مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۲۳-۱۷

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,1:17-23, 2014

بهینه‌سازی تولید آزمایشگاهی سلول‌های دندریتیک

صمد فراشی بناب[۲،۱] تقی زهرائی صالحی[*۱] نعمت‌اله خوانساری[۲] جمشید حاجتی[۲] احمد مسعود[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

۲) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۴ تیر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: سلول‌های دندریتیک قوی‌ترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن محسوب می‌شوند. این سلول‌ها آنتی‌ژن‌های مختلف را گرفته و پس از فراوری و عرضه آنها به سلول‌های T و همچنین با ترشح سیتوکین‌های مختلف و عوامل محلول دیگر پاسخ‌های ایمنی اختصاصی را فعال می‌سازند. سلول‌های دندریتیک در پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و همچنین القاء تحمل ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی هم نقش دارند. با توجه به اهمیت سلول‌های دندریتیک در پاسخ‌های ایمنی بدن در برابر عفونت‌ها، سرطان‌ها، پیوندبافت، آلرژی‌ها و بیماریهای خودایمن؛ این سلول‌ها هدف بسیاری از مطالعات بنیادی و کلینیکی شده است. در حال حاضر برای مطالعه بیولوژی این سلول‌ها و استفاده از آنها در ایمونوتراپی نیاز به تعداد نسبتاً زیاد سلول‌های دندریتیک است. به علت تعداد کم این سلول‌ها در خون و بافت‌ها و مشکل جداسازی آنها، تولید سلول‌های دندریتیک در آزمایشگاه یک ضرورت محسوب می‌شود. **هدف:** هدف از این مطالعه بهینه‌سازی تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای خون‌ساز مغز استخوان موش در آزمایشگاه بود تا به عنوان الگوئی برای مصارف پزشکی مورد استفاده قرار گیرد. **روش کار:** سلول‌های مغز استخوان در محیط کشت حاوی سیتوکین‌های GM-CSF و IL-4 بدون تخلیه هیچ‌یک از رده‌های سلولی به مدت نه روز کشت داده شدند. هر سه روز یک‌بار محیط کشت تازه حاوی سیتوکین اضافه شد. **نتایج:** بررسی مورفولوژی سلول‌ها و ایمونوفنوتیپ آنها از نظر بیان شاخص‌های سطح سلولی CD11c، MHC2 و CD86 حاکی از تولید سلول‌های دندریتیک از روز دوم کشت بود ولی با افزایش دوره کشت، تعداد سلول‌ها با خصوصیات سلول‌های دندریتیک بیشتر شد. در روز نهم خلوص سلول‌های دندریتیک حدود ۸۶٪ بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** این روش می‌تواند به عنوان روشی کارآمد برای تولید سلول‌های دندریتیک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مغز استخوان، سلول‌های دندریتیک، تولید سلول، پیش‌سازهای خون‌ساز

مقدمه

سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن یا APC (Antigen presenting cells) شامل ماکروفاژها، لنفوسیت‌های B و سلول‌های دندریتیک برای آغاز پاسخ‌های ایمنی اختصاصی از جمله پاسخ‌های ایمنی ضد پاتوژن‌ها و همچنین ایجاد ایمنی ضد توموری مهم هستند (۱،۱۳). سلول‌های دندریتیک کارایی بسیار بیشتری نسبت به سایر APC‌ها در شناسائی و عرضه آنتی‌ژن دارند و قوی‌ترین سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن محسوب می‌شوند (۲۱). این سلول‌ها قادر به گرفتن انواع آنتی‌ژن‌ها و فراوری آنها به پپتیدهای قابل بارگذاری بر روی ملکول‌های MHC1 یا MHC2 و سپس عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T جهت القاء گسترش سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن هستند. سلول‌های دندریتیک در ایمنی هومورال هم نقش دارند و این کار را با فعال‌سازی مستقیم یا غیر مستقیم لنفوسیت‌های B جهت تولید آنتی‌بادی‌ها انجام می‌دهند. سلول‌های دندریتیک همچنین ظرفیت فعال‌سازی لکوسیت‌های ایمنی ذاتی از قبیل سلول‌های NK، NKT و سلول‌های Tγδ را دارند (۳،۶،۱۶،۱۷،۲۷،۲۹). سلول‌های دندریتیک علاوه بر داشتن توانایی منحصر به فرد در القاء پاسخ‌های ایمنی اکتسابیِ اختصاصی آنتی‌ژن؛ در القاء تحمل ایمونولوژیکی (عمدتاً نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی) هم نقش دارند و از این طریق وقوع واکنش‌های خودایمن را در بدن به حداقل می‌رسانند (۳،۱۵،۲۲،۲۹،۳۱). بنابراین سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مهم تأثیرگذار در سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و نقش محوری در پاسخ‌های ایمنی بدن در عفونت‌ها، سرطان‌ها، پیوند بافت، آلرژی‌ها و بیماریهای خودایمن دارند و به همین دلیل هدف بسیاری از مطالعات بنیادی و کلینیکی می‌باشند (۴،۲۹).

در حال حاضر برای مطالعه بسیاری از خصوصیات ساختاری و عملکردی سلول‌های دندریتیک و همچنین استفاده از آنها برای مقاصد کلینیکی نیاز به تعداد نسبتاً زیاد سلول دندریتیک است. با وجود این، جداسازی این سلول‌ها از بدن به تعداد کافی و با شرایط مناسب مشکل و در مواردی غیرممکن است (۲۸،۳۱). بیست سال پیش تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای میلوئید در آزمایشگاه (۷،۸،۲۴) و در دهه گذشته در داخل بدن با انتقال پیش‌سازهای میلوئید مشترک مغز استخوان به موش‌های اشعه دیده (۱۱،۳۰،۳۲) انجام شد. تا به امروز گروه‌های تحقیقاتی مختلف روش‌های گوناگونی برای تولید سلول‌های دندریتیک در آزمایشگاه ارائه کرده‌اند. در اکثر این پروتکل‌ها برای تولید سلول دندریتیک از پیش‌سازهای مغز استخوان برخی از پیش‌سازهای سلولی حذف می‌شوند و از GM-CSF همراه یا بدون IL-4 و دوره کشت

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۵۲ نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۲۷۵۱۷ Email: Tsalehi@ut.ac.ir

۷-۶روزه استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر برای تمایز و تولید سلول‌های دندریتیک؛ سلول‌های مغز استخوان بدون تخلیه هیچ یک از پیش‌سازهای سلولی در حضور سیتوکین‌های GM-CSF و IL-4 به مدت نه روز کشت داده شدند و در طول دوره کشت سلول‌ها از نظر مورفولوژی و بیان شاخص‌های سطح سلولی CD11c، MHC2 و CD86 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

جداسازی سلول‌های مغز استخوان: برای به دست آوردن سلول‌های مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت‌نی موش Balb/C استفاده شد. با انفوزیون محیط کشتِ RPMI1640 سلول‌ها در پتری‌دیش استریل جمع‌آوری و گلبول‌های قرمز با استفاده از بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز (شرکت بیولژند، آمریکا) لیز شدند. پس از شستشو، تعداد سلول‌های به دست آمده و درصد سلول‌های زنده با استفاده از تریپان‌بلو و لام نئوبار بررسی شد. تعداد سلول‌های جداسازی شده از مغز استخوان یک موش بالغ در حدود $۲-۲/۵\times۱۰^{۷}$ بود.

کشت سلول‌های مغز استخوان: اساس کشت برای تمایز سلول‌های مغز استخوان به سلول‌های دندریتیک روش Inaba و همکاران در سال ۱۹۹۲است (۸) و در آن تغییراتی به شرح زیر به منظور بهینه‌سازی داده شد. سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان بدون تخلیه هیچ یک از رده‌های سلولی به تعداد $۰/۷-۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت در پلیت کشت سلول شش خانه کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای $۳۷^{o}C$ و اتمسفر واجد ۵٪ CO2 و ۹۰٪ رطوبت به مدت نه روز انکوبه شدند. محیط کشت استفاده شده RPMI1640 حاوی ۲- مرکاپتواتانل (۵۰μM)، L- گلوتأمین (۲mM)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰U/mL) و استرپتومایسین (۱۰۰μg/mL)، سرم جنین گاو (۱۰٪) بود. به گوده‌های شاهد سیتوکینی اضافه نشد ولی به سایر گوده‌ها IL-۴ (Interleukin 4) نوترکیب موشی (شرکت فارمینژن، آمریکا) به میزان ۵۰۰U/mL و GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) نوترکیبِ موشی (شرکت فارمینژن، آمریکا) به میزان ۱۰۰۰U/mL محیط کشت اضافه شد و هر سه-چهار روز محیط کشت کامل تازه همراه با سیتوکین‌های مذکور اضافه شد.

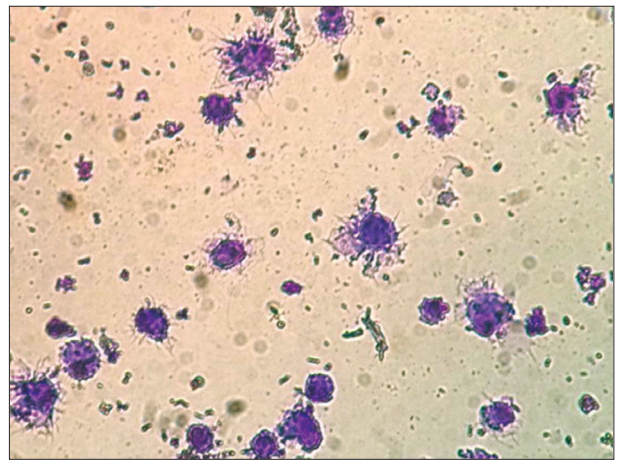
بررسی مورفولوژی سلول‌ها: اندازه و شکل سلول‌های کشت داده شده هر روز با میکروسکپ معکوس بررسی شد.

بررسی شاخص‌های سطح سلولی با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنس (فلوسیتومتری): در سال‌های اخیر مشخص شد که سلول‌های دندریتیک بالغ موش ملکول CD11c (زنجیر اینتگرین α_x) و ملکول‌های تحریک همگام CD80، CD86 و CD40 را بیان می‌کنند و واجد مقادیر متوسط تا زیاد MHC2 هستند (۱۴،۲۷). در مطالعه حاضر برای تأیید تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوانِ کشت داده شده در حضور IL-4 و GM-CSF بیان این شاخص‌ها در سطح سلول‌ها با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس مستقیم بررسی شد. جهت کاهش اتصال غیراختصاصیِ آنتی‌بادی‌های منوکلنال کونژوگه؛ گیرنده‌های CD16/CD32 سلول‌ها با انکوبه کردن سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD16/CD32 بلوک شد. سپس از رقت مناسب آنتی‌بادی‌های منوکلنال کونژوگه با فلوروکروم‌های FITC یا PE مربوط به ملکول‌های CD11c، MHC2، CD86 و آنتی‌بادی‌های کنترل ایزوتیپ مربوطه استفاده شد به این ترتیب که حدود ۲×۱۰^{۵} سلول در ۱۰۰μL بافر فلوسیتومتری با آنتی‌بادی‌های منوکلنال کونژوگه در لوله‌های فلوسیتومتری (شرکت Becton Dickinson، آمریکا) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $۴^{o}C$ و دور از نور انکوبه شدند و پس از شستشوی سلول‌ها، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری مدل BD FACSCalibur (شرکت Becton Dickinson) بیان شاخص‌های مذکور آنالیز شد.

نتایج

بررسی مورفولوژی سلول‌ها: سلول‌های مغز استخوان کشت داده شده در ساعات اولیه کشت کوچک، گرد و فاقد هر گونه استطاله سلولی بودند. در گوده‌هایی که GM-CSF و IL-4 اضافه شده بود در روز دوم کشت تعدادی سلول با استطاله‌های کوچک و تعدادی خوشه سلولی متشکل از چند سلول گرد مشاهده شد. در روز سوم اندازه سلول‌ها بزرگ‌تر و استطاله‌های آنها طویل‌تر بود و خوشه‌های سلولی هم که به صورت شناور یا با اتصال ضعیف به سلول‌های چسبیده به کف پلیت دیده می‌شدند واجد تعداد بیشتری سلول با اندازه بزرگ‌تر و استطاله‌های سلولی طویل‌تر بودند. در روز چهارم تعداد سلول‌ها و اندازه آنها به صورت محسوسی بیشتر شده بود و سلول‌های موجود در خوشه‌های سلولی و سلول‌های منفرد استطاله‌های طویلی داشتند. تعداد سلول‌های چسبیده به کف پلیت هم بیشتر شده بود. با گذشت زمان تعداد بیشتری از سلول‌ها مورفولوژی سلول‌های دندریتیک (سلول‌های بزرگ و با استطاله‌های طویل) را نشان دادند به طوری‌که از روز پنجم سلول‌های بزرگ و با استطاله‌های طویل که از همه جهات از سلول بیرون زده بودند به تعداد زیاد قابل مشاهده بودند (تصویر۱). در انتهای دوره کشت تعداد کل سلول‌ها کمی کاهش یافت. در بررسی میکروسکپی گوده‌های شاهد که سیتوکین‌های GM-CSF و IL-4 به محیط کشت اضافه نشده بود افزایش تعداد و اندازه سلول‌ها و همچنین استطاله‌های سلولی مشاهده نشد و حتی تعداد سلول‌ها با افزایش دوره کشت کاهش چشمگیری داشت.

بررسی شاخص‌های سطح سلولی سلول‌ها: در سلول‌های کشت داده شده در حضور GM-CSF و IL-4 بیان ملکول‌های CD11c به تدریج افزایش یافت (درصد سلول‌های واجد شاخص CD11c در روز اول کشت ۰/۹٪ و در روز آخر ۸۵/۶۸٪ بود). بیان ملکول‌های MHC2 و CD86 هم با گذشت زمان به تدریج افزایش یافت (نمودار۱). این یافته‌ها با یافته‌های به



تصویر ۱. مورفولوژی سلول‌های دندریتیک تولید شده در حضور GM-CSF و IL-4. سلول‌ها در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه سیتوسپین سانتریفیوژ و با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

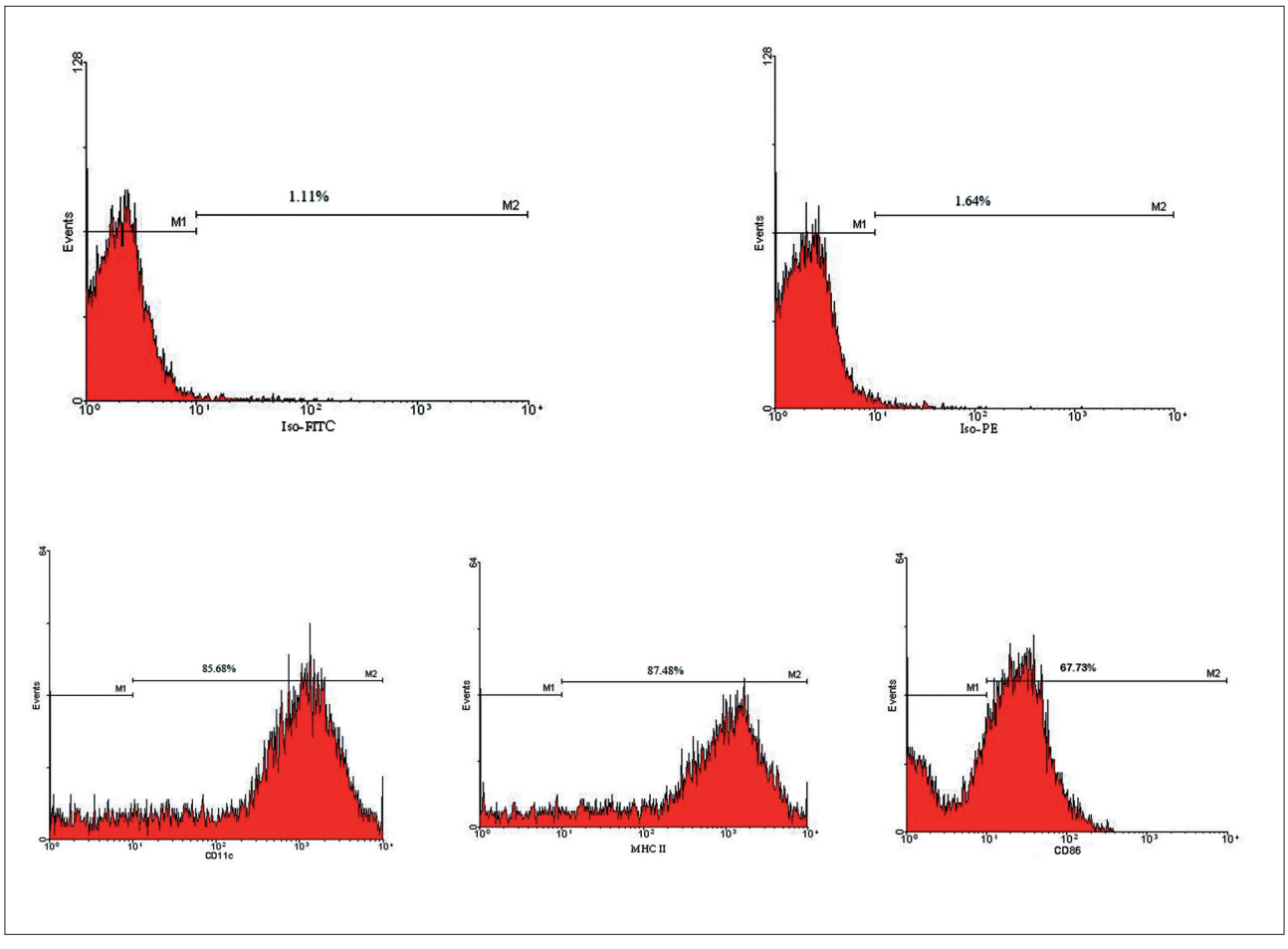
دست آمده با میکروسکپ معکوس (افزایش اندازه سلول‌ها و ایجاد استطاله‌های سلولی طویل که مشخصه سلول‌های دندریتیک است) هم‌خوانی داشت و نشان دهنده افزایش تعداد سلول‌های دندریتیک متمایز شده با افزایش مدت زمان کشت در حضور سیتوکین‌های اضافه شده به محیط کشت بود.

بحث

سلول‌های دندریتیک از سلول‌های پایه‌ای خون‌سازِ (Hematopoietic stem cells) مغز استخوان تولید می‌شوند ولی پیش‌سازهای حقیقی این سلول‌ها هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است (۵،۳۳). به طور کلی سلول‌های مشتق از سلول‌های پایه‌ای خون‌ساز یا از مسیر لنفوئید و یا میلوئید تولید می‌شوند به طوری که گرانولوسیت‌ها، منوسیت‌ها/ماکروفاژها، اریتروسیت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها از پیش‌سازهای چندتوانی رده میلوئید و سلول‌های T، B و NK از پیش‌سازهای چندتوانی رده لنفوئید توسعه می‌یابند (۲،۹). در ابتدا باور بر این بود که سلول‌های دندریتیک منشأ میلوئیدی دارند زیرا سلول‌های دندریتیک شباهت‌هائی با منوسیت‌ها و ماکروفاژها در مورفولوژی، فنوتیپ، پتانسیل‌های اندوسیتی و فعالیت‌های آنزیمی دارند (۳۳) ولی شواهد بعدی قویاً وجود هم منشأ میلوئیدی و هم لنفوئیدی را برای سلول‌های دندریتیک اثبات کرد به‌طوری‌که مطالعات Traver و همکاران در سال ۲۰۰۰، Manz و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Wu و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد پیش‌سازهای میلوئید مشترک و پیش‌سازهای لنفوئید مشترک هرکدام می‌توانند تحت شرایط خاص سلول‌های دندریتیک را تولید کنند (۱۱،۳۰،۳۲). تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان در آزمایشگاه توسط Inaba و همکاران در سال ۱۹۹۲ معرفی شد (۸) و پس از آن در اکثر مطالعات از آن به عنوان روشی مرجع برای تولید سلول‌های دندریتیک در آزمایشگاه استفاده شد. در این روش پس از جداسازی سلول‌های مغز استخوان، سلول‌های واجد شاخص‌های سطح سلولی CD3، CD19 و MHC2 توسط آنتی‌بادی منوکلنال و کمپلمان خرگوش حذف می‌شوند و مابقی سلول‌ها در حضور GM-CSF کشت داده می‌شوند. با توجه به اینکه هنوز پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک به طور دقیق مشخص نشده (۳۳) و مطالعات سال‌های اخیر نشان داده برخی از پیش‌سازهای موجود در مغز استخوان پتانسیل تبدیل به سلول‌های دندریتیک را دارند (۱۱،۲۷،۳۲،۳۴،۳۴)، تخلیه بعضی پیش‌سازها قبل از کشت علاوه بر آسیب رساندن به پیش‌سازهای شناخته شده سلول‌های دندریتیک؛ می‌تواند باعث حذف پیش‌سازهای شناسایی نشده سلول‌های دندریتیک شود. بنابراین در مطالعه حاضر تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان بدون تخلیه هیچ یک از پیش‌سازهای سلولی انجام شد.

طیف گسترده‌ای از سیتوکین‌ها و عوامل رشد تحت شرایط مختلف قادر به القاء تمایز سلول‌های دندریتیک هستند ولی در اکثر پروتکل‌های تحقیقاتی و کلینیکی برای تمایز یا تولید سلول‌های دندریتیک از GM-CSF به تنهایی یا همراه با IL-4 استفاده شده است (۴،۳۷). GM-CSF به عنوان یک سیتوکین ضروری برای تمایز سلول‌های دندریتیک میلوئیدی به حساب می‌آید (۸،۱۱،۱۸،۲۰،۲۳،۲۶). عملکرد GM-CSF از طریق القاء گسترش پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک و تحریک تمایز و افزایش بقاء سلول‌های دندریتیک است (۱۲). IL-4 از تشکیل کلونی ماکروفاژ ممانعت می‌کند و رشد سلول‌های دندریتیک و بلوغ آنها را از منوسیت‌ها القاء می‌کند (۱۹). مطالعات دیگر نشان داد GM-CSF و IL-4 هردو برای تشکیل سلول‌های دندریتیک مشتق از میلوئید در آزمایشگاه مهم هستند (۷،۸،۲۰،۲۴،۲۵،۳۶). به همین دلیل در این مطالعه برای تمایز سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان از GM-CSF و IL-4 استفاده شد. در بررسی میکروسکپی؛ سلول‌های مغز استخوان قبل از کشت کوچک و فاقد استطاله‌های سلولی بودند ولی پس از کشت در حضور GM-CSF و IL-4 به تدریج اندازه سلول‌ها افزایش یافت و استطاله‌های سلولی در آنها ظاهر شد. در ارزیابی ایمونوفنوتیپ سلول‌ها از نظر بیان شاخص‌های سطح سلولی CD11c، MHC2 و CD86 با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنس و فلوسیتومتری؛ در سلول‌های جداسازی شده از مغز استخوان قبل از کشت ملکول CD11c غیر قابل تشخیص بود ولی پس از کشت در حضور GM-CSF و IL-4 بیان این ملکول در سطح سلول‌ها به تدریج افزایش یافت (۸۵/۶۸٪ سلول‌ها در روز نهم این ملکول را بیان می‌کردند). بیان ملکول‌های MHC2 و CD86 هم افزایش قابل توجهی داشت (به ترتیب ۸۷/۴۸٪ و ۶۷/۷۳٪).

مدت زمان مناسب کشت برای تولید سلول دندریتیک از مغز استخوان با GM-CSF ۸-۷ روز گزارش شده است (۸،۲۴). در مطالعه Yamaguchi و همکاران در سال ۱۹۹۷ حداکثر خلوص سلول دندریتیک



نمودار ۱. ایمونوفنوتیپ سلول‌های دندریتیک تولید شده از نظر شاخص‌های سطح سلولی CD11c، MHC2 و CD86.

۷۲٪ با میزان کمتری سلول در روز هشت پس از تیمار با TNF-α به دست آمد (۳۵). Lutz و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند در حضور CSF-GM و TNF-α با کم کردن تراکم سلول‌های کشت داده شده در هر میلی‌لیتر محیط کشت و افزایش طول دوره کشت به ۱۲ روز خلوص و تعداد سلول‌های دندریتیک افزایش می‌یابد. در آنالیز FACS درصد سلول‌های دندریتیک در روز هشت ۶۵٪، در روز ده ۷۵٪ و در روز دوازده ۸۸٪ بود (۱۰). در مطالعه حاضر خلوص حدود ۸۶٪ در روز نهم کشت با GM-CSF و IL-4 به دست آمد. در حضور سیتوکین‌های اضافه شده به محیط سلول‌های دندریتیک از روز دوم کشت قابل مشاهده بودند و با افزایش مدت زمان کشت میزان آنها بیشتر شد. با گذشت زمان تعداد سلول‌ها به تدریج افزایش یافت ولی در اواخر دوره کشت تعداد سلول‌ها کمی کاهش یافت. این امر می‌تواند به علت از بین رفتن تعدادی از سلول‌ها در اثر گذشت زمان باشد. مشاهدات میکروسکپی و یافته‌های به دست آمده از بررسی شاخص‌های سطح سلولی با رنگ‌آمیزی فلورسنس و فلوسیتومتری نشان دهنده تمایز سلول‌های دندریتیک با افزایش مدت زمان دوره کشت در حضور سیتوکین‌های اضافه شده به محیط کشت بود.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم بیتا انصاری‌پور به دلیل زحمات ارزنده ایشان در فلوسیتومتری و سایر پرسنل گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (در قالب طرح شماره ۷۵۰۴۰۰۲/۱/۱) تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Austyn, J.M. (2000) Antigen-presenting cells, experimental and clinical studies of dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med. 162: 146-150.
2. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 404: 193-197.

3. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. Ann Rev Immunol. 18: 767-811.
4. Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 392: 245-252.
5. Dakic A., Wu, L. (2003) Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. Leuk Lymphoma. 44: 1469-1475.
6. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S. (2002) Antigen presentation ant T cell stimulation by dendritic cells. Ann Rev Immunol. 20: 621-667.
7. Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M. (1993) Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 3038-3042.
8. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med. 176: 1693-702.
9. Kondo, M., Weissman, I.L., Akashi, K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell. 91: 661-672.
10. Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L.J., Ro¨ßner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods. 223: 77-92.
11. Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood. 97: 3333-3341.
12. Markowicz, S., Engleman, E.G. (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. J Clin Invest. 85: 955-961.
13. Merad, M., Manz, M.G. (2009) Dendritic cell homeostasis. Blood. 113: 3418-3427.
14. Metlay, J.P., Witmer-Pack, M.D., Agger, R., Crowley, M.T., Lawless, D., Steinman, R.M. (1990) The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. J Exp Med. 171: 1753-1771.
15. Moser, M. (2003) Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? Immunity. 19: 5-8.
16. Moser, M., Murphy, K.M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol. 1: 199-205.
17. Purcell, A., Elliott, T. (2008) Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. Curr Opin Immunol. 20: 75-81.
18. Reid, C.D., Stackpoole, A., Meager, A., Tikerpae, J. (1992) Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. J Immunol. 149: 2681-2688.
19. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G. (1994) Proliferating dendritic cells progenitors in human blood. J Exp Med. 180: 83-93.
20. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 179: 1109-1118.
21. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med. 182: 389-400.

22. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2002) The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. Arthritis Res. 4: S127-S132.
23. Santiago-Schwarz, F., Divaris, N., Kay, C., Carsons, S.E. (1993) Mechanisms of tumor necrosis factor granulocyte macrophage-colony-stimulating factor-induced dendritic cell development. Blood. 82: 3019-3028.
24. Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., Reske, K. (1992) Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Immunol Methods. 154: 253-264.
25. Schreurs, M.W., Eggert, A.A., de Boer, A.J., Figdor, C.G., Adema, G.J. (1999) Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. Eur J Immunol. 29: 2835-2841.
26. Shortman, K., Caux, C. (1997) Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. Stem Cells. 15: 409-419
27. Shortman, K., Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2: 151-161.
28. Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Ann Rev Immunol. 9: 271-296.
29. Steinman, R.M., Hemmi, H. (2006) Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. CTMI. 311: 17-58.
30. Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., Weissman, I.L. (2000) Development of CD8α-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. Science. 290: 2152-2154.
31. Wan, H., Dupasquier, M. (2005) Dendritic cells in vivo and in vitro. Cell Mol Immunol. 2: 28-35.
32. Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., Lucas, K. (2001) Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. Blood. 98: 3376-3382.
33. Wu, L., Dakic, A. (2004) Development of dendritic cell system. Cell Mol Immunol. 1: 112-118.
34. Wu, L., Liu, Y.J. (2007) Development of dendritic-cell lineages. Immunity. 26: 741-50.
35. Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Mitsuru, M., Inaba, K. (1997) Contrasting effects of TGF-β and TNF-α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. Stem Cells. 15: 144-153.
36. Yina, S.Y., Wanga, C.Y., Yanga, N.S. (2011) Interleukin-4 enhances trafficking and functional activities of GM-CSF-stimulated mouse myeloid-derived dendritic cells at late differentiation stage. Exp Cell Res. 317: 2210-2221.
37. Zou, G.M., Tam, Y.K. (2002) Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. Eur Cytokine Netw. 13: 186-199.

An optimized method for ex vivo generation of dendritic cells

Farashi Bonab, S.[1,2], Zahraie Salehi, T.[1*], Khansari, N.[2], Hadjati, J.[2], Massoud, A.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran-Iran*

[2]*Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran*

(Received 2 February 2013 , Accepted 14 May 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Dendritic cells are the most potent antigen presenting cells. They capture, process and present antigens to T cells and secrete various cytokines and soluble factors to initiate adaptive immune responses. Dendritic cells are also important in induction of immunological tolerance to self- antigens. Due to their crucial role in immune responses during infections, cancers, transplantations, allergies, and autoimmune diseases, they have become important targets for many biological and clinical studies. Usually large numbers of dendritic cells is essential for these studies; however, small numbers of these cells in blood and tissues makes the isolation very difficult. Therefore, In vitro generation of these cells is useful for research and clinical applications. **OBJECTIVES:** The aim of this study was in vitro generation of dendritic cells from bone marrow-hematopoietic progenitor cells using a simple and efficient method. **METHODS:** Murine bone marrow cells were cultured in medium supplemented with Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Interleukin 4 without depletion of any cell population for 9 days. Fresh medium containing cytokines was added every 3 days. **RESULTS:** Analysis of the morphology and immunophenotype of cultured cells showed the generation of dendritic cells from day 2 of the culture period. But, the number of cells that possess morphological characteristics and typical cell surface markers (CD11c, MHC-II and CD86) of dendritic cells was elevated by increasing the culture period. The purity of dendritic cells was 86% by the end of 9 days culture. **CONCLUSIONS:** This method can be used as an efficient method for ex vivo generation of dendritic cells.

Key words: bone marrow, dendritic cell, generation, hematopoietic progenitor cells

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Microscopic morphology of ex vivo generated dendritic cells. Cells were cytospined on glass slide and stained with Giemsa (x40).

Graph 1. Immunophenotype of ex vivo generated dendritic cells. Cell surface expression of CD11c, MHC II, and CD86 was analyzed by flow cytometry.

***Corresponding author's email: Tsalehi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117052, Fax:021-66427517**