مقاله پژوهشی

اثر ایمونومدولاتوری اگزوتوکسین A نوترکیب پسودوموناس بر سلول‌های دندریتیکی استخراج شده از طحال موش

محمد حسین کریمی[۱]، عزیز ژاپونی[۲]، منوچهر رسولی[۲*]، سلیمه ابراهیم نژاد[۱]

۱- مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲- مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی پروفسور البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش کلیدی سلول دندریتیک در ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بر علیه آنتی ژن‌های میکروبی و بیماری‌ها، در این مطالعه اثر پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A باکتری پسودوموناس آئروژینوزا در بلو غ و فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: با استفاده از DNA باکتری پسودوموناس آئروژینوزا پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A ساخته شد و اثر سیتوتوکسیک آن بر سلول دندریتیک به وسیله تست MTT مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین اثر این آنتی ژن بر بیان مولکول‌های CD40، CD86 و MHCII بر روی سلول‌های دندریتیک با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این‌ها اثر این آنتی ژن بر تکثیر سلول T به وسیله واکنش مختلط لنفوسیتی (MLR) و ترشح سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ بررسی شد. همچنین اثر این آنتی ژن بر تولید IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک به کمک تکنیک ELISA بررسی شد. نتایج حاصل به وسیله تست آماری one way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: اگزوتوکسین A بقاء سلول دندریتیک را کاهش نداد و همچنین میزان بیان مولکول‌های کمک تحریکی CD40، CD86 و MHCII نسبت به کنترل منفی تغییر معنی داری پیدا نکرد. این آنتی ژن میزان تکثیر سلول T را کاهش داد و این کاهش تکثیر در غلظت ۰/۱ معنی دار بود. میزان ترشح IL-12 توسط سلول دندریتیک تحت تاثیر این آنتی ژن افزایش یافت ولی میزان ترشح IL-4 و IFN-γ در تست MLR کاهش معنی داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این آنتی ژن باعث تغییر در ترشح سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های ایمنی شده و تکثیر سلول‌های T را کاهش می‌دهد.

کلمات کلیدی: اگزوتوکسین A، سلول دندریتیک، اثرات ایمونومدولاتوری

مقدمه

باکتری پسودوموناس آئروژینوزا یک باسیل هوازی گرم منفی می‌باشد که سبب ایجاد عفونت‌های فرصت طلب در انسان می‌شود. این باکتری دارای عوامل ویرولانس مختلفی است که اگزوتوکسین A مهمترین و سمی‌ترین این عوامل می‌باشد. این پروتئین سمی از سم‌های کلاس A -B است که از طریق زیر واحد B به گیرنده سلولی چسبیده و زیر واحد A با ایجاد تداخل در پروتئین سازی سلول سبب مرگ سلول می‌شود (۱). توکسین‌های باکتریایی به دلیل دارا بودن مکانیسمی با کارایی بالا برای ورود به داخل سلول برای تحویل داروها بسیار حائز اهمیت هستند از جمله این توکسین‌ها، اگزوتوکسین A است در فیوژن با سایر توکسین‌ها برای هدف قرار دادن سلول‌های توموری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (۴-۲). از اگزوتوکسین A در اتصال با قطعه متغییر آنتی بادی‌های ضد سلول توموری در درمان استفاده می‌شود که تحت عنوان ایمونو توکسین نامیده می‌شوند. از این دست ایمونو توکسین‌ها می‌توان به آنتی بادی بر علیه CD22 در اتصال با اگزوتوکسین A اشاره کرد که در درمان لوسمی سلول

* **نویسنده مسئول: منوچهر رسولی**، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی پروفسور البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۱۶۴۷۴۳۰۴ Email: rasouliman@yahoo.com

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

موئی شکل مورد مطالعه قرار گرفته و اکنون در فاز یک کارآزمائی بالینی برای درمان لوسمی لنفوبلاستی مزمن، لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان می‌باشد (۵، ۶). با اتصال آنتی بادی به هدف اختصاصی خود در سطح سلول، توکسین متصل به آن سبب مرگ همان سلول مورد هدف گردیده و بدین روش اثر جانبی سم کاهش می‌یابد (۵). علاوه بر این از سم اگزوتوکسین A برای تهیه واکسن نیز استفاده می‌شود که باعث ایجاد پاسخ ایمنی و مصونیت می‌شود (۷).

از مهمترین سلول‌های مشارکت کننده در پاسخ سیستم ایمنی سلول‌های دندریتیک می‌باشند که در هر نوع دو پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش دارند. سلول‌های دندریتیک در حالت معمول و بدون تحریک به صورت نابالغ بسر می‌برند و در این حالت قدرت بالایی در جذب آنتی ژن دارند. این سلول‌های نابالغ پس از جذب آنتی ژن به سمت غدد لنفاوی مهاجرت نموده و تبدیل به سلول‌های دندریتیک بالغی می‌شوند که به طور موثر آنتی ژن را به سلول‌های T عرضه می‌کنند. در این حالت سلول‌های دندریتیک میزان بالائی از مولکول‌های کمک تحریکی CD40، CD86 و MHCII را بیان می‌کنند و همین طور با ترشح سایتوکاین سبب سوگیری سلول‌های T به سمت سلول‌های کمکی Th1 یا Th2 می‌شوند. بنابراین آنتی ژن‌هایی که سبب بلوغ سلول‌های دندریتیک شوند می‌توانند ایمنی زائی مناسبی را القاء نمایند (۱۰-۸).

با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر اگزوتوکسین A بر سلول‌های دندریتک صورت نگرفته است در مطالعه حاضر خاصیت تعدیل ایمنی این آنتی ژن مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. به این منظور پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A تهیه شد و اثر این پروتئین بر بلوغ سلول‌های دندریتیک جدا شده از طحال موش مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این تاثیر این سم بر تکثیر سلول‌های T در واکنش مختلط لنفو سیتی Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) و همچنین ترشح سایتوکاین‌های IL-4، IFN-γ و IL-12 مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: موش آزمایشگاهی از نژاد BALB/c و C57BL/6 از جنس ماده و سن ۱۰-۸ هفته‌ای از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. کلیه موش‌ها در شرایط دمایی، رطوبت و نور مناسب نگهداری شده بودند. در حین مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی در خصوص نگهداری و کشتن موش‌ها طبق آئین نامه‌های کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مراعات گردید.

تهیه پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A: برای تهیه پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A، DNA باکتری سودوموناس آئروژینوزا سوش PA103 استخراج شد و با استفاده از تکنیک PCR و پرایمر اختصاصی (شکل ۱)، ژن اگزوتوکسین A تکثیر یافت. محصول PCR روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و باند با اندازه ۱۸۳۹ جفت باز به عنوان قطعه DNA مورد نظر از ژل با استفاده از QIAquick Gel Extraction Kit خالص سازی گردیده و در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد و به باکتری ایکولی سوش DH5-α انتقال داده شد. باکتری حاوی پلاسمید با غربالگری کلونی سفید/آبی انتخاب و به میزان زیاد تکثیر داده شد. پلاسمید حاوی pTZ57R/T-ExoA خالص و توسط آنزیم محدود الاثر هضم شد. اگزوتوکسین A در پلاسمید بیانی pET32a (+) کلون می‌شود و به باکتری ایکولی سوش Rosetta انتقال داده شده و برای تهیه میزان زیادی از اگزوتوکسین A نوترکیب، باکتری در محیط LB broth کشت داده شد. اگزوتوکسین A با استفاده از تکنیک Fast protein liquid chromatography (FPLC) خالص سازی و خلوص با استفاده از تکنیک سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) و کوماسی بلو چک شد.

جداسازی و خالص سازی سلول‌های دندریتیک: سلول‌های دندریتیک از طحال موش‌های نژاد BALB/c با کمک محلول نایکودنز (Axis Shields, Norway) جداسازی و از خاصیت چسبندگی به پلاستیک این سلول‌ها برای خالص سازی آن‌ها استفاده گردید. به این منظور بافت طحال با استفاده از ۱ میلی گرم در میلی لیتر کلاژناز D (Roche,Germany) و ۲ میکروگرم در میلی لیتر از DNase I (Roche, Germany) کاملا هضم و تجزیه شده و از مش با منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. سلول‌ها با محیط کشت RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA) به همراه EDTA (۵ میلی مولار) شستشو داده و به آرامی به سطح نایکودنز انتقال داده شد. بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ در g ۶۵۰ و C ° ۴ حلقه سلولی بر فاز رویی نایکودنز جمع آوری شده

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

و بعد از ۲ بار شستشو، سلول‌ها به پلیت $6cm^2$ انتقال داده شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷° C و رطوبت ۹۵ درصد، سلول‌ها غیر چسبنده به کمک شستشو حذف شده و سلول‌ها از Anti CD3 Ab (FITC label) (ebioscience, USA) مورد مطالعه قرار گرفت که جمعیت سلول‌های بیان کننده CD3 بیش از ۹۰ درصد بود (۱۲).

GCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAAGCCTGCGTGCTCGACCTCAAGGACGGCGTGC
GTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACCAACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATG
GTCCTGGAGGGCGGCAACGACGCGCTCAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCGACGGCCT
GACCATCCGCCTCGAAGGCGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCGCTACAGCTACACGCGCCAGGCGCGCG
GCAGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTACCGATCGGCCACGAGAAGCCCTCGAACATCAAGGTGTTCATCCAC
GAACTGAACGCCGGCAACCAGCTCAGCCACATGTCGCCGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCT
GGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCG
CCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGGTCATGGCCCAGACCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAA
TGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAACG
CTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACC
TGGACATCAAACCCACGGTCATCAGTCATCGCCTGCACTTTCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGACCG
CGCACCAGGCTTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTCACCCGTCATCGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACAACTGG
AGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCGCCCTCTACCTGGCGGCGCGGCTGTCGTGGAACCAGGTC
GACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGCGGCGACCTGTGCGAAGCGATCCGCGAGCA
GCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCACCG
GCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAACGCCGACGTGGTGAGCCTGACCTGCCCGGTCGCCGCCGGTGAATGC
GCGGGCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGA
CGGCGGCGACGTCAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCAGGCGCACC
GCCAACTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTTCGTCGGCTACCACGGCACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCATC
GTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGAT
CCGGCGCTGGCCTACGGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCACGCGGCCGGATCCGCAACGGTGCCCT
GCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTCGAGCCTGCCGGGCTTCTACCGCACCAGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGA
GGCGGCGGGCGAGGTCGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCA
GGAGGAAGGCGGGCGCCTGGAGACCATTCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGTGATTCCCTCGGC
GATCCCCACCGACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAGGCGA
TCAGCGCCCTGCCGGACTACGCCAGCCAGCCCGGCAAACC**GCCGCGCGAGGACCTGAAG**

شکل ۱. توالی نوکلئوتیدی ژن اگزوتوکسین A . توالی نوکلئوتیدی ژن اگزوتوکسین A که توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر داده شد و در وکتور pTZ57R/T وارد گردید. نوکلئوتیدهای قرمز رنگ توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن را نشان می‌دهند.

چسبیده به پلیت در شرایط ذکر شده برای ۱۶ ساعت انکوبه شد (۱۱). خلوص سلول‌های دندریتیک با استفاده از Anti CD11C Ab (PE label) (ebioscience, USA) و در دستگاه فلوسایتومتری Becton Dickinson (BD) مورد بررسی قرار گرفت که در اغلب موارد بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها مارکر CD11C را بیان می‌کردند.

جداسازی سلول‌های T: از نایلون وول برای جداسازی سلول‌های T از غدد لنفاوی موش‌های نژاد C57BL/6 استفاده شد. بعد از جداسازی سلول‌های T میزان خلوص آن با استفاده

بررسی سمیت سلولی پروتئین اگزوتوکسین A بر سلول‌های دندریتیک: میزان بقای سلول‌ها در مجاورت با آنتی ژن اگزوتوکسین A به روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور 10^5 سلول دندریتیک در پلیت ۹۶ خانه ته صاف به همراه غلظت‌های مختلف آنتی ژن (۱۰۰ µg/ml و ۱۰، ۱، ۰/۱) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. در پایان ۲۴ ساعت تست MTT بر اساس دستور از قبل تبیین شده انجام شد. به طور خلاصه در پایان ۲۴ ساعت ۱۰ میکرولیتر از رنگ (Sigma, USA)

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به ازای هر خانه از پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و ۴ ساعت در شرایط فوق انکوبه می‌شود. بعد از این مدت زمان پلیت سانتریفوژ شده و مایع رویی خارج می‌شود. پس از خشک شدن پلیت DMSO (Sigma, USA) به هر خانه اضافه می‌شود تا کریستال فرمازان حاصل از احیاء نمک تترازولیوم موجود در رنگ MTT حل شده و دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰nm نسبت به طول موج رفرانس ۶۳۰nm در دستگاه الایزا قرائت می‌شود (۱۳).

تیمار سلول‌های دندریتیک با پروتئین اگزوتوکسین A و بررسی بیان مولکول‌های کمک تحریکی: به منظور مطالعه اثر پروتئین اگزوتوکسین A بر بیان مولکول‌های CD80, CD40 (ebioscience, USA) و MHCII از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد که از آنتی بادی‌های Anti CD40, CD86 و Anti MHCII کونژوگه با FITC استفاده گردید. ابتدا سلول‌های دندریتیک با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر اگزوتوکسین A به مدت ۱۶ ساعت مجاور گشته و بعد از این مدت از لحاظ مولکول‌های ذکر شده در دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. از سلول‌های دندریتیک تیمار نشده و یا تیمار شده با TNF-α به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته می‌شود. به منظور آنالیز داده از نرم افزار flowJo استفاده کرده و درصد بیان و fluorescence intensity (MFI)داده‌ها مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر پروتئین اگزوتوکسین A بر واکنش مختلط لنفوسیتی (MLR): در ابتدا سلول‌های دندریتیک از موش نژاد BALB/C و سلول‌های T از موش نژاد C57BL/6 به نسبت ۱ به ۱۰ با هم مخلوط و کشت داده شد و غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر از اگزوتوکسین A به واکنش‌ها اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت تکثیر سلول‌های T با استفاده از 5-Bromo-2 -deoxy-uridine (BrdU) kit (Roche, Germany) بر اساس دستور کیت مورد بررسی قرار گرفت (۱۴). برای محاسبه درصد تکثیر سلول‌ها از فرمول زیر استفاده می‌شود:

۱۰۰×(میزان جذب نوری گروه تیمار نشده / میزان جذب نوری گروه تیمار شده) : تکثیر سلولی (٪)

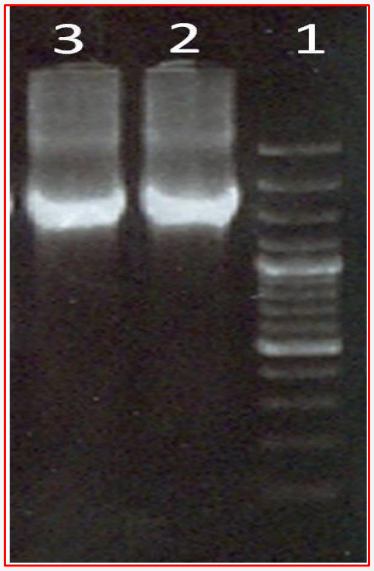
اندازه‌گیری میزان سایتو کاین: مایع رویی تست MLR و کشت شبانه سلول‌های دندریتیک با آنتی ژن برای اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها جمع آوری شد. میزان سایتوکاین IL-4 و IFN-γ ترشح شده در مایع رویی تست MLR و همین طور میزان IL-12 در مایع رویی کشت شبانه سلول‌های دندریتیک مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. میزان حساسیت IL-4، IFN-γ و IL-12 (eBioscience, USA) به ترتیب ۴، ۱۵ و ۱۵ پیکو گرم در میلی لیتر می‌باشد.

آنالیز آماری: کلیه تست‌ها با حداقل ۲ تکرار کاملا مستقل از هم انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار (SD) گزارش شده است. برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها نسبت به کنترل منفی تست آماری One way ANOVA در نرم افزار Graph Pad Prism 5 مورد استفاده قرار گرفت. برای مقایسه آماری بین گروه‌ها از تست Tukey به عنوان Post test استفاده شد. p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان نتایج با اختلاف معنی دار آماری در نظر گرفته شد.

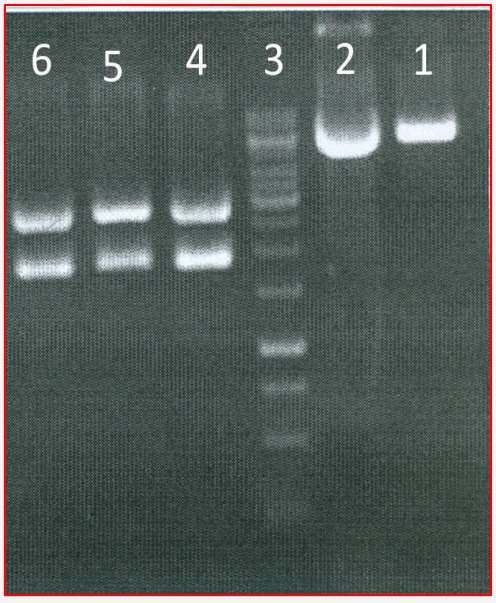
نتایج

تهیه پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A: با استفاده از تکنیک PCR و پرایمر اختصاصی، ژن اگزوتوکسین A تکثیر یافت. توالی این ژن و توالی پرایمرهای مورد استفاده در شکل ۱ آورده شده است. محصول PCR روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و باند با اندازه ۱۸۳۹ جفت باز که نشانگر قطعه مورد نظر بود مشخص گردید (شکل ۲). قطعه DNA مورد نظر خالص سازی گردیده و در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد و به باکتری ایکولی سوش DH5-α انتقال داده شد. پلاسمید حاوی pTZ57R/T-ExoA خالص و توسط آنزیم محدود الاثر هضم شد (شکل ۳). اگزوتوکسین A در پلاسمید بیانی pET32a (+) کلون می‌شود و به باکتری ایکولی سوش Rosetta انتقال داده شده و در محیط LB broth کشت داده شد. بیان ژن مذکور در باکتری ترانسفکت شده به کمک تکنیک SDS-PAGE بررسی شد. اگزوتوکسین A با استفاده از تکنیک Fast protein liquid chromatography (FPLC) خالص سازی و خلوص با استفاده از تکنیک سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) و کوماسی بلو چک شد (شکل ۵).

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]



شکل ۲. تایید محصولات PCR ژن اگزوتوکسین A. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن اگزوتوکسین A تکثیر یافت و محصولات PCR الکتروفورز شدند. ۱: مارکر وزن مولکولی، ۲ و ۳: ژن اگروتوکسین تکتیر یافته



شکل ۳. تایید pTZ57R/ExoA توسط هضم آنزیمی. ژن ExoA وارد پلاسمید pTZ57R شد و توسط آنزیم‌های محدود الاثر، pTZ57R/ExoA مورد تایید قرار گرفت. ۱ و ۲: قبل از هضم آنزیمی. ۳: مارکر وزن مولکولی، ۴و ۵ و ۶: بعد از هضم آنزیمی.

اثر پروتئین اگزوتوکسین A بر بقاء سلولی: بعد از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌های دندریتیک با غلظت‌های ۰/۱، ۱،۱۰ و ۱۰۰ از آنتی ژن اگزوتوکسین A تست MTT انجام شد. نتایج نشان داد که این آنتی ژن در هیچ یک از غلظت‌های فوق کشنده نبوده و برای انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۶).

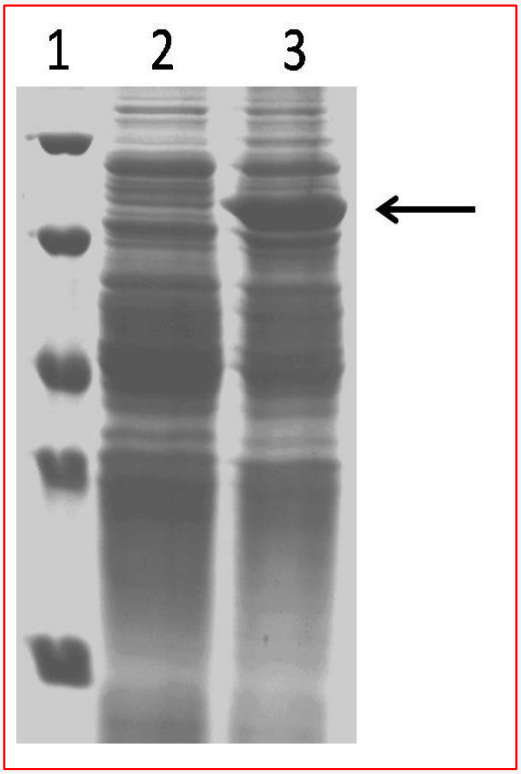
اثر پروتئین اگزوتوکسین A بر بلوغ سلول‌های دندریتیک: سلول‌های دندریتیک نابالغ پس از جداسازی از طحال با غلظت‌های مختلف از پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A مجاور گردید و بعد از ۱۶ ساعت سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای بلوغ CD80, CD40 و MHCII با استفاده از آنتی بادی‌های کونژوگه اختصاصی در دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاکی از آن بود که غلظت‌های ۰/۱، ۱،۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از این آنتی ژن نتوانست بیان این مولکول‌ها را تغییر دهد و MFI و درصد بیان این مولکول‌ها نسبت به سلول‌های بدون تیمار تغییر معنی داری از لحاظ آماری نداشت.

اثر پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A بر واکنش MLR: به منظور مطالعه اثر اگزوتوکسین A بر واکنش MLR بعد از کشت مختلط سلول‌های دندریتیک و T غلظت‌های ۰/۱، ۱،۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به واکنش اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت از طریق تکنیک Brdu incorporation assay میزان تکثیر سلول‌های T مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده این مطلب بود که کلیه غلظت‌های ذکر شده باعث کاهش تکثیر سلول‌های T می‌شوند اگر چه این کاهش تکثیر تنها در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به شرایط بدون تیمار از لحاظ آماری معنی دار بود ($\rho<0/05$) (شکل ۷).

تولید IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک در تیمار با پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A: مایع رویی سلول‌های دندریتیک طحالی بعد از ۱۶ ساعت تیمار با غلظت‌های ۰/۱، ۱،۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن جمع آوری شد و از لحاظ تولید IL-12 با استفاده از تست الایزا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد تولید IL-12 در تیمار با کلیه غلظت‌های ذکر شده به طور معنی داری افزایش می‌یابد ($\rho<0/05$) (شکل ۸-A).

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

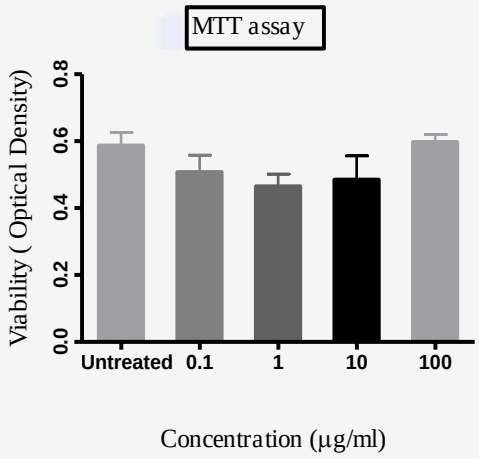
اثر پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A بر سایتوکاین مترشحه در واکنش MLR: میزان ترشح سایتوکاین مرتبط با زیر گروه TH1 و TH2 به ترتیب IFN-γ و IL-4 در مایع رویی واکنش MLR مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. میزان تولید IL-4 در شرایط مجاور شده با ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن نسبت به شرایط کنترل منفی کاهش معنی داری نشان داده است



شکل ۴: تایید بیان ژن اگزوتوکسین A در باکتری میزبان. قطعه نوترکیب pTZ57R/ExoA در باکتری E-coli ترانسفکت شد و به کمک تکنیک SDS-PAGE بیان ژن در باکتری میزبان مشخص گردید. علامت فلش باند مربوط به بیان این ژن را نشان می‌دهد. ۱: مارکر وزن مولکولی، ۲: باکتری ترانسفکت نشده، ۳: باکتری ترانسفکت شده

(ρ<۰/۰۵). سایر غلظت‌ها نیز نسبت به کنترل منفی کاهش نشان دادند اگرچه از لحاظ آماری معنی دار نبودند. مقادیر IL-4 به دست آمده در تیمار با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۸/۲۸ ±۹/۸۶، ۱۷/۸۰±۰/۸۴ و۰/۷۳ ±۱۵/۶۵ پیکو گرم در میلی لیتر نسبت به ۳/۳۵ ±۳۲/۰۴ پیکو

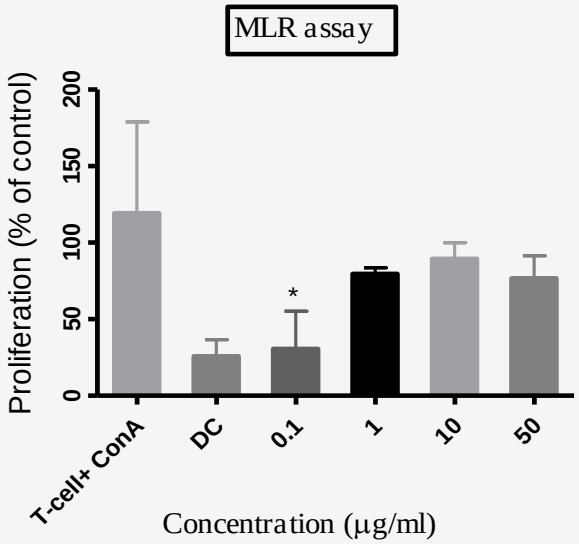
شکل ۵: تایید پروتین تخلیص شده با تکنیک FPLC به کمک SDS-PAGE. پس از تخلیص پروتئین اگزوتوکسین A توسط HPLC، با استفاده از تکنیک SDS-PAGE خلوص پروتئین بدست آمده بررسی شد. ۱: مارکر وزن مولکولی، ۲: ژن تخلیص شده اگزوتوکسین A



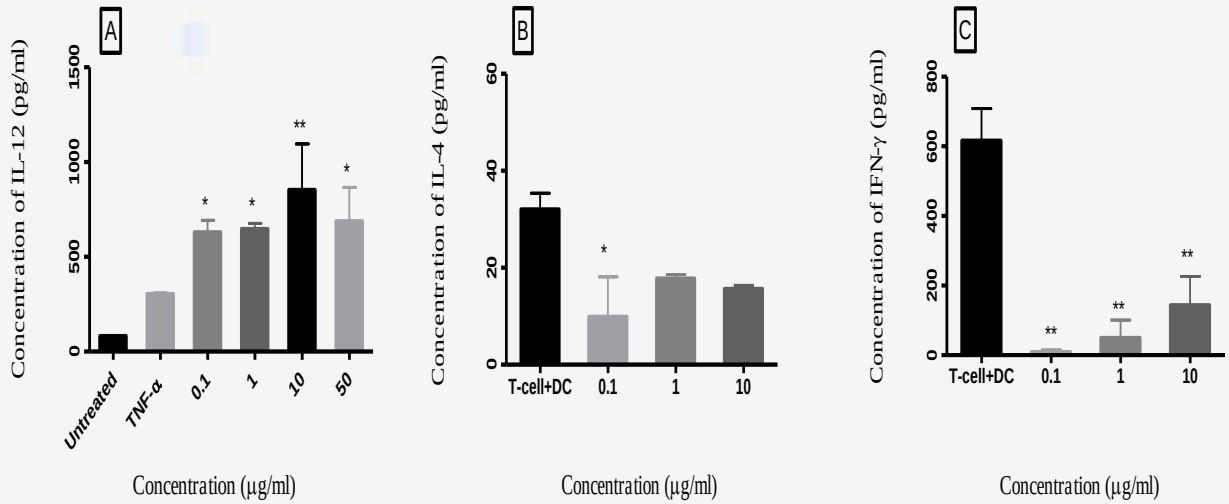
شکل ۶. نتایج تست MTT نشان می‌دهد این آنتی ژن در هیچ یک از غلظت‌های ذکر شده در شکل دارای سمیت سلولی نمی‌باشد. داده‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار (SD) حداقل دو بار مطالعه مستقل از هم می‌باشد.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

گرم در میلی لیتر در کنترل منفی می‌باشد (شکل B-۸). علاوه بر این میزان ترشح IFN-γ در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ به طور معنی داری نسبت به کنترل منفی کاهش یافته است (ρ<۰/۰۵). این میزان از ۹۲/۴ ± ۶۱۶/۲ در کنترل منفی به ۵/۷± ۹/۱، ۴۹/۴۵±۵۱/۳ و ۱۴۳/۹±۸۲/۲۰ به ترتیب در حضور آنتی ژن با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ کاهش می‌یابد (شکل C-۸).



شکل ۷: نتایج به دست آمده از تست MLR نشان می‌دهد غلظت ۰/۱ از این آنتی ژن میزان تکثیر سلول‌های T را به طور معنی داری کاهش می‌دهد (ρ<۰/۰۵). درصد تکثیر در گروه‌های حاوی سلول‌های T و DC و آنتی ژن نسبت به گروه حاوی سلول‌های T و DC بدون حضور آنتی ژن محاسبه می‌شود. داده‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار (SD) حداقل دو بار مطالعه مستقل از هم می‌باشد.



شکل ۸. نتایج حاصل از تست الایزا نشان می‌دهد که میزان ترشح IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده نسبت به تیمار نشده با آنتی ژن افزایش می‌یابد (A- ۸) ولی میزان IL-4 وIFN-γ در شرایط تیمار سلول‌های دندریتیک و T با غلظت‌های مختلف آنتی ژن نسبت به شرایط بدون آنتی ژن کاهش می‌یابد (B,C- ۸). داده‌ها نمایانگر Mean±SD حداقل دو بار مطالعه مستقل از هم می‌باشد. (*: ρ<۰/۰۵ و **: ρ<۰/۰۱).

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

بحث و نتیجه‌گیری

محیط اطراف ما پر از باکتری‌های فرصت طلبی است که در فرد دارای سیستم ایمنی سالم مشکلی ایجاد نمی‌کنند ولی در فرد با سیستم ایمنی ضعیف سبب ایجاد بیماری می‌شوند. یکی از باکتری‌های این دسته سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد که در بیماران سوختگی و دارای زخم سبب ایجاد عفونت همراه با پیگمان می‌شود و حتی سبب مرگ میزبان نیز می‌شود. از عوامل ویرولانس این باکتری پیلی، فلاژل و سم اگزوتوکسین A می‌باشند که سم مترشحه از باکتری بسیار قوی بوده و سبب مرگ سلولی می‌شود (۱۵، ۱۶). این سم واجد دامین کاتالیتک به نام PE3 است که مشابه دامین کاتالتیک سم باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه و سم ویبریو کلرا است. این ناحیه از سم با اتصال به eEF2 سبب مهار سنتز پروتئین می‌شود و سلول به علت عدم سنتز پروتئین خواهد مرد (۱۷).

در سال‌های اخیر استفاده از اگزوتوکسین A در درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفت (۱۸). در این نوع از درمان سم مربوطه به آنتی بادی اختصاصی سلول سرطانی مورد نظر متصل گردیده و پس از اتصال آنتی بادی به سلول سم به داخل سلول هدف نفوذ و با توقف سیستم پروتئین سازی سلول سبب مرگ سلول سرطانی می‌شود از این دسته از داروهای ایمونوتوکسین یا سایتوتوکسین می‌توان به Moxetumomab pasudotox اشاره نمود که در درمان سرطان خون در مرحله کارآزمایی بالینی می‌باشد و سلول‌های B را هدف قرار می‌دهد (۶). به علاوه استفاده از این توکسین در درمان تومور مغزی نیز مورد بررسی قرار گرفت و در مرحله پیش کلینیک قرار دارد (۱۹).

سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن مانند سلول‌های دندریتیک وقتی با آنتی ژن‌های برون زاد برخورد می‌کنند این آنتی ژن‌ها را بلع نموده و در کنار MHC II به سلول‌های T عرضه می‌کنند. در حین بلع و عرضه این آنتی ژن‌ها این سلول‌ها بالغ شده و میزان و شدت بیان CD86, CD40 و MHCII افزایش می‌یابد (۹). در مطالعه حاضر آنتی ژن نوترکیب اگزوتوکسین A که به عنوان یک پادگن برون زاد می‌باشد نتوانست تاثیری در بیان این مولکول‌ها داشته باشد و به طور کلی سبب بلوغ سلول‌های دندریتیک نمی‌شود. اگرچه ترشح سایتوکاین IL-12 از این سلول‌ها بعد از ۱۶ ساعت مجاورت با آنتی ژن افزایش معنی داری نشان می‌دهد که این میزان افزایش حتی نسبت به TNF-α نیز بیشتر بوده است.

سایتوکاین IL-12 مترشحه از سلول‌های دندریتیک در عدم حضور IL-4 باعث جهت گیری سلول‌های T یاور به سمت TH1 می‌شود که این سلول‌ها خود به میزان زیادی IFN-γ را تولید می‌کنند. حضور IL-4 به همراه IL-12 سبب جهت گیری سلول‌های T به TH2 می‌شوند که این سلول‌ها برعکس سلول‌های TH1 سبب تقویت پاسخ با واسطه آنتی بادی و تضعیف پاسخ سلولی می‌شود (۲۰، ۲۱). اگزوتوکسین A نوترکیب مورد استفاده در این مطالعه سبب کاهش تکثیر سلول‌های T در تست MLR شده است که نشان می‌دهد این ترکیب اگرچه سبب افزایش ترشح IL-12 در سلول‌های دندریتیک می‌شود ولی سبب کاهش تکثیر سلول‌های T و همچنین ممانعت از ترشح سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ از این سلول‌ها می‌شود.

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۷ توسط ملستروم و همکاران انجام شد، اثر یک پروتئین سطح سلولی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به نام OxyR بر سلول‌های دندریتیک تمایز یافته از سلول‌های مغز استخوان موش‌های نژاد BalblC مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه مطالعات آن‌ها نیز نشان داد که این پروتئین سبب کاهش تکثیر سلولی می‌شود. البته این مطالعه از لحاظ منشاء سلولی و نوع پروتئین با مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد (۲۲).

به طور کلی می‌توان گفت استفاده از این آنتی ژن به تنهایی و بدون پروتئین حامل نمی‌تواند سبب فعال شدن سیستم ایمنی به طور مناسب شده و حتی سبب ممانعت از پاسخ ایمنی سلولی و ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌های T به عنوان جزء اصلی پاسخ ایمنی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

References

1. Weldon JE, Pastan I. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer. FEBS J. 2011;278(23):4683-700.
2. Bachran C, Morley T, Abdelazim S, Fattah RJ, Liu S, Leppla SH. Anthrax toxin-mediated delivery of the Pseudomonas exotoxin A enzymatic domain to the cytosol of tumor cells via cleavable ubiquitin fusions. MBio. 2013;4(3):e00201-13.
3. Arora N, Klimpel KR, Singh Y, Leppla SH. Fusions of anthrax toxin lethal factor to the ADP-ribosylation domain of Pseudomonas exotoxin A are potent cytotoxins which are translocated to the cytosol of mammalian cells. J Biol Chem. 1992;267(22):15542-8.
4. Kawakami K, Nakajima O, Morishita R, Nagai R. Targeted anticancer immunotoxins and cytotoxic agents with direct killing moieties. ScientificWorldJournal. 2006;6:781-90.
5. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. AAPS J. 2006;8(3):E532-51.
6.Kreitman RJ, Pastan I. Antibody fusion proteins: anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox. Clin Cancer Res. 2011;17(20):6398-405.
7. Yang HP, Wang TC, Wang SJ, Chen SP, Wu E, Lai SQ, et al. Recombinant chimeric vaccine composed of PRRSV antigens and truncated Pseudomonas exotoxin A (PE-K13). Res Vet Sci. 2013;95(2):742-51.
8. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. Int Arch Allergy Immunol. 2006;140(1):53-72.
9. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol. 2006;6(6):476-83.
10. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2003;21:685-711.
11. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Shojaeian J, et al. The efficient isolation of murine splenic dendritic cells and their cytochemical features .Histochem Cell Biol. 2006;126(2):275-82.
12. Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. Phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells induced by 18 alpha- and beta-glycyrrhetinic acid. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014;36(1):52-60.
13. Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells. Cell Immunol. 2012;280(1):44-9.
14. Amirghofran Z, Ahmadi H, Karimi MH. Immunomodulatory activity of the water extract of Thymus vulgaris, Thymus daenensis, and Zataria multiflora on dendritic cells and T cells responses. J Immunoassay Immunochem. 2012;33(4):388-402.
15. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2000;2(9):1051-60.
16. Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. Pseudomonas aeruginosa virulence and therapy: evolving translational strategies. Crit Care Med. 2009;37(5):1777-86.
17. Boland EL, Van Dyken CM, Duckett RM, McCluskey AJ, Poon GM. Structural Complementation of the Catalytic Domain of Pseudomonas Exotoxin A. J Mol Biol. 2014;426(3):645-55.
18. Shapira A, Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches. Toxins (Basel). 2010;2(11):2519-83.
19. Li YM, Hall WA. Targeted toxins in brain tumor therapy. Toxins (Basel). 2010;2(11):2645-62.
20. Xia CQ, Peng R, Annamalai M, Clare-Salzler MJ. Dendritic cells post-maturation are reprogrammed with heightened IFN-gamma and IL-10. Biochem Biophys Res Commun. 2007;352(4):960-5.
21. Smeltz RB, Chen J, Ehrhardt R, Shevach EM. Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. J Immunol. 2002;168(12):6165-72.
22. Melstrom KA Jr, Kozlowski R, Hassett DJ, Suzuki H, Bates DM, Gamelli RL, et al. Cytotoxicity of Pseudomonas secreted exotoxins requires OxyR expression. J Surg Res. 2007;143(1):50-7.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]

Original Article

The Immunomodulatory Effect of Recombinant Exotoxin A of Pseudomonas Aeruginosa on Dendritic Cells Extracted from Mice Spleen

Karimi MH[1], Japoni A[2], Rasouli M[2*], Ebrahimnezhad S[1]

1- Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2- Department of Immunology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Namazi Hospital, Shiraz, Iran.

Received: 01 May 2014 Accepted: 09 Sep 2014

Abstract

Background & Objective: Dendritic cell (DC) is as a key cell in activation of immune response against microbes and disease. Therefore, the effect of recombinant exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa on the maturity and the activation of DCs was evaluated in this study.

Materials & Methods: Recombinant exotoxin A was produced from Pseudomonas aeruginosa DNA. MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of this protein on DCs. The expression of co-stimulatory molecules CD40, CD86, and MHCII was evaluated by flow cytometry. Moreover, the effect of this antigen (Ag) on T-cell proliferation was evaluated using Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) assay and the secretion of IL-4 and IFN- γ. Secretion of IL-12 by DCs was measured with Enzyme-Linked Immunosorbent *Assay* (ELISA) method. The data were collected and analyzed with one way ANOVA test.

***Results*:** Recombinant exotoxin A had no effect on DCs viability. In addition, expression of CD40, CD86, and MHCII did not change significantly compared to the negative control cells. Moreover, T-cells proliferation was decreased significantly at the concentration of 0.1µg/ml of this Ag. The secretion of IL-12 was increased by DCs, in contrast the secretion of IL-4 and IFN-γ in MLR supernatant did not decrease significantly.

***Conclusion*:** Exotoxin A decreases the proliferation of T-cells and also leads to a change in the pattern of cytokine secretion of immune cells.

Keywords: **Exotoxin A, Dendritic cell, Immunomodulatory effects**

* **Corresponding Author: Manouchehr Rasouli**, Department of Immunology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Namazi Hospital, Shiraz, Iran
Email: rasouliman@yahoo.com
Tel :+98 7116474304

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.9.7]