

تاثیر کاهش سرم و تراکم کامل سلولی بر هم‌زمان‌سازی سیکل سلولی و وقوع آپوتوز در فیبروبلاست‌های درمی بز

اعظم دالمن،^۱ M.Sc.، پویک افتخاری یزدی،^۱ Ph.D.،^۱ مجتبی رضازاده ولوجردی،^۱ Ph.D.،^۱ عبدالحسین شاهوردی،^۱ Ph.D.،^۲ حمید گورابی،^۱ Ph.D.،^۱ رحمان فاخری،^۱ B.Sc.،^۱ احسان جان زمین،^۲ B.Sc.،^۲ فاطمه صادقیان،^۲ M.Sc.

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران

۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

۴. مرکز تحقیقاتی و درمان ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی

پست الکترونیک: eftekhari@royaninstitute.org Email:

دریافت مقاله: ۸۷/۶/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۲۴

چکیده

* **هدف:** تاثیر کاهش سرم، کشت تا تراکم سلولی (Confluence) و تراکم کامل سلولی (Full Cell Confluence) بر هم‌زمانی سیکل سلولی و آپوتوز سلول‌های فیبروبلاست درمی بز.

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های فیبروبلاست از گوش یک بز ماده ۱/۵ ساله به دست آمد. گروه‌های آزمایشی در این مطالعه شامل کشت سلول‌ها تا مرحله Confluent، کشت سلول‌های Confluent برای ۷۲ ساعت و کاهش سرم سلول‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد.

* **یافته‌ها:** آنالیز سیکل سلولی توسط فلوسایتومتری نشان داد که ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش سرم منجر به توقف چشم‌گیر سلول‌ها در ۹۱/۵۳ درصد سلول‌های تراکم کامل در مراحل G0/G1 قرار داشتند که بر عکس تیمار کاهش سرم در صد بیشتری از سلول‌ها در مرحله G1 بودند. زمانی که سنتز DNA توسط BrdU بررسی شد، ۱۹/۸۰ درصد از سلول‌های در حال رشد نرمال در فاز S بودند. در گروه‌های آزمایشی تغییر چشم‌گیری در درصد سلول‌های موجود در فاز S مشاهده شد ($p < 0.05$). تحت شرایط کشت نرمال ۶/۶۷ درصد سلول‌ها آپوتوز اولیه را نشان دادند. تیمار تراکم کامل سلولی، آپوتوز را در سلول‌ها افزایش نداد. گروه ۷۲ ساعت کاهش سرم افزایش معنی‌داری را در آپوتوز اولیه نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($p < 0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که فیبروبلاست‌های درمی بز به صورت مؤثر با استفاده از تیمارهای کاهش سرم و تراکم کامل سلولی در مراحل G0/G1 سیکل سلولی هم‌زمان شدند که برای انتقال هسته سلول سوماتیک در این گونه مفید می‌باشد. کاهش سرم به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها را به صورت مؤثر در مرحله G0/G1 متوقف کرد ولی آپوتوز را به صورت چشمگیر افزایش داد.

* **کلیدواژگان:** سیکل سلولی، هم‌زمان‌سازی، کاهش سرم، آپوتوزیس، فیبروبلاست

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۱۹-۲۱۲

مقدمه

انتقال هسته سلول سوماتیک (Somatic Cell Nuclear Trans) (fer; SCNT) به صورت موفق در تولید فرزندان کلون شده بعضی از گونه‌های پستانداران به کار رفته است؛ هر چند میزان موفقیت کلونینگ در همه گونه‌ها به شدت پایین بوده و معمولاً از سه در صد تجاوز نمی‌کند (۱). فاکتورهای زیادی بازده کلونینگ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از این فاکتورها، مرحله سیکل سلولی هسته دهنده است که نقش مهمی در تکوین جنین حاصل از انتقال هسته (Nuclear Transfer; NT) و به دست آوردن فرزندان زنده دارد (۲). ثابت شده است هنگامی که یک هسته از سلولی کاملاً تمایز یافته، به داخل یک تخمک بدون هسته انتقال می‌یابد، DNA با برنامه‌ریزی مجدد تکوین جنین‌های بازسازی شده را تا مرحله پایانی حمایت می‌کند (۱). برنامه‌ریزی مجدد هسته انتقال یافته به داخل تخمک‌ها تحت تأثیر فاکتورهای متعددی است که از میان آنها هم‌زمانی سیکل سلولی بین

هسته دهنده و سیتوپلاسم گیرنده بسیار مهم است (۳). مشخص شده است زمانی که از هسته مرحله G0/G1 برای تخمک‌های متافاز II با سطوح Maturation Promoting Factor (MPF) بالا استفاده می‌شود، تکوین جنین‌های بازسازی شده بهبود می‌یابد زیرا از همانندسازی اضافی DNA و پلئیدی نامناسب جلوگیری می‌کند (۴، ۵). روش‌های زیادی از جمله کاهش سرم، مهار تماسی و تیمارهای شیمیایی می‌تواند مراحل سیکل سلولی سلول‌های کشت شده را دست‌کاری کند. کاهش سرم یک روش معمول برای توقف سلول در مرحله G0/G1 سیکل سلولی است (۶، ۷). این روش برای هم‌زمانی سیکل سلولی سلول‌های دهنده در فرایند انتقال هسته برای تولید گوسفند کلون شده دالی به کار رفته بود (۱). مهار تماسی نیز راه دیگری برای حرکت سلول‌ها به سمت فاز G0/G1 در پاسخ به ازدحام بیش از حد جمعیت سلولی می‌باشد (۸). در این روش به علت کمبود فضا، تقسیم سلول متوقف می‌شود. اگر چه در بسیاری از موارد کاهش سرم برای هم‌زمان‌سازی به کار برده می‌شود

سانتی متر حاوی DMEM همراه با ۱۵ درصد FBS و یک درصد آنتی بیوتیک قرار داده شد. بعد از ۳-۲ روز کشت یا بعد از رسیدن به Confluence سلول‌ها ترپسینه شده و با ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma) در محیط کشت فریز شده و در نیتروژن مایع نگهداری شدند. فیروبلاست‌های فریز شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب و در محیط DMEM همراه با ۱۵ درصد سرم در انکوباتور ۳۸ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ کشت شدند. سلول‌هایی که در این آزمایش به کار رفتند در پاساژهای ۵ تا ۶ بودند.

هم‌زمانی سیکل سلولی

پس از رسیدن سلول‌ها به ۹۰-۸۰ درصد تراکم، در گروه کاهش سرم، محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم با محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد سرم تعویض گردید و سلول‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در این محیط کشت داده شدند. در گروه تراکم کامل سلولی، سلول‌ها در همان محیط ۱۵ درصد سرم به مدت ۷۲ ساعت کشت یافتند. سپس این سلول‌ها ترپسینه شده و برای آنالیز سیکل سلولی آماده شدند. فیروبلاست‌های در حال تقسیم با ۷۰-۶۰ درصد تراکم به عنوان گروه کنترل به کار برده شد.

تعیین سیکل سلولی با فلوسایتومتر

به منظور تعیین مراحل مختلف سیکل سلولی، محتوای DNA با استفاده از Propidium Iodide (PI) رنگ‌آمیزی شد و آنالیز فلوسایتومتری توسط دستگاه فلوسایتومتر کالیبور (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA; FACS) انجام گرفت. فیروبلاست‌های درمی کشت شده با استفاده از ترپسین-EDTA جدا و در DMEM با غلظت 1×10^6 cells/ml دوباره مخلوط شدند. بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰ rpm برای ۵ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آهستگی به سلول‌ها اضافه شد. برای جلوگیری از به هم چسبیدن سلول‌ها، این مرحله بر روی شیکر انجام گرفت. پس از ۲۰ دقیقه فیکساسیون، سلول‌ها با PBS شسته شدند سپس در تریتون ۱۰۰-۱X (Sigma) در درجه حرارت اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با مخلوطی از ۱۰۰ μg/ml و ۳۰ ml PI (Propidium Iodide, Sigma) و ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RNase A (Sigma) در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌ها در یک میزان ۲۰۰-۵۰۰ cells/s آنالیز شدند.

برای جداسازی مراحل G0 و G1 سیکل سلولی از رنگ‌آمیزی دو تایی PI و FITC (Fluorescein Isothiocyanate, Sigma) استفاده شد. در این آزمایش، سلول‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با ۰/۰۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر FITC، ۳۰ PI و ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RNase A رنگ‌آمیزی شدند.

با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر ۱۰۰۰۰ سلول برای هر نمونه ضبط شد. در صد سلول‌ها در فازهای مختلف سیکل سلولی با استفاده از نرم‌افزار Win MDI version ۲/۹ محاسبه شد.

ارزیابی میزان تکثیر سلولی

به منظور ارزیابی میزان همانندسازی DNA (مرحله S سیکل سلولی) از کیت تشخیص تکثیر سلول (5-Bromo-2'-deoxy-uridine; BrdU) استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با ۱۰ میکرومتر

ولی هنوز آشکار نیست که چنین تیماری در انتقال هسته ضروری باشد. برای مثال، گیبلی و همکاران (۹) با استفاده از سلول‌های در حال رشد، گاوهایی را تولید کردند و پیشنهاد دادند که هم‌زمانی سلول در مرحله G0 با استفاده از کاهش سرم ضروری نیست. مطالعات گذشته از انتقال هسته گاو نشان داده است که هر دو سلول‌های سوماتیک خاموشی و در حال تکثیر قادر به برنامه‌ریزی مجدد پس از انتقال هسته بوده و موجب تولید فرزندان زنده می‌شود (۱۰، ۱۱).

مارکرهای مولکولی اختصاصی برای تشخیص مرحله G0 سیکل سلولی وجود ندارد. بنابراین نمی‌توان با اطمینان گفت که سلول‌های به کار برده شده در انتقال هسته سلول سوماتیک واقعا در مرحله G0 سیکل سلولی است یا خیر (۱۱)؛ معمولا مارکرهای مولکولی از قبیل PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (۱۲)، E2F-p130 (۱۳) و FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (۱۴) برای شناسایی سلول‌ها در وضعیت خاموشی استفاده می‌شود.

ثابت شده است کاهش یا برداشت سرم، موجب القا آپوپتوز در لاین‌های سلولی انسان، موش (۱۵) و هم‌چنین فیروبلاست‌های جنینی خوک (۱۶، ۱۷) می‌شود. هر چند هنوز در مورد آپوپتوز کشت اولیه سلول‌های گونه‌های اهلی مطالب زیادی در دست نیست (۱۸). بر اساس ملاک بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، چندین مرحله آپوپتوز تعریف شده است. اشکال بارز آپوپتوز از قبیل وزیکوله شدن غشا، تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در طی فاز نهایی آپوپتوز مشخص می‌شود (۱۹).

بنابراین در مطالعه حاضر برای به دست آوردن روش مناسب هم‌زمانی سیکل سلولی، کارایی تیمار کاهش سرم و تراکم کامل سلولی برای تنظیم مرحله سیکل سلولی و تاثیر آنها بر آپوپتوز فیروبلاست‌های پوست بز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

گوش یک بز ماده ۱/۵ ساله قبل از اینکه یک تکه پوست بریده شود، shave و با الکل ۷۰ درصد استریل شد. قطعه بریده شده ۳ بار در PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) حاوی آنتی‌بیوتیک (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco)) شسته شد. اپیدرم و هیپودرم با یک تیغ اسکالپل برداشته و درم به قطعات کوچک (۲×۲ میلی‌متر) بریده شد. قطعات پوست ۲ بار با PBS شسته شد و در فلاسک ۲۲۵ سانتی‌متر (TPP) حاوی DMEM (Dulbecco, s Modifed Eagle, s Medium, Gibco) محتوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum, Hyclone) و یک درصد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد (پنی‌سیلین و استرپتومایسین). سلول‌ها در محیط مرطوب در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ قرار داده و محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض داده شد.

زمانی که سلول‌ها بعد از ۱۰ روز کشت به Confluence رسیدند، قطعات بافتی برداشته شده سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند. سلول‌ها توسط آنزیم ترپسین EDTA/ (۰/۲۵ درصد) (Gibco) از کف فلاسک جدا شده و در یک لوله سانتریفیوژ حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ۱۲۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. توده سلولی دوباره با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم مخلوط و با لام هماتوسیومتر شمارش شدند. 5×10^5 Cells/ml در فلاسک‌های کشت ۲۲۵

BrdU (Roche) نشان‌دار شدند. سپس در فرمالدهید ۴ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند. پس از شست‌وشو سلول‌ها توسط ۰/۱ درصد تریتون ۱۰۰-X به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شدند و به مدت ۱ ساعت در سرم ۱۰ درصد قرار گرفتند. پس از شست‌وشو سلول‌ها به مدت یک شب با (anti BrdU IgG) (Roche 1 Anti Mouse IgG-Fluorescein) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها پس از شست‌وشو به مدت ۱ ساعت با (anti BrdU IgG-Fluorescein) (Roche) انکوبه شدند. سلول‌ها با PBS شسته و با ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر PI رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰× مشاهده شدند. برای شمارش از هر نمونه حداقل ده عکس گرفته و برای هر نمونه حداقل تعداد ۱۰۰۰ سلول شمارش شد.

ارزیابی آپوپتوز با استفاده از Annexin V

برای اندازه‌گیری آپوپتوز سلولی، از رنگ‌آمیزی ترکیبی Annexin v (IQ Products) متصل شده به ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) و PI استفاده شد. سلول‌ها با بافر کلسیم شسته و در محلول Annexin v همراه با FITC سوسپانسی شدند. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها در بافر کلسیم سوسپانسی شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با محلول فلورسانس PI رنگ‌آمیزی شدند. سپس با استفاده از فلوسایتومتری آنالیز شدند. در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به سطح خارجی غشا سلولی مهاجرت می‌کند. این مرحله به صورت اختصاصی توسط پروتئین‌های متصل شونده به فسفاتیدیل سرین (Annexin V-FITC) شناسایی می‌شود. در طی مراحل اولیه آپوپتوز غشا سلولی سالم است و از ورود PI جلوگیری می‌کند. با پیشرفت آپوپتوز غشا نسبت به PI نفوذپذیر شده و DNA هسته را رنگ می‌کند. درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز نهایی با استفاده از نرم‌افزار Win MDI version ۲/۹ محاسبه شد.

آنالیز آماری

برای نرمال بودن نمونه‌ها از تست kolmogorov-smirnov استفاده شد. نمودارهای فلوسایتومتری سیکل سلولی و آپوپتوز با استفاده از نرم‌افزار Win MDI version ۲/۹ محاسبه و برای بررسی اختلاف میانگین در صدها بین گروه‌های مختلف از روش ANOVA استفاده گردید. جهت بررسی اختلاف میانگین درصد به صورت دو به دو از تست Tukey و برای بررسی وجود اختلاف در روند آپوپتوز به تفکیک گروه‌ها از تست Repeated Measures استفاده شد.

یافته‌ها

تاثیر تیمار کاهش سرم و تراکم کامل سلولی بر سیکل سلولی
به منظور ارزیابی تاثیر کاهش سرم و تراکم کامل سلولی بر سیکل سلولی، محتوای DNA توسط آنالیز FACS اندازه‌گیری و در صد نسبی سلول‌های موجود در مراحل G0/G1 (محتوای ۲S (2C-4C)، DNA (C) و G2/M (محتوای 4C DNA) محاسبه شد. جدول ۱ درصد سلول‌های در حال رشد را در فازهای مختلف سیکل سلولی نشان می‌دهد. زمانی که سلول‌ها با PI و FITC رنگ‌آمیزی شدند، محتوای DNA و پروتئین توسط FACS آنالیز شد. کاهش سرم به مدت ۴۸ ساعت ۸۴/۷۸ درصد سلول‌ها را در مرحله G0/G1 متوقف کرد. دوره طولانی تر کاهش سرم (۷۲ ساعت) نسبت سلول‌هایی را که در فاز G0/G1 بودند، افزایش داد (۹۰/۱۱ درصد) که هر دو گروه نسبت به گروه کنترل (سلول‌های در حال رشد نرمال) افزایش چشم‌گیری را در میزان سلول‌های این فاز نشان دادند ($p < 0.05$). کشت سلول‌ها تا تراکم و به مدت ۷۲ ساعت بعد از رسیدن به تراکم به ترتیب منجر به ورود ۸۰/۲۷ و ۹۱/۵۳ درصد سلول‌ها به فاز G0/G1 شد که این گروه‌ها نیز نسبت به گروه سلول‌های در حال رشد تفاوت چشم‌گیری داشتند ($p < 0.05$).

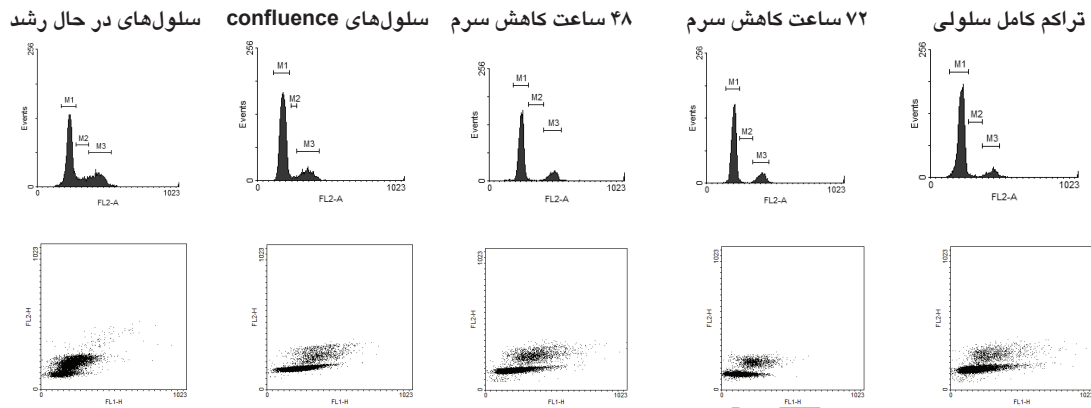
با استفاده از رنگ‌آمیزی دوتایی PI و FITC جمعیت‌های سلولی فاز G0 و G1 از هم تفکیک شدند. سلول‌های تراکم کامل به میزان بیشتری در فاز G1 سیکل سلولی بودند (۸۴/۲۹ درصد) در حالی که سلول‌هایی که کاهش سرم داشتند بیشتر در فاز G0 سیکل سلولی بودند (به ترتیب ۴۶/۳۵ و ۱۸/۲۶ درصد برای ۴۸ و ۷۲ ساعت) (شکل ۱).

تاثیر تیمار کاهش سرم و تراکم کامل سلولی بر تکثیر سلولی
زمانی که دو رشته DNA برای همانندسازی از هم جدا می‌شوند BrdU به جای تیمیدین می‌نشیند. سلول‌هایی که دارای BrdU در DNA خود هستند به سرعت توسط آنتی‌بادی منوکلونال بر ضد BrdU و آنتی‌بادی ثانویه متصل شده به فلوروکروم شناسایی می‌شوند. هنگامی که سنتز DNA توسط BrdU و ائیمونوفلورسنس مشخص شد (جدول ۲)، ۱۹/۸۰ درصد از سلول‌های در حال رشد (گروه کنترل) در فاز S بودند اما تغییر چشم‌گیری در میزان سلول‌های فاز S بین گروه‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش سرم مشاهده شد (به ترتیب ۴/۸۶ و ۲/۹۹ درصد). تعداد سلول‌های موجود در فاز S در گروه تراکم سلولی و ۷۲ ساعت تراکم کامل سلولی به ترتیب ۵/۶۱ و ۳/۲۰ درصد بود که نسبت به گروه کنترل در حال رشد نرمال کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$).

در هر ردیف بین حروف a-d, c-f, e-g و h از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$).

مراحل مختلف سیکل سلولی	کنترل (سلول‌های در حال رشد)	سلول‌های confluence	کاهش سرم		سلول‌های تراکم کامل
			۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
G0	۴/۵۶ ± ۰/۴۲ ^a	۱۲/۷۹ ± ۰/۹۹ ^{b, c}	۱۸/۲۶ ± ۰/۴۸ ^{b, d, e}	۴۶/۳۵ ± ۰/۵۱ ^{b, d, f, g}	۷/۲۴ ± ۰/۴۳ ^{b, d, f, h}
G1	۵۱/۸۸ ± ۲/۳۶ ^a	۶۷/۴۷ ± ۱/۱۱ ^{b, c}	۶۶/۵۲ ± ۰/۶۹ ^{b, e}	۴۳/۷۵ ± ۱/۵۰ ^{b, d, f, g}	۸۴/۲۹ ± ۱/۴۱ ^{b, d, f, h}
S	۱۹/۰۱ ± ۰/۵۲ ^a	۲/۳۹ ± ۰/۱۴ ^b	۲/۶۷ ± ۱/۰۰ ^d	۱/۷۴ ± ۰/۳۷ ^b	۱/۸۳ ± ۰/۴۰ ^b
G2/M	۲۳/۳۸ ± ۲/۵۵ ^a	۱۶/۰۴ ± ۰/۲۴ ^{b, c}	۱۱/۰۳ ± ۰/۷۹ ^b	۷/۷۲ ± ۲/۰۵ ^{b, d}	۶/۳۹ ± ۱/۱۷ ^{b, d}

تأثیر کاهش سرم بر سیکل سلولی

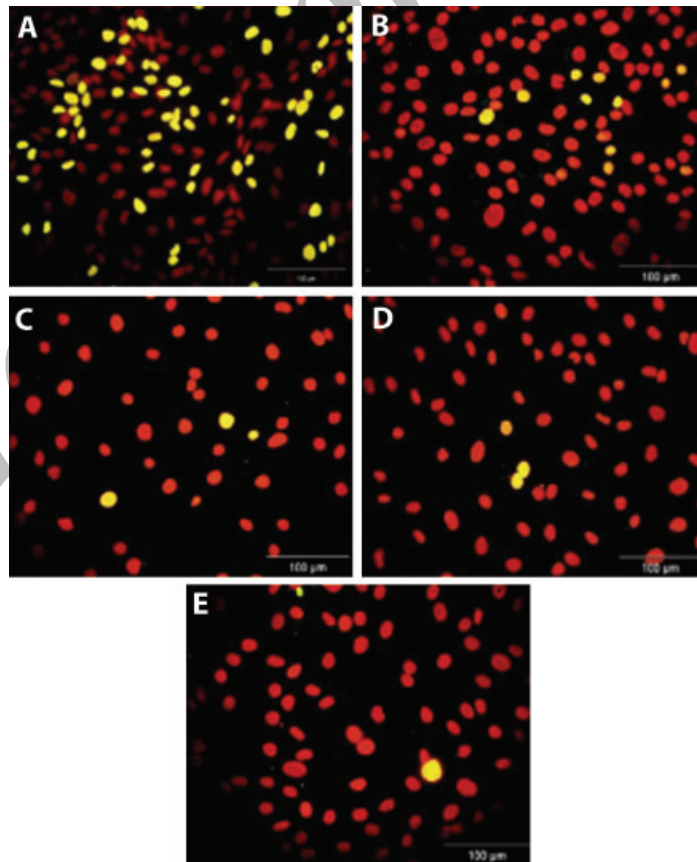


شکل ۱: توزیع مراحل مختلف سیکل سلولی توسط FACS. M3:G2/M, M2: S, M1: G0/G1

زمانی که سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، کاهش سرم داشتند ۸/۹۱ درصد سلول‌ها آپوپتوز اولیه و ۳/۵۹ درصد سلول‌ها آپوپتوز نهایی را نشان دادند. زمانی که کاهش سرم ۷۲ ساعت طول کشید، آپوپتوز اولیه به طور چشم‌گیری افزایش یافت (۳۹/۸۳ درصد آپوپتوز) ($p < 0.05$). سلول‌هایی که به مدت ۷۲ ساعت تراکم کامل داشتند، آپوپتوز اولیه خیلی کمتری را نسبت به سلول‌های کاهش سرم نشان دادند (۶/۳۹ درصد).

گروه ۴۸ ساعت کاهش سرم نیز تفاوت معنی‌داری در میزان سلول‌های موجود در فاز S با گروه کنترل داشته است (شکل ۲).

تأثیر تیمار کاهش سرم و تراکم کامل سلولی بر آپوپتوز سلولی Annexin آپوپتوز را در تعداد کمی از سلول‌های در حال رشد نشان داد (۶/۶۷ درصد) در حالی که کاهش سرم، آپوپتوز سلولی را القا کرد. نتایج نشان می‌دهد درجه آپوپتوز با طول دوره کاهش سرم ارتباط دارد.



شکل ۲: شناسایی میزان سنتز DNA توسط BrdU با استفاده از عدسی ۴۰×. سلول‌هایی که در مرحله S سیکل سلولی هستند به رنگ سبز و سلول‌هایی که در مراحل دیگر سیکل سلولی هستند به رنگ قرمز دیده می‌شوند. (A) سلول‌های در حال رشد، (B) سلول‌های Confluence، (C) ۴۸ ساعت کاهش سرم، (D) ۷۲ ساعت کاهش سرم، (E) تراکم کامل سلولی.

جدول ۲: میانگین در صد سلول‌های موجود در مرحله S در پاسخ به تیمارهای مختلف

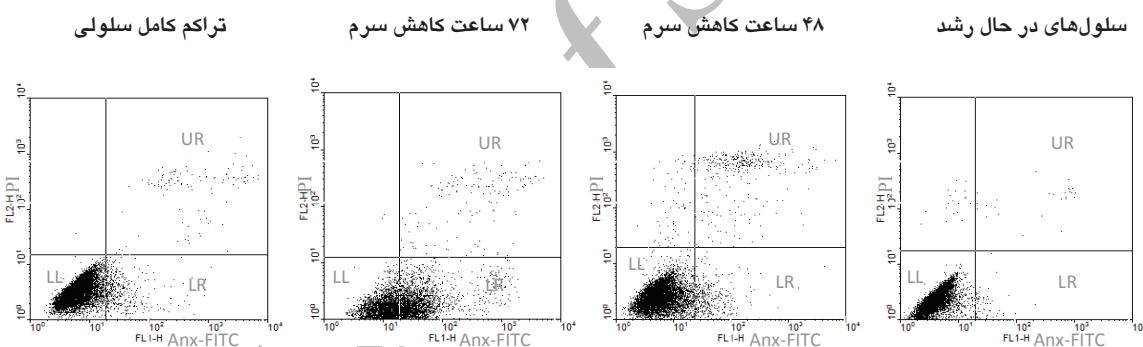
	کنترل (سلول‌های در حال رشد)	سلول‌های confluence	کاهش سرم		سلول‌های تراکم کامل
			۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
تعداد سلول‌های موجود در فاز S	۱۹/۸۰ ± ۰/۵۸ ^a	۵/۶۱ ± ۰/۲۶ ^{b,c}	۴/۸۶ ± ۰/۲۸ ^{b,e}	۲/۹۹ ± ۰/۳۴ ^{b,d,f}	۳/۲۰ ± ۰/۰۷ ^{b,d,f}

در هر ردیف بین حروف a-d، c-f، e و h-g از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد (p < ۰/۰۵).

جدول ۳: میانگین درصد آپوپتوز اولیه و نهایی سلول‌های فیبروبلاستی در پاسخ به تیمارهای مختلف

	کنترل (سلول‌های در حال رشد)	کاهش سرم		تراکم کامل سلولی
		۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
سلول‌های زنده	۹۰/۱۶ ± ۳/۰ ^a	۸۷/۰۳ ± ۲/۶۸ ^a	۵۸/۳۹ ± ۲/۷۲ ^b	۹۰/۹۱ ± ۱/۳۶ ^a
سلول‌های آپوپتوز اولیه	۶/۶۷ ± ۲/۰۷ ^a	۸/۹۱ ± ۲/۰۷ ^a	۳۹/۸۳ ± ۲/۶۵ ^b	۶/۳۹ ± ۱/۳۶ ^a
سلول‌های آپوپتوز نهایی	۲/۹۵ ± ۱/۲۴	۳/۵۹ ± ۰/۶۶	۱/۹۵ ± ۰/۲۳	۲/۴۶ ± ۰/۴۱

در هر ردیف بین حروف a و b از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد (p < ۰/۰۵).



شکل ۳: آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های رنگ شده با AnnexinV-FITC و PI سلول‌های زنده (Lower Left; LL)، سلول‌های آپوپتوز (Upper Right; UR) و سلول‌های آپوپتوزی که انسجام غشاء خود را از دست داده‌اند (Lower Right; LR)

به دست آمده از مطالعه میلی و همکاران بود (۲۱). در این مطالعه بیش از ۹۰ درصد فیبروبلاست‌های ترانسفکت شده بز در مرحله G0/G1 متوقف شدند. این سطوح هم‌زمانی به نظر می‌رسد بالاتر از آنچه توسط یو و همکاران به دست آمده باشد (۲۲) که در آن کاهش سرم به مدت ۱، ۳ و ۵ روز منجر به توقف ۷۰/۱، ۷۰/۲ و ۸۳ درصد از سلول‌ها در مرحله G0/G1 سیکل سلولی شده است.

کشت تا مرحله تراکم، روش دیگری برای وارد کردن سلول‌ها به مرحله G0/G1 در پاسخ به ازدحام جمعیت سلولی بود. در این مطالعه درصد بالایی از سلول‌های G0/G1 (۹۱/۵۳ درصد) با کشت به مدت ۷۲ ساعت پس از رسیدن به مرحله تراکم به دست آمد که مشابه با کاهش سرم به مدت ۷۲ ساعت بود. در مطالعه‌ای که توسط هاپس و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت (۲۰)، تراکم فیبروبلاست‌های بالغ گاو به تنهایی برای القا درصد بالایی از سلول‌ها برای ورود به G0/G1 کافی بود. سلول‌های کشت شده تا مرحله تراکم به صورت موفقیت‌آمیز برای تولید بزهای شیرده تراریخته به کار رفته است (۲۳).

تفاوت چشم‌گیری بین تیمارهای کاهش سرم و تراکم کامل سلولی در هم‌زمانی سیکل سلولی مراحل G0/G1 مشاهده نشد. با

تعداد سلول‌های مرحله نهایی آپوپتوز در هیچ کدام از گروه‌های تیماری تفاوت چشم‌گیری نداشتند (جدول ۳، شکل ۳).

بحث

فاکتورهای زیادی تکوین آزمایشگاهی جنین‌های بازسازی شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از مهم‌ترین این فاکتورها، هم‌زمانی سیکل سلولی بین هسته دهنده و سیتوپلاسم گیرنده است. هسته دهنده قبل از انتقال به تخمک بی‌هسته شده باید در فازهای G0 یا G1 سیکل سلولی باشد (۲۰). در این مطالعه از روش‌های معمول کاهش سرم و تراکم کامل سلولی برای توقف سلول‌ها در مرحله G0/G1 استفاده شد.

مطالعه حاضر نشان داد که کشت تا مرحله تراکم کامل سلولی و کاهش سرم به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت با موفقیت فیبروبلاست‌های بز را در مرحله G0/G1 سیکل سلولی هم‌زمان کرده است. تاثیر هم‌زمانی کاهش سرم روی سیکل سلولی فیبروبلاست‌های بز با ۴۸ ساعت کشت در محیط ۰/۵ درصد سرم به دست آمد (۸۴/۷۸ درصد). دوره طولانی‌تر کاهش سرم (۷۲ ساعت) به میزان ۹۰ درصد سلول‌ها را در مرحله G0/G1 متوقف کرد. این نتایج هم‌سو با نتایج

فقر سرم در کشت منجر به توقف سیکل سلولی فیبروبلاست و هم‌چنین آغاز تغییرات پیچیده و وسیع در سطح نسخه‌برداری می‌شود (۲۷). در این مطالعه فیبروبلاست‌های بز که رشد نرمالی داشتند (کنترل)، میزان آپوتوز کمی را نشان دادند در حالی که سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت کاهش سرم افزایش چشم‌گیری در میزان آپوتوز سلولی داشتند. این نتایج مطابق با گزارش کیوس و همکاران بود که نشان داد کاهش سرم فیبروبلاست‌های خوک بیش از ۴۸ ساعت نه تنها افزایشی در نسبت سلول‌های G0/G1 نداشت بلکه تاثیرات بدی بر حیات سلول‌ها و القاء آپوتوز داشته است (۲۸). نتایج به دست آمده بر روی سلول‌های گرانولوزی گوسفند نیز تایید کننده نتایج این مطالعه است (۲۹).

گیسون و همکاران گزارش دادند که کاهش سرم سلول‌های کشت شده خوک و گاو برای حداقل ۴۸ ساعت، حیات سلول‌ها را کاهش داده و موجب افزایش DNA فرگمنته (از علایم آپوتوز) می‌شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که فیبروبلاست‌های درمی بز به صورت مؤثر با استفاده از تیمارهای کاهش سرم و تراکم کامل سلولی در مراحل G0/G1 سیکل سلولی هم‌زمان شدند که برای انتقال هسته سلول سوماتیک در این گونه مفید می‌باشد. در حقیقت کشت سلول‌ها تا مرحله تراکم کامل، همان نتایج کاهش سرم به مدت ۷۲ ساعت را به دست آورد که تاثیر منفی روی حیات سلول‌ها داشته و آپوتوز را به صورت چشم‌گیر افزایش داده است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب در پژوهشکده رویان به شماره ۲۶۱ است که محل اجرای آن در بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانه مسئولین محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-813.
2. Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod*. 1996; 1: 40-46.
3. Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J Biotechnol*. 1998; 65: 99-110.
4. Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle. *Cloning*. 1999; 1: 3-15.
5. Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*. 2001; 293: 1093-8.
6. Kues WA, Anger M, Carnwarth JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod*. 2000; 62: 412-419.
7. Oback B, Wells D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells*. 2002; 4: 147-68.
8. Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J, Smith R 3rd. Growth arrest of melanoma cells is differentially regu-

lated by contact inhibition and serum deprivation. *DNA Cell Biol*. 1999; 18: 357-367.

این تیمارها اکثر سلول‌ها (بیش از ۸۰ درصد) در مرحله G0/G1 متوقف شدند. از آنجا که سلول‌های خاموش، حاوی سطوح پایین پروتئین هستند (۲۴)، سطوح پروتئین سلولی را به اتفاق محتوای DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی دوتایی PI و FITC اندازه‌گیری کردیم و دانستیم کاهش سرم، سطوح پروتئین سلولی را به طور چشم‌گیر کاهش می‌دهد. مطالعه حاضر نشان داد که گروه کاهش سرم به مدت ۷۲ ساعت حاوی ۴۶/۳۵ درصد سلول‌های موجود در مرحله G0 می‌باشد در حالی که تیمار ۷۲ ساعته کشت تراکم کامل سلولی ۷/۲۴ درصد سلول‌ها را در مرحله G0 نشان داده است. در نتیجه کاهش سرم، تعداد سلول‌های مرحله G0 را افزایش می‌دهد در حالی که کشت تراکم کامل سلولی تعداد سلول‌های G1 را افزایش می‌دهد. هنوز مزیت نسبی استفاده از سلول‌های دهنده‌ای که در مرحله خاموشی یا G1 هستند در جزئیات، مطالعه نشده است. اهمیت کاهش سرم سلول‌های دهنده در مقاله‌ای که تولد دالی را خبر داد، برجسته شد در حالی که بارداری و تولدهای زنده بدون کاهش سرم از فیبروبلاست‌های جنینی گزارش شده است (۹) و نشان می‌دهد کاهش سرم برای موفقیت انتقال هسته ضروری نیست. دو دلیل اصلی استفاده از سلول‌های G1 به عنوان دهنده، حضور سلول‌های آپوتوتیک کمتر در جمعیت سلولی G1 و احتمال هم‌زمانی بهتر سیکل سلولی بین هسته G1 و سیتوپلاسم تخمک می‌باشد (۲۵). نتایج ایمونوسیتوشیمی نتایج فلوسایتومتری را تایید کرد. به طوری که تعداد سلول‌های موجود در فاز S از سلول‌های در حال رشد به سمت سلول‌های تیمار شده با کاهش سرم و تراکم کامل سلولی کاهش یافت.

نیسیرو و همکاران گزارش دادند زمانی که پری ادیوسیت‌های کشت شده در محیط حاوی ۱۰ درصد سرم بودند، کمتر از ۲ درصد سلول‌ها آپوتوز را نشان دادند در حالی که وقتی در محیط بدون سرم کشت شدند در صد سلول‌های آپوتوز به ۱۰ درصد افزایش یافت (۲۶). استیس و همکاران نشان دادند که کاهش سرم ممکن است موجب افزایش آپوتوز و نکروز سلول‌ها و همانندسازی نامناسب یا آسیب DNA شود.

9. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 1998; 280: 1256-1258.
10. Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 1176-1178.
11. Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JH, Xiang T, et al. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*. 2003; 59: 45-59.
12. Larsen JK, Landberg G, Roos G. Detection of proliferating cell nuclear antigen. *Methods Cell Biol*. 2001; 63: 419-31.
13. Smith EJ, Leone G, DeGregori J, Jakoi L, Nevins JR. The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 6965-76.
14. Boquest AC, Day BN, Prather RS. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*. 1999; 60: 1013-9.
15. Mills JC, Kim LH, Pittman RN. Differentiation to an

- NGF-dependent state and apoptosis following NGF removal both occur asynchronously in cultures of PC12 cells. *Exp Cell Res.* 1997; 231: 337-345.
16. Ruhl M, Sahin E, Johannsen M, Somasundaram R, Manski D, Riecken EO, et al. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J Biol Chem.* 1999; 274: 34361-34368.
17. Kues WA, Carnwath JW, Paul D, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis. *Cloning Stem Cells.* 2002; 4: 231-243.
18. Peng X, Maruo T, Matsuo H, Takekida S, Deguchi J. Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA. *Endocrinol.* 1998; 45: 247-253.
19. Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res.* 1998; 238: 389-398.
20. Hayes O, Ramos B, Rodriguez LL, Aguilar A, Badia T, Castro FO. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim Reprod Sci.* 2005; 87: 181-192.
21. Memili E, Behboodi E, Overton SA, Kenney AM, Ócoin M, Zahedi A, et al. Synchronization of goat fibroblast cells at quiescent stage and determination of their transition from G0 to G1 by detection of cyclin D1 mRNA. *Cloning Stem Cells.* 2004; 6: 58-66.
22. Yu YS, Sun XS, Jiang HN, Han Y, Zhao CB, Tan JH. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats: work in progress. *Theriogenology.* 2003; 59: 1277-1289.
23. Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destrempe M, et al. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology.* 2005; 63: 1549-1563.
24. Zetterberg A, Larsson O. Cell cycle progression and cell growth in mammalian cells: kinetic aspects of transition events. In: Hutchison C, Glover DM (eds.). *Cell cycle control.* New York: Oxford University Press; 1995: 206-227.
25. Kurosaka S, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Imai H. Dependence of DNA synthesis and in vitro development of bovine nuclear transfer embryos on the stage of the cell cycle of donor cells and recipient cytoplasts. *Biol Reprod.* 2002; 67: 643-647.
26. Niesier CU, Urso B, Prins JB, Siddle K. IGF-1 inhibits apoptosis induced by serum withdrawal, but potentiates TNF- α -induced apoptosis, in 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinol.* 2000; 167: 165-174.
27. Stice SL, Gibbons J, Rzucidlo JR, Baile CA. Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. *Asian Aust J Anim Sci.* 2000; 13: 856-860.
28. Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod.* 2000; 62: 412-419.
29. Sadeghian Nodushan F, Eimani H, Eftekhari Yazdi P, Sepehri H. Effect of serum starvation on proliferation, apoptosis and cell cycle stage in granulosa cell. *Yakhteh.* 2008; 10(Sup 1): 72-73.
30. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, et al. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine treated adult somatic cells. *Biol Reprod.* 2002; 66: 895-900.

Effect of Serum Starvation and Full Confluence on Cell Cycle Synchronization and Apoptosis of Goat Dermal Fibroblast

Azam Dalman, M.Sc.¹, Poopak Eftekhari Yazdi, Ph.D.^{1*}, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi, Ph.D.¹, Abdolhossein Shahverdi, Ph.D.¹, Hamid Gourabi, Ph.D.², Rahman Fakheri, B.Sc.¹, Ehsan Janzamin, B.Sc.³, Fatemeh Sadeghian, M.Sc.⁴

1. Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
2. Genetic Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
4. Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
Email: eftekhari@royaninsitute.org

Received: 3/Sep/2008, Accepted: 14/Dec/2008

Abstract

Objective: We examine the effects of serum starvation, culture to confluence, and full confluence on cell cycle characteristics and apoptosis of goat dermal fibroblast cells.

Materials and Methods: Fibroblast cells were obtained from the ear of a female goat, 1.5 years of age. The following experimental groups were analyzed for fibroblast cells: 1. cells confluent for 72h, 2. cells starved for 48 and 72h.

Results: Analysis of cell cycle distribution by flow cytometry showed that 4.56, 51.88 of normal cycling cells were at the G₀, G₁ phases, respectively. Serum starvation for 48 and 72h arrested cells at the G₀/G₁ phase ($p < 0.05$). 91.53% of full confluent cells were at G₀/G₁ stage, but in contrast to the serum starved group, this high percentage of G₀/G₁ cells was mainly associated with G₁ cells. When DNA synthesis was detected by BrdU incorporation 19.80% of normally growing cells were in S phase. The percentage of cells in S phase changed significantly among 48 and 72h serum starvation and full confluent groups. Under normal culture conditions, 6.67% of cells underwent apoptosis. Serum starvation for 48 and 72 hours caused early apoptosis in 8.91 and 39.83 of cells, respectively. Treatment with full confluence for 72 hours did not increase the number of apoptotic cell significantly (6.39%). Serum starvation for 72 hours increased early apoptosis significantly ($p < 0.05$).

Conclusion: Goat dermal fibroblasts at various stages of the cell cycle were effectively synchronized; that could be beneficial for somatic cell nuclear transfer in this species. Although serum starvation for 72 hours effectively arrested cells at the G₀/G₁ stages, it significantly increased cell apoptosis.

Keywords: Cell Cycle, Synchronization, Serum Starve, Apoptosis, Fibroblast

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 212-219