مقاله اصیل پژوهشی

پیشگیری از بیان ژن VEGFR-1 در محیط کشت، با استفاده از به‌کارگیری siRNA اختصاصی در درمان نئوواسکولاریزاسیون چشم

علی زارعی محمودآبادی[۱]، معصومه معصومی کریمی[۲]، مجید بهابادی[۳]، مهدی کمالی[۴]، رضاکوشکی[۵]، فریبا خلیلی[۵]، نیما فرهادی[۵]، مصطفی نادری[۶]، سامان سجادی[۷]، مسلم جعفری ثانی[۸]، جواد علیزاده[۹]

چکیده

زمینه و هدف: آنژیوژنز، از مهمترین فرایندهای زیستی است که هر گونه اختلال در آن، به بیماری منجر می‌شود. نقطه اصلی در هدایت سیگنالینگ این فرایند، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است که از طریق رسپتورهایش اعمال اثر می‌کند. مطالعه حاضر، در جهت مهار بیان رسپتور تیپ I این فاکتور (VEGFR-1)، با استفاده از siRNA اختصاصی در محیط کشت، به منظور استفاده از تأثیر مهاری آن در درمان نئوواسکولاریزاسیون چشم صورت گرفته است.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، ابتدا با استفاده از توالی ژن هدف، توالی‌های siRNA اختصاصی، علیه آن طراحی، Blast و ساخته شد. از طرف دیگر، cDNA سلول HUVEC، سنتز و ژن هدف، با کمک پرایمر اختصاصی VEGFR1 و PCR، به میزان مورد نیاز تکثیر شد؛ سپس در وکتور بیانی PEFGP-N1، کلون و تأیید شد. پلاسمید ناقل حاصل، با استفاده از لیپوفکتامین، به سلول Hela که فاقد بیان ژن هدف بود، انتقال داده شد. میزان بیان GFR در وکتور اولیه و وکتور کلون‌شده، در حضور و عدم حضور siRNA اختصاصی علیه VEGFR1 مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان مهار ژن، از طریق ارزیابی کاهش فلورسانس سبز رنگ ناشی از GFP، وسترن بلات و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، با استفاده از آزمون تی‌تست، مورد آنالیز قرار گرفت و $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فلورسانت ناشی از اثر siRNA در گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول حاوی وکتور مواجهه یافته با هر دو نوع siRNA، کاهش میزان پروتئین را نشان داد. نتایج حاصل از دو siRNA به کاررفته، بیانگر کاهش بیان ژن در سطح رونویسی و ترجمه در مقایسه با گروه کنترل بود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: siRNA اختصاصی طراحی‌شده علیه VEGFR-1، با استفاده از لیپوفکتامین، به طور مناسب به داخل سلول منتقل و از بیان رسپتور، به طور معنی‌دار جلوگیری نمود؛ لذا احتمالاً به عنوان یک فاکتور مناسب درمانی جدید، در جلوگیری و یا کاهش نئوواسکولاریزاسیون در چشم، مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: VEGFR-1، siRNA، نئوواسکولاریزاسیون، HUVEC، RT-PCR

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۱؛ ۱۹ (۳): ۲۵۵-۲۶۵

دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۱۰

[۱] دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۲] کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
[۳] کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۴] دکتری بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۵] کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۶] فوق تخصص قرنیه، گروه چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[۷] کارشناس بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۸] نویسنده مسؤول، دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
آدرس: تربت حیدریه- خیابان رازی- دانشکده علوم پزشکی تربت حیدریه- گروه بیوشیمی
تلفن: ۰۹۳۶۵۹۹۸۴۲۶ فکس: ۰۵۳۱-۲۲۴۲۰۳۸ پست الکترونیکی: moslem.jafarisani@gmail.com
[۹] کارشناس ارشد نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.

مقدمه

آنژیوژنز، از مهمترین فرایندهای زیستی است که هرگونه اختلال در آن، به بیماری منجر می‌شود. نقطه اصلی در هدایت سیگنالینگ این فرایند، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است که از طریق رسپتورهایش اعمال اثر می‌کند. ایجاد رگ‌های جدید و کنترل‌نشده در چشم، به عنوان یک فرایند مهم در پاتوژنز انواع مختلف بیماری‌های چشمی از جمله: کراتیت با منشأ ویروس هرپسHSV، رتینوپاتی دیابتی و دژنراسیون مولکولی وابسته به سن و همچنین ضایعات و صدمات شیمیایی و فیزیکی دیده می‌شود (۱). این ضایعه، همچنین به وسیله الیگودزوکسی نوکلئوتیدهای فعال زیستی حاوی CPG نیز ایجاد می‌شود (۲) که روند درمان این بیماری‌های چشمی، سخت بوده و غالباً موفقیت‌آمیز نیست و نهایتاً به کوری منجر می‌شود (۱). از جمله دیگر ظواهر پاتولوژیک آنژیوژنز، توسعه عروق خونی در محل رشد توده بدخیم سرطانی می‌باشد.

مولکول‌های مختلفی مانند: نوروفیلین، آنژِوژنین، اینترلوکین‌های ۶ و ۸، MCP-1، TGF-β[1]، HIF-α[2]، مسئول رگزایی در اختلالات مختلف می‌باشند که همگی به نوعی با VEGF[3] در ارتباط هستند (۳). مطالعات اخیر، نشان داده است که پروتئین VEGF و رسپتورهای آن، به عنوان نقاط کلیدی در القا و یا مهار نئوواسکولاریزاسیون، در سلول‌های توموری هستند (۴). القای فاکتور VEGF و مولکول‌های وابسته، منجر به رگزایی و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، موجب مهار و یا تخریب آن و کاهش القای رگ‌سازی می‌شود (۵).

VEGF در شرایط آزمایشگاهی، تبدیل سلول‌های آندوتلیال را به شریان، ورید و حتی عر ق لنفاوی تحریک می‌کند(۶). وجود VEGF و مکانیسم‌های وابسته، نقش مهمی در القای حیات و جلوگیری از آپپتوزیز در شرایط آزمایشگاهی و بالینی داشته است (۷). جلوگیری از آپپتوزیز با القای سنتز پروتئین‌های BCL-2 و A1 در سلول‌های آندوتلیال همراه می‌باشد (۸).

VEGF، یک خانواده از فاکتورهای رشد پپتیدی هستند که بر عروق خونی تأثیر دارند. ژن VEGF انسانی، پنج ایزوفرم مختلف پروتئینی تحت عناوین ۱۸۹، ۱۶۵، ۱۴۵، ۱۲۱و ۲۰۶ تولید می‌کند که بسته به بافت مترشحه، به نام‌های VEGF-A,B,..., VEGF-E نامگذاری شده‌اند (۹). این مولکول‌ها نیز مانند سایر مدیاتورهای پروتئینی، اثرات بیولوژیک خود را از طریق اتصال به رسپتور خود در سطح سلول آندوتلیال اعمال می‌کند. تاکنون سه رسپتور شناسایی شده‌است که با انواع مختلف VEGF واکنش می‌دهند و بر اساس مرتبه کشف، نامگذاری شده‌اند. این رسپتورها عبارتند از: VEGFR1 (FLT1)(fms Like Tyrosine Kinase)، VEGFR2 (FLK1)(Fetal Liver Kinase)، VEGFR3 (FLT4)، KDR (Kinase inserts Domain-containing Receptor) که البته نوع یک در دو واریانت کد می‌شود (۱۰). این رسپتورها از ابر خانواده رسپتورهای تیروزین کیناز هستند که دارای یک‌دومین واحد ترانس ممبران می‌باشند. ناحیه خارج سلولی آن، دارای ۷ دومین شبه ایمونوگلوبولینی است و دومین داخل سلولی، با خاصیت اتوفسفریلاسیونی تیروزین می‌باشد (۱۰).

تمامی VEGFRها شدیداً همولوگ هستند (۱۰). رسپتورهای نوع ۱ و ۲، دارای افینیتی بالا برای VEGF بوده که خصوصاً در قرنیه و شبکیه بیان می‌شوند. حذف هتروزیگوت ژنVEGF، منجر به مرگ جنین موش، بین روزهای ۸ و ۹ می‌گردد که ناشی از اختلال آنژیوژنز و نیز تشکیل جزایر خونی است که در بررسی میکروسکوپی، قابل مشاهده است (۱۱). حذف هموزیگوت VEGFR2 نیز منجر به مرگ جنین در روزهای ۸ و۹ شده، اما در حذف هموزیگوت VEGFR1، افتراق آندوتلیالی صورت گرفته است؛ هرچند کانال‌های وریدی که تشکیل می‌شوند غیر طبیعی هستند و لذا حیوان در دوره جنینی فوت می‌کند.VEGF، به عنوان یک

[1] *Tumor Growth Factor*
[2] *Hypoxia Induced Factor*
[3] *Vaso- Endothelial Growth Factor*

مدیاتور ایسکمی رتینال که منجر به نئوواسکولاریزاسیون می‌شود نیز مطرح است (۱۱، ۱۲). اخیراً از داروهایی نظیر آنتی‌بادی مونوکلونال، علیهVEGF به منظور درمان و جلوگیری از رگ‌سازی در تومورها استفاده می‌شود که به طور کامل، از رگ‌سازی جدید جلوگیری می‌کند (۱۳).

RNA کوچک مداخله‌گر (small interfering RNA SiRNA)، فرایند حفظ‌شده‌ای طی تکامل موجودات زنده است که به منظور کنترل بیان ژن، در مرحله ترجمه به‌کارگرفته می‌شود. این رشته کوچک RNA، با الگوی واتسون و کریک، به توالی mRNA اختصاصی باند شده و باعث فعال‌سازی کمپلکس خاموش‌گر RISC (RNA Induced Silencing Complex) می‌گردد که پیامد این فعال‌سازی، تخریب mRNA می‌باشد؛ لذا ژن در سطح ترجمه خاموش می‌شود (۱۴، ۱۵).

اخیراً با ساخت مولکول‌های siRNA اختصاصی، در جهت درمان بیماری‌های سرطانی و حتی عفونی و نیز ژنتیکی فعالیت‌هایی صورت گرفته است. مولکول‌های siRNA اختصاصی طراحی‌شده علیه یک mRNA، کارایی‌های مختلفی ار خود نشان می‌دهند؛ لذا در مرحله طراحی و سنتز، باید به نکاتی توجه کرد که در بهبود کارایی این مولکول، مؤثر است. از جمله می‌توان به محل قرارگیری، محتوای C، G و طول رشته اشاره کرد (۱۶).

از آنجا که عملVEGF، به بیان رسپتور ویژه آن در بافت بستگی دارد؛ لذا با بلاک و یا خاموش‌کردن ژن رسپتورها، می‌توان اثر آن را مهار نمود. از جمله ابزارهایی که می‌توان در راستای این هدف به کار برد، استفاده از SiRNA ویژه این رسپتورها می‌باشد که با اتصال اختصاصی به mRNA مربوطه، مکانیسم سلولی تخریب mRNA را فعال و از بیان ژن و در نهایت، سنتز پروتئین هدف جلوگیری می‌کند. از این طریق نه تنها می‌توان جلوی رگ‌سازی را گرفت؛ بلکه سلول اندوتلیال را وارد فاز آپوپتوز می‌کند.

هدف از انجام مطالعه حاضر، مهار بیان رسپتور تیپ I این فاکتور (VEGFR-1) با استفاده از siRNA اختصاصی، با استفاده از بررسی تغییرات بیان GFP (Green Fluorescent Protien) به عنوان اندیکاتور در محیط کشت است. امید است با مهار بیان این رسپتور، به توان رگزایی‌های ناخواسته در چشم را مهار و یا درمان کرد.

روش تحقیق

مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که طی آن، سه گروه سلول Hela مورد مطالعه قرار گرفتند: گروه کنترل که فقط وکتور کلون‌شده را به منظور تولید فلورسانت دریافت کردند و دو گروه تیمار که علاوه بر وکتور کلون‌شده، با استفاده از دو siRNA مختلف، به منظور بررسی میزان مهار بیان ژن مورد تیمار قرار گرفتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین هر یک گروه تیمار با گروه کنترل، با استفاده از آزمونt-test و بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۸)، مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. در این مطالعه، P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مواد

کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق، با درجه خلوص بالا از کمپانی‌های Merck و Sigma، با واسطه شرکت‌های داخلی خریداری گردید.

طراحی SiRNA (small interfering RNA)

در ابتدا توالی ژن VEGFR1 به عنوان ژن هدف، با استفاده از بانک ژن (NCBI) تهیه و به منظور بررسی جایگاه‌های مناسب جهت سنتز siRNA، مورد مطالعه قرار گرفت؛ سپس با استفاده از نرم‌افزارهای تخصصی آنلاین، توالی‌های siRNA اختصاصی علیه آن طراحی شد. در مرحله بعد siRNAهای مشترک، در بین محصول نرم‌افزارها شناسایی و پس از بررسی دستی خصایص و تطبیق با ژن هدف، در پایگاه NCBI، Blast شد و پس از تأیید ۱۰۰٪ اختصاصی‌بودن آن، فقط علیه ژن هدف ساخته شدند. توالی siRNAهای سنتزشده به صورت زیر بود:

Si-Sense1: 5'- GCA, UAA, CUA, AAU, CUG, CCU, G -3'

Si-AntiSense1: 5'- CAG, GCA, GAU, UUA, GUU, AUG, C -3'

Si-Sense2: 5'- GAA, GGA, AAC, AGA, AUC, UGC, A -3'

Si-AntiSense2: 5'- UGC, AGA, UUC, UGU, UUC, CUU, C -3'

کشت سلول و تهیه و تکثیر ژن مورد نظر

سلول اندوتلیال ورید بند ناف (HUVEC)، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در RPMI-1640 (pH=۷/۲) حاوی پن استرپ، رشد و تکثیر داده شد. سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، از نظر زنده‌بودن مورد بررسی قرار گرفتند و پس از اطمینان، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هایپوکسی، به منظور افزایش بیان ژن هدف انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، با استفاده از کیت تخلیص RNA محصول کمپانی Roche، RNA تام از سلول HUVEC تخلیص گشته و سریعاً به فریزر ۸۰- منتقل گردید؛ سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (RT-PCR) محصول کمپانی Roche، cDNA سنتز شد و با کمک پرایمر اختصاصی (توالی زیر)، علیه ژن هدف که از قبل طراحی، بلاست و سنتز شده بود، PCR انجام و ژن هدف به میزان لازم تکثیر شد.

(پیشرو: 5'- GTC, GAA, TTC, CGA, AGA, GTG, TCC, TAG, ATC, AAG- 3)

(پیرو: 5'- AAA, GGT, GAA, CTG, TGA, AAC, TAG, CCT, AGG, CCT-3)

پس از تخلیص محصول PCR از روی ژل آگارز با استفاده از کیت کمپانی Roche، توالی آن بررسی شد و پس از تأیید، با کمک آنزیم‌های محدودگر EcoR-1 و BamH-1 محصول کمپانی Jena Bioscience، برش در ژن انجام شد تا پس از آماده‌سازی وکتور، در پایین دست GFP کلون شود.

کلونینگ ژن در وکتور

وکتور بیانی PEFGP-N1 که از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیده بود، در الکتروکامپیتنت DH5-α ترانسفورم و در محیط LB-Agar حاوی نئومایسین-کانامایسین ۲۰µg/ml تکثیر داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت حاوی باکتری، از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفته و کلنی‌های دارای صلاحیت، به محیط LB-Broth حاوی کانامایسین ۴۰µg/ml منتقل شدند. کلونی‌های رشد کرده، پس از ۲۴ ساعت، جهت تخلیص وکتور مورد استفاده قرار گرفتند. وکتور تخلیص‌شده، پس از تأیید با کمک الکتروفورز، مورد هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های محدودگر EcoR-1 و BamH-1 قرار گرفت. در مرحله بعد، ژن هدف که از قبل برش خورده بود، در ناحیه انتهای N از GFP، کلون، تأیید و تکثیر شد.

بررسی عملکرد SiRNA

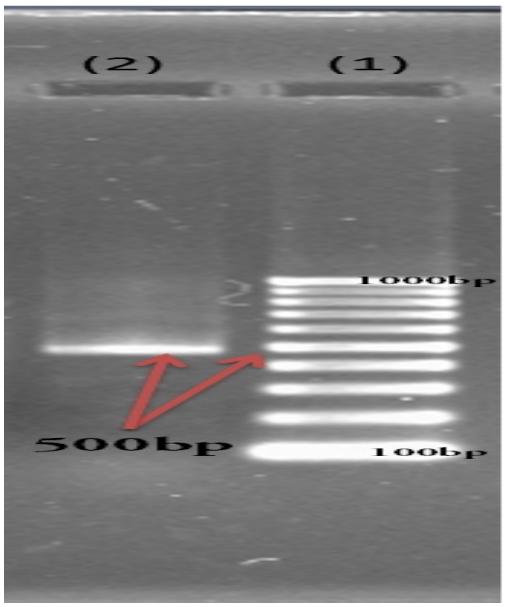
سلول Hela از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری و در محیط RPMI-1640 (pH=۷/۲) حاوی پن استرپ، رشد و تکثیر داده شد؛ سپس با استفاده از RT-PCR، PCR از جهت بیان ژن هدف مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از اطمینان از عدم بیان ژن هدف، به عنوان میزبان تأیید گردید. پلاسمید ناقل حاصل (پلاسمید دارای قطعه ژن هدف در N– انتهایی GFP) و پلاسمید فاقد ژن هدف (فقط دارای بیانGFP) با استفاده از لیپوفکتامین۲۰۰۰، به سلول Hela که فاقد بیان ژن هدف بود، در ۴ گروه انتقال داده شد و سلول‌ها در محیط حاوی G ۴۱۸µg/ml، به منظور حذف سلول‌های فاقد وکتور، رشد داده شدند. از آنجا که با قرارگیری ژن هدف متعاقب ژنGFP، از هر دو ژن یک نسخه mRNA واحد سنتز می‌شود؛ لذا با تخریب mRNA، ناشی از اثر siRNA علیه VEGFR1، از بیان فلورسنات سبز کاسته می‌شود؛ لذا ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن وکتور و تأیید تابش فلورسانت از سلول، siRNAهای اختصاصی، در ۲ گروه با استفاده از لیپوفکتامین۲۰۰۰، ترانسفکت شدند.

۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکت siRNAها، میزان بیان GFP که به عبارتی به بیان VEGFR1 وابسته شده است، در وکتور اولیه (فاقد ژن هدف) و وکتور کلون‌شده (دارای ژن هدف در N- انتهایی GFP) در حضور و عدم حضور siRNA اختصاصی، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر حاصله با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفت تا شدت نور تابشی در گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شود؛ همچنین میزان مهار ژن از طریق وسترن بلات با آنتی‌بادی اختصاصی محصول Ab-cam، جهت بررسی میزان کاهش پروتئین و RT-PCR، جهت بررسی میزان کاهش mRNA مورد بررسی قرار گرفت.

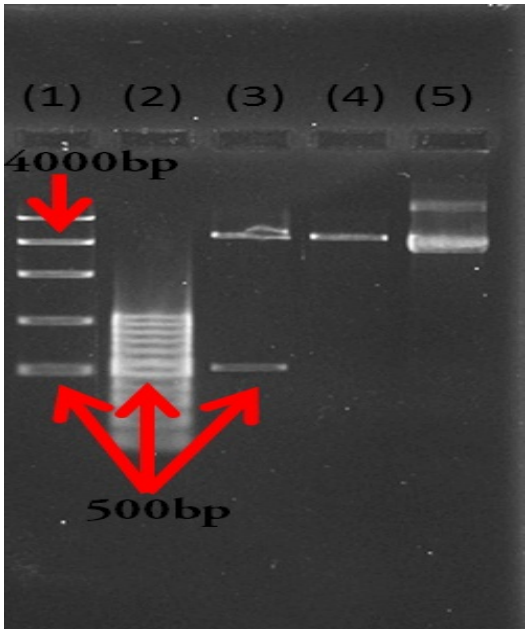
یافته‌ها

بررسی قطعه ژن VEGFR1 تکثیرشده با استفاده از پرایمر اختصاصی با استفاده از الکتروفورز، بیانگر سنتز قطعه‌ای با وزن تقریبی ۵۰۱bp است که نشانگر صحت عملکرد پرایمرهای مورد استفاده است (شکل۱). پس از کلون محصول PCR به داخل وکتور و ترانسفکت به داخل سلول، رشد سلول ترانسفکت‌شده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک، بیانگر انجام ترانسفکت است. صحت کلونینگ؛ پس از تکثیر و الکتروفورز محصول با استفاده از تأثیر آنزیم‌های محدودگر بر روی وکتور کلون‌شده، برشی است که وجود دو باند با وزن تقریبی ۴۷۰۰ جفت باز برای وکتور و ۵۰۱ جفت باز برای قطعه ژن را دربر دارد (شکل۲)؛ همچنین توالی قطعه کلون‌شده نیز این مسئله را تأیید می‌کند.

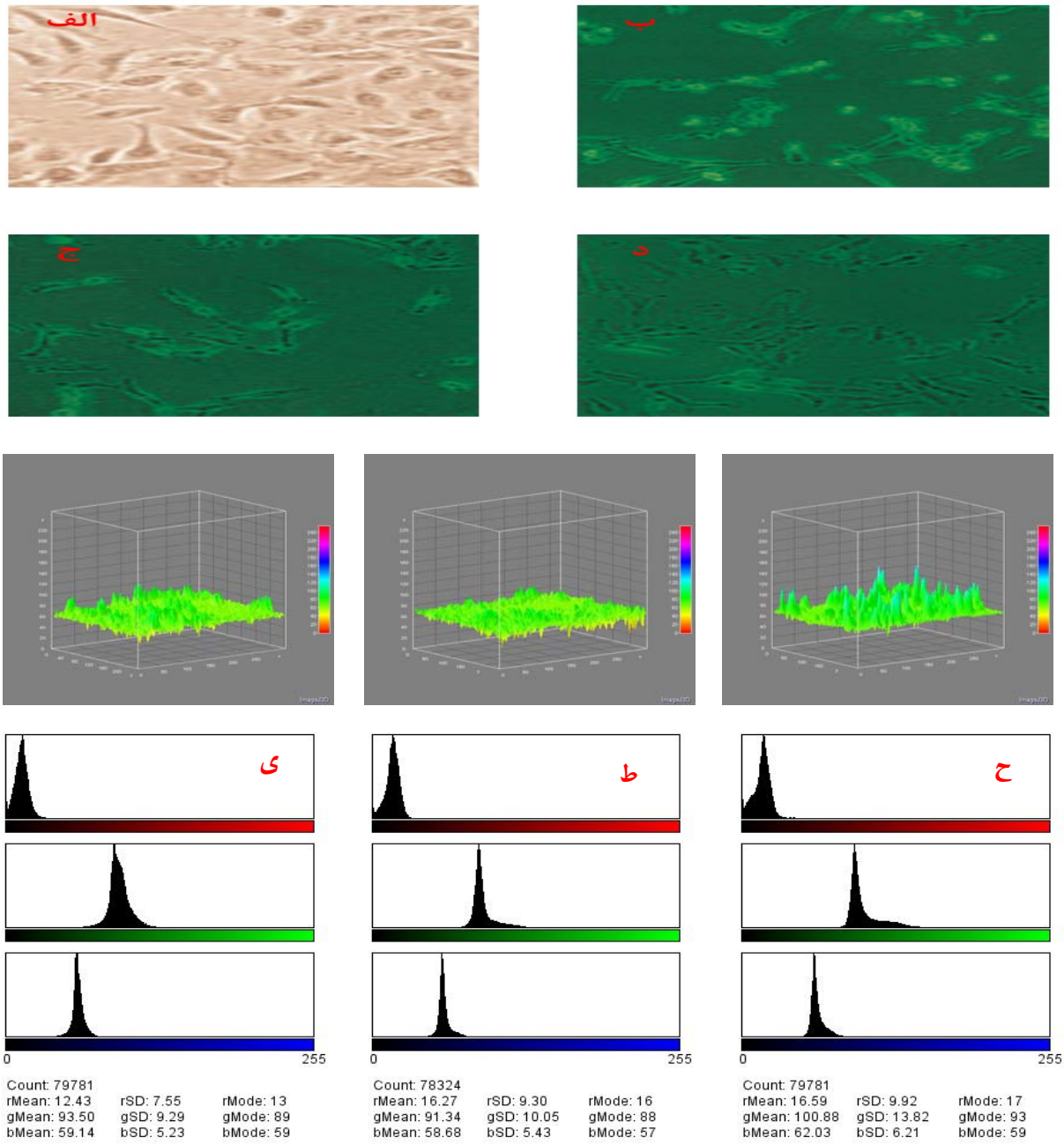
مشاهدات ما بعد از ترانسفکشن وکتور حاوی ژن هدف و متعاقباً siRNAهای اختصاصی علیه ژن هدف به سلولHela، حاکی از این بود که بیان ژن هدف در گروه‌های سلول حاوی وکتور و siRNA، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل که فقط حاوی وکتور بود، کاهش یافته بود.



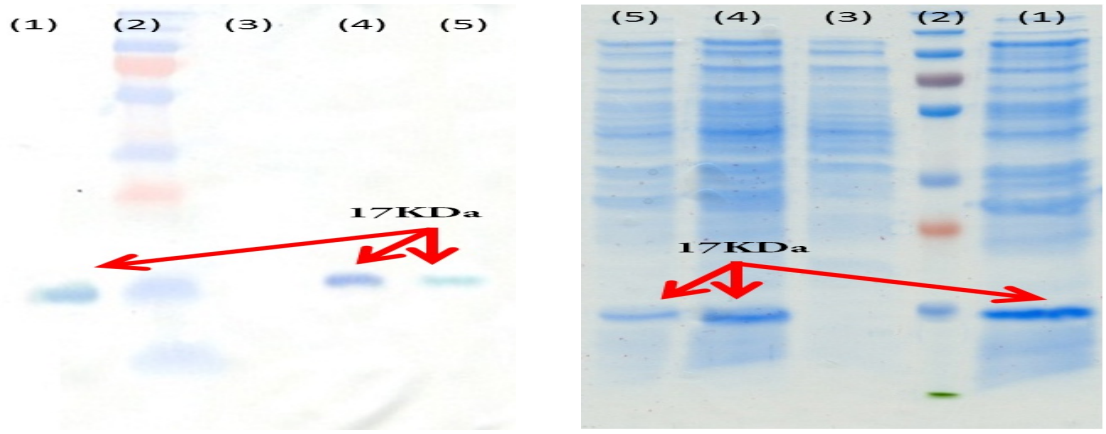
شکل ۱- الکترفورز قطعه ژن VEGFR1 محصول PCR با پرایمر اختصاصی بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. قطعه‌ای به طول ۵۰۱ جفت باز در کنار لدر ۱۰۰جفت باز که محصول PCR بر روی cDNA سلول HUVEC می‌باشد.



شکل ۲- تأیید صحت کلونینگ با استفاده از برش توسط آنزیم محدودگر بر روی محصول تخلیص پلاسمید. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک اول: لدر ۱۰۰۰bp، چاهک دوم: لدر۱۰۰bp، چاهک سوم: وکتور کلون‌شده دابل دایجست‌شده؛ قطعه ژن از وکتور خطی‌شده جداشده است. چاهک چهارم: وکتور خطی‌شده، چاهک پنجم: وکتور برش نخورده.



شکل۳- کاهش فلورسانت ناشی از اثر siRNA در گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل (بزرگنمایی ۴۰) و آنالیز آن با نرم‌افزارImage J. تصاویر پس از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفتند. الف)سلول Hela در محیط RPMI-1640. ب) فلورسانت ناشی از بیان پروتئین GFP در سلول ترانسفورم‌شده با وکتور کلون‌شده حاوی قطعه ژن هدف بدون حضور siRNA. ج) کاهش شدت فلورسانت در گروه تحت ترانسفورم siRNA-1 علیه قطعه ژن هدف. د) کاهش شدت فلورسانت در گروه تحت ترانسفورم siRNA-2 علیه قطعه ژن هدف. ه) آنالیز سه‌بعدی فلورسانت ناشی از بیان GFP توسط نرم‌افزار Image J، در سلول کنترل. و) سلول تیمار با siRNA-2. ز) سلول تیمار با siRNA-1. ح) آنالیز هیستوگرام فلورسانت ناشی از بیان GFP توسط نرم افزارImage J، در سلول کنترل. ط) سلول تیمار با siRNA-2. ی) سلول تیمار با siRNA-1. آنالیزها از کاهش معنی‌دار شدت فلورسانت در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل حکایت دارد که این کاهش در گروه تیمار با siRNA-2 بیشتر است (P<۰/۰۵).

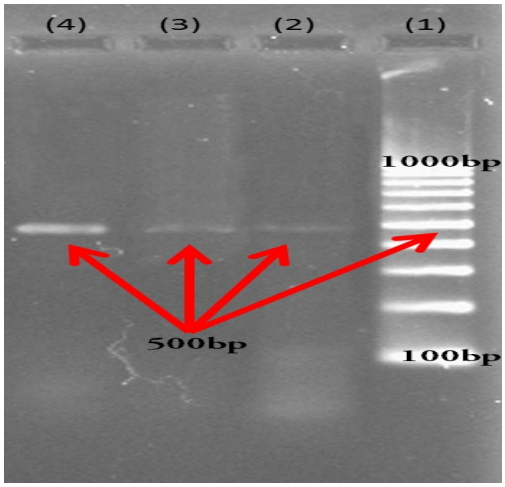


شکل٤– SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول Hela. باند پروتئینی مورد نظر تقریبا ۱۷ کیلو دالتون است که در دو گروه باهم مقایسه شده است. ۱) SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول حاوی وکتور بیان‌کننده. ۲) لدر پروتئین. ۳) SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول فاقد وکتور بیان‌کننده. ۴)SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول حاوی وکتور مواجهه‌یافته با siRNA1، از کاهش میزان پروتئین حکایت دارد. ۵) SDS Page و وسترن بلاتینگ از سلول حاوی وکتور مواجهه‌یافته با siRNA2، از کاهش میزان پروتئین حکایت دارد.

جدول ۱– مقاسیه میزان فلورسانس تابشی و میزان mRNA و غلظت VEGFR1 در گروه‌های تیمار و کنترل (P<۰/۰۵)

	گروه حاوی وکتور بیان‌کننده VEGFR-1		گروه حاوی فقط وکتور کلون‌شده (کنترل)
	در مجاورت siRNA-1	در مجاورتsiRNA-2	
GFP فلورسانت (لوکس نور تابشی)	۹۳/۵±۹/۲۹*	۹۱/۳۴±۱۰/۰۵*	۱۰۰/۸۸±۱۳/۸۲
(ng/µl)VEGFR1 mRNA	۱۸±۱/۲*	۱۵/۲±۰/۹۳*	۵۴/۹±۳/۲
(µg/ml)VEGF1 Concentration	۲۳/۸۱±۳/۵*	۱۹/۷۱±۲/۳*	۶۳/۴۵±۴/۶

مؤید این ادعا، کاهش شدت فلورسانس سبز رنگ ناشی از GFP بود که پس از فلورسانت اسکنینگ بر روی سوسپانسیون سلولی گروه‌های مختلف و سپس آنالیز با نرم‌افزار image J (این نرم‌افزار به صورت پیکسل به پیکسل که معمولاً بیش از ۷۰۰۰۰۰ نقطه در تصاویر می‌باشد، تصاویر را آنالیز و نتایج را به صورت هیستوگرام، آنالیز سه‌بعدی و جداولی به همراه میانگین و انحراف معیار بیان می‌کند)، در گروه‌های تیمار با siRNA اختصاصی، در مجموع کاهش معنی‌دار شدت فلورسانت تابشی را در مقایسه با گروه کنترل به همراه داشت که این میزان برای siRNA2 بیشتر از siRNA1 بود (شکل ۳) (P=۰/۰۵)؛ همچنین نتایج حاصل از وسترن‌بلات و متعاقباً سنجش غلظتVEGFR1بر روی سلول، در مجموع کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین هدف را در گروه‌های تیمار با siRNA اختصاصی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که باز هم siRNA2، سهم بیشتری را به خود اختصاص داده بود (شکل ۴)(P=۰/۰۵)؛



شکل٥– نتایج حاصل از RT-PCR و متعاقباPCR. الکتروفورز محصول RT-PCR و PCR بر روی سلول حاوی وکتور در حضور و عدم حضور siRNA اختصاصی بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱) لدر ۱۰۰bp. ۲) PCR از cDNA سلول حاوی وکتور در مواجهه با siRNA2 از کاهش میزان mRNA حکایت دارد. ۳) PCR از cDNA سلول حاوی وکتور در مواجهه با siRNA1 از کاهش میزان mRNA حکایت دارد. ۴) PCR از cDNA سلول حاوی وکتور در عدم حضور siRNA.

از طرفی نتایج حاصل از RT-PCR نیز از کاهش میزان mRNA در گروه‌های تیمار با siRNA اختصاصی، در مقایسه با گروه کنترل حکایت دارد که هر دو siRNA تقریباً به یک میزان تأثیر داشتند (شکل ۵ و جدول ۱)(P=۰/۰۵).

بحث

نتایج به دست‌آمده از مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که استفاده از siRNA اختصاصی علیه VEGFR1 در مقایسه با سایر روش‌های مهار آن، مؤثرتر عمل کرده‌است. از بین دو siRNA نهایی که مورد بررسی آزمایشگاهی قرارگرفتند، siRNA2 در مجموع، به طور مؤثرتری توانست بیان VEGFR1 را تحت تأثیر منفی قراردهد. این نتایج، خاطر نشان می‌کند که روش جدید مهار ژن VEGFR1 توسط siRNA می‌تواند، به عنوان یک درمان جدید در جلوگیری از رگ‌سازی پاتولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجا که تمام عوامل مؤثر در آنژیوژنز به نحوی با VEGF در ارتباط هستند (۳)؛ لذا جلوگیری از اعمال اثرات آن، با قطع مسیر سیگنالینگ، با واسطه حذفVEGFR1 از سطح سلول به وسیلهsiRNA، می‌تواند یک ابزار توانمند در جهت مهار آثار VEGF به حساب آید؛ به همین دلیل در مطالعه حاضر بر خلاف مطالعه فروغیان (۳) که از مهار بیان لیگاند به عنوان عامل مؤثر استفاده شده بود، از مهار رسپتور، استفاده گشت تا اثر سایرین حذف گردد که این روش با مطالعه Liping و همکاران (۲۰۱۰)(۱۷) که اثرات siRNA اختصاصی و غیر اختصاصی علیه VEGFR2 و VEGF-A در موش را مورد ارزیابی قرار دادند، مشابهت دارد.

در مطالعه Kim و همکاران (۱۱)، از شرایط in vivo برای نیل به هدف استفاده شد که مطابق با تحقیق حاضر نیست. در شرایط طبیعی بدن، بیان ژن همواره تحت تأثیر عوامل متعددی است؛ لذا نمی‌توان کاهش بیان ژن هدف را به استفاده از siRNA نسبت داد. به همین دلیل در مطالعه حاضر، سلول فاقد بیان ژن هدف انتخاب شد تا با بیان ژن مستقل از ژنوم، فقط به بررسی تأثیر مهاری siRNA پرداخته شود.

مشابه با مطالعات Jiang J و همکاران (۲۰۰۸)(۱۸) و نیز Jiang M و همکاران (۲۰۰۵)(۱۹) که نشان دادند، siRNAهای با GC% کمتر از ۶۰، بیشترین کارایی را داشتند، مطالعه حاضر نیز نشان داد که میزان GC% نقش مؤثری در کارایی دارد.

برای نیل به هدف مطالعه، استفاده از یک سیستم انتقال مناسب ضروری است. بدین منظور در پژوهش حاضر لیپوفکتامین انتخاب گردید و بیشترین تأثیر را در انتقال siRNAها داشت. Xia و همکاران (۲۰۰۸)(۲۰) نیز از این روش سود بردند. لیپوفکتامین از آنجا که محلول در چربی است و از طرفی با الیگونوکلئوتید به خوبی کونژوگه می‌گردد؛ لذا به راحتی از غشاها عبورکرده؛ می‌تواند میزان مؤثری از siRNA را به درون سلول انتقال دهد و لذا غلظت موضعی siRNAها که مستقیماً در نتیجه مؤثر است را فراهم آورد. این در حالی است که Jiang و همکاران (۲۰۰۹)(۲۱) و Kim و همکاران (۱۱)، از لیپوزوم و حمل با استفاده از ویروس، برای انتقال سود بردند. Hagigit و همکاران (۲۰۱۲)(۲۲) نشان دادند که استفاده از کاتیونیک لیپوزوم، در انتقال siRNA مؤثرتر عمل می‌کند. Liu و همکاران (۲۰۱۱)(۲۳) نیز از نانوذرات لیپیدی برای این منظور استفاده کردند که همگی، در راستای تحقیق حاضر هستند.

از آنجا که مطالعات Beazley-Long و همکاران (۲۰۱۰)(۲۴) که به نقش محافظتیVEGF از آپپتوز اشاره می‌کنند و مطالعات Lee و همکاران (۲۰۱۱)(۲۵)، پیامدهی VEGFR1 را در مهاجرت سلولی دخیل می‌دانند؛ لذا با قطع مسیر پیام‌دهی که در مطالعه حاضر با جلوگیری از بیان رسپتور به دست‌آمده، می‌توان به مرگ سلول‌های اندوتلیال ناشی از رگزایی امیدوار بود.

نتیجه‌گیری

مشابه نتایج حاصل از مطالعه سایر محققین، توالی‌های انتخابی از ژن VEGFR1 و توالی‌های طراحی‌شده به عنوان siRNA، به طور تخصصی و مؤثر عمل کرده و از بیان این ژن جلوگیری می‌کند؛ لذا احتمالاً به عنوان یک روش بالقوه در درمان و جلوگیری از رگزایی در قرنیه و شبکیه می‌تواند عمل نماید.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مسؤولین پژوهشکده آسیب‌های شیمیایی که هزینه این طرح بژوهشی را تأمین نمودند و از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این مهم یاری کردند، سپاس و قدردانی می‌نماییم. از زحمات جناب آقای دکتر پناهی که هماهنگی لازم در جهت استفاده از وسایل و امکانات را انجام دادند، کمال تشکر را داریم.

منابع:

1-Kim B, Suvas S, Sarangi PP, Lee S, Reisfeld RA, Rouse BT. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2-Based DNA Immunization Delays Development of Herpetic Stromal Keratitis by Antiangiogenic Effects. J Immunol. 2006; 177(6): 4122-31.

2- Zheng M, Klinman DM, Gierynska M, Rouse BT. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(13):8944–9.

3-Forooghian F, Das B. Anti angiogenic effect of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hipoxia inducible factor alpha. Am J Ophthalmol. 2007; 144(5):761-8.

4-Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. A model of angiogenesis in the mouse cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996; 37:1625-32.

5- Zheng M, Schwarz MA, Lee S, Kumaraguru U, Rouse BT. Control of Stromal Keratitis by Inhibition of Neovascularization. Am J Pathol. 2001;159(3):1021-9.

6- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 1997; 18(1): 4-25.

7- Gerber H, Dixit V, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 1998; 273(21): 13313-6.

8- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al.Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem. 1998; 273(46): 30366-43.

9- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Lymphangiogenesis as well as Angiogenesis. J ExpMed. 2002; 196(11): 1497-506.

10- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. Oncogene. 1990; 5(4): 519-24.

11- Kim B, Tang Q, Biswas PS, Xu J, Schiffelers RM, Xie FY, et al. Schiffelers eat al. Inhibition of Ocular Angiogenesis by siRNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Pathway Genes: Therapeutic Strategy for Herpetic Stromal Keratitis. Am J Pathol. 2004; 165(6): 2177-85.

12-Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. J Virol. 2001; 75(20):9828-35.

13-Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. J Thromb Haemost. 2003; 1(7):1356-70.

14- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, et al. specific inhibition of gene experestion using a stably integrated, induceble small interfering RNA vector. EMBO Rep. 2003; 4(6):609-15.

15- Jen-Tsan Ch, Howard Y, Nancy N. genomewide view of gene silencing by small interfring RNAs. P Natl Acad Sci USA. 2003; 100(11):6343-6.

16- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmed A. RNA interference: Biology, Mechanism and Application.microbiol Mol Biol R. 2003; 67(4):657-685.

17 Gu L, Chen H, Tuo J, Gao X, Chen L. Inhibition of experimental choroidal neovascularization in mice by anti-VEGFA/VEGFR2 or non-specific siRNA. Exp Eye Res. 2010; 91(3):433-9.

18- Jiang J, Xia XB, Xu HZ, Xiong Y, Song WT, Xiong SQ, et al. Inhibitory effect of interfering RNA targeting HIF-1alpha and VEGF on retinal neovascularization in the mouse. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2008;44(10):921-8.

19- Jiang M, Wang CQ, Wang BY, Huang DJ. Inhibitory effect of siRNA targeting HIF-1alpha on differentiation of peripheral blood endothelial progenitor cells. Ai Zheng. 2005; 24(11):1293-1300.

20- Xia XB, Xiong SQ, Xu HZ, Jiang J, Li Y. Suppression of retinal neovascularization by shRNA targeting HIF-1alpha.Curr Eye Res. 2008; 33(10): 892-902.

21-Jiang J, Xia XB, Xu HZ, Xiong Y, Song WT, Xiong SQ, et al. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1alpha and VEGF. J Cell Physiol. 2009; 218(1):66-74.

22- Hagigit T, Abdulrazik M, Valamanesh F, Behar-Cohen F, Benita S. Ocular antisense oligonucleotide delivery by cationic nanoemulsion for improved treatment of ocular neovascularization: An in-vivo study in rats and mice. J Control Release. 2012; 160(2):225-31.

23- Liu HA, Liu YL, Ma ZZ, Wang JC, Zhang Q. A lipid nanoparticle system improves siRNA efficacy in RPE cells and a laser-induced murine CNV model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52(7):4789-94.

24-Beazley-Long N, Churchill AJ, Harper SJ, Bates DO. VEGF-A165b is cytoprotective for ARPE-19 cells indicating a potential role in AMD therapy .FASEB J. 2010; 24(Meeting Abstract): 774.11.

25- Lee HK, Chauhan SK, Kay E, Dana R. Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7-dependent pathway. Blood. 2011; 117(21):5762-71.

Abstract *Original Article*

Preventing the expression of VEGFR-1 in culture medium using specific SiRNA - as a potential therapeutic method in eye neovascularization

Ali Zarei Mahmud abadi[1], Masoomeh Masoomi Karimi[2], Majid Bahabadi[3], Mahdi Kamali[4], Reza Kushki[5], Fariba Khalili[5], Nima Farhadi[5], Mostafa Naderi[6], Saman sajadi[7], Moslem Jafari Sani[8], Javad Alizadeh[9]

Background and Aim: Angiogenesis is one of important biological processes any disruption in which leads to disease. The main signaling factor in this process is VEGF which acts through its receptors. The present study was done in order to inhibit the expression of receptor type1of this factor (VEGFR-1) using specific siRNA in the culture medium to use its inhibitory effect on neovascularization in the eye.

Materials and Methods: In this experimental study; first, using target gene sequences, sequences of the specific siRNA were designed against them; blasted and manufactured. On the other hand, cDNA of HUVEC cell was synthesized and PCR, with specific primers for target gene, was reproduced as necessary. Then, PEFGP-N1 expression vectors were cloned and confirmed. Then, the obtained plasmid vector was transferred to Hela cells lacking target expressive genes through lipofectamin. GFR expression rate in the initial vector and in the cloned one, both in presence and in absence of specific VEGFR1 siRNA, was assessed. Evaluation of gene inhibition was carried out through decreasing of green fluorescence from GFR, Western blot and RT-PCR. Results were analyzed using T-test and $P<0.05$ was taken as the significant level.

Results: The fluorescence emission from defined siRNA decreased compared to control group. SDS pages and blots from vector cloned cells exposed to both siRNA showed reduced protein expression

The outcome of applying two siRNA indicates gene expression in the form of transcription and translation, compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Specifically designed siRNA against VEGFR1, through lipofectamin, was appropriately transferred into cell and significantly prevented from the receptor expression. In fact, by blocking angiogenesis signaling route, it was able to prevent neovascurization. Thus, this can be made use of as an appropriate factor in preventing or decreasing neovascularization in the eye.

Key Words: VEGFR-1, siRNA Neovascularization, HUVEC, RT-PCR

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2012; 19 (3): 255-265

Received: March 4, 2012 Accepted: October 31, 2012

[1] *PhD of Clinical Biochemistry, Biochemistry Department& Chemical Damage Research Center, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*
[2] *MSc of Immunology, Immunology Department, torbateheydariyeh university of medical science. Torbateheydariyeh, Iran*
[3] *MSc of Clinical Biochemistry, Biochemistry Department, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*
[4] *PhD of Biotechnology. Nano-biotechnology Research Center, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*
[5] *MSc of Cellular and Molecular Biology, . Nano-biotechnology Research Center, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*
[6] *MD of Retina, Department of Ophthalmology, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*
[7] *MS of cellular and molecular biology, Nano-biotechnology Research Center, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Tehran, Iran*
[8] *Corresponding author, PhD Student of Clinical biochemistry, biochemistry department, torbateheydariyeh university of medical science. Torbateheydariyeh, Iran*
[9] *MSc of Nano-biotechnology. Nano-biotechnology Research Center, Baghiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.*