مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آبان ۱۴۰۰، دوره ۷۹، شماره ۸، صفحه‌های ۵۹۳ تا ۶۰۰ مقاله اصیل

# اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در القا بیان مولکول PD-L1 در لنفوسیت‌های طحالی

بهاره حسنی کارمزدی[1]، علیرضا مردمی[2]، سعید عابدیان کناری[2*]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲- گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

## چکیده

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

***زمینه و هدف:*** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جمله سلول‌های استرومایی غیرخونساز می‌باشند که با فعالیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی در درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن و خودایمن کاربرد دارند. با توجه به محدودیت‌های استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ، استفاده از سلول‌های بنیادی آلوژن رویکرد درمانی امیدبخشی در درمان بیماری‌های ایمونولوژیک می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی توانایی سلول بنیادی مزانشیمی آلوژن در القا PD-L1 در سطح لنفوسیت‌های آلوژن و ارزیابی تولرژنیسیته سلول‌های حاصل می‌باشد.

***روش بررسی:*** این مطالعه از بهمن ۱۳۹۷ تا آذر ۱۳۹۹ در گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده مغز استخوان‌های ران و درشت نی موش C57 را با سلول‌های طحالی آلوژن مجاور کرده و پس از ۷۲ ساعت میزان بیان PD-L1 را در سطح لنفوسیت‌های طحالی با استفاده از فلوسایتومتری سنجیدیم. همچنین میزان سایتوکین‌های IFN-γ و IL-10 در سوپرناتانت کشت سلولی اندازه‌گیری شد. سپس سلول‌های مزبور را به‌عنوان محرک در واکنش لنفوسیتی مختلط با سلول‌های طحالی موش C57 مواجه کرده و میزان تکثیر توسط تست CFSE ارزیابی گردید.

***یافته‌ها:*** میزان لنفوسیت‌های +PD-L1 پس از مجاورت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن به شکل قابل‌توجهی افزایش یافت. مقدار سایتوکین‌های IFN-γ و IL-10 در سوپرناتانت نیز افزایش معناداری داشت. سلول‌های مذکور در واکنش لنفوسیتی مختلط موجب کاهش تکثیر سلول‌های طحالی آلوژن به نسبت گروه کنترل گردیدند.

***نتیجه‌گیری:*** سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن با القا مولکول PD-L1 در سطح لنفوسیت‌ها، موجب شکل‌گیری سلول‌های تولرژنیکی می‌شوند که می‌تواند موجب کاهش پاسخ‌های آلوژنیک گردد.

***کلمات کلیدی:*** سلول بنیادی مزانشیمی، مرگ برنامه‌ریزی شده، تولرانس.

*نویسنده مسئول: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده فرح‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک.
تلفن: ۳۳۵۴۳۸۲۷-۰۱۱
E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells, MSC) از جمله سلول‌های استرومایی چندتوان (Multipotent) می‌باشند که عموما در مغز استخوان یافت می‌شوند. این سلول‌ها دارای توانایی خودنوسازی (Self-renewality) و تمایز (Differentiation) به انواع رده‌های سلولی از جمله استئوسیت، کندروسیت، آدیپوسیت و میوسیت می‌باشند.[1و2] این سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف به تنظیم پاسخ‌های ایمنی می‌پردازند. به‌نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق تماس سلول به سلول و همچنین ترشح



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]

فاکتورهای مختلف رشد (همچون HGF و VEGF)، سایتوکین‌ها (مانند IL-10 و TGF-β)، کموکاین‌ها (نظیر CCL2 و CCL8) و پروتئازهای مختلف (مثل ماتریکس متالوپروتئازها) سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.[۳]

در مطالعات متعدد مهار تکثیر و عملکرد سلول‌های B و T، سلول‌های دندریتیک (DC) و سلول‌های طبیعی کشنده (NK) توسط MSCها گزارش شده است.[٤و٥] از جمله مهمترین مولکول‌های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت تعدیل سلول‌های سیستم ایمنی می‌توان PD-L1، TGF-β، HLA-G و Galectins را نام برد. مطالعات گوناگونی که به بررسی نقش MSCها در محیط تومور می‌پردازد، نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی نه تنها با بیان مولکول‌های کمک مهاری PD-L1 و PDL-2 به مهار پاسخ‌های ایمنی کمک می‌کنند، بلکه موجب افزایش بیان این لیگاندها در سطح سلول‌های سرطانی و سلول‌های ایمنی از جمله سلول‌های T، ماکروفاژها و DCها می‌گردند.[٦-۹] Programmed death-ligand 1 یا CD-274 از خانواده B7 و یک مولکول غشا گذر می‌باشد که غالبا توسط DCها، B cellها، T cellها و ماکروفاژها بیان می‌شود.[۱۰-۱۲]

سیگنالینگ PD-L1 از طریق گیرنده PD-1 موجب مهار سلول‌های T آلوریکتیو (Alloreactive T cells) و القا سلول T تنظیمی می‌گردد. علیرغم تمامی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی که این سلول‌ها را کاندید مناسبی جهت سلول درمانی می‌نماید، استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی اتولوگ محدودیت‌هایی را نیز در پی دارد. جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی با کیفیت و کمیت مطلوب از افراد مختلف مشکل می‌باشد. افزایش سن و یا بیماری‌های زمینه‌ای مانند آرتریت روماتویید و دیابت ویژگی‌های ذاتی MSCها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و موجب نقص در ویژگی‌های محافظتی این سلول‌ها می‌گردند.[۱۳و۱٤]

بنابراین توجهات به سمت استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی آلوژن معطوف گردیده است. با توجه به اهمیت مولکول PD-L1 در القا تولرانس و لزوم استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن در بالین، در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان مولکول PD-L1 در سطح لنفوسیت‌های آلوژن و ارزیابی ایمونوژنیسیتی سلول‌های به دست آمده پرداختیم.

## روش بررسی

موش: در این مطالعه از موش‌های سوری نژاد BALB/c (H-2d) و C57 (H-2b) ماده ۱۲-۸ هفته‌ای استفاده شده است. این حیوانات از انیستیتیو پاستور تهران خریداری شده و در مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم آزمایشگاهی مازندران نگهداری گردیدند. این حیوانات در قفس‌های خود با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری و تحت شرایط محیطی استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای $^{\circ}C$ ۲۵-۲۰ و رطوبت ۱۰٪±۵۰٪) قرار گرفتند. آزمایشات با توجه به دستورالعمل‌های کمیته کنترل و نظارت بر حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق حیوانات انجام شده است.

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی: سلول بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان‌های فمور و تیبیا موش‌های C57 ماده ۱۲-۸ هفته‌ای طبق پروتکل Soleimani & Naderi جدا شدند.[۱۵] به‌طور خلاصه، مغز استخوان‌های مذکور با استفاده از محیط کشت low glucose DMEM (Gibco, UK) به‌روش فلاشینگ استخراج شده و سلول‌های استحصالی پس از دو بار شست و شو با PBS، در غلظت $۲۵\times۱۰^{٦}$ سلول/میلی‌لیتر به محیط Low glucose DMEM به همراه 10% FBS (Gibco, UK) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, UK) منتقل شدند. سلول‌های جداشده از مغز استخوان در پلیت کشت سلول ۹۵ میلی‌متری کشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت کشت سلول‌ها در در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ در انکوباتور $CO_2$ دار، سلول‌های شناور و غیرچسبان را خارج کرده و کشت سلول‌های چسبان را ادامه می‌دهیم. فرآیند تعویض محیط هر دو روز یک بار تا رسیدن به تراکم بالای ۷۰٪ انجام می‌گیرد. سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین دارای ۰/۲۵٪ EDTA از کف پلیت جدا شده و جهت پاساژ به فلاسک بعدی منتقل می‌شود. پس از دو الی سه بار پاساژ متوالی این سلول‌ها، به جمعیت هموژنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل چسبنده دست یافتیم.

جداسازی سلول‌های طحالی: پس از خارج کردن طحال از بدن موش در شرایط استریل، طحال به پتری دیش حاوی محیط کشت RPMI (Gibco, UK) به‌همراه FBS ۱۰٪ و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین منتقل شده و سلول‌ها به روش پرفیوژن از طحال جدا می‌گردند. به‌طور خلاصه، روی کپسول اطراف طحال چندین سوراخ با سرنگ



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]

ایجاد می‌شود و با تزریق مکرر و پرفشار محیط کشت به درون طحال، سلول‌های طحال از سوراخ‌های ایجاد شده خارج می‌گردند. این کار تا خروج کامل سلول‌های طحال و سفید شدن کپسول اطراف طحال ادامه می‌یابد. پس از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی، ۵ ml از محلول لیز RBC ( NH4Cl:8.024 g/L, KHCO3: 1 g/L, EDTA (Na2): 0.37 g/L) را به توده سلولی اضافه کرده و پنج دقیقه روی یخ انکوبه می کنیم. سپس با افزودن ۲۰ تا ۳۰ میلی‌لیتر PBS فرآیند لیز را خنثی می‌کنیم. پس از شست‌وشو، توده سلولی حاصل را در محیط کامل RPMI حل کرده و با استفاده از تریپان بلو شمارش سلولی انجام می‌دهیم.

ارزیابی میزان بیان PD-L1 در سطح سلول‌های طحالی پس از مجاورت با سلول بنیادی مزانشیمی: به‌منظور بررسی توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القا PD-L1 در سلول‌های طحالی آلوژن، MSCهای موش C57 با سلول‌های طحالی موش BALB/c (H-2d) به نسبت ۱:۱۰ به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور CO2 دار انکوبه شدند. پس از ۷۲ ساعت سلول‌های رویی گردآوری شده و پس از شست‌وشو با آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-mouse H-2Kd-PerCP/Cyanine5.5 و Anti-mouse PDL1-PE (Biolegend- USA) و ایزوتایپ مربوطه رنگ‌آمیزی شدند و برای خوانش با دستگاه فلوسایتومتری (Partec, Germany) آماده گردیدند.

اندازه‌گیری غلظت IL-10 و IFN-γ در سوپرناتانت: اندازه‌گیری میزان سایتوکین‌های IL-10 و IFN-γ در سوپرناتانت کشت همزمان MSC و سلول‌های طحالی به‌روش الایزا با استفاده از کیت‌های شرکت کارمانیا پارس ژن (KPG, Kerman, Iran) مطابق با دستوالعمل کیت انجام شد.

واکنش لنفوسیتی مختلط (Mixed lymphocyte reaction): به‌منظور بررسی توانایی لنفوسیت‌های مجاور شده با MSC در القا تولرانس، این لنفوسیت‌ها را در واکنش MLR با سلول‌های طحالی آلوژن مجاور کردیم. بدین منظور جهت ارزیابی ظرفیت تکثیری سلول‌های طحالی C57 (پاسخ‌دهنده)، آنها را توسط ماده CFSE (Invitrogen, USA) نشان دار کرده و به نسبت ۱۰:۱ با سلول‌های طحالی مجاور شده با MSC (محرک) و یا سلول‌های طحالی بکر BALB/c در پلیت ۹۶ خانه کشت دادیم. پس از گذشت ۹۶ ساعت سلول‌ها برای خوانش با دستگاه فلوسایتومتری گردآوری شدند.

جهت آنالیز آماری داده از Unpaired t-test و Unpaired ANOVA test استفاده شد. داده‌های نرمال به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار نمایش داده شد و مقادیر P<۰/۰۵ مبنای معناداری در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از Graphpad prism software version 9 و FlowJo-V10 انجام گردید.

## یافته‌ها

تاثیر سلول بنیادی مزانشیمی بر میزان بیان PD-L1 در سلول‌های طحالی آلوژن: سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان در پاساژ پنجم به جمعیت هموژن و یک دستی از سلول‌های دوکی شکل چسبیده به فلاسک در می‌آیند که شکل تیپیک سلول بنیادی مزانشیمی می‌باشد (شکل ۱).

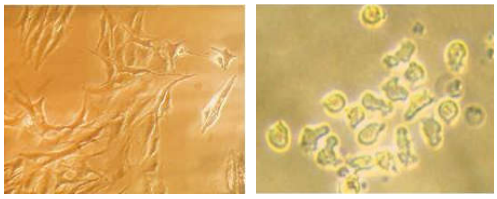
به‌منظور ارزیابی توانایی سلول بنیادی مزانشیمی در القا PD-L1 در سطح لنفوسیت‌ها، این سلول‌ها را به‌مدت ۷۲ ساعت با سلول‌های طحالی آلوژن مجاور کردیم. پس از ۷۲ ساعت سلول‌های شناور گردآوری شده و با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-mouse H-2Kd-PerCP/Cyanine5.5 و Anti-mouse PDL1-PE رنگ‌آمیزی شدند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان لنفوسیت‌های PD-L1+ پس از مواجهه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به‌نسبت سلول‌های بدون مواجهه افزایش معناداری داشته است (P=۰/۰۰۱) (شکل ۳).

مقایسه سطوح اینترفرون گاما و اینترلوکین-۱۰ پیش و پس از مجاورت با سلول بنیادی مزانشیمی: غلظت این دو سایتوکین در سوپرناتانت کشت هم زمان سلول بنیادی مزانشیمی و سلول طحالی آلوژن با تکنیک الایزا مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که نتایج نشان می‌دهد مجاورت با سلول بنیادی مزانشیمی موجب افزایش غلظت این دو سایتوکین می‌گردد (شکل ٤ و ٥).

تاثیر لنفوسیت‌های مجاور شده با سلول بنیادی مزانشیمی در تکثیر سلول‌های طحالی آلوژن در واکنش لنفوسیتی مختلط: به جهت بررسی آلوژنیسیتی لنفوسیت‌های مجاور شده با سلول بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها در واکنش لنفوسیتی مختلط با سلول‌های طحالی آلوژن مواجه شده و میزان تکثیر به‌وسیله CFSE سنجیده شد. همانطور که نتایج نشان می‌دهد تکثیر سلول‌های طحالی C57 در حضور لنفوسیت‌های BALB/c مجاور شده با سلول بنیادی مزانشیمی،

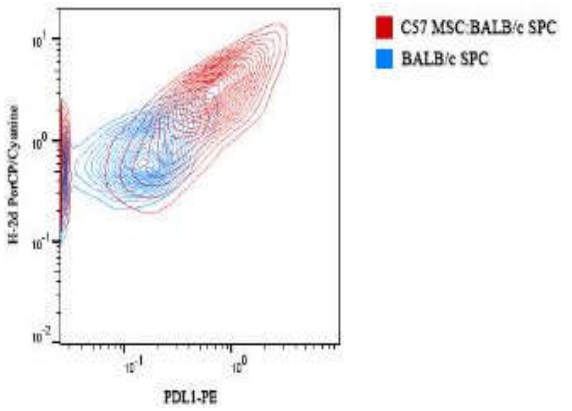


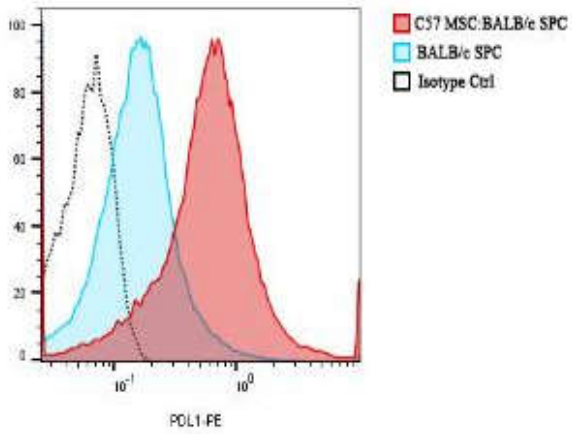
[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]



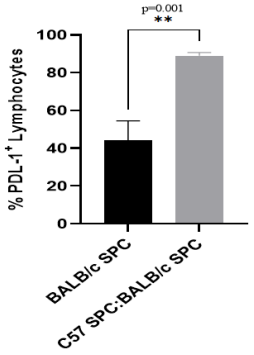
الف ب

**شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان موش C57. تغییر شکل این سلول‌های از پاساژ پنجم مشهود است.** الف) سلول‌های جداشده از مغز استخوان در روز چهارم. ب) سلول‌ها پس از پاساژ پنجم (×۴۰۰)

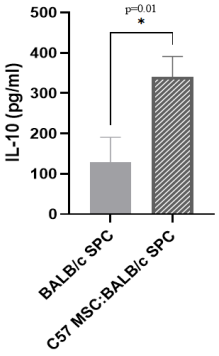


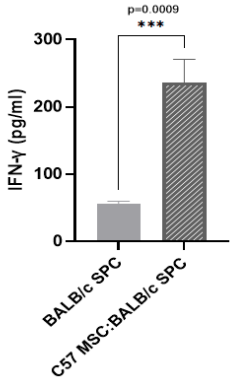

**شکل ۲: مقایسه میزان بیان PD-L1 در سطح سلول‌های طحالی BALB/c پیش و پس از مجاورت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی C57 (SPC: سلول طحالی)**




**شکل ۳: درصد لنفوسیت‌های BALB/c بیان‌کننده PD-L1 پیش و پس از مجاورت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی C57 (SPC: سلول طحالی)**



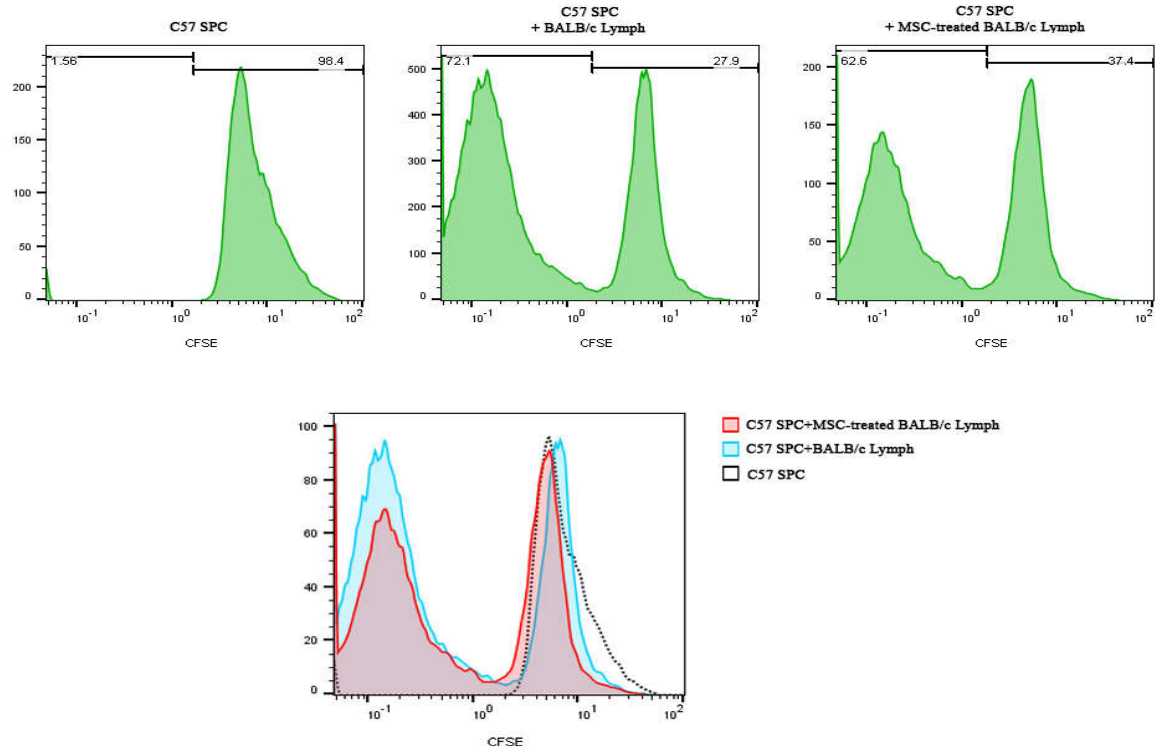

**شکل ٤: غلظت اینترلوکین ۱۰ در سوپرناتانت کشت همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی C57 و سلول‌های طحالی BALB/c (SPC: سلول طحالی)**



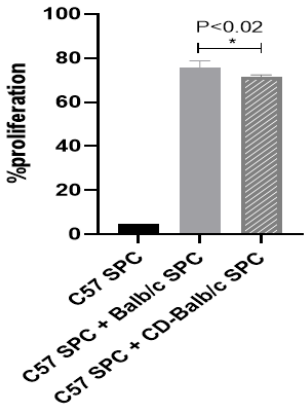

**شکل ۵: غلظت اینترفرون گاما در سوپرناتانت کشت همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی C57 و سلول‌های طحالی BALB/c (SPC: سلول طحالی)**



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]




**شکل ٦: مقایسه میزان تکثیر سلول‌های طحالی C57 در مواجهه با لنفوسیت‌های BALB/c بکر و یا مجاور شده با سلول بنیادی مزانشیمی**




**شکل ۷: درصد تکثیر سلول‌های طحالی C57 در مواجهه با لنفوسیت‌های BALB/c بکر و یا مجاور شده با سلول بنیادی مزانشیمی**

کمتر از زمانی است که این سلول‌ها با لنفوسیت‌های بکر مواجهه داشته‌اند (P=۰/۰۲) (شکل ٦ و ۷).

## بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزون‌بر توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را نیز تعدیل می‌کنند. اگرچه مطالعات بسیاری نقش MSC را در مهار سلول‌های ایمنی بررسی کرده‌اند، اما محدودیت‌های استفاده از سلول‌های اتولوگ و چالش‌های استفاده از MSCهای آلوژن در بالین، محققین را به شناخت دقیق‌تر مکانیسم‌های مسئول در سرکوب ایمنی توسط این سلول‌ها واداشته



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]

است. مطالعه حاضر نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی القا مولکول مهاری PD-L1 را در سطح لنفوسیت‌های طحالی آلوژن دارند. سلول‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط مطالعه توانسته‌اند نسبت به سلول‌های بکر، ایمنی‌زایی کمتری داشته باشد و موجب کاهش تکثیر سلول‌های آلوژن شود. از جمله مولکول‌های مهاری مهم در سطح سلول بنیادی مزانشیمی PD-L1 می‌باشد. مطالعات در حوزه سرطان‌شناسی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزون‌بر بیان مولکول PD-L1، می‌توانند موجب افزایش بیان این مولکول در سطح سلول‌های سرطانی، سلول‌های T و ماکروفازها گردند.[۱۶،۸]

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تعداد سلول‌های بیان‌کننده مولکول PD-L1 پس از مجاورت با MSC به‌طور معناداری بالاتری از سلول‌های بدون مواجهه می‌باشد (P=۰/۰۰۱). این داده‌ها می‌تواند نشان‌دهنده این حقیقت باشد که یکی از مکانیسم‌های اعمال تولرانس توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن القا بیان PD-L1 در سطح لنفوسیت‌ها از جمله سلول‌های B و T می‌باشد. همان‌طور که سلول‌های مجاور شده با MSC در واکنش مختلط لنفوسیتی نیز آلوژنیسیتی کمتری داشته و موجب کاهش تکثیر سلول‌های طحالی آلوژن به نسبت سلول‌های بکر شدند (P=۰/۰۰۲). احتمالا PD-L1 بیان شده در سطح لنفوسیت‌ها با اتصال به مولکول PD-1 سطح لنفوسیت‌های آلوژن روی آنها تاثیر گذاشته و منجر به کاهش تکثیر سلول‌های آلوژن گردند. Moravej و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با القا بیان PD-L1 در سطح DCها موجب شکل‌گیری DCهای تولرژنیکی می‌شوند که کاهش تکثیر سلول‌های T و ترشح IL-2 را به‌دنبال دارد.[۱۱] Diskin و همکاران نشان داده‌اند که PD-L1+ T cellها با اتصال به مولکول PD-1 سطح T cellهای مجاور موجب مهار فعالیت سایر سلول‌های T و کاهش پلاریزاسیون به سمت Th1 می‌گردند. سیگنالینگ PD-L1 در سلول‌های T CD8+ موجب ایجاد فنوتیپ T-bet−IFN-γ− در این سلول‌ها می‌شود که می‌تواند به اندازه سیگنالینگ PD-1 مهاری باشد.[۱۷] فاکتورهای محلول متعددی از جمله TGF-β، پروستاگلاندین E2 (PGE2)، فاکتور رشد کبدی (HGF)، اندول دی‌اکسیژناز (IDO)، نیتریک اکساید (NO) و IL-10 اثرات تنظیمی MSC را واسطه‌گری می‌کنند.[۲۱-۱۸] همینطور که در این مطالعه نیز نشان داده شد IL-10 در سوپرناتانت کشت همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن با سلول‌های طحالی افزایش می‌یابد (P=۰/۰۱). اما میزان سایتوکین پیش‌التهابی IFN-γ نیز در سوپرناتانت افزایش یافته می‌باشد (P=۰/۰۰۰۹). مطالعات مختلفی نشان داده است که IFN-γ نه تنها موجب از بین رفتن ویژگی‌های ایمونوساپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمی‌شود بلکه برای عملکرد این سلول‌ها ضروری می‌باشد.[۲۲،۲۳] Sheng و همکاران گزارش کرده‌اند که IFN-γ موجب افزایش مولکول PD-L1 در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی و افزایش قدرت مهاری این سلول‌ها می‌گردد. به‌طوری‌که کشت هم زمان سلول‌های مزانشیمی با T cellهای جداشده از موش IFN-γ ناک اوت (IFNγ−/−) موجب کاهش بسیار چشمگیری در مهار تکثیر سلول‌های T توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌گردد.[۲۲]

*سپاسگزاری*: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی کارآیی اسپلنوسیت‌های Cross dress شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القا تولرانس نسبت به پیوند پوست آلوژنیک درمدل موشی" در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی پزشکی در سال ۱۳۹۹ و کد ۵۲۲۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی مازندران اجراشده است.

## References

1. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol* 2015;6:560.
2. Ranjbaran H, Abediankenari S ,Mohammadi M ,Jafari N ,Khalilian A, Rahmani Z.et al. Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: Isolation and characterization. *Acta Medica Iranica* 2018; 56(1):28-33.
3. Cortinovis M, Casiraghi F, Remuzzi G, Perico N. Mesenchymal stromal cells to control donor-specific memory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2015;20(1):79-85.
4. Ho MS, Mei SH, Stewart DJ. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis. *J Cell Physiol* 2015;230(11):2606-17.
5. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+ T cells proliferation. *Iran Biomed J* 2011;15(1-2):1-5.
6. O'Malley G, Treacy O, Lynch K, Naicker SD, Leonard NA, Lohan P, et al. Stromal Cell PD-L1 Inhibits CD8+ T-cell Antitumor Immune Responses and Promotes Colon Cancer. *Cancer Immunol Res* 2018;6(11):1426-41.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]

7. Aboulkheyr Es H, Bigdeli B, Zhand S, Aref AR, Thiery JP, Warkiani ME. Mesenchymal stem cells induce PD-L1 expression through the secretion of CCL5 in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2021;236(5):3918-28.
8. Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells* 2017;35(3):766-76.
9. Biswas S, Mandal G, Chowdhury SR, Purohit S, Payne KK, Galindo CMA, et al. Mesenchymal stem cells educate breast tumor associated macrophages to acquire increased immunosuppressive features. *Am Assoc Immnol*; 2019.
10. Abediankenari S, Eslami MB, Sarrafnejad A, Mohseni M, Larijani B. Dendritic cells bearing HLA-G inhibit T-Cell activation in type 1 diabetes. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2007:1-8.
11. Moravej A, Karimi MH, Geramizadeh B, Azarpira N, Zarnani AH, Yaghobi R, et al. Mesenchymal Stem Cells Upregulate the Expression of PD-L1 But Not VDR in Dendritic Cells. *Immunol Invest* 2017;46(1):80-96.
12. Jung H-G, Ahn E-K, Lee J-H, Kim Y-H, Leem S-H, Heo J, et al. Effects of harvesting sites and ages on adipose tissue-derived stem cells in rat. *Tissue Eng Regen Med* 2014;11(2):137-42.
13. Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 2001;82(4):583-90.
14. Mardomi A, Limoni SK, Rahbarghazi R, Mohammadi N, Khorashadizadeh M, Ranjbaran H, et al. PD-L1 overexpression conveys tolerance of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocyte-like cells in an allogeneic mouse model. *J Cell Physiol* 2021.
15. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 2009;4(1):102-6.
16. Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy* 2012;67(10):1215-22.
17. Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat Immunol* 2020;21(4):442-54.
18. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soulillou JP, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;110(10):3691-4.
19. Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS, et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells* 2012;30(12):2692-9.
20. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008;38(6):1745-55.
21. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev Rep* 2014;10(3):351-75.
22. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 2008;18(8):846-57.
23. Abediankenari S, Yousefzadeh Y, Azadeh H, Vahedi M. Comparison of several maturation inducing factors in dendritic cell differentiation. *Iran J Immunol* 2010;7(2):83-7.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2021; Vol. 79, No. 8: 593-600 Original Article

# The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to induce PD-L1 molecule on splenic lymphocytes

Bahare Hasani Karmozdi M.Sc.[1]
Alireza Mardomi Ph.D.[2]
Saeid Abediankenari Ph.D.[2*]

*1- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.*
*2- Department of Immunology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.*

*Corresponding author: Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, km 18 Farah Abad Rd., Sari, Iran.
Tel: +98-11-33543827
E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

Received: 05 May 2021 Revised: 12 May 2021 Accepted: 15 Oct. 2021 Available online: 23 Oct. 2021

## Abstract

***Background:*** Mesenchymal stem cells are non-hematopoietic stromal cells that are used in the treatment of many chronic and autoimmune diseases by modulating the immune system. Due to the limitations of using autologous mesenchymal stem cells, the use of allogeneic stem cells is a promising therapeutic approach in the treatment of immunological disorders. This study aimed to investigate the ability of allogeneic mesenchymal stem cells to induce Programmed death-ligand 1(PD-L1) expression on the surface of splenic lymphocytes and the role of this molecule in the mesenchymal stem cell-treated cells tolerogenicity.

***Methods:*** This study was conducted from February 2019 to December 2020 in the department of Immunology of Mazandaran University of medical sciences. Mesenchymal stromal cells were isolated from the femur and tibia of C57 mice. C57 bone marrow-derived mesenchymal stem cells were co-cultured with allogeneic BALB/c splenic cells. After 72 hours, the expression of PD-L1 on the surface of splenic lymphocytes was evaluated by flow cytometry. Interferon-gamma (IFN-γ) and Interleukin-10 (IL-10) cytokine assay were done in the cell culture supernatant. Mesenchymal stem cell-treated BALB/c lymphocytes were then exposed to allogeneic C57 splenocyte as stimuli in the mixed lymphocyte reaction (MLR) and the rate of proliferation was assessed by CFSE.

***Results:*** The amount of PD-L1 positive BALB/c splenic lymphocytes were significantly increased after allogeneic C57 mesenchymal stem cells exposure (P=0.001). The levels of IFN-γ and IL-10 cytokines in the supernatant of cell culture also increased significantly (respectively, P=0.0009, P=0.01). C57 splenocytes proliferation notably decreased after mesenchymal stem cell-treated BALB/c lymphocytes exposure compared to the group were cultured with naïve BALB/c lymphocytes (P=0.002).

***Conclusion:*** Allogeneic mesenchymal stem cells are capable to induce of PD-L1 on the surface of lymphocytes. PD-L1 expression on mesenchymal stem cell-treated cells makes them less immunogenic than naïve cells. These tolerogenic cells can reduce allogeneic responses. It seems that PD-L1 plays an important role in mesenchymal stem cell immunomodulation.

***Keywords:*** mesenchymal stem cell, PD-1, tolerance.

Copyright © 2021 Hasani Karmozdi et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-13 ]