دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثر بازدارنده روغن ماهی بر تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول چربی در گوسفند

آرش وشکینی[۱]، فاطمه کوهکن[۲]، علی اسدی‌الموتی[۳]، عبدالرضا صالحی[۴] و عبدالله محمدی سنگ‌چشمه[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران (نویسنده مسوول: arash.veshkini@yahoo.com)
۲- استادیار، گروه مولکولی، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
۴- دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۱
صفحه: ۸۸ تا ۹۵

چکیده

در این مطالعه، بیان ژن‌ها و میرهای (miRNA) مرتبط با تمایز، چرخه سلولی و متابولیسم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی گوسفند زندی تحت تیمار روغن ماهی به‌عنوان منبع اسیدهای چرب امگا ۳ بررسی شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی گوسفند پس از جداسازی به‌منظور اثبات پرتوانی بررسی شدند. سلول‌ها در حضور و یا عدم حضور ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روغن ماهی تیمار شدند و چرخه سلولی و القا مرگ برنامه‌ریزی شده در هر گروه از سلول‌ها به کمک فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد (سه تکرار مستقل). در طراحی آزمایشی مشابه، این بار بیان میرها و ژن‌های پایین دست در مرحله رشد و تمایز به چربی در هر دو گروه مقایسه شد. سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با روغن ماهی درصد آپوپتوز ثانویه بالاتری داشتند درحالی که چرخه سلولی تحت تاثیر قرار نگرفت. بیان میرهای تمایزی تحت تاثیر تیمار قرار نگرفتند، با این حال، بیان نسبی میر let-7a به‌طور معنی‌داری در گروه روغن ماهی کاهش یافت. تیمار روغن ماهی بیان نسبی ژن peroxisome proliferator-activated receptor را کاهش (۰/۳۹) و بیان Interleukin 1 beta را افزایش (۱/۸۵) داد. در سلول‌های تمایز یافته به چربی بیان PPARG کاهش یافت. روی هم‌رفته، نتایج این مطالعه خواص بازدارنده روغن ماهی بر تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت چربی را از طریق تاثیر مستقیم یا غیر مستقیم بر مسیر تنظیمی PPAR نشان داد، با این حال تفاوت معنی داری در بیان میرهای انتخاب شده، مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، اسیدچرب امگا ۳، تمایز، چرخه سلولی، سلول چربی، عوامل رونویسی هسته‌ای

مقدمه

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی، سلول‌های بنیادی پرتوانی هستند که قادر به تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوانی می باشند (۲۳). از سلول‌های مزانشیمی به‌عنوان مدل‌های مناسبی برای مطالعات متابولیکی و مخصوصاً ناهنجاری‌های متابولیکی مانند چاقی یاد می‌شود (۲۱،۲۲). تعادل نامناسب رژیم غذایی از لحاظ انرژی باعث اختلال در متابولیسم سلول‌های مزانشیمی از نظر چربی زایی و لیپوژنسیس می‌شود که در نتیجه می‌تواند به پیشرفت چاقی کمک کند (۲۸). از جمله عوامل مؤثر در کنترل نرخ چربی‌زایی میزان فعالیت فاکتورهای رونویسی، شامل peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) و sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) می‌باشد (۱۰،۳۰). تنظیم بیان عوامل رونویسی هسته‌ای تحت‌تاثیر مستقیم RNAهای غیرکدکننده به‌نام miRNA (میر) قرار دارد. به‌عبارت دیگر، میرها همراه با عوامل رونویسی هسته‌ای نقش اصلی در تمایز سلول‌های مزانشیمی دارند (۲۴،۲۵).

پیش از این نشان داده شده است که اسیدهای چرب امگا ۳ از منبع روغن‌ماهی فعالیت ضد چربی‌زایی/لیپوژنسیس (۳۵،۷). دارند، با این‌حال مسیرهای درگیر هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. اسیدهای چرب امگا ۳ به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری شناخته می شوند و قابلیت سنتز از ابتدا را در بدن ندارند (۲۲). روغن ماهی به‌عنوان یک منبع غنی از اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا ۳ مانند اسید ایکوزاپنتائنوئیک (C20:5 n-3) و اسید دکوزهگزائنوئیک (C22:6 n-3) شناخته می‌شود (۱۳،۲،۲۰). اسیدهای چرب بلندزنجیر اثر متقابل بر مجموعه واکنش‌های تنظیمی میرها (۵) و عوامل رونویسی هسته‌ای (۱۵) دارند که در نهایت سرنوشت پیچیده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تعیین می‌کنند. در این رابطه، گزارش شده است که بیان حداقل ۱۵ میر در بافت‌های چربی زیر جلدی و احشایی گوسفند تحت‌تأثیر رژیم غذایی مکمل سازی شده با اسیدهای چرب امگا ۳ قرار گرفت (۱۶). همچنین، مطالعات آزمایشگاهی به‌وضوح نشان‌داد که مکمل امگا ۳ می‌تواند بیان miR-16 (۲۳) و miR-21(۹) در سلول‌های بنیادی را تغییر دهد.

در دهه‌های اخیر علاقه زیادی به استفاده از مکمل‌های چربی بر پایه اسیدهای چرب امگا ۳ در تغذیه دام به‌خصوص در دوره انتقال شده است، با این‌حال اطلاعات کافی در زمینه نقش این چربی‌ها بر چربی‌زایی و بروز بیماری‌هایی مثل چاقی وجود ندارد.

با این‌حال، مطالعات پیشین قادر به ارائه شواهد کافی در مورد چگونگی ایجاد ارتباط سلول‌ها بین عوامل رونویسی هسته‌ای و میرها و اسید های چرب نشده است، از این‌رو، در مطالعه حاضر سلول‌های مزانشیمی گوسفند به‌عنوان مدلی برای مطالعه اثر مکمل‌سازی روغن ماهی بر بیان ژن‌ها و میرهای تنظیمی مسیر لیپوژنسیس و چربی‌زایی استفاده شد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

مواد و روش‌ها

سلول‌های مزانشیمی از قطعات بافت چربی احشایی جمع‌آوری شده از سه میش بالغ نژاد زندی (در کشتارگاه پوریای شرق تهران) استخراج شدند. بافت چربی احشایی در لوله آزمایش ۵۰ سی‌سی حاوی محیط‌کشت DMEM (مکمل‌سازی شده با سه‌درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (Sigma-Aldrich) و سه درصد ماده ضدقارچ (Sigma-Aldrich) و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. به‌محض ورود، نمونه‌ها به بافر نمکی منتقل و سانتریفوژ (۱۲۰۰ دور به‌مدت پنج دقیقه) شدند تا گلبول‌های قرمز و سفید حذف شوند. این مرحله سه بار تکرار شد. نمونه‌ها به لوله آزمایش جدید حاوی DMEM همراه با ۱۰ میلی‌گرم کلاژناز نوع یک (Invitrogen) منتقل شدند و به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و پنج درصد CO_2 روی شیکر انکوبه شدند. سلول‌های جدا شده در اثر نیروی فیزیکی و فعالیت کلاژناز به‌کمک سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور به‌مدت پنج دقیقه) رسوب داده شدند و پلیت سلول‌ها به محیط DMEM جدید مکمل‌سازی شده با ۱۵درصد سرم گاوی، سه‌درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و سه‌درصد ماده ضدقارچ منتقل شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و پنج‌درصد CO_2 تا زمان رسیدن به جمعیت مطلوب برای پاساژ دادن کشت داده شدند. پس از رسیدن تعداد سلول‌ها به حد مناسب سلول‌ها پاساژ داده شدند و گروهی از سلول‌ها برای آزمایشات بعدی فریز شدند.

اثبات مزانشیم بودن سلول‌های جدا شده در درجه اول با بررسی واکنش به آنتی‌بادی اختصاصی سطحی سلول‌های مزانشیمی شامل CD45، CD73 و CD166 توسط فلوسایتومتری (BD FACSCalibur، USA) مورد تایید قرار گرفت. علاوه بر این، پتانسیل چند توانی سلول‌ها با تمایز به چربی و استخوان اثبات شد. محیط تمایز چربی حاوی محیط DMEM پایه همراه با دگزامتازون یک میلی‌مولار، انسولین 1/7 میلی‌مولار، ایندومتاسین ۲۰۰ میلی‌مولار، isobutylmethylxanthine ۵۰۰ میلی‌مولار و ۱۰ درصد سرم گاوی بود. سلول‌ها به‌مدت ۲۱ روز و متوسط هر سه روز یکبار تعویض محیط تحت تمایز بودند. پس از روز ۲۱ سلول-های تمایز یافته با پارفورمالدئید چهار درصد تثبیت و با رنگ-آمیزی oil red رنگ شدند. برای تمایز به استخوان، سلول‌ها با محیط DMEM مکمل سازی شده با ۱۰۰ میلی‌مولار دگزامتازون، ۱۰ میلی‌مولار بتا گلیسرول فسفات، ۵۰ میلی‌مولار اسید اسکوربیک و ده درصد سرم گاوی کشت شدند. بعد از گذشت ۱۴ و ۲۱ روز سلول‌ها با پارافرمالدئید چهاردرصد تثبیت شدند و سپس با رنگ Alizarin red (بهنوژن، ایران) طبق دستورالعمل سازنده رنگ‌آمیزی شدند.

در این مطالعه از روغن‌ماهی تجاری (شماره محصول F8020، مرک، آلمان) مناسب برای کشت‌سلولی استفاده شد. روغن‌ماهی در غلظت نهایی روغن ۱۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر (مستخرج از مطالعه قبلی (۸)) به‌کمک پنج درصد (وزنی وزنی) فسفاتیدیل کولین تخم‌مرغ (سیگما) امولسیفه شد و به‌همراه ۰/۰۳ درصد (وزنی وزنی) butylated hydroxytoluene (به‌عنوان آنتی‌اکسیدان داخل سلولی) در محیط کشت استفاده شد. در کلیه آزمایشات در هر ۲۴ ساعت محیط‌کشت سلول‌ها و روغن‌ماهی تعویض شد. آزمایشات اولیه زیستایی و چرخه سلولی اثر ناچیزی از فسفاتیدیل کولین بر روی سلول‌ها نشان داد. سلول‌های مزانشیم پاساژ چهارم (در تراکم ۲۰۰۰ سلول در هر خانه) در ظرف ۲۴ خانه کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروهی از سلول‌ها با محیط کشت (شاهد) و گروه دیگری با ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از روغن‌ماهی تیمار شدند. زیستایی سلول‌ها با روش MTT در روزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ بعد از تیمار در هر دو گروه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Beckman Coulter، USA) در موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سلول‌های مزانشیمی پاساژ سوم در ظرف شش خانه کشت شدند، سلول‌ها در مرحله رشد با و یا بدون روغن‌ماهی برای مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها به آزمایشگاه سلول بافت آزما (سبز) جهت آنالیز چرخه سلولی و آپوپتوز فرستاده شد.

به‌منظور بررسی تأثیر روغن ماهی بر تمایز سلول‌های مزانشیمی به‌سمت چربی، سلول‌های پاساژ چهارم به‌مدت ۲۱ روز در محیط تمایزی سلول‌های چربی قرار گرفتند. در ۴۸ ساعت اول تمایز، گروهی از سلول‌ها با ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روغن‌ماهی تیمار شدند. در پایان تمایز، گروهی از سلول‌ها با استفاده از oil red به‌منظور تأیید تشکیل چربی رنگ‌آمیزی شدند. بقیه سلول‌ها برای تجزیه و تحلیل بیان میرها و ژن‌ها استفاده شدند. پس از تمایز، محیط به‌طور کامل برداشته شد، سلول‌ها سه‌بار با بافر فسفات سالین شسته شدند و یک میلی‌لیتر بافر لیز کننده به آنها اضافه شد. استخراج کل RNA، از سلول‌های چربی با استفاده از کیت GeneAll (RiboExTM LS، Korea) و بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. خلوص RNA سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتری NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific، USA) بررسی شد. RNA استخراج شده به‌کمک کیت مخصوص بن‌میر شرکت بن‌یاخته به cDNA تبدیل شد. بررسی بیان میرها let-7a ، let-7g، miR-17، miR-27b، miR-33a، miR-101، miR-103، miR-122، miR-125b، miR-142، miR-143، miR-146 ، miR-195، miR-200a، miR-200b و miR-2368 و ژنهای ACSL6، SREBF1، PPARG، PTGS2، IL1B، NF-kB و TNFα به‌روش RT Real-time PCR و در دستگاه ABI 157 PRISM 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems، USA) انجام گرفت. شرایط دمایی و زمانی واکنش Real-time PCR برای تکثیر میرها و ژن‌ها شامل دو مرحله واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس واسرشت ثانویه شامل چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای ۴۰ مرتبه بود. در پایان، سیکل‌های آستانه‌ای (CT) خام مربوط به بیان ژن‌های مرجع و هدف در نمونه‌های گروه‌های شاهد و تیمار ثبت شد. بیان

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

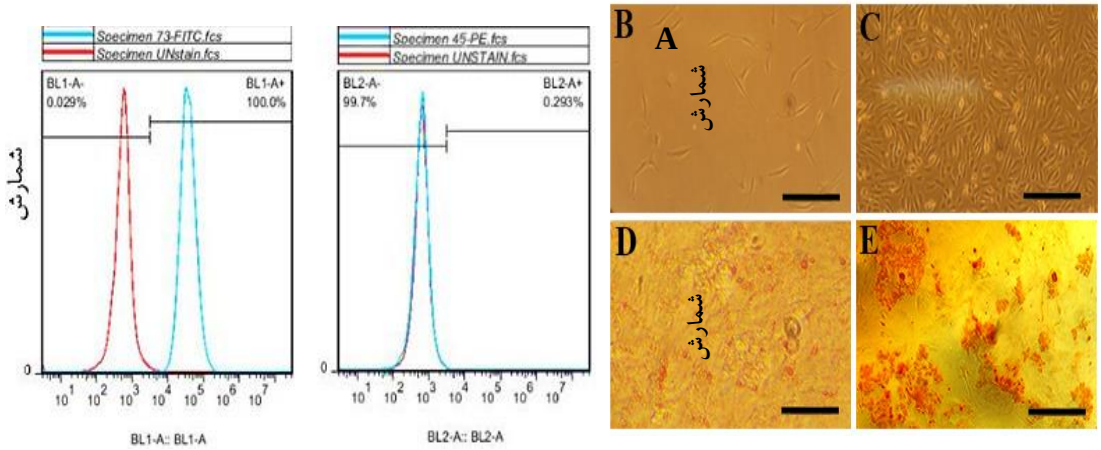
نسبی ژن‌های هدف نسبت به میانگین بیان ژن‌های مرجع β-actin و SNORD به‌روش 2-ΔΔCt محاسبه شد.

سه تکرار مستقل برای هر آزمایش انجام شد. داده‌های حاصل از چرخه سولی و آپوپتوز به‌کمک استودنت t و داده‌های حاصل از بیان ژن‌ها به‌کمک روش 2–ΔΔCt آنالیز شدند.

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین بیان شد و p<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹,۰ (SPSS، شیکاگو، ایالات متحده) انجام شد.

نتایج و بحث

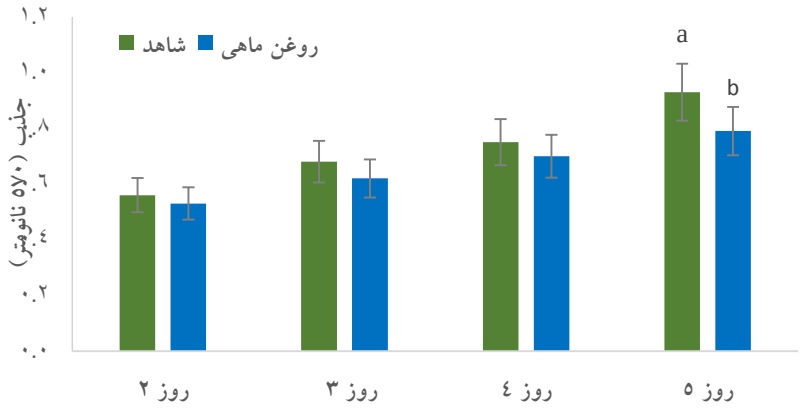
بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی شامل CD166 وCD73 در سلول‌های مزانشیمی جدا شده مثبت و بیان نشانگرهای غیر اختصاصی CD45 منفی بود. همچنین تمایز به چربی و تمایز به استخوان با کمک رنگ‌آمیزی قطرات چربی تشکیل یافته و کانی‌سازی کلسیم در روز ۲۱ تمایز تأیید شد (شکل ۱). این نتایج مطابق با مطالعات قبلی است که نشانگرهای سطحی مثبت و منفی را در سلول‌های مزانشیمی معرفی کردند (۲۷،۱۹). علاوه بر این، قابلیت چندتوانی سلول‌ها با تمایز به‌سمت استخوان و چربی تایید شد (شکل ۱). این نتایج به‌وضوح صحت استخراج سلول‌های بنیادی پرتوان مزانشیمی را تایید کرد. مکمل‌سازی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روغن ماهی به سلول‌های مزانشیمی پاساژ سوم به‌مدت پنج روز باعث کاهش تدریجی قدرت بقا سلول‌ها شد، با این‌حال این اثر تنها در روز پنجم مکمل‌سازی معنادار بود (شکل ۲). غلظت موثر روغن ماهی از مطالعه قبلی (۸) انتخاب شد و نتایج آزمون زیستایی نشان داد که دوز انتخابی برای سلول‌ها کشنده نیست، اگرچه در روز پنجم کاهش رشد سلول‌ها نشان داده شد. ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با روغن ماهی، میانگین سلول‌ها در فاز G0-G1 به‌طور معنی‌داری در گروه روغن ماهی افزایش یافت با این حال میانگین سلول‌ها در فاز S چرخه سلولی کاهش یافت. همچنین تیمار روغن ماهی درصد سلول‌ها در فاز M را افزایش داد. نتایج آزمایش آپوپتوز القا آپوپتوز ثانویه در سلول‌های تیمار شده با روغن ماهی را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۱– A) بیان نشانگرهای اختصاصی و غیراختصاصی سلول‌های مزانشیمی، B و C) مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی (مقیاس ۰/۱)، D) رنگ‌آمیزی E oil red) رنگ‌آمیزی alizarin red (مقیاس ۰/۵ میلی‌متر)

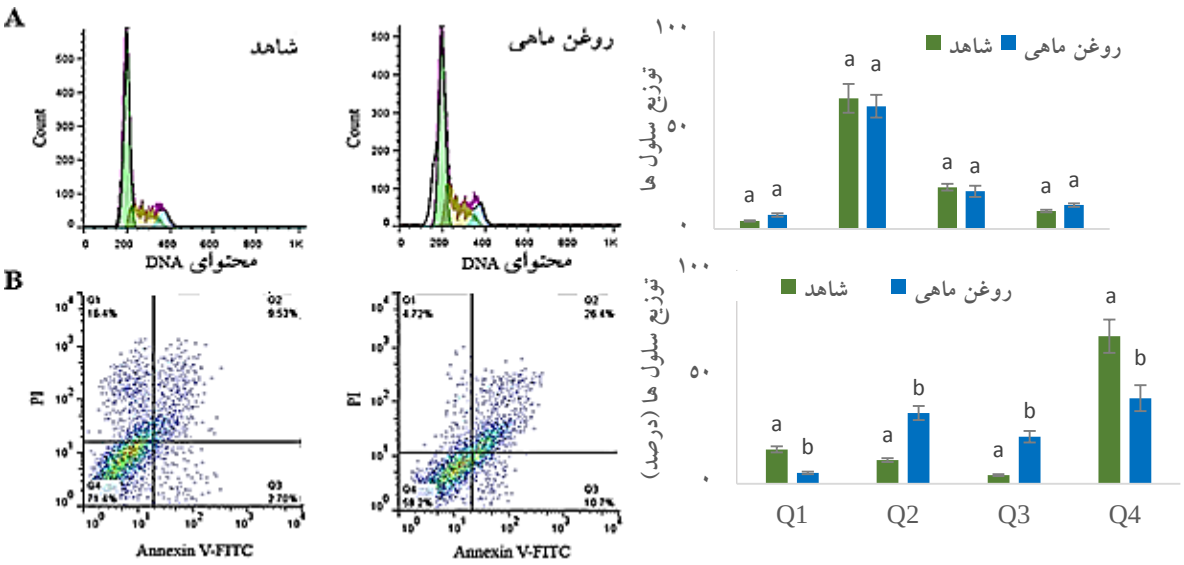
Figure 1. A) Expression of specific and nonspecific mesenchymal cells markers, B and C) Morphology of mesenchymal cells (scale 0.1 Mm), D) oil red staining E) alizarin red staining (scale 0.5 mm)

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]



شکل ۲- اثر روغن ماهی (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر زیستایی سلول‌های مزانشیمی گوسفند در روزهای مختلف اندازه‌گیری پس از اعمال تیمار، ستون‌های با حروف متفاوت تفاوت معنادار (p<۰/۰۵). دارند. نوار خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از میانگین با حداقل سه تکرار مستقل است.

Figure 2. Effect of fish oil administration (15 mg / ml) on the viability of sheep mesenchymal cells on different days of measurement after treatment, columns with different letters represent significant difference (p <0.05). The error bar indicates the standard deviation from the mean (three independent replicate).



شکل ۳- اثر روغن ماهی (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر A) چرخه سلولی B) القا آپوپتوز در سلول‌های مزانشیمی، ستون‌های با حروف متفاوت تفاوت معنادار (p<۰/۰۵). دارند. نوار خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از میانگین با حداقل سه تکرار مستقل است.

Figure 3. Effect of fish oil administration (15 mg / ml) on A) cell cycle B) apoptosis induction in mesenchymal cells, columns with different letters represent significant difference (p <0.05). The error bar indicates the standard deviation from the mean (three independent replicate).

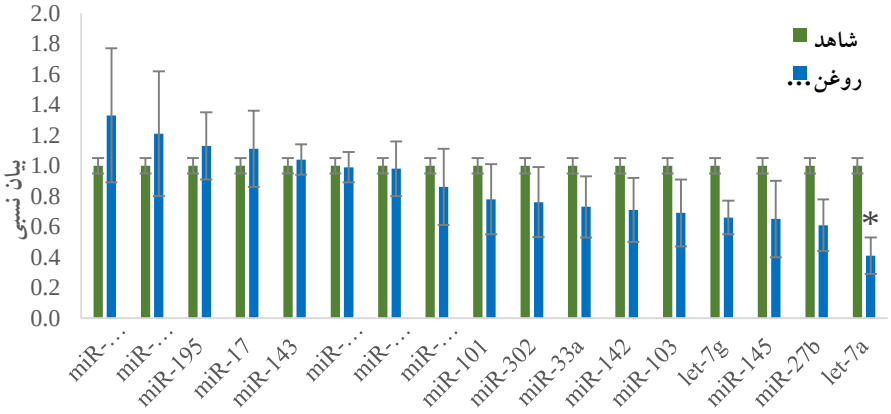
القاء آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار روغن‌ماهی با توجه به آسیب‌پذیری باندهای غیر اشباع در برابر اکسیداسیون (۴) و احتمال تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن قابل توجیه است. همچنین، سوخت‌وساز اسیدهای چرب در میتوکندری و پروکسیزوم باعث افزایش تولید رادیکاهای فعال اکسیژن می‌شود. در تطابق با مطالعات قبلی، تیمار سلول‌ها با منابع مختلف اسیدهای چرب امگا ۳ باعث القا آپوپتوز و توقف چرخه سلولی شد (۳۲،۱۹،۱). هرچند سیکل سلولی در این آزمایش تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت، با این‌حال به سمت وارسی گرایش داشت، که تا حدودی مؤید نتایج بخش آپوپتوز است. با این حال، در آزمایش بعدی بیان ژن‌های آپوپتوزیس اندازه مورد مطالعه قرار گرفت.

به منظور بررسی اثر روغن ماهی بر تمایز چربی، سلول‌های مزانشیم گوسفندی به‌سمت سلول چربی تمایز داده شد و در دو روز اول تمایز، گروهی از سلول‌ها با روغن ماهی تیمار شدند. ۲۱ روز پس از تمایز، بیان میرها و ژن‌های تمایزی مورد بررسی قرار گرفت. مکمل‌سازی محیط تمایزی با روغن ماهی بیان let-7a را کاهش داد (شکل ۴).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

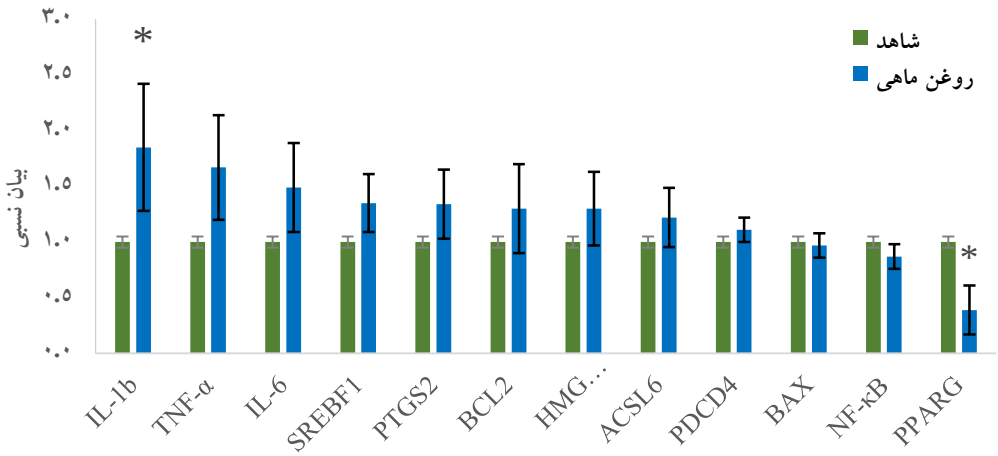
همچنین در بحث ژن‌ها، مکمل سازی محیط تمایزی با روغن ماهی بیان PPARG را کاهش و بیان IL-1β را افزایش داد (شکل ۵).

در فرآیند چربی‌زایی، برخی میرها مثل miR-17، miR-21، miR-122، miR-125b، miR-143، miR-103 و miR-200a به‌عنوان القا کننده چربی‌زایی عمل می‌کنند، در حالی‌که برخی دیگر مانند miR-17، miR-21، miR-122 و miR-125b به‌عنوان ضدچربی درنظر گرفته می‌شوند (۳،۳۷،۳۸). بیان میرهای انتخاب شده تحت‌تاثیر تیمار قرار نگرفت، به‌جز میر let-7a که به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. پیش از این گزارش شده است که بیان let-7a در خلال ادیپوژنیز کاهش می‌یابد (۳۱،۲۸)، همچنین محور Let-7/HMGA2 به‌عنوان یک سیگنال قوی در تنظیم مسیرهای استخوان‌سازی و چربی‌زایی شناخته شده است (۳۳،۳۶).



شکل ۴- اثر روغن ماهی (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر بیان میرهای منتخب در سلول‌های مزانشیمی گوسفند در مرحله رشد، ستون‌های با اندیس ستاره تفاوت معنادار(p<۰/۰۵) با گروه شاهد دارند. نوار خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد از میانگین است. بیان میرها در گروه شاهد توسط نرم‌افزار Rest یک با انحراف استاندارد صفر فرض شد و بیان میرها در گروه تیمار به‌صورت افزایش یا کاهش نسبت (ratio) به شاهد می‌باشد.

Figure 4. Effect of fish oil administration (15 mg/ml) on the microRNA expression of sheep mesenchymal cells during the growth phase, the column with a star index indicates a significant difference (p <0.05) to the control group. The error bar indicates the standard deviation from the mean. The microRNA expression in the control group was assumed to one with a standard deviation of zero by the Rest software, and microRNA expression in the treatment group was represented by a ratio (increase or decrease) to the control.



شکل ۵- اثر روغن ماهی (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر بیان ژن‌های منتخب در سلول‌های مزانشیمی گوسفند در مرحله تمایز به چربی، ستون‌های با اندیس ستاره تفاوت معنادار (p<۰/۰۵) دارند. نوار خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از میانگین است. بیان ژن‌ها در گروه شاهد توسط نرم‌افزار Rest یک با انحراف استاندارد صفر فرض شد و بیان ژن‌ها در گروه تیمار به‌صورت افزایش یا کاهش نسبت (ratio) به شاهد می‌باشد.

Figure 5. Effect of fish oil administration (15 mg/ml) on the gene expression of sheep mesenchymal cells during the adipocyte differentiation, the column with a star index indicates a significant difference (p <0.05) to the control group. The error bar indicates the standard deviation from the mean. The gene expression in the control group was assumed to one with a standard deviation of zero by the Rest software, and gene expression in the treatment group was represented by a ratio (increase or decrease) to the control.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

مکمل روغن ماهی به طور قابل توجهی بیان PPARG را کاهش داد و بیان IL-1β را افزایش داد (شکل ۵)، درحالیکه بیان نسبی ASCL6 تحت‌تاثیر تیمار قرار نگرفت. اعضای خانواده ASCL مسیرهای مختلفی از جمله تشکیل و بازسازی قطرات لیپیدها، سنتز تری‌گلیسیرید و تمایز سلولی را تنظیم می‌کنند. اعضای خانواده ASCL مسیرهای مختلفی از جمله تشکیل و بازسازی قطرات لیپیدها، سنتز تری‌گلیسیرید و تمایز سلولی را تنظیم می‌کنند (۸) در تطابق با یافته‌های حاضر پیش از این نشان داده شد، که فراوانی نسبی ACSL در طی چربی‌زایی ثابت است. PPARγ به‌عنوان یکی از عوامل رونویسی به‌عنوان تنظیم کننده اصلی تمایز سلول‌های چربی شناخته می‌شود (۳۹). در حقیقت، میرها و ژن با خاموش یا فعال کردن PPARγ نقش تنظیمی خود را ایفا می‌کنند (۳۹). نتایج مطالعات دیگر به نوعی بحث برانگیز است. گروهی از محققین از اثر مهاری اسیدهای چرب امگا ۳ بر تمایز سخن گفته‌اند و این اثر را به کاهش بیان PPARG نسبت داده‌اند (۱۴،۳۴). در طرف مقابل تعدادی از مقالات، القا تمایز را از اثرات تیمار اسیدهای چرب امگا ۳ بر سلول‌های 3T3-L1 عنوان کرده‌اند (۹،۱۸) که این تناقض عمدتاً به‌دلیل تنوع در منبع، نوع و نسبت اسیدچرب استفاده شده برمی‌گردد. میرهای انتخاب‌شده در این آزمایش، بیان متفاوتی در هیچ‌یک از مراحل رشد و تمایز نداشتند که این امر ما را از بیان مسیرهای دقیق تمایز و ارتباط آنها با دیگر عوامل مؤثر در تمایز را عاجز می‌سازد.

در مجموع، روغن ماهی به‌عنوان منبع اسیدهای چرب امگا ۳ تمایز سلول‌های مزانشیمی به‌سمت سلول‌های چربی را از طریق مسیر PPARγ مهار کرد، هرچند بیان میرهای منتخب چه در مرحله رشد چه در مرحه تمایز، تحت تأثیر تیمار روغن ماهی قرار نگرفت. در این زمینه پیشنهاد می‌شود تکنولوژی‌های با بازده بالا (Omics) در سطح مولکولی و پروتئین می‌توانند مسیرهای تنظیمی تمایز به‌سمت چربی یا استخوان را بیش از پیش نمایان سازند.

منابع

1. Abdi, J., J. Garssen, J. Faber and F.A. Redegeld. 2014. Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. Journal of Nutritional Biochemistry, 25(12): 1254-1262.
2. Abdollahi, A., A. Akhlaghi, M.J. Zamiri, A. Niazi, S. Kargar and Z. Ansari Pirsaraei. 2020. The Effects of Different Fish Oil Levels on Productive and Reproductive Performance and Blood Attributes In Female Chukar Partridges (Alectoris Chukar). Research on Animal Production, 11(29).
3. Arner, P. and A. Kulyte. 2015. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. Nature Reviews: Endocrinology, 11(5): 276-288.
4. Awada, M., C.O. Soulage, A. Meynier, C. Debard, P. Plaisancie, B. Benoit and M.C. Michalski. 2012. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. Journal of Lipid Research, 53(10): 2069-2080.
5. Davidson, L.A., N. Wang, M.S. Shah, J.R. Lupton, I. Ivanov and R.S. Chapkin. 2009. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. Carcinogenesis, 30(12): 2077-2084.
6. Ellis, J.M., L.O. Li, P.C. Wu, T.R. Koves, O. Ilkayeva, R.D. Stevens and R.A. Coleman. 2010. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. Cell Metabolism, 12(1): 53-64.
7. Green, C.J., C. Pramfalk, C.A. Charlton, P.J. Gunn, T. Cornfield, M. Pavlides and L. Hodson. 2020. Hepatic de novo lipogenesis is suppressed and fat oxidation is increased by omega-3 fatty acids at the expense of glucose metabolism. BMJ open diabetes research and care, 8(1): e000871.
8. Han, S., X. Sun, J.D. Ritzenthaler and J. Roman. 2009. Fish oil inhibits human lung carcinoma cell growth by suppressing integrin-linked kinase. Molecular Cancer Research, 7(1): 108-117.
9. Hanada, H., K. Morikawa, K. Hirota, M. Nonaka and Y. Umehara. 2011. Induction of apoptosis and lipogenesis in human preadipocyte cell line by n-3 PUFAs. Cell Biology International, 35(1): 51-59.
10. Huang, Q., C. Ma, L. Chen, D. Luo, R. Chen and F. Liang. 2018. Mechanistic Insights Into the Interaction Between Transcription Factors and Epigenetic Modifications and the Contribution to the Development of Obesity. Frontiers in Endocrinology, 9: 370.
11. LeMay-Nedjelski, L., J.K. Mason-Ennis, A. Taibi, E.M. Comelli and L.U. Thompson. 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Time-Dependently Reduce Cell Viability and Oncogenic MicroRNA-21 Expression in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells (MCF-7). International Journal of Molecular Sciences, 19(1): 244.
12. Li, J.Z., H. Qu, J. Wu, F. Zhang, Z.B. Jia, J.Y. Sun and K. Kang. 2018. Metabolic profiles of adipose-derived and bone marrow-derived stromal cells from elderly coronary heart disease patients by capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. International Journal of Molecular Medicine, 41(1): 184-194.
13. Lorente-Cebrian, S., A.G. Costa, S. Navas-Carretero, M. Zabala, J.A. Martinez and M.J. Moreno-Aliaga. 2013. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. Journal of Physiology and Biochemistry, 69(3): 633-651.
14. Manickam, E., A.J. Sinclair and D. Cameron-Smith. 2010. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. Lipids in Health and Disease, 9: 57.
15. Martinez-Fernandez, L., L.M. Laiglesia, A.E. Huerta, J.A. Martinez and M.J. Moreno-Aliaga. 2015. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 121(Pt A): 24-41.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

16. Meale, S. J., J.M. Romao, M.L. He, A.V. Chaves, T.A. McAllister and L.L. Guan. 2014. Effect of diet on microRNA expression in ovine subcutaneous and visceral adipose tissues. Journal of Animal Science, 92(8): 3328-3337.
17. Moustaka, K., E. Maleskou, A. Lambrianidou, S. Papadopoulos, M.E. Lekka, T. Trangas and E. Kitsiouli. 2019. Docosahexaenoic acid inhibits proliferation of EoL-1 leukemia cells and induces cell cCycle arrest and cell differentiation. Nutrients, 11(3): 574.
18. Murali, G., C.V. Desouza, M.E. Clevenger, R. Ramalingam and V. Saraswathi. 2014. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 90(1): 13-21.
19. Music, E., K. Futrega and M.R. Doran. 2018. Sheep as a model for evaluating mesenchymal stem/stromal cell (MSC)-based chondral defect repair. Osteoarthritis and Cartilage, 26(6): 730-740.
20. Naderi, N., E.J. Combellack, M. Griffin, T. Sedaghati, M. Javed, M.V. Findlay and I.S. Whitaker. 2017. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. Int. Wound J., 14(1): 112-124.
21. Navidshad, B. 2013. Effects of Dietary Inclusion of Fish Oil, Soybean Oil, Palm Oil or Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Performance and Meat Fatty Acid Composition of Broiler Chickens. Research on Animal Production, 4(7): 35-46.
22. Nguyen, Q.V., B.S. Malau-Aduli, J. Cavalieri, A.A.E.O. Malau-Aduli and P.D. Nichols. 2019. Enhancing omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content of dairy-derived foods for human consumption. Nutrients, 11(4).
23. Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284(5411): 143-147.
24. Rodriguez-Cuenca, S., S. Carobbio, V.R. Velagapudi, N. Barbarroja, J.M. Moreno-Navarrete, F.J. Tinahones and A. Vidal-Puig. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. Molecular and Cellular Biology, 32(8): 1555-1565.
25. Romao, J. M., W. Jin, M.V. Dodson, G.J. Hausman, S.S. Moore and L.L. Guan. 2011. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 236(9): 997-1004.
26. Sam, M.R., M. Tavakoli-Mehr and R. Safaralizadeh. 2018. Omega-3 fatty acid DHA modulates p53, survivin, and microRNA-16-1 expression in KRAS-mutant colorectal cancer stem-like cells. Genes and Nutrition, 13(8): 1-12.
27. Sanjurjo-Rodriguez, C., R. Castro-Vinuelas, T. Hermida-Gomez, T. Fernandez-Vazquez, I.M. Fuentes-Boquete, F.J. de Toro-Santos and F.J. Blanco-Garcia. 2017. Ovine mesenchymal Stromal Cells: Morphologic, Phenotypic and Functional Characterization for osteochondral tissue engineering. PloS One, 12(1): e0171231.
28. Sethi, J.K. and A.J. Vidal-Puig. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. Journal of Lipid Research, 48(6): 1253-1262.
29. Shi, C., F. Huang, X. Gu, M. Zhang, J. Wen, X. Wang and X. Guo. 2016. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. Oncotarget, 7(26): 40830-40845.
30. Siersbaek, R., R. Nielsen and S. Mandrup. 2010. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. FEBS Letters, 584(15): 3242-3249.
31. Skarn, M., H.M. Namlos, P. Noordhuis, M.Y. Wang, L.A. Meza-Zepeda and O. Myklebost. 2012. Adipocyte differentiation of human bone marrow-derived stromal cells is modulated by microRNA-155, microRNA-221, and microRNA-222. Stem Cells Dev, 21(6): 873-883.
32. So, W.W., W.N. Liu and K.N. Leung. 2015. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Trigger Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma LA-N-1. Cells. Nutrients, 7(8): 6956-6973.
33. Sun, T., M. Fu, A.L. Bookout, S.A. Kliewer and D.J. Mangelsdorf. 2009. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. Molecular Endocrinology, 23(6): 925-931.
34. Tanabe, Y., Y. Matsunaga, M. Saito and K. Nakayama. 2008. Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. Journal of Pharmacological Sciences, 106(3): 478-484.
35. Todorcevic, M. and L. Hodson. 2015. The effect of marine derived n-3 fatty acids on adipose tissue metabolism and function. J. Clin. Med., 5(1).
36. Wei, J., H. Li, S. Wang, T. Li, J. Fan, X. Liang and R.C. Zhao. 2014. let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2. Stem Cells Dev., 23(13): 1452-1463.
37. Yun, U.J., N.J. Song, D.K. Yang, S.M. Kwon, K. Kim, S. Kim and H. Kang. 2015. miR-195a inhibits adipocyte differentiation by targeting the preadipogenic determinator Zfp423. Journal of Cellular Biochemistry, 116(11): 2589-2597.
38. Zaiou, M., H. El Amri and A. Bakillah. 2018. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 28(2): 91-111.
39. Zhang, Y.F., H.M. Xu, F. Yu, M. Wang, M.Y. Li, T. Xu and P.F. Li. 2018. Crosstalk between microRNAs and peroxisome proliferator-activated receptors and their emerging regulatory roles in cardiovascular pathophysiology. PPAR Res., 8530371.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]

The Inhibitory Effect of Fish Oil on Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Adipocytes in Sheep

Arash Vashkini[1], Fatemeh Koohkan[2], Ali Asadi Alamouti[3], Abdolreza Salehi[4] and Abdullah Mohammadi Sangcheshmeh[3]

1- PhD Student, Department of Livestock and Poultry, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran (Corresponding Author: arash.veshkini@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Molecular Group, Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Livestock and Poultry Sciences, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran
4- Associate Professor, Department of Livestock and Poultry Sciences, Abu Reihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran

Received: 26 September, 2020 Accepted: 31 December, 2020

Abstract

In this study, the expression of genes and miRNAs related to differentiation, cell cycle and metabolism was investigated in Zandi sheep mesenchymal cells (ADSC) under fish oil treatment as a source of omega-3 fatty acids. Isolated sheep mesenchymal stem cells were confirmed for pluripotency. ADSCs were treated in the presence or absence of 15 mg / ml fish oil, and cell cycle and apoptosis induction were measured in each group (three independent repeat) via Flow cytometry. In a similar experiment, the expression of downstream miRNAs and genes at the growth and differentiation stages to adipocyte was compared in both groups. Mesenchymal cells treated with fish oil had a higher percentage of late apoptosis, while the percentage of cells in S phase decreased. The expression of miRNAs did not change significantly, however, let-7a was significantly decreased in the fish oil group. Fish oil treatment decreased (0.39) relative expression of peroxisome proliferator-activated receptor G (PPARG) and increased (1.85) Interleukin 1 beta expression. In adipocyte-differentiated cells, PPARG expression was decreased. The results of this study showed the inhibitory properties of fish oil on adipocyte differentiation of mesenchymal cells through direct or indirect effects on PPAR pathway. However, no significant difference was observed in the expression of selected miRNAs.

Keywords: Adipocytes, Apoptosis, Cell cycle, Differentiation, Nuclear transcription factors, Omega-3 fatty acid

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.32.1.4]

[DOI: 10.52547/rap.12.32.88]