Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 1, Spring 2021 ORIGINAL ARTICLE

Gene manipulation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by miR-34a

Katayoun Bahman Soufiani[1], Ali Akbar Pourfathollah[2], Mahin Nikougoftar Zarif[3], Ehsan Arefian[4]
[1] PhD Candidate, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Molecular Virology Lab, Department of Microbiology, School of Biology, college of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

Abstract

Background: Safe and effective gene therapy is considered as one of the therapeutic goals in many diseases. Due to the important role of stem cells in cell therapy, this study aimed to produce human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASCs) using the miR-34a overexpression.
Materials and methods: The hsa-mir-34a precursor sequence was cloned into the PCDH lentiviral vector. The recombinant vector and two helper vectors, i.e. psPAX and pMD2, were transferred into HEK-293T cell line by calcium phosphate method. Viral supernatant was collected and concentrated by ultracentrifuge. On the fourth day, transduced HEK-293 T cells were analyzed by flowcytometry. After the determination of viral concentration, hASC cells were transduced with condensed viruses. RNA extraction and cDNA synthesis were performed in order to assess miR-34a expression level by Real Time PCR.
Results: The hsa-mir-34a precursor sequence cloned into PCDH vector was confirmed by colony-PCR and DNA sequencing. Transduction of HEK-293T cells and hASCs were confirmed under fluorescent inverted microscope and flowcytometry. The assessment of miR-34a expression level in infected cells with recombinant virus showed that the expression ratio of miR-34a in the test group was significantly higher than the control group (P=0.001).
Conclusion: This study showed that lentiviral systems can be used to insert actopic genes like miR-34a into cells. It also showed that genetically manipulated stem cells can be used as a delivery system to deliver miR-34a or other genes.
Keywords: *Stem cells, Lentivirus, Transduction, Transfection, HEK-293T, miR-34a.*

Cited as: Bahman Soufiani K, Pourfathollah AA, Nikougoftar Zarif M, Arefian E. Gene manipulation of human adipose -derived mesenchymal stem cells by miR-34a. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(1): **70-78.**

Correspondence to: Ali Akbar Pourfathollah
Tel: *+98 2182883874*
E-mail: pourfa@modares.ac.ir
ORCID ID: 0000-0002-1814-0875
Received: 11 May 2020; **Accepted:** 5 Sep 2020

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۷۰ تا ۷۸

Original Article

دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی با miR-34a

کتایون بهمن صوفیانی[۱]، علی اکبر پورفتح اله[۲]، مهین نیکوگفتار ظریف[۳]، احسان عارفیان[۴]

[۱] دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]استاد دانشگاه تربیت مدرس، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳]دانشیار سازمان انتقال خون ایران، گروه هماتولوری، موسسه آموزش عالی سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
[۴]استادیار دانشگاه تهران، گروه میکروبشناسی، پردیس علوم پایه، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *ژن تراپی ایمن و موثر به عنوان یکی از اهداف درمانی در بسیاری از بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. با توجه به نقش مهم سلول‌های بنیادی در سل تراپی، این مطالعه با هدف تولید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان (hASC) با افزایش بیان miR-34a انجام شد.*

روش بررسی: *توالی پیش ساز hsa-mir-34a در وکتور PCDH لنتی ویروس کلون شد. وکتور نوترکیب و دو وکتور کمکی یعنی psPAX و pMD2 با روش کلسیم فسفات به داخل HEK-293T منتقل شدند. سوپ ویروسی جمع آوری و با اولترا سانتریفیوژ تغلیظ شد. سلول‌های HEK-293T ترانسدیوس شده در روز چهارم با فلوسایتومتری ارزیابی شدند. پس از تعیین غلظت ویروسی، سلول‌های hASC با ویروس‌های تغلیظ شده ترانسدیوس شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور ارزیابی میزان بیان miR-34a با Real Time PCR انجام شد.*

یافته‌ها: *توالی پیش ساز hsa-mir-34a کلون شده در وکتور PCDH با colony-PCR و DNA sequencing تائید شد. ترانسداکشن سلول‌های HEK-293T و hASC در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسنت دار و فلوسایتومتری مورد تائید قرار گرفتند. ارزیابی میزان بیان miR-34a در سلول‌های آلوده به ویروس نوترکیب نشان داد که نسبت بیان miR-34a در گروه تست به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۰۱).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان دادکه از سیستم‌های لنتی‌ویروس‌ها می‌توان برای وارد کردن ژن‌های خارجی نظیر miR-34a به سلول‌ها استفاده کرد. همچنین این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی دستکاری شده ژنتیکی به عنوان delivery system برای انتقال miR-34a و یا هر ژن دیگری می‌توانند استفاده شوند.*

واژگان کلیدی: *سلول‌های بنیادی، لنتی ویروس، ترنسداکشن، ترنسفکشن، HEK-293T، miR-34a*

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cell) یا سلول‌های بنیادی استرومایی(Stroma stem cell) نخستین بار توسط آقای Friedenstein و همکارانش به عنوان سلول‌های شبه فیبروبلاستی توصیف شدند (۱). قدرت چسبندگی به فلاسک کشت سلولی، داشتن مارکرهای تمایزی مانند CD105 ، CD73، CD90 و فقدان عرضه CD45، CD34، CD14 ، CD11b، HLA-II و نیز قدرت تمایز به بافت‌های آدیپوسایت، استئوسایت و کندروسایت تحت شرایط استاندارد در این ویترو، حداقل ملاک‌های معرفی شده از سوی جامعه بین المللی جهت شناسایی این سلول‌ها است (۲). این سلول‌ها علاوه بر مغز استخوان، ازبافت چربی، سینوویوم، بند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه ایمنی شناسی پزشکی ،دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، علی اکبر پورفتح اله (**email**: pourfa@modares.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-1814-0875
تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۶/۱۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

ناف، گردش خون، پالپ دندان ، مایع آمنیوتیک و هم چنین خون جنین، کبد و شش به دست می‌آیند که نشان از ساکن بودن این سلول‌ها در بافت همبند بیشتر ارگان‌ها دارد (۳).

مطالعات بی‌شماری در ارتباط سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بیماری‌ها به ویژه تومورها صورت گرفته است. مهاجرتِ هدفمند MSCها به سمت بافت‌های سرطانی اولیه و متاستاتیک در بسیاری از سرطان‌ها ازجمله سرطان ریه (۴)، سرطان مغز (۵)، سرطان سینه (۶)، سرطان کولون (۷) و سرطان تخمدان (۸) و نیز نقش این سلول‌ها در این موارد گزارش شده است. سالیان پیش معتقد بودند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نقش عواملِ سرگوبکر سیستم ایمنی در منطقه توموری ظاهر می‌شوند، اما مطالعات اخیر و روز افزون نشان می‌دهد که این سلول‌ها علاوه براثرات آنتی‌تومورژنزیس، اثرات تحریکی (۱۰،۹) را بر رشد تومور، به طور مستقیم و یا غیرمستقیم می‌توانند اعمال کنند. به نظر می‌رسد که cross-talkهای پیچیده و متنوع درون زیر محیط تومور، سرنوشت MSC ر ا رقم می‌زنند. هایپوکسی، اسیدیته خارج سلولی، اجزاء تشکیل دهنده ماتریکس داخل سلولی، Toll like Receptorها و نیز حضور سلول‌های التهابی جهت گیری این سلول‌ها را به سمت فنوتایپ MSC1 (pro-inflammatory) و یا MSC2 (Immunosuppressive MSC) را تعیین می‌کنند (۱۱، ۱۲).

شواهد اخیر حکایت از این دارد که در ارتباطات سلولی، گسترش و متاستاز تومور وحتی در تعیین سرنوشت MSCها علاوه بر نقش تمامی فاکتورهای موجود در ریزمحیط التهابی و یا توموری، MicroRNAها نقش کلیدی را در این میان برعهده دارند. MicroRNAها، RNAهای کوچک نان کدونیک تقریبا ۲۲ نوکلئوتیدی‌اند که با اتصال به ناحیه 3'-UTR از mRNA تارگت، سبب تجزیه آن و یا مانع ازآن ترجمه آن به پروتئین می‌شوند (۱۳, ۱۴). این RANهای نان کدونیک علاوه بر اینکه در بسیاری از پروسه‌های بیولوزیک درگیرند، در پروسه‌های پاتوبیولوزیکی نظیر مقابله در برابر ویروس‌ها، آپوپتوزیس و پرولیفراسیون سلولی نیز ایفا نقش می‌کنند (۱۴). miR-34a که بر روی کروموزوم شماره ۱(1p36) قرار دارد، در بسیاری از سرطان‌ها به طور معنی‌داری کاهشی را نشان می‌دهد، به طوری که Deregulation دربیان miR-34a با تاثیر گذاری بر پروسه‌های بیولوژیکی نظیر سیکل سلولی، پیری، اپوپتوزیس، تمایز و تکامل همراه می‌شود. لذا با توجه به اهمیت حضور MSC در مناطق توموری و نقش miRNAها در بیماری‌ها، در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از سیستم تحویل رسانی لنتی ویروسی بتوان به افزایش بیان دائمی miR-34a در این سلول‌ها اقدام کرد.

مواد و روشها

کشت رده‌های سلولی

رده سلولی HEK-293T: رده سلولی Human embryonic kidney 293 cells از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده است. این سلول ابتدا در فلاسک T25 با محیط DMEM high glucose با FBS ده درصد و پنی سیلین –استرپتومایسین (100X) کشت داده شد. فلاسک حاوی سلول‌ها به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 منتقل و انکوبه شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی (Human Adipose Derived Stem Cells (hASCs: این سلول‌ها از سازمان انتقال خون ایران تهیه شدند. این سلول‌ها نیز با استفاده از محیط DMEM-F12 همراه با FBS ده درصد کشت داده شدند و در شرایط مشابه سلول‌های HEK-293T قرار گرفتند.

سلول‌ها روزانه از لحاظ میزان رشد و هم چنین آلودگی روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و محیط رویی آنها هر ۴۸ ساعت یک بار با محیط تازه جایگزین می‌شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی به استخوان و چربی

پس از اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، پر شدگی (confluency) ۷۰ درصد را در کف پلیت ۶ خانه‌ای ایجاد کردند، محیط رویی هر خانه با محیط تمایز دهنده به بافت چربی و یا استخوانی جایگزین شدند. تعویض محیط بمدت ۲۱ روز و هر سه روز یکبار انجام گردید. پس از ۲۱ روز سلول‌ها با رنگ Oil Red و Alizarin Red به منظور مشاهده قطرات چربی و یا رسوبات کلسیم به ترتیب رنگ آمیزی شدند.

استخراج DNA

با استفاده از خون کامل و روش salting out، DNA ژنومی استخراج و با نانودراپ غلظت آن در طول موج ۲۶۰ نانومترمورد خوانش قرار گرفت. با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد کیفیت و یکپارچگی آن مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی پرایمرها و تکثیر قطعه ژنی مورد نظر

بدین منظور با مراجعه به سایت www.mirbase.org و بدست آوردن توالی مربوط به پیش ساز miR-34a و اضافه نمودن 100- 200bp نوکلئوتید در بالادست و پایین دست توالی مورد نظر، پرایمرهای مستقیم (Forward) و غیر مستقیم (Reversrd) با جایگاه‌های برش آنزیمی برای دو آنزیم محدودالاثر

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

BstB1وEcoR1 طراحی وتوسط شرکت پیشگامان سنتز شد. در انتخاب آنزیمهای موردنظر برای کلون کردن ژن پیش ساز miR-34a در وکتور PCDH، جایگاه multiple cloning site در این وکتور از لحاظ نوع آنزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

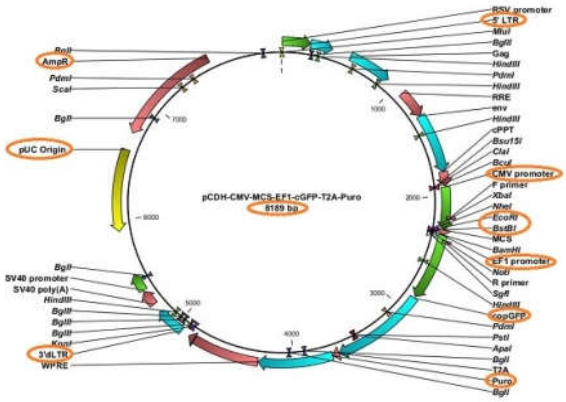
برای تکثیر قطعه ژنی ۴۰۲ جفت بازی حاوی توالی پیش ساز miR-34a از DNA ژنومی و مستر میکس امپلیکون 2X (Amplicon co, Cat No: A180306) و برنامه دمایی: دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشتگی اولیه) به مدت ۷دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای ۳۵ سیکل استفاده شد. همچنین واکنش برای مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه یافت و در انتها در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. محصول PCR برروی ژل آکاروز ۲درصد حاوی رنگ Syber Safe لود گردید و با استفاده از اشعه ماورای بنفش باندهای ظاهر شده با 1kb ladder سنجیده شد.

همسانه سازی ژن miR-34a (Gene Cloning) در پلاسمید PCDH:

همسانه سازی(Gene Cloning) بدنباله هضم آنزیمی محصول تکثیر یافته PCR و پلاسمید لنتی ویروسی به نام PCDH می باشد. دراین مطالعه از پلاسمید PCDH_CMV_MCS_EF1_CGFP_T2A-Puro(8189bp) (شرکت بیوساینس- ایالات متحده) که شامل کاست ژنی برای آنتی بیوتیکهای پرومایسین و آمپی سیلین و نیز دارای ژن بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز (GFP) می باشد (شکل ۱) استفاده گردید. پلاسمید با استفاده از کیت MN از نوع Mega (المان) استخراج شد و با استفاده از نانودراپ و نیز الکتروفورزیس غلظت و خلوص آن تعیین شد. با استفاده از آنزیمهای محدودالاثر EcoR1 و BstB1 (شرکت فرمنتاز) محصول PCR و DNA پلاسمیدی برش داده شد که سپس توسط آنزیم T4 لیگاز (شرکت فرمنتاز) مطابق دستورالعمل کیت به یکدیگر متصل شدند.

انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری اشرشیا کلی سویه DH5α و انجام Colony- PCR :

با استفاده از روش کلسیم کلراید سرد باکتریهای مستعد (compotent) از سویه DH5α تهیه شد. با کمک شوک حرارتی پلاسمید نوترکیب به داخل باکتریهای مستعد انتقال داده شد. پلاسمید نوترکیب در محیط Lysogeny broth که فاقد آنتی بیوتیک است بمدت ۹۰ دقیقه بر روی شیکر ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بدنبال این عمل باکتریهای بر روی پلیت آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند تا باکتریهای ترنسفرمه شده در مدت زمان ۲۴ ساعت درانکیباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد یابند. کلنی‌های ترنسفرم شده با استفاده از پرایمرهای مربوط به توالی پیش ساز miR-34a ونیز توالی‌های مربوط به CMV و EF1 کلنی –PCR شدند. از کلنی‌های تائید شده با استفاده از کیت Mini شرکت MN، پلاسمید استخراج و مقدار کمی برای تائید توالی به شرکت پیشگامان ارسال شد.



شکل۱. نقشه ژنتیکی پلاسمید PCDH

انتقال پلاسمید نوترکیب و پلاسمیدهای ساختاری و پوششی به سلول HEK-293T و تولید ذرات ویروسی

۲۴ ساعت قبل از عمل ترنسفکشن ۱۳۰۰۰۰۰ سلول HEK-293T در فلاسک T25 کشت داده شد تا پرشدگی (confluency) ۷۰-۶۰ درصدی برای ترنسفکشن را فراهم کند. با استفاد از روش کلسیم فسفات و بر اساس پروتکل 21µg ، 21µg و 10.5µg از پلاسمید نوترکیب، پلاسمید ساختاری(psPAX) و پلاسمید پوششی (pMD2) به ترتیب به داخل لوله فالکون اضافه شد. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ایِ فالکون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتویات فالکون به آرامی بر روی فلاسک T25 منتقل و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. پس از ۱۶ ساعت محیط رویی فلاسک تعویض و زیر میکروسکوپ معکوس فلورسنت‌دار از لحاظ بیان پروتئین GFP مورد بررسی قرارگرفت. درصورت مثبت شدن GFP در بیش از ۸۰ درصد سلول‌های HEK ترنسفکت شده، مایع رویی درسه روز متوالی صبح و عصر جمع آوری شد. با استفاده از اولتراسانتریفیوژ ذرات ویروسی تغلیظ شده به دست آمد که در محیط DMEM فاقد FBS حل و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

تعیین تیتر ویروس با استفاده از روش فلوسایتومتری

بدین منظور تعداد ۵۰۰۰۰ سلول HEK-293T در هر خانه پلیت۲۴ خانه‌ای کشت داده شد و سپس مقادیر مختلف (۱، ۴ و ۱۶ میکرولیتر) از ذرات ویروسی تغلیظ شده به آنها اضافه شد. به منظور تسهیل ورود ویروس‌ها به داخل سلول‌ها به میزان ۱ میکرولیتر از پلی برن 2µg/µl به هر خانه اضافه شد. روز دوم پس از مشاهده بیان پروتئین GFP در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسنت دار، سلول‌های HEK در روز چهارم با ترپسین از کف هر خانه کنده وسپس با محیط حاوی FBS ده درصد دکمپلمانه خنثی و پس از سانتریفیور در PBS حل و آماده خوانش با دستگاه فلوسایتومتری (ABI - ایالات متحده) شدند. تعداد ذرات ویروسی با قرار دادن سلول‌های GFP مثبت در فرمول زیر محاسبه شد:

$$\frac{(seeded\ cells \times GFP\ positive\ cells) \times 1000}{\mu l\ of\ vectors} = Tu/ml$$

ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مرانشیمی انسانی مشتق از چربی

از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در پاساژ ۳ استفاده شد. بدین منظور سلول‌های hASC در فلاسک T25 کاشته شد و در پرشدگی (confluency) ۷۰-۶۰ درصد در MOI=20، ذرات ویروسی تغلیظ شده به آن اضافه شد. در روز دوم سلول‌ها از لحاظ بیان GFP در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسنت‌دار بررسی شدند. با استفاده از پرومایسین سلول‌های ترانسداکت نشده حذف شدند. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسداکت نشده نیز به عنوان کنترل در این مطالعه استفاده شد.

استخراج RNA و cDNA سازی

روز ششم پس از ترنسداکشن سلول‌های بنیادی ترانسداکت شده و ترانسداکت نشده با پلاسمید نوترکیب لنتی-miR، سلول‌ها از کف فلاسک با تریپسین کنده و پس از خنثی شدن با محیط FBS دار سانتریفیوژ شدند. بر روی رسوب سلولی RNA xPLus (سیناژن- ایران) اضافه و طبق پروتکل کیت مربوطه RNA سلولی استخراج شد که با استفاده از نانو دراپ غلظت و خلوص آن تایید شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای miR-34a و نیز کنترل داخلی (Snord-47) سنتز cDNA با استفاده از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase (Termofisher co, Cat No: YT4502) طبق پروتکل کیت انجام پذیرفت.

تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism 6 و Rest 2000 صورت گرفت. P-values<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

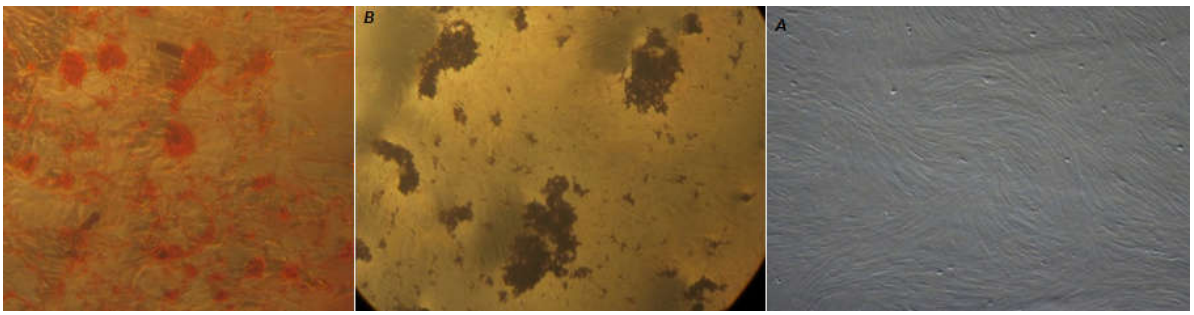
یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی از بافت چربی تهیه شد. پس از ۴۸ ساعت کشت محیط رویی سلول‌ها تعویض و با محیط تازه .DMEM high Glu جایگزین شد. سلول‌های بنیادی به خاطر ویژگی چسبندگی به کف فلاسک از سایر سلول‌های نچسب در طول کشت جدا شدند. این سلول‌ها از نظر مورفولوژی در زیر میکروسکوپ اینورت به شکل چسبیده و کشیده دیده شدند (شکل ۲). این سلول‌ها در پاساژ ۳ جهت تمایز به بافت چربی و استخوانی که جهت تاییدشان ضروری است، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی ویژگی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به بافت چربی و استخوان

علاوه بر قدرت چسبندگی به فلاسک کشت سلولی، تمایز به بافت چربی و استخوانی از شاخص‌های تایید کننده دیگر سلولهای بنیادی مزانشیمی است. پس از کشت سلول‌های بنیادی در محیط تمایز دهنده استخوان و چربی به مدت ۳



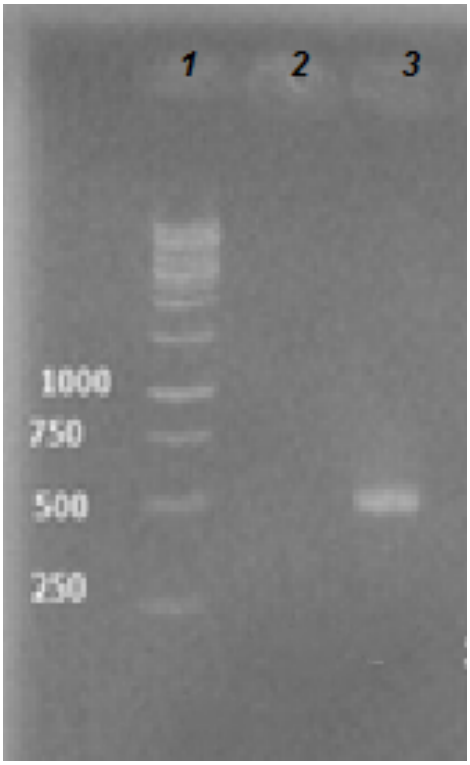
شکل ۲. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی در زیر میکروسکوپ اینورت. تصویر (A): سلول‌های بنیادی مزانشمی به شکل کشیده و چسبان؛ تصویر (B): تمایز به بافت چربی با مشاهده قطرات چربی پس از رنگ آمیزی با Oil Red؛ تصویر (C): تمایز به بافت استخوانی با مشاهده رسوبات کلسیم پس از رنگ آمیزی با Alizarin Red

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

هفته و سپس رنگ‌آمیزی با oil Red و Alizarin Red به ترتیب، نتایج نشان داد که این سلول‌ها از ویژگی تمایزی به بافت چربی و استخوانی برخوردارند. شکل ۲ قطرات چربی و نیز رسوبات کلسیم را در زیر میکروسکوپ اینورت نشان می‌دهد.

تکثیر قطعه ژنی ۴۰۲ جفت بازی حاوی توالی پیش ساز miR-34a

نسبت جذب نوری DNA استخراج شده در طول موج $\frac{260\ nm}{280\ nm}$ برابر با ۱/۹-۱/۸ بود. شکل ۳ نشانگر تکثیر قطعه ژنی 402bp است که نشان از اختصاصی بودن عملکرد پرایمرها و ایده‌آل بودن شرایط زمانی و دمایی دارد.



شکل ۳. الکتروفورزیس قطعه ژنی حاوی توالی پیش ساز miR-34a برروی ژل آگارز ۲ ٪. ستون ۲ کنترل فاقد DNA الگو. ستون ۳ محصول قطعه ژنی حاوی توالی پیش ساز mIr-34a 402bp که در مقابل نشانگر 1kb (ستون ۱) سنجیده شد.

نتایج colony-PCR و تعیین توالی پلاسمید نوترکیب

همان طور در شکل ۴ ملاحظه می‌شود پلاسمید نوترکیب به درون باکتری اشرشیا کلی سویه DH5α ترانسفرم شده است. توالی سکانس شده با توالی پلاسمید نوترکیب در سایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov بلاست شد (شکل ۵) که نشانگر الحاق صحیح توالی پیش ساز miR-34a در پلاسمید است.

ترنسفکشن سلول‌های HEK-293T و تعیین تیتر لنتی ویروس‌های نوترکیب

به دنبال انتقال هم زمان پلاسمید نوترکیب (PCDH-mir-34a) و پلاسمیدهای ساختاری و پوششی (psPAX,PMD2) به داخل سلول‌های HEK-293T انتظار می‌رود که virus packaging در این سلول‌ها صورت پذیرد. اگرچه مشاهده رنگ سبز در زیر میکروسکوپ فلورسنت دلیل بر بسته بندی ویروس نمی‌تواند باشد. لذا به دنبال ترنسفکشن و مشاهده رنگ سبز که دلیل بر بیان GFP است (شکل ۶A)، سوپ ویروسی سه روز پی در پی جمع-آوری شد و پس از تغلیظ شدن با التراسانتریفیوژ جهت ترانسداکت سلول‌های HEK-293T و بررسی کیفیت ویروس‌های تولیدی به کار رفت (شکل۶B) با استفاده از حجم ۲ میکرولیتر از ویروس تغلیظ شده نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۵۵/۵۱٪ سلول‌ها از لحاظ GFP مثبت بودند (شکل ۶C).

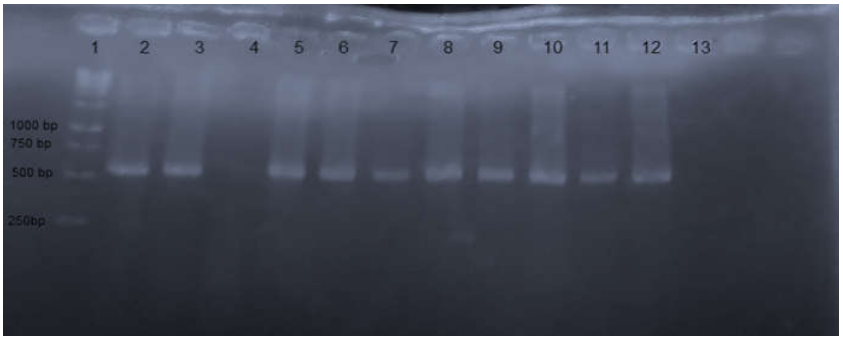
تغییر در میزان بیان miR-34a پس از ترنسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشمی مستق از چربی (hASC)

۷۲ ساعت پس از ترنسداکشن سلول‌های hASC و بررسی میران بیان ژن GFP در میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد که پروتئین GFP در بیشتر سلول‌ها بیان می‌شود (شکل ۷). سلول‌های ترانسداکت شده پس از انتخاب شدن با پرومایسین در روز ششم مورد استخراج RNA و ستنز cDNA و انجام فرایند Q Real Time PCR قرار گرفتند. آنالیز نتایج Real Time PCR در دو نمونه تست و کنترل در مقابل snord47 به عنوان اینترنال کنترل نشان داد که میزان بیان miR-34a در نمونه تست نسبت به کنترل ۷/۰۸ مرتبه افزایش بیان داشته که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار است (P=۰/۰۰۱). در این مطالعه از سه تکرار بیولوژیک استفاده شد.

بحث

امروزه مطالعات بی‌شماری در راستای تاثیرگذاری مسایل اپی ژنتیکی و ژنتیک بر درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های خودایمن و کانسرها صورت می‌پذیرد که در این میان RNAهای نان-کدونیک جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]



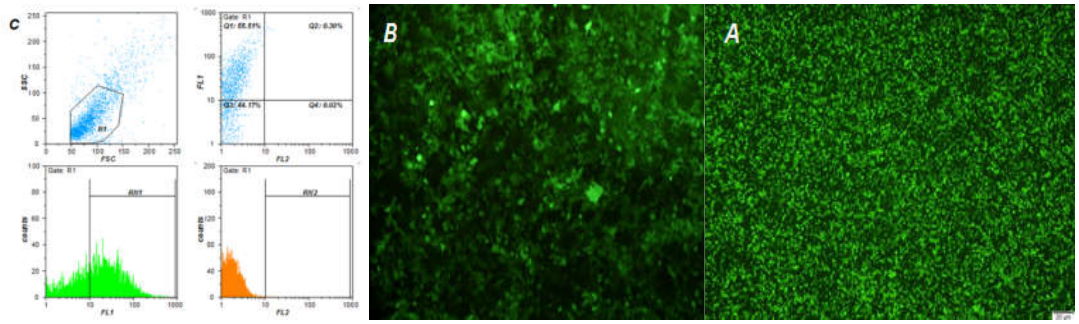
شکل ۴. محصول کلنی –PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون ۱ نشانگر 1Kb است. تمامی ستون‌ها به جز ستون شماره ۴ نشانگر محصول کلنی-PCR با استفاده از دوپرایمر مربوط به ژن‌های CMV و EF1 است. ستون ۱۳ مربوط به کنترل بدون الگو (NTC) است.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
726 bits(804)	0.0()	402/402(100%)	0/402(0%)	Plus/Plus	

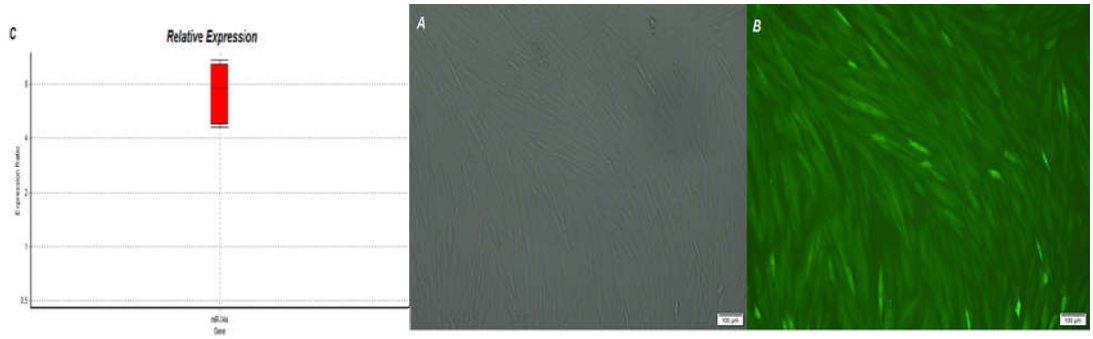
Features:

```
Query  102  CATCCTTTCTTTCCTCCCCACATTTCCTTCTTATCAACAGGTGCTGGGGAGAGGCAGGAC  161
Sbjct  1    CATCCTTTCTTTCCTCCCCACATTTCCTTCTTATCAACAGGTGCTGGGGAGAGGCAGGAC  60
Query  162  AGGCCTGTCCCCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTGTGAGTGTTTCTTT  221
Sbjct  61   AGGCCTGTCCCCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTGTGAGTGTTTCTTT  120
Query  222  GGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGC  281
Sbjct  121  GGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGC  180
Query  282  CCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGATGAAGCGAGAGATGCCCAGAC  341
Sbjct  181  CCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGATGAAGCGAGAGATGCCCAGAC  240
Query  342  CAGTGGGAGACGCCAGGACTTCGGAAGCTCTTCTGCGCCACGGTGGGTGGTGAGGGCGGC  401
Sbjct  241  CAGTGGGAGACGCCAGGACTTCGGAAGCTCTTCTGCGCCACGGTGGGTGGTGAGGGCGGC  300
Query  402  TGGGAAAGTGAGCTCCAGGGCCCCAGGAGCAGCCTGCTCGTGGGTGCGGAAGGAAAAAGG  461
Sbjct  301  TGGGAAAGTGAGCTCCAGGGCCCCAGGAGCAGCCTGCTCGTGGGTGCGGAAGGAAAAAGG  360
Query  462  CACAGGGGCTTGGTGTGGGCGGCTTTTGGCTGGGAGAAGTTT  503
Sbjct  361  CACAGGGGCTTGGTGTGGGCGGCTTTTGGCTGGGAGAAGTTT  402
```

شکل ۵. نتیجه بلاست توالی به دست آمده از توالی پلاسمید نوترکیب در سایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov



شکل ۶. تصاویر مربوط به HEK-293T. (A): ترانسفکشن سلول‌های HEK 293T با سه پلاسمید. (B): ترانسداکشن سلول‌های HEK با ذرات ویروسی تغلیظ شده. (C): درصد سلول‌های GFP مثبت ترنسداکت شده با ۲ میکرولیتر از ویروس تغلیظ شده با فلوسایتومتری.



شکل ۷. تصاویر مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی. (A): قبل از ترنسداکشن، (B): پس از ترانشداکشن، (C): آنالیز میزان بیان miR-34a در نمونه ترانسداکت شده با miR-34a در مقایسه با کنترل که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (P=۰/۰۰۱).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

نقش کلیدی این RNAهای نان-کدونیک دربسیاری از پروسه-های بیولوژیکی نظیر پاسخ‌های ایمنولوژی، آپوپتوزیس، متابولیسم سلولی تا پرولیفراسیون و تمایز سلولی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). به طوریکه امروزه miRNAها به عنوان یک هدف و یا وسیله درمانی و نیز به عنوان یک بایومارکر برای تشخیص و مانیتورنیگ درمان در بیماری‌ها مطرح می‌شوند (۱۷, ۱۸). علاوه بر این محققین نشان دادند که این ملکول‌های کوچک نان-کدونیک در نقش انکوژن و یا تومور ساپرسیو نیز می‌توانند عمل کنند (۱۸). miR-34a از بهترین ملکول‌هایی است که در زمینه توموژنزیس مورد مطالعه قرار گرفته است. به طوری که کاهش miR-34a در بسیاری ازسرطان‌ها حکایت از نقش این ملکول در شروع و یا گسترش تومور دارد (۱۹). بنابراین تومور تراپی براساس پروفایل miRNAها در بیماری‌های مختلف می-تواند یکی از روش‌های تحقیقاتی در درمان بیماری‌ها محسوب شود.

پتانسیل بالا در مهاجرت به مناطق التهابی و سرطانی، سلول-های بنیادی مزانشیمی را به بهترین کاندید در سل تراپی معرفی کرده است. مشاهده حضور این سلول‌ها در این مناطق این نوید را می‌دهد که این سلول‌ها بتوانند در انتقال ژن نیز کاربرد فراوانی را داشته باشند. مفهوم ژن درمانی به اواسط قرن بیستم باز می‌گردد، زمانی که نخستین بار در درمان کودکان مبتلا به نقص ایمنی کشنده از رتروویروس‌ها به عنوان ناقلین ژن‌های خارجی به داخل سلول‌ها استفاده کردند (۲۰, ۲۱). اما شکست در این موفقیت سبب شد تا لنتی‌ویروس‌ها که علاوه بر سلول‌های diving سلول‌های nondividing را نیز الوده می‌کند نیز مطرح شود (۲۰, ۲۱). این سیستم تحویل رسانی به علت برخورداری از جایگاه‌های متعدد کلونینگ و نیز قابلیت بیان در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی جایگاه خاصی را در پروتکل‌های ژن تراپی و تحقیقاتی به خود اختصاص داده است. در این مطالعه نیز بعد از تیمار سلول‌ها با ویروس حامل قطعه مورد نظر و با توجه به نتایج ریل تایم مشاهده شد که افزایش کمی بیان miR-34a در سلول‌های بنیادی مرانشیمی نسبت به گروه کنترل صورت گرفته است که این امر به دنبال الحاق دائمی ژن مورد نظر در ژنوم سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی حاصل شده است. این مطالعه نشان داد که سیستم تحویل رسانی لنتی ویروسی می‌تواند روش مناسبی جهت انتقال miRNA به داخل سلول‌ها به ویژه سلول‌هایی با MOI بالا نظیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته شود که در نهایت می‌تواند در روشهای درمانی که مستلزم رساندن و یا تغییر در میزان بیان miRNAها در بافت‌های هدف باشد مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran National Science Foundation) کمال تشکر و قدردانی را دارند.

سهم نویسندگان

این مطالعه بخشی از پایان نامه دکتری کتایون بهمن صوفیانی در رشته ایمنی شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با راهنمایی جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله انجام پذیرفته است.

REFERENCES

1. Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Prolif 1970;3:393-403.

2. 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;8:315-7.

1. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. Stem Cells 2007;25:2896-902.

3. Loebinger MR, Kyrtatos PG, Turmaine M, Price AN, Pankhurst Q, Lythgoe MF, et al. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. Cancer Res 2009;69:8862-7.

4. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, Van De Water JA, Mohapatra G, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2009;106:4822-7.

5. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-β. J Immunol 2010;184:5885-94.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]

6. Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, et al. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. Stem Cells 2007;25:520-8.

7. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. Stem Cells 2009;27:2614-23.

8. Beckermann B, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, et al. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. Br J Cancer 2008;99:622-31.

9. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. Stem Cells 2009;27:670-81.

10. Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. Biochim Biophys Acta 2013;1836:321-35.

11. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. PloS One 2010;5:10088.

12. Rüegger S, Großhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. Trends Biochem Sci 2012;37:436-46.

13. Xu L, Yang Bf, Ai J. MicroRNA transport: a new way in cell communication. J Cell Physiol 2013;228:1713-9.

14. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. Cancer Cell Int 2015;15:38.

15. Collino F, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. MicroRNAs and mesenchymal stem cells. Vitam Horm. 2011;87:291-320.

16. Chen Y, Gao D-Y, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. Adv Drug Deliv Rev 2015;81:128-41.

17. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006;6:857-66.

18. Gao J, Li N, Dong Y, Li S, Xu L, Li X, et al. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. Oncogene 2015;34:4142-52.

19. Tomás HA, Rodrigues AF, Alves PM, Coroadinha AS. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. London: InTechOpen; 2013.

20. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Arch Immunol Ther Exp 2010;58:107-19.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-09]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.1.5.3]
[DOI: 10.52547/iau.31.1.70]