چالش‌های انتقال ژن به سلول‌های سرطانی ردهٔ کلورکتال (CRC)

نسرین رستگاروند[۱]، حوریه سلیمان جاهی[۲]، احسان عارفیان[۳]، محمودرضا پورکریم[۴]، فاطمه سعادت پور[۵]، راحیل قنبرنسب بهبهانی[۶]

۱- دانشجوی دکتری ویروس شناسی، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- محقق ارشد دانشگاه، آزمایشگاه ویروس شناسی بالینی و اپیدمیولوژیک، دانشگاه Katholieke ، لوون، بلژیک

۵- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۶- کارشناس آزمایشگاه، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران

یافته / دوره ۲۵ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۲ / مسلسل ۹۷

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۲۰

مقدمه: انتقال ژن، یک ابزار قدرتمند برای تغییر عملکرد سلول‌ها است که از کاربردهای آن می‌توان به درمان انواع بیماری‌ها اشاره کرد. با این وجود، مطالعات مختلف نشان می‌دهد که علیرغم وجود تنوع در روش‌های انتقال ژن، محدودیت‌های قابل توجهی در کاربرد هر روش وجود دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه دو روش انتقال ژن با استفاده از ترکیبات PEI و لیپوفکتامین در سلول‌های سرطانی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از Caco-2 و HCT-116 به عنوان سلول‌های هدف و از سلول HEK-293 نیز به عنوان سلول کنترل استفاده شد. بدین منظور، ابتدا انتقال ژن با استفاده از دو مادهٔ PEI و لیپوفکتامین انجام شد و سپس نتایج آنها بر اساس بیان پروتئین GFP با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که انتقال ژن در سلول‌های HEK-293، به میزان مطلوبی صورت گرفته است، اما این فرآیند در سلول‌های رده کلورکتال بسیار ناچیز بود. همچنین در این میان، تفاوت‌هایی نیز بین میزان انتقال ژن در سلول‌های کلورکتال مشاهده شد؛ به گونه‌ای که میزان ترنسفکت در سلول‌های Caco-2 از سلول‌های HCT-116 کمتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: میزان پذیرش ژن خارجی در سلول ها، به عوامل متعددی از جمله نوع و منشأ سلول وابسته است. از آنجائیکه سلول‌های سرطانی دستخوش تغییرات متعدد ژنتیکی شده‌اند، در نتیجه دستکاری ژنتیکی آنها با محدودیت‌های بسیاری همراه است. به همین منظور توصیه می‌شود برای دستیابی به میزان بالای انتقال ژن در این سلول‌ها، از سایر روش‌ها مانند گزینش سلول به وسیلهٔ آنتی بیوتیک و تهیهٔ رده سلولی پایدار استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ترنسفکشن، لیپوفکتامین، سرطان، کلورکتال، سیستم انتقال ژن.

*آدرس مکاتبه: تهران، جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی.

پست الکترونیک: soleim_h@modares.ac.ir

مقدمه

فرآیند سلول درمانی و مهندسی سلولی، از طریق ورود بیو مولکول‌های سنتتیک و نانو مواد عملکردی به درون سلول آغاز می‌شود (۱). در سال‌های اخیر؛ انتقال اسیدهای نوکلئیک به درون سلول و استفاده از آنها به منظور درمان بیماری‌های مختلف، توجهات بسیاری را به خود جلب کرده است (۲, ۳). انتقال مولکول‌های DNA نوترکیب به درون سلول‌ها، یک ابزار تحقیقاتی قدرتمند در بیولوژی مولکولی است که هدف آن بررسی عملکرد ژن‌ها و پروتئین‌ها و همچنین مطالعه اثر آنها بر روی وقایع بعدی سلول است (۲, ۴). متاسفانه علیرغم کلیه مطالعاتی که تا به حال انجام گرفته، کماکان مشکلات بسیاری در این زمینه وجود دارد (۳).

به طور کلی، دو روش متداول برای انتقال ژن وجود دارد: ۱- انتقال ژن با استفاده از ویروس‌ها ۲- انتقال ژن با استفاده از عوامل غیر ویروسی که خود شامل انتقال شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی است (۵, ۶). در روش اول؛ از ویروس‌هایی مانند آدنو ویروس، هرپس ویروس و لنتی ویروس به عنوان ناقل ژن استفاده می‌شود. استفاده از این وکتورهای ویروسی؛ علیرغم داشتن مزایایی مانند قابلیت بالای انتقال ژن، با نگرانی‌هایی نیز همراه است. از جمله این نگرانی‌ها می‌توان به تحریک سیستم ایمنی، ایجاد موتاسیون، راه اندازی پاسخ‌های پیش التهابی و همچنین ایجاد سرطان اشاره کرد (۶, ۷).

تا به امروز، ترکیبات غیر ویروسی بسیاری به منظور انتقال ژن به درون سلول‌ها ساخته شده است. با وجود اینکه کارآیی این محلول‌ها و میزان سمیت شان بر اساس نوع سلول‌های مختلف متفاوت است؛ اما مطالعات نشان داده که هرچه قدرت انتقال ژن یک محلول بیشتر باشد؛ به همان نسبت نیز میزان سمیت آن بیشتر خواهد بود (۳). انتقال ژن با کمک مواد شیمیایی، یکی از مرسوم‌ترین روش‌ها برای بررسی بیان ژن در سلول‌های پستانداران است (۲). از جملهٔ این محلول‌های شیمیایی می‌توان به لیپیدهای کاتیونی، پلیمرهای آنیونی، پپتیدها و آنالوگ‌های کربوهیدراتی اشاره کرد (۷-۵). با اینکه در مقایسه با انتقال ژن با استفاده از ویروس‌ها، این وکتورها کارآمدی کمتری دارند؛ اما میزان سمیت و ایمنوژنیسیتی آن‌ها نیز بسیار کمتر است. علاوه بر آن، کاربرد این ترکیبات ساده‌تر بوده و به علت مقرون به صرفه بودن، میزان تکرارپذیری بیشتری نیز دارند (۲, ۷, ۸). نحوه عملکرد این محلول‌ها بدین صورت است که آنها با در بر گرفتن DNA یا RNA؛ علاوه بر تسهیل فرآیند انتقال، ژن مورد نظر را در برابر تخریب توسط آنزیم‌های سلولی نیز محافظت می‌کنند. این در بر گرفتن، حاصل تعامل یونی بین مولکول‌های ناقل با بار مثبت و اسیدهای نوکلئیک با بار منفی می‌باشد. مکانیسم انتقال سلولی، متناسب با نوع محلول مورد استفاده، به صورت اندوسیتوز یا فیوژن است (۲, ۵, ۹). انتخاب نوع محلول انتقال ژن به عواملی مانند نوع سلول میزبان، نوع ترنس ژن و موقت یا پایدار بودن انتقال بستگی دارد. با این حال، فرآیند استفاده از این محلول‌ها نیازمند بهینه سازی است تا بتواند بالاترین میزان کارآیی را داشته باشد (۹).

در این میان؛ دو ماده لیپوفکتامین (Lipofectamine) و پلی اتیلن ایمین (PEI) از شناخته شده ترین ترکیبات برای انتقال ژن هستند که به ترتیب دارای ساختار لیپیدی کاتیونی و پلیمری بوده و غالباً به عنوان استاندارد طلائی برای انتقال ژن به روش غیر ویروسی مطرح هستند. با این وجود، سمیت سلولی و حساسیت به حضور سرم و آنتی بیوتیک، استفاده ازآنها را با محدودیت‌هایی مواجه ساخته است (۱۰).

لیپوفکتامین به عنوان یک لیپید کاتیونی؛ یکی از متداول‌ترین محلول‌ها برای انتقال ژن است که کارآیی بالایی بر روی اکثر سلول‌ها دارد. در ساختمان لیپیدهای کاتیونی، فسفولیپیدهای دولایه‌ای وجود دارد که دارای

سرهایی با بار مثبت و یک یا دو دم هیدروفوب می‌باشند. سرهای قطبی، با اسکلت فسفاتی اسید نوکلئیک، تعامل الکتروستاتیکی برقرار کرده و بار مثبت لیپوزوم آن‌ها را قادر می‌سازد تا به روش اندوسیتوز از غشای سلولی، که دارای بار منفی است، عبور کنند (۱۱).

PEI نیز یکی از پرکاربردترین پلیمرهای کاتیونی برای انتقال ژن است که از مزایای آن می‌توان به کاربرد ساده، کارآیی بالا، سازگاری با محیط‌های فاقد سرم و مقرون به صرفه بودن آن اشاره کرد. این ترکیبات برای انتقال پلاسمیدهای حاوی قطعات بزرگ DNA و همچنین الیگونوکلئوتیدهای کوچک به درون سلول کاربرد دارند. نحوه عملکرد آن بدین صورت است که تعامل الکتروستاتیکی بین بار مثبت گروه‌های آمینی PEI و بار منفی گروه‌های فسفات DNA باعث می‌شود تا DNA خنثی و فشرده شده و به درون سلول وارد شود. همچنین این آمین‌ها باعث کاهش بار منفی DNA شده و در نتیجه آن را از تخریب هسته‌ای مصون می‌دارند (۱۲, ۱۳).

از آنجایی‌که سلول‌های سرطانی رده کلورکتال یکی از پرکاربردترین سلول‌ها در زمینهٔ ژن درمانی هستند و همچنین با توجه به پاسخ نامناسب این سرطان به درمان (۱۴)، در این مطالعه تصمیم گرفته شد تا امکان انتقال ژن در شرایط آزمایشگاهی بر روی این سلول‌ها بررسی شود. در نتیجه هدف از این مطالعه، انتقال ژن به درون سلول‌های هدف و کنترل با استفاده از دو مادهٔ PEI و لیپوفکتامین و مقایسه نتایج آنها با یکدیگر است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

در این مطالعه از سه نوع سلول مختلف استفاده شد. سلول‌های Caco-2 (تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) و HCT-116 (تهیه شده از ذخایر سلولی گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس) که هر دو متعلق به رده کلورکتال بوده و سلول اصلی و هدف این مطالعه محسوب می‌شوند. همچنین به منظور بررسی صحت مراحل انتقال ژن؛ از سلول HEK-293 (Human Embryonic Kidney) (تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) استفاده شد که این سلول نیز متعلق به کلیهٔ جنین انسان است. یکی از علت‌های استفاده از سلول‌های HEK-293 به عنوان سلول کنترل؛ تکثیر پذیری آسان و ظرفیت بالای آن برای دریافت ژن خارجی است. به گونه‌ای که به علت بیان زیاد پروتئین متعاقب انتقال ژن، HEK-293 یکی از پرکاربردترین سلول‌ها برای تولید ویروس محسوب می‌شود. کشت سلول‌ها در محیط Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) (ایده زیست نوترکیب/ایران) حاوی ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (FBS) (ایده زیست نوترکیب/ ایران) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin/ Pen- Strep) (ایده زیست نوترکیب/ ایران) صورت گرفت و سپس سلول‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و دی اکسید کربن ۵٪ منتقل شدند.

تهیه پلاسمید

پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه از نوع P-lenti (بن یاخته/ ایران) است که سایز این پلاسمید حدود 8.4 kb بوده و حاوی توالی میکرو RNA به عنوان ترنس ژن، مارکر پروتئینی Green Fluorescent Protein (GFP) و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین/نئومایسین است.

انتقال پلاسمید به درون باکتری

فرآیند انتقال پلاسمید با استفاده از ماده کلسیم کلراید به درون باکتری Top10 صورت گرفت. مراحل کار بدین صورت بودکه ابتدا از باکتری Top10 کشت تازه تهیه شد و آنها در چندین مرحله رسوب گیری شدند. سپس، محلول خنک کلسیم کلراید را در چندین مرحله به رسوب باکتری اضافه کرده و پس از حل کردن رسوب و انکوباسیون آن، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ مجدداً رسوب گیری شدند. پس از جداسازی فاز مایع، این مرحله مجدداً تکرار شد. در این زمان، دیواره باکتری مستعد عبور

پلاسمید شده است؛ در نتیجه با استفاده از شوک حرارتی، ورود پلاسمید به داخل باکتری صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا رسوب باکتری‌ها را با پلاسمید ترکیب کرده و محلول مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در یخ، ۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲ درجه و مجدداً ۳ دقیقه در یخ انکوبه شدند. سپس به باکتری‌ها، محیط Luria-Bertani (LB) (زیست کاوش ایرانیان/ ایران) فاقد آنتی بیوتیک افزوده شد تا بازیابی شوند. پس از آن، باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و در محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین به صورت چند منطقه‌ای کشت داده شدند. در نهایت نیز به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند.

تکثیر پلاسمید

مراحل کشت باکتری در محیط LB انجام شد. بدین صورت که ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر باکتری به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱٪ کانامایسین (Sigma- Aldrich/ آمریکا) افزوده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد.

استخراج پلاسمید

مراحل کار توسط کیت ستونی FavorPrep (Favorgen/ تایوان) و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. در مرحله نهایی نیز به رسوب به دست آمده، بافر elution افزوده شد و پس از سانتریفیوژ، نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

انتقال ژن به روش PEI

بدین منظور، سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪ محیط آنها مورد تعویض قرار گرفت. سپس سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در مجاورت محیط بدون سرم قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد، محلول PEI (Sigma- Aldrich/ آمریکا) را با نسبت‌های مختلف با پلاسمید ترکیب کرده و محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس این ترکیب را به سلول‌ها افزوده و پلیت به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، سلول‌ها تعویض محیط شدند و به آنها محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS افزوده شد و نتایج در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ فلورسنت تحت خوانش قرار گرفتند.

انتقال ژن به روش لیپوفکتامین

به این منظور از پلیت ۲۴ خانه استفاده شد و پس از اینکه سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰٪ رسیدند مراحل انتقال ژن بر روی آن انجام شد. بدین منظور از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Fisher Thermo/ آمریکا) استفاده شد و مراحل طبق پروتکل کیت انجام گرفت. سپس نتایج در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

تائید حضور ژن مقامت به کانامایسین در پلاسمید

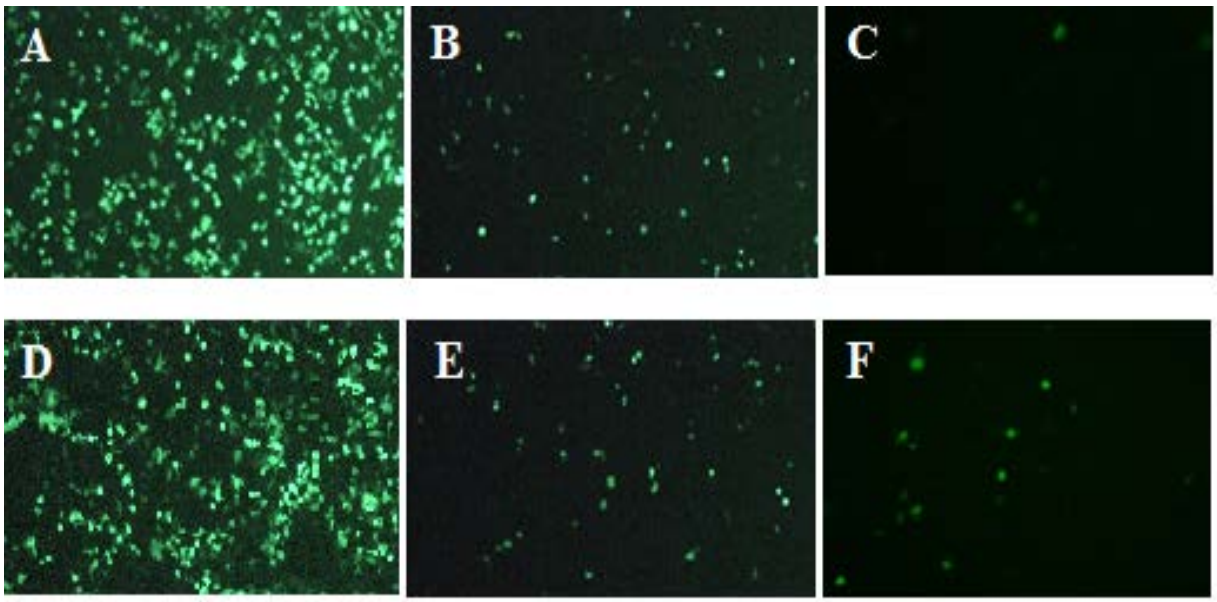
به منظور بررسی حضور ژن مقاومت به کانامایسین و تائید مراحل انتقال پلاسمید، در کنار تست، نتایج نمونه‌های کنترل مثبت و منفی نیز بررسی شدند. بدین منظور، از یک پلاسمید حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد و کشت باکتری حاوی این پلاسمید در دو پلیت آگار، که یکی دارای آنتی بیوتیک کانامایسین و دیگری فاقد آن بود، انجام گرفت. رشد این باکتری در پلیت حاوی آنتی بیوتیک، بیانگر تائید عملکرد صحیح آنتی بیوتیک و در پلیت فاقد آنتی بیوتیک نیز، موید صحت باکتری و از بین نرفتن آن در مراحل انتقال بود. عدم رشد نمونه کنترل منفی در پلیت حاوی آنتی بیوتیک نیز نشان دهنده صحت عملکرد کانامایسین بود. رشد باکتری حاوی پلاسمید تست نیز درستی مراحل انتقال و حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک در پلاسمید را تائید کرد. در انتها نیز باکتری از یکی از کلنی‌ها برداشته شد و به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع افزوده شد. سپس نمونه به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده

شد تا باکتری تکثیر کرده و در مراحل بعد، ذخیره سازی آن شود.

مقاومت نسبی سلول‌های سرطانی به انتقال ژن با استفاده از لیپیدهای کاتیونی و پلیمرها

از آنجائیکه در این مطالعه از پلاسمید دارای مارکر GFP استفاده شده بود، در نتیجه بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت، نشان دهنده نقاط سبز رنگی بود که این نقاط بیانگر انتقال موفق پلاسمید و به دنبال آن بیان ژن در داخل سلول‌ها بود (تصویر ۱). با استناد به مطالعات مشابه، مشاهده شده بود که انتقال ژن به درون سلول‌های HEK-293 به میزان بالایی صورت می‌گیرد، در نتیجه از این سلول به عنوان سلول کنترل در کنار سلول‌های هدف استفاده شد. بر طبق انتظار، در مقایسه با سلول‌های سرطانی، میزان بیان GFP در سلول HEK-293 بسیار بیشتر بود (تصویر A/۱ و D). ولی در سلول‌های رده کلورکتال، با وجود اینکه انتقال ژن انجام گرفته بود؛ اما میزان آن بسیار ناچیز بود (تصویر ۱).

همچنین در مقایسه‌ای که بین نتایج دو روش انتقال ژن در سلول‌های سرطانی انجام گرفت مشاهده شد که میزان بیان GFP در سلول‌های Caco-2 نسبت به سلول‌های HCT-116 کمتر است. به گونه‌ای که در انتقال ژن به روش PEI، این میزان تقریباً نزدیک به صفر بود (تصویر ۱/ قسمت‌های B، C و E، F)..



تصویر ۱. میزان بیان GFP در سلول‌های ترنسفکت شده که توسط میکروسکوپ فلورسنت (بزرگنمایی 10X) گرفته شده است. ردیف اول سلول‌های ترنسفکت شده توسط PEI و ردیف دوم سلول‌های ترنسفکت شده توسط لیپوفکتامین می‌باشند. ترتیب سلول‌ها بدین صورت است: (A) سلول HEK-293، (B) سلول HCT-116، (C) سلول Caco-2، (D) سلول HEK-293، (E) سلول HCT-116، (F) سلول Caco-2

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه انتقال ژن، یکی از راه‌های مؤثر برای بررسی سلولی و مولکولی عملکرد ژن یا پروتئین و نحوه تنظیم آنها و همچنین سرکوب انکوژن یا تومور است (۴). این فرآیند، نقش مهمی در بیولوژی مولکولی داشته و می‌تواند روشی برای درمان انواع بیماری‌های مختلف باشد. برای مثال، توسعه واکسن‌ها و همچنین راهکارهایی برای درمان انواع سرطان، از کاربردهای انتقال ژن است. با این حال، هدفگیری اختصاصی سلول؛ به ویژه سلول‌های سرطانی، کماکان یکی از چالش‌های موجود بر سر مطالعه در زمینه سرطان است. بدین منظور، نیاز است تا از ترکیباتی استفاده شود که علاوه بر ظرفیت بالای انتقال، سمیت سلولی ناچیزی داشته باشد. به منظور دستیابی به این

هدف؛ باید از وکتورهای قدرتمند، زیست تخریب پذیر و اختصاصی سلول استفاده شود (۱۷-۱۵).

تا به حال مطالعات بسیاری بر روی وکتورهای غیر ویروسی انجام گرفته و در این میان، دو ترکیب PEI و لیپوفکتامین نقش چشمگیری در این مطالعات داشته‌اند. از سال ۱۹۹۵ که PEI برای اولین بار برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت؛ این ماده به یکی از پرکاربردترین ترکیبات برای انتقال ژن تبدیل شد. زیرا از سویی، ژنوم را به شدت متراکم کرده و به ورود آن به درون سلول کمک می‌کند؛ از سوی دیگر، آن را از جذب توسط اندوزوم ها و لیزوزوم ها محافظت می‌کند (۱۸). در واقع این پلیمرهای کاتیونی، با DNA کمپلکس تشکیل داده و تعامل الکتروستاتیکی بین بار مثبت گروه‌های آمینی PEI و بار منفی گروه فسفات DNA باعث می‌شود تا اسید نوکلئیک خنثی و فشرده شود (۱۳).

لیپوفکتامین نیز نوعی لیپید کاتیونی است که به منظور انتقال مؤثر اسید نوکلئیک به درون انواع مختلفی از سلول‌ها کاربرد دارد (۱۹). در این ترکیب، به علت حضور یک یا دو اتم نیتروژن با بار مثبت در گروه سر، بین لیپوفکتامین و مولکول‌های قند- فسفات اسید نوکلئیک تعامل ایجاد می‌شود. همچنین حضور توالی فاصله انداز که گروه سر را به زنجیره‌های هیدورکربنی متصل می‌کند نیز باعث افزایش تماس بین لیپیدهای کاتیونی و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۲۰).

هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان انتقال ژن با استفاده از PEI و لیپوفکتامین در سلول‌های Caco-2 و HCT-116 و مقایسهٔ آن با میزان انتقال در سلول‌های HEK-293 بود. مطالعات نشان داده که با وجود در دسترس بودن روش‌های مختلف؛ میزان انتقال ژن سلول‌ها از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت بوده و سمیت حاصل از این ترکیبات نیز بر اساس نوع سلول‌ها متفاوت است (۲۱).

سلول HEK-293، به علت رشد سریع و آسان و همچنین میزان دریافت ژن بالا، یکی از پرکاربردترین سلول‌ها در زمینهٔ تحقیقات آزمایشگاهی است. در این سلول‌ها، میزان انتقال ژن و متعاقب آن؛ میزان بیان پروتئین بالا بوده و از آن‌ها می‌توان به منظور تولید ویروس نیز استفاده کرد (۲۲-۲۵). همچنین، از سلول HEK-293 به عنوان سلول‌هایی با انتقال ژن آسان یاد می‌شود و از آنها برای کنترل صحت مراحل انتقال، در کنار سلول‌های با انتقال سخت (Hard to Transfect) استفاده می‌شود (۲۱, ۲۶). در مطالعه‌ی حاضرنیز از این سلول‌ها برای کنترل صحت مراحل انتقال ژن و بررسی سلامت و کیفیت پلاسمید حاوی ترنس ژن استفاده شد.

نتایج این مطالعه نیز بیانگر انتقال ژن موفق و با میزان بالا در سلول‌های HEK-293 با هر دو مادهٔ لیپوفکتامین و PEI بود. به گونه‌ای که بیش از نیمی از سلول‌ها به علت بیان مارکر GFP، سبز رنگ شدند (تصویر ۱/ A و D).

دو سلول دیگری که در این مطالعه از آنها استفاده شد، سلول‌های Caco-2 و HCT-116 بودند که هر دو متعلق به رده‌ی کلورکتال می‌باشند. مطالعات پیشین نشان داده که انتقال ژن به سلول‌های سرطانی کارآیی ناچیزی داشته و میزان مرگ و میر این سلول‌ها به دنبال انتقال ژن افزایش می‌یابد (۲۷). سلول‌های رده‌ی کلورکتال نیز از این قاعده مستثنی نبوده و از این رو، از آنها به عنوان سلول‌هایی با انتقال ژن سخت یاد می‌شود. همچنین در مطالعات بالینی نیز سلول‌های سرطان کلورکتال در مقایسه با انواع دیگر سرطان؛ نسبت به درمان مقاومت بیشتری را نشان می‌دهند. (۱۴, ۲۸, ۲۹). در این مطالعه نیز، در مقایسه با سلول‌های کنترل، انتقال ژن در سلول‌های رده‌ی کلورکتال به میزان کمتری انجام شد و حتی با وجود بهینه سازی فرآیند انتقال، کمتر از ۲۰٪ سلول‌ها مارکر GFP را، که یک مارکر بیانی مناسب است، بیان کردند (تصویر ۱/ تصاویر B/E متعلق به میزان انتقال ژن سلول‌های HCT-116 و تصاویر C/F متعلق به میزان انتقال ژن در سلول‌های Caco-2 می‌باشند).

در سال ۲۰۱۹، Xu و همکاران از لیپوفکتامین برای انتقال ژن به سلول‌های رده‌ی کلورکتال استفاده کردند. در آن مطالعه نیز انتقال ژن به سلول‌های سرطانی به میزان کمی صورت گرفت (۳۰). یکی از راهکارهایی که برای افزایش میزان انتقال در سلول‌های با انتقال سخت کاربرد دارد، استفاده از آنتی بیوتیک ها برای ایجاد رده‌ی سلولی پایدار است. بدین منظور، سلول‌ها را در معرض یک آنتی بیوتیک قرار می‌دهند که ژن مقاومت به آن، در پلاسمید حاوی ترنس ژن موجود است. در نتیجه سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند پایدار مانده و سایر سلول از بین می‌روند (۴). در مطالعه‌ای که Yang و همکاران انجام دادند ابتدا فرآیند انتقال ژن در سلول‌های رده‌ی کلورکتال را با استفاده از لیپوفکتامین انجام دادند، سپس سلول‌های حاوی پلاسمید را با آنتی بیوتیک پرومایسین گزینش کردند و بدین گونه با تکثیر آنها، میزان سلول‌های حاوی پلاسمید را افزایش دادند (۳۱).

یکی از نکات حائز اهمیت در انتقال ژن در سلول‌ها، نوع سلول و تراکم آن است. به گونه‌ای که در سلول‌هایی که بافت متراکمی دارند، مهار تماسی می‌تواند بر میزان جذب DNA تأثیر منفی بگذارد. زیرا این حجم از فشردگی، میزان دسترسی ماده مورد نیاز برای انتقال ژن به سلول‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین سلول‌ها باید عاری از هرگونه آلودگی بوده و در محیطی باشند که همهٔ فاکتورهای رشد برای آنها فراهم باشد. همچنین از سایر عوامل تأثیر گذار در انتقال ژن می‌توان به نسبت ژنوم به ماده شیمیایی، pH محلول‌ها و آمادگی غشای سلول برای دریافت ژن اشاره کرد. (۳۵-۳۲). در این مطالعه نیز، بافت فشرده‌ی سلول‌های سرطانی را می‌توان یکی از علل احتمالی میزان ناچیز انتقال ژن بر شمرد. زیرا بر اساس مشاهده‌ها، در سلول‌های رده‌ی کلورکتال در مقایسه با سلول‌های کنترل، انباشتگی بیشتری مشاهده شد. همچنین یکی از ملزومات انتقال ژن به روش‌های فوق، کاهش میزان FBS است، به گونه‌ای که میزان FBS از ۱۰٪ به ۲٪ تقلیل یافت. با توجه به تعداد سلول‌ها و فشردگی آنها، کمبود FBS در محیط کشت را نیز می‌توان یکی از علل ناموفق بودن انتقال ژن معرفی کرد. در نهایت نیز با وجود مقایسه نسبت‌های مختلف ژنوم به ماده شیمیایی و گزینش بهترین نسبت، نتایج قابل قبولی در سلول‌های رده‌ی کلورکتال مشاهده نشد.

نکته قابل توجه در این مطالعه این است که با وجود اینکه هر دو سلول متعلق به رده‌ی کلورکتال می‌باشند، اما در میزان انتقال ژن آنها تفاوت وجود دارد. به گونه‌ای که در مقایسه با سلول‌های HCT-116، سلول‌های Caco-2 به میزان کمتری مارکر GFP را نشان دادند. نتایج بدست آمده در این پژوهش با مطالعهٔ دیگری که بر روی انتقال ژن این دو سلول انجام شده بود هم راستا بود (۳۶). همچنین در مقایسه این دو روش انتقال نشان داده شد، که PEI نسبت به لیپوفکتامین قدرت کمتری برای انتقال ژن به درون سلول‌های Caco-2 دارد. در تائید این نتیجه، می‌توان استناد کرد به مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ بر روی سلول‌های Caco-2 انجام شد و نشان داد که PEI برای انتقال ژن به سلول‌های Caco-2 مناسب نبوده و حتی با وجود بهینه سازی، نمی‌توان انتظار نتایج قابل قبولی از آن داشت. به علاوه، میزان انتقال ژن این سلول‌ها با لیپوفکتامین در مقایسه با PEI بیشتر است (۳۷). در سلول HCT-116 نیز میزان انتقال ژن با هر دو روش تقریباً یکسان بوده و تفاوت چشمگیری بین سلول‌ها مشاهده نشد. Li و همکاران نیز در بررسی سلول‌های HCT-116 به این نتیجه رسیدند که انتقال ژن با استفاده از PEI فقط در حدود ۱۰٪ از سلول‌ها صورت می‌گیرد. همچنین آنها نشان دادند که انتقال ژن با لیپوفکتامین نیز نتایج قابل قبولی نداشته و لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در مقایسه با ۳۰۰۰ قدرت کمتری در انتقال ژن به سلول‌های HCT-116 دارد (۳۸).

لازم به ذکر است که حتی با وجود مطالعات متعدد در زمینه انتقال موفق ژن به سلول‌های رده‌ی کلورکتال با استفاده از لیپوفکتامین، محققین کماکان در پی یافتن

راهکاری جایگزین برای انتقال بیشتر ژن بوده که این خود نشان از ناکافی بودن انتقال با این ماده است (۳۹، ۴۰).

با توجه به اینکه سمیت مواد مورد استفاده برای انتقال ژن سلول‌ها با یکدیگر متفاوت است، لذا این سمیت در سلول‌ها نیز می‌تواند نتایج متفاوتی را ایجاد کند. هر چند که انتقال ژن در سلول‌های سرطانی با انواع روش‌ها سخت و دشوار است اما با این وجود در انتقال با لیپوفکتامین نتایج قابل قبول‌تری نسبت به PEI مشاهده شد. در نتیجه برای انتقال ژن به سلول‌های کلورکتال، مادهٔ PEI توصیه نمی‌شود. همچنین در صورت استفاده از لیپوفکتامین نیز، فرآیند انتقال در کمتر از ۳۰٪ سلول‌ها انجام می‌شود که نشان دهندهٔ این است که فرآیند ورود پلاسمید به درون سلول با موفقیت انجام گرفته است. اما اگر انتقال ژن با هدف بررسی بیان صورت می‌گیرد؛ با قطعیت نمی‌توان اعلام کرد که آیا با این میزان از انتقال، می‌توان انتظار بیان پروتئین را داشت یا خیر. لذا به این منظور توصیه می‌شود که سایر روش‌ها مانند ویروس سازی و یا پایدار کردن سلول‌ها با استفاده از آنتی بیوتیک پرومایسین؛ که ژن مقاومت به آن در بدنه‌ی پلاسمید وجود دارد؛ مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر سید محمود سید خرمی و کلیه کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری نمودند؛ تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می کنند که هیچگونه تعارض منافعی با فرد یا دستگاهی برای انتشار این مقاله وجود ندارد.

حمایت مالی

تمامی نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه متعلق به یک پایان‌نامه دکتری است که توسط Grant Number Med-80899 از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی و پشتیبانی از کمک هزینه INSF به شماره ۹۸۰۱۳۹۵۲ پشتیبانی شده است.

مشارکت نویسندگان

نسرین رستگاروند و حوریه سلیمان جاهی، ارائه ایده. حوریه سلیمان جاهی و احسان عارفیان، هدایت پروژه نسرین رستگاروند، فاطمه سعادت پور و راحیل قنبر نسب بهبهانی، کارهای عملی آزمایشگاه. نسرین رستگاروند، نگارش نسخه اولیه. حوریه سلیمان جاهی و محمود رضا پورکریم، اصلاحات مقاله.

ملاحظات اخلاقی

به منظور انجام این مطالعه نیازی به دریافت کد اخلاق نبود.

References

1. Hur J, Park I, Lim KM, Doh J, Cho S-G, Chung AJ. Microfluidic cell stretching for highly effective gene delivery into hard-to-transfect primary cells. ACS nano. 2020;14(11):15094-106.
2. Gharaati-Far N, Tohidkia MR, Dehnad A, Omidi Y. Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2018;46(5):1001-8.
3. Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. Molecules. 2018;23(10):2564.
4. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2017;773:91-103.
5. Fajrial AK, He QQ, Wirusanti NI, Slansky JE, Ding X. A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. Theranostics. 2020;10(12):5532.
6. Nematollahi MH, Torkzadeh-Mahanai M , Pardakhty A, Ebrahimi Meimand HA, Asadikaram G. Ternary complex of plasmid DNA with NLS-Mu-Mu protein and cationic niosome for biocompatible and efficient gene delivery: a comparative study with protamine and lipofectamine. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2018;46(8):1781-91.
7. Nam J-P, Kim S, Kim SW. Design of PEI-conjugated bio-reducible polymer for efficient gene delivery. International journal of pharmaceutics. 2018;545(1-2):295-305.
8. Martínez-Negro M, Barrán-Berdón AL, Aicart-Ramos C, Moyá ML, de Ilarduya CT, Aicart E, et al. Transfection of plasmid DNA by nanocarriers containing a gemini cationic lipid with an aromatic spacer or its monomeric counterpart. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018;161:519-27.
9. Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R, Zabihollahi R. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. Bratislavske lekarske listy. 2018;119(11):701-5.
10. Gonzalez-Fernandez T, Sathy B, Hobbs C ,Cunniffe G, McCarthy H, Dunne N, et al. Mesenchymal stem cell fate following non-viral gene transfection strongly depends on the choice of delivery vector. Acta biomaterialia. 2017;55:226-38.
11. Berardo C, Siciliano V, Di Pasqua LG, Richelmi P, Vairetti M, Ferrigno A. Comparison between Lipofectamine RNAiMAX and GenMute transfection agents in two cellular models of human hepatoma. European Journal of Histochemistry: EJH. 2019;63(3).
12. González-Domínguez I, Grimaldi N, Cervera L, Ventosa N, Gòdia F. Impact of physicochemical properties of DNA/PEI complexes on transient transfection of

mammalian cells. New biotechnology. 2019;49:88-97.
13. Amani A, Kabiri T, Shafiee S, Hamidi A. Preparation and characterization of PLA-PEG-PLA/PEI/DNA nanoparticles for improvement of transfection efficiency and controlled release of DNA in gene delivery systems. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2019;18(1):125.
14. Tolba MF. Revolutionizing the landscape of colorectal cancer treatment: the potential role of immune checkpoint inhibitors. International journal of cancer. 2020;147(11):2996-3006.
15. Dréan M, Debuigne A, Goncalves C, Jérôme C, Midoux P, Rieger J, et al. Use of primary and secondary polyvinylamines for efficient gene transfection. Biomacromolecules. 2017;18(2):440-51.
16. Louzao I, García-Fandiño R, Montenegro J. Hydrazone-modulated peptides for efficient gene transfection. Journal of Materials Chemistry B. 2017;5(23):4426-34.
17. Dirksmeyer T, Stahl P, Vallet C, Knauer S, Giese M, Schmuck C ,et al. Front Cover: Advances towards Cell-Specific Gene Transfection: A Small-Molecule Approach Allows Order-of-Magnitude Selectivity (Chem. Eur. J. 43/2022). Chemistry–A European Journal. 2022;28(43):e202202021.
18. Zhang H, Chen Z, Du M, Li Y, Chen Y. Enhanced gene transfection efficiency by low-dose 25 kDa polyethylenimine by the assistance of 1.8 kDa polyethylenimine. Drug Delivery. 2018;25(1):1740-5.
19. Shi B, Xue M, Wang Y, Wang Y, Li D, Zhao X, et al. An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology. 2018;10(2):95.
20. Douzandegan Y, Gray Z, Mohebbi A, Moradi A, Tabarraei A. Optimization of KYSE-30 Esophagus Cancer Cell Line Transfection Using Lipofectamine 2000. Journal of Clinical and Basic Research. 2017;1(2):16-20.
21. Jin W, Lin D, Nguyen AH, Abdelrasoul GN, Chen J, Mar A, et al. Transfection of difficult-to-transfect rat primary cortical neurons with magnetic nanoparticles. Journal of biomedical nanotechnology. 2018;14(9):1654-64.
22. Yuan J, Xu WW, Jiang S, Yu H, Poon HF. The scattered twelve tribes of HEK293. Biomedical and Pharmacology Journal. 2018;11(2):621-3.
23. Basirnejad M, Bolhassani A, Sadat SM. The distinct role of small heat shock protein 20 on HCV NS3 expression in HEK-293T cell line. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2018;10(3):152.
24. Sohrab SS, El-Kafrawy SA, Mirza Z, Hassan AM, Alsaqaf F, Azhar EI. Designing and evaluation of MERS-CoV siRNAs in HEK-293 cell line. Journal of Infection and Public Health. 2021;14(2):238-43.

25. Rosa F, Sales KC, Cunha BR, Couto A, Lopes MB, Calado CR. A comprehensive high-throughput FTIR spectroscopy-based method for evaluating the transfection event: estimating the transfection efficiency and extracting associated metabolic responses. Analytical and bioanalytical chemistry. 2015;407:8097-108.
26. Kim K, Ryu K, Cho H, Shim MS, Cho Y-Y, Lee JY, et al. Effects of Decomplexation Rates on Ternary Gene Complex Transfection with α-Poly (l-Lysine) or ε-Poly (l-Lysine) as a Decomplexation Controller in An Easy-To-Transfect Cell or A Hard-To-Transfect Cell. Pharmaceutics. 2020;12(6):490.
27. Søndergaard JN, Geng K, Sommerauer C, Atanasoai I, Yin X, Kutter C. Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. Communications Biology. 2020;3(1):319.
28. Cerda MB, Batalla M, Anton M, Cafferata E, Podhajcer O, Plank C, et al. Enhancement of nucleic acid delivery to hard-to-transfect human colorectal cancer cells by magnetofection at laminin coated substrates and promotion of the endosomal/lysosomal escape. RSC Advances. 2015;5(72):58345-54.
29. Bonengel S, Prüfert F, Jelkmann M, Bernkop-Schnürch A. Zeta potential changing phosphorylated nanocomplexes for pDNA delivery. International Journal of Pharmaceutics. 2016;504(1-2):117-24.
30. Xu X, Huang A, Cui X, Han K, Hou X, Wang Q, et al. Ubiquitin specific peptidase 5 regulates colorectal cancer cell growth by stabilizing Tu translation elongation factor. Theranostics. 2019;9(14):4208.
31. Yang Y, He J, Zhang B, Zhang Z, Jia G, Liu S, et al. SLC25A1 promotes tumor growth and survival by reprogramming energy metabolism in colorectal cancer. Cell death & disease. 2021;12(12):1108.
32. Salimzadeh L, Jaberipour M, Hosseini A, Ghaderi A. Non-viral transfection methods optimized for gene delivery to a lung cancer cell line. Avicenna journal of medical biotechnology. 2013;5(2):68.
33. Tamm C, Kadekar S, Pijuan-Galitó S, Annerén C. Fast and efficient transfection of mouse embryonic stem cells using non-viral reagents. Stem cell reviews and reports. 2016;12:584-91.
34. Sariyer IK. Transfection of neuronal cultures. Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols. 2013:133-9.
35. Kim TK, Eberwine JH .Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010;397:3173-8.
36. Yang H, Wang S, Kang Y-J, Wang C, Xu Y, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA SNHG1 predicts a poor prognosis and promotes colon cancer tumorigenesis. Oncology reports. 2018;40(1):261-71.
37. Usman K, Opara CO. Optimization of Lama1 Gene Amplification and Transfection Conditions for Luciferase Assay in Dystonia Dutse Journal of Pure

and Applied Sciences (DUJOPAS). 2018; 4(2): 504 - 518.

38. Li L, Li X, Wu Y, Song L, Yang X, He T, et al. Multifunctional nucleus-targeting nanoparticles with ultra-high gene transfection efficiency for in vivo gene therapy. Theranostics. 2017;7(6):1633.
39. Liu Y, Chen D, Li J, Xia D, Yu M, Tao J, Zhang X, Li L, Gan Y. NPC1L1-Targeted Cholesterol-Grafted Poly (β-Amino Ester)/pDNA Complexes for Oral Gene Delivery. Advanced healthcare materials. 2019 Apr;8(8):1800934.
40. Asfiya R, Maiti B, Kamra M, Karande AA, Bhattacharya S. Novel α-tocopherol–ferrocene conjugates for the specific delivery of transgenes in liver cancer cells under high serum conditions. Biomaterials Science. 2021;9(22):7636-47.

Challenges of Gene Transfer to Colorectal Cancer Cells (CRC)

Rastegarvand N[1], Soleimanjahi H[2*], Arefian E[3], Pourkarim Mr[4], Saadatpour F[5], Ghanbarnasab Behbahani R[6]

1. Ph.D. Student of Virology, Medical Virology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Professor, Medical Virology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, soleim_h@modares.ac.ir
3. Associated Professor, Microbiology Department, Biology Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Senior Researcher, Laboratory of Clinical and Epidemiological Virology, Katholieke University, Leuven, Belgium
5. Ph.D. Student of Microbiology, Microbiology Department, Biology Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran
6. Laboratory Expert, Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Jundishapur University, Ahvaz, Iran

Received: *2023/5/21* Accepted: *2023/10/12*

Abstract

Background: Gene transfection is a powerful tool for changing cell function, which is used for treating various diseases. Nevertheless, various studies show that despite the variety of gene transfer methods, there are significant limitations in the application of each method. The present study aimed to compare two methods of gene transfer using PEI and Lipofectamine compounds in cancer cell.

Materials and Methods: In this study, Caco-2 and HCT-116 were used as target cells, and HEK-293 cells were used as control cells. For this purpose, initially, gene transfer was performed using PEI and Lipofectamine, and then their results were compared with each other based on the expression of GFP protein.

Results: The results of this study showed that although gene transfer was carried out in HEK-293 cells at a favorable rate, this process was very insignificant in colorectal cells. In addition, in the meantime, some differences were observed between the amounts of gene transfer in colorectal cells, so that the amount of transfection in Caco-2 cells was lower than that of the HCT-116 cells.

Conclusion: The degree of acceptance of foreign genes in cells depends on several factors, including the type and origin of the cell. Since cancer cells have undergone many genetic changes, their genetic manipulation is associated with many limitations. For this reason, it is recommended to use other methods, such as cell selection by antibiotics and preparation of stable cell lines to reach a high level of gene transfer in these cells.

Keywords: Cancer, Colorectal, Gene delivery system, Lipofectamine, Transfection.

Citation: Rastegarvand N, Soleimanjahi H, Arefian E, Pourkarim Mr, Saadatpour F, Ghanbarnasab Behbahani R. Challenges of Gene Transfer to Colorectal Cancer Cells (CRC). Yafte. 2023; 25(3):23-35.