

اثر تعداد سلول‌های گرانولوزا در محیط کشت در بیان ژن آنزیم‌های مؤثر در ساخت هورمون‌های استروئیدی

عیسی دیرنده*

گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری-ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ دی ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۹ اسفند ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: سلول‌های گرانولوزا دارای نقشی کلیدی در مسیر استروئیدوسینتیز هستند. **هدف:** از مطالعه حاضر بررسی تراکم سلول‌های گرانولوزا کشت داده شده حاصل از فولیکول‌های ۵-۲ mm بر تراوش استرادیول و بیان ژن‌های مرتبط با ساخت استرادیول و پروژسترون بود. **روش کار:** به طور خلاصه، فولیکول‌های ۵-۲ mm از تخمدان گاوهای بالغ از کشتارگاه جمع آوری شدند، پس از جدا سازی و شمارش سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو ۰/۴٪، سلول‌های گرانولوزا در محیط DMEM/F۱۲ به مدت شش روز کشت داده شدند. تیمارها شامل (۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت، (۳) ۲۵۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و (۴) ۲۵۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت بود. داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها با استفاده از نرم افزار JMP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **نتایج:** در شرایطی که مقدار محیط کشت ثابت بود کاهش تعداد سلول‌ها (کاهش تراکم) منجر به افزایش غلظت استرادیول گردید و در شرایطی که تعداد سلول‌ها ثابت بود کاهش محیط کشت (افزایش تراکم) سبب کاهش غلظت استرادیول گردید. میزان پروتئین و RNA استخراجی تفاوتی بین تیمارها نداشت. با کاهش تراکم بیان ژن‌های β HSD17، FSHR، CYP19، افزایش و بیان ژن‌های β GADD45 و StAR کاهش یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد کاهش تراکم سلول سبب افزایش تولید استرادیول و همچنین افزایش mRNA کد کننده آنزیم‌های استروژنیک گردید ولی بالعکس سبب کاهش بیان mRNA کد کننده آنزیم‌های پروژستژنیک (Progestagenic) گردید. **نتیجه گیری نهایی:** غلظت پروتئین با کاهش تراکم سلول تغییر نکرد در نتیجه می‌توان سلول را از اثرات مضر افزایش تراکم محافظت کرد.

واژه‌های کلیدی: کشت سلول، سلول گرانولوزا، گاو هلشتاین، PCR، RIA

مقدمه

(۲۲). دینامیک فولیکولی و پدیدار شدن امواج فولیکولی در جنس مونث و گاو به نظر مشابه می‌باشد (۲۲). به دلیل اینکه تراوش استرادیول و بیان ژن CYP19 به غلظت‌های فیزیولوژیک FSH پاسخ می‌دهند و همچنین پایین بودن فراوانی mRNA کد کننده ژن StAR در طی دوره شش روزه کشت، به این سیستم، کشت غیر لوتئینه گفته می‌شود (۱۹). هر چند با وجود ظرفیت استروژنی این سلول‌ها، در مقایسه با تولید استرادیول مقدار بیشتری پروژسترون تولید می‌کنند (نسبت استرادیول/پروژسترون > ۰/۰۱). همانند نسبت استرادیول/پروژسترون در مایع فولیکولی که شاخصی است از آتزی فولیکول (۱۳، ۱۰). مطالعات بر روی کشت کوتاه مدت نشان داد سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های سالم (نسبت استرادیول/پروژسترون < ۱ در مایع فولیکولی) در طی ۲۴ ساعت استرادیول بیشتری نسبت به پروژسترون تولید می‌کنند. در نتیجه شرایط کشت طولانی مدت ممکن است به درستی الگوی رشد فولیکول‌های در حال رشد سالم نباشد (۱۴). لذا از هدف از مطالعه حاضر بررسی تراکم سلول‌های گرانولوزا کشت داده شده حاصل از فولیکول‌های ۵-۲ mm بر تراوش استرادیول و بیان ژن‌های مرتبط با ساخت استرادیول و پروژسترون بود.

مواد و روش کار

کشت سلول: تخمدان گاوهای بالغ از کشتارگاه جمع آوری گردید و در

نشخوار کنندگان، به ویژه گاو به دلیل اینکه الگوی رشد فولیکولی و بسیاری از گام‌های رشد در آنها مشابه با انسان است مدل‌های بسیار خوبی می‌باشند (۱، ۲). در شرایط درون تنی، بسیاری از ژن‌های آنزیم‌های استروژنیک در سلول گرانولوزا فولیکول‌های آنترودار کوچک گاو (۴ تا ۰/۴ mm) بیان نمی‌شوند (۱). تراوش استرادیول شاخصی از تخمک‌ریزی موفق فولیکول است. فزون بر نقش آن در رهاسازی غلیان پیش از تخمک‌ریزی گونادوتروپین‌ها، استرادیول فاکتور رشد، تمایز و زنده‌مانی داخل تخمدانی است. استرادیول از راه افزایش ظرفیت FSH در تحریک بیان گیرنده‌های LH، تمایز سلول گرانولوزا را تعدیل می‌کند (۱۹، ۱۶). پدیدار شدن گیرنده‌های LH در زمان انتخاب فولیکول در گاو، رشد و تمایز فولیکولی را افزایش داد (۲۱). در مطالعه‌ای بر روی رت به خوبی مشخص شده است که عملکرد سلول‌های گرانولوزا در زمانی که سلول لوتئینه می‌شود تغییر می‌کند که مهم‌ترین آن تغییر در بیان ژن سیتوکروم P450 اروماتاز (CYP19) و سیگنال پروتئین کیناز A در پاسخ به FSH می‌باشد (۸). به همین دلیل مدل‌های حیوانی برای بررسی سلول‌های گرانولوزا لوتئینه نشده مناسب به نظر می‌رسند (۶). در سلول گرانولوزا بیان ژن CYP19 و CYP11A1 در طی رشد فولیکولی افزایش می‌یابد (۲). در هر دو جنس، تخمک‌ریزی منفرد بوده و قطر فولیکول در گام‌های مختلف تکامل مشابه می‌باشد



شرکت کیازن استفاده شد. cDNA حاصل پس از اتمام کارها و حل نمودن آن در آب بدون یون و استریل، در دمای °C ۷۰- تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد. آغازگرهای مورد استفاده برای اطمینان از تکثیر با استفاده از یک cDNA و Real-time PCR و Applied (۳۰۰) و Biosystems, ABI Prism (کیت Quantifast SYBR Green PCR شرکت کیازن) استفاده شدند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت Real Time PCR انجام شدند. پس از تأیید توالی و صحت طول قطعه تولیدی با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI، آغازگرهای مورد نظر ساخته شدند (جدول ۱). برای استفاده بهینه از کیت، واکنش‌ها برای حجم ۲۵ µL تنظیم شدند (مسترمیکس سایبرگرین µL ۱۲/۵؛ جفت آغازگر اختصاصی µL ۱+۱؛ cDNA، ۱ µL آب دوبار تقطیر شده µL ۹/۵). سطوح mRNA ژن‌ها بر اساس بازدهی PCR و انحراف CT یک نمونه ناشناخته نسبت به کنترل با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برآورد شد. mRNA_{HYAFZ} به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت (راهنمای شرکت ABI، لیواک، ۲۰۰۳). کلیه نمونه‌ها با سه تکرار استفاده شدند.

اندازه‌گیری استرادیول: جهت اندازه‌گیری غلظت استرادیول در روزهای چهارم تا ششم؛ ۷۰٪ محیط کشت جمع‌آوری، و با محیط کشت جدید جایگزین گردید، و در روز ششم کل محیط کشت جمع‌آوری گردید. غلظت استرادیول در نمونه‌ها بر اساس روش رادیوایمونواسی (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX, USA) (۴) و با دو تکرار برای هر نمونه انجام گرفت. حساسیت استرادیول ۱۰ pg به ازای هر لوله بود.

تجزیه و تحلیل آماری: برای نرمال کردن داده‌های حاصل از بیان ژن از لگاریتم‌گیری استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) آنالیز واریانس انجام گردید، به طوری که اثر حیوان به عنوان اثر ثابت و تکرار کشت (هر هفته) به عنوان اثر تصادفی در تست F در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گردید.

نتایج

افزایش تراکم سلول باعث کاهش تراوش استرادیول گردید (نمودار ۱). نتایج نشان داد در شرایطی که مقدار محیط کشت ثابت بود کاهش تعداد سلول‌ها (کاهش تراکم) منجر به افزایش غلظت استرادیول گردید و در شرایطی که تعداد سلول‌ها ثابت بود کاهش محیط کشت (افزایش تراکم) سبب کاهش غلظت استرادیول گردید. غلظت استرادیول در تیمار ۲۵۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت نسبت به تیمارهای دیگر بیشینه بود. برای پی بردن به این سازوکار میزان RNA و پروتئین نیز محاسبه گردید. میزان پروتئین و RNA استخراجی تفاوتی بین تیمارها نداشت و تحت تأثیر تراکم سلول‌ها قرار نگرفت (جدول ۲). افزایش تراوش استرادیول که ناشی

محلول PBS، پنی سیلین (۱۰۰ U/mL) و استریتومایسین (۱۰۰ µg/mL) و در دمای °C ۳۵ به آزمایشگاه منتقل شد. سپس سلول‌های گرانولوزا بر اساس روش Gutierrez و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۹) و بر مبنای انتخاب فولیکول‌هایی با فنوتیپ استروژنی با حداقل لوتئینه شدن کشت داده شدند (۱۵). کلیه مواد به جز آنهایی که در متن اشاره شده است از شرکت اینوتروژن (برلینگتون، انتاریو، کانادا) خریداری شدند. به طور خلاصه برای کشت سلول‌ها، فولیکول‌های ۲-۵ mm گاوهای بالغ زیر هود قطعه قطعه شده و سپس در محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F۱۲)، سلول‌ها جدا و فیلتر گردید. محیط کشت پایه برای سلول‌ها DMEM/F۱۲ بوده که به آن بی کربنات سدیم (۱۰ Mm)، سلنیت سدیم (۴ ng/mL)، آلبومین سرم گاوی (۱۰٪)، پنی سیلین (۱۰۰ U/mL)، استریتومایسین (۱۰۰ µg/mL)، ترانسفرین (۲/۵ µg/mL)، ترکیب اسیدهای آمینه غیر ضروری (۱ mM)، فانگیزون (۱ mg/mL) و اندروستندایون (۷-۱۰ M) اضافه گردید. پس از سه مرحله سانتریفیوژ و دور ریختن سطح بالایی، به رسوب پایین لوله که حاوی سلول‌ها بود ۱۰ mL محیط کشت DMEM/F۱۲ پایه اضافه گردید (۴) و سپس با استفاده از تریپان بلو ۰/۴٪ تعداد سلول‌ها شمارش شدند و در پلت ۲۴ تایی (۶×۴) در چهار تیمار قرار گرفتند. تیمارها شامل ۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، ۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت، ۳) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و افزودن استرادیول از روز دوم کشت و ۴) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت و افزودن استرادیول از روز دوم کشت بود. پلیت‌ها درون انکوباتور، با پنج٪ دی اکسید کربن در دمای °C ۳۷ با بیشینه رطوبت نسبی (۹۸٪) برای شش روز کشت داده شدند و هر یک روز در میان ۷۰۰ µL از محیط کشت با محیط کشت جدید جایگزین گردید. در روزهای صفر، دوم و چهارم به تمامی تیمارها انسولین گاوی اضافه شد. علاوه بر آن جهت رشد سلول‌ها، در روزهای دوم و چهارم هورمون FSH گاوی (۱ ng/mL) به محیط کشت اضافه شد. در تیمارهای حاوی استرادیول در روز دوم و چهارم ۱۰ ng/mL استرادیول به محیط کشت اضافه گردید. کشت فوق با شرایط مشابه در سه هفته متوالی تکرار گردید.

استخراج RNA و Real-Time RT-PCR: استخراج RNA با استفاده از تریزول و بر مبنای دستورالعمل شرکت سازنده (اینوتروژن) صورت گرفت. به منظور رفع آلودگی ناشی از وجود DNA، ابتدا یک واحد DNase به RNA اضافه گردید و در دمای °C ۳۵ برای پنج دقیقه انکوبه شد سپس به مدت سه دقیقه در دمای °C ۶۵ انکوبه شد. RNA سپس در حضور الیگو dT (۱ mmol/L)، آمینوسکرپیتاز (۴ واحد، کیازن)، dNTP و RNase (۲۵ mmol/L)، مهارکننده RNase (۱۹/۳۳ واحد) در حجم ۲۰ µL در دمای °C ۳۷ به مدت ۱ ساعت و سپس برای ۵ دقیقه در °C ۹۵ انکوبه شد. برای تهیه cDNA از کیت Quantifast Revers-Transcriptase



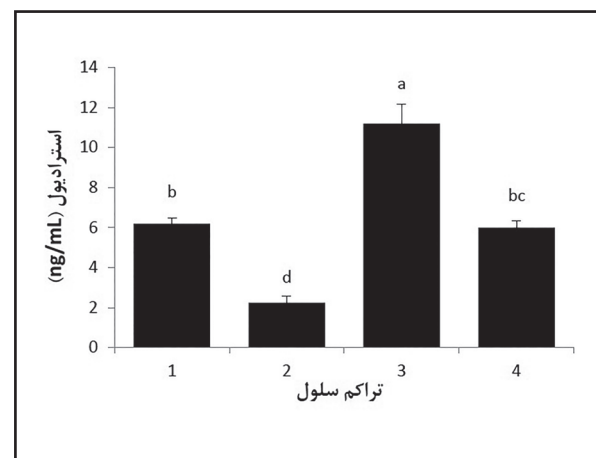
جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده.

Forward (۳-۵)	Reverse (۳-۵)	ژن
GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	HYAFZ
TGTGGTACTCATTACCGGCTGTT	CAGCGTGGCATAACACTTTGAA	۱۷βHSD
GACTCTCAT GAATTCTCCATACATCT	GGACTAG TAATGAGGGGCCCAATTCCCAGA	CYP۱۹
AGCCCCCTGTCACTCAACTCTATGTC	GTTCTCACCGTGAGGTAGATGT	FSHR
CCCAGCAGAAGG GTG TCA TC	TGC GAG AGG ACC TGG TTG AT	StAR
TACGAGTCGGCCAAGCTGAT	GTCTCTCTTCTCTCGTCGAT	GADD۴۵β

شده از فولیکول‌های ۲-۵ mm پرداخته است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد کاهش تراکم سلول سبب تحریک تراوش استرادیول شد با توجه به این نکته طراحی مناسب کشت سلول از نظر تراکم سلولی به برقراری تعادل در زنده‌مانی و تکثیر سلول و در نهایت استروئیدوژنز کمک خواهد کرد. در مطالعات گاوی دامنه گسترده‌ای از تراکم سلولی در کشت‌های مختلف گزارش شده است از ۲۰۰ هزار سلول به ازای ۱ mL در پلت ۲۴ تایی (۹) تا ۱ میلیون سلول به ازای ۱ mL در پلت ۲۴ تایی (۲۱). در شرایط کشت شش روزه نسبت استرادیول به پروژسترون در سلول‌های گرانولوزا جدا شده از فولیکول‌های کوچک ۰/۸ بود (۲۳). نسبت بالاتر استرادیول به پروژسترون تنها در مطالعه بر روی فولیکول‌های بزرگ (< ۸ mm) و در کشت‌های کوتاه مدت (۲۴ تا ۴۸ ساعت) گزارش شده است (۱۱، ۱۴، ۲۰). چون سلول‌های جدا شده از فولیکول‌های بزرگ تمایز یافته‌اند و نمی‌توانند بیشتر از ۴۸ ساعت در محیط کشت بدوم سرم زنده بمانند لذا فولیکول‌های بزرگ مدل خوبی برای این گونه مطالعات نبوده و بالعکس استفاده از فولیکول‌های ۲-۵ mm می‌تواند مدلی مناسب باشد. کاهش در تراوش استرادیول با کاهش mRNA کد کننده گیرنده FSH همراه بود که این امر می‌تواند کاهش در فراوانی سطوح mRNA کد کننده CYP۱۹ و ۱۷βHSD را توجیه نماید زیرا هر دو آنها وابسته به FSH هستند (۱۹). در مقابل، mRNA کد کننده ۳βHSD و StAR وابسته به FSH نیستند (۲۱) و با افزایش تراکم سلول تحریک می‌شوند (۲۴). کاهش در mRNA کد کننده گیرنده FSH و آنزیم‌های استروژنیک و افزایش mRNA کد کننده آنزیم‌های پروژسترنیک که در اثر افزایش تراکم دیده شد از ویژگی‌های سلول‌های گرانولوزا که لوتهینه شده در آنها آغاز شده است (۱۷). Fitzpatrick و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش کردند تراوش استرادیول و بیان CYP۱۹ به میزان قابل توجهی در سطوح بالای LH کاهش پیدا کردند در حالیکه در اثر افزودن FSH افزایش یافتند. پیشنهاد شده که FSH به طور طبیعی سبب افزایش اندک در cAMP داخل سلولی می‌شود که سبب افزایش بیان CYP۱۹ می‌شود در حالی که LH سبب افزایش بیشتر cAMP شده که در نهایت منجر به لوتهینه شدن و کاهش بیان CYP۱۹ می‌شود. همچنین پیشنهاد شده است غلظت‌های بیشتر LH سبب فعال شدن مسیر پیامبر ثانویه پروتئین کیناز C شده و به دنبال آن کاهش بیان CYP۱۹ را به دنبال خواهد داشت (۷).

جدول ۲. مقدار پروتئین و RNA استخراجی از سلول‌های گرانولوزای کشت داده شده. (a, b, c, d) میانگین‌هایی که حرف مشترک انگلیسی ندارند، دارای اختلاف معنی‌دارند ($p < 0.05$).

تیمارها	پروتئین (μg)	RNA (pg)
۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت	۵۵±۹	۶۸±۹۱
۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت	۵۹±۶	۷۰±۷۶
۲۵۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت	۷۰±۱۳	۹۰±۱۱۰
۲۵۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت	۶۵±۸	۸۵±۳۰
p Value	۰/۶۹	۰/۴۵



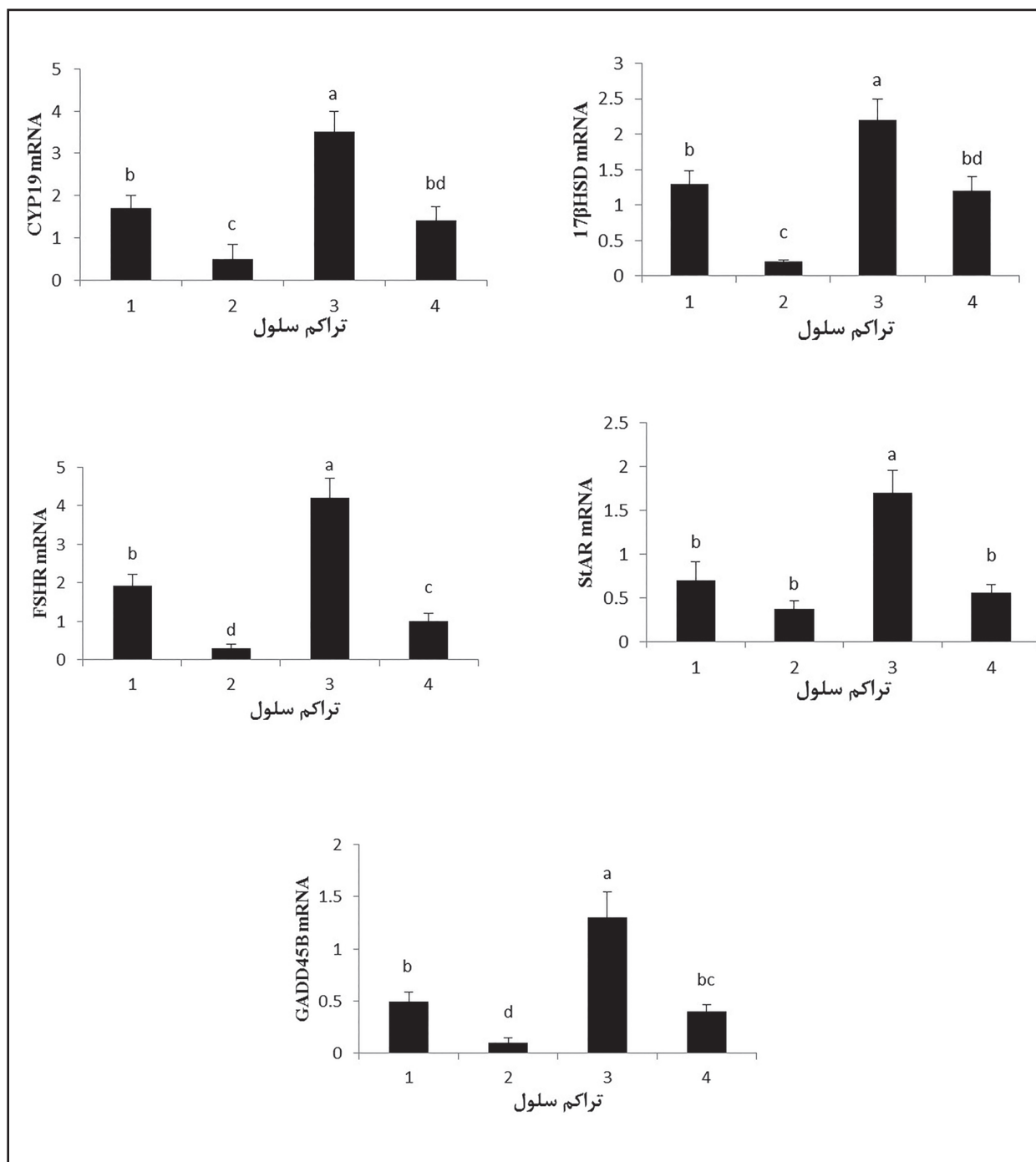
نمودار ۱. غلظت استرادیول در تراکم‌های متفاوت سلول‌های گرانولوزا کشت داده. (۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL کشت، (۳) ۲۵۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و (۴) ۲۵۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت. (a, b, c, d) میانگین‌هایی که حرف مشترک انگلیسی ندارند، دارای اختلاف معنی‌دارند ($p < 0.05$).

از کاهش تراکم بود با افزایش بیان ژن‌های CYP۱۹، FSHR، ۱۷βHSD و کاهش بیان ژن StAR در ارتباط بود. بیان ژن GADD۴۵β که با مرگ سلول در ارتباط است با افزایش تراکم سلول افزایش یافت (نمودار ۲).

بحث

نتایج این مطالعه اهمیت تراکم سلول‌های گرانولوزا گاوی جدا شده از فولیکول‌های ۲-۵ mm را بر قابلیت تولید استرادیول و تعادل مسیرهای ساخت استروژنیک و پروژسترنیک و بیان mRNA کد کننده آنزیم‌های مؤثر در مسیر استروئیدوژنیز نشان داد. بر اساس یافته‌های ما این مطالعه اولین مطالعه‌ای است که به بررسی اثرات تراکم سلول‌های گرانولوزا جدا





نمودار ۲. بیان نسبی ژن آنزیم‌های استروژنیک و پروژسترنیک در تراکم‌های متفاوت سلول‌های گرانولوزا کشت داده. (۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت، (۳) ۲۵۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و (۴) ۲۵۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت. (a, b, c, d) میانگین‌هایی که حرف مشترک انگلیسی ندارند، دارای اختلاف معنی‌دارند ($p < 0.05$).

گزارش کردند تنش ناشی از افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا فولیکول بزرگ‌تر از ۸ mm نرخ مرگ و میر سلولی را افزایش داد. عدم تفاوت در میزان RNA استخراجی به احتمال به دلیل محلول‌های استفاده شده و تفاوتی است که بین سلول‌های مختلف وجود دارد. میزان RNA استخراجی اگرچه اطلاعاتی در مورد سلول به ما نمی‌دهد ولی از جنبه کاربردی دارای اهمیت بسیاری است. یافته‌های این مطالعه محدود به نشخوارکنندگان

افزایش تراکم سلول سبب افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های استخراجی در پایان کشت شد. همانطور که مقدار کل پروتئین سلول نشان داد. سطح mRNA کدکننده GADD45β با افزایش تراکم سلول افزایش یافت. GADD45β که در پاسخ به تنش در بسیاری از سلول‌ها بیان آن افزایش می‌یابد می‌تواند بخشی از یک سازوکار محافظتی سلول باشد (۱۲). نتایج حاضر مشابه با مطالعه Vallerio و همکاران در سال ۲۰۱۰ بود که



References

1. Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C., Ginther, O.J. (1992) Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94: 177–88.
2. Baerwald, A.R., Adams, G.P., Pierson, R.A. (2003) Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod.* 69: 1023–31.
3. Bar-Ami, S., Gitaxy-Goren, H. (1993) Altered steroidogenic activity of human granulosa-lutein cells at different cell densities in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 90: 157–64.
4. Belanger, A., Couture, J., Caron, S., Roy, R. (1990) Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Ann NY Acad Sci.* 595: 251–9.
5. Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Webb, R. (1996) Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil.* 106: 7–16.
6. Campbell, B.K., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P. (2003) Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl.* 61: 429–43.
7. Franks, S., Stark, J., Hardy, K. (2008) Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 14: 367–78.
8. Gonzalez-Robayna, I. J., Alliston, T. N., Buse, P., Firestone, G.L., Richards, J.S. (1999) Functional and subcellular changes in the A-kinase–signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol.* 13: 1318–37.
9. Gutierrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R. (1997) Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 56: 608–16.
10. Grimes, R.W., Ireland J.J. (1986) Relationship of

نیست در سلول‌های گرانولوزا الوتئینه شده انسان، استرادیول و پروژسترون با افزایش تراکم سلول کاهش نشان داد (۳) هرچند در مورد نسبت استرادیول به پروژسترون پاسخ متناقض است (۱۵).
به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد کاهش تراکم سلول سبب افزایش mRNA کد کننده آنزیم‌های استروژنیک، کاهش بیان mRNA کد کننده آنزیم‌های پروژستژنیک و افزایش تولید استرادیول شد.

تشکر و قدردانی

نویسنده از همکاری سرکار خانم طناز صابری فر و سرکار خانم عاطفه عابدینی دانشجویان کارشناسی ارشد دانشگاه تهران در طول این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می‌نماید.

macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biol Reprod.* 35: 725–32.

11. Henderson, K.M., McNatty, K.P., Smith, P., Gibb, M., O’Keeffe, L.E., Lun, S. (1987) Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil.* 79: 185–93.
12. Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2009) GADD45 modulation of intrinsic and extrinsic stress responses in myeloid cells. *J Cell Physiol.* 218: 26–31.
13. Ireland, J.J., Roche, J.F. (1983) Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.* 112: 150–6.
14. Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J. (2002) Development and validation of a shortterm, serum-free culture system for bovine granulosa cells: evaluation of the effects of somatotropin and growth hormone-releasing factor on estradiol production. *J Dairy Sci.* 85: 68–78.
15. Lambert, A., Harris, S.D., Knaggs, P., Robertson, W.R. (2000) Improved FSH sensitization and aromatase assay in human granulosa-lutein cells. *Mol Hum Reprod.* 6: 677–80.
16. Lindeberg, M., Carlstrom, K., Ritvos, O., Hovatta, O. (2007) Gonadotrophin stimulation of nonluteinized granulosa cells increases steroid



- production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod.* 22: 401–6.
17. Murphy, B.D. (2000) Models of luteinization. *Biol Reprod.* 63: 2–11.
 18. Rosenfeld, C.S., Wagner, J.S., Roberts, R.M., Lubahn, D.B. (2001) Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction.* 122: 215–226.
 19. Sahmi, M., Nicola, E.S., Silva, J.M., Price, C.A. (2004) Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in nonluteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 223: 43–54.
 20. Sen, A., Bettgowda, A., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J., Smith, G.W. (2007) Cocaine and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells. *Endocrinology.* 148: 4400–10.
 21. Silva, J.M., Price, C.A. (2000) Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod.* 62: 186–91.
 22. Sirois, J., Fortune, J.E. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 39: 308–17.
 23. Vallerio, P.M., Gustavo, Z., Price, C.A. (2010) Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertil Steril.* 93: 2050–2055.
 24. Zheng, X., Price, C.A., Tremblay, Y., Lussier, J. G., Carriere, P.D. (2008) Role of transforming growth factor- β 1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells. *Reproduction.* 136: 447–57.



Effect of number of culture medium granulosa cells on gene expression of enzymes associated with synthesis of steroid hormones

Dirandeh, E.*

Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari-Iran

(Received 8 January 2015, Accepted 17 March 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Granulosa cells have a key role during oestrogenesis. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to determine the effect of number of culture medium granulosa cells on estradiol concentrations and mRNA coding estrogenic and progestagenic enzyme. **METHODS:** Briefly, follicles between 2 and 5 mm diameter were dissected from the ovaries of adult cows and were collected by rinsing the follicle walls with Dulbecco Modified Eagle medium/F12 (DMEM/F12). The number of cells was counted with a haemocytometer and the viable cells were assessed by the dye exclusion method using 0.4% Trypan Blue. Treatments were 1) 500,000 cell/500 ml, 2) 250,000 cell/500 ml, 3) 500,000 cell/200 ml 4) 250,000 cell/ 200 ml. All data were analyzed by JMP (SAS). **RESULTS:** Low plating density increased E2 secretion and mRNA encoding LHR, FSHR and estrogenic enzymes (17 β HSD, CYP19), whereas decreased mRNA encoding GADD45 β . There were no differences among treatments for RNA and protein concentration. Low plating density also decreased protein amount but there was no difference among treatments for RNA amount. In conclusion, decreased cell density cause increase in mRNA encoding estrogenic enzyme gene expression and decrease in mRNA encoding progestagenic enzyme gene expression. **CONCLUSIONS:** Protein concentrations did not change with decreased cell density therefore we can save cells against harmful effect of increasing cell density.

Keyword: cell culture, granulosa cell, Holstein cow, PCR, RIA

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used.

Table 2. Total RNA and protein isolated from cultures granulosa cells. Values with different superscripts. ^(a, b) differ significantly ($p < 0.05$).

Graph 1. Estradiol concentrations in different cultured granulosa cell densities. 1- 0.5×10^6 cell/ 500 mL, 2- 0.5×10^6 cell/ 200 mL, 3- 0.25×10^6 cell/ 500 mL, 4- 0.25×10^6 cell/ 200 mL. Values with different superscripts. ^(a, b) differ significantly ($p < 0.05$).

Graph 2. Relative gene expression of estrogenic and progestagenic enzyme in different cultured granulosa cell densities. 1- 0.5×10^6 cell/ 500 mL, 2- 0.5×10^6 cell/ 200 mL, 3- 0.25×10^6 cell/ 500 mL, 4- 0.25×10^6 cell/ 200 mL. Values with different superscripts. ^(a, b) differ significantly ($p < 0.05$).



*Corresponding author's email: dirandeh@gmail.com, Tel: 011-33822741, Fax: 011-33922741

J. Vet. Res. 70, 2:155-161, 2015