Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

دانشور پزشکی

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

تراسفکشن پایدار سلول‌های استرومایی مغز استخوان توسط وکتور pSecTag2/HygroA-CNTF به‌منظور استفاده در درمان ضایعات نخاعی

نویسندگان: حجت‌اله عباس‌زاده[۱]، تقی طریحی*[۲]، علی نوری‌زاده[۳]، مجید صادقی‌زاده[٤]، علیرضا عزیززاده دلشاد[٥]، طاهر طاهری[٦]، 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

٤. استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

٥. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

٦. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران

۷. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تقی طریحی **E-mail: ttiraihi@modares.ac.ir**

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۹
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۱/۰۶
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۰۸

چکیده

مقدمه و هدف: ژن (CNTF) که یکی از اعضای خانواده ژن‌های نوروتروفیک است، در محافظت بقا گانگلیون‌های سیلیاری و نورونی شرکت‌دارد. CNTF تمایز و بقای گونه‌های مختلف نورون‌های حسی، حرکتی، اتونوم و الیگودندروسیت‌ها را افزایش‌می‌دهد. به‌منظور 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 بررسی‌شد.

نتایج: سکانسینگ نشان‌داد 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 تأییدشد.

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

واژگان کلیدی: ترانسفکشن، ساب کلونینگ، BMSCs ، CNTF

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

مقدمه

استفاده از عوامل محافظت‌کننده نورون‌ها و سلول‌های گلیالی، سال‌هاست که به‌وسیله محققان مختلف مورد آزمایش و بررسی قرارگرفته‌است؛ از این عوامل محافظ و ارتقادهنده رشد و تقسیم سلولی که به‌صورت طبیعی توسط سلول سنتزمی‌شوند، می‌توان مؤلفه‌های رشد را نام‌برد. آزمایش‌های مختلف در مدل‌های تجربی حیوانات اثر حفاظتی عوامل رشد در بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مانند سکته‌های مغزی یا ضربات وارده به مغز و بیماری‌های مخرب عصب (نرودژنراتیو) مانند ضایعات نخاعی را اثبات‌کرده‌اند (٤-١)؛ بعضی از این مؤلفه‌های رشد مانند خانواده نوروتروفین‌ها مورد آزمون‌های بالینی قرارگرفته‌اند (٧-٥). نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقا، تمایز و مرگ جمعیت‌های مختلف از نورون‌ها ازجمله نورون‌های حسی و حرکتی را تنظیم‌می‌کنند (٨ و٩). آزمایش‌های مختلف، اثر تروفیک این عوامل را در رشد سیستم عصبی نشان‌داده‌اند. یکی از اعضای خانواده فاکتورهای نوروتروفیک Ciliary neurotrophic factor (CNTF) است که در سلول‌های گلیال سیستم اعصاب محیطی و مرکزی بیان‌می‌شود؛ این نوروتوروفین در بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت‌دارد (١٠). پژوهشگران معتقدند که میان جهش و پلی‌مورفیسم‌های ژن CNTF و بسیاری از اختلال‌های روحی سیستم عصبی، ارتباط وجوددارد (١١). در آزمون‌های بالینی از این مؤلفه در درمان بیماری مزمن مخرب شبکیه (chronic retinal degenerative diseases) استفاده‌شده‌است (٦).

مطالعات اخیر پیشنهادمی‌کنند که CNTF در احیای مجدد ارتباط عصب با عضله، دارای نقشی برجسته است (١٤-١٢)؛ همچنین با اثر روی نورون‌های آسیب‌دیده در ضایعات سیستم عصبی مرکزی و محیطی، سبب بقای نورون‌ها و سلول‌های گلیال می‌شود (١٨-١٥). هدف ما در این مطالعه، ایجاد سلول‌های بنیادی با بیان پایدار CNTF به‌منظور کاربردهای درمانی در بیماری‌های مخرب سیستم عصبی ازجمله ضایعات نخاعی بود و برای نیل به این هدف بر آن شدیم که با ساب کلونینگ و ترانسفکت 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 ترانسفورم‌شد. باکتری‌های ترانسفورم‌شده در محیط لوریا برتانی (LB) در داخل انکوباتور کشت‌داده‌شدند و به محیط کشت حاوی باکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد که با توجه به وجود ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در وکتور مبدأ باکتری‌های ترانسفورم‌نشده امکان رشد پیدانمی‌کردند. پس از ١٨ ساعت، باکتری‌های ترانسفورم‌شده رشدکرده، از انکوباتور خارج شدند و برای استخراج پلاسمید آماده شدند. استخراج با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (High pure plasmid isolation- Fermntas) انجام‌شد. به‌منظور تأیید وجود ژن روی وکتور حامل از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های Not I و EcoRV به‌صورت تک‌آنزیمی و دوآنزیمی استفاده‌شد؛ سپس محصولات استخراج پلاسمید و هضم‌های آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورزشد.

پرایمر مناسب برای جداسازی توالی ژن CNTF از وکتور حامل طراحی‌شد و به‌این‌ترتیب از پلاسمید به‌عنوان الگو استفاده‌شد؛ به‌منظور تکثیر ژن از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی به‌صورت سی سیکل ٩٥ درجه ٦ دقیقه، ٥٨ درجه ١ دقیقه و ٧٢ درجه ١ دقیقه و یک سیکل نهایی ٧٢ درجه ١٠ دقیقه و ٢٥ درجه ٥ دقیقه استفاده‌شد. لازم به اشاره است که به هدف بهینه‌کردن اتصال پرایمر به الگو به‌منظور انجام PCR، ابتدا دماهای مختلف آزمایش‌شدند و درنهایت، دمای ٦٢ درجه سانتی‌گراد برای قطعه مورد نظر به‌عنوان دمای بهینه انتخاب‌شد. جفت پرایمرها طوری طراحی‌شدند که

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

سایت‌های برشی در ابتدا و انتهای ژن قرارگیرند. قطعه ژنی که با PCR تکثیرشده بود با استفاده از کیت (clean up gene kit- roch) خالص‌سازی‌شد. در ادامه باکتری ترانسفورم‌شده با وکتور بیانی (pSecTag2/HygroA از شرکت Invitrogen) به‌منظور تکثیر در محیط لوریا برنانی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت‌داده‌شد و با استفاده از آنزیم‌های EcoRV و Not I خطی شد؛ سپس قطعه ژنی یادشده طی فرایند الحاق (ligation) به وکتور مورد نظر با استفاده از کیت(T4 DNA ligase-Fermentas) وارد شد؛ روز بعد باکتری DH5α مستعد به‌وسیله محصول الحاق ترانسفورم‌شد؛ سپس، محصول الحاق، روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت‌داده‌شد؛ درنهایت به‌منظور تشخیص کلونی صحیح از کلونی‌های رشدیافته، روش Colony PCR به‌کاررفت؛ در این مرحله، کلون‌های رشدکرده روی پلیت به‌وسیله سمپلر برداشته‌شدند و همراه با پرایمرهای فوروارد و ریورس و آنزیم Taq DNA polymerase به میکروتیوب وارد شده، در دستگاه ترموسایکلر قرارگرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورزشد و نمونه‌های مثبت که باندی مشخص را ایجادکرده‌بودند به محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین به‌منظور تکثیر کشت‌داده‌شدند؛ روز بعد، وکتور نوترکیب توسط کیت (High pure plasmid – Fermentas) isolation kit تخلیص‌شد؛ در ادامه، تجزیه‌وتحلیل آنزیمی پلاسمید نوترکیب به‌وسیله دو آنزیم و با بافر مشترک انجام‌گرفت؛ محل اثر این دو آنزیم روی پلاسمید در دو سوی قطعه insert شده قرارداشت. نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و کل نمونه‌ها روی ژل الکتروفورزشدند. پلاسمیدی که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان‌داده‌بودند برای تأیید نهایی، یعنی سکانس و تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال به شرکت ژن فناوران فرستاده‌شد؛ سپس نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast برای تطابق با ژن‌های موجود در بانک ژنتیکی بررسی‌شد.

ترانسفکشن

به‌منظور انتقال ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتی از روش ترانسفکشن استفاده‌شد. ترانسفکشن در ظروف کشت شش خانه که ۲٤ تا ٤۸ ساعت پیش در آن سلول کشت‌داده‌شده‌بود، صورت‌گرفت. در زمان ترانسفکت تعداد سلول‌ها به ۵ ۱۰×۳ در هر چاهک رسید. ترانسفکشن با استفاده از مواد پلیمری با بار مثبت انجام‌شد و درحقیقت، این روند به‌وسیله کیت توربوفکت (TurboFect Transfection Reagent-Fermentas) بدین صورت انجام‌شد: یک میکروگرم از DNA پلاسمیدی را به ۳۵۰µL از محیط فاقد سرم اضافه‌کرده، اجازه‌دادیم تا اینکه ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی‌بماند؛ به‌طور هم‌زمان ۱۰µL از توربوفکت را به ۳۵۰µL به محیط افزوده، این مخلوط نیز به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط باقی‌ماند؛ پس از گذشت مدت ۳۰ دقیقه، محتوای این دو تیوب را با یکدیگر مخلوط‌کرده، اجازه‌دادیم تا به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی‌بماند؛ پس از گذشت این زمان، محتوای میکروتیوب را روی سلول‌ها ریخته، به‌مدت ٤ ساعت این سلول‌ها در انکوباتور قرارداده‌شدند؛ درنهایت به این سلول‌ها محیط کشت به اضافه سرم اضافه شد و سپس ٤۸ ساعت در انکوباتور قرارداده‌شد. پس از ترانسفکت‌کردن محیط کشت سلول‌ها در روز بعد از ترانسفکت تعویض‌شد؛ پس از باقی‌ماندن سلول‌های ترانسفکت در یک غلظت مناسب (۱۵۰µg/ml) از آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین به سلول‌های باقی‌مانده اجازه‌داده‌شد رشدکنند و هر دو روز یک‌بار، محیط کشت سلول‌ها با محیط تزه حاوی غلظت بیان‌شده هیگرومایسین تعویض‌می‌شد.

وسترن بلاتینگ

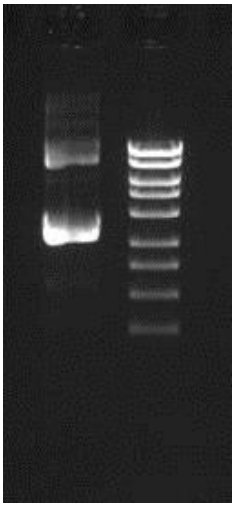
با استفاده از کیت ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent-Fermentas پروتین سلولی استخراج و غلظت پروتئین توسط روش برادفورد تعیین‌شد. برای بررسی بیان پروتئین CNTF در BMSCs از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ استفاده‌شد. وسترن بلاتینگ برپایه

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

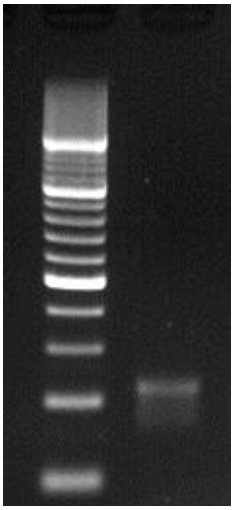
واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی است؛ در این روش، ابتدا بلاتینگ پروتئین‌ها انجام‌می‌شود که در این روند، باندهای پروتئینی از ژل SDS-PAGE به غشای مخصوص منتقل می‌شوند. درعمل بلاتینگ مولکول‌های پروتئین از زمینه ژل، خارج و در سطح غشا در همان موقعیت قرارمی‌گیرند. برای شناسایی پروتئین‌های منتقل‌شده به غشا می‌توان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده‌کرد؛ در این پژوهش ابتدا با روش SDS-PAGE باندهای پروتئین سلولی از یکدیگر جدا شدند؛ سپس در وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی CNTF مجاور و نتایج بررسی‌شدند.

یافته‌ها

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



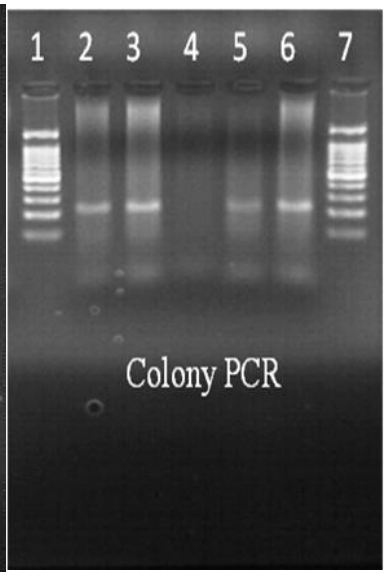
شکل۱. محصولات استخراج پلاسمید



شکل۲. PCR ژن CNTF

سپس فرایند امپلیفیکاسیون محصول PCR به‌وسیله هضم آنزیمی به‌منظور ایجاد انتهای چسبنده آماده شد و با استفاده از کیت Clean up-Qiagen خالص‌سازی‌شد؛ همچنین وکتور بیانی pSecTag2/HygroA با کشت در محیط لوریا برتانی تکثیریافته، با فرایند هضم توسط آنزیم Hind III خطی شد و برای فرایند الحاق آماده شد (شکل ٤). برای انجام فرایند الحاق، ظرف واکنش در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٤ ساعت انکوبه‌شد و سپس به مرحله ترانسفورم، وارد شد و محصول ترانسفورم روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت‌داده‌شد. کلونی‌های مثبت جدا و با استفاده از Colony PCR از نظر صحت الحاق ژن تأییدشدند (شکل ۳) و سپس در محیط لوریا برتانی حاوی آمپی‌سیلین کشت‌داده‌شده، استخراج پلاسمید انجام‌گرفت؛ پس از تجزیه‌وتحلیل آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های XhoI و Hind III، واکنش PCR انجام‌گرفت (شکل ۵) و نتایج حاکی از

موفقیت ساب کلونینگ بود و درنهایت، سکانس ژن نیز تأییدشد.



شکل ۳. Colony PCR محصول الحاق

ستون ۷و۱: مارکر 100BP

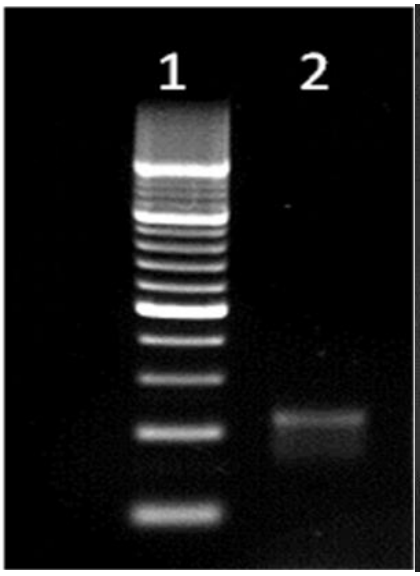
ستون۲، ۳، ۵و٦: نمونه‌های مثبت

ستون٤: نمونه منفی

شکل٤. هضم آنزیمی به‌وسیله Xho,Hind III I

ستون٦و۱:مارکر 100BP

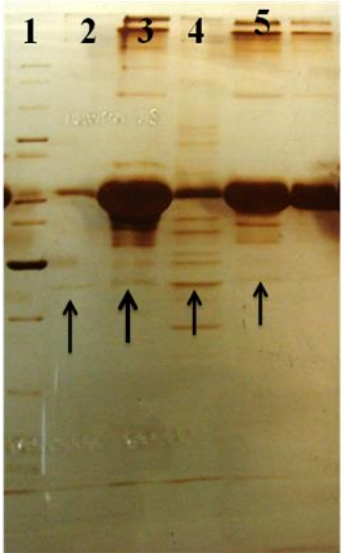
pEGFP-Nl-CNTF



شکل۵. PCR ژن CNTF پس از الحاق

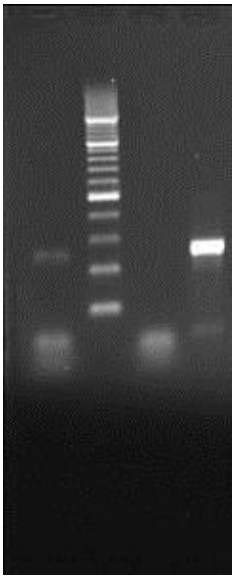
ستون۱:مارکر 100BP

ستون ۲: ژن CNTF



شکل ۸. SDS PAGE ژن

شکل ۹. western blotting CNTF



شکل ۱۰.RT-PCR ژن CNTF پس از ترانسفکت

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

پس از انجام ترانسفکت به‌منظور بررسی بیان ژن از روش RT-PCR استفاده‌شد. RNA سلول‌های ترانسفکت‌شده استخراج و پس از انجام روند تیمار با I Dnase (Invitrogen) از آن cDNA تهیه‌شد و cDNA حاصل به‌عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرارگرفت(شکل ۱۰)؛ همچنین از سلول‌های ترانسفکت‌شده توسط ProteoJET™ Mammalian cell Lysis reagent Kit – Fermentas لیزشدند و پس از جداسازی پروتئین برای ارزیابی بیان CNTF مورد بررسی قرارگرفتند (شکل‌های ۸ و۹).

نتیجه‌گیری

تجزیه‌وتحلیل توالی و سکانس نشان‌داد 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 جداشده از سلول‌های ترانسفکت‌شده پایدار با روش SDS-PAGE، باندی حدود ۲٤ کیلودالتون مشاهده‌شد که با آنتی‌بادی‌مونوکلونال در آنالیز وسترن بلات مورد تأیید قرارگرفت؛ در پایان اینچنین می‌توان‌نتیجه‌گیری‌کرد که استفاده از سلول‌های بنیادی و وکتورهای غیرویروسی ترشح‌کننده عوامل نوروتروفیک، راهکاری بالقوه و مؤثر در درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی به‌شمارمی‌آید.

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 بازی‌می‌کنند. پروتئین CNTF، یکی از اعضای خانواده نوروتروفین‌ها است که توسط آستروسیت‌های منطقه SVZ (subventricular zone) و شکنج دندانه‌دار (dentate gyrus) در مجاورت نورون‌های دوپامینرژیکی بیان‌می‌شود و از این طریق، نوروژنز در دستگاه عصبی مرکزی را تقویت‌می‌کند (۱۷)؛ این نوروتوروفین در بیان ژنی بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت‌دارد. در دهه گذشته از عوامل نوروتروفیک به‌منظور درمان بیماری‌ها، به‌خصوص ضایعات مغزی استفاده‌شده‌است. هدف از این مطالعه، ساب‌کلونینگ و ترانسفکت سلول‌های BMSCs با استفاده از وکتور pSecTag2/HygroA- CNTF به‌منظور افزایش بیان این مؤلفه نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بود که به‌طور گسترده‌ای کاربرد بالینی دارد. دلیل انتخاب پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه، یعنی pSecTag2/Hygro-A قدرت بیان بالای آن و مناسب‌بودن آن برای بیان پروتئین‌هایی که سنتز آنها روی شبکه آندوپلاسمی خشن صورت‌می‌گیرد، بوده‌است.

تابه‌امروز، انتقال ژن با دو روش ویروسی و غیرویروسی صورت‌گرفته‌است. در این تحقیق از وکتور غیرویروسی و با استفاده از پلیمر با بار مثبت ترانسفکشن صورت‌گرفت. مزیت‌های روش غیرویروسی بر روش ویروسی، شامل «هزینه پایین و تولید راحت وکتور حامل ژن دلخواه» است؛ علاوه‌براین، ثابت شده‌است که روش ویروسی سبب تحریک دستگاه ایمنی فرد و واکنش‌های جانبی ناخواسته می‌شود (۱۹ و۲۰). سیستم بیانی باکتریایی با وجود مزیت‌هایی در بیان و سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم‌هزینه‌بودن، 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 به‌نظرنمی‌رسد و بنابراین از مزایای سیستم‌های یوکاریوتی اصلاحات پس از ترجمه است و از این نظر، این وکتور برای تولید بالای پروتئین‌های یوکاریوتی منحصربه‌فرد است؛ ازجانب‌دیگر در سیستم باکتریایی به خالص‌سازی و سپس تزریق مداوم پروتئین درمانی نیازاست. در این تحقیق از سلول‌های BMSCs استفاده‌شد که این سلول‌های بنیادی، توسط دیگر محققان به‌طور گسترده مورد مطالعه قرارگرفته‌اند و در اغلب تحقیق‌های بیولوژیک و پزشکی استفاده‌شده‌اند (۲۱

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

و۲۳)؛ بدین‌ترتیب که وکتور حامل ژن CNTF به سلول‌های BMSCs وارد شد و سپس با افزودن آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین به محیط کشت سلول‌های پایدار از نظر بیان این پروتئین غربال‌شدند. ازآنجاکه سلول‌های مورد نظر سلول‌های بنیادی هستند و توانایی تقسیم‌های پیاپی دارند با ترانس پلانت‌کردن چنین سلول‌هایی، دیگر به تزریقات مجدد فاکتور نوروتروفیک نیازنیست؛ بنابراین در این پژوهش، سلول‌های BMSCs پایداری از نظر بیان CNTF ایجادشدند که از این سلول‌های ایجادشده می‌توان برای ترانسپلنت در بافت آسیب‌دیده استفاده‌کرد که گامی مهم در درمان بیماری‌های عصبی به‌حساب‌می‌آید.

منابع

1. 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.
2. 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. Behavir Pharmacology 2010;21(5-6):427-37.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Kauper K, McGovern C, Sherman S, Heatherton 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.
7. Patel NK, Gill SS. GDNF delivery for Parkinson's disease. Acta Neurochirurgica Supplement 2007; 97(Pt 2):135-54.
8. Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. Experimental Cell Research. 2012;318(11):1221-8.
9. Moris G, Vega JA. [Neurotrophic factors: basis for their clinical application]. Neurologia 2003;18 (1):18-28.
10. 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.
11. Li T, Vallada H, Bell R, Liu X, Xie T, Collier DA . CNTF and psychiatric disorders. Nature Genetics 1996; 13(2):143-4.
12. 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 neurorrhaphy. BMC Neuroscience 2011; 12:58.
13. 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.
14. Huang S, Wang F, Hong G, Wan S, Kang H. Protective effects of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2002; 22(2):148-51.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P, Chiocca EA, Viapiano MS. Strategies in gene therapy for glioblastoma. Cancers (Basel) J. 2013; 5(4): 1271-305.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:22 IRST on Tuesday October 17th 2017

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
21st Year, No.110
April- May, 2014

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

HojjatAllah Abbaszadeh[1], Taki Tirahi[2]*, Ali Noori-Zadeh[3], Majid Sadeghizade[4], Alireza Azizzadeh Delshad[5], Taher Taheri[3], Hadi Kazemi[3]

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: ttiraihi@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

Received: 2014/01/29
Last revised: 2014/03/26
Accepted: 2014/03/29