

## *Evaluation of VEGF-111b Anticancer Peptide Production in Transfected Human Cells Using Real time- PCR Analysis*

Morteza Sadeghi<sup>1</sup>,  
Zohreh Hojati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received May 15, 2016 ; Accepted September 13, 2016)

### *Abstract*

**Background and purpose:** Endothelial growth factor type b with anti-angiogenic activity and inhibition of tumor growth are considered as new anticancer drugs. The aim of this research was to study the expression of vegf111b in HEK293 human cells.

**Materials and methods:** In this experimental study, HEK293 cells were transfected by pBUD.VEGF111b vector containing the VEGF111B gene through lipofectamine method. The mRNA of transfected cells and control cells were extracted and cDNA was built over it. Then, the expression levels of vegf111b were measured using Real time- PCR.

**Results:** Transfection of HEK293 cells was successfully done and 48 hours after transfection of HEK293 cells, ct of the vegf111b expression in transfected cells was 23.17 and ct of the GAPDH control gene expression in these cells was 21.11. In the control (untransfected) cells the ct of GAPDH was 21.09 and there was no expression of vegf111b in these cells.

**Conclusion:** Expression of Vegf111b recombinant protein in HEK293 cells is the first step for further research on this protein. Current study has provided the possibility of using this product for future research on angiogenesis and cancer treatments.

**Keywords:** vascular endothelial growth factor, transfection, HEK293 cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 20-28 (Persian).

## بررسی میزان تولید پپتید ضد سرطان VEGF-111b در سلول های انسانی ترنسفکت شده از طریق Real Time-PCR

مرتضی صادقی<sup>۱</sup>  
زهره حجتی<sup>۲</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** فاکتورهای رشد اندوتلیالی تیپ b با فعالیت ضد رگ زایی و مهار رشد تومورها به عنوان داروهای جدید ضد سرطان مورد توجه هستند. در این مطالعه هدف بررسی میزان بیان vegf111b در سلول های انسانی HEK293 بوده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی سلول های HEK293 توسط وکتور pBUD.VEGF111b حاوی ژن VEGF111B به روش لیپوفکتامین ترنسفکت شدند و mRNA سلول های ترنسفکت شده و سلول های کنترل استخراج شدند و از روی آن cDNA ساخته شد و میزان بیان vegf111b از طریق Real time-PCR اندازه گیری شد.

**یافته ها:** ترنسفکشن سلول های HEK293 با موفقیت انجام شد و ۴۸ ساعت پس از ترنسفکشن سلول های HEK293، ct مربوط به بیان vegf111b در سلول های ترنسفکت شده برابر 23.17 و ct مربوط به بیان ژن کنترل GAPDH در این سلول ها برابر 21.11 بود. در سلول های کنترل (ترنسفکت نشده) و ct مربوط به GAPDH برابر 21.09 بود و هیچ بیانی از vegf111b در این سلول ها مشاهده نشد.

**استنتاج:** بیان مناسب پروتئین نو ترکیب vegf111b در سلول های HEK293 نخستین گام برای تولید و تحقیقات پیش تر روی این پروتئین است و با انجام این مطالعه امکان استفاده از این محصول در تحقیقات بعدی روی مهار رگ زایی و درمان سرطان فراهم شد.

**واژه های کلیدی:** فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، ترنسفکشن، سلول HEK293

### مقدمه

میان سلول ها و مولکول های مختلف وابسته بوده و توسط پپتیدها و فاکتورهای رشد متعددی کنترل می شود. به منظور جوانه زدن عروق خونی جدید، آنبشاری از وقایع زیر در سلول به وقوع می پیوندد که به طور خلاصه عبارتند از تجزیه غشاء پایه عروقی، مهاجرت سلول های اندوتلیال به فضای بین بافتی و به سمت فاکتورهای القاکننده رگ زایی، تکثیر سلول های اندوتلیال، شکل گیری لامینا

رگ زایی به فرآیند شکل گیری عروق خونی جدید از عروق قدیمی اطلاق می گردد. این فرآیند شامل تمایز سلول های اندوتلیال از سلول های پیش ساز مزودرمی محل می شود (۱). مهم ترین عملکردهای رگ زایی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند شکل گیری و تکامل جنین، درمان زخم ها و سیکل های بازسازی در بدن افراد بالغ است (۲). فرآیند رگ زایی به فعل و انفعالات وسیع

E-mail: ms.sadeghi@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** مرتضی صادقی - تهران: میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، بخش ژنتیک

۱. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۳

و غشاء پایه جدید برای ساخت مویرگ خونی جدید (۴۳). فاکتورهای مولکولی اصلی تحریک کننده رگ‌زایی عبارتند از فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتورهای رشد فیروبلستی (FGF) و فاکتورهای رشد تغییری آلفا و بتا (۵،۶). VEGF یکی از تنظیم کننده‌های اصلی رگ‌زایی فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی است (۷). علاوه بر رگ‌زایی VEGF به عنوان یک میتوزن و فاکتور بقاء برای سلول‌های اندوتلیال عمل می‌کند و در افزایش نفوذپذیری عروق و هم‌چنین مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی مغز استخوان دخیل است. از آنجایی که VEGF در افراد بالغ به‌طور طبیعی نقش‌های محدودی دارد ولی به وسیله سلول‌های توموری ترشح می‌گردد، به عنوان یک هدف درمانی مهم در نظر گرفته می‌شود (۸). VEGFA نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط با رگ‌زایی برعهده دارد. در اندام‌ها و بافت‌های بزرگسالان، VEGF در سطح پایه و برای محافظت از سلول‌های اندوتلیال در برابر آپوپتوز تولید می‌شود (۹). این فاکتور رگ‌زایی بقا زیستی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند. VEGF در آنژیوژنز تومورها به صورت یک فاکتور کلیدی عمل نموده و رشد رگ‌های جدید از رگ‌های قبلی را تحریک می‌کند. به این ترتیب مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز سلول‌های تومور فراهم می‌گردد و در نتیجه باعث رشد و متاستاز تومور می‌شود (۱۰). استفاده از داروهای ضد رگ‌زایی به عنوان استراتژی موثر در درمان سرطان از اواخر دهه ۹۰ مد نظر محققین قرار گرفته است (۲). افزایش بیان VEGF در بسیاری از تومورهای انسانی گزارش شده است و با تکثیر سلول‌های توموری و متاستاز تومور در ارتباط است (۸). پیرایش‌های متناسب در mRNA اولیه ژن VEGF-A، باعث تولید دو نوع متفاوت از ایزوفرم‌های VEGF-A با عنوان VEGF-xxx و VEGF-xxxب می‌شود. عملکرد کنترلی جایگاه پیرایش نزدیک در اگزون ۸ این ژن منجر به تولید ایزوفرم‌های با خاصیت رگ‌زایی

یا همان VEGFxxx حامل اگزون 8a و عملکرد جایگاه پیرایش دور باعث ایجاد ایزوفرم‌های ضد رگ‌زایی VEGFxxxب حامل اگزون 8b می‌شود (۱۱،۱۲). ROPritchard-Jones و همکارانش در مطالعه‌ای روی مهار متاستاز ملانوما گزارش کردند که با افزایش بیان VEGF165b و کاهش رگ‌زایی می‌توان متاستاز ملانوما را مهار کرد (۱۳).

کازمی و همکاران در مطالعه دیگری گزارش کردند که القاء بیان VEGF121b و VEGF165b باعث کاهش تشکیل عروق در سلول‌های توموری سرطان کولورکتال انسان و موش می‌شود (۱۴). در مطالعه‌ای جدید Li و همکارانش گزارش کردند که با افزایش بیان VEGF111b در سلول‌های سرطانی رحم می‌توان پیشروی سرطان رحم را مهار کرد (۱۵). با توجه به اهمیت درمانی ایزوفرم‌های VEGF گروه b، هدف از این مطالعه بررسی تولید VEGF111b به عنوان یک ایزوفرم مهارکننده رگ‌زایی در سلول‌های HEK293 از طریق real time-PCR برای استفاده در مطالعات تحقیقاتی و هم‌چنین نخستین گام برای تولید این ایزوفرم جدید در ایران بوده است.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی بوده است

تهیه سلول و وکتور

در این مطالعه از وکتور بیانی pBUD.CE4.1 استفاده شد که قبلاً قطعه ژنی VEGF111b تحت پروموتور EF-1 $\alpha$  توسط تیم حاضر در دانشگاه اصفهان در آن کلون شده بود. سلول‌های انسانی HEK293 به خاطر رشد سریع و قابلیت تولید سطح بالای پرتئین‌های نو ترکیب و هم‌چنین سازگاری با سیستم بیانی وکتور pBUD.CE4.1 برای این مطالعه انتخاب شد و از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت سلول‌ها از محیط High Glucose، GlutaMAX (Gibco) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین (P/S) ساخت فرمنتاز استفاده شد.

گردید. در این کیت برای ساخت cDNA از روش پرایمرهای رندوم هگزامر استفاده می شود. ساخت cDNA کامل از تمام rRNA، tRNA و mRNA انجام گردید.

#### انجام گرادیانت دمائی RT-PCR

برای تست کردن پرایمرهای Real time PCR و تعیین دمای مناسب اتصال پرایمرها در مرحله اول روی cDNA ساخته شده یک واکنش RT-PCR به صورت گرادیانت دمائی گذاشته شد. در این مرحله دو جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر قطعه VEGF111b و ژن کنترل GAPDH روی cDNA ساخته شده از سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از آنزیم تک پلیمراز طبق مقادیر ذکر شده در جدول شماره ۱ تهیه شد. در این PCR برای تعیین بهترین دمای اتصال پرایمرها یک گرادیانت دمایی از ۵۷ درجه تا ۶۲ درجه شامل دماهای ۵۷، ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱/۱ و ۶۲/۳ روی پرایمرهای مورد نظر اعمال شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Real Time PCR

| پرایمر                      | والی                            | طول محصول | دمای اتصال <sup>TM</sup> |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------|--------------------------|
| F1 پرایمر رفت<br>Vegf111b   | 5'- AACATCACCATGCAGATCATGCG-3'  | ۱۱۲ bp    | ۶۱۴                      |
| R1 پرایمر برگشت<br>Vegf111b | 5'-TCAGTCCTTCGGGGTCAGCCT-3'     |           | ۶۲۷                      |
| F2 پرایمر رفت<br>GAPDH      | 5'- CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'  | ۴۹۵ bp    | ۵۶۷                      |
| R2 پرایمر برگشت<br>GAPDH    | 5'- AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' |           | ۵۷/۹                     |

#### واکنش Real-Time PCR

برای انجام این مطالعه ۲ جفت پرایمر با استفاده از نرم افزار Oligo 7 و Beacon designer 7.5 طراحی شد: جفت اول (F1 & R1) مربوط به ژن هدف VEGF111b و جفت دوم (F2 & R2) مربوط به ژن کنترل GAPDH. پرایمر R1 طوری طراحی شد که در مرز بین اگزون 4 و اگزون 8b قرار گیرد و بنابراین به

انتقال (transfection) وکتور نو ترکیب pBUD.VEGF111b به داخل سلول های HEK293

برای بیان ژن VEGF111b در سیستم یوکاریوتی وکتور نو ترکیب pBUD.VEGF111b با استفاده از کیت لیپوفکتامین (Invitrogen, Cat N:15338-100) به داخل سلول های HEK293 ترنسفکت شد. برای این منظور ابتدا در حدود  $5 \times 10^3$  سلول در هر پلیت کشت داده شد و پلیت حاوی سلول برای رسیدن به رشد معادل ۵۰ تا ۸۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس به ازای هر خانه از پلیت ۱۰۰ μl محیط فاقد سرم و ۵۰۰ ng از DNA پلاسمیدی با هم مخلوط و ۱ μl از بافر PLUS<sup>TM</sup> Reagent به آن اضافه گشت. به مخلوط فوق ۳۰ μl از Lipofectamine<sup>®</sup> LTX اضافه و ۱۰۰ μl از مخلوط نهایی به هر خانه از پلیت اضافه گشت. نهایتاً پلیت در انکوباتور دارای دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شد.

#### استخراج RNA سلولی و ساخت cDNA

RNA تام سلولی (Total RNA) از سلول‌های ترنسفکت شده ۴۸ ساعت بعد از انتقال وکتور و سلول‌های کنترل ترنسفکت نشده با استفاده از کیت استخراج RNA کیزول (ساخت کمپانی کیزاژن) استخراج شد و برای حذف بقایای DNA ژنومی نمونه با آنزیم DNaseI تیمار شد. در مرحله بعد به منظور حذف کامل آنزیم DNaseI از کیت RNeasy (QIAGEN) استفاده شد. بررسی کیفیت RNA استخراج شده از لحاظ کیفی با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و غلظت و خلوص RNA توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر سنجیده شد. ساخت cDNA روی ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده و با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (fermentase) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام

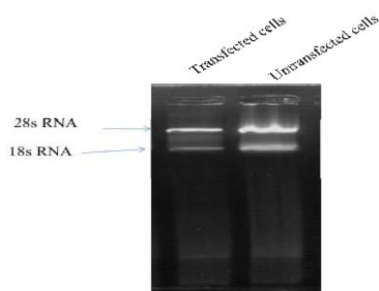
محاسبه میزان بیان پروتئین VEGF111b

برای بررسی میزان بیان فاکتور نوترکیب VEGF111b و ژن کنترل GAPDH در رده سلولی HEK293 ترنسفکت شده با وکتور نوترکیب و سلول‌های کنترل HEK293 ترنسفکت نشده، از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. در این روش میزان بیان ژن VEGF و ژن کنترل در سلول‌های ترنسفکت شده نسبت به بیان این دو ژن در سلول‌های کنترل ترنسفکت نشده سنجیده می‌شود (۱۶).

## یافته‌ها

میزان و کیفیت RNA استخراج شده

۴۸ ساعت بعد از ترنسفکشن میزان RNA استخراج شده از سلول‌های ترنسفکت شده برابر ۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر و جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر این نمونه ۱/۸۳ بود و میزان RNA استخراج شده از سلول‌های ترنسفکت نشده به عنوان کنترل برابر ۲۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر این نمونه ۱/۶۸ بود. برای بررسی بیش‌تر کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. در تصویر شماره ۱ نتایج الکتروفورز نشان داده شده است. مشاهده دو بانده 18s و 28s روی ژل نشان‌گر کیفیت RNA استخراج شده است.



تصویر شماره ۱: نتایج استخراج RNA از سلول‌های HEK293 ترنسفکت شده با وکتور نوترکیب pBud.VEGF111b. باند بالای 28s RNA، باند پایینی 18s RNA

## گرادیانت دمائی RT-PCR

قبل از انجام Real Time-PCR برای بررسی کیفیت پرایمرهای طراحی شده و تعیین بهترین دمای اتصال

صورت اختصاصی قادر به تشخیص ایزوفرم VEGF111b از بین باقی ایزوفرم‌ها باشد (جدول شماره ۱).

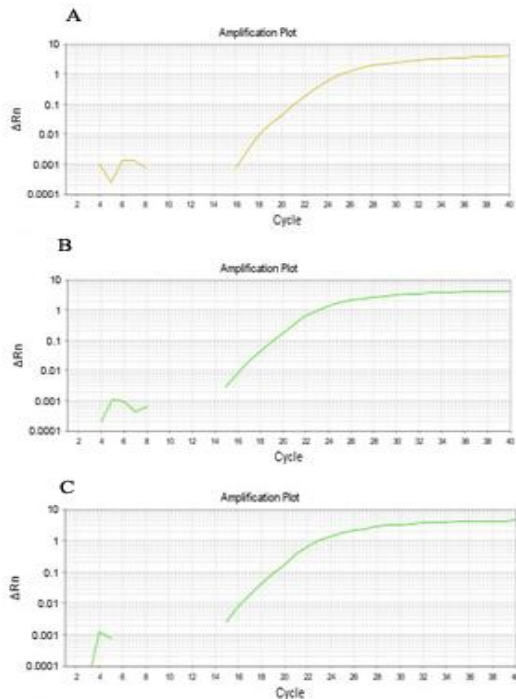
برای انجام واکنش Real-Time PCR از کیت سایبرگیرین (Biorad) و دستگاه Applied Biosystem (USA) استفاده شد. برای این منظور چهار استوک جداگانه (دو استوک برای نمونه مورد مطالعه و دو استوک برای نمونه کنترل) طبق مقادیر ذکر شده در جدول شماره ۲ ساخته شد که به یکی پرایمرهای برگشت ژن VEGF111b و به دیگری پرایمرهای رفت و برگشت ژن GAPDH اضافه شد و برای هر کدام از نمونه‌های کنترل و نمونه مورد مطالعه واکنش کلی با غلظت‌های ذکر شده در جدول شماره ۳ و به صورت زیر انجام شد: سیکل اول یک بار ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه برای دناتوراسیون اولیه، سیکل‌های بعدی هر کدام ۳۰ بار به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه برای دناتوراسیون ثانویه به همراه ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه جهت اتصال پرایمر و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه جهت فعالیت آنزیم. پس از انجام واکنش Real Time PCR داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار Step one Software مدل ۲/۲ آنالیز شد.

جدول شماره ۲: مواد مورد استفاده در واکنش RT-PCR به همراه غلظت و حجم مصرفی

| نوع ماده          | غلظت          | حجم مورد استفاده |
|-------------------|---------------|------------------|
| پایر PCR          | ۱۰ X          | ۵ μl             |
| MgCl <sub>2</sub> | ۵۰ mM         | ۳ μl             |
| dNTP              | ۱۰ mM         | ۱ μl             |
| پرایمر F2         | ۱۰ pM         | ۱ μl             |
| پرایمر R2         | ۱۰ pM         | ۱ μl             |
| آنزیم پلیمرز      | ۵ u/μl        | ۰/۷ μl           |
| cDNA              | ۱۲۰-۱۶۰ ng/μl | ۱ μl             |
| H <sub>2</sub> O  | ...           | Up to 25 μl      |

جدول شماره ۳: مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام Real Time PCR.

| نوع ماده                                 | غلظت        | حجم مورد استفاده |
|--|-------------|------------------|
| Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X | ۱ x         | ۱۷/۵ μl          |
| پرایمر F1                                | ۰/۴ pmol/μl | ۱ μl             |
| پرایمر R1                                | ۰/۴ pmol/μl | ۱ μl             |
| Template cDNA                            | ۸-۱۲ ng/μl  | ۲ μl             |
| ddH <sub>2</sub> O                       | ....        | Up to 25 μl      |



تصویر شماره ۳: منحنی تکثیر Real time PCR ژن VEGF111b در سلولهای HEK293. (A) منحنی تکثیر VEGF111b در سلولهای ترنسفکت شده، (B) منحنی تکثیر GAPDH در سلولهای ترنسفکت شده، (C) منحنی تکثیر GAPDH در سلولهای ترنسفکت نشده

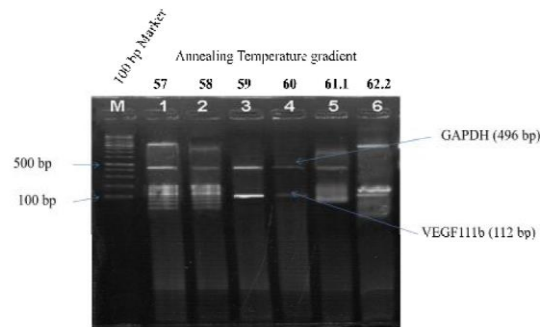
جدول شماره ۴: میزان Ct در رده سلولی HEK293 ترنسفکت شده با پلاسمید نو ترکیب pBud-VEGF111b

| نوع نمونه                            | $\Delta C_t$ |
|--------------------------------------|--------------|
| سلول HEK293 ترنسفکت شده (VEGF-111b)  | ۲۳/۱۷        |
| سلول HEK293 ترنسفکت شده (GAPDH)      | ۲۱/۱۱        |
| سلول HEK293 ترنسفکت نشده (GAPDH)     | ۲۱/۰۹        |
| سلول HEK293 ترنسفکت نشده (VEGF-111b) | ۰            |

## بحث

VEGF-A نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط با رگ زایی برعهده دارد. در اندامها و بافت‌های بزرگسالان، VEGF در سطح پایه و برای محافظت از سلولهای اندوتلیال در برابر آپوپتوز تولید می‌شود. این فاکتور رگ‌زایی بقاء زیستی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلولهای اندوتلیال را تحریک می‌کند، VEGF در آنژیوژنز تومورها به صورت یک فاکتور کلیدی عمل نموده و رشد رگ‌های جدید از رگ‌های

پرایمرها یک گرادیانت دمایی از ۵۷ درجه تا ۶۲ درجه شامل دماهای ۵۷، ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱/۱ و ۶۲/۳ روی پرایمرهای مورد نظر و cDNA ساخته شده انجام شد. بهترین حالت باند برای دمای اتصال برای دو جفت پرایمر ۵۹ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: نتایج RT-PCR ژن VEGF111b و GAPDH در گرادیانت دمایی با استفاده از cDNA ساخته شده از وکتور نو ترکیب. M مارکر 1Kb، لاین های ۱ تا ۶: محصولات PCR در دماهای ۵۷، ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱/۱ و ۶۲/۳.

## Real Time- PCR

دمای اتصال پرایمرها در واکنش Real Time PCR نهایی با توجه به گرادیانت دمایی انجام شده دمای ۵۹ درجه در نظر گرفته شد. پس از انجام Real Time PCR، منحنی تکثیر cDNA ژن VEGF در سلولهای HEK293 ترنسفکت شده و GAPDH در نمونه سلولهای HEK293 ترنسفکت شده و ترنسفکت نشده رسم شد و Ct هر کدام تعیین گردید. Ct مربوط به cDNA ژن VEGF در سلولهای ترنسفکت شده نزدیک به Ct مربوط به ژن کنترل GAPDH است که این نشان‌گر این مطلب است که بیان ژن نو ترکیب VEGF111b در سلولهای نو ترکیب نزدیک بیان ژن کنترل GAPDH است و تعداد کپی ژن VEGF در نمونه سلولهای HEK293 ترنسفکت شده با پلاسمید نو ترکیب pBud-VEGF111b، نزدیک به تعداد کپی رونوشت ژن کنترل GAPDH است ولی در سلولهای ترانسفرم نشده بیانی از VEGF111b مشاهده نمی‌شود (جدول شماره ۴).

قبلی را تحریک می‌کند. به این ترتیب با ایجاد رگ‌های خونی جدید مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز سلول‌های تومور فراهم می‌گردد و در نتیجه شرایط رشد بیش‌تر و متاستاز تومورها فراهم می‌شود (۱۸،۱۷). با توجه به عملکرد ویژه VEGF افزایش بیان این فاکتور رشد در بسیاری از تومورهای انسانی گزارش شده است و ارتباط آن با تکثیر سلول‌های توموری و متاستاز تومورها ثابت شده است (۸). بررسی‌های مولکولی نشان می‌دهد که عملکرد جایگاه پیرایش دور در ژن VEGFA باعث تولید ایزوفرم‌های VEGFxxxب در سلول‌ها می‌گردد که حامل اگزون 8b و دارای خاصیت ضد رگ‌زایی هستند (۱۹). تحقیقات جدید نشان می‌دهد که ایزوفرم‌های گروه b به عنوان داروی ضدسرطان قابل استفاده هستند. در این مطالعه ما برای اولین بار در ایران موفق به تولید VEGF111b به عنوان یک ایزوفرم مهارکننده رگ‌زایی در سلول‌های HEK293 شدیم. طبق یافته‌های این مطالعه میزان بیان VEGF111b کلون شده در وکتور بیانی pBUD.CE4.1 در ۴۸ ساعت بعد از ترنسفکشن برابر با ۲۳/۱۷ بود که این میزان بسیار نزدیک به میزان بیان ژن کنترل GAPDH در نمونه سلول‌های HEK293 ترنسفکت شده (برابر ۲۱/۱۱) بود و این یافته‌ها نشان گر بیان موفق و بالای فاکتور نو ترکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 است. در تحقیقات قبلی روی خانواده ایزوفرم‌های VEGF-xxxب، ایزوفرم VEGF165b به عنوان اولین واریانت با خاصیت ضد رگ‌زایی معرفی شده بود (۲۰). با بررسی این ایزوفرم مشخص شد مناطق اتصال به گیرنده در VEGFها در اگزون ۳، ۴ و اگزون 8a قرار دارد و بنابراین در ایزوفرم‌های گروه b قرارگیری اگزون 8b به جای 8a مانع اتصال این ایزوفرم‌ها به گیرنده می‌شود و این ایزوفرم‌ها به صورت مهارکننده رقابتی برای ایزوفرم‌های گروه A عمل می‌کنند و از این طریق باعث مهار رگ‌زایی می‌شوند (۲۲،۲۱). در تحقیقات بعدی روی VEGFها ایزوفرم‌های 145b، 121b و 189b به ترتیب شناسائی و معرفی شدند (۲۴،۲۳). سلول‌های

HEK293 سلول‌های انسانی با منشاء بافت اپیتلیال هستند که دارای پتانسیل بالایی برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب هستند و پروتئین‌های تولید شده با این رده سلولی دارای فولدینگ و ساختار ثانویه مشابه پروتئین‌های وحشی سلولی هستند (۲۵). در این مطالعه برای تولید VEGF111b از رده سلولی HEK293 استفاده شد.

در مطالعات هم راستا با مطالعه حاضر افخمی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ موفق به کلونینگ vefg165b در وکتور pYD7 و تولید این ایزوفرم در سلول‌های HEK293 شدند که بیش‌ترین بیان در روز سوم بعد از ترنسفکشن مشاهده شد و اثر ضد رگ‌زایی ایزوفرم 165b نیز روی سلول‌های مزانشیال تأیید شد (۲۶). در مطالعه ای دیگر Zheng و همکارانش موفق به کلون کردن vefg111b در وکتور pcDNA3.1 و بیان آن در سلول‌های SKOV3 شدند و نشان دادند که این پپتید دارای فعالیت ضد رگ‌زایی است و می‌تواند در درمان سرطان کلون مورد استفاده قرار گیرد (۲۷). طبق یافته‌های مطالعه حاضر سلول HEK293 کاندید مناسبی برای تولید VEGF111b است. هم‌چنین از نتایج Real Time PCR می‌توان نتیجه گرفت که پروموتور EF-1 $\alpha$  موجود در وکتور pBud.CE4.1 به خوبی با سیستم بیانی سلول HEK293 سازگاری دارد به طوری که میزان بیان ژن VEGF پس از ترنسفکشن نمودن در رده سلولی HEK293 با پلاسمید نو ترکیب pBud-VEGF111 به طور چشم‌گیری افزایش یافته است. با توجه به تولید موفق این پروتئین و خاصیت ضد رگ‌زایی و مقاومت آن به هضم پروتئولیتیکی در مطالعات آینده می‌توان از این پروتئین برای تحقیقات روی مهار رشد تومورها و جلوگیری از رگ‌زایی استفاده کرد.

## سپاسگزاری

در این قسمت از بخش ژنتیک دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم آوردن تجهیزات و موارد لازم برای این مطالعه تشکر می‌شود.

## References

- Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumors: an overview. *Eur J Intern Med* 2009; 20(7): 663-671.
- Dreys J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *E J C Supplement* 2008; 6(6): 7-13.
- Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(4): 409-420.
- Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 2000; 24(1): 75-78.
- Raab S, Plate KH. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and nervous system. *Acta. Neuropathol* .2007; 113(6): 607-626.
- Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2005; 109(3): 227-241.
- Emamgholipour S, Bandehpour M, Shabani P, Maghen L, Yaghmaee B, Kazemi B. Mutagenesis in se-quence encoding of human factor VII for gene therapy of hemophilia, *DARU* 2009; 117(4): 294-298.
- Murata N, Takashima Y, Toyoshima K, Yamamoto M, Okada H. Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice. *J Controlled Release* 2008; 126(3): 246-254.
- Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2001; 6(19): 1005-1024.
- Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D, et al. Transcriptional Regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. *PLoS ONE* 2010; 5(3): 3-9.
- Pagès G, Pouysségur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3): 564-573.
- Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF<sub>xxx</sub>b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci* 2006; 110(5): 575-585.
- Pritchard-Jones RO, Dunn DBA, Qiu Y, Varey AHR, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF<sub>xxx</sub>b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007; 97(2): 223-230.
- Kazemi M, Carrer A, Moimas S, Zandonà L, Bussani R, Casagrande B, et al. VEGF121 and VEGF165 differentially promote vessel maturation and tumor growth in mice and humans. *Cancer Gene Therapy* 2016; 23(5): 1-8.
- Li X, Gu F, Niu Ch, Wang Y, Liu Z, Li Na, et al. VEGF111b, a C-terminal splice variant of VEGF-A and induced by mitomycin C, inhibits ovarian cancer growth. *J Transl Med* 2015; 13(1): 164.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- Biselli-Chicote PM, Oliveira AR, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Goloni-Bertollo, VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer, *J. Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(3): 363-370.



18. Woolard J1, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al, VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogen. *Cancer Res* 2004; 64(21): 22-35.
19. Konopatskaya O1, Churchill AJ, Harper SJ, Bates DO, Gardiner TA. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis* 2006; 12: 626-632.
20. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(14): 4123-4131.
21. Kawamura H1, Li X, Goishi K, van Meeteren LA, Jakobsson L, Cébe-Suarez S Cebe-Suarez, et al. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* 2008; 112(9): 3638-3649.
22. Giacca M. Non-redundant functions of the protein isoforms arising from alternative splicing of the VEGF-A pre-mRNA. *Transcription* 2010; 1(3): 149-153.
23. Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ, Wheatley ER, Stewart L, Mather S, et al. VEGF(121)b, a new member of the VEGF(XXX)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* 2009; 101(7): 1183-1193.
24. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx b, are downregulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond.)* 2006; 110(5): 575-585.
25. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51(3): 187-200.
26. Afkhami F, Durocher Y, Prakash S. Investigation of Antiangiogenic Tumor Therapy Potential of Microencapsulated HEK293 VEGF165b Producing Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 7-10.
27. Gu F1, Li X, Kong J, Pan B, Sun M, Zheng L, et al. VEGF111b, a new member of VEGFxxx b isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 18-24.