Archive of SID

Original Article

In Vitro Cell Cycle Synchronization of Sheep Granulosa Cells

Sadeghian Nodishan F., M.Sc., Eftekhari-Yazdi P., Ph.D.*, Sepehri H., Ph.D., Eimani H., Ph.D., Dalman A., M.Sc.

**P.O.Box: 19395-4644,* Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, *Tehran, Iran.*

Abstract

Purpose: To investigate the effect of different methods of synchronization on sheep granulosa cell cycle.

Materials and Methods: Granulosa cells were aspirated from ovarian follicles and plated in a DMEM medium containing 15% FBS. Upon 70-80% confluency, the medium of the primary-cultured as well as the passaged-5 cells were replaced with the medium containing either 0.5% FBS for 24, 48 and 72 h or 0.5 mg mimosine for 24 h. In the last group the cells were cultured in a base medium for further 4 days. In the present investigation, for each culture system, the cells were examined in terms of their cell cycle stage using flow cytometry. Moreover, the cultures were investigated with respect to their apoptotic as well as the proliferating cell contents by using Brdu labeling and TUNEL staining.

Results: At primary as well as passaged-5 cultures subjected to serum starvation for 24 h, the frequency of G0/G1, proliferating as well as apoptotic cells were similar to those of control group. At culture with 48 and 72h serum starvation, the percentage of G0/G1 cells tended to increase significantly to 83% and 85% at primary culture and 89% and 90% at passage-5 culture respectively. Moreover, treating the cultures with mimosine caused the G0/G1 cell to increase. The percentages of apoptotic cells in cultures with either serum starvation (for 24 and 48 h) or with mimosine did not increase compared to those of control cultures. According to our results, 72 h after serum starvation, frequency of the apoptotic cells appeared to increase significantly.

Key words: Synchronization, Confluency, Serum starvation, Mimosine, Granulosa cells.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله تحقیقی

القای همزمانی سیکل سلولی در سلول‌های گرانولوزای گوسفند در محیط آزمایشگاه

فاطمه صادقیان ندوشن .M.Sc *و*، پویک افتخاری یزدی .Ph.D **، حوری سپهری .Ph.D *، حسین ایمانی.Ph.D ****
اعظم دالمن .M.Sc **

* دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران
** گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان، تهران، ایران
*** مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

تاریخ وصول: فروردین‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی روش‌های مؤثر همزمان‌سازی سیکل سلولی در فاز G0/G1 برای سلول‌های گرانولوزای گوسفند

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش مطالعه مداخله‌ای از نوع تجربی انجام شد. سلول‌های گرانولوزا با روش آسپیره کردن تخمدان به‌دست آمده و در محیط DMEM محتوی ۱۵ درصد سرم (FBS) کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به ۷۰ تا ۸۰ درصد confluency محیط کشت سلول‌ها در کشت اولیه و پاساژ پنجم در گروه‌های حذف سرم به‌ترتیب با محیط ۰/۵ درصد سرم به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و درگروه تیمار با میموزین با محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم میموزین به مدت ۲٤ ساعت تعویض شد. در گروه آخر نیز کشت سلول‌ها در محیط اصلی به مدت ٤ روزدیگر ادامه یافت (گروه confluency). سپس میزان توقف سیکل سلولی در فاز G0/G1 بعد از تیمار با استفاده از روش فلوسیتومتری، اثر تیمار بر تکثیر و آپوپتوز سلول‌ها با استفاده از روش نشاندار کردن با Brdu و روشTUNEL بررسی شد.

یافته‌ها: پس از ۲٤ ساعت کاهش سرم در کشت اولیه و پاساژ پنجم تعداد سلول‌های فاز G0/G1، میزان تکثیر سلول‌ها و درصد سلول‌های آپوپتوز شده با گروه confluency مشابه بود. با کاهش سرم به مدت ٤۸ و ۷۲ ساعت درصد سلول‌های موجود در فاز G0/G1 به میزان قابل توجهی افزایش یافت (به‌ترتیب ۸۳ و۸۵ درصد در کشت اولیه و ۸۹ و۹۰ درصد در پاساژ پنجم). تیمار سلول‌ها با میموزین نیز باعث افزایش درصد سلول‌های موجود در فاز G0/G1 شد ($p<0.05$). درصد سلول‌های آپوپتوز شده پس از کاهش سرم به‌مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت و تیمار سلول‌ها با میموزین نسبت به گروه confluency در هر دو گروه کشت اولیه و پاساژ پنجم چندان افزایش نداشت. اما ۷۲ ساعت کاهش سرم باعث آپوپتوز سلول‌ها به‌شکل معنی دار شد ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: کاهش سرم به مدت ٤۸ ساعت و استفاده از میموزین به مدت ۲٤ ساعت درصد سلول‌های موجود درفاز G0/G1 را افزایش می‌دهد و همزمان تعداد سلول‌های آپوپتوز شده نیز قابل قبول است.

کلیدواژه‌ها: همزمان‌سازی سیکل سلولی، مهار تماسی، محرومیت از سرم، میموزین، سلول گرانولوزا.

آدرس مکاتبه: ایران، تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-٤٦٤٤

E-mail: eftekhari@royaninstitute.org

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سال‌های اخیر شبیه‌سازی حیوانات از طریق انتقال هسته (nuclear transfer) به‌سرعت در حال پیشرفت بوده است. هنگامی که یک هسته از سلولی که کاملاً تمایز یافته است به داخل یک تخمک بدون هسته انتقال می‌یابد، DNA برنامه‌ریزی مجدد (reprogramming) شده و تکوین جنین بازسازی شده را تا مرحله ترم حمایت می‌کند [۱و۲]، هرچند میزان موفقیت بسیار پایین است و اغلب بیش از ۳ درصد گزارش نشده است [۳-۱]. برنامه‌ریزی مجدد هسته انتقال یافته به‌داخل تخمک تحت تأثیر عواملی چند است که از میان آن‌ها همزمانی (synchronization) مراحل سیکل سلولی سیتوپلاسم پذیرنده و هستهٔ دهنده یک اصل مسلم در فرآیند شبیه‌سازی است [٤و٥]. این امر به‌دلیل حفظ پلوئیدی و جلوگیری از آسیب به DNA ضرورت دارد. مرحله سیکل سلولی هستهٔ دهنده باید با فعالیت فاکتور پیش‌برندهٔ بلوغ (maturation promoting factor) موجود در تخمک مرحلهٔ متافاز دو (MII) به‌خوبی هماهنگ باشد [٦]. به همین دلیل تنها هستهٔ سلول‌هایی را که در فاز G1 [۱۰ــ۷] یا G0 [۱،۲و۱۱] سیکل سلولی است، می‌توان برای انتقال به تخمک متافاز دو برگزید. در عوض وقتی یک تخمک پذیرندهٔ از پیش فعال شده(pre-activated) یا به‌عبارتی پذیرندهٔ جهانی (universal recipient) مورد استفاده قرار می‌گیرد، هر دو مرحلهٔ G یا S سیکل سلولی را نیز می‌توان برای انتقال هسته به‌کار برد. هرچند هسته‌های دهنده‌ای که در فاز G هستند و پیش از فعال‌سازی تخمک بازسازی شده داخل آن گذاشته شده‌اند، به‌دلیل ضرورت تعامل بین اووپلاسم پذیرنده و هستهٔ دهنده، برای انتقال هسته ارجحیت دارند. یک فاصله زمانی بین ۲ تا ٤ ساعت قبل از فعال‌سازی تخمک باعث مبادلهٔ بهتر پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های مهم ضروری در امر برنامه‌ریزی مجدد هسته در سیتوپلاسم پذیرنده، می‌شود [۱۵ـ۱۲].

مراحل سیکل سلولی سلول‌های کشت‌یافته در in vitro را می‌توان با فرآیندهایی مثل محرومیت یا حذف سرم (serum deprivation/starvation)، مهار تماسی (confluency) یا با استفاده از مواد شیمیایی دستکاری کرد. محرومیت از سرم [۲و۱٦] و مهار تماسی [۸ و۱۷] به‌ترتیب از روش‌های متداول برای همزمان‌سازی سیکل سلولی در فاز G0 و G0/G1 هستند. چندین مادهٔ شیمیایی نیز برای توقف سلول‌ها در فازهای مختلف سیکل سلولی به‌کار می‌رود. در سال‌های گذشته تأثیر مطلوب استفاده از roscovitine بر همزمان‌سازی در فاز G0/G1 و به‌دنبال آن موفقیت در انتقال هسته با استفاده از سلول‌های سوماتیک گوسفند توسط گیبسون (Gibbons) و همکارانش (۲۰۰۲) گزارش شده است [۱۸]. پارتر (Parther) و همکارانش (۱۹۹۹) گزارش کردند که میموزین (ماده‌ای که سیکل سلولی را در فاز G0 همزمان می‌کند) بطور مؤثری تعداد سلول‌های فاز G1 را در سلول‌های پستانی خوک از ٦۷ درصد به ۸۲ـ۷۹ درصد افزایش می‌دهد [۱۹]. همین ماده در سال ۱۹۹۹ توسط بوکست (Boquest) و همکارانش برای همزمان‌سازی سلول‌های فیبروبلاست جنینی در فاز G1 به‌کار برده شد و تأثیر آن نسبت به روش‌های حذف سرم و مهار تماسی گزارش شد [۲۰]. لیکن تاکنون در مطالعات، مقایسه‌ای بین تأثیر استفاده از مواد شیمیایی، محرومیت از سرم و مهار تماسی برای سلول‌های سوماتیک گوسفندی انجام نشده است.

در این مطالعه تأثیر سه پروتکل مختلف همزمان‌سازی سیکل سلول‌های گرنولوزای گوسفندی در فاز G0 و G1 و اثر آن بر بقای سلولی و تکثیر یا مرگ سلولی، بررسی شد. همزمان‌سازی سیکل سلولی با استفاده از ۱ـ محرومیت سرمی، ۲ـ مهار تماسی یا confluency و ۳ــ استفاده از میموزین حاصل شد. از آنجا که سلول‌ها در پاساژهای بالاتر تکوین طولانی مدت حیوانات شبیه‌سازی شده را حمایت می‌کنند و برای برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای مستعدتر هستند، در این تحقیق اثر سه روش فوق در کشت اولیه و پاساژ پنجم سلول‌های نامبرده مورد مطالعه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

استحصال و کشت سلول‌های گرانولوزا

تخمدان‌های گوسفندی در فاصله زمانی حداکثر دو ساعت پس از جداسازی از بدن حیوان ذبح شده در محلول حاوی سرم فیزیولوژی، به همراه پانصد هزار تا یک میلیون واحد پنی‌سیلین و مقدار ۱ گرم بر لیتر استرپتومایسین به آزمایشگاه منتقل شدند. تخمدان‌ها در محلول PBS[1] (Sigma, USA) شستشو شده و سلول‌های گرانولوزا با استفاده از محیط TCM حاوی HEPES[2] (Sigma, USA) و روش آسپیره کردن فولیکول‌های آنترال تخمدانی، به‌دست آمدند. سلول‌های گرانولوزای جدا شده در محیط DMEM[3] (Sigma, USA) محتوی ۱۵درصد سرم جنینی گاو (FBS: Gibco, Invitrogen, USA[4]) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت شدند. پس از اینکه سلول‌ها سطح فلاسک را کاملاً پر کردند (کشت اولیه) (شکل ۱، الف) پاساژ داده شدند. به این ترتیب که ابتدا محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد سپس سطح سلول‌ها (به منظور حذف آثار منفی سرم بر عملکرد آنزیم) با استفاده از PBS انکوبه شده و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و۵ درصد CO2 شستشو داده شد. آنگاه با استفاده از ۱/۵ میلی‌لیتر آنزیم ۰/۰۵ درصد تریپسین (EDTA)[5] (Gibcoe, Invitrogen, USA) سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. پس از گذشت زمان یک دقیقه با عمل ضربه زدن به فلاسک کل سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و آنزیم با استفاده از ۱/۵ میلی لیتر محیط DMEM حاوی ۱۵درصد FBS خنثی شده و سوسپانسیون سلولی در نهایت در فلاسک های جدید کشت داده شد. به‌منظور به‌دست آوردن سلول‌های پاساژ پنجم این عمل پس از پر شدن کف فلاسک از سلول‌ها ۵ بار تکرار شد.

تیمار سلول‌ها و همزمان‌سازی سیکل سلولی

به منظور همزمان‌سازی سیکل سلولی سلول‌های گرانولوزای گوسفند و توقف سیکل سلولی آنها در فاز G0/G1 از سه روش عمدهٔ مهار تماسی، حذف سرم و مهارکنندهٔ شیمیایی استفاده شد. برای انجام آزمون‌ها ابتدا سلول‌ها با غلظت اولیهٔ ۱۰۵ سلول در میلی‌لیتر یا در فلاسک‌های پلاستیکی ۲۵ سانتی مترمربع (Falcon, France) برای آنالیز سیکل سلولی یا در دیش‌های چهار چاهکی (Falcon) برای بررسی میزان آپوپتوز یا در چمبر اسلاید (chamber slide; Nalge Nunc International, USA) برای بررسی سنتز DNA کشت شدند و وقتی که سلول‌ها به۸۰-۷۰ درصد Confluency رسیدند در کشت اولیه و پاساژ پنجم در پنج گروه به شرح زیر تیمار شدند:

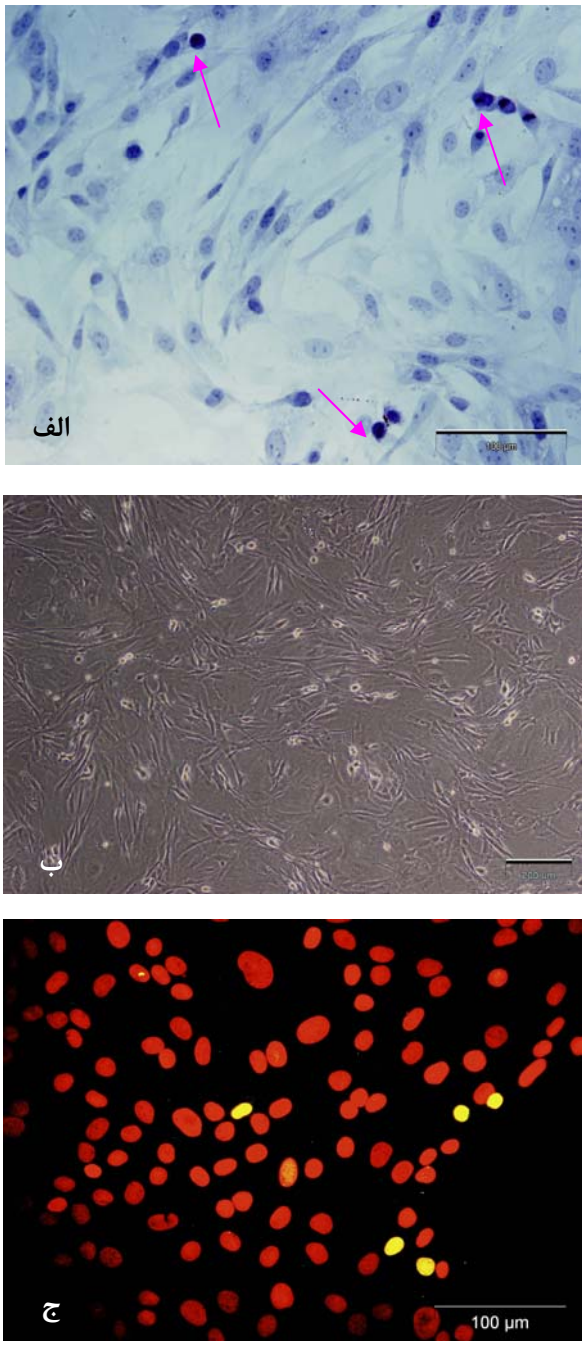
۱) مهار تماسی: سلول‌های در حال تکثیر گرانولوزا ٤ روز پس از رسیدن به ۸۰ تا ۱۰۰ درصد Confluency در محیط DMEM و ۱۵ درصد FBS، ابتدا تریپسینه شده و سپس مورد بررسی‌های آنالیز سیکل سلولی، سنتز DNA و میزان وقوع آپوپتوزیس قرار گرفتند. ۲) حذف سرم به مدت ٢٤ ساعت، ۳) حذف سرم به مدت ٤٨ ساعت، ٤) حذف سرم به مدت ۷۲ ساعت؛ در سه گروه اخیر محیط سلول‌ها با محیط DMEM محتوی ۰/۵ درصد سرم جایگزین شد. پس از طی زمان‌های مذکور آنالیزهای ذکر شده انجام گرفت. ۵) مهارکنندهٔ شیمیایی: مادهٔ شیمیایی مورد استفاده میموزین (L-Mimosine; Sigma, USA) به میزان ۰/۵ میلی‌مولار بود. بدین منظور ٢٤ ساعت قبل از آنالیزهای سیکل سلولی محیط سلول‌ها با استفاده از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌مولار میموزین جایگزین شد و پس از طی ٢٤ ساعت سلول‌های تریپسینه

1. Phosphate buffer saline
2. 4-(2-hydroxyethyl)- 1- piperazineethane sulfonic acid
3. Dulbeco's modified Eagle's Medium
4. Fetal bovin serum
5. Ethylendiaminetetra acetic acid

www.SID.ir

Archive of SID

شده ارزیابی شدند.



شکل ۱. الف: سلول‌های Confluency . ب: سلول‌های رنگ شده با روش TUNEL در گروه کاهش سرم پس از ٤٨ ساعت، هسته‌های تیره رنگ (فلش) سلول‌های آپوپتوز شده را نشان می‌دهد. ج: سلول‌های رنگ شده با Brdu در گروه مهار تماسی، رنگ سبز سلول‌های در حال تکثیر را نشان می‌دهد.

آنالیز سیکل سلولی

بعد از تریپسینه کردن و جداکردن سلول‌ها از کف فلاسک، سوسپانسیون سلولی با تعداد ۱×۱۰٦ سلول به مدت ۷ دقیقه در۱۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، محلول تثبیت‌کننده (اتانول ۷۰ درصد) به آرامی و روی شیکیر (shaker) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها مجدداً با PBS محتوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA شستشو داده شدند. سپس با PBS محتوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید (PI; Sigma, USA) به همراه ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر RNAase (Sigma, USA) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. و درنهایت سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری FACS Callibur, (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) و نرم افزار WINMDI 2.8 آنالیز شدند و درصد سلول‌ها در فازهای G2/M، S و G0/G1 محاسبه شد. برای هر نمونه ۳ بار تکرار و هر بار حداقل حدود ۱۰٦ سلول آنالیز شد و میانگین آن‌ها برای آنالیزهای آماری مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی سنتز DNA

برای بررسی سنتز DNA از روش نشاندار کردن با Brdu (5-Bromo-2-deoxy-Uridin labaling and detetion kit; Roche, Germany) استفاده شد. به این منظور سلول‌ها در چمبر اسلاید کشت شدند. پس از تیمار سلول‌ها به روش‌های ذکر شده، سلول‌ها با محیط DMEM محتوی ۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر Brdu به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شده و سپس با PBS شستشوداده شده و با محلول ۵۰ میلی مولار گلیسین در اتانول ۷۰ درصد در دمای٤ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت تثبیت شدند. سلول‌ها با تریتون ۱ درصد (Triton x-100; Sigma, USA) به مدت۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق نفوذپذیر شدند و به‌دنبال آن با goat-serum (Sigma, USA) ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد به مدت یک ساعت انکوبه شدند. آنتی بادی اولیه Anti-Brdu به سلول‌ها اضافه شد و بعد از شستشو با PBS با آنتی‌بادی ثانویه Anti-mouse-Ig-fluorescein به مدت یک ساعت انکوبه شدند. سلول‌ها مجدداً با PBS شستشو داده شده و با ۵ میکروگرم درمیلی‌لیترPI به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. سلول‌های رنگ شده توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و شمارش شدند. هستهٔ سلول‌هایی که در فاز تکثیر قرار دارند به رنگ سبز دیده می‌شوند. برای هر نمونه ۳ بار تکرار و هر بار حدود ۱۰۰۰ هسته شمارش شد و میانگین آنها برای آنالیزهای آماری استفاده شد.

بررسی آپوپتوز سلول‌ها

اثر تیمار روی آپوپتوز سلول‌ها با استفاده از روش TUNEL (in situ cell death detection kit,POD; Roche, Germany) بررسی شد. سلول‌ها روی لامل (Coverslip) در پلیت‌های چهار چاهکی کشت داده شدند. پس از تیمار سلول‌ها به روش‌های ذکر شده سلول‌ها در تثبیت کننده پارافرمالدهید ٤ درصد در PBS و در درجه حرارت اتاق به مدت یک ساعت تثبیت شدند. بعد با PBS شستشو داده شده و برای متوقف کردن واکنش پراکسیدازی داخلی، سلول‌ها با H2O2 ۳ درصد در متانول به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از شستشوی مجدد سلول‌ها با PBS، تریتون ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به‌ترتیب با محلول TUNEL و converter-POD به مدت یک ساعت در محیط مرطوب انکوبه شدند. سلول‌ها با PBS شستشو داده شده و محلول سوبسترای DAB[1] در محیط تاریک به مدت۱۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت پس از آبگیری در اتانول و شفاف‌سازی درگزیلل Coverslip ها به کمک چسب انتلان روی لام ثابت شده و در زیر میکروسکوپ نوری هسته های TUNEL مثبت که به‌صورت تیره رنگ مشخص بودند شمارش شد. برای هر نمونه ۳ بار تکرار و هر بار حدود ۱۰۰ هسته شمارش شد و میانگین آن‌ها برای آنالیزهای آماری استفاده شد.

1. Diamino benzidine

یافته‌ها

اثر مهار تماسی، کاهش سرم و بازدارنده‌های شیمیایی روی سیکل سلولی

درصد سلول‌ها در فازهای مختلف سیکل سلولی در جدول ۱ نشان داده شده است. در گروه مهار تماسی در کشت اولیه ۷۳/۱۱ ، ۸/۸۱ و۱۸/۸۰ درصد سلول‌ها به ترتیب در فازG0/G1, S و G2/M بودند.در پاساژ پنجم تعداد سلول‌ها در این فازها به‌صورت ۷۲/٦، ٦/٥ و۲۰/۹ درصد بود. کاهش سرم بعد از ٢٤ ساعت باعث افزایش تعداد سلول‌ها به میزان ۷٦/۹ و ۷٥/٤ درصد در فاز G0/G1 در کشت اولیه و پاساژ پنجم می‌شود. کاهش سرم پس از ٤٨ و۷۲ ساعت باعث افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G0/G1 به‌ترتیب به میزان ۸۳/٥ و ۸۹/٤٦ درصد در کشت اولیه و ۸٥/۷ و ۹۰/۷ درصد در پاساژ پنجم می‌شود. بعد از تیمار سلول‌ها با ۰/٥میلی‌مولار میموزین ۸٥/۲ و ۸٥/٥ درصد سلول‌ها در فاز G0/G1 در هر دو گروه کشت اولیه و پاساژ پنجم بودند.

اثر مهار تماسی، کاهش سرم و بازدارنده‌های شیمیایی روی تکثیر سلول‌ها

بررسی ایمنوسیتوشیمی سنتز DNA با میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که ۱۰/۲ و ۹/٦ درصد از سلول‌های confluency در کشت اولیه و پاساژ پنجم در حال تکثیر و در فاز S هستند (نمودار۳-۱). درصد سلول‌هادر فاز S سیکل سلولی بعد از ٢٤ ساعت کاهش سرم از غلظت ۱٥ به ۰/٥ درصد تغییر چندانی نمی‌کند (p>0/05) ولی کاهش سرم بعد از

www.SID.ir

Archive of SID

۴۸ و ۷۲ ساعت باعث کاهش سلول‌های در حال تکثیر به‌ترتیب به میزان ۳/۱ و ۳/۲ درصد در کشت اولیه و ۳/۲ و۲/۳درصد در پاساژ پنجم می‌شود. تیمار میموزین هم باعث کاهش سلول‌های Brdu مثبت به اندازه کافی در کشت اولیه و بعد از پاساژ پنجم می‌شود و درصد سلول‌های در حال تکثیر به ۳/٤ درکشت اولیه و ۳/۱ در پاساژ پنجم می‌رسد.

جدول۱. تعداد سلول‌های گرانولوزای گوسفندی در فازهای مختلف سیکل سلولی در گروه‌های مهار تماسی (Confluency)، کاهش سرم و تیمار با میموزین. (الف) کشت اولیه، (ب) پاساژ پنجم

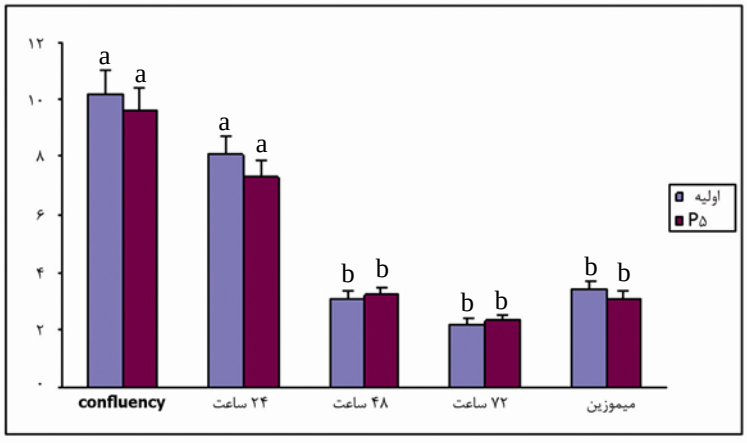
الف)

گروه‌های تیمار شده	فاز G0/G1 سیکل سلولی	فاز S سیکل سلولی	فاز G2/M سیکل سلولی
مهار تماسی	۷۳/۱۱ ± ۳/۰a	۸/۸۱ ± ۱/٤۱ a	۱۸/۰۸ ± ۰/۵۸ a
۲٤ ساعت کاهش سرم	۷٦/۹ ± ۱/٦ a	۷/۸ ± ۰/۳۰ a	۱۵/۳ ± ۰/۹۰ af
٤۸ ساعت کاهش سرم	۸۳/۵ ± ۱/۳ b	۲/٤ ± ۰/۰۱ b	۱٤/۱ ± ۰/٦ bc
۷۲ ساعت کاهش سرم	۸۹/٤٦ ± ۲/۰ b	۱/۹ ± ۰/۳۰ b	۸/٦٤ ± ۱/۱٤ bd
میموزین	۸۵/۲ ± ۱/۱ b	۳/۵ ± ۰/۳۰ b	۱۱/۳ ± ۰/٦ bf

ب)

گروه‌های تیمار شده	*فاز G0/G1 سیکل سلولی*	*فاز S سیکل سلولی*	*فاز G2/M سیکل سلولی*
مهار تماسی	۷۲/٦ ± ۱/۰a	٦/۵ ± ۰/٤a	۲۰/۹ ± ۱/٤a
۲٤ ساعت کاهش سرم	۷۵/٤ ± ۲/۲a	٤/۹ ± ۰/٤b	۱۹/۷ ± ۰/۵ab
٤۸ ساعت کاهش سرم	۸۵/۷ ± ۲/۳b	۲/۱ ± ۰/۲bc	۱۲/۲ ± ۰/٦bd
۷۲ ساعت کاهش سرم	۹۰/۷ ± ۱/۷۲b	۱/۸ ± ۰/٤۵bd	۷/۳۲ ± ۰/٤۲bf
میموزین	۸۵/۵ ± ۱/۳۰b	٤/۵ ± ۰/۱۵b	۱۰/۰ ± ۰/۵b

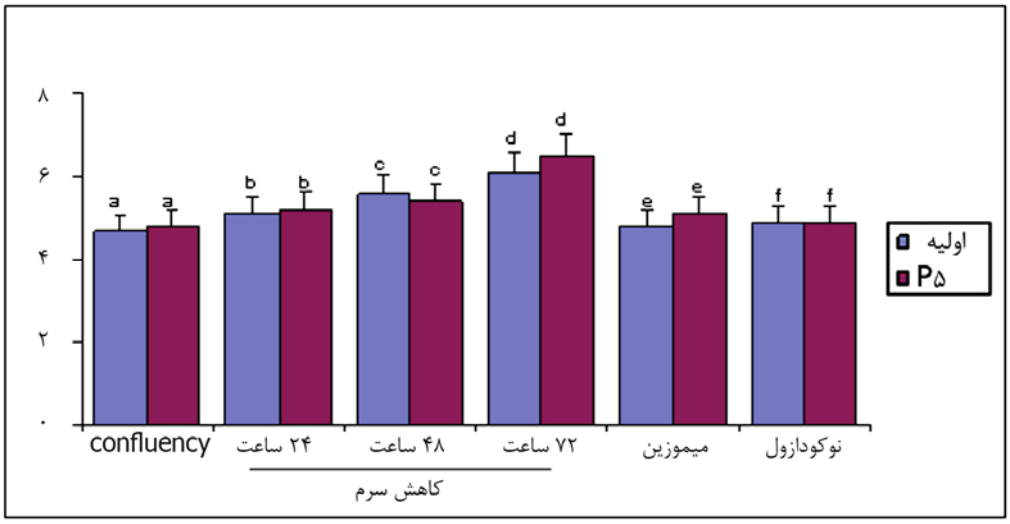
کلیه اعداد به صورت میانگین درصد ± انحراف معیار هستند. در ستون‌هایی با اندیس متفاوت ($p< 0.05$) است



نمودار۱. بررسی میزان سنتز DNA در گروه‌های تیمار شده مختلف. در ستون‌هایی با اندیس‌های متفاوت $p<0.001$ است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲. اندازه‌گیری میزان آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در گروه‌های تیمار شده متفاوت. در ستون‌هایی با اندیس‌های a-d, d-e ,b-d در هر دو گروه کشت اولیه و پاساژ پنجم ، c-d در پاساژ پنجم و d-d بین هر دو گروه کشت اولیه و پاساژ پنجم $p< 0.05$ است

اثر مهار تماسی، کاهش سرم و بازدارنده‌های شیمیایی روی آپوپتوز سلول‌ها

در گروهی که سلول‌ها بدون هیچ تیماری سطح فلاسک را کاملاً پر کرده بودند (مهار تماسی)، ٤/٧ و ٤/٨ درصد سلول‌ها در کشت اولیه و پاساژ پنجم دچار آپوپتوز شده بودند (نمودارهای ۲و۳). کاهش سرم پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت درصد سلول‌های آپوپتوز شده را افزایش چندانی نداد ($p>0.05$). اما ۷۲ ساعت کاهش سرم باعث افزایش آپوپتوز سلول‌ها در کشت اولیه و پاساژ پنجم به میزان ٦/١ و ٦/٥ درصد شد که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها نشان داد ($p>0.05$) . میزان وقوع آپوپتوز در گروه تیمار با میموزین نیز تفاوتی با گروه‌های مهار تماسی و کاهش سرم به مدت ٢٤ ساعت و ٤٨ ساعت نداشت (٤/٨ درصد در کشت اولیه و ٥/١ درصد در پاساژ پنجم).

بحث

همزمانی مراحل سیکل سلولی در فاز G0/G1 یکی از فاکتورهای کلیدی تعیین کننده موفقیت انتقال هسته است. تحقیقات نشان می‌دهد که سلول‌های فاز G1 برای برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای مناسب‌تر هستند. آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های گرانولوزای گوسفندی در این تحقیق نشان داد که درصد سلول‌ها در فاز G0/G1 با تیمارهای مختلف (مهار تماسی، حذف سرم و استفاده از مادهٔ میموزین) به‌صورت معنی‌دار نسبت به سلول‌های گروه کنترل (سلول‌های در حال تکثیر) افزایش می‌یابد (داده ها نشان داده نشده است). تأثیر کاهش سرم بر سلول‌ها بستگی به طول مدت آن دارد. محرومیت از سرم در سلول‌های کشت شده خوک و گاو برای دوره‌های طولانی سبب کاهش بقای سلول‌ها و افزایش قطعات DNA که نشان‌دهنده آپوپتوز است، می شود [۲۳-۲۰]. کاهش چشمگیر در تعداد جنین‌ها و ناهنجاری‌های جنینی مشاهده شده در گاوها و آسیب DNA در سلول‌های فیبروبلاستی کشت شدهٔ گوسفند ممکن است با محرومیت سرمی هسته‌های دهنده در ارتباط باشد [٢٤]. در این مطالعه در سلول‌هایی با confluency بالا ٤/٧ و ٤/٨ درصد سلول‌ها در کشت اولیه و پاساژ پنجم دچار آپوپتوز شده بودند. کاهش سرم بعد از یک یا دو روز میزان آپوپتوز

www.SID.ir

Archive of SID

را چندان افزایش نمی‌دهد، بعد از سه روز به ۵/٦ و ۵/٤ درصد می‌رسد. کاهش سرم برای یک یا دو روز مناسب است زیرا درصد سلول‌های G0/G1 و سلول‌های آپوپتوز شده قابل قبول است. یو (Yu) و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که کاهش سرم به‌مدت ۵ روز درصد سلول‌های آپوپتوز شده را به ۱۱/۷ درصد می‌رساند و برای مدت ۱۰ روز بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها علامت آپوپتوز را نشان می‌دهند [۲۵]. در حالی که دو یا سه روز کاهش سرم باعث توقف ۷۰ درصد سلول‌ها در فاز G0/G1 و٤ درصدآپوپتوز می‌شود. هایس(Hayes) و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که confluency بالا برای القای سلول‌های فیبروبلاست و گرانولوزا در فاز G0/G1 کافی است و در میزان تکوین بلاستوسیست‌ها بین سلول‌های محروم از سرم وconfluency بالا تفاوتی نیست [۲٦]. در مطالعه حاضر ۷۳ درصد سلول‌های confluencey در فاز G0/G1 بودند و کاهش سرم به‌صورت مؤثر باعث توقف ۸۵ و ۹۰ درصد سلول‌ها در این دو فاز شد.

واکووا (Vackova) و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که میموزین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به‌صورت مؤثر برای همزمانی سلول‌های گرانولوزای تخمدان خوک بالغ در فاز G0/G1 سیکل سلولی می‌تواند استفاده شود [۲۷]. آن‌ها گزارش کردند که ۲٤ ساعت تیمار با میموزین برای توقف سلول‌ها در فاز G0/G1 از کاهش سرم به مدت ۲٤ یا ٤۸ ساعت مؤثرتر است و این توقف قابل برگشت است. لالاند (Lalande) (۱۹۹۰) گزارش کرد که غلظت ۰/۲ میلی مولار میموزین، سلول ها را در انتهای فاز G1 با کاهش فعالیت فاکتور آغازکننده سنتز پروتئین ها متوقف می‌کند [۲۸] اماباکوست (Boquest) و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که میموزین اثر کمی روی افزایش درصد سلول‌های G1 فیبروبلاست‌های جنینی خوک دارد، حتی وقتی غلظت بالای ۱/۲ میلی‌مولار اضافه شود [۲۰]. در مقایسه نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ۲٤ ساعت تیمار سلول‌ها با ۰/۵ میلی‌مولار میموزین باعث افزایش سلول‌های گرانولوزای گوسفندی در فاز G0/G1 به میزان ۸۵ درصد می‌شود در صورتی که تعداد سلول‌های آپوپتوز شده را هم به میزان بسیار کم افزایش می‌دهد.

هرچه سلول‌ها در پاساژهای بالاتری باشند، تکوین جنین‌های بازسازی شده پس از انتقال هسته را به‌منظور همانندسازی بیشتر حمایت می‌کنند. در این تحقیق نشان داده شد که روش‌های استفاده شده برای توقف سیکل سلولی در فاز G0/G1 برای هر دو گروه کشت اولیه و پاساژ پنجم مشابه عمل می‌کند و تفاوتی در میزان توقف سلول‌ها وجود ندارد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از هرسه روش مهار تماسی، کاهش سرم و مادهٔ میموزین قادر است به میزان مناسبی سلول‌های گرانولوزای گوسفندی را در فاز G0/G1 متوقف نماید ولی کشت طولانی مدت سلول‌ها به دور از سرم باعث القای آپوپتوز در آن‌ها شده و این امر نتایج حاصل از تکوین جنین بازسازی شده را تحت الشعاع قرار می‌دهد. استفاده از میموزین علاوه براین‌که درصد قابل قبولی از سلول‌ها را در فاز G0/G1 متوقف می‌کند سلامت DNA و عدم القای آپوپتوز را نیز در پی دارد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مشترک بین پژوهشکده رویان و دانشگاه تهران به شماره ۲-۲۵۸ است که محل اجرای آن در بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانهٔ مسئولین محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. **Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johanson KR, Yanagimachi R**. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 1998; 280: 1256-8.
2. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhier J, Kind AJ, Campbell KHS**. Viable offspring derved from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385: 810-3.
3. **Cardoso MC, Leonhardt H, Nadal-Ginard B**. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and CDK2 specifically at subnuclear site of DNA replication. Cell 1993; 74: 979-92.
4. **Campbell KH, Loi P, Otaegui P, Wilmut I**. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev Reprod 1996; 1: 40-6.
5. **Wolf E, Zakhartchendo V, Berm G**. Nuclear transfer in mammals: recent development and future perspectives. J Biotechnol 1998; 65: 99-110.
6. **Campbell KHS, McWhir J, Rirchie WA, Wilmut I**. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 1996; 380: 64-6.
7. **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: 256-8.
8. **Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al**. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature 2000; 470: 505-9.
9. **Kasinnathan P, Knott JG, Wang YDJ, Robi JM**. Production of calves from G1 fibroblasts. Nat Biotech 2001; 19: 1176-8.
10. **Zou X, Wang Y, Cheng Y, Yang Y, Ju H, Tang H, et al**. Generation of cloned goats (Capra hirkus) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. Mol Reprod Dev 2002; 61: 164-72.
11. **Wells DN, Misica PM, Tervit HR**. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulose cells. Biol Reprod 1999; 60: 996-1005.
12. **Prather RS, Boquest AC, Day BN**. Nuclear transplantation in early pig embryos. Biol Reprod 1989; 41: 414-8.
13. **Prather RS, Rickords LF**. Nuclear transplantation as a method of producing genetically identical livestock. Anim Biotechnol 1992; 3: 67-79.
14. **Kikyo N, Wolffe AP**. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryos. J Cell Sci 2000; 120: 231-7.
15. **Liu L, Shin T, Draemer D, Westhusin ME**. High blastocyst development following nuclear transfer with fibroblast cells derived from a cloned fetus. Biol Reprod 2000; 62(suppl 1): 214.
16. **Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J**. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblast: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. Biol Reprod 2000; 62: 412-9.
17. **Nour MSM, Ikeda K, Takanahi Y**. Bovine nuclear transfer using cumulus cells derived from serum-starved and confluent cultures. J Reprod Dev 2000; 46: 85-92.
18. **Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respess D, et al**. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. Biol Reprod 2002; 66: 895-900.
19. **Prather RS, Boquest AC, Day BN**. Cell cycle analysis of porcine mammary cells. Cloning 1999; 1: 17-24.
20. **Boquest AC, Day BN, Prather RS**. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells used for nuclear transfer. Biol Reprod 1999; 60: 1013-19.

www.SID.ir

Archive of SID

21. **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA**. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Bio 1992; 119: 493-501.
22. **Katska L, Bochenek G, Kania B, Rynska , Smorag Z**. Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary culture estabilished for bovine cloning. Thriogenology 2002; 58: 1733-44.
23. **Lanza RP, Gibelli JB, Black Well C, Cristofalo VJ, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdrop PM, West MD**. Extension of cell life-span andtelomere length in animals cloned from senescent somatic cells. Science 2000; 288: 665-8.
24. **Campbell KH, Ritchie WA, Wilmut I**. Disappearance of maturation promoting factor and the formation of pronuclei in electrically activated in vitro matured bovine oocytes. Theriogenology 1993; 39: 199.
25. **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: 1277-89.
26. **Hayes O, Ramosb B, Rodr´ıguezb LL, Aguilara A, Bad´ıac T, Castroa 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: 181-92.
27. **Vacková I, Engelová M, Marinov I, Tománek M**. Cell cycle synchronization of porcine granulose cells in G1 stage with mimosine. Anim Reprod Sci 2003; 77: 235–45.
28. **Lalande M. A** reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle. Exp Cell Res 1990; 186: 332–9.

www.SID.ir