

Study of the Expressions of IL-20R1 and IL-20R2 in C57BL/6 Mice Astroglial Cells

Bahareh Abd Nikfarjam¹, Massoumeh Ebtekar^{2*}, Farzaneh Sabouni³, Zahra Pourpak⁴, Maryam Kheirandish⁵

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Biochemistry, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
- 4- Professor, Immunology, Asthma and Allergy Research Institute, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 5- Assistant Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ebtekarm@modares.ac.ir*

Received: 28/Nov/2012, Accepted: 16/Feb/2013

Abstract

Objective: Astrocytes are the most abundant glial cell type. They may promote or inhibit CNS inflammation depending on which cytokines are secreted. Astrocytes also have immune roles. IL-19, IL-20, and IL-24 activate a heterodimer receptor composed of the IL-20R1 α -chain and the IL-20R2 β -chain. It has long been considered that signaling by these receptor complexes affects immunological reactions, however the biological functions of IL-20R1 and IL-20R2 in the brain remain unclear. As the first step to address the role of these cytokine receptors in the brain, in this study we have researched the expressions of IL-20R1 and IL-20R2 in C57BL/6 mice astrocytes.

Methods: We examined expressions of IL-20R1 and IL-20R2 proteins in mice astroglial cells and in the 1321N1 astrocytoma cell line in response to MOG, LPS and GM-CSF by flow cytometry. The effect of LPS on mRNA expression of IL-20R1 and IL-20R2 was investigated by RT-PCR.

Results: We provide, for the first time, evidence that astrocytes expressed IL-20R1 and IL-20R2 mRNA not only in response to LPS stimulation but also in unstimulated astrocytes. We did not observe the expressions of IL-20R1 and IL-20R2 proteins in mice astroglial cells and the 1321N1 astrocytoma cell line.

Conclusions: IL-20R1 and IL-20R2 mRNA are constitutively expressed in astrocytes. Because the majority of neuropathological processes involve astrocytes and inflammatory cytokines, the results of this study, which are reported for the first time, have important implications for future research.

Keywords: Astrocytes, Lipopolysaccharide, IL-20R1, IL-20R2

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 35-47

مطالعه بیان اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 در سلول‌های آستروگلیال موش‌های C57BL/6

بهاره عبد نیک‌فر جام^۱، معصومه ابتکار^{۲*}، فرزانه صابونی^۳، زهرا پورپاک^۴، مریم خیراندیش^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، آسم و آلرژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون، انستیتو عالی پژوهش و آموزش در پزشکی انتقال خون، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی

Email: ebtokarm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۸

دریافت مقاله: ۹۱/۰۹/۰۸

چکیده

هدف: آستروسیت‌ها بیشترین سلول‌های موجود در مغز هستند. این سلول‌ها قادرند التهاب سیستم اعصاب مرکزی را وابسته به سایتوکین‌هایی که تولید می‌کنند آغاز یا مهار نمایند. انتقال پیام اینترلوکین ۱۹، اینترلوکین ۲۰ و اینترلوکین ۲۴ از طریق اتصال به یک گیرنده هتروداایمر متشکل از زنجیره α اینترلوکین 20R1 و زنجیره β اینترلوکین 20R2 صورت می‌گیرد. مطالعات گذشته روشن نموده‌است که انتقال پیام توسط این کمپلکس‌های گیرنده واکنش‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ اما اعمال زیست‌شناختی اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 در مغز تاکنون روشن نشده است. به عنوان اولین مرحله برای شناخت نقش این گیرنده‌های سایتوکینی در مغز، بیان گیرنده‌های اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 توسط آستروسیت‌های موش C57BL/6 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 توسط پپتید میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین، لیپو پلی‌ساکارید و GM-CSF تحریک شدند و تولید پروتئین گیرنده‌های اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 به روش فلوسیتومتری بررسی شد. همچنین تأثیر لیپو پلی‌ساکارید بر تولید mRNA این گیرنده‌های سایتوکینی توسط آستروسیت با استفاده از روش RT-PCR مطالعه شد.

نتایج: برای اولین بار در این مطالعه نشان داده شد که آستروسیت‌ها قادرند mRNA اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 نه تنها در پاسخ به تحریک لیپو پلی‌ساکارید بلکه در غیاب آن نیز بیان نمایند. به علاوه؛ بیان پروتئین اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 بر سطح آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 تشخیص داده نشد. نتیجه‌گیری: mRNA اینترلوکین 20R1 و اینترلوکین 20R2 به طور ساختاری و دایم در آستروسیت‌ها بیان می‌شود. از آنجایی که در بیشتر فرآیندهای نوروپاتولوژیک آستروسیت‌ها و سایتوکین‌های التهابی نقش دارند این یافته‌ها که برای اولین بار گزارش می‌شود در تحقیقات آینده اهمیت ویژه‌ای دارد.

کلیدواژگان: آستروسیت‌ها، لیپو پلی‌ساکارید، اینترلوکین 20R1، اینترلوکین 20R2

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۳۵-۴۷

مقدمه

دو نوع سلول اصلی در مغز وجود دارد؛ نورون‌ها که تحریک‌های الکتریکی را هدایت می‌کنند و واسطه‌های اصلی تشکیل حافظه هستند و آستروسیت‌ها (Astrocytes) که به طور عمده اعمال پشتیبانی و محافظتی را برای نورون‌ها مهیا می‌کنند. آستروسیت یا آستروگلیا (Astroglia) از واژه یونانی "astro" به معنای ستاره نامگذاری شده است و بیشترین سلول‌های موجود در مغز بوده و ۹۰ درصد کل توده مغز را تشکیل می‌دهند. مطالعات نشان می‌دهند که آستروسیت‌ها نقش‌های مهمی در تنظیم اعمال مغز دارند که از آثار آن‌ها بر نورون‌ها مستقل است [۱]. به عنوان مثال این سلول‌ها در تمامی مراحل تکامل عصبی نقش اساسی دارند. همچنین قادرند به عنوان سلول‌های بنیادی عصبی عمل نمایند و موجب تولید نورون‌ها شوند [۲]، زواید آکسونی را هدایت [۳] و نوریت (Neuritis) را القا کنند [۴]، همچنین باعث تشکیل سیناپس [۵-۷] و بقای نورون‌ها شوند [۴].

تحت شرایط خاصی که تاکنون به خوبی شناخته نشده است، آستروسیت‌ها می‌توانند التهاب را آغاز نمایند و همچنین با فعال شدن سلول‌های T واکنش‌گر با آنتی‌ژن‌های خودی (Auto-Reactive T Cells) مقابله نمایند. ممکن است پتانسیل پیش یا ضد التهابی آستروسیت‌ها به جایگاه آن‌ها و نیز سایتوکین‌هایی (Cytokines) که تولید می‌کنند وابسته باشد. یکی از نقش‌های فیزیولوژیک آستروسیت‌ها فعال کردن سلول‌های Th2 (T helper 2) و القا آزادسازی سایتوکین‌های ضد التهابی نظیر اینترلوکین ۴ (Interleukin 4: IL-4) و IL-10 است که التهاب مغزی به واسطه سلول‌های T پیش التهابی را فروتنظیم می‌کند. به علاوه آستروسیت‌ها در سیستم اعصاب مرکزی پاسخ‌های پیش التهابی سلول‌های T را توسط القای آنرژی (Anergy) و مرگ سلولی برنامه ریزی شده سلول‌های T با میانجی‌گری CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte) و CD95L (Antigen-1) سرکوب می‌نمایند. همچنین این سلول‌ها قادر به تولید سایتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α)، IL-6، IL-1β، MCP-1

(Monocyte Chemotactic Protein-1) و GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) هستند. بنابراین آستروسیت‌ها التهاب سیستم اعصاب مرکزی را وابسته به سایتوکین‌هایی که ترشح می‌کنند آغاز یا مهار می‌نمایند [۸].

مطالعات نشان می‌دهند که آستروسیت‌ها طی فعال شدن طولانی در بدن یا پس از تحریک توسط IFN-γ (Interferon-γ)، TNF-α و IL-1β مولکول‌های MHC (Major Histocompatibility Complex) کلاس II را بیان می‌نمایند و ظرفیت تحریک سلول‌های CD4⁺ T اتوراکتیو خاطره‌ای اختصاصی میلین و فعال نمودن سلول‌های T به صورت اختصاصی آنتی‌ژن را کسب می‌کنند. این فرآیندها منجر به آغاز التهاب سیستم اعصاب مرکزی می‌شود و دارای نقش مهمی در بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis: MS) است. گیرنده‌های بتا-۲-آدرنرژیک بیان مولکول‌های MHC کلاس II را در آستروسیت‌ها کنترل می‌نمایند؛ واکنش‌های ایمنی منجر به از دست رفتن این گیرنده‌ها و در نتیجه کاهش وضعیت سرکوب کننده ایمنی در آستروسیت‌ها می‌شود [۸].

آستروسیت‌ها به عنوان خط ثانویه سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن غیرحرفه‌ای ساکن در سیستم اعصاب مرکزی عمل می‌نمایند که با آغاز التهاب توسط دیگر سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن نظیر میکروگلیا (Microglia) و سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells) فعال می‌شوند. به واسطه آزادسازی موضعی IFN-γ، آستروسیت‌ها پپتیدهای میلین را که از سلول‌های آسیب دیده در نزدیکی‌شان آزاد می‌شود را برداشت و عرضه می‌نمایند. همچنین این سلول‌ها قادرند برخی پپتیدهای نوروانتی‌ژن مانند پپتیدهای میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین (myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: MOG) را به طور مستقیم به واسطه مولکول‌های MHC کلاس II سطح سلولی اشغال نشده عرضه نمایند یا آن‌ها را برداشت، پردازش و عرضه کنند، نظیر پروتئین اصلی میلین (Myelin Basic Protein: MBP) [۸].

آستروسیت‌ها و سایتوکین‌های مشتق از آن‌ها پاسخ‌های ایمنی را در سیستم اعصاب مرکزی آغاز و به صورت مناسبی هماهنگ می‌نمایند. به علاوه این سایتوکین‌ها می‌توانند ترکیبات اصلی و کلیدی در مکانیسم‌های شرکت کننده در نورودژنراسیون (Neurodegeneration) باشند. برهمکنش‌های نورونی- گلیال در تعیین آستانه فعال شدن آستروسیت‌ها در راستای تولید سایتوکین‌های التهابی نقش دارد. با توجه به نقش بالقوه آستروسیت‌ها در محافظت عصبی و نوروپاتولوژی (Neuropathology) پیش‌بینی می‌شود که سایتوکین‌ها با اعمال تنظیمی و گیرنده‌های اختصاصی می‌توانند عملکرد آستروسیت‌ها را به یک جهت مطلوب یا مضر تغییر دهند؛ برای مثال فرآیندهای ترمیم در بیماری‌های نوروپاتولوژیک یا نورودژنراسیون در شرایط التهابی تحت کنترل قرار می‌گیرند [۹].

خانواده IL-10 شامل IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 و IL-29 است [۱۰-۱۱]. تشکیل کمپلکس‌ها با گیرنده‌های سایتوکینی سطح سلولی اختصاصی خانواده IL-10 مرحله اول در مسیرهای انتقال پیام است که این سایتوکین‌ها به کار می‌برند. برای تولید کمپلکس‌های انتقال پیام، دو زیر واحد مجزای گیرنده (نوع ۱ و ۲) مورد نیاز است. گیرنده‌های نوع ۱ دارای دومن‌های (Domains) درون سلولی بلندتر است که می‌تواند STAT ها (Signal Transducer and Activator of Transcription) را فراخوانی کند. یک گیرنده با دومن درون سلولی کوتاه‌تر که با STAT ها برهمکنش نمی‌دهد نوع ۲ خوانده می‌شود [۱۲]. در ژنوم IL-10, IL-19, IL-20 و IL-24 در نزدیکی یکدیگر قرار دارند و هومولوژی بسیار بالایی بین آن‌ها وجود دارد و به همین علت دارای ساختار سوم بسیار مشابهی هستند [۱۳].

IL-19, IL-20 و IL-24 به طور اصلی توسط سلول‌های میلوییدی (Myeloid Cells) و کراتینوسیت‌ها (Keratinocytes) ساخته می‌شوند و پاسخ‌های پیش التهابی را توسط القا کموکین‌ها (Chemokines) و سایتوکین‌ها در کراتینوسیت‌ها فعال می‌کنند. سلول‌های اپی‌تلیال منبع تولید این سایتوکین‌ها

هستند. همچنین لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) تولید این سایتوکین‌ها را توسط مونوسیت‌ها القا می‌کند. IL-19, IL-20 و IL-24 در کراتینوسیت‌ها یا رده‌های سلولی کراتینوسیت‌ها STAT3 را فعال می‌کنند. IL-20، ژن‌های التهابی نظیر کموکین‌ها، پروتئازها و دفسین‌ها (Defensins) را در پوست فراتنظیم می‌کند [۱۳]. انتقال پیام IL-19, IL-20 و IL-24 از طریق اتصال به یک گیرنده دو زنجیره‌ای به نام IL-20R1 و IL-20R2 از طریق فعال کردن مسیر Jak/Stat (Stat1 و Stat3) صورت می‌گیرد [۱۰، ۱۴]. همچنین IL-20R2 قادر است با IL-22R کمپلکس گیرنده هتروداایمر تشکیل دهد که ترجیحاً توسط IL-20 و IL-24 استفاده می‌شود [۱۵].

از آنجایی که نقش‌های زیستی و تنظیم اغلب اعضای خانواده سایتوکینی IL-10 و گیرنده‌های آن‌ها در ایمنی مغز و آستروسیت‌ها مشخص نیست، به عنوان اولین گام در شناسایی نقش سایتوکین‌های این خانواده و گیرنده‌های آن‌ها، IL-20R1 و IL-20R2 برای مطالعه انتخاب شدند. همان طور که در بالا بیان شد سه عضو خانواده سایتوکینی IL-10 یعنی IL-19, IL-20 و IL-24 با به کارگیری این گیرنده‌ها انتقال پیام می‌نمایند. این سایتوکین‌ها دارای نقش‌های مهمی در سیستم ایمنی است. به عنوان مثال مطالعات آثار IL-19 بر سلول‌های ایمنی و پیام‌هایی که قادر است IL-19 را فراتنظیم کند نشان می‌دهد که IL-19 یک سایتوکین ایمونومادولاتور (Immunomodulators) است. به علاوه؛ این سایتوکین‌ها در پاتوژنز بیماری‌های مختلفی نقش دارد. بنابراین شناسایی بیان این گیرنده‌ها توسط سلول‌های ایمنی موجود در سیستم اعصاب مرکزی برای مثال آستروسیت‌ها اهمیت دارد.

مطالعات نشان می‌دهند IL-19, IL-20 و IL-24 در سلول‌های تک هسته‌ای موجود در مایع سینوویال (Synovial Fluid) بیماران مبتلا به روماتوئید آرتریت (Rheumatoid Arthritis) فراتنظیم می‌شوند [۱۶-۱۷]. همچنین روشن شده است IL-19, IL-20 و IL-24 در پاتوژنز بیماری‌های پوستی نظیر پسوریازیس (Psoriasis) نقش دارند [۱۸]. چندین مطالعه نشان داده است که IL-19 نقش اساسی در ایمونوپاتولوژی

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid، ۱/۵ میلی لیتر تریپسین و ۷۵ میکرولیتر DNAase منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. قطعات کوچک بافت قشر به طور مکانیکی توسط یک پیپت پاستور به سوسپانسیون تک سلولی تبدیل شد و ذرات سلولی با فیلتراسیون از یک فیلتر سلولی ۷۵ میکرومتری خارج شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. کشت اولیه سلول گلیال در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FSC (Fetal Calf Serum)، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) سوسپانسیون شد و در پلیت های کشت سلولی ۹۰ میلی متری پوشیده شده با پلی-ال-اورنیتین (Poly-L-ornithine) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد کشت سلولی رشد داده شد. محیط کشت روز بعد، ۶ روز بعد و سپس دو مرتبه در هفته تعویض شد. ۹۰ درصد Confluence کشت ها ۱۴ تا ۱۸ روز پس از کشت اولیه به دست آمد.

سپس پلیت ها برای جداسازی سلول های غیر چسبیده [الیگودندروسیت ها (Oligodendrocytes) و میکروگلیا] از آستروسیت ها روی شیکر (Shaker) به مدت ۲ ساعت با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد تکان داده شد (Shaking off method). مایع رویی محیط کشت به منظور جداسازی این سلول ها توسط پیپت پاستور برداشته شد. آستروسیت ها توسط تریپسین کردن به دست آمدند و در پلیت های کشت بافتی پوشیده شده با پلی-ال-اورنیتین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شدند. برای به دست آوردن کشت خالص آستروسیت ها، ۲ مرتبه مراحل روش فوق و تریپسین کردن تکرار شد.

تعیین خلوص کشت آستروسیت ها به روش

ایمونوسیتوشیمی با نشانگر اختصاصی GFAP

خلوص کشت سلول های آستروگلیال توسط روش ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) غیر مستقیم با

(Immunopathology) پسوریازیس بازی می کند [۱۹]. بیان IL-19 در ضایعات پسوریاتیک در سرم بیماران مبتلا به آسم فراتنظیم می شود [۱۱]. IL-20 نقش مهمی در اعمال زیستی پوست دارد. افزایش بیان IL-20 در موش های تراخیخت (Transgenic) منجر به مرگ نوزادان با اختلالات پوستی مشابه پسوریازیس می شود [۲۰]. IL-24 سبب توقف رشد غیرقابل بازگشت تومورها توسط القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) یا تمایز می شود [۱۳].

تاکنون بیان گیرنده های IL-20R1 و IL-20R2 توسط آستروسیت ها و بنابراین پاسخ گویی آن ها به IL-19، IL-20 و IL-24 بررسی نشده است. در این مطالعه آستروسیت های حاصل از قشر مغز موش های نوزاد C57BL/6 و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 (Astrocytoma Cell Line) توسط پپتید MOG (یکی از آنتی ژن های میلین که مورد حمله سلول های T قرار می گیرد و در بیماری های MS نقش دارد)، اوالبومین (Ovalbumin: OVA) به عنوان پپتید کنترل، LPS و GM-CSF به صورت جداگانه تحریک شدند و تأثیر آن بر تولید گیرنده های IL-20R1 و IL-20R2 به روش فلوسیتومتری بررسی شد. به علاوه؛ تأثیر LPS بر تولید mRNA و گیرنده های سایتوکینی IL-20R1 و IL-20R2 توسط آستروسیت های به روش RT-PCR مطالعه شد.

مواد و روش ها

کشت آستروسیت ها از مغز موش های C57BL/6

سلول های آستروگلیال موش های C57BL/6 با تغییرات اندکی از روش مک کارتی (McCarthy) به دست آمدند [۲۱]. کورتکس از مغز موش های نوزاد C57BL/6 یک تا پنج روزه و منتر با استفاده از یک استریومیکروسکوپ به طور کامل جدا شد. کورتکس ها به قطعات کوچک بریده شد و همراه با ۱/۵ میلی لیتر Dulbecco's Modified Eagle's Minimum (DMEM Essential Medium) به فالکون ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۳/۵ میلی لیتر HBSS-HEPES [Hanks' Balanced Salt Solution-

آنتی‌بادی anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) موشی (Dakopatts، آمریکا) تعیین شد. برای تسهیل اتصال، آستروسیت‌ها روی Coverslip های پوشانده شده با پلی-ال-اورنیتین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت سلولی کشت داده شدند. سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. پس از آن با آنتی‌بادی اولیه anti-GFAP موشی به مدت ۱۶ ساعت در یخچال انکوبه شدند. سپس سه بار توسط بافر (PBS Buffered Phosphate Saline) شستشو شدند و با آنتی‌بادی ثانویه Alexa Fluor 488 (dye-labeled goat anti-rabbit IgG، Invitrogen، آلمان) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با PBS، هسته سلول‌ها توسط DAPI (-6,4' diamidino-2-phenylindole) رنگ‌آمیزی شد. Coverslip ها روی لام شیشه‌ای توسط Mowiol (Merk، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در تاریکی تثبیت و توسط میکروسکوپ فلورسنت و کانفوکال شمارش و تجزیه و تحلیل شد.

کشت رده‌های سلولی A375 حاصل از پوست انسان مبتلا به ملانومای بدخیم (Malignant Melanoma)، با ریخت‌شناسی شبه سلول‌های اپی‌تلیال و آستروسیتومای 1321N1

سلول A-375 در محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS رشد داده شد. این رده سلولی به طور خودبه‌خود گیرنده IL-20R1 و IL-20R2 را بیان می‌نماید. رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد FCS کشت داده شد.

بررسی بیان گیرنده IL-20R1 و IL-20R2 بر سطح آستروسیت‌های موش، رده‌های سلولی آستروسیتوما 1321N1 و A375 به روش فلوسیتومتری

آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 در

پلیت‌های ۲۴ خانه با پپتیدهای نوترکیب MOG (MOG 35-55) موشی (Alexis، آمریکا) و اوالبومین (OVA323-339) موشی (ANASPECT) هر کدام به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و همچنین سایتوکین نوترکیب GM-CSF موشی (R&D، آمریکا) به غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و LPS از اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) 0127:B8 (Sigma، آمریکا) به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. چاهک‌های کنترل کشت آستروسیت‌ها بدون محرک‌های MOG، GM-CSF و LPS بود. از پپتید اوالبومین به عنوان کنترل پپتید MOG استفاده شد. رده سلولی A375 به صورت خودبه‌خودی گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 را بیان می‌نماید و در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت بیان گیرنده‌های فوق به کار رفت. آنتی‌بادی ضد موشی IL-20RA (Abnova، آمریکا)، Goat Anti-Rabbit IgG Rhodamine (Abnova، آمریکا) و IgG طبیعی خرگوش به عنوان ایزوتیپ کنترل (R&D) در سنجش IL-20R1 به روش فلوسیتومتری استفاده شد.

آنتی‌بادی ضد موشی IL-20RB (R&D)، NorthernLight Anti-sheep IgG-NL557 (R&D) و IgG طبیعی گوسفند به عنوان ایزوتیپ کنترل (R&D) در سنجش IL-20R2 به روش فلوسیتومتری به کار رفت.

آستروسیت‌ها و سلول آستروسیتومای 1321N1 تیمار شده و رده سلولی A375 توسط انکوباسیون با تریپسین/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جداسازی و برداشته شدند. سلول‌ها دو مرتبه در بافر شستشو (PBS، ۳ درصد FBS و ۰/۰۱ درصد سدیم آزید) شسته شدند.

آستروسیت‌ها در ۵۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی (PBS، ۳ درصد FBS و ۰/۰۱ درصد سدیم آزید) سوسپانسیون و با آنتی‌بادی‌های اولیه (آنتی‌بادی‌های ضد موشی IL-20RA و IL-20RB) به مدت ۱ ساعت روی یخ انکوبه شدند. سلول‌ها دو بار با بافر شستشو (PBS، ۱ درصد FBS و

کشت آستروسیت‌ها بدون محرک LPS بود.

استخراج RNA

RNA از آستروسیت‌های تیمار شده و کنترل با استفاده از تریزول بر طبق دستورالعمل تولید کننده استخراج شد.

سنتز cDNA

cDNA تک زنجیره‌ای توسط نسخه‌برداری معکوس ۲ میکروگرم از RNA درحجم واکنش ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت RNT (Applied Biosystem، آمریکا) بر طبق دستورالعمل تولید کننده ساخته شد. شرایط سنتز cDNA: ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸۵ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب به مدت ۱۰ دقیقه، ۲ ساعت و ۵ دقیقه.

واکنش RT-PCR

تکنیک الگوی cDNA در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲ میکرولیتر الگوی cDNA، ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq polymerase، ۵ میکرولیتر آغازگرهای (Primers) جلویی و معکوس) انجام شد. آغازگر ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده

آغازگر معکوس	آغازگر جلویی	ژن
TCT GCC TCC AGC CTC AGG TT	GGC GCT CAA TGC TGG CTT CA	GFAP
GAC AGT ATG CTC CTG ACC CAGG	GGCACAAGAGTC TTT GAA CCTACT G	IL-20R1
CTA GGT GCA CCG GAA TGTC	GTC TGG ACA AGT CCG TTC ATG	IL-20R2
TTTGATGTCACG CAC GATTT	GGG AAT GGG TCA GAA GGA CT	بتا اکتین

توالی‌ها از سمت چپ به راست (نوکلئوتید ۵' به نوکلئوتید ۳') نوشته شده است.

الکتروفورز محصولات PCR

اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) در ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز و توسط دستگاه UV

۰/۰۱ درصد سدیم آزید) شسته شدند. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های کونژوگه ثانویه (NorthernLight Anti-sheep IgG-NL557 و Goat Anti-Rabbit IgG Rhodamine) به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند. سپس سلول‌ها دو بار با بافر شستشو شدند. در لوله‌های جداگانه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ایزوتایپ کنترل‌ها رنگ‌آمیزی شد. در این رنگ‌آمیزی به جای استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه از IgG طبیعی خرگوش و IgG طبیعی گوسفند استفاده شد. سلول‌ها برای بررسی بیان پروتئین IL-20R1 و IL-20R2 توسط FACSCallibur flow cytometer (Bioscience، آمریکا) تجزیه و تحلیل شدند.

مطالعه بیان mRNA ژن‌های IL-20R1 و IL-20R2

GFAP و بتا اکتین (β -actin) در آستروسیت‌های

حاصل از قشر مغز موش‌های نوزاد C57BL/6

تحریک شده توسط LPS به روش RT-PCR

آستروسیت‌ها ۲ روز قبل از انجام آزمایش در پتری‌دیش‌های ۹۰ میلی‌متری پوشیده شده با پلی-ال-اورنیتین (برای استخراج mRNA توسط تریزول) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس توسط LPS با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت تحریک شدند. چاهک کنترل

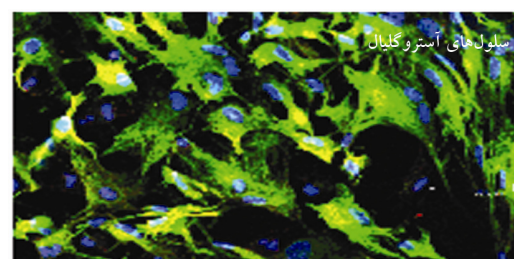
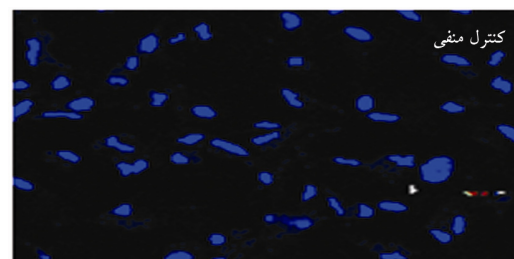
محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۱۰ میکرولیتر

Transilluminator مشاهده و بررسی شد.

نتایج

خلوص کشت آستروسیت‌ها

خلوص کشت‌ها توسط روش ایمونوسیتوشیمی غیرمستقیم با نشانگر اختصاصی آستروسیتی (GFAP) تعیین شد. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با نشانگر اختصاصی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت شمارش شدند. خلوص سلول‌ها حدود ۹۵ درصد تخمین زده شد. آستروسیت‌های رنگ‌آمیزی شده با GFAP و کنترل منفی در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱ تجزیه و تحلیل میکروسکوپ کانفوکال واکنش ایمونوسیتوشیمی برای تعیین خلوص کشت سلول‌های آستروگلیال؛ آستروسیت‌های رنگ‌آمیزی شده با anti-GFAP موشی به رنگ سبز و هسته‌ها توسط DAPI به رنگ آبی در آمده‌اند. در رنگ‌آمیزی کنترل منفی برای تأیید واکنش اختصاصی anti-GFAP و GFAP فقط از آنتی‌بادی ثانویه DAPI استفاده شده است. (بزرگنمایی $\times 40$)

بیان گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 توسط

آستروسیت‌ها و رده‌های سلولی آستروسیتوما

1321N1 و A375

در این مطالعه بیان IL-20R1 و IL-20R2 توسط

آستروسیت‌های حاصل از مغز موش‌های نوزاد C57BL/6 و رده‌های سلولی آستروسیتوما 1321N1 و A375 به روش فلوسایتومتری بررسی شد. آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 توسط پپتیدهای نوترکیب MOG و OVA و همچنین سایتوکین نوترکیب GM-CSF و LPS به مدت ۲۴ ساعت تحریک شدند. چاهک‌های کنترل کشت بدون محرک‌های MOG، GM-CSF و LPS بود. سلول‌های رنگ نشده به عنوان کنترل استفاده شدند. ایزوتایپ کنترل‌ها با آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ رنگ‌آمیزی شدند.

رده سلولی A375 به طور خودبه‌خود گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 را بیان می‌نماید و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار WinMDI تجزیه و تحلیل شد و درصد بیان گیرنده‌ها به صورت نمودار نقطه‌ای شکل ۲ نمایش داده شده است. در این آزمایش‌ها IL-20R1 و IL-20R2 توسط آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 بیان نشد.

بیان mRNA ژن‌های IL-20R1، IL-20R2 و

GFAP (نشانگر اختصاصی آستروسیت‌ها) و بتا

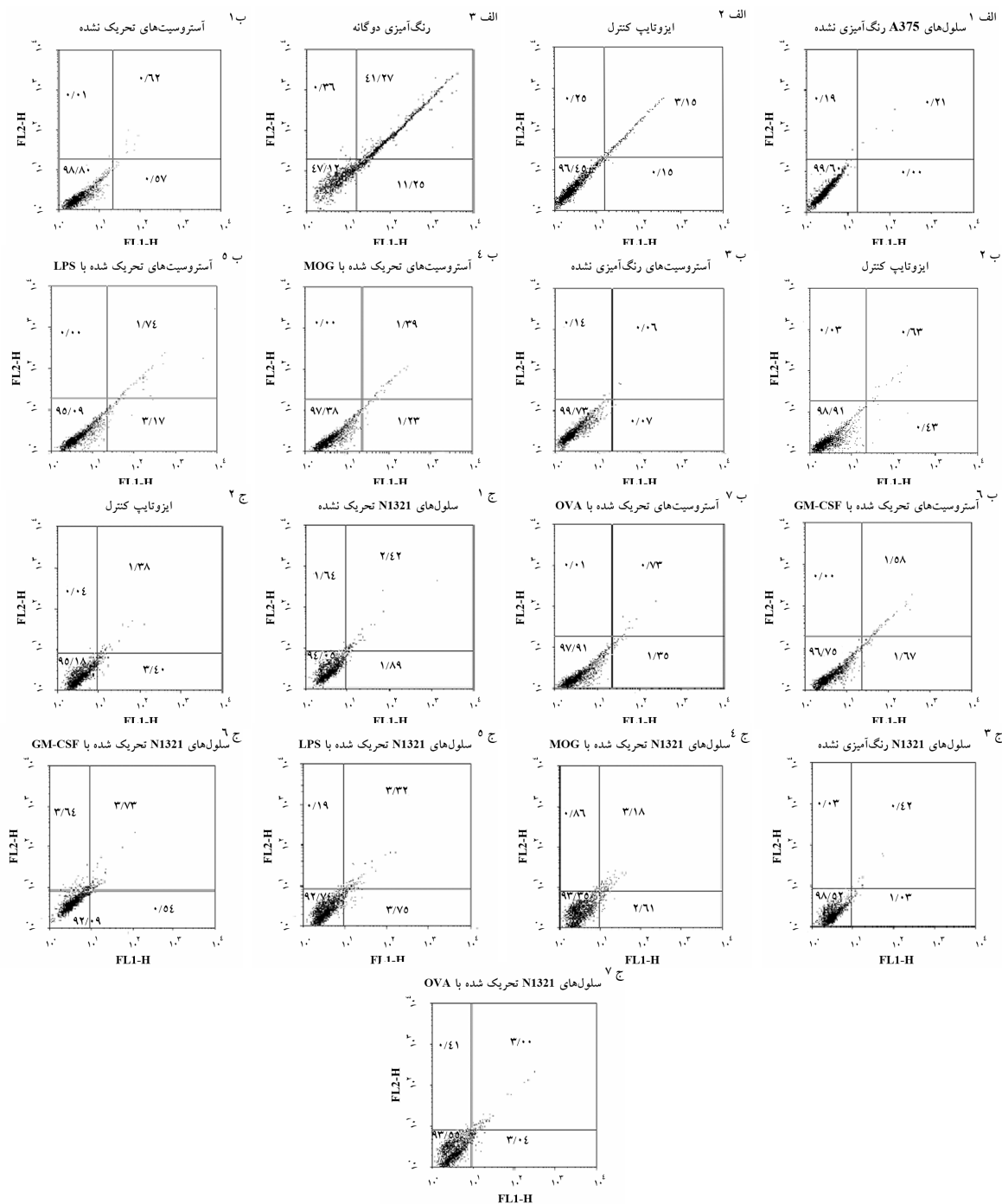
اکتین (کنترل مثبت)، در آستروسیت‌های حاصل

از قشر مغز موش‌های نوزاد C57/BL6 تحریک

شده توسط LPS به روش RT-PCR

برای بررسی بیان mRNA ژن‌های IL-20R1، IL-20R2، GFAP، بتا اکتین آستروسیت‌ها در حضور و غیاب LPS (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تحریک شدند. چاهک کنترل کشت آستروسیت‌ها بدون محرک LPS بود.

آستروسیت‌های حاصل از قشر مغز موش‌های نوزاد C57/BL6 در حضور و غیاب LPS قادر به بیان ژن‌های IL-20R1 و IL-20R2 بودند. نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۳ نشان داده شده است.



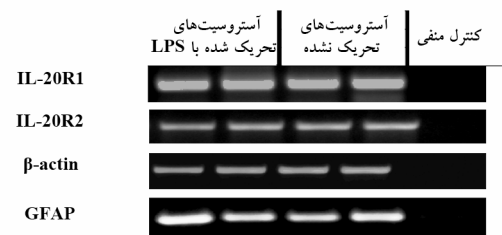
شکل ۲ بیان IL-20R1 و IL-20R2 توسط رده سلولی A375 (کنترل مثبت)، آستروسیت ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 در پاسخ به تحریک MOG، OVA، GM-CSF، LPS و مدت ۲۴ ساعت به روش فلوسایتمتری؛ (الف ۱-۳) درصد بیان IL-20R1 و IL-20R2 توسط رده سلولی A375 که قادر به بیان ساختاری و دائمی این گیرنده ها است ۴۱/۲۷ درصد است. همان طور که در شکل نشان داده شده است درصد بیان گیرنده ها در ایزوتایپ کنترل و سلول های رنگ آمیزی نشده بسیار پایین است؛ بنابراین رنگ آمیزی دوگانه اختصاصی است. (ب ۱-۷) گیرنده های IL-20R1 و IL-20R2 توسط آستروسیت های موش، در پاسخ به تحریک LPS، GM-CSF، MOG و OVA بیان نشد. ایزوتایپ کنترل، سلول های رنگ آمیزی نشده و سلول های تحریک نشده برای اطمینان از درستی نتیجه آزمایش فلوسایتمتری استفاده شد. (ج ۱-۷) همان طور که در نمودار نقطه ای نمایش داده شده است IL-20R1 و IL-20R2 توسط رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 در پاسخ به LPS، GM-CSF، MOG و OVA با روش فلوسایتمتری تشخیص داده نشد. ایزوتایپ کنترل، سلول های رنگ آمیزی نشده و سلول های تحریک نشده در هر آزمایش برای اطمینان از درستی نتایج فلوسایتمتری استفاده شد.

توجه به مشاهدات فوق این پرسش مطرح می‌شود که آیا اختلال در بیان ساختاری این گیرنده‌ها می‌تواند سبب بروز برخی اختلالات ایمنولوژیک در مغز شود؟

کراتینوسیت‌ها و دیگر سلول‌های اپی‌تلیال منبع IL-19، IL-20 و IL-24 هستند. این سایتوکین‌ها در پسیوریازیس نقش دارند زیرا بیان آن‌ها با پیشرفت بیماری افزایش می‌یابد. تجزیه و تحلیل کمی بیان mRNA گیرنده‌های IL-19، IL-20 و IL-24 نشان داده است که سلول‌های استروما/پارانشیمی (Stromal/Parenchymal Cells) اهداف اصلی این سایتوکین‌ها هستند. با توجه به منابع سلول ایمنی، این سایتوکین‌ها کاندید ارتباط بین سلول‌های پارانشیمی ساکن اندام‌های مختلف با لکوسیت‌های ارتشاحی به بافت، مونوسیت‌ها و سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن است. در مقایسه با سطوح بالای بیان mRNA گیرنده‌های IL-20R1، IL-22R، IL-20R2 و IL-24 در برخی سلول‌های پارانشیمی نظیر پوست، بیان دایمی و ساختاری mRNA این گیرنده‌های در سلول‌های لنفوبلاست پاپین است [۲۵]. در تحقیق حاضر برای اولین بار بیان گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 در آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 بررسی شد.

IL-19، در سیستم ایمنی اغلب توسط مونوسیت‌ها تولید می‌شود. ژن IL-19 توسط LPS، IFN- γ ، IL-4 و GM-CSF القا می‌شود. [۱۴، ۱۰]. IL-19 تولید IL-6 و TNF- α را در مونوسیت‌ها فراتنظیم می‌نماید و سبب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود [۲۶] که نشان دهنده خصوصیت پیش التهابی این سایتوکین است. در مقابل برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که IL-19 ضد التهابی است. برای مثال IL-19 تولید IL-10 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را افزایش می‌دهد، این مشاهدات پیشنهاد می‌کند که IL-19 نقش مهمی در سیستم ایمنی دارد [۱۶].

نشان داده شده است که IL-19 و IL-20 به زنجیره IL-20R1 در محلول متصل نمی‌شوند، اما به نسبت مولار ۱:۱ به زنجیره IL-20R2 متصل می‌شوند. به علاوه؛ زنجیره‌های



شکل ۳ بیان mRNA ژن‌های IL-20R1، IL-20R2، GFAP و بتا اکتین توسط آستروسیت‌های حاصل از قشر مغز موش‌های نوزاد C57/BL6 در حضور و غیاب LPS (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود آستروسیت‌ها در حضور و غیاب LPS قادر به بیان mRNA ژن‌های IL-20R1 و IL-20R2 هستند. همچنین ژن‌های GFAP و بتا اکتین به ترتیب برای نشانگر اختصاصی سلول‌های آستروگلیال و کنترل داخلی به کار رفته است.

بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 از خانواده سایتوکین‌های تنظیمی در کنترل فعالیت آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 است. گیرنده IL-19 در تعدادی از بافت‌ها شامل پوست، بیضه، تخمدان، قلب، ریه، عضله، جفت، غده آدرنال، روده کوچک و غده بزاق یافت شده است [۲۲]. هپاتوسیت‌ها (Hepatocytes) نیز یک هتروداایمر کارآی IL-20R را بیان می‌نمایند [۲۳].

گیرنده‌های IL-20R1 و IL-20R2 به میزان زیادی بر سطح کراتینوسیت‌های سراسر اپیدرمیس (Epidermis)، در سلول‌های ایمنی و اندوتلیال (Endothelial Cells) بیان می‌شوند. افزایش بیان گیرنده فعال IL-20R و برهمکنش‌های بین سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های ایمنی و کراتینوسیت‌ها منجر به عدم تنظیم تکثیر و تمایز کراتینوسیت‌ها می‌شود. پروتئین IL-20R1 و IL-20R2 به میزان بالایی به روش ایمنو هیستوشیمی بر کراتینوسیت‌های بازال و سوپر بازال پوست سالم رنگ‌آمیزی شده‌است و در پوست پسوریاتیک انسان در مقایسه با پوست سالم فراتنظیم می‌شوند [۲۴]. یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بیان mRNA این گیرنده‌ها به صورت ساختاری در آستروسیت‌ها رخ می‌دهد، با

همچنین در این مطالعه بیان IL-20R1 mRNA و IL-20R2 در آستروسیت‌ها پس از تحریک با LPS ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که آستروسیت‌های حاصل از قشر مغز موش‌های نوزاد C57/BL6 در حضور و غیاب LPS قادر به بیان این ژن‌ها هستند. با توجه به این که آستروسیت‌هایی که در ایمنی مغز نقش دارند در قشر ساکن هستند، این یافته‌ها دارای اهمیت است.

آزمایش‌های بیشتر در سطح بیان پروتئین این گیرنده‌های به روش وسترن بلات (Western Blot) و نیز بیان کمی mRNA در شرایط مختلف با استفاده از محرک‌های گوناگون به روش Real-Time PCR و تحقیقات بیشتر که نقش آستروسیت‌ها و IL-20R1 و IL-20R2 را در ایمنی مغز و التهاب مشخص نمایند ضروری است. در بیشتر فرآیندهای نوروپاتولوژیک که آستروسیت‌ها و سایتوکین‌ها نقش دارند، شناسایی عوامل التهاب در شناخت کامل‌تر علل و فرآیند بیماری‌زایی در مغز اهمیت دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره 88-04-10239 می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی که هزینه‌های این پژوهش را تأمین نمودند سپاسگزاری می‌گردد. بخشی از این مطالعه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام گرفته است.

R1 و R2 نمی‌توانند به یکدیگر متصل شوند و کمپلکس پایدار ۱:۱:۱ فقط در حضور لیگاند تشکیل می‌شود. این مشاهدات پیشنهاد می‌کند که هر دو سایتوکین ابتدا به زنجیره IL-20R2 متصل شده و این آرایش باعث تغییر ساختار فضایی پروتئین سایتوکین‌ها می‌شود که آن‌ها را قادر به اتصال به یکی از زنجیره‌های R1 می‌نماید: زنجیره IL-20R1 یا IL-22R1. سپس تجمع دو زنجیره گیرنده منجر به انتقال پیام می‌شود [۲۷]. به علاوه پلتنو (Pletnev) نشان داده است که IL-19 و IL-20 کمپلکس‌های سه‌گانه پایدار ۱:۱:۱ با گیرنده‌های محلول sIL-20R1 و sIL-20R2 و همچنین کمپلکس‌های دوگانه با میل ترکیبی بالا با sIL-20R2 تشکیل می‌دهد. جالب است که sIL-20R1 نمی‌تواند به تنهایی به IL-19 و IL-20 متصل شود. بنابراین یکی از مکانیسم‌های ترتیبی ممکن تشکیل کمپلکس انتقال پیام سه‌گانه می‌تواند شامل دو مرحله باشد: ابتدا لیگاند به گیرنده II متصل می‌شود و یک جایگاه اتصال با میل ترکیبی بالا برای گیرنده I به وجود می‌آورد و سپس گیرنده I کمپلکس را کامل می‌کند [۲۸].

در این تحقیق بیان پروتئین IL-20R1 و IL-20R2 به روش فلوسایتومتری بر سطح آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 مطالعه شد. بر مبنای روش‌های استفاده شده در بررسی حاضر شامل روش فلوسایتومتری با توجه به آنتی‌بادی‌های استفاده شده و روش تحریک سلول‌ها بیان پروتئین IL-20R1 و IL-20R2 بر سطح آستروسیت‌ها و رده سلولی آستروسیتوما 1321N1 تشخیص داده نشد. البته بیان این گیرنده‌ها در مطالعه حاضر در سطح سلول‌های کنترل مثبت (رده سلولی A375) یافت شد.

منابع

- [1] Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(6): 1145-50.
- [2] Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial

- nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 149-84.
- [3] Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in

- Drosophila*. Cell 1999; 96(6): 785-94.
- [4] Banker GA. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. Science 1980; 209(4458): 809-10.
- [5] Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. Science 2001; 291(5504): 657-61.
- [6] Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullen CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. Cell 2005; 120(3): 421-33.
- [7] Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. Cell 2009; 139(2): 380-92.
- [8] Kort JJ, Kawamura K, Fugger L, Weissert R, Forsthuber TG. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. J Neuroimmunol 2006; 173(1-2): 23-34.
- [9] Aschner M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. Toxicol Lett 1998; 102-103: 283-7.
- [10] Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. J Allergy Clin Immunol 2008; 121(5): 1108-11.
- [11] Liao SC, Cheng YC, Wang YC, Wang CW, Yang SM, Yu CK, Shieh CC, Cheng KC, Lee MF, Chiang SR, Shieh JM, Chang MS. IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. J Immunol 2004; 173(11): 6712-8.
- [12] Wei CC, Chang MS. Mouse interleukin-20 receptor 1a targets renal epithelial cells and is associated with renal calcium deposition. Genes Immun 2009; 10(3): 237-47.
- [13] Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol 2011; 29: 71-109.
- [14] Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol 2001; 167(7): 3545-9.
- [15] Gallagher G, Eskdale J, Jordan W, Peat J, Campbell J, Boniotto M, Lennon GP, Dickensheets H, Donnelly RP. Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. Int Immunopharmacol 2004; 4(5): 615-26.
- [16] Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y. Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation. Rheumatology (Oxford) 2008; 47(6): 815-20.
- [17] Alanärä T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomäki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. Scand J Rheumatol 2010; 39(2): 118-26.
- [18] Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke

- WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol* 2006; 15(12): 991-1004.
- [19] Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, Kasman I, Winer J, Modrusan Z, Danilenko DM, Ouyang W. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007; 178(4): 2229-40.
- [20] Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K, Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggle K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekher YA. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; 104(1): 9-19.
- [21] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980; 85(3): 890-902.
- [22] Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 2002; 277(49): 47517-23.
- [23] Wegenka UM, Dikopoulos N, Reimann J, Adler G, Wahl C. The murine liver is a potential target organ for IL-19, IL-20 and IL-24: Type I Interferons and LPS regulate the expression of IL-20R2. *J Hepatol* 2007; 46(2): 257-65.
- [24] Wei CC, Chen WY, Wang YC, Chen PJ, Lee JY, Wong TW, Chen WC, Wu JC, Chen GY, Chang MS, Lin YC. Detection of IL-20 and its receptors on psoriatic skin. *Clin Immunol* 2005; 117(1): 65-72.
- [25] Wahl C, Müller W, Leithäuser F, Adler G, Oswald F, Reimann J, Schirmbeck R, Seier A, Weiss JM, Prochnow B, Wegenka UM. IL-20 receptor 2 signaling down-regulates antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2009; 182(2): 802-10.
- [26] Liao YC, Liang WG, Chen FW, Hsu JH, Yang JJ, Chang MS. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol* 2002; 169(8): 4288-97.
- [27] Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(5): 315-24.
- [28] Pletnev S, Magracheva E, Kozlov S, Tobin G, Kotenko SV, Wlodawer A, Zdanov A. Characterization of the recombinant extracellular domains of human interleukin-20 receptors and their complexes with interleukin-19 and interleukin-20. *Biochemistry* 2003; 42(43): 12617-24.