دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

# تأثیر اورسولیک اسید بر بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای در جوجه‌های بومی

هنگامه مرادی[۱]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۲]، سید داوود شریفی[۳]، سیم زر حسین‌زاده[۴]، احسان سید جعفری[۵] و عبدالرضا صالحی[۳]

۱- دانشجوی دکترا تخصصی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، گروه علوم دام و طیور
۲- استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، گروه علوم دام و طیور، (نویسنده مسوول: amohammadis@ut.ac.ir)
۳- دانشیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، گروه علوم دام و طیور
۴- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی
۵- دانشیار، پردیس علوم دانشگاه تهران، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۷
صفحه: ۱۱ تا ۱۹

**چکیده**

**اورسولیک اسید (UA) به عنوان یک تری‌ترپن پنج حلقه‌ای شناخته می‌شود که در بعضی از گیاهان دارویی همچون مرزه و آویشن کوهی وجود دارد و روی توسعه عضلات اثر می‌گذارد. در مطالعه اخیر، تأثیر اورسولیک اسید بر روی سلول‌های C2C12 و همچنین سلول‌های ماهواره‌ای (SCs) جدا شده از جوجه‌های گوشتی بومی مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا در آزمایش In vitro، سلول‌های C2C12 از مرکز تحقیقات بنیاخته تهیه شدند و سلول‌های ماهواره‌ای از جوجه‌های یک روزه جداسازی و خالص سازی شدند، در نهایت تحت تأثیر اورسولیک اسید قرار گرفتند. در آزمایش In vivo، اورسولیک اسید بر اساس وزن بدن به صورت داخل عضلانی در شش روز اول در دو نوبت به جوجه‌ها تزریق شد، بطوریکه دوزهای مورد استفاده بر اساس دوزهای بدست‌آمده از آزمایش In vitro بود. سلول‌های ماهواره‌ای در روز هفتم از عضله پکتورال جوجه‌های تیمار شده جداسازی شدند. تشخیص SCs از طریق بیان ژن PAX-7 در آزمایشات In vitro و In vivo تأیید شد. در واقع، سلول‌های ماهواره‌ای و C2C12 در محیط کشت با اورسولیک اسید (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) همراه با ۱ سی‌سی DMSO کشت شدند. نتایج بدست‌آمده از هر دو آزمایشات In vitro و In vivo نشان داد که اورسولیک در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بطور معنی‌داری بیان ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره ای یعنی PAX-7، MyoD و میوژنین را افزایش داد و همچنین هایپرتروفی عضله را بهبود بخشید. در نتیجه، اورسولیک اسید می‌تواند به عنوان یک ماده مؤثر در کاهش دوره پرورش و افزایش سرعت رشد عضله اسکلتی در جوجه‌های گوشتی بومی پیشنهاد شود.**

**واژه‌های کلیدی: اورسولیک اسید، توسعه عضله، فلوسیتومتری، PAX-7**

## مقدمه

صنعت طیور همراه با رشد فزاینده جمعیت رشد چشمگیری داشته است (۲۲). فشار بر صنایع طیور منجر به فزونی سرعت رشد پرندگان، بازدهی خوراک و توده عضلانی بدن آنها گردیده است (۲۲). در این خصوص، مهمترین عامل در دستیابی به حداکثر پتانسیل رشد جوجه‌ها و تبدیل مواد مغذی به گوشت و عضله، اندازه‌گیری احتیاجات مواد مغذی جوجه‌ها در هفته‌های اول پس از هچ است که پتانسیل رشد عضله تا زمان کشتار را تعیین می‌نماید (۱۱). از آنجایی که رشد عضله در جوجه‌ها با هایپرتروفی عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد، بهبود چنین فرایندی توجه وافری را در پژوهش‌ها به خود جلب کرده است.

هایپرتروفی عضله اسکلتی از طریق جمعیت میوبلاست‌های بالغ کنترل می‌شود که بعنوان سلول‌های ماهواره‌ای معروف هستند. این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی اصلی عضله اسکلتی محسوب می‌شوند (۱۳). سلول‌های ماهواره‌ای توسط اهدای هسته به فیبرهای عضله‌ای، هایپرتروفی عضله را تسریع می‌نمایند و ظرفیت فیبرها برای سنتز پروتئین را افزایش می‌دهند (۲۱). این سلول‌ها در هفته اول پس از هچ فعال‌اند که با محدودیت خوراک در این زمان آسیب می‌بینند (۲۸). مستندات علمی موجود پیشنهاد می‌کنند که سلول‌های ماهواره‌ای به شدت توسط عوامل خارجی مثل فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده بتا (TGF-β)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و چندین عامل رونویسی از قبیل PAX-7، عامل تنظیمی میوژنیک (MRF)، عامل تمایز میوژنیک (MyoD) و میوژنین کنترل می‌شوند (۱۸،۶). لذا، شناسایی این عوامل و فهم اینکه آنها چگونه عمل می‌نمایند مسیر جدیدی در بهبود عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی باز خواهد نمود.

تلاش‌های زیادی در جهت فهم سازوکارهای مولکولی و سلولی درگیر در هایپرتروفی و آتروفی عضلات در سال‌های اخیر انجام شده است (۲۵). یکی از راهبردهای موجود در تحریک هایپرتروفی عضلات بهره‌گیری از مواد طبیعی گیاهی مثل اورسولیک اسید است (۱۹). اورسولیک اسید یک ترکیب لیپوفیلیک می‌باشد که در پوست سیب، نعنا، رزماری، آویشن، آلو و مرزه حضور دارد (۱۰). تا کنون اثرات بیولوژیکی متعددی برای این ترکیب تعیین شده است که شامل اثرات ضدتوموری از طریق مهار مسیر STAT، ضداکسیداتیو، ضدالتهابی، ضددیابت، ضدایدز، ضدباکتری و محافظت از کبد است

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

(۷،۲۴). محققان مختلف نشان داده‌اند که اورسولیک اسید تخریب عضله اسکلتی را مهار می‌کند و در نهایت حجم و قدرت این بافت را در حیوانات آزمایشگاهی افزایش می‌دهد (۱۶). همچنین، نشان داده شده است اورسولیک اسید حجم عضله اسکلتی را با افزایش بیان ژن‌های مسیر هوازی (پروتئین کیناز B) و کاهش بیان ژن‌های مسوول در تخریب عضله (MURF-1 و آتروژین-۱) افزایش می‌دهد (۱۶).

گیاهان دارویی همچون مرزه بعنوان یک جایگزین آنتی‌بیوتیک مناسب در جیره طیور استفاده می‌شوند. منطبق بر مدارک علمی، استفاده از مرزه در جیره جوجه‌ها مصرف خوراک و افزایش وزن را به مقدار قابل توجهی افزایش می‌دهد (۳۰).

در کل، به نظر می‌رسد اورسولیک اسید سلول‌های ماهواره‌ای را جهت بهبود عملکرد و افزایش سرعت رشد در هفته اول پس از هچ فعال می‌نماید. تأثیر اورسولیک اسید در جوجه‌های گوشتی بومی به‌ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. لذا، فرضیه ما این بود که افزایش حجم عضله می‌تواند بطور مثبتی بوسیله اسید اورسولیک تحت تأثیر قرار گیرد. در مطالعه حاضر، پاسخ القاشده در جوجه‌های گوشتی بومی با افزودن اورسولیک اسید به سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از عضله اسکلتی بصورت In vitro و تزریق اورسولیک اسید به عضله جوجه‌ها به صورت In vivo بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

اسید اورسولیک از شرکت Enzo Life Sciences با خلوص ۹۰ درصد خریداری شد. FBS، DMEM، پنی‌سیلین- استرپتومایسین، آنزیم‌های گوارشی مانند کلاژناز نوع اول و چهارم و همچنین دیسپاز از شرکت GIBCO (گراند آیلند، نیویورک) خریداری شدند. آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای β-actin، PAX7، Myogenin و MyoD از شرکت بیوتکنولوژی سانتا کروز (سانتا کروز) و آباکام خریداری شدند. فسفات بافر نمکی-EDTA، ژلاتین، کیت سنتز DNA، PCR Master Mix، از شرکت سیگما-آلدریچ و سایر مواد شیمیایی از شرکت Merck خریداری شدند.

این پژوهش در دو مرحله In vitro و In vivo صورت گرفت که در هر مرحله تعدادی جوجه بومی گلپایگانی یک روزه تهیه و از آنها نمونه گرفته شد و مراحل جداسازی سلول، شناسایی سلول با فلوسیتومتری، تیمار با اورسولیک اسید، تشخیص سمیت سلول، استخراج RNA وcDNA و در نهایت اندازه‌گیری میزان بیان ژن بطور جداگانه در هر مرحله انجام گرفت.

### مطالعه In vitro

### جداسازی سلول‌های ماهواره‌ای عضله اسکلتی

ابتدا، جداسازی سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه اسکلتی با استفاده از روش pre-plating صورت گرفت (۲۹). از آنجایی که سلول‌های ماهواره‌ای در ماهیچه طیور جوان‌تر بیشتر یافت می‌شوند، بنابراین برای دست‌یابی به جمعیت خالص‌تری از این سلول‌ها از جوجه‌های گوشتی در سنین ابتدایی استفاده شد. ابتدا چند جوجه بومی گلپایگانی یک روزه تهیه شد و در روز سوم جوجه‌ها با محلول کتامین/زالین بیهوش شده و در ادامه، ماهیچه اسکلتی به قطر ۱ میلی‌متر از سینه طیور گوشتی جدا شده و درون فالکون حاوی محلول آنزیمی (۰/۱ درصد کلاژناز نوع ۱، ۰/۱ درصد کلاژناز نوع ۴ و ۱/۷۵ u/mg دیازپاز) به مدت ۱ شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد تا هضم انجام شود. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها به مدت سه و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. نمونه‌ها از یک صافی با منفذهای ۷۰ میلی‌متری عبور داده شدند و به مدت ۲ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۵۰ قرار گرفتند. در ادامه، با افزودن به محیط‌کشت حاوی D-MEM و FBS ۱۰٪، سوسپانسیون تک سلولی کشت شده و بمدت یک و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. اولین مرحله از pre-plating، با ذخیره سلول‌های غیرقطبی و سلول‌های جداشده توسط بافر فسفات سالین-EDTA انجام گرفت. این مرحله هر روز تکرار شد و سلول‌ها در یک فلاسک حاوی محیط کشت داده شدند. در نهایت، برای تشخیص سلول‌های کشت داده شده از فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX-7 استفاده شد.

### فلوسیتومتری

در این مرحله، شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی اولیه PAX-7 صورت گرفت. سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری (شامل PBS و سرم ۱٪) بمدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. در مرحله بعدی با آنتی‌بادی PAX7 و بصورت مستقیم به یک آنتی بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند بمدت ۱ ساعت انکوبه شدند. بعد از تثبیت مجدد سلول‌ها با پارافرمالدئید یک درصد، نمونه‌ها برای بررسی بیان نشانگر سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Dekenson Bectin و نرم‌افزار Win 8/MDI2 در آزمایشگاه هیستوژنوتک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### تیمار با اورسولیک اسید

سلول‌های ماهواره‌ای به همراه $C_2C_{12}$ در محیط کشت فیبروبلاست (DMEM با ۴/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلوکز) شامل ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین، ۱ درصد گلوتامین و ۱۰ درصد FBS همراه با ۹۵ درصد رطوبت هوای انکوباتور و ۵ درصد $CO_2$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. سلول‌های ماهواره‌ای با چگالی $2*10^3$ سلول/چاهک در یک پلیت ۹۸ چاهکی بمدت ۲ روز کشت شدند. این سلول‌ها بمدت ۷ روز در محیط کشت سرم ۱۰ درصد به‌تنهایی (DMSO ۰/۱ درصد) یا با اسید اورسولیک (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر همراه با DMSO (۱ سی‌سی) کشت شدند. تمام داده‌های ارائه‌شده در این مطالعه از سه آزمایش مستقل به دست آمده است.

### آزمون MTT

سمیت سلولی اورسولیک اسید (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از طریق آزمون MTT آزمایش شد. مکانیسم آن شامل شکستن نمک MTT به بلورهای نامحلول فورمازان از طریق آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده است. خروجی

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

این واکنش، تولید کریستال‌های محلول بنفش رنگ فورمازان در دی متیل سولفوکساید (DMSO) است. برای بهینه‌سازی غلظت اورسولیک اسید در محیط کشت، سلول‌های ماهواره‌ای بهمراه $C_2C_{12}$ با رقت‌های مختلف اورسولیک اسید تیمار شدند. پس از گذشت ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ سی‌سی DMSO اضافه شد و سپس OD هر چاهک از طریق میکروپلیت ریدر (نوین گستر–ایران) ثبت شد. در پایان، درصد سلول‌های زنده در هر گروه محاسبه شد.

**استخراج RNA و سنتز cDNA**

ابتدا، استخراج RNA بر اساس کیت تجاری سیناژن از نمونه‌ها انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز تعیین شد. برای تعیین خلوص، پس از تیمار نمونه‌ها با IDNase، میزان جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. برای تعیین کیفیت، تفکیک RNA استخراجی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد اجرا شد و باندهای مربوط به RNAهای ۲۸ و ۱۸ S ارزیابی شدند. بعد از اطمینان از خلوص و کیفیت نمونه‌ها، از RNA خالص بمنظور سنتز cDNA استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت تجاری شرکت Genet Bio استفاده شد. نمونه‌ها نخست یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرار گرفتند.

**اجرای qRT-PCR**

سطح mRNA در نمونه‌ها با استفاده از تکنیک QRT-PCR تعیین شد (۱۷). بطور خلاصه، با استفاده از معرف Trizol، RNA کل از نمونه‌ها استخراج شده و در آب حاوی دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) طبق دستورالعمل شرکت سازنده حل شد. در ادامه، cDNA از ۳ میکروگرم RNA سنتز شده و QRT-PCR با استفاده از دستگاه Rotor Gene 3000 (Corbett Research) انجام شد. جهت اجرای QRT-PCR، مسترمیکس ۱۰ ایکس SYBR green PCR با ۱۰ میکرولیتر cDNA برای جوجه‌های تحت تیمار با اسید اورسولیک و ۸ میکرولیتر برای جوجه‌های کنترل و همچنین ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رو به جلو و عقب (جدول ۱) مخلوط شدند و سپس حجم مخلوط واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر طبق مراحل زیر انجام شد: مرحله ۱) واسرشته‌کردن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۵ ثانیه؛ مرحله ۲) واسرشته‌کردن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ۳) اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ۴) گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۰ ثانیه؛ مرحله ۵) تجزیه منحنی ذوب. مراحل ۱ تا ۴ برای ۴۰ چرخه تکرار شدند و تکثیر برای هر ژن در سه تکرار انجام شد. اختصاصی‌بودن آمپلیکون توسط تجزیه منحنی ذوب تأیید شد و برای محاسبه تغییر بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار REST-384 (نسخه ۲) (بیکمن) از استانداردهای چرخه آستانه استفاده شد (۵). بیان ژن‌ها در برابر ژن خانه‌دار (β-actin) نرمال شد و بعنوان تغییر نسبی در بیان با توجه به کنترل ترسیم شد. این پرایمرها اختصاصی بوده و برای مطالعه عملکرد ژن طراحی شدند.

**مطالعه In vivo**

در این مطالعه از ۴۰ قطعه جوجه بومی نژاد گلپایگانی با میانگین وزنی ۴۰ گرم استفاده شد .سپس، اورسولیک اسید در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بصورت داخل عضلانی بر اساس کیلوگرم وزن بدن در طول شش روز اول بصورت دوبار در روز به جوجه‌های گوشتی بدون ایجاد ترس و تنش در جوجه‌ها تزریق شد.۲۰ قطعه جوجه بصورت تصادفی انتخاب و سلول‌های ماهواره‌ای از عضله سینه آنها در روز آخر جدا شد. مشابه آزمایش In vitro، شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای از طریق آزمون بیان PAX-7 تایید شد. در ادامه، بیان ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای شامل PAX-7، MyoD و میوژنین اندازه‌گیری شدند.

**تجزیه آماری**

داده‌ها با استفاده از آزمون t-student در نرم‌افزار SPSS تجزیه شدند و نمودارها در نرم‌افزار اکسل ترسیم شدند. هر آزمایش حداقل سه بار انجام شد و داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. The sequence of used primers

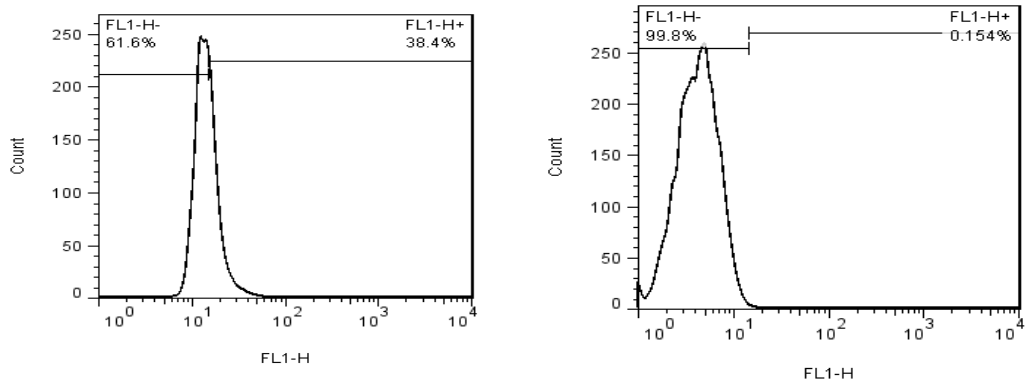
| پرایمرها | توالی (′۳-′۵) | توالی (′۵-′۳) |
|---|---|---|
| PAX7 | AAGAGGAAAGCCACATTGC | CCTGCTTGAAGTTCCTGCTC |
| Myogenin | GTGGAGGATATGTCTGTTG | CTTATGTGAATGGGGAGTG |
| MyoD | GTTCTGTTGTTTCCAGCCTCG | GAAGAGGGGTGCAGTTGGTG |
| β-actin | ATATCGCTGCGCTGGTCGTC | AGGATGGCGTGAGGGAGAGC |

## نتایج و بحث

**شناسایی سلول های ماهواره‌ای**

به منظور مطالعه فاکتورهای اولیه متأثر از اورسولیک اسید، تجزیه نتایج حاصل از فلوسیتومتری ماهیت این سلول‌ها را تایید کرد. تجزیه فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX-7 نشان داد که این عامل در حدود ۳۸/۴ درصد سلول‌ها بیان شدند. لذا معلوم شد که حدود نصف سلول‌ها از نوع ماهواره‌ای هستند (شکل ۱).

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

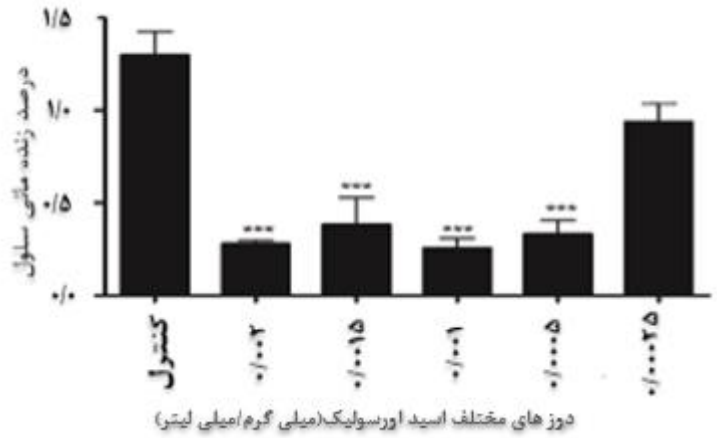



شکل ۱- نتایج فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX-7. چپ: نمونه بافت حاوی سلول ماهواره‌ای، راست: کنترل منفی
Figure 1. Flow cytometric results of PAX-7 antibody. Left: Muscle tissue sample containing satellite cells and right: Negative control

**بررسی اثر سمیت اسید اورسولیک**

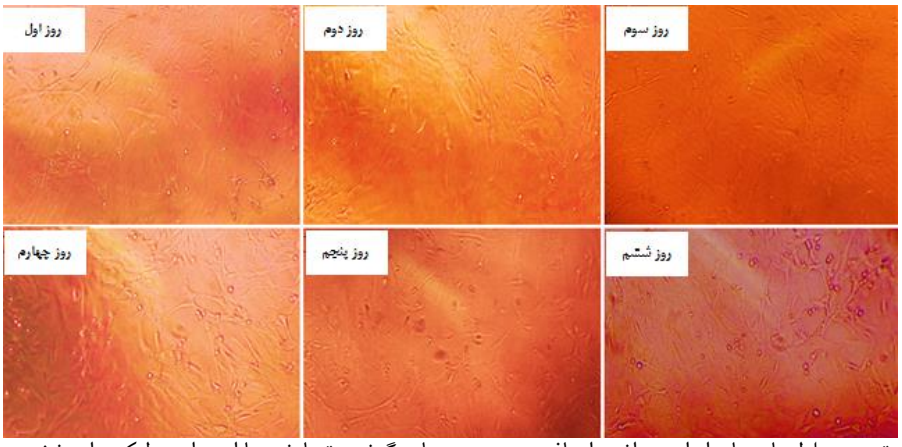
نتایج MTT برای تعیین درصد زنده مانی سلولی برای دوزهای مختلف اورسولیک اسید نشان داد که بیشترین زنده مانی سلول های $C_2C_{12}$ و سلول‌های ماهواره‌ای در دوز ۰/۰۰۰۲۵ بود (شکل ۲). از این رو، اولین دوز برای سلول‌های ماهواره‌ای بکار رفت و سپس در طول زمان دنبال شد.

همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای در طول زمان افزایش یافت. به طوریکه تفاوت در روز اول و ششم مشهود بود. این موضوع آشکار می‌سازد که اورسولیک اسید توانایی بهبود هایپرتروفی عضلات اسکلتی را دارد.




شکل ۲- نتایج آزمون MTT برای تعیین درصد زنده مانی سلول برای دوزهای مختلف اسید اورسولیک
Figure 2. MTT test results for determining the percentage of metabolic activity for different doses of ursolic acid

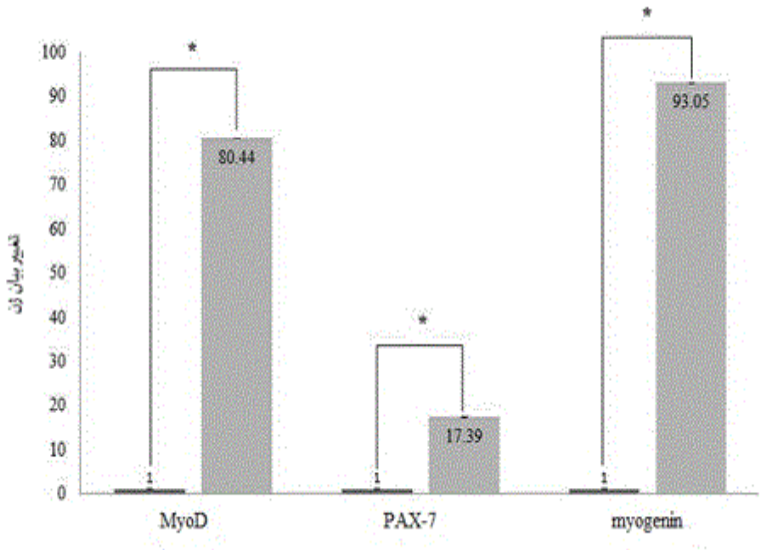
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]




شکل ۳- تصویر سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از بافت سینه جوجه‌های گوشتی تیمارشده با اسید اورسولیک برای شش روز متوالی
Figure 3. Satellite cell images isolated from breast tissue of native broiler chickens treated with ursolic acid for seven days

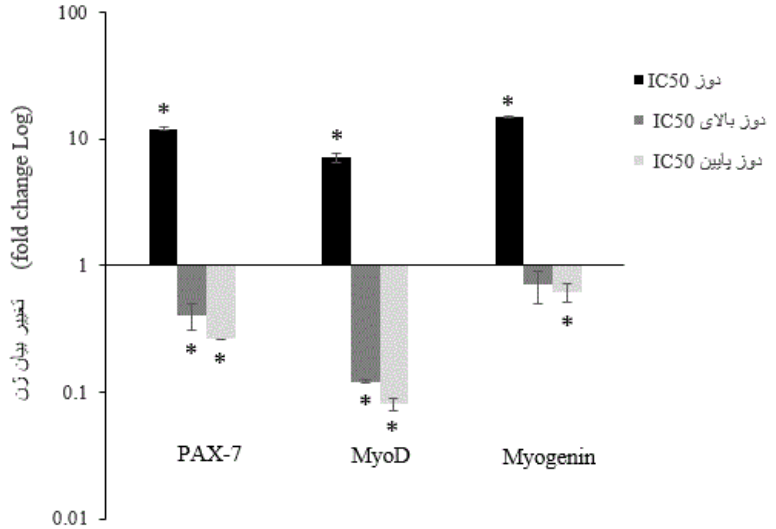
**بررسی اثر اسید اورسولیک بر بیان ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای**

در این مرحله ، درجه تأثیر این ترکیب طبیعی پنج حلقه‌ای روی بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین جهت آشکارکردن مکانیسم هایپرتروفی عضلات که ناشی از اسید اورسولیک است بررسی شد. آزمایش خالص سازی RNA استخراج‌شده بوسیله اسپکتروفوتومتر نشان داد که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ در تمام نمونه‌های استخراج‌شده در ۱/۹۷ تا ۱/۹۲ ظاهر شد که نشان‌دهنده کیفیت مناسب استخراج است. آزمایش کیفیت RNA استخراج شده از طریق ژل الکتروفورز و مشاهده باندهای s۱۸ و s۲۸ در ارتباط با RNA ریبوزومی که شاخص کیفیت RNA استخراج شده است، نشان داد که خالص سازی مولکول RNA کیفیت مناسبی برای ادامه داشته است. پس از اینکه PCR انجام شد، در هر دو آزمایشات In vito و In vivo به نظر می‌رسد که سطوح بیان ژن‌های PAX7، میوژنین و MyoD زمانیکه که با کنترل مقایسه شد افزایش یافت. بنابراین سطوح بیان این ژن‌ها بترتیب حدود ۹۳، ۸۰ و ۱۷ برابر افزایش یافت. پس می‌توان نتیجه گرفت که تیمار اورسولیک اسید به طور معنی‌داری سطح MyoD و میوژنین را در سلول‌های ماهواره‌ای بطور معنی‌داری افزایش می‌دهد (شکل ۴ و ۵).




شکل ۴- بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین در سلول‌های ماهواره‌ای بعد از تیمار اسید اورسولیک در مقایسه با کنترل تحت شرایط آزمایشگاهی. علامت ستاره گویای سطح معنی‌داری ۵ درصد مابین تیمار و شاهد است.
Figure 4. Expression of PAX-7, Myogenin and MyoD genes in satellite cells after ursolic acid treatment when compared to control under in vitro conditions. Star marks indicate a significant difference at the 5% level between the sample treated with ursolic acid and the control.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]




شکل ۵- بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین در سلول‌های ماهواره‌ای بعد از تیمار اسید اورسولیک در مقایسه با کنترل تحت شرایط درون پیکری. علامت ستاره گویای سطح معنی‌داری ۵ درصد مابین تیمار و شاهد است.

Figure 5. Expression of PAX-7, Myogenin and MyoD genes in satellite cells after ursolic acid treatment when compared to control under in vivo conditions. Star marks indicate a significant difference at the 5% level between the sample treated with ursolic acid and the control.

جمعیت سلول‌های ماهواره‌ای به وسیله برنامه‌ریزی منظم داخل سلولی کنترل می‌شود که نقش مهمی در تنظیم فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای، تمایز و تکثیر میوژنیک و نقش احتمالی در هایپرتروفی میوفیبر دارد. در این برنامه، مولکول‌های تنظیمی کلیدی شامل MRFs، PAX-7 می‌باشند. MRFها شامل MyoD ، میوژنین، MYF5 و MRF4 هستند که هر کدام نقش‌های خاصی در کنترل فرایند میوژنیک دارند (۱۳). در این مطالعه، بیان ژن PAX-7 پس از تیمار با اورسولیک اسید افزایش پیدا کرد. افزایش بیان PAX-7 بنظر می‌رسد مرتبط با اثر اورسولیک اسید بر روی فعالیتSIRT 1 است (۹) که نقش حیاتی در افزایش وزن دارد.

القای بیان PAX-7 در سلول‌های ماهواره‌ای موش توسط بختیاری و همکاران (۲) گزارش شده است. آنها پیشنهاد کردند که این ژن نقش مهمی در تغییر بیان ژن‌های درگیر در تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای دارد. نشان داده شده است که PAX-7 قادر به تحریک سلول‌های ماهواره‌ای بوده و تولید میوبلاست‌های مشتق‌شده از سلول‌های ماهواره‌ای را محدود می‌کند. نقش حیاتی PAX-7 در شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای آن را به یک شاخص مفید در تعیین کینتیک جمعیت آن‌ها تبدیل کرده است. این امر از طریق تنظیم کاهشی PAX-7 در سلول‌های ماهواره‌ای جوجه‌های گوشتی محروم از خوراک ۴۸ ساعت پس از هچ مشخص می‌شود، بطوریکه شاخص کاهش تعداد سلول‌های ماهواره‌ای در عضله سینه پرندگان محروم از خوراک است (۳).

علاوه‌بر PAX-7، بیان ژن‌های MyoD و میوژنین پس از تیمار با اورسولیک اسید افزایش یافت این عوامل عضو خانواده عامل تمایز میوژنین (MRF1) می‌باشند که در فرایند تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای درگیر هستند. این عوامل در سلول‌های ماهواره‌ای فعال بیان می‌شوند در حالیکه بیان آن‌ها در سلول‌های ماهواره‌ای غیرفعال اتفاق نمی‌افتد. به عبارت دیگر، MRFs در سلول‌های ماهواره‌ای خاموش بیان نمی‌شوند، اما بمحض فعال‌شدن و تکثیر، Myf5 MyoD بیان می‌شوند (۱). اگرچه رابطه عملکردی بین MyoD و Myf5 وجود دارد، MyoD عامل اصلی رونویسی میوژنیک است و نشان داده شده است که برای تمایز سلول‌های ماهواره‌ای ضروری است (۲۷). در واقع، MyoD یکی از اولین شاخص‌های شناخته‌شده در فرایند ساخت عضله می‌باشد و نقش مهمی در تنظیم تمایز عضله دارد (۲۲). در این راستا بیان MyoD فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای را بهبود می‌بخشد. مطالعات قبلی نشان داده اند که بیان MyoD بیان ژن myogenin را بهبود داده و تمایز نهایی سلول‌های عضله اسکلتی را تحریک می‌کند (۲۰). میوژنین همچنین در تمایز سلول‌های ماهواره‌ای درگیر است و بعنوان شاخص در توسعه داخل سلولی عضله مفید می‌باشد. بیان میوژنین همچنین برای تنظیم میوژنیک حیاتی است بطوریکه برای تشکیل طبیعی و تمایز multinucleated myotubes ضروری است (۲۶). نقش خاص mrf4 در این فرایند بسیار پیچیده است. این قادر است تمایز میوژنیک در رویان فاقد میوژنین و رویان‌های myogenin null را تسهیل کند (۲۲). تمام این مطالعات پیشنهاد می‌کنند که MyoD برای فعال‌سازی میوژنیک و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز است. در نهایت، میوژتین نقش مهمی در تمایز نهایی آنها دارد و mrf4 تا حدودی هر دو نقش را ایفا می‌کند.

مکانیسم احتمالی اثر ارسولیک اسید روی سلول‌های ماهواره‌ای را می‌توان به فعال‌سازی ژن MyoD و توسعه داخل سلولی عضله نسبت داد. افزایش بیان میوژنین و MyoD در سلول‌های بنیادی تیمارشده با ارسولیک اسید در توانایی تکثیر سلول‌های بنیادیمنکس می‌شود. توانایی ارسولیک اسید به تحریک تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای بوسیله جونگ و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده است (۱۴). آنها

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

نشان دادند که تیمار سلول‌های ماهواره‌ای با ارسولیک اسید استخراج‌شده از پوست سیب منجر به افزایش پاسخ به دوز در بیان AMPK، SIRT1، و PGC1α در سلول‌های عضله شد. همچنین محققان مشاهده کردند که ارسولیک اسید بیان پروتئین‌های IGF1، AKT و Mtor را که باعث القای هایپرتروفی عضله می‌شوند و همچنین پروتئین‌های درگیر در آتروفی عضلات را کاهش می‌دهد (۱۴). بنابراین محققان پیشنهاد کردند که ارسولیک اسید قادر به تنظیم پروتئین‌های درگیر در بیوژنزیس میتوکندریایی، افزایش هایپرتروفی و آتروفی عضله است. بختیاری و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ارسولیک اسید بطور مستقیم SIRT را فعال می‌کند (۴). آنها گزارش کردند که ارسولیک اسید به سطح خارجی SIRT متصل می‌شود و منجر به اتصال محکم سوبسترا به آنزیم می‌شود. آنها همچنین نشان دادند که ارسولیک اسید، SIRT را به سمت شکل فعال آنزیم انتقال می‌دهد. لذا محققان پیشنهاد کردند که ارسولیک اسید فعالیت SIRT در سلول‌ها را تقویت می‌کند. بختیاری (۲) همچنین نشان داد که ارسولیک اسید، نئومیوژنزیس را از طریق هایپرپلازیا و توسعه تعداد سلول‌های ماهواره‌ای در عضله اسکلتی القا می‌کند. کاتاشیما و همکاران (۱۵) در یک مرور سیستماتیک نشان دادند که برخی از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی در اثر بخشی ارسولیک اسید بر روی فیتنس فیزیکی، از دست‌دادن توده عضله اسکلتی هزینه انرژی و چاقی نقش دارند. این سازوکارها شامل: ۱) بهبود فیتنس فیزیکی از طریق SIRT1 و بیان SMPGC-α ۲) بهبود توده عضله اسکلتی از طریق مهار MURF1، فعال‌سازی MTOR، ترشح IGF-1، فعال سازی هورمون رشد ۳) توسعه ترموژنزیس از طریق بیان زیاد UCP1، فعال‌سازی AMPK، و تنظیم فاکتور رونویسی آدیپوسیت. در نتیجه، مکمل‌سازی با ارسولیک اسید می‌تواند یک درمان جنبی برای پیشگیری و درمان پیامدهای متابولیکی مرتبط با توده عضله در انسان باشد و همچنین می‌تواند دوره رشد را کوتاه کرده و رشد عضله اسکلتی در جوجه‌های گوشتی را افزایش دهد.

بطور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد اورسولیک در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بطور معنی‌داری بیان ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای یعنی PAX-7، MyoD و میوژنین را افزایش داد و همچنین هایپرتروفی عضله را بهبود بخشید. در نتیجه، اورسولیک اسید می‌تواند بعنوان یک ماده مؤثر در کاهش دوره پرورش و افزایش سرعت رشد عضله اسکلتی در جوجه‌های گوشتی بومی پیشنهاد شود.

## منابع


1. Alison, D., B. Jason, C. Foster and R. McGuigan. 2006. Using session RPE to monitor different methods of resistance exercise. Sports Science and Medicine, 5(2): 289-295.
2. Bakhtiari, N. 2016. Ursolic acid induces neomyogenesis through hyperplasia and increasing of satellite cells number in mice skeletal muscle. Journal of Stem Cell and Regenerative Biology, https://doi.org/10.15436/2471-0598.16.015.
3. Bakhtiari, N., M. Soulemani, M. Javan, R. Hemmati and S. Hosseinkhani. 2015. Ursolic acid induces myoglobin expression and skeletal muscle remodeling in mice. Physiology and Pharmacology, 18(4): 373-382.
4. Bakhtiari, N., S. Mirzaie, R. Hemmati, E. Moslemee-Jalalvand, A.R. Noori and J. Kazemi. 2018. Mounting evidence validates Ursolic Acid directly activates SIRT1: A powerful STAC which mimic endogenous activator of SIRT1. Arch Biochem Biophys, 650: 39-48.
5. Beekman, L., T. Tohver and R. Leguillette. 2012. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. Journal of Veterinary Internal Medicine, 26(1): 153-161.
6. Cameron-Smith, D. 2002. Exercise and skeletal muscle gene expression. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 29(3): 209-13.
7. Chu, X., X. He, Z. Shi, C. Li, F. Guo, S. Li, Y. Li, L. Na and C. Sun. 2015. Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and β-oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle. Molecular Nutrition & Food Research, 59(8): 1491-503.
8. Dhawan, J. and T.A. Rando 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. Trends Cell Biol, 15(12): 666-73.
9. Fulco, M., R.L. Schiltz, S. Iezzi, M.T. King, P. Zhao, Y. Kashiwaya, E. Hoffman, R.L. Veech and V. Sartorelli. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. Molecular Cell, 12(1): 51-62.
10. Garcia, V.P., F. Catala-Gregori, M.D. Hernandez, A. Megras and J. Madrid. 2006. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. Journal of Applied Poultry Research, 16: 555-562.
11. Halevy, O.A., M. Geyram, Z. Barakm and D. Sklan. 2000. Early post hatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks, Journal of Nutrition, 130: 858-864.
12. Hall, I.R., A. Tomann and U. Bauermann. 2008. Effect of a graded supplementation of savory in broiler feed on growth and carcass traits. Archive for Geflugelk, 72(3): 129-135.
13. Hawke, T.J. and D.J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. Journal of Applied Physiology, 91(2): 534-551.


[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

14. Jeong, J.W., J.J. Shim and I.D. Choi. 2015. Apple pomace extract improves endurance in exercise performance by increasing strength and weight of skeletal muscle. Journal of Medicinal Food, 18: 1380-1386.
15. Katashima, C.K., V.R. Silva, T.L. Gomes, C. Pichard and G.D. Pimentel. 2017. Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review. Obesity Reviews, 18(6): 700-711.
16. Kunkel, S.D., M. Suneja and S.M. Ebert. 2011. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identifies a natural compound that increases muscle mass. Cell Metab, 13: 627-638.
17. Kunwar, A., S. Jayakumar, H.N. Bhilwade, P.P. Bag, H. Bhatt, R.C. Chaubey, K.I. Priyadarsini. 2016. Protective effects of selenocystine against gamma-radiation-induced genotoxicity in Swiss albino mice, Radiat. Environ. Biophys, 50(2): 271-280.
18. Lepper, C. and C.M. Fan. 2010. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. Genesis, 48: 424-436
19. Li, S., X. Liao, F. Meng, Y. Wang, Z. Sun, F. Guo, X. Li, M. Meng, Y. Li and C. Sun. 2014. Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats. PLoS One, 9: e86724.
20. Meadows, E., J. Cho, J.M. Flynn and W.H. Klein. 2008. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. Developmental Biology, 322: 406-414.
21. Moss, F.P. and C.P. Leblond. 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats, Anatomical Record, 170: 421-435.
22. Nakatsuka, R., T. Nozaki, Y. Uemura, Y. Matsuoka, Y. Sasaki, M. Shinohara, K. Ohura and Y. Sonoda. 2010. 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. Archives of Oral Biology, 55: 350-357.
23. Nkukwana, T.T. 2018. Global poultry production: Current impact and future outlook on the South African poultry industry. South African Journal of Animal Science, http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v48i5.7.
24. Nuredin, B. 2015. Ursolic acid induces myoglobin expression and skeletal muscle remodeling in mice. Physiology and Pharmacology, 18(4): 373-382.
25. Rahimi, S.Z., M.A. Teymouri-Zadeh, R. Karimi-Torshizi, A. Omidbaigi and H. Rokni. 2011. Effect of the three herbal extracts on growth performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. Journal of Agriculture Science Technology, 13: 527-539.
26. Sumariwalla, V.M. and W.H. Klein. 2001. Similar myogenic functions for myogenin and MRF4 but not MyoD in differentiated murine embryonic stem cells. Genesis, 30: 239-249.
27. Tapscott, S.J. 2005. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. Development, 132: 2685-2695.
28. Velleman, S.G., K.E. Nestor, C.S. Coy and N.B. Anthony. 2010. Effect of posthatch feed restriction on broiler breast muscle development and muscle transcriptional regulatory factor gene and heparan sulfate proteoglycan expression, Int. Journal of Poultri Science, 9: 417-425.
29. Wu, H., R. Yu, L. Shuo, W. Wei, Y. Jianlong, G. Xudong, L. Dongjun and C. Ming. 2012. In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. Cell Biology International, 36: 579-587.
30. Zamani, A.K., A.R. Ghannadi, A. Gafarian and B. Shojadoost. 2010. The effect of Satureja hortensis on performance of broiler chickens and NDHI titers, 16th European Symposium on Poultry Nutrition, 87-89.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]

# Ursolic Acid Improve Skeletal Muscle Hypertrophy by Increasing of PAX7, Myod and Myogenin Expression and Satellite Cells Proliferation in Native Broiler Chickens

**Hengameh Moradi[1], Abdullah Mohammadi Sang Cheshmeh[2], Seyed Davood Sharifi[3], Sim Zar Hosseinzadeh[4], Ehsan Seyed Jafari[5] and Abdolreza Salehi[3]**

1- PhD Student, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Department of Animal and Poultry Sciences
2- Assistant Professor, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Department of Animal and Poultry Sciences, (Corresponding author: amohammadis@ut.ac.ir)
3- Associate Professor, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Department of Animal and Poultry Sciences
4- Assistant Professor, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Faculty of New Medical Technologies
5- Associate Professor, University of Tehran Science Campus, Department of Biotechnology
Received: 13 April, 2020 Accepted: 16 June, 2020

## Abstract

Ursolic acid (UA) is known as a naturally occurring triterpene pentacyclic compound in some medicinal herbs including savory that affects the skeletal muscle. In the current study, the effect of UA was evaluated on $C_2C_{12}$ cells and satellite cells (SCs) isolated from native broiler chicks. First in the in vitro experiment, the $C_2C_{12}$ cell line obtained from the Stem Cell Technology Research Center and the SCs were isolated and purified from one-day chickens and then treated with UA. In the in vivo experiment, UA was injected intramuscularly based on the body weight to chicks during the first seven days, two times a day, from day one to day seven by the appropriate dose obtained in the in vitro experiment, and then SCs were isolated from pectoralis muscle at the last day. The purification was confirmed by assessment of PAX-7 expression in both in vitro and in vivo experiments. In fact, SCs and $C_2C_{12}$ cells were cultured for seven days in 10% serum medium with vehicle alone (0.1% DMSO) or UA (0.00025, 0.0005, 0.001, 0.0015 and 0.002 mg/mL) along with DMSO (1 mL). The findings from the in vitro and in vivo experiments revealed that UA at 0.00025 mg/mL significantly increased the expression of genes involved in the SCs proliferation and differentiation including PAX-7, MyoD and Myogenin, and improve the muscle hypertrophy. As a result, UA can be suggested as a suitable material to reduce the breeding period and faster growth of skeletal muscle in broiler chickens.

**Keywords:** Flow-cytometry, Muscle development, Paired box protein Pax-7, Poultry, Ursolic Acid

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.13.5 ]
[ DOI: 10.52547/rap.11.30.11 ]