دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۵، صفحه ۲۹۵ - ۲۷۸ (آذر و دی ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(5): 278-295

ارزیابی ایمونوفنوتایپ و ایمونوتایپ رده‌های سلولی میلومایی KMM1، JJN3، LP1، L363، KMS-12BM و RPMI-8226 جهت تصدیق هویت رده‌ها

نادر وظیفه شیران (MSc)[1*]، سعید آبرون (PhD)[1]

[1] گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۴/۱۶- پذیرش مقاله: ۹۸/۵/۳۰)

چکیده

زمینه: در بیشتر تحقیقات پره‌کلینیکال که از رده‌های سلولی مربوط به بیماری‌ها استفاده می‌شود، می‌بایست ابتدا رده‌ها تصدیق و تعیین هویت شوند تا هزینه‌های پژوهش صرف سلول نابجا نشده و نتایج حاصل، غیرمرتبط نباشند. در این تحقیق شش رده سلول میلومای انسانی (HMCL) به منظور تعیین هویت، از نظر ایمونوفنوتایپ و ایمونوتایپ ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها: برای بررسی مورفولوژی از گستره سیتواسپین و رنگ رایت، برای ایمونوفنوتایپ از فلوسایتومتری مارکرهای CD45، CD2، CD19، CD38 و CD138 و برای بررسی وضعیت ترشحی و ایمونوتایپ، از کاپیلاری الکتروفورز و ایمونوفیکساسیون استفاده گردید.

یافته‌ها: با توجه به مورفولوژی مشخص پلاسماسل، ماهیت همه رده‌های سلولی تأیید شد ولی L363 و JJN3 شباهت مورفولوژی بالایی داشتند. در بررسی ایمونوفنوتایپ، گذشته از تأیید ماهیت میلومایی همه رده‌ها، شباهت کاملی بین دو رده L363 و JJN3 مشاهده گردید، برای تأیید نهایی، ایمونوتایپ آن‌ها نیز انجام شد که KMS12BM غیرمترشحه، KMM1 به صورت BJP-λ و مابقی به صورت IgG-λ بودند.

نتیجه‌گیری: هویت ۴ رده سلولی RPMI-8226، KMS-12BM، KMM1 و LP1 پس از بررسی، تأیید شد ولی هویت دو سلول JJN3 و L363 به دلیل شباهت اساسی در مورفولوژی، ایمونوفنوتایپ و ایمونوتایپ مورد تردید قرار گرفت. در بررسی ما، ایمونوتایپ هر دو IgGλ بودند، این درحالی است که طبق اطلاعات حاصل از مقالات و سایت ATCC.org، ماهیت اصلی JJN3 به صورت IgAκ می‌باشد. لذا اصالت و ماهیت JJN3 مخدوش و در واقع همان رده L363 بوده است. بدین ترتیب رده JJN3 کنار گذاشته شد و نتایج آن برپایه همسانی با نتایج L363 تفسیر گردید.

واژگان کلیدی: رده سلولی، HMCL، میلوما، تصدیق هویت، ایمونوفنوتایپ، ایمونوتایپ

*تهران، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: nadershirani@yahoo.com
***ORCID: 0000-0003-0438-4438**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

مقدمه

نئوپلاسم‌های خونی به انواع لنفوم (۵۳ درصد)، لوسمی (۳۲ درصد) و دیسکرازی‌های پلاسماسل (۱۵ درصد) تقسیم می‌شوند که در بین دیس‌کرازی‌ها، گاماپاتی مونوکلونال با اهمیت نامعین (MGUS) و مالتیپل‌میلوما (MM) با ۶۲ و ۲۱ درصد بیشترین شیوع را دارند (۱). مالتیپل میلوما به دلیل داشتن تتراد CRAB[1] یا هیپرکلسمی (C)، نارسایی کلیوی (R)، آنمی پیشرونده (A) و ضایعات لیتیک استخوانی (B) از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۲). پلاسماسل‌ها، B سل‌های بعد مرکز زایا در غدد لنفاوی هستند که بعد برخورد با آنتی‌ژن و سیتوکاین‌های مترشحه از T-کمکی و طی چند مرحله به پلاسماسل تمایز می‌یابند. در واقع برخی از T سل‌های فعال شده در خارج فولیکول مانده و با تولید سیتوکاین باعث تمایز برخی از B سل‌های تکثیر شده به پلاسماسل‌های کوتاه عمر (SL-P.cell)[2] می‌شوند، برخی T سل‌ها نیز با بیان CXCR5 و کاهش CCR7 وارد فولیکول شده و تشکیل T سل‌های کمکی فولیکولار را می‌دهند که برهم‌کنش آن‌ها با B سل‌های تکثیر شده داخل فولیکول منجر به تمایز تدریجی آن‌ها به سنتروبلاست، سنتروسیت، ایمونوبلاست، پلاسمابلاست، پلاسماسل عمر بلند (LL-P.cell) و B- خاطره می‌شود (۳). پلاسماسل‌های عمر بلند به دلیل مهاجرت و استقرار در نیچ BM و دریافت فاکتورهای رشد APRIL، BAFF، IL-6، IL-21 و IGF-1 تا سال‌های طولانی زنده مانده، مورفولوژی کامل پلاسماسلی پیدا کرده و باعث تولید IgG و دیگر ایزوتایپ‌های آنتی‌بادی می‌شوند ولی SL-PC به دلیل منشاء غیر مرکز زایا، عدم دریافت سیگنال CD40L و عدم مهاجرت به BM، نه تنها مورفولوژی حد واسط بین لنفوسیت و پلاسموسیت پیدا می‌کنند (لنفوپلاسماسیتوئید)، بلکه دچار جهش سوماتیک و تعویض کلاس آنتی‌بادی نیز نشده و فقط IgM می‌سازد. SL-PCها منشاء بیماری ماکروگلبولینمی والدنشتروم (WM) یا لنفوم لنفوپلاسماسیتوئیدی و LL-PCها منشاء بیماری‌های MGUS، مالتیپل میلوما و لوسمی پلاسماسل می‌باشند که به LL-PCهای بدخیم مغز استخوان، سلول‌های میلومایی نیز گفته می‌شود. نئوپلاسم سلول میلومایی منجر به تولید انبوهی از ایمونوگلبولین‌های کامل (IgH+IgL) یا ناقص (IgH یا IgL) می‌شود که فرم ناقص IgH باعث بیماری زنجیره سنگین (HCD) و فرم ناقص IgL باعث مالتیپل میلوما با گاماپاتی پروتئین بنس جونز (BJP-MM) می‌شود. فرم کامل ایمونوگلبولین نیز بر اساس نوع گاماپاتی به انواع IgG (۵۲ درصد)، IgA (۲۲ درصد)، BJP (۱۵ درصد)، IgM (۱۰ درصد)، IgD (۱ درصد) و IgE (<۱ درصد) تقسیم می‌شود (۴).

برای تحقیق بر روی بیماری میلوما می‌بایست جمعیت آماری خود را از نمونه بیمار، مدل‌های حیوانی، سلول‌های اولیه جدا شده از بدن بیماران یا رده سلول‌های میلومایی انتخاب نمود. کار بر روی نمونه انسان به جهت کم بودن شیوع میلوما، انتخاب نمونه‌های تازه تشخیص درمان نشده، عدم همکاری یا عدم دسترسی بیماران، فوت برخی بیماران، کسب رضایت‌نامه و رعایت اخلاق پزشکی دشوار بوده و البته جداسازی سلول‌های میلومایی از آن‌ها برای کشت اولیه نیز به دلیل عمر کوتاه سلول‌ها دشوار بوده و به مهارت بالای محقق و تکنولوژی‌های پیچیده کشت سلولی نیاز دارد، تحقیق بر روی حیوانات آزمایشگاهی نیز به جهت عدم امکان تعمیم تمامی

[1] CRAB- hyperCalcemia, Renal failur, Anemia or lytic Bone lesions]
[2] Long Lived-Plasma Cell and Short Lived-Plasma Cell

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

نتایج به انسان، اختلافات فیزیولوژیک، گران بودن مدل‌های مذکور (موش C57BL یا KalwRij پیوند با رده‌های سلولی 5T2MM و 5T33) و نیاز به رعایت اخلاق پزشکی با محدودیت‌هایی همراه بوده و از طرفی موش به میلوما مبتلا نشده و فقط پلاسماسیتوما ایجاد می‌کند، لذا امروزه برای بیشتر تحقیقات پایه و کارآزمایی‌های پیش‌بالینی بر روی میلوما (مثل تأثیر دارویی، سیگنالینگ داخل سلولی، بررسی ساختار سلولی و بر همکنش بین سلولی) از رده‌سلول میلومای انسانی (HMCL) استفاده می‌شود که با توجه به تنوع وسیع در بیماری میلوما، رده‌های حاصل از آن‌ها نیز بسیار متنوع می‌باشند. با توجه به هزینه بالای مطالعات مذکور، اولین اقدام برای کار روی رده‌های سلولی، شناسایی و تعیین هویت آن‌ها می‌باشد که برای این منظور یا از سلول‌های تجاری شناسنامه‌دار استفاده شده یا اینکه می‌بایست شخصاً اقدام به تعیین هویت آن نمود. درواقع به دلیل آلودگی یک سلول با سلول‌های دیگر یا به دلیل تغییرات ناشی از پاساژهای مکرر می‌بایست خصوصیات افتراقی یک سلول را مورد آنالیز قرار داد. در این تحقیق به تعیین هویت و خصوصیات ایمونوفنوتایپ (از نظر CD مارکرها) و ایمونوتایپ (از نظر نوع و کلاس آنتی‌بادی مترشحه) شش رده میلومایی KMS12-BM، KMM1، L363، LP1، JJN3 و RPMI-8226 فاقد شناسنامه و اهدایی از دانشگاه کالج لندن (UCL) پرداخته می‌شود تا در صورت تصدیق، مورد استفاده پژوهشگران قرار بگیرد. به دلیل عدم استفاده از نمونه بالینی، ملاحظات اخلاقی خاصی در این تحقیق وجود نداشت و آنالیز آماری یافته‌ها و مشاهدات نیز به صورت توصیفی و طی تطبیق آن‌ها با مقالات معتبر صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

- کشت و آماده‌سازی سلول‌ها

رده‌های HMCL مورد استفاده در این مطالعه بنیادی-کاربردی، شامل L363، RPMI-8226، LP1، KMM1 و KMS-12BM بود که در شرایط مشابه (انکوباتور CO2دار ۵ درصد با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۵ درصد) و در محیط کشت RPMI-1640 (شرکت زیست فناوری کوثر) ساپلمنت با FBS ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها بلافاصله به محض رسیدن از لندن به تهران، به آزمایشگاه کشت سلولی انتقال داده شدند. در اولین اقدام وایابیلیتی و مورفولوژی سلول‌ها به کمک تست تریپان بلو ۰/۴ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند که متأسفانه به دلیل شرایط نامساعد ارسال، حیات سلول‌ها کمتر از ۱۰ درصد بوده و اغلب سلول‌ها وارد فاز آپوپتوتیک شده بودند. بدین ترتیب سلول‌ها با محیط کشت RPMI مورد شستشو قرار گرفتند تا مواد آپوپتوتیک، رادیکال‌های آزاد و لاشه‌های سلولی القاءگر آپوپتوز حذف شوند. سپس سلول‌ها به صورت سریالی رقیق‌سازی شدند تا به حد ۵-۱ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه برسد. در نتیجه چاهک‌هایی که در آن‌ها به صورت رندوم ۲-۱ سلول زنده قرار گرفته بودند، شروع به تکثیر نموده ولی چاهک‌های فاقد سلول زنده، دچار آپوپتوز نهایی و تخریب کامل سلولی شدند. در ادامه چاهک‌های تکثیر شده که در مجموع چند مورد بودند، باهم به یک چاهک پلیت ۴۸ خانه انتقال یافتند و با تکثیر بیشتر سلول‌ها به مرور از چاهک 24W، 12W و 6W استفاده کرده و نهایتاً سلول‌ها به فلاسک T25 منتقل شدند. به دلیل حساس بودن سلول‌ها، بلافاصله از آن‌ها فریز تهیه و به ازت مایع انتقال پیدا کردند. بعد از چند پاساژ و با

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

توجه به خصوصیات سلول‌های میلومایی، لاین‌های فوق از نظر چهار ویژگی مورد آنالیز قرار گرفتند:
بررسی مورفولوژی میلومای سلولی
بررسی ایمونوفنوتایپ و CD مارکرهای سلولی
بررسی توانایی ترشح ایمونوگلبولین یا BJP
بررسی ایمونوتایپ و کلاس آنتی‌بادی مترشحه به روش ایمونوفیکساسیون

- تهیه گستره با دستگاه سیتواسپین

برای تهیه گستره ابتدا روی یک لام شیشه‌ای، کاغذ صافی پانچ شده مخصوص را به همراه فونل قیفی قرار داده و هر دو در جایگاه مخصوص سیتوسپ قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی درون قیف‌فونل ریخته و قیف به صورت عمودی در بازوهای دستگاه سیتواسپین Shandon-III (England) قرار داده شد، سپس دستگاه را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده تا حین چرخش، هوا از دهانه قیف وارد و سوسپانسیون سلولی را به فرم افشانه یا اسپری تبدیل کند، از طرفی دیگر نیروی سانتریفوژ باعث پخش شدن سوسپانسیون بر روی سطح لام شده و کاغذ صافی نیز مازاد افشانه سلولی را جذب و از روی هم نشستن سلول‌های مازاد جلوگیری می‌کند. باد و جریان هوای تشکیل شده در سیتواسپین باعث خشک شدن سریع گستره شده و از تشکیل آرتیفکت جلوگیری می‌کند. لام‌های تهیه شده با متانول ۹۹/۵ درصد فیکس و به کمک دستگاه Ames (USA) و رنگ رایت (مرک- آلمان)، رنگ‌آمیزی و سلول‌ها مورد بررسی مورفولوژی قرار گرفتند.

- آماده‌سازی نمونه برای فلوسایتومتری

سلول‌ها به آرامی پیپتاژ شده و بعد از فیلتر و حذف سلول‌های بهم چسبیده، برای جلوگیری از اگرگاسیون سلولی در بافر بدون کلسیم و منیزیم PBS-A سوسپانسه شدند. در بررسی سلول‌های خونی حاوی FCγR، این احتمال وجود دارد که آنتی‌بادی‌ها از طریق Fc خود به رسپتورهای فوق متصل شده و باعث رنگ‌آمیزی غیراختصاصی سلول‌ها شوند، لذا برای بلوکه کردن رسپتورهای مذکور، ۱۰۰ میکرولیتر از BSA به هر یک میلیون سلول افزوده و سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای RT انکوبه و نهایتاً در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، بعد از حذف مایع رویی، به رسوب سلولی ۱۰۰ میکرولیتر بافر D-PBS خالص یا ساپلمنت با BSAی ۳ درصد افزوده می‌شود. به منظور نشان‌دار کردن با آنتی‌بادی فلورسنت، در دو لوله به نام‌های کنترل منفی و نمونه تست، ۱۰۰µl از سوسپانسیون سلولی فوق افزوده و به‌ترتیب به هرکدام ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی کنترل و آنتی‌بادی‌های ضد CD45، CD19، CD2، CD38 و CD138 شرکت Dako (دانمارک) افزوده و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه یخچال و در تاریکی انکوبه شدند. از آنجایی که آنتی‌بادی‌ها به‌جز اپی‌توپ اصلی، اتصال به اپی‌توپ‌های غیراختصاصی و اتصال غیروابسته به Fab نیز دارند، لذا در لوله کنترل منفی ایزوتایپ، از همان جنس آنتی‌بادی و از همان نوع حیوان (مثلاً IgG1 موشی) ولی علیه یک اپی‌توپ غیرمرتبط استفاده می‌شود تا اگر علی‌رغم استفاده از بلوکان، مختصر اتصال غیراختصاصی نیز وجود داشته باشد، مقدار آن تعیین شده و از پالس‌های حاصل از لوله نمونه کم شود. پس از انکوباسیون، به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر بافر شوینده D-PBS افزوده و سپس سانتریفوژ و محلول رویی اوت و به آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر D-PBS افزوده و طی کمتر از یک ساعت قرائت می‌شود. لکوسیت‌ها به دلیل داشتن مقادیر بالای NADH و FADH، دارای خاصیت اتوفلورسنت بوده و لذا حین

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

تنظیم کنترل منفی ایزوتایپ، می‌بایست سیگنال غیراختصاصی و Unstained سلول‌ها از سیگنال اختصاصی و اصلی ناشی از لیبل‌سازی حذف شود. در این تحقیق از دستگاه BD-FACS Calibur (امریکا) دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استفاده گردید. با توجه به رده و هموژن بودن سلول‌ها، نیازی به گیتینگ رده خاص نبوده و سلول‌ها بعد از تنظیمات دستگاه و قرائت نمونه کنترل ایزوتایپ منفی، در پنجره FSC vs SSC، FL1:FITC vs FL2:PE و FSC:A vs FSC:H تنظیم و گیت شده و سلول‌ها دو به دو توسط FSC، SSC، CD19، CD45، CD38، CD2 و CD138 مورد آنالیز قرار گرفتند.

- ایمونوتایپ رده سلول‌های میلومایی

برای ایمونوتایپ سلول‌ها از دستگاه کاپیلاری الکتروفورز MiniCAP Sebia (فرانسه) استفاده گردید. در این روش الکتروفورز محیط کشت‌رویی تغلیظ شده در یک میدان الکتریکی با ولتاژ بالا، دمای ثابت و دقیق و در حضور بافر قلیایی (pH:9.9) انجام، شناسایی و سنجش دقیق باندهای پروتئینی تفکیک شده توسط جذب UV:200nm در انتهای کاتدیک کاپیلاری و با نرم‌افزار Capillarys ویرایش ۵/۵ انجام می‌شود. در این دستگاه ۶ کاپیلاری وجود دارد که همزمان در یکی سرم به همراه بافر الکتروفورز و در ۵ کاپیلاری دیگر به‌جز دو مورد مذکور، آنتی سرای ضد γ، μ، α، κ و λ نیز افزوده می‌شود. از آنجایی که محیط کشت حاصل از کشت سلول‌ها، رقت بسیار محدودی از پروتئین داشته و شناسایی آن‌ها روندی دشوار است، لذا در وحله اول اقدام به تغلیظ و دیالیز پروتئین محیط رویی کشت گردید که برای این منظور از لوله‌های فالکون حاوی فیلتر مخصوص VivaSpin استفاده گردید. در مورد محیط کشت، ابتدا مقدار پروتئین آن تعیین و سپس درصد فراکسیون گاما یا بتای بیمار در آن ضرب شده و مقدار باند گاما یا بنس جونز بیمار مشخص می‌شود. سپس ۵ میلی‌لیتر محیط کشت با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی جدا می‌شود. از آنجایی که غلظت پروتئین محیط کشت زیر ۱۰۰ میلی-گرم بر دسی‌لیتر بود، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت با ۱۸ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و به فیلتر Vivaspin انتقال داده می‌شود. سپس لوله به مدت ۴۰ دقیقه با قدرت ۴۰۰۰g سانتریفوژ می‌شود تا حجم محیط کشت به ۰/۵ میلی‌لیتر برسد. محیط کشت را هموژن کرده و ۲۰ میلی‌لیتر بافر دیالیز (یک حجم محلول استوک + یک حجم DW) به آن افزوده و بعد از بالانس کردن، مجدداً به مدت ۴۰ دقیقه با قدرت ۴۰۰۰g سانتریفوژ می‌شود تا حجم محیط کشت تغلیظ- دیالیز شده به ۰/۵ میلی‌لیتر برسد و اگر حجم کمتر بود با بافر دیالیز حجم را به مقدار مذکور رسانده و سپس مخلوط را هموژن و ۱۰ میکرولیتر محلول دیالیز با ۱۰ میکرولیتر نمونه و ۱ میکرولیتر آنتی‌سرا مخلوط و به دستگاه داده می‌شود. در این مرحله انواع آنتی سراهای ضد زنجیره سنگین IgG، IgM، IgA و ضد زنجیره سبک Igκ و Igλ به ترتیب به نمونه تغلیظ - دیالیز شده افزوده می‌شود تا امکان تشکیل کمپلکس بین دو آنتی‌بادی فراهم شود. این روند به دلیلی سنگینی دایمر دو ایمونوگلبولین و عدم حرکت در جایگاه قبلی، باعث حذف یا کاهش باند ایمونوگلبولینی قبلی و در نتیجه شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال درگیر در بیماری می‌شود (کمپلکس آنتی‌بادی- آنتی‌سرا نیز به دلیل حرکت شدیداً آنودتیک بین آلبومین و α1 و حتی در داخل یا جلوی آلبومین قرار می‌گیرد). حال اگر نمونه‌ای دارای IgG با زنجیره سبک لامبدا باشد، از بین آنتی‌سراهای فوق، فقط آنتی‌بادی ضد IgG و آنتی‌بادی ضد Igλ قادر

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

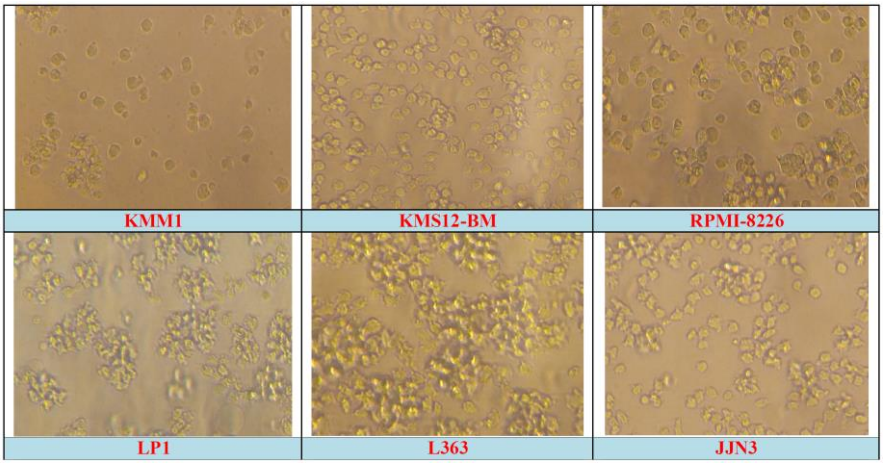
خواهند بود پیک مربوط به باند گاماگلبولین را نسبت به شرایط کنترل حذف کرده یا کاهش بدهد و افزودن دیگر آنتی‌بادی‌ها مانع از تشکیل پیک مربوطه نخواهند شد. آنالیز محیط کشت می‌بایست با آپشن مخصوص ادرار و انتخاب Ratio Urine انجام شود که خود نرم‌افزار نمودار الکتروفورز اولیه را با نمودار بعد از تشکیل کمپلکس آنتی‌سرا- آنتی‌بادی همپوشانی و ادغام می‌کند.

یافته‌ها

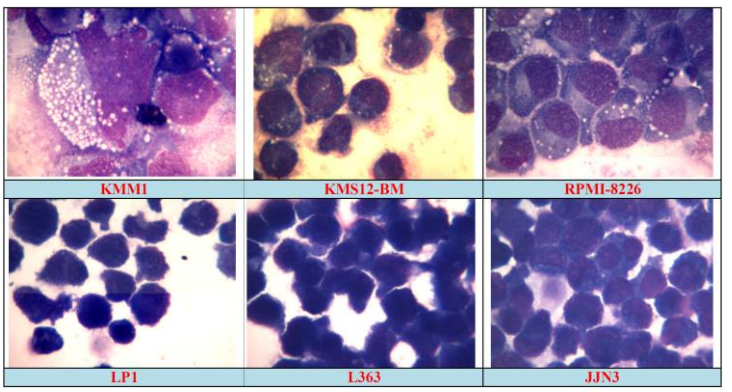
علی‌رغم تأیید مورفولوژی میلومایی در رده‌ها، دو رده L363 و JJN3 شباهت اساسی با یکدیگر داشتند: اولین اقدام برای بررسی مورفولوژی سلولی، ارزیابی شکل سلول‌ها در محیط کشت توصیه شده RPMI-1640 توسط بانک سلولی ATCC بود. از آنجایی که سلول‌های خونی حالت سوسپانسه داشته و این محیط کشت نیز حاوی حداقل مقدار کلسیم مورد نیاز برای چسبیدن سلول‌ها می‌باشد، لذا هر ۶ رده سلولی به صورت سوسپانسه بودند، با این وجود دو رده L363 و JJN3 به صورت نیمه چسبنده بوده و با یک پی‌پتاژ قوی یا ضربه کف فلاسک به سطح میز از فلاسک کنده و سوسپانسه می‌شدند (بدون نیاز به تریپسین، آکوناز یا EDTA). سه رده RPMI-8226، KMM1 و KMS-12BM به صورت گرد، صاف و هم سایز لنفوسیت بودند ولی سلول‌های JJN3 و L363 علاوه بر شکل مثلثی یا چند ضلعی و میل به چسبندگی سست، گاهاً به شکل کشیده و استوانه‌ای نیز دیده می‌شدند (شکل 1A). رده LP1 از نظر پلئومورفیک و چندضلعی بودن و گاهاً کشیدگی، شباهت بالایی به دو رده L363 و JJN3 داشته ولی به صورت کاملاً سوسپانسه بوده و میل به چسبندگی نداشت. لذا برای بررسی دقیق‌تر ساختار داخلی سلول، می‌بایست از سلول‌ها گستره سیتواسپین تهیه و رنگ‌آمیزی می‌شد. بعد از تهیه سیتواسپین از هر رده میلومایی و رنگ‌آمیزی رومانفسکی رایت بر روی آن‌ها، در رده KMM1 علاوه‌بر منظره کلاسیک میلوما، تعداد زیادی راسل‌بادی و سلول‌های پلی‌پلوئیدی بزرگ نیز رؤیت شد و در مجموع منشاء میلومایی رده سلولی از نظر سیتولوژی تأیید شد. در رده KMS-12BM علاوه‌بر مورفولوژی میلومایی تعداد زیادی اشکال میتوتیک (سلول‌های در حال میتوز) و سلول‌های پلی‌پلوئید غول‌پیکر رؤیت گردید (شکل 1B). کلاسیک‌ترین مورفولوژی میلومایی به همراه زون گلژی در رده RPMI-8226 دیده شد که البته تعدادی واکوئل راسل نیز در سیتوپلاسم سلولی مشهود بود. سه رده JJN3، L363 و LP1 علی‌رغم داشتن مورفولوژی میلومایی و گاهاً دو هسته‌ای، شباهت بالایی با همدیگر داشتند. از این رو امکان Cross-Contamination سلولی بین این سه رده مطرح گردید که جهت افتراق آن‌ها، می‌بایست نتایج ایمونوفنوتایپ سلولی از نظر CD مارکرها و نوع ایمونوگلبولین و زنجیره سبک درگیر نیز مورد آنالیز قرار بگیرند.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

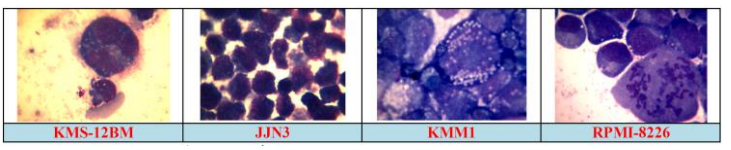
[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]



(A)



(B)



(C)

شکل ۱) بررسی مورفولوژی میلومایی در سل‌لاین‌های مورد بررسی (A: بدون رنگ‌آمیزی، B: رنگ‌آمیزی رایت از گستره سیتواسپین که در ردیف C نیز به چند شکل خاص تأکید شده است.

نتایج ایمونوفنوتایپ میلومایی حاکی از شباهت دو رده L363 و JJN3 بود: برای ایمونوفنوتایپ سلول‌ها، CD مارکرهای CD45، CD38، CD138 و CD19 مورد آنالیز FCM قرار گرفتند (جدول ۱) که دو مارکر CD38 و CD138 در رده‌های KMM1، LP1، JJN3 و L363 مثبت قوی (۹۸-۸۱ درصد بیان) و در دو رده KMS-12BM و RPMI-8226 مثبت ضعیف (۲۰-۱۰ درصد) بودند (شکل ۲). مارکر CD2 و CD19 در هر ۶ رده منفی یا ضعیف (۱۴-۰/۲ درصد) بوده و مارکر CD45 نیز در دو رده RPMI-8226 و KMS-12BM مثبت قوی (۹۹-۹۴ درصد) و در چهار رده دیگر مثبت ضعیف یا منفی (۱۵-۴ درصد) بود، لذا ایمونوفنوتایپ میلومایی هر شش رده تأیید شد. با این وجود، شباهت بالای دو رده L363 و JJN3 از نظر CD مارکرهای میلومایی نیز تأیید شد. البته بیان مختصری بالاتر CD19 در LP1 (۱۲/۷ درصد) در مقایسه با L363 (۳/۳ درصد) و JJN3 (۷ درصد)

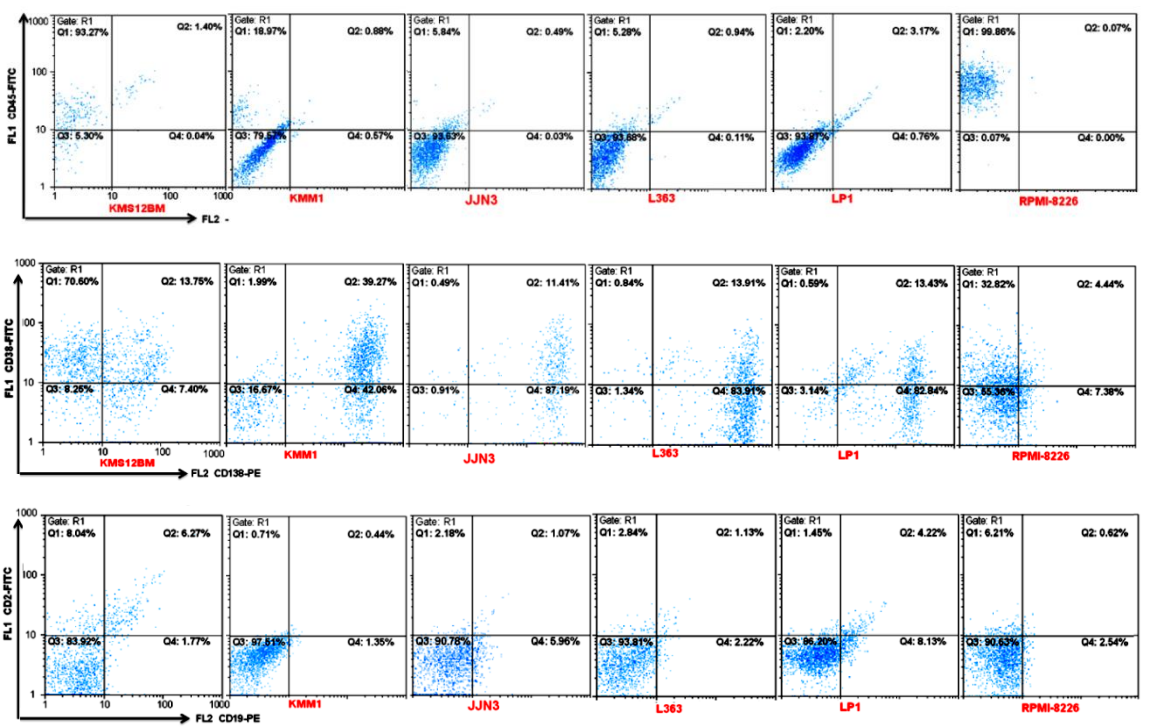
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

می‌توانست افتراق دهنده باشد. برای حل ابهام، اقدام به بررسی نوع ایمونوگلبولین و زنجیره سبک مترشحه از سلول‌ها (ایمونوتایپ) گردید تا قضاوت نهایی انجام شود.

جدول ۱) نتایج شماش، بقاء، مورفولوژی، دوبلینگ تایم و ایمونوفنوتایپ سلول‌های رده میلومایی HMCL

HMCL	زنده مانی	زمان دوبلینگ (ساعت)	مورفولوژی	CD45	CD2	CD19	CD38	CD138
KMS12BM	۹۸	۵۸	گرد، کوچک، غیرچسبنده	۹۵	۱۴	۸	۸۴	۲۱
KMM1	۹۸	۳۲	گرد، کوچک، غیرچسبنده	۱۵	۰/۲	۰/۹	۴۱	۸۱
L363	۸۷	۲۷	چندضلعی، کوچک، نیمه‌چسبنده	۶	۴	۴	۱۵	۹۸
JJN3	۹۲	۲۵	چندضلعی، کوچک، نیمه‌چسبنده	۶	۳	۷	۱۲	۹۸
LP1	۸۵	۵۵	چندضلعی، کوچک، غیرچسبنده	۴	۶	۱۳	۱۴	۹۶
RPMI-8226	۱۰۰	۳۶	گرد، کوچک، غیرچسبنده	۹۹	۶	۴	۳۷	۱۳

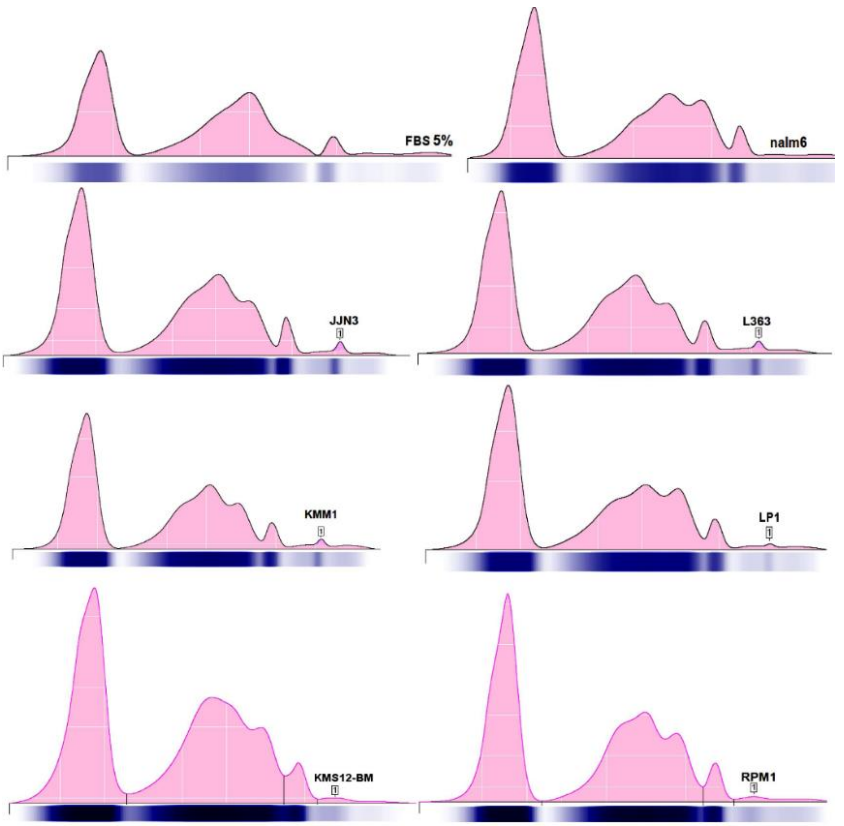


شکل ۲) خصوصیات ایمونوفنوتایپی رده KMS12BM: CD45+CD38+CD138+CD19-CD2-، رده KMM1: CD45-CD38++ CD138+ CD19- CD2-، رده JJN3: CD45-CD38+ CD138++ CD19- CD2-، رده L363: CD45-CD38+CD138++CD19-CD2-، رده LP1: CD45+CD38+CD138-CD19-CD2- و رده RPMI-8226: CD45+CD38+CD138-CD19-CD2- می‌باشند که غالباً به دلیل عدم بیان CD19 و بیان قوی CD38 و CD138، میلومایی بودن سلول‌ها را تأیید می‌کنند.

نتایج ایمونوتایپ سلول‌های میلومایی، نشانگر غیر مترشحه بودن رده KMS12BM بود: برای تعیین نوع ایمونوگلبولین ترشح شده از رده‌ها، سلول‌ها به مدت ۳ روز در محیط کشت RPMI-1640 توأم با ۵ درصد سرم FBS کشت شده و محلول‌رویی با کاپیلاری الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. همزمان از محیط

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

کشت توأم با FBS ۵ درصد استفاده نشده نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. FBS به دلیل غیرفعال‌سازی در دمای ۵۶ درجه فاقد کمپلمان بوده ولی مثل هر سرم نرمالی مقادیر اندکی باند گاماگلبولین پلی‌کلونال دارد که می‌بایست از باند گامای ترشح شده از رده‌های میلومایی افتراق داده شود. در بررسی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و مشاهده باند تیز M، وجود هر باند باریک و پر رنگ در منطقه γ-گلبولین و در مقایسه با نمونه کنترل (FBS ۵ درصد در RPMI) و رده Nalm-6 (فاقد توانایی ترشح آنتی‌بادی) به عنوان باند M مدنظر قرار گرفت (شکل ۳).



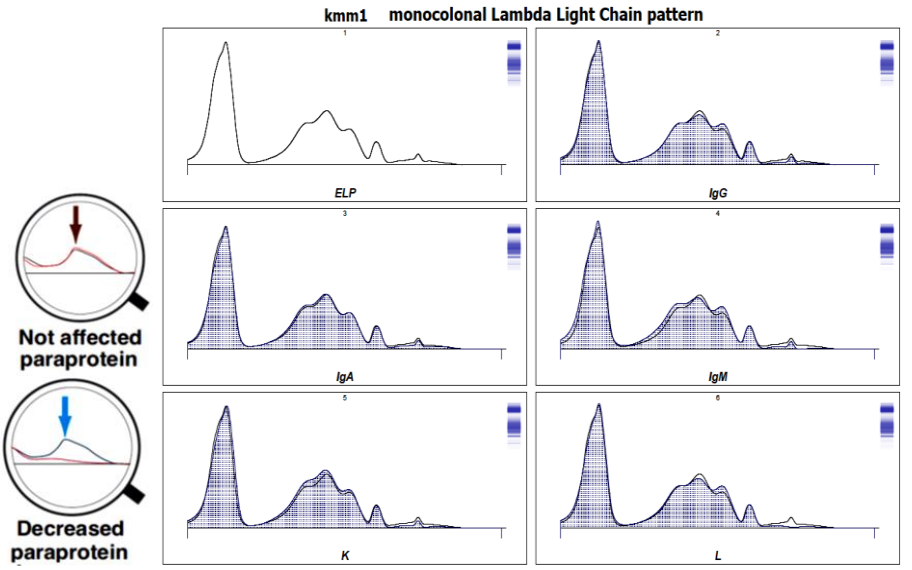
شکل ۳) الکتروفورز مایع‌رویی رده‌های مختلف میلومایی به همراه محیط کشت حاوی FBS ۵ درصد (به‌عنوان کنترل منفی) که L363، JJN3، LP1 و RPMI دارای باند مونوکلونال و شارپ بودند ولی Nalm6 (رده Pre-B-ALL) به دلیل غیرپلاسماسل بودن، KMS12BM به دلیل غیرمترشحه بودن و نمونه کنترل FBS به دلیل نداشتن سلول میلومایی، فاقد باند M می‌باشند.

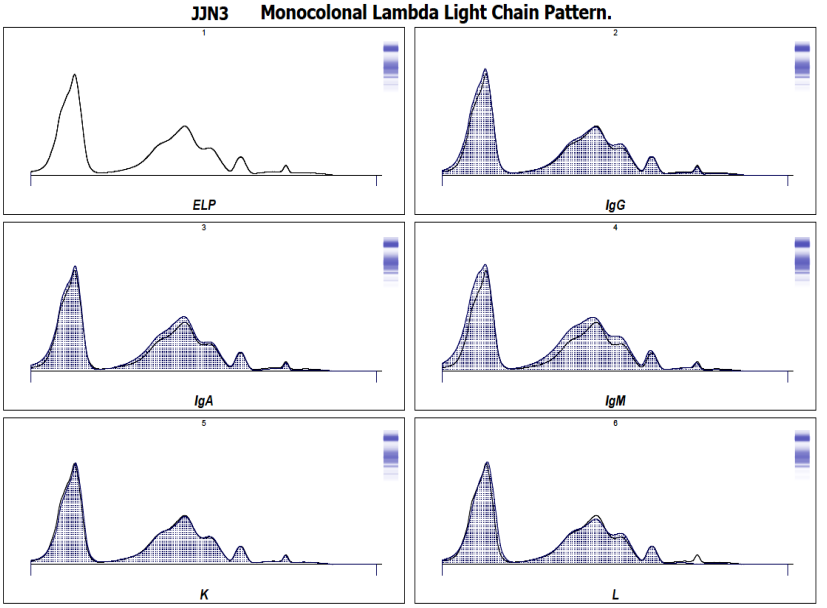
بدین ترتیب سلول‌های KMM1، JJN3، L363 و LP1 باندهای شارپ M و دو رده RPMI-8226 و KMS-12BM باندهای نسبتاً ضعیف ولی قطعی را نشان دادند ولی از آنجایی که ایمونوفنوتایپ و مورفولوژی میلومایی مشخصی داشتند، لذا شکی در هویت آن‌ها وجود نداشت. در مرحله بعد به منظور ایمونوتایپ باند M ایمونوفیکساسیون نمونه با آنتی‌سراهای ضد زنجیره γ، μ، α، κ و λ انجام شد (شکل ۴). از نظر محدودیت به زنجیره سبک، رده KMM1 پروتئین BJP نوع λ، سه رده JJN3 و L363 و RPMI-8226، ایمونوگلبولین IgG با زنجیره λ و رده‌های KMS12BM و Nalm6 به دلیل عدم ترشح

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

آنتی‌بادی، فاقد توانایی ایمونوفیکساسیون بودند. در رده LP1 نیز افت چندانی در هیچ کدام از دو زنجیره κ و λ رؤیت نشد و حالتی مشابه پلی‌کلونال مشاهده گردید که به دلیل پیک بسیار کوتاه گاما، می‌تواند کاذب باشد. این دستگاه و این روش قدرت بیان نسبت κ:λ را هم دارد که نسبت آن در LP1 به صورت ۲/۵ به ۵۶/۹، در RPMI-8226 به صورت ۲/۶ به ۷/۵، در L363 به صورت ۲/۸ به ۱۲۶، در JJN3 به صورت ۲/۶ به ۸۵/۷، در KMS12BM به صورت ۲/۸ به ۵/۳ و در KMM1 به صورت ۲/۶ به ۸/۵ بود.

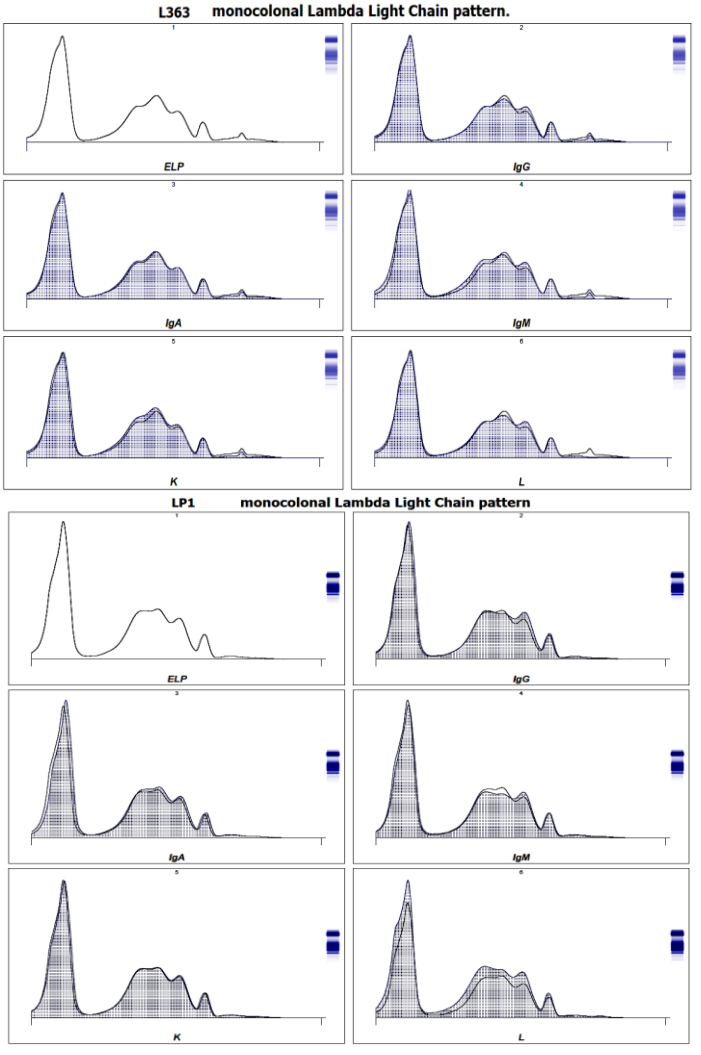




شکل ۴) ایمونوتایپ ترشحات موجود در سوپرناتانت رده‌های مختلف میلومایی که KMM1 به صورت BJP-λ و رده LP-1، L363، JJN3 و RPMI به صورت IgGλ بودند. در این روش، اگر نوع زنجیره سنگین ایمونوگلبولین مثلاً از نوع گاما و زنجیره سبک از نوع لامبدا باشد، آنتی بادی ضد این دو زنجیره در برخورد با آن‌ها تشکیل کمپلکس و رسوب داده و لذا در مقایسه با الکتروفورز اولیه (ELP) دچار کاهش پیک می‌شود که در مثال فوق IgGλ تأیید شده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]



شکل ۴) ادامه تصویر قبل

جدول ۲) خصوصیات رده‌های سلولی مورد استفاده در مقاله و دسته‌بندی آن‌ها بر اساس نوع HMCL (۱۲)

رده سلولی	وابستگی به IL-6	بیماری حین تشخیص	نوع نمونه	جنس	ایزوتایپ	ترانسلوکاسیون در 14q32 یا 22q11	ژن‌های هدف	K/N-Ras کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱	Myc t(8;14)	P53 (جهش، حذف یا الحاق)	CD45	طبقه HMCL
JJN3	-	MM	مایع پلور	زن	IgAκ	t(14;16)	c-MAF	موتانت	+	غیرطبیعی	+/-	MF
KMM1	-	MM	زیرجلد	مرد	λ	t(6;14)	CCND3/mum1	موتانت	+	غیرطبیعی	-	CD2L
KMS12BM	-	MM	مغز استخوان	زن	NS	t(11;14)	CCND1	وحشی	-	غیرطبیعی	-	CD2L
L363	-	PCL	خون محیطی	زن	NS	t(20;22)	Maf-B	موتانت	-	غیرطبیعی	-	CD2L
LP1	-	MM	خون محیطی	زن	IgGλ	t(4;14)	TGFR3/MMSET	وحشی	-	غیرطبیعی	-	MS
RPMI8226	-	MM	خون محیطی	مرد	IgGλ	t(14;16)/ t(16;22)	c-Maf	موتانت	-	غیرطبیعی	-	MF
U266	-	MM	خون محیطی	مرد	IgEλ	t(11;14)	CCND1	وحشی	-	غیرطبیعی	+	CAT/ FRZB

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

بحث

کار تحقیقاتی بر روی نمونه‌های انسانی به دلایلی مثل تعداد کم نمونه، فوت یا از دسترس رفتن برخی از بیماران، الزام به تازه تشخیص بودن بیماران و کسب رضایت کتبی بیمار و پزشک معالج، با محدودیت‌هایی همراه بوده و از طرفی دیگر، کار بر روی مدل‌های حیوانی نیز به دلیل عدم هومولوژی کامل با انسان و تفاوت‌های قابل توجه ساختاری و فیزیولوژی، قابلیت تعمیم تام به انسان را ندارد، لذا در بسیاری از موارد برای تحقیقات بیولوژیکی پایه از رده‌های سلولی انسانی استفاده می‌شود. البته تعمیم مستقیم نتایج حاصل از رده‌ها یا کشت اولیه به بدن انسان به دلیل فقدان نیچ میلومایی، سلول‌های استرومال، سیستم کلیرانس کبدی و کلیوی، جریان شار، گردش خون و دیگر موارد فیزیولوژیک، هرگز مقبول نبوده و نیاز به سپری نمودن مراحل مختلف کلینیکال ترایال دارد. تهیه رده میلومایی، پروسه طولانی و سختی می‌باشد که در آن ابتدا منبعی از پلاسماسل‌های مرتبط با بیماری را از خون محیطی (مثل L363، U266 و LP1)، مغز استخوان (مثل KMS-12BM)، مایعات بیولوژیکی مثل مایع پلور (مثل KMM56، JIM3، XG21 و KMS-12PM) یا آسیت (مثل XG10) یا بافت توموری پلاسماسیتوما (مثل KMM1 و ada) جداسازی کرده و به صورت اولیه و بدوی در محیط کشت غنی از FBS20% و گاهاً سیتوکاین رشد کشت می‌دهند (۶)، در ادامه و طی پاساژهای مکرر (گاهاً تا ۱۵ ماه)، به تدریج محیط کشت غنی به محیط کشت عمومی با FBS ۱۰ درصد تبدیل شده و لذا فقط سلول‌های سازگارتر و نامیرا کلونال باقی مانده و دیگر سلول‌ها از بین می‌روند. در این شرایط سلول‌ها به تدریج هموژن‌تر شده و از دوبلینگ تایم، مورفولوژی و کلونالیتی همگن‌تری برخوردار می‌شوند و در پنجره FSC vs SSC فلوسایتومتری، یک کلون واحد را نشان می‌دهند. بعد از رسیدن به این مرحله، تست‌های سیتوژنتیک و کاریوتایپ (از نظر ناهنجاری‌های کمی و کیفی کروموزومی) و تست‌های وسیع ایمونوفنوتایپ (از نظر کلونالیتی و CD مارکرهای مختلف) نیز انجام شده و نتایج آن‌ها به همراه محیط کشت و محیط فریز ایده‌آل استخراج شده و نهایتاً به عنوان یک سلول شناسنامه‌دار نام‌گذاری شده و وارد مسیر تجاری می‌شود. در غنی‌سازی محیط‌های کشت گاهی از مایع آمنیون نیز به دلیل داشتن فاکتورهای رشد متعدد، به جای FBS استفاده می‌شود (۷).

حدود ۴-۱ درصد از سلول‌های BM را پلاسماسل‌ها تشکیل می‌دهند که سلول‌هایی دوکی تا بیضی شکل به اندازه ۲۰-۱۴ میکرومتر، با هسته کوچک و کناری هستند که دارای مقادیر زیاد کروماتین فشرده و پاراکروماتین واضح می‌باشند. هر پلاسماسل می‌تواند ۶۰۰ پیکوگرم در روز از یک نوع ایمونوگلوبولین ترشح کند، در این مرحله، پلاسماسل به دلیل حضور مقادیر بالایی از شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری، ریبوزوم و mRNAی IgH و IgL شدیداً بازوفیلیک بوده و به دلیل گلیکولیزیلاسیون ایمونوگلوبولین‌ها در دستگاه گلژی، دارای یک زون گلژی مشخص در اطراف هسته هستند. گاهی در اثر جهش در پروتئین ترافیک داخل سلولی داینئین، واکوئول‌های بزرگ، فراوان و اسیدوفیلی از جنس شبکه اندوپلاسمی متسع و مملو از ایمونوگلبولین (اجسام راسل) در سیتوپلاسم پلاسماسل مشاهده می‌شود. مورفولوژی پلاسماسل‌ها در برخی از بیماران یک شکل و در برخی دیگر، بسته به مرحله بیماری هتروژن می‌باشند. بر این اساس پلاسماسل‌ها را به سه دسته بالغ (پلاسماسل تیپیک)، حدواسط و نابالغ تقسیم می‌کنند

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

که پلاسماسل‌های نابالغ یا پلاسمابلاستیک، سلول‌های چند هسته‌ای بوده و با پرولیفراسیون شدید و پروگنوز بد بیماران در ارتباط می‌باشند. حضور این نوع پلاسماسل‌های دیس‌پلاستیک و اشکال میتوتیک، بدون توجه به درصد آن‌ها، نشان‌دهنده بیماری میلوما می‌باشد که در این تحقیق طیفی از همه موارد فوق شامل پلاسماسل کلاسیک، پلاسماسل چندهسته‌ای و اجسام راسل مشاهده گردید.

ایمونوتایپ پلاسماسل طبیعی به صورت CD19+، CD20-، CD22-، CD38++، CD56-، CD138+، HLA-DR-، CD45+، PCA1+، PC1+، CD24+، CD27+، CD28-، CD30+، CD31+، CD40+، CD44+، CD52-، CD54+، BCL2+، CD200-/+، CD307+، CD117-، CD229-، CD81+ و Ki67- شناخته می‌شود (۵) که در اثر بدخیمی، هیپرموتاسیون فراوان، بیان تنظیم نشده پروتئین‌های ضدآپوپتوز یا اختلال در تنظیم چرخه سلولی، نئوپلاستیک و نامیرا شده و به سلول‌های میلومایی تبدیل می‌شود که بیان PAX-5، CD45، CD27 و به‌ویژه CD19 خود را از دست داده و بیان CD56، CD79، CD28 را کسب می‌کند (۶ و ۸). سلول‌های میلومایی برخلاف پلاسماسل نرمال به صورت CD19-، CD20+/-، CD22-، CD38+، CD56+، CD138+، HLA-DR-، CD45-، PCA1+، PC1+، CD24+، CD27+/-، CD28+، CD30+، CD31+، CD40+، CD44+، CD52+، CD54+، BCL2+، CD200+، CD307+، CD117+، CD229+، CD319+، CD81- و Ki67+ شناخته می‌شود که بیان CD138 قادر است پلاسماسل را از B سل CD19+، CD38+، CD56- و CD138- افتراق بدهد (۹).

پلاسماسل قادر است در هر ثانیه، ۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی بسازد که در ۵ روز حدود ۱۰ تریلیارد آنتی‌بادی خواهد بود. افزایش یا تولید غیرطبیعی ایمونوگلوبولین‌های سرم و یا اجزاء مختلف آن را، گاماپاتی می‌نامند که اگر پیک گاما نوک تیز، باریک و توأم با درگیری انحصاراً یکی از دو زنجیره κ یا λ باشد، به آن گاماپاتی مونوکلونال گفته می‌شود. باند منوکلونال که به آن باند M میلومایی نیز گفته می‌شود، در اثر تکثیر کلونال و بدخیم یک نوع پلاسماسل به وجود می‌آید، از این رو کلون مذکور شروع به تولید ایمونوگلبولین از یک نوع کلاس می‌کند که به دلیل تعداد بالای پلاسماسل‌های تولید کننده آن، غلظت پلاسمایی آن شدیداً افزایش یافته و باعث هیپرویسکوزیته، هیپرپروتئینمی و بروز باند M در الکتروفورز پروتئین‌های سرم و ادرار می‌شود. از آنجایی که دو زنجیره سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌ها در کروموزوم‌های مختلف سنتز می‌شوند، گاهی نسبت این دو زنجیره در پلاسماسل بدخیم به‌هم خورده و لذا IgLهای مازاد وارد خون و سپس ادرار می‌شوند، از سویی دیگر، با توجه به اینکه تکثیر سلول‌ها کلونال بوده و هر پلاسماسل فقط یک نوع از IgLهای کاپا یا لامبدأ (و نه هردو) را می‌سازد، در نتیجه یک باند جدید از پروتئین‌های کوچک Igκ یا Igλ در الکتروفورز سرم و ادرار ظاهر می‌شود که به آن‌ها به ترتیب زنجیره سبک آزاد (FLC) و پروتئین بنس جونز (BJP) گفته می‌شود. پروتئین‌های BJP/FLC، مولکول‌های غیرطبیعی و یا اجزاء ناکامل ایمونوگلوبولین‌ها هستند که به دلیل تجزیه و یا اختلال در سنتز مولکول‌های کامل ایمونوگلوبولین به‌وجود می‌آیند. این پروتئین‌ها وزنی معادل ۳/۵S یا ۴۰ کیلودالتون وزن دارند که به علت کوچکی و فیلترینگ سریع از کلیه، بلافاصله دچار کلیرانس و دفع کلیوی شده و وارد ادرار می‌شوند و به همین نسبت نیز مقدار آن در خون کاهش می‌یابد. این اتفاق باعث پروتئینوری بنس جونز می‌شود که در دراز مدت در کلیه‌ها رسوب

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

کرده و باعث آمیلوئیدوز و تخریب کلیه می‌شود، در این مرحله، علاوه بر BJP، آلبومین نیز از ادرار دفع می‌شود (در بین انواع ایمونوگلبولین، IgD و در بین دو زنجیره سبک، زنجیره λ نفروتوکسیک‌تر می‌باشد). ایمونوگلوبولین‌های کامل، برخلاف BJP قدرت دفع در ادرار را نداشته و در الکتروفورز ادرار دیده نمی‌شوند، مگر اینکه به دلیل آسیب کلیوی و سندرم نفروتیک ناشی از مسمومیت با پروتئین‌های BJP، مولکول‌های ایمونوگلوبولین نیز دفع شوند.

رده‌های میلومای انسانی (HMCLs) به دو دسته وابسته به FBS+IL6 و سل‌لاین‌های وابسته به FBS (مستقل از IL-6) تقسیم می‌شوند (۱۲) که ۶۳ درصد از موارد وابسته به IL-6 و ۲۳ درصد از موارد مستقل از IL-6، مارکر CD45 را نیز بیان می‌کنند. دسته اول بیشتر شامل انواع رده‌های XG1 تا XG24 و رده‌های NAN1/3، SBN، BCN و ANBL6 بوده ولی دسته دوم شامل رده‌های متنوعی می‌باشند (جدول ۲) که همه رده‌های استفاده شده در این مقاله نیز از نوع دوم (وابسته به FBS و مستقل از IL-6) بودند ولی با این وجود افزودن IL-6 و دیگر فاکتورهای رشد میلومایی (مثل APRIL، IGF1، IL-21 و HGF) نیز می‌توانند باعث افزایش تکثیر و بقاء این دسته از رده‌ها شوند. رده‌های فاقد CD45 مستقل از IL-6 به IL-21 و IGF-1 پاسخ داده ولی رده‌های وابسته به IL-6 که CD45 را بیان می‌کنند، به تنهایی به IL-21 و IGF-1 پاسخ نمی‌دهند. در رده‌های حساس به IL-6 افزایش بیان MAF بیشتر دیده شده و بیان بالای c-MAF و MAFB باعث وابستگی به IL-6 می‌شود. البته برخی از رده‌ها (مثل U266) قادر به تولید مقادیر بالای IL-6 اندوکرین بوده و لذا می‌توانند مستقل از IL-6 اگزوژن نیز تکثیر و بقاء داشته باشند. در یک تحقیق، از ۲۴۸ ژن مورد بررسی، در گروه وابسته به IL-6، تعداد ۲۳ ژن در مقایسه با گروه مستقل افزایش بیان داشته و ناهمگونی مولکولی نیز بیشتر از گروه مستقل دیده شده بود. در رده‌های میلومایی به دلیل هیپومتیلاسیون توالی CCGG اگزون ۳ ژن c-Myc، مقدار بیان آن تا ۵۰-۳۰ برابر افزایش می‌یابد که نقش مهمی در پرولیفراسیون آن‌ها دارد (۱۰). افزایش c-Myc در ۹۳ درصد موارد MM دیده می‌شود. بیماران میلومایی از نظر تنوع بیان Cyclin-D به ۷ گروه PR، LB، MS، HY، CD-1، CD2 و MF[3] تقسیم می‌شود که سه گروه PR، MF و به‌خصوص MS دارای پروگنوز بدی هستند. در سال ۲۰۱۱ رده‌های میلومایی به ۶ دسته CTA/FRZB، MS، MF، CD-1، CD-2Like، CTA/MF و تقسیم شده بود که گروه CTA/MF[4] علاوه بر بیان CTA و همانند گروه MF، دارای افزایش بیان c-Maf و MafB نیز بودند، لذا امروزه به گروه MF منتقل شدند ولی گروه CTA یا FRZB اغلب دارای تریزومی کروموزوم‌های فرد، افزایش بیان FRZB، فقدان ترانسلوکاسیون درگیر کننده 14q32، غالبیت جنس مذکر و وابستگی به IL-6 بود که امروزه به عنوان گروه HY (هیپردیپلوئیدی) شناخته می‌شود. گروه CD-1 دارای افزایش بیان CCND1/3 بوده ولی گروه CD-2L همانند CD2 دارای افزایش بیان CCND1/3، RRAS2، MDK، ZDHHC14 و DMD بوده ولی برخلاف CD-2، فاقد بیان MS41 و Pax5 می‌باشند.گروه MS دارای ناهنجاری کروموزومی

[3] Cell cycle and proliferation (PR group for proliferation), a lower expression of genes involved in bone disease (LB group for ''low bone disease''), an aberrant expression of FGFR3 and MMSET genes (MS group for MMSET), a hyperdiploid signature (HY group); an overexpression of cyclin D1 or cyclin D3 genes (CD-1 and CD-2 groups), or an overexpression of MAF and MAFB genes (MF group).
[4] Cancer testis antigens (CTA)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

t(4;14) می‌باشد که در ۷۰ درصد موارد با افزایش بیان FGFR3، PAX5، PBX1، IGF1، IGF1-R و CCND2 و در ۱۰۰ درصد موارد با افزایش ژن MMSET همراه بوده و حتی بیان افزایش یافته MMSET به عنوان تست جایگزین t(4;14) نیز مطرح می‌باشد (۱۳). این گروه اغلب از نظر CD45 منفی یا مثبت بسیار ضعیف بوده و ۷ ژن مرتبط با پروگنوز بد (TEAD1، LRP12، NUDT11، CLEC11A، MMSET، KIAA1671 و FGFR3) را نیز بیان می‌کند (گروه PR سه ژن اول را بیان می‌کند). لازم به ذکر است که طبق طبقه‌بندی Kaplan-meier و بر اساس تعداد ژن‌های ۷گانه درگیر و شدت پروگنوز بد، میلوما به سه گروه I (تعداد ۱-۰ ژن) با شیوع ۷۳-۷۱ درصد، گروه II (تعداد ۴-۲ ژن) با شیوع ۲۲-۲۱ درصد و گروه III (تعداد بالای ۵ ژن) با شیوع ۸-۵ درصد تقسیم‌بندی می‌شود که گروه III با متوسط بقاء ۴۰-۳۰ ماه، بیشترین مقاومت دارویی و بدترین پروگنوز را دارند. البته علاوه بر گروه MS دو گروه PR و MF نیز پروگنوز بدی دارند با توجه به پروگنوز بد t(4;14)، خود رده‌های غیر MS و بدون t(4;14) بر اساس عدم بیان یا بیان بالای ژن‌های GAG1، GAG12 (در PR)، BCHE (در CD-1)، LOC283352 (در HY و PR) و FSTL5 (در HY) به دو گروه با پروگنوز خوب و بد تقسیم می‌شوند که البته گروه دوم در مقایسه با گروه MS از پروگنوز و بقاء بهتری برخوردار هستند. در بین رده‌های مورد استفاده این تحقیق، سه رده KMS-12BM، KMM1 و L363 در گروه CD-2L، دو رده RPMI-8226 و JJN3 در گروه MF، رده LP1 در گروه MS و رده U266 در گروه CTA/FRZB قرار دارد (۱۳). عنوان می‌شود که استحاله MGUS و پلاسماسل نرمال به MM با هیپومتیلاسیون DNA و افزایش بیان CTA و استحاله MM به PCL و HMCL با هیپرمتیلاسیون DNA همراه می‌باشد و رده‌های CTA+ در شرایط هیپومتیله قرار دارند ولی با این وجود همه گروه‌های MS توأم با t(4;14)، بیان پایینی از CTA (شرایط هیپرمتیلاسیون) و پروگنوز بد را نشان داده ولی گروه‌های CTA/FRZB توأم با بیان بالای CTA و EDNRB پروگنوز بهتری دارد. برخلاف گروه CD-1، اکثریت گروه CD-2L مستقل از IL-6 و CTA+ بوده ولی گروه CTA/MF علی‌رغم تولید کم IL-6 و بیان بالای IL-6R، همگی وابسته به IL-6 اگزوژن یا پاراکرین هستند. البته دو رده KMS-12BM و KMM1 در محیط فاقد FBS نیز می‌تواند تکثیر پیدا کند. دو رده KMM1 و NOP2 فاقد توانایی تولید ایمونوگلبولین بوده و فقط پروتئین بنس جونز Igλ ترشح می‌کنند (۱۱ و ۱۴).

لازم به ذکر است که رده‌ها اغلب هتروژنیسیتی مولکولی که در بدو تشخیص بیماری وجود داشته را طی مرحله سل‌لاینی خود نیز حفظ نموده و این هتروژنیسیتی در گروه وابسته به IL-6 بیشتر هم می‌باشد. در واقع تغییر الگوی بیان ژنی، تولید فاکتورهای اتوکرین و مقاومت رده‌ها به آنوئیکیس (آپوپتوز ناشی از بی‌خانمان شدن یک سلول در اثر جداشدن از بافت و نیچ اصلی) باعث می‌شود تا سلول‌های میلومایی بتوانند در محیط اکسترا مدولاری تکثیر نموده و نامیرا شوند. رده‌ها در ۹۰ درصد موارد دارای ترانس لوکاسیون 14q32 می‌باشند که به ترتیب در ۳۱، ۲۸ و ۲۳ درصد موارد با Maf، CyclinD1 و MMSET جابجایی ایجاد می‌کنند. موتاسیون P53 در ۵۸ درصد از سلول‌های وابسته به IL-6 و ۸۵ درصد سلول‌های مستقل از آن (متوسط ۶۵ درصد موارد) و موتاسیون N/K-Ras در ۴۵ درصد از سلول‌ها دیده می‌شود ولی در عین حال برخی از رده‌های وابسته به IL-6 فاقد هر دو جهش Ras

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

و P53 هستند. نکته دیگر آنکه ۲۵ درصد رده‌های وابسته و ۶ درصد رده‌های مستقل از IL-6 فاقد ترانس لوکاسیون عود شونده هستند.

قیمت اکثر رده‌ها در فرم فریز و داخل فلاسک به ترتیب ۳۶۰ و ۷۲۰ یورو (معادل ۳/۶ میلیون تومان) و قیمت هر ۵ میکرولیتر از DNA تخلیص شده آن‌ها ۱۰۰ یورو می‌باشد. برخلاف KMS-12PM، رده KMS-12BM فاقد توانایی تولید آمیلاز و CD7 و دارای t(11;14)، بیان بالای Bcl-2، Bcl-X، CD11a و CD20 هستند. این سلول‌ها در کل Non-Secretor بوده و آنتی‌بادی ترشح نمی‌کنند ولی رده سلولی KMS-12PE و اکثریت رده‌ها به دلیل عدم بیان CD20 احتمالاً در مراحل آخر تمایز B سل قرار دارند. این رده به دلیل استقرار در مایع پلور به صورت اکتوپیک آمیلاز تولید کرده و در ناحیه 1p22-pter نیز دچار حذف شدگی می‌باشد (۱۵).

رده‌ها اغلب در کارهای تحقیقاتی پری‌کلینیکال یا فاز 0 کلینیکال، برای بررسی اثرات مستقیم یا سینرژیک دارویی، سیگنالینگ، بیان ژنی و مواردی مثل برهم‌کنش سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته برخی از رده‌ها مثل KMS-5 (CD10+) توانایی تومورزایی نیز داشته و در صورت تزریق زیرجلدی به غدد لنفاوی یا ورید دم موش، باعث بروز تومورهای منفرد میلومایی می‌شوند. اعتماد مطلق به رده خریداری یا اهداء شده اغلب باعث بروز مشکلاتی می‌شود که ممکن است کل نتایج آزمایشگاهی را مورد تردید قرار دهد. احتمال آلودگی یک سلول با سلول دیگری که همزمان روی آن‌ها کار می‌شود، لیبل نویسی اشتباه در مراحلی مثل پاساژ، فریز یا دفریز، پاک شدن نوشته‌های روی کرایوول یا فلاسک، برخی اشتباهات سهوی و عدم انتخاب رده مناسب از علل مهمی هستند که نیاز به تعیین هویت و ارزیابی اولیه خصوصیات یک رده قبل از شروع کارهای تحقیقاتی را توجیه می‌کنند. چه بسا در این مرحله، از بین رده‌های مختلف یک بیماری، یک رده رد شده و رده دیگری انتخاب شود؛ به عنوان مثال گاهاً از بین رده‌های مختلف برخی مقاوم به یک داروی خاص بوده، یا برخی از نظر بیان یک CD مارکر، مثبت بوده یا برخی از نظر بیان یک ژن موتانت، Over express باشند یا به دلایلی، احتمال آلودگی مایکوپلاسمایی در یک رده وجود داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق که فاز ابتدایی از شروع یک تحقیق مجزا بود، ابتدا رده‌هایی که فاقد شناسنامه معتبر بوده و به صورت اهدایی و غیررسمی از لندن به تهران ارسال شده بود، مورد بررسی ایمونوفنوتایپ و ایمونوتایپ جهت تعیین هویت قرار گرفتند. در بررسی مورفولوژی، میلومایی بودن همه رده‌های سلولی تأیید شد ولی مورفولوژی سه رده LP1، JJN3 و L363 شباهت بالایی را به یکدیگر نشان دادند. در ادامه CD مارکرهای میلومایی نیز روی سلول‌ها انجام شد که کماکان شباهت ایمونوفنوتایپی این سه رده بسیار بالا بود ولی در مرحله الکتروفورز پروتئین‌های سرم (SPE) و ایمونوتایپ باند گاما، تفاوت‌هایی در رده LP1 دیده می‌شد که حکایت از تفاوت آن با دو رده JJN3 و L363 داشت. از طرفی دیگر در منابع مختلف، JJN3 به صورت IgA:κ معرفی شده بود که در بررسی ما، این ایمونوتایپ تأیید نشد (IgG:λ) و لذا یکسان بودن دو رده JJN3 و L363 و وجود یک اشتباه احتمالی در لیبل‌گذاری رده JJN3 مورد شک و هویت این سلول مورد تردید قرار گرفت. لذا در تحقیقات آتی یا این رده حذف شده یا اینکه تمامی نتایج آن با تردید و در قیاس با L363 آنالیز

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

خواهند شد. از طرفی دیگر، با توجه به عدم وجود منبع دیگری از این رده‌ها در کشور، بدین‌وسیله توصیه می‌شود همکاران و پژوهشگران گرامی نیز با توجه به نتایج فوق، یکی از دو سلول را به عنوان گزینه نهایی خود استفاده کنند.

سپاس و قدردانی

در پایان لازم است از زحمات تمامی اساتید، همکاران و پژوهشگران گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات و فناوری بن‌یاخته به جهت ایجاد امکانات مطلوب پژوهشی و کمک به کسب نتایج فوق، تشکر نمایم. این تحقیق با هزینه شخصی انجام و تحت حمایت مالی مرکزی قرار نداشت.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Klein U, Dalla-Favera R. Germinal Centres: Role in B-Cell Physiology and Malignancy. Nat Rev Immunol 2008; 8(1): 22-33.
2.Nakaya A, Fujita S, Satake A, et al. Impact of CRAB Symptoms in Survival of Patients with Symptomatic Myeloma in Novel Agent Era. Hematol Rep 2017; 9(1): 6887.
3.Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, et al. The Generation of Antibody-Secreting Plasma Cells. Nat Rev Immunol 2015; 15(3): 160-71.
4.Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The Molecular Classification of Multiple Myeloma. Blood 2006; 108(6): 2020–28.
5.Manzanera MG, Izquierdo SJ, Matos OA. Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. Methods Mol Med 2005; 113: 5-24.
6.Gooding PR, Bybee A, Cooke A, et al. Phenotypic and Molecular Analysis of Six Human Cell Lines Derived from Patients with Plasma Cell Dyscrasia. Br J Haematol 1999; 106(3): 669-81.
7.Bakhtiari M, Kaviani S, Abroon S, Moallemi M, Jalaei Kho H. Amniotic Fluid that Supports the Growth of Plasma Cells. Iran South Med J 2018; 21(4): 304-318
8.Seegmiller AC, Xu Y, McKenna RW, et al. Immunophenotypic Differentiation between Neoplastic Plasma Cells in Mature B-cell lymphoma vs Plasma Cell Myeloma. Am J Clin Pathol 2007; 127(2): 176-81.
9.Flores-Montero J, De Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of Normal vs. Myeloma Plasma Cells: Toward Antibody Panel Specifications for MRD Detection in Multiple Myeloma. Cytometry B Clin Cytom 2016; 90(1): 61-72.
10.Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, et al. Multiple Myeloma Cells Expressing Low Levels of CD138 Have an Immature Phenotype and Reduced Sensitivity to Lenalidomide. Int J Oncol 2012; 41(3): 876-84.
11.Togawa A, Inoue N, Miyamoto K, et al. Establishment and Characterization of a Human Myeloma Cell Line (KMM-1). Int J Cancer 1982; 29(5): 495-500.
12.Moreaux J, Klein B, Bataille R, et al. A High-Risk Signature for Patients with Multiple Myeloma Established from the Molecular Classification of Human Myeloma Cell Lines. Haematologica 2011; 96(4): 574-82.
13.Vincent Rajkumar S. Multiple Myeloma: 2018 Update on Diagnosis, Risk-Stratification, and Management. Am J Hematol 2018; 93(8): 1091-110.
14.Drexler HG, Matsuo Y. Malignant Hematopoietic Cell Lines: in Vitro Models for the Study of Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia. Leuk Res 2000; 24(8): 681-703.
15.Ohtsuki T, Yawata Y, Wada H, et al. Two Human Myeloma Cell Lines, Amylase-Producing KMS-12-PE and Amylase-Non-Producing KMS-12-BM, Were Established from a Patient, Having the Same Chromosome Marker, t(l1;14)(ql3;q32). Br J Haematol 1989; 73(2): 199-204.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]

Original Article

Immunophenotypic and Immunotypic Evaluations of Human Myeloma Cell Lines KMM-1, JJN3, LP1, L363, KMS-12BM and RPMI-8226 for Cell-Line Authentication

N. Vazifeh shiran (MSc)[1], S. Abroun (PhD)[1]*

[1] Department. of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiate Modares University, Tehran, Iran

(Received 7 Jul, 2019 Accepted 21 Aug, 2019)

Abstract

Background: The disease-associated cell lines used in the majority of preclinical trials should be first authenticated and identified to avoid directing research expenditure on wrong cells and obtaining irrelevant results. The present study evaluated the immunophenotypic and immunotypic authenticity of six human myeloma cell lines (HMCLs).

Materials and Methods: Cytospin smear and Wright staining were used for invetigating cell morphology, the flowcytometry of the markers CD45, CD2, CD19, CD38 and CD138 for immunophenotypic investigations, capillary electrophoresis for the immunoglobulin secretion potency and immunofixation for the immunotypical investigation of the cells.

Results: Given the definite plasma cell morphology, the identity of all the cell lines was confirmed, although a similar morphology was observed in L363 and JJN3. In addition to authenticating the myeloma nature of all the cell lines, immunophenotypic investigations suggested a complete similarity between L363 and JJN3 cell lines. Examining their immunotypes for a final confirmation found KMS12BM to be non-secretor, KMM1 to be BJP-λ and the remaining to be IgG-λ.

Conclusion: Despite confirming the identity of four cell lines, i.e. RPMI-8226, KMS-12BM, KMM1 and LP1, that of JJN3 and L363 cells, whose immunotype was determined as IgGλ, was questioned owing to their fundamental morphological, immunophenotypic and immunotypic similarities. On the other hand, a reveiew of literature and ATCC.org suggested that the main nature of JJN3 is IgAκ. The authenticity of the JJN3 cell line was therefore unclear and it was indeed the same as that of L363. The JJN3 cell-line was therefore discarded, and the associated results were interpreted as consistent with the results of L363.

Keywords: Cell line, HMCL, myeloma, authentication, immunophenotype, immunotype

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Vazifeh shiran N, Abroun S. Immunophenotypic and Immunotypic Evaluations of Human Myeloma Cell Lines KMM-1, JJN3, LP1, L363, KMS-12BM and RPMI-8226 for Cell-Line Authentication. Iran South Med J 2019; 22(5): 287-295

Copyright © 2019 Vazifeh shiran, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Department of Hematology and Blood Banking, School of Medical Sciences, Tarbiat modares University of Medical Sciences, tehran, Iran.
Email: nadershirani@yahoo.com
*ORCID: 0000-0003-0438-4438

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.29252/ismj.22.5.278]