

Expression of natural cytotoxicity receptors from peripheral blood and adipose tissue derived NK cells from obese and non-obese persons and Its Effect on neoplastic cells

Amir Ali Hamidieh^{1*}, Maryam Behfar¹, Rashin Mohseni², Alireza Shoaie-Hassani²

1. Department of Pediatric Stem Cell Transplantation, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Applied Cell Sciences and Tissue Engineering Department, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2017/11/15 Accept: 2017/12/12)

Abstract

Background: There are many types of leukocytes residing in subcutaneous adipose tissue among which Natural Killer cells (NKs) comprise a major part. The aim of the present study was to study the expression of natural cytotoxicity receptors from peripheral blood and adipose tissue derived NK cells from obese and non-obese persons on its effect on neoplastic cells.

Materials and methods: In the current experimental survey, flow cytometry phenotyping was used to study the differences between the natural cytotoxicity receptor expression on ADNKs and PBNKs of both obese (BMI>30) and lean persons (BMI<25). The activation experiments on isolated and expanded NKs were performed using IL-2, IL-15, and IL-21 cytokines. Also, their cytotoxicity and cytokine production patterns were evaluated.

Results: The activation experiments on NK cells revealed that the main population of the CD56^{dim} within the total ADNKs of obese persons had an under-expression of NKp30 and NKp44 despite the unchanged levels of NKG2D.

Conclusion: The data suggest the suppressive condition of the adipose tissue niche on the NKs response against sensitive neoplastic cells. As the NKs are the first line of the body's defense against tumor formation, this change may lead to the development of transformed cells into the tumors.

Keywords: Cancer; Cell Therapy; Natural Killer Cells; Stromal Vascular Fraction

*Corresponding author: Amir Ali Hamidieh
Email: aahamidieh@tums.ac.ir

بررسی عملکرد بیان پذیرنده‌های سایتوتوکسیسیته سلول‌های کشنده ذاتی خون محیطی و بافت چربی افراد چاق و غیرچاق در برابر سلول‌های سرطانی

امیر علی حمیدیه^{۱*}، مریم بهفر^۱، راشین محسنی^۲، علیرضا شعاع حسنی^۲

۱- بخش پیوند سلول‌های بنیادی خونساز کودکان، بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۸/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۱

چکیده:

سابقه و هدف: انواع مختلفی از لکوسیت‌ها مانند خون در بافت چربی نیز وجود دارند که در میان آن‌ها سلول‌های کشنده ذاتی (NK) بخش عمده‌ای را تشکیل می‌دهند. هدف از این پژوهش بررسی عملکرد بیان پذیرنده‌های سایتوتوکسیسیته سلول‌های NK در افراد چاق و غیرچاق و عملکرد آن‌ها در برابر سلول‌های سرطانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعیین فنوتیپ NKها با استفاده از فلوسایتومتری برای بررسی تفاوت‌های احتمالی بین پذیرنده‌های سایتوتوکسیسیته این سلول‌ها در افراد با شاخص توده بدنی کمتر از ۲۵ (افراد غیرچاق) و افراد با شاخص توده بدنی بیشتر از ۳۰ (افراد چاق) انجام شد. آزمایش‌های فعال‌سازی سلول‌های NK تکثیر شده در آزمایشگاه با استفاده از سایتوکاین‌های اینترلوکین ۲، ۱۵ و ۲۱ انجام شد. همچنین سمیت این سلول‌ها بر رده‌های سلول‌های سرطانی و الگوی تولید سایتوکاین توسط آن‌ها به ترتیب با روش‌های لاکتات دهیدروژناز و الیزا ارزیابی شد.

یافته‌ها: آزمایش‌های فعال‌سازی سلول‌های NK تکثیر شده در آزمایشگاه نشان داد که بخش اعظم جمعیت سلول‌های NK بافت چربی که CD۵۶ dim هستند در افراد چاق سالم ($BMI > 30$) بیان کمتری از $NKp30$ و $NKp44$ دارند در حالی که تغییری در میزان شاخص $NKG2D$ این سلول‌ها بین دو گروه دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر وضعیت سرکوب‌کنندگی ریز محیط بافت چربی روی پاسخ‌های سلول‌های کشنده ذاتی علیه سلول‌های توموری است که در شرایط معمولی نسبت به اثر ضد توموری NKها حساس هستند. از آنجا که سلول‌های NK اولین سد پاسخ ایمنی علیه تشکیل تومور در بدن هستند، چنین تغییری می‌تواند به تکثیر و گسترش سلول‌های بدخیم و تبدیل آن‌ها به تومور منجر شود.

واژگان کلیدی: بخش استرومایی - عروقی بافت چربی، سلول درمانی، سلول‌های کشنده ذاتی، سرطان

مقدمه:

چاقی دارای شرایط آسیب‌شناختی است که با رسوب بیش از حد چربی در بدن همراه است و امروزه یکی از مشکلات بزرگ سلامت جامعه محسوب می‌شود، زیرا یک فاکتور خطر مهم در انواعی از بیماری‌ها در سراسر جهان است. چاقی نه تنها گسترش بافت آدیپوز است، بلکه با سرایت آثاری از قبیل التهاب مزمن و هایپوکسی از این بافت به سایر نقاط بدن مرتبط است. بسیاری از تداخل‌های متابولیکی و ایمنی به وسیله شبکه‌ای از واسطه‌های محلول سیستم ایمنی و آدیپوسیت‌ها هماهنگ می‌شوند. آدیپوسیت‌ها منبع سایتوکاین‌های متنوعی شامل آدیپونکتین، لپتین، رزیستین و ویسفاتین هستند که به نظر می‌رسد واسطه‌های مهمی بین چاقی و اختلال‌های مختلف هستند (۷). چاقی

طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، در حال حاضر بیش از ۱/۵ میلیارد نفر در سراسر جهان اضافه وزن دارند و حدود ۶۰۰ میلیون نفر چاق محسوب می‌شوند (۱). در این وضعیت، شیوع برخی از سرطان‌ها و اختلال‌های ایمنی افزایش می‌یابد. چاقی باعث افزایش رشد آدیپوسیت‌ها و محدود شدن دسترسی به اکسیژن و مواد غذایی می‌شود (۲). چنین تنش‌هایی باعث فعال‌سازی سلول‌های پیش‌تهابی در بافت چربی می‌شود (۳). تعدادی از سلول‌های مختلف ایمنی شامل ماکروفاژها، اتوزینوفیل‌ها، سلول‌های کشنده ذاتی (NK)، سلول‌های NKT و سلول‌های T همگی در حفظ هوموستاز بافت چربی اهمیت دارند (۴-۶).

نویسنده مسئول: امیرعلی حمیدیه
پست الکترونیک: aahamidieh@tums.ac.ir

در این پژوهش به بررسی اهمیت ریزمحیط محل استقرار سلول‌های کشته‌دانی و مقایسه تغییر پذیرنده‌های سایتوتوکسیسته در افراد چاق و غیرچاق پرداختیم و علاوه بر تعیین میزان تغییرها در بیان پذیرنده‌های NKp۳۰, NKp۴۴, NKp۴۶ میزان سمیت سلول‌های NK از بافت‌های چربی و خون محیطی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌های کشته‌دانی این مطالعه تجربی به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران رسید. بافت چربی از داوطلبان چاق سالم با BMI بالاتر از ۳۰، گرفته شد و در گروه افراد غیر چاق، داوطلبین با BMI کمتر از ۲۵ وارد این مطالعه شدند. تمامی افراد وارد شده به این مطالعه (۷۰ نفر) از نظر آزمایش عوامل عفونی HIV, HBV, HCV, HTLV-1 و مایکوپلازما توبریکولوزیس چک شدند. همچنین فرم رضایتنامه در اختیار تمامی اهداکنندگان قرار گرفت. لیپواسپیراسیون با استفاده از تکنیک تامیست در هر دو گروه انجام شد. به اندازه ۲۰ میلی‌لیتر چربی از بافت زیرپوستی در ناحیه شکم از افراد چاق و تنها ۱۰ میلی‌لیتر چربی از اهداکنندگان غیرچاق بیوپسی شد و سلول‌های NK هم از خون محیطی و هم از این بافت چربی استخراج شد. در استخراج سلول‌های NK از خون محیطی جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون روی گرادیان فایکول انجام شد. در فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری میزان ۴ میلی‌لیتر از فایکول ریخته شد و سپس نمونه خون به آرامی از گوشه فالکن روی فایکول ریخته شد تا کاملاً لایه‌ای روی فایکول تشکیل شود. تمامی فالکن‌ها در ۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا لایه‌ای بین سرم و فایکول ایجاد شود که سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در آن قرار دارند. در استخراج از بافت چربی، نمونه‌ها توسط آنزیم کلاژناز دچار هضم آنزیمی شد (۲۵) تا بخش استرومایی - عروقی از بافت چربی جدا شود که این بخش حاوی سلول‌های تک هسته‌ای است. با قرار دادن این بخش استرومایی عروقی حامل سلول‌های تک هسته‌ای بر روی گرادیان فایکول، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰ g انجام شد و سلول‌های تک هسته‌ای از مخلوط سلول‌ها جدا شدند. با استفاده از روش جداسازی انتخاب منفی کیت تجاری میلنتی بایوتک برپایه MACS سلول‌های CD3+ از این مخلوط جدا شدند. سپس با استفاده از کیت جداسازی میکروبیدهای ضد CD56 این سلول‌ها به طور مستقیم جدا شدند تا خلوص جمعیت سلول‌های CD56 مثبت به حدود ۹۰ درصد برسد.

آزمایش ایمونوفنوتایپینگ:

در این آزمایش پنبلی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برضد CD3, CD4, CD16, CD56, Granzyme B, CD158b (KIR2DL2/3) (FITC conjugated; Biolegend, San Diego, CA, USA), NKp30 (CD337), NKp44 (CD336), NKp46 (CD335), NKG2D (CD314), CD244 (2B4) (PEcy5 conjugated; Becton, Dickinson and Company; Mountain View, CA, USA), CD107a (FITC conjugated; Pharmingen, San Diego, CA, USA) سلول‌های انسانی مهیا شدند و طبق پروتکل دستگاه FACS Calibur استفاده شدند (۸). به طور خلاصه رنگ‌آمیزی مارکرها به این صورت بود که سلول‌ها در بافت با فرسکس شست‌وشو و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اشاره شده در غلظت‌های یک به ۲۰، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به این سلول‌ها افزوده شد. در مرحله بعد سلول‌های NK به مدت ۹۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و در انتها پس از دوبار شست‌وشو در بافر فکس، نمونه با دستگاه خوانده شد و داده‌ها با نرم‌افزار Cell Quest آنالیز شدند (۲۲).

تکثیر و فعال‌سازی سلول‌های NK حاصل از خون محیطی و بافت چربی:

پس از جداسازی سلول‌های NK CD56+، تکثیر این سلول‌ها با Xvivo-20 (Lonza, Barcelona, Spain) medium به همراه ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله، ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی اینترلوکین ۲، ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر اینترلوکین ۱۲، ۵۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر اینترلوکین ۱۵ و در نهایت ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر اینترلوکین ۲۱ برای فعال شدن سلول‌ها اضافه شد.

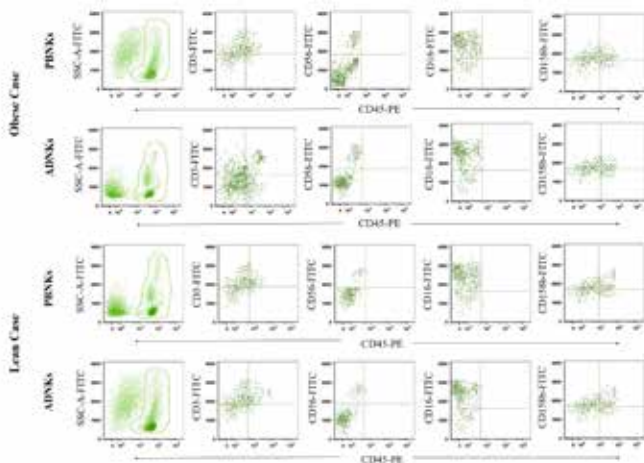
با فعال‌سازی مزمن سیستم ایمنی ذاتی، مقاومت به انسولین و دیابت همراه است. همچنین از عوامل مهم در پرفشاری خون، هایپرکلسترولمی، انواع تومور، بیماری‌های قلبی - عروقی، اختلال عملکرد ایمنی و سرعت بالای عفونت می‌باشد (۷).

سلول‌های کشته‌دانی با داشتن یک نقش قدرتمند تنظیمی، در تعادل سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی قادر به از بین بردن سلول‌های بدخیم هستند (۸). سلول‌های NK از پیش‌سازهای مغز استخوان منشاء می‌گیرند و وارد روند بلوغ می‌شوند که در این راه تحت تاثیر شبکه ترانوسی قرار گرفته و تغییرهای فنوتیپی را تجربه می‌کنند تا به دو زیرجمعیت کاملاً متمایز عملکردی CD56dim و بخش کوچک‌تر CD56bright تقسیم شوند (۹). این سلول‌ها توسط فاکتورهای محلولی از قبیل سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و لیگاند‌های ترشحی برای پذیرنده‌های NKها کنترل می‌شوند. به همین دلیل در طول زمان تنوع بسیار زیادی از گنجینه سلول‌های NK پدید آمده است (۱۰). پذیرنده‌های غالب در این سلول‌ها شامل مولکول‌های سیگنالینگ حاوی نواحی فعال بر پایه تایروزین (ITAM)، از قبیل پذیرنده‌های سایتوتوکسیسته ذاتی (NCR) مانند NKp۳۰, NKp۴۴ و NKp۴۶ هستند (۱۱). دشواری در فهم اساس بی‌پاسخی NKها در مواردی، بخصوص پدیده فرار تومور به بیان کم یا عدم بیان NCRها ارتباط دارد و شاید به سیگنال‌های مهاری مربوط باشد که هنوز شناسایی نشده‌اند. از این رو ریزمحیطی که سلول‌ها در آن قرار دارند به طور کارآمدی بر تکثیر و عملکرد جمعیت‌های مختلف NKها تاثیرگذار است. روشن کردن پلتفورم عملکرد سلول‌های کشته‌دانی شگفت‌انگیز خواهد بود چراکه به طور معمول این سلول‌ها اصول مربوط به سایر لنفوسیت‌ها را نقض می‌کنند. برخی پذیرنده‌های NK با شناسایی کمپلکس اصلی سازگاری بافتی نوع I (MHC-1) سلول‌های عادی را محافظت می‌کنند. سلول‌هایی که مقادیر ناچیزی از MHC-I را بیان می‌کنند (اغلب سلول‌های سرطانی) توسط سلول‌های NK مورد حمله قرار می‌گیرند (۱۲)، ولی سایر پذیرنده‌های فعال‌کننده روی NKها از قبیل NKG2D شبه لکتینی، می‌تواند سلول‌های NK را بدون لیگاند‌های MHC-I فعال کرد (۱۳). در حالی که اکثر پذیرنده‌های فعالگر برای لیگاند‌های غیر MHC-I که هم روی سلول‌های سالم و هم بدخیم ارائه می‌شوند، اختصاصی هستند (۱۴).

پذیرنده‌های شبه ایمونوگلوبولینی سلول‌های کشته‌دانی (KIR) شامل پذیرنده‌های مهاری عمده‌ای از قبیل KIR2DL1-3, KIR2DL5, KIR3DL1-3 هستند که مولکول‌های MHC کلاس یک را شناسایی می‌کنند (۱۵)، در حالی که پذیرنده‌های خانواده NKG2s توالی‌های سیگنالی MHC-I را می‌شناسند که به مولکول MHC غیر کلاسیک (HLA-A-E) متصل می‌شوند (۱۵). حتی تفاوت‌هایی در یک خانواده نیز بر فعالیت سایتولیتیک NKها تاثیرگذار است به طوری که NKG2A یک مولکول مهاری است در حالی که NKG2C باعث فعال شدن این سلول‌های کشته‌دانی می‌شود (۱۴).

سلول‌های کشته‌دانی می‌توانند وارد بافت‌های محیطی شوند و تنش‌های سلولی را شناسایی کنند. همچنین می‌توانند به تنش بافت چربی پاسخ داده و باعث التهاب و حتی مقاومت به انسولین شوند (۱۶). در این مسیر مکانیسم‌های گوناگونی از جمله فاکتور رشد انسولینی، هورمون‌های مشتق از سلول‌های چربی (مانند لپتین)، هورمون‌های استروئیدی، کموکاین‌ها و آدیپوکاین‌ها می‌توانند عملکرد NK را در این ریزمحیط تغییر دهند (۱۷).

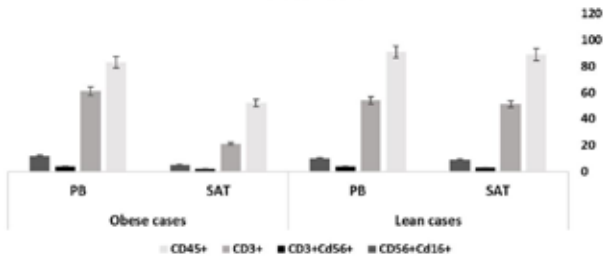
از طرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که یک درصد سلول‌های بافت چربی را تشکیل می‌دهند دارای اثر تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی هستند و می‌توانند عملکرد ایمنی را سرکوب کنند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از عملکرد سلول‌های T (۱۸ و ۱۹) و سلول‌های دندریتیک (۲۰) ممانعت می‌کنند. نقش تعدیل‌گری سیستم ایمنی سلول‌های حتی باعث استفاده بالینی از آن‌ها در درمان بیماری پیوند علیه میزبان پس از پیوند آلورن سلول‌های بنیادی خونساز شده‌است (۲۱). برخی مطالعه‌ها نشان می‌دهد که فنوتیپ فعال شده NK در بافت چربی احشایی وجود دارد که نشانگر نقش آن‌ها در بیماری‌های التهابی و متابولیک است (۲۲). این سلول‌ها سایتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل TNF- α و اینترفرون گاما تولید می‌کنند و در تنظیم ماکروفاژها برای ایجاد مقاومت به انسولین نقش دارند (۲۳).



شکل ۱) هیچ تفاوتی در میزان تکثیر سلول‌های کشته ذاتی در گروه‌های مختلف وجود نداشت (A). بیان هتروژن مولکول‌های چسبنده CD56، شاخص CD16 پذیرنده Fc و CD158b در ADNK و PBNK افراد چاق و مقایسه آن با افراد غیرچاق (B).

سلول‌های NK با شاخص‌های CD3+, CD56+ و CD3-, CD56+ در هر دو گروه تقریباً یکسان بود و سلول‌های NK ساکن در بافت چربی دارای الگوی فنوتیپی متفاوتی از سلول‌های NK خون محیطی بودند (شکل ۲).

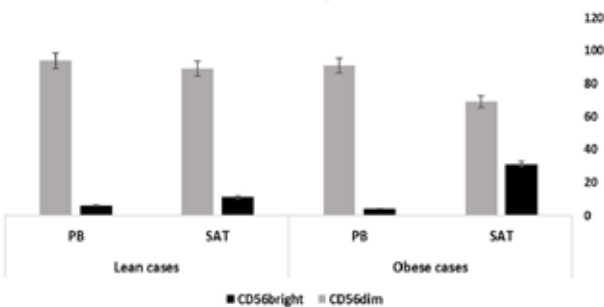
درصد جمعیت سلول‌ها نسبت به کل سلول‌های سیستم ایمنی در افراد چاق و غیرچاق



شکل ۲) درصد سلول‌های CD45+, CD16+, CD3+, CD56+ و CD45+ در افراد چاق و غیرچاق.

در بین این دو گروه تفاوت‌هایی نیز در میزان سلول‌های CD56dim و CD56bright در افراد چاق سالم و غیرچاق دیده شد (شکل ۳A). در افراد غیرچاق، جمعیت CD56dim موجود در بخش سلول‌های NK در بافت چربی کاهش نشان می‌داد و بالعکس در خون محیطی تعداد سلول‌های CD56dim بیشتر بود، در حالی که در افراد چاق جمعیت این سلول‌ها به سمت CD56bright متمایل بود. پرفورین و گرانزیم B دارای سطح یکسانی در جمعیت سلول‌های CD56dim در هر دو گروه ADNK و PBNK بودند در حالی که گرانزیم A در جمعیت ADNK به میزان دو برابر بیان شد ($p < 0.05$) (شکل ۳B).

درصد زیرجمعیت‌های سلول‌های کشته ذاتی در افراد چاق و غیرچاق



رده‌های سلول‌های توموری:

از دو رده سلولی نوروبلاستوم انسانی (ATCC-HTB11TM) SK-NSH و CHLA255 (DSMZ-Germany) در این مطالعه برای بررسی سایتوتوکسیسته سلول‌های NK مختلف استفاده شد. این سلول‌ها در محیط RPMI1640 به همراه ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین استرپتومایسین، دو میلی‌مول آل-گلوتامین و ۵ درصد سرم جنین گوساله در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. میزان سلول‌های زنده با روش تریپان بلو محاسبه شد.

میزان تولید سایتوکاین‌ها:

برای بررسی میزان تولید سایتوکاین‌های مهم $TNF\alpha$ و $IFN\gamma$ سلول‌های NK از هر دو منبع خون محیطی و بافت چربی در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. در هر چاهک ۱۰۰ هزار سلول NK با افزودن ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر IL-2 و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر IL-15 تکثیر شدند. پس از ۴ روز قابلیت حیاتی این سلول‌ها به روش تریپان بلو مشخص شد. مایع رویی تمام چاهک‌ها با سانتریفیوژ از سلول‌ها جدا شد و برای بررسی میزان کمی تولید $TNF\alpha$ و $IFN\gamma$ با استفاده از کیت الایزا (Abcam, Cambridge, MA, USA) استفاده شد. میزان تولید این سایتوکاین‌ها بر حسب نانوگرم در هر میلی‌لیتر از محیط سلول‌های NK گزارش شد.

سنجش سایتوتوکسیسته:

سلول‌های NK با دوز ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک به نسبت‌های ۱:۱، ۱:۱، ۱:۳ و ۵:۱ با سلول‌های هدف نوروبلاستومی به مدت ۴ ساعت در حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر انکوبه شدند. سایتوتوکسیک بودن سلول‌های NK توسط کیت سنجش لاکتات دهیدروژناز (Roche, Mannheim, Germany) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه محیط کشت پس از تیمار با نسبت‌های مذکور پس از ۴ ساعت جمع‌آوری شد و این محیط در شرایط به دور از نور وارد چاهک‌های تعبیه شده در کیت شده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس میزان جذب نوری برای سنجش رهایی لاکتات دهیدروژناز در محیط با استفاده از الایزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر طبق پروتکل سازنده کیت خوانده شد (۲۸). نتایج نیز برحسب درصد نسبت به گروه شاهد بیان شد.

آنالیز آماری:

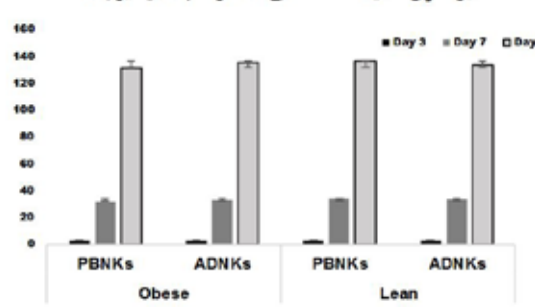
روش One way ANOVA برای بررسی تفاوت‌های بیان NCRهای سطحی سلول‌های NK پیش و پس از تکثیر سلول‌ها با استفاده از IL-2 استفاده شد. نتایج به‌صورت p -values < 0.05 معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج:

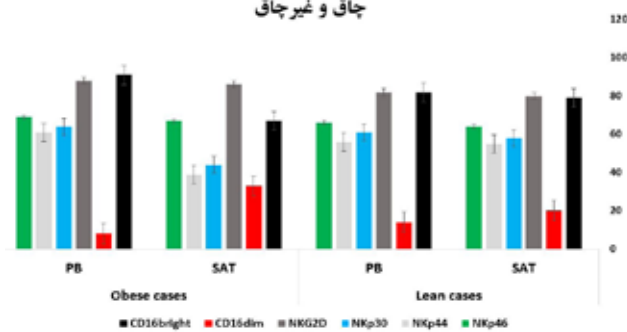
سلول‌های کشته ذاتی خون محیطی و بافت چربی:

با بررسی ۷۰ نمونه دخیل در آزمایش‌ها، هیچ‌گونه تفاوت معناداری در تکثیر این دو گروه از سلول‌های کشته ذاتی وجود نداشت (شکل ۱A). سلول‌های NK جدا شده از بافت چربی زیر پوست به دلیل بررسی مارکرهای سطحی آن‌ها در هر دو گروه مطالعه شده با شاخص‌های بدنی متفاوت با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شدند. همچنین وجود شاخص‌های گرانزیم CD158b، B و میزان بیان CD16 و CD56 اهمیت خاصی در این پژوهش داشت (شکل ۱B). میزان سلول‌های CD3+ و CD45+ در خون محیطی به مراتب بیشتر از جمعیت سلول‌ها در بخش استرومایی عروقی بافت چربی بود در حالی که فراوانی

تکثیر سلول‌های کشته ذاتی در افراد چاق و غیرچاق



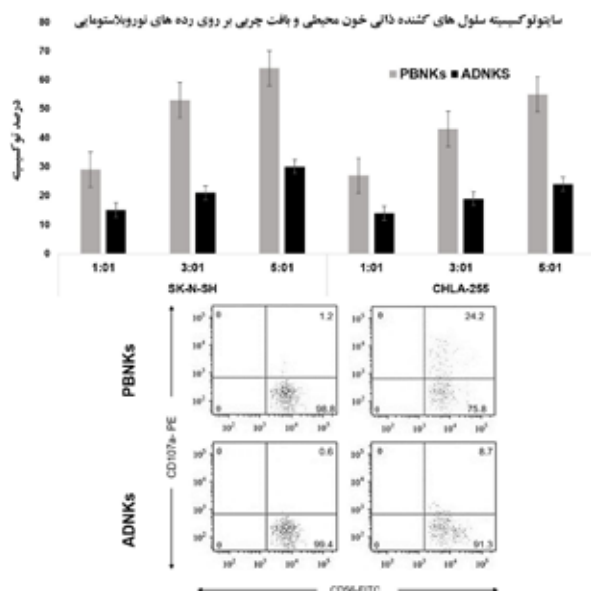
درصد شاخص های بیان شده بر سلول های کشته ذاتی در افراد چاق و غیر چاق



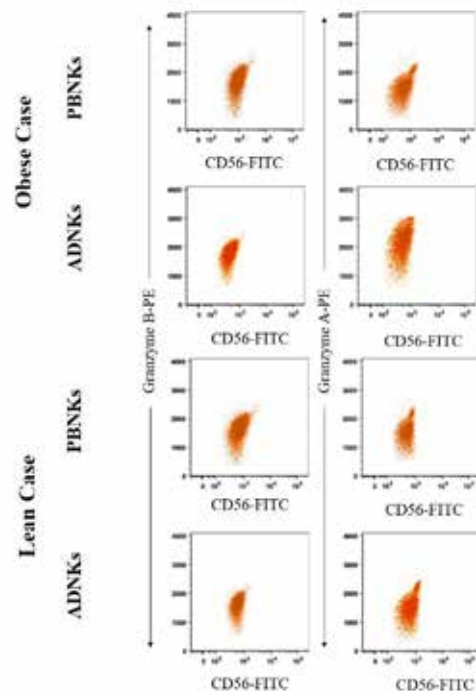
شکل ۵) نمودار نشان دهنده مقادیر NCR ها از تمامی نمونه‌ها در افراد چاق و غیر چاق که تفاوت معناداری را در بین گروه‌ها نشان می‌دهد (PB). (*p < 0.05): خون محیطی، SAT: بافت چربی زیر پوست).

سنجش سائیتوتوکسیسته سلول های NK:

داده های ما آشکار کرد که در افراد چاق، ADNK ها دارای فعالیت سائیتولیتیک ضعیف تری نسبت به PBNK ها علیه سلول های نتوبلاستیک به NKها حساس هستند. در صورتی که در افراد غیر چاق هیچ گونه تفاوت معناداری بین ADNK و PBNK وجود ندارد (شکل ۶). سلول های نتوبلاستی باعث القای بیان میزان بالای از NKp۴۴ در سلول های CD56dim می‌شوند، ولی در آزمایش های ما هیچ اثری از چنین افزایشی در ADNK های افراد با چاق مشاهده نشد (شکل ۵). همچنین نتایج فلوسائیتومتری نشان داد که سطح CD107a پس از کشت NKها با سلول های نوروبلاستومایی کاهش داشته است (شکل ۶ B). هنگامی که میزان دگرانوله شدن سلول های NK با بررسی الگوی بیان CD107a انجام شد، میزان بیان پایه آن در ADNK افراد غیر چاق ۱/۲ درصد بود در حالی که این میزان در افراد چاق به طور دقیق نصف آن یعنی ۰/۶ درصد سنجیده شد $p < 0.05$. برعکس پرفورین، گرانزیم B در هر دو گروه ADNK و PBNK به یک میزان بیان داشت، ولی جالب توجه است گرانزیم A به میزان دوبرابر بیان را در جمعیت ADNK نسبت به PBNK نشان داد $p < 0.05$ (شکل های ۳ B و ۶ B).

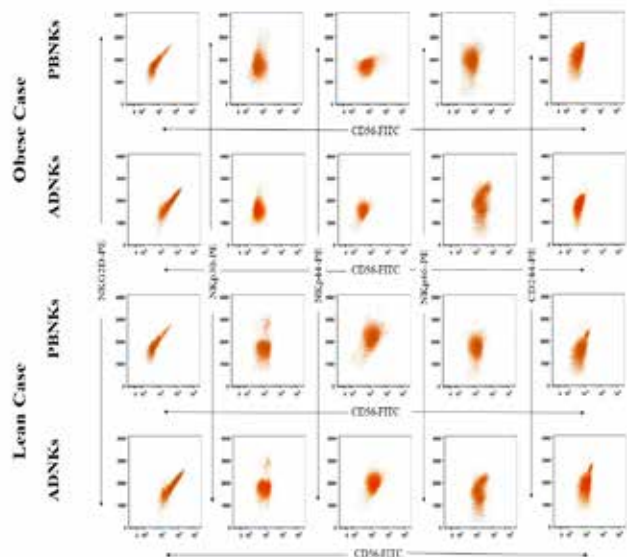


شکل ۶) سنجش سائیتوتوکسیسته ADNK در مقابل PBNK از افراد چاق و غیر چاق روی رده های سلولی SK-N-SH و CHLA-255 نوروبلاستومایی در نسبت های ۱:۱، ۳:۱، ۵:۱ (A). بیان مارکر CD107a که مارکر دگرانولاسیون سلول های NK است و پیش و پس از مجاور سازی با رده های نوروبلاستومایی اندازه گیری شده است. درصد سلول های CD107a+، CD3+، CD4+ در هر پلات نشان داده شده است (B).



شکل ۳) الگوی فنوتیپی CD56+ در سلول های NK هر دو گروه که تفاوت هایی را نشان می‌دهد و میزان سلول های CD56bright نیز در ADNK افزایش معناداری را نشان می‌دهد (A). دیاگرام فلوسائیتومتری سلول های NK در گروه های مختلف که نشان دهنده میزان بیان گرانزیم های A و B در این گروه هاست (B). تمامی نتایج نمایش داده شده از نظر آماری معنادار بوده $(p < 0.05)$ و تمامی آزمایش ها با سه تکرار انجام شد.

سطح بیان NKG2D که از مارکرهای فعال سازی سلول های NK است در تمامی گروه ها یکسان بود، ولی میزان بیان NKp۳۰ و NKp۴۴ در جمعیت ADNK افراد چاق کاهش معناداری را نسبت به افراد غیر چاق نشان داد $p < 0.05$ (شکل ۴). هیچ گونه کاهشی از بیان NKp۴۶ در هیچ کدام از گروه های مطالعه شده دیده نشد. میزان کمی بیان NCRها پس از تکثیر و فعال سازی سلول های NK در شکل ۵

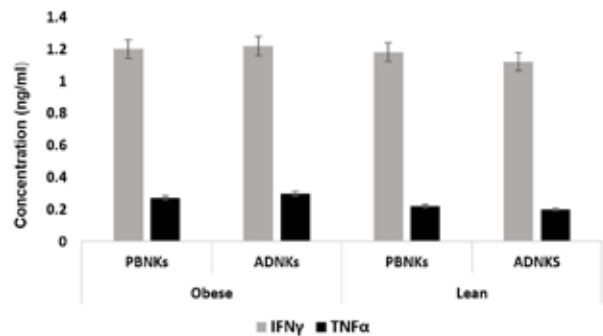


دیده می‌شود. شکل ۴) جمعیت سلولی غنی از CD56+ برای شناسایی پذیرنده های ذاتی سائیتوتوکسیک توسط PE رنگ آمیزی شده و با فلوسائیتومتری آنالیز شدند (PBNK: سلول های کشته ذاتی خون محیطی، ADNK: سلول های کشته ذاتی بافت چربی).

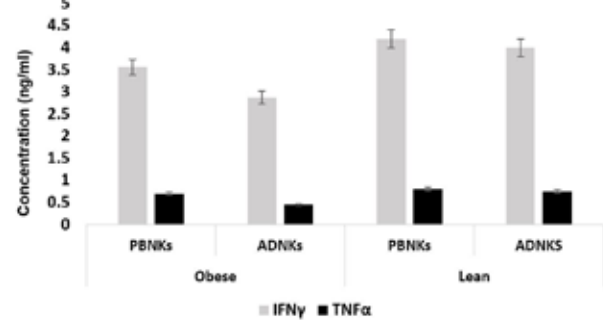
بیان سایتوکاین‌های NK در گروه‌های مختلف:

هنگامی که سلول‌های NK برخوردی با سلول‌های نوروبلاستومایی نداشتند، هیچ تفاوتی در منبع آن‌ها در گروه‌های مطالعه در بیان سایتوکاین‌ها وجود نداشت (شکل ۷ A). هنگامی که جمعیت‌های NK پیش از کشت با سلول‌های نئوبلاستیک نوروبلاستومایی با IL-21 تیمار شدند، این ریزمحیط بافت چربی بود که به میزان قابل توجهی از فعالیت سلول‌های NK ممانعت کرد (شکل ۶ A). و این سلول‌ها میزان بیان بسیار پایین‌تری از سایتوکاین‌های اینترفرون گاما و فاکتور نکروزدهنده توموری تا در تماس با سلول‌های نوروبلاستومایی نشان دادند (شکل ۷ B). حداکثر کاهش تولید این سایتوکاین‌ها مربوط به گروه ADNK از افراد چاق بود $p < 0.05$.

تولید TNF- α و IFN- γ از سلول‌های کشته ذاتی بدون فعال‌سازی



تولید TNF- α و IFN- γ از سلول‌های کشته ذاتی فعال شده توسط سایتوکاین‌ها



شکل ۷) نتایج نشان می‌دهد که القای سلول‌های NK تکثیر شده توسط IL-21 می‌تواند باعث فعال شدن آن‌ها شود. نتایج الیزا هیچ‌گونه تغییری در تولید سایتوکاین‌ها در نبود عامل محرک نشان نمی‌دهد (A) ولی کاهش سطوح IFN γ و TNF α در سلول‌های کشته ذاتی بافت چربی نسبت به سلول‌های خون محیطی معنادار است (B). تمامی نتایج نمایش داده شده از نظر آماری معنادار بوده ($p < 0.05$) و تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. (PBNK): سلول‌های کشته ذاتی خون محیطی، (ADNK): سلول‌های کشته ذاتی بافت چربی).

بحث و نتیجه‌گیری:

فعال‌سازی سلول‌های NK تکثیر شده در آزمایشگاه نشان داد که بخش اعظم جمعیت سلول‌های NK بافت چربی که CD56dim هستند در افراد چاق سالم ($BMI > 30$) بیان کمتری از NKp30 و NKp44 دارند در حالی که تغییری در میزان شاخص NKG2D این سلول‌ها بین افراد چاق و غیرچاق وجود ندارد. در این پژوهش خصوصیات فنوتیپی سلول‌های NK ساکن در بافت چربی زیرپوست در افراد چاق بررسی و با افراد غیرچاق مقایسه شد. این نکته نیز اهمیت دارد که بدانیم بافت چربی احشایی دارای تفاوت‌های زیادی با بافت چربی زیرپوستی از نقطه نظر بیان پروفایل ژنی و رفتاری است (۳۱). یافته‌های اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که چاقی عامل بیش از ۱۵ درصد از مرگ و میرها در افراد بالای ۴۰ سال در ایالات متحده است (۳۲). سلول‌های کشته ذاتی نیز جمعیتی از لنفوسیت‌ها هستند که وارد بافت چربی شده و برای تمام عمر در آن ساکن می‌شوند. از

آنجا که این سلول‌ها اولین سد ایمنی بدن علیه تشکیل تومورها هستند، تغییرات فنوتیپی در مارکرهای سطحی این سلول‌ها، پذیرنده‌های شبه ایمونوگلوبولینی سلول‌های کشته (KIR) و بیان پذیرنده‌های ذاتی سایتوتوکسیسته (NCRs) می‌تواند به پیشرفت سلول‌های ترانسفورم منجر شده به یک تومور گردد. از سوی دیگر عملکرد نادرست سلول‌های NK می‌تواند باعث خودایمنی شود. حضور این سلول‌ها در سایر بافت‌ها نیز ممکن است برای بلوغ برخی از آن‌ها لازم باشد که در مورد فنوتیپ سایتولیتیک این سلول‌ها وجودشان در خون محیطی لازم خواهد بود. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی از هورمون‌ها و سایتوکاین‌ها می‌توانند باعث غیرفعالی شدن NKها شوند. در سال ۲۰۰۶، Kim و همکاران متوجه شدند که آدیپونکتین تنظیم‌کننده کاهشی سایتوتوکسیسته سلول‌های NK است (۳۳) ولی هنوز کسی گزارشی از مکانیسم عمل آن ارائه ن داده است. در مطالعه ما تفاوت معناداری در تعداد سلول‌ها بین افراد چاق و غیرچاق دیده نشد (شکل ۱A) ولی تفاوت در این بود که سلول‌های استخراج شده از بافت چربی افراد چاق بیشتر جمعیت CD56bright بودند که این موضوع می‌توانست نشانگر عملکرد سایتوتوکسیک کمتر NKها در افراد چاق باشد، چرا که بیان CD16 در این سلول‌ها کاهش نشان می‌داد (شکل ۱B). در سال ۲۰۰۴، Dovic و همکاران فعالیت سلول‌های NK را در افراد با BMI بالاتر از ۳۶ بررسی کردند که از نظر تعداد و متابولیسم، این سلول‌ها تفاوتی با سلول‌های افراد غیرچاق نداشتند. آن‌ها بر این باور بودند که تنها در افراد چاق غیرسالم که ۸۰ درصد از افراد با شاخص توده بدنی بالاتر از ۳۶ را تشکیل می‌دهند سطوح NK پایین‌تر و فنوتایپ سلول‌ها متفاوت است (۳۴). در پژوهش ما که تنها ر روی افراد سالم داوطلب انجام شد، نتایج آزمایش‌های سایتوتوکسیسته روی رده‌های سلول‌های نوروبلاستومایی نشان از فعالیت سایتولیتیک ضعیف ADNKS افراد چاق در مقایسه با PBNK افراد داشت (شکل ۶ A). با افزایش BMI تعداد بیشتری از سلول‌های NK در این بافت چربی ساکن می‌شوند که به تدریج عملکرد خود را از دست داده و تا آخر عمر به سلول‌هایی غیر عملگر در بافت چربی تبدیل می‌شوند.

پاسخ به این سوال که چرا سلول‌های به دام افتاده در نیچ بافت چربی فعالیت سایتولیتیک خود را علیه سلول‌های نئوبلاستی از دست می‌دهند، شاید در این نکته نهفته باشد که در این بافت برهم‌کنشی میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی (ADSC) با سلول‌های NK رخ می‌دهد. بیش از ۱۵ سال از گزارش‌های وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت چربی می‌گذرد (۳۵). به احتمال زیاد این سلول‌های مزانشیمی بر ریزمحیط بافت چربی تاثیر زیادی دارند و نقش تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی را در این ریزمحیط پیرامون خود انجام می‌دهند (۳۶) که یا به دلیل تماس مستقیم سلول‌ها با هم است و یا توسط سایتوکاین‌های ترشح شده از آن‌ها مانند TGF β ، اینترفرون γ و اینترفرون α انجام می‌شود (۳۷). شایان ذکر است که شواهدی دال بر قدرت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نسبت به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (BMSC) وجود دارد. در سال ۲۰۰۹، Ivanova-Todorov و همکاران نشان دادند که ADSC به میزان بسیار بیشتری از BMSC قادر به مهار سلول‌های دندریتیک است (۳۸). پس از آن Spaggiari و همکاران بر مطالعه روی نقش اندولامین دی اکسیژناز و پروستاگلندین E2 در پروسه‌های تکثیر، فعال شدن، سایتولیز و تولید سایتوکاین توسط NKها متمرکز شدند (۳۹). به همین ترتیب Selmani و همکاران نشان دادند که ترشح HLA-G5 توسط سلول‌های مزانشیمی برای خاموش کردن عملکرد سلول‌های NK لازم است (۴۰). یکی از تغییرهای مهمی که در نتایج فلوسایتومتری ما دیده شد، کاهش بیان NKp30 و NKp44 بود. همان‌طور که می‌دانیم پذیرنده‌های کشته ذاتی NKp30 و NKp44 به طور ثابتی روی تمامی سلول‌های NK بیان می‌شوند ولی بیان NKp44 تنها پس از فعال شدن اتفاق می‌افتد. نتایج ما نشان‌دهنده سطوحی از NKp44 در سلول‌های NK تازه جدا شده از خون محیطی پس از فعال شدن با سایتوکاین‌ها بود که به طور معناداری در گروه ADNKS حاصل از افراد چاق کمتر از سایر گروه‌ها بود (شکل ۵). کاهش بیان NKp44 رابطه مستقیمی با بی‌پاسخی سلول‌های NK نسبت به سلول‌های نئوبلاستی دارد (شکل ۶ A). میزان بیان NKp44 در همه گروه‌ها

نیز می‌تواند پیامد مجاورت سلول‌های مزانشیمی در بافت چربی و تاثیر آن بر NK ها باشد. مطالعه‌های دیگری نیز نقش لپتین که توسط سلول‌های چربی تولید می‌شود را روی تولید سایتوکاین‌های سلول‌های NK بررسی شده‌اند. یافته‌های این پژوهش رابطه بین بافت چربی زیرپوست بدن انسان را با زیست‌شناسی سلول‌های NK آشکار می‌کند که این محیط می‌تواند تاثیر زیادی در ابتلا به بیماری‌های بدخیم و بیماری‌های متابولیک در افراد چاق داشته باشد. نقش سایر سلول‌ها و یا فاکتورهایی که میزان NCR ها را کاهش می‌دهند در دست تحقیق است و هنوز نیاز به زمان بیشتری دارد تا به طور کامل آشکار شد.

ملاحظات اخلاقی:

تمام روش‌های به کار رفته در آزمایش با سلول‌های انسانی، طبق اصول اخلاقی و کسب اجازه با رضایتنامه مکتوب از داوطلبین اهداکننده‌ای بوده که به دلیل دریافت خدمات زیبایی به کلینیک‌ها مراجعه کرده بودند.

منابع:

1. Obesity and Overweight. (2017). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* (2009) 29:1575–91. doi:10.1128/MCB.01300-08
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* (2006) 444:860–7. doi:10.1038/nature05485
4. Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* (2014) 37(5):365–71. doi:10.14348/molcells.2014.0074
5. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, et al. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* (2012) 37:574–87. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.016
6. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* (2011) 332:243–7. doi:10.1126/science.1201475
7. Ferrante AW. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* (2013) 3:34–8. doi:10.1111/dom.12154
8. Shoaee-Hassani A, Hamidieh AA, Behfar M, Mohseni R, Mortazavi-Tabatabaei SA, Asgharzadeh S. NK cell derived exosomes from NK cells previously exposed to neuroblastoma cells augment the antitumor activity of cytokine activated NK cells. *J Immunother* (2017) 40(7):265–76. doi:10.1097/CJI.0000000000000179
9. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* (1990) 76(12):2421–38.
10. Bezman NA, Kim CC, Sun JC, Min-Oo G, Hendricks DW, Kamimura Y, et al. The immunological genome project consortium molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat Immunol* (2012) 13:1000–9. doi:10.1038/ni.2395
11. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* (2008) 371(9612):569–78. doi:10.1016/S0140-6736(08)60269-X
12. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* (1990) 11:237–44. doi:10.1016/0167-5699(90)90097-S
13. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* (2001) 19:197–223. doi:10.1146

annurev.immunol.19.1.197

14. Fernández-Messina L, Reyburn H, Vales-Gomez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol* (2012) 3:299. doi:10.3389/fimmu.2012.00299

15. Dahlberg CIM, Sarhan D, Chrobok M, Duru AD, Alici E. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front Immunol* (2015) 6:605. doi:10.3389/fimmu.2015.00605

16. Wensveen FM, Jelencic V, Valentice S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* (2015) 16(4):376–85. doi:10.1038/ni.3120

17. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* (2006) 6(10):772–83. doi:10.1038/nri1937

18. Meisel R, Zibert A, Laryea M. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood* (2004) 103:4619–21. doi:10.1182/blood-2003-11-3909

19. Ghannam S, Pene J, Moquet-Torcey G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* (2010) 185(1):302–12. doi:10.4049/jimmunol.0902007

20. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* (2009) 113(26):6576–83. doi:10.1182/blood-2009-02-203943

21. Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of mesenchymal stem cell therapy for steroid-refractory acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* (2015) 10(8):e0136991. doi:10.1371/journal.pone.0136991

22. O'Rourke RW, Gaston GD, Meyer KA, White AE, Marks DL. Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism* (2013) 62(11):1557–61. doi:10.1016/j.metabol.2013.07.011

23. Lee BC, Kim MS, Pae M, Yamamoto Y, Eberle D, Shimada T, et al. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. *Cell Metab* (2016) 23:685–98. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.002

24. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S.

- adults. *N Engl J Med* (2003) 348(17):1625–38. doi:10.1056/NEJMoa021423
25. Amirkhani MA, Mohseni R, Soleimani M, Shoaie-Hassani A, Nilforoush-zadeh MA. A rapid sonication based method for preparation of stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells from fat tissue. *Bioimpacts* (2016) 6(2):99–104. doi:10.15171/bi.2016.14
26. Abeles D, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Manakkat Vijay GK, et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14hi/CD16neg monocytes: expansion of CD14hi/CD16pos and contraction of CD14lo/CD16pos monocytes in acute liver failure. *Cytometry* (2012) 81:823–34. doi:10.1002/cyto.a.22104
27. Shoaie-Hassani A, Keyhanvar P, Seifalian AM, Mortazavi-Tabatabaei SA, Ghaderi N, Issazadeh K, et al. lambda Phage nanobioparticle expressing apoptin efficiently suppress human breast carcinoma tumor growth in vivo. *PLoS One* (2013) 8(11):e79907. doi:10.1371/journal.pone.0079907
28. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One* (2011) 6(11):e26908. doi:10.1371/journal.pone.0026908
29. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* (2003) 101:3052. doi:10.1182/blood-2002-09-2876
30. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, et al. Nkp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of Nkp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* (1999) 29:1656–66. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-1
31. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* (2004) 12:1217–22. doi:10.1038/oby.2004.153
32. Masters RK, Reither EN, Powers DA, Yang YC, Burger AE, Link BG. The impact of obesity on US mortality levels: the importance of age and cohort factors in population estimates. *Am J Public Health* (2013) 103:1895–901. doi:10.2105/AJPH.2013.301379
33. Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, Cho DH, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* (2006) 176(10):5958–64. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5958
34. Dovic A, Caramello V, Masera RG, Sartori ML, Saba L, Tinivella M, et al. Natural killer cell activity and sensitivity to positive and negative modulation in uncomplicated obese subjects: relationship to leptin and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2004) 28:894–901. doi:10.1038/sj.ijo.0802639
35. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* (2001) 7(2):211–28. doi:10.1089/107632701300062859
36. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* (2004) 103(12):4619–21. doi:10.1182/blood-2003-11-3909
37. Elman JS, Li M, Wang F, Gimble JM, Parekkadan B. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J Inflamm (Lond)* (2014) 11:1. doi:10.1186/1476-9255-11-1
38. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* (2009) 126:37–42. doi:10.1016/j.imlet.2009.07.010
39. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* (2008) 111:1327–33. doi:10.1182/blood-2007-02-074997
40. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* (2008) 26:212–22. doi:10.1634/stemcells.2007-0554
41. Seidel E, Glasner A, Mandelboim O. Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition. *Cell Mol Life Sci* (2012) 69:3911–20. doi:10.1007/s00018-012-1001-x
42. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, et al. Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* (1999) 189(5):787–96. doi:10.1084/jem.189.5.787
43. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* (1998) 187:2065–72. doi:10.1084/jem.187.12.2065
44. Spits H, Artis D, Colonna M, Dieffenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(2):145–9. doi:10.1038/nri3365
45. Poggi A, Massaro AM, Negrini S, Contini P, Zocchi MR. Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells: role of natural cytotoxicity receptors. *J Immunol* (2005) 174(5):2653–60. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2653
46. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* (2012) 33(3):136–43. doi:10.1016/j.it.2011.11.004