مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۹/هفته اول خرداد ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۱۰

مقایسه‌ی اثر دو داروی سرکوبگر ایمنی بر بیان فاکتور $Foxp3^+$ در آزمایشگاه، پس از تحریک سلول‌های T بکر $CD4^+$

سرینه شاجانیان[۱]، دکتر مرجان قراگوزلو[۲]، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۳]، میترا رفیعی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در بدن انسان، سلول‌های لنفوسیت T تنظیمی (Treg) در کنترل بیماری‌های خودایمن و سامان‌دهی به پاسخ‌های ایمنی در پیوند، سرطان و عفونت‌ها شرکت می‌کنند. سیلیمارین یک کمپلکس فلاونولیگنان برگرفته از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است و دارای اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، محافظت کبدی (Hepatoprotective) و تعدیل سیستم ایمنی (Immunomodulatory) می‌باشد. در میان داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی، راپامایسین می‌تواند mTOR (Mammalian target of rapamycin) را مهار کرده، باعث بیان Foxp3، تکثیر Tregs و مهار سایر سلول‌های T گردد. در این تحقیق، به مقایسه‌ی اثر سیلیمارین با راپامایسین بر تولید سلول‌های $CD4+Foxp3+$ در خون محیطی پرداختیم.

روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) با استفاده از فایکول، از خون هپارینه‌ی داوطلبان سالم جدا شد. سپس، سلول‌های $CD4^+$ بکر از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، با استفاده از ستون آهن‌ربای ایمنی، خالص‌سازی گردید. سلول‌های T بکر $CD4^+$ با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD28 در محیط RPMI(Sigma)-1640 (Roswell Park Memorial Institute) برای مدت ۱۸ ساعت فعال شدند و کشت آن‌ها در حضور سیلیمارین یا کنترلش، DMSO (Dimethyl sulfoxide) یا در حضور یا عدم حضور راپامایسین و با اضافه کردن IL-2 به مدت ۳ روز انجام شد؛ سپس، درصد سلول‌های $TCD4^+Foxp3^+$ از طریق رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های نشان‌دار و بررسی آن‌ها توسط فلوسایتومتری انجام پذیرفت.

یافته‌ها: سیلیمارین در مقایسه با کنترلش، DMSO، همچنین، راپامایسین، باعث افزایش تولید سلول‌های $TCD4^+Foxp3^+$ در کشت سه روزه‌ی لنفوسیت‌های T بکر خون محیطی شد ($P < ۰/۰۵$)؛ در حالی که راپامایسین، در مقایسه با کنترلش (محیط RPMI) افزایشی در تولید سلول‌های $TCD4^+Foxp3^+$ در کشت سه روزه نشان نداد ($P > ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت جایگزینی داروهای کم ضررتر و نقش سلول‌های Treg در تنظیم و سامان‌دهی سیستم ایمنی، سیلیمارین به عنوان داروی تولید کننده‌ی Treg می‌تواند در درمان بیماری‌های خودایمنی و یا حتی در پیوند اعضا مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: راپامایسین، سیلیمارین، سلول‌های Treg، Foxp3، mTOR

ارجاع: شاجانیان سرینه، قراگوزلو مرجان، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، رفیعی میترا. **مقایسه‌ی اثر دو داروی سرکوبگر ایمنی بر بیان فاکتور $Foxp3^+$ در آزمایشگاه، پس از تحریک سلول‌های T بکر $CD4^+$.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۹): ۴۶۶-۴۵۷

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- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی
Email: mghakemi@med.mui.ac.ir

مقدمه

فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات گیاهی هستند که در میان آن‌ها «سیلیمارین» یک کمپلکس فلاونولیگنان برگرفته از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است که به علت داشتن اثرات محافظت از کبد (Hepatoprotective)، در درمان بیماری‌های مختلف کبدی و در پاسخ‌های التهابی مانند مسمومیت الکلی یا دارویی، مسمومیت قارچی و هپاتیت ویروسی استفاده می‌شود. همچنین، سیلیمارین دارای خواص ضد التهابی، ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. برخی مطالعات، اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulatory) این گیاه را بر روی مدل انسانی گزارش کرده‌اند (۲-۱).

اثر سیلیمارین بر سلول‌های ایمنی از جمله لنفوسیت‌های T تا حدود زیادی ناشناخته است. بر اساس مقدار مورد استفاده در گزارش‌های مختلف، سیلیمارین می‌تواند با مهار تولید IFNγ (Interferon) و IL-2 (Interleukin-2) اثر بازدارنده‌ای بر تکثیر سلول‌های T داشته باشد (۳) و همچنین باعث تکثیر سلول‌های T و ترشح IFNγ، IL-4 و IL-10 توسط لنفوسیت‌های فعال شود (۴). این در حالی است که مکانیسم‌های مسؤول برای اثرات نسبت داده شده به سیلیمارین به خوبی شناخته شده نیست (۲).

سلول‌های T تنظیمی (Treg) در تولید و حفظ تحمل ایمونولوژیکی و همچنین کنترل بیماری‌های خودایمنی نقش اساسی دارند و در ساماندهی به پاسخ‌های ایمنی در سرطان‌ها، پاتوژن‌ها و آلوآنتی‌ژن‌ها (آنتی‌ژن‌های درون گونه‌ای) شرکت می‌کنند (۷-۵). سلول‌های Treg را می‌توان برای ایمنی درمانی بر پایه‌ی سلول در آینده جهت جلوگیری از درمان خودایمنی (Graft-versus-host disease یا GVHD) استفاده کرد (۸). فعالیت سلول‌های Treg ناشی از داروهای سرکوبگر ایمنی در بدن با بیولوژی پیوند ارتباط دارد و ممکن است برای افزایش استراتژی‌های واکسن‌های ضد توموری مؤثر باشد (۹).

راپامایسین (Rapamycin) آنتی‌بیوتیکی با خواص سرکوبگری ایمنی است (۱۰) که در سلول‌های پستانداران به FK506 (گیرنده‌ی سیتوپلاسمیک) متصل شده، سپس این کمپلکس با mTOR (Mammalian target of rapamycin) جفت می‌شود و فعالیت کینازی آن را (که برای تولید پروتئین و برنامه‌ی چرخه‌ی سلولی ضروری است) مهار می‌کند. داروی راپامایسین چرخه‌ی سلولی سلول‌های T را در زمان فعالیت در فاز G1 متوقف می‌کند و باعث تحمل (Tolerance) می‌گردد (۱۲-۱۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی مختلف، اثرات متفاوتی بر روی سلول‌های Treg دارند (۱۴-۱۳). راپامایسین با تأثیر غیر مستقیم بر روی سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (Antigen-Presnting cells یا APCs)، باعث افزایش فعالیت سرکوبگری سلول‌های Treg می‌شود (۱۶-۱۵). همچنین، راپامایسین باعث تکثیر و ماندگاری سلول‌های nTreg (Naturally Treg) موشی به صورت انتخابی در آزمایشگاه (۱۷) و تکثیر Treg و مهار سلول‌های T معمولی (Conventional T-cells یا Tconv) می‌گردد؛ چرا که راپامایسین باعث مهار mTOR در سلول‌های Tconv می‌شود (۱۸). بیشتر مطالعات قبلی به تأثیر راپامایسین در افزایش بیان FoxP3 به همراه فاکتورهای دیگری از جمله TGFβ (Transforming growth factor β)

پرداخته‌اند (۲۰-۱۹) و اثر این دارو به تنهایی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته و یا بیشتر این تحقیقات بر روی سلول‌های موش انجام شده است.

شاید عواملی مانند عدم کاهش PTEN (Phosphatase and tensin homolog) بعد از تحریک TCR (T-cell receptor) که باعث مهار مسیر mTOR می‌شود (۲۲-۲۱) و یا همراهی FoxP3 با STAT5 (Signal transducer and activator of transcription-5) (حاصل از سیگنالینگ IL-2) که برنامه‌ی چرخه‌ی سلولی را به جای mTOR پیش می‌برد (۲۴-۲۳)، علت تکثیر Treg در حضور راپامایسین باشد.

مطالعه‌ای گزارش کرد که اثر مهاری سیلی‌بینین (یکی از اجزای فعال سیلیمارین) باعث مهار فعالیت mTOR در سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم و سلول‌های سرطانی کبد می‌شود (۲۵). همچنین پژوهشی که در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت، نشان دهنده‌ی مهار mTOR در سلول‌های T بود (۲۶). سلول‌های $TCD4^+Foxp3^+$ علاوه بر این‌که در تیموس تمایز می‌یابند، می‌توانند در محیط و تحت شرایط خاص توسط آنتی‌ژن از Tconv تولید شوند. این سلول‌ها همچنین در آزمایشگاه از طریق فعال کردن سلول‌های $TCD4^+CD25$ در حضور TGFβ، IL-2 و FoxP3 بیان می‌شوند و قابلیت تبدیل به Treg را دارند (۲۹-۲۷). با توجه به مطالب بیان شده، هدف از مطالعه‌ی حاضر مقایسه‌ی اثر سیلیمارین با راپامایسین بر بیان Foxp3 در سلول‌های T بکر $CD4^+$ خون محیطی بود.

روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های $TCD4^+$ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی: سلول‌های تک‌هسته‌ای محیطی (PBMC یا Peripheral blood mononuclear cell) با استفاده از فایکول از خون افراد سالم داوطلب جدا و لنفوسیت‌های آن با پیپت پاستور جمع‌آوری گردید و با محلول PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. شمارش و زیست‌پذیری (Viability) سلول‌ها با تریپان بلو (Trypan blue) (۰/۴ درصد در PBS) تعیین شد و سلول‌های دارای زیست‌پذیری بیش از ۹۵ درصد در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های $TCD4^+$ به وسیله‌ی ستون آهنربای ایمنی و توسط کیت Naïve CD4 cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی جدا شدند خلوص سلول‌های $TCD4^+$ با روش فلوسایتومتری، بیش از ۹۶ درصد تعیین گردید. این سلول‌ها بلافاصله بعد از جداسازی مورد استفاده قرار گرفتند (۳۱-۳۰).

فعال‌سازی سلول‌های $TCD4^+$ و کشت آن‌ها در مجاورت سیلیمارین و راپامایسین: ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بادی مونوکلونال (eBioscience) Anti CD3 در کف چاهک‌های پلیت ریخته شد و یک شب در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس پلیت‌ها با بافر PBS سرد شسته شد و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول Anti CD28 (eBioscience) به آن اضافه گردید و سلول‌ها برای مدت ۱۸ ساعت در محیط 1640- (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma) RPMI فعال شدند. در این مرحله ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین Sigma یا DMSO

(Dimethyl sulfoxide) (به عنوان کنترل منفی)، ۱۰۰ نانومولار راپامایسین (Cayman Chemicals) و ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر IL-2 (Peprotech) در شرایط استریل (۷-۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) افزوده شد و سلول‌ها در این شرایط برای ۳ روز کشت داده شدند (۳۱، ۱۹).

تعیین بیان Foxp3 در سلول‌ها با روش فلوسایتومتری: بعد از ۳ روز، سلول‌های کشت شده با PBS شستشو شدند و توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti Foxp3-PE (eBioscience) و Anti-CD4-FITC (Miltenyi Biotec) و یک گروه از سلول‌ها نیز با ایزوتایپ کنترل IgG1 (Immunoglobulin G1) متصل شده به فلوروکروم مربوط رنگ‌آمیزی گردیدند. برای این منظور ابتدا سلول‌های کشت شده دو بار با PBS شستشو داده و سپس توسط آنتی‌بادی Anti-CD4-FITC به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد رنگ‌آمیزی شدند. برای ثبوت سلول‌ها و آنتی‌بادی متصل شده پس از شستشوی مجدد، از فرمالدئید ۴ درصد به مدت ۶۰ دقیقه استفاده شد، سپس شستشو انجام گرفت. جهت نفوذپذیر کردن سلول و هسته‌ی آن از ساپونین ۰/۱ درصد و تریتون ۰/۱ درصد (به مدت ۳۰ دقیقه) استفاده گردید. در نهایت، سلول‌ها توسط آنتی‌بادی Anti Foxp3-PE رنگ‌آمیزی شدند و درصد سلول‌های $TCD4^+$ بیان کننده‌ی Foxp3 توسط دستگاه FACSCalibur flow cytometer و نرم‌افزار CellQuest مشخص گردید.

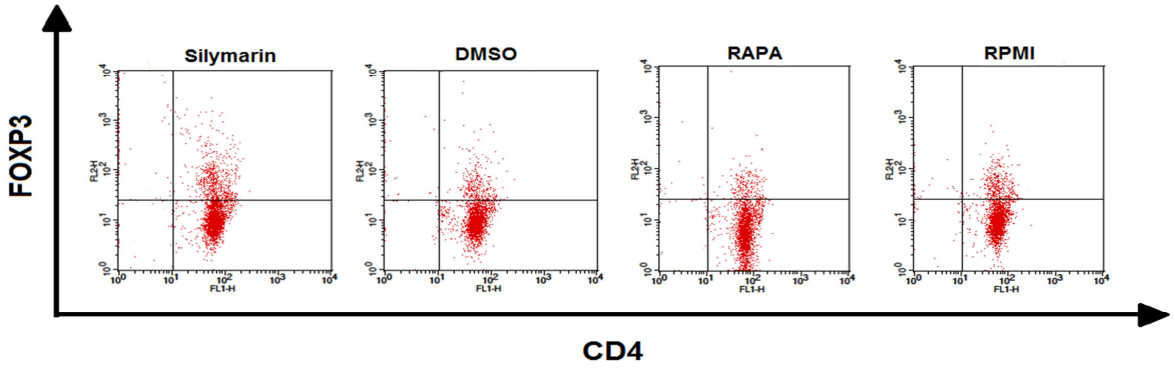
بیان فاکتور Foxp3 در سلول‌های $TCD4^+$ در مجاورت با سیلیمارین یا کنترل منفی‌اش DMSO و راپامایسین یا کنترل منفی‌اش RPMI مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل آماری با استفاده از آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney برای مقایسه‌ی هر دارو با کنترلش انجام شد. داده‌ها در نهایت توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < ۰/۰۵$ در همه‌ی سطوح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

درصد سلول‌های $TCD4^+$ بیان کننده‌ی فاکتور $Foxp3^+$ در بین جمعیت‌های لنفوسیت‌های $TCD4^+$ بکر بعد از ۳ روز کشت در مجاورت با سیلیمارین بیشتر از DMSO بود، اما اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵$). به همین ترتیب درصد سلول‌های CD4+Foxp3+ در مجاورت با راپامایسین کمتر از کنترلش (RPMI) بود و اختلاف راپامایسین با RPMI نیز معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$) (شکل‌های ۱ و ۲). انکوباسیون ۳ روزه برای افزایش معنی‌دار بین سیلیمارین و DMSO کافی نبود (شکل ۳) و در شرایط یکسان بیان Foxp3 در تست راپامایسین از RPMI کمتر شد، هر چند که اختلاف آن معنی‌دار نبود. همچنین وقتی هر دارو با کنترلش نسبت گرفته شد (یعنی دو داروی سیلیمارین و راپامایسین به تنهایی مقایسه نشدند بلکه نتایج نسبت سیلیمارین به DMSO با نتایج نسبت راپامایسین به RPMI مقایسه گردید)، اختلاف سیلیمارین (۱/۸۷ به ۰/۶۶ درصد، $P = ۰/۰۵$) با راپامایسین معنی‌دار بود که نشان دهنده‌ی اثر مثبت سیلیمارین در یک روند افزایشی در بیان Foxp3 سلول‌های $TCD4^+$ می‌باشد.

بحث

اثرات جانبی داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی در بیماری‌های خودایمنی و یا در پیوند اندام‌ها باعث گسترش داروهای کم ضررتر و یا حتی گیاهی شده است. همچنین، تحقیقات موجود نشان داده است که درمان‌های منجر به گسترش سلول‌های Treg در بیماری‌های مذکور، به مقدار کمتری از داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی پاسخ می‌دهند (۳۲).

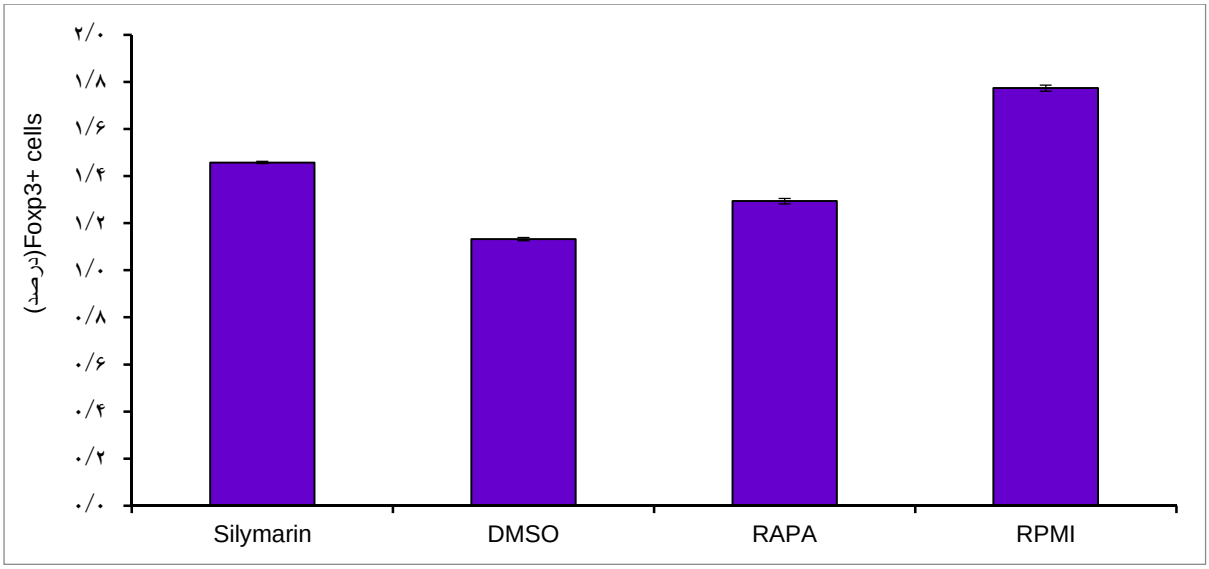


شکل ۱. بررسی سلول‌های **CD4+Foxp3+** با استفاده از روش فلوسایتومتری

به کارگیری راپامایسین نسبت به کنترلش، افزایشی را در شمار سلول‌های **CD4+Foxp3+** نشان نداد (دو نمودار سمت راست) (**P** = ۰/۷۱۵).

به کارگیری سیلیمارین باعث افزایش تعداد سلول‌های **CD4+Foxp3+** نسبت به کنترلش شد (دو نمودار سمت چپ) (**P** = ۰/۵۲۰). نتایج به صورت میانگین چهار بار تکرار آزمایش گزارش گردید.

DSMO: Dimethyl sulfoxide; PARA: Paramycin; RPMI: Roswell Park Memorial Institute

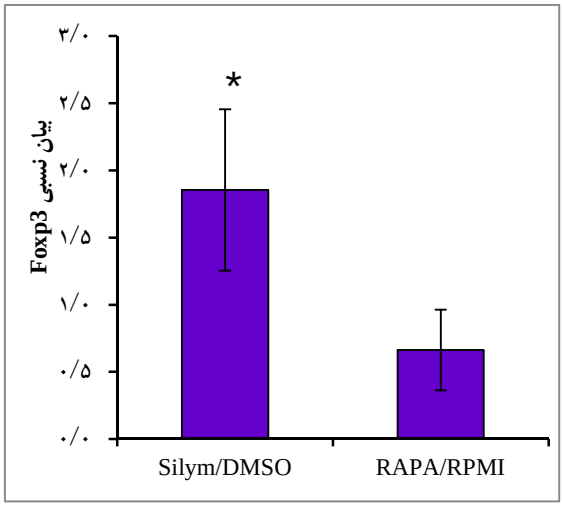


شکل ۲. درصد سلول‌های بیان کننده‌ی **Foxp3** پس از تحریک سلول‌های **T** بکر در حضور راپامایسین و سیلیمارین

تأثیر سیلیمارین در تولید سلول‌های **CD4+Foxp3+** برخلاف راپامایسین بیش از کنترلش می‌باشد و این اختلاف معنی‌دار نبود (**P** > ۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین چهار آزمایش یکسان ± انحراف استاندارد نسبی گزارش شد.

DSMO: Dimethyl sulfoxide; PARA: Paramycin; RPMI: Roswell Park Memorial Institute



شکل ۳. بیان Foxp3 در سلول‌های T توسط سیلیمارین و راپامایسین

*** نمایانگر اختلاف معنی‌دار آماری است.**

ارزیابی نسبت‌های سیلیمارین به DMSO و راپامایسین به RPMI (بعد از این‌که هر دارو با کنترلش نسبت گرفته شد) با استفاده از روش qRT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) افزایش معنی‌داری را در میزان بیان Foxp3 نشان داد. نتایج به صورت میانگین چهار آزمایش یکسان ± خطای استاندارد از میانگین گزارش شد.

DSMO: Dimethyl sulfoxide; PARA: Paramycin; RPMI: Roswell Park Memorial Institute

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر دو داروی راپامایسین و سیلیمارین در تولید سلول‌های CD4+Foxp3+ به صورت آزمایشگاهی مقایسه گردید و نتایج نشان دهنده‌ی افزایش بیان Foxp3 توسط سیلیمارین نسبت به کنترلش و همچنین نسبت به راپامایسین بود. هرچند این اختلاف نسبت به کنترل معنی‌دار نبود، اما در مقایسه با راپامایسین معنی‌دار شد. جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی برای یافتن مطالعات مشابه جهت مقایسه بی‌نتیجه بود، اما مطالعات مختلفی در ارتباط با بیان Foxp3 توسط راپامایسین صورت گرفته است (۳۴-۳۳، ۳۱، ۱۹). به دلیل شباهت سیلیمارین و راپامایسین از لحاظ مهار mTOR، این دو دارو با یکدیگر مقایسه شدند که نتایج مشابهی به دست نیامد. علت احتمالی به مدت انکوباسیون کم و یا قوی‌تر بودن سیلیمارین در مهار mTOR ارتباط دارد. انجام تحقیقات بیشتر با زمان کشت طولانی‌تر و بررسی میزان مهار شدن mTOR، می‌تواند روشی برای مشخص شدن علت این تفاوت باشد. همچنین ممکن است به علت شباهت ساختمانی سیلیمارین به هورمون‌های استروئیدی، این هورمون‌ها به داخل هسته نفوذ کرده، به طور مستقیم باعث افزایش تولید Foxp3 شده باشد.

همچنین در تحقیق حاضر راپامایسین در بیان Foxp3 افزایشی را در مقایسه با کنترلش نشان نداد که امکان تولید Treg را در اثر تحریک سلول‌ها و عدم حضور راپامایسین نشان می‌دهد. Bocian و همکاران پس از ۶ روز کشت فهمیدند که تولید Treg و بیان Foxp3 در حضور راپامایسین نسبت به کنترلش کاهش خفیفی دارد (۱۳) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت. Valmori و همکاران نیز گزارش کردند که بعد از یک دور تحریک سلول‌ها در حضور راپامایسین و یا ادامه‌ی تحریک، تکثیر دو گروه سلولی $TCD4^+$ بدون Treg و Treg مهار می‌شود (۳۴). برخی از یافته‌ها (۳۳، ۳۱) نیز کاهش تولید سلول‌های Treg و بیان Foxp3 را در حضور راپامایسین نشان می‌دهند. نتایج تحقیق Long و Buckner حاکی از آن بود که اضافه کردن راپامایسین به محیط کشت باعث افزایش درصد سلول‌های $TCD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ می‌شود و این افزایش به دلیل تکثیر سلول‌های $TFoxp3^+$ به صورت انتخابی نمی‌باشد (۳۱).همچنین Kopf و همکاران به این نتیجه رسیدند که ترکیب راپامایسین با غلظت ۱۰۰-۱

نانوگرم بر میلی‌لیتر و TGF-β باعث افزایش بیان Foxp3 و تولید Treg می‌گردد (۳۳).

مسیر PI3K–AKT–mTOR باعث توقف در تولید Foxp3 می‌شود، در نتیجه تحریک سلول‌های T در حضور مهار کننده‌ی این مسیر ممکن است باعث افزایش بیان Foxp3 گردد. در بیشتر مطالعات انجام شده جهت بررسی تأثیر راپامایسین در تولید سلول‌های Treg، از سلول‌های موشی استفاده شده بود (۲۰–۱۹). در مطالعه‌ی حاضر علت کاهش Foxp3 در حضور راپامایسین ممکن است به دلیل تفاوت در ترکیب مدت زمان کشت، قدرت تحریک توسط آنتی‌بادی‌ها و مقدار IL-2 استفاده شده در کشت سلول‌های انسانی باشد.

تحریک سلول‌ها برای ۱۸ ساعت باعث تغییر در هیستون‌های جایگاه ژنی Foxp3 می‌شود و دسترسی آن برای فاکتورهای نسخه‌برداری را آسان می‌نماید. بنابراین اضافه کردن زود هنگام مهار کننده‌ی mTOR، اعمال ضروری سلول‌های T را مهار می‌کند. در ادامه اضافه کردن مهار کننده‌ی mTOR و IL-2 یا IL-15 (که باعث تولید STAT می‌شوند)، منجر به افزایش سلول‌های بیان کننده‌ی Foxp3 می‌گردد. لازم به ذکر است که این مسیر به پیام‌رسانی TGFβ بستگی ندارد (۱۹). پس مهار مسیر PI3K–AKT–mTOR بعد از ۱۸ ساعت به همراه مسیر پیام‌رسانی IL-2 که از ابتدا به محیط کشت اضافه شده است، باعث افزایش Foxp3 بدون نیاز به TGF-β می‌گردد، هرچند راپامایسین و TGF-β باعث تقویت تولید Treg با مکانیسم‌های متفاوت و مستقل از یکدیگر می‌شود. TGF-β و راپامایسین به صورت سینرژیسم باعث تولید Treg در موش شده‌اند، ولی در مطالعات اندکی (۳۲، ۲۰) بیان Foxp3 و تولید Treg بدون TGF-β مشاهده شده است.

به طور خلاصه در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر راپامایسین و سیلیمارین در تولید $CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg پس از ۳ روز کشت بررسی شد و نشان داد که سیلیمارین بیش از راپامایسین باعث افزایش بیان Foxp3 می‌گردد و این نتایج حاکی از تأثیر مفید سیلیمارین به عنوان داروی سرکوبگر سیستم ایمنی در تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌باشد؛ هرچند در این آزمایش کیفیت Tregهای تولید شده از لحاظ قدرت سرکوبگری بررسی نشد. از آن‌جا که سیلیمارین یک فرآورده‌ی گیاهی و بی‌خطر است، کاربرد آن پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد سرینه شاجانیان به شماره‌ی ۳۹۱۳۲۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است، که در گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب شد. نویسندگان از همکاری صمیمانه‌ی استادان و کارکنان گروه ایمنی‌شناسی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. Curr Med Chem 2007; 14(3): 315-38.
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. 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.
4. 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.
5. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer Res 1999; 59(13): 3128-33.
6. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature 2002; 420(6915): 502-7.
7. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. J Exp Med 2002; 196(3): 401-6.
8. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. Blood 2006; 108(1): 390-9.
9. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Nat Med 2003; 9(9): 1144-50.
10. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. Annu Rev Immunol 1996; 14: 483-510.
11. Blaha P, Bigenzahn S, Koporc Z, Schmid M, Langer F, Selzer E, et al. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade. Blood 2003; 101(7): 2886-93.
12. Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. Prog Cell Cycle Res 1995; 1: 53-71.
13. Bocian K, Borysowski J, Wierzbicki P, Wyzgal J, Klosowska D, Bialoszewska A, et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(3): 710-7.
14. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. J Am Soc Nephrol 2007; 18(3): 1007-18.
15. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. J Exp Med 2001; 194(12): 1711-9.
16. Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F, Ricciardi-Castagnoli P. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. J Immunol 2003; 170(10): 5075-81.
17. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood 2005; 105(12): 4743-8.
18. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. Nat Rev Immunol 2009; 9(5): 324-37.
19. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(22): 7797-802.
20. Gao W, Lu Y, El EB, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. Am J Transplant 2007; 7(7): 1722-32.
21. Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beilhack A, Loh J, et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. Blood 2008; 111(1): 453-62.
22. Walsh PT, Buckler JL, Zhang J, Gelman AE, Dalton NM, Taylor DK, et al. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. J Clin Invest 2006; 116(9): 2521-31.
23. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. J Exp Med 2005; 201(2): 259-66.
24. Basu S, Golovina T, Mikheeva T, June CH, Riley JL. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. J Immunol 2008; 180(9): 5794-8.
25. Garcia-Maceira P, Mateo J. Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. Oncogene 2009; 28(3): 313-24.

26. Gharagozloo M, Javid EN, Rezaei A, Mousavizadeh K. Silymarin inhibits cell cycle progression and mTOR activity in activated human T cells: therapeutic implications for autoimmune diseases. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013; 112(4): 251-6.
27. Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, Khazaie K, von BH. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. Immunol Rev 2006; 212: 163-9.
28. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+. J Exp Med 2003; 198(12): 1875-86.
29. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(13): 4572-7.
30. Fantini MC, Dominitzki S, Rizzo A, Neurath MF, Becker C. In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells. Nat Protoc 2007; 2(7): 1789-94.
31. Long SA, Buckner JH. Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T cells. J Autoimmun 2008; 30(4): 293-302.
32. Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, et al. Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. J Immunol 2006; 177(2): 944-9.
33. Kopf H, de la Rosa GM, Howard OM, Chen X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. Int Immunopharmacol 2007; 7(13): 1819-24.
34. Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, et al. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. Inflamm Res 2000; 49(1): 20-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 12.02.2015
Vol. 33, No. 329, 1st Week, June 2015
Accepted: 30.04.2015

Comparing In-Vitro Effects of Two Immunosuppressive Drugs on the Expression of Foxp3 from Naïve CD4+ T Cells

Sarineh Shajanian[1], Marjan Gharagozloo PhD[2], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD[3], Mitra Rafiee MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: Many studies showed that regulatory T cells (Tregs) have immunosuppressive effects on immune responses in transplantation and autoimmune disease. Silymarin (isolated from milk thistle or silybum marianum plant) is a flavolignan complex with anti-inflammatory, hepatoprotective, antioxidant and immunomodulatory activities. Previous studies in our group revealed inhibition effect of silymarin on mammalian target of rapamycin (mTOR) activity in activated T cells. Among immunosuppressive drugs, rapamycin can inhibit mTOR, results in Foxp3 expression, Tregs expansion and conventional T cells inhibition. In this study, the effect of silymarin on in-vitro generation of CD4+Foxp3+ cells, in comparison with rapamycin, was evaluated.

Methods: Naïve CD4+ T cells were separated from healthy individuals' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and activated with monoclonal antibody anti-CD3 and anti-CD28 for 18 hours in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete medium. Then, incubation was continued with adding Interlukin-2 (IL-2) and silymarin or its control, dimethyl sulfoxide (DMSO), or cultured in present or absent of rapamycin for 3 days. Cells were harvested and stained with anti-CD4 and anti-FoxP3 antibodies for flow cytometry.

Findings: Silymarin increased CD4+Foxp3+ T cells compared with its control, DMSO, and with rapamycin after three days of culture of naïve T cells ($P < 0.05$); while, rapamycin compared to its control (RPMI medium) did not increased CD4+Foxp3+ T cells during three days culture ($P > 0.05$).

Conclusion: Given the importance of replacement less harmful medicine and Tregs role in regulating immune system, silymarin, as aTreg generation drug, can be used in the treatment of autoimmune diseases and even in organ transplantation.

Keywords: Silymarin, Rapamycin, Foxp3, Regulatory T cells (Treg), Mammalian target of rapamycin (mTOR)

Citation: Shajanian S, Gharagozloo M, Ganjalikhani-Hakemi M, Rafiee M. **Comparing In-Vitro Effects of Two Immunosuppressive Drugs on the Expression of Foxp3 from Naïve CD4+ T Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(329): 457-66

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- Assistant Professor, Cellular and Molecular Immunology Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD, Email: mghakemi@med.mui.ac.ir