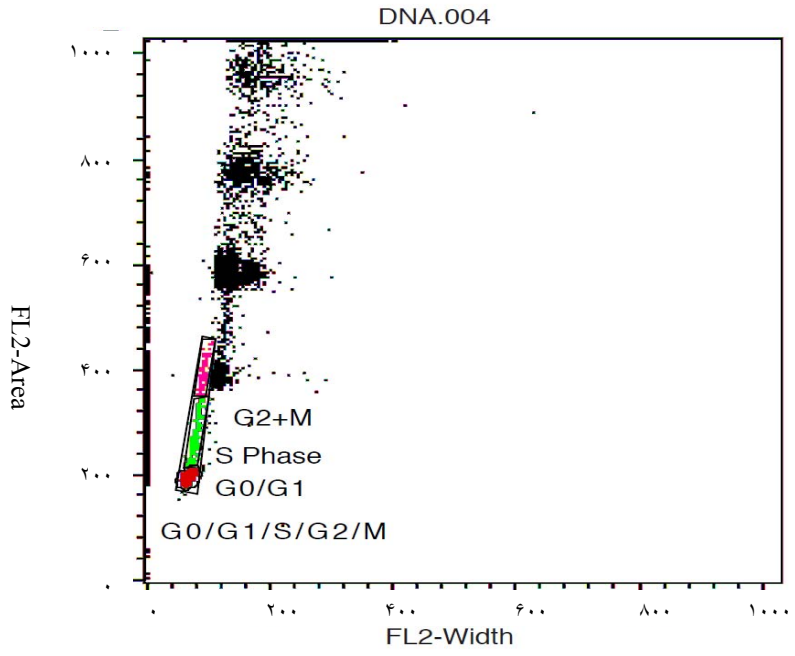
www.mui.ac.ir

یداید (Propidium iodide یا PI) رنگ عمده‌ای است که کاربرد گسترده‌ای دارد. PI در بین زنجیره‌های دو رشته‌ای اسید نوکلئیک قرار می‌گیرد و توسط لیزر آرگون در طول موج ۴۸۸ نانومتر تحریک می‌شود و نور فلورسانس قرمز را از خود پراکنده می‌سازد و چون از ورود این رنگ توسط سلول‌های زنده به داخل جلوگیری می‌شود یک راه تشخیص سلول‌های زنده از مرده، استفاده از همین نوع رنگ است (۱۵).

هدف از این مطالعه، بررسی سیکل سلولی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD28 در زمان‌های انکوباسیون مختلف با استفاده از فلوسایتومتری بود. در این مطالعه از رنگ PI برای بررسی سیکل سلولی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD28 و زمان‌های انکوباسیون مختلف استفاده شد.

روش‌ها

در ابتدا جهت فعال کردن لنفوسیت‌های T از میان سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs یا Peripheral blood mononuclear cells)، آنتی‌بادی Anti-CD3 (OKT3) (شرکت eBioscience) با غلظت ۵ میکروگرم در میلی میتر، در محلول بافر نمکی فسفات شده‌ی استریل (Phosphate buffered saline یا PBS) (شرکت Sigma) رقیق شد. سپس آنتی‌بادی به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در کف چاهک‌های پلیت‌های کشت ۲۴ خانه ریخته شد تا آنتی‌بادی کف چاهک‌ها را بپوشاند. سپس پلیت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از این مدت زمان پلیت از دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد خارج شد و محلول آنتی‌بادی رقیق شده با سمپلر برداشته شد و ۱ تا ۲ بار با ۲۰۰ میکرولیتر PBS استریل شستشو داده شد.



شکل ۱. نمودار نقطه‌ای FL2A/FL2W برای محتوای DNA و تشخیص Doublet محدوده‌ای در اطراف جمعیت G0/G1/S/G2/M ایجاد شده است (۱۳).

پس از آن ۱۰ سی‌سی خون از فرد داوطلب سالم تهیه و به یک لوله ی استریل انتقال داده شد و با PBS استریل رقیق گردید. سلول‌های تک هسته‌ای از خون رقیق شده با انجام سانتریفیوژ شیب چگالی بر روی فایکول (Ficoll-paque) جدا شدند. پس از شستشوی سلول ها، توسط محیط کشت استریل RPMI ۱۶۴۰ (Roswell park memorial institute medium) (شرکت Sigma)، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی تهیه شد. شمارش سلول‌ها توسط لام نئوبار انجام شد و پس از آن سلول‌ها به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که روز قبل با آنتی‌بادی Anti-CD3 پوشش داده شده بود، انتقال داده شد و به سلول‌ها محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ کامل که دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS یا Fetal bovine serum) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین- استرپتومایسین بود، اضافه شد تا حجم هر چاهک به ۱ سی‌سی برسد.

پس از آن به چاهک‌ها آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-CD28 (شرکت eBioscience) با غلظت۲ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد و پلیت‌ها برای مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت جهت بررسی میزان تکثیر سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 با غلظت ۵ درصد قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان‌های مورد نظر، سلول‌ها با سمپلر از کف چاهک‌های پلیت‌ها برداشته و در لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری ریخته شدند و با PBS سرد شستشو شدند. پس از آن به سلول‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هایپوتونیک PI که شامل ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ریبونوکلئاز A ۰/۱ درصد، Triron x-۱۰۰، سدیم سیترات ۰/۱ درصد و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PI بود، اضافه شد. سلول‌ها حداقل ۲۰ دقیقه و حداکثر ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سیکل سلولی لنفوسیت‌های T توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد. از آن جایی که سلول‌ها باید نفوذپذیر شوند تا رنگ به داخل آن‌ها وارد شود، Triron x-۱۰۰ که از دترجنت‌ها می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. ریبونوکلئاز A هم برای حذف RNA احتمالی در نمونه به کار رفت. پس از این که دستگاه فلوسایتومتری آماده شد، سلول‌ها برای بررسی به دستگاه داده شد. با توجه به این که هر گونه اختلال در جریان نمونه در دستگاه فلوسایتومتر CV را افزایش می‌دهد، غلظت سلول‌ها بالا (بین $۱۰^۵ \times ۵-۲$) و سرعت خوانش دستگاه (Run) پایین بود (۱۳).

با ترسیم نمودارهای SSC-FSC (Side scatter-forward scatter) سلول‌ها به صورت نقاطی در نمودار ظاهر شدند. SSC و FSC باعث تمایز سلول های مختلف در یک زیر جمعیت مخلوط از سلول‌های گوناگون شده، می‌شوند. در این نمودار لنفوسیت‌ها که هم اندازه‌ی کوچک‌تر و هم گرانولیتی کمتری دارند، در ناحیه‌ای از نمودار قرار گرفتند که کمترین SSC و FSC را نشان می‌دهند (۱۵). میزان فلورسنت سلول‌ها به صورت منحنی روی نمودار هیستوگرام مشخص شد. یک نمودار نقطه‌ای Width در برابر Area رسم شد و محدوده‌ای در اطراف سلول‌ها ایجاد شد (Gating) تا سلول‌های تکی انتخاب شوند. پس از آن یک نمودار هیستوگرام با پارامتر اصلی FL2A برای مشخص شدن الگوی سیکل سلولی با فازهای مختلف ترسیم شد. فلورسنت پروپیدیوم یداید DNA هر سلول با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری استاندارد FACScan اندازه‌گیری شد (شرکت Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA).

نتایج فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار WinMDI نسخه‌ی ۲/۸ انجام شد و آنالیز هیستوگرام DNA سیکل سلولی با استفاده از برنامه ی Cylchred انجام شد. لازم به ذکر است که هر تست سه بار تکرار شد.

یافته‌ها

سلول‌های T تحریک شده پس از مدت زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در زیر میکروسکوپ از نظر عدم وجود آلودگی و همچنین میزان پایداری (Viability) سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو بررسی شدند و سلول‌هایی با Viability بیشتر از ۹۸ درصد برای ادامه‌ی مراحل به کار رفتند. با مشاهده‌ی میکروسکوپی در کشت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته مشخص شد که میزان تکثیر در سلول‌ها بسیار کم بوده است و آنالیز سیکل سلولی سلول‌های تحریک شده با استفاده از نمودارهای هیستوگرام هم نشان داد که سلول‌های تحریک شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت همه در فاز G1 سیکل سلولی بودند ولی سلول‌ها بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت وارد فاز S و G2/M هم شده بودند (جدول ۱و شکل ۲).

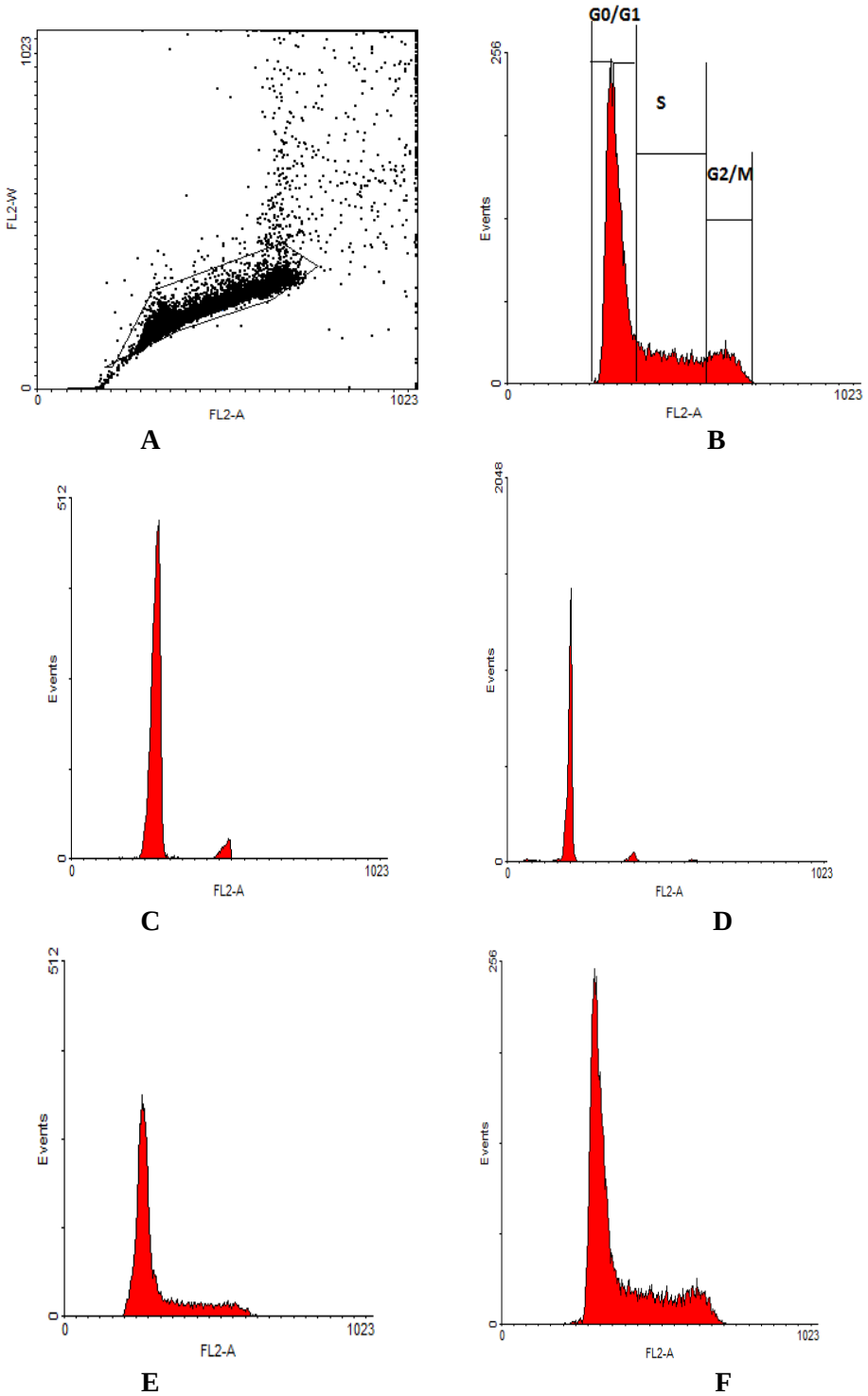
جدول ۱. درصد سلول‌های T تحریک شده با آنتی‌بادی‌های Anti-CD3 و Anti-CD28 در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی

زمان انکوباسیون ساعت	درصد سلول‌ها در فازهای سیکل سلولی انحراف معیار ± میانگین		
	G1	S	G2/M
۷۲	۶۱/۸ ± ۸/۸	۲۶/۴ ± ۶/۹	۱۱/۶ ± ۳/۸
۹۶	۴۳/۹ ± ۴/۸	۴۹/۱ ± ۴/۷	۶/۹ ± ۲/۲

بحث

همان طور که گفته شد یک ویژگی معمول آنالیز DNA برای سیکل سلولی یافتن سلول‌های دوتایی و تکی می‌باشد. سلول‌های دوتایی وقتی تشکیل می‌شود که دو سلول با محتوای DNA فاز G1 به صورت یک سلول با محتوای DNA مشابه فاز G2/M توسط فلوسایتومتر ثبت شود. اگر نمونه‌ای دارای تعداد زیادی سلول‌های دوتایی باشد، می‌تواند تعداد نسبی سلول‌ها در فاز G2/M سیکل سلولی را افزایش دهد و جمعیت G2/M به اشتباه تخمین زده شود. به منظور تصحیح این خطا، دستگاه های فلوسایتومتری این توانایی را دارند تا سلول‌های دوتایی را از تکی جدا کنند. نور فلورسنت نشر شده از رنگ DNA (FL2) یک سیگنال الکترونیک تولید می‌کند که می‌تواند به صورت High (FL2-H) برای شدت رنگ ثبت شود و همچنین به صورت FL2-A و FL2-W نمونه اندازه‌گیری شود. با ترسیم نمودار نقطه‌ای FL2-W در برابر FL2-A می‌توان سلول‌های دوتایی در فاز G1 را از سلول‌های تکی G2/M تشخیص داد (۱۶، ۱۳). DNA سلول‌ها در فاز G2/M دو برابر DNA سلول‌ها در فاز G1 است، ولی قطر هسته تنها در حدود ۲۵ درصد بیشتر است. بنابراین این ها یک پیک سیگنال بلندتر در مقایسه با سلول‌های به هم چسبیده (Clumped) در G1 دارند، ولی پهنای باریک‌تری دارند (۱۲-۱۱).

مطالعه‌ی حاضر می‌تواند در راه‌اندازی تست فلوسایتومتری جهت بررسی شرایط و زمان‌های انکوباسیون مناسب برای تحریک لنفوسیت‌های T با Anti-CD3 و Anti-CD28 برای ورود به سیکل سلولی و تکثیر این سلول‌ها در شرایط In vitro و بررسی فازهای مختلف سیکل سلولی مفید باشد. در این مطالعه دیده شد که سلول‌های T تحریک شده با Anti-CD3 و Anti-CD28 پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، وارد چرخه‌ی سلولی نشده بودند



شکل ۲. نمودار هیستوگرام سیکل سلولی لنفوسیت‌های **T** فعال‌شده‌ی انسانی. شدت فلورسنت **PI** توسط فلوسایتومتری اندازه‌گیری شده است. هیستوگرام **A** نشان‌دهنده‌ی سلول‌های تکی جدا شده است که با ترسیم **FL2-W** در برابر **FL2-A** به دست آمده‌اند. هیستوگرام **B** نمایانگر یک الگوی تیپیک فازهای **G0/G1/S/G2/M** سیکل سلولی در یک لنفوست **T** می‌باشد. هیستوگرام‌های **C** تا **F** الگوی سیکل سلولی لنفوسیت‌های **T** را به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از فعال‌سازی نشان می‌دهد. هیستوگرام‌های **C** و **D** تنها دارای پیک **G1** هستند ولی **E** و **F** دارای هر سه پیک **G1/S/G2/M** هستند.

و تکثیر را شروع نکرده بودند و همه‌ی سلول‌ها در فاز G1 بودند، ولی ۷۲ ساعت پس از فعال سازی تعدادی از سلول‌ها به تدریج در حال ورود به فازهای S و G2/M بودند و در ۹۶ ساعت پس از فعال سازی به مقدار کافی تحریک و وارد سیکل سلولی شدند. بنابراین تکثیر سلول‌ها اتفاق افتاده بود. همچنین آپوپتوز به میزان قابل توجهی در سلول‌ها دیده نشد، بنابراین بهترین زمان انکوباسیون برای تحریک و تکثیر لنفوسیت‌های T، ۹۶ ساعت در نظر گرفته شد.

از آن جایی که سلول‌ها برای ورود به سیکل سلولی و تکثیر، به دریافت دو سیگنال نیاز دارند، پس از دریافت سیگنال های مورد نیاز، آبشارهای انتقال پیام به کمک مولکول های واسطه در درون سلول‌ها به راه می‌افتد که نتیجه‌ی آن تولید فاکتورهای رشد مورد نیاز برای ورود به چرخه‌ی سلولی و تکثیر سلول می‌باشد. برای فعال شدن کامل این مسیرها و مولکول‌های سیگنال‌دهی زمان مناسب اهمیت بسیاری دارد (۱۶). در واقع طول مدت تحریک لنفوسیت T از طریق TCR و کمک محرک آن (CD28) برای خارج شدن سلول از فاز G0 و ورود آن به فاز G1 سیکل سلولی بسیار مهم و ضروری می‌باشد (۱).

بنابراین، تکثیر بسیار کم لنفوسیت‌های T که ۲۴ و ۴۸ ساعت تحریک شده بودند به دلیل کافی نبودن زمان برای تکمیل فعال سازی آبشارهای سیگنال دهی بوده است، ولی در تحریک ۷۲ ساعته‌ی لنفوسیت‌ها، زمان کافی برای فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی و ورود به سیکل سلولی فراهم شده بود و سلول‌ها سیکل سلولی را به طور کامل طی کردند و تکثیر شدند.

اگر چه مکانیسمی که توسط آن رشد سلولی و سیکل سلولی هماهنگ می‌شود تا حد زیادی ناشناخته مانده است، ولی پروتئین‌های پیام‌دهی اصلی که هم رشد و هم پیشرفت سیکل سلولی را در گونه‌های مختلف تنظیم می‌کنند شناخته شده‌اند. این پروتئین‌ها از طریق مولکول‌های اجرایی که در مسیر پیام‌دهی قرار گرفته‌اند ترجمه‌ی mRNA پروتئین های سیکل سلولی را تنظیم می‌کنند و باعث پیشرفت فاز G1 به S و تکثیر سلولی می‌شوند (۱۷). به دست آوردن شرایط مناسب تحریک لنفوسیت‌های T در In vitro می‌تواند برای کاربردهای درمانی قابل بررسی و استفاده باشد و از نتایج به دست آمده برای بررسی اثر داروها بر سیکل سلولی لنفوسیت‌های T استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل اجرای طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۰۲۶۹ بود که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب گردید و هزینه‌ی آن توسط این معاونت تأمین شد.

References

1. Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. J Immunol 2006; 176(5): 2730-8.
2. Shi M, Lin TH, Appell KC, Berg LJ. Cell cycle progression following naive T cell activation is independent of Jak3/common gamma-chain cytokine signals. J Immunol 2009; 183(7): 4493-501.
3. Drela N, Zesko I, Jakubowska M, Biernacka M. CD28 in thymocyte development and peripheral T cell activation in mice exposed to suspended particulate matter. Toxicol Appl Pharmacol 2006; 215(2): 179-88.
4. Reedquist KA, Bos JL. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in

human T lymphocytes. J Biol Chem 1998; 273(9): 4944-9.
5. Breslin EM, White PC, Shore AM, Clement M, Brennan P. LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit T-cell proliferation. Br J Pharmacol 2005; 144(6): 791-800.
6. Kirken RA, Wang YL. Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTor. Transplant Proc 2003; 35(3 Suppl): 227S-30S.
7. Zhao YM, Zhou Q, Xu Y, Lai XY, Huang H. Antiproliferative effect of rapamycin on human T-cell leukemia cell line Jurkat by cell cycle arrest and telomerase inhibition. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(4): 481-8.
8. Richman DP. Lymphocyte cell-cycle analysis by flow cytometry. Evidence for a specific postmitotic phase before return to G0. J Cell Biol 1980; 85(2): 459-65.
9. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. J Transl Med 2010; 8: 104.
10. Ochatt SJ. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). [Online]. 2006. Available from: URL:http://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/FlowCytometry.pdf.
11. Ormerod MG. Analysis of DNA-general methods. In: Ormerod MG, editor. Flow Cytometry - A Basic Introduction.Oxford, NY: University of Oxford; 2008.
12. Ormerod MG. Cell proliferation. In: Ormerod MG, editor. Flow Cytometry - A Basic Introduction.Oxford, NY: University of Oxford; 2008.
13. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr Issues Mol Biol 2001; 3(3):67-70.
14. Kang K, Lee SB, Yoo JH, Nho CW. Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells. Biotechnol Lett 2010; 32(8): 1045-52.
15. Zarkesh Esfahani SH, Etemadi Far Z, Karim Pour N. The principals of flow cytometry and its applications in biological sciences. Isfahan: Isfahan University; 2010.
16. Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP, Zarek PE, et al. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. J Immunol 2007; 178(4): 2163-70.
17. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. Mol Cell Biol 2004; 24(1): 200-16.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 198, 4th week, September 2012 Received: 19.6.2012 Accepted: 15.8.2012

Assessing Cell Cycle of Human T Lymphocytes Activated by Anti-CD3 and Anti-CD28 Monoclonal Antibodies Using Flow Cytometry in Vitro

Elahe Noorijavid MSc[1], Marjan Gharagozloo PhD[2], Abbas Rezaei PhD[3]

Abstract

Background: T lymphocyte proliferation is central for adaptive immune response. Proliferation of T lymphocytes is initiated by the engagement of T cell receptor (TCR) and costimulatory receptors (CD28) which culminate with cell cycle entry and clonal expansion. This study aimed to use flow cytometry test to assay cell cycle of human T lymphocytes activated by anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies in different incubation times in vitro.

Methods: After obtaining 10 cc heparinized blood samples from normal volunteer donors, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by ficoll density-gradient centrifugation. The cells were then activated with anti human CD3 (OKT3) at 5 µg/ml and soluble anti human CD28 monoclonal antibody at 2 µg/mL in coated 24-well plates. Incubation was conducted at 37°C for 2 hours or at 4°C overnight. Finally, cell cycle analysis was performed using flow cytometry.

Findings: Cell cycle histogram of activated T lymphocytes showed all the cells in G1 phase 24 and 48 hours after activation. However, activated cells entered into S and G2M phases 72 and 96 hours after activation.

Conclusion: The degree and the length of TCR and CD28 occupancy are both critical for T cells to leave the G0 stage and enter different phases of cell cycle. Activation of Activated T cells need more than 24 and 48 hours to progress out of G1 phase. However, the cells could progress to S and G2 phases 72 and 96 hours after activation.

Keywords: Cell cycle, T lymphocytes, Flow cytometry

[1] 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.
Corresponding Author: Marjan Gharegozloo PhD, Email: marjangh@gmail.com