

پیشگیری از بیان ژن 1 VEGFR در محیط کشت، با استفاده از به کار گیری siRNA اختصاصی در درمان نئوواسکولاریزاسیون چشم

علی زادعی محمودآبادی^۱، معصومه معصومی کریمی^۲، مجید بهابادی^۳، مهدی کمالی^۴، رضا کوشکی^۵، فریبا خلیلی^۶، نیما فرهادی^۷، سامان سجادی^۸، مسلم جعفری ثانی^۹، جواد علیزاده^{۱۰}

چکیده

زمینه و هدف: آنژیوژن، از مهمترین فرایندهای زیستی است که هر گونه اختلال در آن، به بیماری منجر می‌شود. نقطه اصلی در هدایت سیگنالینگ این فرایند، فاکتور رشد اندوتیال 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، HUVEC سلول cDNA، سلول PEFGP-N1، کلون و ژن هدف، با کمک پرایمر اختصاصی VEGFR1 و PCR، به میزان مورد نیاز تکثیر شد؛ سپس در وکتور بیانی GFR در وکتور اولیه و وکتور کلون شده، در حضور و عدم حضور siRNA که قادر بیان ژن هدف بود، انتقال داده شد. میزان بیان VEGFR1 در وکتور اولیه و وکتور کلون شده، در حضور و عدم حضور siRNA اختصاصی علیه VEGFR1 مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان مهار ژن، از طریق ارزیابی کاهش فلورسانس سیزر رنگ ناشی از GFP، وسترن بلات و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، با استفاده از آزمون تی تست، مورد آنالیز قرار گرفت و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فلورسانس ناشی از siRNA در گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت SDS Page و وسترن بلاستینگ 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 طراحی شده VEGFR-1، با استفاده از لیپوفکتامین، به طور مناسب به داخل سلول منتقل و از بیان رسپتور، به طور معنی دار جلوگیری نمود؛ لذا احتمالاً به عنوان یک فاکتور مناسب درمانی جدید، در جلوگیری و یا کاهش نئوواسکولاریزاسیون در چشم، مطرح باشد.

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

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیرجنده، ۱۳۹۱: ۱۹: 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 (ع)، تهران، ایران.

^۲ کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تربیت حیدریه، تربیت حیدریه، ایران.

^۳ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

^۴ دکتری بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

^۵ کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

^۶ فوق تخصص قرنیه، گروه چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

^۷ کارشناس بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

^۸ نویسنده مسؤول، دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

آدرس: تربیت حیدریه- خیابان رازی- دانشکده علوم پزشکی تربیت حیدریه- گروه بیوشیمی

تلفن: ۰۹۳۶۵۹۹۸۴۲۶-۰۵۳۱-۲۲۴۲۰۳۸ فکس: moslem.jafarisani@gmail.com پست الکترونیکی:

^۹ کارشناس ارشد نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران.

مقدمه

آزمایشگاهی و بالینی داشته است (۷). جلوگیری از آپتوزیز با القای سنتز پروتئین‌های BCL-2 و A1 در سلول‌های آندوتیال همراه می‌باشد (۸).

VEGF، یک خانواده از فاکتورهای رشد پیتیدی هستند که بر عروق خونی تأثیر دارند. ژن VEGF انسانی، پنج ایزوفرم مختلف پروتئینی تحت عنوان ۱۸۹، ۱۶۵، ۱۴۵ و 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 آندوتیال 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)، VEGFR3 (FLT4)، VEGFR2 (FLK1)(Fetal Liver Kinase) و KDR (Kinase inserts Domain-containing Receptor) البته نوع یک در دو واریانت کد می‌شود (۱۰). این رسپتورها از ابر خانواده رسپتورهای تیروزین کیناز هستند که دارای یک دومین واحد ترانس ممبران می‌باشند. ناحیه خارج سلولی آن، دارای ۷ دومین شبیه ایمونوگلوبولینی است و دومین داخل سلولی، با خاصیت اتوفسفریالاسیونی 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 ژن VEGF، منجر به مرگ جنین موش، بین روزهای ۸ و ۹ می‌گردد که ناشی از اختلال آنژیوژن 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 و ۹ شده، اما در حذف هموزیگوت VEGFR1، افتراق آندوتیالی صورت گرفته است؛ هرچند کانال‌های وریدی که تشکیل می‌شوند غیر طبیعی هستند و لذا حیوان در دوره جنینی فوت می‌کند. VEGF، به عنوان یک

آنژیوژن، از مهمترین فرایندهای زیستی است که هرگونه اختلال در آن، به بیماری منجر می‌شود. نقطه اصلی در هدایت سیگنالینگ این فرایند، فاکتور رشد آندوتیال عروقی است که از طریق رسپتورهای اعمال اثر می‌کند. ایجاد رگ‌های جدید و کنترل نشده در چشم، به عنوان یک فرایند مهم در پاتوژن انواع مختلف بیماری‌های چشمی از جمله: کراتیت با منشأ ویروس هرپس HSV، رتینوپاتی دیابتی و دژنراسیون مولکولی وابسته به سن و همچنین ضایعات و خدمات 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 آنژیوژن، توسعه عروق خونی در محل رشد توده بدخیم سرطانی می‌باشد.

مولکول‌های مختلفی مانند: نوروفیلین، آنژوژنین، ایترولوکین‌های ۶ و ۸، MCP-1^۱، HIF- α ^۲، TGF- β ^۳ در اختلالات مختلف می‌باشند که همگی به نوعی با VEGF^۴ در ارتباط هستند (۳). مطالعات اخیر، نشان داده است که پروتئین VEGF و رسپتورهای آن، به عنوان نقاط کلیدی در القا و یا مهار نشوواسکولاریزاسیون، 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 آندوتیال را به شریان، ورید و حتی عرق لنفاوی تحریک می‌کند (۶). وجود VEGF و مکانیسم‌های وابسته، نقش مهمی در القای حیات و جلوگیری از آپتوزیز در شرایط

¹ Tumor Growth Factor

² Hypoxia Induced Factor

³ Vaso- Endothelial Growth Factor

فاکتور (VEGFR-1) با استفاده از siRNA اختصاصی، با استفاده از بررسی تغییرات بیان GFP (Fluorescent Protein) به عنوان اندیکاتور در محیط کشت است. امید است با مهار بیان این رسپتور، به توان رگزابی‌های 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 کلون شده را به منظور تولید فلورسانست دریافت کردند و دو گروه تیمار که علاوه بر وکتور کلون شده، 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 آزمون t-test و بهره‌گیری از نرمافزار SPSS (ویرایش ۱۸)، مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. در این مطالعه، $P < 0.05$ 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٪ اختصاصی بودن آن، فقط علیه ژن هدف ساخته شدند. توالی siRNA‌های سنتز شده به صورت زیر بود:

مدیاتور ایسکمی رتبیمال که منجر به نتوواسکولاریزاسیون می‌شود نیز مطرح است (۱۱، ۱۲). اخیراً از داروهایی نظری آنتی‌بادی مونوکلونال، علیه VEGF به منظور درمان و جلوگیری از رگ‌سازی در تومورها استفاده می‌شود که به طور كامل، از رگ‌سازی جدید جلوگیری می‌کند (۱۳).

small interfering RNA کوچک مداخله‌گر (SiRNA)، فرایند حفظشده‌ای طی تکامل موجودات زنده است که به منظور کنترل بیان ژن، در مرحله ترجمه به کار گرفته 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).

اخیراً با ساخت مولکول‌های siRNA اختصاصی، در جهت درمان بیماری‌های سرطانی و حتی عفونی و نیز ژنتیکی siRNA فعالیت‌هایی صورت گرفته است. مولکول‌های siRNA اختصاصی طراحی شده علیه یک mRNA، کارایی‌های مختلفی از 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 و طول رشته اشاره کرد (۱۵).

از آنجا که عمل VEGF، به بیان رسپتور ویژه آن در بافت بستگی دارد؛ لذا با بلاک و یا خاموش کردن 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 اندوتیال را وارد فاز آپوپتوز می‌کند.

هدف از انجام مطالعه حاضر، مهار بیان رسپتور تیپ I این

خریداری گردیده بود، در الکترو کامپیتنت DH5- α ترانسفورم و در محیط LB-Agar حاوی نومایسین-کانا مایسین ۲۰ μ g/ml تکثیر داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت حاوی باکتری، از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفته و کلنجی های دارای صلاحیت، به محیط LB-Broth حاوی کانا مایسین ۴۰ μ g/ml منتقل شدند. کلونی های رشد کرده، پس از ۲۴ ساعت، جهت تخلیص و کتور مورد استفاده قرار گرفتند. و کتور تخلیص شده، پس از تأیید با کمک الکترو فورز، مورد هضم آنزیمی با کمک آنزیم های 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 انسستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط (pH=۷/۲) RPMI-1640 حاوی پن استرپ، رشد و تکثیر داده شد؛ سپس با استفاده از RT-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 بیان GFP) با استفاده از لیپوفکتمین ۲۰۰۰، به سلول Hela که فاقد بیان ژن هدف بود، در ۴ گروه انتقال داده شد و سلول ها در محیط حاوی ۴۱۸ μ g/ml G، به منظور حذف سلول های فاقد و کتور، رشد داده شدند. از آنجا که با قرار گیری ژن هدف متعاقب ژن GFP، از هر دو ژن یک نسخه mRNA واحد سنتز می شود؛ لذا با تخریب mRNA، ناشی از siRNA VEGFR1، از بیان فلورسانس سبز کاسته می شود؛ لذا ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن و کتور و تأیید تابش فلورسانس از سلول، siRNA های اختصاصی، در ۲ گروه با استفاده از لیپوفکتمین ۲۰۰۰، ترانسفکت شدند.

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 تهییه و تکثیر ژن مورد نظر

سلول اندوتیال ورید بند ناف (HUVEC)، از بانک سلولی انسستیتو پاستور ایران تهییه و در RPMI-1640 (pH=۷/۲) حاوی پن استرپ، رشد و تکثیر داده شد. سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی تریپیان بلو، از نظر زنده بودن مورد بررسی قرار گرفتند و پس از اطمینان، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط های پیوکسی، به منظور افزایش بیان ژن هدف انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، با استفاده از کیت تخلیص RNA HUVEC RNA Tam از سلول Roche محصول کمپانی کمپانی Roche تام از سلول 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.

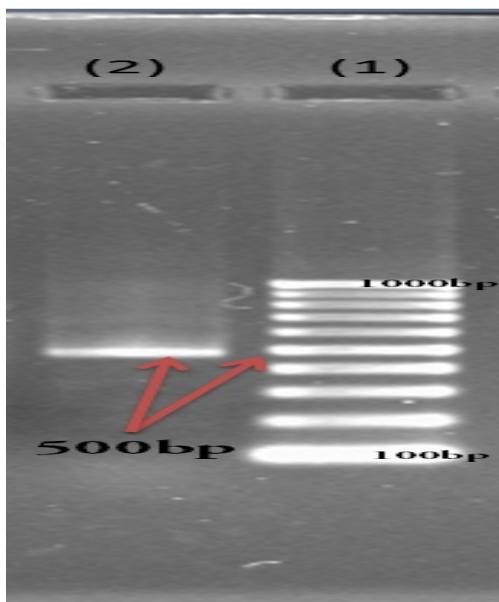
(پیش رو: ۳'-GTC, GAA, TTC, CGA, AGA, GTG, TCC, TAG, ATC, AAG-

(پیرو: ۳'-AAA, GGT, GAA, CTG, TGA, AAC, TAG, CCT, AGG, CCT-

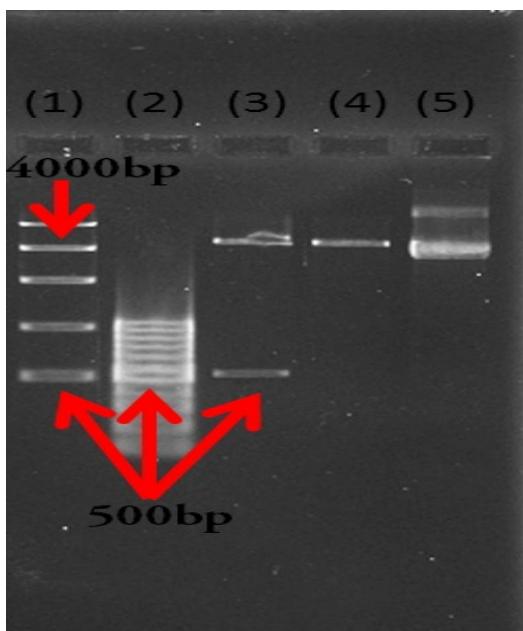
پس از تخلیص محصول PCR از روی ژل آکارز با استفاده از کیت کمپانی Roche، توالی آن بررسی شد و پس BamH-1 EcoR-1 از تأیید، با کمک آنزیم های محدودگر Jena Bioscience، برش در ژن انجام شد محصول کمپانی تا پس از آماده سازی و کتور، در پایین دست GFP کلون شود.

کلونینگ ژن در وکتور

وکتور بیانی PEFGP-N1 که از انسستیتو پاستور ایران



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

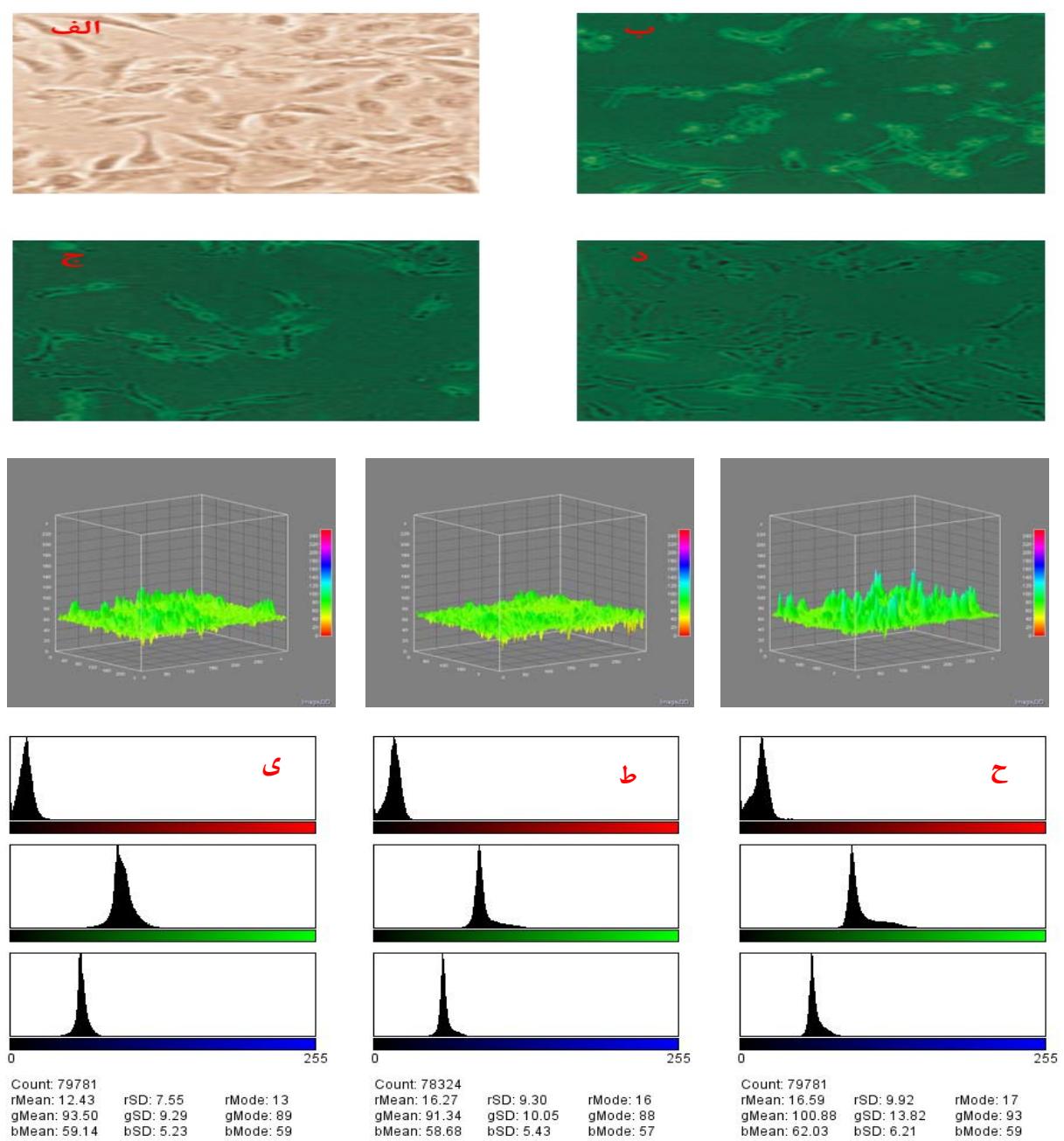


شکل ۲- تأیید صحت کلونینگ با استفاده از برش توسط آنزیم محدودگر بر روی محصول تخلیص پلاسمید. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، چاهک اول: لدر ۱۰۰۰ bp، چاهک دوم: لدر ۱۰۰ bp، چاهک سوم: وکتور کلون شده دابل دایجست شده؛ قطعه ژن از وکتور خطی شده جدا شده است. چاهک چهارم: وکتور خطی شده، چاهک پنجم: وکتور برش نخورده.

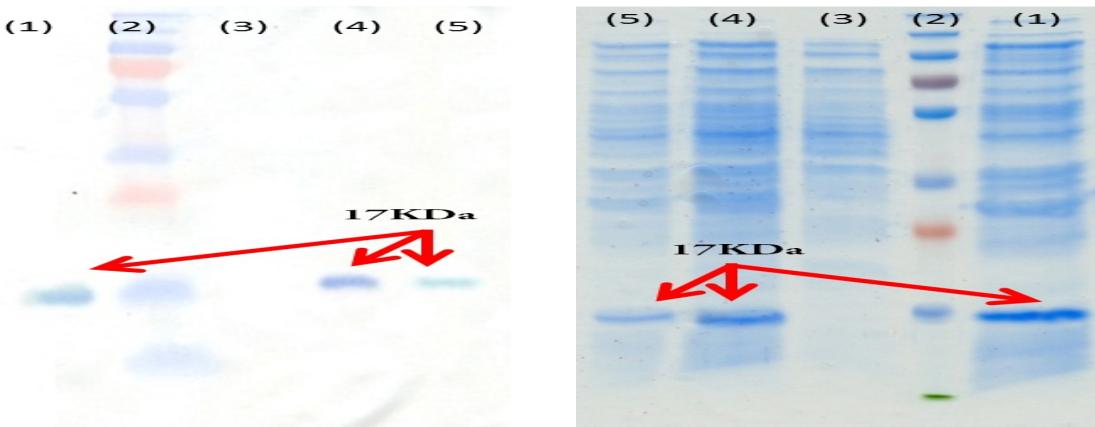
۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکت siRNAها، میزان GFP که به عبارتی به بیان VEGFR1 وابسته شده است، در وکتور اولیه (فاقد ژن هدف) و وکتور کلون شده (دارای ژن هدف در N-انتهایی GFP) در حضور و عدم حضور siRNA اختصاصی، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر حاصله با استفاده از نرمافزار J Image 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 تکثیر شده با استفاده از پرایمر اختصاصی با استفاده از الکتروفورز، بیانگر سنتز قطعه‌ای با وزن تقریبی ۵۰۱ bp است که نشانگر صحت عملکرد پرایمرهای مورد استفاده است (شکل ۱). پس از کلون PCR به داخل وکتور و ترانسفکت به داخل سلول، رشد سلول ترانسفکت شده 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 کلون شده، بررسی است که وجود دو باند با وزن تقریبی ۴۷۰۰ جفت باز برای وکتور و ۵۰۱ جفت باز برای قطعه ژن را دربر دارد (شکل ۲)؛ همچنین توالی قطعه کلون شده نیز این مسئله را تأیید می‌کند. مشاهدات ما بعد از ترانسفکشن وکتور حاوی ژن هدف و متعاقباً siRNAهای اختصاصی علیه ژن هدف به سلول HeLa، 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.



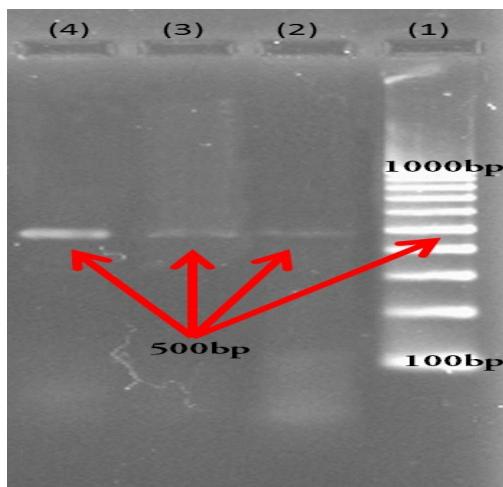
شکل ۳- کاهش فلورسانست ناشی از اثر siRNA در گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل (بزرگنمایی ۴۰×) و آنالیز آن با نرم افزار J. Image از تهیه عکس توسط نرم افزار J مورد آنالیز قرار گرفتند. (الف) سلول HeLa در محیط RPMI-1640. (ب) فلورسانست ناشی از بیان پروتئین GFP در سلول ترانسفورم شده با وکتور کلون شده حاوی قطعه ژن هدف بدون حضور siRNA. (ج) کاهش شدت فلورسانست در گروه تحت ترانسفورم siRNA-1 علیه قطعه ژن هدف. (د) کاهش شدت فلورسانست در گروه تحت ترانسفورم siRNA-2 علیه قطعه ژن هدف. (ه) آنالیز سه بعدی فلورسانست ناشی از بیان GFP توسط نرم افزار J. (Image) در سلول کنترل. (و) سلول تیمار با siRNA-2 (ز) سلول تیمار با siRNA-1 (ی) سلول تیمار با siRNA-2 (ح) آنالیز هیستوگرام فلورسانست ناشی از بیان GFP توسط نرم افزار J. (Image) در سلول کنترل. (ط) سلول تیمار با siRNA-2 (ی) سلول تیمار با siRNA-1 (ح) آنالیزها از کاهش معنی دار شدت فلورسانست در گروه های تیمار در مقایسه با گروه کنترل حکایت دارد که این کاهش در گروه تیمار با siRNA-2 بیشتر است.
(P<0.05)



شکل ۴- SDS Page و وسترن بلاستینگ از سلول HeLa. باند پروتئینی مورد نظر تقریباً ۱۷ کیلو دالتون است که در دو گروه باهم مقایسه شده است.
 ۱) SDS Page و وسترن بلاستینگ از سلول حاوی وکتور بیان کننده. ۲) لدر پروتئین. ۳) SDS Page و وسترن بلاستینگ از سلول فاقد وکتور بیان کننده.
 ۴) SDS Page و وسترن بلاستینگ از سلول حاوی وکتور مواجهه یافته با siRNA1، از کاهش میزان پروتئین حکایت دارد. ۵) SDS Page و وسترن بلاستینگ از سلول حاوی وکتور مواجهه یافته با siRNA2 از کاهش میزان پروتئین حکایت دارد.

جدول ۱- مقایسه میزان فلورسانس تابشی و میزان mRNA و غلظت VEGFR1 در گروههای تیمار و کنترل ($P<0.05$)

	گروه حاوی وکتور بیان کننده-1		گروه حاوی فقط وکتور کلون شده (کنترل)
	در مجاورت-1	در مجاورت-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



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

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 J image (این نرمافزار به صورت پیکسل به پیکسل که معمولاً بیش از ۷۰۰۰۰ 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) ($P=0.05$)؛ همچنین نتایج حاصل از وسترن‌بلات و متعاقباً سنجش غلظت VEGFR1 بر 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) ($P=0.05$)؛

مستقل از زنوم، فقط به بررسی تأثیر مهاری siRNA پرداخته شود.

مشابه با مطالعات Jiang و همکاران (۲۰۰۸) و نیز Jiang M و همکاران (۲۰۰۵) 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 لیپوفکتمین انتخاب گردید و بیشترین تأثیر را در انتقال siRNAها داشت. Xia و همکاران (۲۰۰۸) نیز از این روش سود برداشتند. لیپوفکتمین 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. Kim در حالی است که Jiang و همکاران (۲۰۰۹) و Kim و همکاران (۱۱)، از لیپوزوم و حمل با استفاده از ویروس، برای انتقال سود برداشتند. Hagigit و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از کاتیونیک لیپوزوم، در انتقال siRNA مؤثرتر عمل می‌کند. Liu و همکاران (۲۰۱۱) 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 محافظتی VEGF از آپیتوز 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 دست آمده، می‌توان به مرگ سلول‌های انوتیال ناشی از رگزایی امیدوار بود.

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) ($P=0.05$).

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که استفاده از siRNA اختصاصی علیه VEGFR1 در مقایسه با سایر روش‌های مهار آن، مؤثرتر عمل کرده است. از بین دو siRNA نهایی که مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفته‌اند، siRNA2 در مجموع، به طور مؤثرتری توانست VEGFR1 را تحت تأثیر منفی قرار دهد. 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 آثیوژنز به نحوی با VEGF در ارتباط هستند (۳)؛ لذا جلوگیری از اعمال اثرات آن، با قطع مسیر سیگنالینگ، با واسطه حذف VEGFR1 از سطح سلول به وسیله siRNA می‌تواند یک ابزار توانمند در جهت مهار آثار VEGF به حساب آید؛ به همین دلیل در مطالعه حاضر برخلاف 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 VEGF-A و VEGFR2 در موش را مورد ارزیابی قرار دادند، مشابه است.

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

تقدیر و تشکر

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

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 رگزابی در قرنیه و شبکیه می‌تواند عمل نماید.

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 Exp Med.* 2002; 196(11): 1497-506.
- 10- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima 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 et 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 expression using a stably integrated, inducible 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 interfering RNAs. *P Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(11):6343-6.
- 16- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed 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.

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

Ali Zarei Mahmud abadi¹, Masoomeh Masoomi Karimi², Majid Bahabadi³, Mahdi Kamali⁴, Reza Kushki⁵, Fariba Khalili⁵, Nima Farhadi⁵, Mostafa Naderi⁶, Saman sajadi⁷, Moslem Jafari Sani⁸, Javad Alizadeh⁹

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 type 1 of 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 neovascularization. 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, 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.