مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۰۳/هفته اول آبان ماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۰

بررسی اثر سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT در سلول‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط In vitro

الهه نوری جاوید[۱]، دکتر مرجان قراگوزلو[۲]

چکیده

مقدمه: سیلیمارین (Silymarin) یک کمپلکس فلاونولیگنان مشتق از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است که اثرات حفاظت کبدی، ضد التهابی و ضد سرطانی از خود نشان می‌دهد. اگر چه اثرات حفاظت کبدی سیلیمارین به خوبی شناخته شده است، ولی اثرات آن بر روی لنفوسیت‌های T تا حد زیادی ناشناخته مانده است. در این مطالعه، اثر سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT (Phosphatidylinositol 3 kinase) در سلول‌های T فعال شده‌ی انسانی در شرایط In vitro بررسی شد.

روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMCs) از خون افراد داوطلب سالم جداسازی شد و با فیتوهماگلوتینین (Phytohemagglutinin یا PHA) و آنتی‌بادی مونوکلونال anti-CD28 با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تحریک شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت کامل RPMI 1640 با غلظت ۱۰۰ میکرومول سیلیمارین و شاهد DMSO (Dimethyl sulfoxide) به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن عصاره‌ی سلولی تحت آزمایش ELISA قرار گرفت.

یافته‌ها: سیلیمارین با غلظت ۱۰۰ میکرومول به مدت ۷۲ ساعت، باعث کاهش قابل توجه سطح داخل سلولی مولکول (Ser235/236) Phosphorylated-S6 که در مسیر سیگنالینگ نقش دارد، شد؛ این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P = ۰/۰۲۴)، ولی تغییر قابل توجهی در سطح سلولی سایر مولکول‌های مؤثر در این مسیر مانند Akt و Phospho-Akt مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه اثر سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT با ارزیابی سطح مولکول‌هایی که در این مسیر نقش دارند، بررسی شد. نتایج نشان داد که سیلیمارین به طور قابل توجهی سطح سلولی Phospho-S6 را کاهش داد. همچنین ممکن است سیلیمارین اثر مهاری خود را بر تکثیر لنفوسیت‌های T، از طریق مهار برخی از مولکول‌های مسیر PI3K/AKT اعمال کند.

واژگان کلیدی: سیلیمارین، سیگنالینگ PI3K-AKT، سلول‌های T

مقدمه

سیلیمارین (Silymarin) یک کمپلکس فلاونولیگنان مشتق از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybum marianum است. این دارو به دلیل اثرات محافظت کبدی خود، سال‌ها است که برای درمان بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود. اثرات آنتی‌اکسیدانی، محافظ سلولی و ضد سرطانی سیلیمارین در مقالات متعددی نشان داده شده است (۲-۱). به تازگی توجه محققان به اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulatory) این گیاه معطوف شده است. اما هنوز نکات مجهول بسیاری در زمینه‌ی اثر سیلیمارین بر سلول‌های ایمنی وجود دارد. بعضی از مقالات نشان داده‌اند که اثر مهاری سیلیمارین بر تکثیر لنفوسیت‌های T در شرایط آزمایشگاهی با مهار تولید IL-2 (Interlukin-2) و IFN-γ (Interferon-γ) همراه می‌باشد (۱۰-۳). حال آن که در بعضی مقالات دیگر

[۱] کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اطفهان، ایران
[۲] استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرجان قراگوزلو
Email: marjangh@gmail.com

اثرات تحریکی این دارو بر تکثیر سلول‌های T گزارش شده است (۱۴-۱۱). دلیل اصلی این تفاوت‌ها غلظت سیلیمارین و شرایط متفاوت آزمایشات انجام شده می‌باشد. این طور به نظر می‌رسد که در غلظت‌های پایین سیلیمارین در محیط کشت اثرات تحریکی بر تکثیر سلول‌هایT از خود نشان می‌دهد، اما در غلظت‌های بالاتر اثر مهاری بر تکثیر سلول‌ها و تولید سایتوکاین‌های IL-2 و IFNγ دارد که هم‌زمان از فعال شدن فاکتور نسخه‌برداری NF-kB (Nuclear factor-kappaB) و انتقال آن به هسته نیز جلوگیری می‌کند (۱۳، ۶-۵). سیلیمارین بدون القای مرگ سلولی و یا آپوپتوز باعث مهار تکثیر سلول‌های T می‌شود (۶). تاکنون مکانیسم دقیق این اثر مهاری مشخص نشده است.

سلول T برای فعال شدن حداقل نیاز به ۳ سیگنال دارد (۱۵). سیگنال اول با شناسایی آنتی‌ژن توسط گیرنده‌ی سلول دریافت می‌شود و سیگنال دوم برای فعال شدن سلول‌های T توسط مولکول‌های سطحی سلول‌های ارائه دهنده‌ی آنتی‌ژن که به نام کمک محرک‌ها خوانده می‌شوند، فراهم می‌شود. این مولکول‌های سطحی همراه با آنتی‌ژن سبب تحریک سلول‌هایT می‌شوند. مهم‌ترین مسیر کمک تحریکی در فعال شدن سلول T یک مولکول سطحی در این سلول به نام CD28 است. سیگنال سوم از طریق IL-2 که یک فاکتور رشد برای سلول T محسوب می‌شود، به سلول می‌رسد. در حقیقت سلول T پس از شناسایی آنتی‌ژن و گرفتن سیگنال ۱ و ۲ فعال می‌شود و از ژن IL-2 نسخه‌برداری می‌شود. IL-2 می‌تواند روی خود سلول اثر اتوکراین داشته باشد و باعث فعال شدن بیشتر سلول T شود. در این مرحله سلول T وارد چرخه‌ی سلولی می‌شود و تکثیر می‌یابد (۱۶). اتصال IL-2 به پذیرنده‌اش باعث فراخوانی PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase) به کمپلکس گیرنده می‌شود. آنزیم PI3K با فسفریله کردن PIP2 و تولید PIP3 باعث فراخوانی مولکول‌های پایین دست (Downstream) مسیر سیگنالینگ از جمله AKT می‌شود. AKT یک سرین/ترهاونین کیناز است که سه ایزوفرم دارد. AKT1 در سنتز پروتئین و رشد سلول نقش دارد. فسفریله شدن AKT در ترهاونین ۳۰۸ و سرین ۴۷۳ در نهایت منجر به فعالیت mTOR می‌شود. این مولکول سنتز پروتئین را از طریق فسفریله کردن و فعال کردن S6 kinase (P70S6K) کنترل می‌کند. نتیجه فعالیت آنزیم S6 kinase، فسفریله شدن S6 ribosomal protein می‌باشد که باعث فعال‌سازی ترجمه‌ی mRNA می‌گردد. از آن جایی که P70S6K ترجمه را کنترل می‌کند، بیان پروتئین‌های تنظیمی سیکل سلولی افزایش می‌یابد. به همین دلیل این مولکول می‌تواند مکانیسمی را که توسط آن پیشرفت سیکل سلولی همراه با رشد سلولی اتفاق می‌افتد، نشان دهد (۱۷).

در یک مطالعه اثر مهاری سیلیبینین (Silibinin) که یکی از اجزای فعال سیلیمارین است بر فعالیت mTOR در سلول‌های Hela و Hep3b بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که فسفریلاسیون mTOR و مولکول پایین دست آن یعنی P70S6K مهار گردید (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای اثر مهاری سیلیمارین بر روی آپوپتوز سلول‌های تحریک‌شده توسط نور ماورای بنفش در ملانومای بدخیم انسان از طریق مهار مسیر AKT بررسی شد (۱۹).

با توجه به آن چه گفته شد، مطالعات موجود اثر سیلیبینین و سیلیمارین را بر مسیر سیگنالینگ

PI3K/AKT/mTOR در رده‌های سلولی غیر از لنفوسیت‌های T بررسی کرده‌اند و تاکنون اثرات سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT در لنفوسیت‌های T بررسی نشده است. اثرات ایمونوساپرسیو سیلیمارین بر تکثیر لنفوسیت‌ها پیش از این نشان داده شده است، اما مکانیسم مولکولی این اثرات مشخص نشده است. S6 ribosomal protein، Phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236)، Akt1، Phospho-Akt (Ser473) و Phospho-Akt(Thr308) پروتئین‌های اصلی مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT هستند (۲۰). در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر میزان بیان این پروتئین‌ها با تکنیک ELISA بررسی شد.

روش‌ها

برای جداسازی و خالص‌سازی لنفوسیت‌ها از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs یا Peripheral blood mononuclear cells) در ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر خون تهیه شده از افراد داوطلب سالم بر روی فایکول برده شد و سانتریفوژ گردید. PBMCs جدا شد و با بافر PBS شستشو داده شدند. سلول‌ها شمارش شد و درصد حیات آن‌ها باتریپان بلو (۰/۴ درصد در PBS) تعیین شد. سلول‌های با درصد حیات بیش از ۹۵ درصد در مراحل بعدی آزمایش استفاده شدند.

برای فعال‌سازی لنفوسیت‌های T و کشت آن‌ها در مجاورت سیلیمارین، سلول‌ها با تعداد 10^6 در هر چاهک با مایتوژن فیتوهماگلوتینین (Phytohemagglutinin یا PHA) در مجاورت غلظت ۱۰۰ میکرومول سیلیمارین و یا در حلال آن DMSO (Dimethyl sulfoxide)، به عنوان شاهد منفی، کشت داده شدند. پودر سیلیمارین در محلول DMSO حل و یک محلول استوک ۱۰۰ میکرومول از آن تهیه شد. سیلیمارین محلول در DMSO در ویال‌های کوچک‌تر تقسیم شد و در فریز ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سلول‌ها در محیط کشت کامل شامل RPMI 1640، پنی‌سیلین (۱۱۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و سرم جنین گاوی (۱۰ درصد) در شرایط استریل هوای مرطوب ۹۵ درصد، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO_2 به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند (۶).

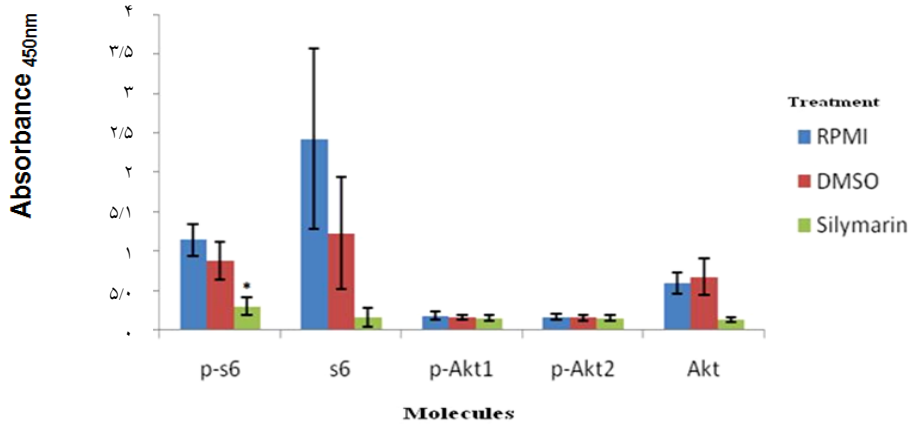
سپس لیز سلول‌های T فعال شده در مجاورت سیلیمارین تهیه شد و مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT در عصاره‌ی سلولی بررسی گردید. برای این کار عصاره‌ی سلولی (cell extract) را مطابق با روش ELISA و توسط کیت PathScan®Multi Target (Cell Signaling Technology, USA) آماده شد و تمام مراحل کار روی یخ انجام گرفت. برای این کار محیط سلولی جدا شد و سلول‌ها با بافر PBS سرد شستشو داده شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده‌ی سلول که در کیت موجود بود به اضافه‌ی ۵ میکرولیتر از مخلوطی از مهارکننده‌های پروتئازها به سلول‌ها اضافه شد و بر روی یخ برای مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سلول‌ها پس از چند بار فریز و دفریز کردن سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت که حاوی عصاره‌ی سیتوپلاسمی سلول‌ها بود، به لوله‌ی دیگر انتقال داده شد.

بررسی اثر سیلیمارین بر مولکول‌های اصلی سیگنالینگ مسیر PI3K/AKT توسط کیت PathScan® Cell growth Multi-target sandwich

(Cell Signaling Technology, USA) ELISA انجام شد. این روش ELISAی فاز جامد و حاوی مواد ضروری برای بررسی سطوح داخلی مولکول‌های S6 ribosomal protein ، Phospho-S6 ribosomal، AkT1، Phosphoakt (ser473) و Phosphoakt (thr308) است. این مولکول‌ها پروتئین‌های سیگنالینگ اصلی مسیر PI3K-AKT در مسیر کنترل رشد هستند. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی سلولی به هر Well از پلیت که با یک Capture antibody پوشیده شده بود، اضافه شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد پروتئین‌های هدف توسط آنتی‌بادی‌های چاهک گرفته شدند. پس از آن با wash buffer ۴ مرحله شستشو انجام شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از Detection antibody اضافه گردید و برای ۱ ساعت انکوبه شد و بعد دوباره شستشو انجام گردید. در مرحله‌ی بعد ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP (Horseradish peroxidase -linked secondary antibody) به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و بعد از این مرحله دوباره ۴ بار شستشو انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر TMB که سوبسترای HRP است برای ایجاد رنگ اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر Stop solution اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه اثر سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT با ارزیابی سطح مولکول‌هایی که در این مسیر نقش دارند، بررسی شد. نتایج نشان داد که سیلیمارین به طور قابل توجهی سطح بیان فرم فسفریله‌ی مولکول S6 (Phospho-S6) را کاهش داد. این کاهش در مقایسه با میزان بیان همین مولکول در سلول‌های مجاور شده با DMSO از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P = ۰/۰۲۴). تغییر قابل توجهی در سطح سلولی مولکول‌هایی مانند S6، Akt و فرم‌های فسفریله‌ی آن (Phospho-Akt) مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱. اثر سیلیمارین بر میزان بیان مولکول‌های مسیر سیگنالینگ PI3K-Ak در سلول‌های T فعال شده با P HA و آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-CD28. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار جذب نوری نشان داده شده است.
*** کاهش آماری معنی‌دار (P < ۰/۰۵)**

مقایسه‌ی بین مولکول‌های مطالعه شده در سلول‌های کشت داده شده در محیط RPMI و سلول‌های کشت داده شده در مجاورت DMSO نشان داد که DMSO به عنوان حلال سیلیمارین اثری بر بیان مولکول‌های مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT ندارد و اختلافات مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۱).

بحث

تکثیر سلول T برای افزایش پاسخ‌های ایمنی اکتسابی بسیار ضروری می‌باشد و توسط پیام‌هایی از طریق گیرنده‌ی سلول T، مولکول‌های کمک محرک و سایتوکاین‌هایی مانند IL-2 تنظیم می‌شود. PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) در پایین هر کدام از این مسیرها قرار می‌گیرد و به طور مستقیم در تنظیم تکثیر لنفوسیتی نقش دارد (۲۱). در واقع مسیر PI3K/AKT سیگنال‌هایی را از گیرنده‌های تیروزین کینازی تحریک شده با لیگاند، به مولکول‌های اجرایی که متابولیسم، تکثیر، اندازه و بقای سلولی را کنترل می‌کنند، انتقال می‌دهد (۲۰). بنابراین مهارکننده‌های مولکول‌های این مسیر می‌توانند نقش مهمی در مهار سیکل سلولی و جلوگیری از تکثیر سلول داشته باشند. مهارکننده‌های PI3K مثل LY294002 و Wortmannin و راپامایسین (Rapamycin) می‌توانند باعث توقف سیکل سلولی در فاز G0-G1 بدون آپوپتوز سلول‌های T شوند (۲۳-۲۱).

از آن جایی که PI3K تکثیر لنفوسیت‌های T را در پاسخ به محرک‌های مختلف تنظیم می‌کند استفاده از مهارکننده‌های این مسیر می‌تواند به عنوان یک درمان سرکوبگر ایمنی جایگزین عمل کند (۲۱).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر سیلیمارین بر مولکول‌های مسیر PI3K/AKT به عنوان تنظیم‌کننده‌ی تکثیر سلولی بود.

یک مطالعه نشان داده است که سیلیمارین در لوسمی سلول‌های T خون محیطی و Jurkat (Human peripheral blood leukemia T cells) در دوز ۴۰۰ میکرومول به مدت ۴۸ ساعت و ۴۰۰-۲۰۰ میکرومول به مدت ۷۲ ساعت می‌تواند باعث مهار تکثیر سلولی از طریق توقف سیکل سلولی شود (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری نیز مشاهده شد که سیلیمارین در لنفوسیت‌های +TCD4 فعال‌شده می‌تواند فعال‌سازی فاکتور نسخه‌برداری NF-KB را مختل کند و باعث مهار تولید IL-2، IFN-γ و همچنین تکثیر سلولی شود (۶). بنابراین برای تعیین بیشتر مکانیسم مهار تکثیر توسط سیلیمارین، بررسی مولکول‌های اصلی که در پیشرفت تکثیر لنفوسیت‌های T نقش دارند لازم به نظر می‌رسد.

همچنین مطالعات قبلی بیان می‌کنند که عملکردهای ضد تکثیری سیلیمارین به مولکول‌هایی همچون AKT مربوط می‌شوند (۴). به تازگی در یک مطالعه اثر مهاری سیلیبینین بر فعالیت mTOR و مولکول پایین دست آن (P70S6K) در سلول‌های سرطانی کبدی و دهانه‌ی رحم نشان داده شده است. در این مطالعه با حذف سیلیبینین تمامی اثرات ذکر شده برگشت داشتند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای اثر مهاری سیلیمارین بر روی آپوپتوز سلول‌های تحریک‌شده توسط نور ماورای بنفش در ملانومای بدخیم سلول‌های A375-S2 در انسان بررسی شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که سیلیمارین آپوپتوز تحریک شده توسط نور ماورای بنفش را به وسیله‌ی فعال‌سازی مسیر AKT کاهش می‌دهد (۱۹). در

www.mui.ac.ir

مطالعه‌ی دیگری اثر سیلیبینین بر فعالیت آنزیم‌های پروتئولایتیک ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (Matrix metalloproteinase-2یا MMP-2) و فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن نوع کینازی (Urokinasetype plasminogen activator یا U-PA) بررسی شد. این آنزیم‌ها توانایی تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی را دارند و باعث تهاجم و متاستاز تومور می‌شوند. به علاوه یعنی آنزیم پروتئین کیناز فعال شده توسط مایتوژن (Mitogen activated protein kinase یا MAPK) که تنظیم‌کننده‌ی این دو آنزیم در سطح نسخه‌برداری است، در سلول‌های A549 بررسی شد. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که مهار بیان MMP-2 و U-PA توسط سیلیبینین از طریق مهار فسفریلاسیون ERK1/2 که اعضای خانواده‌ی MAPK هستند و همچنین Akt که به نوبه‌ی خود باعث کاهش تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود، انجام می‌گیرد (۲۴). در مطالعه‌ای که به تازگی بر روی کشت سلول‌های بنیادی سرطانی انجام گردیده است، نشان داده شده است که سیلیبینین می‌تواند باعث کاهش سطح فسفریلاسیونAkt Ser473 شود (۲۵).

بنابراین اطلاعات موجود از مطالعاتی است که اثر سیلیبینین و سیلیمارین را بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR در رده‌های سلولی غیر از لنفوسیت‌های T بررسی کرده‌اند و تاکنون اثرات سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT در لنفوسیت‌های T بررسی نشده است.

در این مطالعه اثر سیلیمارین بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT با ارزیابی سطح مولکول‌هایی که در این مسیر نقش دارند، بررسی شد. نتایج نشان داد که سیلیمارین به طور قابل توجهی سطح سلولی Phospho-S6 را کاهش می‌دهد ولی تغییر قابل توجهی در سطح سلولی مولکول‌هایی مانند Akt و Phospho-Akt مشاهده نشد. این نتایج با مطالعات قبلی که بیان می‌کنند مهارکننده‌هایی مانند راپامایسین و مشابه با آن به طور قابل توجهی فسفریلاسیون S6 را در لنفوسیت‌های T فعال شده کاهش می‌دهند، هماهنگ بود (۲۷-۲۶، ۲۱).

نتایج به دست آمده از این نتایج این مطالعه، نشان‌دهنده‌ی این مطلب بود که سیلیمارین اثر مهاری بر تکثیر لنفوسیت‌های T را، که در مطالعات قبلی مشاهده شد، از طریق مهار برخی از مولکول‌های مسیر PI3K/Akt که برای ورود سلول به سیکل سلولی مورد نیاز هستند، اعمال کند.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل اجرای طرح پژوهشی به شماره‌ی ۲۹۰۰۸۳ بود که توسط شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و هزینه‌ی آن توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین شد.

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. Cheung CW, Gibbons N, Johnson DW, Nicol DL. Silibinin--a promising new treatment for cancer. Anticancer Agents Med Chem 2010; 10(3): 186-95.
3. Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Paschal DM, Apodaca MC, Liu Y, et al. Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection. Gastroenterology 2010; 138(2): 671-81, 681.
4. 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.
5. 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.
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. Min K, Yoon WK, Kim SK, Kim BH. Immunosuppressive effect of silibinin in experimental autoimmune encephalomyelitis. Arch Pharm Res 2007; 30(10): 1265-72.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
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. Bagherpour B, Gharagozloo M, Moayedi B. The influence of iron loading and iron chelation on the proliferation and telomerase activity of human peripheral blood mononuclear cells. Iran J Immunol 2009; 6(1): 33-9.
13. 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.
14. Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi SE, Hourfar H, et al. Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. Int Immunopharmacol 2006; 6(8): 1305-10.
15. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004; 351(26): 2715-29.
16. Abbas AK, Lichtman AH. Activation of T Lymphocytes. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007.
17. Delgoffe GM, Powell JD. mTOR: taking cues from the immune microenvironment. Immunology 2009; 127(4): 459-65.
18. 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.
19. Li LH, Wu LJ, Tashiro SI, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T. The roles of Akt and MAPK family members in silymarin's protection against UV-induced A375-S2 cell apoptosis. Int Immunopharmacol 2006; 6(2): 190-7.
20. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. Cancer Cell 2011; 19(1): 58-71.
21. Breslin EM, White PC, Shore AM, Clement M, Brennan P. LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit T-cell proliferation. Br J Pharmacol 2005; 144(6): 791-800.
22. Appleman LJ, van Puijenbroek AA, Shu KM, Nadler LM, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. J Immunol 2002; 168(6): 2729-36.
23. Fung MM, Rohwer F, McGuire KL. IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. Cell Signal 2003; 15(6): 625-36.
24. Chen PN, Hsieh YS, Chiou HL, Chu SC. Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways. Chem Biol Interact 2005; 156(2-3): 141-50.
25. Wang JY, Chang CC, Chiang CC, Chen WM, Hung SC. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. J Cell Biochem 2012; 113(5): 1733-43.
26. Zhao YM, Zhou Q, Xu Y, Lai XY, Huang H. Antiproliferative effect of rapamycin on human T-cell leukemia cell line Jurkat by cell cycle arrest and telomerase inhibition. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(4): 481-8.
27. Dieterlen MT, Bittner HB, Klein S, von SS, Mittag A, Tarnok A, et al. Assay validation of phosphorylated S6 ribosomal protein for a pharmacodynamic monitoring of mTOR-inhibitors in peripheral human blood. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82(3): 151-7.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 203, 1st week, November 2012 Received: 5.7.2012 Accepted: 1.10.2012

Assessment of PI3K/AKT Signaling Pathway in Activated Human T Lymphocytes In Vitro

Elaheh Noorijavid MSc[1], Marjan Gharegozloo PhD[2]

Abstract

Background: Silymarin is a complex flavonolignan from milk thistle (*Silybum marianum*) plant. It exhibits cytoprotective, anticarcinogenic, and anti-inflammatory effects. Although its hepatoprotective effect has been well documented, its effects on T cells have not been thoroughly investigated. In this study, the effects of silymarin on phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway of human activated T lymphocytes were investigated *in vitro*.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers were isolated and activated with phytohaemagglutinin (PHA) and 2 µg/ml of monoclonal antibody [anti-cluster of differentiation 28 (CD28)]. Cells were incubated for 72 hours in a Roswell Park Memorial Institute **(**RPMI-1640) complete medium with 100 µM silymarin and dimethyl sulfoxide (DMSO) as control. Then, cell lysate was prepared with lysis buffer and cell signaling was assessed using enzyme-linked immunosorbent assay (PathScan® Cell Growth Multi-Target Sandwich ELISA Kit, Cell Signaling Technology, USA).

Findings: Treatment with 100 µM silymarin for 72 hours could partially decrease the cellular levels of phosphorylated-AKT (Ser473/Thr308) and AKT. In addition, silymarin significantly decreased the cellular expression of phosphorylated-S6 (Ser235/236).

Conclusion: Silymarin significantly decreased the cellular level of Ser235/236 but had no significant effects on cellular levels of other molecules such as AKT and Ser473/Thr308. Therefore, the inhibitory effects of silymarin on T lymphocytes proliferation, that have been observed in previous studies, might have been the result of inhibition of some molecules in the PI3K/AKT pathway which are necessary for cell cycle entrance.

Keywords: Silymarin, Signaling, Phosphatidylinositol-3-kinase, Protein kinase B, Interleukin 2, T cells

[1] Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Marjan Gharegozloo PhD, Email: marjangh@gmail.com