مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۵

تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه

فرشته قندهاری[۱]، دکتر ماندانا بهبهانی[۲]، دکتر عباسعلی پورآذر[۳]، دکتر زهرا نورمحمدی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (Vesicular stomatitis virus G یا VSVG) یک گلیکوپروتئین غشایی است که در اتصال ویروس به گیرنده‌های اختصاصی در سطح سلول دخالت دارد. این پروتئین به طور وسیع در مطالعات ژن درمانی استفاده می‌شود. با این حال، یکی از محدودیت‌های عمده‌ی استفاده از آن در ژن درمانی، توکسیک بودن در غلظت‌های بالا برای سلول‌های انسانی است.

روش‌ها: با انجام ترانسفکشن، پروتئین VSVG تولید و سپس فعالیت سایتوتوکسیک پروتئین با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و بررسی تغییرات مرفولوژیک بر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7 و MDA-MB-231) و سلول طبیعی کلیه‌ی انسانی (HEK-293) بررسی گردید.

یافته‌ها: با افزایش غلظت سمیت سلولی، پروتئین VSVG بر روی سلول‌های سرطانی افزایش یافت و بین اثر سمیت این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 تفاوت آماری معنی‌دار وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). در حالی که بین اثر آن بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی HEK تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین، نتایج حاصل از بررسی تغییرات مرفولوژیک، چروکیدگی و تغییر شکل در غشای سلول‌های سرطانی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که پروتئین VSVG فقط در غلظت‌های بالا برای سلول‌های طبیعی دارای خاصیت سمی است، به نظر می‌رسد که با مطالعات بیشتر بر روی این پروتئین بتوان از آن به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ویروس وزیکولار استوماتیتیس، ژن درمانی، سایتوتوکسیک، ترانسفکشن

ارجاع: قندهاری فرشته، بهبهانی ماندانا، پورآذر عباسعلی، نورمحمدی زهرا. **تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۳۰-۲۲۱

مقدمه

نوع سلول‌هایی که توسط ویروس آلوده می‌شوند، به پروتئین پوشش ویروس وابسته است. ناقل‌های ویروسی که حاوی پوشش یک ویروس دیگر باشند، ویروس کاذب نامیده می‌شوند. این ناقل‌های ویروسی تنها قادر به آلوده کردن سلول‌هایی هستند که دارای گیرنده برای این پروتئین پوشش جدید است. بنابراین، دامنه‌ی عفونت‌زایی ویروس به این پوشش

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- استادیار، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرشته قندهاری
Email: ghandehari@iaufala.ac.ir

جدید وابسته است (۱).

از پوشش‌های پروتئینی ویروس‌های مختلف، برای تولید ناقل‌های ویروسی کاذب استفاده شده است (۲). گلیکوپروتئین پوشش ویروس وزیکولار استوماتیتیس (Vesicular stomatitis virus G یا VSVG) یکی از پروتئین‌های پوششی است که جهت تولید ناقل‌های ویروسی، به ویژه ناقل‌های رتروویروسی و لنتی‌ویروسی کاذب مورد استفاده قرار گرفته است.

یکی از کاربردهای مهم ناقل‌های ویروسی کاذب، در ژن درمانی است. از آن جایی که، این ناقل‌ها می‌توانند به محدوده‌ی وسیعی از انواع سلول‌ها وارد شوند، بنابراین می‌توان با استفاده از این پوشش در ناقل‌های ویروسی کاذب، این امکان را فراهم نمود که ناقل‌های ویروسی به سلول‌های مختلف که در ژن‌تراپی و انتقال ژن نیاز است، متصل شوند. ویروس‌های کاذب دارای این گلیکوپروتئین، به علت بر هم‌کنش با فسفر لیپیدهای غشای میزبانی، گستره و طیف میزبانی وسیعی دارند (۳).

پروتئین G وزیگولار استوماتیتیس با طولی حاوی ۵۱۱ آمینواسید و وزن مولکولی ۶۵ هزار دالتون، از خانواده رابدو ویروس‌ها می‌باشد. قسمت عمده‌ای از این پروتئین در خارج از غشای ویروس قرار گرفته است و به عنوان اکتودومین در پروتئین معرفی می‌شود (۴). پروتئین G دارای حداقل سه شکل فرضی مختلف است که خصوصیات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی متفاوتی دارد؛ حالت Pre-fusion (طبیعی) که در pH بالای ۷ مشاهده می‌شود، حالت هیدروفوبیک فعال که با غشای هدف به عنوان اولین مرحله از پروسه فیوژن واکنش می‌دهد و حالت Post-fusion که از نظر ساختاری، متفاوت از دو حالت قبلی است. یک موازنه‌ی وابسته به pH بین اشکال مختلف پروتئین G وجود دارد؛ به صورتی که در pH پایین، پروتئین G به سمت ساختار Post-fusion هدایت می‌شود. این تغییر شکلی ناشی از pH پایین، قابل برگشت است (۵).

گزارش‌های زیادی مبنی بر توکسیک بودن این پروتئین بر روی سلول‌های انسانی عنوان شده است و این امر می‌تواند مشکلاتی را هنگام تهیه‌ی ناقل‌های کاذب سبب شود. Yu و همکاران نشان دادند که ناقل‌های رتروویروسی بر پایه‌ی HIV-I () با پوشش VSVG دارای کارآیی بالا جهت انتقال ژن به بافت‌های عروقی می‌باشند (۶). Miyanohara نیز در مطالعه‌ای نشان داده است که استفاده از VSVG به تنهایی در حد مطلوبی می‌تواند به‌عنوان یک ناقل مناسب برای انتقال ژن باشد و این در حالی است که استفاده‌ی بیش از حد مطلوب از آن، سایتوتوکسیک است (۷). در یک بررسی نیز پیشنهاد شده است که پروتئین VSVG به‌عنوان یک پروتئین، پوششی مناسب برای ساخت ناقل‌های ویروسی کاذب است و همچنین، این پروتئین به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی معرفی شده است (۸).

تا زمان انجام این مطالعه، هیچ پژوهشی به صورت آزمایشگاهی بر روی اثرات توکسیک پروتئین VSVG گزارش نشده بود. در این پژوهش، پروتئین G تولید و خصوصیت سایتوتوکسیک آن بر روی سلول‌های سرطانی سینه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

روش‌ها

استخراج پلاسمید: در این پژوهش، از پلاسمید pMD2-G جهت تولید پروتئین VSVG استفاده شد. این پلاسمید دارای ژن گلیکوپروتئین VSVG و پروموتور سایتومگالوویروس و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک است. اندازه و تعداد جفت باز این پلاسمید بر اساس نقشه‌ی ژنومی ۵۸۲۴ جفت باز می‌باشد. جهت بیان ژن VSVG، از سلول‌های یوکاریوت HEK 293T استفاده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است که به‌عنوان ژن گزارشگر انتخابی استفاده می‌شود.

باکتری Escherichia coli DH 5a حاوی پلاسمید مذکور از شرکت Addgene کشور آمریکا خریداری گردید. کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌ی باکتری حاوی پلاسمید در محیط Luria-Bertani جهت استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت Roche آلمان و روش لیز قلیایی انجام گرفت. مشاهده‌ی باند الکتروفورز بر روی ژل اگارز یک درصد و متعاقب آن، رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید انجام شد. با مقایسه‌ی اندازه‌ی باند استخراج شده با نشانگر ده کیلوبازی، صحت استخراج پلاسمید اثبات شد. غلظت پلاسمید استخراج شده با کیت و روش لیز قلیایی با استفاده از اسپکت NanoDrop بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر محاسبه شد.

ترانسفکشن و تولید پروتئین VSVG: یک تا دو روز قبل از انجام ترانسفکشن، $۱۰^۴ \times ۵$ سلول HEK293T در دو چاهک از ظرف شش خانه کشت داده شد. زمان لازم برای انجام ترانسفکشن وقتی بود که کشت سلولی تک لایه به تراکم سطحی بیشتر از ۷۰ درصد رسید. یک ساعت قبل از شروع ترانسفکشن، محیط رویی چاهک‌ها خارج و محیط تازه‌ی حاوی گلوتامین و سرم اضافه شد. فرایند ترانسفکشن به منظور تولید پروتئین VSVG با استفاده از کیت Polyfect Transfection (شرکت Roche آلمان) مطابق دستورالعمل کیت انجام و عمل تغلیظ با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و اولتراسانتریفوژ صورت گرفت. برای اثبات پروتئین، از الکتروفورز سدیم ۲- دسیل پلی‌آکریل امید استفاده شد و باند مشاهده شده با نشانگر پروتئینی ۲۰۰ کیلودالتونی از شرکت Fermentas کشور آمریکا مقایسه شد. همچنین، با استفاده از تکنیک ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و اندازه‌گیری جذب نوری، وجود و مقدار پروتئین در نمونه‌ی بعد از ترانسفکشن اثبات گردید.

تغلیظ پروتئین با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و اولتراسانتریفوژ: ۴۸ ساعت بعد از انجام ترانسفکشن، محیط رویی حاوی پروتئین از روی سلول‌ها جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. این عمل جهت جداسازی ضایعات سلولی شناور در محیط انجام گرفت. به مایع رویی، ۲ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۸ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه، بر روی یخ قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۵۰۰، سانتریفوژ انجام شد.

در مرحله‌ی بعد، ۲ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و به باقی‌مانده، ۴ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیگول ۱۶ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و بعد از قرار دادن بر روی یخ، سانتریفوژ انجام شد. در پایان، ۴ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و به باقی‌مانده، ۶ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن

گلیکول ۲۴ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و بار دیگر، بعد از قرار دادن بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه، سانتریفوژ انجام شد. ۴ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و باقی‌مانده جمع آوری و در دور g ۸۰۰۰۰ اولتراسانتریفوژ شد. پس از اولتراسانتریفوژ، رسوب جمع آوری و محلول رویی دور ریخته شد.

تکنیک ELISA مستقیم: نمونه‌ی حاوی پروتئین توسط بافر پوشش دهنده‌ی رقیق به میزان ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، به چاهک‌ها در میکروپلیت انتقال داده شد. سپس، پلیت توسط یک پلاستیک پوشانده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد؛ با استفاده از بافر شستشو سه بار شستشو گردید و ۲۰۰ میکرولیتر بافر توقف به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و بار دیگر، با استفاده از بافر شستشو، سه بار شستشو داده شد.

سپس، آنتی‌بادی کونژوکه Goat Anti-VSVG IgG Antibody به صورت (Horseradish peroxidase) HRP با بافر مسدود کننده، رقیق شد و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اضافه و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. بار دیگر، چاهک‌ها توسط ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو دهنده، شستشو داده شد.

در نهایت، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از معرف ترامتیل بنزیدین (TMB یا Tetramethylbenzidine) اضافه شد تا رنگ گسترش یابد و بعد از ۱۰ دقیقه، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر توقف اضافه گردید. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه ELISA reader خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین محاسبه گردید.

کشت سلول‌ها: فلاسک‌های حاوی رده‌های سلولی سرطانی MCF7,MDA-MB231 و سلول طبیعی HEK293 مورد استفاده در پژوهش، از انستیتو پاستور ایران دریافت گردید. این سلول‌ها به صورت تک لایه رشد کرده، کف فلاسک را پر می‌کنند و در این حالت نیاز است که سلول‌ها واکشت شوند. جهت انجام پاساژ، از محیط کشت RPMI1640 (Merck آلمان) با مکمل ۱۰درصد سرم آلبومین گاوی، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲ میکرومول از گلوتامین استفاده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن، انکوبه گردید. تمام مراحل در زیر هود لامینار انجام گرفت.

ارزیابی میزان سایتوتوکسیسیتی: برای انجام آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]، ابتدا تعداد ۵۰۰۰۰ از سلول‌های مورد نظر در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ چاهکی و در ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) کشت داده شد. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین اضافه گردید. سه چاهک حاوی محیط و سلول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و پس از طی این مدت، در تاریکی

۲۰ میکرولیتر، محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و پلیت بار دیگر برای دو ساعت به انکوباتور برگردانده شد. سپس، محیط روی سلول‌ها خارج و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide)، ساخت شرکت Merck آلمان، جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان افزوده و پیتاژ شد.

جذب نوری غلظت‌ها با استفاده از ELISA reader (شرکت Awareness آمریکا) در طول موج ۶۳۰-۴۹۲ نانومتر خوانده شد. درصد بقای سلول‌ها، که تحت تأثیر غلظت خاصی از پروتئین قرار گرفته باشند، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بقا = (جذب بلانک - جذب کنترل/جذب بلانک - جذب سلول تیمار شده) × ۱۰۰

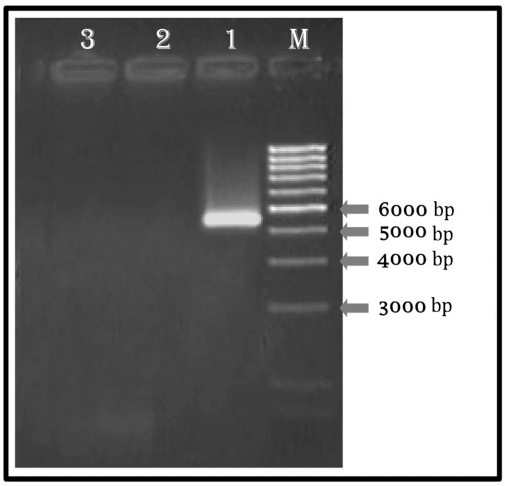
همچنین، CC50 (50% cytostatic concentration) یا غلظتی از پروتئین که بتواند ۵۰ درصد از سلول‌ها را از بین ببرد) پس از رسم نمودار Regression خطی تعیین شد.

بررسی تغییرات مرفولوژیک در سلول‌های تیمار شده: سه فلاسک حاوی 10^5 سلول، در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، که از اتصال سلول‌ها اطمینان حاصل شد، غلظت CC50 از پروتئین (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به طور جداگانه اضافه و پس از۴۸ ساعت، تغییرات ایجاد شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس در بزرگ‌نمایی ۲۰ مشاهده و عکس برداری شد.

نتایج و داده‌های به دست آمده از انجام مطالعات، به صورت میانگینی از سه تکرار مختلف گزارش گردید. نتایج به دست آمده، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تحلیل آماری قرار گرفت. در تحلیل آماری، نتایج اثرات غلظت‌های مختلف پروتئین بر رده‌های سلولی با یکدیگر مقایسه شد. برای مشخص شدن این امر، که بین گروه‌های مطالعاتی تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد یا خیر، از آزمون ANOVA (دانکن و Repeated Measure) در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ استفاده گردید. نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۱۲ (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA) ترسیم شد.

یافته‌ها

مقایسه‌ی باند حاصل از استخراج پلاسمید با نشانگر ۱۰ کیلو جفت بازی، صحت استخراج پلاسمید را نشان داد (شکل ۱).

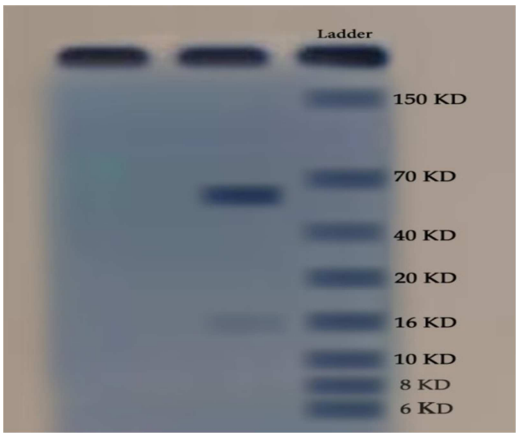


شکل ۱. مقایسه‌ی باند پلاسمید استخراج شده با نشانگر ۱۰ کیلو جفت بازی

همچنین، غلظت پلاسمید استخراج شده با دو روش لیز قلیایی و کیت به ترتیب برابر ۰/۳۲ و ۵/۳ میکروگرم در میکرولیتر بود که حاکی از

مناسب‌تر بودن روش استخراج پلاسمید با استفاده از کیت نسبت به روش لیز قلیایی می‌باشد.

به دنبال ترانسفکشن و تولید پروتئین VSVG، با مقایسه‌ی باند حاصل با نشانگر ۲۰۰ کیلودالتونی، وجود پروتئین در نمونه اثبات گردید (شکل ۲).

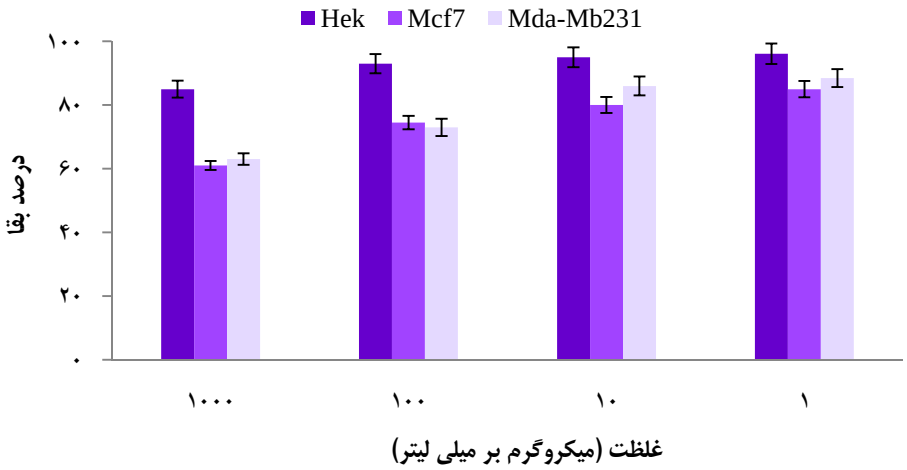


شکل ۲. مقایسه‌ی باند پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) با نشانگر پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی

نتایج حاصل از بررسی سمیت پروتئین بر روی رده‌های سلولی ذکر شده در غلظت‌های مختلف، در نمودار ۱ آورده شده است.

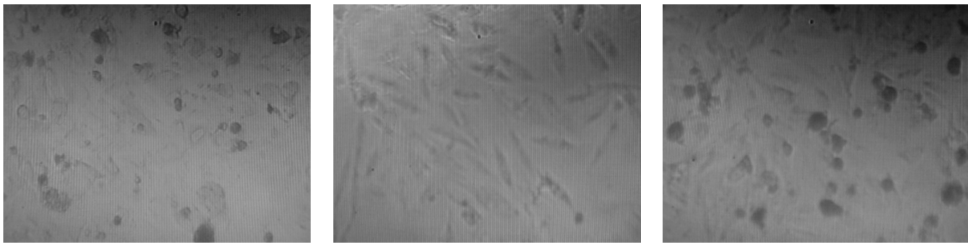
مقایسه‌ی میانگین‌ها نیز نشان داد که با افزایش غلظت سمیت سلولی، این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. این در حالی است که پروتئین بر روی سلول‌های طبیعی، فقط در غلظت ۱۰۰۰ توانست حدود ۱۵ درصد رشد سلول را کاهش دهد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که بین اثر سمیت این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی MCF7 و MDA-MB231، تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد؛ در حالی که، بین اثر آن بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی HEK، تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات مرفولوژیک نیز نشانگر چروکیدگی و تغییر شکل در غشای سلول‌ها، به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50 از پروتئین VSVG بود (شکل ۳).

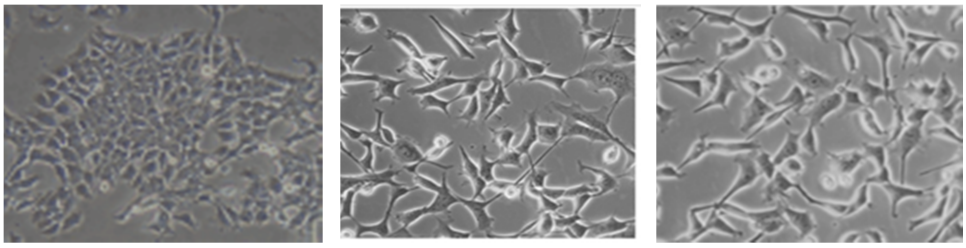


نمودار ۱. درصد بقای سلول‌های تیمار شده با پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG)

هر نقطه روی نمودار، میانگین سه بار تکرار است. Error bar بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. با افزایش غلظت پروتئین، سمیت آن بر سلول‌های سرطانی افزایش یافت؛ در حالی که، پروتئین بر روی سلول طبیعی HEK اثر چندانی نشان نداد و فقط در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، حدود ۱۵ درصد رشد سلول‌ها را کاهش داد.



سلول سرطانی MDA-MB231 بعد از تیمار | سلول سرطانی MDA-MB231 | سلول سرطانی MCF7 بعد از تیمار



سلول طبیعی (HEK) بعد از تیمار | سلول طبیعی (HEK) قبل از تیمار | سلول سرطانی MCF7 قبل از تیمار

شکل ۳. تغییرات مرفولوژیک در سلول‌های سرطانی و طبیعی (HEK) قبل و بعد از تیمار با پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) با بزرگ‌نمایی ۲۰ ×

در سلول‌های سرطانی، بعداز تیمار با غلظت‌های CC50، چروکیدگی و تغییر شکل در سلول‌ها مشاهده شد؛ در حالی که، در سلول طبیعی (HEK) تغییری دیده نشد.

بحث

نتایج حاصل از بررسی اثرات سایتوتوکسیک پروتئین VSVG بر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF7-MDA-MB231) در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که این پروتئین دارای خاصیت توکسیک بوده، بقای سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد. همچنین، یافته‌ها نشان می‌دهد که پروتئین بر روی سلول طبیعی HEK نیز دارای خاصیت سمی است و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند رشد سلول را حدود ۱۵ درصد کاهش دهد. نتایج ما بیانگر آن بود که این پروتئین دارای خاصیت سایتوتوکسیک بوده، بر روی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی دارای سمیت بیشتری است.

در دهه‌ی اخیر، این پروتئین به عنوان یک پروتئین مهم در ژن درمانی در سلول‌های مختلفی معرفی شده است. Amado و Chen پیشنهاد نمودند که از پروتئین VSVG، به دلیل تروپیسم وسیع، می‌توان در یک پروسه‌ی سودوتایپینگ جهت ساخت ناقل‌های لنتی‌ویروس و رتروویروس کاذب استفاده کرد و تنها محدودیت آن، سمیت پروتئین است (۹).

در مطالعه‌ای دیگر، Qiao و همکاران نشان دادند که پروتئین VSVG یک پروتئین پوششی مناسب برای ساخت ناقل‌های ویروسی کاذب است و همچنین، به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی مؤثر است (۸). در پژوهش انجام شده توسط Miyanohara نیز پیشنهاد گردید که

استفاده‌ی بیش از حد مطلوب از پروتئین VSVG در ژن‌درمانی، برای سلول‌های گیرنده، توکسیک است (۷).

Coil و Miller با مطالعه‌ای بر روی پروتئین VSVG نشان دادند که تروپیسم وسیع پروتئین، به دلیل وجود یک لیپید غشایی (فسفاتیدیل سرین) در سطح سلول‌ها است که می‌تواند، به عنوان گیرنده عمل کند و ۱۹ آمینواسید از این پروتئین، به طور محکم به فسفاتیدیل سرین متصل می‌شود (۱۰).

در پژوهش دیگری توسط Sun و همکاران نیز نشان داده شد که اتصال پروتئین VSVG در حضور گروه‌های فسفولیپید اسیدی، مثل فسفاتیدیل سرین، افزایش می‌یابد (۱۱). این در حالی است که Dobrzynska و همکاران پیشنهاد نمودند که سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، قادر به بیان مقادیر بیشتری از مولکول‌های آنیونیک، مثل فسفاتیدیل سرین(بیشتر از ۹ درصد از فسفولیپیدهای غشا)، هستند (۱۲).

نتایج این مطالعات بیانگر آن است که پروتئین VSVG تمایل بیشتری جهت اتصال به سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز سمیت بیشتر پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، بیانگر آن است که احتمال دارد، به دلیل وجود گروه‌های فسفولیپیدی، نظیر فسفاتیدیل سرین، در سطح سلول‌های سرطانی که می‌تواند به عنوان گیرنده‌ی پروتئین عمل نماید، پروتئین تمایل بیشتری جهت اتصال به سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، نشان می‌دهد.

از آن جایی که این پروتئین فقط در غلظت‌های بالا برای سلول‌های طبیعی دارای خاصیت سمی است، به نظر می‌رسد که با مطالعات بیشتر بر روی این پروتئین بتوان از آن، به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی استفاده نمود. بررسی سایتوتوکسیسیتی اولین گام در بررسی آپوپتوز است. در این روش، میزان مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار گرفته، نمی‌توان آپوپتوز را از نکروز متمایز نمود.

ارزیابی تغییرات مرفولوژیک نقش کلیدی در مطالعات مرگ سلولی دارد. در پژوهش حاضر، این تغییرات بعد از تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50 از پروتئین VSVG مشاهده شد. بدین صورت که به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50، درصدی از سلول‌ها از سطح فلاسک و سلول‌های مجاور جدا شد و چروکیدگی و تغییر شکل نیز در ظاهر سلول‌ها مشاهده گردید.

این نتایج نشان می‌دهد که احتمال دارد، پروتئین VSVG بتواند در القای آپوپتوزنقش داشته باشد؛ البته، نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری وجود دارد. از آن جایی که، داروهای شیمی‌درمانی در القای آپوپتوز نقش دارند، با انجام مطالعات بیشتر بر روی پروتئین VSVG و شناسایی دومین و پپتید مسؤول این خصوصیت توکسیک آپوپتوز، شاید بتوان از آن به عنوان عامل سایتوتوکسیک جهت درمان سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

امروزه پپتیدهای ضدسرطانی به عنوان یک نسل جدید از داروهای ضدسرطان معرفی می‌شوند. پپتیدها بر خلاف داروهای ضدسرطانی، نیازی به ورود به داخل سلول ندارند و بر غشای سلول عمل می‌کنند؛ در حالی که، داروها بایستی وارد سلول شوند و در نتیجه، سلول‌ها با خارج کردن داروها

موجب افزایش مقاومت به دارو می‌شوند. همچنین، پپتیدها دارای فعالیت سایتوتوکسیک کم برای سلول‌های طبیعی پستانداران می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر آن است که با انجام مطالعات بیشتر بر روی پروتئین VSVG و شناسایی پپتید مسؤول خاصیت توکسیک آن می‌توان، تغییراتی در جهت کاهش خاصیت سمی آن ایجاد نمود. همچنین، با انجام مطالعات بیشتر می‌توان این پروتئین را به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسؤولان محترم دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران که در انجام این طرح ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Sanders DA. No false start for novel pseudotyped vectors. Curr Opin Biotechnol 2002; 13(5): 437-42.
2. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von LD. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. J Virol 2002; 76(3): 1488-95.
3. Galipeau J, Li H, Paquin A, Sicilia F, Karpati G, Nalbantoglu J. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. Cancer Res 1999; 59(10): 2384-94.
4. Rose JK, Whitt MA. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Field's Virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1221–44.
5. Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. J Virol 1993; 67(3): 1365-72.
6. Yu H, Eton D, Wang Y, Kumar SR, Tang L, Terramani TT, et al. High efficiency in vitro gene transfer into vascular tissues using a pseudotyped retroviral vector without pseudotransduction. Gene Ther 1999; 6(11): 1876-83.
7. Miyanohara A. Preparation of vesicular stomatitis virus-G (VSV-G) conjugate and its use in gene transfer. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012(4): 453-6.
8. Qiao J, Moreno J, Forshaw M, Diaz RM, Vile RG. 741. VSV-G pseudotyped, MLV-based, semi-replication-competent retroviruses for cancer gene therapy. Mol Ther 2004; 9(S1): S282.
9. Amado RG, Chen IS. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? Science 1999; 285(5428): 674-6.
10. Coil DA, Miller AD. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. J Virol 2004; 78(20): 10920-6.
11. Sun X, Belouzard S, Whittaker GR. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. J Biol Chem 2008; 283(10): 6418-27.
12. Dobrzynska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. Mol Cell Biochem 2005; 276(1-2): 113-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 29.11.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 24.02.2015

Producing Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG) Protein and Assessment of its Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cells

Fereshteh Ghandehari MSc[1], Mandana Behbahani PhD[2], Abbasali Pourazar PhD[3], Zahra Nourmohammadi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: The vesicular stomatitis virus G (VSVG) protein is a transmembran glycoprotein, which is involved in virus attachment to the specific receptor at the cell surface. This protein has been widely used to study therapeutic gene delivery. However, the major limitation of its usage in gene therapy is toxicity of protein for host cells in high concentrations.

Methods: The vesicular stomatitis virus G protein was produced via transfection of HEK-293T cells with using polyfection kit. The cytotoxic activity was examined against MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and human embryonic kidney normal cell line (HEK293) using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and morphology changes assay.

Findings: The cytotoxic activity of vesicular stomatitis virus G protein against MCF-7 and MDA-MB-231 cells was significantly more than that of the normal cells ($P < 0.05$). In addition, cancer cells treated with vesicular stomatitis virus G protein showed morphology changes.

Conclusion: The results indicated that cytotoxic activity of vesicular stomatitis virus G protein against MCF-7 and MDA-MB-231 cells was more than that of the normal cells and it could be an appropriate candidate for in-vivo testing as cytotoxic agent.

Keywords: Vesicular stomatitis virus G protein, Cytotoxic, Transfection

Citation: Ghandehari F, Behbahani M, Pourazar A, Nourmohammadi Z. **Producing Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG) Protein and Assessment of its Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 221-30

1- PhD Student, Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Tehran Sciences and Research Branch, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Tehran Sciences and Research Branch, Tehran, Iran
Corresponding Author: Fereshteh Ghandehari MSc, Email: ghandehari@iaufala.ac.ir