

بررسی چرخه سلولی، بیان ژن‌های میوژنیک و فاکتور رشد سلول‌های میوبلاست جنینی گوسفند با ازدیاد بیان ژن فولیستاتین

محمود نظری Ph.D.^۱، فاطمه ثعلبی Ph.D.^۲، لیشین دو Ph.D.^۲

۱- دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه علوم دامی، اهواز، ایران
 ۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، اهواز، ایران
 ۳- مرکز ملی ژنتیک و اصلاح دام، آکادامی علوم کشاورزی، پکن، چین.
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: M.nazari@ramin.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات ازدیاد بیان ژن فولیستاتین بر چرخه سلولی، بیان ژن‌های میوژنیک و فاکتور رشد سلول‌های میوبلاست جنینی گوسفند در محیط آزمایشگاه بود که با استفاده از ویروس AAV سروتیپ ۲ حمل‌کننده فولیستاتین انجام شد. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های میوبلاست جنینی به‌دست آمده از جنین‌های ۶۰ روزه گوسفند در محیط رشد و تمایز، کشت داده شدند. میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر، به‌عنوان شاخص تکثیر در سلول‌های ترانسفکت شده با ویروس AAV2 حمل‌کننده فولیستاتین، بررسی شد. در نهایت بیان ژن‌های میوژنیک، Myo D، CDK2، Myf 5، p57 و p21 با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR اندازه‌گیری شد.

نتایج: میزان جذب نور (در ۴۵۰ نانومتر) در سلول‌های آلوده شده با ویروس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که این موضوع نشان‌می‌دهد که فولیستاتین می‌تواند تکثیر را افزایش دهد. ازدیاد فولیستاتین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Akt 1 و CDK2 و کاهش بیان ژن p21 در شرایط تکثیر شد. نتایج ریل تایم نشان داد که بیان ژن‌های میوژنیک، Myo D، Myf 5، p57 و p21 تحت شرایط تمایز با ازدیاد فولیستاتین افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که ازدیاد فولیستاتین سبب افزایش تکثیر سلول میوبلاست از طریق بیان ژن p21 و افزایش تمایز سلول‌های میوبلاست از طریق افزایش بیان ژن‌های میوژنیک می‌شود.

واژگان کلیدی: ریل تایم qPCR، فولیستاتین، ژن‌های میوژنیک، میوبلاست جنینی گوسفند

مقدمه

در گذشته از روش‌هایی همچون تزریق درون پیش هسته و انتقال هسته سلول سوماتیک جهت تولید حیوانات تراریخته استفاده می‌شد. این روش‌ها در بعضی گونه‌ها کارآمد نیستند و ریسک و هزینه بالایی دارند و فرزندان غیر نرمال در این روش‌ها ایجاد شده است (۱). اخیراً انتقال ژن به واسطه ویروس‌ها برای تولید حیوانات تراریخته استفاده می‌شود و ناقل‌های ویروسی یک مکانیسم کارآمد و جایگزین برای انتقال ژن را فراهم می‌آورند. اگرچه هنوز مباحث جنجال‌برانگیزی در مورد استفاده از رترو ویروس‌ها، لنتی ویروس‌ها و آدنوویروس‌ها جهت انتقال ژن وجود دارد (۲). در مقایسه با دیگر ویروس‌ها، ناقل‌های نوترکیب بوجود آمده بر پایه آدنوویروس‌ها کارایی بیشتری داشته و قادرند سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده را آلوده کنند و ریسک کمتری دارند (۳). ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌های (AAV) انسانی در سال ۱۹۶۵ به‌عنوان یک آلودگی در محتویات حاوی آدنوویروس‌ها کشف شدند (۴). آدنوویروس‌ها برای آلوده نمودن، نیاز به یک کمک یار (Helper) دارند و به‌همین دلیل سروتیپ‌های AAV در یک جنس جداگانه از خانواده پاروو ویریده (Parvoviridae family) به‌نام دیپن‌دو ویروس (Dependovirus) تقسیم‌بندی می‌شوند. این ویروس‌ها دارای یک ژنوم DNA خطی تک رشته‌ای به‌طول تقریبی ۴/۷ کیلوباز می‌باشند که می‌توانند در کروموزوم ۱۹ انسان در یک جایگاه اختصاصی به‌صورت تکراری یا غیرتکراری وارد شوند (۵). آدنوویروس‌ها می‌توانند برای آلوده نمودن محدوده زیادی از میزبان‌ها بدون تحریک سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گیرند (۶). چون AAV یک ویروس وابسته است، محدودیت‌های رترو ویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها را ندارد. به‌همین دلیل از AAV جهت ژن درمانی در انسان استفاده شده است (۷). ژنوم نوترکیب AAV می‌تواند در داخل کروموزوم میزبان وارد شده و یک روش انتقال ژن طولانی مدت پایدار را ایجاد کند (۸).

ناقل‌های تولیدی بر پایه AAV، بافت‌های سوماتیکی زیادی همچون ماهیچه‌های اسکلتی را آلوده می‌کنند (۹). ویروس AAV دارای سروتیپ‌های زیادی است. تاکنون ۱۱ سروتیپ از این ویروس شناسایی شده است (۱۰). مشهورترین سروتیپ این ویروس سروتیپ نوع ۲ است (AAV2) که به‌طور وسیعی جهت انتقال ژن در سلول‌های ماهیچه‌ای صاف (۱۱) و سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی (۱۲) به‌کارگرفته شده است. گزارش‌های اخیر نشان داده که AAV قادر است که ژن فولیستاتین را در کروموزوم میزبان وارد کرده و در طولانی مدت آن را بیان کند (۱۳-۱۴). فولیستاتین به‌عنوان یک ممانعت کننده قوی برای خانواده TGF- β از جمله میوستاتین شناخته می‌شود (۱۵). مطالعات نشان داده که فولیستاتین قادر است با سد کردن مسیر میوستاتین سبب افزایش جرم ماهیچه شود (۱۶). همچنین میوستاتین می‌تواند با فعال کردن مسیر p21 و smad سبب کاهش تکثیر و تمایز میوبلاست شود (۱۷-۱۸). مطالعات اخیر به‌طور قابل توجهی بر مهار میوستاتین متمرکز شده‌اند که در نتیجه سبب تولید گاو‌هایی با ماهیچه‌های بیشتر (۱۹) و موش‌هایی با ماهیچه‌های بزرگ دارای میوستاتین معیوب (۲۰) شده است. چون گوسفند یک حیوان مهم اقتصادی است تولید گوسفندان دارای ماهیچه بیشتر می‌تواند ارزش اقتصادی زیادی داشته باشد. انتقال ژن فولیستاتین در گوسفند با استفاده از ناقل لنتی ویروس گزارش شده است (۲۱) اما به‌واسطه ویروس AAV گزارش نشده است. هدف از این مطالعه تولید یک ناقل ویروس AAV نوترکیب سروتیپ ۲ حمل‌کننده فولیستاتین جهت بررسی اثرات فولیستاتین بر تکثیر و تمایز سلول‌های میوبلاست جنینی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود. در مطالعه حاضر، این فرضیه که ویروس AAV حمل‌کننده فولیستاتین می‌تواند سبب تحریک تکثیر و تمایز سلولی شود مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌های میوبلاست جنینی از یک جنین ۶۰ روزه به‌دست آمد که جهت تهیه این سلول‌ها از دستورالعمل Hembree

و همکاران (۲۲) استفاده شد. محیط کشت عمومی مورد استفاده (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) بود که جهت تهیه محیط کشت رشد (Growth Media)، ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum)، به همراه آنتی بیوتیک مناسب اضافه شد. جهت تهیه محیط کشت تمایز (Differentiation Media) ۲ درصد سرم اسب (Horse serum) به همراه آنتی بیوتیک مناسب اضافه شد. جهت کلون سازی فولیستاتین در ناقل pAAV-IRES-GFP (خریداری شده از شرکت Agilent Technologies) از پرایمرهای پیش‌ساز AAGAATTCCTCAGGATGGCCCGTCCTA 3'5' دارای جایگاه برش برای آنزیم EcoR I و پیرو-5' GCTCGAGGGTTTTCCACTCTAGAATGGA 3' دارای جایگاه برش برای آنزیم XhoI استفاده شد. این دو جایگاه برش جهت کلون سازی قطعه‌ای به طول ۱۰۳۵ جفت بازی در ناقل لازم است. وکتور نهایی دارای فولیستاتین، pAAV-CFS-FLAG نام گذاری شده است. این وکتور هم دارای توالی کدکننده GFP است که برای شناسایی سلول توسط میکروسکوپ فلورسنت دار مناسب است و هم دارای دم FLAG می‌باشد که برای شناسایی پروتئین تولیدشده توسط این وکتور با استفاده از تکنیک

وسترن بلات مناسب می‌باشد. در این آزمایش سلول‌های ترانسفکت نشده به‌عنوان کنترل و سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل pAAV-GFP به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از تهیه ناقل پلاسمیدی، با استفاده از کیت Adeno-Associated Virus Purification Mega Kit (ViraBind™) ذرات ویروس در سلول‌های HEK 293 تهیه و خالص سازی شد. پس از تهیه ذرات ویروس، جهت آلوده سازی سلول‌ها با ویروس از کیت AAV Transduction Kit (ViraDuctin™) شرکت Cell Biolabs استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت GeneJET RNA Purification Kit شرکت فرمنتاز انجام شد. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ترمو) محاسبه شد و چنانچه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بالای ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند. برای ساخت cDNA، از کیت Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت فرمنتاز استفاده شد. توالی و خصوصیات آغازگر ژن اختصاصی و ژن خانه‌دار در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: نام، توالی و مشخصات ژن اختصاصی و ژن خانگی برای انجام Real time qPCR.

ژن	آغازگرها	طول محصول	دمای اتصال
P21	F: 5'-GCAGACCAGCATGACAGATTT-3' R: 5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA-3'	۷۰	۵۸
P57	F: 5'-CGCCGCACCTTTCCCATG-3' R: 5'-CCCAGCATGGCATGTCCA-3'	۱۶۶	۵۹
Myo D	F: 5'-CGACTCGGACGCTTCCAGT-3' R: 5'-GATGCTGGACAGGCAGTCGA-3'	۱۸۱	۶۰
Akt I	F: 5'-CAGCATCGTGTGGCAGGAC-3' R: 5'-TCTTGGTCAGGTGGCGTAA-3'	۱۳۸	۶۰
CDK2	F: 5'-CATGGATGCCTCTGCACTCACTG-3' R: 5'-AGGACCCGATGAGAGTGGCAGAA-3'	۱۰۲	۶۰
Myf5	F: 5'-ACCAGCCCCACCTCAAGTTG-3' R: 5'-GCAATCCAAGCTGGATAAGGAG-3'	۱۵۰	۶۰
Myogenin	F: 5'-GTGCCAGTGAATGCAGCTC-3' R: 5'-GTCTGTAGGGTCCGCTGGGA-3'	۱۱۱	۶۰
Myo D	F: 5'-CGACTCGGACGCTTCCAGT-3' R: 5'-GATGCTGGACAGGCAGTCGA-3'	۱۸۱	۶۰

برای انجام Real time PCR از دستگاه BIO-RAD iQ5 ساخت شرکت Applied Biosystem آمریکا استفاده شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از Master mix SYBER Green ساخت شرکت ABI آمریکا صورت گرفت. در این آزمایش qPCR طبق دستورالعمل جدول ۲ در ۴۰ سیکل انجام شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در

این پژوهش روش $\Delta\Delta CT$ (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن GAPDH بود. در روش مقایسه‌ی نسبی تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول: $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد (۲۳). بررسی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS و آزمون t در سطح معنی‌داری ۱ درصد انجام شد.

جدول ۲: دستورالعمل دمایی Real-time qPCR

نام سیکل	تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	توضیح
سیکل اول	1 X	۲ دقیقه	۵۵	
سیکل دوم	1 X	۱۰ دقیقه	۹۵	
سیکل سوم				
		۱۵ ثانیه	۹۵	دناتوره شدن
	40 X	۳۰ ثانیه	متغیر	اتصال
		۳۰ ثانیه	۷۲	تکثیر
سیکل چهارم	51 X	۱۰ ثانیه	۷۰-۹۵	تهیه نمودار ذوب

تصاویر از رنگ‌آمیزی به‌وسیله گیمسا استفاده شد و توسط میکروسکوپ فلورسنس (ECLIPSE TE2000-U) شرکت نیکون (توکيو، ژاپن) تصاویر تهیه شد. جهت بررسی میزان ادغام هسته سلولی و تمایز سلولی نیز از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. در این روش درصد ادغام هسته‌ای به‌صورت نسبت تعداد هسته‌هایی که برای تشکیل لوله‌های ماهیچه‌ای با هم ادغام می‌شوند به کل هسته‌ها تعریف می‌شود.

نتایج

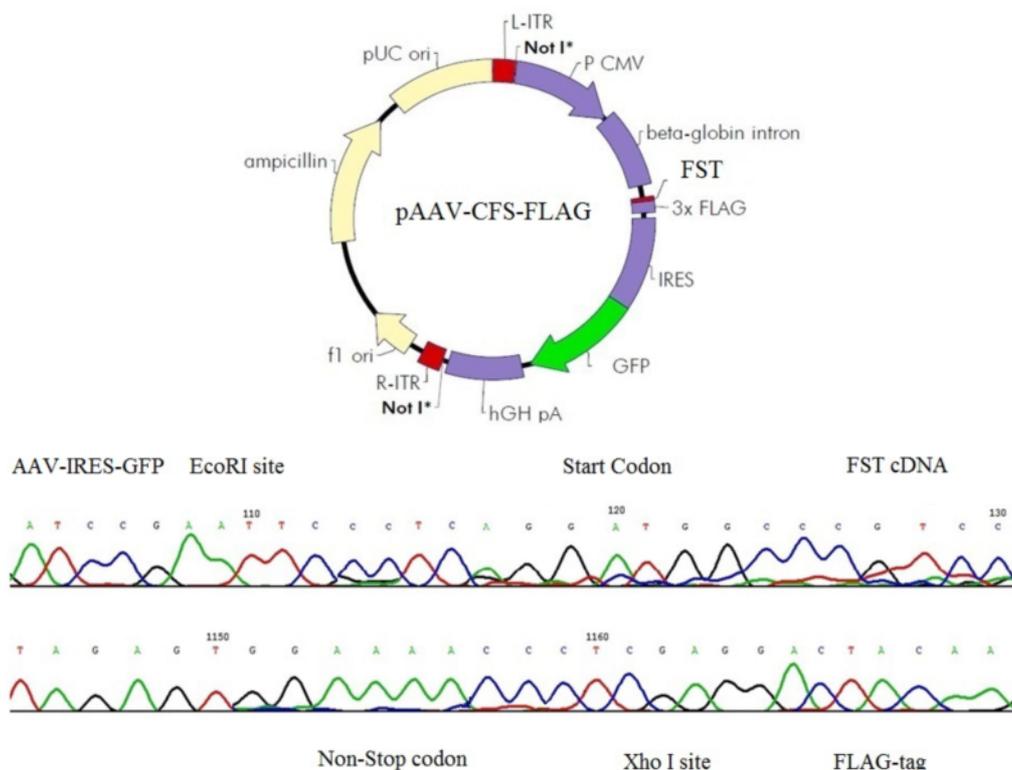
تکثیر سلولی

نتایج توالی‌یابی ذکر شده در شکل ۱ نشان داد که ژن فولیستاتین در ساختار ناقل قرار گرفته است و نتایج وسترن بلات (نتایج ارائه نشده است) نشان داد که فولیستاتین در سلول میوبلاست گوسفند بیان می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان جذب نوری در ۴۵۰

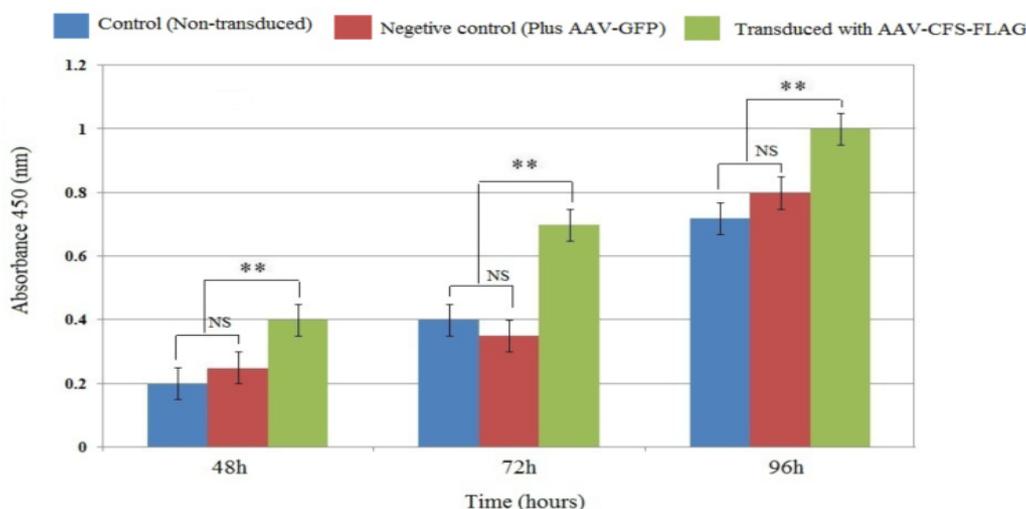
جهت آنالیز چرخه سلولی، سلول‌ها ابتدا در محیط رشد، کشت شدند. سپس رنگ‌آمیزی با استفاده از پروپیدیوم دیدید انجام گرفت. با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر BD FACS Calibur flow cytometer از شرکت Biosciences میزان سلول‌ها در مرحله G1، S و G2 اندازه‌گیری شد.

جهت بررسی تکثیر سلولی میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Spectra Max M5 microplate reader ثبت می‌شود. ابتدا سلول‌ها کشت داده می‌شوند و پس از گذشت ۱۶ ساعت با ویروس آلوده می‌شوند. سلول‌های آلوده شده به مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری می‌شوند و میزان جذب نوری در طول این دوره‌ها با کمک Cell-Counting Kit-8 reagents (CCK-8) اندازه‌گیری می‌شود. جهت تهیه

نانومتر برای تیمار ترانسفکت شده با ویروس در مقایسه با گروه کنترل بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت افزایش یافته است.



شکل ۱: نقشه ژنتیکی ناقل پلاسمیدی نو ترکیب pAAV-CFS-FLAG شامل فولیستاتین (FST)



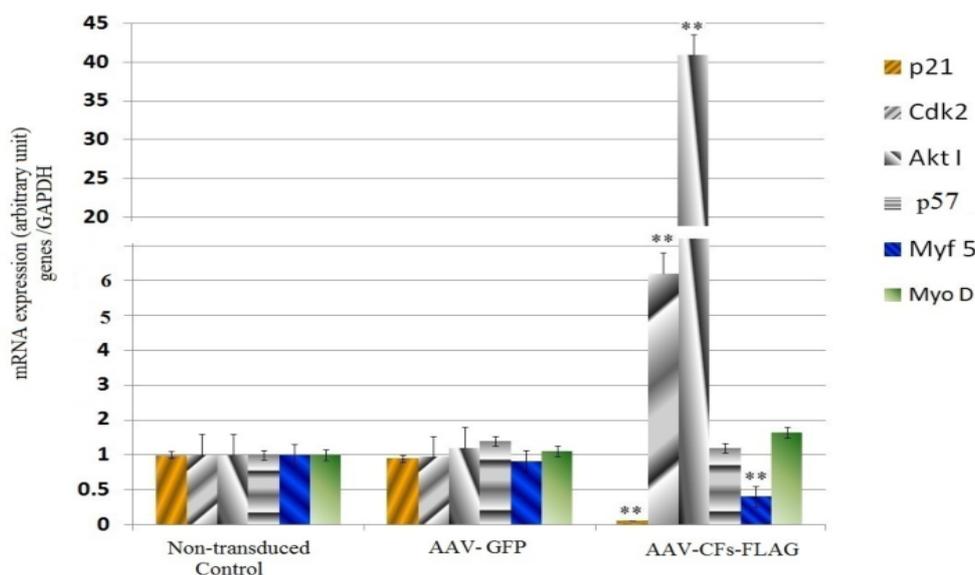
شکل ۲: میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر برای گروه کنترل (رنگ آبی)، گروه کنترل منفی (رنگ قرمز) و گروه ترانسفکت شده با ویروس AAV-CFS-FLAG (رنگ سبز) بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت رشد در محیط کشت نشان داده شده است. داده‌ها در سطح معنی‌داری یک درصد آنالیز شدند و دو ستاره نشان‌دهنده سطح معنی‌داری یک درصد و NS نشان‌دهنده عدم معنی‌داری است.

بیان ژن‌های p21, p57, Myo D, AktI, CDK2 و Myf5 با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR در سطح رونویسی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج نشان داد که

در این آزمایش، RNA کل از سلول‌های میوبلاست جنینی گوسفند آلودن شده با ویروس AAV حامل فولیستاتین، استخراج شد تا اثر ازدیاد فولیستاتین بر میزان

نتایج ریل تایم نشان داد که بیان ژن Myf5 به میزان ۲/۵ برابر در مقایسه با کنترل کاهش یافته است. همچنین، افزودن فولیستاتین تاثیر معنی داری بر بیان ژن‌های Myo D و p57 نداشت.

فولیستاتین سبب کاهش بیان ژن p21 به میزان ۱۲/۵ برابر و افزایش ۶/۱ برابری در ژن CDK2 شد. همچنین مشخص شد که بیان ژن Akt I به طور چشم گیری به میزان ۴۱ برابر افزایش یافت (شکل ۳). این در حالی است که



شکل ۳: اثر ازدیاد فولیستاتین بر بیان ژن‌های p21, p57, Myf 5, Akt I, Myo D, Myf 5, Cdk 2. اثر ازدیاد فولیستاتین بر بیان ژن‌های p21 و p57 در محیط کشت رشد با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR، داده‌ها در سطح معنی داری یک درصد آنالیز شدند و دو ستاره نشان دهنده معنی داری یک درصد می‌باشد.

نسبت به گروه کنترل در مرحله G1 (مرحله رشد) به طور معنی داری کاهش و در مرحله S (مرحله سنتز) افزایش یافته است.

چرخه سلولی

نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان داد که درصد سلول‌ها در تیمارهای آلوده شده با AAV2 حامل کننده فولیستاتین

جدول ۳: درصد سلول‌های آلوده شده با ویروس AAV حامل کننده فولیستاتین در مرحله G1, G2/M و S

تیمار	G1 (%)	G2 /M (%)	S (%)
کنترل	85.45± 2.12 ^a	5.32± 0.87 ^b	9.23± 1.60 ^c
کنترل منفی (آلوده شده با AAV-GFP)	81.65± 2.41 ^a	6.86± 1.12 ^{ab}	11.49± 1.34 ^c
سلول‌های آلوده شده با ویروس AAV حامل کننده فولیستاتین	63.43± 1.95 ^c	9.47± 0.93 ^a	27.10± 1.81 ^a

حروف غیر مشترک در هر ردیف و برای هر فاکتور جدول دارای اختلاف معنی داری در سطح (p < 0.01) می‌باشد

این رقم در ادغام هسته‌ای در کشت سلولی کنترل، ۳۲/۰۵ درصد بود. نتایج ریل تایم qPCR نشان داد که بیان زیاد ژن فولیستاتین منجر به افزایش ۷/۸، ۵/۳، ۳/۶، ۴/۵ و ۲/۷

تمایز سلولی

میزان درصد ادغام در سلول‌های آلوده شده با ناقل ویروس AAV2 حاوی فولیستاتین ۴۷/۱۱ درصد بود در حالی که

شدن به میوستاتین و جلوگیری از ورود آن به سلول، سبب افزایش تکثیر سلولی می‌شود (۱۶).

همان‌طور که آزمایش‌های چرخه سلولی نشان داد تعداد سلول‌ها در مرحله S در تیمارهای آلوده شده با ویروس AAV2 حمل‌کننده فولیستاتین افزایش یافته است. این نتایج تاییدکننده این موضوع است که فولیستاتین سبب افزایش رشد سلول‌های میوبلاست از طریق انتقال سلول‌ها از مرحله رشد به مرحله سنتز سلولی شده است. میوستاتین با افزایش بیان ژن p21 سبب گیر افتادن سلول‌ها در مرحله رشد (G1) و طولانی شدن این مرحله می‌شود (۲۴). در مقابل، پروتئین فولیستاتین با اتصال به میوستاتین از این عمل جلوگیری می‌کند.

نتایج رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ گیمسا (شکل ۴) نشان داد که تمایز سلولی در تیمارهای آلوده شده با ویروس AAV2 حمل‌کننده فولیستاتین افزایش یافته است. این نتایج نشان دهنده این موضوع است که حضور فولیستاتین منجر به افزایش تمایز سلول‌های میوبلاست جنینی در گوسفند شده است. افزایش بیان ژن‌های میوزنیک، Myo D، Myf 5، p57 و p21 در سطح رونویسی موید این موضوع است (شکل ۵). پروتئین Myo D یک تنظیم‌کننده مرکزی در ماهیچه سازی است. در نتیجه افزایش پروتئین می‌توان انتظار افزایش تمایز سلولی را داشت. میوزنیک نیز از تنظیم‌کننده‌های شاخص در تمایز سلول‌های ماهیچه است. فولیستاتین با افزایش بیان این دو ژن تنظیم‌کننده و مهم در تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای سبب افزایش تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای جنینی در گوسفند می‌شود. افزایش

Myo D هم‌زمان با افزایش بیان میوزنیک در فاز G1 سلولی، علائم تمایز سلولی را ایجاد می‌کند (۲۶). ادامه افزایش بیان Myo D منجر به افزایش بیان ژن‌های p21 و p57 می‌گردد که در این زمان لوله‌های تک هسته‌ای به هم چسبیده و لوله‌های چند هسته‌ای ایجاد می‌کنند (۲۷). این نتایج تایید می‌کند که فولیستاتین تمایز سلول‌های

برابری بیان ژن‌های میوزنیک، Myo D، Myf 5، p57 و p21 در سطح رونویسی شد. در حالی که اثری بر بیان ژن میوستاتین و ActRII B در شرایط تمایز نداشت.

بحث

فولیستاتین به‌عنوان یک ممانعت‌کننده قوی برای خانواده TGF- β از جمله میوستاتین شناخته شده است (۱۵). مطالعات نشان داده که فولیستاتین قادر است با سد کردن مسیر میوستاتین سبب افزایش جرم ماهیچه شود (۱۶). میوستاتین نیز می‌تواند با فعال کردن مسیر p21 و مسیر smad سبب کاهش تکثیر و تمایز میوبلاست شود. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شد، میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر برای تیمار ترانسفکت شده با ویروس در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است و این نشان دهنده این است که فولیستاتین سبب افزایش تکثیر سلولی شده است. نتایج این آزمایش، با مطالعات دیگر محققین همخوانی داشت (۱۳ و ۱۴). آن‌ها بیان کردند که فولیستاتین سبب تکثیر سلول‌های میوبلاست و افزایش ماهیچه در موش می‌شود.

جهت بررسی اثر فولیستاتین بر بیان ژن‌های کنترل‌کننده رشد، پس از آلوده سازی سلول‌های کشت داده شده در محیط رشد با ویروس AAV2، RNA کل استخراج و از آن cDNA تهیه شد. تغییرات بیان ژن با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده از ریل تایم نیز با نتایج محققین دیگر هم‌خوانی دارد (۲۴ و ۲۵). محققین نشان دادند که افزایش فولیستاتین در سلول‌های ماهیچه موش سبب کاهش بیان ژن p21 گردید و اثری بر بیان ژن p57 نداشت. آن‌ها بیان کردند که فولیستاتین با بلوکه کردن مسیر p21 سیگنال‌های مسیر میوستاتین را بلوکه می‌کند و با این عمل سبب افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود (۲۴ و ۲۵). همان‌طور که مشخص شده است میوستاتین یک تنظیم‌کننده و مهارکننده رشد ماهیچه است (۱۷) و فولیستاتین با متصل

میوبلاست را با افزایش بیان ژن‌های میوژنیک تنظیم می‌کند.

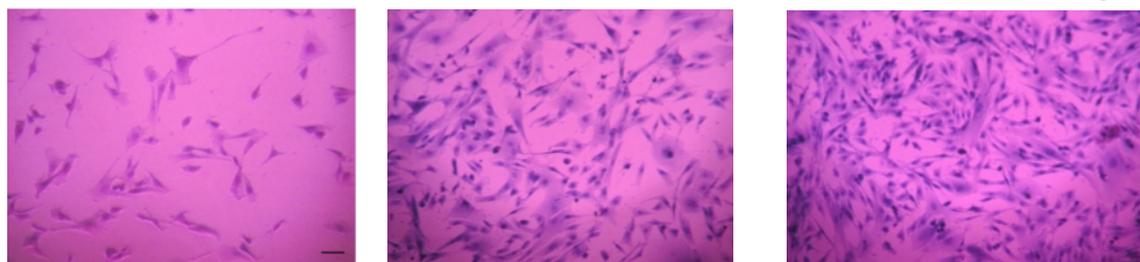
کنترل (بدون آلودگی ویروسی)



کنترل منفی (آلودن شده با AAV-GFP)



آلودن شده با AAV-CFS-FLAG

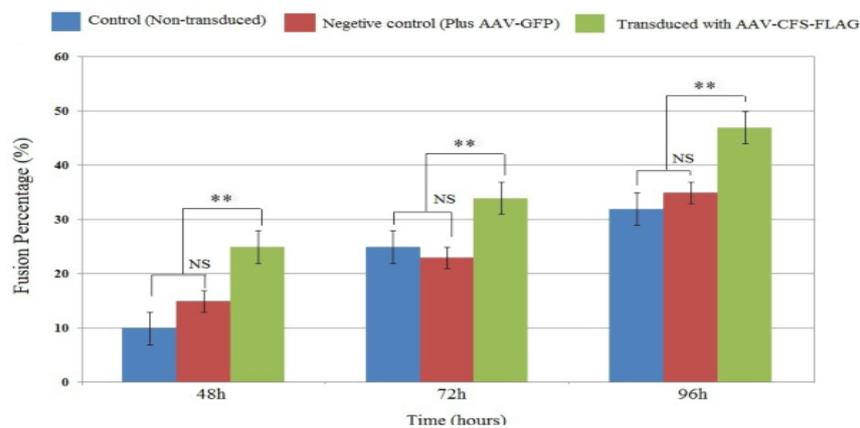


48 h

72 h

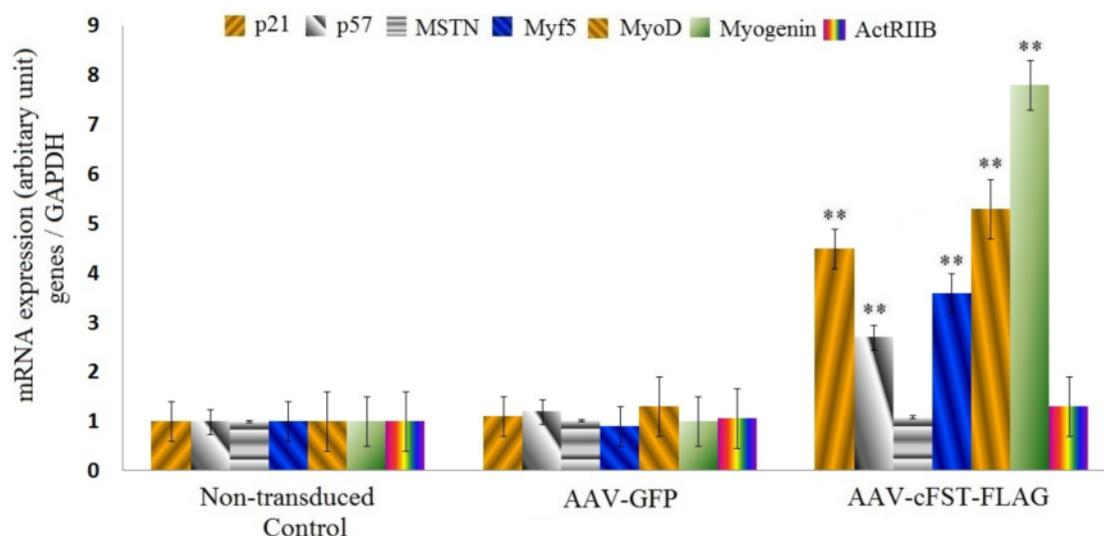
96 h

(الف)



(ب)

شکل ۴: الف) سلول‌های میوبلاست جنینی در محیط کشت تمایز (حاوی ۲ درصد سرم اسب) برای مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کشت داده شده و سپس با ویروس AAV-CFS-FLAG ترانسفکت شده است. از سلول‌های ترانسفکت شده با AAV-GFP به عنوان کنترل منفی استفاده شده است. در نهایت سلول‌ها با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شده‌اند. ب) میزان درصد ادغام هسته برای گروه کنترل (رنگ آبی)، گروه کنترل منفی (رنگ قرمز) و گروه ترانسفکت شده با ویروس AAV-CFS-FLAG (رنگ سبز) بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نشان داده شده است. داده‌ها در سطح معنی‌داری یک درصد آنالیز شدند و دو ستاره نشان دهنده سطح معنی‌داری یک درصد و NS نشان دهنده عدم معنی‌داری است.



شکل ۵: اثر ازدیاد فولیستاتین بر بیان ژن‌های میوژنیک، میوستاتین، Myo D، ActRIIB، Myf 5، p57 و p21 در محیط کشت تمایز با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR. داده‌ها در سطح معنی‌داری یک درصد آنالیز شدند و دو ستاره نشان‌دهنده سطح معنی‌داری یک درصد می‌باشد.

after germ cell transplantation. The FASEB J. 2008; 22(2): 374–382.

2. Naldini L, Blomer P, Gallay D, Ory R, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science. 1996; 272(52-59): 263–267.

3. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. Nature (London). 1993; 361: 647–650.

4. Atchison RW, Castro BC, Hammon WM. Adenovirus-associated defective virus particles. Science. 1965; 149(3685): 754-756.

5. Srivastava A. Obstacles to human hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors. J. Cell. Biochem. 2002; 38: 39–45.

6. Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC, Samulski RJ. Targeted adeno-associated virus vector transduction of non-permissive cells mediated by a bispecific Fantibody. Nature Biotech. 1999; 17(2): 181–186.

7. Trobridge G, Hirata RK, Russell DW. Gene targeting by adeno-associated virus vectors is

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش برای اولین بار بیان شدن ژن فولیستاتین توسط ویروس AAV2 در سلول‌های گوسفندی را ارائه می‌دهد. نتایج نشان داد که می‌توان ژن فولیستاتین را با موفقیت به کمک AAV در سلول‌های گوسفندی بیان کرد. یافته‌های این آزمایش نشان داد که فولیستاتین می‌تواند با کاهش بیان ژن p21 در سطح رونویسی سبب افزایش تکثیر سلول میوبلاست در گوسفند شود. به نظر می‌رسد که فولیستاتین با اتصال به میوستاتین و توقف سیگنال مرتبط با آن منجر به افزایش تکثیر سلولی می‌شود. همچنین، فولیستاتین با افزایش بیان Myo D و میوژنیک (ژن‌های تنظیم کننده و مهم در تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای) سبب افزایش تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای جنینی در گوسفند می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که می‌توان از ویروس AAV جهت تولید سلول‌های ترانس ژنیک گوسفند استفاده کرد.

منابع

1. Honaramooz A, Megee S, Zeng W, Destrempe M, et al. Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission

16. Lee SJ. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. *Trends Genet.* 2007; 23(10): 475-477.
17. Han DS, Huang HP, Wang TG, Hung MY. Transcription activation of myostatin by trichostatin A in differentiated C2C12 myocytes via ASK1-MKK3/4/6-JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Cell Biochem.* 2010; 111: 564-573.
18. Philip B, Lu Z, Gao Y. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cellular Signalling.* 2005; 17(3): 365-75.
19. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. *Nature Genetic.* 1997; 17(1): 71-74.
20. Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol.* 2002; 52(6): 832-836.
21. Zhang N, Zhang X, Liu M, Tan L. Ovine Follistatin gene expression and functional analysis of Follistatin domains. *Chin J Biotech.* 2010; 26(8): 1050-1056.
22. Hembree JR, Hathaway MR, Dayton WR. Isolation and culture of fetal porcine myogenic cells and the effect of insulin, IGF-1, and sera on protein turnover in porcine myotube cultures. *J. Animal Science.* 1991; 69: 3241-3250.
23. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* 2002; 30(9): 1-10.
24. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, et al. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275(51): 40235-40243.
- cell-cycle dependent. *Hum. Gene Ther.* 2005; 16: 522-526.
8. Flotte TR, Barraza X, Solow R, Afione SA, et al. An improved system for packaging recombinant adeno-associated virus vectors capable of in vivo transduction. *Gene Ther.* 1995; 2(1): 29-37.
9. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfers into muscle tissue of immune-competent mice by adeno-associated virus vector. *Journal of Virology.* 1996; 70(11): 8098-8108.
10. Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology.* 2004; 330 (2): 375-83.
11. Richter M, Iwata A, Nyhuis J, Nitta Y, et al. Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. *Physiological Genomics.* 2000; 2(3): 117-27.
12. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood.* 2003; 101(8): 2963-2972.
13. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(11): 4318-4322.
14. Kota J, Handy CR, Haidet AM, Montgomery CL, et al. Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 2010; 1(6): 1-17.
15. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, et al. Follistatin complexes myostatin and antagonizes myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Devel Biol.* 2004; 270(1): 19-30.

25. Benabdallah BF, Bouchentouf M, Rousseau J, Tremblay JP. Overexpression of Follistatin in human myoblasts increases their proliferation and differentiation, and improves the graft success in SCID mice. *Cell Transplantation*. 2009; 18(7): 709-718.
26. Perry RL, Rudnick MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci* 2000; 5: D750–D767.
27. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, et al. Kambadur R. myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating Myo D expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 49831–49840.

Investigation of Cell Cycle, Myogenic and Growth Factor Genes Expression of Ovine Primary Myoblast Cells by Follistatin Gene Over-expression

Nazari M, Ph.D.^{1*}, Salabi F, Ph.D.², Du L, Ph.D.³

1. Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz-Iran
2. Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz-Iran
3. National Center for Molecular Genetics and Breeding of Animal, Chinese Academy of Agricultural Sciences, People's Republic of China

* Email corresponding author: M.nazari@ramin.ac.ir

Received: 1 Oct. 2016

Accepted: 5 Sep. 2017

Abstract

Aim: The aim of this study was investigation of Follistatin gene over-expression effects on cell cycle, myogenic and growth factor genes expression of ovine primary myoblast (OPM) cells in lab that was done using AAV serotype 2 virus (rAAV2) carrying Follistatin (FST).

Material and Methods: Obtained primary myoblasts cells from 60-day-old sheep fetuses were cultured in the growth and differentiation media. The optical density at 450 nm was measured as an indicator of proliferation in transfected cells with AAV serotype 2 (rAAV2) carrying Follistatin. Finally, Myogenic, Myo D, CDK2, Myf5, p57 and p21 genes expressions were measured using Real-Time qPCR.

Results: The optical density (at 450 nm) was significantly increased in virus infected cells that shows Follistatin can increase proliferation. Follistatin proliferation significantly increased the expression of Akt1 and CDK2 genes and decreased the p21 expression gene under proliferation conditions. Real-Time results showed that the expression of myoincin, Myo D, Myf5, p57 and p21 genes increased under conditions of differentiation with Follistatin elevation.

Conclusions: The results showed that proliferation of Follistatin increased the myoblast cells proliferation by p21 gene expressing and increasing the differentiation of myoblast cells by increasing the myogenic genes expression.

Keywords: Real Time qPCR, Follistatin, myogenic genes, ovine primary myoblast