Original Article

Optimization and Comparison of the PolyFect Gene Delivery Method in Three Different Kinds of Mesenchymal Stem Cell Types

Mehdi Kadivar, Ph.D.*, Neda Memari, M.Sc., Pezhman Fard-Esfahani, Ph.D.

Biochemistry Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 13164, Biochemistry Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
Email: kadivar@pasteur.ac.ir

Received: 28/Dec/2009, Accepted: 24/May/2010

Abstract

Objective: The aim of this study was optimization of the PolyFect gene delivery method of pcDNA3.1 expression vector transfected with the mouse pdx-1 gene in three different kinds of mesenchymal stem cells and Hepa cells as well as comparison of transfection efficiency leading to expression of the mentioned gene in the cell types used.

Materials and Methods: Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, C57 mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells, human synovium derived mesenchymal stem cells and Hepa cells were used in this study. After culturing of the mentioned cells, mouse pdx-1 gene were transfected into them using the Qiagen PolyFect kit. 72 hours later, the cells were treated with anti-mouse Pdx-1 antibody and immunocytochemically analyzed using a fluorescent inverted microscope. Transfection conditions were optimized in each of these cells by changing different lipofection parameters such as DNA concentration, PolyFect reagent concentration and cell density.

Results: The results demonstrated that for transfection of these cells, the best concentrations of DNA and PolyFect reagent are 400 ng/μL and 6000 ng/μL respectively. For maximum transfection efficiency, the best cell density in 12-well plates was 10^5 cells in Hepa cells, 1.3×10^5 cells in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, 1.5×10^5 cells in human synovium-derived mesenchymal stem cells and 10^5 cells in C57 mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Under the mentioned optimized conditions, the maximum efficiency of transfection was determined to be 50% for Hepa cells, 40% for rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, 21% for human synovium-derived mesenchymal stem cells and 10% for C57 mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Conclusion: These findings implicate that the most important factor extremely influencing transfection efficiency in mesenchymal stem cells is the cell derivation origin. Results of this study can be used in basic and clinical studies dealing with gene therapy in mesenchymal stem cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Transfection, pdx-1 gene

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 191-198

بهینه‌سازی و مقایسه روش انتقال ژن با واسطه پلی فکت در سه نوع سلول بنیادی مزانشیمی مختلف

مهدی کدیور .Ph.D[1*]، ندا معماری .M.Sc، پژمان فرد اصفهانی .Ph.D

انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۴، انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی
پست الکترونیک: Email: kadivar@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۳

چکیده

* **هدف:** بهینه‌سازی و مقایسه روش انتقال سازه بیانی pcDNA 3.1 حاوی ژن pdx-1 موشی به کمک پلی‌فکت در سه نوع سلول بنیادی مزانشیمی مختلف ونیز رده سلول‌های Hepa

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت سینوویوم زانوی انسان و نیز رده سلول‌های Hepa به عنوان رده‌ای استاندارد استفاده شد. پس از کشت سلول‌های مذکور ژن pdx-1 با استفاده از کیت پلی‌فکت کیاژن، به سلول‌ها منتقل شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت از انتقال ژن، سلول‌ها توسط آنتی‌بادی ضد Pdx-1 و به کمک میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. در طی تست‌های مختلف با تغییر متغیرهای انتقال ژن هم‌چون تراکم سلولی، غلظت DNA و نیز غلظت پلی‌فکت در هر کدام از سلول‌ها، بهترین شرایط برای ترانسفکت شدن هر کدام از آنها تعیین شد.

* **یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که برای کلیه سلول‌های به کار رفته در این تحقیق، بهترین غلظت DNA و پلی‌فکت برای حصول بیشترین بازده انتقال ژن به ترتیب ۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و ۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر می‌باشد. بهترین تراکم سلولی برای این منظور در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای و در سلول‌های هپاتومای موشی 10^5 سلول، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت $1/3\times10^5$ سلول، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان $1/5\times10^5$ سلول و برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 10^5 سلول تعیین شد. در بهترین شرایط یاد شده بیشترین بازده انتقال ژن pdx-1 در سلول‌های هپاتومای موشی ۵۰ درصد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ۴۰ درصد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان ۲۱ درصد و در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 ۱۰ درصد به دست آمد.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد مهم‌ترین عاملی که بازده انتقال ژن را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر قرار می‌دهد، نوع سلول و یا به عبارتی منشأ جداسازی سلول می‌باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند راه‌گشای مطالعات علوم پایه‌ای و نیز کلینیکی در زمینه ژن درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، انتقال ژن، ژن pdx-1

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۹۸-۱۹۱

مقدمه

دیابت نوع ۱، یک بیماری التهابی مزمن است که با تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس همراه است (۱). در حال حاضر راه مقابله با این بیماری که در کودکان و جوانان مشاهده می‌شود تزریق مرتب و پی‌درپی انسولین می‌باشد که خود دارای مشکلاتی مثل لزوم اندازه‌گیری پی‌درپی قند خون می‌باشد (۲). برای درمان دایمی این بیماری در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی به کار رفته که یکی از آنها پیوند جزایر لانگرهانس طبق پروتکل ادمونتون (Edmonton) از فرد اهدا کننده به بیماراست (۳، ۴). اگرچه این روش در سال‌های گذشته به عنوان یک راه درمان مناسب مدنظر بوده است ولی این روش معایب خاص خود را داراست که از جمله می‌توان به رد پیوند، کمبود اهدا کننده، تهاجمی بودن این روش و پرهزینه بودن آن اشاره کرد (۵) . با توجه به پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها (۹-۶) و نیز به دلیل وجود معایب ذکر شده در روش ادمونتون، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان برای درمان این بیماری صورت گرفته است. در این رویکرد، درمان دیابت به کمک تمایز این سلول‌ها به سلول‌های سازنده انسولین مد نظر است (۴، ۵، ۱۰). در این راستا با توجه به لزوم پیوند آلوگرافت و در نتیجه امکان رد پیوند در مورد سلول‌های بنیادی جنینی، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ به دلیل امکان پیوند اتوگرافت که خطر رد ایمنی را برطرف می‌کند، بیشتر مورد توجه است (۴، ۱۱). به طور کلی جهت تمایز سلول‌های بنیادی دو راهکار اصلی وجود دارد. در روش اول تمایز به کمک به کارگیری مواد القا کننده که به محیط کشت سلول‌ها اضافه می‌شود القا می‌شود. در این روش با تغییر ریز محیط (Microen-vironment) اطراف سلول‌ها توسط مقادیر معینی از مواد القا کننده مشخص، سعی می‌گردد سلول‌ها به سمت خاصی متمایز گردند (۱۲). در روش دوم که به تمایز مستقیم (Direct Differentiation) معروف است با استفاده از دستکاری مستقیم ژنی، سلول‌های بنیادی در مسیر تمایزی خاصی قرار می‌گیرند. در چنین رویکردی، به طور معمول لازم است ژن‌هایی که در تکامل جنینی، نقش مهمی در تمایز سلول‌ها به سمتی خاص ایفا می‌کنند، به سلول‌های بنیادی وارد گردند (۱۳).

تا کنون روش‌های مختلفی برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های بنیادی به کار رفته است. از جمله این روش‌ها می‌توان به لیپوفکشن، الکتروپوریشن، میکرواینجکشن، انتقال هسته، نوکلئوفکشن، استفاده از وکتورهای ویروسی و روش‌های مبتنی بر به‌کارگیری سیستم همانندسازی نام برد که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود بوده است (۱۴). هر کدام از این روش‌ها در بازده انتقال، امکان‌پذیری، هزینه و زمان مورد نیاز، دایمی یا موقتی بودن بیان ژن و میزان سمیت با یکدیگر متفاوتند. اما متاسفانه به طور کلی بازده انتقال ژن در سلول‌های بنیادی و به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پایین است (۱۵). با توجه به اهمیت این مسأله در راستای تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های انسولین‌ساز، در تحقیق حاضر، از ژن pdx-1 برای بررسی انتقال ژن به انواعی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه سلول‌های لاین Hepa (به عنوان یک لاین استاندارد و کنترل) استفاده شد. اندازه این ژن حدود ۵/۷ کیلو باز می‌باشد و از دو اگزون و یک اینترون تشکیل شده است. طول اگزون یک ۵۱۷ باز و طول اگزون دو، ۷۷۰ باز است. محصول این ژن پلی‌پپتیدی با ۲۸۴ اسید آمینه است و در این پروتئین ناحیه‌ای وجود دارد که در واقع دُمین (Domin) اتصال به DNA می‌باشد و نقش آن تنظیم نسخه‌برداری در روندهای تمایزی می‌باشد. این ژن همچنین نقش مهمی در تکامل پانکراس، تمایز سلول‌های β پانکراس و حفظ این سلول‌ها در حالت تمایز ایفا می‌کند (۲۱-۱۶). در مطالعه حاضر با انتقال این ژن در سه رده مختلف سلول‌های بنیادی و نیز سلول‌های Hepa، این فرایند بهینه‌سازی شده و بازده انتقال و بیان ژن مذکور در سلول‌های یاد شده ارزیابی و مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سلول‌ها

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی است که در آن کلیه مسائل اخلاقی طبق مصوبه کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران رعایت شده است. در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش رت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت سینوویوم زانوی انسان - که قبل از توسط ما جداسازی و تعیین هویت گردیده بود - (۷) و نیز سلول‌های Hepa استفاده شد. سلول‌های مذکور در محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma, USA) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma, USA) در شرایط عادی کشت سلولی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2) درون فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. پس از آنکه سلول‌ها به تعداد کافی برای لیپوفکت کردن رسیدند، تریپسینه شده و پس از شمارش، به تعداد مورد نظر در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت داده شدند.

انتقال سازه ژنی pdx-1

در این تحقیق از سازه ژنی pcDNA3.1-pdx-1 - که از قبل توسط ما تهیه گردیده بود - استفاده شد (۲۲). در این سازه cDNA ژن pdx-1 موشی درون پلاسمید pcDNA3.1 کلون شده است. لازم به توضیح است که cDNA ی ژن pdx-1 موشی به صورت کلون شده در پلاسمید PZL1 (Invitrogen^R) و نیز پلاسمید pcDNA3.1(+) (Invitrogen R) از بانک ژن نوترکیب ایران تهیه شد. برای انتقال سازه ژنی ذکر شده به سلول‌ها از روش ارائه شده در کیت شرکت QIAGEN استفاده شد. در این روش ژن مورد نظر به کمک یک نوع دندریمر به نام پلی‌فکت به سلول‌ها وارد می‌گردد. یک روز بعد از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای، سازه ژنی حاوی ژن pdx-1 موشی با استفاده از کیت پلی‌فکت کیاژن و مطابق با دستورالعمل مورد اشاره در کیت مذکور به سلول‌ها ترانسفکت گردید. خلاصه روش کار بدین صورت است که ابتدا DNA ی غلیظ به کمک محیط DMEM فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به غلظت‌های مورد نظر رقیق گردید. سپس غلظت‌های مختلف از DNA با غلظت‌های مختلف از پلی‌فکت با هم مخلوط شده تا غلظت بهینه به دست آید (رجوع به بخش نتایج). مخلوط حاصل ۸ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا کمپلکس (DNA و پلی‌فکت) تشکیل شود. سپس λ ۲۵۰ محیط کامل (DMEM + ۱۰ درصد سرم + L- گلوتامین) به کمپلکس مذکور اضافه گردید. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با Phosphate Buffered Saline (PBS) شست‌وشو داده شد و محیط کامل به سلول‌ها افزوده شده و مخلوط کمپلکس و محیط کامل به سلول‌ها منتقل شد. پس از این مرحله پلیت‌های حاوی سلول‌ها در انکوباتور قرار گرفته و روزانه پایش می‌گردید. با توجه به اینکه در همه انواع سلول‌های به کار رفته، سلول‌های مرده از پلیت کشت سلولی کنده می‌شدند، برای سنجش درصد زنده بودن سلول‌ها (Viability) از شمارش سلول‌های چسبیده به ته پلیت کشت سلولی استفاده شده و نسبت سلول‌های چسبیده به ته پلیت به کل سلول‌ها به عنوان این درصد در نظر گرفته شد. ۳ روز بعد از انتقال ژن جهت ارزیابی بیان ژن pdx-1 در سلول‌های ترانسفکت شده، سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد Pdx-1 بررسی شدند.

بررسی بیان ژن pdx-1 در سلول‌های ترانسفکت شده

به این منظور از تست‌های اختصاصی ایمونوسیتوشیمی به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد Pdx-1 نشان‌دار با رنگ فلورسنت فیکواریترین (Anti-h/m Pdx-1 Phycoerythrin Conjugated, R&D) که بیان ژن مذکور را در سلول‌های تایید می‌کند، استفاده شد. روش کار بدین صورت است که ۳ روز بعد از انتقال ژن، محیط سلول‌ها خارج شده و سلول ها با PBS شست‌وشو شدند. سپس سلول‌ها یک بار با بافر SAP (Sigma, USA) که مخلوطی از ساپونین و NaN3 می‌باشد، شست‌وشو داده شدند و آنگاه پس از خارج کردن بافر SAP به طور مجدد بر روی سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بافر SAP جدید به همراه ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDX-1 ریخته شد. سپس پلیت حاوی سلول‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت و مجدد سلول‌ها با بافر SAP شست‌وشو داده شده و به آرامی بر روی آنها محیط کشت ریخته شد. بعد از انجام این مراحل، سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت معکوس نوع Zeiss (Filter Set= 15) تصویربرداری شدند.

محاسبه درصد زنده بودن سلول‌ها

برای سنجش زنده بودن سلول‌ها از شمارش سلول‌های چسبیده به ته پلیت کشت سلولی استفاده شده است. از آنجایی که در اثر ترانسفکشن، سلول‌های مرده در همه انواع سلول‌های به کار رفته ظرف مدت ۱۲-۸ ساعت از ته پتری دیش کنده می‌شوند، به راحتی می‌شود با شمارش سلول‌های چسبیده، میزان زنده بودن سلول‌ها را به دست آورد. در ضمن با توجه به اینکه سنجش بیان pdx-1، ۷۲ ساعت پس از

ترانسفکشن صورت می‌پذیرفت، تا آن موقع همه سلول‌های مرده کنده و حذف شده بودند.

محاسبه بازده ترانسفکت شدن

جهت محاسبه بازده ترانسفکت شدن در هر کدام از سلول‌های به کار رفته، بدین‌ترتیب عمل شد که برای هر سلول ۵ پلیت و برای هر پلیت ۵ زمینه تصادفی انتخاب گردید. سپس با شمارش سلول‌های رنگ شده و رنگ نشده در هر زمینه، نسبت سلول‌های رنگ گرفته به کل سلول‌ها به عنوان بازده در هر زمینه در نظر گرفته شده و آن گاه در مورد هر سلول میانگین ۲۵ زمینه انتخاب شده به دست می‌آمد که به عنوان بازده ترانسفکشن در آن سلول محاسبه می‌گردید (۲۳).

یافته ها

بهینه‌سازی انتقال ژن pdx-1

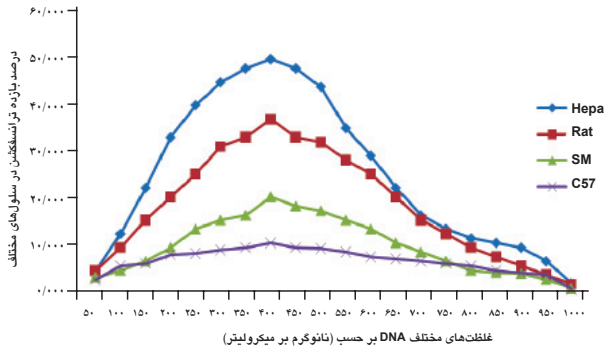
به منظور حصول بیشترین بازده انتقال و بیان ژن و نیز بهینه‌سازی شرایط ترانسفکت شدن ژن pdx-1 به سلول‌های به کار رفته در این پژوهش، غلظت‌های مختلف DNA، پلی‌فکت و همچنین تراکم‌های مختلف سلولی برای هر نوع سلول، استفاده شد. در هر آزمایش، حدود ۵ پلیت ۱۲ خانه‌ای برای هر نوع سلول به طور تصادفی انتخاب شد. بازده ترانسفکت شدن از شمارش تعداد سلول‌های ترانسفکت شده نسبت به کل سلول‌های به کار رفته برای انتقال ژن به دست آمد.

غلظت DNA

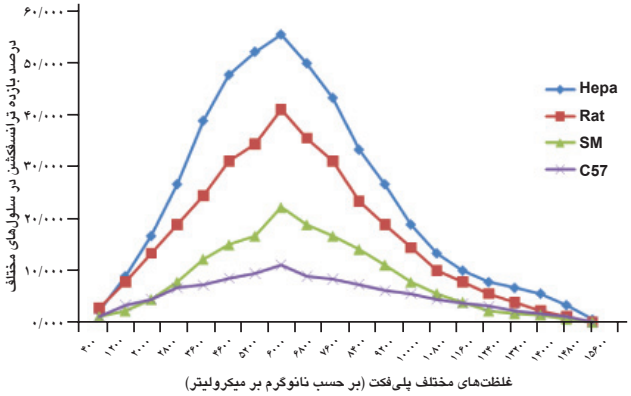
جهت بهینه‌سازی غلظت DNA، میزان پلی‌فکت و نیز تعداد سلول‌ها ثابت و به ترتیب برابر ۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و 10^5 سلول در نظر گرفته شد. همان طور که در نمودار ۱ مشخص است، بیشترین بازده ترانسفکت شدن در غلظت ۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA به دست آمد. در این شرایط بیشترین بازده ترانسفکت شدن برای سلول‌های هپاتومای موشی، ۵۰ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ۳۷ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان ۲۰ درصد و برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 ۱۰ درصد به دست آمد.

غلظت پلی‌فکت

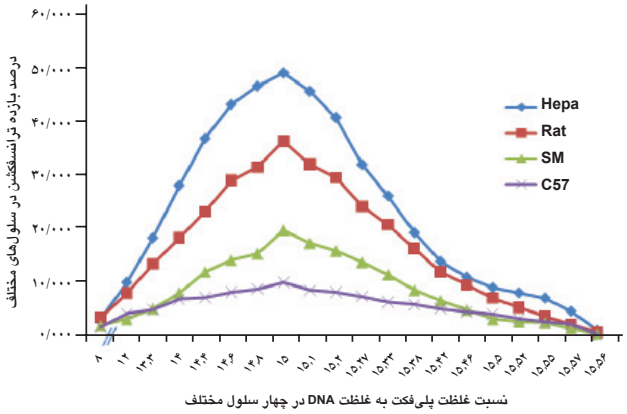
جهت بهینه‌سازی غلظت پلی فکت، میزان DNA و نیز تعداد سلول‌ها ثابت و به ترتیب برابر ۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و 10^5 سلول در نظر گرفته شد. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، بیشترین بازده ترانسفکت شدن در غلظت ۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر پلی‌فکت به دست آمد. در این شرایط بیشترین بازده ترانسفکت شدن برای سلول‌های هپاتومای موشی، ۵۰ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ۳۷ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان ۲۰ درصد و برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 ۱۰ درصد به دست آمد.



نمودار ۱: بازده ترانسفکت شدن در سلول‌های مختلف و غلظت‌های مختلف DNA با میزان پلی‌فکت (۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و تعداد سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول) ثابت.



نمودار ۲: بازده ترانسفکت شدن در سلول‌های مختلف و غلظت‌های مختلف پلی‌فکت با میزان DNA (۴۰۰ نانوگرم برمیکرولیتر) و تعداد سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول) ثابت.



نمودار ۳: درصد بازده ترانسفکت شدن در چهار سلول مختلف در نسبت‌های مختلف غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA با تعداد سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول) ثابت.

نسبت غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA

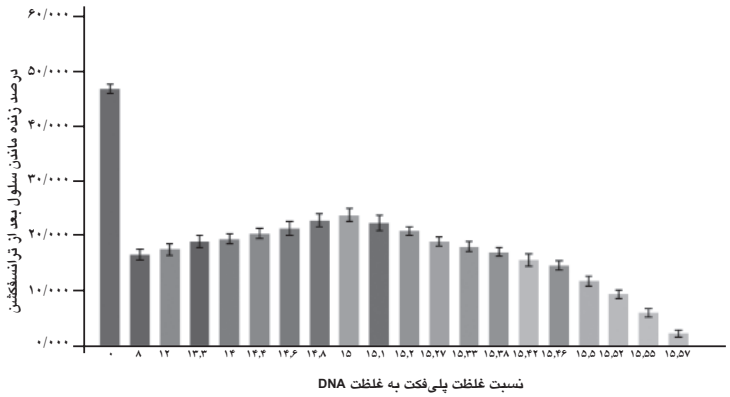
با توجه به تست‌های صورت گرفته در غلظت DNA و غلظت پلی‌فکت که در دو بخش بالا ذکر شد، بهترین نسبت از غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA که بیشترین درصد بازده ترانسفکت شدن را داشته باشد نسبت ۱۵ می‌باشد. همان گونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، زمانی که نسبت بین غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA برابر ۱۵ باشد، بازده انتقال ژن بیشترین مقدار است؛ یعنی برای سلول‌های هپاتومای موشی ۵۰ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ۳۷ درصد، برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان ۲۰ درصد و برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 ۱۰ درصد می‌باشد. در انحراف از این نسبت بین غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA به علت تغییر نسبت دو متغیر و تاثیر آن بر سلول‌ها، بازده انتقال و بیان ژن کم می‌شود.

درصد زنده بودن سلول‌ها بعد از ترانسفکت شدن

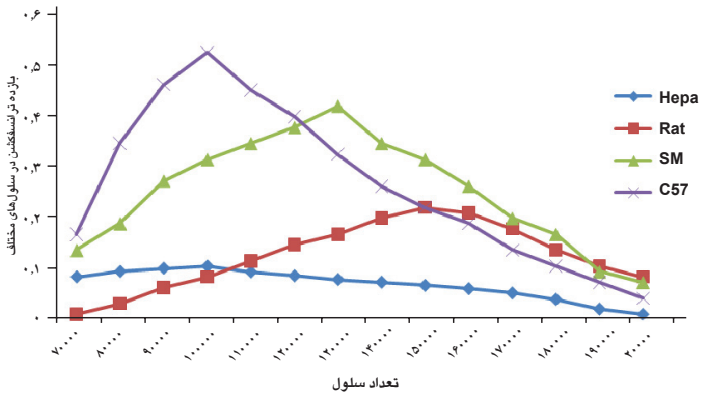
دو متغیر DNA و پلی‌فکت که برای ترانسفکت شدن مورد استفاده قرار می‌گیرد، خود دارای سمیت بوده و در بهترین نسبت نیز تا حدودی باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. میزان زنده بودن سلول‌ها در نسبت‌های مختلف دو متغیر مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، در بهترین نسبت دو متغیر پلی‌فکت و DNA (نسبت ۱۵)، درصد زنده بودن سلول‌ها حدود ۵۰ درصد می‌باشد. در این تست نیز تعداد سلول ها ثابت بوده و 10^5 سلول می‌باشد.

تراکم سلولی

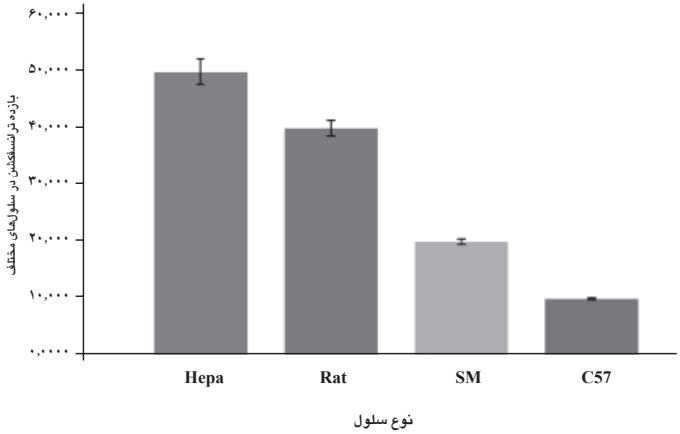
با مشخص شدن بهترین شدن نسبت DNA و پلی‌فکت، در مرحله بعد بازده ترانسفکت در تراکم‌های مختلف سلولی مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین بازده ترانسفکت شدن برای سلول‌های هپاتومای موشی در تراکم 10^5 سلول برابر ۵۰ درصد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت در تراکم سلولی $1/3\times10^5$ سلول برابر ۴۰ درصد، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان در تراکم سلولی $1/5\times10^5$ سلول برابر ۲۱ درصد، و در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 در تراکم سلولی 10^5 سلول حدود ۱۰ درصد حاصل شد. در نمودار ۶ سلول‌های مختلف از نظر بازده ترانسفکت شدن با یکدیگر مقایسه شده‌اند.



نمودار ۴: درصد زنده ماندن سلول بعد از ترانسفکت شدن با توجه به نسبت غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA با تعداد سلول ثابت (۱۰۰۰۰۰ سلول).



نمودار ۵: بازده ترانسفکت شدن در سلول‌های مختلف و در تراکم‌های مختلف سلولی با غلظت ثابت پلی‌فکت (۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و غلظت ثابت DNA (۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر).



نمودار ۶: بازده ترانسفکت شدن در سلول‌های مختلف در بهترین شرایط از نظر تعداد سلول، غلظت پلی‌فکت (۶۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و غلظت DNA (۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر).

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های گوناگونی مثل مغز استخوان، بافت چربی، سینوویوم و ماهیچه اسکلتی قابل جداسازی هستند. این سلول‌ها، سلول‌های چندتوانی می‌باشند که قابلیت تمایز، به شماری از بافت‌های همبندی از قبیل استخوان، چربی، غضروف و ماهیچه و نیز ظرفیت تمایز به انواعی از سلول‌های بافت‌های دیگر از جمله سلول‌های تولید کننده انسولین را دارا هستند (۱۰، ۱۲). دست‌کاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی، جهت انجام مطالعات پایه در بیولوژی تکوینی و نیز تحقیقات کاربردی در زمینه پزشکی ترمیمی از ضروریات است. هدف از انتقال ژن به سلول‌های بنیادی بر حسب مورد می‌تواند متفاوت باشد که از آن جمله می‌توان به القای مستقیم تمایز، ژن درمانی، اعطای ویژگی منحصر به فرد در آنها و نیز استفاده از آنها به عنوان وکتورهای حمل ژن نام برد.

تا کنون برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی از روش‌های مختلفی استفاده شده است که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود می‌باشد (۱۵). در این میان روش‌های غیرویروسی انتقال ژن با توجه به امنیت زیستی (Biosafety) بیشتر و نیز بیان موقت ترانس‌ژن (که برای برخی از اهداف انتقال ژن از ضروریات است) از اهمیت بالایی برخوردار است. متاسفانه مشکل موجود در مورد روش‌های غیرویروسی انتقال ژن، بازده کم این روش‌ها می‌باشد (۱۵، ۲۴). در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت صورت پذیرفته، نشان داده شده است که از میان لیپیدهای کاتیونی لیپوفکتامین، افکتین و fuGENE HD مورد اول یعنی لیپوفکتامین بیشترین بازده انتقال و بیان ژن را به میزان حدود ۲۰ درصد داشته است. همچنین در بین دندریمرهای فعال شده سوپرفکت و پلی‌فکت، بیشترین بازده انتقال و بیان ژن مربوط به پلی‌فکت با بازده حدود ۱۶ درصد بوده است (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان صورت پذیرفته، نشان داده شده است که لیپوفکتامین قادر است این سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد ترانسفکت نماید (۲۳). علت تفاوت بازده در این مطالعات علاوه بر نوع سلول‌ها می‌تواند شرایط متفاوت انتقال ژن در آنها باشد. با توجه به اهمیت مساله انتقال ژن در سلول‌های بنیادی (۱۴) و نیز اهمیت روش‌های غیرویروسی انتقال ژن و در عین حال بازده پایین این روش‌ها و نیز مطالعات بسیار کمی (۲۵) که در زمینه انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط پلی‌فکت صورت گرفته است، در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا با تغییر متغیرهای دخیل در این روش، بهترین شرایط را برای انتقال ژن pdx-1 توسط پلی‌فکت در سه نوع سلول بنیادی مزانشیمی مختلف بهینه کرده و نتایج را با سلول‌های Hepa مقایسه کنیم. ژن مورد استفاده در این مطالعه، یعنی ژن pdx-1 در سطح وسیعی

از سلول‌های بالغ β پانکراس بیان می‌شود و یک فاکتور رونویسی همودمین است که نقش بسیار مهمی به عنوان تنظیم کننده در تکامل سلول‌های اندوکرین پانکراس و نیز عملکرد سلول‌های بالغ β پانکراس دارد (۲۱-۱۶). هر چند علاوه بر این ژن، چندین ژن از جمله pax4 NuroD، و mafA در تمایز سلول‌های β پانکراس نقش دارند (۱۸، ۲۶، ۲۷)، ولی در این میان ژن pdx-1 نقش کلیدی‌تری دارد (۱۹). در این مطالعه با بهینه کردن سه پارامتر تراکم سلولی، غلظت DNA و غلظت پلی‌فکت در همه انواع سلول‌های به کار رفته موفق شدیم، بازده ترانسفکت شدن منجر به بیان ژن pdx-1 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت تا ۴۰ درصد افزایش دهیم که این بازده نسبت به مطالعه‌ای که از قبل توسط پلی‌فکت در این سلول‌ها صورت گرفته بود (۲۵) حدود ۲۴ درصد افزایش داشت. علت این افزایش بازده را می‌توان در عواملی هم‌چون مناسب‌تر بودن پارامترهای انتقال ژن و نیز تفاوت‌های زیر جمعیتی احتمالی در سلول‌های استفاده شده جست‌وجو کرد.

با دقت در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ می‌توان چنین نتیجه گرفت که در همه انواع سلول‌های به کار رفته، مهم‌ترین عاملی که در بازده انتقال و بیان ژن pdx-1 با واسطه روش پلی‌فکت تاثیر داشته است، نسبت‌های مناسب غلظت پلی‌فکت به غلظت DNA بوده است. همان طور که در نمودار ۴ مشخص شده است در بهترین شرایط، یعنی زمانی که نسبت میزان پلی‌فکت به DNA برابر ۱۵ باشد، میزان بازده انتقال ژن و نیز میزان زنده ماندن سلول‌ها حد اکثر و برابر ۵۰ درصد است. در نسبت‌های دیگر، میزان مرگ سلولی بیشتر است که علت این امر به طور دقیق مشخص نیست و برای روشن شدن آن به مطالعات تکمیلی نیاز است. ولی به نظر می‌رسد با افزایش غلظت پلی‌فکت این ماده حالتی سمی برای سلول دارد. همین امر در مورد DNA نیز صدق می‌کند که شاید به دلیل بالارفتن میزان اندوتوکسین‌ها در غلظت‌های بالای DNA باشد. با توجه به نمودار ۵ مشخص شده است که اثر تغییر تراکم سلولی بر بازده انتقال ژن با واسطه پلی‌فکت در در رده‌های مورد استفاده ناچیز است و در بهترین شرایط از نظر تراکم سلولی، این بازده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت حدود ۳ درصد و در سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان حدود ۱ درصد افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد که مهم‌ترین عامل، نوع سلول می‌باشد که به شدت بازده انتقال ژن با واسطه روش پلی‌فکت را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر قرار می‌دهد. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های فیزیولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از گونه‌ها و یا بافت‌های مختلف باشد. روشن است که کشف این تفاوت‌ها و چگونگی تاثیر آنها بر بازده انتقال ژن نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. از نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان جهت افزایش بازده انتقال با واسطه روش پلی‌فکت ژن‌های مختلف و به ویژه ژن pdx-1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور دستورزی ژنی و یا تمایز مستقیم این سلول‌ها به سلول‌های دیگر و به ویژه سلول‌های تولید کننده انسولین استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

به موجب طرح تحقیقاتی شماره ۳۹۶ ، این تحقیق در انستیتو پاستور ایران و در گروه بیوشیمی انجام شد. مولفان این تحقیق از همکاری‌های همه جانبه پرسنل محترم بخش بیوشیمی انستیتو پاستور نهایت تشکر را دارند.

References

1. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease. N Engl J Med. 1986; 314(21): 1360-1368.
2. Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. BMJ. 2001; 322(7277): 29-32.
3. George CM. Future trends in diabetes management. Nephrol Nurs J. 2009; 36(5): 477-483.
4. McCall MD, Toso C, Baetge EE, Shapiro AM. Are stem cells a cure for diabetes? Clin Sci (Lond). 2009; 118(2): 87-97.
5. O'Connell PJ, Hawthorne WJ, Holmes-Walker DJ, Nankivell BJ, Gunton JE, Patel AT, et al. Clinical islet transplantation in type 1 diabetes mellitus: results of Australia's first trial. Med J Aust. 2006; 184(5): 221-225.
6. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 340(2): 639-647.
7. Kadivar M, Darvish M, Salehi Moghadam M. Isolation, culture and characterization of human synovium-derived mesenchymal stem cells. Yakhteh. 2009; 11(2): 160-167.
8. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Soleimani M, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Isolation, culture and characterization of post natal human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. DARU. 2005; 13(4): 170-176.
9. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Iran Biomed J. 2006; 10(4): 175-184.
10. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, et al. Mesenchymal stem cells: stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. Diabetes Metab. 2009; 35(2): 85-93.
11. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. World J Gastroenterol. 2004; 10(20): 3016-3020.
12. Xie QP, Huang H, Xu B, Dong X, Gao SL, Zhang B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. Differentiation. 2009; 77(5): 483-491.
13. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004; 8(3): 301-316.
14. Phillips MI, Tang YL. Genetic modification of stem cells for transplantation. Adv Drug Deliv Rev. 2008; 60(2): 160-172.
15. Izadpanah R, Bunnell BA. Gene delivery to mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol. 2008; 449: 153-167.

16. Delisle JC, Martignat L, Dubreil L, Sai P, Bach JM, Louzier V, et al. Pdx-1 or Pdx-1-VP16 protein transduction induces beta-cell gene expression in liver-stem WB cells. BMC Res Notes. 2009; 2: 3.
17. Gerrish K, Gannon M, Shih D, Henderson E, Stoffel M, Wright CV, et al. Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. J Biol Chem. 2000; 275(5): 3485-3492.
18. Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Yamamoto K, Kato K, Shiraiwa T, et al. PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. Endocr J. 2008; 55(2): 235-252.
19. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. Diabetologia. 2004; 47(8): 1442-1451.
20. Li L, Li F, Qi H, Feng G, Yuan K, Deng H, et al. Coexpression of Pdx1 and betacellulin in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. Stem Cells Dev. 2008; 17(4): 815-823.
21. Liu T, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Xiong JX, Zhou J. PDX-1 expression and proliferation of duct epithelial cells after partial pancreatectomy in rats. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2007; 6(4): 424-429.
22. Kadivar M, Memari N, Parivar K, Fard-Esfahani P. Insulin-producing cells can be achieved in vitro by direct transfection of mouse pdx-1 into rat mesenchymal stem cells. Toxicol Lett. 2009; 189(Supplement 1): s61.
23. Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gülkan H, Böcker W. Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. J Gene Med. 2005; 7(6): 718-728.
24. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. AAPS J. 2005; 7(1): 61-77.
25. Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, Zeinali S. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. Cytotherapy. 2008; 10(8): 815-823.
26. Lin HT, Kao CL, Lee KH, Chang YL, Chiou SH, Tsai FT, et al. Enhancement of insulin-producing cell differentiation from embryonic stem cells using pax4-nucleofection method. World J Gastroenterol. 2007; 13(11): 1672-1679.
27. Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, Matsuhisa M. Combination of MafA, PDX-1 and NeuroD is a Useful Tool to Efficiently Induce Insulin-Producing Surrogate beta -Cells Curr Med Chem. 2009; 16: 3144-1451.