ORIGINAL ARTICLE

Effect of Epigallocatechin gallate (EGCG) on Production of Dendritic Cells from Peripheral Blood Monocytes

Mohammad Ali Mofid Nakhaei[1],
Nabiallah Mohammadi[2],
Saeid Abediankenari[3]

[1] MSc Student in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Immunology, Immunogenetics Research center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Immunogenetics Research center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 13, 2020 ; Accepted September 23, 2020)

Abstract

Background and purpose: Dendritic cells are professional antigen presenting cells that initiate and modulate immune responses. Epigallocatechin gallate (EGCG) is identified as a prophylactic agent that can suppress tumor formation. This research aimed at investigating the effect of EGCG on differentiation of dendritic cells from monocytes and as a potential substitute for IL-4 in this process.

Materials and methods: In this experimental study, blood samples were drawn and peripheral blood mononuclear cells were isolated using FICOL. The monocytes CD14 + were purified by MACS. EGCG was added in 5 µmol / l and 10 µmol / l. On days six and eight, the cells were analyzed and differentiation factors such as CD83, HLA-DR, and CD-b were evaluated using flow cytometry. In addition, IL-23 and IL-35 levels were measured.

Results: CD-11 and CD11b levels in mature and immature dendritic cells were significantly different between the two paths ($P<0.05$), HLA-DR levels were also significantly different in dendritic cells ($P<0.05$). IL-23 and IL-35 levels in mature and immature dendritic cells were not significantly different, whereas these levels in mature dendritic cells showed significant differences between the two paths ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that EGCG compared to IL-4 can initiate monocyte differentiation to dendritic cells and this molecule can turn monocytes to dendritic cells with tolerogenic qualities compared to the classic path.

Keywords: EGCG, IL-35, IL-23

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (190): 1-10 (Persian).

* **Corresponding Author: Saeid Abediankenari -** Immunogenetics Research center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Abedianlab@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 190 آبان سال 1399 (10-1)

بررسی اثر ماده موثره epigallocatechin-gallate (EGCG) بر تولید سلول های دندریتیک از مونوسیت های خون محیطی انسانی

محمدعلی مفیدنخعی[1]
نبی اله محمدی[2]
سعید عابدیان کناری[3]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که آغازگر و تعدیل‌کننده پاسخ‌های ایمنی می‌باشند. ماده شیمیایی epigallocatechin gallate (EGCG) چای سبز یکی از عوامل سرکوبگر تومور شناخته شده است. از آن‌جایی که اینترلوکین4 (IL-4) تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی را مهار می‌کند و EGCG نیز دارای اثر ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی می‌باشد، لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر EGCG در تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک به عنوان جایگزینی مناسب برای IL-4 بوده است .

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول جداسازی و سلول‌های مونوسیت $CD14^+$ به روش MACS جمع‌آوری شدند. EGCG در دو غلظت 5 µmol/l و 10 µmol/l اضافه شد. سلول‌ها درروز ششم و هشتم از جهت شاخص‌های تمایزی CD83، HLA-DR و CD11b به روش فلوسیتومتری ارزیابی شدند. IL-23 و IL-35 نیز در مایع رویی کشت سلولی بررسی شدند.

یافته‌ها: مولکول‌های CD11b و CD83 در سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ، تفاوت معنی‌داری بین دو روش داشت ($P < 0/05$) مولکول HLA-DR در سلول‌های دندریتیک نیز تفاوت معنی‌داری داشت($P < 0/05$). IL-23 و IL-35 در مرحله نابالغ نسبت به سلول‌های دندریتیک بالغ تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی در مرحله بالغ بین دو روش تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P < 0/05$).

استنتاج: بر اساس نتایج این مطالعه، EGCG درمقایسه با IL-4 توانایی تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک نابالغ را دارد و به‌نظر می‌رسد این مولکول باعث تولید سلول‌هایی دندریتیک با خاصیت تولروژنیک نسبت به روش کلاسیک می‌شود.

واژه های کلیدی: EGCG، اینترلوکین 35، اینترلوکین 23

مقدمه

سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که آغازگر و تعدیل‌کننده پاسخ‌های ایمنی می‌باشند. این سلول‌ها دارای عملکرد ایمونولوژیکی مختلف هستند و قادر به القای پاسخ‌های ایمنی اولیه در بدن و آزمایشگاه می‌باشند. سلول‌های دندریتیک از چندین زیرگروه تشکیل شده و در اندام‌های لنفاوی و

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی E-mail:Abedianlab@yahoo.com
1. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشجوی دکترا ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1399/2/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1399/3/13 تاریخ تصویب : 1399/7/2

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

غیر لنفاوی قرار دارند و از پیش‌سازهای موجود در گردش‌خون مشتق می‌شوند. این پیش‌سازها به‌واسطه جریان خون در اندام‌های غیر لنفاوی به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل می‌شوند. سلول‌های دندریتیک بسته به نوع بافت هدف به اندام‌های لنفاوی مانند طحال و غدد لنفاوی مهاجرت کرده و در آن‌جا به سلول‌های دندریتیک بالغ تمایز پیدا می‌کنند. سلول‌های دندریتیک تحریک‌کننده‌های اصلی پاسخ‌های سلولی T ناآزموده هستند. این سلول‌ها دارای شاخص‌های مختلفی از جمله CD83، p55، S100b، OX62، M342، 2A1 و MIDC-8 بوده و سایتوکاین‌های اینترلوکین12 (IL-12)، کموکاین‌ها و پروتئازها را ترشح می‌کنند(1). مونوسیت‌ها پیش‌ساز سلول‌های دندریتیک می‌باشند. تمایز مونوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی با شرایط تمایز آن‌ها در داخل بدن متفاوت است. مطالعات نشان داده‌اند که مونوسیت‌های خون محیطی در محیط کشت RPMI تحت اثر اینترلوکین4 و فاکتورتحریک‌کننده کلونی مونوسیت و گرانولوسیت (GM-CSF) به سلول‌های $CD1a^{+}CD14low/-$ غیر چسبنده با مورفولوژی و ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک (DC) تمایز پیدا می‌کند، اما این سلول‌ها به دلیل فقدان بیان CD83 نابالغ هستند. سلول‌های دندریتیک نابالغ مشتق از مونوسیت پس از تیمار با ترکیبات شناخته شده برای القای بلوغ مانند LPS و TNF-α بالغ می‌شوند. مونوسیت‌های انسان و موش کشت شده با GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک نابالغ تمایز پیدا می‌کنند که بیان MHC class II و مولکول‌های کمک تحریکی پایینی دارند(2). امروزه سلول‌های دندریتیک به دلیل توانایی تعدیل پاسخ‌های ایمنی از عوامل مهم درمانی درسرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی، آلرژی و جلوگیری از رد پیوند محسوب می‌شوند(3). واکسن‌های بر پایه سلول‌های دندریتیک (DC-Based Vaccine) شامل سلول‌های دندریتیک ارائه‌دهنده آنتی‌ژن مانند آنتی‌ژن‌های تومور بوده که اکثر آن‌ها برای تحریک پاسخ‌های ایمنی به‌ویژه علیه سرطان استفاده می‌شود. امروزه برای اغلب مطالعات بالینی از سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت و سلول‌های $CD34^{+}$ استفاده می‌شود(3). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از برخی مواد مثل لیپوپلی ساکارید، می‌تواند سبب تغییر در مسیر بلوغ و تکامل سلول‌های دندریتیک شود(6-4).

چای سبز از ترکیبات پلی فنول از جمله (EGCG) epigallocatechin-gallate، (EGC) epigallocatechin و (EC) epicatechin تشکیل شده است. فراوان‌ترین پلی‌فنول چای سبز EGCG است که مسئول بسیاری از اثرات مفید چای سبز می‌باشد. EGCG به عنوان قوی‌ترین عامل پیشگیری‌کننده تومورها است که می‌تواند باعث القای سرکوب شکل‌گیری و رشد تومور از جمله در سرطان کولورکتال شود. نشان داده شده است که EGCG از مسیرهای مختلف رشد سلول‌های سرطانی، بقا، رگ زایی و متاستاز را تنظیم می‌کند. در مقایسه با مواد ضد سرطان رایج مانند رتینوئیدها و دوکسوروبیسین، این ترکیب دارای سمیت نسبتا کم می‌باشد، بنابراین استفاده از EGCG در آزمایش‌های بالینی به عنوان یک ماده ضد سرطان حائز اهمیت بوده است. EGCG باعث ایجاد سطوح بالایی از سلول‌های دندریتیک مملو از آنتی‌ژن در گره‌های لنفاوی موش‌های مبتلا به سرطان شده است. علاوه بر این، ترکیبی از EGCG همراه با واکسن DNA منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی سلول‌های T ویژه تومور و اثرات ضدتومور شده و میزان درمان واکسن همراه با EGCG در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد(7). از آن‌جایی‌که سایتوکاین IL-4 تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند IL-1، IL-6، TNF-α و IL-8 را مهار می‌کند و همچنین EGCG موجود در چای سبز دارای اثر ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی می‌باشد، لذا در این مطالعه اثر EGCG در تمایز سلول‌های دندریتیک از مونوسیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان افق تازه‌ای در تمایز سلول‌های دندریتیک ترسیم نمود.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

مواد و روش‌ها

در ایـن مطالعـه تجربـی، 25-20 سـی‌سـی خـون محیطی در لوله حاوی ماده ضد انعقـاد هپـارین از افـراد داوطلب پس از کسب رضایت آگاهانه اخذ گردید.

- جداسازی سلول‌های مونوسیت به روش (MACS) Magnetic activated cell sorter

به منظور جداسـازی سـلول‌های تک‌هسـته‌ای خـون محیطـی (PBMC)از فـایکول بـا وزن مخصـوص 1/077 (سیگما، امریکا) استفاده شد. نمونه خون گرفته شده پس از رقیق کردن در بافر فسفات به آرامی به فایکول اضـافه گردید. سپس لوله‌ها بـه مـدت 20 دقیقـه در دورg 2000 سـانتریفوژ شـدند. پـس از سـانتریفوژ، سـلول‌هـای تـک هسته‌ای خون محیطی کـه بـه‌صـورت حلقـه ای تشـکیل شده بودند، جدا گردید. پس از شمارش سلول‌های تک هسـته‌ای خـون محیطـی بـا اسـتفاده از روش جداسـازی سلولی مبتنی بر مگنت (MACS) مونوسیت‌هـای دارای شاخص CD14خالص و جمع‌آوری شد. سلول‌ها پس از دوبار شستشو و شمارش، در محیط کشـت RPMI1640 حـاوی سـرم جنـین گوسـاله 10 درصـد و پنـی‌سـیلین - استرپتو مایسین 1درصد در یک پلیت شش خانـه کشـت شدند و در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گـراد حـاوی Co2 5 درصد به مدت 2/5 ساعت انکوبه شدند.

-تولید سلول‌هـای دنـدریتیک نابـالغ از مونوسـیت‌هـای $CD14^+$

برای تولید سلول‌های دندریتیک به روش کلاسـیک و روش آزمایشی (EGCG) پس از اتمام زمان انکوباسیون، سایتوکاین‌ها و ماده EGCG به‌صورت زیر اضافه شد:

در روش اسـتاندارد بـه ازای هـر میلـی‌لیتـر محـیط کشـت سـلولی، 50 ng/mL اینترلـوکین 4 و100 ng/mL GM-CSF اضافه شد. برای ترکیب EGCG، دو غلظـت متفاوت پس از اپتیمازاسیون در نظـر گرفتـه شـد کـه در این تحقیق به جای اینترلوکین 4، ماده موثره EGCG در غلظت‌های 5 µmol/l و µmol/l10 همـراه بـا GM-CSF با غلظت 100 ng/mL اضافه شد.

در روز سـوم تعـویض محـیط انجـام شـد و در روز ششم سلول‌ها به سلول دندرتیک نابالغ بـا زوایـد کشـیده شده و ستاره‌ای شکل تمایز پیدا کردند. سپس مـایع رویـی چاهک (سوپر ناتانت) بـرای بررسـی آنـالیز سـایتوکاین (Cytokine assay)، IL-23 و IL-35 جمع‌آوری شـد و سـلول‌هـای دنـدریتیک نابـالغ بـه روش فلوسـیتومتری و بررسی مارکرهای CD83 و CD11b و HLA-DR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تبدیل سلول‌های نابالغ به سـلول‌هـای دنـدریتیک بالغ، سـایتوکاین TNF-α بـا غلظـت 100 ng/mL اضـافه شد و به مدت 2 روز در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون سلول‌ها جهت بررسی شاخص‌هـای بلوغ به روش فلوسیتومتری جمع‌آوری گردیدند.

- ارزیابی مولکول‌هـای سـطحی سـلول‌هـای دنـدریتیک نابالغ و بالغ به روش فلوسیتومتری

در روز ششـم پـس از کشـت سـلولی، سـلول‌هـای دندریتیک نابالغ که تحت اثر اینتر لـوکین4 وGM-CSF به روش استاندارد و نیز تحـت اثـر EGCG و GM-CSF در روش آزمایشـی قـرار گرفتـه بودنـد، بـا اسـتفاده از دسـتگاه فلوسـیتومتری (Partec, Germany) مارکرهـای CD83 و CD11b و HLA-DR همراه با ایزوتیپ کنترل جهت تعیین هویت مورد ارزیابی قرار گرفتند. علاوه بـر این در روز هشتم، 3 چاهک باقیمانده از کشت سلول‌های دندریتیک از دو غلظت EGCG و روش استاندارد بـرای بررسی بلوغ سلول‌های دندرتیک جمع‌آوری شدند. ابتدا مایع رویی (سوپر ناتانت) برای بررسی آنالیز سـایتوکاین IL-23 و IL-35 جمع‌آوری شد و سپس بـرای بـه دسـت آوردن سلول‌ها برای آماده‌سازی جهت فلوسـیتومتری بـا پی‌پتاژ کـردن و در نهایـت بـا اضـافه نمـودن PBS سـرد تخلیـه شـدند. سـپس بـه مـدت 10 دقیقـه در دور g 400 سانتریفوژ شد به‌طوری‌که در روز هشتم، مایع رویـی هـر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

3 لوله را به آرامی خالی و پس از آن سلول‌ها را برای مارکرهای CD83 و CD11b و HLA-DR به روش فلوسیتومتری بررسی کرده و نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار Flow Max آنالیز شد.

- بررسی سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت کشت سلولی به روش الیزا

در این مطالعه به منظور ارزیابی نقش EGCG، میزان ترشح سایتوکاین‌های IL-23 و IL-35 در مایع‌رویی محیط کشت سلول بالغ پس از جمع آوری با استفاده از کیت الایزا (Biowest, Germany) براساس پروتکل شرکت سازنده در هر دو گروه اندازه‌گیری شد.

یافته ها

- تعیین غلظت مناسب EGCG جهت استانداردسازی روش

نتایج کشت غلظت‌های مختلف EGCG با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مقایسه با کنترل نشان داد که غلظت 5 µmol/l، بهینه‌ترین غلظت جهت حیات سلولی پس از اضافه کردن ماده موثره بوده است که همانند غلظت 1 µmol/l بالاترین غلظت معقول جهت حفظ سلول بوده است. علاوه بر این، در مطالعه حاضر از غلظت 10 µmol/l نیز جهت مقایسه استفاده گردید.

- نتایج فلوسیتومتری

به منظور بررسی توانایی EGCG در القای تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک، شاخص CD11b در سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ در غلظت‌های مختلف EGCG مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین میزان CD11b در سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ، بین دوروش وجود دارد($P < 0/05$). لاوه بر این بررسی نتایج فلوسیتومتری برای تعیین مارکر CD11b در سلول‌های دندریتیک نابالغ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری با روش استاندارد بوده است. بدین معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان مارکر CD11b شده است (جدول شماره1).

به علاوه اختلاف معنی‌داری بین سطح شاخص CD83 در سلول‌های دندریتیک نابالغ با روش استاندارد دیده شده است. بدین‌معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان شاخص CD83 شده است. علاوه بر این سطح CD83 در سلول‌های دندریتیک بالغ دارای تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد بوده است (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: میانگین فراوانی مارکر CD11b در سطح سلول‌های دندرتیک نابالغ و بالغ، که نشان دهنده میزان تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک در گروه‌های مختلف است.

گروه ها		انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
سلول دندریتیک نابالغ	روش استاندارد	101/4 ± 0/5774	
	EGCG غلظت 5	90/06 ±0/5774	0/0002***
	EGCG غلظت 10	93/73 ±0/5774	0/0007***
سلول دندریتیک بالغ	روش استاندارد	117/4 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	81/73 ±0/5774	<1/00001 ****
	EGCG غلظت 10	85/14 ±0/5774	<0/0001 ****

نتایج حاصل، میانگین و انحراف‌معیار به‌دست آمده از MFI بروش فلوسایتومتری در مقایسه بین دو روش در غلظت‌های مختلف است که ($P < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شده است

بررسی نتایج فلوسیتومتری برای تعیین سطح HLA-DR در سلول‌های دندریتیک نابالغ تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد داشته است. بدین‌معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان مارکر CD83 شده است. علاوه بر این سطح CD83 در سلول‌های دندریتیک بالغ دارای تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد بوده است (جدول شماره 3).

جدول شماره 2: میانگین فراوانی مارکر CD83 در سطح سلول های دندرتیک نابالغ و بالغ، که حضور سلول دندریتیک و میزان تمایز مونوسیت به دندریتیک را در گروه های مختلف نشان می دهد

گروه		انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
سلول دندریتیک نا بالغ	روش استاندارد	7619 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	12/87 ±0/5774	0/0011 **
	EGCG غلظت 10	10/81 ±0/5774	0/00004
سلول دندریتیک بالغ	روش استاندارد	36/29 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	11/79 ±0/5774	<0/0001 ****
	EGCG غلظت 10	13/54 ±0/5774	<0/0001 ****

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

جدول شماره 3: میانگین فراوانی مارکر HLA-DR در سطح سلول‌های دندرتیک نابالغ و بالغ، که نشان‌دهنده میزان تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک درگروه‌های مختلف است.

گروه		انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
سلول دندریتیک نا بالغ	روش استاندارد	126/4 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	186 ±0/5774	<0/00001 ****
	EGCG غلظت 10	219/4 ±./5774	<0/0001 ****
سلول دندریتیک بالغ	روش استاندارد	278/7 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	272/1 ±0/5774	0/0013 **
	EGCG غلظت 10	249/2 ±0/5774	<0/0001 ****

نتایج حاصل میانگین و انحراف معیار به‌دست آمده از MFI به روش فلوسایتومتری با مقایسه بین دو روش در غلظت‌های مختلف است که P <0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شده است

- سطح سایتوکاین ها IL-23, IL-35 به روش الیزا

نتایج مربوط به اندازه گیری سایتوکاین‌ها نشان می‌دهد که میانگین غلظت سایتوکاین‌ها در مقایسه با روش استاندارد نزدیک به هم بوده است، از این رو میانگین غلظت اینترلوکین 35 در مقایسه با روش استاندارد، قبل از بلوغ، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P >0/05). در حالی‌که در زمان بلوغ تفاوت معنی‌داری نشان داده است (جدول شماره 4).

جدول شماره 4: میانگین غلظت اینترلوکین 35 در دوغلظت EGCG در مقایسه با روش کلاسیک.

گروه		انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
سلول دندریتیک نا بالغ	روش استاندارد	7/54 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	8/343 ±0/5745	(ns)0/3798
	EGCG غلظت 10	7/79 ±0/5774	(ns)0/7747
سلول دندریتیک بالغ	روش استاندارد	10/05 ±0/5774	
	EGCG غلظت 5	7/53 ±0/5774	0/0367 *
	EGCG غلظت 10	7/08 ±0/5774	0/0220 *

نتایج به صورت Mean ±SD نمایش داده شده است و P >0/05 معنی دار در نظر گرفته شده است

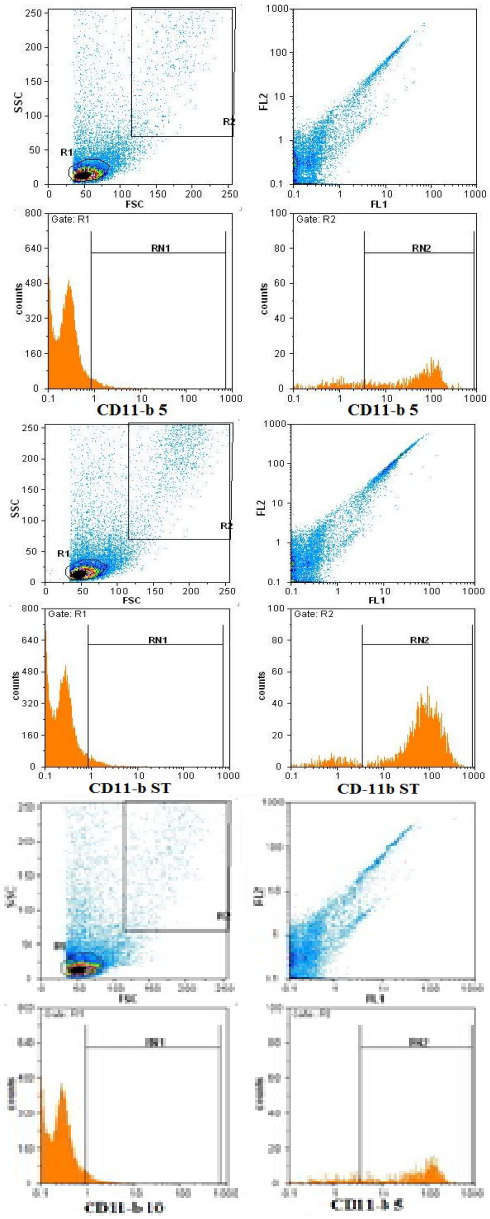
بحث

در این مطالعه برای اولین بار از ماده موثره EGCG جهت تبدیل مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک نابالغ به جای اینتر لوکین4 استفاده شد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلول‌های T دخیل هستند و به عنوان عوامل مهم برای درمان‌های مبتنی بر سلول مورد توجه قرار گرفته‌اند. از این رو، سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت (Mo-DC) در پروتکل‌های بالینی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها استفاده شده است.

Min و همکاران (2015) نشان دادند که EGCG با افزایش سلول‌های T تنظیمی باعث تعدیل پاسخ ایمنی می‌گردد(8). درشرایط آزمایشگاهی، DC ها را می‌توان از منابع مختلف سلولی از جمله سلول‌های پیش‌ساز $CD34^+$ از مغز استخوان (BM) و خون بند ناف (CB) و مونوسیت‌های به‌دست آمده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) تمایز داد. DC های نابالغ در کشت به مدت 5 روز در محیط بدون سرم حاوی IL-4 و GM-CSF، از مونوسیت‌ها تولید می‌شوند این سلول‌های نابالغ با قرار گرفتن در معرض محرک بلوغ تحریک می‌شوند و همزمان با آنتی ژن توموری به مدت 2-1 روز بارگیری می‌شوند(9).

نتایج مطالعه نشان داد پس از کشت مونوسیت‌ها در روش استاندارد و روش آزمایشی در دو غلظت (غلظت‌های 5 و 10 µmol/Lit از ترکیب EGCG)، میزان CD11b در هر دوحالت بالغ و نابالغ، اختلاف معنی‌داری بین دو روش دارد. براساس این نتایج EGCG در بروز CD11b نقش کم‌تری نسبت به روش استاندارد داشته است. بر اساس داده‌های این مطالعه، میزان بیان در حضور EGCG به‌طور معنی‌داری کم‌تر از روش استاندارد است. از این‌رو تمایز و ایجاد سلول‌های دندریتیک کم‌تر از روش استاندارد می‌باشد و میانگین مارکر CD11b میان این دو گروه (روش استاندارد و روش آزمایشی در هر دو غلظت) در هر دو حالت بالغ و نابالغ دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (جدول شماره1 و نمودار شمار 1).

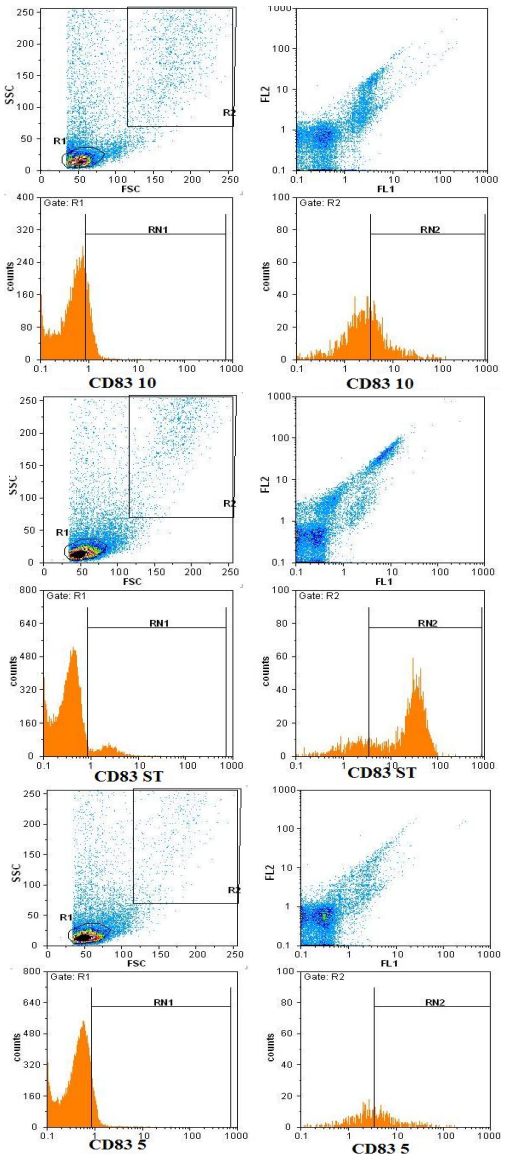
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]



نمودار شماره 1: نمودار فلوسیتومتری از مارکر CD11b در دوغلظت EGCG در مقایسه با کنترل

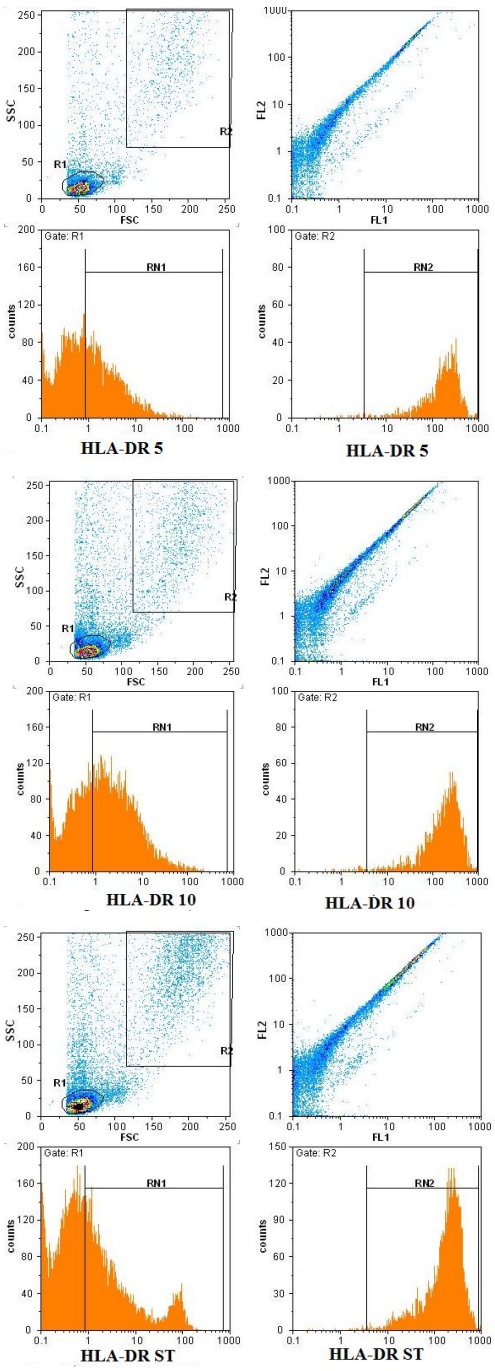
مطالعه‌ای که Yoneyama و همکاران (2008) انجام دادند نشان می‌دهد که EGCG بر فنوتیپ سلول‌های دندریتیک بالغ با اثر بر روی CD83، CD80، CD11C، و HLA-DR نقش دارد و با تاثیر بر مولکول‌های کمک تحریکی می‌تواند در عرضه آنتی‌ژن موثر باشد. به‌طوری که EGCG سبب تعدیل توانایی آندوسیتوز در سلول‌های دندریتیک می‌شود(10).

در این مطالعه میزان تظاهر CD83 و HLA-DR تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد در مقایسه با EGCG در هر دو غلظت، در حالت‌های بالغ و نابالغ داشته است (نمودار شماره 2 و3، جداول شماره 2و3). این نتایج نشان می‌دهد که EGCG نسبت به روش استاندارد سبب بروز کم‌تر CD83 و HLA-DR می‌شود($P < 0/05$) که از دلایل آن می‌تواند القای آپوپتوز درسلول‌های مونوسیت و کاهش بروز شاخص‌های بلوغ در سلول‌های دندریتیک باشد.



نمودار شماره 2: نمودار فلوسیتومتری شاخص بلوغ CD83 در دو غلظت از EGCG در مقایسه با روش استاندارد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]



نمودار شماره 3: نمودار فلوسیتومتری: درصد بروز HLA-DR در دو غلظت 5 µmol/l و 10 EGCG در مقایسه با روش استاندارد

موافق با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، در یک مطالعه نشان داده شده که EGCG موجب القای آپوپتوز در مرحله تبدیل سلول‌های نابالغ به سلول‌های بالغ در سلول‌های DC شده ودر فنوتیپ آن‌ها اثر می‌گذارد(10). آن‌ها بیان کردند که DC های بالغ تحت تیمار با EGCG، فعالیت تحریکی سلول‌های T آلوژنیک را با ترشح اینترلوکین 10 مهار می‌کنند. در همین راستا و موافق با نتایج مطالعه حاضر، Roger و همکاران نشان دادند که EGCG بیان MHC II را در سلول‌های DC مهار می‌کند(12،11). علاوه بر این EGCG می‌تواند سبب افزایش تماس سلول به سلول و تعدیل پاسخ‌های ایمنی شود(13،11).

در راستای نتایج مربوط به شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک، سایتوکاین‌های اینترلوکین 23 و 35 در روش EGCG، در مقایسه با روش استاندارد در حالت نابالغ دارای تفاوت معنی‌داری نبود، ولی در حالت بالغ میانگین این سایتوکاین‌ها در گروه آزمایشی، کم‌تر از روش استاندارد بوده است. از آن‌جایی‌که IL-23 یک سایتوکاین التهابی می‌باشد، انتظار می‌رود پس از بلوغ، سلول‌های دندریتیبک، افزایش بیان داشته باشد و در مقابل، بیان سایتوکاین IL-35 پس از بلوغ کاهش یابد که این نتایج در مطالعه حاضر مشاهده شد. با توجه به اثرات ضد التهابی EGCG، مشاهده شد که این ترکیب موجب کاهش بیان این سایتوکاین در کشت مربوطه، به‌خصوص بعد از بلوغ شده است. به‌طوری‌که بین میانگین غلظت اینترلوکین 23 در روش آزمایشی و روش استاندارد، قبل از بلوغ، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد در حالی که بعد از بلوغ، این تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود. موافق با مطالعه حاضر، sun و همکاران در مطالعه خود مشاهده نمودند که EGCG سطح سایتوکاین‌های IL-17، IL-22، IL-23 و مالون دی آلدئید (MDA) را در پلاسما کاهش می‌دهد وهمچنین سبب افزایش تعداد د سلول‌های CD4+ T می‌شود(14). با توجه به ماهیت این سایتوکاین‌ها، این شواهد نشان می‌دهد که تغییرات این سایتوکاین‌ها نشان از نقش ضد التهابی EGCG دارد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسدکه ترکیب مورد آزمایش می‌تواند با مکانیسمی شبیه IL-4 و GM-CSF، با اثر بر M-CSF و گیرنده آن

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

و یا با اثر بر میزان بیان IL-4 و GM-CSF موجب تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک شود و لذا می‌تواند ترکیبی مناسب در تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک با ویژگی تعدیل پاسخ ایمنی باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجوی ایمونولوژی است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح 32-96 و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1398.1015 انجام شد.

References

1. Leichsenring A, Bäcker I, Furtmüller PG, Obinger C, Lange F, Flemmig J. Long-Term Effects of (–)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Pristane-Induced Arthritis (PIA) in Female Dark Agouti Rats. PloS One 2016; 11(3): e0152518.
2. Saleh F, Raghupathy R, Asfar S, Oteifa M, Al Saleh N. Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 2014; 14(1): 322.
3. Wang T, Xiang Z, Wang Y, Li X, Fang C , Song S, et al. (–)-Epigallocatechin Gallate Targets Notch to Attenuate the Inflammatory Response in the Immediate Early Stage in Human Macrophages. Frontiers In Immunology 2017; 8: 433.
4. Abediankenari S, Janbabaei Mollae G, Ghasemi M, Yousefzadeh Y, Bahrami M, Alimoghaddam K. Vaccination of diffuse large B-cell lymphoma patients with antigen-primed dendritic cells.Acta Med Iran 2013; 51(5): 284-288 (Persian).
5. Abediankenari S, Mohammad Bagher Eslami, Abdolfattah Sarrafnejad, Mehrnosh Mohseni, Bagher Larijani. Dendritic Cells Bearing HLA-G Inhibit T-Cell Activation in Type 1 Diabetes. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2007; 6(1): 1-7 (Persian).
6. Abediankenari S, Yousefzadeh Y, Azadeh H, Vahedi M. Comparison of several maturation inducing factors in dendritic cell differentiation. Iran J Immunol 2010; 7(2): 83-87 (Persian)
7. Wang ZM, Gao W, Wang H, Zhao D, Nie ZL, Shi JQ, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TNF-a-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 in human umbilical vein endothelial cells. Cell Physiol Biochem 2014; 33(5): 1349-1358.
8. So Youn Min, Mei Yan, Bum Kim S, Ravikumar S, Ryuel kwon S, Vanarsa K, et al. Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Autoimmune Arthritis Through Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expressing Dendritic Cells and the Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 Antioxidant Pathway. J Inflamm 2015; 12: 53.
9. Chung CYJ, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. Clin Dev Immunol 2013; 2013: 972865.
10. Yoneyama S, Kawai K, Tsuno NH, Okaji Y, Asakage M, Tsuchiya T, et al. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. J Allergy Clin Immunol 2008; 121(1): 209-214.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]

11. Bell G, Anderson A, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry R, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2017; 76(1): 227-234.
12. Rogers JL. Major tea catechin inhibits dendritic cell maturation in response to microbial stimulation. 2007.
13. Kenji Kuriya, Masahiro Nishio*, Tomoko Matsuda, Hayato Umekawa., Tea extract increases cell fusion via regulation of cell surface DC-STAMP. Biochem Biophys Rep 2020; 22: 100759.
14. Sun B, Wang W, He Z, Zhang M, Kong F, Sain M, et al. Improvement of Stability of Tea Polyphenols: A Review. Curr Pharm Des 2018; 24(29): 3410-3423.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-09-24]