خون
دوره ۸ شماره ۴ زمستان ۹۰ (۲۸۵-۲۷۲)
مقاله پژوهشی

دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از سیستم بیانی آدنو ویروس حاوی ژن حفاظت‌کننده سلولی NRF2

محمد محمدزاده[۱]، راحله حلبیان[۲]، مهشید محمدی‌پور[۳]، علی اصغر کیانی[۴]، احمد قره‌باغیان[۵]، ناصر امیری‌زاده[۶]، مهریار حبیبی رودکنار[۷]

چکیده

سابقه و هدف

مهم‌ترین مساله در پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC)، بقای پایین پس از پیوند می‌باشد. دست‌ورزی ژنتیکی آن‌ها، یک استراتژی در جهت حفاظت سلولی علیه آسیب‌های محیطی است. حفظ خاصیت تمایزی این سلول‌ها پس از دست‌کاری، مهم می‌باشد. در این مطالعه توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از دست‌ورزی با NRF2 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جداسازی شد. ژن NRF2 با روش TOPOcloning به وکتور pENTR وارد شد. با استفاده از تکنولوژی gateway ، ژن NRF2 ، به وکتور pAd/CMV/V5-DEST انتقال یافت. آدنوویروس نوترکیب در سلول‌های AD293 تولید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آن‌ها آلوده و بیان NRF2 توسط RT-PCR تایید شد. پس از مواجهه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 با شرایط استرسی، میزان بقا و آپوپتوز سلولی آن‌ها ارزیابی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده NRF2 به رده استخوان و چربی بررسی شد.

یافته‌ها

ژن NRF2 به طور موفقیت‌آمیزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان شد. تمایز NRF2-MSC ها به رده‌های استخوانی و چربی، نشان می‌دهد افزایش بیان NRF2 ، خصوصیت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تغییر نمی‌دهد.

نتیجه گیری

بیان NRF2 ، فاکتور به خوبی شناخته شده حفاظت سلولی، با استفاده از سیستم بیانی آدنو ویروس، با ظرفیت تمایزی آن‌ها تداخل نمی‌کند. NRF2-MSC ها ممکن است در آینده جهت استفاده در سلول درمانی بر اساس سلول بنیادی قابل استفاده باشند.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، پروتئین Nrf2 ، TOPO

تاریخ دریافت : ۸۹/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش : ۹۰/ ۶/۱۴

۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مربی دانشگاه علوم پزشکی لرستان ـ خرم‌آباد ـ ایران
۵- PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۶- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۷- مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC)، گروهی از سلول‌های کلونی‌زا و پرتوان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلفی از جمله استخوان، چربی، آستروسیت، عصب، سلول‌های عضله قلبی و اسکلتی و سایر انواع تمایز یابند(۴-۱).

امروزه به دلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز وسیعی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند، کاربردهای مختلفی در پزشکی به دست آورده‌اند. در بسیاری از بیماری‌های بدخیم مانند انواع لوسمی‌ها و بیماری‌های ژنتیکی و مادرزادی، استفاده از سلول‌های بنیادی روش درمانی نوینی است به طوری که پیوند سلول‌های بنیادی، راه‌کار مناسبی برای درمان این گونه از بیماری‌ها به شمار می‌رود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC) با توانایی تمایز به رده‌های مختلف، توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان، خاصیت تعدیل ایمنی و سهولت تکثیر آن‌ها در محیط کشت، سلول‌های ایده‌آلی برای استفاده در سلول درمانی می‌باشند. به طوری که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان آسیب‌های بافتی هم چون انفارکتوس میوکارد، آسیب حاد کلیوی، پیوند کبدی و سایر انواع بیماری‌ها بسیار مؤثر می‌باشد(۷-۵).

برای استفاده بالینی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیاز به دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های صلاحیت‌دار از نظر عملکرد با فنوتیپ و ژنوتیپ پایدار است ولی طی فرآیندهای جمع‌آوری، کشت و پردازش، آسیب‌های متعددی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی وارد می‌شود که بقا و عملکرد آن‌ها را در بدن کاهش می‌دهد. به عنوان مثال یک روز پس از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به قلبی که دچار انفارکتوس شده است؛ کمتر از ۱٪ سلول‌های پیوند شده زنده باقی می‌مانند. از طرف دیگر افرادی که گیرنده سلول‌های بنیادی می‌باشند، بنا به دلایل مختلف(شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، التهاب و ...) دارای محیط توکسیک و شرایط اکسیداتیو استرس هستند که به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش بقای سلول‌های بنیادی متعاقب پیوند شود(۸).

اگر استراتژی به کار برده شود که این سلول‌ها به آسیب‌های وارده مقاوم شوند به طوری که حدود دو یا چند روز بیشتر زنده بمانند، می‌توان این انتظار را داشت که درصد موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار بالا باشد.

یکی از راه‌کارها، دست‌ورزی مهندسی ژنتیک این سلول‌ها با استفاده از عوامل محافظت‌کننده سلولی مانند آنزیم NRF2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor2) می‌باشد. پروتئین NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری محافظت‌کننده سلولی(cytoprotective) است که در برابر استرس‌های مختلف، موجب بقای سلولی می‌شود. NRF2 به طور طبیعی بیان و به پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود و در اثر استرس‌های گوناگون، به هسته سلول رفته و موجب بیان ژن‌های متعددی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های سم‌زدایی کننده، ژن‌های پردازش دارو و ... می‌شود. NRF2 و پروتئین‌های حاصل از آن، نقش مهمی در حفاظت علیه استرس‌های اکسیداتیو، آسیب سلولی ناشی از مواد شیمیایی، حفاظت از تشکیل سرطان و ترمیم زخم دارند(۱۳-۹). چون بیان دایمی ژن از جمله NRF2 در MSC مجاز نمی‌باشد، از این رو در این تحقیق رده سلول بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک دست‌ورزی شده به طوری که ژن NRF2 بتواند در این رده سلولی به طور کارا و مؤثر و موقتی بیان شود.

در این مطالعه از وکتور آدنو ویروس به منظور انتقال ژن NRF2 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. دلیل انتخاب این وکتور و مزایای استفاده از آن، آلوده‌سازی تعداد زیادی از سلول‌ها، بیان بالا، بیان موقت، تغییرات پس از ترجمه‌ای مناسب و ... می‌باشد(۱۴).

همان طوری که گفته شد، مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که باعث شده است این سلول‌ها اهمیت ویژه‌ای را در سلول درمانی داشته باشند، توانایی تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی مختلف است. اما در صورت دست‌ورزی ژنتیکی این سلول‌ها، این نگرانی وجود دارد که خاصیت تمایزی آن‌ها کاهش یافته و یا از بین برود. در این مطالعه ابتدا از اثر حفاظت‌کنندگی NRF2 با سیستم بیانی آدنو ویروس استفاده شد و سپس ویژگی این

سلول‌ها در تمایز به دو سیستم چربی و استخوان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده، از نوع تجربی بود. تعداد نمونه ۳ عدد بوده و آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار شده‌اند. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۴ ، جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شده است.

جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

ابتدا طی مطالعه‌های انجام شده و بررسی شرایط سلامت‌دهنده، در مرکز پیوند بیمارستان شریعتی با اخذ رضایت‌نامه کتبی، نمونه خون مغز استخوان تهیه گردید. پس از سانتریفوژ، شیب غلظتی با استفاده از محلول فایکول هایپک(Ficoll/Hypaque, Stem Cell)، سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی و در محیط کشت DMEM Low glucose (اینویتروژن) حاوی ۱۰ درصد FBS (Stem Cell) کشت داده شدند. هر ۳ روز مایع رویی تعویض گردید، به این شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی که خاصیت چسبندگی به کف فلاسک را دارند از سایر انواع سلول‌ها جدا می‌شوند. مورفولوژی مخصوص این سلول‌ها و وجود شاخص‌های مخصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسیتومتری به منظور تعیین هویت آن‌ها به کار رفت. به منظور تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسیتومتری، بیان شاخص‌های مختص این رده، CD105 ، CD90 ، CD73 و CD166 و عدم بیان مارکرهای سایر رده‌های سلولی مانند CD14 ، CD34 و CD45 ارزیابی شد. پس از کشت سلول و گذشت زمان لازم، سلول‌ها با تریپسین جدا شده و با یکی از آنتی‌بادی‌های فوق به همراه آنتی CD105 انکوبه و سپس با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل گردیدند. برای هر یک از آنتی‌بادی‌های فوق از آنتی‌بادی کنترل منفی ایزوتیپ مخصوص خود نیز استفاده شد.

جداسازی و کلونینگ NRF2 :

به منظور القای بیان ژن NRF2 ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۱ ساعت با H_2O_2 mM ۵ (سیگما)، انکوبه شدند. سپس با استفاده از ترایزول(رُوش، tripure isolation reagent)،RNA سلول‌ها استخراج و با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت آن مشخص گردید. طبق دستورالعمل کیت cDNA synthesis (اینویتروژن)، cDNA این سلول‌ها ساخته شد. با استفاده از آغازگرهای بالا دست (Forward NRF2)، 5- CAC CAT GGG AAT GGA CTT GGA GCT GCC-3 و پایین دست(Reverse NRF2)، 5-CTA GTT TTT CTT AAC ATC TGG CTT CTT AC-3 و با استفاده از آنزیم DNA Pfu پلیمراز (فرمنتاز)، ژن NRF2 در وکتور pENTR/TEV/D-TOPO ، از کیت pENTR Directional TOPO Cloning (اینویتروژن) مطابق دستورالعمل آن استفاده گردید. در طی این عمل، ژن NRF2 جدا شده، وارد وکتور pENTR گردید.

تکنولوژی gateway و ساخت آدنوویروس نوترکیب:

در تکنولوژی gateway توسط آنزیم LR ClonaseII (اینویتروژن)، ژن NRF2 از وکتور pENTR وارد وکتور pAd/CMV/V5-DEST (اینویتروژن) می‌گردد و وکتور pAd/CMV/V5-NRF2 تهیه می‌شود. در مرحله بعد توسط آنزیم اندونوکلئاز PacI ، سازه ژنی آدنو ویروس نوترکیب pAd/CMV/V5-NRF2 به همراه کنترل pAD/CMV/V5-DEST خطی، آماده ترانسفکت به سلول‌های(Stratagene) AD293 گردیدند. به منظور ترانسفکشن از فیوژن ۶ (رُوش) استفاده گردید. در این سلول‌ها، آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2 و نیز آدنو ویروس‌های خالی به عنوان کنترل تولید شدند که جهت آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رفتند.

بررسی بیان موقت NRF2 :

به منظور بررسی بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس در سطح RNA ، از واکنش RT-PCR استفاده شد. جهت استخراج RNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های نوترکیب، محتوی NRF2 در روزهای

مختلف، همانند قبل، از ترایزول استفاده شد. سپس با استفاده از کیت cDNA synthesis (اینویتروژن)، cDNA این سلول‌ها ساخته شد و واکنش PCR به منظور بررسی بیان NRF2 صورت گرفت. برای این منظور از آغازگرهای داخلی NRF2 (آغازگر بالادست 5-GCG ACG GAA AGA GTA TGA GCT GG-3 و آغازگر پایین دست 5-GTT GGC AGA TCC ACT GGT TTC TG-3) و بتا اکتین(آغازگر بالادست 5-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3 و پایین دست 5-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3) که توسط نرم‌افزار primer3 طراحی شدند، استفاده گردید. هم چنین بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس خالی نیز با استفاده از آغازگرهای مذکور سنجیده شد.

بررسی بیان پروتئین NRF2:

آزمایش وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان NRF2 در سطح پروتئین انجام گردید. در این راستا، پروتئین توتال به وسیله معرف Lysis M (رُوش، آلمان، دیاگنوستیکا) بر طبق دستورالعمل از MSCs آلوده شده با آدنو ویروس نوترکیب استخراج شد و با استفاده از روش SDS-PAGE ، نمونه استخراجی پس از طی مراحل لازم بر روی ژل پلی‌آکریلامید الکتروفورز شد و از طریق روش وسترن بلات، به غشای PVDF (رُوش، آلمان، دیاگنوستیکا) انتقال یافت و در پایان با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال NRF2 (سانتاکروز، بیوتکنولوژی)، بیان پروتئین NRF2 آنالیز گردید. از اندازه‌گیری بیان پروتئین بتا اکتین به عنوان کنترل استفاده شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی:

به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2 ، از کیت تمایز STEMPRO Osteogenesis (اینویتروژن، جیبکو) استفاده شد. به مدت ۲۱ روز، محیط تمایز هر ۴-۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از این مدت به منظور بررسی تمایز سلول‌ها، رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد (کمیکون) انجام گرفت. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده چربی:

کیت تمایز STEMPRO Adipogenesis (اینویتروژن، جیبکو) جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2 و یا آدنو ویروس‌های خالی به کار رفت. پس از ۷ روز، رنگ‌آمیزی HCS LipidTOX™ Green Neutral Lipid (اینویتروژن) به منظور مشخص نمودن میزان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده چربی توسط میکروسکوپ فلورسانت استفاده شد.

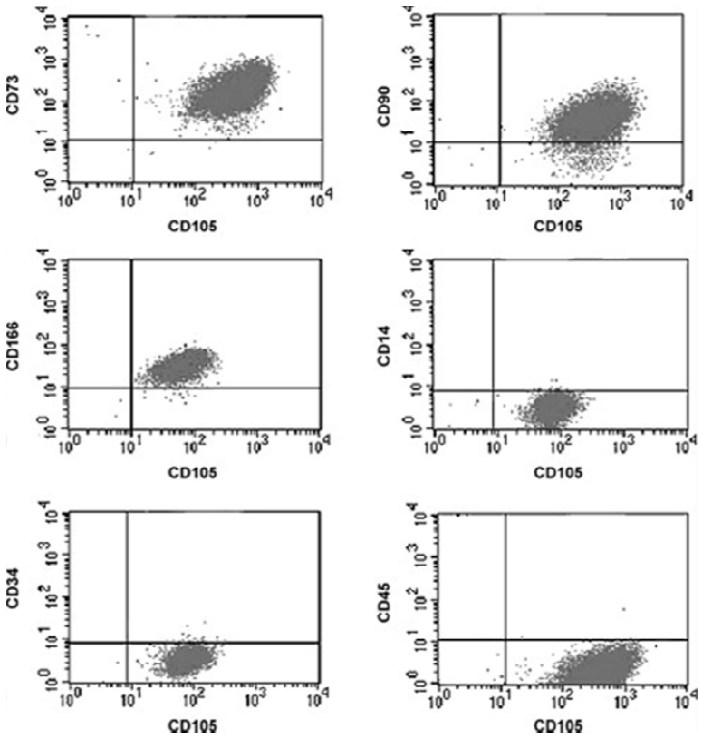
ارزیابی آپوپتوز سلولی با استفاده از آنکسین V:

آپوپتوز سلول‌های NRF2-MSC تحت شرایط استرس با استفاده از کیت آنکسین V (رُوش، آلمان، دیاگنوستیکا) مطابق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۲۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های دارای ژن NRF2 تحت تاثیر استرس‌های مختلف قرار گرفتند و سپس با استفاده از تریپسین جدا و دو مرتبه با استفاده از بافر PBS شسته شدند و پس از انکوباسیون در بافر محتوی آنکسین V به مدت ۱۵ دقیقه، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (partec) و نرم‌افزار flomax آنالیز شدند.

سنجش درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT:

به منظور انجام این آزمون، ابتدا تعداد بیست هزار سلول در هر خانه از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در معرض استرس‌های مختلف قرار گرفتند.

پس از ارایه استرس‌ها به مدت‌های زمانی مختلف، سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT ۵ mg/mL [3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide](سیگما، دوسلدورف ـ آلمان)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش با افزودن SDS ۱۰٪ و ۰/۰۱ مول HCl متوقف گردید. پس از حل نمودن کریستال‌ها در DMSO ، میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.



شکل ۱: بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی. در این شکل بیان مارکرهای مختلف سطح سلولی در برابر مارکر مختص سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD 105 ارزیابی شده است. همان طوری که انتظار داشتیم این سلول‌ها مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی CD105، CD90، CD73 و CD166 را بیان می‌کنند ولی از نظر مارکرهای سایر سلول‌ها مانند CD14، CD34 و CD45 منفی می‌باشند.

یافته‌ها

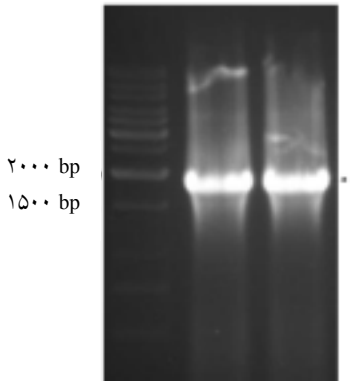
پس از جداسازی سلول‌ها و کشت در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از لحاظ مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. به تدریج با تعویض محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سایر انواع سلول‌های موجود در مغز استخوان که خاصیت اتصال به کف فلاسک را ندارند حذف گردیدند. مشاهده میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مورفولوژی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.

تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و دستگاه فلوسایتومتری:

پس از مشاهده میکروسکوپی، حضور آنتی‌ژن‌های موجود در سطح سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وجود مارکرهای سطحی CD37 ، CD90 ، CD166 ، CD105 و عدم حضور مارکرهای سطحی CD34 ، CD14 و CD45 ، تاییدکننده سلول‌های مزانشیمی بود(شکل ۱).

ساخت cDNA و جداسازی ژن NRF2 :

برای جداسازی ژن NRF2 لازم بود ابتدا cDNA کل سلولی ساخته و سپس cDNA ژن مورد نظر از مجموعه جدا گردد، برای این منظور در ابتدا از روش RT-PCR برای ساخت cDNA کل سلول استفاده شد. با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژن و آغازگرهای طراحی شده، انتظار می‌رفت ژن NRF2 پس از القای سلول‌ها با H_2O_2 طی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) جدا شود. در طراحی آغازگر سعی شد تا علاوه بر اختصاصی بودن برای ژن، دارای چهار نوکلئوتید ویژه واکنش توپوکلونینگ نیز باشد. پس از اتمام فرآیند، محصول PCR با الکتروفورز تجزیه گردید، نتیجه ایجاد باند ۱۸۲۵ bp بود که با طول قطعه ژن موجود در بانک ژنی مطابقت داشت(شکل ۲). در تمام نمونه‌های تیمار شده با H_2O_2 ، این باندها مشاهده شد.



شکل۲ : الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی NRF2. چاهک(M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک ۱و ۲ (باند ۱۸۲۵ bp ژن NRF2) مربوط به رده سلولی MSC تیمار شده با H_2O_2 می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین نمونه‌ها وجود ندارد.

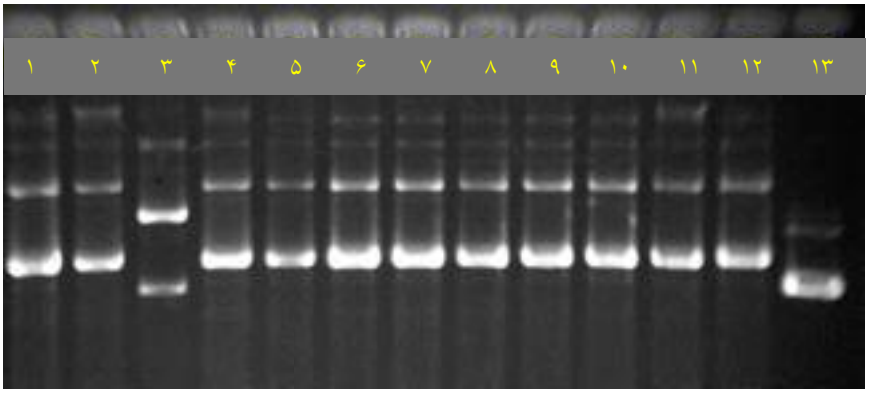
واکنش TOPO® Cloning :

محصول PCR حاصل برای واکنش توپوکلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش، وکتور نوترکیب به باکتری مستعد به روش شیمیایی انتقال داده شد. از آن جا که ناقل کلونینگ حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بود، باکتری‌های نوترکیب برای غربالگری در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. از دو حجم باکتری برای کشت در محیط کشت اختصاصی استفاده شد تا تک کلونی‌های نوترکیب، بهتر قابل جداسازی باشند.

از کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت اختصاصی، استخراج پلاسمید به عمل آمد. از ۱۳ کلونی مورد بررسی، پس از الکتروفورز آن‌ها، ۱۱ کلونی سنگین‌تر بودند که می‌توانست نشان‌دهنده حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها باشد و ۲ کلون دیگر حاوی وکتور خالی بودند(شکل ۳). یکی از کلونی‌ها(شماره ۱) برای مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. برای تایید نهایی، ناقل توپوکلونینگ تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور ژن در پلاسمید و قرار گرفتن آن در قالب صحیح را اثبات کرد. توالی حاصل به منظور ثبت به شرکت NCBI فرستاده شد که با کد HM446346 در بانک ژن به نام مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ثبت شد.

بررسی واکنش LR و ایجاد کلون‌های نوترکیب حاوی وکتور بیانی نوترکیب(gateway) و تایید نوترکیبی توسط محیط کشت انتخابی:

وکتور pAd/CMV/V5 در ناحیه نوترکیبی خود در بین دو جایگاه نوترکیبی attR1 & attR2 ، دارای بخش ژنی Cm^R (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل) می‌باشد که بعد از انجام واکنش LR ، این ژن حذف می‌گردد. پس از انجام واکنش LR و از دست رفتن ژن مقاومت به کلرامفنیکل، برای غربالگری کلون‌های حاوی وکتور بیانی،



شکل۳ : الکتروفورز پلاسمیدها بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱، ۲ و ۴ تا ۱۲ از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی کانامایسین و ۲ کلونی ۳ و ۱۳ سبک‌تر بوده که نشان‌دهنده عدم حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها می‌باشد.

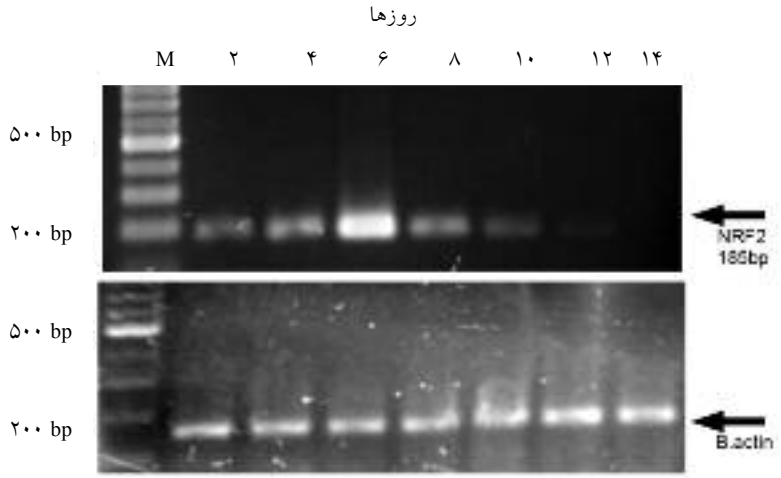
هر کدام از تک کلون‌های رشد کرده در محیط کشت LB آگار، در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به طور جداگانه کشت داده شدند. ژن NRF2 طی نوترکیبی و انجام واکنش LR ، در ناحیه نوترکیب جایگزین شد و بنابراین سازه ژنی نوترکیب حاصل (pAd/CMV/V5-NRF2) بخش ژنی Cm^R را از دست داد و پس از ترانسفورماسیون به باکتری *E.coli* ، باکتری‌های مذکور به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل حساس شده و در حضور این آنتی‌بیوتیک هیچ گونه رشدی از خود نشان ندادند. در صورتی که باکتری‌های ترانسفورم شده با pAd/CMV/V5 (وکتور خالی) به دلیل دارا بودن بخش ژنی Cm^R به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مقاوم بوده و در حضور آن رشد نمودند.

ساخت آدنوویروس نوترکیب و Transduction آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور تعیین دوز آدنو ویروس:

پس از تهیه ساختار حلقوی آدنو ویروس نوترکیب pAd/CMV/V5-NRF2 ، ابتدا توسط آنزیم PacI ساختار خطی آدنو ویروس به وجود آمد که پس از ترانسفکشن توسط فیوژن ۶ به سلول‌های AD293 ، آدنو ویروس نوترکیب محتوی NRF2 تولید شد.

در مرحله بعد به منظور استفاده از ویروس برای آلوده‌سازی سلول‌ها و بیان ژن NRF2 در سلول‌های آلوده شده با ویروس، تعیین میزان غلظتی از ویروس که اولاً باعث سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌ها نشود و ثانیاً باعث بیان ژن NRF2 درون سلول‌ها شود، سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pAd/CMV/V5-NRF2 و سلول‌های حاوی pAd/CMV/V5 ، ضروری بود.

بدین منظور تعداد ذرات ویروسی توسط روش End-Point Dilution Assay که قبلاً توصیف شده است، مشخص گردید(۱۵). این تعداد در مطالعه حاضر ۵۰۰۰۰۰۰ بود. عدد MOI (Multiplicity of infection) نسبت کل ویروس به سلول می‌باشد که جهت ایجاد عفونت لازم است. در این مطالعه پس از انجام آزمایش در MOI های مختلف، MOI ۱۰۰ جهت انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رفت.



شکل۴: بررسی بیان موقت NRF2 سلول‌های بنیادی آلوده شده با آدنوویروس محتوی ژن NRF2 با آزمایش RT-PCR. شکل بالا: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NRF2 بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) مارکر bp ۱۰۰ (۵۰ ng/µl)، سایر چاهک‌ها به ترتیب مربوط به نمونه استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ روز از زمان آلوده شدن آن‌ها با آدنوویروس می‌باشد. شش روز پس از آلودگی ویروسی، بیشترین میزان بیان NRF2 مشاهده شد و پس از ۱۴ روز هیچ بیان افزایش یافته‌ای از NRF2 مشاهده نگردید. شکل پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) مارکر bp ۱۰۰(۵۰ ng/µL).

بررسی بیان موقت ژن NRF2 نوترکیب با استفاده از RT-PCR:

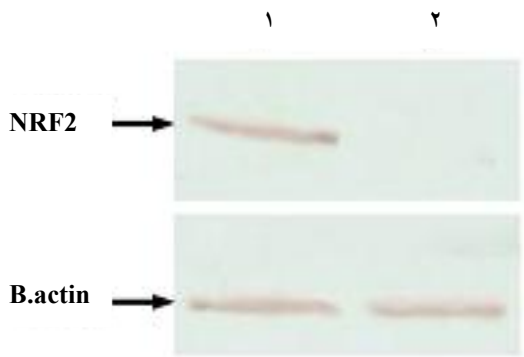
از نمونه‌های RNA استخراج شده در روزهای مختلف از زمان آلوده شدن با آدنو ویروس محتوی ژن NRF2 ، cDNA ساخته و با آغازگرهای اختصاصی NRF2 انسانی، PCR انجام شد. آغازگر طراحی شده برای ژن NRF2 که در قسمت فوق اشاره شد، توانایی ساخت قطعه‌ای به طول ۱۸۵ جفت بازی را داشت(شکل ۴). در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنو ویروس محتوی NRF2 ، آزمایش RT-PCR انجام شد که بر اساس آن بیشترین بیان NRF2 مربوط به روز ششم می‌باشد.

ارزیابی بیان پروتئین NRF2 با استفاده از آزمون وسترن بلاتینگ:

به منظور تایید بیان NRF2 در سلول‌های MSC حاوی ژن NRF2 ، پس از لیز سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن NRF2 با بافر lysis M ، نمونه بر روی ژل الکتروفورز SDS گردید. سپس در مرحله بعد به منظور تایید وجود پروتئین NRF2 ، با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به پروتئین NRF2 و هم چنین آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP ، آزمایش وسترن بلات انجام شد. بدین منظور پروتئین موجود در ژل SDS-PAGE بر روی غشای PVDF منتقل گردید و عشا تحت تاثیر آنتی‌بادی‌های اختصاصی NRF2 قرار گرفت. عدم حضور باند در سلول‌های MSC حاوی وکتور خالی(کنترل) و حضور باند در سلول‌های MSC حاوی ژن NRF2 ، نشان‌دهنده وجود پروتئین NRF2 در سلول‌های آلوده شده با ویروس بود(شکل ۵).

تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده استخوانی:

پس از آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنو ویروس حاوی NRF2 (و یک دسته نیز با آدنو ویروس فاقد NRF2 به عنوان کنترل)، با استفاده از روش‌های ذکر شده، تمایز به رده استخوانی داده شد و پس از ۲۱ روز رنگ‌آمیزی آلیزارین رد صورت گرفت(شکل ۶) . فضاهای



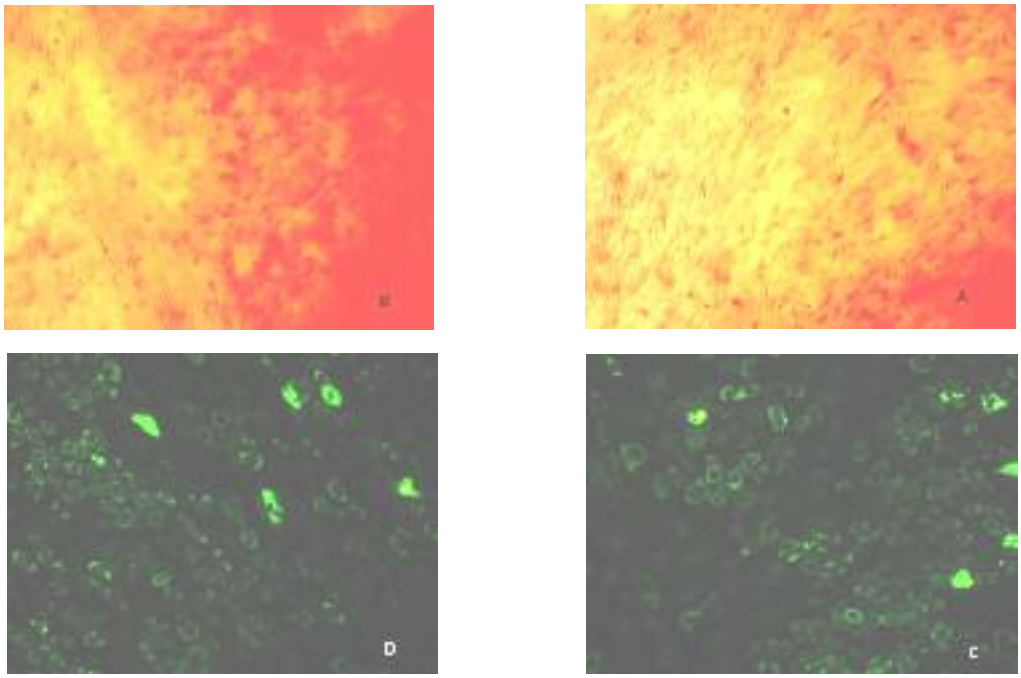
شکل ۵: آنالیز بیان پروتئین NRF2 توسط آزمایش وسترن بلاتینگ. شکل بالا: در این شکل بیان پروتئین NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های حاوی ژن NRF2 در مقایسه با کنترل با استفاده از آزمایش وسترن بلات نشان داده شده است. ستون ۱ مربوط به بیان پروتئین NRF2 توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های حاوی ژن NRF2 است و ستون ۲ بیان آن پروتئین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس کنترل را نشان می‌دهد. همان طوری که انتظار داشتیم آدنوویروس‌های دارای ژن NRF2 ، موجب افزایش بیان پروتئین NRF2 گردیدند. شکل پایین: بیان پروتئین بتا اکتین در هر دو نمونه آزمایش و کنترل، در این شکل نشان داده شده است.

مثبت رنگ‌آمیزی(حداقل در ۵۰ فیلد، در ۳ نمونه مستقل که هر کدام ۳ مرتبه تکرار شدند) با استفاده از نرم‌افزار Image J ویرایش ۱.۴۲ (National Institutes of Health ، مریلند، بتسدا) همان طوری که قبلاً گفته شده بود، کمی گردیدند(۱۷، ۱۶)(نمودار ۱).

نتایج بیانگر آن بود که سلول بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 همانند سلول کنترل می‌تواند به رده استخوانی تمایز یابد و افزایش بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مانع تمایز به سمت رده استخوانی نمی‌گردد.

تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده چربی:

پس از آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنو ویروس حاوی NRF2 (و یک دسته نیز با آدنو ویروس فاقد NRF2 به عنوان کنترل)، با استفاده از روش‌های ذکر شده، تمایز به رده چربی داده شد و پس از ۷ روز

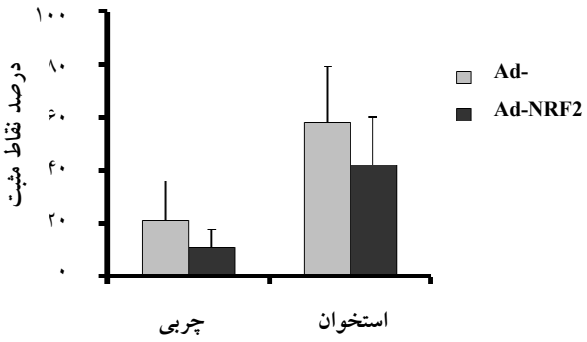


شکل۶ : تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های حاوی ژن NRF2 در مقایسه با کنترل به سمت رده استخوانی. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های کنترل و یا حاوی ژن NRF2 ، در محیط کشت اختصاصی تمایز استخوانی و چربی کشت داده شدند و سپس رنگ‌آمیزی اختصاصی گردیدند. پس از تصویربرداری، آنالیز تصاویر توسط نرم افزار image J نشان داد NRF2 تاثیر معناداری بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی و چربی ندارد. A)تمایز سلول های مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس محتوی NRF2 به رده استخوانی. B) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس فاقد NRF2 به رده استخوانی. C) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس محتوی NRF2 به رده چربی. D) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس فاقد NRF2 به رده چربی.

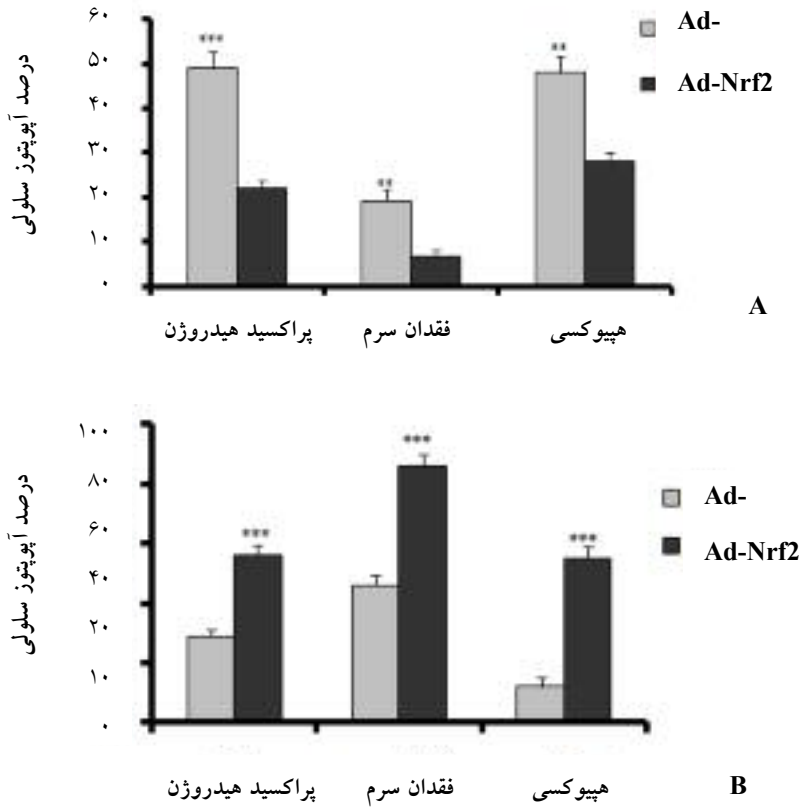
رنگ‌آمیزی HCS LipidTOX™ Green Neutral Lipid صورت گرفت. تفاوتی از نظر تمایز به رده چربی در ۲ دسته سلولی دیده نشد. نتایج بیانگر آن است که سلول بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 همانند سلول کنترل می‌تواند به رده چربی تمایز یابد(شکل ۶ و نمودار ۱).

بررسی تاثیر دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آدنو ویروس حاوی ژن NRF2 ، بر میزان آپوپتوز سلولی:

جهت مطالعه اثر NRF2 بر آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ابتدا سلول‌های NRF2-MSC و MSC را تحت تاثیر استرس‌های مختلف قرار دادیم. سپس میزان مرگ سلولی با استفاده از کیت آنکسین V اندازه‌گیری گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با ۴۰۰ میکرومولار



نمودار ۱: تعیین میزان تمایز سلول‌های بنیادی- مزانشیمی به رده‌های چربی و استخوان. پس از آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدنوویروس‌های خالی و یا محتوی ژن NRF2 ، به رده‌های چربی و استخوان تمایز داده شدند. همان طوری که مشاهده می‌گردد، NRF2 تاثیر معناداری در تمایز به سمت رده‌های چربی و استخوان و یا ممانعت از تمایز به این دو رده ندارد.



نمودار۲: نمودار A) نمودار بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های کنترل و حاوی ژن NRF2 پس از مواجهه با استرس‌های پراکسید هیدروژن(H_2O_2)، هیپوکسی و فقدان سرم با استفاده از آزمایش آنکسین V. نتایج نشان می‌دهد افزایش بیان NRF2 موجب کاهش معنادار میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مواجهه با استرس‌های مذکور می‌گردد. نمودار B) بررسی میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با آدنو ویروس محتوی NRF2 در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با آدنو ویروس خالی. NRF2 توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را جهت مواجهه با شرایط استرسی هم چون پراکسید هیدروژن ۳ میلی‌مولار به مدت ۲ ساعت، فقدان سرم به مدت ۴۸ ساعت و یا هیپوکسی به مدت ۲۴ ساعت، افزایش می‌دهد و درصد بقای سلولی آن‌ها را افزایش می‌دهد.

از پراکسید هیدروژن، دست‌ورزی شده با NRF2 به طور معناداری آپوپتوز کمتری را نشان دادند. هم چنین پس از مواجهه با استرس هیپوکسی(۱٪ اکسیژن) به مدت ۲۴ ساعت و یا شرایط فقدان سرم به مدت ۳ روز نیز به طور معناداری تعداد سلول‌های آپوپتوز شده کاهش یافت(نمودار ۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی القا شده با NRF2 ، در برابر استرس‌های هیپوکسی، فقدان سرم و عوامل اکسیداتیو، مقاومت بیشتری را از خود نشان می‌دهند.

جهت نشان دادن تاثیر قدرتمند NRF2 بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پس از مواجهه سلول‌های NRF2-MSC و Ad-MSC با استرس‌های هیپوکسی، فقدان سرم و عوامل اکسیداتیو، سنجش سیتوتوکسیسیته توسط آزمایش MTT انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های حاوی NRF2 در برابر ۳ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به مدت ۲ ساعت، مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند.

هم چنین سلول‌های NRF2-MSC در شرایط فقدان سرم به مدت ۴۸ ساعت و یا شرایط هیپوکسی(۱٪ اکسیژن، ۵٪ دی‌اکسید کربن) به مدت ۲۴ ساعت نیز

مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های Ad-MSC از خود نشان دادند.

تمامی این آزمایش‌ها، تایید کننده تاثیر حفاظت‌کنندگی شدید NRF2 در برابر استرس‌های مختلف می‌باشد(نمودار ۲).

بحث

امروزه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اساس سلول درمانی را تشکیل می‌دهد. بیماری‌های مختلفی توسط پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی درمان می‌شوند. مهم‌ترین مساله‌ای که در درمان با این سلول‌ها وجود دارد، مرگ اغلب آن‌ها پس از پیوند می‌باشد. لذا امروزه جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند تلاش فراوانی می‌شود(۱۸).

از جمله؛ از روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی ژن‌هایی که در توانمند نمودن سلول‌ها در برابر استرس‌ها نقش دارند، استفاده می‌کنند. تاکنون از ژن‌های Bcl-2 ، surviving ، HO-1 ، HSP70 ، Akt ، FGF-2 ، CXCR4 و ... بدین منظور استفاده کرده‌اند. مهم‌ترین نگرانی که در دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد، تغییر خاصیت تمایزی این سلول‌ها می‌باشد. از آن جایی که مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی آن‌ها در تمایز به رده‌های مختلف است لذا دست‌ورزی ژنتیکی این سلول‌ها زمانی می‌تواند ارزشمند باشد که موجب تغییر خصوصیت فنوتیپی آن‌ها نگردد(۲۶-۱۹). فاکتور نسخه‌برداری NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری basic-leucine-zipper می‌باشد که از مدت ها پیش به عنوان یک فاکتور حیاتی در حفاظت سلول علیه آسیب‌های اکسیداتیو و الکتروفیل شناخته شده بود. تحت شرایط بدون استرس، NRF2 در سیتوپلاسم به صورت متصل به پروتئین keap 1 می‌باشد و پس از نیمه عمر چند ساعته، یوبی کویتینه شده و تجزیه می‌گردد. تحت شرایط استرسی، NRF2 از keap 1 جدا شده، نیمه عمر آن افزایش می‌یابد و به هسته منتقل می‌گردد که موجب رونویسی از ژن‌هایی می‌گردند که باعث افزایش مقاومت سلولی در برابر استرس‌های مختلف می‌شوند(۳۰-۲۷). در این مطالعه از وکتور آدنو ویروسی به منظور افزایش بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. مطالعه‌ها نشان می‌دهد آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای آدنو ویروسی و یا رترو ویروسی، بدون تغییر در فنوتیپ، میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز، موجب بیان پروتئین مورد نظر خواهد شد(۱۴). با استفاده از تعیین دوز آدنو ویروس، غلظت ۲۰ میکرومولار از ذخیره آدنو ویروسی جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد. تاکنون مطالعه‌ای دقیقاً مشابه مطالعه اخیر انجام نشده است. در مطالعه مشابه، لووئن و همکاران از آدنو ویروس به منظور انتقال NRF2 به سلول‌های عضله صاف عروقی استفاده کردند و نشان دادند NRF2 در بیماری‌های عروقی که التهاب و استرس اکسیداتیو نقش دارند، می‌تواند کاربرد درمانی داشته باشد(۳۱). در مطالعه دیگری کائو و همکاران از وکتور pIRESneo2/ NRF2 به منظور توانمندسازی سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو استفاده کردند(۳۲).

آدیپوژنزیس روند پیچیده‌ای شامل تکثیر پیش‌سازها، تعهد به رده آدیپوژنیک و تمایز نهایی به آدیپوسیت‌های بالغ می‌باشد. مطالعه‌ها نشان دادند فاکتور نسخه‌برداری PPARγ جهت تمایز به رده چربی لازم و کافی می‌باشد و در صورت فقدان آن، هیچ فاکتور دیگری نمی‌تواند موجب تمایز به رده چربی گردد. مطالعه‌های بعدی نشان دادند فاکتورهای نسخه‌برداری C/EBPα , β & δ نیز در تمایز به رده چربی نقش دارند. به ویژه C/EBPα نیز در تمایز نهایی به رده چربی بسیار مهم است و در آدیپوسیت‌های بالغ به فراوانی وجود دارد. مطالعه نواحی اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری PPARγ و C/EBPα نشان داد که این دو فاکتور به محل‌هایی در کنار هم در طول ژنوم اتصال می‌یابند(colocalization) و این موضوع نشان می‌دهد، این دو فاکتور نسخه‌برداری با هم همکاری دارند و به این ترتیب موجب بیان ژن‌هایی می‌شوند که در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت رده چربی نقش دارند. هنوز مشخص نشده است چگونه عوامل دیگر، اثر فاکتورهای PPARγ و C/EBPα را در تمایز به سمت رده چربی افزایش و یا کاهش می‌دهند. به عبارت دیگر

چگونگی تعامل بین عوامل اثرگذار بر روی تمایز سلول‌های بنیادی و فاکتورهای نسخه‌برداری مذکور هنوز روشن نشده است(۳۳). در این مطالعه نشان داده شد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2 که در روند مقاومت سلولی در برابر استرس‌های مختلف محیطی نقش دارد؛ تاثیری در تمایز به سمت رده چربی ندارد. این موضوع نشان می‌دهد NRF2 تعاملی با PPARγ و C/EBPα ندارد و این ۲ مسیر نسخه‌برداری کاملاً از هم مجزا می‌باشند.

امروزه شناخته شده است که مراحل تعهد، تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها، نیازمند عملکرد هماهنگ و منظم فاکتورهای نسخه‌برداری مخصوصی می‌باشد که مسؤول تنظیم تمایز و عملکرد استئوبلاست‌ها می‌باشند. این فاکتورهای نسخه‌برداری شامل Runx2 ، Osx و ATF4 هستند. از این میان Runx2 نقش حیاتی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت رده استخوانی ایفا می‌کند. به طوری که اختصاصی‌ترین و حیاتی‌ترین مارکر مولکولی رده استخوانی، از میان فاکتورهای نسخه‌برداری مختلف می‌باشد. بیان Runx2 جهت القای تمایز استخوانی لازم و کافی است که موجب بیان ژن‌های مخصوص رده استخوانی از جمله استئوکلسین، سیالوپروتئین استخوانی، استئوپونتین و کلاژن نوع I می‌گردد(۳۴). مطالعه ما نشان می‌دهد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2 ، تاثیری در تمایز به رده استخوانی ندارد و به احتمال زیاد تداخلی در فعالیت فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در تمایز به رده استخوانی ایجاد نمی‌کند.

نتیجه‌گیری

آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای آدنو ویروسی، بدون تغییر در فنوتیپ، میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز، موجب بیان پروتئین مورد نظر خواهد شد. این مطالعه نشان می‌دهد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2 ، ضمن ایفای نقش مورد انتظار خود در حفاظت سلول علیه آسیب و مرگ، تاثیری در تمایز به رده استخوانی و چربی ندارد و به احتمال زیاد تداخلی در فعالیت فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در تمایز به این رده‌ها ایجاد نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه ماحصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی مصوب مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران می‌باشد.

References :

1- Liu X, Hou J, Shi L, Chen J, Sang J, Hu S, *et al.* Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against ischemia-induced apoptosis *in vivo* Stem Cells Dev 2009; 18(7): 947-54.
2- 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.
3- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999; 103(5): 697-705.
4- Pereira RF, Halford KW, O Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(11): 4857-61.
5- Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, *et al*. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis. Biol Pharm Bull 2009; 32(8): 1335-42.
6- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, *et al*. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. Circulation 2004; 109(12): 1543-9.
7- 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. Cardiovasc Res 2005; 66(3): 543-51.
8- Wang J-a, Chen T-l, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo R-h,. *et al*. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/ reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(1): 74-82.
9- Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, *et al*. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. Carcinogenesis 2009; 30(6): 1024-31.
10- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. J Biol Chem 2003; 278(14): 12029-38.
11- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, *et al*. Activation of Nrf2- antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. Biochem Pharmacol 2008; 76(11): 1485-9.

12- Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. Increased Nrf2 activation in livers from keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. Toxicol Sci 2009; 108(1) : 35-47.
13- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. J Biol Chem 2003; 278(10) : 8135-45.
14- Roelants V, Labar D, de Meester C, Havaux X, Tabilio A, Gambhir SS, *et al*. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. J Nucl Med 2008; 49(11): 1836-44.
15- Weng Q, Yang K, Xiao W, Yuan M, Zhang W, Pang Y. Establishment of an insect cell clone that harbours a partial baculoviral genome and is resistant to homologous virus infection. J Gen Virol 2009; 90(pt 12): 2871-6.
16- Kamiya N, Watanabe H, Habuchi H, Takagi H, Shinomura T, Shimizu K, *et al*. Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. J Biol Chem 2006; 281(4): 2390-400.
17- Hu G, Liu P, Feng J, Jin Y. A novel population of mesenchymal progenitors with hematopoietic potential originated from CD14 peripheral blood mononuclear cells. Int J Med Sci 2010; 8(1): 16-29.
18- Gui C, Wang JA, He AN, Chen TL, Luo RH, Jiang J, *et al*. Heregulin protects mesenchymal stem cells from serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis. Mol Cell Biochem 2007; 305(1-2): 171-8.
19- Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. Curr Opin Biotechnol 2009; 20(5): 531-6.
20- 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.
21- Fan L, Lin C, Zhuo S, Chen L, Liu N, Luo Y, *et al.* Transplantation with survivin-engineered mesenchymal stem cells results in better prognosis in a rat model of myocardial infarction. Eur J Heart Fail 2009; 11(11): 1023-30.
22- Noiseux N, Gnecchi M, Lopez-Ilasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, *et al*. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. Mol Ther 2006; 14(6) : 840-50.
23- 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.
24- Zeng B, Ren X, Lin G, Zhu C, Chen H, Yin J, *et al.* Paracrine action of HO-1-modified mesenchymal stem cells mediates cardiac protection and functional improvement. Cell Biol Int 2008; 32(10): 1256-64.
25- Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation. Cardiovasc Revasc Med 2006; 7(1): 19-24.
26- Song H, Kwon K, Lim S, Kang SM, Ko YG, Xu Z, *et al*. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. Mol Cells 2005; 19(3): 402-7.
27- Jin W, Wang H, Ji Y, Zhu L, Yan W, Qiao L, *et al*. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice. Exp Biol Med (Maywood) 2009; 234(2): 181-9.
28- Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. J Biochem Mol Biol 2004; 37(2): 139-43.
29- Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, *et al.* Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. Arch Biochem Biophys 2006; 454(1): 7-15.
30- Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, *et al*. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. Clin Cancer Res 2009; 15(10): 3423-32.
31- Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, *et al*. Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth *in vitro* and reduces oxidative stress in rabbit aorta *in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27(4): 741-7.
32- Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, Seabrook GR. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. J Neurochem 2005; 95(2): 406-17.
33- Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. Trends Endocrinol Metab 2009; 20(3): 107-14.
34- Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys 2008; 473(2): 98-105.

Original Article

Infection of MSCs by adenovirus expression system expressing NRF2 as a cytoprotective factor

Mohammadzadeh M.[1], Halabian R.[1], Mohammadipoor M.[1], Kiani AA.[2], Gharehbaghian A.[3], Amirizadeh N.[1], Habibi Roudkenar M.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine,Tehran, Iran*
[2]*Lorestan University of Medical Sciences, Lorestan, Iran*
[3]*Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Poor viability of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) following transplantation is one of the major challenges in their therapeutic application. Manipulation of MSCs by the genetic engineering method is one of the strategies used to protect the cells against cytotoxic microenvironment. However, maintaining multi differentiation capacity of MSCs following manipulation is important. We investigated if the manipulation of MSCs with NRF2 affects the multi differentiation capacity.

Materials and Methods

MSCs were isolated from bone marrow. NRF2 was isolated and TOPO cloned into the pENTR vector. The recombinant vector was transferred into pAD/CMV/V5-DEST vector by gateway technology. Recombinant adenovirus was produced in AD293 cells, followed by being infected into MSCs. Expression of NRF2 was verified by RT-PCR. The NRF2 engineered MSCs were exposed to stress conditions followed by the evaluation of the cells viability and apoptosis. Finally, NRF2 expressing MSCs differentiation into osteoblast and adipocyte lineages was studied.

Results

NRF2 was successfully expressed in MSCs. NRF2- MSCs differentiation into osteoblast and adipocyte lineages indicating overexpression of NRF2 does not affect the differentiation property of MSCs.

Conclusions

Expression of NRF2, a well known cytoprotective factor, by using adenovirus expression system does not intervene in the differentiation capacity of MSCs. NRF2-MSCs might be applicable for stem cell-based cell therapy in future.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Nrf2 Protein, TOPO
Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 8(4):272-285

Received: 12 Mar 2011
Accepted: 5 Sep 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*