مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۰۷/هفته چهارم آذر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۷

تأثیر داروی سیلیمارین بر تکثیر لنفوسیت‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط آزمایشگاهی (In-vitro)

احسان الماسی[۱]، دکتر ناهید اسکندری[۲]، دکتر مرجان قراگوزلو[۲]، افشین الماسی[۳]، وجیهه استادی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استفاده‌ی گسترده از داروهای گیاهی به دلیل اثرات حفاظتی آن‌ها بر ارگان‌های مختلف بدن در مطالعات بسیاری نشان داده شده است. سیلیمارین یک کمپلکس فلاونولیگنان مشتق از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است. از این ترکیب، به علت داشتن اثرات ضد التهابی و حفاظتی در بیماری‌های کبدی (Hepatoprotective) در کلینیک استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulatory) این گیاه از سوی محققین مورد توجه قرار گرفته و در این خصوص مطالعاتی صورت پذیرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سیلیمارین و DMSO (Dimethyl sulfoxide) بر تکثیر لنفوسیت‌های T انسانی در شرایط کشت سلولی بود.

روش‌ها: جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs یا Peripheral blood mononuclear cells) از افراد سالم داوطلب و سپس تحریک آن با کانکاناوالین A (Con A یا Concanavalin A) انجام گرفت و میزان تکثیر سلول‌ها پس از نشان‌دار کردن سلول‌ها با ماده‌ی فلورسنت CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) بررسی و ارزیابی آن با فلوسیتومتری نسبت به شاهد مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: سیلیمارین در غلظت‌های ۱۰۰ µM و ۲۰۰ µM نسبت به Dimethyl sulfoxide به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر مهاری سیلیمارین بر تکثیر سلول‌های T، شاید بتوان از آن به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی مهار کننده‌ی ایمنی و یک داروی حیات بخش در شرایط نیاز به سرکوب ایمنی، استفاده نمود.

واژگان کلیدی: سیلیمارین، سلول‌های T، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، دی‌متیل سولفوکساید

ارجاع: الماسی احسان، اسکندری ناهید، قراگوزلو مرجان، الماسی افشین، استادی وجیهه. **تأثیر داروی سیلیمارین بر تکثیر لنفوسیت‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۷): ۱۸۲۳-۱۸۱۶

مقدمه

تحقیقات بسیاری در دهه‌های اخیر نشان داده‌اند که برخی گیاهان دارای اثرات محافظت کنندگی-شیمیایی (Chemopreventive) هستند. در این میان، سیلیمارین یک مشتق پلی‌فنلیک فلاونولیگنان جدا شده از میوه‌ها و دانه‌های گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است که شامل مقادیر زیادی از فلاونولیگنان‌ها از

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه آمار زیستی، واحد توسعه‌ی تحقیقات بالینی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۴- دانشجوی دکتری، آزمایشگاه فلوسیتومتری و گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ناهید اسکندری
Email: neskandari@med.mui.ac.ir

قبیل Silybin (کـه فعـال‌تـرین ترکیـب آن اسـت)، Isosilybin، Silydianin و Silychristin اسـت (۱). امروزه از سیلیمارین به طور گسترده‌ای به عنوان عامل محافظ کبـدی در درمـان بیمـاری‌هـای کبـدی نظیـر سـیروز، هپاتیـت و ارتشـاح اسـید چـرب (Fatty change) ناشـی از مصـرف الکـل و مـواد شیمیایی سمی استفاده می‌گردد. همچنین سـیلیمارین دارای خواص ضـد التهـابی، اثـرات ضـد سـرطانی و آنتی‌اکسیدانی است. برخی مطالعات روی مدل انسانی اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulary) این گیاه را گزارش کرده‌اند و گزارش‌هایی نیز در ایـن زمینـه بـه چـاپ رسـیده اسـت (۳-۲). مطالعـات دیگـر نشـان داده‌انـد کـه سـیلیمارین یـک آنتـی‌اکسـیدان قـوی و Hypolipidaemic agent بـا اثـر آنتـی‌کارسـینوژیک است (۵-۴).

بر خلاف اثرات توکسیک داروهای مهـار کننـده‌ی ایمنـی، مطالعـات فارماکولوژیـک نشـان داده‌انـد کـه سیلیمارین حتی در دوزهای فیزیولوژیـک بـه نسـبت بالا، غیر سمی است. در نتیجه، پیشنهاد شده است کـه اسـتفاده از آن در درمـان بیمـاری‌هـای گونـاگون ایمونولوژیکی مورد تأکید و مطالعـه قـرار گیـرد (۶). همچنین در مطالعات دیگری بیان گردیـده اسـت کـه سیلیمارین و مشتقات آن می‌تواند اثـرات مفیـدی بـر روی برخی از عوامل خطرزای اترواسکلروزیز داشـته باشد (۷). با توجه به ویژگی سیلیمارین در مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز در سرطان پروسـتات انسـانی (۸)، پیشـنهاد شـده اسـت کـه ایـن اثـر سـیلیمارین، می‌تواند مربـوط بـه فعالیـت آنتـی‌اکسـیدانی و مهـار رادیکال‌های آزاد آن باشد (۹).

فعال شدن لنفوسـیت‌هـای T موجـب آغـاز یـک سری مسیرهای سیگنال‌دهی داخل سلولی مـی‌شـود و در کنترل اعمال مختلف سلولی از جمله بیان ژن‌هـای تنظـیم سیسـتم ایمنـی (Immunoregulatory genes) دخالت دارد. از این رو، عملکرد آن برای شروع پاسخ ایمنی ضروری است. علاوه بر این، فرایند فعال شـدن لنفوسیت T همراه با تغییرات در مولکول‌های سطحی است که بسیاری از آن‌ها در پیشـرفت پاسـخ‌هـا و یـا محدود کردن آن‌ها نقش مهمی بازی می‌کنند. افـزایش کلونی و تمایز سلولی به دلیل حضـور تعـداد زیـادی ساز و کارهای همراه بـا بـازخورد مثبـت و افزاینـده، بسیار سریع اتفاق می‌افتـد. بـه عنـوان مثـال، تولیـد و رهاسازی سایتوکاین‌های ناشی از سلول T فعال شده، تکثیر و تمایز سلول‌هـای T بـه سـلول‌هـای اجرایـی کارآمد را می‌توان ذکر کرد (۱۰).

از آن جایی که اثر سیلیمارین بر سلول‌های ایمنـی از جمله لنفوسیت‌های T تا اندازه‌ی زیـادی ناشـناخته است، به استناد گزارش‌هـای متفـاوت، مقـادیر مـورد استفاده‌ی سیلیمارین هم می‌تواند اثر مهاری بر تکثیـر سلول‌های T داشـته باشـد کـه بـا مهـار تولیـد IFNγ (Interferon gamma) و IL-۲ (Interleukin-۲) همراه است (۶) و هـم باعـث تکثیـر سـلول‌هـای T، ترشح IFN-γ، IL-۴، IL-۱۰ توسـط لنفوسـیت‌هـای فعال شود (۱۱). این در حالی است که مکانیسـم‌هـای ویژه‌ای برای اثرات نسبت داده شده به سیلیمارین بـه خوبی مشخص نیست (۲).

بر این اساس، سیلیمارین تنظیم کننـده‌ی قدرتمنـد پاسخ سیستم ایمنی است و فعالیت تحریک کنندگی و یا مهار کنندگی سیستم ایمنی آن ممکن است وابسـته به غلظت و یا روش‌هـای درمـانی باشـد. بـه عـلاوه، سیلیمارین اگر چه دارای فعالیت ضـد التهـابی اسـت،

اما مکانیسم این اثر سیلیمارین هنوز شناخته نشده است (۱۴-۱۲).

به منظور روشن شدن این تناقض و با توجه به حاشیه‌ی امنیتی بالا، این دارو می‌تواند کاربردی مفید و مؤثر در بیماری‌های ایمونولوژیکی داشته باشد که بر ضرورت این تحقیق دلالت دارد. بنابراین، هدف این مطالعه، استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMCs) داوطلبین سالم و فعال‌سازی آن‌ها از طریق تحریک با کانکاناوالین A بود. همچنین اثر سیلیمارین بر تکثیر سلول‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط In vitro مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

۰/۰۵ g از پودر سیلیمارین (C۰۲۹۲ ،MW: ۵۰۰/۷ g :Sigma, USA, product No) در ۱ ml دی‌متیل سولفوکساید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) خالص به منظور ایجاد محلول ذخیره (Stock solution) ۱۰۰ mM حل شد. محلول ذخیره در ویال‌های کوچک تقسیم و در ۲۰ ^{o}C- تا موقع استفاده نگهداری شد و مدت کوتاهی پیش از استفاده از فریزر خارج شد تا به دمای محیط آزمایشگاه برسد.

۵ mg از پودر کانکاناوالین (L۶۳۹۷: Sigma, USA, catalog No) به ۱ ml PBS (Phosphate buffered saline) استریل (pH = ۷/۴) یا ۱ ml محیط کشت اضافه شد تا محلول ذخیره‌ی ۵ mg/ml ایجاد شود. محلول ذخیره در ویال‌های کوچک تقسیم‌بندی گردید و در دمای ۲۰ ^{o}C- تا موقع استفاده نگهداری شد.

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از خون هپارینه‌ی افراد سالم داوطلب با تکنیک سانتریفیوژ روی فایکول جدا شدند. ۱۰ ml از خون هپارینه با حجم برابر از محلول فسفات بافر سالین (PBS) (pH = ۷/۴) مخلوط شد. محلول حاصل به آرامی بر روی فایکول برده شد و در ۲۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید و در مرحله‌ی بعد، سلول‌های PBMC با استفاده از پیپت پاستور جمع‌آوری و سپس دو مرتبه با PBS سلول‌های جمع‌آوری شده شستشو داده شد. به دنبال آن، سلول‌ها شمارش شد و زیست پذیری آن‌ها با تریپان بلو (۰/۰۴ درصد در PBS) ارزیابی گردید و سلول‌هایی با زیست پذیری بیش از ۹۵ درصد در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (n = ۳).

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جدا شده، جهت ارزیابی ظرفیت تکثیرشان توسط ماده‌ی CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) نشان‌دار شدند و به منظور تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T به آن‌ها کانکاناوالین A (Con A یا Concanavalin A) (۵ µg/ml) اضافه شد. سپس سلول‌های T با غلظت‌های مختلف داروی سیلیمارین (۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ µM) به مدت ۵ روز در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute۱۶۴۰) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) و در شرایط استاندارد (CO_2 ۵-۷ درصد و دمای ۳۷ ^{o}C) انکوبه شدند. همچنین از DMSO به عنوان شاهد منفی در این آزمایش استفاده گردید. پس از ۵ روز، سلول‌ها جمع‌آوری و دو بار با محلول PBS شستشو و سانتریفوژ شدند. سپس میزان

تکثیر سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

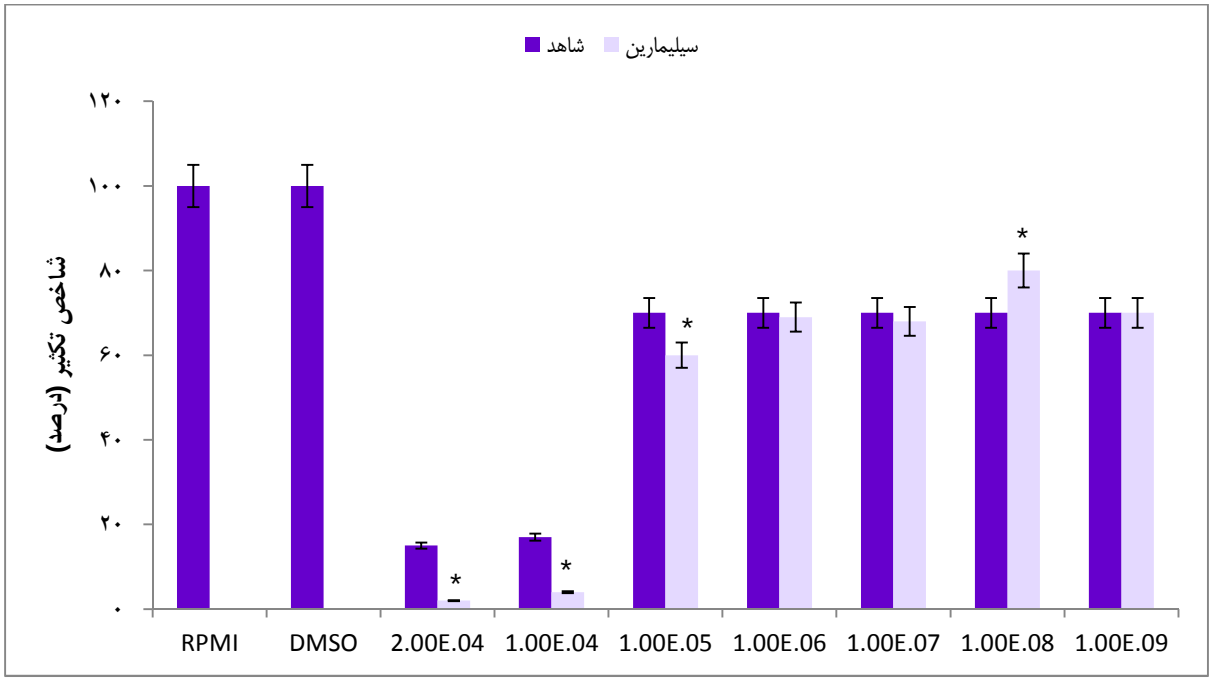
از این روش جهت تعیین میزان دوز دارویی (دوز مؤثر) که می‌تواند در مدت ۵ روز باعث آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ سلولی ۵۰ درصد سلول‌های PBMC شود، برای هر یک از داروها به صورت مجزا استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism، درصد سلول‌های زنده بر اساس دوز محاسبه گردید و میزان IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) برای داروی سیلیمارین به عنوان دوز مؤثر محاسبه گردید.

تمامی آزمون‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار آمده است. تفاوت‌های آماری با آزمون ANOVA (Analysis of variance) مورد بررسی قرار گرفتند. $P < ۰/۰۰۱$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر سیلیمارین بر تکثیر سلول‌های T

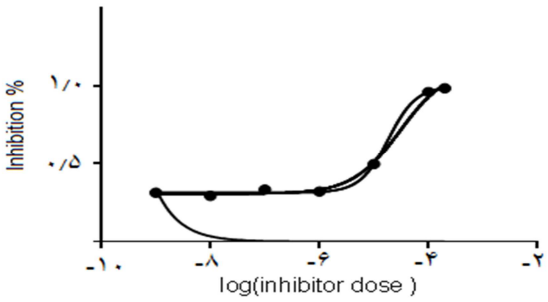
به منظور روشن شدن اثر مهاری سیلیمارین بر روی سلول‌های T، این سلول‌ها با ماده‌ی فلورسنت CFSE نشان‌دار شدند و تکثیر آن‌ها در مجاورت با غلظت‌های مختلف سیلیمارین در مقایسه با DMSO به عنوان شاهد منفی پس از انکوباسیون ۵ روزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سیلیمارین در غلظت‌های ۱۰۰ µM و ۲۰۰ µM به طور قابل توجهی باعث مهار سلول‌های T می‌شود. این مهار در مقایسه با میزان مهار همین سلول‌ها در مجاورت با DMSO از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر تکثیر سلول‌های T پس از ۵ روز انکوباسیون. نتایج نشان داد که سیلیمارین در غلظت‌های ۱۰۰ µM و ۲۰۰ µM به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر سلول‌های T را مهار می‌کند که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). غلظت نهایی DMSO (Dimethyl sulfoxide) (شاهد) در چاهک‌های شاهد معادل غلظت آن در چاهک‌های مورد مطالعه بود ($n = ۳$)

محاسبه‌ی IC_{50}

نتایج این روش پس از بررسی نمودار درصد سلول‌های زنده بر حسب دوز دارویی (نمودار IC_{50}) نشان داد که دوز مؤثر داروی سیلیمارین در مدت ۵ روز بر روی سلول‌های T، ۳×۱۰^{-۵} µM/ml محاسبه شد (شکل ۲).



شکل ۲. نمودار IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) جهت محاسبه‌ی دوز مؤثر داروی سیلیمارین بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism (نسخه‌ی ۶) که مقدار آن ۳×۱۰^{-۵} µM/ml به دست آمد

بحث

هدف این مطالعه استفاده از سلول‌های T خون محیطی داوطلبین سالم و فعال‌سازی آن‌ها از طریق تحریک با کانکاناوالین A بود. به علاوه، اثر سیلیمارین بر تکثیر سلول‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط In vitro مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت.

پیوند عضو، یکی از پیچیده‌ترین و چالش برانگیزترین مباحث در علم پزشکی است. رد پیوند با به کارگیری از داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی از جمله راپامایسین می‌تواند کاهش پیدا کند. اگر چه ممکن است گاهی با عوارض جانبی نیز همراه باشد (۱۵). بر همین اساس، امروزه محققان درصدد هستند تا با استفاده از داروهای مکمل و جایگزین که دارای اثرات جانبی کمتر و اثربخشی بیشتری هستند، این مشکل را مرتفع سازند.

محصولات گیاهی- دارویی متعددی تاکنون به عنوان عوامل ضد التهابی و تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی شناخته شده‌اند که در این میان، سیلیمارین به علت داشتن اثرات محافظت کنندگی کبدی (Hepatoprotective) در درمان بیماری‌های مختلف کبدی در پاسخ‌های التهابی نظیر مسمومیت الکلی یا دارویی، مسمومیت قارچی و هپاتیت ویروسی به شکل گسترده‌ای در درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند. هر چند که در این رابطه، خواص ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و تعدیل ایمنی سیلیمارین را نمی‌توان از نظر دور داشت (۱۶).

به منظور تعیین اثر سیلیمارین بر روی تکثیر لنفوسیت‌های T، پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T جدا شده از خون محیطی را پس از تحریک با کانکاناوالین A و پس از نشان‌دار کردن با CFSE مورد ارزیابی قرار داده شد. آنالیز نتایج نشان داد که سیلیمارین در بالاترین غلظت‌هایش (۱۰۰ µM و ۲۰۰ µM) پس از انکوباسیون ۵ روزه به میزان زیاد و قابل توجهی اثرات مهار کنندگی بر تکثیر سلول‌های T در مقایسه با شاهد از خود نشان داد که این یافته از نظر آماری نیز معنی‌دار بود.

همچنین محاسبه‌ی IC_{50} نشان داد که سیلیمارین در دوز ۳×۱۰^{-۵} µM/ml می‌تواند باعث مهار ۵۰ درصدی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی شود. نتایج حاصل از این تحقیق با برخی از مطالعات مشابه انجام شده همخوانی دارد؛ به طوری که در آن‌ها ضمن بررسی اثر سیلیمارین بر روی عملکرد و

تکثیر لنفوسیت‌های بر این نکته تأکید می‌کند که سیلیمارین و ترکیباتش دارای اثرات ضد التهابی و سرکوب کننده‌ی ایمنی هستند (۱۷، ۶، ۲). در مدل موشی مبتلا به هپاتیت (که در آن سلول‌های T با کانکاناوالین A تحریک شده بودند) اثر مهار کنندگی سیلیمارین بر آسیب کبدی ناشی از سلول T، مهار بیان TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha)، IFN-γ، IL-۲ و IL-۴ و مهار نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS یا Inducible nitric oxide synthase) به اثبات رسیده است (۱۸).

در مطالعه‌ی مشابه دیگری گزارش شده است که Silybin (جزء بیولوژیکی فعال و مهم سیلیمارین) در شرایط In vitro باعث مهار بلاستوژنز لنفوسیت‌های T القا شده با Anti-CD۳ و یا القا شده با میتوژن‌هایی از قبیل فیتوهماگلوتینین، کانکاناوالین A و Powekeed می‌شود (۱۹). در مطالعه‌ی دیگری که بر روی موش‌های BALB/c صورت گرفت، نشان داده شد که سیلیمارین موجب مهار بیان IL-۲ و IL-۴ می‌شود (۲۰). اگر چه تمامی مطالعات و شواهد حاکی از این است که سیلیمارین دارای اثرات ضد التهابی است، اما مکانیسم ایجاد این اثر سیلیمارین به خوبی مشخص نگردیده است. روی هم رفته، با توجه به مطالعات دیگران و تحقیق حاضر، اثرات تعدیل کنندگی ایمنی و سرکوب کنندگی سیلیمارین به غلظت آن و روش درمانی به کار رفته بستگی دارد (۱۲-۱۴).

در مجموع، نتایج بیان شده در این مطالعه نشان می‌دهد که سیلیمارین موجب مهار فعال شدن و تکثیر سلول‌های T می‌شود و در نتیجه، می‌تواند به عنوان یک عامل مهار کننده‌ی سیستم ایمنی در بیماری‌های پیوند اعضا مورد توجه قرار بگیرد. جا دارد که سیلیمارین گیاهی به عنوان یک کاندیدای جذاب برای توسعه‌ی داروهای تعدیل کننده‌ی ایمنی در مطالعات آینده مورد پژوهش و تحقیق بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد احسان الماسی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۵۷۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از تمامی افرادی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود. همچنین از شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت پشتیبانی مالی از مطالعه‌ی حاضر قدردانی گردد.

References

1. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. J Immunol 1999; 163(12): 6800-9.
2. Gharagozloo M, Amirghofran Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. J Cancer Res Clin Oncol 2007; 133(8): 525-32.
3. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. Curr Med Chem 2007; 14(3): 315-38.
4. Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. Chem Biol Interact 2006; 161(2): 104-14.
5. Ramakrishnan G, Elinos-Baez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S, Anandakumar P, et al. Silymarin downregulates COX-2 expression and attenuates hyperlipidemia during NDEA-

induced rat hepatocellular carcinoma. Mol Cell Biochem 2008; 313(1-2): 53-61.
6. Gharagozloo M, Velardi E, Bruscoli S, Agostini M, Di SM, Donato V, et al. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: effects on NF-kappaB activity and IL-2 production. Pharmacol Res 2010; 61(5): 405-9.
7. Sobolova L, Skottova N, Vecera R, Urbanek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. Pharmacol Res 2006; 53(2): 104-12.
8. Flaig TW, Su LJ, Harrison G, Agarwal R, Glode LM. Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells. Int J Cancer 2007; 120(9): 2028-33.
9. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2003; 136(3): 205-12.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia, PA: Saunders; 201i. p. 365.
11. Wilasrusmee C, Kittur S, Shah G, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, et al. Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. Med Sci Monit 2002; 8(11): BR439-BR443.
12. Cruz T, Galvez J, Crespo E, Ocete MA, Zarzuelo A. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Planta Med 2001; 67(1): 94-6.
13. Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Liu Y, Lee DY. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. Gastroenterology 2007; 132(5): 1925-36.
14. Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. Cancer Lett 2008; 269(2): 352-62.
15. Frohn C, Fricke L, Puchta JC, Kirchner H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. Nephrol Dial Transplant 2001; 16(2): 355-60.
16. Hussain SA, Jassim NA, Numan IT, Al-Khalifa II, Abdullah TA. Anti-inflammatory activity of silymarin in patients with knee osteoarthritis. A comparative study with piroxicam and meloxicam. Saudi Med J 2009; 30(1): 98-103.
17. Gharagozloo M, Jafari S, Esmaeil N, Javid EN, Bagherpour B, Rezaei A. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: the impact on T cell proliferation and cytokine production. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013; 113(3): 209-14.
18. Schumann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R, Tiegs G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. J Hepatol 2003; 39(3): 333-40.
19. Meroni PL, Barcellini W, Borghi MO, Vismara A, Ferraro G, Ciani D, et al. Silybin inhibition of human T-lymphocyte activation. Int J Tissue React 1988; 10(3): 177-81.
20. Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. Planta Med 2003; 69(1): 44-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 07.08.2014
Vol. 32, No. 307, 4th Week, December 2014
Accepted: 18.11.2014

The Effect of Silymarin on the Proliferating of the Activated Human T Cells in Vitro

Ehsan Almasi[1], Nahid Eskandari PhD[2], Marjan Gharagozloo PhD[2], Afshin Almasi MSc[3], Vajiheh Ostadi MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: The widespread use of herbal medicines, because of their protective effects on various organs, has been shown in many studies. Silymarin is a flavonolignan complex isolated from the milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn), has been clinically used for its anti-inflammatory and hepatoprotective effects. Recently, immunomodulating effects of this plant have considered by the researchers. This study aimed to investigate the effect of silymarin and dimethyl sulfoxide (DMSO) on the human T lymphocyte proliferation under the cell culture conditions.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the healthy individuals were activated with Con A (10 µg/ml) and treated with silymarin at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 200 µM). Then, cells were incubated for five days at 37° C with 5% CO_2 for proliferation assay using the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dye and for viability analysis using flow cytometry. We analyzed the data using the Graph pad prism (version 6) software.

Findings: Silymarin had the ability to inhibit the T cell proliferation in vitro. Moreover, 100 µM and 200 µM of silymarin had more inhibitory effect on T cells ($P < 0.001$).

Conclusion: We conclude that silymarin exerts immunosuppression effects, and it could be used in therapeutic situations with fewer side effects compared with the other immunosuppressive drugs.

Keywords: Silymarin, Carboxyfluorescein succinimidyl ester, T cells, Peripheral blood mononuclear cell, Dimethyl sulfoxide

Citation: Almasi E, Eskandari N, Gharagozloo M,Almasi A, Ostadi V. **The Effect of Silymarin on the Proliferating of the Activated Human T Cells in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(307): 1816-23

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor. Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Clinical Research Development Unit, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
4- PhD Student, Flow Cytometry Lab AND Department of Immunology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nahid Eskandari PhD, Email: neskandari@med.mui.ac.ir