خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۲ تابستان ۸۵ (۱۳۱-۱۲۱)

بررسی سلولی و مولکولی پیش سازهای اندوتلیال خون محیطی پس از جداسازی انتخابی و مقایسه ترانسفکشن آن‌ها با دو روش لیپوفکشن و الکتروپوریشن

دکتر فردین فتحی[۱]، دکتر محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد[۲]، محمدباقر خادم‌عرفان[۳]، دکتر تاکا یوکی‌آساهارا[۴]

چکیده

سابقه و هدف

مغز استخوان بالغین حاوی رده‌ای از سلول‌های پیش ساز بوده که این سلول‌ها قابلیت متمایز شدن به سلول‌های اندوتلیال بالغ را دارا می‌باشند. به این سلول‌ها، سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال(EPC) گفته‌می‌شود. مطالعه‌های بالینی به منظور به‌کارگیری سلول‌های EPC جهت تولید عروق جدید در ارگان‌های ایسکمیک شروع شده‌است. در این پژوهش سلول‌های EPC از خون محیطی انسان جداسازی شده و با استفاده از روش لیپوفکشن ترانسفکت شدند.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. ابتدا کل سلول‌های تک‌هسته‌ای از خون محیطی جداسازی شده سپس در محیط کشت پایه سلول‌های اندوتلیال و دیش‌های پوشیده شده با فیبرونکتین، کشت داده شدند. در روز هفتم، سلول‌هایی را که از طریق اتصال به کف دیش‌ها قادر به رشد و تکثیر بودند، تریپسینیزه کرده و از ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و مولکولی، جهت تأیید ماهیت اندوتلیالی آن‌ها استفاده شد. سپس دو روش الکتروپوریشن و لیپوفکشن جهت ترانسفکشن آن‌ها به‌کار گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که سلول‌های جداسازی شده بر روی سطوح پوشیده شده با فیبرونکتین رشد می‌کنند و در روز هفتم علاوه بر این که قادر به جذب AC-DIL (Acetylated low density lipoproteins) هستند، ژن‌های CD31، CD34، KDR ، VECAM-1 و Tie-1 را بیان نموده و پاسخ‌شان به آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های CD31 ، CD34 ، KDR و لکتین مثبت است. همچنین سلول‌ها با استفاده از روش لیپوفکشن ترانسفکت شدند.

نتیجه گیری

از یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های EPC انسانی در روز هفتم، ژن‌های مورد مطالعه را بیان می‌کنند و این سلول‌ها با استفاده از روش لیپوفکشن هر چند با کارایی پایین ترانسفکت می‌شوند.

کلمات کلیدی: سلول‌های پیش ساز اندوتلیال ، جدا سازی، لیپوفکتین، الکتروپوریشن

تاریخ دریافت : ۸۴/۱۰/ ۳
تاریخ پذیرش : ۸۵/ ۱/ ۵

۱- مؤلف مسؤول: PhD آناتومی ـ آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ صندوق پستی ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶
۲- PhD آناتومی ـ پژوهشکده رویان
۳- کارشناس ارشد انگل شناسی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان
۴- PhD آناتومی ـ انستیتو Riken ژاپن ـ مرکز بیولوژی تکاملی (COB)

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

خون محیطی بزرگسالان حاوی رده سلولی بی‌نظیری از سلول‌های مشتق از مغز استخوان می‌باشد که ویژگی‌های آن‌ها مشابه با آنژیوبلاست‌های جنینی (Embryonal angioblasts) است(۱). این سلول‌ها دارای قابلیت تکثیر و تمایز به سلول‌های اندوتلیال بالغ بوده و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (EPC:Endotelial progenitor cells) نامیده می‌شوند (۴-۲). نتایج مطالعه‌هایی که اخیراً بر روی نمونه های انسانی و حیوانی انجام شده است پیشنهاد می‌کند که سلول‌های پیش ساز اندوتلیال توانایی بازگرداندن فعالیت از دست‌رفته به ارگان‌های ایسکمیک را دارا می‌باشند که این عمل احتمالاً از طریق القا و تعدیل واسکولوژنزیس و آنژیوژنزیس در نواحی با اکسیژن پایین و یا از طریق تحریک اندوتلیالیزاسیون مجدد در عروق آسیب دیده انجام می‌شود(۱). سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال موجود در گردش خون محیطی برای اولین بار توسط آساهارا و همکاران در سال ۱۹۹۷ جداسازی و توصیف شدند(۵). این محققین توانستند سلول‌های $CD34^+$ را از خون محیطی انسان با استفاده از میکروبیدهای مغناطیسی جداسازی کنند. این سلول‌ها بر روی سطوح پوشش داده شده با فیبرونکتین رشد کرده و به سلول‌هایی با ویژگی سلول‌های اندوتلیال تبدیل شدند(۵). چند سال بعد، در طی مطالعه‌های جداگانه، سه مارکر کشف شد که قادر به شناسایی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال عملکردی می‌باشند(۹-۶). EPCهای موجود در گردش خون محیطی انواع مختلفی از مارکرها را با شدت مختلف بیان می‌کنند که این مارکرها مختص رده سلولی اندوتلیالی می‌باشند، از جمله آن‌ها می‌توان به PECAM-1 (CD31)، VE-cadherin و Von-Willbrand factor، eNOS (Endothelial nitric oxide synthase)، E-selectin و Tie-1 اشاره کرد(۱۰، ۵، ۱). همچنین لیپوپروتئین‌های کم چگال استیله شده را اینکورپورت (Incorporation) کرده و به لکتین ویژه سلول اندوتلیالی (به‌عنوان مثال Ulex europaeus agglutinin-1) متصل می‌شوند (۱۲، ۱۱). معمولاً از دو روش جهت جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف استفاده می‌شود. روش اول جداسازی سلول‌ها با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه یکی از آنتی‌ژن‌های CD133، CD34 و KDR و روش دوم شامل تکثیر آزمایشگاهی (Ex vivo expansion) کل سلول‌های تک هسته‌ای می‌باشد(۱۳).

هنگامی‌که با استفاده از روش تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال جداسازی می‌شوند، تا روز هفتم تقریباً تمام سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از طریق اتصال به کف دیش‌های پوشیده شده با فیبرونکتین از سایر سلول‌ها جدا می‌گردند. لذا به منظور تأیید ماهیت اندوتلیالی این سلول‌ها، ارزیابی سلولی و مولکولی آن‌ها در روز هفتم ضروری به‌نظرمی‌رسد. همچنین با توجه به اهمیت بالینی بالایی که این سلول‌ها در امر سلول درمانی و ژن درمانی دارند، در صورتی‌که بتوان با روش‌های معمول ترانسفکشن، این سلول‌ها را با ژن‌های درمانی مهمی نظیر VEGF همراه کرد، بر اهمیت بالینی آن‌ها افزوده خواهد شد(۱۵، ۱۴). در همین راستا ایواگورو و همکاران توانستند پس از ترانسفکشن سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال با آدنوویروس حامل ژن VEGF-164 و تزریق این سلول‌ها به مدل آزمایشگاهی ایسکمی اندام در موش، هم تولید عروق جدید و هم افزایش جریان خون را در محل ضایعه بهبود ببخشند(۱۶). با مروری بر مطالعه‌های انجام شده مشخص شد که تاکنون گزارشی در حد یک مقاله کامل در مورد به‌کارگیری سایر روش‌های معمول ترانسفکشن نظیر الکتروپوریشن و لیپوفکشن جهت انتقال ژن به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال منتشر نشده است. در همین زمینه در پژوهش حاضر ابتدا سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال انسان (hEPC) را از خون محیطی جدا سازی نموده و پس از تأیید بیان ۵ ژن و ۴ آنتی‌ژن اختصاصی سلول‌های اندوتلیال در روز هفتم، به منظور یافتن روشی مناسب جهت انتقال ژن به این سلول‌ها، توانایی روش‌های لیپوفکشن و الکتروپوریشن در ترانسفکشن آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

Archive of SID
www.SID.ir

جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از خون محیطی انسان:

جهت جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال انسان، ابتدا کل سلول‌های تک‌هسته‌ای از خون محیطی جداسازی شد. به این‌منظور، ۱۰۰ میلی لیتر خون به روش معمول خونگیری از ورید مدین کوبیتال ناحیه آرنج با استفاده از یک سرنگ ۲۰G و لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شده و بلافاصله به زیر هود لامینار منتقل شدند.

از سانتریفوژ مبتنی بر به‌کارگیری هیستوپک ۱۰۷۷) Density-gradient centrifugation with histopag) جهت جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای استفاده شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت Cambrex)EGM2) با غلظت ۱×۱۰^{۷} در خانه در دیش‌های کشت شش خانه‌ای که با فیبرونکتین پوشش داده‌شده‌بودند(Falcon) کشت داده شدند(۱۳). روز جداسازی به‌عنوان روز صفر در نظر گرفته‌شد و در روزهای چهارم، هفتم و دهم، سلول‌ها پاساژ داده شدند.

ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها:

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس جهت ارزیابی مورفولوژیک سلول‌ها استفاده شد. Dil-Ac-LDL (Biomedical Technologi Inc.) با غلظت ۱۰µg/ml و آنتی‌بادی بر علیه لکتین (Fluorescein Griffonia simplicifolia Lectin I, Vector laboratory) با غلظت ۵µg/ml که کونژوگه به FITC بود استفاده شد. به منظور ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها، در روز هفتم سلول‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از متانول با دمای ۲۰- (Merck) فیکس شدند. سپس آنتی‌بادی‌های اولیه CD31 (Dako,mouse anti human) با غلظت $\frac{۱}{۴۰}$، CD34 (Dako,mouse anti human) با غلظت $\frac{۱}{۵۰}$ به مدت ۲ ساعت و آنتی‌بادی اولیه بر علیه (Dako,mouse KDR anti human) با غلظت $\frac{۱}{۱۰۰}$ به صورت آور نایت (Overnight) به سلول‌ها اعمال شدند. آنتی‌بادی‌های ثانویه متصل به cy3(Chemicon, Donkey anti mouse) جهت اتصال به آنتی‌بادی بر علیه CD31 و KDR با غلظت $\frac{۱}{۱۰۰}$ و آنتی‌بادی ثانویه متصل به Jackson, Goat anti FITC (mouse) جهت اتصال به آنتی‌بادی بر علیه CD34 با غلظت $\frac{۱}{۱۰۰}$ به مدت یک ساعت در دمای اتاق به سلول‌ها اعمال شدند. لازم به ذکر است که ایمونوسیتوشیمی برای آنتی‌بادی‌های CD31 و CD34 به‌صورت هم‌زمان بر روی سلول‌های مشابهی به شکل رنگ‌آمیزی دوگانه (Double Staining) انجام شد، به‌طوری‌که ابتدا آنتی‌بادی اولیه ضد CD34 ، سپس آنتی‌بادی ثانویه بر علیه آن و پس از شستشوی سلول‌ها از آنتی‌بادی اولیه ضد CD31 و سپس آنتی‌بادی ثانویه بر علیه آن استفاده شد. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، از Vector hard set که همراه آن رنگ داپی (Dapi) هم موجود بود، جهت ماونت کردن سلول‌ها استفاده شد و نهایتاً سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و عکسبرداری شدند.

بررسی RT-PCR :

از RT-PCR جهت تأیید بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد (جدول۱). به این ترتیب که ابتدا با استفاده از محلول ایزوژن، RNA کل را از سلول‌هایی که در روز هفتم آزمایش قرار داشتند استخراج نموده، از آنزیم DNase برای حذف احتمالی آلودگی ژنومی استفاده شد. جهت تبدیل mRNA مورد نظر به cDNA از کیت پرومگا، آغازگر oligodT و آنزیم AMV reverse transcriptase استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. سایر مواد لازم جهت انجام واکنش شامل بافر تکثیر ۱۰x، مخلوط dNTP ده میلی مولار ، $MgCl_2$ بیست و پنج میلی مولار ، ممانعت کننده آنزیم RNase(RNasin) و آب عاری از نوکلئاز بود. پس از تهیه cDNA ، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. از کیت آمپلی تک گولد (Ampli Taq Gold) جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) ، از بافر تکثیر ۱۰X ،

Archive of SID
www.SID.ir

مخلوط dNTP بیست و پنج میلی مولار، آنزیم DNA پلی‌مراز (Ampli Taq Gold) ، $MgCl_2$ بیست و پنج میلی مولار، آب عاری از نوکلئاز و آغازگر بالا دست (Forward) و پایین دست (Reverse) ، با مشخصات جدول ۱ استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR مطابق دستورالعمل کیت با یک مرحله پره انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه شروع شد. با شرایط دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۳۰ ثانیه بسته به نوع آغازگر در دماهای ۶۰-۵۶ درجه سانتی‌گراد و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد سیکل ۳۰بار، یک سیکل Extention نهایی به صورت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

بعد از اتمام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

ژن‌هایی که بیان آن‌ها مطالعه شد به همراه آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول شماره ۱ آورده شده‌است. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی و سایر ژن‌ها به صورت ژن‌های اختصاصی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال مورد مطالعه قرار گرفتند.

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به آغازگرهای بالادست (F) و پایین دستی (R) که در این پژوهش استفاده شدند

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر
GAPDH	humanGAPDH-F	5'GCCCCAGCAAGAGCACAAGA 3'
	humanGAPDH-R	5'TAGGCCCCTCCCCTCTTCAA 3'
CD31	h CD31-F	5'AGGACATCCATGTTCCGAGA3'
	h CD31-R	5'TGAACCGTGTCTTCAGGTTG3'
CD34	h CD34-F	5'TGAGCCTCTCACCTGTACTC3'
	h CD34-R	5'AGGAGCTGATCTGGGCTATG3'
KDR/fik-1	h KDR/fik-1-F	5'CCCTGCCGTGTTGAAGAGTT3'
	h KDR/fik-1-R	5'GGACAGGGGGAAGAACAAAA3'
VCAM1	VCAM1-F	5'AGAAATGCCCATCTATGTCC3'
	VCAM1-R	5'CGGCATCTTTACAAAACCTG3'
Tie1	Tie1-F	5'GCAAACTCTGCTGTCTAACC3'
	Tie1-R	5'GGATGCCCAGGATAGCTATG3'

ترانسفکت کردن موقتی (Transient transfection) سلول‌های کشت‌داده‌شده با وکتور پلاسمیدی:

در این پژوهش در روز هفتم از دو روش لیپوفکشن و الکتروپوریشن جهت ترانسفکشن سلول‌ها استفاده‌شد. جهت الکتروپوریشن سلول‌ها، دستگاه Gene pulser II کمپانی بیوراد به‌کار گرفته شد. پارامترهای دستگاه در ۵ آزمایش متوالی به‌صورت (۳۵۰μF، ۵۰۰V)، (۳۵۰μF، ۴۰۰V)، (۳۵۰ μF، ۳۰۰V)، (۲۵۰ μF ، ۵۰۰V) (۲۵۰μF، ۲۵۰V) تنظیم شده و الکتروپوریشن انجام شد. همچنین در آزمایش‌های جداگانه دیگری پارامترها را به‌صورت (۳۵۰ μF، ۵۰۰ V)، (۲۵۰ μF، ۲۵۰V) تنظیم نموده و بلافاصله قبل از الکتروپوریشن، کیووت حامل سلول‌ها و DNA به مدت ۱ دقیقه بر روی یخ‌انکوبه شد. در کلیه آزمایش‌ها هر بار مقدار ۳۰ میکروگرم از پلاسمید pCAG-IRES2-VENUSnucmem no NotI 262 (این پلاسمید از آزمایشگاه بیولوژی استم‌سل واقع در CDB وابسته به مؤسسه Riken ژاپن تهیه شد) که حامل ژن پروتئین فلورسنت زرد (Yellow Flurescent protein) بود استفاده‌شد و پس از الکتروپوریشن، سلول‌ها به محیط کشت سرم‌دار با دمای ۳۷ درجه منتقل شدند. بعد از گذشت ۲۴ الی ۷۲ ساعت بیان موقت YFP به‌وسیله میکروسکوپ معکوس فلورسنت(زایس) بررسی شد.

در روش لیپوفکشن، از لیپیدهای کاتیونی ساخت شرکت کیاژن استفاده‌شد. ۲۴ لیپوفکشن مطابق با پروتکل همراه Superfect transfection reagent انجام شد. به‌طور خلاصه، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن (روز ششم) سوسپانسیون سلولی تهیه شده و شمارش سلولی انجام شد تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول به هر خانه از اسلایدهای ۴ خانه پوشش داده شده با فیبرونکتین منتقل شد. در روز ترانسفکشن (روز هفتم) از لیپوفکشن با نسبت‌های ۳،۴،۵،۶،۷و۸ میکرولیتر استفاده شد به‌طوری‌که میزان DNA پلاسمیدی در هر آزمایش ۱μg بود. ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد از انجام لیپوفکشن، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس مطالعه شدند.

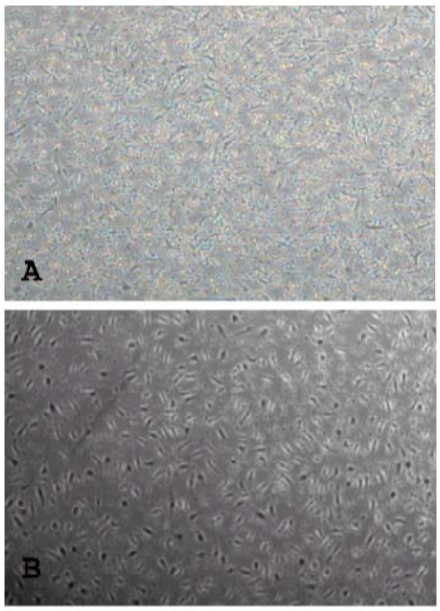
یافته‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد در صورتی‌که سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون محیطی، پس از جداسازی از خون در ظرف‌های پوشش داده شده با فیبرونکتین و محیط کشت EGM2 کشت داده

Archive of SID
www.SID.ir

شوند، به‌تدریج بخشی از این سلول‌ها که همان سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال موجود در خون محیطی می‌باشند شروع به چسبیدن به کف ظرف نموده و رشد می‌کنند به‌طوری‌که به تدریج سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از سایر سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا می‌شوند(شکل ۱).

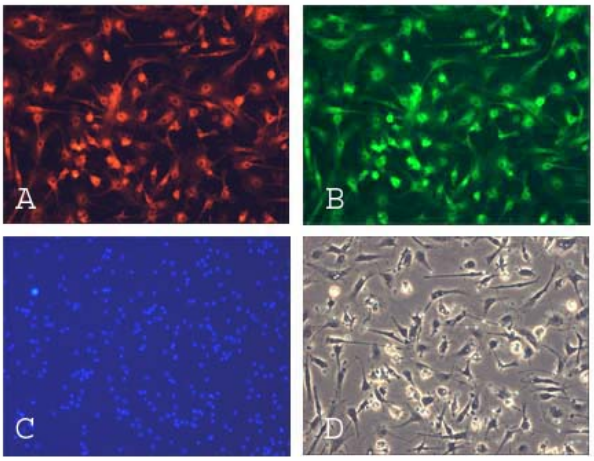
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ نوری از مراحل کشت سلول‌های hEPC (بزرگ‌نمایی x ۲۰۰)



A: تصویری از کل سلول‌های منونوکلئار در روز چهارم، بخشی از سلول‌ها از طریق اتصال به سطوح پوشیده شده با فیبرونکتین رشد کرده و سایر سلول‌های منونوکلئار کشت داده شده، پس از ۴ روز هنوز به شکل معلق در محیط کشت باقی مانده‌اند.
B: تصویر سلول‌های hEPC در روز هشتم، بر تعداد این سلول‌ها نسبت به روز چهارم افزوده شده است.

به منظور تأیید فنوتیپ اندوتلیالی و ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های جداسازی شده در روز ۷، از ماده Dil-Ac-LDL و نیز آنتی‌بادی‌های لکتین ، CD31، CD34 و KDR استفاده شد. یکی از روش‌های مورد استفاده جهت تشخیص سلول‌هایی با ویژگی اندوتلیالی، ارزیابی توانایی سلول‌ها در جذب Dil-Ac-LDL است. ماده مذکور یک نوع لیپوپروتئین است که با ماده فلورسنت Dil کونژوگه شده و اختصاصاً به‌وسیله رده سلول‌هایی با ماهیت اندوتلیالی جذب می‌شود. تقریباً تمامی سلول‌هایی که جهت ارزیابی استفاده شدند دارای توانایی جذب Dil-Ac-LDL بودند. همچنین تمام سلول‌هایی که به‌طور هم‌زمان بر روی آن‌ها ارزیابی به کمک لکتین و Dil-Ac-LDL صورت گرفت، پاسخ‌شان در مقایسه با گروه کنترل منفی مثبت بود(شکل ۲). به‌طوری‌که سلول‌هایی که Dil-Ac-LDL را جذب کرده بودند، به‌دلیل حضور Dil در

شکل ۲: تصاویر مربوط به سلول‌های hEPC در روز هفتم (بزرگ‌نمایی x ۲۰۰)، A: نشان می‌دهد که تقریباً ۱۰۰ درصد سلول‌های جداسازی شده Ac-dil را اینکورپوریت کرده‌اند. B: همان سلول‌ها را نشان می‌دهد که واکنششان به آنتی‌بادی بر علیه لکتین مثبت شده‌است. C: هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد که با Dapi رنگ شده‌اند. D: تصویر سلول‌های قبلی است که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده‌است.

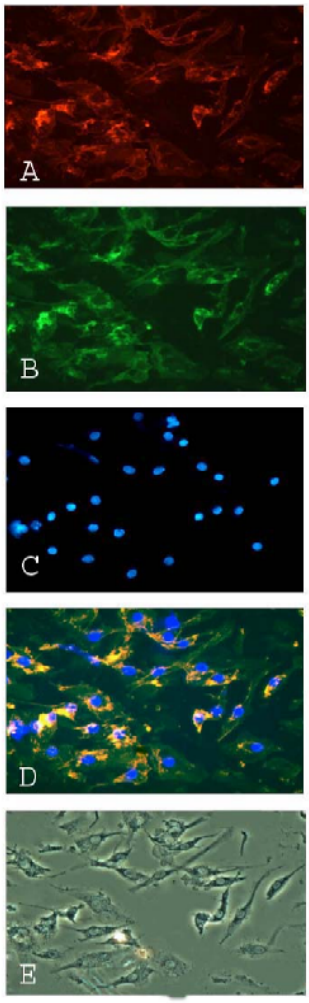


آن‌ها که یک ماده فلورسنت با رنگ قرمز است، با فیلتر Texaz-red به رنگ قرمز و سلول‌هایی که لکتین به آن‌ها متصل شده بود، چون کونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود با فیلتر FITC قابل مشاهده بودند. همان‌طوری‌که در شکل B-۲ دیده می‌شود، پاسخ تمامی سلول‌ها به لکتین مثبت بود و قادر به جذب Dil-Ac-LDL هم بودند. در گروه کنترل منفی از Dil-Ac-LDL و لکتین جهت ارزیابی آن‌ها استفاده نشده بود اما مشابه بقیه سلول‌های گروه آزمایش، سایر مراحل بر روی آن‌ها انجام شد، هیچ‌گونه سیگنال فلورسنت قرمز یا سبزی در آن‌ها مشاهده نشد. همچنین سلول‌هایی که به‌وسیله آنتی‌بادی KDR و یا به‌طور هم‌زمان با آنتی‌بادی‌های CD31 و CD34 تحت ارزیابی

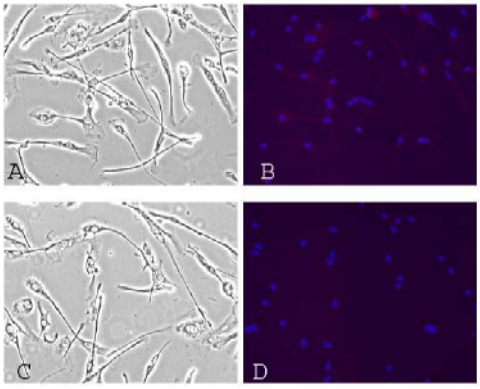
www.SID.ir

ایمونوسیتوشیمی به روش غیر مستقیم قرار گرفتند، پاسخ‌شان به آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه مثبت بود به‌طوری‌که بسته به نوع آنتی‌بادی ثانویه ، با فیلترهای Texaz-red با FITC قابل مشاهده بودند. در حالی‌که در گروه کنترل منفی که در آن‌ها از آنتی‌بادی اولیه استفاده شد، هیچ‌گونه سیگنال فلورسنتی مشاهده نشد(شکل‌های ۳ و ۴).

شکل ۳: ایمونوسیتوشیمی سلول‌های hEPC (بزرگ‌نمایی ۲۰۰x) A: تصویر سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور را نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی بر علیه CD31 مثبت شده‌است. B: تصویر سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور را نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی بر علیه CD34 مثبت شده‌است. C: هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد که با دایی رنگ شده‌اند. D: نتیجه میکس شدن تصاویر A و B را نشان می‌دهد. E: تصویر سلول‌های قبلی است که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده است.

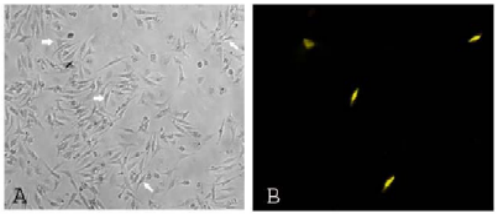


شکل ۴: ایمونوسیتوشیمی سلول‌های hEPC (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ x). A: تصویر سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور را نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی بر علیه KDR یا FLK-1 مثبت شده است و هسته آن‌ها با دایی رنگ شده‌است. B: همان سلول‌ها را نشان می‌دهد که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده است. C: تصویر سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور را در گروه کنترل منفی نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی ثانویه منفی بوده و هسته آن‌ها با دایی رنگ شده‌است. D: تصویر سلول‌های قبلی است که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده است.



علاوه بر ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی، در روز هفتم بیان ۶ ژن اختصاصی سلول‌های EPC در سلول‌های مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و بیان آن‌ها تایید شد. اندازه باندهای مربوط به ۵ ژن مورد مطالعه به ترتیب (CD31 =۵۷۸ bp) ، (CD34=۲۱۹ bp)(KDR =۱۸۰bp)،(VECAM-1 =۳۷۵ bp) و (Tie-1 =۱۷۳bp) واندازه باند ژن GAPDH که به‌صورت کنترل داخلی استفاده شد، ۱۳۴bp بود (شکل ۵).

شکل ۵: تصویر سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور انسانی (hEPC) با میکروسکوپ معکوس فلورسنت و فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی x ۲۰۰)، A: سلول‌های فلورسنت در بررسی با فیلتر YFP به رنگ زرد دیده می‌شوند. B: همان میدان که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده است. پیکان به سلول‌های ترانسفکت شده با YFP اشاره می‌کند سایر سلول‌ها ترانسفکت نشده و لذا هنگام مشاهده با میکروسکوپ معکوس فلورسنت دیده نمی‌شوند.

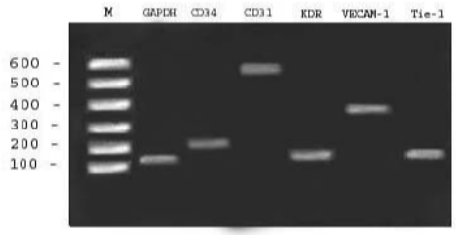


Archive of SID
www.SID.ir

نتایج به‌کارگیری روش‌های الکتروپوریشن و لیپوفکشن در ترانسفکشن سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. در هنگام استفاده از الکتروپوریشن، در تمام موارد بیشتر از ۹۰ درصد از سلول‌ها از بین رفته و در هیچ‌کدام از سلول‌های باقی‌مانده هم بیان YGFP مشاهده نشد اما در هنگام استفاده از لیپوفکشن اگر چه در غلظت‌های بیشتر از ۵ میکرولیتر مرگ سلولی افزایش می‌یافت اما در دوز ۶ میکرولیترلیپوفکتامین و ۱ میکروگرم پلاسمید ، حدود یک درصد از سلول‌ها ترانسفکت شده و بیان ژن گزارش‌گر پروتئین فلورسنت زرد در آن‌ها مشاهده شد(شکل ۶).

شکل ۶: بررسی بیان ۵ ژن مختص سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های خونی به روش RT-PCR

M : مارکر به کار گرفته شده را نشان می‌دهد که اندازه باندهای آن هرکدام 100bp می‌باشد. ردیف‌های بعدی به ترتیب مربوط به بیان ژن‌های (GAPDH=139bp)، (CD 34 = 219 bp)، (CD31 = 578 bp)، (KDR = 180 bp) ، (VECAM-1=375bp) و(Tie-1=173bp) که استفاده شد.



بحث

نتایج این پژوهش از نقطه نظر شناسایی سلول‌های سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال حایز اهمیت بوده و به ویژه هنگامی‌که سلول‌های پیش ساز اندوتلیال به روش تکثیر آزمایشگاهی جداسازی می‌شوند جهت تایید فنوتیپ و ژنوتیپ این سلول‌ها قابل استفاده می‌باشد. تا قبل از سال ۱۹۹۷ زمانی‌که برای اولین بار آساهارا و همکاران توانستند سلول‌های EPC را از خون محیطی انسان جداسازی کنند، باور بر این بود که بعد از تولد تولید سلول‌های اندوتلیال جدید فقط از طریق تکثیر ، مهاجرت و تغییر شکل سلول‌های اندوتلیال عروق خونی از پیش موجود امکان‌پذیر است، فرایندی که اصطلاحاً آنژیوژنزیس نامیده می‌شود(۵). در حالی‌که محققین مذکور نشان دادند که فرایند واسکولوژنزیس بعد از تولد، هم اتفاق می‌افتد. در طی این فرایند که بیشتر در طی تکامل جنین رخ می‌دهد، عروق خونی جنین از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال یا آنژیوبلاست‌ها حاصل می‌شوند (۵). از نظر بیان ژنی آنژیوبلاست‌ها و سلول‌های هماتوپویتیک (HSCs) ، هر دو ، آنتی‌ژن‌های مشابهی را بیان می‌کنند که از جمله آن‌ها می‌توان به آنتی‌ژن‌های CD34 ، FLK-1 و Tie-2 اشاره کرد. لذا به راحتی می‌توان حدس زد که این سلول‌ها از یک منشاء مشترک برخوردار باشند (۱۷، ۵). آنتی ژن CD34 در تمام سلول‌های هماتوپویتیک بیان شده اما بیان آن در سلول‌های هماتوپویتیک کاملاً تمایز یافته از دست می‌رود، این آنتی‌ژن همچنین در سن بلوغ به‌وسیله بسیاری از سلول‌های اندوتلیال فعال شده بیان می‌شود(۵). FLK-1 گیرنده‌ای برای فاکتور رشد VEGF است که در هر دو دسته سلول‌های هماتوپویتیک اولیه و سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود اما بیان آن در سلول‌های هماتوپویتیک تمایز یافته از دست می‌رود. FLK-1 همچنین در موش با نام VEGFR-2 شناخته شده و همولوگ انسانی آن KDR است(۵). آساهارا و همکاران با تکیه بر این واقعیت و در جهت اثبات این فرضیه که خون محیطی حاوی سلول‌هایی است که می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا کنند، اقدام به جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از خون محیطی انسان و $FLK\text{-}1^+$ از خون محیطی موش نموده و پس از کشت آن‌ها در شرایط خاص آزمایشگاهی توانستند آن‌ها را به سلول‌های اندوتلیال تمایز دهند. آن‌ها برای تأیید فنوتیپ سلول‌های شبه اندوتلیال حاصل از سلول‌های $CD34^+$ علاوه بر ارزیابی توانایی سلول‌ها در جذب Acl-Dil و اتصال به لکتین، بیان ژن‌های ecNOS ، FIK-1/KDR و CD31 را بررسی کرده و بیان این ژن‌ها را در سلول‌های مذکور مشاهده کردند. آن‌ها همچنین از طریق پیوند سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به مدل‌های ایسکمیک، ماهیت عملکردی سلول‌ها را تایید کردند(۵). آساهارا و همکاران در ادامه تحقیقات شان در سال ۲۰۰۰ اقدام به جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به روش تکثیر آزمایشگاهی از خون محیطی انسان

Archive of SID
www.SID.ir

نمودند(۱۳). آن‌ها علاوه بر این‌که از طریق پیوند سلول‌های EPC جداسازی شده به روش تکثیر آزمایشگاهی، ماهیت عملکردی آن‌ها را تایید کردند، بیان ژن‌های VEGFR-2(KDR)، VE-cadherin، CD31 و آنتی‌ژن‌های CD34، Integrin $\alpha_v\beta_3$ و CD14 را در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال مشاهده کردند(۱۳).

در این روش نسبت به روش قبلی که مبتنی بر جداسازی سلول‌های $CD34^+$ بود، هم تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال بیشتری از حجم مساوی از خون محیطی ($۰/۵\times۱۰^۴$ در مقابل $۳/۵\times۱۰^۴$ سلول در میلی لیتر) جداسازی می‌شد و هم میزان نئوواسکولاریزاسیون، بعد از پیوند سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به نواحی ایسکمیک بیشتر بود(۱۳). نتایج این پژوهش که در ادامه پژوهش‌های قبلی آساهارا و همکاران به‌منظور شناسایی بیشتر سلول‌های EPC حاصل از روش تکثیر آزمایشگاهی و نیز جهت دست‌یابی به روشی مناسب برای ترانسفکشن سلول‌ها طرح‌ریزی شد از نقطه نظر تأیید بیان ژن‌های CD31، CD34، KDR و توانایی اتصال به لکتین و جذب Acl-Dil، ماهیت اندوتلیالی سلول‌های جداسازی شده مشابه مطالعه آساهارا و همکاران در سال ۱۹۹۷ و از نقطه نظر بیان ژن‌ها یا آنتی‌ژنهای EGFR-2(KDR) ، VE-cadherin ، CD31 و CD34 مشابه نتایج مطالعه آساهارا و همکاران در سال ۲۰۰۰ بود، ضمن این‌که بیان دو ژن اختصاصی دیگر سلول‌های اندوتلیال VECAM-1، Tie-1 هم در سلول‌های جداسازی شده تأیید شد(۱۳، ۵). مطالعه‌های دیگری هم در زمینه جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال انجام گرفته که از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه ماتسوموتو و همکاران در سال ۲۰۰۰ اشاره کرد(۱۸). آن‌ها با استفاده از روش‌های CFC(Colony forming assay) و LTC-IC(Long term culture initiating cells) و جداسازی سلول‌های $AC133^+CD34^+$ و سلول‌های $AC133^-CD34^+$ به این نتیجه رسیدند که در جداسازی سلول‌های خونساز اولیه از خون محیطی بهتر است مارکر AC133 ملاک عمل قرار گیرد. در سال ۲۰۰۰ جهلینگ و همکاران توانستند از طریق جداسازی سلول‌های $AC133^+$، دو گروه سلول چسبنده و غیر چسبنده جدا کنند به‌طوری‌که سلول‌های چسبنده قادر به جذب یا اینکورپوریشن Acl-Dil ، توانایی اتصال به لکتین ، بیان آنتی‌ژن‌های KDR ، VWF و Tie-2 و در بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی حاوی اجسام وایبل پالاد (Wieble plade bodies) بودند(۱۹). نتایج این پژوهش از نظر بیان ژن‌های CD34 و KDR و توانایی اتصال سلول‌ها به لکتین و جذب Acl-Dil مشابه مطالعه اخیر بود. در سال ۲۰۰۳ ریمن و همکاران گزارش کردند که منشاء سلول‌هایی که تحت عنوان سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از خون محیطی جداسازی می‌شوند، منوسیت‌ها یا ماکروفاژهای خونی می‌باشد(۲۰).

نتایج مطالعه‌های قبلی که در زمینه نئوواسکولاریزاسیون جنینی انجام شده‌اند پیشنهاد می‌کند که بیان هم‌زمان ژن‌های FIK-1 و VE-cadherin، نقطه جدایی سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های رده‌های سلولی خونساز محسوب می‌شود(۲۱). علاوه بر این ترکیبی از آنتی‌بادی‌های منونوکلئالی که واکنش آن‌ها بر علیه FIK-1/KDR ، VE-cadherin، CD31 ، Tie-1 و Tie-2 مثبت است بیان‌گر مراحل حد واسط تمایز سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های بنیادی جنینی بوده و توانایی سلول‌ها در جذب Acl-Dil و اتصال به لکتین باعث شناسایی بیشتر سلول‌های اندوتلیال می‌شود(۲۴-۲۲). با توجه به مروری بر مطالعه‌های انجام شده و مقایسه‌ای که مابین نتایج این مطالعه با آن‌ها انجام شد، به طور خلاصه می‌توان گفت که نتایج بخش اول این پژوهش به شناسایی بیشتر سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال کمک می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده در قسمت به‌کارگیری الکتروپوریشن، با در نظر گرفتن شرایط ترانسفکشن از جمله دستگاه مورد استفاده ، پارامترهای انتخاب شده و پلاسمید به‌کار رفته کاملاً غیر قابل قبول بوده و لذا می‌توان احتمال داد که این روش، روش مناسبی جهت ترانسفکشن سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال نمی‌باشد، البته مرگ سلولی بالا در هنگام الکتروپوریشن معمولاً حدود ۹۰ درصد بوده که از این نقطه نظر نتایج به‌دست‌آمده غیر منتظره نبود اما از آن‌جایی‌که هیچ‌کدام از سلول‌ها به‌صورتی که بیان ژن ترانسفکت شده در آن‌ها قابل مشاهده باشد، ترانسفکت نشدند می‌توان گفت روش مذکور جهت انتقال ژن به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال

www.SID.ir
Archive of SID

مناسب به نظر نمی‌رسد(۲۵). هنگام استفاده از روش لیپوفکشن، حدود یک درصد از سلول‌ها با استفاده از لیپوفکشن با شرایط ۶ میکرولیتر لیپوفکتامین و ۱ میکرولیتر ترانسفکت شدند و لذا می‌توان گفت که در مقایسه با الکتروپوریشن روش خوبی جهت ترانسفکشن سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در روز هفتم می‌باشد. در هنگام استفاده از دوز بالاتر از ۶ میکرولیتر لیپوفکتامین (Qiagen superfect) درصد زیادی از سلول‌ها از بین می‌رفتند که این بیانگر حساسیت سلول‌ها به لیپوفکتامین است که در مورد بعضی از سلول‌ها مانند سلول‌های بنیادی جنینی نیز قبلاً گزارش شده است(۲۶).

نتیجه گیری

مروری بر مطالعه‌های انجام شده نشان داد که تاکنون فقط یک‌بار نتایج استفاده از لیپوفکشن جهت ترانسفکشن سلول‌های اندوتلیال پروژنیتور در سایت Pubmed گزارش شده‌است که به علت انگلیسی نبودن و در دسترس نبودن اصل مقاله، مقایسه جزئیات این پژوهش با نتایج مطالعه مذکور امکان‌پذیر نمی‌باشد. اگر چه در بخش خلاصه مقاله بهترین شرایط لیپوفکشن را استفاده از ۱ میکروگرم DNA پلاسمیدی به‌همراه ۳ میکرولیتر لیپوفکتامین ذکر کرده است(۲۷). از این نظر نتایج مطالعه مذکور با این مطالعه متفاوت است اما از آن‌جایی‌که کارایی ترانسفکشن علاوه بر مقدار پلاسمید و لیپوفکتامین تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع پلاسمید، نوع لیپوفکتامین (و شرکت سازنده) و بروز مسمومیت سلولی در مورد بعضی از سلول‌ها نیز می‌باشد، نتایج به‌دست‌آمده را نمی‌توان با نتایج مطالعه مذکور به شکل مستدل مورد بحث قرار داد. (۳۱-۲۸، ۲۶). اما در صورتی‌که این نتایج را با نتایج به‌دست‌آمده از به‌کارگیری آدنوویروس مقایسه کنیم که حدود ۴۰ درصد گزارش شده است، شاید بتوان گفت که ترانسفکشن سلول‌ها با روش لیپوفکشن و اختصاصاً Qiagen superfect از کارایی ترانسفکشن بسیار کمی برخوردار است .

تشکر و قدردانی

در این پژوهش از کمک ها و مساعدت‌های پرسنل محترم Stem cell and translational research department واقع در مرکز بیولوژی تکاملی ، انستیتو Riken کشور ژاپن بهره‌مند شدیم که بدین‌وسیله از ایشان قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

1- Histov M, Erl W, Weber PC. Endothelial Progenitor cells, isolation and characterization. TCM 2003; 3(5):

2- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, *et al*. Statin therapy accelerates reendow- thelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Circulation 2002; 105: 3017-3024.

3- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, *et al*. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone- marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med 2001;7:430-436.

4- Assmus B, Schachinger V, Yeupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, *et al*. Transplantation of progenitor cellsand regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI).Circulation 2002;106:3009-3017.

5- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275:964-967.

6- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, *et al*. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133. positive progenitor cells. Blood 2000; 95:3106-3112.

7- Pcichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, *et al*. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulation human CD34-cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood 2000; 95:952-958.

8- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, *et al*. AC133m a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997; 90: 5002-5012.

9- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.J Clin Invest 2002; 109: 337-346.

10- Kaushal S, Amicl GE, Gulescrian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, *et al*. Functional small-diameter neovesscls crcated using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat Med 2001; 7:1035-1040.

11- Murohara T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitiors. Trends Cardiovasc Mod 2001; 11: 303-307.

12- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, *et al*. Transplanted cord blood-derived endothelial proccursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest 2000; 105: 1527-1536.

13- Kalka C, Masuda H, Takabashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, *et al*. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 3422-3427.

14- Kawamuoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial cells for therapeutic neovascularization.Cardiovascular Radiation Medicine 2002; 3(3-4): 221-225.

15- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Asahara T*, et al*. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. Cire Res 2000; 86: 1198-1202.

16- Waguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, *et al*. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. Circulation, 2002; 12: 732-738.

17- Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. Development 1992; 116(2): 435-9.

18- Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N,Horie Y, Yamada T, *et al*. In vitro Proliferation Potential of AC 133 Positive Cells. In Peripheral Blood. Stem cells 2000; 18: 196-203.

19- Gehling U M, Ergun S, Schumacher U,Wagner C, Pantel K, Otte M, *et al*. In vitro differentiation of endothelial cells from AC 133-posivive progenitor cells. Blood 2000; 95 (10)L 3106-3112.

20- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and scoretc angiogenic growth factors. Circulation 2003; 107: 1164-1169.

21- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC,Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.. Development 1998; 125: 725-732.

22- Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, *et al*. A common precursor for hematopoictic and endothelial cells. Development 1998; 125: 1747-1757.

23- Vitter D, Prandini MH, Berthier R, *et al*. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. Blood 1996; 88: 3424-3431.

24- Yamaguchi TP , Dumont DJ , Conlon RA, Breitman ML,Rossant J, *et al*. flk-l, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker fr endothelial cell precursors. Development 1993; 118: 489-498.

25- Doctschman T, Maeda N, Smithice O. Targeted mutation of the hprt gene in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85 (22): 8583-7.

26- Watanabe M, Shirayoshi Y, Koshimizu U, Hashimoto S, Yonehara S, Eguchi Y, *et al*. Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control. Exp Cell Res 1997; 10; 230(1): 76-83.

27- Zaric V, Weltin D, Stephen D. Theraputic anglogenesls using genetic transfections. An in vitro quantitative and functional study after gene code transfer for vascular endothelial growth factor. Arch Mal Coeur vaiss 2000; 93(8): 987-91.

28- Ma H, Liu Q , Diamond SL , Pierce EA . Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptidc result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency . Methods 2004 ; 33 (2) : 113-20.

29- Ma H, Diamond SL. Nonviral gene therapy and its delivery systems. Curr Pharm Biotechnol 2001; 2(1): 1-17.

Archive of SID
www.SID.ir

30- Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklud L, Isacson O,Kim KS. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. Stem Cells 2002; 20(2): 139-45.

31- Ward CM, Stern PL. The human cytornegalovirus immediatc-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Stem Cells 2002; 20(5): 472-5.

Archive of SID

www.SID.ir

Cellular and molecular evaluation of endothelial progenitor cells after selective isolation from peripheral blood and comparison of their transection by lipofection and electroporation

Fathi F.[1](PhD), Bageban Eslaminejad M.R.[2](PhD), Khadem Erfan M.B.[3](MS),Yuki Asahara T.[4](PhD)

[1] *Cellular and Molecular Research Lab, Kurdestan University of Medical Sciences*
[2] *Ruyan Research Center,Tehran*
[3] *College of Medicine, Kurdestan University of Medical Sciences*
[4] *Riken Institute, Center of Biology, Japan*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives
Bone marrow of adults contains a subtype of progenitor cells that has the capacity to differentiate into mature endothelial cells and has therefore been termed as endothelial progenitor cells (EPCs). Clinical studies employing EPCs for revascularization of ischemicorgans have just started to be conducted. In the present research, endothelial progenitor cells were isolated from peripheral blood and transfected by lipofection method.

Materials and Methods
All mononuclear cells were isolated from peripheral blood by vivo expansion method and cultured in fibronectin coated dishes and basal EC medium. In day 7, the cells were tripsinized and examined by immunocytochemical and molecular evaluation methods; then, electroporation and lipofection methods were used for transfection of EPCs.

Results
Observations showed isolated cells were proliferated on fibronectin coated surfaces. The cells were able to incorporate Acl-Dil and express CD31, CD34, KDR, VECAM-1, Tie-1 genes, CD31, CD34, Lectin and KDR antigens. The cells were also transfected by lipofection method.

Conclusions
It can be concluded that hEPCs express specific endothelial genes in day 7 and are transfected by lipofection method with low efficiency.

Key words: Endothelial progenitor cells (EPCs), Isolation, Lipofectin, Electroporation
SJIBTO 2006; 3(2): 121-131

Received: 24 Dec 2005
Accepted:25 Mar 2006

Correspondence: Fathi F. PhD of Anatomy. Cellular and Molecular Research Lab, Kurdistan University of Medical Sciences
P.O.Box: 66177-13446,Tehran, Iran.Tel: (+98871) 6661830 ; Fax : (+98871) 6660051
E-mail: *farfath@yahoo.com*

www.SID.ir