انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمال موشی: بررسی مقایسه‌ای دو روش ویروسی و غیر ویروسی

محمدشفیع مجددی[۱]، دکتر معصومه ابتکار[۲*]، دکتر مجید گل کار[۳*]، دکتر حسین خان احمد[٤]، دکتر کیهان آزادمنش[٥]

تاریخ دریافت: 1391/09/15، تاریخ پذیرش: 1391/12/17

چکیده

پیش زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمال به‌علت توانایی تمایز به رده‌های سلولی مختلف، گزینه مناسبی جهت سلول‌درمانی و انتقال ژن در بیماری‌ها می‌باشند. از اینرو انتخاب روشی مناسب و کارامد جهت انتقال ژن به این سلول‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. در این مطالعه، کارایی دو روش رایج انتقال ژن، ویروسی و غیرویروسی، در سلول‌های مزانشیمال موشی مقایسه شده است.

مواد و روش کار: سلول‌های بنیادی مزانشیمال، از مغز استخوان موش‌ها جدا، و از نظر شاخص‌های آنتی‌ژنی سطحی و توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی بررسی شدند. سپس میزان کارایی روش کلسیم فسفات و لیپیدهای کاتیونیک تجاری لیپوفکتامین و توربوفکت، به‌عنوان روش‌های غیرویروسی؛ و وکتور لنتی‌ویروسی، در انتقال پلاسمید پروتئین فلورسانس سبز (GFP) به این سلول‌ها مقایسه شد.

یافته‌ها: سلول‌های مزانشیمال مشتق از مغز استخوان توانستند به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یابند. آن‌ها واجد شاخص‌های آنتی‌ژنیCD24 ، CD29و CD44؛ و فاقد شاخص‌های آنتی‌ژنی سلول‌های خونساز یعنی CD11b و CD45 بر سطح خود بودند. روش‌های غیر ویروسی، در تحویل ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی کاملا ناکارامد بودند؛ طوری‌که روش کلسیم فسفات در همه موارد سبب مرگ سلول‌ها شد؛ و میزان کارایی دو ماده تجاری ترانسفکشن هم در انتقال پلاسمیدGFP ، زیر سه درصد بود. اما، وکتور لنتی‌ویروسی توانست بالای ۷۰ درصد، پلاسمید مذکور را به سلول‌های مزانشیمال منتقل نماید.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد سلول‌های مزانشیمال موشی نسبت به ترانسفکشن با روش‌های غیرویروسی انتقال ژن مقاوم می‌باشند؛ اما وکتورهای لنتی‌ویروسی می‌توانند گزینه مناسبی جهت انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی باشند؛ بی‌آنکه تاثیری منفی بر فنوتایپ یا قدرت تمایزی آن‌ها داشته باشند.

کلید واژه‌ها: سلول‌های مزانشیمال موشی، انتقال ژن، روش‌های غیر ویروسی، وکتور لنتی‌ویروسی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوم، ص ۸۹-۷۹، اردیبهشت ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی، دکتر معصومه ابتکار کدپستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، تلفن تماس ۰۹۱۲۵۴۶۷۰۷۴

Email: ebtekarm@modares.ac.ir

مقدمه

سلول‌های مزانشیمال، سلول‌های خودتجدید شونده و چند توانه می‌باشند که توانایی تبدیل به چندین نوع سلول مختلف از جمله سلول‌های استخوان، غضروف، چربی، کبد، ماهیچه قلب و سلول‌های عصبی را دارا می‌باشند. این سلول‌ها را می‌توان از گونه‌های مختلف جانوری و یا از بافت‌های مختلف بدن جدا کرد (۱). امروزه سلول‌های مزانشیمال امیدهای زیادی را در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی ایجاد نموده‌اند. به‌علاوه با انتقال ژن به این سلول‌ها می‌توان ویژگی‌های مفید درمانی و همچنین کاربردهای درمانی آن‌ها را افزایش داد؛ که در این صورت می‌توان از این سلول‌ها به منظور تحویل ژن به نقاط آسیب دیده بدن استفاده کرد تا ضمن بروز پروتئین مورد نظر، روند مبارزه با بیماری و یا ترمیم آسیب را تسریع نمایند (۲-۵). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط ناکامورا (Nakamura) و همکارانش انجام گرفته است، اثرات ضد توموری سلول‌های مزانشیمال، با انتقال ژن اینترلوکین-۲ (IL-2) به آن‌ها افزایش یافته، و توانسته است باعث بقای بیشتر رتهای مبتلا به گلیوما شود (۶).

[۱] استادیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب،دانشگاه علوم پزشکی کرمان،کرمان،ایران

[۲] دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار، آزمایشگاه انگل شناسی مولکولی، گروه انگل شناسی، انستیتو پاستور، تهران (نویسنده مسئول)

[٤] استادیار، گروه آناتومی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[٥] استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران

در مطالعه دیگری، انتقال ژن Akt1 (رمز دهنده پروتئین عامل بقاء Akt) به سلول‌های مزانشمیال و پیوند این سلول‌ها به رت‌های دچار ایسکمی میوکارد، توانسته است باعث بهبود عملکرد قلب شود (۷). از اینرو انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال می‌تواند یک شیوه امیدوارکننده در درمان بسیاری از بیماری‌های دژنراتیو، التهابی و خودایمن باشد (۷،۵-۱۰). با توجه به این مطالب، می‌توان گفت که انتخاب یک شیوه مناسب و کارامد و با کمترین سایتوتوکسیسیتی، جهت انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در حال حاضر دو سیستم کلی جهت انتقال ژن به سلول‌ها وجود دارد. یکی بهره گیری از روش‌های ویروسی و دیگری روش‌های غیر ویروسی. استراتژی معمول در طراحی وکتورهای ویروسی، حذف ویژگی‌های پاتوژنیک و در عین حال حفظ ویژگی‌های انتقالی و بروز ژنی در آن‌ها می‌باشد. از میان وکتورهای ویروسی که امروزه در تحقیقات پایه و بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان به وکتورهای لنتی ویروسی و وکتورهای آدنو ویروسی و مشتقات آن اشاره کرد (۱۱). اگر چه به نظر بهره گیری از وکتورهای ویروسی می‌تواند روشی موثر و کارامد در انتقال ژن به بسیاری از سلول‌ها و ارگان‌ها باشد، با این حال نگرانی‌ها در مورد امنیت و همچنین پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان به اجزای مختلف وکتور ویروسی، از جمله مواردی می‌باشند که استفاده‌های عمومی از این نوع وکتورها را با محدودیت روبرو کرده‌اند (۱۲،۸). بعلاوه به علت محدودیت در سیستم بسته بندی ویروس‌ها، طبیعتا اندازه قطعه ژنی را هم که می‌توان با آن‌ها انتقال داد، نمی‌تواند از یک حدی بیشتر باشد. بعلاوه اینکه تولید ویروس‌های نوترکیب در مقیاس زیاد، به منظور آلوده کردن سلول‌های هدف، کار بسیار پر زحمت و طاقت فرسایی می‌باشد (۱۴،۱۳). در روش‌های غیر ویروسی از موادی نظیر رسوب کلسیم فسفات و یا لیپوزوم‌ها، جهت انتقال ژن به سلول‌ها در محیط آزمایشگاه استفاده می‌شود. مزیت این روش‌ها بر روش‌های ویروسی انتقال ژن، ارزانی نسبی، سادگی انجام و بی خطری آن می‌باشد. بعلاوه اینکه محدودیت اندازه، جهت انتقال ژن در این روش‌ها موضوعیت ندارد (۱۵).

از آنجا که اکثر مطالعات پایه در علوم پزشکی بر روی مدل‌های موشی بیماری‌های انسانی صورت می‌گیرند، در این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای برخی از روش‌های رایج غیر ویروسی و ویروسی انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی پرداخته شده است تا از این طریق موثرترین و کارامدترین روش انتقال ژن به این سلول‌ها بدست آید، و راه را برای تحقیقات بعدی در زمینه‌های مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی، با استفاده از سلول‌های مزانشیمال دستکاری شده از نظر ژنتیکی، در مدل‌های موشی بیماری‌های انسانی هموارتر نماید. بدین منظور، سلول‌های بنیادی مزانشمیال از مغز استخوان موش‌ها نژاد C57BL/6 جدا شدند و پس از تایید فنوتایپی و تمایزی، مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق کارایی هر کدام از روش‌های کلسیم فسفات و لیپوزومهای کاتیونیک تجاری لیپوفکتامین (Invitrogen) و توربوفکت (Fermentas)، به عنوان روش‌های غیر ویروسی انتقال ژن؛ و همچنین وکتور لنتی ویروسی، در انتقال ژن رمزدهنده پروتئین فلورسانس سبز (GFP)، به سلول‌های بنیادی مزانشمیال موشی بررسی و با یکدیگر مقایسه شده است.

مواد و روش کار

جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان

در این مطالعه، کار بر روی موش‌ها بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمال را می‌توان بر اساس خاصیت چسبندگی آن‌ها به کف پلیت کشت سلول، از بقیه سلول‌های موجود در مغز استخوان جدا کرد (۱۵،۱۶). در این تحقیق سلول‌های مزانشیمال بر اساس همین ویژگی، از مابقی سلول‌های موجود در مغز استخوان جدا شدند. برای جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان، استخوان‌های فمور و تیبیا از سه سر موش نر نژاد C57BL/6 (انستیتو پاستور تهران) ۶-۸ هفته‌ای جدا شدند. سپس در زیر هود لامینار و در شرایط استریل، مغز استخوان‌های فمور و تیبیا با تزریق محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ میگروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین (تمامی مواد از شرکت GIBCO/BRL) به داخل یک لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری تخلیه شد. سوسپانسیون سلولی بدست آمده به طور مساوی به دو عدد فلاسک کشت سلول T75 منتقل شد. فلاسک‌ها در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و پنج درصد CO2 قرار داده شدند. محیط کشت سلول‌ها اولین بار ۴۸ ساعت بعد و برای دفعات بعدی هر ۷۲ ساعت تعویض می‌شد. با اولین تعویض محیط کشت، سلول‌های غیر چسبنده از سلول‌های چسبنده کف پلیت جدا شده و دور ریخته شدند. سلول‌ها روزانه با میکروسکوپ اینورت بررسی می‌شدند. موقعیکه کلونی‌های سلولی ۸۰ درصد کف پلیت را پر می‌کردند، سلول‌ها با استفاده از محلول تریپسن- اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۲۵ در صد (GIBCO/BRL) از کف پلیت جدا و پاساژ داده می‌شدند.

آزمایش بررسی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمال به سلول‌های استخوانی و چربی

برای این آزمایش، دو پلیت کشت سلول شش خانه‌ای انتخاب شد. به پلیت شماره یک، تعداد ۲۵۰۰۰ سلول مزانشیمال، و به پلیت شماره دو، تعداد ۱۵۰۰۰۰ سلول مزانشمیال (میزان سلول‌های زنده در هر دو مورد بالای ۹۵ درصد) حاصل از پاساژ ۲، به هرکدام از خانه‌ها منتقل شد. در هر پلیت، سه خانه به عنوان کنترل و سه خانه دیگر به عنوان آزمایش تمایز انتخاب شدند. به این صورت که سلول‌های موجود در خانه‌های آزمایش پلیت شماره یک و دو به ترتیب تحت تیمار با محیط کشت تمایزی اختصاصی (شرکت ایده زیست تهران) سلول‌های استخوانی (به مدت سه تا چهار هفته) و سلول‌های چربی (به مدت دو هفته) قرار گرفتند. سلول‌های موجود در خانه‌های کنترل در این مدت تنها از محیط کشت DMEM کامل برای رشد و تکثیر بهره می‌بردند. پس از طی زمان‌های مذکور، محیط کشت سلول‌ها آسپیره گردید و پس از شستشو با PBS گرم، با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس، و سپس با رنگ الیزارین رد و اویل رد (شرکت ایده زیست تهران) به ترتیب برای بررسی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی رنگ آمیزی شدند.

بررسی شاخص‌های آنتی ژنی سطح سلول‌های مزانشیمال

به منظور بررسی شاخص‌های آنتی ژنی سلول‌های جدا شده از مغز استخوان موش‌ها، رنگ آمیزی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد مولکول‌های CD24 (کونژوگه با FITC به شماره کاتولوگ 11-0242)، CD29 (کونژوگه با PE به شماره کاتولوگ 12-0291)، CD44 (کونژوگه با PE به شماره کاتولوگ 12-0441)، CD45 (کونژوگه با FITC به شماره کاتولوگ 11-0451) و CD11b (کونژوگه با FITC به شماره کاتولوگ 11-0112) (همگی از شرکت eBioscience)، و در کنار ایزوتایپ کنترل‌های مربوطه (از شرکت eBioscience) و بر طبق پروتکل توصیه شده شرکت انجام شد. به طور خلاصه، تعداد پانصد هزار سلول (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد) داخل هر تیوب اپندورف تمیز ریخته شد. سپس، مقدار توصیه شده از هر کدام از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مذکور و ایزوتایپ کنترل مربوط به آن آنتی‌بادی، به تیوب‌های مربوطه اضافه شد. انکوباسیون به مدت یک ساعت و در یخچال انجام شد. پس از این مدت سلول‌ها یک مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) سرد حاوی دو درصد FBS شستشو داده شدند. سپس رسوب سلولی در یک میلی لیتر PBS سرد حاوی دو درصد FBS به حالت سوسپانسیون درآمد. در نهایت، سلول‌های رنگ آمیزی شده با دستگاه و نرم افزار فلوسایتومتری PAS machine and Flomax software (Partec, Münster, Germany) مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۷).

آماده سازی پلاسمیدها

در این مطالعه از پلاسمید p240 (شکل ۱) استفاده شد. این پلاسمید با داشتن پروموتر بسیار قوی EF1-alpha، امکان بروز مداوم یک ژن را در شرایط مختلف برون تنی و درون تنی فراهم می‌سازد. همچنین این پلاسمید با کد کردن پروتئین GFP، این امکان را فراهم می‌آورد تا در موارد انتقال ژن به سلول‌ها، به آسانی انتقال ژن را با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و یا میکروسکوپ فلورسانس ردیابی کرد. بعلاوه از این پلاسمید به‌علت داشتن توالی‌های LTR ویروس ایدز، و در کنار پلاسمیدهای مناسبی که پروتئین‌های ساختاری این ویروس را رمزدهی می‌کنند، در تهیه لنتی ویروس‌های نوترکیب، جهت انتقال ژن استفاده می‌شود. از اینرو در این مطالعه برای بررسی کارایی روش‌های غیر ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی، از پلاسمیدp240 استفاده شد. همچنین برای بررسی کارایی روش‌های ویروسی انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی، از این پلاسمید در کنار پلاسمیدهای PsPAX (پلاسمید رمز دهنده پروتئین‌های ساختاری ویروس ایدز) و PMD2G (پلاسمید کد کننده گلیکوپروتئین G ویروس VSV) (هر سه پلاسمید از شرکت Addgene.org) جهت تولید ویروس نوترکیب استفاده شد. از اینرو جهت تکثیر، پلاسمیدهای مذکور به باکتری‌های مستعد E.coli سوش DH5α منتقل، و سپس با استفاده از کیتEndoFree Plasmid Mega شرکت کیاژن به مقدار زیاد و به صورت عاری از اندوتوکسین تهیه شدند.

روش‌های غیر ویروسی انتقال ژن (ترانسفکشن) به سلول‌های مزانشیمال موشی

در این تحقیق از دو روش غیر ویروسی رسوب کلسیم فسفات و لیپیدهای کاتیونیک، جهت انتقال پلاسمید p240 به سلول‌های مزانشیمال بهره گرفته شد.

روش کلسیم فسفات

یک روز قبل از ترانسفکشن، تعداد ۵۰ هزار سلول مزانشمیال حاصل از پاساژ ۵ (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد)، به هریک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول منتقل شد. ترانسفکشن پلاسمید p240 به سلول‌های مزانشیمال طبق پروتکل توصیف شده در رفرنس شماره ۱۸ انجام شد (۱۸). به طور خلاصه رسوب حاصل از مخلوط محلول‌های (HEPES- 2xHBS buffered saline) و محلول کلرید کلسیم ۲ مولار حاوی غلظت‌های مختلف پلاسمید p240 (۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ میکروگرم) پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، به آرامی و به صورت قطره قطره بر روی سلول‌ها ریخته شد. سپس سلول‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. مدت زمان قرارگیری رسوب کلسیم فسفات بر روی سلول‌ها ۵ ساعت یا ۱۲ ساعت در نظر گرفته شد. پس از طی

هر کدام از زمان‌های مذکور، رسوب کلسیم فسفات با استفاده از بافر PBS شسته و محیط کشت DMEM کامل به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت سلول‌ها از نظر بروز پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Nikon TE2000) مورد بررسی قرار گرفتند.

ترانسفکشن با استفاده از لیپیدهای کاتیونیک

در این تحقیق، از دو لیپوزوم تجاری لیپوفکتامین (Lipofectamine™ LTX with Plus™ Reagent) شرکت Invitrogen و توربوفکت (Turbofect™) شرکت فرمنتاز، برای انتقال پلاسمید p240 به سلول‌های بنیادی مزانشیمال موشی استفاده شد. به این ترتیب که یک روز قبل از ترانسفکشن، تعداد ۵۰ هزار سلول مزانشمیال حاصل از پاساژ ۵ (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد) به هریک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول منتقل شد. سپس ترانسفکش با استفاده از هر یک از لیپوزومهای مذکور و بر طبق پروتکل پیشنهادی شرکت، و با بهینه سازی شرایط از طریق تغییر غلظت پلاسمید و یا مقدار لیپوزوم انجام شد. سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن به منظور بررسی میزان بیان پروتئین GFP با استفاده از دستگاه و نرم افزار فلوسایتومتری PAS machine and Flomax software (Partec, Münster, Germany) مورد آنالیز قرار گرفتند.

استفاده از وکتور لنتی ویروسی جهت انتقال ژن (ترانسداکشن) به سلول‌های مزانشیمال موشی

ساخت وکتور لنتی ویروس بیان کننده GFP

بدین منظور ابتدا لنتی ویروس نوترکیب بیان کننده پروتئین GFP ساخته شد. برای ساختن لنتی ویروس نوترکیب، به طور همزمان پلاسمیدهای p240، PsPAX و PMD2G به ترتیب با مقادیر ۲۵، ۲۰ و ۷ میکروگرم و با استفاده از روش کلسیم فسفات، به سلول‌های 293T موجود در پلیت کشت سلول ۱۰ سانتیمتری ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت روی سلول‌ها که در این مدت ذرات ویروس نوترکیب ساخته شده از سلول‌ها در آن آزاد شده بودند، جمع آوری، و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. به منظور تغلیظ ذرات ویروسی، محیط کشت فیلتر شده حاوی این ذرات در داخل لوله‌های استریل مخصوص سانتریفوژ با دور بالا، به مدت ۴ ساعت و با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. سپس رسوب ویروسی حاصل، در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حل شد. رسوب ویروسی پس از تیتراسیون (۱۹) جهت آلوده کردن سلول‌های مزانشیمال مورد استفاده قرار گرفت.

ترانسداکشن سلول‌های مزانشیمال موشی

تعداد ۵۰ هزار سلول مزانشیمال حاصل از پاساژ ۵ (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد)، به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت سلول منتقل شد. سلول‌های مذکور بر اساس تجربه‌های قبلی، با نسبت ۴۰ به ۱ ذره ویروسی به سلول مزانشیمال (MOI: 40) و در حضور ۶ میکروگرم در میلی لیتر پلی برن (سیگما) آلوده شدند. ۶ ساعت پس از ترانسداکشن، محیط کشت روی سلول‌ها دور ریخته شد و پس از دو بار شستشو با بافر PBS گرم، محیط DMEM تازه حاوی ۱۵ درصد FBS به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت سلول‌های مزانشیمال با استفاده از محلول تریپسن- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۲۵ درصد از کف چاهک‌ها جدا شده و از نظر میزان بیان پروتئین GFP، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا الگوی تفرق نوری سلول‌های مزانشیمال طبیعی (سلول‌های مزانشیمال آلوده نشده با ویروس) در دستگاه فلوسایتومتری بدست آمده و جمعیت سلول‌های مزانشیمال انتخاب شد (Gating). سپس آنالیزهای بعدی بر اساس این الگو انجام گرفت.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، بوسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون‌های آماری Kruskal-Wallis و تی مستقل (t-test) صورت گرفت. در تمامی موارد سطح معنی داری داده‌ها، ۹۵% در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی قدرت تمایزی و ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مزانشیمال

روند جداسازی سلول‌های مزانشیمال تا بدست آوردن سلول‌های تقریبا همگن (شکل ۲)، حدود ۵۳ روز طول کشید. در طی این مدت سلول‌های مزانشیمال حاصل از پاساژ ۲ (۴۴ روز پس از جداسازی از مغز استخوان) در معرض محیط‌های کشت تمایزی استخوانی و چربی قرار گرفتند. سلول‌های مزانشیمال توانستند در این محیطها به ترتیب به سلول‌های استخوانی و سلول‌های چربی تمایز یابند (شکل ۳). همچنین سلول‌های مزانشیمال حاصل از پاساژ ۳ (۵۹ روز پس از جداسازی از مغز استخوان) جهت بررسی ایمونوفنوتایپی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با فلوروکروم و بر ضد شاخص‌های آنتی ژنی CD24، CD29، CD44، CD45 و CD11b، و در کنار ایزوتایپ کنترل‌های مناسب رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه و نرم افزار فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل از

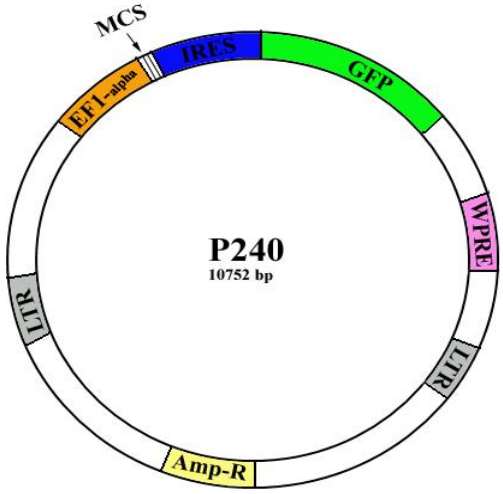
فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها واجد شاخص‌های سلول‌های مزانشیمال یعنی مولکول‌های CD24، CD29 و CD44، و فاقد شاخص‌های آنتی ژنی مختص سلول‌های خونساز یعنی CD45 و CD11b بودند (شکل ۴)

کارایی روش‌های غیر ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی

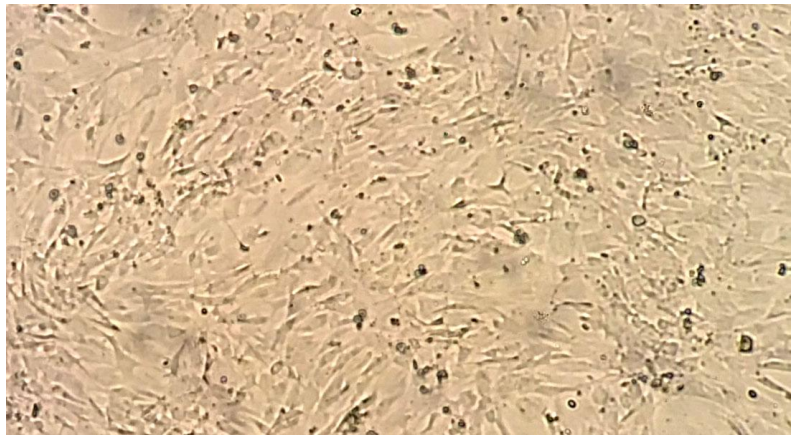
نتایج حاصل از روش‌های غیر ویروسی انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال حکایت از آن داشت که رسوب کلسیم فسفات در تمام شرایط تست شده در این تحقیق و با هر غلظت مورد استفاده از پلاسمید p240 برای سلول‌های مزانشیمال سمی بود و باعث مرگ سلول‌ها شد (جدول ۱). از طرفی لیپوزومهای تجاری لیپوفکتامین و توربوفکت نیز از کارایی چندانی در انتقال ژن به این سلول‌ها برخوردار نبودند. بطوریکه در تمام شرایط بهینه سازی شده (چه از نظر تغییر مقدار پلاسمید و چه از نظر تغییر مقدار لیپوزوم) تعداد سلول‌های بیان کننده پروتئین GFP کمتر از سه درصد بود (جدول ۲). از نظر آماری هم هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان کارایی دو لیپوزوم مورد بحث مشاهده نشد.

کارایی وکتور لنتی ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی

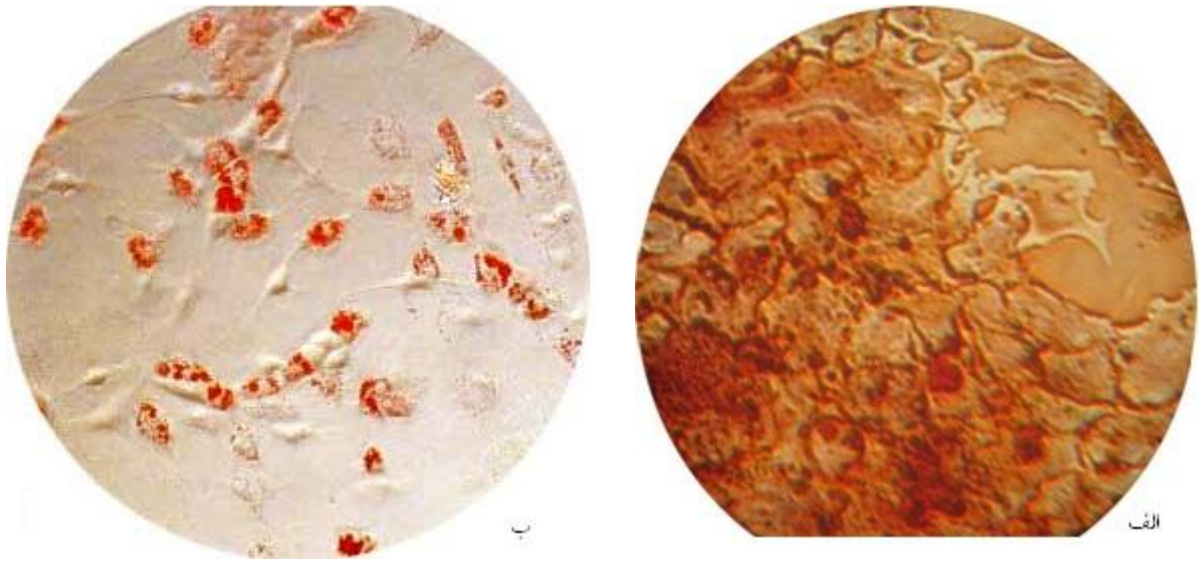
نتایج حاصل از ترانسداکشن سلول‌های مزانشیمال موشی با لنتی ویروس بیان کننده GFP و با MOI: 40، نشان داد که این وکتور توانست ژن کد کننده GFP را به بیش از ۷۰ درصد سلول‌ها منتقل کند (شکل ۵). همچنین آزمایشات ایمونوفنوتایپینگ و تمایزی که پس از ترانسداکشن بر روی سلول‌های مزانشیمال انجام گرفت، نشان داد که پروسه ترانسداکشن تغییری در فنوتایپ و یا قدرت تمایزی سلول‌های مزانشیمال ایجاد نکرده بود (نتایج این قسمت نشان داده نشده است).



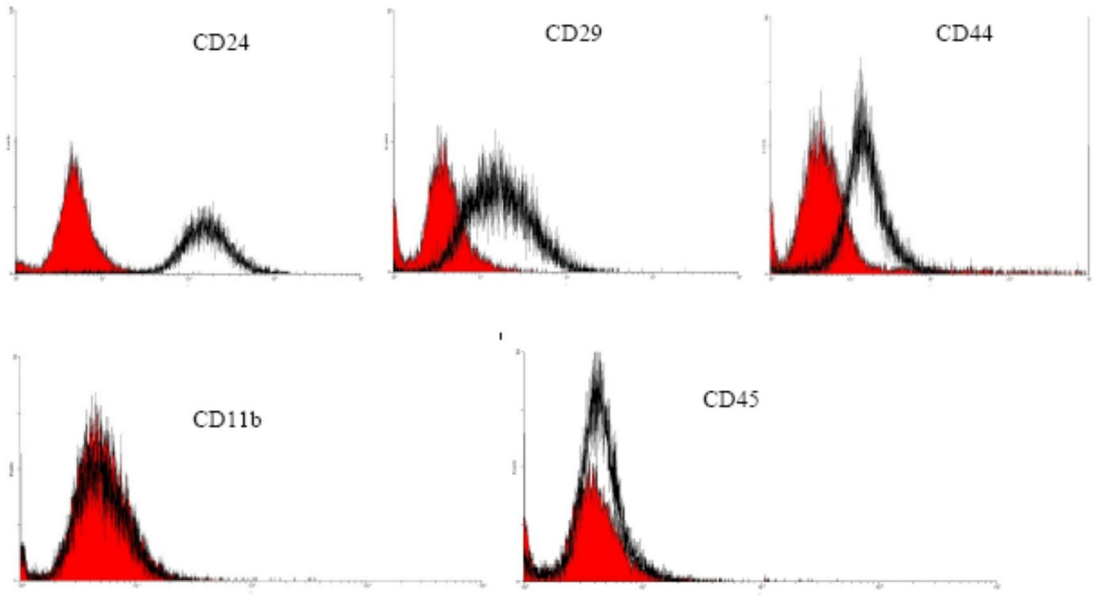
شکل شماره (۱): پلاسمید p240. این پلاسمید دارای پروموتر بسیار قوی EF1-alpha بوده و پروتئین فلورسانس سبز (GFP) را بیان می‌کند. از این پلاسمید به علت داشتن توالی‌های LTR ویروس ایدز، و در کنار پلاسمیدهای مناسبی که پروتئین‌های ساختاری این ویروس را رمزدهی می‌کنند، در تهیه لنتی ویروس‌های نوترکیب استفاده می‌شود.



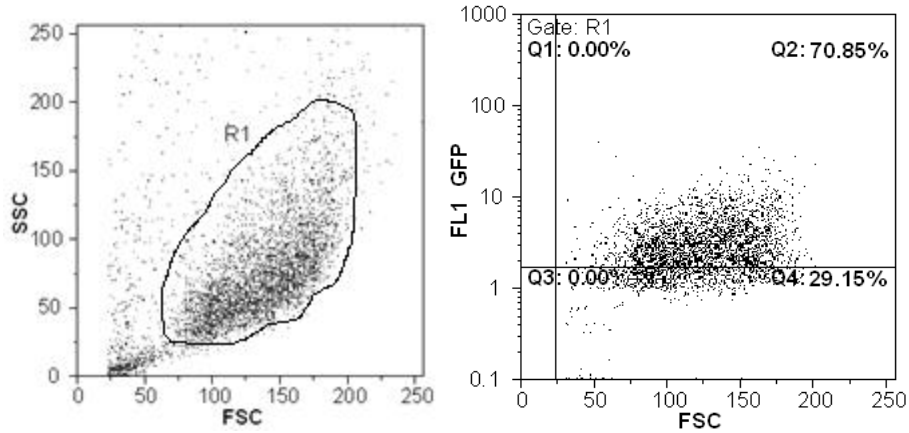
شکل شماره (۲): سلول‌های مزانشمیال موشی در پاساژ ۳.



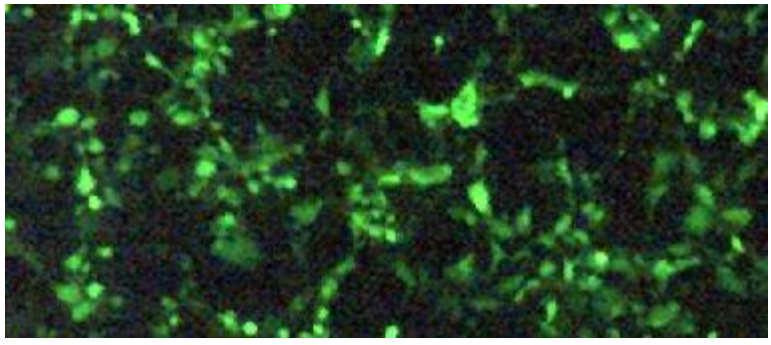
شکل شماره (۳): تمایز سلول‌های مزانشیمال موشی. سلول‌های مزانشیمال حاصل از پاساژ ۲، پس از قرار گرفتن در معرض محیط‌های کشت تمایزی اختصاصی استئوسیتی و آدیپوسیتی به ترتیب به سلول‌های استخوانی (الف) و سلول‌های چربی (ب) تمایز یافتند.



شکل شماره (۴): بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مزانشیمال موشی. سلول‌های مزانشیمال حاصل از پاساژ ۳ پس از رنگ آمیزی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی کونژوگه شده با فلوروکروم و در کنار ایزوتایپ کنترل‌های اختصاصی، با دستگاه فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. آن‌ها واجد شاخص‌های آنتی ژنی CD24، CD29 و CD44، و فاقد شاخص‌های آنتی ژنی CD45 و CD11b بودند.



شکل شماره (۵): سلول‌های مزانشیمال موشی با MOI: 40، با وکتور لنتی ویروس بیان کننده GFP آلوده شدند. نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسایتومتری نشان داد که بالای ۷۰ درصد از سلول‌ها (منطقه Q2 شکل سمت راست)، پروتئین GFP را بیان می‌کردند. شکل سمت چپ، الگوی تفرق نوری سلول‌های مزانشیمال طبیعی را در دستگاه فلوسایتومتری، به همراه Gating نشان می‌دهد.



شکل شماره (۶): انتقال پلاسمید p240 به سلول‌های 293T، با استفاده از روش کلسیم فسفات و یا لیپیدهای کاتیونیک لیپوفکتامین و توربوفکت

جدول شماره (۱): ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمال موشی با استفاده از روش کلسیم فسفات. ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمال با بهره گیری از روش کلسیم فسفات در شرایط مختلف از نظر مقدار پلاسمید p240 و یا مدت زمان قرارگیری رسوب کلسیم فسفات بر روی سلول‌ها انجام شد. در تمام شرایط تست شده، رسوب کلسیم فسفات سبب مرگ سلول‌ها شد.

پلیت	پلاسمید P240 (میکروگرم)	مدت زمان مواجهه با رسوب (ساعت)	نتیجه ترانسفکشن
۱	۰/۵	۵	مرگ سلول
۲	۱	۵	مرگ سلول
۳	۲	۵	مرگ سلول
۴	۳	۵	مرگ سلول
۵	۵	۵	مرگ سلول
۶	۰/۵	۱۲	مرگ سلول
۷	۱	۱۲	مرگ سلول
۸	۲	۱۲	مرگ سلول
۹	۳	۱۲	مرگ سلول
۱۰	۵	۱۲	مرگ سلول

جدول شماره (۲): ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمال موشی با استفاده از لیپیدهای کاتیونیک تجاری لیپوفکتامین و توربوفکت. در تمام شرایط بهینه سازی شده (چه از نظر تغییر مقدار پلاسمید p240 و چه از نظر تغییر مقدار لیپوزوم) درصد سلول‌های بیان کننده پروتئین GFP کمتر از ۳ درصد بود.

condition	Turbofect™			Lipofectamine™ LTX with Plus™ Reagent			
	P240 (µg)	Reagent (µl)	Transfection Rate %	P240 (µg)	Reagent (µl)	Plus™ Reagent (µl)	Transfection Rate %
1	1	1	1.2 ± 0.4	0.25	0.5	0.25	1.54 ± 0.3
2	1	1.5	2.5 ± 0.53	0.25	1	0.5	1.73 ± 0.2
3	1	2.5	1 ± 0.3	0.25	2	1	1.95 ± 0.4
4	1.5	1.5	1.3 ± 0.45	0.5	1	0.5	2.4 ± 0.35
5	1.5	2.5	0.8 ± 0.15	0.5	2	1	2.7 ± 0.35
6	1.5	3	Cell death	0.5	3	1.5	1.83 ± 0.15

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد که اگر چه روش‌های غیر ویروسی انتقال ژن بنابر دلایلی از جمله سادگی انجام، ارزان بودن، عدم محدودیت در اندازه ژن انتقالی و یا عدم برانگیختن پاسخ‌های ایمنی، بر روش‌های ویروسی ارجحیت دارند (۳)، ولی با این حال، روش‌های غیر ویروسی که در این مطالعه به منظور انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی مورد استفاده قرار گرفتند، در انجام ماموریت خویش ناکارامد بودند. بطوریکه استفاده از روش کلسیم فسفات جهت انتقال پلاسمید p240، باعث مرگ سلول‌های مزانشیمال در تمام شرایط تست شده در این مطالعه شد. همچنین استفاده از لیپیدهای کاتیونیک تجاری لیپوفکتامین و توربوفکت هم نتوانست به‌طور موثری پلاسمید p240 را به سلول‌های مزانشیمال منتقل نماید، بطوریکه در تمام شرایط تست شده در این مطالعه، میزان ترانسفکشن پلاسمید مذکور با بهره‌گیری از این مواد، به سه درصد هم نمی‌رسید. البته با شک به این موضوع که احتمالا خطاهای پیش بینی نشده ای نظیر تخریب لیپوزومهای تجاری خریداری شده (هر دوی این لیپوزومها از خارج کشور تهیه می‌شوند و این احتمال وجود دارد که زنجیره سرد و یا شرایط مناسب نگهداری هنگام انتقال به داخل کشور رعایت نشود)، ممکن است علت درصد پایین ترانسفکشن در مطالعه ما باشند، تصمیم گرفته شد تا برای برطرف شدن این شک، با لیپوزومهای مورد استفاده در این مطالعه، عمل انتقال پلاسمید p240 به سلول‌های 293T نیز انجام شود. نتایج این بررسی نشان داد که هم رسوب کلسیم فسفات و هم لیپوزومهای تجاری لیپوفکتامین و توربوفکت توانستند پلاسمید p240 را به بیش از ۸۰ درصد این سلول‌ها منتقل نمایند (شکل ۶). مقایسه نتایج حاصل از مطالعه ما با مطالعات مشابه انجام گرفته روشن می‌سازد که در کل، روش‌های غیر ویروسی روشی کارامد جهت انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال نمی‌باشند. به عنوان مثال در یکی از این مطالعات، میزان ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمال انسانی با استفاده از لیپیدهای کاتیونیک و در بهترین شرایط بین ۲ تا ۳۵ درصد گزارش شده است (۲۰). در مطالعه دیگری که توسط قیصری و همکاران انجام شده است، میزان ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمال رتی در بهترین شرایط و با استفاده از لیپوفکتامین، ۱۹/۶ گزارش شده است (۲۱). به نظر می‌رسد که هیچکدام از این میزان ترانسفکشنها برای اهداف ژن‌درمانی کافی نباشند. یکی از علت‌هایی که می‌تواند اختلاف میزان ترانسفکشن را بین مطالعه ما و دو مطالعه ذکر شده توضیح دهد، نوع سلول‌های مزانشیمال مورد مطالعه باشد، بطوریکه تحقیق اولی بر روی سلول‌های مزانشیمال انسانی و مطالعه دومی بر روی سلول‌های مزانشیمال رتی انجام گرفته است. از اینرو می‌توان گفت که نوع منبع جداسازی سلول‌های مزانشیمال (انسان، رت، موش یا ...) می‌تواند عاملی در میزان پذیرایی آن‌ها از ژن خارجی باشد. البته برای اثبات این فرضیه، نیاز به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد.

در این مطالعه همچنین از وکتور لنتی ویروسی جهت انتقال پلاسمید GFP به سلول‌های مزانشیمال موشی استفاده شد. نتایج نشان داد که وکتور لنتی ویروسی نوترکیب توانست بیش از ۷۰ درصد سلول‌های مزانشیمال را ترانسداکت نماید؛ بی‌آنکه تاثیری منفی بر فنوتایپ و یا قدرت تمایزی این سلول‌ها داشته باشد. در مطالعات مشابه میزان ترانسداکشن ۵۰/۳ و ۶۰/۵ درصد برای سلول‌های مزانشیمال موشی (۲۲)، ۷۰ درصد برای سلول‌های مزانشیمال انسانی (۲۳)، حدود ۴۲ درصد برای سلول‌های مزانشیمال میمون (۲۴) و۷۲ تا ۹۹ درصد برای سلول‌های مزانشیمال بابون (۱۶) گزارش شده است. نتیجه‌ای که از مقایسه

مطالعه ما و مطالعات ذکر شده حاصل می‌شود اینست که بسته به اینکه سلول مزانشیمال از چه گونه جانوری جدا شده باشد، میزان ترانسداکشن آن توسط وکتورهای لنتی ویروسی متغیر خواهد بود. بطوریکه میزان ترانسداکشن در سلول‌های مزانشیمال موشی، در مقایسه با دیگر سلول‌های مزانشیمال ذکر شده (بجز میمون) در سطح پایین تری قرار دارد. البته مورد دیگری که می‌تواند عامل اختلاف میزان ترانسداکشن بین این مطالعات باشد، MOI یعنی نسبت لنتی ویروس نوترکیب به سلول مزانشیمال در هنگام ترانسداکشن باشد. مطالعات نشان داده است که با افزایش این نسبت، میزان ترانسداکشن سلول‌های مزانشیمال نیز افزایش پیدا می‌کند (۲۲). البته به این موضوع هم باید توجه کرد که افزایش دادن MOI به قیمت مرگ سلول‌ها تمام نشود.

به طور خلاصه نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد که سلول‌های مزانشیمال موشی نسبت به ترانسفکشن با روش‌های غیر ویروسی مقاوم می‌باشند؛ اما در مقابل، وکتورهای لنتی ویروسی می‌توانند گزینه مناسبی جهت انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمال موشی باشند؛ بی‌آنکه تاثیری منفی بر فنوتایپ و یا قدرت تمایزی این سلول‌ها داشته باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب بخشی از رساله دکتری تخصصی ایمونولوژی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خویش را از حمایت‌ها و مساعدت‌های بخش‌های مختلف این دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، ابراز می‌دارند.

References:

1. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. Stem Cells Dev 2004;13(5):463-72.
2. Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. J Musculoskelet Neuronal Interact 2002;2(4):309-20.
3. Santos J, Pandita D, Rodrigues J, P Pego A, L Granja P, Tomas H. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. Curr Gene Ther 2011;11(1):46-57.
4. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. Expert Opin Biol Ther 2005;5(12):1571-84.
5. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. Gene Ther 2008;15(10):711-5.
6. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. Gene Ther 2004;11(14):1155-64.
7. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003;9(9):1195-201.
8. Griffin M, Greiser U, Barry F, O'Brien T, Ritter T. Genetically modified mesenchymal stem cells and their clinical potential in acute cardiovascular disease. Discov Med;9(46):219.
9. Hamada H, Kobune M, Nakamura K, Kawano Y, Kato K, Honmou O, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. Cancer Sci 2005;96(3):149-56.
10. 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):2118-27.
11. Rapley R. Medical biomethods handbook. Totowa, NJ.: Humana Pr Inc; 2005.
12. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. AAPS J 2005;7(1):61-77.

13. Kane NM, McRae S, Denning C, Baker AH. Viral and non-viral gene delivery and its role in pluripotent stem cell engineering. Drug Discov Today Technol 2009;5(4):107-15.
14. Li SD, Huang L. Non-viral is superior to viral gene delivery. J Control Release 2007;123(3):181.
15. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. Mesenchymal stem cells: Methods & protocols. Totawa, NJ: Humana Press; 2008.
16. Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, et al. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. Human Gene Ther 2001;12(12):1527-41.
17. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Gheisari Y, Vasei M, Amanpour S, Bagherizadeh I, et al. Dormant Phase and Multinuclear Cells: Two Key Phenomena in Early Culture of Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Devt 2010;20(8):1337-47.
18. Transfection of DNA into Eukaryotic Cells. Curr Protoc Mol Biol 1996;9:1-9.1.
19. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell–based systems. Curr Protoc Immunol 1999;10:14-0.7.
20. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Airess-Barros MR, da Silva CL, et al. Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. J Biomed Biotechnol 2010;2010:735349.
21. 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):815-23.
22. Ricks DM, Kutner R, Zhang XY, Welsh DA, Reiser J. Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2008;17(3):441.
23. Van Damme A, Thorrez L, Ma L, Vandenburgh H, Eyckmans J, Dell'Accio F, et al. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. Stem Cells 2006;24(4):896-907.
24. Lee CI, Kohn DB, Ekert JE, Tarantal AF. Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Mol Ther 2004;9(1):112-23.

Original Article

COMPARATIVE EVALUATION OF VIRAL AND NONVIRAL METHODS OF GENE DELIVERY TO MOUSE MESENCHYMAL STEM CELLS

Mohammad Shafi Mojadadi[1], Massoumeh Ebtekar[2], Majid Golkar[3*], Hossein Khanahmad[4], Kayhan Azadmanesh[5]*

Received: 23 Dec, 2012; Accepted: 15 Feb, 2013

Abstract

***Background and Aims*:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are attractive targets for cell and gene therapy, because they can differentiate into many cell lineages. Hence, finding an efficient and suitable method for transferring of genetic materials to these cells is very essential. In this study, we evaluated the efficiency of two methods of gene transferring, viral and nonviral, in transfection of mouse MSCs, comparatively.

***Materials and methods*:** MSCs were isolated from mouse bone marrow and their ability to differentiate into osteocyte and adipocyte lineages and their surface markers were evaluated. Then, the efficiency of two methods of nonviral gene transferring; calcium phosphate, and cationic lipid reagents (Lipofectamine™ LTX with Plus™ Reagent and Turbofect™); and also lentivirus vector were examined in transfection of mouse MSCs with green fluorescent protein (GFP) plasmid.

***Results*:** The isolated MSCs successfully differentiated to osteocytes and adipocytes. They were positive for CD24, CD29 and CD44; and negative for CD11b and CD45 cell surface markers. Nonviral gene transferring methods were completely inefficient in transfection of mouse MSCs; whereas calcium phosphate precipitate was completely toxic to mouse MSCs and cationic lipids only transfected less than three percent of the cells. In contrast, high transfection rate and GFP expression (above 70%) was seen with lentivirus vector.

***Conclusions*:** it seems that mouse MSCs are refractory to nonviral gene transferring methods. In contrast, lentivirus-mediated gene transfer methods may be an efficient tool for transfection of mouse MSCs without any interference on their phenotype and differentiation potential.

***Keywords*:** Mouse mesenchymal stem cells, gene delivery, nonviral methods, lentivirus vector

Address: *[2] Dr. Massoumeh Ebtekar, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, P. O. Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel/Fax: 98 21 8288 3891.
E-mail: ebtekarm@modares.ac.ir
Address:*[3] Dr. Majid Golkar, Parasitology Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, P. O. Box: 1316943551, Tehran, Iran. Tel/Fax: 98 21 66968855.
E-mail: golkar@pasteur.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(2): 89 ISSN: 1027-3727

[1] *Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Authors)*
[3] *Assistant Professor, Parasitology Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (Corresponding Authors)*
[4] *Assistant Professor, Department of Anatomical Science and Genetics, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran*
[5] *Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*