



The Effect of Chemokine CXCR3 Receptor Downregulation on Vascular Endothelial Cell Dysfunction

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Sajjadi S.F.¹ MSc,
Boroumand M.A.² PhD,
Behmanesh M.*¹ PhD

How to cite this article

Sajjadi S.F, Boroumand M.A, Behmanesh M. The Effect of Chemokine CXCR3 Receptor Downregulation on Vascular Endothelial Cell Dysfunction. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(3):311-317.

¹Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Tehran Heart Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82884451
Fax: +98 (21) 82884717
behmanesh@modares.ac.ir

Article History

Received: May 21, 2020

Accepted: July 25, 2020

ePublished: September 20, 2020

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic vascular disease and remains the leading cause of death and morbidity worldwide. Endothelial dysfunction is an important factor in the progression of atherosclerotic disease. Increased expression of cell adhesion index genes and decreased cell-binding proteins lead to abnormal endothelial function. These molecular changes are one of the most important indicators of endothelial cell dysfunction and the progression of atherosclerosis. CXCR3 is a G-protein-coupled chemokine receptor expressed by endothelial cells. The role of the receptor CXCR3 and its ligands in endothelial cells and heart disease is not yet fully understood. In the current study, the effect of CXCR3 downregulation on the expression level of adhesion (I-CAM-1, V-CAM-1), tight junction (TJP1), related to endothelial dysfunction is evaluated.

In order to reduce the expression of the CXCR3 gene, the RNA-cleaving DNase was used against the mRNA of the CXCR3 gene. DNase was transfected into HUVEC cells by TurboFect™. After confirmation of decreased CXCR3 gene expression, RNA extraction and cDNA synthesis were performed and then the expression of markers was evaluated by RT-qPCR technique.

The results depicted that the expression level of I-CAM-1 and V-CAM-1 were showed significant up-regulation in transfected cells compared with control cells, while the TJP1 gene was not showed significant change. It seems that reducing the CXCR3 gene expression could induce endothelial dysfunction through the change of adhesion markers genes expression. Therefore, this receptor can be considered as a potential molecular target for a better understanding of the mechanism of atherosclerosis.

Keywords Atherosclerosis; Endothelial Dysfunction; CXCR3; Tight Junction; Adhesion Markers

CITATION LINKS

[1] Inflammation, atherosclerosis, and coronary ... [2] Atherosclerosis ... [3] Pathophysiology of coronary artery ... [4] Endothelial dysfunction: Clinical implications in cardiovascular disease and ... [5] Vascular endothelium-gatekeeper of vessel ... [6] Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style ... [7] Endothelial dysfunction: The early predictor of ... [8] Role of endothelial dysfunction in ... [9] Inflammatory markers, endothelial function and ... [10] Critical roles of inflammation in ... [11] Testing for endothelial ... [12] ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and ... [13] Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the ... [14] Chemokine receptors: Key for molecular imaging of ... [15] The role of CXCR3 and associated chemokines in the development of ... [16] The distinct roles of CXCR3 variants and their ligands in the ... [17] Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular ... [18] Cxc chemokine receptor expression on human endothelial ... [19] From endothelial dysfunction to ... [20] CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: Expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic ... [21] Endothelial cell dysfunction and the pathobiology ... [22] Blockade of CXC chemokine receptor 3 on endothelial cells protects ... [23] CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and ... [24] Blocking CXCR3 with AMG487 ameliorates the blood-retinal barrier disruption ... [25] Effects of CXCL4/CXCR3 on the lipopolysaccharide-induced injury in human ... [26] Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell ... [27] TNFR1-induced NF- κ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ... [28] Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by ... [29] Leukocytes crossing the endothelium: A ... [30] Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity ... [31] Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the ... [32] Chemokines as the modulators of endometrial ... [33] Adhesion molecules and ...

تاثیر کاهش بیان گیرنده کموکاینی CXCR3 بر اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال رگ

سیده فاطمه سجادی MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محمدعلی برومند PhD

مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مهرداد بهمنش* PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

آترواسکلروز یک بیماری عروقی مزمن و عامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال عامل مهمی در ایجاد آترواسکلروز است. افزایش بیان ژن‌های شاخص چسبندگی سلولی و کاهش پروتئین‌های متصل‌کننده سلول‌ها منجر به عملکرد غیرطبیعی اندوتلیوم می‌شود. این تغییرات مولکولی از مهم‌ترین نشانگرهای اختلال در سلول‌های اندوتلیال و پیشرفت بیماری آترواسکلروز است. CXCR3 یک گیرنده کموکاینی G پروتئینی است که توسط سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود. نقش گیرنده CXCR3 و لیگاند‌های آن در عملکرد سلول‌های اندوتلیال و ایجاد بیماری‌های قلبی هنوز به‌درستی شناخته نشده است. در مطالعه حاضر، تاثیر کاهش بیان ژن CXCR3 بر میزان بیان نشانگرهای چسبندگی (V-CAM-1 و I-CAM-1) و اتصال محکم (TJP1) بین سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور کاهش بیان ژن CXCR3 از DNAzyme برش‌دهنده علیه mRNA ژن CXCR3 استفاده شد. DNAzyme توسط توربوفاکت به درون سلول‌های HUVEC ترانسفکت شد. بعد از تایید کاهش بیان ژن CXCR3، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد و سپس بیان ترانسکریپت ژن‌های هدف توسط تکنیک RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که سطح بیان ICAM-1 و VCAM-1 به‌طور قابل توجهی در سلول‌های ترانسفکت‌شده در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش یافت، در حالی که ژن TJP1 تغییر قابل توجهی نشان نداد. به نظر می‌رسد که کاهش بیان ژن CXCR3 می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال از طریق افزایش بیان مولکول‌های چسبندگی شود. بنابراین، این گیرنده می‌تواند به‌عنوان یک هدف مولکولی بالقوه برای درک بهتری از مکانیزم ایجاد بیماری آترواسکلروز در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: آترواسکلروز، اختلال عملکرد اندوتلیال، CXCR3، اتصالات محکم، نشانگرهای چسبندگی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴

*نویسنده مسئول: behmanesh@modares.ac.ir

مقدمه

بیماری قلبی و عروقی (CAD) از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در سراسر جهان است که با افزایش شیوع چاقی و دیابت در جهان پیش‌بینی می‌شود که به‌زودی به‌عنوان عامل اصلی مرگ و میر در جهان مورد توجه قرار گیرد^[1]. محرک اصلی و کمک‌کننده در ایجاد بیماری قلبی و عروقی سخت‌شدن جدار عروق یا همان آترواسکلروز است. فاکتورهای مختلفی همچون افزایش کلسترول و تری‌گلیسیرید در خون، فشار خون بالا، دیابت و سیگار باعث

افزایش ریسک ابتلا به آترواسکلروز می‌شوند^[2, 3]. آترواسکلروز یک بیماری عروقی پیش‌رونده مزمن است که با ضخیم‌شدن دیواره عروق و در نتیجه تجمع کلسترول، ماکروفاژها، لوکوسیت‌ها و سلول‌های عضلانی صاف عروق (vsmc) در اینتیمای رگ می‌دهد^[4, 5]. در حالی که چندین نوع سلول به‌وضوح در پاتوژنز پلاک آترواسکلروتیک درگیر هستند، اما در این بین اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

اندوتلیوم عروق نقش فعال و پیچیده‌ای در حفظ سیالیت خون، هموستاز بافتی، مهار و تحریک تکثیر سلول‌های عضله صاف و مهاجرت آنها، تولید فاکتور رشد و تعادل بین عروق و خون بر عهده دارد. هنگامی که این تعادل از بین می‌رود، اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال رخ می‌دهد و باعث آسیب به دیواره شریان می‌شود^[6, 7]. امروزه مشخص شده است که اختلال عملکرد در سلول‌های اندوتلیال نه‌تنها شروع‌کننده بلکه یک فاکتور مهم در پیشرفت روند آترواسکلروز است. نقش جدایی‌ناپذیر اندوتلیوم در سلامت عروق و اختلال در عملکرد اندوتلیال در آترواسکلروز باعث شده است که توجه زیادی به پتانسیل معکوس عملکرد اندوتلیال در درمان آترواسکلروز جلب شود^[8].

افزایش نفوذپذیری و مهاجرت لوکوسیت‌ها و ماکروفاژها به لایه زیراندوتلیالی عامل مهمی در ایجاد فوم‌سل‌ها و در نهایت پلاک آترواسکلروز است. افزایش نفوذپذیری سلول‌های لوکوسیتی به لایه زیر سلول‌های اندوتلیال تحت تاثیر افزایش نشانگرهای چسبندگی و کاهش پروتئین‌های اتصالی محکم اتفاق می‌افتد^[9]. مطالعات قبلی بیانگر آن است که از جمله نشانگرهای چسبندگی که در اختلال عملکرد اندوتلیالی افزایش می‌یابند افزایش بیان ژن‌های ICAM-1 و VCAM-1 است^[10, 11]. همچنین مطالعات نشان داده است که تغییر در مقدار اتصالات محکم بین سلولی عملکرد سد اندوتلیال را مختل می‌کند و باعث التهاب و ایجاد اختلال در عملکرد اندوتلیالی می‌شود. از جمله مهم‌ترین پروتئین تشکیل‌دهنده این نوع اتصالات ZO1 (Zonula occludens-1) از خانواده اتصال محکم است که توسط ژن TJP1 کد می‌شود که در اختلال عملکرد اندوتلیالی مقدار آن کاهش می‌یابد^[12]. افزایش مولکول‌های چسبندگی ICAM-1 و VCAM-1 و کاهش پروتئین ZO1 که شکل‌دهنده ایجاد اتصالات محکم است از مارکرهای مهم اندوتلیالی هستند که در تغییرات نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیالی و مهاجرت لوکوسیت‌ها به زیراندوتلیال نقش دارند. گزارش‌های قبلی دال بر آن است که بیان آنها پس از فعال‌شدن سلول‌های اندوتلیالی توسط محرک‌های پیش‌التهابی افزایش می‌یابد^[13].

از جمله محرک‌های پیش‌التهابی کموکاین‌ها هستند. کموکاین‌ها پروتئین‌های کوچکی هستند که به گیرنده‌های G پروتئینی (GPCR) متصل می‌شوند و این گیرنده‌ها را فعال می‌کنند^[14]. GPCRها خانواده متنوعی از گیرنده‌های 7TM هستند که به G پروتئین‌های داخل سلول متصل می‌شوند و مسیرهای سیگنال‌دهی درون سلول را فعال می‌کنند. GPCRها پس از اتصال

CXCR3 استفاده شد. طراحی توالی‌های تک‌ رشته DNA با طول ۳۲ و ۳۱ نوکلئوتید پس از یافتن ناحیه مشترک بین واریانت‌های مختلف CXCR3 توسط نرم‌افزارهای Oligo 7 و NCBI-Blast انجام شد. همچنین برای بررسی تشکیل ساختارهای ثانویه درون رشته mRNA هدف، از نرم‌افزار پیش‌بینی ساختار دوم RNA به نام RNAfold استفاده شد. توالی DNAzyme ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱) توالی DNAzyme های طراحی شده علیه mRNA ژن CXCR3 و توالی پرایمرهای استفاده شده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
CXCR3-DZ1	5'-GGTACAGCAGGCTAGCTACAACGAGA GTCACT-3'	-
CXCR3-DZ2	5'-CACGTCTAGGCTAGCTACAACGACCTG CTTT-3'	-
CXCR3 F	3'-TCTGGCTCTCCCAATATCCTCGC-5'	۲۳۰
CXCR3 R	5'-CTCTACGCCATGCCTGTACTCCC-3'	۲۳۰
ICAM-1 F	5'-AACTGCAGCACACCTGTAA-3'	۲۶۶
ICAM-1 R	5'-CTGCACTCAATGGTGAAGGA-3'	۲۶۶
VCAM-1 F	5'-GGGAACGAACACTCTTACCT-3'	۲۴۰
VCAM-1 R	5'-ATCCTCCAGAAATTCCTGACT-3'	۲۴۰
TJP1 F	5'-AATCATCCGACTCCTCGTCGGG-3'	۳۲۱
TJP1 R	5'-CGTCAATCACAACATGCAGTG-3'	۳۲۱
ACTB F	5'-AGCCTTCCTTCTCGGGCATGG-3'	۱۰۹
ACTB R	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAGGTC-3'	۱۰۹

به منظور ترانسفکشن DNAzyme ها به درون سلول‌های HUVEC، از روز قبل، تعداد 10^5 سلول HUVEC درون هر چاهک پلیت ۱۲ خانه برای زمان‌های ۲۴ و ۴۸ کشت داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌های اندوتلیال به کف چاهک‌های پلیت و رسیدن به تراکم ۷۰٪، در ادامه به ازای هر چاهک، یک نانومولار DNAzyme های طراحی شده با ۲۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم به خوبی پیتاژ شد و بعد از افزودن ۴ میکرولیتر TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific؛ ایالات متحده) مخلوط حاصل سریع به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل تازه به هر چاهک اضافه شد و سپس ترکیب DNAzyme به هر چاهک اضافه شد. چاهک حاوی سلول‌های اندوتلیالی بدون اضافه کردن DNAzyme به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای اطمینان از ترنسفکشن سلول‌ها از یک وکتور بیان کننده پروتئین GFP به عنوان کنترل ترانسفکشن استفاده شد.

به منظور بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های تحت ترانسفکشن با DNAzyme استخراج RNA از این سلول‌ها و سلول‌های کنترل انجام گرفت. RNA کل از سلول‌های اندوتلیالی براساس روش فنول-کلروفرم و توسط RNX™-plus (سیناژن؛ ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

به لیگندهای مختلف از جمله انتقال دهنده‌های عصبی، کموکاین‌ها، سیتوکین‌ها، هورمون‌ها و یون کلسیم فعال می‌شوند. بیان GPCR ها در سلول‌ها نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ دارد که منجر به تولید سیتوکین‌های التهابی و کموکاین‌ها و تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تکثیر، بقا و کموتاکسی می‌شود^[15]. CXCR3 انسانی یکی از اعضای خانواده گیرنده‌های کموکایینی CXCR است که به ۴ لیگاند کموکایینی CXCL9، CXCL10، CXCL11 و CXCL4 متصل می‌شود. این گیرنده دارای یک پروتئین با سه ایزوفرم متفاوت شامل ایزوفرم A، B و alt است^[15]. پروتئین‌های داخل سلولی پس از فعال شدن CXCR3، طیف گسترده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ مانند آدنیلیل سیکلاز، فسفولیپاز C (PLC)، فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) و پروتئین کیناز (MAPK) را فعال می‌کنند. هر ایزوفرم CXCR3 به زیرواحدهای خاصی از پروتئین Gα مرتبط است^[16]. رسپتور CXCR3 از طریق افزایش التهاب و افزایش مارکرهای اتصالی سطح لوکوسیت‌ها به ویژه سلول‌های T در افزایش نفوذپذیری این سلول‌ها به لایه ساب‌اندوتلیالی نقش دارد. علاوه بر نقش این گیرنده و لیگندهای آن در فعال شدن و ورود لوکوسیت‌ها به درون لایه ساب‌اندوتلیالی، این گیرنده و لیگندهایش بر روی سلول‌های اندوتلیالی هم می‌توانند موثر باشند که نقش آن هنوز به درستی مشخص نشده است^[17]. CXCR3 عضو خانواده بزرگی از گیرنده‌ها در سلول‌های اندوتلیالی است^[18]. در مطالعه حاضر، به بررسی نقش این رسپتور در ایجاد اختلال عملکرد اندوتلیال و اهمیت این رسپتور در بروز بیماری آترواسکروز پدیده پرداخته شده است. به طور کلی هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان نشانگرهای چسبندگی و اتصالی ICAM-1، VCAM-1 و TJP1 به عنوان نشانگرهای اختلال در عملکرد اندوتلیالی در شرایط کاهش بیان رسپتور CXCR3 در محیط کشت سلول‌های HUVEC است.

مواد و روش‌ها

رده سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های HUVEC در فلاسک T25 کشت داده شدند. به منظور رشد و نگهداری سلول‌ها از محیط (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium؛ Gibco؛ ایالات متحده) حاوی ۵ میلی‌مولار گلوکز به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. سلول‌ها در حضور ۵٪ CO₂ در ۳۷°C در انکوباتور رشد داده شدند تا از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب رسیدند و سپس برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

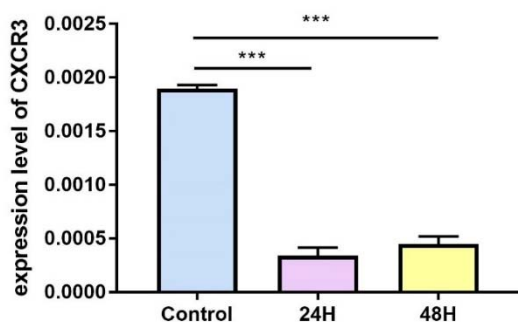
کاهش بیان گیرنده CXCR3

به منظور کاهش بیان گیرنده CXCR3 از دو الیگودئوکسی نوکلئوتید برش دهنده طراحی شده علیه mRNA ژن

سلول‌های ترانسفکت شده بیانگر موفقیت آمیز بودن روند انجام ترانسفکشن بود. تصاویر مربوط به تصویربرداری از سلول‌های ترانسفکت شده در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

شکل ۱ ترانسفکشن سلول HUVEC با یک وکتور بیان کننده پروتئین GFP با استفاده از توربوفاکت؛ (الف) نور مرئی (۱۰X)؛ (ب) نور فلورسنت (۱۰X)

نتایج RT-PCR کمی نشان داد که در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن DNAzyme بیان ژن *CXCR3* به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. میزان کاهش بیان ژن *CXCR3* در ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن ($p = 0.0013$)، $3/7$ برابر کاهش) بیشتر از ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن ($p = 0.0014$)، $3/2$ برابر کاهش) بود. به همین منظور از بازه زمانی ۲۴ ساعت برای مطالعه تاثیر کاهش بیان ژن ریسپتور *CXCR3* بر بیان ژن‌های هدف انتخاب شده استفاده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱ میانگین آماری کاهش بیان ژن *CXCR3* توسط ترانسفکشن DNAzyme اختصاصی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن ($p < 0.001$)

برای بررسی تاثیر مقدار کاهش بیان ژن‌های هدف *VCAM-1*، *ICAM-1* و ژن *TJP1* از سلول‌های Huvec که در آن‌ها ژن گیرنده *CXCR3* کاهش یافته بود استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *VCAM-1* به طور معنی داری در سلول‌هایی که بیان ژن *CXCR3* در آنها توسط DNAzyme کاهش یافته بود نسبت به سلول‌های کنترل افزایش داشت ($p = 0.014$)، ۸ برابر افزایش؛ نمودار ۲-الف). همچنین ژن *ICAM-1* نیز در سلول‌هایی که در آنها بیان ژن *CXCR3* کاهش یافته بود به شکل معنی داری نسبت به سلول‌های کنترل، افزایش بیان داشت ($p = 0.012$)، ۱۲ برابر افزایش؛ نمودار ۲-ب). بیان ژن *TJP1* در سلول‌هایی که ژن *CXCR3* در آن‌ها کاهش یافته بود نسبت به سلول‌های کنترل اندکی افزایش یافته بود اما این تغییر از نظر آماری معنی دار نبود ($p = 0.03$ ؛ نمودار ۲-ج).

کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت. سنتز cDNA توسط کیت سنتز cDNA (Biofact؛ کره) انجام شد. ساخت cDNA با ۳ میکروگرم RNA کل و ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و یک نانومول پرایمرهای Oligo(dT)18 (MWG؛ آلمان) و رندوم هگزامر (MWG؛ آلمان) و مطابق با دستورالعمل کیت شرکت سازنده انجام شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در حجم ۲۰ میکرولیتر به انجام رسید.

به منظور طراحی پرایمر، ابتدا توالی ژن‌های *ICAM-1*، *CXCR3*، *ACT-B*، *TJP1*، *VCAM-1* از بانک ژن NCBI به دست آمد. پس از کنار هم قراردادن ترانسکرپت‌های تایید شده از ژن‌های هدف پرایمرهای اختصاصی ژن‌ها برای نواحی مشترک و با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo 7 و Allele ID طراحی شدند. سپس با استفاده از NCBI BLAST از اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱). در این مطالعه از ژن بتا/کتین انسانی به عنوان ژن کنترل داخلی برای نرمال کردن آنالیزهای بیان ژن استفاده شد.

سطح بیان mRNA ژن‌های *VCAM-1*، *ICAM-1*، *CXCR3* و *TJP1* با متد qPCR اندازه‌گیری شد. PCR توسط دستگاه Applied Biosystems- StepOne (Applied Biosystem؛ ایالات متحده) و با استفاده از ۱۰ نانوگرم cDNA، ۳ میکرولیتر مستر EvaGreen (5X؛ Solis BioDyne؛ استونی) و ۴ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای پیش‌برنده و برگرداننده در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. صحت انجام واکنش تکثیر ژن‌های هدف از طریق اطمینان از تک‌باند بودن محصولات PCR بر روی ژل ۱۲٪ اکریل‌آمید و بررسی نمودار ذوب محصول مورد بررسی قرار گرفت. تمام واکنش‌ها حداقل با دو بار تکرار انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه بود. سیکل PCR برای ۴۰ بار انجام شد.

آنالیز آماری و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Graph Pad prism انجام شد. آنالیز بیان ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای محاسبه مقدار fold change انجام شد [20]. همچنین به منظور مقایسه دو گروه از unpaired Student T-test استفاده شد. نتایج برای هر گروه با میانگین و خطای استاندارد از میانگین نشان داده شد. مقدار $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار از نظر آماری مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، به منظور ردیابی رنگ سبز مربوط به بیان ژن *GFP*، سلول‌ها در شرایط کاملاً استریل با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. نور سبزرنگ تابیده شده از