بیان و تخلیص فاکتور رشد مشتق از پلاکت و ارزیابی عملکرد آن در اتصال به فیبرینوژن

مریم ملاصالحی[1]، بهاره دبیر منش[2]، صادق حسن نیا[*3]

1-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2-دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3-استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[*]نویسنده مسئول: hasannia@modares.ac.ir

دریافت: 1402/4/22 پذیرش: 1402/9/11

چکیده

فرایند ترمیم زخم، یک فرایند پیچیده و پویا است که انواع سلول‌ها و مسیرهای متابولیکی مختلف را درگیر می‌کند. این فرایند از سه فاز اصلی شامل فاز التهابی، تکثیر سلولی و بازسازی بافتی تشکیل شده است. بهبود موفقیت‌آمیز زخم به تنظیم دقیق و هماهنگی بین عوامل درگیر بستگی دارد. تا سال‌های پیشین استراتژی درمان زخم‌های مزمن به آماده‌سازی زخم، برداشتن بافت نکروزه‌شده، کنترل عفونت و التهاب محدود بود، اما اکنون استفاده از فاکتورهای رشد در جهت تسریع روند درمانی و بهبود زخم تأیید شده است. از اولین انواع فاکتورهای رشد نوترکیب که در درمان زخم‌های دیابتی به تأیید جهت مصرف انسانی رسیده است، فاکتور رشد نوترکیب انسانی PDGF-BB می‌باشد. به استناد گزارش‌های آمده در مطالعه‌های مختلف، PDGF به‌عنوان یک واسطه‌ی مهم در فرایند ترمیم زخم به کاهش التهاب، تسریع بهبودی، تکثیر سلولی، رگ‌زایی و بازسازی بافت کمک می‌کند. در این مطالعه، ژن PDGF-B در وکتور بیانی pET 21(a+) سنتز و در میزبان *E. coli* SHuffle تحت پروموتور T7 کلون شد. پس از بیان، خالص‌سازی با استفاده از ستون نیکل آگارز انجام گرفت. از آن‌جایی‌که پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده دنباله هیستگ دارد، با روش وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی آنتی‌هیستگ باند پروتئینی تأیید و صحت تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با روش المان و SDS-PAGE بررسی شد. برای بررسی فعالیت پروتئین تخلیص‌شده، آزمایش‌های تکثیر سلولی، مهاجرت و اتصال به پروتئین ماتریکس خارج سلولی انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام‌شده در این مطالعه نشان می‌دهد که PDGF به‌صورت دایمر بیان شده و پیوندهای دی‌سولفیدی به‌طور کامل تشکیل می‌شود. بیان این پروتئین در میزبان باکتریایی SHuffle که قادر به تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی است، منجر به حفظ ساختار پروتئین شده است. با توجه به نتایج مطالعه‌های برون‌تنی[1] پروتئین تخلیص‌شده هر دو فعالیت اصلی، یعنی تکثیر سلولی و همچنین قابلیت اتصال به پروتئین‌های ماتریکس سلولی داردکه این دلیلی بر فعال‌بودن پروتئین و تشکیل ساختار صحیح آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ترمیم زخم، فاکتور رشد مشتق از پلاکت، بیان، کلونینگ.

1 *in vitro.*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

روش سودآور است، بنابراین تولید انواع پروتئین‌ها ازجمله فاکتورهای رشد نیز در سیستم بیانی باکتریایی امکان‌سنجی شده است. در ارتباط با تولید انواع نوترکیب PDGF، آزمایش‌ها نشان داده است که گلیکوزیلاسیون PDGF برای فعالیت بیولوژیکی آن ضروری نیست و این ویژگی مهم امکان تولید این پروتئین را در سیستم‌های باکتریایی فراهم می‌کند [6]. در مطالعه حاضر بیان و تخلیص PDGF-BB در باکتری *E. coli* SHuffle با غلظت حدود 350 میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد. با توجه به پیوندهای دی‌سولفیدی درون و بین‌رشته‌ای این پروتئین، انتخاب سویه بیانی SHuffle یک گزینه مناسب می‌توانست باشد که با انجام آزمایش‌های *برون‌تنی* مانند آزمایش تکثیر، مهاجرت سلولی و امکان اتصال به فیبرینوژن فعالیت این پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی باکتریایی ارزیابی و تأیید شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1 مواد

در این مطالعه تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک[4] (آلمان) خریداری شده است. آنزیم‌های برشگر از شرکت ترموفیشرساینتیفیک[5] (آمریکا) ، ایزوپروپیل بتا دی 1 تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) از شرکت مرک پودر فیبرینوژن از شرکت هایفن بیومد[6] (فرانسه)، آنتی‌بادی اولیه خرگوشی بر علیه ناحیه 300-15 انتهای N ترمینال زنجیره بتا فیبرینوژن از شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی[7] (آمریکا)، آنتی‌بادی ثانویه ضدآنتی‌بادی خرگوشی کونژوگه و سوبسترا وسترن بلات از شرکت دی ان ای بیوتک[8] (ایران)، آنتی‌بادی آنتی هیستگ از شرکت سیتومتین ژن (ایران)، وبسترای الایزا از شرکت بیورد[9] (آمریکا) و کیت ستخراج پلاسمید از شرکت ژن آل[10] (کره جنوبی) خریداری شده است.

2-2 تعیین و طراحی توالی PDGF-BB نوترکیب

نخست توالی ژنی PDGF-BB انسانی از بانک اطلاعات NCBI با کد 5155 برداشته شد و به‌وسیله نرم‌افزار آنلاین کدون یوزیج[11]شرکت ژن اسکریپت بیوتک[12] (آمریکا) برای استفاده در باکتری *E. coli* بهینه‌سازی شد. توالی ژن در وکتور pET21a (+) بین دو آنزیم برشگر *NdeI* و *XhoI* قرار داده شد. در این طراحی دنباله هیستیدینی وکتور استفاده شد. درنهایت توالی حاصل‌شده به‌وسیله شرکت ژن اسکریپت بیوتک ساخته شد.

2-3 بیان PDGF-BB نوترکیب

پلاسمید حاوی سازه ارسالی در باکتری *E. coli* سویه DH5α با کیت استخراج پلاسمید، استخراج و به باکتری *E. coli* سویه شافل[13] ترانسفورم شد. باکتری شافل در محیط کشت لوریا برتانی[14] (سدیم کلرید 1 درصد، پپتون 1 درصد و عصاره مخمر 0/5درصد) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی100 میکروگرم بر میلی‌لیتر در شرایط بیانی مختلف کشت داده شد. شرایط بهینه رشد این باکتری پس از رسیدن به OD 0/6 -0/5 در طول موج 600 نانومتر با غلظت نهایی 1 میلی‌مولار IPTG در دمای 30°C، با دور شیکر 180rpm به مدت چهار ساعت به دست آمد. با توجه به اینکه پروتئین مستعد تشکیل اینکلوژن بادی[15] بود، از اوره برای جلوگیری از ایجاد آن استفاده شد. بنابراین رسوب باکتریایی در بافر لیز (سدیم کلرید 500 میلی‌مولار، سدیم فسفات 50 میلی‌مولار، اوره 3 مولار با pH نهایی 7/5) به مدت یک ساعت در دمای 4°C به صورت دورانی روی دستگاه روتاتور قرار گرفت.

4 Merk
5 Thermo Fisher Scientific
6 HYPHEN BioMed
7 Santa Cruz Biotechnology
8 DNA Biotech
9 Bio-Rad

10 GeneAll
11 Codon usage
12 GenScript Biotech
13 SHuffle
14 Luria Bertani
15 Inclusion body

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

2-6-2 روش الکتروفورز

با توجه به اینکه پیوند دی‌سولفیدی بین مونومرهای PDGF-BB تشکیل می‌شود، علاوه‌بر تست المان تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با ژل SDS-PAGE با بافر نمونه احیایی و غیراحیایی نیز بررسی شد. دراین‌حالت نمونه یک بار با بافر احیایی حاوی بتامرکاپتواتانل و یک بار با بافر غیراحیایی روی ژل 12/5 درصد آکریل آمید برده شد.

2-7 بررسی تکثیر سلولی (MTT assay)

اثر فاکتور رشد PDGF-BB بیان‌شده بر زنده‌مانی و تکثیر رده سلولی L929 (NCTC clone 929) براساس استاندارد ایزو (ISO10993 -5 :2009) انجام شد. 1×10^4 عدد سلول داخل هریک از چاهک‌های پلیت کشت سلولی 96 خانه تلقیح و سپس پلیت به مدت 24 ساعت (دمای $37^\circ C$، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) انکوبه شد. 100 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پروتئین (100-10 میکروگرم بر میلی‌لیتر) در سه تکرار به هریک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت 24 ساعت با همان شرایط انکوبه شد. 10 میکرولیتر معرف MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium) با غلظت 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت نمونه به مدت 2-4 ساعت (دمای $37^\circ C$، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) انکوبه شد. محلول MTTحذف و رسوب بنفش‌رنگ حاصل در DMSO حل شد. پلیت 96 خانه به مدت 30 دقیقه روی شیکر قرار گرفت و جذب در طول موج 570 نانومتر خوانده شد.

2-8 بررسی مهاجرت سلولی

یک روز قبل از شروع آزمایش، پلیت کشت سلولی 12 چاهکی با رده سلول‌های L929 به مدت 24 ساعت (دمای $37^\circ C$، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) کشت شد. محیط‌های کشت تیمار (حاوی پروتئین فاکتور رشد نوترکیب PDGF-BB در محیط کشت پایه) و شاهد به‌صورت سه بار تکرار به هر چاهک اضافه شدند. با نوک سمپلر 10-0/5 میکرولیتری، خراشی در مرکز هر چاه ایجاد شد. سپس مهاجرت روی هر نمونه با میکروسکوپ بررسی شد تا زمانی‌که زخم‌ها بسته شدند.

2-9 بررسی اتصال به فاکتور رشد PDGF-BB به فیبرینوژن با روش الایزا

نخست پلیت پلی‌استایرن 96 چاهکی برای تثبیت نمونه، با 100 میکرولیتر پروتئین نوترکیب PDGF-BB (10 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت یک شبانه روز در دمای $4^\circ C$، انکوبه و پس از تثبیت نمونه، پلیت سه بار با بافر PBS شستشو شد. پلیت با BSA 5 درصد در PBS به مدت سه ساعت در دمای $37^\circ C$ بلاک شد. پس از 3 بار شستشو با توین20- PBS، پروتئین فیبرینوژن با سری غلظت (0،1،2،3،4،5 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای $37^\circ C$، انکوبه شد. پلیت 5 بار با توین20- PBS شسته شد. آنتی‌فیبرینوژن به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه به مدت دو ساعت در دمای $37^\circ C$، انکوبه و در آخر پلیت با آنتی‌بادی ثانویه که همان آنتی-بادی ضد IgG خرگوشی است که با HRP کونژوگه شده است به مدت دو ساعت در دمای $37^\circ C$ انکوبه شد. سوبسترا TMB براساس روش شرکت بیورد آماده و به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. در آخر واکنش با اسید سولفوریک 1 نرمال متوقف و میزان جذب همه چاهک‌ها در طول موج 450 نانومتر با پلیت ریدر مدل Epoch شرکت بیوتک[20] (آمریکا) خوانده شد.

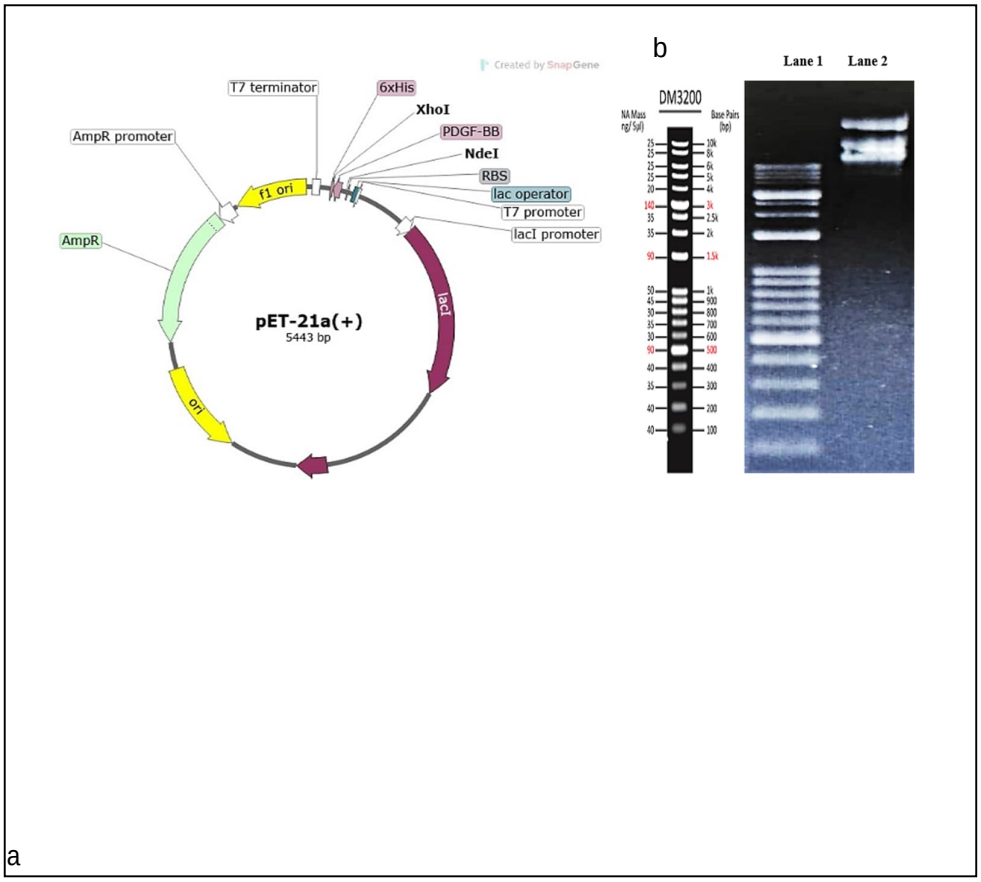
3- نتایج

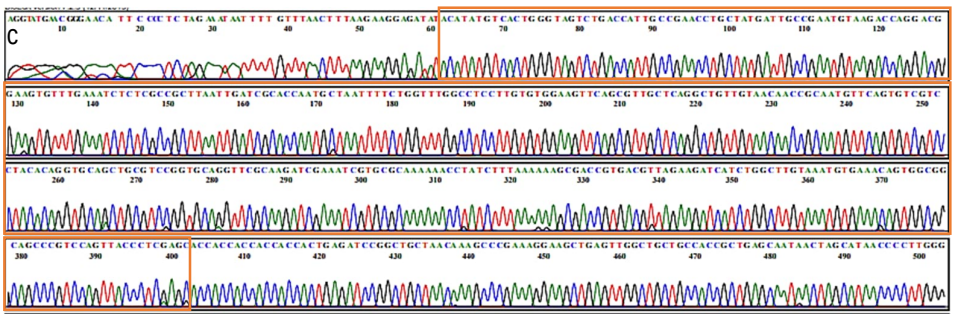
3-1 ترانسفورم پلاسمیدحاوی ژن به سویه بیانی *E. coli* SHuffle

همان‌طور که در شکل 1 نشان داده شده است، پلاسمید حاوی ژن از میزبان *E. coli* DH5α استخراج و به باکتری بیانی *E. coli*شافل منتقل شد. صحت توالی به‌وسیله توالی‌یابی بررسی و سپس شرایط بیان بهینه شد.

20 Bio Tek Epoch Plate Reader

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



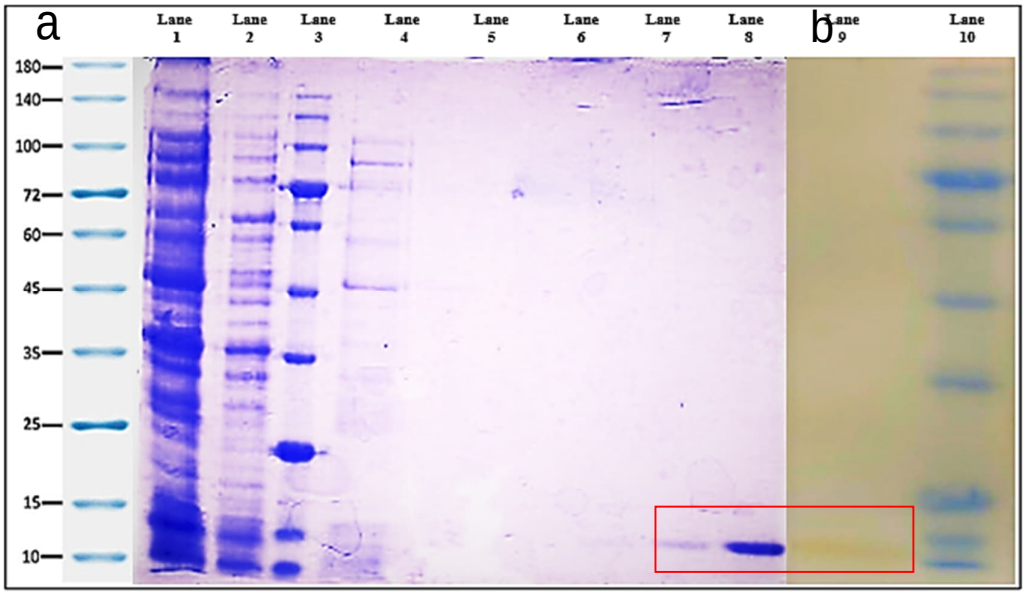


شکل 1 الف- نقشه پلاسمید: ژن PDGF-BB بین دو آنزیم برشگر *NdeI* و *XhoI* قرار دارد و دنباله هیستیدینی در بخش C ترمینال می‌باشد؛ ب- ژل آگارز یک درصد: استخراج پلاسمید از میزبان *E. coli* DH5α برای کلون به سویه بیانی Shuffle؛ ج- تعیین توالی: توالی ژن کلون‌شده.

2-3 بیان و تخلیص پروتئین PDGF-BB

نتیجه ژل الکتروفوز نشان داده می‌دهد که این پروتئین در دمای 30 درجه به مدت چهار ساعت با غلظت 1 میلی-مولار IPTG و دور شیکر 180rpm در بیشترین غلظت بیان می‌شود (شکل 2- الف). پروتئین نوترکیب تولید شده پس از استخراج از باکتری با بافر لیز به‌وسیله ستون نیکل آگارز با غلظت 350میکروگرم بر میلی‌لیتر تخلیص و وسترن بلات با آنتی‌بادی آنتی‌هیستگ برای تأیید تخلیص روی پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده گذاشته شد (شکل 2- ب).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



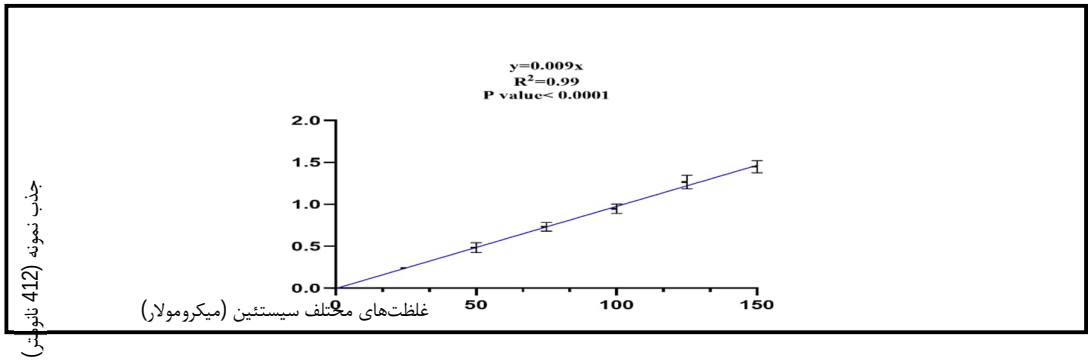
شکل 2 ژل SDS-PAGE پروتئین نوترکیب PDGF-BB (الف). L1 عصاره خام محلول حاصل از بیان پروتئین در 30 درجه با غلظت یک مولار IPTG به مدت چهار ساعت. L2 اولین خروجی از ستون که نشان می‌دهد بخش زیادی از پروتئین به ستون متصل‌شده است، L3 مارکر پروتئینی.L4,5,6،7 نمونه‌های خروجی بعد از شستشو با بافر شستشو با غلظت‌های 25،50،75،100 میلی‌مولار ایمیدازول. L8 خروج پروتئین تخلیص‌شده با بافر حاوی ایمیدازول 250 میلی-مولار با غلظت 350 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. وسترن بلات نمونه برای تأیید بیان (ب). L9 نمونه تخلیص شده و L10 مارکرپروتئینی می‌باشد.

3-3 تأیید تشکیل پیوند دی‌سولفیدی

3-3-1-روش المان

پروتئین نوترکیب PDGF-BB دو پیوند دی‌سولفیدی بین‌رشته‌ای و سه پیوند دی‌سولفیدی درون‌رشته‌ای دارد. در روش المان با استفاده از معرف DTNB تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بررسی می‌شود. در صورت تشکیل باند دی‌سولفیدی گروه سولفیدریل آزاد وجود ندارد و معرف، تغییر رنگ نمی‌دهد. در صورت تشکیل‌نشدن باند دی‌سولفیدی، معرف با گروه‌های سولفیدریل آزاد سیستئین‌ها وارد واکنش شده و تغییر رنگ مشاهده می‌شود. در این آزمایش از غلظت‌های مختلف نمونه کنترل (که همان آمینواسید سیستئین است) استفاده و منحنی استاندارد برای این غلظت‌ها رسم شد.(شکل 3). در ادامه جذب نمونه حاوی پروتئین PDGF-BB خوانده شد و در منحنی قرار گرفت که جذب نمونه‌هاتقریباً برابر با صفر بود که این موضوع نشان‌دهنده تشکیل پیوند دی‌سولفیدی است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



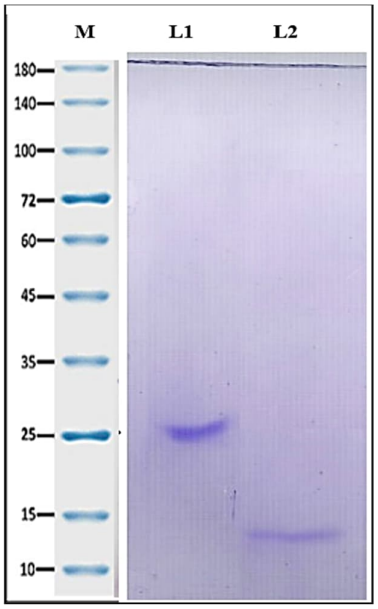
شکل 3 نمودار منحنی استاندارد سیستئین در غلظت‌های مختلف در حضور معرف است. در قسمت جدول نیز جذب نمونه‌هایPDGF-BB تخلیص‌شده آورده شده است که با توجه به اینکه در PDGF پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده بود و سیستئین آزادی وجود ندارد، جذب نمونه‌ها در حد صفر بود.

نام نمونه	جذب در 412nm
نمونه شاهد (blank)	0/082
تکرار 1 نمونه	0/081
تکرار 2 نمونه	0/093
تکرار 3 نمونه	0/088

3-3-2-روش الکتروفورز

2-مرکاپتواتانول جهت احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین در الکتروفورز ژل پلی آکریل‌آمید کاربرد و منجر به شکستن پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی بین زیر واحدهامی شود و به زیر واحدهای یک پروتئین اجازه می‌دهد، تا به‌طور مستقل در SDS-PAGE از هم جدا شوند. از آنجائی‌که زیرواحدهایPDGF-BBهمو دایمر است در صورت تشکیل پیوند دی‌سولفیدی در بافر غیر احیائی (فاقد 2-مرکاپتواتانول) وزن ملکولی دو برابر نمونه در بافر احیائی (حاوی 2-مرکاپتواتانول) خواهد بود (شکل 4).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



شکل 4 ژل SDS-PAGE برای نمونه PDGF-BB با بافر نمونه احیایی و غیراحیایی: M مارکر پروتئینی، L1 نمونه در بافر غیراحیایی و L2 نمونه در بافر احیایی است. همان‌طور که مشخص است، با تشکیل پیوند دی‌سولفیدی بین دو رشته، نمونه در بافر غیراحیایی وزنی حدود دوبرابر به نسبت نمونه در بافر احیایی دارد.

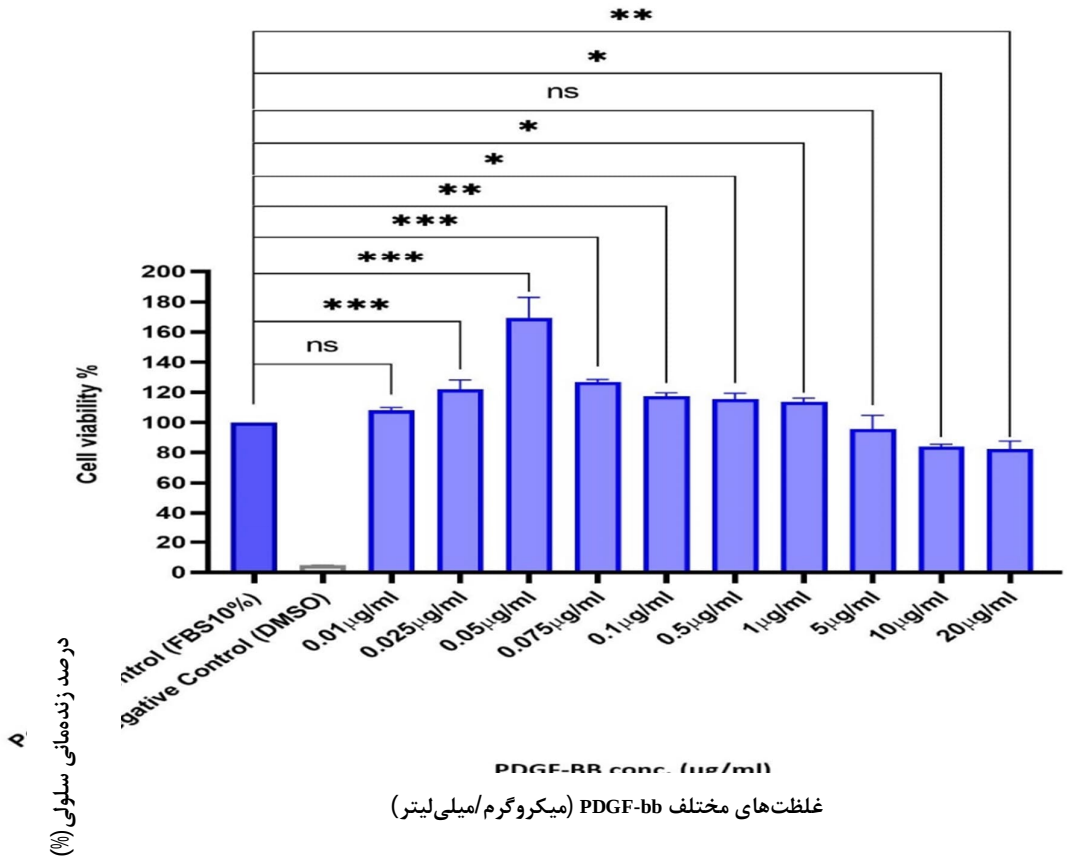
4-3 بررسی تکثیر سلولی به روش MTT

نتایج بررسی تکثیر سلولی بر رده سلولی L929 نشان داد که در حضور پروتئین PDGF-BB تخلیص‌شده، سلول‌ها قابلیت زنده‌مانی در غلظت‌های بین 1-0/025 میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارند و در غلظت‌های بالاتر اثر مهاری بر زنده‌مانی سلولی دارند (شکل 5). درواقع بررسی نتایج نشان می‌دهد که در طول 24 ساعت در حضور پروتئین نوترکیب PDGF-BB در غلظت‌های بین 0/0-025/1 میکروگرم بر میلی‌لیتر، سلول‌ها تکثیر شده و درصد زنده‌مانی از نمونه کنترل مثبت که همان محیط کشت کامل حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) بیشتر شده است.

شکل 5 بررسی تکثیر سلولی با روش MTT. غلظت های 0/01 تا 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر PDGF-BB در محیط کشت پایه (DMEM بعلاوه L-گلوتامین) بررسی شد. از محیط کشت کامل (DMEM، L- گلوتامین و FBS 10درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و DMSO به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. همان‌طور که مشخص است، در غلظت 0/05 میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین درصد زنده-مانی دیده می‌شود (برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار گراف پد[21] استفاده شد. در این بررسی میانگین زنده‌مانی نمونه کنترل مثبت 100 درصد در نظر گرفته شد و اختلاف میانگین رشد نمونه‌ها با کنترل مثبت مقایسه شد (میانگین اختلاف بین داده‌ها در $p<0.05$ *، $p<0.01$ ** و $p<0.001$ *** معنادار در نظر گرفته شد).

21 GraphPad

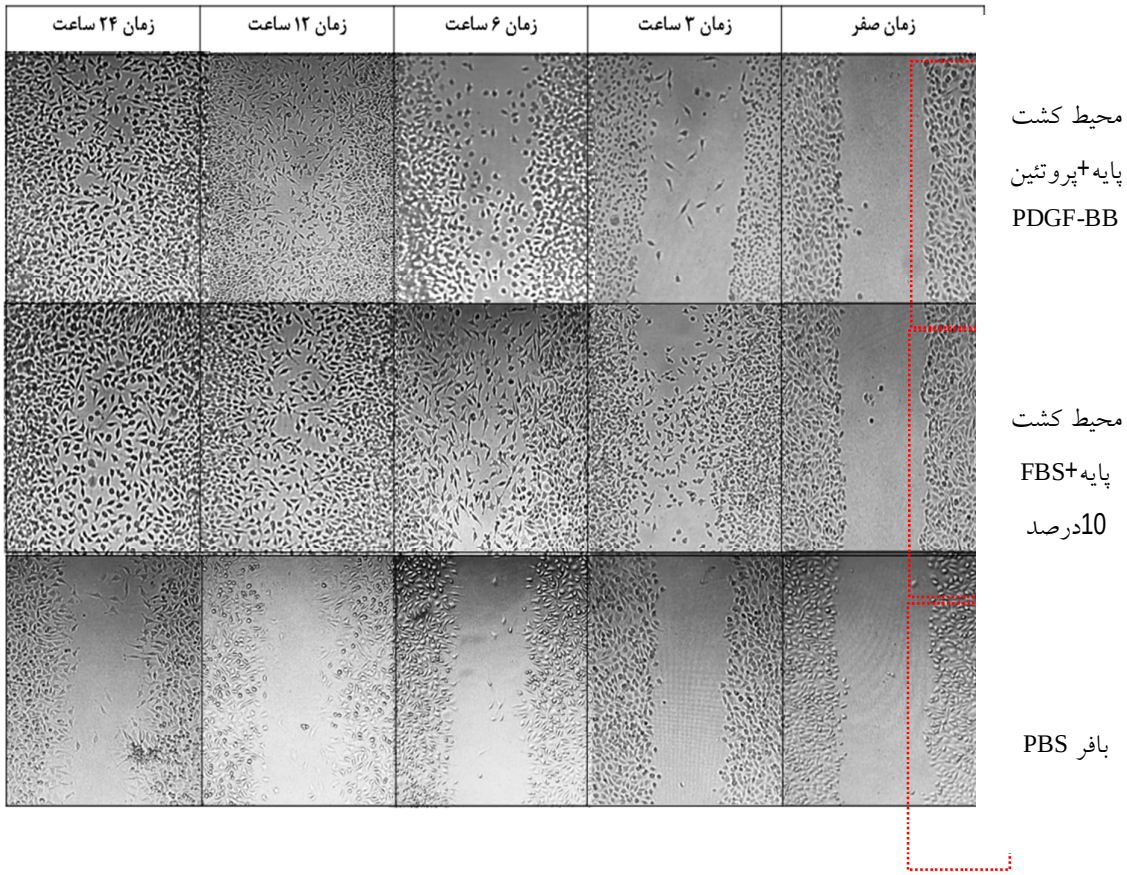
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



5-3 بررسی مهاجرت سلولی

برای بررسی اثر فاکتور رشد در مهاجرت رده سلولی L929 با روش ایجاد خراش، PDGF-BB تخلیص‌شده با غلظت نهایی 0/05 میکرگرم بر میلی‌لیتر در محیط‌کشت پایه (DMEM، L–گلوتامین) آماده و از محیط کشت کامل (DMEM، L-گلوتامین و FBS 10 درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و از بافر PBS به‌عنوان کنترل منفی در آزمایش استفاده شد. از خراش ایجادشده در ته چاهک‌ها در ساعت مختلف (24،12،0،3،6) عکس‌برداری انجام شد که نتایج نشان داد فاکتور رشد PDGF-BB تخلیص‌شده اثری تقریباً مشابه با محیط‌کشت کامل حاوی 10 درصد FBSرا در القای ترمیم خراش دارد. درواقع هر چه قدر توانایی سلول‌ها در مهاجرت و تهاجم بالاتر باشد، آن ناحیه خراش داده‌شده سریع‌تر پر می‌شود (شکل 6).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

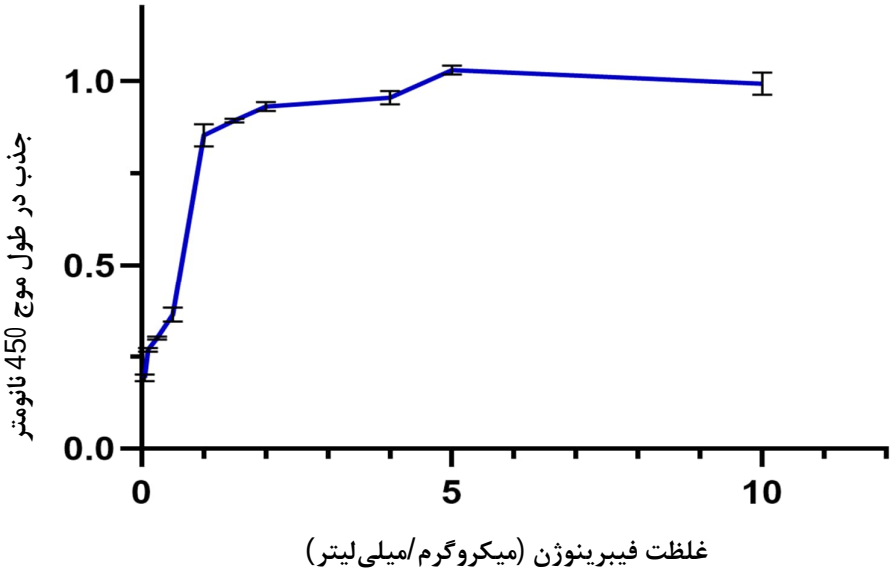


شکل 6 بررسی مهاجرت سلولی با روش زخم: در ردیف اول مهاجرت سلول‌های L929 در حضور نمونه تخلیص PDGF-BB با غلظت 0/05 میکروگرم در محیط کشت پایه بدون FBS در ساعت‌های مختلف دیده می‌شود. از ساعت 6 مهاجرت شروع شده و در 12 ساعت زخم ایجادشده‌تقریباً بسته شده و بعد از گذشت 24 ساعت مرز زخم نیز تشخیص داده نمی‌شود. در ردیف وسط مهاجرت سلول‌های L929 در حضور محیط کشت کامل حاوی FBS به‌عنوان کنترل مثبت و در ردیف آخر مهاجرت سلولی در حضور بافر PBS بدون محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی دیده می‌شود. همان‌طور که نشان داده شده است، در کنترل مثبت از ساعت 3 شروع به ترمیم خراش شده است و پس از 24 ساعت اثری از خراش دیده نمی‌شود. در کنترل منفی که نمونه بدون مواد مغذی است، سلول‌ها ثابت باقی مانده و تغییری در خراش ایجاد نشده است.

6-3 بررسی عملکرد اتصال به فیبرینوژن به روش الایزا

برای بررسی اتصال PDGF-BB تخلیص‌شده به فیبرینوژن از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. همان‌طور که نتایج الایزا نشان می‌دهد (شکل)7، با افزایش غلظت فیبرینوژن، جذب افزایش پیدا کرده است که این موضوع نشان‌دهنده اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB است، زیرا در این آزمایش آنتی‌بادی استفاده‌شده بر علیه فیبرینوژن است و با توجه به اینکه PDGF-BB در کف چاهک‌ها تثبیت شده است در صورت اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB، اتصال آنتی‌بادی انجام می شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]



شکل 7 بررسی اتصال با روش الایزا: نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت فیبرینوژن، جذب در طول موج 450 نانومتر (که ناشی از اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB است) افزایش پیدا می‌کند. البته افزایش جذب تا زمانی ادامه دارد که جایگاه‌های PDGF-BB به اشباع برسد. از این نقطه به بعد مقدار جذب، عددی‌تقریباً ثابت است که با افزایش غلظت تغییری نخواهد کرد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

امروزه زخم‌های مزمن به صورت چشمگیری در حال افزایش می‌باشند. این مسئله به یکی از موضوعات مهم پزشکی تبدیل شده است، زیرا درمان‌های موجود برای زخم‌های مزمن مؤثر نیستند. زخم‌های مزمن به دلیل طولانی‌بودن مدت زمان و هزینه‌های بالا، یک مشکل اقتصادی بزرگ برای جوامع ایجاد می‌کند. در مطالعات گذشته به استفاده از فاکتورهای رشد برای تسریع فرایند ترمیم زخم اشاره شده است و فاکتورهای رشدی مانند BMP-2 و PDGF-BB توانسته‌اند از سازمان غذا و دارو ایالات متحده آمریکا مجوز مصرف انسانی دریافت کنند [11].

ترمیم زخم یک فرایند پویا و تعاملی است و به‌خوبی سازمان‌دهی می‌شود که البته نیازمند محیط مطلوب و رگ-زایی مناسب است. فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF-BB) که نقش مهمی در روند بهبود زخم دارد، به یکی از اهداف جذاب در پزشکی بازساختی برای درمان ترمیم زخم تبدیل شده است [12]. PDGF-BB یک میتوژن برای سلول‌های مزانشیمی ازجمله استئوبلاست‌ها و فیبروبلاست‌های لثه و پریودنتال است. پلاکت‌های در حال تجزیه، استئوبلاست‌ها، فیبروبلاست‌های ماهیچه صاف، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها و کراتینوسیت‌ها توانایی تولید این فاکتور را دارند. این پروتئین برای روند بهبود زخم در بسیاری از جنبه‌ها مانند رگ‌زایی، تنظیم التهاب، تحریک تکثیر و مهاجرت سلولی، رسوب کلاژن و غیره تأثیر می‌گذارد [13]، برای مثال PDGF-BB می‌تواند تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تقویت کند و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال عروقی را

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

تحریک کند [14]. منگ و همکاران نیز گزارش دادند که PDGFمی‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی عروقی چند توان را به سلول‌های ماهیچه صاف القا کند [15]. PDFG-BB یک گیلکوپروتئین با دو زنجیره پلی‌پپتیدی است که از طریق دو پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. بررسی‌ها بر پروتئین نوترکیب PDGF در مقایسه با پروتئین طبیعی نشان داده است که گلیکوزیلاسیون PDGF-BB نقشی در اتصال آن به گیرنده ندارد [16]. در-نتیجه این پروتئین نیاز به سیستم‌های پرهزینه یوکاریوتی مانند مخمر و اصلاحات پس از ترجمه ندارد. بنابراین می‌تواند در سیستم‌های باکتریایی (که یکی از راه‌های تولید مقرون‌به‌صرفه پروتئین‌ها است) تولید شود. در مطالعه حاضر، پروتئین نوترکیب PDGF-BB در سیستم باکتریایی *E. coli* سویه SHuffle بیان و با ستون نیکل آگارز تخلیص شد. سیستم باکتری *E. coli* برای تولید صنعتی چندین نوع پروتئین نوترکیب از سوی سازمان غذا و دارو آمریکا مجوز GRAS را دریافت کرده است. با توجه به وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در این پروتئین، استفاده از میزبانی که امکانات لازم برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را داشته باشد، ضروری است و سویه SHuffle (که یک سویه مهندسی‌شده برای پروتئین‌های نوترکیب با پیوند دی‌سولفیدی است) این امکان را برای این مطالعه فراهم کرد. همچنین سیستم ستون نیکل آگارز یکی از راه‌های تخلیص صنعتی پروتئین‌های نوترکیب است [7]. برای بررسی فعالیت سلولی، آزمایش تکثیر سلولی برای پروتئین تخلیص‌شده با روش MTT انجام شد. در بررسی فنگ و همکاران در سال 2021 اثر PDGF-BB بر زنده‌مانی سلولی HBVSMC و افزایش بیان miR-552 نشان داده شد. در این بررسی دیده شد که PDGF-BB در غلظت 0/05 میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر بالایی بر زنده‌مانی سلولی و تکثیر سلولی دارد [17]. نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد که پروتئین نوترکیب PDGF-BB در غلظت‌های بین 0/1-0/025 میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر بیشتری بر رشد سلولی به نسبت کنترل مثبت (که محیط کامل حاوی FBS 10درصد است) دارد. بررسی مهاجرت سلولی با روش خراش یا scratch نیز برای اطمینان از عملکرد فاکتور رشد نوترکیب بیان‌شده گذاشته شد، زیرا یکی از ویژگی‌های فاکتور رشد مشتق از پلاکت القا تکثیر سلولی است. سنجش خراش در شرایط آزمایشگاهی روشی آسان، کم‌هزینه و بهینه برای اندازه‌گیری مهاجرت سلولی است. مراحل اولیه شامل ایجاد یک «خراش» در تک لایه سلول، گرفتن تصاویر در آغاز و در فاصله‌های منظم در طول مهاجرت سلول تا بستن خراش و مقایسه تصاویر برای تعیین کمیت نرخ مهاجرت سلول‌ها است [18]. چن و همکاران در سال 2021 نشان دادند که پروتئین PDGF-BB نوترکیب انسانی (rhPDGF-BB) قابلیت ترمیم زخم در آزمایش خراش را پس از 24 ساعت دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان می‌دهد که فاکتور رشد نوترکیب بیان‌شده قابلیت ترمیم کامل زخم را پس از گذشت 24 ساعت همانند کنترل مثبت که حاوی محیط کامل و FBS است، دارد [19]. سرم جنین گاوی (FBS) یک محیط طبیعی است که در کشت‌های سلولی استفاده می‌شود. این محیط حاوی مقادیر زیادی مواد مغذی و فاکتورهای رشد موردنیاز برای رشد سلول است و درواقع شرایط بهینه موردنیاز سلول‌ها را برای رشد فراهم می‌کند [20]. اتصال فاکتورهای رشد به ECM به حضور کنترل‌شده آنها در محل زخم کمک می‌کند. در زمان بروز آسیب و ایجاد زخم، لخته فیبرینی یکی از ارکان مهم در ترمیم زخم است. در سال 2009 موگفورد و همکاران مشاهده کردند که فرمول فیبرینوژن-ترومبین همراه با فیبروبلاست‌ها و PDGF-BBباعث بهبود زخم پوستی می‌شود [21]. فاکتور رشد پلاکتی با افزایش گرانولاسیون بافتی به ترمیم زخم کمک می‌کند. در سال 2014 مارتینو و همکارانش

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

نشان دادند که فاکتور رشد مشتق از پلاکت از محل دمین اتصالی به هپارین قابلیت اتصال به فیبرین/ فیبرینوژن را دارد [9]. این مطالعه نشان داد که این قسمت از فیبرینوژن (که در آغاز زنجیره بتا فیبرین/ فیبرینوژن پس ناحیه برش ترومبین قرار دارد) قابلیت اتصال به انواع فاکتورهای رشد را دارد. در بررسی حاضر، اتصال فاکتور رشد نوترکیب بیان‌شده به فیبرینوژن با روش الایزا ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی اتصال با روش الایزا مشخص کرد که پروتئین نوترکیب PDGF-BB تخلیص‌شده در این مطالعه قابلیت اتصال به فیبرینوژن را دارند.

به‌طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که پروتئین PDGF-BB بیان‌شده در باکتری *E. coli* فعالیت تکثیر سلولی در 24 ساعت اول کشت را دارد. نتایج آزمایش الایزا در مقابل پروتئین فیبرینوژن نشان داد که نمونه نوترکیب PDGF بیان‌شده در سویه باکتری علاوه‌بر دارابودن فعالیت تکثیری در سطح سلولی به دلیل حفظ ساختار اصلی خود، قابلیت اتصال به پروتئین فیبرینوژن را دارد.

منابع

[1] Vaidyanathan, L. (2021) ‘Growth factors in wound healing’, Biomedical and Pharmacology Journal, 14(3), 1469–1480.

[2] Locatelli, L. *et al.* (2021) ‘Platelets in wound healing: what happens in space?’, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 1–11.

[3] Jian, K. *et al.* (2022) ‘PDGF-BB derived supramolecular hydrogel for promoting skin wound healing’, Journal of Nanobiotechnology, 20(1), 1–9.

[4] Moore, C. A. (2017). ‘Aptamer-based biosensor for platelet-derived growth factor-BB using fluorescence resonance energy transfer’, Texas State University, San Marcos, Texas.

[5] Lynch, S.E. *et al.* (1987) ‘Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors.’, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 84(21), 7696–7700.

[6] Ghasemi, Y. *et al*. (2020) ‘Cloning, expression, and purification of human PDGF-BB gene in *Escherichia coli*: new approach in PDGF-BB protein production’, Gene Reports, 19, 100653.

[7] Chen, P.H. *et al*. (2013) ‘Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives’, Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1834(10),2176–2186.

[8] Westermark, B. and Heldin, C.H. (1993) ‘Platelet-derived growth factor structure, function and implications in normal and malignant cell growth’, Acta Oncologica, 32(2), 101–105.

[9] Martino, M.M. *et al.* (2014) ‘Matrix enhances tissue healing’, Science, 343, 885–889.

[10] Martino, M.M. and Hubbell, J.A. (2010) ‘The 12th–14th type iii repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain’, The FASEB Journal, 24(12), 4711–4721.

[11] Deptuła, M. *et al.* (2020) ‘Development of a peptide derived from platelet-derived growth factor (PDGF-BB) into a potential drug candidate for the treatment of wounds’, Advances in Wound Care, 9(12), 657–675.

[12] Zhang, Z. *et al*. (2021) ‘PDGF-BB/SA/Dex injectable hydrogels accelerate BMSC-mediated functional full thickness skin wound repair by promoting angiogenesis’, Journal of Materials Chemistry B, 9(31), 6176–6189.

[13] Cooke, JW. *et al*. (2006) Effect of RhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. Tissue Eng;12(6):1441-50.

[14] Zhang, M. *et al*. (2018) ‘The effects of platelet-derived growth factor-bb on bone marrow stromal cell-mediated vascularized bone regeneration’, Stem Cells International. 31; 3272098.

[15] Meng, X. *et al*. (2018) ‘Oxidation prevents hmgb1 inhibition on PDGF induced differentiation of multipotent vascular stem cells to smooth muscle cells: a possible mechanism linking oxidative stress to atherosclerosis’, Biomed Research International, 23; 4019814.

[16] Devare, S.G. *et al.* (1984) ‘Expression of the PDGF-related transforming protein of simian sarcoma virus in *E. coli’*, Cell, 36(1), 43–49.

[17] Feng, M. *et al*. (2022) ‘ATF4 promotes brain vascular smooth muscle cells proliferation,

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

[20] Liu, S. *et al.* (2023) 'fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments', Scientific Reports, 13(1), 1–8.

[21] Mogford, J.E. *et al.* (2009) 'Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhances wound healing in excisional wounds', Wound Repair and Regeneration, 17(3), 405–410.

invasion and migration by targeting mir-552-ski axis', Plos ONE, 17(7), 1–14.

[18] Liang, C.C. *et al*. (2007) '*In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro', Nature Protocols, 2(2), 329–333.

[19] Chen, L. *et al.* (2021) 'Inhibition of PDGF-BB reduces alkali-induced corneal neovascularization in mice', Molecular Medicine Reports, 23(4),1–11.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Expression and purification of platelet-derived growth factor and evaluation of its function in binding to fibrinogen

Maryam Molasalehi[1], Bahareh Dabirmanesh[2], sadegh HasanNia[3*]

1- Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Associate Prefessor ,Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3- Professor Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*corresponding author : hasannia@modares.ac.ir
Received:2023/7/13 Accepted: 2023/12/2

Abstract

The wound healing process is a complex and dynamic process that involves different types of cells and metabolic pathways. This process consists of three main phases, including the inflammatory phase, cell proliferation, and tissue regeneration. Successful wound healing depends on careful regulation and coordination between the factors involved.

Until recent years, the strategy of treating chronic wounds was limited to wound preparation, removal of necrotic tissue, and control of infection and inflammation, but recently the use of growth factors has been approved to accelerate the healing process and heal the wound. Human recombinant growth factor PDGF-BB is one of the first types of recombinant growth factors that have been approved in the treatment of diabetic wounds. Various studies have reported that PDGF as an important mediator in the wound healing process helps to accelerate healing and reduce inflammation, cell proliferation, angiogenesis, and tissue regeneration. In this study, the PDGF-B gene was synthesized in the pET 21(a+) expression vector and cloned in the *E. coli* SHuffle host under the control of the T7 promoter. After expression, purification was done using a nickel agarose column. Since the purified recombinant protein has a His-tag sequence, the protein band was confirmed by western blotting with an anti-His-tag antibody, and the correctness of disulfide bond formation was checked by the Ellman method and SDS-PAGE. To investigate the activity of the purified protein, cell proliferation, migration, and binding to extracellular matrix protein, experiments were performed. The results of this study showed that PDGF is expressed as a dimer with complete disulfide bonds. The expression of this protein in the SHuffle bacterial host, which is capable of forming disulfide bonds, probably led to the maintenance of the protein structure. The results of in vitro studies showed that the purified protein has both main activities, i.e., cell proliferation and the ability to bind to cell matrix proteins.

Key Words: Wound healing, platelet-derived growth factor, expression, cloning.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-07]