خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ مکرر پاییز ۹۱
ویژه‌نامه سلول‌های بنیادی (۲۲۵-۲۱۴)

مقاله پژوهشی

# کلونینگ و بیان موقت ژن محافظت‌کننده سلولی، HO-1 ، در سلول‌های بنیادی مزانشیمال از طریق سیستم بیانی آدنوویروس بر مبنای تکنولوژی Gateway

*پژمان حامدی اصل[۱]، راحله حلبیان[۲]، محمد محمدزاده[۳]، مهشید محمدی‌پور[۴]، زهرا بخشنده[۱]، داریوش حامدی اصل[۵]، علی‌اصغر کیانی[۶]، دکتر محمدعلی جلیلی[۷]، دکتر ناصر امیری‌زاده[۸]، دکتر مهریار حبیبی رودکنار[۹]*

## چکیده

### سابقه و هدف

**HO-1 (هم‌اکسیژناز-۱) یکی از عوامل قدرتمند محافظت کننده سلولی می‌باشد. هدف از این مطالعه، کلونینگ و بیان موقت ژن HO-1 انسانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSCها) با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروسی برمبنای تکنولوژی Gateway بود.**

### مواد و روش‌ها

**در یک مطالعه تجربی، به منظور القای HO-1 ، رده سلولی A549 به مدت ۱ ساعت با اشعه UV مواجه گردید. cDNA توتال HO-1 جداسازی شد و از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتور pENTR TOPO/D کلون گردید. برای ایجاد کلون بیانی، واکنش نوترکیبی LR بین کلون اولیه و وکتور مقصد(pAd/CMV/V5-DEST) به انجام رسید. ویروس نوترکیب در رده سلولی یوکاریوتی مناسب تشکیل شد. MSCها به وسیله ویروس نوترکیب بیان‌کننده HO-1 آلوده‌سازی شدند.**

### یافته‌ها

**نتایج نشان داد که HO-1 انسانی نوترکیب با موفقیت کلون شده و صحت و قرار گرفتن ژن در قالب صحیح درون وکتور به وسیله تعیین توالی DNA تایید شد. بیان HO-1 در MSCها به وسیله آنالیز RT-PCR و وسترن بلات تایید گردید. این نتایج حاکی از این بود که بیان HO-1 موقت است.**

### نتیجه گیری

**بیان موقت ژن HO-1 انسانی در MSCها با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروسی، ممکن است یک استراتژی انتقال ژنی کارآمد در راستای ارتقای سلول درمانی فراهم نماید.**

***کلمات کلیدی:*** **سلول‌های بنیادی مزانشیمال، هم‌اکسیژناز-۱، مهندسی ژنتیک، آدنوویروس‌ها**

*تاریخ دریافت : ۹۰/۳/ ۴*
*تاریخ پذیرش : ۹۰/۷/۳۰*

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی دکترای خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- دانشجوی دکترای ژنتیک ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی بالینی ـ انستیتو تحقیقاتی سرم و واکسن‌سازی رازی کرج ـ ایران
۶- دانشجوی دکترای خون‌شناسی ـ مربی دانشگاه علوم پزشکی لرستان ـ خرم‌آباد ـ ایران
۷- PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۸- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۹- مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

## مقدمه

استفاده از سلول‌های بنیادی، روشی نوین در درمان بسیاری از بیماری‌های بدخیم مانند انواع سرطان و بیماری‌های ژنتیکی و مادرزادی است، به طوری که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی، بهترین گزینه برای درمان قطعی بسیاری از بیماری‌های کشنده محسوب می‌گردد(۲، ۱). تکنولوژی‌های انتقال ژن، اساساً بر مبنای وکتورهای ویروسی می‌باشند و به تازگی در زمینه پیوند سلولی در تعدادی از مطالعه‌های بالینی بر روی انسان با موفقیت چشمگیری همراه بوده‌اند(۵-۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمال( Mesenchymal Stem Cells) از گروه سلول‌های استرومایی غیر خون‌ساز مغز استخوان بوده که توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی همانند سلول‌های استخوانی، چربی، غضروف و سلول‌های عضلانی قلب را در آزمایشگاه و محیط بدن دارا می‌باشند(۷، ۶). ویژگی‌هایی از قبیل جداسازی و تکثیر آسان در *in vitro* و قابلیت تعدیل سیستم ایمنی و نیز نقش حمایتی در خونسازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به عنوان یک منبع سلولی ایده‌آل در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی معرفی نموده است(۱۰-۸).

استفاده بالینی از MSCها، نیازمند دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های صلاحیت‌دار از نظر عملکرد با فنوتیپ و ژنوتیپ پایدار می‌باشد، اما متاسفانه در روند جداسازی، پردازش و کشت سلولی، آسیب‌های فراوانی به این سلول‌ها وارد می‌آید که به موجب آن میزان بقا و عملکرد MSCها را پس از پیوند، بسیار پایین‌تر از حد انتظار می‌کشاند(۱۱). به طوری که کمتر از یک درصد سلول‌های پیوندی در طی ۴ روز پس از پیوند به عضله قلبی انسان و مدل‌های حیوانی، دارای بقای مطلوب بوده‌اند(۱۴-۱۲). از این رو، اگر روشی به کار گرفته شود که محافظت سلول‌ها را در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند موجب گردد، می‌توان انتظار داشت که درصد موفقیت پیوند تا حد مطلوبی افزایش یابد. یکی از روش‌های مؤثر و کاربردی در افزایش بقا و نیز مقاومت سلول‌های بنیادی، دستورزی ژنتیکی این سلول‌ها با عوامل محافظت‌کننده سلولی می‌باشد(۱۵، ۱۴).

هم اکسیژناز-۱ (HO-1)، یک آنزیم القایی در شرایط استرس سلولی می‌باشد. این آنزیم مولکول اکسیدکننده "هم" (Heme) را تجزیه نموده و محصولات جانبی هم چون منواکسید کربن(CO)، بیلی وردین و $Fe^{2+}$ را تولید می‌نماید. این محصولات می‌توانند به همراه HO-1 دارای عملکردهای محافظت سلولی باشند(۱۸-۱۶).

از مهم‌ترین عملکردهای سیستم HO-1 می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌آپوپتوتیک و ضد التهابی اشاره نمود، به گونه‌ای که در بسیاری از مطالعه‌ها، افزایش بیان HO-1 از طریق مهندسی ژنتیک یا عوامل دارویی، حفظ ساختار و عملکرد و طولانی شدن بقای بافت پیوندی را در پی داشته است(۲۰-۱۸). سیستم بیانی آدنوویروس مزایای فراوانی دارد که از آن جمله می‌توان به مواردی همانند بیان موقت و بالای ژن هدف، انتقال کارا و مؤثر ژن هدف در آزمایشگاه و محیط بدن، آلوده‌سازی آسان سلول‌های میزبان، تطبیق پذیری بالا با قطعات DNA خارجی، الحاق نیافتن به ژنوم میزبان، ایمنی زیستی بالا در نتیجه تولید آدنوویروس‌های فاقد صلاحیت تکثیری و تولید استوک‌های آدنوویروسی با تیتر بالا و نیز در زمان نسبتاً کوتاه اشاره نمود(۲۳-۲۱). با توجه به این که بیان دایم ژن هدف در سلول‌های میزبان ممکن است عوارض نامطلوبی از قبیل امکان جهش‌زایی و ایجاد تومور به واسطه الحاق ژنوم ویروس به ژنوم میزبان را در پی داشته باشد، از این روی برای درمان کوتاه مدت (درمان بیماری در یک مدت زمان مشخص) یا ژن درمانی مبتنی بر نوع بیماری(Diagnostic Therapy) ، ایمنی زیستی بالاتری تصور می‌شود(۲۴). هدف از انجام این پژوهش، بیان موقت HO-1 انسانی در MSCهای جداسازی شده از مغز استخوان انسان با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروس بر اساس تکنولوژی Gateway بوده و در راستای بهبود کیفیت و کارآیی سلول درمانی صورت پذیرفته است.

## مواد و روش‌ها

*پلاسمید و سویه باکتری:*

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پلاسمید



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

pENTR TOPO/D به عنوان وکتور اولیه و برای کلونینگ ابتدایی و پلاسمید pAd/CMV/V5-DEST به عنوان وکتور مقصد یا بیانی برای کلونینگ نهایی و بیان موقت ژن HO-1 در MSCها انتخاب شدند. هر دو وکتور محصول آمریکا(اینویتروژن) بودند و سویه باکتری *E.coli* TOP10 (اینویتروژن) به عنوان میزبان پروکاریوتی در مراحل مختلف کلونینگ در نظر گرفته شد. وکتور pENTR TOPO/D دارای ژن مقاومت به کانامایسین می‌باشد که برای غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده در میزبان پروکاریوتی استفاده می‌گردد. وکتور pAd / CMV / V5-DEST دارای پروموتر قوی سایتومگالوویروس (CMV) می‌باشد که بیان بالایی از ژن هدف را موجب می‌شود و نیز دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد که به منظور غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده در میزبان پروکاریوتی می‌توان از آن استفاده نمود.

*کشت سلولی:*

رده سلولی سرطان ریه انسان(A549)(بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) و رده سلولی کلیه جنین انسان (۲۹۳A)(اینویتروژن) به ترتیب در محیط کشت سلولی RPMI-1640 (آلمان، اگن‌اشتین و جیبکو) و محیط کشت سلولی DMEM-High Glucose (اینویتروژن) هر دو با ۱۰٪ FBS ، ۱٪ پنی سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ $CO_2$ کشت داده شدند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال از نمونه آسپیراسیون مغز استخوان سه داوطلب سالم(با کسب رضایت) برطبق دستورالعمل قبلی جداسازی شدند(۲۵).

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان با استفاده از فایکول(۱/۰۷۷ g/mL ؛ آمریکا، آمرشام) و به وسیله سانتریفیوژ شیب غلظت جداسازی و به محیط کشت سلولی اختصاصی DMEM-Low Glucose با ۱۰٪ FBS انتقال داده شدند. تعویض محیط کشت سلولی با فاصله زمانی ۳ روز، موجب حذف سلول‌های غیر چسبنده شد. در نهایت MSCها از پاساژ چهارم برای آزمایش‌های نهایی فراهم شدند. جهت تایید هویت سلولی، MSCهای تکثیر یافته در *in vitro* ، از نظر مرفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند و مارکرهای سطحی سلول‌ها توسط فلوسیتومتری(بر طبق دستورالعمل قبلی) تعیین گردید(۲۵).

*جداسازی و کلونینگ HO-1 به وکتور اولیه:*

رده سلولی A549 جهت القای بیان HO-1 به مدت ۱ ساعت در معرض اشعه UV قرار گرفت. سپس RNA سلول‌های اشعه دیده برطبق دستورالعمل استخراج گردید و به وسیله دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل ۱٪ آگارز، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت. پس از آن cDNA توتال با استفاده از RNA (۱۲۵۰ ng/µL)، آغازگرهگزامر راندوم و آنزیم ترانس کریپتاز III (اینویتروژن، cDNA synthesis kit) ساخته شد. در مرحله بعد، آغازگرهای اختصاصی ژن‌های HO-1 و بتا- اکتین طراحی شدند، و ژن HO-1 انسانی به وسیله PCR و با استفاده از آنزیم pfu DNA پلیمراز (رُوش، آلمان) جداسازی و تکثیر گردید(جدول ۱). به منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، ژن بتا- اکتین به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد. محصولات PCR در ژل ۲٪ آگارز الکتروفورز و سپس ارزیابی شدند.

**جدول ۱: آغازگرهای ۱ و ۲ جهت ایجاد قطعه ۸۶۸ جفت بازی از ژن هم اکسیژناز و آغازگرهای ۳ و ۴ بتا اکتین جهت ایجاد قطعه ۱۱۵ جفت بازی از ژن بتااکتین**

| ردیف | نام آغازگر | توالی |
|---|---|---|
| ۱ | Forward HO-1 | 5´-CAC CAT GGA GCG TCC GCA ACC CGA C-3´ |
| ۲ | Reverse HO-1 | 5'- CAT GGC ATA AAG CCC TAC AGC AAC TG-3' |
| ۳ | Forward β-actin | 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3' |
| ۴ | Reverse β-actin | 5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3' |

به منظور ایجاد انتهای چسبنده در ژن HO-1 جهت انجام واکنش کلونینگ TOPO، توالی نوکلئوتیدی CACC (توالی کوزاک) در ابتدای آغازگر مستقیم(Forward) لحاظ گردید. محصول PCR به وسیله واکنش کلونینگ TOPO بر طبق دستورالعمل(اینویتروژن) به وکتور اولیه pENTR



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

TOPO/D کلون شد. مخلوط واکنش(پلاسمید pENTR (TOPO/D-HO-1 به میزبان پروکاریوتی *E.coli* TOP10 ترانسفورم شد و باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت آگار LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. به منظور گزینش و بررسی کلونی‌های مثبت، در مرحله بعد به طور تصادفی از ۴ کلونی برطبق دستورالعمل، استخراج پلاسمید(رُوش، High pure plasmid isolation Kit) به عمل آمد و با انجام PCR در حضور آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن HO-1 بررسی شد. سرانجام، با ارسال نمونه جهت توالی‌یابی DNA ، صحت ژن HO-1 و قرار گرفتن آن در قالب صحیح درون ساختار وکتور اولیه مورد تایید قرار گرفت.

*ایجاد وکتور آدنوویروسی نوترکیب حاوی HO-1 انسانی:*

واکنش نوترکیبی LR جهت انتقال ژن HO-1 انسانی از وکتور اولیه(pENTR TOPO/D-HO-1) به وکتور مقصد (pAd/CMV/V5-DEST) با استفاده از آنزیم LR کلوناز II صورت گرفت. مخلوط واکنش به میزبان پروکاریوتی *E.coli* TOP10 ترانسفورم گردید. در پایان به طور تصادفی از ۶ کلونی رشد کرده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، استخراج پلاسمید به عمل آمد و به وسیله PCR در حضور آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن HO-1 مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید نتایج، کلون مثبت جهت تعیین توالی DNA ارسال گردید.

*تولید استوک‌های ویروسی و آلوده‌سازی MSCها:*

کلون بیانی حاوی ژن HO-1 انسانی(pAd/CMV/V5-HO-1) پس از استخراج پلاسمید به وسیله آنزیم محدودکننده PacI (آمریکا، New England Biolabs) برش داده شده و به صورت خطی درآمد. این ژنوم خطی شده، می‌بایست به رده سلولی سازنده ذره کامل آدنوویروس ۲۹۳ A Cells ترانسفکت گردد. به منظور تهیه نسبت بهینه شده، ۳ µL از معرف فیوژن -۶ به ۲ µg از DNA وکتور طی شده (نسبت ۳:۲) اضافه شد و به رده سلولی ۲۹۳ A Cells بر طبق دستورالعمل(آلمان ، رُوش) ترانسفکت گردید. ذرات آدنوویروسی نوترکیب در سلول‌های ۲۹۳ A (اینویتروژن) ایجاد و پس از ۱۳ روز، لیزات ویروسی اولیه در طی دو مرحله انجماد و ذوب به دست آمد. به منظور افزایش تیتر استوک ویروس، سلول‌های ۲۹۳ A توسط لیزات اولیه ویروسی آلوده‌سازی مجدد شدند و این روند ۳ مرتبه تکرار گشته و در نهایت استوک ۴ ویروسی حاصل گردید. سپس MSCها با رقت‌های سریال تهیه شده از استوک ۴ آدنوویروسی آلوده‌سازی و سایتوتوکسیسیتی ویروس با آزمایش MTT assay (آمریکا، سیگما) بررسی شد. غلظت غیرکشنده از استوک ویروسی برای آزمایش‌های نهایی تعیین شد.

*آنالیز بیان HO-1 به وسیله RT-PCR و وسترن بلات:*

جهت ارزیابی بیان ژن HO-1 انسانی، RNA توتال (۵۰۰ ng/µL) از MSCهای آلوده شده با آدنوویروس نوترکیب در روزهای مختلف استخراج گردید، cDNA توتال ساخته شد و به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای بررسی میزان بیان ژن HO-1 در روزهای مختلف، PCR انجام شد و به منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، ژن بتا-اکتین به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد. در پایان ۷ µL از محصولات PCR به وسیله الکتروفورز در ژل ۲٪ آگارز بررسی گردید. آزمایش وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان HO-1 در سطح پروتئین بود. در این راستا، پروتئین توتال به وسیله معرف Lysis M (آلمان، رُوش) بر طبق دستورالعمل از MSCهای آلوده شده با آدنوویروس نوترکیب در روزهای مختلف استخراج گردید و با استفاده از روش SDS-PAGE ، نمونه استخراجی پس از طی مراحل لازم بر روی ژل پلی آکریلامید الکتروفورز شد و از طریق روش وسترن بلات به غشای PVDF (آلمان، رُوش) انتقال یافت. در پایان با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال HO-1 انسانی (کانادا، Stressgen)، بیان پروتئین HO-1 در روزهای مختلف آنالیز گردید.

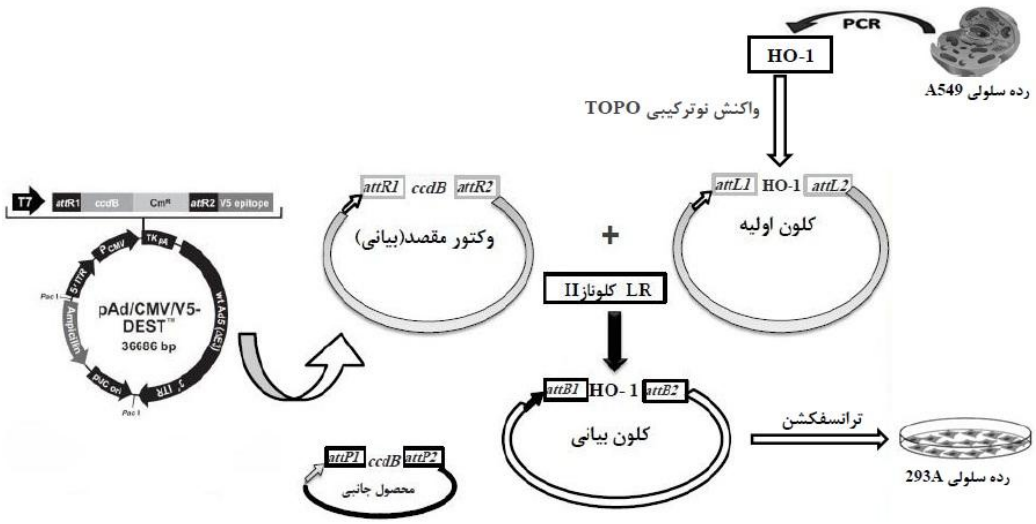
## یافته‌ها

*جداسازی HO-1 انسانی و ایجاد کلون اولیه حاوی ژن (pENTR TOPO/D-HO-1):*

به منظور القای بیان HO-1، سلول‌های ۵۴۹ A به مدت



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]




**شکل ۱: نمای کلی از آزمایش‌های کلونینگ بر اساس تکنولوژی Gateway . رده سلولی A549 به عنوان منبعی برای جداسازی ژن HO-1 انسانی استفاده شد. محصول PCR با انتهای چسبنده از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتور اولیه pENTR TOPO/D کلـون گردیـد. ایـن سـاختار کلون اولیه نامیده می‌شود. سپس جهت ایجاد کلون بیانی، واکنش نوترکیبی LR بـین کلـون اولیـه pENTR TOPO/D-HO-1 و وکتـور مقصـد pAd/CMV/V5-DEST صورت پذیرفت. در نتیجه کلون بیانی pAD/CMV/V5-HO-1 ایجاد شد. کلون بیانی حاوی ژن HO-1 بـه وسـیله آنـزیم محدود کننده PacI خطی گردید و به رده سلولی 293A جهت ساخت و افزایش تیتر ذرات آدنوویروسی نوترکیب ترانسفکت شد.**

یک ساعت با اشعه UV مواجه شدند. برای جداسـازی ژن HO-1 ، cDNA توتال به وسیله RT-PCR ساخته شـد و از طریـق آغازگرهـای اختصاصـی طراحـی شـده، HO-1 جداسـازی و تکثیـر گردیـد(شـکل ۱). جهـت کـاهش خطاهای احتمالی ناشی از همانندسازی در طـی PCR ، از DNA پلیمراز با صـحت بـالا (pfu DNA polymerase) بـا قابلیت ویرایشی استفاده شد. با الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگـارز، حضـور ژن HO-1 انسـانی بـه وسـیله مشاهده باند ۸۶۸ bp مطابق با طول قطعه ژنی موجـود در بانک ژنی (NCBI) تایید شد (شکل ۲).

بـرای تاییـد کلـون شـدن ژن HO-1 بـه وکتـور اولیـه pENTR TOPO/D ، بـه طـور تصـادفی از ۴ کلـونی، اسـتخراج پلاسـمید بـه عمـل آمـد و بـه وسـیله PCR بـا آغازگرهای اختصاصـی HO-1 بررسـی شـدند(شـکل ۳). برای تایید نهایی، وکتور نوترکیب اولیه تعیـین تـوالی شـد که نتیجـه آن حضـور ژن HO-1 در پلاسـمید نوترکیـب و قـرار گرفتـن آن در قالـب صحیح را تایید کرد. در نتیجه وکتور اولیه برای واکنش نوترکیبی LR مهیا گردید.

*تایید حضور ژن HO-1 در وکتور بیانی با PCR :*

پس از انجام واکنش نـوترکیبی LR بـین وکتـور اولیـه حاوی ژن HO-1 و وکتور بیانی، به منظور تایید حضور ژن HO-1 در ساختار وکتور آدنوویروسی، به طور تصـادفی از ۶ کلـون بیـانی رشـد کـرده در محـیط کشـت حـاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استخراج پلاسمید صورت گرفـت که به عنوان الگو برای PCR استفاده شدند.

نتایج PCR بـا آغازگرهـای اختصاصـی HO-1 حضـور بانـد ۸۶۸ bp را در کلـون‌هـای ۲، ۵ و ۶ نشـان داد. در کلون‌های ۱، ۳ و ۴ واکنش نوترکیبی LR به طـور صـحیح انجام نشده بود.

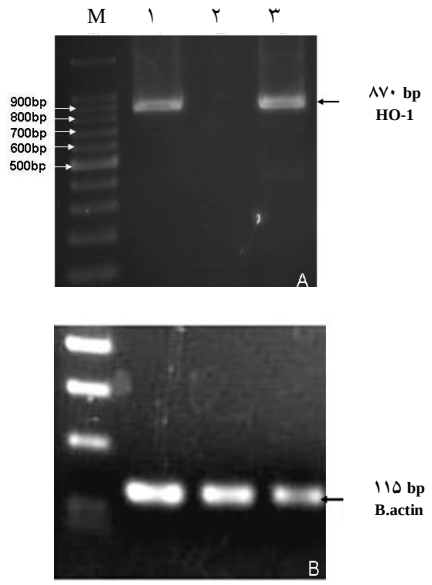
در پایان، کلون بیـانی حـاوی ژن HO-1 ( pAd/ CMV/ V5-HO-1) تعیین توالی شد، در نتیجه حضـور و صـحت تـوالی و قـرار گـرفتن ژن HO-1 در قالـب صـحیح درون سـاختار وکتـور آدنوویروسـی تاییـد شـد( Gen Bank accession number JF323038). کلـون بیـانی تاییـد شـده بـرای مراحـل بعـدی آزمـایش‌هـا مـورد اسـتفاده قـرار گرفت(شکل ۴).



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

*تعیین مارکرهای سطح سلولی اختصاصی MSCها به وسیله فلوسایتومتری:*

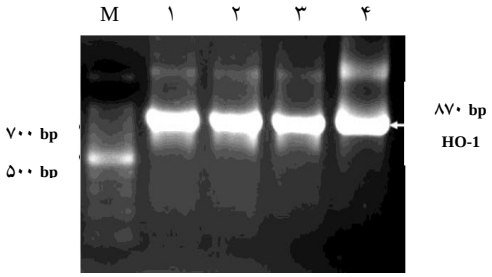
پس از مشاهده‌های میکروسکوپی، جهت تایید هویت MSCهای مشتق شده از مغزاستخوان انسان، مارکرهای سطح سلولی به وسیله فلوسیتومتری آنالیز شد. بیان مارکرهای سطحی CD73، CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای CD34، CD14 و CD45 فنوتیپ سطحی MSCها را که اخیراً گزارش شده است به درستی تایید می‌کند(۲۵).



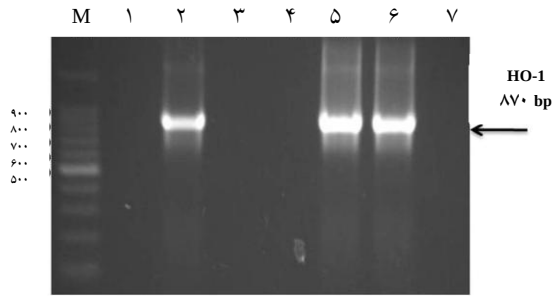

**شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HO-1 . A: نتایج RT-PCR ژن هم اکسیژناز-۱ : چاهک(M) شاخص اندازه ملکولی bp ۱۰۰(غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ و چاهک ۳ (باند bp ۸۶۸ ژن HO-1) مربوط به رده سلولی A549 مواجه شده با UV می‌باشد. چاهک ۲ رده سلولی کنترل را نشان می‌دهد. B: نتایج RT-PCR ژن بتااکتین: چاهک(M) شاخص اندازه مولکولی bp ۱۰۰(غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و چاهک ۲ شامل باند bp ۱۱۵ ژن بتااکتین نمونه کنترل و چاهک‌های ۱ و۳ شامل نمونه‌های القا شده با UV می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین نمونه‌ها وجود ندارد.**

*ترانسفکشن سلول‌های ۲۹۳A و تولید استوک ویروسی:*

وکتور نوترکیب آدنوویروسی به دلیل نداشتن قطعه ژنی E1 ، فاقد صلاحیت تکثیری است، در نتیجه ایجاد ذره کامل ویروس و افزایش تیتر ویروس نوترکیب، مستلزم ورود آن به رده سلولی اختصاصی سازنده آدنوویروس (293A) که دارای قطعه ژنی E1 است، می‌باشد. از سوی دیگر توالی‌های ITRs ویروسی می‌بایست جهت رونویسی و ترجمه پروتئین‌های ویروسی از طریق برش آنزیمی با PacI رونمایی گردد. در این راستا، ساختار وکتور آدنوویروسی نوترکیب به وسیله آنزیم محدود کننده PacI برش داده شده و خطی گردید.




**شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR کلون‌های نوترکیب حاوی ژن HO-1 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک(M) شاخص اندازه مولکولی bp ۱۰۰(غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۴ محصول PCR از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی کانامایسین. ۴ کلونی دارای باند bp ۸۶۸ بوده که نشان دهنده حضور ژن HO-1 درکلونی‌ها می‌باشد.**



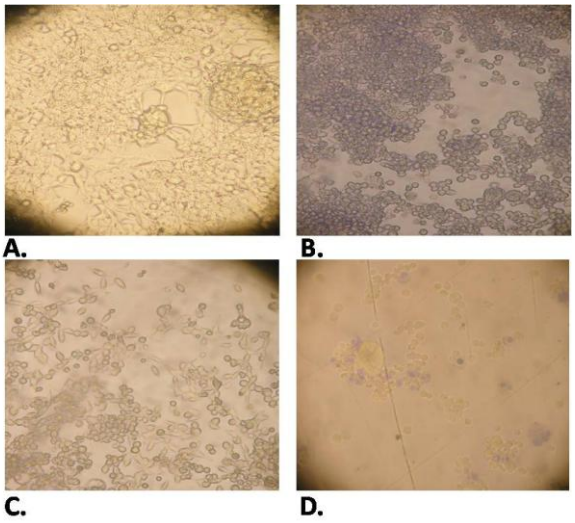

**شکل ۴: الکتروفورز محصول PCR کلونهای pAD/CMV/V5 نوترکیب حاوی ژن HO-1 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی bp ۱۰۰(غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۶ محصول PCR از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی آمپی‌سیلین. ۳ کلونی دارای باند bp ۸۶۸ بوده که نشان‌دهنده حضور ژن HO-1 درکلونی‌ها می‌باشد. چاهک ۷ کنترل منفی PCR است.**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

ترانسفکت در رده سلولی A ، با مقادیر مختلفی از DNA وکتور خطی شده و معرف ترانسفکشن فیوژن-۶ انجام شد.

در راستای افزایش بازدهی، سلول‌های A ۲۹۳ با تراکم ۷۰-۶۰ درصد در محیط کشت سلولی بدون FBS در نسبت بهینه شده ۳:۲ (۲ µg از DNA وکتور خطی شده و ۳ µL فیوژن-۶) در طی ۶ ساعت انکوباسیون، ترانسفکت گردیدند. سپس نتایج مربوط به ساخت و افزایش تیتر ذرات آدنوویروسی نوترکیب در طی ۱۳ روز به وسیله میکروسکوپ اینورت بررسی شد(شکل ۵). در پایان لیزات ویروسی اولیه تهیه شد و از آن برای آلوده‌سازی سلول‌های A ۲۹۳ به منظور افزایش تیتر آدنوویروس‌های نوترکیب استفاده شد. در طی ۳ مرحله آلوده‌سازی متوالی، استوک ۴ ویروسی جهت آزمایش‌های نهایی فراهم شد.

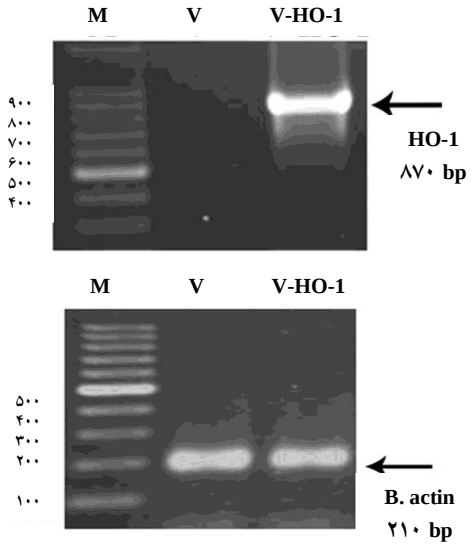



**شکل ۵ : مراحل ترانسفکشن و تولید لیزات ویروسی اولیه. A: نشان‌دهنده یک روز بعد از ترانسفکشن سلول‌های A ۲۹۳ با وکتور ویروسی p AD/CMV/V5-HO-1 . B: سلول‌های A ۲۹۳ شش روز پس از ترانسفکشن، آغاز مشاهده اثرات سایتوپاتیک ویروسی. C: سلول‌های A ۲۹۳ هشت روز پس از ترانسفکشن. D: سلول‌های A ۲۹۳ سیزده روز پس از ترانسفکشن، حدود ۹۰٪ سلول‌ها لیز شده‌اند.**

*بیان موقت HO-1 در MSCهای آلوده شده با وکتور آدنوویروسی نوترکیب:*

آلوده‌سازی سلول‌ها توسط ویروس و بیان مناسب ژن HO-1 در سلول‌های آلوده شده، نیازمند تعیین میزان غلظتی از ویروس است که باعث سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌ها نشود و نیز بیان ژن HO-1 درون سلول‌ها را موجب شود.

بدین منظور، پیش از آلوده نمودن(Infection) سلول‌ها برای انجام آزمایش‌های نهایی، غلظت‌های مختلفی از استوک ۴ آدنوویروس(µL/۱۰۰ µL ۴۰-۱) بر روی MSCها اضافه شد و با استفاده از MTT assay ، نتایج بررسی شد. در این آزمایش، غلظت‌های µL/۱۰۰µL ۱۵به بالا، غلظت‌هایی بودند که منجر به مرگ سلول‌ها می‌شدند(جدول۲).




**شکل ۶: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲٪ آگارز. شکل بالا، (M) مارکر bp ۱۰۰ (۵۰ ng/µL)، (ستون۱) نتیجه RT- PCR حاصل از MSCها آلوده شده با وکتور خالی(کنترل) پس از گذشت ۴ روز، (ستون۲) محصول RT-PCR حاصل از MSC ها آلوده شده با وکتور آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 پس از گذشت ۴ روز را نشان می‌دهد. شکل پایین به ترتیب بتا اکتین MSCها آلوده شده با وکتور خالی و وکتور حاوی ژن HO-1 نوترکیب پس از گذشت ۴ روز می‌باشد.**

پس از تعیین غلظت مطلوب استوک ویروسی (µL/۱۰۰µL ۱۵)، به منظور ارزیابی میزان بیان HO-1 در

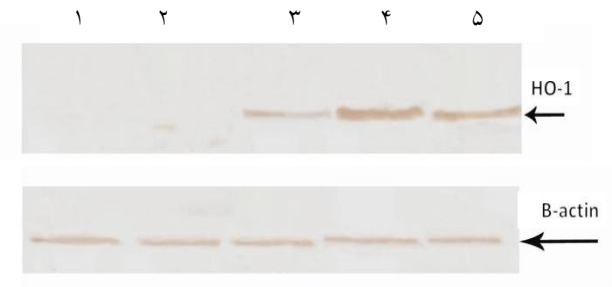


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

**جدول ۲: آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت‌های متفاوت ویروسی. در غلظت‌های ۱۵-۱ µL/۱۰۰ µL میزان زنده بودن سلول‌ها بیش از ۹۰٪ بود و از غلظت ۱۵ µL/۱۰۰ µL به بالا، اثرات سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌ها مشاهده شد.**

| غلظت (µL) / میانگین بقای سلول‌ها (درصد) | ۱ | ۵ | ۱۰ | ۱۵ | ۲۰ | ۲۵ | ۳۰ | ۳۵ | ۴۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V-HO-1 (وکتور) | ۹۶ ± ۶/۳ | ۹۱/۲ ± ۴/۱ | ۹۰ ± ۷/۳ | ۸۷ ± ۳/۸ | ۶۵/۱ ± ۳/۱ | ۳۲ ± ۲/۴ | ۱۲ ± ۲ | ۷/۳ ± ۱/۲ | ۲/۱ ± ۰/۹۹ |
| V (وکتور) | ۹۵ ± ۶/۴ | ۹۱/۵ ± ۵/۹۴ | ۸۹/۱ ± ۹/۳ | ۸۵/۰۱ ± /۴ | ۶۲/۳ ± ۳ | ۳۱ ± ۲/۲ | ۱۱/۸ ± ۲ | ۷/۰۱ ± ۱/۰۱ | ۲/۰۱ ± ۰/۹۳ |

سطح رونویسی و پروتئین در MSCها دست‌ورزی شده، به ترتیب RT-PCR و وسترن بلات بر روی نمونه‌های سلولی در روزهای مختلف(روز۱، روز۲، روز۴، روز۶، روز۸ و روز۱۰) بعد از آلوده‌سازی اجرا گردید. در سطح رونویسی، بیان اولیه HO-1 پس از آلوده‌سازی MSCها با وکتور آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 در روز دوم مشاهده شد و سپس در روز چهارم شاهد بیشترین میزان بیان بودیم (شکل ۶).




**شکل ۷: بررسی بیان پروتئین HO-1 سلول‌های بنیادی مزانشیمال آلوده شده با ۱۵ µL/۱۰۰ µL استوک ویروسی با آزمایش وسترن بلات. شکل بالا: چاهک ۱ : نمونه کنترل منفی. چاهک ۲: سلول‌ها یک روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک۳: سلول‌ها دو روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۴: سلول‌ها چهار روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۵: سلول‌ها شش روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1.چهار روز پس از آلودگی ویروسی بیشترین میزان بیان پروتئین HO-1 مشاهده شد. شکل پایین: بتا اکتین MSCها آلوده شده با وکتور آدنوویروسی نوترکیب.**

بیان موقت HO-1 در سطح پروتئین به وسیله آنالیز وسترن بلات تایید شد، به طوری که بیان اولیه پروتئین HO-1 در روز ۲ مشاهده شد و در روز ۴ به حداکثر رسید و سپس از روز ۶ به بعد، کاهش بیان پروتئین HO-1 مشاهده گردید (شکل ۷). این نتایج حاکی از این است که افزایش بیان HO-1 در MSCهای دست‌ورزی شده، به صورت موقت بوده است.

## بحث

در این پژوهش برای اولین بار افزایش بیان HO-1 انسانی به صورت موقت در MSCها از طریق سیستم بیانی آدنوویروسی بر اساس تکنولوژی Gateway گزارش شد. تکنولوژی Gateway یک روش کلونینگ جهانی بر مبنای ویژگی نوترکیبی جایگاه اختصاصی( Site-specific recombination) باکتریوفاژ لامبدا می‌باشد، که مسیری سریع و با کارآیی بالا جهت کلون کردن توالی‌های DNA به سیستم‌های وکتوری مختلف فراهم می‌آورد(۲۳). در این تکنولوژی، از دو نوع وکتور اولیه و وکتور مقصد یا بیانی استفاده می‌شود که بر طبق آن دو نوع کلون، یعنی کلون اولیه و کلون بیانی وجود دارد. در این مطالعه، pENTR TOPO/D و pAd/CMV/V5-DEST به ترتیب وکتور اولیه و وکتور بیانی بودند.

حلبیان و همکاران در سال ۲۰۰۹ از تکنولوژی Gateway با وکتور بیانی pDEST26 جهت بیان و تخلیص فاکتور انعقادی هفت نوترکیب استفاده کردند(۲۶). هم چنین در مطالعه‌ای مشابه، مسروری و همکاران در سال



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

۲۰۱۰ از طریق سیستم بیانی باکولوویروس بر اساس تکنولوژی Gateway به بیان بالایی از فاکتور انعقادی هفت نوترکیب در رده سلولی حشره(Sf9) دست یافتند(۲۷). در هر دو پژوهش، از وکتور اولیه pENTR TOPO/D استفاده شده بود.

در مطالعه حاضر، برای جداسازی و تکثیر ژن HO-1 در طی PCR و به منظور مرتفع ساختن خطاهای احتمالی ناشی از همانندسازی، از DNA پلیمراز pfu استفاده شد. این آنزیم قابلیت ویرایشی داشته و اشتباهات همانندسازی را تصحیح می‌نماید، در نتیجه توالی نوکلئوتیدی و عملکرد ژن مورد نظر حفظ می‌گردد. جهت ایجاد کلون اولیه، HO-1 cDNA مستقیماً از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتور pENTR TOPO/D در مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق با بازده نزدیک به ۱۰۰٪ و بدون نیاز به روش‌های برش آنزیمی و الحاقی و نیز پردازش‌های پس از PCR کلون گردید.

در طی واکنش نوترکیبی LR بین pENTR TOPO/D-HO-1 و pAd/CMV/V5-DEST، ژن HO-1 به وکتور بیانی انتقال یافت و در نتیجه آن pAD/CMV/V5-HO-1 ایجاد شد. رده سلولی A ۲۹۳ جهت ایجاد و افزایش تیتر ذرات آدنوویروسی نوترکیب استفاده گردید. در این راستا از روش لیپوزوم با معرف ترانسفکشن فیوژن-۶ برای انتقال DNA وکتور خطی شده به سلول‌های A ۲۹۳ استفاده شد. از مزایای این معرف می‌توان به دستورالعمل اجرایی آسان، سهولت در بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، سایتوتوکسیسیتی پایین، محافظت از ساختار DNA وکتور از تجزیه شدن در برابر آنزیم نوکلئیناز(Nucleinase) و عدم محدودیت نسبت به اندازه مولکولی وکتور اشاره نمود(۲۸). برطبق این شواهد، در این مطالعه فیوژن-۶ جهت ترانسفکت ساختار DNA وکتورخطی شده به سلول‌های A ۲۹۳ انتخاب شد. بازده ترانسفکشن به روش لیپوزوم تحت تاثیر پارامترهایی از قبیل نسبت مخلوط معرف ترانسفکشن به DNA وکتور، زمان انکوباسیون و غلظت سرم خون در محیط کشت سلولی قرار دارد (۳۰، ۲۹). در راستای بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، با بررسی مقاله‌ها و آنالیز نسبت‌های مختلف در آزمایش‌های اولیه، بهترین نسبت DNA وکتور خطی شده به معرف فیوژن-۶ به صورت ۳:۲ (یعنی ۳ µL ، فیوژن-۶ به ۲ µg ، DNA وکتور خطی شده) حاصل شد (۳۲، ۳۱). هم چنین از محیط کشت DMEM بدون FBS در مراحل ترانسفکشن استفاده شد، زیرا سرم حاوی پروتئین‌هایی با بار الکتریکی منفی و لیپید با بار الکتریکی مثبت بوده، که می‌تواند قابلیت ارتباطی لیپوزوم با DNA را جهت تشکیل کمپلکس کاهش دهد. در مطالعه مشابهی، توشیناری تسوبوکاوا و همکاران در سال ۲۰۱۰ از روش لیپوزوم با معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰ جهت ترانسفکشن DNA وکتور پلاسمیدی حاوی ژن HO-1 به MSCها استفاده کردند، که در آن پس از گذشت ۲ روز، بیشترین بیان HO-1 مشاهده شد و سپس از روز ۴ ، بیان HO-1 کاهش یافت(۳۳).

با وجود عملکردهای محافظت سلولی HO-1، مطالعه‌ها نشان داده‌اند که بیان پایدار HO-1 ممکن است اثرات نامطلوبی برروی سلول‌ها داشته باشد(۳۵، ۳۴). در تایید این مطلب، یائو لیانگ تانگ و همکاران(۲۰۰۵) به منظور بیان موقت HO-1 در MSCها از وکتور پلاسمیدی با حس‌گر بیولوژی حساس به اکسیژن(OST) جهت القای بیان HO-1 در شرایط هایپوکسی ریز محیط پیوندی مدل‌های حیوانی استفاده کردند(۳۶). در نتیجه، با توجه به این که اکثریت MSCها، در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند، بنابراین بیان موقت HO-1 در MSCها با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروسی می‌تواند منطقی باشد. همچنین در مطالعه‌های مشابهی، عبدالمجید و همکاران(۲۰۰۹) جهت بیان موقت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز خارج سلولی(EC-SOD) در MSCها و وانگ و همکاران(۲۰۰۹) جهت بیان موقت پروتئین شوک حرارتی-۲۰ (Hsp-20) در MSCها هر دو از وکتور آدنوویروسی استفاده کردند(۳۸، ۳۷). در راستای شواهد ارایه شده، در این مطالعه از وکتور آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 جهت آلوده‌سازی MSCها استفاده شد، در این خصوص نتایج آنالیز RT-PCR و وسترن بلات، افزایش بیان موقت HO-1 را در MSCها تایید می‌کند، به طوری که بیان HO-1 دو روز پس از آلوده‌سازی شروع شد و در روز چهارم بیشترین میزان بیان مشاهده گردید و



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

در ادامه در روز ششم، بیان HO-1 کاهش یافت. انتقال کارا و موثر ژن هدف به وسیله وکتور آدنوویروسی در پیوستگی با بهره‌مندی از تکنولوژی Gateway می‌تواند از دیگر برتری های این پژوهش در مقایسه با سایر مطالعه‌های مشابه باشد، به طوری که تکنولوژی Gateway از طریق مکانیسم نوترکیبی همولوگ، موجب ایجاد ساختارهای آدنوویروسی با درجه بالایی از صحت و کارآیی می‌شود و در نتیجه دستکاری‌های ژنی ناشی از روش‌های برش آنزیمی و الحاقی صورت گرفته در وکتورهای متداول را مرتفع ساخته و سیستم را برای استفاده در کاربردهایی با ظرفیت بالا و نیز در پروسه‌های انتقال بسیار توانمند می‌سازد.

پژوهش حاضر می‌تواند راه‌کار جدیدی برای افزایش مقاومت و بهبود عملکرد MSCها در شرایط نامطلوب قبل از پیوند و بعد از پیوند به وسیله فراهم ساختن سیستم انتقال ژنی با درجه بالایی از صحت و کارآمدی در راستای ارتقای اثرات درمانی و کیفیت سلول درمانی در آینده ارایه دهد.

## نتیجه‌گیری

پایه‌گذاری سیستم‌های انتقال ژنی با کارآیی بالا به همراه دسترسی به بیان بالایی از ژن‌هایی با قابلیت درمانی در MSCها، می‌تواند نیازمندی به کشت‌های طولانی مدت را که موجب پیری و کاهش کیفیت و عملکرد سلولی می‌شوند، مرتفع ساخته و امکان دست‌یابی به اثرات درمانی قابل انتظار با تعداد سلول‌های پیوندی کمتر را فراهم نماید.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می‌باشد و با حمایت مالی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است.

## References:

1- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, *et al*. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. Blood 1977; 49(4): 511-33.
2- Futagawa Y, Terasaki PI. An analysis of the OPTN/UNOS Liver Transplant Registry. Clin Transpl 2004; 315-29.
3- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, *et al*. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 2000; 288(5466): 669-72.
4- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, *et al*. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science 2002; 296(5577): 2410-3.
5- Takahashi Y, Geller DA, Gambotto A, Watkins SC, Fung JJ, Murase N. Adenovirus-mediated gene therapy to liver grafts: successful gene transfer by donor pretreatment. Surgery 2000; 128(2): 345-52.
6- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276(5309): 71-4.
7- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-7.
8- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood 2001; 98(9): 2615-25.
9- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, *et al.* Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. Blood 2006; 107(5): 1878-87.
10- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003; 31(10): 890-6.
11- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999; 107(2): 275-81.
12- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105(1): 93-8.
13- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, *et al*. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann Thorac Surg 2002; 73(6): 1919-25.
14- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

death in cardiac repair. J Mol Cell Cardiol 2008; 45(4): 567-81.
15- Haider HKh, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. J Mol Cell Cardiol 2008; 45(4): 554-66.
16- Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15(1): 9-19.
17- Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, *et al*. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. Transplantation 2002; 73(2): 287-92.
18- Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, *et al.* Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. Hum Gene Ther 2002; 13(10): 1189-99.
19- Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, *et al*. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. Nat Med 1998; 4(9): 1073-7.
20- DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R, Bromberg JS. Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. Transplantation 2000; 69(1): 120-8.
21- Russell WC. Update on Adenovirus and its Vectors. J Gen Virol 2000; 81(pt 11): 2573-2604.
22- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(19): 8802-6.
23- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. Genome Res 2000; 10(11): 1788-95.
24- Fehse B, Roeder I. Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. Gene Ther 2008; 15(2): 143-53.
25- Halabian R, Mohammadi MH, Salimi M, Amani M, Roushande AM, Aghaipoor M, *et al*. Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Stably Expressing Green Fluorescent Protein. IJBMS 2010; 13(2): 24-30.
26- Halabian R, Fathabad ME, Masroori N, Roushandeh AM, Saki S, Amirizadeh N, *et al*. Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology. Blood Transfus 2009; 7(4): 305-12.
27- Masroori N, Halabian R, Mohammadipour M, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Najafabadi AJ, *et al*. High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells. Biotechnol Lett 2010; 32(6): 803-9.
28- Zhang P, Zhang H, Hu SS, Chen LG, Wei YJ. [Plasmid transfection of rat bone marrow mesenchymal stem cells by cationic lipid for gene-modified cell transplantation therapy]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2005; 27(4): 504-8.
29- Eastman SJ, Tousignant JD, Lukason MJ, Murray H, Siegel CS, Constantino P, *et al*. Optimization of formulations and conditions for the aerosol delivery of functional cationic lipid: DNA complexes. Hum Gene Ther 1997; 8(3): 313-22.
30- Felgner PL. Improvements in cationic liposomes for *in vivo* gene transfer. Hum Gene Ther 1996; 7(15): 1791-3.
31- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, *et al*. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 1996; 16(9): 4606-13.
32- Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. Circulation 1996; 94(7): 1647-54.
33- Tsubokawa T, Yagi K, Nakanishi C, Zuka M, Nohara A, Ino H, *et al*. Impact of anti-apoptotic and anti-oxidative effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010; 298(5): H1320-9.
34- Deramaudt TB, da silva JL, Remy P, Kappas A, Abraham NG. Negative Regulation of Human Heme Oxygenase in Microvessel Endothelial Cells by Dexamethasone. Proc Soc for Exp Biol Med 1999; 222(2): 185-93.
35- Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. FASEB J 1999; 13(13): 1800-9.
36- Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol 2005; 46(7): 1339-50.
37- Abdel-Mageed AS, Senagore AJ, Pietryga DW, Connors RH, Giambernardi TA, Hay RV, *et al*. Intravenous administration of mesenchymal stem cells genetically modified with extracellular superoxide dismutase improves survival in irradiated mice. Blood 2009; 113(5): 1201-3.
38- Wang X, Zhao T, Huang W, Wang T, Qian J, Xu M, *et al*. Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors. Stem Cells 2009; 27(12): 3021-31.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; Stem Cell Suppl. 9(3): 214-225*

***Original Article***

# Cloning and transient expression of cytoprotective factor, HO-1, in mesenchymal stem cells using the adenoviral expression system through Gateway technology

***Hamedi Asl P.[1], Halabian R.[2], Mohamadzadeh M.[1], Mohammadipour M.[1], Bakhshandeh Z.[1], Hamedi Asl D.[3], Kiani AA.[4], Jalili M.[1], Amirizadeh N.[1], Habibi Roudkenar M.[1]***

*[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
*[2]Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
*[3]Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
*[4]Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Heme oxegenase1 (HO-1) is one of the potent cytoprotective factors. The goal of this study was to perform cloning and transient over expression of the human HO-1 gene in mesenchymal stem cells (MSCs) using the adenoviral expression system based on the gateway technology.

***Materials and Methods***

In order to induce expression of HO-1, A549 cell lines were exposed to UV for 1 hour. The full length cDNA of HO-1 was isolated and cloned into pENTR TOPO/D vector by TOPO cloning reaction. To construct the expression clone, a LR recombination reaction was carried out between the entry clone and destination vector, pAd/CMV/V5-DEST. The recombinant virus was produced in the appropriate mammalian cell line. MSCs were infected by the recombinant virus expressing HO-1.

***Results***

The results showed that human recombinant HO-1 was successfully cloned and the accuracy of the gene and its frame in the vector were confirmed by DNA sequencing. Expression of HO-1 in MSCs was confirmed by RT-PCR and western blot analysis. The results indicated that the expression of HO-1 is transient.

***Conclusions***

Transient expression of human HO-1 gene in MSCs by using adenovirus expression system may be considered as an efficient gene transfer strategy into MSCs in order to promote stem cell therapy.

***Key words:*** Mesenchymal Stem Cells, Heme Oxygenase-1, Genetic Engineering, Adenoviruses

*Received: 25 May 2011*
*Accepted:22 Oct 2011*

*Correspondence:* Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *roudkenar@ibto.ir*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]