

ساخت سامانه انتقال ژن بیان کننده هم زمان ژن های eGFP و HIF-1 α در سلول های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای لنتی ویروسی

وحید رزبان¹، سحر خواجه²، عباس صاحبقدم لطفی^{3*}، مسعود سلیمانی⁴، حسین احمدی⁵، محمد معصومی⁶

- 1- استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
- 2- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استاد بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
- 4- دانشیار هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 5- استاد جراحی قلب و توراکس، مرکز قلب دانشگاه تهران، تهران، ایران
- 6- استادیار ژنتیک پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*تهران، کدپستی 1497716316

lotfi-ab@nigeb.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/1/7، پذیرش: 91/6/4)

چکیده - برای درمان بیماری های ایسکمیک، سلول درمانی به عنوان روشی جدید و مؤثر مطرح است. سلول های بنیادی مزانشیمی به دلایل مختلف مانند امکان جداسازی و تکثیر آسان بدون از دست دادن توانایی تمایزی و تنظیم سامانه ایمنی جایگاه ویژه ای دارند. سلول های بنیادی پس از تزریق در بافت های ایسکمیک با شرایط سخت کمبود اکسیژن رو به رو می شوند که با مرگ بیشتر سلول ها همراه است. به همین دلیل کارایی سلول درمانی بسیار کاهش می یابد. همچنین سرنوشت این سلول ها از نظر زنده ماندن و تمایز مورد بحث است. در مطالعات متعددی تأثیر مفید پیش آماده سازی سلول ها با هیپوکسی برای سلول درمانی بافت های ایسکمیک گزارش شده است و تنظیم کننده ای اصلی در این فرایند، فاکتور رونویسی HIF-1 α است.

در این پژوهش، ژن HIF-1 α با استفاده از لنتی ویروس ها به سلول های بنیادی مزانشیمی منتقل می شود تا با افزایش بیان آن، شرایط پیش آماده سازی با هیپوکسی، شبیه سازی شود. از طرفی پروتئین eGFP نیز به صورت Bisictronic همراه HIF-1 α بیان می شود. به این ترتیب هم می توان اثر شبیه سازی پیش آماده سازی هیپوکسی روی سلول های بنیادی مزانشیمی را بررسی کرد و هم پیگیری و بررسی سرنوشت سلول های تزریق شده در مدل های حیوانی با استفاده از مارکر GFP، انجام می شود.

کلیدواژگان: سلول های بنیادی مزانشیمی، HIF-1 α ، eGFP، انتقال ژن، لنتی ویروس ها.

1- مقدمه

در سال‌های نزدیک، سلول‌درمانی به عنوان روشی نوین برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مطرح شده است. هدف اصلی سلول‌درمانی، احیا کردن ارگان‌های آسیب‌دیده با استفاده از سلول‌های بنیادی است. از میان سلول‌های مختلف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی¹ مورد توجه ویژه قرار گرفته است که تا حدی به‌خاطر توانایی تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی مختلف [1، 2] و نیز ایجادنشدن پاسخ ایمنی پس از تزریق سلولی است [3-5]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی منشأ استروما داشته و تا کنون از بافت‌هایی مانند جفت، خون و بند ناف، مغز استخوان، بافت‌های چربی و ریه جداسازی شده است [6].

سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تزریق به بافت‌های ایسکمیک، چه از نظر زنده ماندن و چه از نظر تمایز، از موضوعات جالب و همچنان سؤال‌برانگیز است. نشان‌دار شدن این سلول‌ها با ژن گزارشگر GFP، به پیگیری سرنوشت آن‌ها کمک می‌کند و این امکان را به وجود می‌آورد که توانایی این سلول‌ها در رسیدن به بافت هدف ارزیابی شود.

تقریباً در همه موارد، سلول‌های تزریق‌شده می‌میرند که می‌تواند به میزان زیادی توانایی درمانی سلول‌ها را کاهش دهد. همچنین درک سازوکارهایی که باعث زنده ماندن ضعیف سلول‌های تزریق‌شده در شرایط استرس می‌شود می‌تواند سبب یافتن راه‌کارهای درمانی بهتر شود [7]. مطالعات متعددی نشان داده است که سلول‌های بیان‌کننده ژن‌های مربوط به بقا [8-10] یا فاکتورهای آنژیوژنیک [11] توانایی زنده ماندن بیشتری پس از تزریق نشان می‌دهند.

پیش‌آماده‌سازی با هیپوکسی یا ایسکمی (HP یا IP)² یکی از قدرتمندترین محرک‌های محافظ سلول است [12، 13] که مؤثر بودن آن بستگی به فعالیت رونویسی HIF-1 α دارد [14]. در این مطالعه، ژن HIF-1 α برای شبیه‌سازی پیش‌آماده‌سازی سلول‌ها با هیپوکسی، همراه ژن eGFP و کتورهای لنتی‌ویروسی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان منتقل شد تا سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آید که هم در آن‌ها شرایط هیپوکسی شبیه‌سازی شده باشد و هم با بیان ژن گزارشگر GFP، امکان پیگیری آن‌ها پس از تزریق در مطالعات آینده فراهم شود.

2- مواد و روش‌ها

2-1 تأیید مزانشیمی بودن MSCs

بر اساس توافق‌نامه بین‌المللی برای استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌درمانی، این سلول‌ها نباید مارکرهای CD31 و CD34 را داشته باشند ولی باید مارکرهای CD73 و CD105 را بیان کنند. این سلول‌ها همچنین تعداد زیادی مولکول‌های چسبندگی، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و گیرنده‌های فاکتورهای رشد دارند [15-17].

در شرایط مناسب، MSCs می‌تواند به سلول‌های ادیپوسیت، استئوبلاست و کندروسیت تمایز پیدا کند [16-18].

برای تعیین مارکرهای سطحی با روش فلوسایتومتری، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان‌دار شده با FITC³، علیه CD34، CD73، CD105 و آنتی‌بادی نشان‌دار شده با PE، علیه CD31 استفاده شد.

برای تمایز به استئوبلاست، این سلول‌ها 14 روز در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا (4/5 گرم در لیتر) حاوی 10

2. Hypoxic or Ischemic preconditioning

3. Fluorescent isothiocyanate

1. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2-2 همسان‌سازی ژن HIF-1 α در وکتور

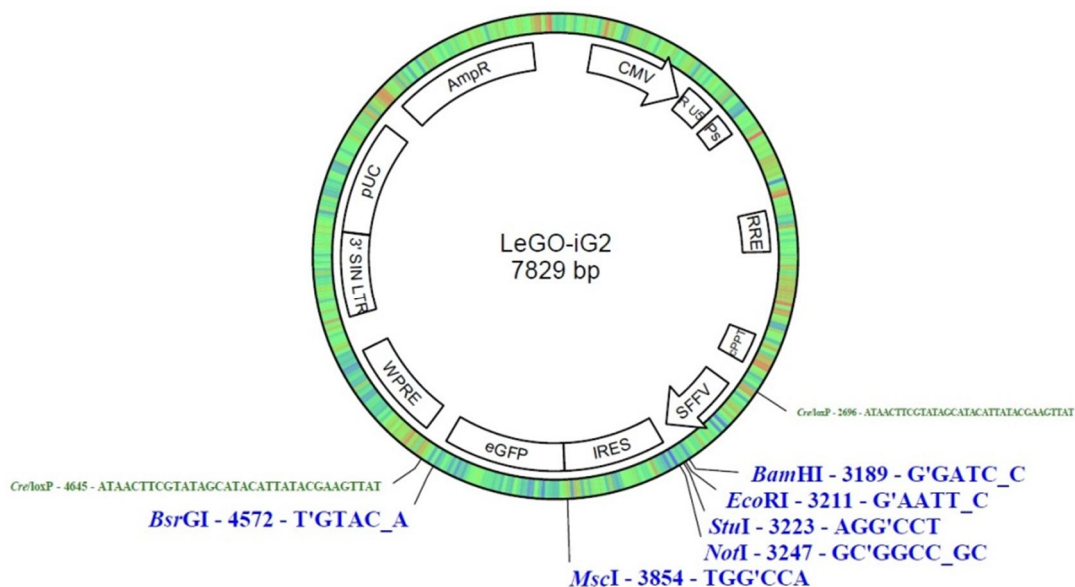
انتقال دهنده‌ی لتی‌ویروسی

cDNA ژن HIF-1 α در شرکت Shine Gene ساخته و در وکتور PUC57 ارسال شد. شماره دسترسی (Accession Number) این ژن در Gene Bank، NM_001530.1 است.

در این مطالعه، سامانه لتی‌ویروسی استفاده شد که شامل وکتورهای pSPAX2، pMD2.G و iG2 بود. وکتور ترانسفر iG2، توالی Internal Ribosome Entry Site (IRES) از ویروس انسفالومایوکاردیتیس دارد که امکان بیان ژن کلون‌شده را به طور جداگانه از eGFP می‌دهد. همچنین ژن هدف تحت کنترل پروموتور رتروویروسی spleen focus-forming virus (SFFV) بیان می‌شود که در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها، بیان بالا دارد (شکل 1).

درصد FBS و القاگرهای تمایزی [10 میکرومولار دگزامتازون، 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر اسیدآسکوربیک و 10 میکرومولار بتاگلیسروفسفات] قرار داده شدند. در این مدت سلول‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد CO₂ نگهداری شدند و تعویض محیط هر 3 روز یک‌بار انجام شد. پس از 14 روز، سلول‌ها با روش Alizarin O red رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شدند.

برای تمایز ادیپوژنیک، سلول‌ها در معرض محیط القایی ادیپوژنیک قرار گرفتند. محیط القاکننده ادیپوژنیک حاوی 10 درصد FBS، 1 میکرومولار دگزامتازون، 200 میکرومولار اندومتاسین، 1/7 میکرومولار انسولین و 500 میکرومولار ایزوبوتانل متیل‌زانتین بود. پس از 14 روز با رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil red staining، تمایز آن‌ها به ادیپوسایت ارزیابی شد.



شکل 1 نقشه وکتور ترانسفر iG2

باکتری‌های دارای DH5α با وکتورهای لنتی‌ویروسی ترانسفورم شدند. برای ترانسفورماسیون از روش شیمیایی کلسیم کلراید و شوک حرارتی استفاده شد.

2-3- تولید لنتی‌ویروس نو ترکیب دارای HIF-1α

تولید لنتی‌ویروس با ترانسفکشن هم‌زمان وکتورهای plox-MD₂ و plox-PAX₂ و وکتور ترانسفر حاوی ژن کلون‌شده‌ی HIF-1α در رده سلولی HEK-293.T و با روش کلسیم- فسفات انجام شد.

پس از گذشت 48 ساعت از ترانسفکشن، سلول‌های HEK-293.T زیر میکروسکپ فلورسانت مشاهده شد تا از انجام ترانسفکشن، بیان پروتئین‌های ویروسی و پروتئین گزارشگر GFP اطمینان حاصل شود. سپس محیط رویی سلول‌ها برداشته و 5 دقیقه در 4000 rpm سانتریفوژ شد که سلول‌ها یا باقیمانده‌های سلولی رسوب داده شوند. محلول دارای ویروس با فیلتر با cut off برابر MWCO 100000 شرکت Millipore تغلیظ شد.

برای تیتراسیون، تعداد 1×10^5 سلول HEK-293.T در هر چاهک یک پلیت 6 خانه کشت داده شد. به دو چاهک از پلیت 6 خانه به ترتیب 50 μl و 25 μl از ویروس رقیق‌نشده استوک و به سه چاهک به ترتیب 100 μl، 50 μl و 25 μl از استوک ویروسی که به نسبت 50 : 1 رقیق شده است اضافه شد. به آخرین چاهک که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، هیچ ویروسی اضافه نشد. پس از 72 ساعت، بیان پروتئین گزارشگر در سلول‌ها با میکروسکپ فلورسانت بررسی شد؛ سپس سلول‌ها تریپسینه شده و درصد سلول‌های GFP مثبت با دستگاه فلوسیتومتر به دست آمد.

تیترو ویروس براساس واحد (Transducing unit) TU/ml طبق فرمول زیر محاسبه شد:

برای استخراج cDNA از ژل آگارز، ابتدا Double digest با آنزیم برشی BamH1 همراه آنزیم Dra1 که تنها PUC-57 را برش می‌زند ولی تأثیری روی cDNA ندارد، انجام شد. سپس الکتروفورز انجام شد. باند 2/5 kb از ژل بریده شد و استخراج cDNA با استفاده از High pure plasmid isolation kit شرکت Roche انجام شد. پس از استخراج، cDNA و وکتور لنتی‌ویروسی iG2 با آنزیم BamH1 هضم شدند و واکنش لیگاسیون¹ یا الحاق که شامل آنزیم لیگاز T4 (شرکت Fermentas)، بافر و rATP بود در 16 °C و در شب انجام شد.

از آن‌جا که وکتور iG2 ژن مقاومت به آمپی‌سیلین دارد، باکتری‌های DH5α که با محصول واکنش الحاق، ترانسفورم شده بودند، روی پلیت LB-Agar حاوی 50 میکروگرم در هر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، کشت داده شدند. تعداد 10 تک‌کلونی به دست آمده از الحاق برای استخراج پلاسمید و هضم با آنزیم BamH1 انتخاب شد. خارج شدن قطعه 2/5 کیلوبازی نشان‌دهنده‌ی موفقیت واکنش الحاق است و تک‌باند نشان می‌دهد که self ligation اتفاق افتاده است.

برای بررسی درست‌بودن کلون شدن cDNA در وکتور iG2 از آنزیم NCO1 برای تهیه Restriction map استفاده شد. در صورتی که قطعه در راستای درست کلون شده باشد، تعداد 3 باند با اندازه 3166bp، 2580bp و 4581bp مشاهده می‌شود و اگر در راستای عکس کلون شده باشد، تعداد 2 باند با اندازه‌های 4581bp و 5749bp ایجاد می‌شود.

در نهایت، قطعه کلون‌شده در وکتور ترانسفر لنتی‌ویروسی برای توالی‌یابی ارسال شد. برای تکثیر،

1. Ligation

$$\frac{1 \times 10^5 \text{ cell} \times \% \text{GFP positive cells} \times 1000}{\mu\text{l of vector}}$$

(Polybrene) با غلظت نهایی $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ استفاده شد. پلی‌برن، چسبندگی ویروس‌ها را به سطح سلول‌ها را بالا می‌برد.

2-4- تعیین MOI و انتقال ژن HIF-1 α به سلول‌های بنیادی مزانشیمی

انتقال ژن HIF-1 α با ترانسداکت کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ذرات لنتی ویروسی دارای این ژن انجام شد. با توجه به تیترا به‌دست‌آمده ویروس در مرحله قبل، غلظت‌های مختلف ویروس [که دارای تعداد ذرات مختلف ویروس است] به سلول‌ها اضافه شد تا بهترین (multiplicity of infection) MOI یا غلظتی از ذرات ویروس که بالاترین درصد ترانسفکشن را دارد و روی رشد و حیات سلول‌ها تأثیر منفی ندارد، تعیین شود. پس MOI‌های 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40، 45 و 50 بررسی شد. همچنین برای افزایش کارایی ترانسداکشن از ترکیب کاتیونی پلی‌برن

2-5- واکنش RT-PCR

در این مطالعه، توالی ژن HIF-1 α و ژن GAPDH، به عنوان کنترل داخلی، از Gene Bank استخراج شد. پرایمرها (جدول 1) با نرم‌افزار 5 oligo طراحی شده و پس از BLAST کردن پرایمرها، واکنش PCR (جدول 2) با آن‌ها انجام شد.

برای استخراج total RNA از سلول‌ها، از RNeasy plus micro kit شرکت Qiagen استفاده شد. ساخت cDNA با cDNA synthesis kit شرکت power شرکت Intron و واکنش PCR kit Maxime PCR PreMix شرکت Intron انجام شد.

جدول 1 مشخصات پرایمرها

ژن	اندازه قطعه (bp)	توالی پرایمر
GAPDH	141	F: 5'- agaaggctggggctcatttc -3' R: 5'- tgcaggaggcattgctgatg -3'
HIF-1 α	177	F: 5'- cttctggatgctggtgattgg -3' R: 5'- gtgtccagttagttcaactgag -3'

جدول 2 شرایط واکنش PCR

ژن	دما و زمان طویل شدن نهایی	30 چرخه			دما و زمان واسرشت اولیه
		دما و زمان طویل شدن	دما و زمان اتصال	دما و زمان واسرشت	
GAPDH	72 °C ، 7 دقیقه	72 °C ، 45 ثانیه	60 °C ، 45 ثانیه	94 °C ، 30 ثانیه	94 °C ، 5 دقیقه
HIF-1 α (25 چرخه)	72 °C ، 7 دقیقه	72 °C ، 45 ثانیه	61 °C ، 45 ثانیه	94 °C ، 30 ثانیه	94 °C ، 5 دقیقه

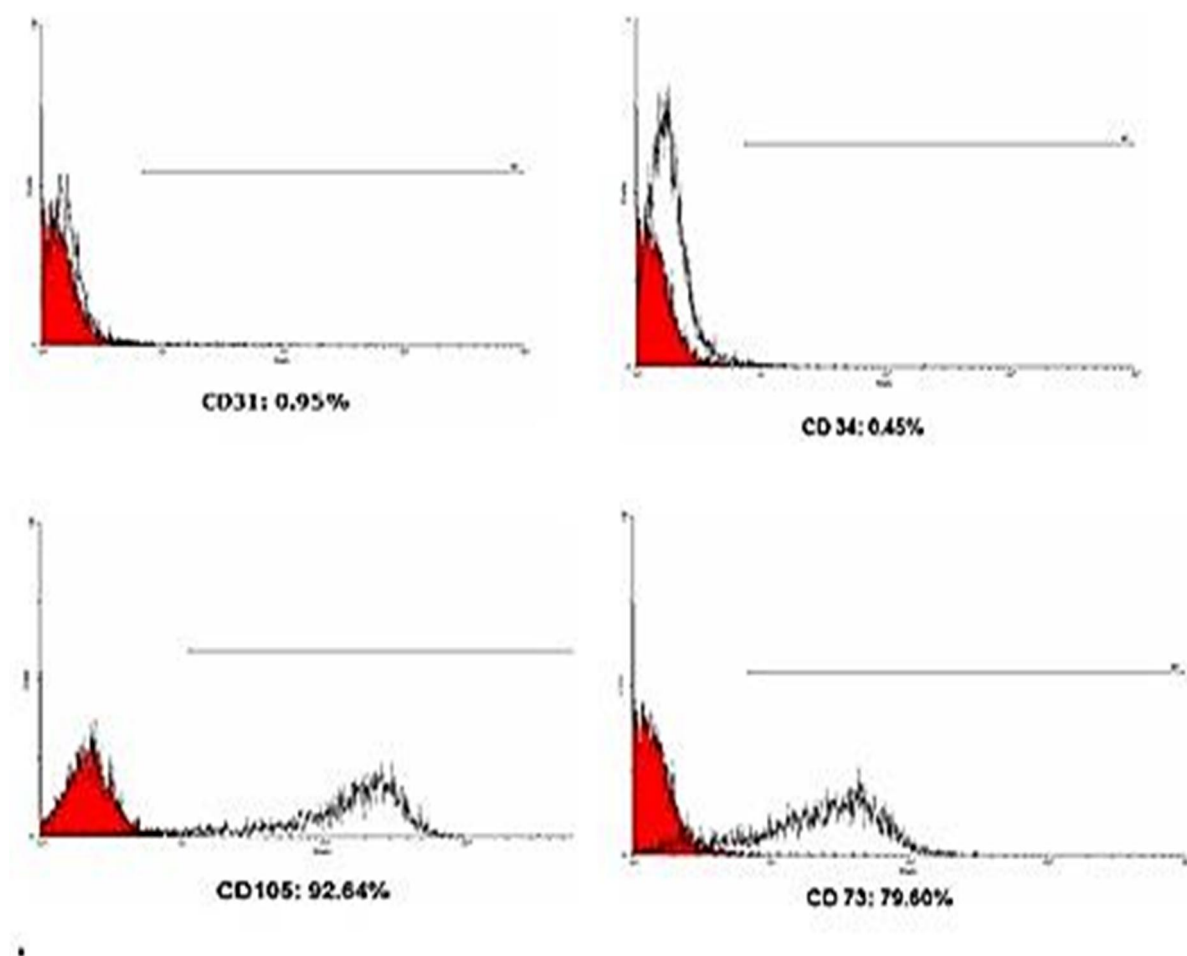
3- یافته ها

3-1- بیان شاخص های سلول های بنیادی

مزانشیمی

نتایج ایمونوفنوتایپینگ سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به روش فلوسیتومتری نشان داد که درصد بیان مارکرهاي اختصاصی سلول های MSC شامل

CD73 و CD105، به ترتیب 79/60 و 92/64 درصد بود؛ در حالی که مارکرهاي ویژه ی سلول های هماتوپوئیتیک، CD34 و CD31، بیان چشم گیری نداشتند (شکل 2). این نتایج نشان دهنده ی کیفیت MSCs استفاده شده در این مطالعه و آلوده نشدن آنها به سلول های هماتوپوئیتیک بود.



شکل 2 ایمونوفنوتایپینگ سلول های مزانشیمی مغز استخوان انسان به روش فلوسیتومتری

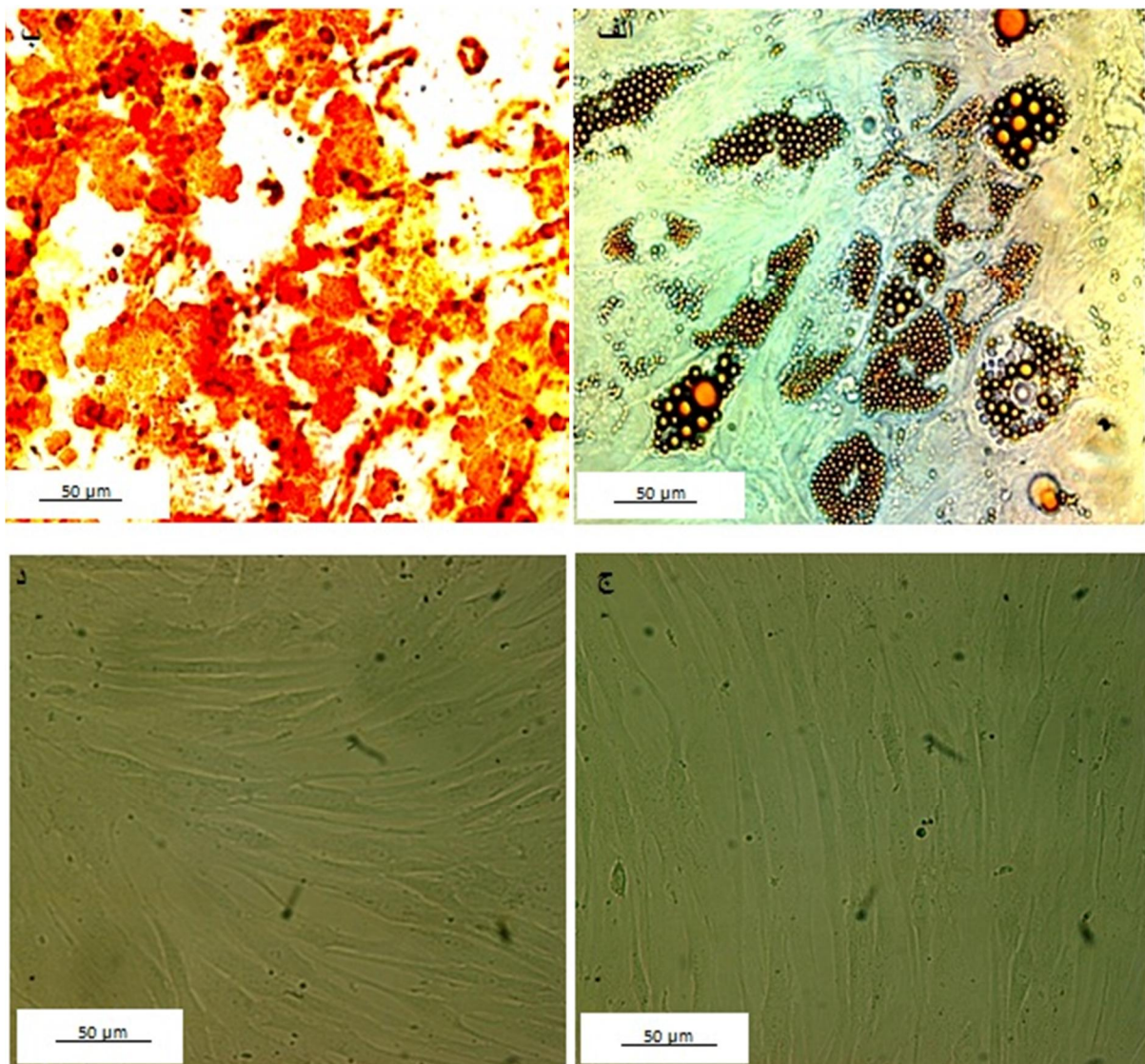
2-3- ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های بنیادی

مزانشیمی به استئوبلاست و ادیپوسایت

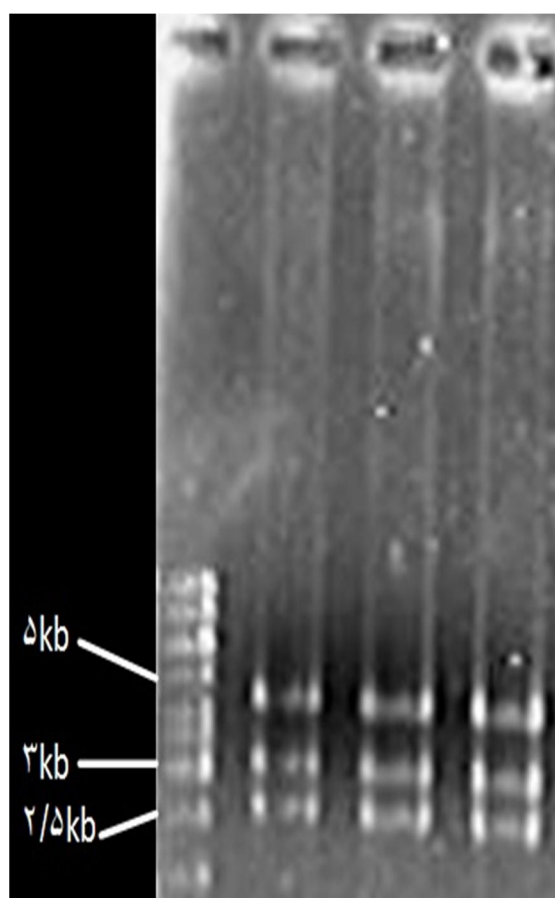
افزون بر ایمونوفلورسسانس مارکرهای سطحی، پتانسیل تمایز MSCs استفاده شده در این مطالعه برای تأیید بیشتر بررسی شد.

رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin red، تجمع کلسیم را

در سلول‌های تمایز داده شده به اوستئوبلاست نشان داد که از ویژگی‌های سلول‌های استخوانی است. همچنین پس از رنگ‌آمیزی Oil red، تجمع نارنجی رنگ قطرات چربی در سلول‌هایی که در معرض محیط تمایزی ادیپوسایت بودند، مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی تمایز به سمت سلول‌های چربی بود (شکل 3).



شکل 3 الف- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده سلول‌های چربی، ب- استخوانی، ج و د- سلول‌ها بدون القای تمایز



شکل 5 نتایج هضم با *NCO1* نشان دهنده قطعاتی در حدود 2/5، 3 و 4/5 کیلوباز است.

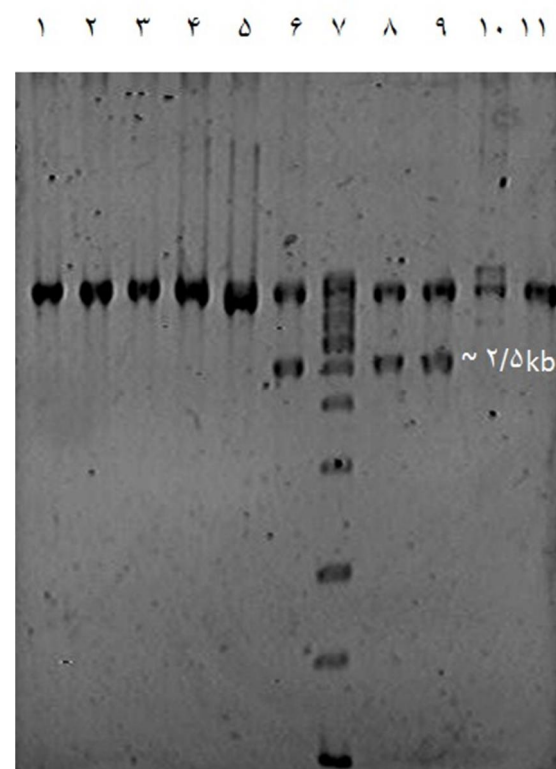
در نهایت، نتایج توالی یابی، توالی درست قطعه کلون شده را تأیید کرد.

3-4- تولید ذرات لنتی ویروسی نوترکیب

نتایج ترانسفکشن سلول های HEK-293.T زیر میکروسکپ فلورسنت بعد از 48 ساعت نشان دهنده ترانسفکت شدن بیش از 90 درصد سلول ها بود (شکل 6).

3-3 همسان سازی ژن *HIF-1α*

نتیجه هضم 10 کلونی به دست آمده از الحاق با آنزیم *BamH1* نشان داد که کلونی های 6، 7 و 8 قطعه مورد نظر را داشتند (شکل 4).



شکل 4 نتایج هضم محصولات لیگاسیون با آنزیم *BamH1*. ردیف های 1-6 و 8-11 به ترتیب کلون های 1 تا 10 و ردیف 7، اندازه ی مارکر

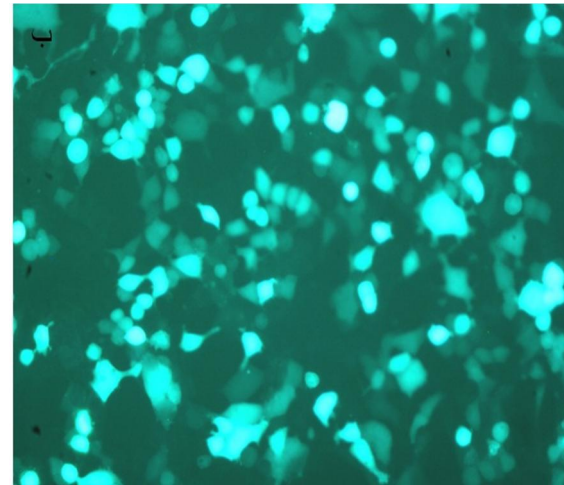
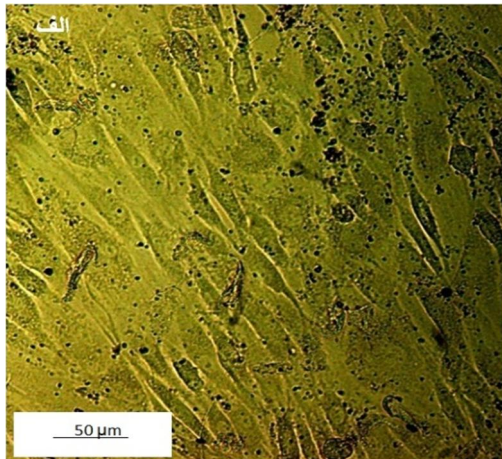
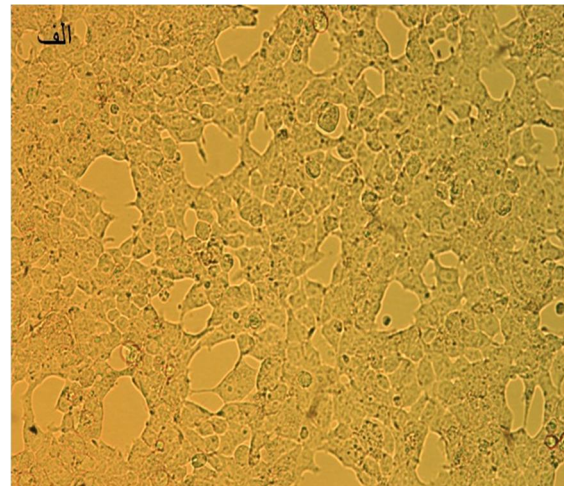
هضم کلون های دارای قطعه ی 2/5 کیلوبازی با آنزیم *NCO1* نشان داد که قطعات در راستای درست کلون شده است (شکل 5).

ترتیب 16 و 19 درصد سلول‌های مثبت برای بیان GFP داشتند و تعداد ذرات در یک میلی‌لیتر آن‌ها به ترتیب 5×10^7 و $9/4 \times 10^7$ به‌دست آمد.

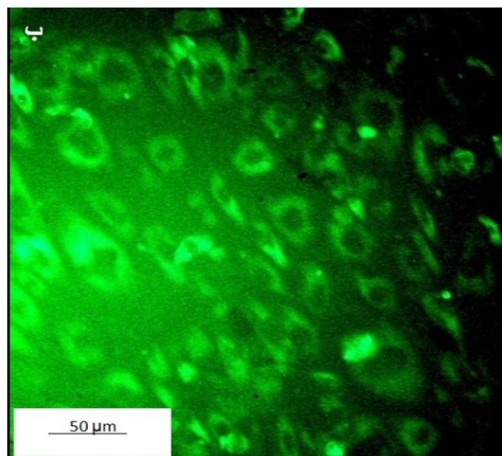
3-5- انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی و

تعیین بهترین MOI

بهترین MOI برای آزمایش‌ها 35 تعیین شد و با توجه با بیان GFP، میزان موفقیت در ترانسداکشن بیش از 80 درصد بود (شکل 7).

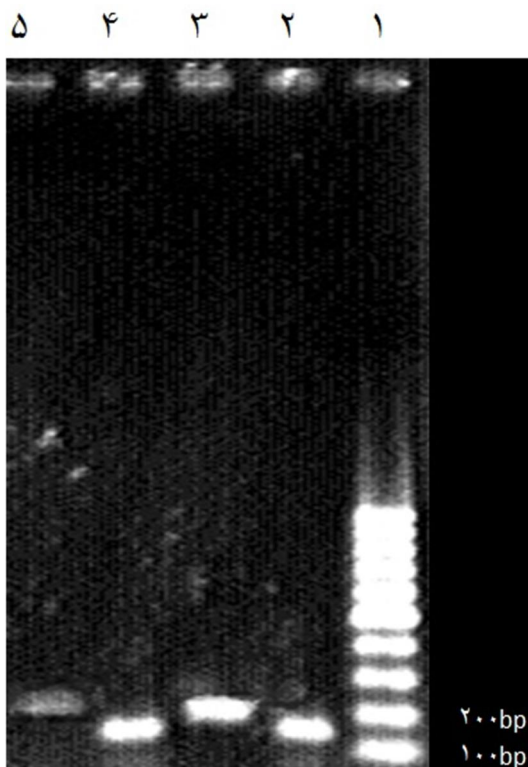


شکل 6 نتایج ترانسفکشن سلول‌های HEK-293.T. الف - تصویر با نور مرئی ب - تصویر با نور فلورسانت



شکل 7 نتایج ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی، الف - نور مرئی ب - نور فلورسانت

نتایج فلوسایتومتری برای غلظت‌های مختلف ویروس نشان داد در نمونه کنترل که به سلول‌های HEK-293.T ویروس اضافه نشده بودند، بیان GFP صفر است. چاهک‌هایی که 25 و 50 میکرولیتر ویروس رقیق‌شده به آن اضافه شده بود، به ترتیب 5/5، 6/8 و 6/9 درصد سلول‌های مثبت برای بیان GFP داشتند و تعداد ذرات در یک میلی‌لیتر آن‌ها به ترتیب $10^7 \times 2/9$ ، $3/3 \times 10^7$ و $4/1 \times 10^7$ به‌دست آمد. چاهک‌هایی که 25 و 50 میکرولیتر ویروس رقیق‌نشده به آن اضافه شده بود، به



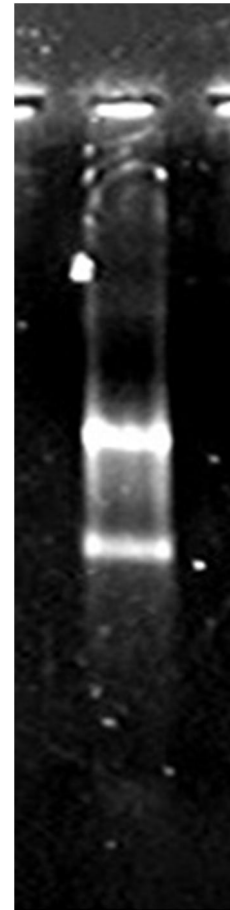
شکل 9 نتایج RT-PCR برای HIF-1α. ستون 1، اندازه‌ی مارکر، ستون 1 و 3، باند GAPDH، ستون 2 و 4، باند HIF-1α، به ترتیب در سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های دارای HIF-1α

4- بحث

از آن‌جا که MSCs به آسانی در محیط کشت تکثیر می‌شود و به چندین رده سلولی تمایز می‌یابد، برای کاربرد در ترمیم بافت و ژن‌درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [19]. در حقیقت، کارکرد اصلی این سلول‌ها ایجاد منبع جایگزین برای بافت‌های آسیب‌دیده است. مطالعات در سیستم زنده نشان می‌دهد که سلول‌های MSC تکثیرشده در محیط آزمایشگاه، توانایی تمایزی خود را بعد از پیوند حفظ می‌کنند [20]. از مزایای دیگر MSCs، امکان استفاده از سلول‌های خودی است که احتمال رد پیوند به وسیله سیستم ایمنی را به

6-3- بررسی افزایش بیان ژن HIF-1α

با الکتروفورز RNA استخراج‌شده، باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی 18S و 28S به صورت دو باند مجزا و mRNA به صورت اسمیر مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی کیفیت RNA استخراج‌شده بود (شکل 8).



شکل 8 نتایج به‌دست‌آمده از استخراج total RNA از سلول‌های MSC

نتایج به‌دست‌آمده از واکنش RT-PCR برای HIF-1α نشان داد این ژن در سلول‌های آلوده‌شده با ویروس‌های نوترکیب، بیان بیشتری دارد (شکل 9)

شدت کاهش می‌دهد. همچنین به دلیل این‌که امکان جداسازی این سلول‌ها از مغز استخوان خود بیمار و کشت آن به راحتی وجود دارد که سبب صرفه‌جویی در وقت و تسریع درمان می‌شود، استفاده از سلول‌های MSC توصیه می‌شود [6, 16, 21, 22].

از طرفی آزمایش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که MSCs از تکثیر سلول‌های T جلوگیری کرده و با اثر مستقیم سلول-سلول و ترشح نوعی فاکتور محلول ناشناخته، از بلوغ آن‌ها جلوگیری می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد MSCs آلورژیک (غیرخودی) نیز تا حدی از نظر ایمنی مصون بوده و می‌تواند به عنوان منبع فوری و در دسترس برای درمان به کار رود؛ اگر چه خطر انتقال بیماری نیز وجود دارد [23].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان، CD105 و CD73 را بیان می‌کنند [24]. برای این سلول‌ها، مارکر اختصاصی شناخته نشده است؛ بنابراین با اثبات تمایز به سلول‌های استئوبلاست و ادیوسایت می‌توان اطمینان داشت که سلول‌ها، بنیادی مزانشیمی است [25]. تمایز به سلول‌های استئوبلاست و ادیوسایت نشان‌دهنده‌ی توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در این مطالعه بود.

نتایج فلوسایتومتری در این مطالعه برای مارکرهای سطحی مزانشیمی (CD73 و CD105) و همچنین آزمایش‌های هیستوشیمی برای تمایز به استئوبلاست و ادیوسایت نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده‌شده در این پژوهش، تمایز یافته بوده و با انجام القای مناسب می‌توانند به انواع سلولی مختلفی تمایز پیدا کنند. بیان‌نشدن مارکرهای CD31 و CD34 نیز مشخص کرد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به سلول‌های هماتوپوئیک آلوده‌نشده و یک جمعیت خالص است.

درصد بالای ترانسداکشن بستگی زیادی به ویروس‌های تولیدشده دارد. نتایج نشان داد که بیش از 90 درصد سلول‌های HEK-293.T با روش کلسیم-فسفات ترانسفکت شدند که نشان‌دهنده‌ی کارایی بالای تولید ذرات ویروسی با این روش است. 80 تا 90 درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی با لنتی ویروس‌های تولیدشده ترانسداکت شدند. همچنین نتایج RT-PCR برای ژن $HIF-1\alpha$ ، افزایش بیان آن را تأیید کرد. از طرفی با توجه به ساختار وکتور ترانسفر iG2 (شکل 1) مشخص است که ژن هدف درست بعد از پروموتور کلون شده و پس از آن، ژن eGFP قرار دارد؛ بنابراین بیان این دو ژن به صورت bisitronic انجام می‌شود. به خاطر این‌که انتظار می‌رود ژنی که پشت IRES قرار گرفته با کارایی کمتری نسبت به ژنی که در جلوی IRES قرار گرفته ترجمه شود، این نوع طراحی، بیان بالای ژن کلون‌شده در این ساختار را در مقایسه با GFP تضمین می‌کند [26]. به این صورت، میزان بیان ژن هدف کمی بیشتر از میزان بیان تخمین‌زده‌شده برای GFP خواهد بود. این نتایج اطمینان می‌دهد که ذرات لنتی ویروسی دارای ژن کلون‌شده $HIF-1\alpha$ با کارایی بالا تولید شده و افزایش بیان این ژن در سلول‌های هدف انجام‌پذیر است.

همان‌گونه که گفته شد، حضور ژن eGFP پس از ژن $HIF-1\alpha$ در وکتور ترانسفر لنتی ویروسی، امکان تخمین میزان موفقیت در ترانسداکشن را به وجود می‌آورد. به این ترتیب به طور غیرمستقیم، می‌توان از موفقیت انتقال و بیان $HIF-1\alpha$ اطلاع پیدا کرد که این یکی دیگر از مزایای آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با شیوه‌ای است که در این مقاله گفته شد. همچنین بیان این ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این امکان را فراهم می‌کند تا پس از تزریق سلول‌ها در مدل‌های حیوانی بتوان سلول‌ها

را با توجه به نور فلورسانت به دست آمده از GFP، از دیگر سلول‌ها تشخیص داده و پیگیری کرد.

انتقال ژن با استفاده از ویروس‌ها در مقایسه با سایر روش‌های انتقال ژن، سریع‌تر و ارزان‌تر است. ویروس‌ها این توانایی را دارند که ژن هدف را به طور پایدار به داخل ژنوم سلول‌های در حال تقسیم و سلول‌های غیرتقسیم‌شونده انتقال دهند. ویروس‌ها به طور گسترده برای وارد کردن cDNA به داخل سلول‌ها در محیط کشت، استفاده می‌شوند [27]. برای نمونه، نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی مشابهی که برای انتقال ژن آلفا-1 آنتی‌تریپسین انجام شد، نشان‌دهنده‌ی بیان سریع و پایدار این ژن در سلول‌های کبدی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از لنتی ویروس‌های نوترکیب بود [28]. در این بررسی نیز بیان ژن HIF-1 α با استفاده از این ویروس‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت افزایش داده شد و نشان داد که وکتورهای لنتی ویروسی می‌توانند برای کاربرد در ژن‌درمانی به عنوان ابزاری مناسب در نظر گرفته شوند. مشکل اصلی این نوع وکتورها، ورود تصادفی آن‌ها به داخل ژنوم است که امکان دارد منجر به قطع کردن توالی‌های ژنومی، ایجاد جهش و یا بیان متغیر ژن شود [29]. این مشکل می‌تواند در آینده با اصلاحاتی در این وکتورها حل شود. با انتقال موفقیت‌آمیز ژن HIF-1 α ، سلول‌هایی به دست آمد که تنظیم‌کننده‌ی اصلی در پیش‌آماده‌سازی (HIF-1 α) را بیان می‌کنند. با استفاده از نتایج این پژوهش می‌توان سلول‌هایی را در مطالعات آینده بررسی کرد که شرایط شبیه‌سازی شده‌ی پیش‌آماده‌سازی از نظر بیان HIF-1 α در آن‌ها ایجاد شده است.

در سلول‌درمانی بسیج سلول‌های تزریق شده به بافت هدف و سازوکار آن بسیار مورد توجه است. سازوکارهای

اصلی دخیل در فراخوانی سلول‌ها به بافت‌های آسیب‌دیده، مانند محور SDF-1/CXCR4 و یا محور HGF-c-MET، شناسایی و مشخص شده که به وسیله‌ی HIF-1 α القا می‌شوند [30-32]. از طرفی مسئله‌ی مشارکت سلول‌های بنیادی در بازیابی بافت آسیب‌دیده به صورت مستقیم و از طریق تمایز سلول‌های بنیادی، مبهم است و گزارش‌های متفاوت و متناقضی در این رابطه وجود دارد [33-35]. پاسخ به این سؤالات، نیازمند نشان‌دار کردن و پیگیری سلول‌های بنیادی تزریق شده است. در این مطالعه، نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بیان پروتئین GFP با کمک لنتی ویروس‌های نوترکیب با موفقیت انجام شد.

به طور کلی در این پژوهش، ژن HIF-1 α با موفقیت کلون و به سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسداکت شد. انتقال ژن با لنتی ویروس‌ها سبب بیان مؤثر ژن‌های HIF-1 α و GFP در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شد. به این ترتیب زمینه‌ی مناسبی برای مطالعاتی در آینده به وجود آمده است که با هدف شبیه‌سازی شرایط هیپوکسی و پیگیری سلول‌ها در شرایط In vivo و In vitro طراحی شده باشند.

5- منابع

- [1] Pittenger MF, M.A., Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al., (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science (Wash DC).284, 143-7.
- [2] Pittenger MF, M.B., (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res.95, 9-20.

- [8] Gneccchi M, H.H., Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al., (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*.11, 367-8.
- [9] Gneccchi M, H.H., Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al., (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*.20, 661-9.
- [10] Urbinati F, L.F., Facchini G, Montanari M, Ferrari G, Mavilio F, et al., (2005) Competitive engraftment of hematopoietic stem cells genetically modified with a truncated erythropoietin receptor. *Hum Gene Ther*.16, 594-608.
- [11] Azarnoush K, M.A., Sebbah L, Carrion C, Bissery A, Mandet C, et al., (2005) Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1 α . *J Thorac Cardiovasc Surg*.130, 173-9.
- [12] Gross, E.R., and Gross, G. J., (2007) Ischemic Preconditioning And Myocardial Infarction: An Update and Perspective. *Drug Discov. Today Dis. Mech*.4, 165-174.
- [3] Gerdoni E, G.B., Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, et al., (2007) Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 61, 219-27.
- [4] Krampera M, G.S., Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. , (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific t cells to their cognate peptide. *Blood*.101, 3722-9.
- [5] Rossignol J, B.C., Thinard R, Remy S, Dugast AS, Dubayle D, et al., (2009) Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med*.
- [6] Menabde G, G.K., Kakabadze Z, Berishvili E., (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cell plasticity and their application perspectives. *Georgian Med News* 167, 71-6.
- [7] Karen M. Peterson, A.A., Amir Lerman, Lilach O. Lerman, Martin Rodriguez-Porcel, (2011) Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning :Role of oxidative stress. *Life Sciences*.88, 65-73.

- marrow stromal cell line. *J Cell Biochem.*1, 158-169.
- [19] Rawadi GB, V.F., Baron DB, Roman SR, (2003) BMP2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.*18, 1842- 1853.
- [20] AI, C., (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.*213, 341-7.
- [21] Minguell JJ, C.P., Erices A, (2000) Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.*33, 881-7.
- [22] Carlo-Stella C, G.M., (2005) Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells. *Pathol Biol.*53, 162-4.
- [23] Murrell W, W.A., Donnellan M, Feron F, Burne T, Meedeniya A, (2008) Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. *Stem Cells.*26, 2183-92.
- [24] Pittenger MF, M.A., Beck SC et al., (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (Wash DC).*284, 143-146.
- [13] Hausenloy, D.J., and Yellon, D. M., (2006) Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.*70, 240-253.
- [14] Yuan, G., Adhikary, G., McCormick, A. A., Holcroft, J. J., Kumar, G. K., and Prabhakar, N. R., (2004) Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J. Physiol.*557, 773-783.
- [15] Short B, B.N., Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simon PJ, (2003) Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.*34, 565-571.
- [16] Chen ML, L.K., Huang HC, Tsai YL, Wu YC, Kuo TM, Hu CP, Chang C, (2010) HNF-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *World J Gastroenterol.*16, 5092-103.
- [17] Atmani H, C.D., Basle MF, (2003) Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem.*2, 364-372.
- [18] Allan EH, H.P., Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, (2003) Differentiation potential of a mouse bone

- HIF-1 α in human salivary gland cancer cells. *Oral Oncol* 42, 593-598.
- [31] Ivana Rosová, M.D., Ben Capoccia, Daniel Link, and Jan A. Nolte, (2008) Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*.26, 2173–2182.
- [32] Melania Tesio, K.G., Simona Corso, Silvia Giordano, Amir Schajnovitz, Yaron Vagima, Shoham Shivtiel, Alexander Kalinkovich, Luisa Caione, Loretta Gammaitoni, Elisa Laurenti, Eike C.Buss, Elias Shezen, Tomer Itkin, Orit Kollet, Isabelle Petit, Andreas Trumpp, James Christensen, Massimo Aglietta, Wanda Piacibello and Tsvee Lapidot, (2011) Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. *Blood*.117, 419-428.
- [33] Takashi Iwase, N.N., Takafumi Fujii, Takefumi Itoh, Shinsuke Murakami, Toshio Matsumoto, Kenji Kangawa, Soichiro Kitamura, (2005) Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovascular Research*.66, 543- 551.
- [25] Sabine Neuss, E.B., Michael Woltje, Lothar Tietze, Willi Jahnen-Dechent, (2004) Functional Expression of HGF and HGF Receptor/c-met in Adult Human Mesenchymal Stem Cells Suggests a Role in Cell Mobilization, Tissue Repair, and Wound Healing. *Stem Cells*.22, 405-414.
- [26] Weber, K., et al., (2008) A Multicolor Panel of Novel Lentiviral “Gene Ontology” (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis. *The American Society of Gene Therapy*.
- [27] Berns, K.I., Flotte, T.R., Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V., (2008) Gene therapy: use of viruses as vectors. *Encyclopedia of Virology*, Academic Press, Oxford.301-306.
- [28] Mahboobe Ghaedi, A.S.L., Masoud Soleimani, (2010) Establishment of lentiviral-vector-mediated model of human alpha-1 antitrypsin delivery into hepatocyte-like cells differentiated from mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*.42, 181–189.
- [29] Pfeifer, A., Verma, I.M., (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* .2.۲۱۱-۲۲۷ ,
- [30] Hara S, N.K., Klosek SK, et al., (2006) Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating

- [35] Zentilin, L., Tafuro, S., Zacchigna, S., Arsic, N., Pattarini, L., Sinigaglia, M., Giacca, M., (2006) Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*.107, 3546-54.
- [34] Vien Khach Lai, M.R.A., Muhammad Ashraf, Shujia Jiang, Husnain Kh Haider, (2012) Non-hypoxic stabilization of HIF-1 α during coordinated interaction between Akt and angiopoietin-1 enhances endothelial commitment of bone marrow stem cells. *J Mol Med*.1-12.