مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۹/هفته سوم آذر ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۳۱

روش شناسایی و تعیین درصد لنفوسیت‌های TH17 در خون محیطی به روش فلوسایتومتری

نسرین سرشکی[۱]

خلاصه

مقدمه: برای جدا کردن لنفوسیت‌های TH17 از سایر لنفوسیت‌ها از مارکرهای CD4 و IL-17 می‌توان استفاده نمود. بهترین روش برای شناسایی این سلول‌ها در خون محیطی روش فلوسایتومتری می‌باشد. در این مطالعه برای تعیین غلظت TH17 غلظت‌های مختلف مواد تحریک کننده و زمان انکوباسیون متفاوت را بررسی کردیم.

روش‌ها: در نمونه‌ی خون هپارینه یک داوطلب، لنفوسیت‌های با استفاده از فایکول جدا و سه غلظت متفاوت از سوسپانسیون سلولی در کنار سه غلظت متفاوت از PMA، یونومایسین و مونسین کشت داده شد (از هر غلظت سه سری) و در سه زمان متفاوت (۶، ۱۲ و ۲۰ ساعت) در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت شرایط CO_2 انکوبه شد.

یافته‌ها: درصد لنفوسیت‌های TH17 در سوسپانسیون سلولی ۲×۱۰^۶ سلول بود که همراه با غلظت ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA، ۱/۵ میکرومول یونومایسین و ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین کشت داده شده و ۱۲ ساعت انکوبه شده بود، مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: هر آزمایشگاهی باید با توجه به شرایط و دستگاه‌های موجود روش بهینه‌ی خود را تعیین کند.

واژگان کلیدی: لنفوسیت‌های TH17، یونومایسین، فوربول میریستات استات، مونسین.

مقدمه

لنفوسیت‌های TH17 زیر مجموعه‌ای از لنفوسیت‌های $TCD4^+$ هستند که به دلیل تولید مقدار قابل توجهی IL-17 به این شکل نام‌گذاری شده‌اند (۱). بنابراین برای جدا کردن این لنفوسیت‌ها از سایر لنفوسیت‌ها، چه در خون و چه در بافت، می‌توان از مارکرهای CD4 و IL-17 استفاده نمود. بهترین روش برای شناسایی این سلول‌ها در خون محیطی روش فلوسایتومتری می‌باشد.

فلوسایتومتری روشی است که توانایی اندازه‌گیری چندین خصوصیت خاص از ذرات (اغلب سلول) را به طور همزمان دارا می‌باشد. این خصوصیات شامل اندازه‌ی ذره، گرانولیتی ذره یا ترکیبات موجود در ذره، و شدت فلورسانس ذره می‌باشد. این مشخصات با کمک یک سیستم اپتیکی- الکترونیکی تعیین می‌شوند (۲). پس برای جداسازی لنفوسیت‌های TH17 می‌توان از آنتی‌بادی‌های متصل به رنگ‌های فلورسنت علیه شاخص‌های سطحی CD4 و IL-17 استفاده نمود (۲).

CD4 مارکری است که در حالت عادی در سطح سلول بیان شده و رنگ‌آمیزی آن به سادگی انجام می‌شود ولی IL-17 سایتوکینی است که در حالت فعال سلول توسط سلول تولید و به بیرون سلول ترشح می‌شود. به همین علت برای تشخیص TH17 با این شاخص باید ابتدا سلول تحریک و فعال شود که برای این کار از فوربول میریستات استات (Phorbol myristate acetate یا PMA) و یونومایسین استفاده می‌کنیم. همچنین برای جلوگیری از ترشح IL-17 به خارج از سلول از مونسین استفاده می‌کنیم. مقاله‌های مختلف غلظت و زمان‌های انکوباسیون

[۱] کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: نسرین سرشکی
Email: sereshki@resident.mui.ac.ir

متفاوتی برای تعیین درصد لنفوسیت‌های TH17 به کار برده‌اند. در این مطالعه به بررسی غلظت بهینه‌ی مواد تحریک کننده و زمان انکوباسیون مناسب برای تعیین غلظت لنفوسیت‌های TH17 پرداختیم.

روش‌ها

۲۰ سی‌سی خون حاوی هپارین از یک داوطلب تهیه و PBMC آن به روش گرادیان چگالی فایکول (برای آنالیز فلوسیتومتری) جداسازی شد. به این صورت که ابتدا خون با بافر PBS با نسبت ۱ به ۲ رقیق شد. ۱۰ سی‌سی از خون رقیق شده به ۱۰ سی‌سی فایکول اضافه و سپس در دور ۲۷۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. سپس PBMCها که بین پلاسما و گلبول‌های قرمز قرار گرفته بودند با کمک پیپت پاستور جدا شدند. در مرحله‌ی بعدی سوسپانسیون‌های سلولی با دانسیته‌ی ۲×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر از PBMC در محیط کشت کامل (RPMI1640 مکمل شده با پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، گلوتامین ۲ میکروموکل و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد غیر فعال شده با گرما) تهیه و به کشت‌ها PMA به اضافه یونومایسین به عنوان تحریک کننده و مونسین به عنوان مهار کننده‌ی ترشح IL-17 به خارج سلول، اضافه گشت و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت شرایط CO_2 انکوبه شد. مقادیر مواد اضافه شده به کشت‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. مواد اضافه شده به سوسپانسیون سلولی حاوی ۲×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶} سلول

لنفوسیت‌های تحریک نشده (شاهد)	ایزوتایپ شاهد	لنفوسیت‌های تحریک شده		
۲×۱۰^{۵} سلول	۲×۱۰^{۵} سلول ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۵} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱/۵ میکرومول یونومایسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۵} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱ میکرومول یونومایسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۵} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۰/۵ میکرومول یونومایسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین
۱×۱۰^{۶} سلول	۱×۱۰^{۶} سلول ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۱×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱/۵ میکرومول یونومایسین ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۱×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱ میکرومول یونومایسین ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۱×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۰/۵ میکرومول یونومایسین ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین
۲×۱۰^{۶} سلول	۲×۱۰^{۶} سلول ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱/۵ میکرومول یونومایسین ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۱ میکرومول یونومایسین ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین	۲×۱۰^{۶} سلول ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر PMA ۰/۵ میکرومول یونومایسین ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مونسین

تهیه‌ی این کشت در سه سری و انکوباسیون آن‌ها به مدت ۶، ۱۲ و ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت شرایط CO_2 انجام شد.

www.mui.ac.ir

بعد از انکوباسیون، محتوای چاهک‌ها به لوله‌های ۵ سی‌سی منتقل و دردور ۱۵۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از این سلول‌ها برای رنگ‌آمیزی شاخص‌های سطحی و داخل سلولی استفاده شد.

برای رنگ‌آمیزی، سلول‌ها داخل لوله‌ها ریخته شدند و یک مرتبه با سالین بافر فسفات شسته شدند. سپس ۳ میکرولیتر FITC آنتی‌هیومن CD4 (از شرکت BD PHARMINGEN) به آن‌ها اضافه شد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از این مدت، سلول‌ها ابتدا با کمک بافرهای فیکس کننده و نفوذ پذیر کننده (که از شرکت BD PHARMINGEN آمریکا خریداری شدند) و مطابق با دستورالعمل گفته شده‌ی شرکت سازنده، فیکس و در مرحله‌ی بعد نفوذپذیر شدند.

۵ میکرولیتر آنتی‌بادی درون سلولی PE آنتی‌هیومن IL-17A به لوله‌ی حاوی PBMC اضافه و پس از انکوباسیون، با دستگاه فلوسیتومتری BD آنالیز شدند.

یافته‌ها

درصد لنفوسیت‌های +CD4 و +IL-17 در لنفوسیت‌های کشت داده شده در پلیت‌هایی که ۶ ساعت انکوبه شده بودند نزدیک به صفر بود. در کشت‌هایی که دوره‌ی انکوباسیون ۲۰ ساعته داشتند هیچ لنفوسیتی مشخص نشد و آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که همه‌ی سلول‌ها دچار مرگ شده‌اند.

در کشت‌هایی که به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شده بودند در غلظت‌های سلولی ۲×۱۰^{۵} سلول و ۱×۱۰^{۶} سلول درصد سلول‌های +CD4 در مقایسه با شاهد تحریک نشده به شدت کاهش یافته بود و در نتیجه میزان سلول‌های +CD4 و +IL17 نیز به ترتیب در حدود صفر و دهم درصد مشخص شد.

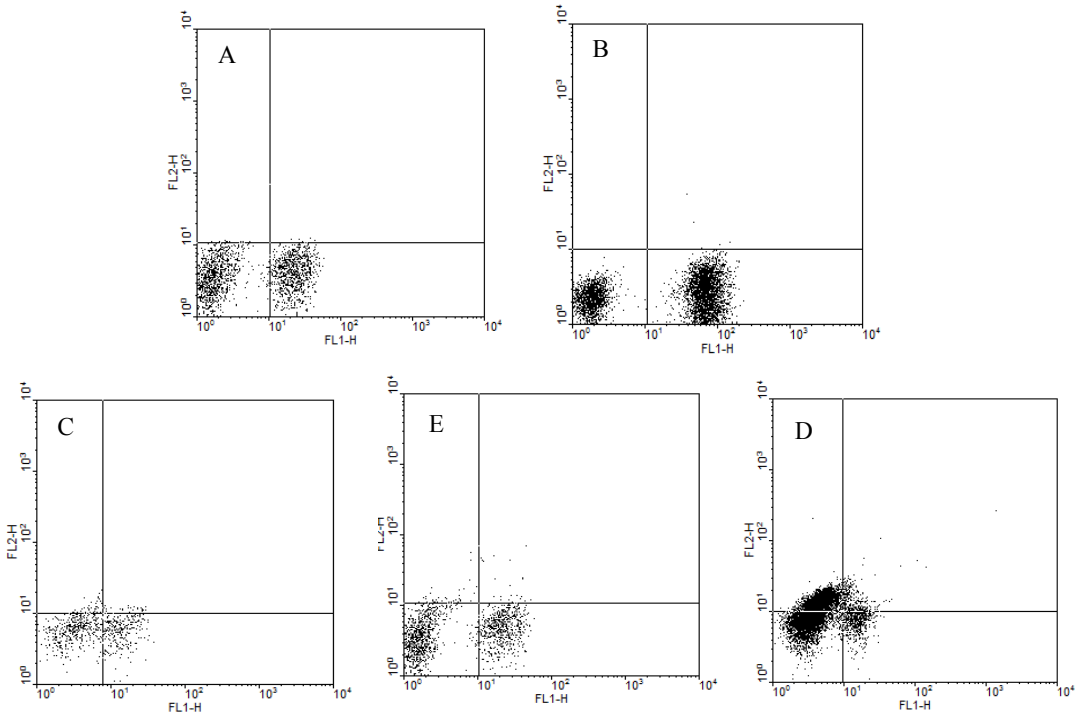
بیشترین درصد لنفوسیت‌های +CD4 و +IL17 در کشتی مشاهده شد که سوسپانسیون سلولی با دانسیته‌ی ۲×۱۰^{۶} سلول در غلظت‌های PMA برابر ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، یونومایسین برابر ۱/۵ میکرومول و مونسین برابر ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شده بود (شکل ۱).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در زمان انکوباسیون کمتر از شش ساعت سلول‌ها فرصت کافی برای تحریک شدن را نخواهند داشت و زمان ۲۰ ساعت منجر به مرگ سلول‌ها خواهد شد. این مرگ سلولی می‌تواند به دلیل آپوپتوز و یا اثر سمی مواد تحریک کننده و مونسین باشد. برای فهمیدن این مطلب مطالعات بیشتری لازم است.

ما در این کار نشان دادیم که برای مشخص کردن درصد لنفوسیت‌های +CD4 و +IL17 در خون محیطی به روش فلوسایتومتری بهترین زمان ۱۲ ساعت و بهترین غلظت، غلظت‌های PMA برابر ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، یونومایسین برابر ۱/۵ میکرومول و مونسین برابر ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و غلظت سلولی ۲×۱۰^{۶} سلول بود.

Cheng و همکاران از غلظت‌های PMA برابر ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، یونومایسین برابر ۱ میکرومول و مونسین برابر ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و انکوباسیون ۴ ساعت و سوسپانسیون سلولی ۲×۱۰^{۶} سلول برای مشخص کردن درصد لنفوسیت‌های +CD4 و +IL-17 در خون محیطی استفاده نمودند (۳).



شکل ۱. نمودار نقطه‌ای فلوسایتومتری

A: سوسپانسیون سلولی ۲×۱۰^{۶} سلول تحریک نشده

B: ۲×۱۰^{۶} سلول، ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر **PMA**، یونومایسین ۱/۵ میکرومول، مونسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۶ ساعت انکوباسیون

C: ۲×۱۰^{۶} سلول، ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر **PMA**، یونومایسین ۱/۵ میکرومول، مونسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۱۲ ساعت انکوباسیون

D: ۲×۱۰^{۶} سلول، ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر **PMA**، یونومایسین ۱/۵ میکرومول، مونسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۱۲ ساعت انکوباسیون

E: ۲×۱۰^{۶} سلول، ۱۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر **PMA**، یونومایسین ۱/۵ میکرومول، مونسین ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۱۲ ساعت انکوباسیون

Rong و همکاران نیز غلظت‌های مشابه Cheng را با انکوباسیون ۵ ساعته برای مشخص کردن این سلول‌ها به کار بردند (۴).

مطالعات مختلف دیگری انجام شده است که از غلظت‌های متفاوت و زمان‌های انکوباسیون متفاوتی استفاده کرده‌اند (۷-۵). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که هر آزمایشگاهی در شروع کار باید بهترین غلظت و بهترین زمان انکوباسیون را برای مشخص کردن درصد TH17 در خون محیطی تعیین کند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از خانم راضیه علی‌پور از گروه ایمنی شناسی به خاطر همکاری های فراوانی که در این مطالعه با نویسنده داشتند. این مطالعه با حمایت مالی معاونت آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

References

1. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. Microbes Infect 2009; 11(5): 625-30.
2. Rahman M. Introduction to Flow Cytometry, AbD SeroTec [online] 2011; Available from: URL: http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf.
3. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang

www.mui.ac.ir

TT, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. Clin Immunol 2008; 127(1): 89-97.
4. Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. Clin Exp Immunol 2009; 156(2): 217-25.
5. Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, Saito S. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. Am J Reprod Immunol 2010; 63(2): 104-9.
6. Schaub B, Liu J, Schleich I, Hoppler S, Sattler C, von ME. Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. Allergy 2008; 63(11): 1438-47.
7. Wang WJ, Hao CF, Yi L, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. J Reprod Immunol 2010; 84(2): 164-70.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 159, 3rd week, December 2011 Received: 10.5.2011 Accepted: 22.8.2011

Detection and Determination of TH17 Lymphocytes Percentage in Peripheral Blood by Flow Cytometry

Nasrin Sereshki MSc[1]

Abstract

Background: CD4 and IL-17 markers can be used for separating TH17 lymphocytes from the population of CD4+ lymphocytes. The best technique for detecting TH17 cells in peripheral blood is flow cytometry in which the cells need to first be activated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin. Moreover, monensin is used in order to prevent interleukin 17 (IL-17) secretion out of cells.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from freshly isolated heparinized venous blood by centrifugation on a Ficoll-Hypaque (Lymphopreb, Sigma, USA) density gradient. Cell suspension was prepared in three concentrations and cultured with three concentrations of PMA, ionomycin and monensin (each concentration was prepared in three series). Then these were incubated for 6, 12, and 20 hours.

Findings: The percentage of TH17 cells was detected by culture of 2×10^6 cells/ml of peripheral blood mononuclear cells with 150 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate, 1.5 µM of ionomycin, and 500 ng/ml of monensin and incubation at 37^oC in a humidified and 5% CO_2 atmosphere for 12 hours.

Conclusion: Optimum procedures have to be determined based on the instruments and conditions of each laboratory.

Keywords: TH17 lymphocytes, Ionomycin, Phorbol myristate acetate, Monensin.

[1] Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Nasrin Sereshki MSc, Email: sereshki@resident.mui.ac.ir