

طراحی و ساخت سازه ژنی نو ترکیب بیان کننده ژن حفاظت سلولی "متالوتیونین یک" و افزایش بیان موقت آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان

علی اصغر کیانی^۱، راحله حلبیان^۲، مهریار حبیبی رودکنار^۳، مهشید محمدی پور^۴، علی شیخیان^۵، معصومه کاشی^۵

۱- استادیار، گروه هماتولوژی و انتقال خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲- استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزش و پژوهش در طب انتقال خون، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۵- کارشناس آزمایشگاه، امور آزمایشگاه‌ها، دانشکده پیراپزشکی و بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۵ / زمستان ۹۲ / مسلسل ۵۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۱۲/۹/۱۰، پذیرش مقاله: ۹۱۲/۱۱/۱۹

*** مقدمه:** دست‌ورزی ژنتیکی یک راهبرد مؤثر برای حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های محیطی و بالا بردن توانمندی آنان در استفاده‌های درمانی است. به منظور جلوگیری از عوارض ناخواسته‌ای همچون ایجاد بدخیمی‌ها، دست‌کاری ژنتیکی و افزایش بیان ژن‌های حاصل از آن می‌بایست به صورت موقت باشد. هدف از انجام این پژوهش، کلونینگ و افزایش بیان ژن محافظ سلولی "متالوتیونین یک" (MT1) انسانی به صورت موقت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) با استفاده از سیستم بیانی پلاسمیدی و استفاده از وکتور pcDNA 3.1 بود. این افزایش بیان به منظور افزایش مقاومت سلول‌های مزانشیمی نسبت به آسیب‌های محیطی و ... است.

*** مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان انسان جداسازی و توسط روش فلوسایتومتری تأیید شدند. توالی کامل cDNA ژن MT1 جداسازی شد و برای وارد شدن در وکتور پلاسمیدی pcDNA 3.1 مورد استفاده قرار گرفت. سازه ژنی نو ترکیب ایجاد شده، به روش لیپوفکشن وارد MSCs گردید. بیان MT1 توسط RT-PCR و لکه‌گذاری وسترن پایش شد.

*** یافته‌ها:** ژن MT1 انسانی نو ترکیب با موفقیت در وکتور pcDNA کلون گردید و درست قرار گرفتن ژن در قالب صحیح درون وکتور به وسیله تعیین توالی DNA تأیید شد. افزایش بیان MT1 در MSCs به وسیله روش‌های RT-PCR و لکه‌گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت. این نتایج نشان دهنده بیان موقت MT1 در MSCs بود.

*** بحث و نتیجه‌گیری:** ساخت سازه نو ترکیب MT1-pcDNA3.1 و ورود موفق آن به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند به عنوان یکی از راهبردهای محافظت سلول‌های پیوندی از مرگ سلولی پیشنهاد گردد و ممکن است بتواند راه کاری جدید در راستای ارتقاء کارآمدی سلول درمانی بعد از پیوند را فراهم آورد.

*** واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، "متالوتیونین یک"، pcDNA 3.1.

آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی و انتقال خون.

پست الکترونیک: aliasgharkianii@gmail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از جمله مهم‌ترین سلول‌های تشکیل دهنده استرومای مغز استخوان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلف سلولی همانند سلول‌های استخوانی، چربی، غضروف، سلول‌های عضلانی و ... تمایز یابند (۱،۲). این سلول‌ها نقشی حیاتی در ایجاد مکان‌های لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی خون‌ساز دارند و وجودشان برای رشد و تکثیر آنان ضروری است (۳). این ویژگی‌های منحصر به فرد MSCs آنان را به سلول‌هایی مناسب برای اهدافی چون ژن-درمانی و ترمیم بافتی تبدیل نموده است (۴).

از جمله روش‌های نو در درمان بیماری‌هایی چون انواع سرطان و بیماری‌های ژنتیکی می‌توان به سلول-درمانی و ژن-درمانی (بر پایه استفاده از سلول‌های بنیادی) اشاره نمود. ویژگی‌هایی چون جداسازی و تکثیر آسان در آزمایشگاه و قابلیت تعدیل سیستم ایمنی و نیز نقش حمایتی در خون‌سازی می‌توانند MSCs را به عنوان یک منبع سلولی ایده‌آل در این زمینه معرفی نمایند (۵،۶).

آسیب‌های فراوان در روند جداسازی و کشت سلولی موجب کاهش قابل توجه میزان بقا و عملکرد MSCs می‌گردد و این امر مانعی بزرگ در استفاده‌های درمانی این سلول‌ها به حساب می‌آید. از این روی، استفاده آنها در بالین نیازمند دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های دارای عملکرد مطلوب است (۷). از طرف دیگر انتظار می‌رود که محیط بدن افراد گیرنده سلول‌های بنیادی به دلیل طی نمودن فرآیندهای درمانی، شرایط را برای بقای مناسب سلول‌های بنیادی تزریق شده سخت‌تر کنند که این خود عاملی دیگر در کاهش بقا سلول‌های بنیادی متعاقب پیوند است.

انتظار می‌رود که افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی کاندید پیوند، بتواند ماندگاری آنان را در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند افزایش داده و درصد موفقیت پیوند را بالا ببرد و بنابراین، گامی بزرگ در عرصه استفاده‌های درمانی این سلول‌ها و از جمله پیوند مغز استخوان برداشته شود.

یکی از روش‌های پرکاربرد در افزایش ماندگاری و نیز مقاومت سلول‌های بنیادی، دست‌ورزی ژنتیکی آن‌ها با عوامل حفاظت کننده سلولی است (۸،۹). البته باید توجه داشت که افزایش بیان ژن‌ها می‌بایست موقت باشد، زیرا افزایش بیان پایدار ممکن است زمینه‌ساز ایجاد خطراتی چون ایجاد بدخیمی‌ها گردد. از جمله ژن‌های حفاظت کننده مفیدی که می‌توان در بالابردن مقاومت سلول‌های بنیادی از آن استفاده نمود، ژن "متالوتیونین یک" است (۱۰). متالوتیونین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های داخل سلولی غنی از سیستمین هستند که قابلیت اتصال به فلزات از جمله روی مس و سلیوم، کادمیوم، جیوه، آرسنیک، نقره و ... را دارند و در دفاع سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد، مسمومیت با فلزات، تنش‌ها و نیز سم‌زدایی فلزات سنگین مؤثرند (۱۱-۱۴). "متالوتیونین یک" نوعی پروتئین سیتوزولی است اما به هنگام تکثیر یا تمایز می‌تواند وارد هسته شده و تعدادی از عامل‌های نسخه‌برداری را فعال نماید (۱۴،۱۵). افزایش غلظت درون سلولی پروتئین MT1 موجب حفاظت سلول‌ها علیه آسیب DNA، تنش‌های اکسایشی و آپوپتوز می‌گردد (۱۵). همچنین مشخص شده است که پروتئین MT1 بلافاصله پس از التهاب و یا تنش‌های اکسایشی در درون سلول افزایش می‌یابد در واقع MT1 نوعی پروتئین القا شونده توسط تنش است (۱۶) که این نکته مهمی در اثبات نقش ارزشمند پروتئین مذکور در واکنش به عوامل آسیب‌رسان است. متالوتیونین همچنین برای بیان ژن مربوط به آنزیم گاما

تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به منظور تأیید هویت سلول‌های چسبنده به عنوان سلول‌های مزانشیمی، پس از رسیدن به همشاری مناسب (هشتاد درصد)، مرفولوژی این سلول‌ها و وجود شاخص‌های ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD105، CD73 و CD166 و عدم وجود مارکرهای سلول‌های خون‌ساز (همانند CD14، CD34 و CD45) در سطح آنان با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور با استفاده از آنزیم تریپسین سلول‌های چسبنده جدا شدند و با یکی از آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با Phycoerythrin (PE) یا Isothiocyanate (FITC) و اختصاصی علیه مارکرهای فوق انکوبه شدند. لوله‌ها به مدت سی دقیقه در تاریکی و در دمای 4°C قرار داده شدند. پس از این مدت، میزان پانصد میکرو لیتر PBS به نمونه‌ها اضافه و شستشو داده شدند. سپس به منظور تثبیت سلول‌ها، پنجاه میکرولیتر از محلول پارافمالدئید یک درصد به آن‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری Becton-Dickinson (USA) آنالیز شدند.

جداسازی و کلونینگ ژن MT1

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ژن MT1 را به طور محدود بیان می‌نمایند. این سلول‌ها کشت داده شده و RNA آن‌ها بر اساس دستورالعمل کیت High Pure RNA Isolation Kit, (Roche Germany) جداسازی و cDNA این سلول‌ها بر اساس پروتکل کیت cDNA synthesis (Bioneer, Korea) ساخته شد. با استفاده از پرایمرهایی که محل برش آنزیم‌های محدودالایر BamH I و Xho I در آنان طراحی شده بود و با استفاده از آنزیم Platinum® Taq DNA Polymerase High

گلوتامیل سیستئین سنتتاز ضروری است. این آنزیم نادر نقشی اساسی در سنتز گلوکاتیون دارد. گلوکاتیون مهم‌ترین عامل حفاظتی درون سلولی علیه تنش‌های مختلف از جمله تنش‌های اکسایشی است (۱۷-۱۹).

خصوصیات محافظتی پروتئین متالوتیونین ما را بر آن داشت تا با استفاده از وکتور pcDNA 3.1 (Invitrogen, USA) زمینه افزایش بیان موقت ژن MT1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی را فراهم نماییم. در صورت موفقیت، می‌توان از سلول‌های دست‌ورزی شده که احتمالاً دارای مقاومت بیشتری هستند، زمینه‌های استفاده‌های درمانی بی‌شماری را به وجود آورد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان اهدا کنندگان سالم مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران با اخذ رضایت‌نامه کتبی جدا شدند. نمونه مغز استخوان بلافاصله در شرایط دمایی 2°C تا 8°C سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای توسط "فایکول هایپک" جداسازی شده و سپس در پلیت‌های کشت شش‌تایی در محیط کشت DMEM Low (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی FBS (Invitrogen, USA) کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط 37°C درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن، انکوباسیون شدند. با تعویض محیط، سلول‌های غیرچسبنده خارج گردیدند. محیط کشت با فاصله زمانی سه روز تعویض می‌شد و در عرض ۱۴ روز سلول‌های چسبنده به کف پلیت به میزان هشتاد درصد رسیدند.

cDNA Fidelity (Invitrogene, USA) توالی کامل
مربوط به نواحی کد کننده ژن MT1 از سلول‌های بنیادی
مزانشیمی توسط روش RT-PCR جداسازی و تکثیر گردید.
توالی پرایمرهای طراحی شده به این شرح بود:

MT1-Forward primer: 5'-

ATAGGATCCACCATGGACCCCAACTGCTC
C-3'

MT1-Reverse primer: 5'-

TACTCGAGTCAGGCACAGCAGCTGCACTT
C-3'

شرایط دمایی و تعداد سیکل‌ها شامل سه مرحله و به
این شرح بود: مرحله اول تقلیب: 95°C به مدت چهار دقیقه
و یک سیکل، مرحله دوم که ۳۳ سیکل بود شامل سه بخش
دمایی تقلیب 95°C به مدت سی ثانیه، آنیلینگ 60°C به
مدت بیست ثانیه و توسعه یا (Extension) در دمای 72°C
به مدت بیست ثانیه بود. مرحله سوم که مرحله Total
Extension به مدت زمان هفت دقیقه و در دمای 72°C و
یک سیکل صورت گرفت. طول قطعه ژنی تولید شده ۲۰۵
جفت باز بود.

پرایمرهای طراحی شده برای ژن بتا اکتین نیز به این
شرح بود:

Beta actin- Forward primer: 5'-

CGAGCACAGAGCCTCGCCTTT-3'

Beta actin-Reverse primer: 5'-

CTTGACATGCCGAGCCGT-3'

شرایط دمایی مشابه با ژن MT1 و طول قطعه تولید
شده ۱۱۴ جفت باز بود.

محصول PCR توسط کیت High pure PCR
production kit (Roche, Germany) تخلیص شد.
سپس به منظور فراهم آوردن شرایط مطلوب برای ورود ژن

MT1 به درون وکتور pcDNA3.1، محصول تخلیص شده
PCR و نیز وکتور pcDNA با آنزیم‌های محدودالایتر
Xho I و BamH I به مدت یک ساعت در دمای 37°C درجه
سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از تیمار آنزیمی هر دو محصول
دوباره تخلیص شده و عملکرد برش صحیح آنزیمی توسط
الکتروفورز در ژل آگارز مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت با
استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (Roche, Germany)
توالی کامل ناحیه کد کننده ژن MT1 در وکتور پلاسمیدی
pcDNA وارد گردید. بدین منظور از باکتری E. coli
DH5 alpha (سینا کلون، تهران) و محیط کشت LB به
همراه پادزیست آمپی‌سیلین (Merck, Germany) صد
میکرو گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. کلونی‌های باکتریایی
احتمالی حاوی ژن MT1 به طور تصادفی انتخاب و
پلاسمیدهای آنان تخلیص می‌شد. پلاسمیدهای سنگین‌تر که
احتمالاً حامل قطعه ژنی MT1 بودند، جدا شده و با استفاده
از پرایمرهای اختصاصی، حضور ژن MT1 در آنان مورد
بررسی قرار می‌گرفت. پس از تأیید حضور ژن با PCR،
پلاسمیدهای حاوی ژن MT1 برای تأیید نهایی و تعیین
توالی یا انجام توالی‌یابی DNA به کشور کره جنوبی ارسال
شدند.

ترانسفکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سازه ژنی نو ترکیب pcDNA-MT1

ترانسفکشن (تراآلایی) مرحله‌ای است که در آن
وکتورهای دارای ژن مورد نظر وارد سلول‌های میزبان می‌شوند.
در این پژوهش برای انجام تراآلایی و به منظور انتقال
وکتورهای pcDNA حاوی MT1 (pcDNA-MT1) به
درون MSCs از فناوری ایجاد ترکیبات با ساختار شبه
لیپوزومی و با استفاده از معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰
(Invitrogene, USA) به نسبت ۱:۱ (نسبت DNA به

(USA) و همچنین آنتی بادی ثانویه متصل به Anti- HRP (HIF-1 alpha, abcam, UK) آزمایش لکه گذاری و سترن انجام شد.

یافته‌ها

جداسازی موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تأیید مارکرهای اختصاصی آن‌ها توسط فلوسایتومتری

پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کشت در محیط اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از لحاظ مرفولوژی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و مشاهده شد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مرفولوژی شبیه به فیبروبلاست‌ها بوده و مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD73, CD105, CD166 و CD90 در سلول‌های مزانشیمی به ترتیب ۹۷/۵٪، ۹۷/۶٪، ۹۴٪، ۹۸/۴٪ است. در حالی که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD45 و CD34 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی را نشان ندادند (به ترتیب ۳/۴٪ و ۲/۶٪) (شکل ۱).

جداسازی موفق توالی کد کننده MT1 از سلول‌های بنیادی مزانشیمی طبیعی

برای جداسازی توالی کد کننده ژن MT1، پس از سنتز cDNA حاصل از RNA تام جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی طبیعی، عمل RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده انجام شد. محصول PCR الکتروفورز گردید که نتیجه آن جدا شدن باند 205 bp مربوط به MT1 بود که با طول قطعه ژن مورد نظر مطابقت داشت. ذکر این نکته لازم است که طول ژن کامل MT1 معادل 185bp است که با توجه به این که بیست باز نیز برای طراحی

لیپوفکتامین) بر اساس دستورالعمل کیت استفاده شد. به این صورت که یک میکروگرم pcDNA-MT1 با یک میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ مخلوط شده و به MSCs کشت داده شده در پلیت‌های شش تایی حامل یک میلی‌لیتر محیط DMEM اضافه شد. پس از دوازده ساعت محیط تعویض شده و محیط کشت تازه به همراه FBS اضافه می‌شد.

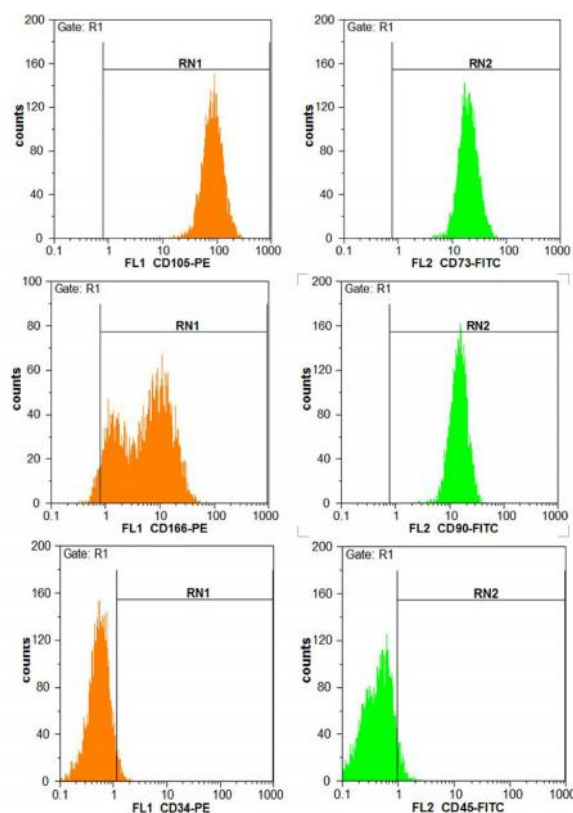
بررسی میزان بیان ژن MT1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترآلایی شده

پس از انجام ترآلایی، بیان ژن MT1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با MT1-pcDNA توسط فن RT-PCR بررسی گردید. محتوای RNA سلول‌های ترآلایی شده در روزهای ۱ تا ۱۴ پس از ترآلایی، استخراج شده و سپس cDNA این سلول‌ها ساخته شد و واکنش RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن MT1 صورت گرفت. از ژن بتا اکتین برای کنترل استفاده گردید. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی طبیعی نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

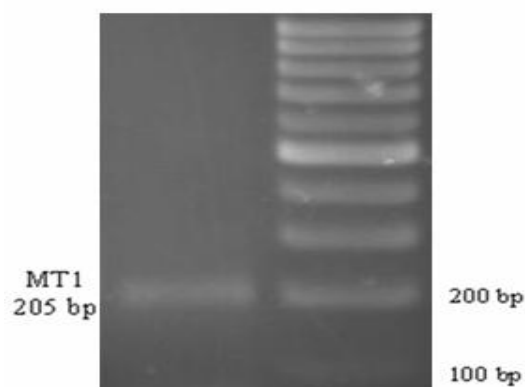
بررسی میزان بیان پروتئین MT1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترآلایی شده

به منظور تأیید بیان پروتئین MT1، کل محتوای پروتئینی سلول‌های مزانشیمی پس از آلودگی با pcDNA-MT1 در روزهای مختلف اول تا هشتم (و نیز سلول‌های مزانشیمی طبیعی به عنوان کنترل) توسط بافر (Roche, lysis M Germany) مطابق دستورالعمل کیت استخراج گردید و با استفاده از روش SDS-PAGE نمونه استخراجی پس از طی مراحل لازم بر روی ژل پلی‌آکرلامید الکتروفورز شد و از طریق روش لکه‌گذاری و سترن به غشای PVDF (Roche, Germany) انتقال یافت. در مرحله بعد به منظور تأیید وجود پروتئین MT1، با استفاده از آنتی بادی اختصاصی مربوط به پروتئین MT1 (Anti-MT1, Santa Cruz, MT1)

سطح پروتئین MT1 در سلول‌های مزانشیمی طبیعی بسیار کم بود و با رنگ آمیزی DAB قابل تشخیص نبود (شکل ۵).



شکل ۱. نمونه‌ای از بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از فن فلوسایتومتری. سلول‌ها از نظر مارکرهای CD90, CD73, CD105, و CD90 مثبت بودند اما فاقد مارکرهای خون‌ساز همچون CD34 و نیز مارکر CD45 بودند.



شکل ۲. قطعه کامل ژن MT1 جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی طبیعی به طول 205 bp.

پرایمرها به توالی‌های پرایمری اضافه شد، طول قطعه در نهایت به 205 bp رسید (شکل ۲).

قطعه کامل توالی کد کننده ژن MT1 در پلاسمیدهای pcDNA3.1 وارد گردید

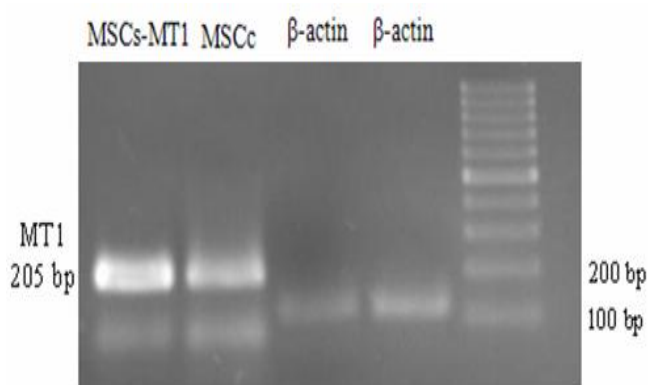
پس از مواجهه قطعه کامل توالی کد کننده ژن MT1 با pcDNA 3.1 و انجام Ligation، پلاسمیدهای حاوی این قطعه (MT1-pcDNA) از کلونی‌های باکتریایی تخلیص شدند (شکل ۳). پس از ساخت موفق سازه ژنی MT1-pcDNA و تخلیص آن، این محصول برای تأیید توالی به کشور کره جنوبی ارسال شد.

تأیید بیان موقت ژن MT1 پس از ترانژلاسیون سازه ژنی MSCs به درون pcDNA-MT1

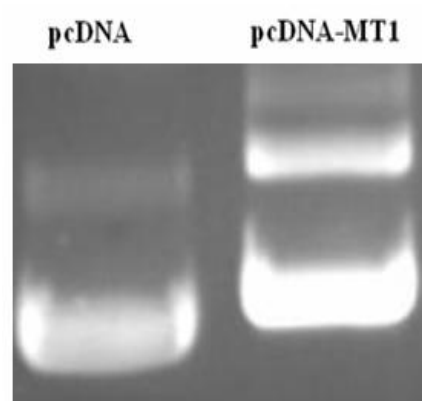
در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با پلاسمید محتوای MT1، آزمایش RT-PCR انجام گرفت که بر اساس آن بیشترین بیان MT1 مربوط به روز سوم بود (شکل ۴). از روز اول تا سوم بیان MT1 افزایش داشت اما از روز چهارم بیان رو به کاهش گذاشت به طوری که در روز پنجم بیان MT1 تقریباً مشابه سلول‌های مزانشیمی طبیعی شد. (شکل‌های ۴ الف و ۴ ب).

ارزیابی بیان موقت پروتئین MT1 با استفاده از آزمون لکه‌گذاری وسترن

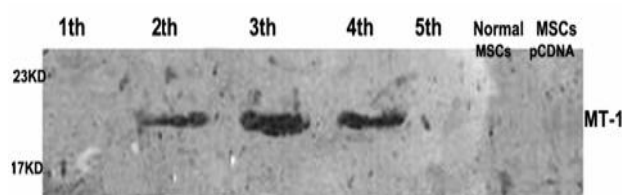
پس از انجام لکه‌گذاری وسترن بر روی سلول‌های مزانشیمی طبیعی و نیز سلول‌های آلوده با MT1-pcDNA و انجام رنگ‌آمیزی DAB، مقایسه باندهای به وجود آمده نشان دادند که بیشترین میزان بیان پروتئین MT1 مربوط به روز سوم پس از ترانژلاسیون بود و بیان پروتئین MT1 در روزهای چهارم به بعد کاهش یافت به طوری که در روز پنجم بیان این پروتئین قابل تشخیص نبود. لازم به ذکر است که



شکل ۴ ب. با مقایسه بیان MT1 در سلول‌های مزانشیمی طبیعی با سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با pcDNA-MT1 (که به صورت (MSCs-MT1) نمایش داده شده است) مشاهده می‌گردد که میزان بیان MT1 در سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با pcDNA-MT1 کاملاً بیشتر از MSCs طبیعی است.



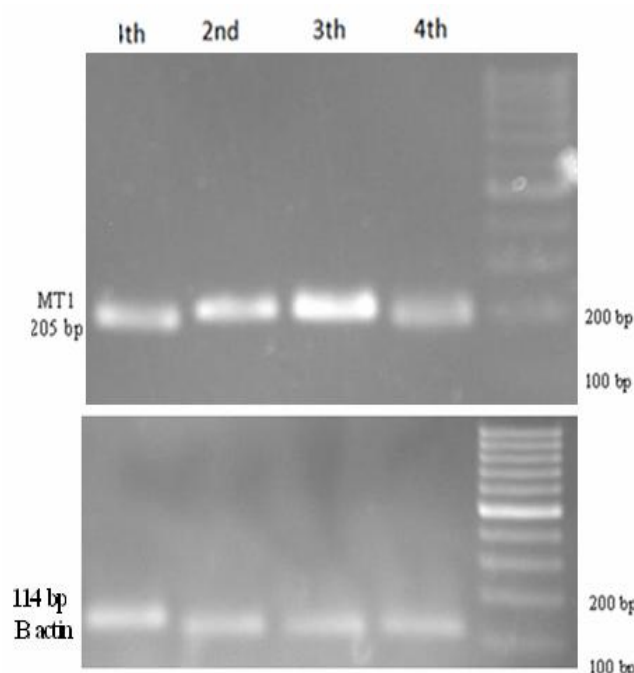
شکل ۳. مقایسه پلاسمیدهای حاوی MT1 با پلاسمید فاقد MT1. pcDNA-MT1 سنگین‌تر از pcDNA است. البته با توجه به این که طول قطعه MT1 بسیار سبک است (205kb)، تفاوت حرکت پلاسمید خالی و پلاسمید همراه MT1 چندان بارز نیست.



شکل ۵. بررسی بیان پروتئین MT-1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با pcDNA-MT1 با آزمایش لکه‌گذاری وسترن در روزهای مختلف پس از ترآلایی. مشاهده می‌گردد در روز اول بیان پروتئین متالوتیونین قابل تشخیص نیست، اما از روز دوم، باند پروتئینی قابل مشاهده است. سه روز پس از ترآلایی بیشترین میزان بیان پروتئین MT-1 مشاهده شد و بعد از آن، بیان رو به کاهش نهاد به گونه‌ای که در روز پنجم باند پروتئینی قابل تشخیص نبود.

بحث و نتیجه گیری

امروزه از پیوند سلول‌های بنیادی (سلول درمانی) به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان یا کمک به درمان بیماری‌های مختلفی استفاده می‌گردد. مهم‌ترین مسئله‌ای که کاربرد سلول-درمانی را با مشکل مواجه نموده است، مرگ اکثر سلول‌ها پس از پیوند است. بر این اساس تلاش‌های فراوانی برای افزایش "بقاء پس از پیوند" سلول‌های بنیادی انجام شده



شکل ۴ الف. ارزیابی نحوه بیان MT1 در MSCs پس از ترآلایی توسط RT-PCR. بیشترین بیان در روز سوم مشاهده شد و پس از آن بیان MT1 رو به کاهش گذاشت.

است (۱). از جمله ژن‌هایی که در توانمند نمودن سلول‌ها در برابر تنش‌ها نقش دارند و تاکنون از روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی از آن‌ها استفاده شده است، می‌توان به ژن‌های Bcl-2 (۲۰)، HO-1 (۲۱)، NRF-2 (۲۲) و HIF-1 alpha (۲۳) اشاره نمود. در این پژوهش نیز با دست‌ورزی MSCs افزایش بیان موقت MT1 در آن‌ها انتظار بر آن است که این دست‌ورزی موجبات افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و در نتیجه بهبود کیفیت استفاده‌های درمانی این سلول‌های دست‌ورزی شده را فراهم آورد.

در این مطالعه توسط روش‌های RT-PCR و لکه‌گذاری وسترن ثابت شد که افزایش بیان MT1 به صورت موقت بوده و از روز سوم پس از ترآلایی میزان بیان MT1 رو به کاهش می‌گذارد به طوری که از روز پنجم به بعد افزایش بیان مشاهده نمی‌شود و سلول‌ها به حالت طبیعی از نظر بیان متالوتیونین باز می‌گردند. عدم بیان موقت ژن، از مهم‌ترین نگرانی‌های است که در دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد. ژنی که افزایش بیان شده است، می‌بایست دارای بیانی موقت باشد، زیرا بیان پایدار می‌تواند نگرانی‌هایی مبتنی بر مضر بودن این دست‌ورزی را به همراه داشته باشد. افزایش بیان پایدار هر نوعی از ژن‌ها می‌تواند خطر ایجاد تومور را به همراه داشته باشد که MT1 نیز از این قضایه ممکن است مستثنا نباشد (۲۴، ۲۵).

در این مطالعه از وکتور پلاسمیدی pcDNA3.1 به منظور افزایش بیان MT1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. مطالعات نشان می‌دهد آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای پلاسمیدی تغییری در فنوتیپ آنان ایجاد ننموده و تأثیری مخرب بر میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز آنان ندارد (۲۶).

همان‌گونه که اشاره شد، متالوتیونین دارای اثرات فراوانی بر حیات سلول‌هاست. این پروتئین نقشی حیاتی در تنظیم فلز روی دارد. این فلز نیز در تنظیم خانواده‌ی مهم و وسیعی از عامل‌های نسخه‌برداری به نام "عوامل رونوشت‌برداری حاوی انگشت روی" نقش دارند (۲۷). از جمله این عامل‌های نسخه‌برداری می‌توان به خانواده GATA1-6 و NF-κB اشاره نمود که تأثیری زیادی بر تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز دارند (۲۸-۳۱). بنابراین، انتظار می‌رود که افزایش بیان MT1 بتواند تأثیر بسیار مثبتی بر بالا بردن مقاومت سلولی داشته باشد.

تاکنون مطالعه‌ای مشابه این پژوهش انجام نشده است و پژوهش‌های سایر محققین در حیطه‌هایی غیر از سلول‌های مزانشیمی بوده است. Chiaverini و همکاران در سال ۲۰۱۰ نقش حفاظتی متالوتیونین را در برابر تنش‌های آکسایشی در رده‌های سلولی فاقد متالوتیونین (MT-null cell lines) مورد تأیید قرار دادند (۳۲). محققان به نام Sato و همکاران در سال ۲۰۱۰ نقش متالوتیونین در برابر سمیت فلزات سنگین و نیز رادیکال‌های آزاد اکسیژن را بررسی و تأیید نمودند (۳۳). Pedersen و همکاران نیز MT1 را پروتئینی ضد تنش معرفی نمودند (۳۴). در نهایت می‌توان گفت که سیستم‌های انتقال ژنی کارآمد و با بیان بالا و موقت می‌توانند امکان دستیابی به اثرات درمانی قابل انتظار با تعداد سلول‌های پیوندی کمتر را فراهم نمایند. از سوی دیگر، دستیابی به سلول‌های مقاوم می‌تواند لزوم کشت‌های طولانی مدت را که موجب پیری و کاهش کیفیت و عملکرد سلولی می‌شوند، مرتفع سازد. بنابراین، بررسی افزایش مقاومت MSCs حاوی سازه ژنی pcDNA-MT1 و نیز کاربردهای عملی این دست‌ورزی در شرایط آزمایشگاه و نیز محیط بدن از جمله اهداف مطالعات بعدی خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان بابت پشتیبانی مالی و نیز از همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون تهران قدردانی می‌گردد.

References

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822.
2. Abdallah B, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene therapy*. 2008;15(2):109-116.
3. Alakel N, Jing D, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Experimental hematology*. 2009;37(4):504-513.
4. Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, et al. Human Mesenchymal Stromal Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a $\beta 1$ -Integrin-Dependent Mechanism. *Stem Cells*. 2006;25(3):798-806.
5. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxeavanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells*. 2006;24(1):74-85.
6. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*. 2003;34(6):565-571.
7. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007;25(10):2638-2647.
8. Jackson L, Jones D, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of postgraduate medicine*. 2007;53(2):121.
9. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8):1128-1135.
10. Nordberg M, Nordberg G. Toxicological aspects of metallothionein. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2000;46(2):451-463.
11. Habel N, Hamidouche Z, Girault I, Patiño-García A, Lecanda F, Marie PJ, Fromiguet O. Zinc chelation: a metallothionein 2A's mechanism of action involved in osteosarcoma cell death and chemotherapy resistance. *Cell Death Dis*. 2013 24(4): 874.
12. Juang HH, Chung LC, Sung HC, Feng TH, Lee YH, Chang PL, Tsui KH. Metallothionein 3: an androgen-upregulated gene enhances cell invasion and tumorigenesis of prostate carcinoma cells. *Prostate*. 2013;73(14):1495-1506.
13. Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settineri CE, Pitt BR, Lazo JS. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Molecular pharmacology*. 1997;52(2):195-201.
14. Park JD, Liu Y, Klaassen CD. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*. 2001;163(2):93-100.

15. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;238(3):215-220.
16. Kagi JH. Overview of metallothionein. *Methods in enzymology*. 1991;205:613-626.
17. Pearce LL, Gandley RE, Han W, Wasserloos K, Stitt M, Kanai AJ, et al. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(1):477-482.
18. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1999;39(1):267-294.
19. Nagamine T, Nakajima K. Significance of Metallothionein Expression in Liver Disease. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2013;14(4):420-426.
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):2118-2127.
21. Hamed-Asl P, Halabian R, Bahmani P, Mohammadipour M, Mohammadzadeh M, Roushandeh AM, et al. Adenovirus-mediated expression of the HO-1 protein within MSCs decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses. *Cell Stress and Chaperones*. 2012;17(2):181-190.
22. Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirzadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, et al. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress and Chaperones*. 2012;17(5):553-565.
23. Kiani AA, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. HIF-1 α Confers Resistance to Induced Stress in Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Archives of medical research*. 2013; 44(3):185-193.
24. Krizkova S, Fabrik I, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Kizek R. Metallothionein--a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislavské lekárske listy*. 2009;110(2):93.
25. Qu W, Pi J, Waalkes MP. Metallothionein blocks oxidative DNA damage in vitro. *Archives of toxicology*. 2013;87(2):311-321.
26. Kingsman JA, Mazarakis ND, Martin-rendon E, Azzouz M, Rohll J. Vector system. *EP Patent Appliation*. 2010; EP2180057.
27. Ota I, Li X-Y, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(48):20318-20323.
28. Majumder S, Roy S, Kaffenberger T, Wang B, Costinean S, Frankel W, et al. Loss of Metallothionein Predisposes Mice to Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis by Activating NF- κ B Target Genes. *Cancer research*. 2010;70(24):10265-10276.
29. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH, et al. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of

- breast cancer cells. FEBS letters. 2011;585(2):421-428.
30. Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: a miniassay. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. 2011;16(7):977-989.
 31. Mar GY, Ku PM, Chen LJ, Cheng KC, Li YX, Cheng JT. Increase in cardiac M 2-muscarinic receptor expression is regulated by GATA binding protein 4 (GATA-4) in streptozotocin-induced diabetic rats. International Journal of Cardiology. 2013; 167(2): 436-441.
 32. Chiaverini N, De Ley M .Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. Free radical research. 2010;44(6):605-613.
 33. Sato M, Kawakami T, Kondoh M, Takiguchi M, Kadota Y, Himeno S, et al. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. The FASEB Journal. 2010;24(7):2375-2384.
 34. Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. Progress in histochemistry and cytochemistry. 2009;44(1):29-64.