ORIGINAL ARTICLE

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

Morteza Sadeghi[1],
Zohreh Hojati[2]

[1] Assistant Professor, Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۲۸-۲۰)

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

مرتضی صادقی[۱]
زهره حجتی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: فاکتورهای رشد اندوتلیالی تیپ b با فعالیت ضد رگ‌زایی و مهار رشد تومورها به عنوان داروهای جدید ضدسرطان مورد توجه هستند. در این مطالعه هدف بررسی میزان بیان vegf111b در سلول‌های انسانی HEK293 بوده است.

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

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

استنتاج: بیان مناسب پروتئین نوترکیب vegf111b در سلول‌های HEK293 نخستین گام برای تولید و تحقیقات بیش‌تر 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

رگ‌زایی به فرآیند شکل‌گیری عروق خونی جدید از عروق قدیمی اطلاق می‌گردد. این فرآیند شامل تمایز سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های پیش‌ساز مزودرمی محل می‌شود(۱). مهم‌ترین عملکردهای رگ‌زایی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند شکل‌گیری و تکامل جنین، درمان زخم‌ها و سیکل‌های بازسازی در بدن افراد بالغ است(۲). فرآیند رگ‌زایی به فعل و انفعالات وسیع میان سلول‌ها و مولکول‌های مختلف وابسته بوده و توسط پپتیدها و فاکتورهای رشد متعددی کنترل می‌شود. به منظور جوانه‌زدن عروق خونی جدید، آبشاری از وقایع زیر در سلول به وقوع می‌پیوندد که به‌طور خلاصه عبارتند از تجزیه غشاء پایه عروقی، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به فضای بین بافتی و به سمت فاکتورهای القاکننده رگ‌زایی، تکثیر سلول‌های اندوتلیال، شکل‌گیری لامینا

مولف مسئول: مرتضی صادقی- تهران: میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..، بخش ژنتیک E-mail: ms.sadeghi@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

و غشاء پایه جدید برای ساخت مویرگ خونی جدید(۴،۳). فاکتورهای مولکولی اصلی تحریک‌کننده رگ‌زایی عبارتند از فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGF) و فاکتورهای رشد تغییری آلفا و بتا(۶،۵). VEGF یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی رگ‌زایی فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی است(۷). علاوه بر رگ‌زایی VEGF به عنوان یک میتوژن و فاکتور بقاء برای سلول‌های اندوتلیال عمل می‌کند و در افزایش نفوذپذیری عروق و هم‌چنین مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی مغز استخوان دخیل است. از آن‌جایی‌که 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 رگ زایی 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 متناوب در mRNA اولیه ژن VEGF-A، باعث تولید دو نوع متفاوت از ایزوفرم‌های VEGF-A با عنوان VEGF-xxx و VEGF-xxxb 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 VEGFxxxb حامل اگزون 8b می‌شود(۱۲،۱۱).

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).

کاظمی 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 رگ‌زائی 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 روش ها

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-1α توسط تیم حاضر در دانشگاه اصفهان در آن کلون شده بود. سلول‌های انسانی HEK293 به خاطر رشد سریع و قابلیت تولید سطح بالای پرتئین‌های نوترکیب 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 GlutaMAX، High Glucose (Gibco) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (P/S) ساخت فرمنتاز استفاده شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

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

برای بیان ژن VEGF111b در سیستم یوکاریوتی وکتور نوترکیب pBUD.VEGF111b با استفاده از کیت لیپوفکتامین (Inviotrogen, Cat N:15338-100) به داخل سلول‌های HEK293 ترنسفکت شد. برای این منظور ابتدا در حدود $۵/۳\times۱۰^{۳}$ سلول در هر پلیت کشت داده شد و پلیت حاوی سلول برای رسیدن به رشد معادل ۵۰ تا ۸۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس به ازای هر خانه از پلیت ۱۰۰µl محیط فاقد سرم و ۵۰۰ ng از DNA پلاسمیدی با هم مخلوط و ۱µl از بافر PLUS™ Reagent به آن اضافه گشت. به مخلوط فوق ۳۰ µl از Lipofectamine® LTX اضافه و ۱۰۰µl از مخلوط نهایی به هر خانه از پلیت اضافه گشت. نهایتاً پلیت در انکوباتور دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 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 کیازول (ساخت کمپانی کیاژن) 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 گردید. در این کیت برای ساخت cDNA از روش پرایمرهای رندوم هگزامر استفاده می‌شود. ساخت cDNA کامل از تمام RNAها از قبیل tRNA، rRNA 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 نوترکیب 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 ™
F1 پرایمر رفت	5´- AACATCACCATGCAGATCATGCG-3´	۱۱۲ bp	۶۱۴
Vegf111b R1 پرایمر برگشت	5´-TCAGTCCTTGCGGGTCAGGCT-3´		۶۲/۷
Vegf111b F2 پرایمر رفت	5´- CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3´	۴۹۵ bp	۵۶/۷
GAPDH R2 پرایمر برگشت	5´- AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3´		۵۷/۹

واکنش Real-Time PCR

برای انجام این مطالعه ۲ جفت پرایمر با استفاده از نرم افزار Oligo 7 و 7.5 Beacon designer 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

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

برای انجام واکنش Real-Time PCR از کیت سایبرگرین (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 رفت و 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 غلظت های 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 هرکدام 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
بافر PCR	۱۰ X	۵ µl
MgCl2	۵۰ mM	۳ µl
dNTP	۱۰ mM	۱ µl
پرایمر F2	۱۰ pM	۱ µl
پرایمرR2	۱۰ pM	۱ µl
آنزیم پلیمراز	۵ u/µl	۰/۷ µl
cDNA	۱۲۰–۱۶۰ ng/µl	۱ µl
H2O	...	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	۱۲/۵ 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
ddH2O	....	Up to 25 µl

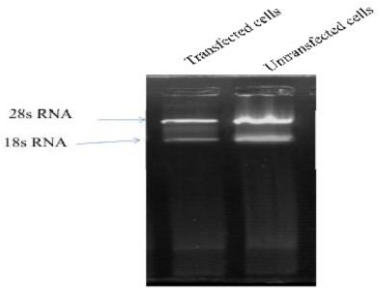
محاسبه میزان بیان پروتئین VEGF111b

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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ استفاده شد. در این روش میزان بیان ژن VEGF و ژن کنترل در سلول های ترنسفکت شده نسبت به بیان این دو ژن در سلول‌های کنترل ترنسفکت نشده سنجیده می‌شود(۱۶).

یافته ها

میزان و کیفیت RNA استخراج شده

۴۸ساعت 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 باند 18s و 28s روی ژل نشان گر کیفیت RNA استخراج شده است.



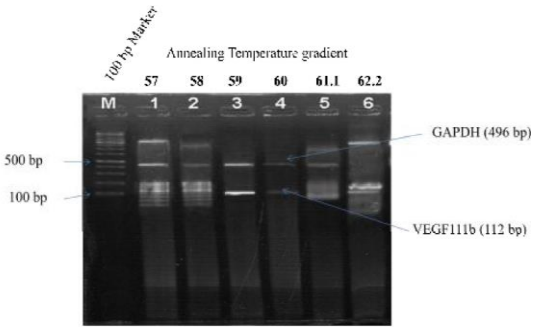
تصویر شماره ۱: نتایج استخراج RNA از سلول‌های HEK293 ترنسفکت شده با وکتور نوترکیب pBud.VEGF111b. باند بالائی 28s RNA، باند پائینی 18s RNA

گرادیانت دمائی RT-PCR

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

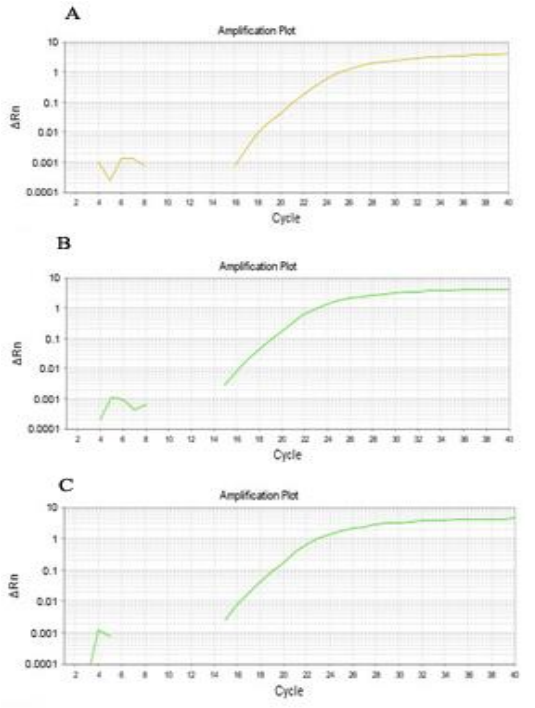
پرایمرها یک گرادیانت دمایی از ۵۷ درجه تا ۶۲ درجه شـــامل دماهـــای ۵۷، ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱/۱ و ۶۲/۳ روی پرایمرهـای مـورد نظـر و cDNA سـاخته شـده انجـام شـد. بهترین حالت باند برای دمای اتصال برای دو جفـت پرایمـر ۵۹ درجه سانتی گراد مشاهده شد (تصویر شماره ۲).



تصویر شـماره ۲ : نتـایج RT-PCR ژن VEGF111b و GAPDH در گرادیانت دمائی با اسـتفاده از cDNA سـاخته شـده از وکتـور نوترکیـب. 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 اتصـال پرایمرهـا در واکـنش Real Time PCR نهایی باتوجه به گرادیانت دمـائی انجـام شـده دمـای ۵۹ درجه در نظر گرفته شـد. پـس از انجـام Real Time PCR، منحنی تکثیر cDNA ژن VEGF در سـلول‌هـای HEK293 ترنسفکت شده و GAPDH در نمونه سلول‌های HEK293 ترنسفکت شده و ترنسـفکت نشـده رسـم شـد و Ct هـر کدام تعیین گردید. Ct مربوط به cDNA ژن VEGF در سلول‌های ترنسفکت شده نزدیک بـه Ct مربـوط بـه ژن کنترل GAPDH است که این نشان‌گر این مطلب است کـه بیان ژن نوترکیب VEGF111b در سلول‌های نوترکیـب نزدیک بیان ژن کنترل GAPDH است وتعداد کپـی ژن VEGF در نمونه سلول‌های HEK293 ترنسـفکت شـده بـا پلاسـمید نوترکیـب pBud-VEGF111، نزدیـک بـه تعداد کپی رونوشت ژن کنترل GAPDH است ولـی در سلول‌های ترانسفرم نشده بیانی از VEGF111b مشـاهده نمی‌شود (جدول شماره ۴).



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

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

نوع نمونه	ΔC_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 پاتولوژیـک مـرتبط بـا رگ زایـی برعهـده دارد. در اندام‌ها و بافت‌های بزرگسالان، VEGF در سطح پایـه و برای محافظت از سلول‌های انـدوتلیال در برابـر آپوپتـوز تولید می‌شود. این فاکتور رگ‌زایی بقاء زیستی، تکثیـر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال را تحریـک مـی‌کنـد، VEGF در آنژیوژنز تومورهـا بـه صـورت یـک فـاکتور کلیدی عمل نموده و رشد رگ‌های جدید از رگ‌هـای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

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 VEGFxxxb در سلول‌ها می‌گردد که حامل اگزون 8b و دارای خاصیت ضد رگ زایی 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 نوترکیب VEGF111b در سلول‌های HEK293 است. در تحقیقات قبلی روی خانواده ایزوفرم‌های VEGF-xxxb، 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 بالائی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هستند و پروتئین‌های تولید شده با این رده سلولی داری 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 vegf165b در وکتور pYD7 و تولید این ایزوفرم در سلول های HEK293 شدند که بیش‌ترین بیان در روز سوم بعد از ترنسفکشن مشاهده شد و اثر ضد رگ‌زایی ایزوفرم 165b نیز روی سلول‌های مزانشیال تائید شد(۲۶). در مطالعه ای دیگر Zheng و همکارانش موفق به کلون کردن vegf111b در وکتور pcDNA3.1 و بیان آن در سلول‌های SKOV3 شدند و نشان دادند که این پپتید دارای فعالیت ضد رگ زایی 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 پروموتر EF-1α موجود در وکتور pBud.CE4.1 به خوبی با سیستم بیانی سلول HEK293 سازگاری دارد به طوری که میزان بیان ژن VEGF پس از ترنسفکت نمودن در رده سلولی HEK293 با پلاسمید نوترکیب pBud-VEGF111 به طور چشم‌گیری افزایش یافته است. با توجه به تولید موفق این پروتئین و خاصیت ضد رگ زایی و مقاومت آن به هضم پروتئولیتیکی در مطالعات آینده می‌توان از این پروتئین برای تحقیقات روی مهار رشد تومورها و جلوگیری از رگ‌زائی استفاده کرد.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

References

1. 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.
2. Drevs J. VEGF and angiogenesis: imlications for breast cancer therapy. E J C Supplement 2008; 6(6): 7-13.
3. 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.
4. Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. Semin Perinatol 2000; 24(1): 75-78.
5. 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.
6. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under phisiological and pathological conditions. Clin Sci 2005; 109(3): 227-241.
7. 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; l17(4): 294-298.
8. 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.
9. Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. Drug Discov Today 2001; 6(19): 1005-1024.
10. 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.
11. 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.
12. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxxb, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. Clin Sci 2006; 110(5): 575-585.
13. Pritchard-Jones RO, Dunn DBA, Qiu Y, Varey AHR, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of $VEGF_{xxx}b$, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. Br J Cancer 2007; 97(2): 223-230.
14. Kazemi M, Carrer A, Moimas S, Zandonà L, Bussani R, Casagranda 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.
15. L i 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.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22 (-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-408.
17. 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

18. Woolard J1, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al, VEGF165b, aninhibitory 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, VEGFxxxb, 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, PrakashS. 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 VEGFxxxb isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun 2013; 441(1): 18-24.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]