دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۲، صفحه ۱۴۰-۱۳۰ (خرداد و تیر ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(2): 130-140

بررسی بیان مینی ژن‌های فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

آزاده سادات آزادبخش [۱و۲]، محمدرضا سام [۱و۲*]، فرح فرخی [۲]، علیرضا زمردی‌پور [۳]، علی اکبر حداد مشهد ریزه [۴]، آرام مکاری‌زاده [۵]

[۱] گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۳] گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
[۴] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
[۵] گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

(دریافت مقاله: ۹۱/۹/۳۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۱۶)

چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی هدف مناسبی جهت سلول درمانی و ژن درمانی بیماران هموفیلی B محسوب می‌شوند. این سلول‌ها دارای ویژگی‌های بی‌نظیر از جمله تمایز به طیف وسیعی از سلول‌های مختلف و ایمنی‌زایی اندک در شرایط پیوند می‌باشند که آن‌ها را برای سلول درمانی و ژن درمانی مناسب کرده است. بیان اندک ترانس ژن از مشکلات ژن درمانی است. با شناسایی توالی‌های تنظیمی و استفاده از آن‌ها در موقعیت‌های مناسب در ناقلین می‌توان در جهت بهبود بیان ژن با هدف ژن درمانی اقدام نمود. در این بررسی، ۴ ناقل پلاسمیدی فاکتور ۹ فاقد و واجد اینترون‌های ژن بتاگلوبین به درون سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت گردیدند. هدف این پژوهش بررسی توانایی این سلول‌ها در بیان فاکتور ۹ بود.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان تیبیا و فمور موش رت، فنوتیپ این سلول‌ها با روش فلوسایتومتری تعیین شد. ناقلین پلاسمیدی فاکتور ۹ با استفاده از عامل ترانسفکشن به درون سلول‌های مزانشیمی وارد شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، توانایی سلول‌های بنیادی در بیان مینی ژن‌های مختلف فاکتور ۹ از طریق انجام آزمون ساندویچ الایزا بر روی محیط کشت و آزمون RT-PCR ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One – Way ANOVA) انجام شد.

یافته‌ها: بالاترین سطح بیان فاکتور ۹ از سازه ژنی بدون اینترون و سازه ژنی دارای اینترون ۱ ژن بتاگلوبین به‌دست آمد. بالاترین میزان فعالیت زیستی از فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت از سازه ژنی دارای اینترون ۱ و ۲ بتا گلوبین به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانائی بیان فاکتور ۹ و اسپلایسنگ اینترون ۱ ژن بتاگلوبین را نشان دادند. توالی‌های اینترونی بتاگلوبین سطح بیان فاکتور ۹ را کاهش دادند که این کاهش بیان را می‌توان با احتمال به اسپلایسینگ نادرست اینترون‌ها نسبت داد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هموفیلی B، فاکتور ۹، ناقل پلاسمیدی، اینترون‌های ژن بتاگلوبین

*ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری، گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی

E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا استرومایی مغز استخوان که بخشی از جمعیت سلولی مغز استخوان را تشکیل می‌دهند در بقاء و تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک نقش مهمی بر عهده دارند (۱).

این سلول‌ها جمعیت ناهمگنی را تشکیل می‌دهند که قدرت تمایز به انواع مختلفی از رده‌های سلولی سوماتیک از جمله استئوسیت‌ها، کندروسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها، سلول‌های سازنده تاندون و سلول‌های ماهیچه‌ای را دارند (۲ و ۳).

سلول‌های اشاره شده از بافت‌های مختلفی از جمله مغز استخوان، کبد، ریه، مغز، خون جنینی، بندناف، کلیه، بافت چربی، مایع آمنیون، ریه جنینی و فولیکول‌های مو قابل جداسازی هستند (۷-۴).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌های بی‌همتای زیستی هستند که به همین دلیل کاربردهای درمانی گوناگونی یافته‌اند. این ویژگی‌ها شامل: آسانی جدا کردن، توانایی در تمایز به انواع سلول‌های مختلف از نوع مزانشیمی و غیر مزانشیمی، توانایی تکثیر بالا در محیط کشت بدون از دست دادن قدرت تمایز، توانایی تولید ترکیبات مهار کننده پاسخ ایمنی در شرایط پیوند و توانایی مهاجرت به بافت‌های آسیب دیده می‌باشد (۸ و ۹). سلول‌های مزانشیمی اتولوگ و آلوژنیک در محل پیوند، سیستم ایمنی میزبان را فعال نمی‌کنند. بر اساس این توانایی، سلول‌های مزانشیمی حامل‌های ایده‌آلی در انتقال ژن به درون بافت مورد نظر جهت سلول درمانی بیماری‌های ژنتیکی هستند (۱۰). همچنین نشان داده شده است که بیان یک ترانسژن از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تولرانس یا تحمل ایمونولوژیک به ترانسژن را به همراه دارد که می‌تواند مشکل ایجاد آنتی‌بادی‌های مهارکننده در پلاسمای خون بیماران را برطرف نماید. بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی هدف بسیار مناسبی جهت سلول درمانی بیماری‌های ژنتیکی می‌باشند. از جمله بیماری‌های ژنتیکی که سلول درمانی و ژن درمانی آن مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است، بیماری هموفیلی نوع B می‌باشد. این بیماری که در اثر نبود و یا نقص در عملکرد پروتئین فاکتور ۹ انعقادی ایجاد می‌گردد (۱۱) یکی از رایج‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در مسیر انعقاد خون می‌باشد که به‌صورت مغلوب وابسته به X به ارث می‌رسد (۱۲). زندگی این بیماران در اثر خونریزی‌های مکرر دائماً تهدید می‌شود و شایع‌ترین علت مرگ در آن‌ها، خونریزی‌های مغزی است. در ۳ دهه گذشته از پلاسمای تازه منجمد شده و کنسانتره‌های فاکتور ۹ جهت درمان و جلوگیری از عود خونریزی‌ها در این بیماران استفاده شده است (۱۳).

با این وجود، هزینه بالای تولید فاکتور۹ نوترکیب، تشکیل آنتی‌بادی‌های مهارکننده، واکنش‌های آلرژیک و ترومبوز در بیماران، توجه به سایر روش‌های درمانی ازجمله سلول درمانی را باعث گردید (۱۴). در این پژوهش، با هدف بررسی توانایی سلول‌های مزانشیمی در بیان فاکتور ۹ انسانی، ۴ ناقل پلاسمیدی فاکتور۹، که پیشتر در مطالعات قبلی ساخته شده بودند (۱۷-۱۵) به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش رت منتقل شدند و بیان فاکتور۹ در سطح mRNA و پروتئین از سازه‌های ژنی در سلول‌های نوترکیب مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

سوش باکتری، پلاسمیدهای بیانی ساخته شده و پرایمرها

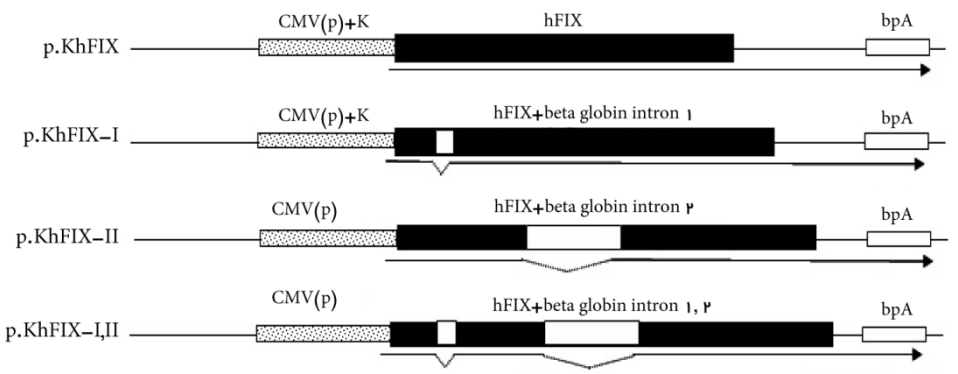
سوش DH5α باکتری اشرشیا کلی برای انجام عمل

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

ترانسفورماسیون ومراحل مختلف همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی ۴ سازه ژنی، p.KhFIX، p.KhFIX-I، p.hFIX-II، p.hFIX-I-II (شکل ۱) به‌ترتیب شامل cDNA فاکتور ۹ انسانی، اینترون۱ ژن بتاگلوبین انسانی بین اگزون‌های ۱ و۲ cDNA فاکتور ۹، اینترون ۲ ژن بتاگلوبین در موقعیت مشابه خود در cDNA فاکتور ۹ و اینترون ۱و۲ همراه با هم در موقعیت‌های مشابه خود در cDNAفاکتور ۹ می‌باشند. طول مینی ژن‌های فاکتور۹ در جدول۱بیان شده است.

جدول ۱) طول قطعه‌سازه‌های بیانی فاکتور۹

سازه پلاسمیدی	طول قطعه bp
pcDNA3-hFIX	۶۸۰۰
pcDNA3-hFIX-I	۶۸۰۰+۱۵۰
pcDNA3-hFIX-II	۶۸۰۰+۸۵۰
pcDNA3-hFIX-I-II	۶۸۰۰+۱۵۰+۸۵۰



شکل شماتیک ۱) سازه‌های بیانی فاکتور ۹ انسانی که در پلاسمید pcDNA3 کلون گردیده‌اند.

p.khFIX: سازه ژنی فاقد اینترون، p.khFIX-I: سازه ژنی دارای اینترون ۱ بتاگلوبین انسانی، p.hFIX-II: سازه ژنی دارای اینترون ۲ بتاگلوبین، p.hFIX-I,II: سازه ژنی دارای اینترون ۱ و۲ بتاگلوبین، K: توالی کوزاک (توالی ۶ نوکلئوتیدی: Ribosome binding site).

hFIX: Human factor IX , bpA: Bovine poly adenylation signal sequence;CMVp: CMV promoter

محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها

از محیط کشت LB به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد و آمپی‌سیلین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در صورت نیاز به محیط کشت انتخابی افزوده شد. کیت‌های تخلیص پلاسمید، RNA و عامل ترانسفکشن X-tremeGENE HP از شرکت Roche آلمان و کیت ساخت cDNA وRT–PCR نیز از شرکت Fermentas آلمان خریداری شدند. محیط کشت DMEM از شرکت Gibco آمریکا جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها جهت انجام فلوسایتومتری از شرکت eBioscience وabcam تهیه شدند.

همسانه‌سازی سازه‌های نوترکیب و تخلیص

سازه‌های پلاسمیدی ساخته شده به باکتری اشرشیاکلی منتقل و همسانه‌سازی شدند. تخلیص پلاسمیدها با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت Roche آلمان انجام شد. غلظت پلاسمیدهای به‌دست آمده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. پلاسمیدهای مذکور، تا زمان مورد استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در این مطالعه از موش رت نژاد ویستار (Wistar) با سن تقریبی ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. استخوان‌های درشت نی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

و ران پا از بافت‌های نرم اطراف استخوان‌ها با اسکالپل و قیچی جدا شدند. آنگاه استخوان‌ها در محیط کشت DMEM حاوی پنی‌سیلین۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتردر فالکون و روی یخ قرارگرفتند. باقی مراحل استخراج در زیر هود استریل انجام شد. ابتدا دوسر استخوان با قیچی استریل بریده شد و با استفاده از یک سرنگ، محیط کشتDMEM حاوی۱۵٪ سرم گاوی، پنی‌سیلین۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به داخل کانال استخوانی با فشار پیستون هدایت گردید به گونه‌ای که با این عمل، مغز استخوان شستشو شده از سر دیگر استخوان خارج شد. سپس مغز استخوان به‌داخل لوله‌های۱۵ میلی‌لیتری هدایت شد و در ۱۲۰۰گرادیان به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه محیط رویی تخلیه و رسوب سلولی پس از شمارش با تراکم10^5 سلول در سانتی‌مترمربع در فلاسک‌های۲۵ سانتی‌مترمربعی در محیط کشت تازه در شرایط کشت سلولی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصدCO_2 کشت داده شد. برای کشت سلول‌های مزانشیمی استحصال شده، تلفیقی از پروتکل مرسوم فردنشتاین و تعویض مداوم محیط کشت استفاده شد (۱۸). کشت اولیه سلول تا زمان پرشدن کف فلاسک ادامه یافت. سپس سلول‌ها توسط آنزیم تریپسین از کف فلاسک کشت جدا شده و در پاساژ سوم یا چهارم جهت فلوسایتومتری و انجام ترانسفکشن آماده گردیدند.

فلوسایتومتری

تعیین درصد خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش فلوسایتومتری برای بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی انجام شد.

پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و شستشوی آنها با بافر PBS، تعداد 2×10^5 سلول در میکروتیوب ریخته شد. سپس سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در یخچال باanti CD۹۰–PE، anti CD۴۴–FITC، anti CDFITC–۲۹، anti CD۴۵–FITC و anti CD۴۵–FITCانکوبه گردیدند. همچنین جهت کنترل منفی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌هایanti IgG۲a κ–PE، IgG۱–κ–FITCانکوبه شدند و با دستگاه فلوسایتومتری (Partec GmbH, Germany) و نرم‌افزار Flow max آنالیز شدند.

ترانسفکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ترانسفکشن در پلیت‌های شش خانه‌ای و بر اساس پروتکل شرکت Roche صورت گرفت. برای این منظور حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن، سلول‌های مزانشیمی تریپسینه شدند و پس از شمارش در تراکم $1/5\times10^5$ سلول به‌ازای هر خانه کشت داده شدند.

برای واکنش ترانسفکشن، ۲ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب را با ۱۰۰میکرولیتراز محیط کشت پایه (فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک) مخلوط کرده و به مخلوط فوق ۶ میکرولیتر از محلول ترانسفکشن را اضافه و مجموعه پس از مخلوط شدن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مخلوط نهایی مستقیماً به‌صورت قطره‌ای به ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های مزانشیمی اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد و محیط کشت تازه و کامل همراه با ویتامینK به غلظت۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، مایع رویی سلول‌ها برای بررسی پروتئین فاکتور۹ جمع‌آوری گردید.

آزمون الایزا

فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت با استفاده از روش ساندویچ ELISA سنجیده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

محیط کشتی که جمع‌آوری گردیده بود به چاهک‌های پلیتی که از آنتی‌بادی پلی کلونال ضد فاکتور۹ پوشیده شده بود افزوده شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق و در محیط بدون نور به‌مدت یک ساعت، پلیت ۵ بار با محلول شستشو، شسته شد. در مرحله بعدی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود افزوده گشت. پس از انکوباسیون و شستشو، در نهایت به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن تترامتیل بنزیدین (TMB) به‌عنوان سوبسترا افزوده شد و پس از انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، واکنش توسط اسید سولفوریک ۰/۵ نرمال متوقف شد. جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد از طریق رقت‌های سریالی تهیه شده از پلاسمای طبیعی رسم شد و غلظت فاکتور ۹ در محیط کشت براساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

واکنشRT-PCRنیمه کمی

در روز دوم پس از ترانسفکشن، RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از کیت تخلیص RNA شرکت Roche استخراج شد و به‌عنوان الگو توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس[1] برای ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. از cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ای از cDNA فاکتور ۹ به طول ۳۲۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصیhFIXE۴-R و hKozF۹-Fدر واکنش PCR طبق پروفایل ذیل استفاده گردید (جدول۲).

واسرشتی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ادامه، واسرشتی در همان دما به‌مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. اتصال پرایمر[2]در ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. سپس مرحله ساخت رشته مکمل هدف از روی رشته اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. در مرحله آخر جهت تکمیل رشته‌های تکثیر شده ناکامل واکنش پلیمرازی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. این چرخه ۳۵ بار تکرار شد. برای کنترل داخلی و نرمالایز کردن واکنش‌های RT-PCR انجام شده، از تکثیر cDNA ژن GAPDH با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی آن استفاده شد.

تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (USA، Il،Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۸ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با کمک آزمون Duncan و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One–Way ANOVA) انجام شد. در همه محاسبات، ارزش عددی P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تعیین خلوص آن‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی به فلاسک کشت از دیگر سلول‌های مغز استخوان جدا شدند (شکل ۲). بعد از پاساژ سوم که سلول‌ها از نظر مرفولوژیکی به‌صورت یکنواخت درآمده بودند. سلول‌ها جهت بررسی مارکرهای سطحی CD۹۰، CD۴۴، CD۲۹ وCD۴۵ با روش فلوسایتومتری آماده شدند (شکل ۳).

[1] M-Mulv

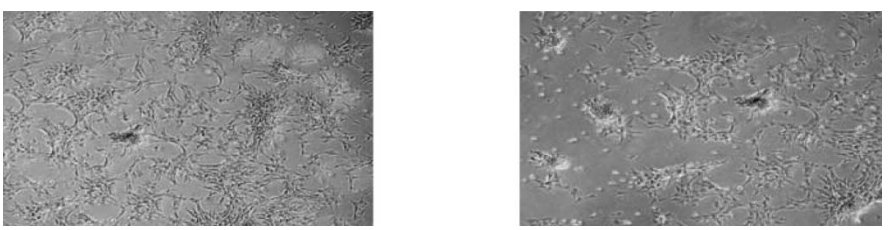
[2] Annealing

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

جدول۲) توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

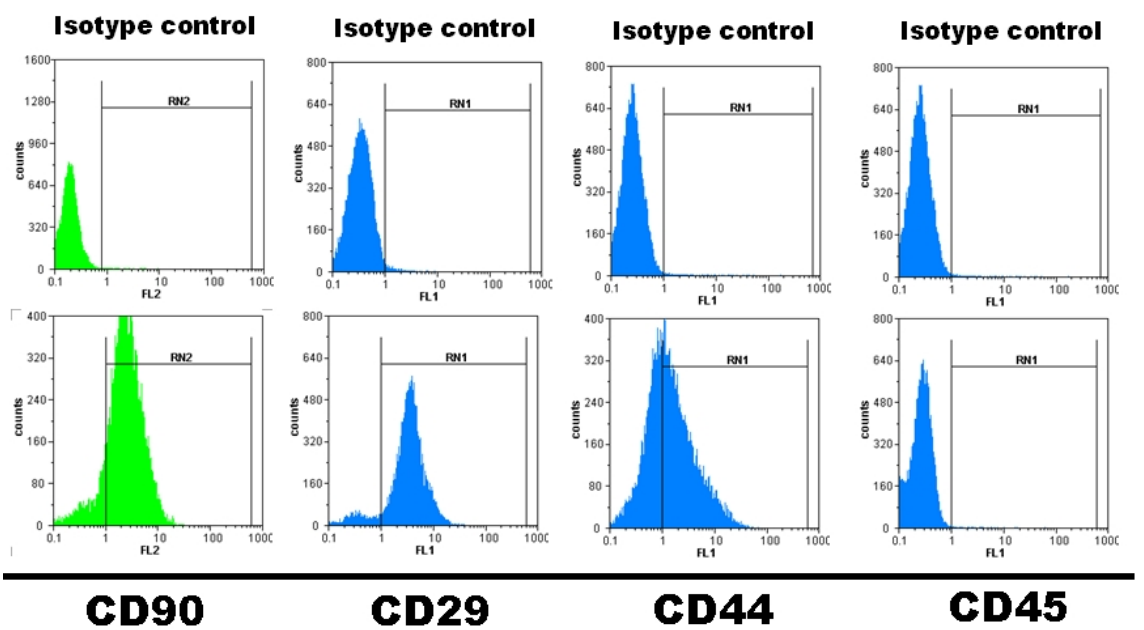
نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعه (bp)	T_m
hKozF9-F	5′GGATCC *GCCACC*ATGCAGCGCGTGAACATGAT 3′	۳۲۲	۵۴C
hFIXE4-R	5′CCT TGC AAC TGC CGC CATTTAAAC 3′		
GAPDH-F	5′CAAGGTCATCCATGACAACTTTG 3′		
GAPDH-R	5′GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3′	۴۹۶	۵۴C

توالی کوزاک GCCACCقبل از کدون شروع ترجمه در پرایمرhKozF9-F به‌صورت ایتالیک نشان داده شده است.



الف ب

شکل ۲) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش رت
الف) در روز هفتم ب) در روز چهاردهم



شکل ۳) پلات فلوسایتومتری مربوط به بیان CD۲۹، CD۴۴، CD۴۵ و CD۹۰ در سلول‌هایبنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش رت نژاد ویستار

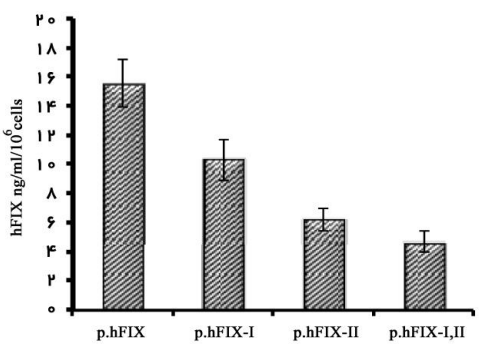
یافته‌های فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مارکر CD۴۴، ۵۹/۲ درصد، برای مارکرCD۹۰، ۸۶/۴ درصد برای مارکرCD۲۹، ۸۹/۵ درصد مثبت و برای مارکر هماتوپویتیک CD۴۵، ۰/۳

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

درصد مثبت بودند.

سنجش بیان فاکتور ۹ در سطح پروتئین

بر مبنای یافته‌های به‌دست آمده، سطح بیان فاکتور۹ در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با p.KhFIX، بیش از سلول‌های ترانسفکت شده با سایر سازه‌های ژنی بود. در روز دوم پس از ترانسفکشن، میزان غلظت فاکتور۹ بر مبنای 10^6 سلول در سازه‌های ژنی p.KhFIX، p.KhFIX-I، p.hFIX-II و p.hFIX-I-II به‌ترتیب ۱۵/۸، ۱۰/۴، ۷/۲ و ۴/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در سلول‌های کنترل منفی (ترانسفکت نشده) بیان فاکتور۹ صفر ارزیابی شد (نمودار۱).



نمودار۱) میزان فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های کنترل منفی (ترانسفکت نشده) بیان فاکتور ۹ صفر ارزیابی شد که نشان داده نشده است. مقادیر نشان داده شده میانگین بیان ± انحراف معیار، پس از دو بار تکرارآزمایش می‌باشد.

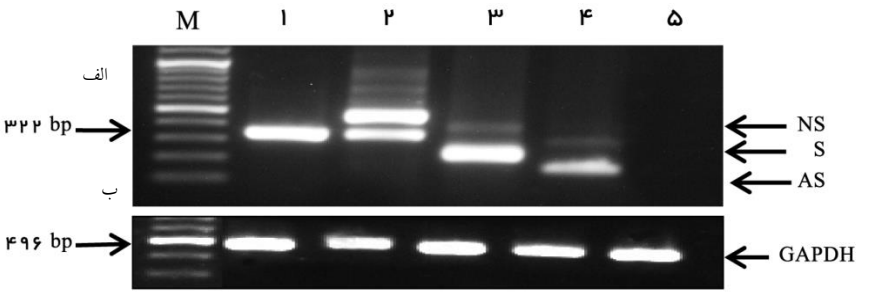
مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی در ۴۸ساعت پس ازترانسفکشن در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳) مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی در ۴۸ ساعت پس ازترانسفکشن

پلاسمید		افزایش بیان فاکتور ۹	ارزش عددی P
p.hFIXvs.	p.hFIX-I	۱/۵۲	۰/۰۱
	p.hFIX-II	۲/۵	۰/۰۰۱
	p.hFIX-I-II	۳/۳	۰/۰۰۰
p.hFIX-Ivs.	p.hFIX-II	۱/۶	۰/۰۱
	p.hFIX-I-II	۲/۲	۰/۰۰۴
p.hFIX-IIvs.	p.hFIX-I,II	۱/۳	۰/۰۳

بررسی بیان فاکتور۹ در سطحmRNA

با هدف بررسی نیمه کمی بیان در سطح mRNA و بررسی اسپلایسینگ اینترون‌های ۱ و ۲ ژن بتاگلوبین از cDNA ژن فاکتور ۹، آزمون RT-PCR انجام شد. با توجه به الگوی الکتروفورزی محصولات RT-PCR به خوبی نشان داده می‌شود که رویداد اسپلایسینگ در اینترون‌های ژن بتاگلوبین در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور۹ به‌طور ناقص و نابجا انجام می‌پذیرد. پس از نرمالایز کردن بر مبنای ژن GAPDH باند mRNA صحیح و بالغ ایجاد شده در سازه ژنی بدون اینترون از شدت بیشتری نسبت به سایر سازه‌ها برخوردار بود(شکل ۴).



شکل الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۱) p.hFIX ۲)p.hFIX-I ۳)p.hFIX-II ۴)p.hFIX-I,II و ۵) سلول‌های ترانسفکت نشده

AS: aberrant spliced product ،S: spliced product ،NS: non- spliced product ،M: Marker

شکل ب)cDNAGAPDH تکثیر شده مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده در هر ردیف

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

از آنجا که بیان فاکتور۹ در سازه ژنی بدون اینترون بالاتر از سایر سازه‌های ژنی دارای اینترون بوده در این مرحله با توجه به نیمه کمی بودن آزمون نشان داده می‌شود که در سازه ژنی بدون اینترون مقادیر mRNA بالغ بیشتری نسبت به سایر سازه‌های ژنی دارای اینترون حاصل می‌گردد که در نتیجه ترجمه آن‌ها به پروتئین، بیان بالاتری از فاکتور۹ را در خارج سلول‌ها فراهم می‌نماید.

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی امیدواری‌های بسیاری را در سلول درمانی و ژن درمانی بیماری‌های ژنتیکی و اکتسابی ایجاد کرده‌اند. توانایی بیان پایدار ترانسژن‌های مختلف در این سلول‌ها و عدم ایجاد پاسخ ایمنی در صورت پیوند به میزبان از مزیت‌های قابل توجه این سلول‌هاست (۱۹).

تاکنون ترانسژن‌های مختلفی از جمله فاکتور ۸ انسانی (۲۰ و ۲۱)، IL۳ (۲۲)، IL، IFN β، BMP۲، ۴، کلاژن نوع۱(۲۳ و ۲۴)، IL۷ (۲۵)، فاکتور رشد انسانی(۲۶)، اریتروپویتین انسانی(۲۷) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان شده‌اند. در مطالعات مختلفی بیان فاکتور۹انسانی با ناقلین ویروسی در سلول‌های مزانشیمی نشان داده شده است (۲۸ و ۲۹). بیماری ژنتیکی هموفیلی B مدل مناسبی جهت بررسی‌های سلول درمانی و ژن درمانی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب می‌شود. در مطالعه کنونی، از ناقلین پلاسمیدی جهت ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمی استفاده گردید که در درون هسته سلول‌های هدف به‌صورت اپیزومال قرار می‌گیرند و در مقایسه با ناقلین ویروسی که به‌صورت تصادفی در ژنوم سلول‌های هدف وارد می‌شوند از ایمنی بهتر و بالاتری برخوردارند. این ناقلین قابلیت ایجاد ذرات تکثیری که ممکن است در ناقلین ویروسی روی دهد را ندارند. به علاوه تهیه این ناقلین در مقیاس بالا، کم هزینه و با کیفیت یکسانی صورت می‌گیرد(۳۰).

در این مطالعه از پلاسمیدهای بیانی فاکتور۹ که مجهز به تلفیق‌های مختلفی از توالی‌های تنظیمی سیس از جمله پروموتر CMV، توالی کوزاک و اینترون‌های ۱و۲ ژن بتاگلوبین انسانی بودند استفاده شد و بیان فاکتور۹ از سلول‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون الایزا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بیان مینی ژن‌های فاکتور۹ را نشان دادند. در این مطالعه نشان داده شد که میزان ترشح فاکتور۹ به محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های ژنی مختلف، متفاوت است که احتمالاً بیانگر نقش توالی‌های مختلف سیس به‌کار رفته در هر وکتور بیانی است که موجب تفاوت در مراحل مختلف تنظیمی بیان یک ژن از جمله رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و ترشح می‌گردد. برخلاف انتظار نتایج قبلی گروه مبنی بر افزایش بیان در اثر استفاده از اینترون‌های هترولوگ (۱۷-۱۵)، معرفی اینترون‌های ۱و۲ ژن بتاگلوبین هم به‌طور جداگانه و هم به‌طور همزمان در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور۹ به‌طور چشمگیری بیان فاکتور۹ را در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون در سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاهش داد. بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون RT-PCR، توالی‌های رونویسی شده از سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های ژن بتاگلوبین به‌طور مناسبی پردازش نمی‌گردند که می‌توان بیان کاهش یافته فاکتور۹ را به آن نسبت داد. با در نظر گرفتن این واقعیت که توالی‌ها و ساختارهای اطراف اینترون و نیز ماهیت اینترون‌ها جهت کارایی پیرایش اینترون‌ها مهم می‌باشند، احتمالاً ساختار کایمریک ایجاد شده با

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

معرفی اینترون‌های ژن بتاگلوبین شرایط را برای اسپلایسینگ مناسب این توالی‌ها فراهم نمی‌کند.

در همین زمینه محققین نیز نشان داده‌اند که اینترون‌های هترولوگ به مانند اینترون‌های طبیعی خود ژن، به‌طور مؤثری بریده نمی‌شوند (۳۱). به استناد اطلاعات موجود در مقالات منتشر شده، بررسی اثرات توالی‌های تنظیمی سیس مختلف بر بیان فاکتور۹ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار است که در این مطالعه گزارش می‌گردد. نوع ساخت این سازه‌های ژنی به ما این امکان را می‌دهد که در ادامه پتانسیل بیان فاکتور۹ از این وکتورها را در مدل حیوان آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دهیم.

یافته‌های بررسی پیش رو نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بیان ژن فاکتور۹ را دارند. بالاترین سطح بیان فاکتور ۹ از سازه ژنی بدون اینترون و سازه ژنی دارای اینترون۱ بتا گلوبین به‌دست آمد. از سایر سازه‌های ژنی، بیان کمتری حاصل شد که احتمالاً ناشی از اسپلایسینگ نادرست اینترون‌های به‌کار رفته در آن‌ها می‌باشد. با این وجود بررسی کارایی سازه‌های ژنی ساخته شده در in vivo که اهمیت بسزایی دارد پیشنهاد می‌گردد.

سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و دانشگاه ارومیه انجام شده است. نویسندگان مقاله از سرکار خانم کبری رضازاده به واسطه همکاری مستمر ایشان قدردانی می‌نمایند.

References:

1.Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics,Sources, and Mechanisms of Action. Vet Clin North Am Equine Pract 2011; 27: 243-61.
2.Deng ZL, Sharff KA, Tang N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. Front Biosci 2008; 13: 2001-21.
3.Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J Orthop Res 2007; 25: 665-77.
4.Almeida-Porada G, Shabrawy D, Porada C, et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. Exp Hematol 2002;30:1454-62.
5.Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 7: 211-28.
6.Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 17734-8.
7.Ling L, Ni Y, Wang Q, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells derived from human fetal lung to hepatocyte-like cells. Cell Biol Int 2008; 32:1091-8.
8.Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, et al. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 735349.
9.Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 1156-66.
10.Baksh D, Song L, Tuan RL. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004; 8: 301-16.
11.Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol 2002; 55:127-44.
12.VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia. Curr Gene Ther 2001; 1:301-15.
13.Saenko EL, Ananyeva NM, Shima M, et al. The future of recombinant coagulation factors. J Thromb Haemost 2003; 1:922-30.
14.Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy. Semin Thromb Hemost 2004; 30:239-47.
15.Haddad-Mashadrizeh A, Zomorodipour A, Izadpanah M, et al. A systematic study of the

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

function of the human beta-globin introns on the expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells. J Gene Med 2009; 11:941-50.
16.Sam MR, Zomorodipour A, Shokrgozar MA, et al.Enhancement of the human factor IX expression, mediated by an intron derived fragment from the rat aldolase B gene in cultured hepatoma cells. Biotechnol Lett 2010; 32:1385-92.
17.Mashhadrizeh AA, Sam MR, Safari S, et al. Effect of the Kozak sequence on transient expression of human coagulation factor IX (FIX) minigene in mammalian cells. ISMJ 2008; 11:98-107.
18.Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nat Protoc2009; 4: 103-6.
19.Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. Expert Opin Biol Ther 2005; 5: 1571-84.
20.Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, et al. Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with Factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human Factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. Hum Gene Ther 2000;11:729-38.
21.Chiang GG, Rubin HL, Cherington V, et al. Bone marrow stromal cell-mediated gene therapy for hemophilia A: in vitro expression of human Factor VIII with high biologicalactivity requires the inclusion of theproteolytic site at amino acid 1648. Hum
Gene Ther 1999; 10:61-76.
22.Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, et al.LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. Hum Gene Ther 1997; 8:1417-27.
23.van Damme A, Vanden Diressche T, Collen D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. Curr Gene Ther 2002; 2: 195-209.
24.Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. Cytotherapy 2008; 10: 815-23.
25.Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, et al. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. Blood 1996; 88: 1887-94.
26.Hurwitz DR, Kirchgesserr M, Merrill W, et al. Systemic delivery of human growth hormone or human Factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. Hum Gene Ther 1997; 8: 137-56.
27.Bartholomew A, Patil S, Mackay A. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. Hum Gene Ther 2001; 12: 1527-41.
28.Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK. Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human factor IX model. J Gene Med 2003; 5:11-7.
29.Coutu DL, Cuerquis J, El Ayoubi R, et al. Hierarchical scaffold design for mesenchymal stem cell-based gene therapy of hemophilia B. Biomaterials 2011; 32: 295-305.
30.Miao CH, Thompson AR, Loeb K, et al. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo.MolTher 2001; 3:947-57.
31.Noé V, MacKenzie S, Ciudad CJ. An intron is required for dihydrofolate reductase protein stability. J Biol Chem 2003; 278: 38292-300.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]

ISMJ 2014; 17(2): 130-140

Original Article

Expression of the human coagulation factor IX in the bone marrow mesenchymal stem cells

AS.Azadbakhsh[1, 2], MR. Sam[1, 2*], F. Farrokhi[2],

AR. Zomorodipour[3], AK. Haddad Mashahrizeh[4] A. Mokarizadeh[5]

[1]Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, IRAN
[2]Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, IRAN
[3]Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IRAN
[4]Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, IRAN
[5]Department of Immunology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, IRAN

(Received 20Dec, 2012 Accepted 4 Feb, 2013)

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) are appropriate target for gene and cell-based therapy of hemophilia B patients. MSCs possess several unique properties such as capability of differentiating into multiple lineages and lower immunogenecity in transplant procedure that make them attractive candidates for cell and gene therapy. One of the challenges in the gene therapy is the low expression level of transgene. To improve expression, strong regulatory elements in the context of vectors could contribute to improve efficacy of gene therapy strategies. In this study four human factor IX (hFIX)-expressing plasmids equipped with various combination of human β-globin (*hBG*) introns and Kozak sequence were transfected into the MSCs and expression of the hFIX was evaluated in vitro.

Material and Methods: MSCs were obtained from tibias and the femora of rats and phenotypic characterization of the MSCs was determined by flow cytometry. Four hFIX-expressing plasmids were introduced into the culture-expanded MSCs using transfection agent. 48 hours after transfection, ability of the MSCs for expression of the hFIX and efficacies of the plasmids were evaluated by performing sandwich ELISA on cultured media as well as semi-quantitative RT-PCR. All analyses were performed with One-way ANOVA using SPSS software.

Results:The highest expression level of the hFIX was obtained from intron-less and *hBG* intron-I containing construct. The highest biological activity was obtained from *hBG* intron-I,II containing construct.

Conclusion: Successful expression of the hFIX was obtained from recombinant MSCs. MSCs were able to splice heterologous *hBG* intron-I from the hFIX-cDNA. Application of the*hBG* introns reduced the hFIX expression levels, probably due to improper splicing of the *hBG* introns.

Keywords: mesenchymal stem cells, hemophilia B, human factor IX, plasmid, human β-globin introns

***Address for correspondence*:Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, IRAN; E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-07]