

دانشور

پزشکی

ترانسفکشن پایدار سلول‌های استرومایی مغز استخوان توسط وکتور-pSecTag2/HygroA CNTF به منظور استفاده در درمان ضایعات نخاعی

نویسندگان: حجت‌اله عباس‌زاده^۱، تقی طریحی^{۲*}، علی نوری‌زاده^۳، مجید صادقی‌زاده^۴، علیرضا عزیززاده دلشاد^۵، طاهر طاهری^۶، هادی کاظمی^۷

۱. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران و استاد گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران
۴. استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۶. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران
۷. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران

E-mail: ttiraihi@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول: تقی طریحی

چکیده

مقدمه و هدف: ژن (CNTF) که یکی از اعضای خانواده ژن‌های نوروتروفیک است، در محافظت بقا کانگلیون‌های سیلیاری و نورونی شرکت دارد. CNTF تمایز و بقای گونه‌های مختلف نورون‌های حسی، حرکتی، اتونوم و الیگودندروسیت‌ها را افزایش می‌دهد. به منظور افزایش خاصیت نوروتروفیک BMSCs پلاسمید pSec-Tag2/hygroA-CNTF ساخته و با استفاده از لیپوفکتامین وارد سلول‌های BMSCs شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمید pSec-Tag2/hygroA-CNTF ساخته‌شد و با استفاده از سکانسینگ مورد تأیید قرارگرفت و با استفاده از لیپوفکتامین به سلول‌های BMSCs وارد شد. میزان رونویسی در ژن مورد نظر توسط RT-PCR محاسبه و میزان بیان پروتئین با استفاده از وسترن بلات و الیزا بررسی شد.

نتایج: سکانسینگ نشان داد که پلاسمید pSec-Tag2/hygroA-CNTF دارای توالی صحیحی است. پس از ترانسفکشن، بیان ژن CNTF و بیان پروتئینی آن با استفاده از RT-PCR و وسترن بلات تأیید شد.

نتیجه‌گیری: پلاسمید pSec-Tag2/hygroA-CNTF با داشتن بیان مناسب در سلول‌های BMSCs می‌تواند در صورت پیوند، سبب افزایش بازسازی سلول‌های آسیب‌دیده پس از ضایعه نخاعی شود.

واژگان کلیدی: ترانسفکشن، ساب کلونینگ، BMSCs، CNTF

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم-شماره ۱۱۰
اردیبهشت ۱۳۹۳

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۹

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۱/۰۶

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۰۸

مقدمه

استفاده از عوامل محافظت‌کننده نورون‌ها و سلول‌های گلیالی، سال‌هاست که به‌وسیله محققان مختلف مورد آزمایش و بررسی قرار گرفته‌است؛ از این عوامل محافظ و ارتقادهنده رشد و تقسیم سلولی که به‌صورت طبیعی توسط سلول سنتز می‌شوند، می‌توان مؤلفه‌های رشد را نام برد. آزمایش‌های مختلف در مدل‌های تجربی حیوانات اثر حفاظتی عوامل رشد در بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مانند سکت‌های مغزی یا ضربات وارده به مغز و بیماری‌های مخرب عصب (نروژنراتیو) مانند ضایعات نخاعی را اثبات کرده‌اند (۴-۱)؛ بعضی از این مؤلفه‌های رشد مانند خانواده نوروتروفین‌ها مورد آزمون‌های بالینی قرار گرفته‌اند (۷-۵). نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقا، تمایز و مرگ جمعیت‌های مختلف از نورون‌ها از جمله نورون‌های حسی و حرکتی را تنظیم می‌کنند (۸ و ۹). آزمایش‌های مختلف، اثر تروفیک این عوامل را در رشد سیستم عصبی نشان داده‌اند. یکی از اعضای خانواده فاکتورهای نوروتروفیک Ciliary neurotrophic factor (CNTF) است که در سلول‌های گلیال سیستم اعصاب محیطی و مرکزی بیان می‌شود؛ این نوروتروفین در بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت دارد (۱۰). پژوهشگران معتقدند که میان جهش و پلی‌مورفیسم‌های ژن CNTF و بسیاری از اختلال‌های روحی سیستم عصبی، ارتباط وجود دارد (۱۱). در آزمون‌های بالینی از این مؤلفه در درمان بیماری مزمن مخرب شبکیه (chronic retinal degenerative diseases) استفاده شده‌است (۶).

مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که CNTF در احیای مجدد ارتباط عصب با عضله، دارای نقشی برجسته است (۱۲-۱۴)؛ همچنین با اثر روی نورون‌های آسیب‌دیده در ضایعات سیستم عصبی مرکزی و محیطی، سبب بقای نورون‌ها و سلول‌های گلیال می‌شود (۱۵-۱۸). هدف ما در این مطالعه، ایجاد سلول‌های بنیادی با بیان پایدار CNTF به‌منظور کاربردهای درمانی در بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از جمله ضایعات نخاعی بود و

برای نیل به این هدف بر آن شدیم که با ساب کلونینگ و ترانسفکشن سلول‌های BMSC امکان دسترسی به سلول‌های قادر به ترشح این مؤلفه رشد، فراهم شود.

مواد و روش‌ها

ساب کلونینگ

در این مطالعه، ابتدا وکتور حامل ژن CNTF انسانی (pCMV-SPORT6) به‌منظور تکثیر در سویه DH5- α باکتری E.Coli ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط لوریا برتانی (LB) در داخل انکوباتور کشت داده شدند و به محیط کشت حاوی باکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد که با توجه به وجود ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در وکتور مبدأ باکتری‌های ترانسفورم نشده امکان رشد پیدانمی‌کردند. پس از ۱۸ ساعت، باکتری‌های ترانسفورم شده رشد کرده، از انکوباتور خارج شدند و برای استخراج پلاسمید آماده شدند. استخراج با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (High pure plasmid isolation- Fermntas) انجام شد. به‌منظور تأیید وجود ژن روی وکتور حامل از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های EcoRV و Not I به‌صورت تک‌آنزیمی و دوآنزیمی استفاده شد؛ سپس محصولات استخراج پلاسمید و هضم‌های آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

پرایمر مناسب برای جداسازی توالی ژن CNTF از وکتور حامل طراحی شد و به‌این‌ترتیب از پلاسمید به‌عنوان الگو استفاده شد؛ به‌منظور تکثیر ژن از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی به‌صورت سی سیکل ۹۵ درجه ۶ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه و ۲۵ درجه ۵ دقیقه استفاده شد. لازم به اشاره است که به هدف بهینه‌کردن اتصال پرایمر به الگو به‌منظور انجام PCR، ابتدا دماهای مختلف آزمایش شدند و در نهایت، دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای قطعه مورد نظر به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. جفت پرایمرها طوری طراحی شدند که

ترانسفکشن

به منظور انتقال ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتی از روش ترانسفکشن استفاده شد. ترانسفکشن در ظروف کشت شش خانه که ۲۴ تا ۴۸ ساعت پیش در آن سلول کشت داده شده بود، صورت گرفت. در زمان ترانسفکشن تعداد سلول‌ها به 5×10^3 در هر چاهک رسید. ترانسفکشن با استفاده از مواد پلیمری با بار مثبت انجام شد و درحقیقت، این روند به وسیله کیت توربوفکت (TurboFect Transfection Reagent-Fermentas) بدین صورت انجام شد: یک میکروگرم از DNA پلاسمیدی را به $350 \mu\text{L}$ از محیط فاقد سرم اضافه کرده، اجازه دادیم تا اینکه ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی بماند؛ به طور هم‌زمان $10 \mu\text{L}$ از توربوفکت را به $350 \mu\text{L}$ به محیط افزوده، این مخلوط نیز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط باقی ماند؛ پس از گذشت مدت ۳۰ دقیقه، محتوای این دو تیوب را با یکدیگر مخلوط کرده، اجازه دادیم تا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی بماند؛ پس از گذشت این زمان، محتوای میکروتیوب را روی سلول‌ها ریخته، به مدت ۴ ساعت این سلول‌ها در انکوباتور قرار داده شدند؛ در نهایت به این سلول‌ها محیط کشت به اضافه سرم اضافه شد و سپس ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ترانسفکشن کردن محیط کشت سلول‌ها در روز بعد از ترانسفکشن تعویض شد؛ پس از باقی ماندن سلول‌های ترانسفکت در یک غلظت مناسب ($150 \mu\text{g/ml}$) از آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین به سلول‌های باقی مانده اجازه داده شد رشد کنند و هر دو روز یک‌بار، محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه حاوی غلظت بیان شده هیگرومایسین تعویض می‌شد.

وسترن بلائینگ

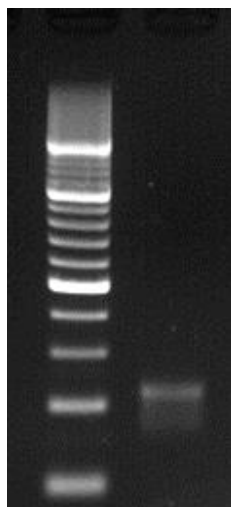
با استفاده از کیت ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent-Fermentas پروتئین سلولی استخراج و غلظت پروتئین توسط روش برادفورد تعیین شد. برای بررسی بیان پروتئین CNTF در BMSCs از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلائینگ استفاده شد. وسترن بلائینگ برپایه

سایت‌های برشی در ابتدا و انتهای ژن قرار گیرند. قطعه ژنی که با PCR تکثیر شده بود با استفاده از کیت (clean up gene kit- roch) خالص‌سازی شد. در ادامه با کتری ترانسفورم شده با وکتور بیانی (pSecTag2/HygroA) از شرکت Invitrogen) به منظور تکثیر در محیط لوریا برنالی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و با استفاده از آنزیم‌های EcoRV و Not I خطی شد؛ سپس قطعه ژنی یاد شده طی فرایند الحاق (ligation) به وکتور مورد نظر با استفاده از کیت (T4 DNA ligase-Fermentas) وارد شد؛ روز بعد با کتری DH5 α مستعد به وسیله محصول الحاق ترانسفورم شد؛ سپس، محصول الحاق، روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد؛ در نهایت به منظور تشخیص کلونی صحیح از کلونی‌های رشد یافته، روش Colony PCR به کار رفت؛ در این مرحله، کلون‌های رشد کرده روی پلیت به وسیله سمپلر برداشته شدند و همراه با پرایمرهای فوروارد و ریورس و آنزیم Taq DNA polymerase به میکروتیوب وارد شده، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد و نمونه‌های مثبت که بانندی مشخص را ایجاد کرده بودند به محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین به منظور تکثیر کشت داده شدند؛ روز بعد، وکتور نو ترکیب توسط کیت (High pure plasmid – Fermentas) isolation kit تخلیص شد؛ در ادامه، تجزیه و تحلیل آنزیمی پلاسمید نو ترکیب به وسیله دو آنزیم و با بافر مشترک انجام گرفت؛ محل اثر این دو آنزیم روی پلاسمید در دو سوی قطعه insert شده قرار داشت. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و کل نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز شدند. پلاسمیدی که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان داده بودند برای تأیید نهایی، یعنی سکانس و تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال به شرکت ژن فناوریان فرستاده شد؛ سپس نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast برای تطابق با ژن‌های موجود در بانک ژنتیکی بررسی شد.

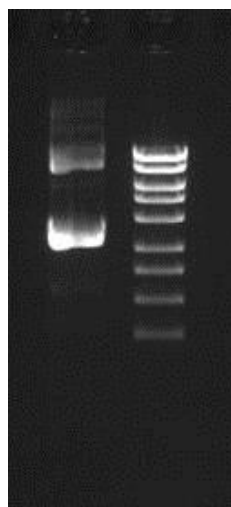
یافته‌ها

وکتور حامل ژن CNTF به‌منظور تکثیر، ترانسفورم‌شد و محصول ترانسفورم با استفاده از محیط لوریا برتانی کشت داده شد پس از رسوب‌گیری نمونه‌ها توسط کیت High pure plasmid تخلیص شد و با استفاده از آنزیم‌های Not I و EcoR V هضم آنزیمی و آنالیز انجام گرفت (شکل ۱)؛ سپس ۱ میکرولیتر از محصولات هضم و پلاسمید روی ژل آگارز لوشد که نتیجه از صحت کار تخلیص و هضم حکایت می‌کند؛ سپس پلاسمید به‌عنوان الگو برای امپلیفیکاسیون، مورد واکنش زنجیری پلیمرز قرار گرفت که در نتیجه آن، ژن مورد نظر به مقدار لازم تکثیر یافت (شکل ۲). پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال و پس از تأیید توالی و بلاست به مرحله بعدی، وارد شد.

واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی است؛ در این روش، ابتدا بلائینگ پروتئین‌ها انجام می‌شود که در این روند، باندهای پروتئینی از ژل SDS-PAGE به غشای مخصوص منتقل می‌شوند. در عمل بلائینگ مولکول‌های پروتئین از زمینه ژل، خارج و در سطح غشا در همان موقعیت قرار می‌گیرند. برای شناسایی پروتئین‌های منتقل شده به غشا می‌توان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده کرد؛ در این پژوهش ابتدا با روش SDS-PAGE باندهای پروتئین سلولی از یکدیگر جدا شدند؛ سپس در وسترن بلائینگ با آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی CNTF مجاور و نتایج بررسی شدند.



شکل ۲. PCR ژن CNTF

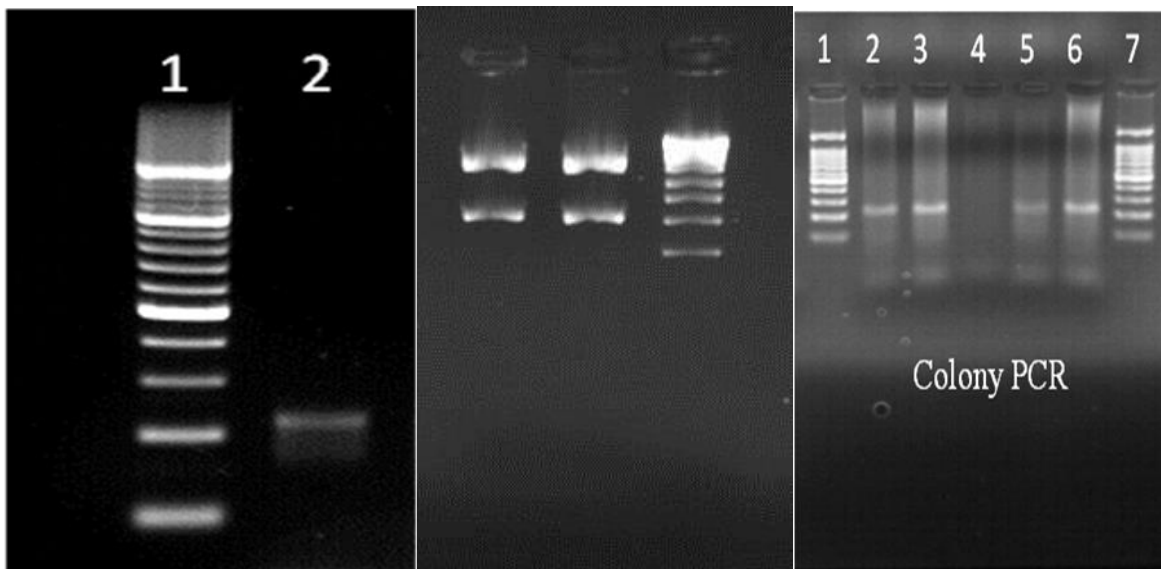


شکل ۱. محصولات استخراج پلاسمید

سپس فرایند امپلیفیکاسیون محصول PCR به‌وسیله هضم آنزیمی به‌منظور ایجاد انتهای چسبیده آماده شد و با استفاده از کیت Clean up-Qiagen خالص‌سازی شد؛ همچنین وکتور بیانی pSecTag2/HygroA با کشت در محیط لوریا برتانی تکثیر یافته، با فرایند هضم توسط آنزیم Hind III خطی شد و برای فرایند الحاق آماده شد (شکل ۴). برای انجام فرایند الحاق، ظرف واکنش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت انکوبه شد و

سپس به مرحله ترانسفورم، وارد شد و محصول ترانسفورم روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. کلونی‌های مثبت جدا و با استفاده از Colony PCR از نظر صحت الحاق ژن تأیید شدند (شکل ۳) و سپس در محیط لوریا برتانی حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شده، استخراج پلاسمید انجام گرفت؛ پس از تجزیه و تحلیل آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های Hind و XhoI III، واکنش PCR انجام گرفت (شکل ۵) و نتایج حاکی از

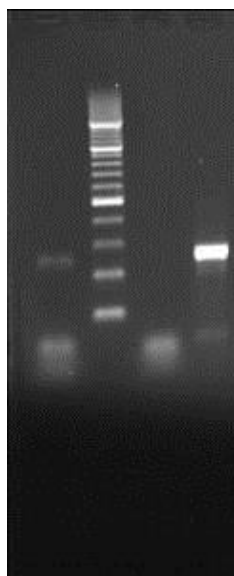
موفقیت ساب کلونینگ بود و در نهایت، سکانس ژن نیز تأیید شد.



شکل ۵. PCR ژن CNTF پس از الحاق
ستون ۱: مارکر 100BP
ستون ۲: ژن CNTF

شکل ۴. هضم آنزیمی به وسیله Xho, Hind III I
ستون ۱ و ۶: مارکر 100BP
pEGFP-N1-CNTF

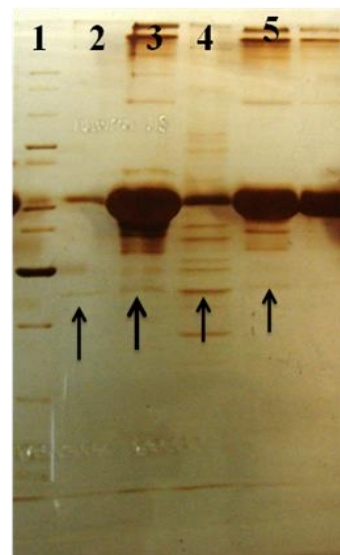
شکل ۳. Colony PCR محصول الحاق
ستون ۱ و ۷: مارکر 100BP
ستون ۲، ۳، ۵ و ۶: نمونه‌های مثبت
ستون ۴: نمونه منفی



شکل ۱۰. RT-PCR ژن CNTF پس از ترانسفکت



شکل ۹. western blotting CNTF



شکل ۸. SDS PAGE ژن

پس از انجام ترانسفکشن به منظور بررسی بیان ژن از روش RT-PCR استفاده شد. RNA سلول‌های ترانسفکشن شده استخراج و پس از انجام روند تیمار با I Dnase (Invitrogen) از آن cDNA تهیه شد و cDNA حاصل به عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱۰)؛ همچنین از سلول‌های ترانسفکشن شده توسط ProteoJET™ Mammalian cell Lysis reagent Kit - Fermentas لیز شدند و پس از جداسازی پروتئین برای ارزیابی بیان CNTF مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۸ و ۹).

نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل توالی و سکانس نشان داد که در پلاسمید pSecTag2/HygroA-human CNTF ژن مورد نظر یعنی CNTF حاوی توالی صحیحی بوده، تطابق کامل با توالی ژن مورد نظر در بانک ژن را دارد. در آنالیز پروتئین‌های جدا شده از سلول‌های ترانسفکشن شده پایدار با روش SDS-PAGE، باندی حدود ۲۴ کیلودالتون مشاهده شد که با آنتی‌بادی مونوکلونال در آنالیز وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت؛ در پایان اینچنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از سلول‌های بنیادی و وکتورهای غیرویروسی ترشح‌کننده عوامل نوروتروفیک، راهکاری بالقوه و مؤثر در درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی به‌شمار می‌آید.

بحث

نوروتروفین‌ها اغلب پروتئین‌های ترشحی هستند که نقشی مهم را در بقا، تمایز و رشد و شاخه‌دهی اکسون‌ها به سمت اهداف سلولی‌شان برای ایجاد سیناپس شیمیایی بازی می‌کنند. پروتئین CNTF، یکی از اعضای خانواده نوروتروفین‌ها است که توسط آستروسیت‌های منطقه SVZ (subventricular zone) و شکنج دندانه‌دار (dentate gyrus) در مجاورت نورون‌های دوپامینرژیک بیان می‌شود و از این طریق، نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی را تقویت می‌کند (۱۷)؛ این نوروتروفین در بیان

ژنی بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت دارد. در دهه گذشته از عوامل نوروتروفیک به منظور درمان بیماری‌ها، به خصوص ضایعات مغزی استفاده شده است. هدف از این مطالعه، سبب کلونینگ و ترانسفکشن سلول‌های BMSCs با استفاده از وکتور pSecTag2/HygroA-CNTF به منظور افزایش بیان این مؤلفه نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بود که به طور گسترده‌ای کاربرد بالینی دارد. دلیل انتخاب پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه، یعنی pSecTag2/Hygro-A قدرت بیان بالای آن و مناسب بودن آن برای بیان پروتئین‌هایی که سنتز آنها روی شبکه آندوپلاسمی خشن صورت می‌گیرد، بوده است.

تا به امروز، انتقال ژن با دو روش ویروسی و غیرویروسی صورت گرفته است. در این تحقیق از وکتور غیرویروسی و با استفاده از پلیمر با بار مثبت ترانسفکشن صورت گرفت. مزیت‌های روش غیرویروسی بر روش ویروسی، شامل «هزینه پایین و تولید راحت وکتور حامل ژن دلخواه» است؛ علاوه بر این، ثابت شده است که روش ویروسی سبب تحریک دستگاه ایمنی فرد و واکنش‌های جانبی ناخواسته می‌شود (۱۹ و ۲۰). سیستم بیانی باکتریایی با وجود مزیت‌هایی در بیان و سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم‌هزینه بودن، به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری و تغییرات پس از ترجمه (Post translation modifications) برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی نظیر پروتئین CNTF چندان مناسب به نظر نمی‌رسد و بنابراین از مزایای سیستم‌های یوکاریوتی اصلاحات پس از ترجمه است و از این نظر، این وکتور برای تولید بالای پروتئین‌های یوکاریوتی منحصر به فرد است؛ از جانب دیگر در سیستم باکتریایی به خالص‌سازی و سپس تزریق مداوم پروتئین درمانی نیاز است. در این تحقیق از سلول‌های BMSCs استفاده شد که این سلول‌های بنیادی، توسط دیگر محققان به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در اغلب تحقیق‌های بیولوژیک و پزشکی استفاده شده‌اند (۲۱)

نیازنیست؛ بنابراین در این پژوهش، سلول‌های BMSCs پایداری از نظر بیان CNTF ایجاد شدند که از این سلول‌های ایجاد شده می‌توان برای ترانسپلنت در بافت آسیب‌دیده استفاده کرد که گامی مهم در درمان بیماری‌های عصبی به حساب می‌آید.

منابع

- Godinho MJ, Teh L, Pollett MA, Goodman D, Hodgetts SI, Sweetman I. Immunohistochemical, Ultrastructural and Functional Analysis of Axonal Regeneration through Peripheral Nerve Grafts Containing Schwann Cells Expressing BDNF, CNTF or NT3. *PLoS One* 2013;8(8):e69987.
- Kaplan GB, Vasterling JJ, Vedak PC. Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behav Pharmacology* 2010;21(5-6):427-37.
- Ramu J, Bockhorst KH, Grill RJ, Mogatadakala KV, Narayana PA. Cortical reorganization in NT3-treated experimental spinal cord injury: Functional magnetic resonance imaging. *Experimental Neurology* 2007;204(1):58-65.
- Wang Y, Gu J, Wang J, Feng X, Tao Y, Jiang B. BDNF and NT-3 expression by using glucocorticoid-induced bicistronic expression vector pGC-BDNF-IRES-NT3 protects apoptotic cells in a cellular injury model. *Brain Research* 2012;1448:137-43.
- Bartus RT, Baumann TL, Siffert J, Herzog CD, Alterman R, Boulis N, et al. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology* 2013; 80(18):1698-701.
- Kauper K, McGovern C, Sherman S, Heatherston P, Rapoza R, Stabila P, et al. Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(12):7484-91.
- Patel NK, Gill SS. GDNF delivery for Parkinson's disease. *Acta Neurochirurgica Supplement* 2007; 97(Pt 2):135-54.
- Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. *Experimental Cell Research*. 2012;318(11):1221-8.
- Moris G, Vega JA. [Neurotrophic factors: basis for their clinical application]. *Neurologia* 2003;18 (1):18-28.
- Selvaraj BT, Sendtner M. CNTF, STAT3 and new therapies for axonal degeneration: what are they and what can they do? *Expert Rev Neurother* 2013; 13(3):239-41.
- Li T, Vallada H, Bell R, Liu X, Xie T, Collier DA. CNTF and psychiatric disorders. *Nature Genetics* 1996; 13(2):143-4.
- Dubovy P, Raska O, Klusakova I, Stejskal L, Celakovsky P, Haninec P. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneous nerve in an experimental model of end-to-side neurotrophic. *BMC Neuroscience* 2011; 12:58.
- Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, Tabares L, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2010 1586-973:(6)19.
- Huang S, Wang F, Hong G, Wan S, Kang H. Protective effects of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2002; 22(2):148-51.
- Xu JJ, Chen EY, Lu CL, He C. Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. *Clinical Neurosci J*. 2009; 16(6): 812-7.
- Mori M, Jefferson JJ, Hummel M, Garbe DS. CNTF: a putative link between dopamine D2 receptors and neurogenesis. *Neurosci J*. 2008; 28(23):5867-9.
- Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *Neurosci J*. 2008; 28(9):223. 41-1.
- Ye J, Cao L, Cui R, Huang A, Yan Z, Lu C, et al. The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. *Brain Resarch J*. 2004; 997(1):30-9.
- Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P, Chiocca EA, Viapiano MS. Strategies in gene therapy for glioblastoma. *Cancers (Basel) J*. 2013; 5(4): 1271-305.

20. Guo X, Huang L. Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(7):971-9.
21. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad AR, Sadeghi Zadeh M, Taheri T. Bone Marrow Stromal Cell Transdifferentiation into Oligodendrocyte-Like Cells Using Triiodothyronine as a Inducer with Expression of Platelet-Derived Growth Factor α as a Maturity Marker. *Iranian Biomedical J*. 2013; 17(2): 62–70.
22. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering :limitations and recent advances. *Annals of Biomedical Engineering J*. 2004; 32(1):160-5.
23. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatric Transplantation J*. 2003;7 Suppl 3:86-8.

Transfection of BMSCs by pSec-TAG-A-CNTF for spinal cord injury

HojjatAllah Abbaszadeh¹, Taki Tirahi^{2*}, Ali Noori-Zadeh³, Majid Sadeghizade⁴, Alireza Azizzadeh Delshad⁵, Taher Taheri³, Hadi Kazemi³

1. Dept. Anatomical Sciences, School of Medical Science, Ilam Medical Sciences University and Shefa Neuroscience Research Center of Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.

2. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.

4. Department of Genetics, Faculty of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

5. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: ttirahi@modares.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) was originally described as a trophic factor supporting the survival of ciliary ganglion neurons *in vitro*. CNTF can also promote the survival and differentiation of a variety of nerve cells including sensory, motor, autonomic neurons and oligodendrocytes. To enhance the neurotrophic effect of BMSCs, the CNTF-pSec-tag 2 /hygro A plasmid was constructed and transferred into BMSCs by lipofectamin.

Materials and Methods: Plasmid CNTF-pSec-tag 2 /hygro A was constructed and verified by sequencing. BMSCs were transfected by lipofectamin. The transcription of the gene was evaluated by RT-PCR and real time PCR, and the expression of protein was evaluated by western blotting and ELISA.

Results: CNTF-pSec-tag 2 /hygro A plasmid was correctly verified. After transfection, the transcription of CNTF gene and the expression of CNTF protein were proven by RT-PCR, western blotting and ELISA.

Conclusion: CNTF-pSec-tag 2 /hygro A plasmid was correctly constructed and BMSCs were successfully transfected by transfection and CNTF-pSec-tag 2 /hygro A protein can be expressed well, which is a good foundation for future studies on the transplantation of gene-modified BMSCs to promote spinal cord regeneration.

Keywords: Transfection, Subcloning, CNTF, BMSCs