Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Designing and Constructing the Lentiviral Vector Coding miRNA-499a and Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells

Vajiheh Neshati[1],
Samaneh Mollazadeh[2],
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz[3,4],
Majid Mojarrad[5,6]
Zeinab Neshati[7],
Mohammad Amin Kerachian[8,9]

[1] PhD Candidate, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2] PhD in Biotechnology, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Professor, Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Professor, Pharmaceutical Control Department, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5] Associate Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[6] Associate Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[7] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[8] Assistant Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[9] Assistant Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received December 28, 2017 ; Accepted June 10, 2018)

Abstract

Background and purpose: Lentiviral vectors (LVs) are suitable candidates for gene delivery to cells with stable and high-level of transgene expression in target cells. MicroRNAs (miRNAs, miRs) are non-protein coding, short (~22 nucleotides) and single-stranded RNAs that act as post-transcriptional regulators of gene expression, and are involved in various cellular processes, including proliferation, differentiation and apoptosis. Several studies have shown that miR-499a promotes cardiac differentiation in cardiac stem cells. So, the aim of our study was to construct lentiviruses carrying miRNA-499a.

Materials and methods: Specific sequences of miRNA-499a (3p and 5p) were designed and constructed. Then, miRNA-499a was cloned into lentiviral vector. Analytical digestion and nucleotide sequence analysis were performed to ensure successful introduction of the miRNA to the vector. Then, the lentiviral particles produced (miRNA-499a-3p and miRNA-499a-5p) were used for transduction of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs).

Results: Analytical digestion and sequence analysis confirmed the accuracy of the constructs. The high expression of eGFP represented the high efficiency of transfection and transduction. The lentiviral particles carrying miRNA-499a-3p/5p were made and could transduce hBM-MSCs.

Conclusion: In this study we made lentiviral particles carrying miR-499a that could be used for differentiation of stem cells to cardiomyocytes.

Keywords: lentiviral vectors, MicroRNA, miRNA-499a-3p/5p, differentiation

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (166): 21-29 (Persian).

* **Corresponding Author: Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz -** Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (E-mail: fazlis@mums.ac.ir)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۶ آبان سال ۱۳۹۷ (۲۹-۲۱)

طراحی و ساخت حامل لنتی ویروسی بیان کننده miRNA-499a و انتقال آن به سلول های بنیادی مزانشیمی انسان

وجیهه نشاطی[۱]
سمانه ملازاده[۲]
بی بی صدیقه فضلی بزاز[۳و۴]
مجید مجرد[۵و۶]
زینب نشاطی[۷]
محمد امین کراچیان[۸و۹]

چکیده

سابقه و هدف: وکتورهای لنتی‌ویروسی حامل‌های مناسبی برای انتقال ژن به سلول‌ها بوده و می‌توانند سبب بیان بالا و مداوم ژن‌ها در سلول‌های میزبان شوند. ریز RNA ها (miRNAs)، گروهی از RNA های غیر کدکننده کوچک هستند که بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه یا القاء تجزیه mRNA کنترل می‌کنند و از این طریق فرآیندهای زیستی متعددی از جمله تمایز سلولی را تنظیم می‌نمایند. مطالعاتی نشان داده‌اند که miRNA-499a در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی نقش دارد. با توجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه ساخت وکتور لنتی‌ویروسی ناقل miRNA-499a جهت استفاده در تمایز سلول‌های قلبی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسمید ویژه‌ای کلون شدند. برای اطمینان از ورود صحیح این رشته‌های نوکلئوتیدی، هضم آنزیمی و توالی‌یابی انجام گردید. سپس ذرات لنتی‌ویروسی حامل رشته‌های miRNA-499a-3p و miRNA-499a-۵p ساخته شدند و برای ترانس‌داکشن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی‌یابی، کلون شدن صحیح رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسمید را نشان دادند. بیان بالای eGFP نشان دهنده کارایی بالای ترانس‌فکشن و ترانس‌داکشن بود. ویروس‌های حامل رشته‌های miRNA-499a-3p/5p ساخته شده، توانستند سبب ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی گردند.

استنتاج: در این مطالعه حامل‌های لنتی‌ویروسی ناقل miRNA-499a-3p/5p تولید شدند، که با توجه به میزان مناسب ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌توانند در تمایز این سلول‌ها به سلول‌های قلبی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: لنتی ویروس، ریز RNA، تمایز

مقدمه

وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن در فرآیندهای دستکاری ژنتیکی سلول ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که از لحاظ نحوه آلوده سازی، ورود به سلول و هم‌چنین پایداری در سلول‌های میزبان، با یکدیگر متفاوت

مولف مسئول: بی بی صدیقه فضلی بزاز– مشهد: بلوار وکیل آباد، پردیس دانشگاه، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو E-mail: fazlis@mums.ac.ir
۱. دانشجوی دکترای تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو تکنولوژی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. استاد، گروه کنترل دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶. دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۷. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۸. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۹. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۳/۲۰

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

می‌باشند. یکی از مناسب‌ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن‌های مورد نظر، وکتورهای لنتی ویروسی می‌باشد. از مهم‌ترین وکتورهای لنتی ویروسی وکتورهایی هستند که بر پایه ویروس *HIV-1* ساخته می‌شوند. ویروس *HIV* یک رترو ویروس و عضوی از زیر خانواده لنتی ویریده و جنس لنتی ویروس‌ها بوده است و دارای بسیاری ازخصوصیات فیزیکی وشیمیایی ویژه این خانواده می‌باشد. وکتورهای لنتی ویروسی قابلیت انتقال ژن به سلول‌های درحال تقسیم و همچنین سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند را دارند و سبب بیان مداوم ژن‌ها در سلول‌های میزبان می‌شوند(۲،۱). این وکتورها گروه‌های سلولی متعددی مانند سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی، شبکیه، سلول‌های فیبروبلاست، سلول‌های عضلات اسکلتی وقلبی، سلول‌های غدد درون ریز، سلول‌های کبدی و همچنین سلول‌های بنیادی مختلف را مورد هدف قرار می‌دهند. وکتورهای لنتی ویروسی طوری طراحی می‌شوند که ایمن بوده و در میزبان دریافت کننده سبب ایجاد بیماری‌های مرتبط با ویروس نگردند(۳).

ریز RNA ها گروهی از RNA های غیر کدکننده کوچک (۲۴-۲۰ نوکلئوتیدی) هستند که در بسیاری از یوکاریوت‌ها بعنوان عناصر تنظیمی پس از رونویسی یافت می‌شوند و بیان ژن را از طریق مهار ترجمه mRNA یا القاء تجزیه آن کنترل می‌کنند. مولکول‌های miRNA با اتصال به توالی مکمل روی mRNA هدف در ناحیه UTR-3' (untranslated region-3') انتهای مولکول mRNA، سبب تنظیم منفی بیان ژن پس از رونویسی می‌شوند و از این طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی از جمله تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز و غیره را تنظیم می‌کنند(۵،۴). مطالعات نشان داده اند که ریز RNA های متعددی در تکامل و تمایز بافت‌های مختلف بدن موجودات ایفای نقش می‌کنند. مطالعه مسیر تمایزی قلب نیز نشان داده است که ریز RNA های مختلفی در رشد و تکامل قلب دخیل هستند، که در میان آن‌ها miR-499a نقش مهمی را در ایجاد سلول‌های قلبی (کاردیومیوسیت‌ها) ایفا می‌کند(۸-۶). miR-499a توسط ژن Myh7b کد شده و عضوی از خانواده miR-499 می‌باشد. این خانواده دارای دو عضو شناخته شده تحت عنوان miR-499a و miR-499b می‌باشد که دارای ساختار ساقه- لوپ بوده و هر دو پس از پردازش، اولیگونوکلئوتیدهای ۳p و ۵p را ایجاد می کنند. miR-499a در سلول‌های قلبی جنینی، نوزادان و افراد بالغ بیان شده و بیان آن در طی مراحل تکامل قلب افزایش می‌یابد(۱۱-۸). انتقال miR-499a به کمک وکتورهای لنتی ویروسی به سلول‌های بنیادی، سبب بیان پایدار این ریز RNA در سلول‌های مزبور شده است(۱۰،۹). هم‌چنین بیان اجباری این ریز RNA در سلول‌های بنیادی مختلف، سبب افزایش بیان نشانگرهای ویژه سلول‌های قلبی و تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت‌ها شده است(۱۱). بنابراین لنتی ویروس‌های حامل miR-499a می‌توانند بعنوان ابزاری مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی مورد استفاده قرار گیرند و با تولید کاردیومیوسیت‌ها، در درمان برخی بیماری‌های قلبی مرتبط با آسیب بافت قلب، به‌کار گرفته شوند. هدف از این مطالعه، تولید لنتی ویروس‌های حامل رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a می‌باشد که با اثر بر سلول‌های بنیادی و ترانس داکشن آن‌ها، سبب بیان دایمی این ریز RNA در سلول‌های ترنسداکت شده گشتند. با استفاده از این حامل لنتی ویروسی و افزایش بیان پایدار miRNA-499a در سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان، می‌توان زمینه را برای مطالعات تمایز این سلول‌ها به سلول‌های قلبی و استفاده درمانی از سلول های تمایز یافته فراهم ساخت.

مواد و روش ها

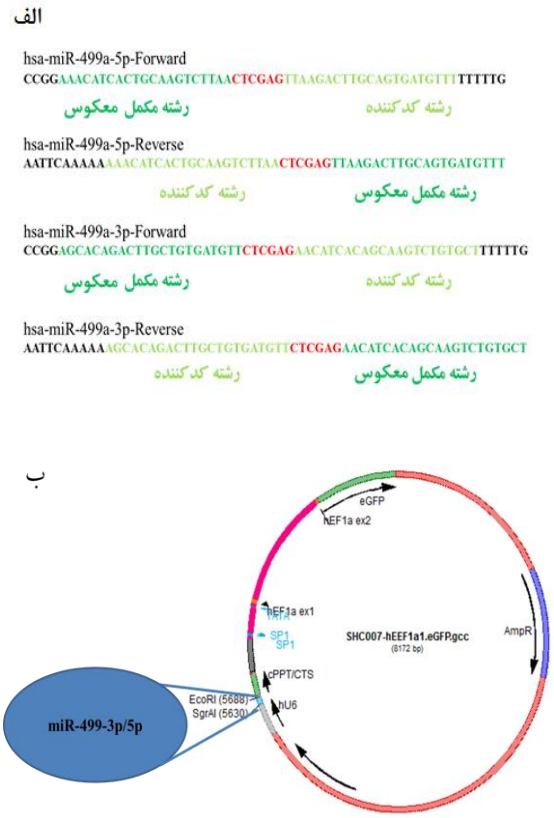
مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است.

طراحی، ساخت و کلون کردن miR-499a

توالی‌های بالغ hsa-microRNA-499a (hsa-miR-499a-3p و hsa-miR-499a-5p) از سایت miRBase

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

(http://www.mirbase.org/) بـه‌دسـت آمـد و از ایـن توالی‌ها برای ساخت یک رشته اولیگوریبونوکلئوتیـدی استفاده شد. در رشته مزبور، به ترتیب تـوالی مربـوط بـه جایگاه اثر آنزیم SgrAI، توالی مکمـل معکـوس تـوالی کدکننـده hsa-miR-499a-3p یـا hsa-miR-499a-5p، توالی مربوط به جایگـاه اثـر آنـزیم XhoI کـه بـه‌عنـوان لوپ عمل می‌کند، توالی کدکننده hsa-miR-499a-3p یـا hsa-miR-499a-5p، نوکلئوتیـدهای T کـه سـیگنال پایان رونویسی برای polymerase III RNA می‌باشند و توالی مربوط به جایگاه اثر آنـزیم EcoRI قـرار گرفتنـد. این رشته به عنوان رشته پیشـرو در نظـر گرفتـه شـد و بـا توجه به آن رشته پیرو ساخته شد. تصویر شماره ۱-الف، توالی‌های کدکننده و توالی‌های مکمل معکوس را نشان می‌دهد. در ادامه هیبریداسیون دو رشته پیرو و پیشـرو انجـام شد. برای انجام واکنش هیبریداسـیون، الیگونوکلئوتیـدهای پیـرو و پیشـرو کدکننـده miR-499a -3p/5p بـا غلظـت ۱۰۰ µM تهیه، و مخلوط شدند و به مدت یـک سـاعت در دمای اتاق قرار گرفتند. محصول هیبریداسیون توسط فرآینـد لیگاسـیون وارد شـاتل وکتـور لنتـی ویروسـی SHC007 (Sigma-Aldrich، آلمـان) شـد. بـرای انجـام لیگاسیون ابتدا این پلاسمید توسط آنزیم‌هـای EcoRI و SgrAI که هر دو انتهای چسبنده ایجـاد مـی‌کننـد بـرش داده شد. طی واکنش لیگاسیون که در دمـای اتـاق و بـه مدت یک ساعت و نیم انجام گرفت، اولیگونوکلئوتیدها بـا اسـتفاده از آنـزیم T4 DNA lygase (Fermentase، آمریکا) وارد وکتور شدند. تصویر شماره ۱- ب، نقشـه ژنتیکـی وکتـور SHC007 را نشـان مـی‌دهـد. واکـنش ترانسفورماسیون و ورود وکتورهای نوترکیب بـه داخـل باکتری *Escherichia coli* سویه Gene Hog با اسـتفاده از شوک حرارتی انجام گردید. واکنش هضم آنزیمی به منظور تأیید ورود صحیح توالی‌هـای مربـوط بـه miR-499a -3p/5p به وکتور مورد نظر انجام شد. بـدین ترتیـب که وکتورهای لنتـی ویروسـی مربـوط، توسـط ۴ آنـزیم (AccI، HaeII، PVuI و XhoI) کـه مـی‌توانسـتند بـین نمونه‌های وکتور اصلی (نمونه‌هایی که miRNA به آن‌ها وارد نشده و یا خود ترکیبی کرده‌اند) و وکتورهـای حـاوی miRNA، تفاوت ایجـاد کننـد، بـرش داده شـدند. بـرای تأیید توالی اولیگونوکلئوتیدهای وارد شده بـه پلاسـمید نوترکیب نیز از روش توالی یابی سنگر استفاده شد.



تصویر شماره ۱: طراحی پرایمر های پیشرو و پیـرو بـرای رشـته هـای کـد کننـده miRNA-499a و کلـون کـردن آن هـا در شـاتل لنتـی ویروسی، الف: توالی های سبز روشن رشته هـای کـد کننـده و سـبز تیره توالی های مکمل معکوس آن را نشـان مـی دهنـد. تـوالی قرمـز رنگ برای ایجـاد لـوپ و تشـکیل سـاختار سـنجاق سـری ضـروری است و توالی های سیاه رنگ نیز جایگاه های اثـر آنزیمـی را شـکل می دهند، ب: نقشه ژنتیکی وکتور SHC007 که در آن بخـش هـای مختلف وکتور، جایگاه هـای بـرش آنـزیم هـای EcoRI و SgrAI و محل قرارگیری miRNA-499a نشان داده شده است.

ترانس فکشن سلول های HEK-293T

ابتـدا سـلول‌هـای HEK-293T در فلاسـک‌هـای ۱۷۵cm^2 کشت شدند و زمـانی کـه تـراکم سـلول‌هـا بـه ۷۰-۶۵ درصد رسید، محیط ترانس فکشـن بـه سـلول‌هـا

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

اضافه شد. این محیط حاوی NaCl (۱۵۰ mM) و پلی‌اتیلن ایمین (PEI) PolysciencesEurope، آلمان)، پلاسمید حامل miR-499a -3p/5p و دو پلاسمید کمکی psPAX2، pLPVSVG به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ بود. پس از قرارگیری سلول‌ها به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در این محیط، میزان ترنسفکت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. سپس محیط ترانس فکشن تعویض شده و پس از شستشوی سلول‌ها با PBS محیط تازه به آن ها اضافه گردید.

افزایش غلظت ویروس های به دست آمده

پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود، سانتریفیوژ شد تا سلول‌های موجود در آن حذف گردند. به منظور تخلیص و تغلیظ ذرات لنتی ویروسی، محیط کشت حاوی ویروس به فالکون منتقل شده و سوکروز ۲۰ درصد به آن اضافه گردید. به مدت دو ساعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اولترا سانتریفیوژ شد. ویروس‌های چسبیده به ته فالکون در ۵۰۰ ماکرولیتر BSA (۱ درصد) حل شد و در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند.

ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی

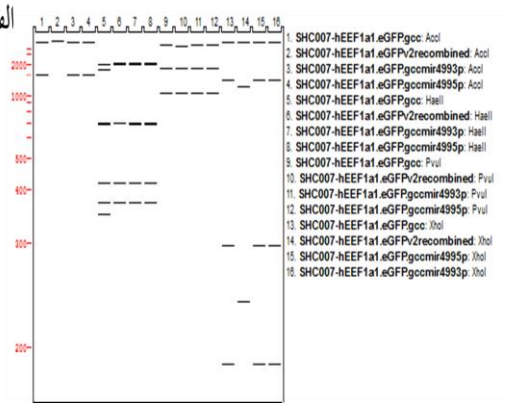
سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBM-MSCs) تعیین خصوصیت شده، از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه شدند. سلول‌های مورد نیاز از پاساژ ۳ انتخاب شد و به تعداد ۵×۱۰^{۳} کشت شدند. حدود ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها، میزان آن‌ها به حدی رسید که حدود ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند. در این مرحله سلول‌های مذکور با ویروس‌های کنترل (ویروس بدون ریز RNA)، ویروس‌های حامل miR499a-3p و mir499a-5p با غلظت ۳ µl/ml به‌طور جداگانه تیمار شدند. محیط حاوی ویروس به مدت ۱۶ ساعت در معرض سلول‌ها قرار گرفت و پس از آن به طور کامل برداشته شد و سلول‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شدن، به آن ها محیط کشت معمولی حاوی FBS (۱۰ درصد) اضافه شد. کارایی ترانس داکشن با استفاده از نور فلورسنت سبز ساطع شده توسط eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)، ۷۲ ساعت پس از تأثیر ویروس، بررسی شد.

یافته ها

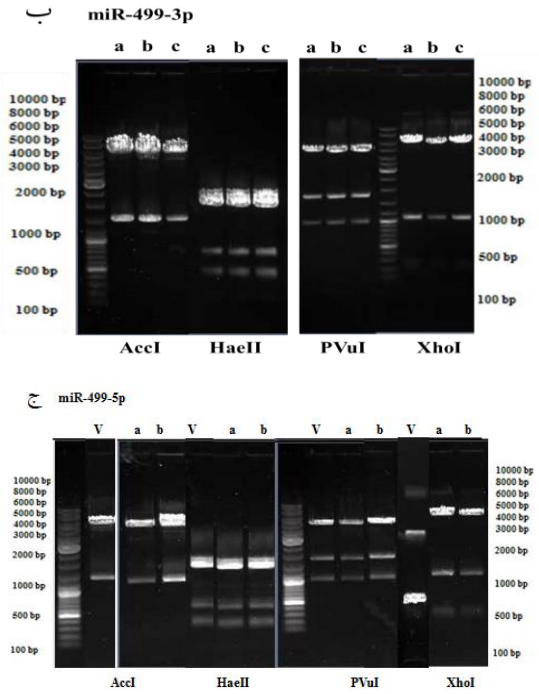
تأیید ورود صحیح توالی های مربوط به miR-499a-3p و miR-499a-5p

وکتورهای لنتی ویروسی حامل miRNA-499a-3p/5p و کنترل، توسط ۴ آنزیم (AccI، HaeII، PVuI و XhoI) برش داده شدند. با توجه به نقشه ژنتیکی وکتور حامل توالی‌های miR-499a -3p/5p، در صورت ورود صحیح توالی‌ها به وکتور باید باندهایی مشابه با تصویر شماره ۲-الف ایجاد گردد. از آن‌جایی که وکتورهای مورد نظر از کلون های مختلفی بدست آمده بودند، واکنش هضم آنزیمی وکتور هایی که به طور صحیح اولیگونوکلئوتیدها را دریافت کرده بودند را تأیید کرد (تصویر شماره ۲-ب و ج). واکنش توالی‌یابی که به منظور تأیید عدم جهش در بین نوکلئوتیدهای مورد نظر انجام شد تنها صحت توالی وارد شده در برخی وکتورها را تأیید کرد. وکتورهای صحیح حامل توالی‌های miR-499a -3p/5p برای ساخت لنتی ویروس‌های مربوطه استفاده شدند.

الف



Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018



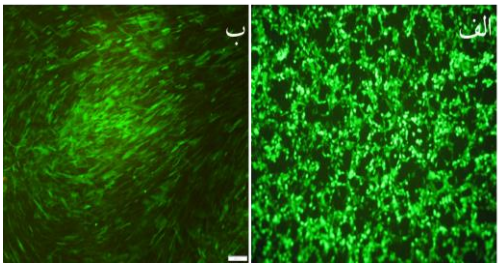
تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم های ACCI، HaeII، PVuI و XhoI، الف: اندازه باند های مورد انتظار پس از اثر آنزیم ها بر نمونه های مختلف، ب: باند های ایجاد شده حاصل از هضم آنزیمی در کلون های مختلف از miR-499a-3p، ج: miR-499a-5p، کلون های مختلف با حروف انگلیسی نشان داده شده اند، V (وکتور اصلی که هضم آنزیمی بر روی آن انجام شده است).

ترانس فکشن سلول های HEK-293T

نتایج ترانس فکشن سلول های HEK-293T نشان داد که حدود ۹۰ درصد از سلول‌های HEK-293T، eGFP را بیان می کنند (تصویر شماره ۳-الف).

ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی

نتایج ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی که در معرض ذرات لنتی ویروسی قرار گرفته بودند نشان داد که در حدود ۸۰ درصد سلول ها پس از گذشت سه روز eGFP را بیان کردند (تصویر شماره ۳-ب). از آن‌جایی که بیان بالای eGFP نشان دهنده بیان بالای ژن‌های کلون شده همراه آن می‌باشد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانستند به میزان مناسبی miR-499a-3p/5p را بیان کنند.



تصویر شماره ۳: بررسی بیان eGFP. الف: بیان eGFP در سلول های HEK-293T، ب: سلول های بنیادی مزانشیمی. همانطور که در تصویر مشاهده می شود حدود ۸۰ درصد سلول های HEK-293T و ۷۰ درصد سلول های بنیادی مزانشیمی $eGFP^+$ بوده و رنگ سبز را نشان داده اند.

بحث

انفارکتوس قلبی از علل عمده مرگ و میر در جهان بوده و به علت کاهش یا عدم خون رسانی در بخش‌هایی از قلب و متعاقب آن آسیب به سلول های قلبی ایجاد می گردد(۱۲). یکی از اهداف مهم پزشکی ترمیمی مرتبط با بیماری‌های قلبی، ترمیم بافت‌های آسیب دیده و جایگزین نمودن آن‌ها با سلول‌های عملکردی می‌باشد(۱۳). منابع سلولی متعددی از جمله سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ، توانایی تمایز به کاردیومیوسیت‌ها و بهبود عملکرد قلب پس از پیوند به آن را دارند(۱۴، ۱۵). به دست آوردن تعداد زیادی کاردیومیوسیت نیازمند اعمالی چون القاء سلول‌های بنیادی در شرایط in vitro و استفاده از روش‌هایی مانند ورود ژن به این سلول ها و تمایز هدفمند آن‌ها است. با استفاده از وکتورهای ویروسی مانند لنتی ویروس‌ها می توان القاء مداوم و بیان همیشگی ژن های مورد نظر در سلول های هدف را سبب شد(۱۲).

مطالعه مسیر تمایزی قلب نشان می‌دهد که ژن‌ها، ریز RNA ها و عوامل متعددی در تکوین و تکامل قلب، تمایز سلول‌های قلبی و ایجاد کاردیومیوسیت‌ها دخیل هستند(۱۶). در این میان مطالعات نوین نشان داده‌اند که ریز RNAهای متعددی سبب تمایز و ایجاد کاریومیوسیت‌ها می‌شوند که از میان آن‌ها نقش miR-499a به دلیل

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

شرکت در مسیرهای سلولی چندگانه مرتبط با تمایز سلول‌های قلبی، قابل توجه است(۱۷). باتوجه به مطالب ذکر شده در این مطالعه، ساخت حامل‌های لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a-3p و miRNA-499a-5p جهت القاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور توالی رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسمید ویژه ای کلون شدند.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی یابی، کلون شدن صحیح رشته های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسمید لنتی ویروسی را نشان دادند. پس از ساخت لنتی ویروس‌ها و اثر بر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، کارایی ترانس داکشن ویروس های ساخته شده تأیید شد و نتایج نشان داد که تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانسته اند ویروس حامل ریز RNA را دریافت کنند.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که miRNA-499a در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن نقش داشته و می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی در برخی بیماری‌ها مورد توجه قرار گیرد(۱۸). به عنوان مثال بیان این ریز RNA در هنگام آسیب بافت مغز افزایش یافته و سطح سرمی آن بالا می‌رود(۱۹، ۲۰). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که بیان miRNA-499a بطور مشخصی در انواعی از سرطان تغییر می‌کند و بیان بالای آن به عنوان یک عامل مهاری در رشد، تکثیر و مهاجرت سلول های سرطانی مانند سرطان ریه و سینه عمل می کند(۲۱). همان طور که ذکر شد، در بسیاری از مطالعات نقش عملکردی این ریز RNA در فرآیند تکامل قلب و تمایز سلول‌های قلبی نیز بررسی شده است. مولکول miRNA-499a کنترل بیان تعدادی از ژن های ویژه قلبی را بر عهده دارد که این امر نقش مهم این مولکول زیستی را در تمایز قلب روشن می سازد(۱۰). افزایش اجباری بیان miR-499a، سبب تسریع و پیشرفت تمایز سلول های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. انواعی از سلول های بنیادی هم‌چون سلول‌های بنیادی رویانی، سلول‌های بنیادی قلبی انسان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت، با لنتی ویروس های حامل miR-499a القاء شده و به کاردیومیوسیت ها بالغ و دارای عملکرد تمایز یافته اند(۹، ۱۰، ۱۲). بر اساس مطالعات تاکنون ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با لنتی ویروس های حامل miR-499a و رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به آن انجام نشده است. از آن‌جایی که کارایی ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان توسط لنتی ویروس های ساخته شده بالا بوده است، می‌توان از این ویروس‌ها در مطالعات مربوط به تمایز سلول های بنیادی و کاربردهای درمانی آن‌ها استفاده نمود (تصویر شماره ۳-ب). همچنین القاء hBM-MSCs، توسط لنتی ویروس‌های حامل رشته‌های ۳p و miR-499a ۵p، می‌تواند نقش متفاوت رشته‌های ۳p و ۵p را در فرآیند تمایز این سلول‌ها مشخص سازد. در سال‌های اخیر، پزشکی ترمیمی، با هدف جایگزینی بافت‌های از دست رفته با بافتی زنده و دارای عملکرد مناسب، به عنوان یکی از شاخه‌های مهم علم پزشکی، در درمان بیماری‌های مختلف ازجمله بیماری‌های قلبی، مورد توجه واقع شده است. استفاده از سلول های بنیادی و القاء آن‌ها توسط ریز RNA ها با توجه به کارکردهای مهم آن‌ها، می‌تواند عملکرد این مولکول‌ها در فرآیند تمایز را نشان داده و بهینه‌سازی تمایز سلول‌های بنیادی به بافت های مورد نظر را سبب گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه قسمتی از پروژه پایان نامه دکترای تخصصی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (طرح پژوهشی شماره ۹۱۰۷۸۷) بوده و با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از همکاری صمیمانه اعضاء آزمایشگاه کاردیولوژی، مرکز دانشگاه پزشکی لایدن هلند اعلام می دارند.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018

References

1. Barth AS, Kizana E, Smith RR, Terrovitis J, Dong P, Leppo MK, et al. Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na+-Ca2+ exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells. Mol Ther 2008; 16(5): 957-964.
2. Limoni SK, Salimi F, Moghaddam MF. Designing pLEX-LAMP-DARPin Lentiviral Vector for Exression of HER2 Targeted DARPin on Exosome Surface. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(151):12-23 (Persian).
3. Allahverdi A, Abroun S, Jafarian A, Soleimani M, Taghikhani M, Eskandari F. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells by Using A Lentiviral Vector Carrying PDX1. Cell J 2015; 17(2): 231-242.
4. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochim Biophys Acta 2010; 1803(11): 1231-1243.
5. Zheng S, Zhang S, Song Y, Guo W, Zhai W, Qiu X, et al. MicroRNA-297a regulates vascular calcification by targeting fibroblast growth factor 23. Iran J Basic Med Sci 2016; 19(12): 1331-1336 (Persian).
6. Tao L, Bei Y, Zhou Y, Xiao J, Xinli L. Non-Coding RNAs in Cardiac Regeneration. Oncotarget 2015; 6(40): 42613–42618.
7. Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. Exp Ther Med 2017; 13(1): 3-8.
8. Jakob P, Landmesser U. Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. Cardiovasc Res 2012;(4): 614-422.
9. Hosoda T, Zheng H, Cabral-Da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. Circulation 2011; 123(12): 1287-1296.
10. Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu J, Sun N, Abilez OJ, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Role for miR-499. Circ Cardivasc Genet. 2010; 3(5):426–435.
11. Li X, Wang J, Jia Z, Cui Q, Zhang C, Wang W, et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. PLoS One 2013; 8(9): e74504.
12. Zhang L lu, Liu J jin, Liu F, Liu W hua, Wang Y shun, Zhu B, et al. MiR-499 induces cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells through wnt/β-catenin signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 2012; 420(4): 875-881.
13. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, et al. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the global burden of disease 2010 study. Circulation 2014; 129(14): 1493-1501.
14. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circ Res 2007;100(9):1249–1260.
15. Rajala K, Pekkanen-mattila M, Aalto-set K. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Int 2011; 2011(1).
16. Serradifalco C, Zummo G, Felice V. MicroRNA and Cardiac Stem Cell Therapy. J Clin Exp Cardiolg 2012; S11.
17. Fu JD, Rushing SN, Lieu DK, Chan CW, Kong CW, Geng L, et al. Distinct roles of microRNA-1 and-499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. PLoS One 2011; 6(11): e27417.
18. Xin Y, Yang C, Han Z. Circulating miR-499

as a potential biomarker for acute myocardial infarction. Ann Transl Med 2016; 4(7): 7–10.

19. Hu Z, Yu D, Almeida-suhett C, Tu K, Marini AM, Eiden L, et al. Expression of miRNAs and Their Cooperative Regulation of the Pathophysiology in Traumatic Brain Injury. Plos One 2012; 7(6): e39357.
20. You WD, Tang QL, Wang L, Lei J, Feng JF, Mao QY, et al. Alteration of microRNA expression in cerebrospinal fl uid of unconscious patients after traumatic brain injury and a bioinformatic analysis of related single nucleotide polymorphisms. Chin J Traumatol 2016; 19(1): 11-15.
21. Li M, Zhang S, Wu N, Wu L, Wang C, Lin Y. Overexpression of miR-499-5p inhibits non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting VAV3. Nat Publ Gr 2016; 1-10.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:18 +0330 on Thursday November 15th 2018