

تشخیص اتصال پپتید ضد رگ‌زایی به سلول‌های HUVEC با استفاده از FITC

فهیمة امینی سپهر، سید محسن اصغری، مصطفی شوریان*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: رگ‌زایی تولید عروق خونی جدید از عروق موجود است. رگ‌زایی وابسته به وجود تعادل بین فاکتورهای فعال‌کننده و مهارکننده آن است. اندواستاتین، یک قطعه ۲۰ کیلو دالتونی از کلاژن XVIII و عضوی از گروه پروتئین‌های مهارکننده رگ‌زایی می‌باشد که تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل ساختار لوله مانند را مهار می‌کند. استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی به واسطه پروب‌های فلورسنت به عنوان ردیاب، کاربرد گسترده‌ای دارد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و تشخیص اتصال پپتید ضد رگ‌زایی به سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی با استفاده از یک نشانگر فلورسنت بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی قطعه ۲۷ آمینواسیدی مربوط به دمین انتهای آمینوی پروتئین اندواستاتین، با FITC به عنوان یک نشانگر فلورسنت، نشانه‌گذاری شد. از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به وسیله سفادکس G₁₀ برای جداسازی پپتیدهای اتصال یافته استفاده شد و در نهایت به منظور تأیید اتصال FITC به پپتید از روش FTIR استفاده شد. سلول‌های اندوتلیال بندناف انسانی بعد از کشت با پپتیدهای اتصال یافته به نشانگر تیمار شدند و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس به منظور مشاهده اتصال پپتید به رسپتور خود بر روی سطح این سلول‌ها مطالعه گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه با میکروسکوپ فلورسانس اتصال این پپتید ضد رگ‌زایی به گیرنده مخصوص خود بر روی سلول‌های اندوتلیال را تأیید می‌کند. جهت رسیدن به شرایط مناسب برای نشانه‌گذاری پپتیدها، شرایط مختلف آزمایشی از قبیل غلظت پپتید و FITC و زمان و دمای انکوبه شدن مورد بررسی قرار گرفت. FITC‌های آزاد به وسیله روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از نمونه‌های کانژوگ FITC-peptide جدا شدند. سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی (HUVEC) کشت داده شده با نمونه‌های کانژوگ FITC-peptide تیمار شد. سپس سلول‌ها تثبیت و به وسیله میکروسکوپ فلورسانس مطالعه شدند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق اتصال بین FITC، به عنوان یک پروب فلورسانس به پپتید در یک شرایط بهینه انجام شد. به علاوه نشان دادیم که این کمپلکس قابل جداسازی می‌باشد. از طرفی نتایج تحقیقات حاکی از این است که پپتید مشتق از اندواستاتین به نحو مؤثری به سلول‌های HUVEC متصل شده است. این روش راهکار درستی برای شناسایی این اتصال می‌باشد. اتصال پروب فلورسنت به پپتید می‌تواند به عنوان یک ابزار مولکولی مناسب برای مطالعات آینده در دو حوزه *in vitro* و *in vivo* استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پپتید ضد رگ‌زایی، فلورسین ایزوتیوسیانات، سلول‌های اندوتلیال بندناف انسانی

*نویسنده مسئول: مصطفی شوریان، گیلان، دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی

Email: Shourian@guilan.ac.ir

مقدمه

واژه رگزایی^(۱) به معنی ایجاد عروق خونی جدید از عروق پیشین، از طریق جوانه زدن سلول‌های اندوتلیال موجود به وسیله هانتز مطرح شد^(۱). رگزایی در حالت‌های فیزیولوژیک مثل چرخه تولید مثل و بهبود زخم‌ها و همین‌طور حالت‌های پاتولوژیک مثل آرتریت روماتوئید، دیابت و هم‌چنین سرطان نقش دارد^(۲). فولکمان فرضیه‌ای ارایه داد که مبنی بر وابسته بودن رشد تومورها به رگزایی بود. پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که رشد و متاستاز تومورها و تهاجم سلول‌های توموری به اندام‌های دیگر، به ایجاد رگ‌های جدید و رفع نیازهای غذایی تومور بستگی دارد^(۳). در واقع این پژوهش‌ها فرآیند رگزایی منجر به توسعه تومورها به میزان ۱ الی ۲ میلی‌متر مکعب می‌شود که این واقعه در تومورهای بدخیم مشاهده می‌شود^(۴). هاپیوکسی و تغییرات انکوژنیک در سلول‌های توموری از طریق فاکتورهای آنژیوژنیک ممکن است در القا و گسترش رگزایی نقش داشته باشند^(۵). علاوه بر تحریک کننده‌های رگزایی، مهار کننده‌هایی نیز برای این فرآیند وجود دارند که در ۴ دسته جای می‌گیرند. این مهار کننده‌ها شامل؛ اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، مهار کننده‌های ماتریکس، متالوپروتئینازها (TIMP) و اجزای پروتئولیتیک که شامل ترکیبات ضد رگزایی حاصل از هضم پروتئین‌های بزرگتر مثل آنژیواستاتین و اندواستاتین می‌باشند^(۶). اندواستاتین یک قطعه ۲۰ کیلو دالتونی از انتهای کربوکسیل کلاژن XVIII است و

شامل ۱۸۴-۱۸۳ آمینو اسید می‌باشد^(۷ و ۸) که به وسیله میشل ریلی، بر اساس فرضیه فولکمان کشف شد^(۹). اندواستاتین مونومری انسانی و یک پروتئین کروی است. مکانیسم تولید پروتئولیتیک اندواستاتین از کلاژن XVIII در حال حاضر شناخته شده است. آنالیز ساختاری و دمین انتهای کربوکسیل نو ترکیب کلاژن XVIII (۲۸ KDa) نشان می‌دهد که اندواستاتین شامل سه قطعه است؛ دمین انتهای آمینی (۵ KDa)، منطقه لولایی که حاوی محل شناسایی پروتئاز و دمین انتهای کربوکسیل اندواستاتین (۲۲ KDa) (۱۰). فعالیت ضد توموری اندواستاتین به توالی ۲۷ آمینو اسیدی انتهای آمینی اندواستاتین وابسته است. پپتیدهای سنتزی شامل این توالی، دارای فعالیت ضد رگزایی هستند که برای کل مولکول در اندازه کامل ذاتی است^(۱۱). در طول پژوهش‌های چمنی و همکاران روی فعالیت ضد سرطانی اندواستاتین، نقش یون Zn و لوپ انتهای آمینی مشخص گردید. در این تحقیق یون Zn و لوپ انتهای آمینی در فعالیت ضد سرطانی اندواستاتین درگیر شدند^(۱۲).

فلوئورسین ایزوتیوسیانات^(۴) یکی از معروف‌ترین پروب‌های فلورسانس است که تا به حال شناخته شده است. ایزوتیوسیانات‌ها با نوکلئوفیل‌هایی از قبیل؛ آمین‌ها، سولفیدریل‌ها و یون فنولی حلقه جانبی تیروزین واکنش می‌دهند. تنها محصول پایدار

1-Angiogenesis
2-Angiostatin
3-Endostatin
4-Fluorescein isothiocyanat (FITC)

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، شکل ۱ ساختار شیمیایی فلوئورسین ایزوتیوسیانات و نحوه اتصال کوالان انتهای آمینوی پپتید با FITC و تشکیل پیوند تیاوره را نشان می‌دهد؛ FITC با آمین انتهای پپتید که یک نوکلئوفیل است واکنش می‌دهد و یک محصول پایدار ایجاد می‌کند. واکنش درگیر حمله نوکلئوفیلی بر روی کربن الکتروفیلی مرکزی گروه های ایزوسیانات است. بر اساس ساختار FITC و پپتید ۲۷ آمینواسیدی مشتق از انتهای آمینوی پروتئین اندواستاتین (شکل ۲) شرایط برای مطالعه طیف سنجی فراهم گردید. براین اساس طیف جذبی و نشری بر حسب نانومتر مربوط به FITC (cat number: F7250 sigma aldrich) و همچنین پپتید مورد نظر طیف جذبی در محدوده طول موج ۶۰۰-۲۰۰ نانومتر به دست آمد. بدین صورت که از نمونه‌های تهیه شده طبق جدول ۱ (غلظت‌های یکسان از پپتید و FITC و همچنین نمونه کانژوگه که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در حال استیر و واکنش دادند) علاوه بر طیف جذبی، طیف نشری نیز به دست آمد.

محلول پپتید در بافر سدیم کربنات ۰/۱ مولار با pH=۹ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس محلول FITC در DMSO بی آب در غلظت ۳

گروه‌های آمین اولیه است و همین‌طور FITC تقریباً گزینه خوبی برای تغییر آمین‌های انتهایی در پروتئین‌هاست. واکنش درگیر، حمله نوکلئوفیلی روی کربن الکتروفیلی مرکزی گروه‌های ایزوتیوسیانات است. نتیجه انتقال الکترون ساخته شدن پیوند تیاوره^(۱) بین FITC و پروتئین بدون هیچ گروه ترک‌کننده‌ای است. FITC پرتوهای نوری را با طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر را جذب می‌کند، اما در مورد پرتوهای با طول موج ۴۹۰ نانومتر بیشترین جذب را دارد و همین‌طور تابش فلورسانس آن، در محدوده ۴۷۵ تا ۷۰۰ نانومتر رخ می‌دهد و بیشینه آن در ۵۲۵ نانومتر است که همان طیف سبز می‌باشد (۱۳).

همچنین عملکرد پپتید بعد از اتصال به پروپ فلورسنت بررسی شد. در نهایت اتصال پپتید به گیرنده خود بر روی سلول‌های اندوتلیال بندناف انسانی (HUVEC)^(۲) با استفاده از ردیابی فلورسنس مطالعه و تأیید شد. با توجه به خواص فلوئورسین ایزوتیوسیانات و نقش اندواستاتین در مهار تکثیر سلول‌های HUVEC و همچنین مهار این سلول‌ها در پاسخ به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF، اتصال این قطعه ۲۷ اسید آمینه‌ای ES-SS به گیرنده خود در غشای پلاسمایی سلول‌های هدف (HUVEC)، اهمیت دارد، زیرا باعث مهار رشد این سلول‌ها، توقف رگ‌زایی و در نهایت توقف رشد تومور می‌شود. لذا هدف از این مطالعه در ابتدا نشاندار کردن پپتید ۲۷ آمینواسیدی مشتق از اندواستاتین به وسیله FITC بود.

1-Thiourea

2-Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. در یک آزمایشگاه تاریک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول FITC به هر میلی لیتر محلول پپتید اضافه شد. به تدریج حل گردید. برای مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد در حال استیرر کانژوگه شد.

جهت بررسی شرایط بهینه اتصال بین پپتید و پروب از طریق آزمایش های مختلف حاصل گردید. بدین منظور ۱۲ شرایط مختلف واکنشی انتخاب شد (جدول ۲). این نمونه ها از لحاظ غلظت پپتید، FITC، زمان و دمای انکوبه شدن متفاوت بودند، به این صورت که در این ۱۲ شرایط مختلف دماهای ۲۲ و ۴ درجه سانتی گراد، زمان واکنش ۸ و ۲۴ ساعت و همچنین غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر برای FITC و پپتید انتخاب شدند و همگی در حال استیرر (GFL-GRACO) واکنش دادند. در نهایت جذب آن ها در ۴۹۰ نانومتر ثبت گردید، اما برای بررسی جزئی تر شرایط اتصال، غلظت های بیشتری در دمای بهینه انتخابی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تا ۱۰ از FITC و غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از پپتید در نظر گرفته شد. تمامی حالت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و در حال استیرر قرار گرفتند. سپس جذب آن ها در ۴۹۰ نانومتر ثبت و نتایج به صورت نمودار به دست آمد.

نمونه ها قبل از تخلیص به وسیله ژل فیلتراسیون دارای سه جمعیت از مولکول ها بودند که شامل؛ پپتیدهای غیر متصل، FITC آزاد و پپتیدهای

کانژوگه شده به FITC. با توجه به این که شرایط انتخابی برای واکنش کانژوگاسیون، از نظر زمان، دما و غلظت به نحوی بود تا حداکثر اتصال بین پپتید و FITC اتفاق بیفتد و این که به هر پپتید تنها یک فلوروفور متصل می شود، به دلیل این که پپتیدها به عنوان غلظت محدود کننده در واکنش انتخاب شده اند پس از پپتیدهای غیر متصل صرف نظر شد. حال لازم بود تا FITC های آزاد از محلول واکنش حذف شوند. با توجه به این که جرم مولی FITC ۳۹۸ دالتون است سفادکس G_{10} (cat number: G10120 sigma aldrich) برای جداسازی FITC های آزاد به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون انتخاب شد. فاز متحرک بافر PBS با غلظت ۲۰ میلی مولار بود که با سرعت تقریبی ۸۰۰-۵۰۰ میکرولیتر در دقیقه از ستون عبور کرد. در هر دقیقه حدودا ۵۰۰ میکرولیتر از ستون جمع آوری شد. تعداد ۵۰ فرکشن جمع آوری شد تا جذب بافر متحرک تقریباً به صفر رسید. برای به دست آوردن غلظت نمونه های حاصل از ژل فیلتراسیون از قانون بیر لامبرت استفاده شد. از آنجایی که به هر پپتید تنها یک مولکول FITC متصل شده است، پس مقدار مول محاسبه شده برای FITC برابر با مقدار مول پپتید در نمونه های خروجی از ژل فیلتراسیون می باشد. از این طریق غلظت پپتید هم محاسبه گردید (جدول ۳).

بدین منظور از طیف سنجی مادون قرمز Bruker) Alpha (استفاده شد. از نمونه های انتخابی حاصل از ژل فیلتراسیون و همین طور پپتید و خالص طیف FTIR تهیه و در بازه ۵۰۰ تا 4000 cm^{-1}

فرکانس نور عبوری به شکل نمودار ثبت گردید. غلظت تهیه شده برای FITC برابر با $10^{-5} \times 169$ و برای پپتید $10^{-5} \times 1364$ بود.

سلول‌های HUVEC تهیه شده از مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه در محیط کشت DMEM F12 کشت داده شد و پس از رنگ‌آمیزی شمارش گردید. در یک پلیت ۶ خانه ۶ لامل استریل قرار گرفت و به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (برابر است با تعداد $10^2 \times 1148$ سلول) اضافه شد. پس از ۲ ساعت باقی ماندن در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فشار ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت، سلول‌ها بر روی لامل‌های طی مراحل شستشو و تثبیت شدند. بعد از گذشت مدت زمان ۲ ساعت نمونه‌ها از پلیت خالی شد و لامل‌ها به پلیت‌های دیگری منتقل شدند. به منظور استفاده از آنها برای مطالعات میکروسکوپی سلول‌ها شستشو و بر روی لامل تثبیت گردید. برای شستشو و تثبیت سلول‌ها ابتدا ۳ محلول تهیه و اتوکلاو شد (محلول شستشو شامل بافر PBS و ۰/۰۵ tween درصد، محلول برای افزایش نفوذپذیری شامل بافر PBS حاوی تریتون X-100 و بافر بلاکینگ تهیه شده از سرم آلبومین گاوی ۱۰ درصد نرمال، گلیسین ۰/۱ درصد ۰/۳ مولار، بافر PBS، توئین ۰/۱ درصد. سپس مراحل شستشو و تثبیت (با استفاده از پارافرمالدئید ۰/۱ درصد) صورت گرفت. در مرحله آخر سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌ها در مرحله آخر مورد مطالعه با میکروسکوپ

فلوئورسانس (OLYMPUS IX71) قرار گرفت. به این صورت که یک بار با فیلتر سبز میکروسکوپ و بار دیگر با فیلتر آبی از سلول‌ها عکس‌برداری شد. سپس عکس‌های مربوط به نمونه‌های کانژوگه به وسیله نرم‌افزار ImageJ و Merge داده شد.

یافته‌ها

FITC با آمین انتهایی پروتئین که یک نوکلئوفیل است واکنش داد و یک محصول پایدار ایجاد کرد. واکنش درگیر حمله نوکلئوفیلی بر روی کربن الکتروفیلی مرکزی گروه‌های ایزوسیانات است. طیف جذبی مربوط پپتید خالص، نشان داد که پپتید در طول موج ۲۰۸ نانومتر دارای حداکثر جذب است که مربوط به پیوندهای پپتیدی است. در حالی که در این آزمون مقادیر مشابهی از پپتید و FITC استفاده کردیم، مشخص شد که جذب FITC در طول موج ۴۹۰ نانومتر به صورت خالص ۱/۴۶۲ بوده است (شکل ۳ الف و ب). خواص فلورسانس FITC ضرورتاً با اتصال به پروتئین‌ها تغییر نخواهد کرد. طیف اسپکتروم (شکل ۳ ج) نشان داد که نمونه کانژوگه هم‌چنان در ۴۹۰ نانومتر دارای حداکثر جذب بود. هیچ‌گونه جایی در بیشینه جذب برای نمودار مشاهده نشد. این مقدار در حالت کانژوگه به ۰/۶۵۲ کاهش یافت. این کاهش قابل ملاحظه به اندازه ۰/۸۱، بیانگر این است که بخش قابل ملاحظه‌ای از مولکول‌های FITC وارد اتصال با پپتید شده‌اند.

طیف نشری پپتید و FITC حداکثر نشر FITC را در طول موج ۵۱۲ نانومتر نشان داد (شکل ۴ الف و ب). همین‌طور میزان نشر FITC به صورت کانژوگه شده به پپتید تقریباً در همین ناحیه و در طول موج ۵۱۵ نانومتر است (شکل ۴ ج). خصوصیات طیفی برای FITC در حالت کانژوگه و آزاد در این مطالعه ثابت است.

بررسی نتایج متغیرهای دما، زمان و غلظت نشان داد که حالت واکنشی ششم (نسبت FITC به پپتید ۲ به ۱، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت) شرایط بهتری برای اتصال از خود نشان داد، زیرا دارای کمترین جذب برای FITC و به تبع آن بیشترین نسبت اتصال است (شکل ۵).

با توجه به شکل ۶ بین ۱۰ غلظت انتخابی برای FITC، حالت واکنشی سوم که شامل پپتید با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و FITC با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، کمترین مقدار جذب در ۴۹۰ نانومتر را دارا بود و به تبع آن کمترین FITC آزاد را دارد، در نتیجه بهترین شرایط برای اتصال را نشان داد.

همان‌طور که انتظار می‌رود، پپتیدهای کانژوگه شده به FITC به دلیل داشتن اندازه بزرگتر در مراحل اولیه از ستون خارج شدند. در اینجا نمونه جدا شده ۱۰ که در طول موج ۴۹۰ نانومتر دارای مقدار جذب ۰/۲۲۱ و بیشترین مقدار جذب می‌باشد دارای بیشترین غلظت پپتید کانژوگه شده به FITC است. به همین ترتیب نمونه‌هایی که در مراحل بعدی از ستون

خارج می‌شوند دارای غلظت پپتید کانژوگه کمتری هستند که این موضوع با توجه به کاهش جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر قابل مشاهده است. همین نمونه جدا شده به عنوان نمونه کانژوگه با درصد خلوص بالا انتخاب شد و مطالعات بعدی با این نمونه انجام گرفت (شکل ۷).

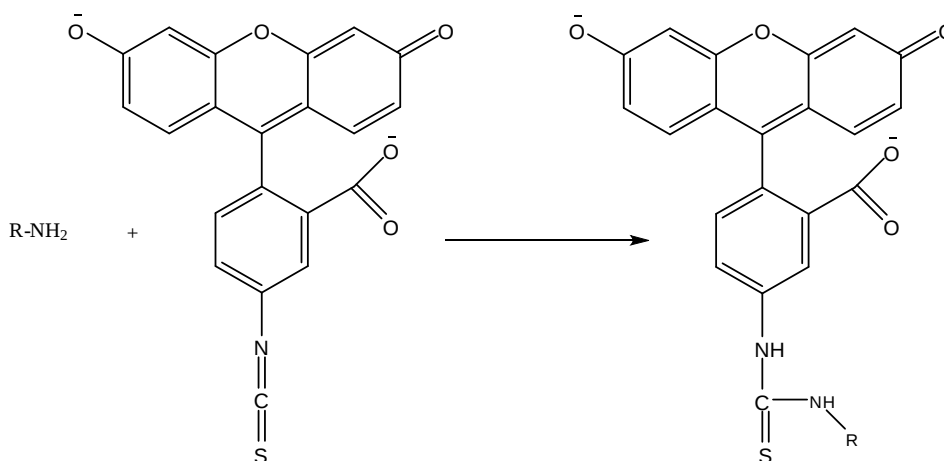
برای انجام پژوهش‌های بعدی پس از محاسبه ضریب خاموشی مربوط به FITC در حالت کانژوگه از طریق قانون بیر لامبرت غلظت FITC محاسبه شد. با توجه به این که هر پپتید تنها به یک فلوفور متصل می‌شود از طریق غلظت FITC، غلظت پپتید هم در این نمونه جدا شده محاسبه گردید. بدین صورت که جذب FITC در حالت آزاد و کانژوگه به ترتیب ۱/۶۲۱ و ۰/۶۵۲ در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ضریب خاموشی به ترتیب ۲۹۲/۴ و ۱۳۰/۴ حاصل شده است. در ادامه با به دست آمدن ضریب خاموشی FITC، در این فرآیند غلظت آن با استفاده از قانون بیر لامبرت محاسبه گردید. در این فرآیند حال غلظت نمونه خارج شده کانژوگه با جذب ۰/۲۲۱ برابر $10^{-5} \times 169$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌شود. با توجه به این که غلظت پپتید در نمونه حاصل از ژل فیتراسیون برابر با مقدار FITC است پس می‌توان مقدار FITC و پپتید در حجم ۵۰۰ میکرولیتر نمونه را محاسبه کرد که برابر $10^{-4} \times 2/185$ مول است.

برای تأیید برقراری اتصال بین پپتید و FITC از اسپکتروسکوپی FTIR استفاده شد. نتایج حاضر نشان داد که بر اساس اسپکتروم FTIR (شکل ۸ الف)

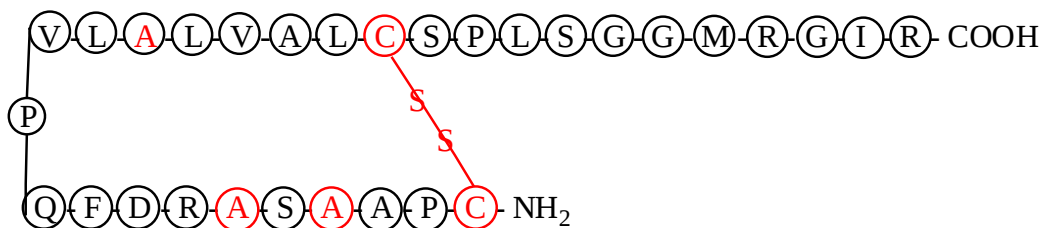
و با فیلتر آبی تشخیص داده می‌شود. در اینجا نیز سلول‌ها یک بار با فیلتر آبی به خاطر تشخیص رنگ DAPI و بار دیگر با فیلتر سبز به خاطر شناسایی فلوئورسین عکس‌برداری شدند (رنگ‌آمیزی سطح سلول). رنگ‌آمیزی با DAPI نشان می‌دهد که چه تعداد سلول در یک سطح مقطع خاص موجود است (شکل ۹) و عکس‌برداری با فیلتر سبز مشخص می‌کند که چه تعداد از آنها به پپتید کانژوگه شده با FITC متصل شده‌اند. طول موج نشری FITC در ۵۲۵ نانومتر و در ناحیه نور سبز می‌باشد. در آخر عکس‌ها برای مشاهده و تشخیص نحوه اتصال سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image merge، داده‌ها نشان می‌دهد پپتید کانژوگه شده با FITC به گیرنده خود در سطح سلول‌های HUVEC که موقعیت آن‌ها با رنگ‌آمیزی هسته به وسیله DAPI مشخص شد، متصل شده است (شکل ۱۰).

مربوط به FITC خالص، یک پیک مشخص در محدوده فرکانس ۲۱۵۰-۲۱۰۰ وجود دارد و متعلق به ساختار $N=C=S$ در ساختمان FITC است. این پیک در طیف مربوط به پپتید موجود نیست (شکل ۸ ب). هنگام برقراری پیوند کووالان بین پپتید و FITC ساختار مذکور وارد پیوند کووالان با انتهای آمینوی پپتید شده و منجر به تشکیل تیواوره شده است. بنابراین فقدان این پیک در طیف اسپکتروم تأییدی بر اتصال پپتید و FITC می‌باشد. نبود پیک ۲۱۵۰-۲۱۰۰ در نمونه کانژوگه (شکل ۸ ج) که مربوط به $N=C=S$ است نشان دهنده تخریب این گروه و شرکت در پیوند کووالان است و همین‌طور دلیل بر تخلیص نمونه از FITC‌های غیر متصل در نمونه حاصل از ژل فیلتراسیون می‌باشد.

سلول‌ها در آخرین مرحله از تثبیت، با رنگ DAPI، رنگ‌آمیزی شدند. برای مطالعات با میکروسکوپ فلورسانس، DAPI با نور فرابنفش تهییج



شکل ۱: ساختار شیمیایی فلوئورسین ایزوتیوسیانات و نحوه اتصال کووالان انتهای آمینوی پپتید با FITC و تشکیل پیوند تیواوره



شکل ۲: ترتیب باقی مانده های پپتید ۲۷ آمینواسیدی مشتق از انتهای آمینوی پروتئین اندو استاتین (ES-SS).

جدول ۱: حجم و غلظت های انتخابی برای آماده سازی نمونه جهت طیف سنجی جذبی و نشری، غلظت های ۱ میلی گرم بر میلی لیتر برای هر پپتید و پروب در نظر گرفته شد در نهایت حجم همه نمونه ها به ۴۰۰ میکرو لیتر رسانده شد

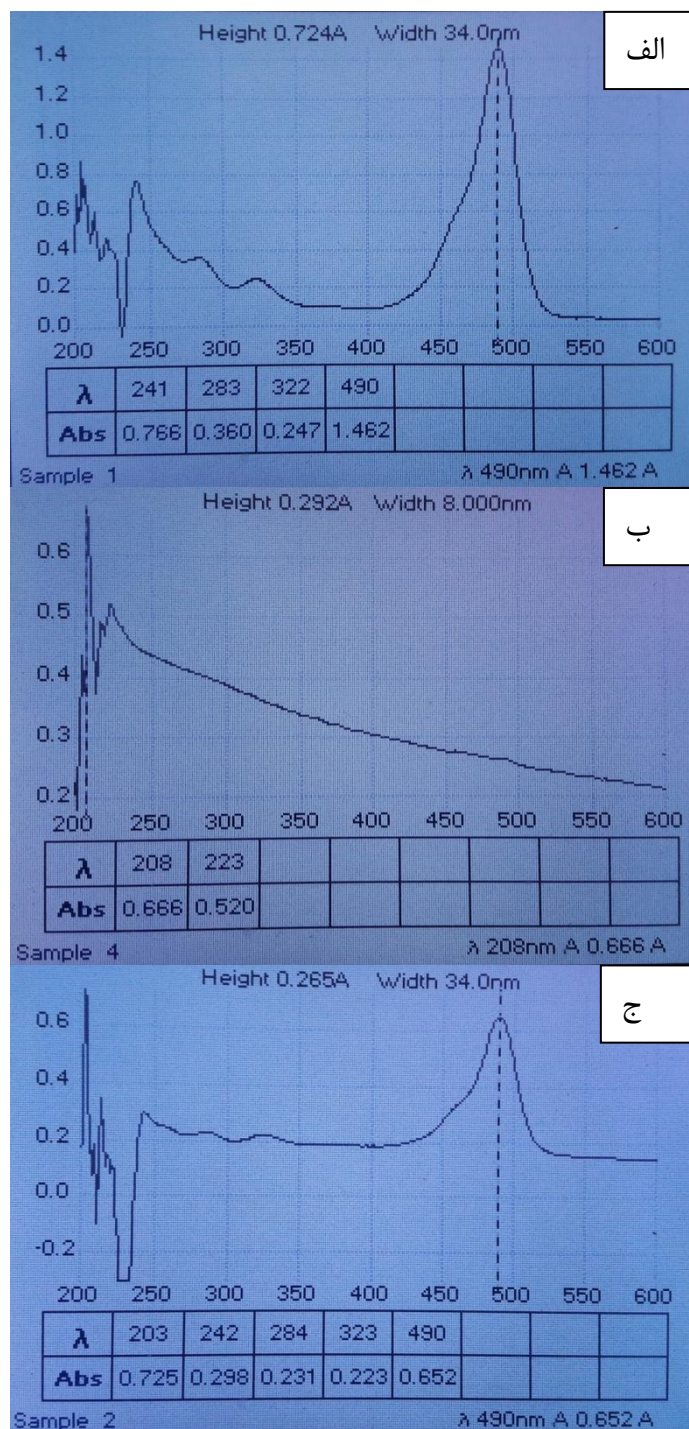
نمونه ها	حجم نهایی (میکرومول)	FITC میلی گرم بر میلی لیتر	پپتید میلی گرم بر میلی لیتر
۱	۴۰۰	۲۰	۲۰۰
۲	۴۰۰	۲۰	
۳	۴۰۰		۲۰۰

جدول ۲: شرایط انکوباسیون پپتید با FITC جهت اتصال از نظر دما و زمان، ۱۲ شرایط واکنشی متفاوت از نظر دما (۲۲ و ۴ درجه سانتی گراد)، زمان (۸ و ۲۴ ساعت) و غلظت (۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

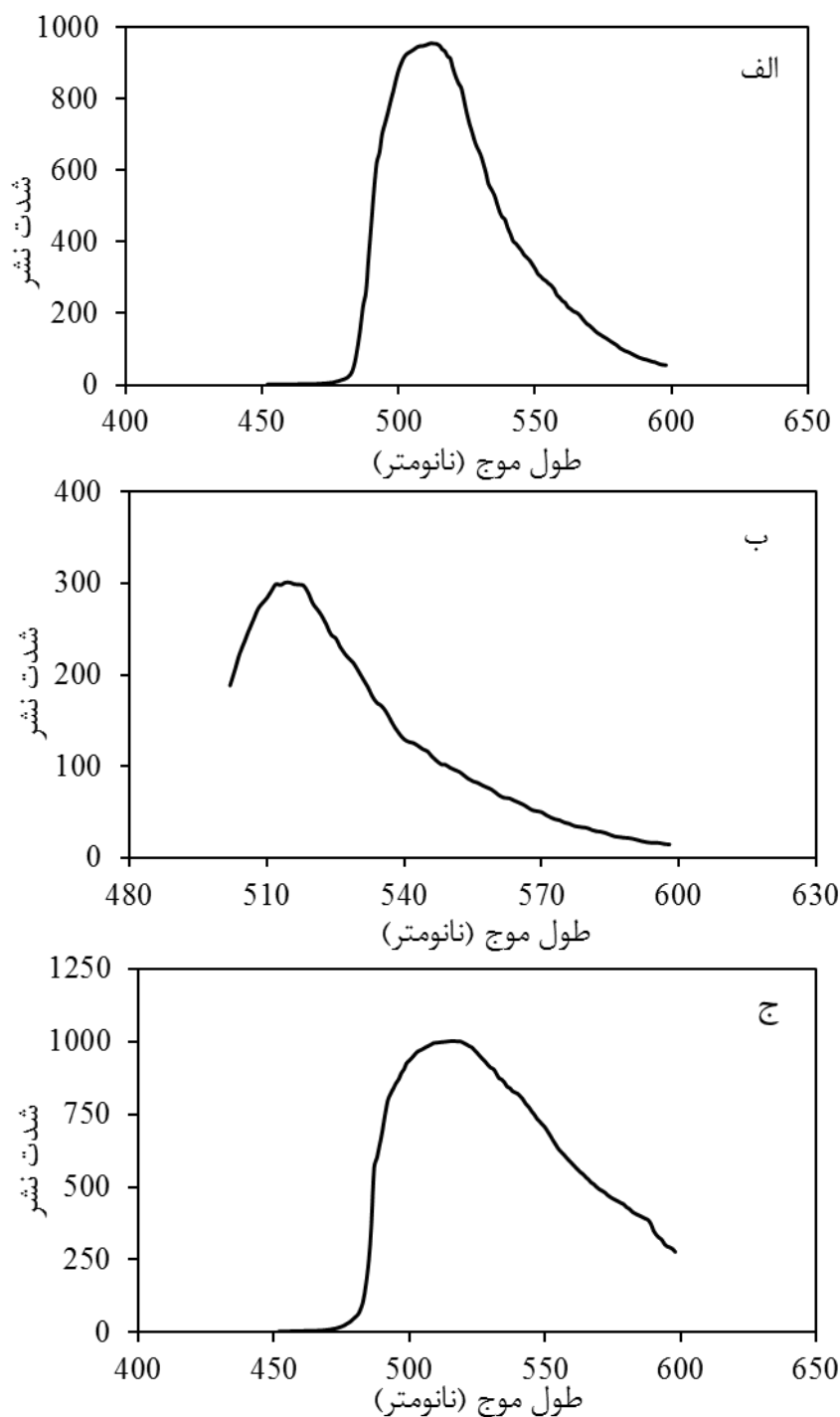
واکنش	FITC (میلی گرم بر میلی لیتر)	پپتید (میلی گرم بر میلی لیتر)	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ساعت)
۱	۲	۲	۲۲	۸
۲	۱	۲	۲۲	۲۴
۳	۱	۲	۴	۸
۴	۱	۲	۴	۲۴
۵	۲	۱	۲۲	۸
۵	۲	۱	۲۲	۲۴
۷	۲	۱	۴	۸
۸	۲	۱	۴	۲۴
۹	۱	۱	۴	۸
۱۰	۱	۱	۴	۲۴
۱۱	۱	۱	۲۲	۸
۱۲	۱	۱	۲۲	۲۴

جدول ۳: غلظت FITC و پپتید در نمونه جدا شده انتخابی از ژل فیلتراسیون، این غلظت ها برای نمونه انتخابی که دارای حداکثر جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر بود از طریق قانون بیر لامبرت محاسبه و ثبت گردید

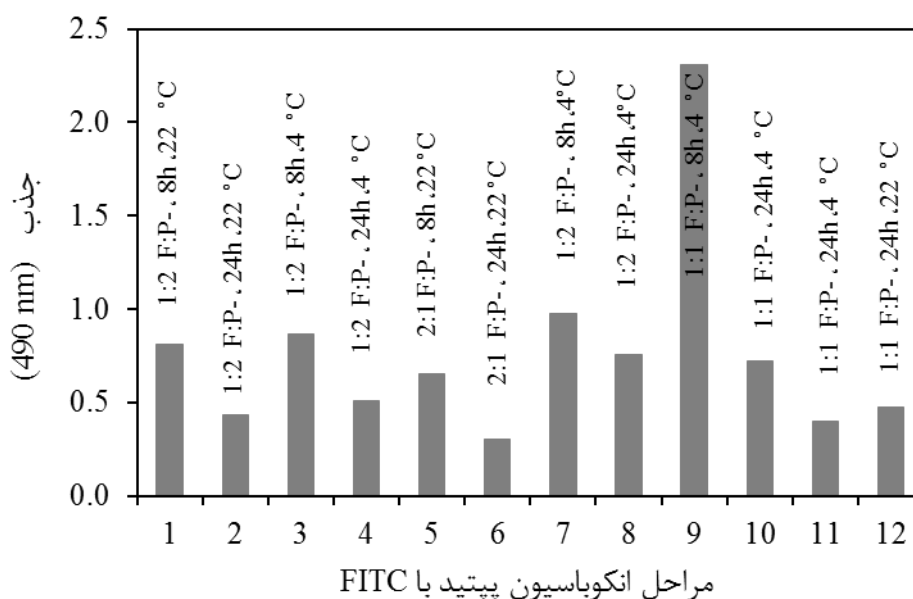
-	FITC (میلی گرم بر میلی لیتر)	پپتید (میلی گرم بر میلی لیتر)	A ₄₉₀ (نانومتر)
نمونه حاصل از ژل فیلتراسیون	۱۶۹×۱۰ ^{-۵}	۱۳۶۳/۸۷×۱۰ ^{-۵}	۰/۲۲



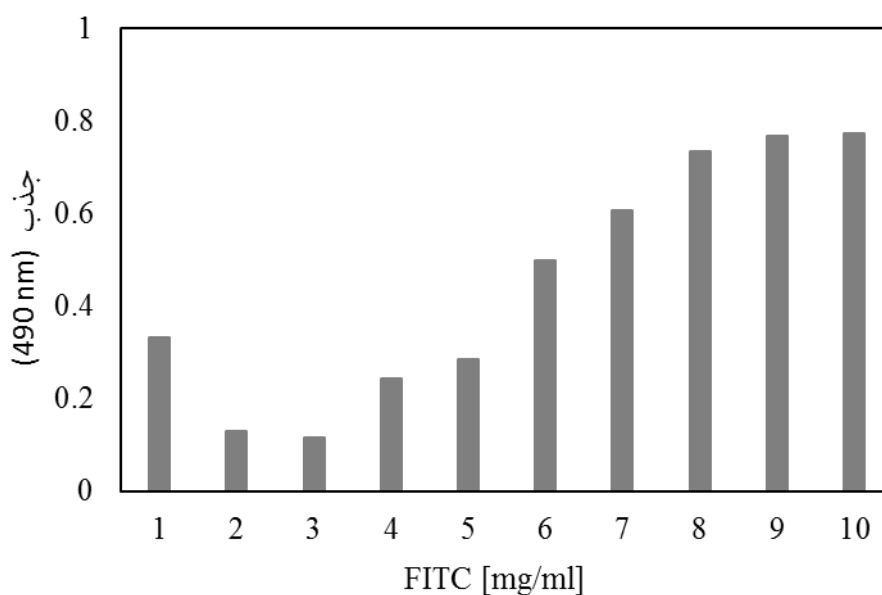
شکل ۳: الف) طیف جذبی مربوط به FITC خالص، ب) طیف جذبی مربوط به پپتید خالص و ج) طیف جذبی مربوط به نمونه کانژوگه، با غلظت یکسان از پپتید و FITC در محلول بافر PBS. پس از آماده سازی نمونه‌ها طبق جدول ۱ طیف جذبی در ناحیه ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر از هر کدام تهیه شد تا طول موج دارای بیشینه جذب برای هر سه حالت تعیین گردد.



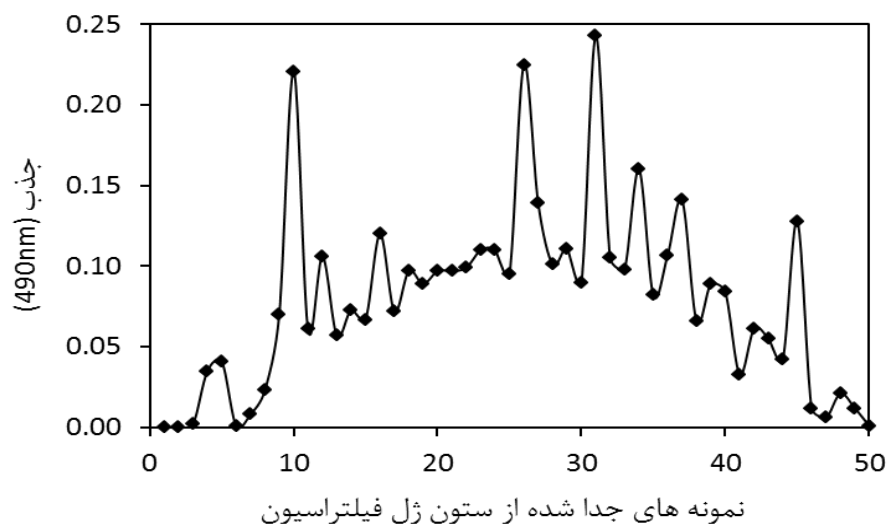
شکل ۴: طیف های نشری؛ الف) طیف نشری مربوط به FITC خالص، ب) طیف نشری مربوط به پپتید خالص، ج) طیف نشری مربوط به نمونه کانژوگه در محلول بافر PBS. از نمونه های تهیه شده طبق جدول ۱ طیف نشری نیز به دست آمد. به این منظور که طول موج حداکثر نشر نیز علاوه بر جذب، برای هر یک مشخص شود.



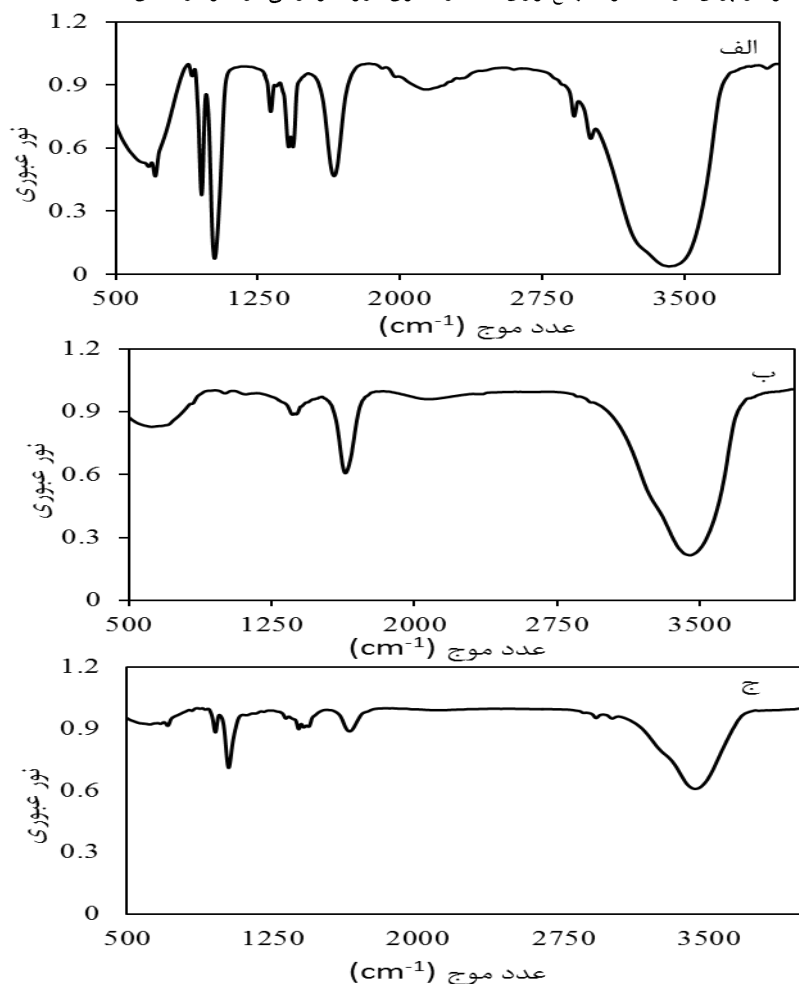
شکل ۵: نمودار بهینه سازی دما و زمان؛ جذب هر یک از ۱۲ محلول حاصل از واکنش در ۱۲ شرایط مربوط به جدول ۲ در طول موج ۴۹۰ نانومتر در نموداری ثبت گردید.



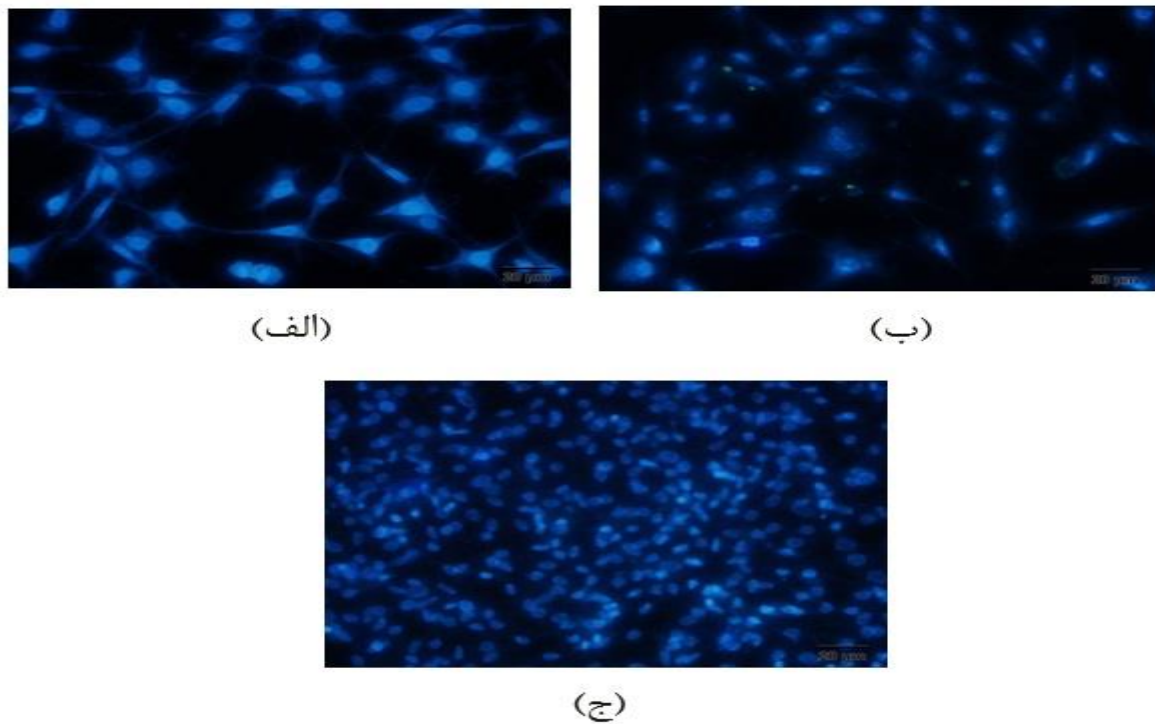
شکل ۶: نمودار بهینه سازی غلظت بین پپتید و FITC جهت اتصال کوالان که برای بررسی جزئی تر غلظت پس از تأیید دما و زمان بهینه صورت گرفت. غلظت پپتید برای تمامی حالت ها یکسان و به مقدار ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت FITC بین ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و همگی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت در حالت استیرر واکنش داده‌اند.



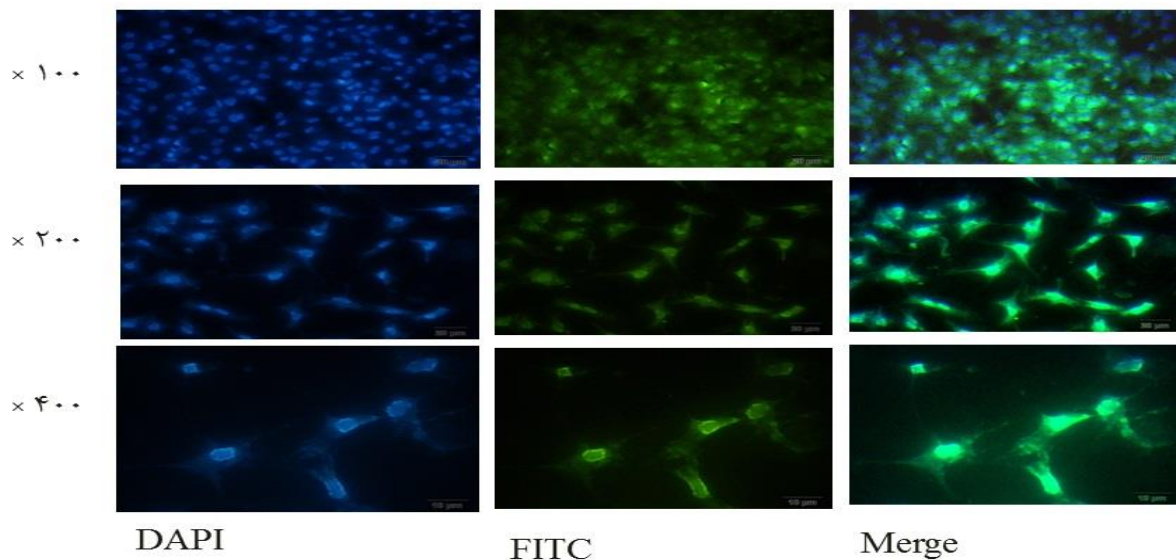
شکل ۷: نمودار جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر علیه محلول پپتید متصل به FITC حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون. جذب در ناحیه ۴۹۰ نانومتر برای هر ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی در نمودار نشان داده شده است.



شکل ۸: نمودارهای مربوط به طیف سنجی مادون قرمز: الف) FITC خالص، ب) پپتید خالص، ج) نمونه کانژوگه. از نمونه انتخابی حاصل از ژل فیلتراسیون و همینطور پپتید و FITC خالص طیف FTIR تهیه و در بازه فرکانس ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ فرکانس نور عبوری به شکل نمودار ثبت گردید. غلظت تهیه شده برای FITC برابر با 1.69×10^{-5} و برای پپتید 1.364×10^{-5} بود.



شکل ۹: نمونه‌های سلولی در زیر میکروسکوپ فلورسینس (فیلتر آبی) که به دلیل رنگ‌آمیزی هسته جایگاه سلول‌ها را مشخص می‌کند؛ (الف) تیمار با نمونه FITC خالص، (ب) تیمار با نمونه پپتید خالص، (ج) تیمار با محیط کشت. DAPI زمانی که به دو رشته DNA متصل است دارای حداکثر نشر در طول موج ۴۶۱ نانومتر می‌باشد که در محدوده نور آبی است. بنابراین برای مطالعات با میکروسکوپ فلورسانس، DAPI با فیلتر آبی تشخیص داده می‌شود.



شکل ۱۰: نمونه‌ها سلولی پس از تیمار با نمونه کانژوگ پپتید-FITC در زیر میکروسکوپ فلورسینس با سه بزرگنمایی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰. رنگ‌آمیزی با DAPI نشان می‌دهد که چه تعداد سلول در یک سطح مقطع خاص موجود است و عکس برداری با فیلتر سبز مشخص می‌کند که چه تعداد از آنها به پپتید کانژوگ شده با FITC متصل شده‌اند. سپس عکس‌های مربوط به نمونه‌های کانژوگ به وسیله نرم افزار z. imag Merge گردید، این داده‌ها نشان می‌دهد پپتید کانژوگ شده با FITC به گیرنده خود در سطح سلول‌های HUVEC که موقعیت آن‌ها با رنگ‌آمیزی هسته به وسیله DAPI مشخص شد، متصل گردیده است.

بحث

فعالیت ضد توموری اندو استاتین به توالی ۲۷ آمینو اسیدی انتهای آمینی اندو استاتین وابسته است. پپتیدهای سنتزی شامل این توالی، دارای فعالیت ضد رگ زایی هستند که برای کل مولکول در اندازه کامل ذاتی است (۱۱). در طول پژوهش‌های چمنی و همکاران روی فعالیت ضد سرطانی اندو استاتین، نقش یون Zn و لوپ انتهای آمینی مشخص گردید (۱۲)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و تشخیص اتصال این پپتید ضد رگ زایی به سلول‌های HUVEC با استفاده از FITC بود. با توجه به افزایش مقاومت سرطان نسبت به درمان‌های رایج، تلاش محققان برای کشف و شناسایی عوامل جدید ضد سرطان جهت بالا بردن میزان حساسیت سلول‌های سرطانی رو به افزایش است. مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش سطح پاسخ این سلول‌ها نسبت به دارو و در نتیجه شکست اقدامات درمانی می‌شود. بنابراین تحقیق و توسعه داروهای مؤثرتر و یا با اثرات جانبی کمتر، از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۴). مهار رگ زایی ممکن است یک روش با ارزش جدید برای درمان سرطان باشد. همچنین درمان با عوامل ضد رگ زایی می‌تواند زمینه امیدبخشی را در این خصوص فراهم کند. رگ زایی فرآیند پیچیده‌ای است که بر پایه همکاری بین سلول‌های متنوع نظیر پری سیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف استوار است. در شرایط فیزیولوژیک رگ زایی

فرآیندی بسیار تنظیم شده می‌باشد و در حالات پاتولوژیک نظیر سرطان مکانیسم‌های رگ زایی نرمال برای ایجاد و پیشبرد بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). تومور بدون رگ به دلیل عدم وجود جریان خون، در رشد بالقوه محدود می‌شود (۱۶). مطالعات در مورد مهارکننده‌های رگ زایی نشان داد که می‌توان با مهار رگ زایی رشد تومور را مهار کرد (۱۷). این روش سمیت کمتری دارد و بسیاری از عوارض جانبی که در اثر شیمی‌درمانی به وجود می‌آیند در این روش مشاهده نمی‌شود. دو استراتژی مورد استفاده در توسعه عوامل رگ زایی شامل مهار عوامل پیش‌رگزا (نظیر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) و درمان با مهارکننده‌های درون زاد رگ زایی (مانند endostatin و angiostatin) است که اصطلاحاً از جهت دادن رگ زایی به سمت رشد عروق خونی تومور جلوگیری می‌کنند (۱۸). اندو استاتین یک پروتئین ضد رگ زای قدرتمند و دارای ۱۸۳ آمینو اسید بوده که از دامین انتهای کربوکسیل کلاژن XVIII مشتق شده است. از سوی دیگر پژوهش‌های گذشته نشان داده است که می‌توان به جای پروتئین اندو استاتین از قطعه ۲۷ آمینو اسیدی جزء انتهای آمینوی آن که خاصیت ضد توموری، ضد رگ زایی و ضد نفوذپذیری دارد، استفاده کرد (۱۹). فعالیت زیستی اندو استاتین از طریق اتصال آن به گیرنده‌های سطح سلول‌های اندوتلیال و آغاز آبخار پیام رسانی درون سلولی انجام می‌شود. تعدادی پروتئین مانند اینتگرین $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ (۲۰)،

تروپومیوزین (۲۱)، گلیپیکان (۲۲)، لامینین (۲۳)، ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (۲۴) و گیرنده VEGF به عنوان گیرنده‌های اندواستاتین شناسایی شده‌اند که اعمال ضد اندوتلیالی را میانجی‌گری می‌کنند. اندواستاتین به هپارین و با تمایل کمتری به هپاران سولفات پروتئوگلیکان‌های سطح سلول که در پیام رسانی فاکتور رشد درگیرند، متصل می‌شود (۲۵). به نظر می‌رسد که فعالیت ضدگرزایی اندواستاتین به میانکنش با پروتئوگلیکان هپاران سولفات بستگی دارد (۲۶). در پژوهش‌های قبلی که در دانشگاه گیلان انجام شد، در مورد اتصال پپتید به گیرنده سلول‌های اندوتلیال قبل از این مطالعه‌ای انجام نشده است و در مورد نحوه اتصال هیچ اطلاعاتی موجود نیست. بنابراین برای این که دید عمیق‌تری نسبت به این پپتید و مکانیسم عمل آن داشته باشیم، به روشی نیاز است که ما را در راستای شناسایی میانکنش پپتید با گیرنده کمک کند. از جمله روش‌هایی که در مقدمه هم به آن اشاره شد، استفاده از پروب‌های فلورسنت است. یکی از این پروب‌ها، فلئورسین ایزوتیوسیانات است که دارای حداکثر جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر (نور آبی) و حداکثر نشر در طول موج ۵۲۵ نانومتر (نور سبز) می‌باشد. همان‌طور که در طول موج جذبی، جا به جایی در بیشینه جذب برای نمودار FITC در حالت آزاد و کانژوگه مشاهده نشد، در مورد داده‌های نشری نیز همین امر صدق می‌کند که احتمال این تفسیر می‌باشد که اتصال کوالان در تشکیل تیواوره دور از حلقه‌های آروماتیک تشکیل گردیده و منجر

شده که اثراتی بر جا به جایی بیشینه طول موج جذبی و نشری نداشته باشد. در واقع خصوصیات طیفی برای FITC در حالت کانژوگه و آزاد در این مطالعه ثابت است. ژنگ و همکاران (۱) FITC کانژوگه شده به پپتیدهای RGD (Arg-Gly-Asp) به عنوان پروب فلورسنت برای سنجش آزمایشگاهی بیان اینتگرین $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ در بافت‌های توموری مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده در این مطالعه به وضوح نشان داد که FITC کانژوگه شده با پپتیدهای RGD برای سنجش سطوح بیانی نسبی اینتگرین $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ در بافت‌های توموری مفید است. در مطالعه‌ای FITC به گاما گلوبولین کانژوگه شده است (۲۷). در ازای هر میلی‌گرم پروتئین از ۱۰ میلی‌گرم FITC استفاده شده است. محلول در بافر بی‌کربنات با pH برابر با ۹ تهیه شد. برای جداسازی FITC آزاد هم از ژل فیلتراسیون با سفادکس G_{25} استفاده گردیده است. در مطالعه دیگری هافمن و همکاران به دنبال واکنش پروب با پروتئین به وسیله تغییر دادن نسبت فیروونکتین پلاسمای انسانی FITC/ در سیستم FITC- فیروونکتین را بررسی کردند (۲۸). هدف این مطالعه به دست آوردن اطلاعاتی درباره دینامیک فیروونکتین و سلول‌ها بود. داده‌های اسپکتروسکوپی نشان داد که کانژوگه شدن پروتئین با FITC فرایند unfolding را در ساختار فیروونکتین القا نمی‌کند. هانگرفورد و همکاران اثر نسبت‌های نشان‌دار کردن مختلف را بر روی فتوفیزیک FITC کانژوگه شده با سرم آلبومین گاوی در بین تکنیک‌های اسپکتروسکوپی مختلف را با استفاده

نشان دادیم که این کمپلکس قابل جداسازی نیز می‌باشد. از طرفی نتایج تحقیقات حاکی از این است که پپتید مشتق از اندوستاتین به نحو مؤثری به رسپتور خود بر روی سلول‌های HUVEC متصل شده است. روش‌های عکس‌برداری میکروسکوپی به این منظور راهکار مناسبی برای شناسایی این اتصال می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد با کد پایان نامه ۱۰۲۸۸ در دانشگاه گیلان می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. لذا از اساتید محترم و کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه گیلان برای فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این مطالعات تشکر می‌گردد.

از روش‌های حالت پایدار و زمان انحلال فلورسانس در نمونه‌ها مطالعه کرده‌اند. نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌تواند برای مطالعه کانفورماسیون پروتئین‌ها به کار رود و به وسیله دنا توره شدن آلبومین سرم گاوی با استفاده از اوره تأیید گردد. در مطالعه دیگری مولکول‌های ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) به FITC کانژوگه شد. محلول APTES در اتانول با نسبت ۵ به ۲۵ و FITC هم در اتانول با نسبت ۵ درصد به ۱۵ تهیه شد. واکنش برای مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق انجام گرفت. در این مطالعه برای پی بردن به ایجاد اتصال بین FITC و APTES از اسپکتروسکوپی FTIR استفاده گردید (۳۰).

استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه با FITC برای مطالعه گیرنده‌های خاص، تیمار سلول‌ها با دوزهای متفاوتی از ترکیبات پپتید-FITC، کاربرد ترکیبات پپتید-FITC برای مطالعات *in vivo* و همچنین استفاده از نشانگرهای فلورسنت غیر از FITC، مانند Alexa 4 در مطالعات سلول و یا ترکیب FITC با سایر پپتیدها شایسته توجه بیشتر در پژوهش‌های آتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اتصال FITC، به عنوان یک نشانگر فلورسانس به پپتید در یک شرایط بهینه انجام شد. این نشانگر برای مطالعه واکنش بین پپتید و رسپتور مناسب است و با تمایل بالا به انتهای آمینی پپتید مشتق از اندوستاتین متصل می‌شود، به علاوه

REFERENCES

1. Breier G. Angiogenesis in embryonic development—a review. *Placenta* 2000; 21: S11-S5.
2. Fox, Stephen B, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *The lancet Oncology* 2001; 2(5): 278-89.
3. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1992; 84(24): 1875-87.
4. O'Reilly, Michael S. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2): 277-85.
5. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgraduate Medical Journal* 2005; 81(954): 236-42.
6. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 2005; 111(12): 1556-66.
7. Mansouri K, Seifi P, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh HR. Study of the mechanisms and causes related to angiogenesis. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2012; 17(2): 96-107.
8. Oh SP, Kamagata Y, Muragaki Y, Timmons S, Ooshima A, Olsen BR. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91(10): 4229-33.
9. Rehn M, Pihlajaniemi T. Alpha 1 (XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91(10): 4234-8.
10. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, et al. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994; 59: 471-82.
11. Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VS, Folkman J, Javaherian K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity. *Cancer Research* 2005; 65(9): 3656-63.
12. Chamani R, Asghari SM, Alizadeh AM, Eskandari S, Mansouri K, Khodarahmi R, et al. Engineering of a disulfide loop instead of a Zn binding loop restores the anti-proliferative, anti-angiogenic and anti-tumor activities of the N-terminal fragment of endostatin: Mechanistic and therapeutic insights. *Vascular Pharmacology* 2015; 72: 73-82.
13. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques* Cambridge. Massachusetts: Academic Press; 2002; 395-9.
14. Mostafaie A, Motlagh HR, Mansouri K. Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis. *Yakhteh Medical Journal* 2010; 11(4): 374-81.
15. Thébaud B. Angiogenesis in lung development, injury and repair: implications for chronic lung disease of prematurity. *Neonatology* 2007; 91(4): 291-7.
16. Khan MK, Miller MW, Taylor J, Gill NK, Dick RD, Van Goled K, et al. Radiotherapy and antiangiogenic TM in lung cancer. *Neoplasia* 2002; 4(2): 164-70.
17. Amanpour S, Muhammadnejd S, Muhammadnejad A, Mazaheri Z, Kazem-Haghighi M, Oghabian M, et al. Studying angiogenesis in autochthonous xenograft models of glioblastoma multiforme by MVD-CD34 technique in Iranian patients. *Tehran University Medical Journal* 2011; 69(3): 141-5.
18. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; 15(3): 232-9.
19. Monteiro Torres PH, Limaverde Soares Costa Sousa G, Pascutti PG. Structural analysis of the N-terminal fragment of the antiangiogenic protein endostatin: A molecular dynamics study. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2011; 79(9): 2684-92.
20. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007; 38(3): 258-68.
21. MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, Plum SM, Wingard JN, Fuhrmann SR, et al. Endostatin binds tropomyosin A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(27): 25190-6.
22. Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Molecular Cell* 2001; 7(4): 811-22.

23. Javaherian K, Park SY, Pickl WF, LaMontagne KR, Sjin RT, Gillies S, et al. Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(47): 45211-8.
24. Lee SJ, Jang JW, Kim YM, Lee HI, Jeon JY, Kwon YG, et al. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS letters* 2002; 519(1-3): 147-52.
25. Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U, et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *The EMBO Journal* 1999; 18(22): 6240-8.
26. Johan K, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *The EMBO Journal* 2002; 21(23): 6303-11.
27. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007; 39(2): 212-20.
28. Hoffmann C, Leroy-Dudal J, Patel S, Gallet O, Pauthe E. Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling. *Analytical Biochemistry* 2008; 372(1): 62-71.
29. Hungerford G, Benesch J, Mano JF, Reis RL. Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2007; 6(2): 152-8.
30. Yakacki CM, Saed M, Nair DP, Gong T, Reed SM, Bowman CN. Tailorable and programmable liquid-crystalline elastomers using a two-stage thiol-acrylate reaction. *Rsc Advances* 2015; 5(25): 18997-9001.

Diagnosis of Anti-Angiogenesis Peptide Binding to HUVECs Using FITC

Amini Sepehr F, Asghari SM, Shourian M*

¹ Department of biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 20 April 2019

Accepted: 07 July 2019

Abstract

Background & aim: Angiogenesis is the production of new blood vessels from existing vessels. Angiogenesis depends on the balance between its activating and inhibitory factors. Endostatin, a 20-kDa fragment of collagen XVIII, is a member of the angiogenesis inhibitory protein group that inhibits endothelial cell proliferation and migration and tubular-like structure. The use of colorimetric methods by fluorescent probes as a tracer is widespread, so the aim of this study was to determine and detect the binding of anti-angiogenic peptide to human cord endothelial cells using a fluorescence marker.

Methods: In the present experimental study, the 27 amino acid fragment of the endostatin protein amino acid domain was labeled with FITC as a fluorescence marker. Gel filtration chromatography with Sephadex G10 was used to separate the bound peptides and finally FTIR method was used to confirm the binding of FITC to the peptide. Human umbilical cord endothelial cells were treated with marker-bound peptides after culturing and studied by fluorescence microscopy to observe peptide binding to their receptor on the surface of these cells.

Results: findings by Fluorescence microscopy confirmed binding antiangiogenic peptide to its specific receptor. Various conditions such as concentration, time, and temperature were tested to achieve the proper conditions for marking peptides. Unlabeled FITCs separated by gel filtration Chromatography method with sephedex G₁₀. Human umbilical endothelial cells (HUVECs) are harvested and treated with conjugate samples (FITC-peptide) from gel filtration chromatography. After the required time, the cells were fixed and the binding of labeled peptides to their receptors on HUVECs was analyzed by Fluorescence microscope.

Conclusion: The results of fluorescence microscopy confirmed the binding of this antiangiogenic peptide to its specific receptor on endothelial cells. Different experimental conditions such as peptide concentration and FITC and incubation time and temperature were studied to obtain the appropriate conditions for peptide labeling. Free FITCs were separated by conjugated FITC-peptide samples by gel filtration chromatography. Human umbilical cord endothelial cells (HUVEC) cultured with FITC-peptide conjugated samples were treated. The cells were then fixed and examined by fluorescence microscopy.

Keywords: Antiangiogenic peptide, Fluorescein isothiocyanat, Human umbilical endothelial cells (HUVECs)

Corresponding author: Shourian M, Department of Biology, University of Guilan, Guilan, Iran

Email: Shourian@guilan.ac.ir

Please cite this article as follows:

Amini Sepehr F, Asghari SM, Shourian M. Diagnosis of Anti-Angiogenesis Peptide Binding to HUVECs Using FITC. Armaghane-danesh 2019; 24(4): 691-709.