مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۹/هفته اول اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۴

بررسی خاصیت تنظیم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از مغز استخوان انسان بر تکثیر لنفوسیت T

معصومه معصومی کریمی[۱]، دکتر مینو ادیب[۲]، دکتر بتول هاشمی بنی[۳]، راضیه علی پور[۱]، اکبر حسن‌زاده[۴]

چکیده

مقدمه: سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSC یا Bone marrow-mesenchymal stem cell) به عنوان سلول با خاصیت سرکوب ایمنی شناخته شده است. بعضی از مطالعات این سلول را به عنوان مهار کننده‌ی تکثیر و ترشح سایتوکاین از لنفوسیت T می‌دانند. بسیاری از مطالعات، عوامل ترشحی مانند IL-10، TGF- β1 (Transforming growth factor -β1)، نیتریک اکساید، ایندول آمین ۳-۲ دی اکسیژناز (IDO)، پروستاگلاندین E2 و بعضی از محققان دیگر، تماس سلولی را برای خاصیت سرکوب ایمنی لازم می‌دانند. با این حال مکانیسم دقیق این خاصیت مهاری مشخص نشده است. هدف از مطالعه، بررسی مکانیسم تنظیم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با واسطه‌ی تماس سلولی و همچنین اثر دوز این سلول، در خاصیت مهار تکثیر لنفوسیت T بود.

روش‌ها: در این مطالعه لنفوسیت‌های T تحریک شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMC) و فیتوهماگلوتینین (Phytohemagglutinin یا PHA)، در حضور و عدم حضور BM-MSCs در دوزهای افزایش یافته، یک بار در پلیت کشت‌های معمولی و بار دیگر در پلیت کشت Transwell کشت داده شدند. این پلیت دارای دو محفظه‌ی مجزا بود که توسط غشای نیمه تراوا از یکدیگر جدا شدند. لنفوسیت‌های T و سلول‌های بنیادی در این دو محفظه، جدا از هم قرار گرفتند. عوامل ترشحی از محفظه‌ای به محفظه‌ی دیگر وارد شدند. در نهایت تکثیر لنفوسیت T به وسیله‌ی روش ELISA با استفاده از برمو دی‌اکسی یوریدین (BrdU) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه تفاوت آماری معنی‌داری بین شاخص تکثیر در کشت‌های حاوی لنفوسیت T تحریک نشده در حضور BM-MSC در مقایسه با کشت‌هایی که در عدم حضور این سلول بودند، وجود نداشت؛ اما کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر سلول‌های T تحریک شده در حضور BM-MSC با کشت‌هایی که در عدم حضور BM-MSC بودند، دیده شد. این شاخص تکثیر رابطه‌ی عکس با میزان BM-MSC موجود در محیط کشت داشت. همچنین کاهش تکثیر معنی‌داری در کشت‌هایی Transwell در مقایسه با کشت‌های حاوی لنفوسیت تحریک شده بدون BM-MSC مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که BM-MSC خاصیت تحریک لنفوسیت T را ندارد و تکثیر لنفوسیت‌های T تحریک شده با PHA یا PBMC را به صورت وابسته به دوز مهار می‌کند. همچنین خاصیت مهار تکثیر لنفوسیت‌های T توسط BM-MSC وابسته به تماس نمی‌باشد. اما تماس سلولی باعث به حداکثر رساندن نقش مهاری این سلول می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، تنظیم ایمنی، لنفوسیت T، تماس سلولی

مقدمه

اولین بار Cohnheim در سال ۱۸۶۷ وجود سلول‌های شبیه فیبروبلاست را در محل ترمیم زخم مشاهده نمود و وجود سلول‌های بنیادی غیر خون‌ساز در مغز استخوان را گزارش کرد (۱). از آن زمان تاکنون سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های دیگر شامل بافت چربی، بند ناف، کبد جنینی، خون، جفت، مایع آمنیوتیک، پالپ دندان نیز جدا شد (۴-۲).

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] مربی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مینو ادیب
Email: adib@med.mui.ac.ir

سلول‌های بنیادی غیر خون‌ساز که از مغز استخوان جدا شده‌اند، تحت عناوین سلول‌های استرومایی مغز استخوان یا سلول‌های بنیادی اسکلتی و یا سلول‌های بنیادی مزانشیمی نامیده می‌شوند (۵).

این سلول‌ها، سلول‌های غیر خون‌ساز چند توان هستند که می‌توانند به مغز استخوان، استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت، تنوسیت، سلول‌های ماهیچه‌ی اسکلتی، سلول‌های مزودرم احشایی (۷-۶) و همچنین سلول‌های اندوتلیال و استروسیت (۴) تمایز یابند.

تعیین سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC یا Mesenchymal stem cell) کشت داده شده در محیط کشت به وسیله‌ی ترکیبی از خصوصیات مورفولوژیکی، فنوتیپی و تکثیری صورت می‌گیرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مارکرهای سطحی سلول‌های خون‌ساز شامل CD14، CD34، CD45 را ندارند (۸). ولی مولکول‌های خاصی مثل SH2(CD105)، SH3، SH4(CD73)، VCAM-1(CD106)، ICAM-1(CD54)، CD44، CD13، CD22، CD90، CD166 و STRo-1 را بیان می‌کنند. همچنین از لحاظ داشتن CD40، CD80 و CD86 منفی هستند و سطح پایینی از HLA-I و LFA-3 را بیان می‌کنند، ولی HLA-II را بیان نمی‌کنند و به وسیله‌ی این خاصیت از سیستم ایمنی فرار می‌کنند (۹-۸، ۶، ۲).

با این که بعضی مطالعات خاصیت تنظیم ایمنی MSC را رد می‌کنند، اما در اکثر مطالعات نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی خاصیت تنظیم کنندگی ایمنی (Immunoregulatory) را دارند (۹-۸، ۷، ۳) و ممکن است نقش‌های ویژه‌ای در حفظ تولرانس محیطی، تحمل عضو پیوند شده، درمان بیماری‌های خود ایمنی، فرار تومورها و همچنین تحمل جنین به وسیله‌ی مادر را داشته باشند (۱۱-۱۰، ۶).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ لنفوسیت T تحریک شده، هم با HLA آلوژن، هم با فعال کننده‌های پلی‌کلونال را در in vivo و in vitro سرکوب می‌کند و مارکرهای فعال سازی لنفوسیت T (CD25، CD69، CD39) را کاهش می‌دهد (۳).

همچنین MSC باعث کاهش بلوغ سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (Antigen-presnting cells یا APC) و کاهش بیان HLA-DR در سطح آن‌ها می‌شود (۳) و وقتی که با سلول‌های دندرتیک (Dendritic cell یا DC) نوع I کشت داده می‌شود، ترشح TNFα (فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور) و IL-12 (اینترلوکین-۱۲) را از آن‌ها کاهش می‌دهد (۳).

کارآزمایی‌های بالینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انسان‌ها، نتایج امید بخشی را در چند زمینه‌ی کلینیکی شامل آسیب میوکارد بعد از انفارکتوس قلبی، ترمیم شکستگی‌های استخوان‌های مقاوم به ترمیم و درمان بیماری GVHD (Graft versus host disease) مقاوم به کورتیکواستروییدها نشان داده است (۱۲).

همچنین در مدل‌های موشی، استفاده از MSC به صورت داخل رگی به واسطه‌ی اثر پاراکرین و شیفت سایتوکاین‌های پیش التهابی به ضد التهابی در محل جراحت باعث بهبودی عواقب ناشی از جراحت‌های عصبی، ششی، کلیه می‌شود (۳).

عوامل مهاری، چه آن‌هایی که از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترشح می‌شوند و چه آن‌هایی که در پاسخ به این سلول‌ها از سلول‌های سیستم ایمنی ترشح می‌شوند، نقش مهمی در پدیده‌ی مهار ایمنی دارند. مهم‌ترین این عوامل عبارت از IFNγ (اینترفرون γ)، IL10، TGF-β1، پروستاگلاندین E2 (PGE2)، فاکتور

www.mui.ac.ir

رشد سلول‌های کبدی (Hepatic growth factor یا HGF) و آنزیم IDO می‌باشند (۱۵-۱۳، ۹، ۴).

برخی مطالعات تماس مستقیم سلولی را برای سرکوب ایمنی لازم می‌دانند (۴). اما بر اساس بسیاری از مطالعات جدا کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به وسیله‌ی یک غشای نیمه تراوا نیز مانع از اثر مهاری سلول‌ها نمی‌شوند. البته این سلول‌ها بیشترین اثر مهاری را هنگامی نشان می‌دهند که در تماس با سلول‌های ایمنی باشند (۱۷-۱۶، ۲).

مکانیسم دقیق مهار پاسخ ایمنی توسط MSC ناشناخته مانده است (۶). از آن جایی که لنفوسیت T از مهم‌ترین سلول‌های ایمنی محسوب می‌شود، در این مطالعه بر آن شدیم تا مکانیسم‌هایی چون نقش تماس سلولی و اثر دوز این سلول را بر تکثیر سلول‌های T مورد بررسی قرار دهیم.

روش‌ها

آماده سازی محیط کشت:

به محیط‌های کشت DMEM، RPMI که به ترتیب جهت تهیه‌ی سوسپانسیون سلولیMSC و لنفوسیت‌ها استفاده می‌شود، L-گلوتامین (۱ درصد)، استرپتومایسین و پنی‌سیلین (۱ درصد) و FCS (۱۰ درصد) افزوده شد.

آماده سازی سلول:

الف- جداسازی لنفوسیت‌های T از خون تازه: ۵۰ سی‌سی خون هپارینه و تازه از یک فرد داوطلب سالم و با استفاده از کیت RosetteSep enrichment cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) و سانتریفیوژ، مطابق دستورالعمل سازنده، به روش انتخاب منفی (Negative selection)، از سایر گلبول‌های سفید جدا شدند (۱۹-۱۸). این لنفوسیت‌ها در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ سوسپانسیون شدند (۲۰) و غلظت لنفوسیت‌ها در سوسپانسیون سلولی به تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر رسانده شد. این لنفوسیت‌ها تا هنگام استفاده (در همان روز) در حرارت اتاق نگهداری شدند.

ب- آماده سازی سلول های محرک (Stimulator) برای کشت‌های MLC: ۱۰ سی‌سی خون هپارینه و تازه از یک فرد داوطلب دیگر (آلوژن با فردی که خون از وی برای جداسازی لنفوسیت‌های T تهیه شد) گرفته شد. گلبول‌های سفید تک هسته‌ای PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) بر روی فایکول با کمک سانتریفیوژ جداسازی گردید. این سلول‌های جدا شده در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ سوسپانسیون شدند. برای غیر فعال کردن، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه همراه با ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میتومایسین C انکوبه و بعد از انکوباسیون و شستشو، به تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر در سوسپانسیون تنظیم شدند و تا هنگام استفاده، این سلول‌ها در حرارت اتاق نگهداری شدند.

ج- سلول‌های بنیادی: سلول‌های BM-MSC در پاساژ ۳ از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی مؤسسه‌ی رویان اصفهان خریداری و در فلاسک‌های کشت سلول، کشت داده شدند تا به تعداد لازم تکثیر یابند. سلول‌های بنیادی (پاساژ ۵) از این کشت‌ها برداشته شدند و در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ در غلظت حدود ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون شدند.

سلول‌های بنیادی قبل از استفاده با ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر میتومایسین C غیر فعال شدند.

انجام کشت‌های لازم:

الف- کشت‌های Mixed lymphocyte culture (MLC):

www.mui.ac.ir

به چهار چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی (Flat-bottom)، به ترتیب مقادیر ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های BM-MSC افزوده شدند. این کار در ۴ دسته‌ی چهارتایی تکرار شد. بعد از ۲۰-۱۸ ساعت (انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد) که سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند، به یک سری چاهک چهارتایی، سلولی اضافه نشد (BM-MSC تنها) و به سری‌های دیگر تعداد 10^5 لنفوسیت T (۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه)، همراه با همین تعداد سلول تحریک کننده (۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون PBMCs) افزوده گردید. حجم نهایی هر کشت، با افزودن مقدار محیط کشت لازم به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. یک سری از چاهک‌ها نیز به شاهد منفی (سلول T تحریک نشده بدون BM-MSC) و شاهد مثبت (MLC بدون BM-MSC) اختصاص داده شدند.

البته کشت‌ها علاوه بر میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی، در میکرو پلیت‌های ۲۴ چاهکی دو محفظه‌ای (ThinCert™ Cell Culture) نیز کشت داده شدند؛ به این صورت که لنفوسیت‌ها و سلول‌های Stimulator در محفظه‌ی بالایی (به عبارت بهتر کشت MLC در محفظه‌ی بالایی چاهک انجام شد) و سلول‌های بنیادی در محفظه‌ی پایینی کشت داده شدند (۲۱). همه‌ی کشت‌ها ۳ بار به صورت ۲ تایی تکرار شدند.

ب- کشت‌های MLC تغییریافته: در این سری کشت Mixed lymphocyte reaction (MLR)، از سلول‌های BM-MSC غیر فعال شده با میتومایسین C (در ۴ دوز ذکر شده) به جای سلول‌های تحریک کننده استفاده شد (با این هدف که آیا خود سلول‌های بنیادی می‌توانند باعث فعال شدن لنفوسیت‌های T شوند یا خیر).

ج- کشت‌های Lymphocyte transformation test (LTT): تعداد 10^5 سلول در میلی‌لیتر لنفوسیت T (۵۰ میکرولیتر از کشت اولیه)، به اضافه‌ی فیتوهماگلوتینین در حضور یا عدم حضور سلول‌های BM-MSC به طور جداگانه کشت شدند [حجم نهایی PHA (Phytohemagglutinin) در چاهک‌ها به ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر رسانده شد]. جزییات کشت‌ها مطابق آن چه برای کشت‌های MLC توضیح داده شد، انجام گردید. یادآوری می‌شود که تمام کشت‌های مرحله‌ی الف (اعم از کشت‌ها در پلیت‌های معمولی و پلیت‌های ویژه‌ی Transwell) در این مرحله نیز صورت پذیرفت.

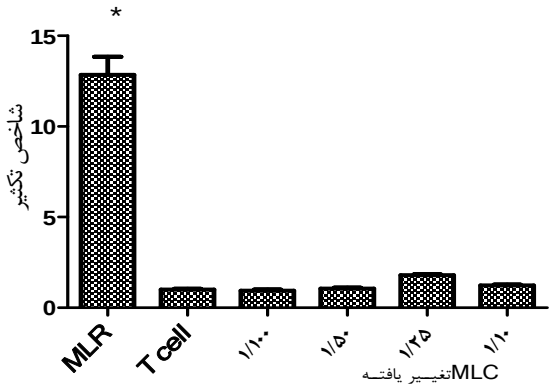
تمام کشت‌های مراحل الف و ب و ج در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد، به مدت ۴ روز برای MLC و ۳ روز برای LTT انکوبه شدند. بعد از این مدت سوپرناتانت کشت‌ها بعد از سانتریفیوژ جمع‌آوری شد. بعد از خشک کردن پلیت، تکثیر لنفوسیت‌ها به وسیله‌ی روش Colorimetric Cell Proliferation ELISA BrdU طبق دستورالعمل سازنده سنجیده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده وارد نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) شد و با استفاده از آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

با توجه به شکل ۱، مقایسه‌ی شاخص تکثیر (تکثیر T تحریک شده با PHA و یا PBMC در حضور یا عدم حضور BM-MSC/)، MLC تغییر یافته (دوزهای افزایش یافته‌ی T cell + BM- MSC) با کشت‌های حاوی سلول‌های T تحریک نشده‌ی تنها (به عنوان شاهد منفی) از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما مقایسه‌ی شاخص

www.mui.ac.ir



شکل ۱: مقایسه‌ی MLC تغییر یافته در دوزهای افزایش یافته‌ی MSC با کشت‌های حاوی سلول‌های T تنها

جدول ۱. شاخص تکثیر در دو نوع کشت LTT و MLR در حضور دوزهای افزایش یابنده‌ی BM-MSC و عدم حضور آن

نسبت T cell/MSC	شاخص تکثیر انحراف معیار ± میانگین		
	LTT (Lymphocyte transformation test)	MLC	جمع
۱/۱۰۰	۱۱/۵۹ ± ۱/۴۱	۹/۰۲ ± ۱/۰۴	۹/۵۱ ± ۳/۳
۱/۵۰	۹/۹۹ ± ۱/۳۷	۸/۱۱ ± ۱/۳۴	۸/۳۷ ± ۲/۹
۱/۲۵	۸/۶۷ ± ۱/۴۰	۷/۱۷ ± ۱/۴۴	۷/۳۰ ± ۲/۶
۱/۱۰	۷/۱۸ ± ۱/۴۲	۵/۹۲ ± ۱/۵۲	۶/۰۵ ± ۲/۳
عدم حضور BM-MSC	۱۳/۹۸ ± ۰/۴۰	۱۲/۵۸ ± ۰/۱۴	۱۴/۲۸ ± ۱/۲
مقدار P	< ۰/۰۱	< ۰/۰۱	< ۰/۰۱

LTT: Lymphocyte transformation test MLC: Mixed lymphocyte reaction

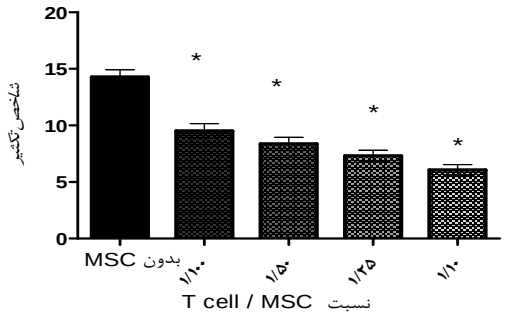
تکثیر سلول‌های T تحریک شده با PBMC (به عنوان شاهد مثبت) با T تنها افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۱ شاخص تکثیر سلول‌های T تحریک شده با PHA و یا PBMC را در حضور BM-MSC نشان می‌دهد.

به طور کلی، کاهش معنی‌داری بین شاخص تکثیر کشت‌ها در حضور BM-MSC در مقایسه با عدم حضور این سلول دیده شد (شکل ۲).

با افزایش دوز BM-MSC، کاهش بیشتر در تعداد لنفوسیت T مشاهده شد. این نتایج برای LTT و MLC به صورت جداگانه تکرار شد ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).

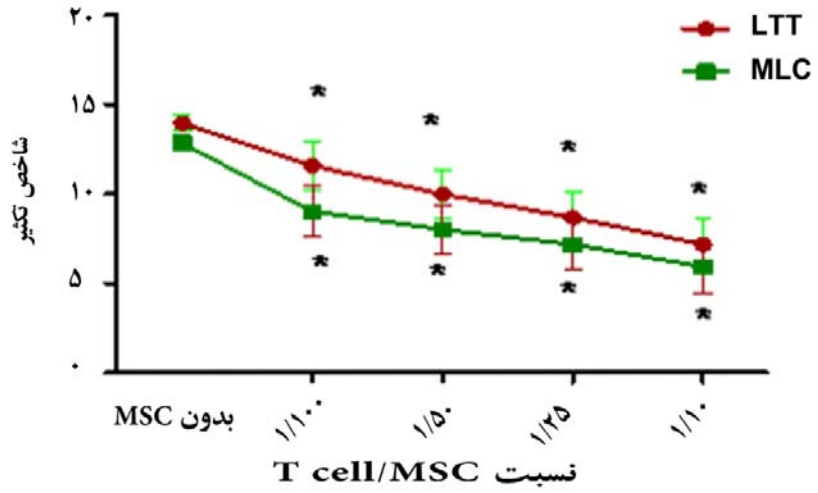
با توجه به شکل ۴ الف و ب شاخص تکثیر در تماس مستقیم کاهش معنی‌داری نسبت به کشت بدون حضور BM-MSC داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین کاهش شاخص تکثیر در تماس غیر مستقیم در مقایسه با کشت‌های بدون BM-MSC هم دیده شد ($P < ۰/۰۵$).



*: $P < ۰/۰۵$

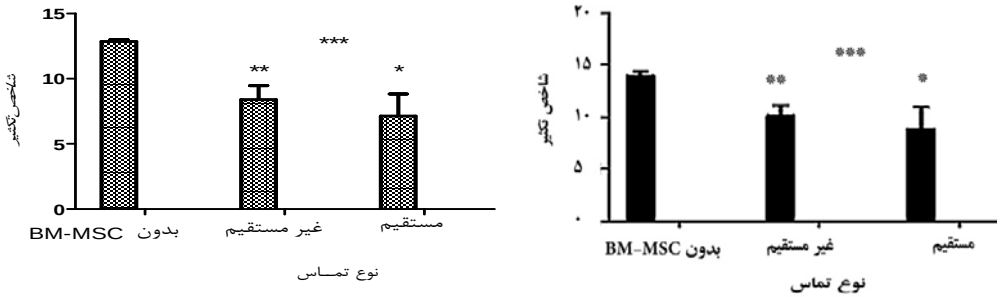
شکل ۲. افزایش دوز BM-MSC باعث کاهش هر چه بیشتر شاخص تکثیر سلول‌های T تحریک شده می‌شود.

www.mui.ac.ir



*: $P < ۰/۰۵$

شکل ۳. BM-MSC تکثیر لنفوسیت T تحریک شده با PHA و یا PBMC را به صورت وابسته به دوز مهار می‌کند.



الف- LTT ب- MLC

شکل ۴. مقایسه‌ی شاخص تکثیر سلولی بین کشت‌های حاوی سلول T تحریک شده الف- با PHA یا ب- با PBMC در حضور BM-MSC در تماس مستقیم و یا غیر مستقیم

*: مقایسه‌ی تماس مستقیم با کشت بدون BM-MSC

**: مقایسه‌ی تماس غیر مستقیم با کشت بدون BM-MSC

***: مقایسه‌ی تماس غیر مستقیم با تماس مستقیم

البته افزایش معنی‌دار در شاخص تکثیر تماس غیر مستقیم در مقایسه با تماس مستقیم وجود داشت ($P < ۰/۰۵$)، این نتایج در کشت‌های LTT یا MLC یکسان بود.

بحث

اگر چه بسیاری از یافته‌ها نقش سرکوب ایمنی سلول بنیادی را چه در in vitro و چه در کارآزمایی‌های بالینی تأیید می‌کنند، اما به منظور استفاده‌ی بیشتر این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها نیاز به شناخت بیشتر مکانیسم‌های مسؤول است. ما در این مطالعه، نقش سرکوب‌گری ایمنی BM-MSC را روی تکثیر سلول‌های T تحریک شده با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و میتوژن [فیتوهماگلوتینین (PHA)] بررسی کردیم و مکانیسم‌هایی چون وابسته به دوز بودن، لزوم تماس سلولی بین سلول‌های T و

BM-MSC را مورد آزمایش قرار دادیم.

نتایج این مطالعه نشان داد که BM-MSC حتی در تعداد افزایش یابنده نمی‌تواند باعث تحریک سلول‌های T شود. نتایج ما با یافته‌های Tse و همکاران (۲۲) مطابقت داشت. این محققان دریافتند که سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان انسان، حتی بعد از این که IFNγ اضافه شده به محیط باعث افزایش بیان MHCΠ و ICAM-I بر سطح سلول‌های بنیادی می‌شود، قادر به تحریک پاسخ تکثیری سلول‌های T نیستند. همچنین Mahmud و همکاران (۲۳) و دیگر محققان (۲۶-۲۴) عدم تحریک و تکثیر لنفوسیت‌های T آلوژن، توسط MSC به دست آمده از انسان و دیگر پستانداران شامل سگ، بز و شامپانزه را گزارش کردند.

نتیجه‌ی دیگر این مطالعه وابسته به دوز بودن اثر مهاری تکثیر بر لنفوسیت T بود. ما در این مطالعه از ۴ نسبت ۱/۱۰، ۱/۲۵، ۱/۵۰ و ۱/۱۰۰ BM-MSC به cell T استفاده کردیم. طبق نتایج، علاوه بر این که در هر ۴ دوز (حتی در دوز کم ۱/۱۰۰) اثر مهاری (در مقایسه با عدم حضور BM-MSC) معنی‌دار بود، هر چه میزان MSC بیشتر می‌شد، اثر مهار تکثیر روی سلول‌های T بیشتر و تعداد سلول‌های T کمتر می‌شد.

اما در بعضی مطالعات خاصیت مهاری فقط در دوزهای بالا گزارش شده است. به طور مثال طبق گزارش Liu و همکاران، نسبت ۱ تا ۵ لنفوسیت‌های خون محیطی به BM-MSCs خوکچه‌ی هندی، اثر مهاری وابسته به دوز بود، اما در دوز ۱/۰۰۰۱ تا ۱/۱۰۰ هیچ اثر مهاری دیده نشد (۲۷). ممکن است BM-MSCs اثر تحریکی هم داشته باشند. البته تفاوت در نوع گونه‌هایی که سلول‌های MSC از آن جدا شده‌اند، تفاوت در نتایج را توجیه می‌کند. Yanez و همکاران نیز اثر مهار ایمنی سلول مزانشیمی برگرفته از چربی (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity یا ADSC) را بررسی کردند و نشان دادند که اثر سرکوب‌گری تکثیر این سلول در دوز ۱/۱۰۰ دیده نشد و با توجه به این نتیجه پیشنهاد شد که شاید BM-MSC، خاصیت مهاری بیشتری نسبت به ADSC دارد (۲۸).

در مقایسه‌ی کشت‌های معمولی با کشت‌های Transwell، کاهش معنی‌داری در خاصیت سرکوب‌گری BM-MSC در نتایج ما دیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تماس سلولی باعث افزایش خاصیت مهاری BM-MSC می‌شود.

Li و همکاران مطابق با نتایج به دست آمده با مطالعه‌ی ما نشان دادند که کشت‌های Transwell مانند کشت‌های معمولی می‌تواند تکثیر لنفوسیت را مهار کند، اما میزان مهار کمتر می‌باشد (۲).

Krampera و همکاران دریافتند که خاصیت مهاری BM-MSC وابسته به تماس است و پیشنهاد کردند که MSC مانع از میان کنش APC با سلول‌های T می‌شود (۸).

طبق گزارش‌های Augello و همکاران، تماس سلولی (به کمک میان کنش مولکول‌هایی چون PD-1 با PD-L1 و PD-L2) برای مهار فعال شدن سلول‌های T و B نیاز است (۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های حاضر، سلول‌های BM-MSC خاصیت ایمنی‌زایی (Immunogenicity) ندارند. همچنین نقش مهاری بر تکثیر لنفوسیت‌های T توسط BM-MSC تأیید می‌شود. با توجه به این که در دوزهای کم هم این خاصیت حفظ می‌شود،

www.mui.ac.ir

تماس سلولی بین لنفوسیت T و MSC، برای به حداکثر رساندن این خاصیت سرکوب‌گری لازم شمرده می‌شود.

یافته‌های به دست آمده در مورد BM-MSC و مکانیسم‌های سرکوب ایمنی این سلول باعث تقویت اهمیت استفاده از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های مختلف التهابی و همچنین جلوگیری از رد عضو پیوند شده می‌شود. هر چند لازم است تا با مطالعات بیشتر در in vivo این اثرات مورد تأیید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بود که در قالب پایان‌نامه در آزمایشگاه گروه آناتومی و بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. بدین‌وسیله از همکاران محترم آزمایشگاه مربوط قدردانی می‌شود.

References

1. Cohnheim J. Uber entzundung und eiterung. J Arch Path Anta Physiol Klin Med. 1867; 40: 1-79.
2. Li C, Zhang W, Jiang X, Mao N. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. Cell Tissue Res 2007; 330(3): 437-46.
3. Le BK, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. J Intern Med 2007; 262(5): 509-25.
4. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. Tissue Eng Part A 2009; 15(10): 2795-806.
5. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95(5): 209-14.
6. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(2): 386-98.
7. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. Cell Immunol 2008; 251(2): 131-6.
8. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 2003; 101(9): 3722-9.
9. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica 2005; 90(4): 516-25.
10. Dugast AS, Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. Clin Exp Immunol 2009; 156(1): 25-34.
11. Nasef A, Mazurier CH, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, et al. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. Cellular Immunology 2008; 253(1-2): 16-22.
12. Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. Br J Haematol 2009; 144(4): 571-9.
13. Kong QF, Sun B, Bai SS, Zhai DX, Wang GY, Liu YM, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. J Neuroimmunol 2009; 207(1-2): 83-91.
14. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell 2008; 2(2): 141-50.
15. Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. Transpl Int 2009; 22(4): 365-76.
16. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007; 25(11): 2739-49.
17. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem

www.mui.ac.ir

cells and clinical implications. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2008; 56(1): 1-8.
18. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. J Immunol 2007; 179(3): 1595-604.
19. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood 2005; 105(5): 2214-9.
20. Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. Stem Cells 2006; 24(11): 2466-77.
21. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol 2005; 129(1): 118-29.
22. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation 2003; 75(3): 389-97.
23. Mahmud N, Pang W, Cobbs C, Alur P, Borneman J, Dodds R, et al. Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model. Exp Hematol 2004; 32(5): 494-501.
24. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. J Bone Joint Surg Am 2003; 85-A(10): 1927-35.
25. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127(5): 1293-300.
26. De Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, van den Bos C, Kadiyala S, Aukhil I, et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. Clin Oral Implants Res 2003; 14(4): 481-9.
27. Liu J, Lu XF, Wan L, Li YP, Li SF, Zeng LY, et al. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. Transplant Proc 2004; 36(10): 3272-5.
28. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. Stem Cells 2006; 24(11): 2582-91.
29. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol 2005; 35(5): 1482-90.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 169, 1st week, March 2012 Received: 30.9.2011 Accepted: 25.11.2011

Immunoregulatory Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocyte Proliferation

Masoumeh Masoumi Karimi[1], Minoo Adib PhD[2], Batool Hashemi Beni PhD[3], Razieh Alipour[1], Akbar Hassanzadeh MSc[4]

Abstract

Background: Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) have been shown to be highly immunosuppressive. In some studies, MSCs were found to suppress T cell proliferation and cytokine production. Most researchers reported this effect to be mediated by soluble factors including IL-10, TGF-β1, nitric oxide, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), and prostaglandin (PG) E2. Others however claim that cell-to-cell contact is necessary. Since the exact mechanism is still uncertain, this study tried to determine the mechanism underlying the immunoregulatory properties of human BM-MSCs and their ability to inhibit T-cell proliferation. In addition, role of cell-cell contact and dose-dependent immunomodulatory activities of these cell were explored.

Methods: In this study, both mitogen- and alloantigen-activated T cells were cultured in the presence of different numbers of BM-MSCs. In some co-cultures, activated T cells were in direct contact to BM-MSC and in other co-cultures, they were separated from BM-MSCs by a permeable membrane. The proliferation of T lymphocytes was assayed with a cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Brdu).

Findings: Although proliferation index of unstimulated T cells did not significantly differ in the presence or absence of BM-MSCs, the index was inversely related with BM-MSC presence in stimulated cells. Generally, the presence of BM-MSC resulted in a statistically significant decrease in PHA/alloantigen-induced proliferation of T lymphocytes. In addition, proliferation was significantly lower in transwell cultures than in stimulated lymphocytes without BM-MSCs ($P < 0.05$).

Conclusion: The present study showed that BM-MSC suppressed T cells proliferation triggered by allogeneic PBMCs and mitogen (PHA). This effect is dose dependent and BM-MSCs do not necessarily require the cell-to-cell contact (direct contact) of MSC and lymphocytes. However, the suppression is reduced to some extent by the physical separation of MSCs and immune cells (indirect contact).

Keywords: Mesenchymal stem cells**,** Immunoregulation, T lymphocytes, Cell to cell contact**.**

[1] MSc Student, Student Research Committee Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Lecturer, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Minoo Adib MD, Email: adib@med.mui.ac