خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۴ زمستان ۹۴ (۳۳۰-۳۱۸)

مقاله پژوهشی

ارزیابی میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مجاورت با سکرتوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α*

فاطمه سلطانی[۱]، فاطمه امیری[۲]، مریم خیراندیش[۳]، مهشید محمدی‌پور[۴]، محسن جلیلی[۵]، مهریار حبیبی رودکنار[۶]، محمد علی جلیلی[۷]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، یک منبع سلولی ایده‌آل برای پیوند می‌باشند. اما استرس‌های مختلف در طول تکثیر آزمایشگاهی منجر به کاهش بقای سلولی آن‌ها پس از پیوند می‌شود. بنابراین به کارگیری راه‌کارهای عملی جهت افزایش میزان بقای آن‌ها در ریز محیط سرشار از استرس بسیار ضروری است. هدف این مطالعه، بررسی اثر سکرتوم ترشحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با دو ژن *Nrf2* و *HIF-1α* بر بقای این سلول‌ها، تحت استرس‌های سلولی مختلف بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2 به طور جداگانه و هم زمان به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف ترانسفکت شدند. ۷۲ ساعت بعد، بیان *HIF-1α* و *Nrf2* در سلول‌های دست‌ورزی شده به روش RT-PCR بررسی شد. گروه‌های سلولی مختلف با استرس اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن مواجه شدند. سکرتوم سلول‌های ترانسفکت شده جمع‌آوری و تغلیظ شده و با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف مجاور شد. بقای سلول‌ها پس از اعمال شرایط استرس مشابه با روش WST-1 بررسی شد.

یافته‌ها

سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده، ژن‌های *HIF-1α* و *Nrf2* را بیان کردند. این سلول‌ها میزان بقای (۵/۵٪ ± ۸۴/۵٪) بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل(۴٪ ± ۵۵/۳٪) نشان دادند. هم چنین بقای سلول‌های کشت داده شده با سکرتوم پس از مواجهه با استرس‌های مختلف، ۶٪ ± ۸۱/۳٪ و بقای گروه کنترل ۴/۳٪ ± ۵۷/۹٪ بود.

نتیجه گیری

سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در برابر استرس اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن محافظت می‌کند.

کلمات کلیدی: محیط رویی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بقای سلولی

تاریخ دریافت : ۹۳/۷/۶
تاریخ پذیرش : ۹۴/۴/۲

۱- کارشناس ارشد زیست فن‌آوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- PhD ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران – ایران
۴- دانشجوی PhD ژنتیک ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- دانشجوی دامپزشکی ـ دانشگاه آزاد اسلامی کرج ـ کرج ـ ایران
۶- PhD زیست فن‌آوری پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۷- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

مقدمه

امروزه انواع مختلف سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌های ارثی و اکتسابی کاربرد دارند. پس از شناسایی گروه دیگری از سلول‌های بنیادی غیر خونساز یا همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی، امید به استفاده از این سلول‌ها در پیوند و ترمیم بافت‌های آسیب دیده افزایش پیدا کرد و گروه‌های مختلفی بر روی کاربرد بالینی این سلول‌ها کار کرده‌اند(۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی(Mesenchymal (MSCs Stem Cells ، توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را داشته، در آزمایشگاه به آسانی از بافت‌های مختلف جدا و تکثیر داده می‌شوند(۵-۲). این سلول‌ها دارای ویژگی‌های خاص مانند خصوصیت تعدیل ایمنی و توانایی مهاجرت و جایگزینی در محل آسیب دیده هستند(۹-۶). امروزه از این سلول‌ها به عنوان یک منبع سلولی ایده آل در زمینه سلول درمانی، ژن درمانی و نیز مهندسی بافت استفاده می‌شود.

با این وجود، آسیب‌های وارده به آن‌ها قبل و بعد از پیوند که در نتیجه عوامل آسیب‌رسان ریز محیط‌ها ایجاد می‌شوند، در مجموع باعث مرگ زودرس سلول‌های بنیادی مزانشیمی در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند شده و موجب کاهش کارآیی سلول درمانی به پایین‌تر از حد انتظار می‌گردند(۱۰). از مهم‌ترین این عوامل آسیب‌رسان؛ کمبود اکسیژن، فقر غذایی و وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از واکنش‌های اکسیداسیون و احیا یا همان استرس اکسیداتیو می‌باشند(۱۱).

با توجه به مطالب ذکر شده، افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر شرایط استرس‌زا جهت افزایش کارآیی پیوند این سلول‌ها، بسیار حیاتی است(۱۲). بدین منظور در مطالعه‌های مختلف، راه‌کارهای گوناگونی همانند پیش شرطی کردن و بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار گرفته شده‌اند(۱۴، ۱۳).

مطالعه‌های متعددی در زمینه افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها با ژن‌های محافظت کننده سلولی مختلف انجام شده است(۱۸-۱۵). از جمله ژن‌های محافظت کننده سلولی، دو ژن *Nrf2* (NF-E2 یا Nuclear Factor-Erythorid Related Factor 2 -) و *HIF-1α* (Hypoxia Inducible Factor-1α) می‌باشند که به عنوان دو فاکتور رونویسی منجر به بیان مجموعه ژن‌هایی می‌گردند که افزایش مقاومت این سلول‌ها را مقابل شرایط استرس اکسیداتیو و کمبود اکسیژن به دنبال خواهد داشت(۲۰، ۱۹).

اما متأسفانه با وجود مؤثر بودن روش دست‌ورزی ژنتیکی در افزایش کارآمدی سلول‌ها در پیوند، استفاده از سلول دست‌ورزی شده در بالین، مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیست. از طرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی ترشح سیتوکین‌ها و مولکول‌های فعال زیستی زیادی را دارا می‌باشند(۲۱). سکرتوم (Secretome) مجموعه‌ای از سیتوکین‌های تعدیل‌کننده ایمنی و درمانی مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است(۲۲). به نظر می‌رسد سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* و *HIF-1α* ، حاوی مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی باشد که می‌توانند در افزایش مقاومت سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو و شرایط کمبود اکسیژن مؤثر باشند، بدون دست‌ورزی مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نتایج قابل قبولی در افزایش بقای این سلول‌ها به دنبال داشته و گامی مؤثر جهت افزایش کارآیی استفاده از این سلول‌ها در بالین محسوب شود.

از آن جا که سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاربردهای فراوانی در سلول درمانی دارند، بهبود درصد بقای آن‌ها با روش‌های مناسب مانند استفاده از مواد ترشحی خود این سلول‌ها می‌توانند نگرانی‌ها در زمینه استفاده از سایر روش‌های موجود در افزایش بقای آن‌ها مانند عدم ایمنی و سلامت و یا احتمال بر انگیختن پاسخ ایمنی را کاهش دهد.

با توجه به مطالعه‌ها و مطالب ذکر شده و با این فرضیه که استفاده از سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α* می‌تواند مشکل عدم امکان استفاده از سلول‌های دست‌ورزی شده در بالین را مرتفع سازد و از طرفی فقدان مطالعه مشابه در زمینه بررسی اثرات پاراکرین سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بقای این سلول‌ها، این مطالعه با هدف بررسی اثر سکرتوم ترشحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

HIF-1α بـر میـزان بقـای ایـن سـلول‌هـا پـس از القـای استرس‌های سلولی مختلف(کمبود اکسیژن، فقـر غـذایی و استرس اکسیداتیو) طراحی و انجام شد.

بدین ترتیب پس از کشت سلول‌های بنیادی مزانشـیمی بندناف در شرایط مناسب، محیط کشـت رویـی(سـکرتوم) آن‌ها جمع‌آوری شده و با این سلول‌هـا مجـاور گردیـد. در نهایت میـزان بقـای سـلول‌هـای کشـت داده در مجـاورت سکرتوم پس از مواجهه با شرایط استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیـژن و فقـر سرمـی نسبـت بـــه گـروه کنتـرل ارزیـابی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف موجود در ذخیره سلولی مرکز تحقیقات مؤسسه عـالی آموزشی- پژوهشی طب انتقال خون، کـه قـبلاً مارکرهـای سطحی و توانایی تمایز آن‌ها به سه رده چربی، اسـتخوان و غضـروف بررسـی و تأییـد شـده بـود، اسـتفاده شـد(۲۳). پلاسمید نوترکیـب حـاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-Nrf2) و پلاسـمید نوترکیـب حـاوی ژن *HIF-1α* pcDNA3.1-HIF- (1α) نیز قبلاً با روش بـرش و اتصـال آنزیمـی تولیـد و بـا روش‌های PCR ، هضم آنزیمی و تـوالی‌یـابی DNA تأییـد شده بودند و باکتری اشرشیاکولـی نـوع DH5α دارای ایـن پلاسمیدهای نوترکیب به صورت ذخیره (استوک) در مرکز تحقیقات موجود بود(۱۸، ۱۷).

آماده‌سازی و استخراج پلاسمیدهای نوترکیب:

بـاکتری‌هـای حـاوی pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α از استوک خارج شده و در محیط LB مایع حـاوی آنتی‌بیوتیک اختصاصی کانامایسین یا آمپـی‌سـیلین(شـرکت اینویتروژن آمریکا) به صورت جداگانه به مدت یـک شـب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد شـیکردار(شـرکت ایـوی من استرالیا) کشت داده شـدند. پلاسـمیدهای نوترکیـب بـا استفاده از کیت استخراج پلاسمید(شـرکت رُوش آلمـان) و بر طبق روش کار کیت استخراج و کمیت آن‌ها بـا اسـتفاده از اسـپکتروفتومتر نـانودراپ (شـرکت‌هـای تـک آمریکـا) اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند نـاف از دمـای ۸۰- یـا تانک ازت خارج شده، پس از یخ‌زدایی با محـیط DMEM-Low glucose حـاوی ۱۰٪ سـرم جنـین گـاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سـیلین(هـر سـه مـاده از شرکت اینویتروژن آمریکا) مخلوط شده و به ظروف کشت مناسب و استریل منتقـل و در انکوبـاتور اسـتاندارد کشـت سلولی، کشت داده شدند. خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌هـا با استفاده از میکروسکوپ نوری معکـوس(شـرکت نیکـون ژاپن) بررسی شـد. سـپس تعـداد ۳۰۰ هـزار عـدد از ایـن سلول‌ها در چاهک‌های پلیـت‌هـای ۶ خانـه‌ای کشـت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها بـه کـف پلیـت، از آن‌هـا جهت انجام مراحل ترانسفکشن(ورود DNA پلاسمیدی بـه داخل سلول) استفاده شد.

ترانسفکشن پلاسمیدهای نوترکیب بـه داخـل سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه از ماده لیپوزومی فیـوژن اچ دی (شـرکت رُوش آلمـــان) جهـــت وارد کـــردن pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α به درون سلول‌های بنیـادی مزانشـیمی بند ناف استفاده شد. نسبت‌هـای مناسـب از فیـوژن اچ دی بـــا pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α بـــه طـــور جداگانه و هم زمان با هـر دوی آن‌هـا مخلـوط شـده و بـه محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشـت داده شـده در چاهک‌های مختلف پلیت‌های ۶ خانه‌ای اضافه شد. پس از گذشت ۵-۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها تعویض شد.

تأیید بیان ژن‌هـای *Nrf2* و *HIF-1α* بـه روش PCR تـرانس کریپتاز معکوس(RT-PCR):

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، بیان *Nrf2* در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2 (که MSC-Nrf2 نامیده شدند)، بیان *HIF-1α* در سـلول‌هـای ترانسـفکت شـده بـا pcDNA3.1-HIF-1α (یا MSC-HIF-1α) و بیـان هـم زمـان هر دو ژن در سلول‌هـای هـم زمـان ترانسـفکت شـده (یـا MSC-Nrf2-HIF) به روش PCR ترانس کریپتـاز معکـوس بررسی شد. RNA گروه‌های سلولی مختلف بـا اسـتفاده از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

ماده ترایزول(شرکت اینویتروژن آمریکا) استخراج شد. cDNA آن‌ها با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت بیونیر آمریکا) و بر اساس روش کار توصیفی کیت ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی دو ژن مورد نظر با استفاده از سایت NCBI طراحی شده، واکنش‌های PCR با استفاده از دوره‌های دمایی و زمانی مناسب ایجاد شده توسط دستگاه PCR (شرکت تاکارای ژاپن) انجام شد. محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. باندهای ایجاد شده با دستگاه ترانس لومیناتور(شرکت تتروی انگلیس) مشاهده و تفسیر گردید.

جمع‌آوری و تغلیظ سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با هر دو پلاسمید نوترکیب ذکر شده و به روش توصیف شده ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد محیط کشت آن‌ها با محیط کشت فاقد سرم تعویض شد و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لوله‌های دارای فیلتر ۵ کیلو دالتون(شرکت سارتوریوس آلمان) و سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه تغلیظ شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در مجاورت سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده:

۱۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی بندناف به طور سه تایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای و در محیط DMEM-LG دارای ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شده و درصدهای مختلف از سکرتوم سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با *Nrf2* و *HIF-1α* (MSC-HIF-Nrf2) به آن‌ها اضافه شد و به مدت یک شب در انکوباتور استاندارد کشت سلولی نگهداری شدند.

این گروه HIF-Nrf2 -S نامیده شدند. هم زمان گروه کنترل(S-MSC) نیز با سکرتوم به دست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی به مدت یک شب مجاور شدند.

ایجاد شرایط گوناگون استرس سلولی بر گروه‌های سلولی مختلف:

به منظور بررسی تأثیر افزایش بیان *HIF-1α* و *Nrf2* به طور جداگانه و هم زمان و هم چنین سکرتوم به دست آمده از آن‌ها بر میزان بقای سلول‌ها، گروه‌های سلولی مختلف ترانسفکت شده و یا کشت داده شده، در مجاورت سکرتوم با شرایط استرس کمبود اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو ناشی از اثر پراکسیدهیدروژن(H_2O_2) مواجه شدند.

۱۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به طور جداگانه و سه تایی کشت داده شدند.

جهت اعمال استرس کمبود اکسیژن، سلول‌ها به مدت زمان‌های مختلف ۰، ۱/۵، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت در انکوباتور مخصوص با اکسیژن پایین(هیپوکسی) و در غلظت ۱٪ اکسیژن و ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. جهت ایجاد استرس فقر سرمی، محیط کشت سلول‌ها خارج و به آن‌ها محیط کشت فاقد FBS اضافه و پلیت‌ها به مدت زمان‌های ۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلولی نگهداری شدند. به منظور ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سلول‌ها با غلظت‌های ۵-۰ میلی‌مولار H_2O_2 به مدت یک ساعت مواجه شدند.

تعیین درصد سلول‌های زنده و میزان بقای سلول‌ها پس از اعمال استرس‌های سلولی مختلف:

پس از ایجاد شرایط استرس، درصد سلول‌های زنده گروه‌های سلولی مختلف با روش تریپان‌بلو تخمین زده شد. به منظور تایید بیشتر و کمی سازی نتایج، میزان بقای سلول‌ها با روش WST-1 (Water Soluble Tetrazoliume Salt ، شرکت سیگمای آمریکا) نیز بررسی شد. WST-1 به نسبت ۱:۱۰ به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۴-۳ ساعت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا خوان (شرکت مولتی اسکن بلژیک) خوانش و میزان بقای سلولی محاسبه گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

بررسی‌های آماری:

کلیه آزمایش‌ها به صورت سه تا پنج‌تایی ارزیابی شدند و نتایج به دست آمده و میزان بقای سلولی به صورت میانگین ± انحراف معیار(mean ± SD) مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های کمی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS version ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و دامنه طبیعی سازی و اختلاف‌های معنادار با ارزش p کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف ظاهری دوکی شکل دارند:

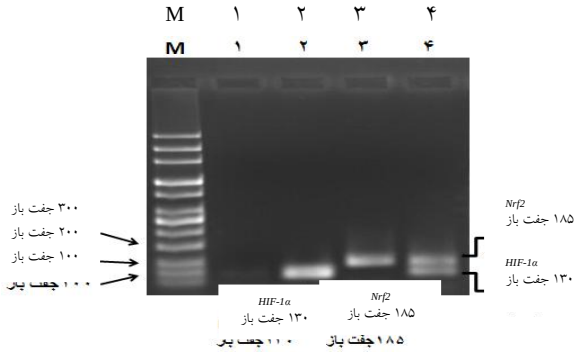
پس از یخ‌زدایی و کشت سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از نظر ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های کشت داده شده از این نظر کاملاً مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده، ظاهری شبه فیبروبلاستی دارند و دوکی شکل هستند (شکل ۱).



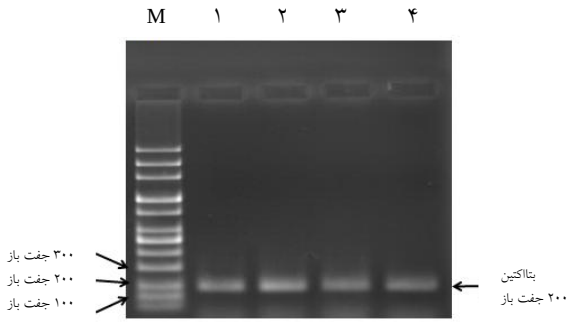
شکل۱: خصوصیات ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف. سلول‌ها ظاهری دوکی و کشیده داشتند(بزرگ‌نمایی ۲۰۰×).

سلول‌های ترانسفکت شده، ژن‌های Nrf2 و HIF-1α را بیان می‌کنند:

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها با pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α به طور جداگانه و هم زمان، بیان این ژن‌ها به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس در سلول‌ها بررسی شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2 که MSC-Nrf2 نامیده شدند، ژن *Nrf2* را بیان کردند. با توجه به شکل ۲ ، بیان HIF-1α در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α نیز تایید شد.



شکل۲: بررسی بیان ژن *HIF-1α* و *Nrf2* در گروه‌های سلولی مختلف با روش PCR ترانس کریپتاز معکوس. M مارکر DNA ، ردیف ۱: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی، ردیف ۲: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1- HIF-1α ، ردیف۳: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1- Nrf2 و ردیف۴: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α. سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم زمان ترانسفکت شده، *HIF-1α* و *Nrf2* را بیان کردند.



شکل۳: بررسی بیان بتااکتین در گروه‌های سلولی مختلف با روش PCR ترانس کریپتاز معکوس(کنترل داخلی). M مارکر DNA ، ردیف ۱: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی، ردیف ۲: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1- HIF-1α ، ردیف۳: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1- Nrf2 و ردیف ۴: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pcDNA3.1-Nrf2 و pcDNA3.1-HIF-1α. تمامی گروه‌ها ژن بتااکتین را بیان کردند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

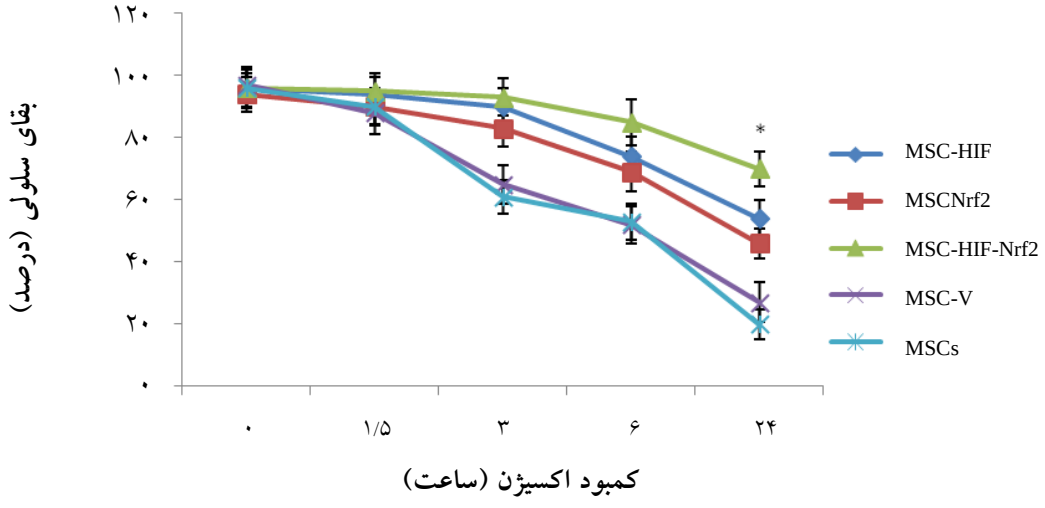
وجود دو باند با اندازه‌های مورد انتظار مؤید بیان هم زمان هر دو ژن در سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده(یا سلول‌های MSC-Nrf2-HIF) بود(شکل ۲). جهت کنترل مراحل آزمایش، بیان ژن بتاکتین نیز مورد بررسی قرار گرفت و همه گروه‌های مورد بررسی این ژن را به میزان مناسب بیان کردند (شکل۳).

سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده در برابر استرس کمبود اکسیژن مقاوم‌تر هستند:

گروه‌های سلولی مختلف ترانسفکت شده در غلظت اکسیژن ۱٪ تنظیم شده با انکوباتور مخصوص هیپوکسی در مدت زمان‌های مختلف کشت داده شدند و میزان بقای آن‌ها با روش WST-1 ارزیابی شد(نمودار ۱). طبق نمودار ارائه شده، میزان بقای سلولی گروه‌های ترانسفکت شده با ژن‌های ذکر شده بیش از گروه کنترل(سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی) بود. و در بین گروه‌های ترانسفکت شده نیز، میزان بقای سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده بیش از سلول‌هایی بود که فقط یکی از ژن‌های *Nrf2* یا *HIF-1α* در آن‌ها افزایش بیان داده شده بود. به طوری که این اختلاف در زمان ۲۴ ساعت مواجهه با کمبود اکسیژن معنادار بود($p< ۰/۰۵$) (نمودار۱).

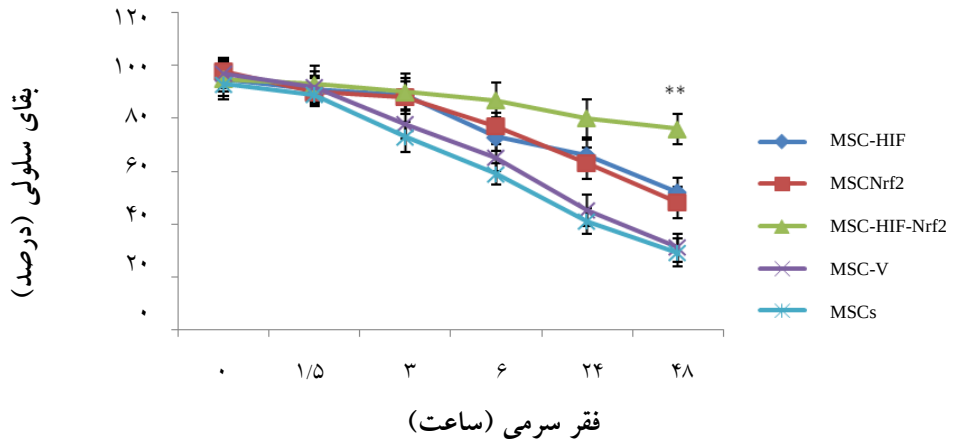
میزان بقای سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده پس از استرس فقر سرمی بیش از سایر گروه‌ها است:

پس از کشت سلول‌ها در محیط فاقد سرم در زمان‌های مختلف، میزان بقای آن‌ها با روش WST-1 سنجیده شد (نمودار۲). همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده در برابر استرس فقر سرمی مقاومت بیشتری داشته و میزان بقای آن‌ها با میزان بقای سلول‌هایی که فقط با یکی از پلاسمیدها ترانسفکت شده بودند در زمان ۴۸ ساعت، اختلاف معنادار داشت ($p< ۰/۰۱$)(نمودار ۲).

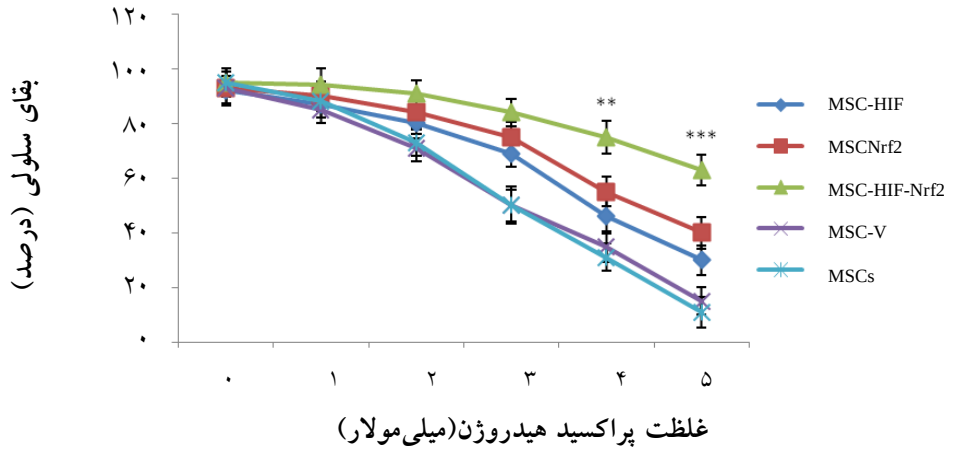


نمودار۱: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه با استرس کمبود اکسیژن در زمان‌های متفاوت(۰، ۱/۵، ۳ ، ۶ و ۲۴ ساعت)، با روش WST-1:MSC-Nrf2. سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2 ، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2 ، MSC-V : سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs : سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دستورزی ژنتیکی($p< ۰/۰۵$). گروه هم زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



نمودار۲: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه با استرس فقر سرمی در زمان‌های متفاوت(۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، با روش WST-1. MSC-Nrf2 : سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF : سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α ، MSC-HIF-Nrf2 : سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده باpcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2 ، MSC-V : سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs : سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی(p< ۰/۰۱). گروه هم زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.



نمودار۳: میزان بقای سلولی گروه‌های سلولی مختلف پس از مواجهه یک ساعته با غلظت‌های ۰-۵ میلی مولار H_2O_2 با روش WST-1 . MSC-Nrf2 : سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α ، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2، MSC-V : سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی و MSCs: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی(p< ۰/۰۱ و p< ۰/۰۰۱). گروه هم زمان ترانسفکت شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بود.

افزایش بیان هم زمان Nrf2 و HIF-1α اثر حفاظتی بیشتری بر سلول‌ها در شرایط استرس اکسیداتیو دارد:

میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف تحت مطالعه پس از یک ساعت مواجهه با غلظت ۰-۵ میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن بررسی شد(نمودار۳). نتایج WST-1 که در نمودار ۳ ارایه شده است، نشان داد که افزایش بیان هم زمان این دو ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها را در برابر استرس ناشی از H_2O_2 محافظت کرده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

به طوری که اختلاف میزان بقای گروه سلولی هم زمان ترانسفکت شده با دیگر گروه‌ها در غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌مولار H_2O_2 با ارزش p کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ معنادار بود(نمودار۳).

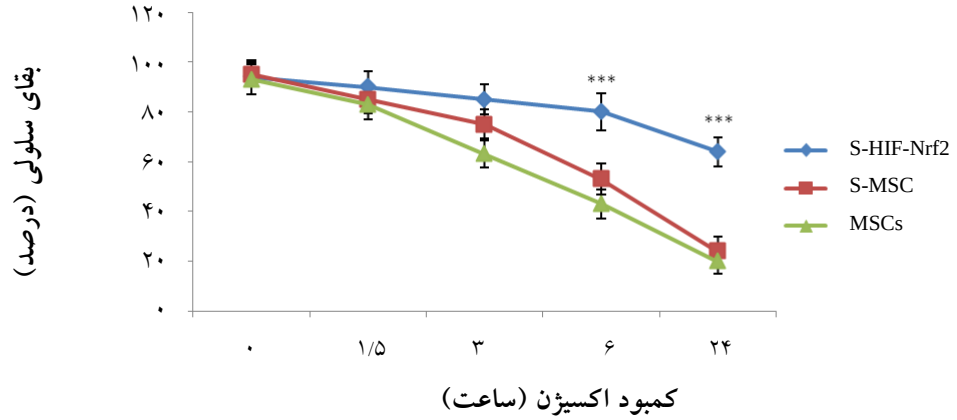
سکرتوم سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده، اثرات محافظت سلولی مناسبی در شرایط استرس سلولی مختلف دارد:

پس از جمع‌آوری و تغلیظ سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده با دو ژن و سکرتوم سلول‌های بدون دست‌ورزی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش ذکر شده با این سکرتوم‌ها مواجه شده و سپس تحت شرایط استرس سلولی مشابه، کشت داده شدند. در نهایت میزان بقای سلولی آن‌ها با روش WST-1 سنجیده شد (نمودارهای ۴ تا ۶). با توجه به نمودار ۴ ، سلول‌های مجاور شده با سکرتوم سلول‌های همزمان ترانسفکت شده با Nrf2 و HIF-1α که S-HIF-Nrf2 نامیده شده بودند، نسبت به گروه کنترل خود یا سلول‌های مجاور شده با سکرتوم به دست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی(S-MSC) مقاومت بیشتری در برابر استرس کمبود اکسیژن از خود نشان دادند. اختلاف میزان بقای آن‌ها پس از ۶ و ۲۴ ساعت مواجهه با کمبود اکسیژن با میزان بقای گروه کنترل با ارزش p کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار بود (نمودار۴).

بر طبق اطلاعات ارائه شده در نمودار ۵، گروه سلولی S- HIF-Nrf2 که با سکرتوم سلول‌هایی که بیان هر دو ژن در آن‌ها افزایش بیان یافته بود مجاور شده‌اند، بیشترین مقاومت را در برابر استرس فقر سرمی داشته و میزان بقای آن‌ها نسبت به میزان بقای گروه سلولی S-MSC (سلول‌های مواجه شده با سکرتوم سلولی بدون دست‌ورزی ژنتیکی) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته، اختلاف معناداری را نشان داد (نمودار۵). ارزش P محاسبه شده کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ بود. با توجه به نمودار۶ ، میزان بقای سلول‌های مواجه شده با سکرتوم سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده پس از اعمال استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسیدهیدروژن در غلظت‌های ۲ تا ۵ میلی مولار با گروه کنترل اختلاف معنادار داشت($p< ۰/۰۰۱$ و $p< ۰/۰۱$).

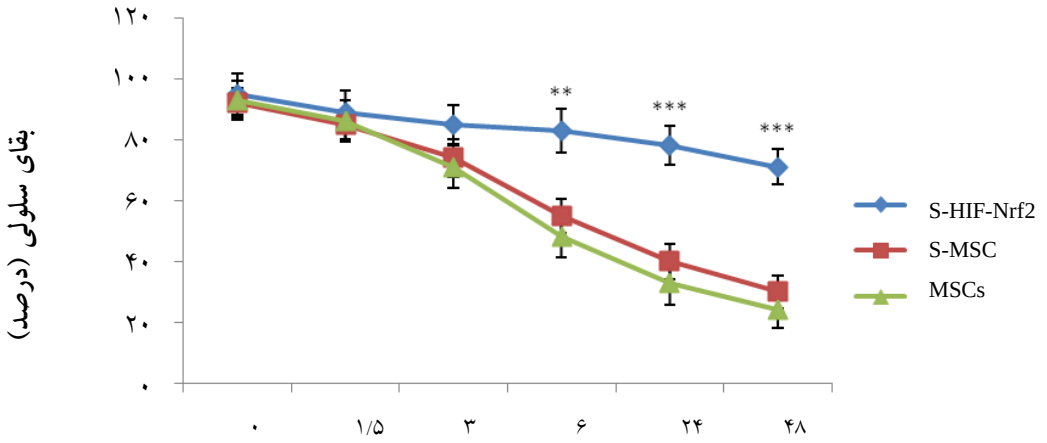
جدول ۱ میانگین و انحراف معیار درصد بقای سلولی پنج گروه اصلی تحت مطالعه را پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیژن و فقر سرمی ارایه می‌کند.

با نگاهی به نتایج بدست آمده می‌توان این طور نتیجه گرفت که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت سکرتوم ترشحی آن‌ها نیز باعث افزایش مقاومت این سلول‌ها در مقایسه با کنترل مناسب می‌شود.

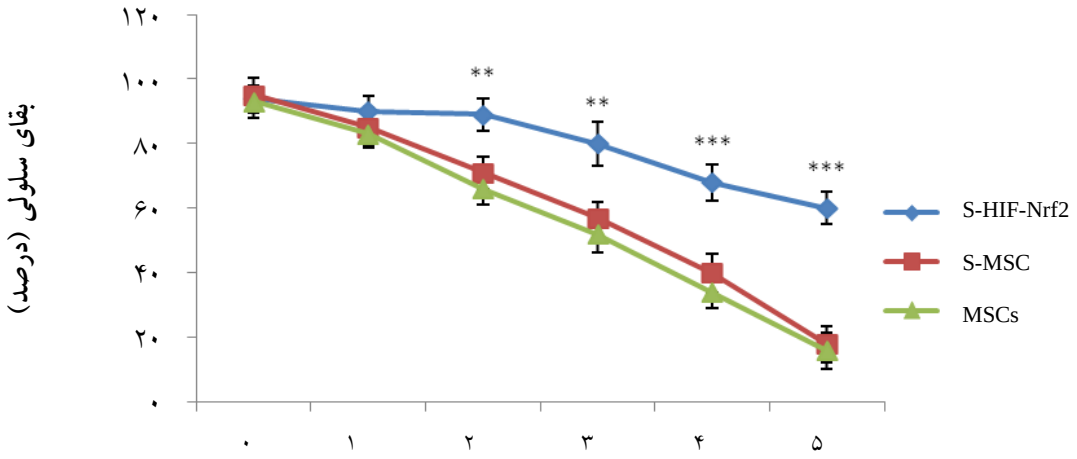


نمودار۴: میزان بقای سلولی در کروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکرتوم پس از مواجهه با استرس کمبود اکسیژن در زمان‌های مختلف (۰، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با روش WST-1. S-HIF-Nrf2 : سلول‌های مجاور شده با سکرتوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC : سلول‌های مجاور شده با سکرتوم سلولی بدون دست ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌های بدون مجاورت با سکرتوم($p< ۰/۰۰۱$). سلول‌های مجاور شده با سکرتوم دست‌ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



نمودار۵: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکرتوم پس از مواجهه با استرس فقر سرمی در زمان‌های مختلف(۰ ، ۱/۵، ۳، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، با روش WST-1. S-HIF-Nrf2: سلول‌های مجاور شده با سکرتوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC: سلول‌های مجاور شده با سکرتوم سلولی بدون دست ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌ها بدون مجاورت با سکرتوم (p< ۰/۰۱ و p< ۰/۰۰۱). سلول‌های مجاور شده با سکرتوم دست ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.



نمودار۶: میزان بقای سلولی در گروه‌های سلولی مختلف مجاور شده با سکرتوم پس از مواجهه یک ساعته با غلظت‌های ۵-۰ میلی مولار H_2O_2 ، با روش WST-1 . S-HIF-Nrf2 : سلول‌های مجاور شده با سکرتوم MSC-HIF-Nrf2، S-MSC : سلول‌های مجاور شده با سکرتوم سلولی بدون دست ورزی ژنتیکی و MSCs: سلول‌ها بدون مجاورت با سکرتوم. (p< ۰/۰۱ و p< ۰/۰۰۱). سلول‌های مجاور شده با سکرتوم دست ورزی شده با دو ژن دارای بیشترین بقای سلولی بودند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار درصد بقای سلولی در گروه‌های مختلف پس از مواجهه با استرس اکسیداتیو، کمبود اکسیژن و فقر سرمی با روش WST-1. MSC-Nrf2: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-Nrf2، MSC-HIF: سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α ، MSC-HIF-Nrf2: سلول‌های هم زمان ترانسفکت شده با pcDNA3.1-HIF-1α و pcDNA3.1-Nrf2 ، S-HIF-Nrf2 : سلول‌های مجاور شده با سکرتوم MSC-HIF-Nrf2 و MSC: سلول‌های بنیادی مزانشیمی کنترل.

گروه سلولی	استرس اکسیداتیو	کمبود اکسیژن	فقر سرمی
MSC-Nrf2	٪۷۲/۸ ± ٪۵/۸	٪۷۶/۸ ± ٪۴/۳	٪۷۷/۳ ± ٪۵/۱
MSC-HIF	٪۶۷/۳ ± ٪۶	٪۸۱/۶ ± ٪۶/۱	٪۷۶/۴ ± ٪۴/۵
MSC-HIF-Nrf2	٪۸۳/۶ ± ٪۵/۲	٪۸۷/۸ ± ٪۴/۵	٪۸۵/۳ ± ٪۶/۲
S-HIF-Nrf2	٪۸۰ ± ٪۴/۴	٪۸۲/۶ ± ٪۵/۸	٪۷۲/۸ ± ٪۵
MSC	٪۵۸/۲ ± ٪۴/۵	٪۶۴ ± ٪۴	٪۷۲/۸ ± ٪۵/۸

بحث

به دلیل خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، استفاده از آن‌ها در مطالعه‌های بالینی و به خصوص پزشکی ترمیمی، مورد توجه قرار گرفته است(۵-۲). اما مهم‌ترین چالش بر سر راه استفاده از آن‌ها، بقای کم این سلول‌ها پس از تزریق است(۱۰). بنابراین مجهز کردن آن‌ها به ابزارهایی که باعث افزایش مقاومت سلولی می‌شوند، کمک کننده است. به نظر می‌رسد استفاده از اثرات ترشحی و محافظتی خود سلول‌های بنیادی مزانشیمی، راه‌کار مناسبی جهت رسیدن به این هدف باشد. در مطالعه اخیر جهت افزایش بیان دو ژن *Nrf2* و *HIF-1α* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، از حامل پلاسمیدی و ماده فیوژن اچ‌دی استفاده شد. استفاده از حامل پلاسمیدی (به جای حامل ویروسی) نگرانی از واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی و یا جهش‌زایی را به همراه ندارد(۲۴). ماده لیپوزومی فیوژن اچ دی باعث افزایش درصد انتقال DNA به داخل سلول شده و بر روی تکثیر و تمایز سلولی اثر منفی ندارد(۲۵).

Nrf2 و *HIF-1α* از عوامل بسیار مهم در فرآیندهای حفاظت سلولی هستند که افزایش بیان آن‌ها اثر مضاعفی بر مقاومت سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف دارد (۲۰، ۱۹). سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با نمونه‌گیری آسان جداسازی می‌شوند و دارای قدرت تکثیر و خاصیت تعدیل ایمنی بیشتری هستند(۲۶). در این مطالعه میزان بقای سلولی پس از اعمال سه استرس کمبود اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو که باعث بیشترین مرگ سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه و بالین می‌شوند، با روش WST-1 بررسی و افزایش داده شد(۱۱). WST-1 روشی آسان و دقیق با سمیت سلولی کمتر است(۲۷). نتایج WST-1 مبین افزایش میزان بقای سلولی در سلول‌های دست‌ورزی شده پس از اعمال شرایط استرس بود.

کیانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان *HIF-1α* را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از حامل پلاسمیدی افزایش دادند و سپس سلول‌ها را با استرس‌های اکسیداتیو، فقر سرمی و کمبود اکسیژن مواجه کردند و این طور نتیجه گرفتند که با افزایش بیان این ژن، میزان بقای سلول‌ها در مواجهه با استرس‌های سلولی افزایش می‌یابد (۱۷). محمدزاده (۲۰۱۲) طی مطالعه‌ای نشان داد که افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث اثر حفاظتی قابل قبولی در برابر استرس‌های سلولی مشابه می‌شود. وی از حامل ویروسی در مطالعه خود استفاده کرده بود(۱۸). نتایج آن‌ها با مطالعه اخیر هم خوانی داشت. از طرفی در مطالعه اخیر افزایش بیان هم زمان *HIF-1α* و *Nrf2* باعث هم‌افزایی اثرات محافظتی دو ژن شده و منجر به افزایش مقاومت سلولی در شرایط استرسی سخت‌تر شد.

در قسمتی از این مطالعه مجاور کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده نیز باعث افزایش مقاومت آن‌ها شد. استفاده از سکرتوم و اثرات ترشحی سلول‌ها، نگرانی‌های ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

سلول‌ها و عدم امکان استفاده از آن در بالین را به همراه ندارد.

لی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با جمع‌آوری سکرتوم سلول‌های بنیادی دست ورزی شده با ژن GATA-4 و اعمال استرس کمبود اکسیژن نشان دادند که سلول‌های سیاهرگی مجاور شده با این سکرتوم، پس از پیوند دارای توان تمایزی و بقای بیشتری هستند(۲۸).

جنسکی و گروه وی (۲۰۰۶) چنین گزارش کردند که جمع‌آوری سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی که ژن Akt در آن‌ها افزایش بیان یافته، کشت سلول‌های قلبی در مجاورت این سکرتوم و اعمال شرایط کمبود اکسیژن باعث تسریع در فرآیند ترمیم عضله قلبی آسیب دیده می‌شود (۲۹). در این دو مطالعه از حامل‌های ویروسی جهت دست‌ورزی سلول‌ها استفاده شده بود. از طرفی میزان بقای سلول‌ها تنها پس از شرایط کمبود اکسیژن مورد بررسی قرار گرفته بود.

زانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با مجاورت محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های عضلانی قلب که در شرایط کمبود اکسیژن تیمار شده بودند، نشان دادند که اثر ترشحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی منجر به محافظت از سلول‌های عضله قلبی در برابر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو نیز می‌گردد (۳۰). در این مطالعه نیز همانند مطالعه‌ی اخیر، سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بقای سلولی پس از مواجهه سلول‌ها با H_2O_2 شد.

به طور خلاصه در این تحقیق میزان بقا و مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر استرس‌های سلولی مختلف پس از افزایش بیان دو ژن مهم در فرآیندهای محافظت سلولی(*Nrf2* و *HIF-1α*) و هم چنین کشت این سلول‌ها در مجاورت سکرتوم به دست آمده از سلول‌های دست‌ورزی شده، افزایش داده شد.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان دو ژن *Nrf2* و *HIF-1α* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثر مضاعفی بر میزان بقای آن‌ها دارد. سکرتوم سلول‌های دست‌ورزی شده با این دو ژن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در برابر استرس‌های کمبود اکسیژن، فقر سرمی و استرس اکسیداتیو محافظت کرده و نگرانی‌های ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها و عدم امکان استفاده از آن در بالین را نیز از بین می‌برد. به نظر می‌رسد استفاده از سکرتوم، راه‌کاری مناسب و عملی در افزایش بقای سلول‌ها و امکان کاربرد بیشتر و مفیدتر آن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجویی خانم فاطمه سلطانی در مقطع کارشناسی ارشد و مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال ایران می‌باشد که از محل بودجه‌های پژوهشی این مرکز تامین اعتبار گردیده است.

References :

1- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation 1974; 17(4): 331-40.

2- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, *et al*. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovas Res 2005; 66(3): 543-51.

3- Li X, Zhang Y, Qi G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology 2013; 65(3): 323-34.

4- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-7.

5- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98(8): 2396-402.

6- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005; 105(4): 1815-22.
7- Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, *et al*. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation 2006; 81(10): 1390-7.
8- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrian R, Müller S, Seifried E, *et al*. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. Blood 2006; 108(12): 3938-44.
9- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. Blood 2003; 101(8): 2999-3001.
10- Lee KA, Shim W, Paik MJ, Lee SC, Shin JY, Ahn YH, *et al*. Analysis of changes in the viability and gene expression profiles of human mesenchymal stromal cells over time. Cytotherapy 2009; 11(6): 688-97.
11- Wang JA, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, *et al*. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(1): 74-82.
12- Robey TE ,Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. J Mol Cell Cardiol 2008; 45(4): 567-81.
13- Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, *et al*. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. J Thor Cardiovas Surg 2008; 135(4): 799-808.
14- Lu H, Li Y, Sheng Z, WANG Y. Preconditioning of stem cells for the treatment of myocardial infarction. Chinese Med J 2012; 125(2): 378-84.
15- Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, *et al*. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. Stem Cells 2007; 25(8): 2118-27.
16- Vanella L, Sodhi K, Kim DH, Puri N, Maheshwari M, Hinds TD, *et al*. Increased heme-oxygenase 1 expression in mesenchymal stem cell-derived adipocytes decreases differentiation and lipid accumulation via upregulation of the canonical Wnt signaling cascade. Gene expre 2013; 51(6): 35-41.
17- Kiani AK, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. *HIF-1a* confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Arch Med Res 2013; 44(3): 185-93.
18- Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, *et al*. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. Cell Stress Chaperones 2012; 17(5): 553-65.
19- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-*Nrf2*-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007; 47: 89-116.
20- Adams J, Difazio L, Rolandelli R, Lujan J, Haskó G, Csoka B, *et al*. *HIF-1*: a key mediator in hypoxia. Acta Physiol Hung 2009; 96(1): 19-28.
21- Kilroy EG, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, *et al*. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. J Cell Physiol 2007; 212(3): 702-7.
22- Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. Curr Stem Cell Res Ther 2010; 5(2): 103-10.
23- Amiri F, Halabian R, Salimian M, Shokrgozar MA, Soleimani M, Jahanian-Najafabadi A, *et al*. Induction of multipotency in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultivated under suspension conditions. Cell Stress Chaperones 2014; 19(5): 657-66.
24- Phillips AJ. The challenge of gene therapy and DNA delivery. J Pharm Pharmacol 2001; 53(9): 1169-74.
25- Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gülkan H, Böcker W, *et al*. Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. J Gene Med 2005; 7(6): 718-28.
26- Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. Stem Cells Cloning 2011; 4: 39-50.
27- Kwang M K, Sang BL, Lee SH, Yong KL, Kyoung NK. Comparison of validity between WST-1 and MTT test in bioceramic materials. Key Eng Mats 2005; 284-286: 585-8.
28- Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, *et al*. Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010; 299(6): 1772-81.
29- Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, *et al*. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J 2006; 20(6): 661-9.
30- Xiang MX, He AN, Wang JA, Gui C. Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. J Zhejiang Univ Sci B 2009; 10(8): 619-24.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 12(4): 318-330

Original Article

Cell survival evaluation of mesenchaymal stem cells cultivated in the presense of secretome of *HIF-1α/Nrf2*-engineered-MSC

Soltani F.[1], Amiri F.[1], Kheirandish M.[1], Mohammadipour M.[1], Jalili M.[2], Habibi Roudkenar M.[1], Jalili M.A.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine,Tehran, Iran
[1]Karaj Branch of Islmaic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background and Objectives

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are the ideal cell source for transplantation. But different stresses during MSCs *in vitro* expansion lead to decreased survival rate after transplantation. Therefore, applying practical strategies to enhance their viability in stressful microenvironment is quite necessary. This study aimed to survey effects of *HIF-1α-Nrf2*-engineered-MSCs secretome on MSCs survival under different stress conditions.

Materials and Methods

Recombinant pcDNA3.1-*Nrf2* and pcDNA3.1-*HIF-1α* were transfected and co-transfected into umbilical cord MSCs (UC-MSCs) using FUGENE HD transfection reagent. After 72 hrs, expression of *Nrf2* and *HIF-1α* were verified by RT-PCR. Different cell groups were exposed to hypoxic, serum deprived and oxidative stress conditions. The *HIF-1α-Nrf2*-engineered-MSCs secretome was harvested and concentrated. Then, UC-MSCs were cultured in presence of this secretome and their viability was assayed using trypan blue exclusion dye and WST-1 flowing by induction of the same stress conditions.

Results

HIF-1α-Nrf2-engineered-MSCs expressed *Nrf2* and *HIF-1α. HIF-1α-Nrf2*-engineered-MSCs indicated a higher survival rate (84.5 ± 5.5%) compared with the control group (55.3 ± 4%). Moreover, the survival rate of UC-MSCs cultured with *HIF-1α-Nrf2*-engineered-MSCs secretome was 81.6 ± 6% and it was 57.9 ± 4.3% for the control group under the same stress conditions.

Conclusions

HIF-1α-Nrf2-engineered-MSCs secretome protects MSCs against oxidative, serum deprived and hypoxic stress conditions.

Key words: Conditioned Medium, Mesenchymal Stem Cells, Cell Survival

Received: 28 Sep 2014
Accepted: 23 Jun 2015

Correspondence: Jalili MA., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *m.jalili@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]