



## "مقاله پژوهشی"

# تأثیر اورسولیک اسید بر بیان ژن های MyoD، PAX-7 و میوژنین و تکثیر سلول های ماهواره ای در جوجه های بومی

هنگامه مرادی<sup>۱</sup>، عبدالله محمدی سنگ چشمه<sup>۲</sup>، سید داوود شریفی<sup>۳</sup>، سیم زر حسین زاده<sup>۴</sup>، احسان سید جعفری<sup>۵</sup> و عبدالرضا صالحی<sup>۳</sup>

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 مسؤول: amohammadis@ut.ac.ir)  
۳- دانشیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، گروه علوم دام و طیور  
۴- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری های 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 تری ترین پنج حلقه ای شناخته می شود که در بعضی از گیاهان دارویی همچون مرزه و آویشن کوهی وجود دارد و روی توسعه عضلات اثر می گذارد. در مطالعه اخیر، تأثیر اورسولیک اسید بر روی سلول های C2C12 و همچنین سلول های ماهواره ای (SCs) جدا شده از جوجه های گوشتی بومی مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا در آزمایش *In vitro* سلول های C2C12 از مرکز تحقیقات بنیادته تهیه شدند و سلول های ماهواره ای از جوجه های 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 جوجه ها تزریق شد، بطوریکه دوزهای مورد استفاده بر اساس دوزهای بدست آمده از آزمایش *In vitro* بود. سلول های ماهواره ای در روز هفتم از عضله پکتورال جوجه های تیمار شده جداسازی شدند. تشخیص SCs از طریق بیان ژن PAX-7 در آزمایشات *In vitro* و *In vivo* تأیید شد. در واقع، سلول های ماهواره ای و C2C12 در محیط کشت با اورسولیک اسید (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۰۵، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱۵ و ۰/۰۰۰۲ میلی گرم در میلی لیتر) همراه با ۱ سی سی DMSO کشت شدند. نتایج بدست آمده از هر دو آزمایشات *In vitro* و *In vivo* نشان داد که اورسولیک در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بطور معنی داری بیان ژن های درگیر در تکثیر و تمایز سلول های ماهواره ای یعنی MyoD، PAX-7 و میوژنین را افزایش داد و همچنین هاپیروتروپی عضله را بهبود بخشید. در نتیجه، اورسولیک اسید می تواند به عنوان یک ماده مؤثر در کاهش دوره پرورش و افزایش سرعت رشد عضله اسکلتی در جوجه های گوشتی بومی پیشنهاد شود.

واژه های کلیدی: اورسولیک اسید، توسعه عضله، فلوسیتومتری، PAX-7

## مقدمه

که با محدودیت خوراک در این زمان آسیب می بیند (۲۸). مستندات علمی موجود پیشنهاد می کنند که سلول های ماهواره ای به شدت توسط عوامل خارجی مثل فاکتور رشد تغییر شکل دهنده بتا ( $TGF-\beta$ )، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و چندین عامل رونویسی از قبیل PAX-7، عامل تنظیمی میوژنیک (MRF)، عامل تمایز میوژنیک (MyoD) و میوژنین کنترل می شوند (۱۸۶). لذا، شناسایی این عوامل و فهم اینکه آنها چگونه عمل می نمایند مسیر جدیدی در بهبود عملکرد رشد جوجه های گوشتی باز خواهد نمود. تلاش های زیادی در جهت فهم سازوکارهای مولکولی و سلولی درگیر در هاپیروتروپی و آتروفی عضلات در سال های اخیر انجام شده است (۲۵). یکی از راهبردهای موجود در تحریک هاپیروتروپی عضلات بهره گیری از مواد طبیعی گیاهی مثل اورسولیک اسید است (۱۹). اورسولیک اسید یک ترکیب لیپوفیلیک می باشد که در پوست سیب، نعنای 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، ضداسیداتیو، ضدالتهابی، ضد دیابت، ضدایدز، ضدباکتری و محافظت از کبد است

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 جوجه ها و تبدیل مواد مغذی به گوشت و عضله، اندازه گیری احتیاجات مواد مغذی جوجه ها در هفته های اول پس از هچ است که پتانسیل رشد عضله تا زمان کشتار را تعیین می نماید (۱۱). از آنجایی که رشد عضله در جوجه ها با هاپیروتروپی عضله اسکلتی اتفاق می افتد، بهبود چنین فرایندی توجه وافر را در پژوهش ها به خود جلب کرده است.

هاپیروتروپی عضله اسکلتی از طریق جمعیت میوبلاست های بالغ کنترل می شود که بعنوان سلول های ماهواره ای معروف هستند. این سلول ها، سلول های بنیادی اصلی عضله اسکلتی محسوب می شوند (۱۳). سلول های ماهواره ای توسط اهدای هسته به فیبرهای عضله ای، هاپیروتروپی عضله را تسریع می نمایند و ظرفیت فیبرها برای سنتز پروتئین را افزایش می دهند (۲۱). این سلول ها در هفته اول پس از هچ فعال اند

روز سوم جوجه ها با محلول کتامین/زالین بیهوش شده و در ادامه، ماهیچه اسکلتی به قطر ۱ میلی متر از سینه طیور گوشتی جدا شده و درون فالكون حاوی محلول آنژیومی (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، نمونه ها به مدت سه و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. نمونه ها از یک صافی با منافذهای ۷۰ میلی متری عبور داده شدند و به مدت ۲ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۵۰ قرار گرفتند. در ادامه، با افزودن به محیط کشت 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 سلول های غیرقطبی و سلول های جدا شده توسط بافر فسفات سالین-EDTA انجام گرفت. این مرحله هر روز تکرار شد و سلول ها در یک فلاسک حاوی محیط کشت داده شدند. در نهایت، برای تشخیص سلول های کشت داده شده از فلوسیتومتری آنتی بادی PAX-7 استفاده شد.

#### فلوسیتومتری

در این مرحله، شناسایی سلول های ماهواره ای با استفاده از آنتی بادی اختصاصی اولیه PAX-7 صورت گرفت. سلول ها 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 آنتی بادی PAX7 و بصورت مستقیم به یک آنتی بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند بمدت ۱ ساعت انکوبه شدند. بعد از تثبیت مجدد سلول ها با پارافرمالدئید یک درصد، نمونه ها برای بررسی بیان نشانگر سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Dekenson Bectin و نرم افزار Win 8/MDI2 در آزمایشگاه هیستونوتک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### تیمار با اورسولیک اسید

سلول های ماهواره ای به همراه C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> در محیط کشت فیبروبلاست (DMEM با ۴/۵ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکز) شامل ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین، ۱ درصد کلوتامین و ۱۰ درصد FBS همراه با ۹۵ درصد رطوبت هوای انکوباتور و ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. سلول های ماهواره ای با چگالی ۱۰<sup>۳</sup> \* ۲ سلول/چاهک در یک پلیت ۹۶ چاهکی بمدت ۲ روز کشت شدند. این سلول ها بمدت ۷ روز در محیط کشت سرم ۱۰ درصد به تنهایی (DMSO ۰/۱ درصد) یا با اسید اورسولیک (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر همراه با DMSO (۱ سی سی) کشت شدند. تمام داده های ارائه شده 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 میلی گرم در میلی لیتر) از طریق آزمون MTT آزمایش شد. مکانیسم آن شامل شکستن نمک MTT به بلورهای نامحلول فورمازان از طریق آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول های زنده است. خروجی

(۷،۲۴). محققان مختلف نشان داده اند که اورسولیک اسید تخریب عضله اسکلتی را مهار می کند و در نهایت حجم و قدرت این بافت را در حیوانات آزمایشگاهی افزایش می دهد (۱۶). همچنین، نشان داده شده است اورسولیک اسید حجم عضله اسکلتی را با افزایش بیان ژن های مسیر هوازی (پروتئین کیناز B) و کاهش بیان ژن های مسوول در تخریب عضله (MURF-1 و آتروژین-۱) افزایش می دهد (۱۶). گیاهان دارویی همچون مرزه بعنوان یک جایگزین آنتی بیوتیک مناسب در جیره طیور استفاده می شوند. منطبق بر مدارک علمی، استفاده از مرزه در جیره جوجه ها مصرف خوراک و افزایش وزن را به مقدار قابل توجهی افزایش می دهد (۳۰).

در کل، به نظر می رسد اورسولیک اسید سلول های ماهواره ای را جهت بهبود عملکرد و افزایش سرعت رشد در هفته اول پس از هچ فعال می نماید. تأثیر اورسولیک اسید در جوجه های گوشتی بومی به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. لذا، فرضیه ما این بود که افزایش حجم عضله می تواند بطور مثبتی بوسیله اسید اورسولیک تحت تأثیر قرار گیرد. در مطالعه حاضر، پاسخ القاشده در جوجه های گوشتی بومی با افزودن اورسولیک اسید به سلول های ماهواره ای جدا شده از عضله اسکلتی بصورت In vitro و تزریق اورسولیک اسید به عضله جوجه ها به صورت In vivo بررسی شد.

#### مواد و روش ها

اسید اورسولیک از شرکت Enzo Life Sciences با خلوص ۹۰ درصد خریداری شد. FBS، DMEM، پنی سیلین-استرپتومایسین، آنزیم های گوارشی مانند کلاژناز نوع اول و چهارم و همچنین دیسپاز از شرکت GIBCO (گرانند آیلند، نیویورک) خریداری شدند. آنتی بادی های اختصاصی برای  $\beta$ -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-آلدریج 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 و cDNA و در نهایت اندازه گیری میزان بیان ژن بطور جداگانه در هر مرحله انجام گرفت.

#### In vitro مطالعه

##### جداسازی سلول های ماهواره ای عضله اسکلتی

ابتدا، جداسازی سلول های ماهواره ای ماهیچه اسکلتی با استفاده از روش pre-plating صورت گرفت (۲۹). از آنجایی که سلول های ماهواره ای در ماهیچه طیور جوان تر بیشتر یافت می شوند، بنابراین برای دستیابی به جمعیت خالص تری از این سلول ها از جوجه های گوشتی در سنین ابتدایی استفاده شد. ابتدا چند جوجه بومی گلپایگانی یک روزه تهیه شد و در

(جدول ۱) مخلوط شدند و سپس حجم مخلوط واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر طبق مراحل زیر انجام شد: مرحله ۱) واسرشته کردن در ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۵ ثانیه؛ مرحله ۲) واسرشته کردن در ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ۳) اتصال در ۵۹ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ۴) گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد 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. اختصاصی بودن آمپلیکون توسط تجزیه منحنی ذوب تأیید شد و برای محاسبه تغییر بیان ژن‌ها توسط نرم افزار REST (نسخه ۲) (بیکن) از استانداردهای چرخه آستانه استفاده شد (۵). بیان ژن‌ها در برابر ژن خانه دار ( $\beta$ -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 میلی گرم/میلی لیتر 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 تأیید 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 نرم افزار SPSS تجزیه شدند و نمودارها در نرم افزار اکسل ترسیم شدند. هر آزمایش حداقل سه بار انجام شد و داده‌ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

این واکنش، تولید کریستال‌های محلول بنفش رنگ فورمازان در دی متیل سولفوکساید (DMSO) است. برای بهینه‌سازی غلظت اورسولیک اسید در محیط کشت، سلول‌های ماهواره‌ای به همراه  $C_{2}C_{12}$  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 (نوبین 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، از cDNA 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- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

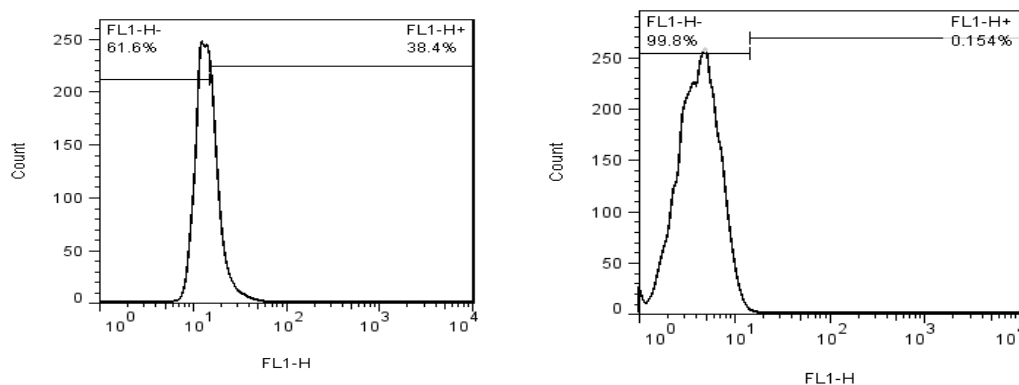
Table 1. The sequence of used primers		پرایمرها
توالی (۵'-۳')	توالی (۵'-۳')	
CTGTGCTGAAGTTCCTGCTC	AAGAGGAAAGCCACATTGC	PAX7
CTTATGTGAATGGGGAGTG	GTGGAGGATATGTCTGTTG	Myogenin
GAAGAGGGGTGCAGTTGGTG	GTTCTGTTGTTCCAGCCTCG	MyoD
AGGATGGCGTGAGGGAGAGC	ATATCGCTGCGTGGTCGTC	$\beta$ -actin

تأیید 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).

#### نتایج و بحث

##### شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای

به منظور مطالعه فاکتورهای اولیه متأثر از اورسولیک اسید، تجزیه نتایج حاصل از فلوسیتومتری ماهیت این سلول‌ها را

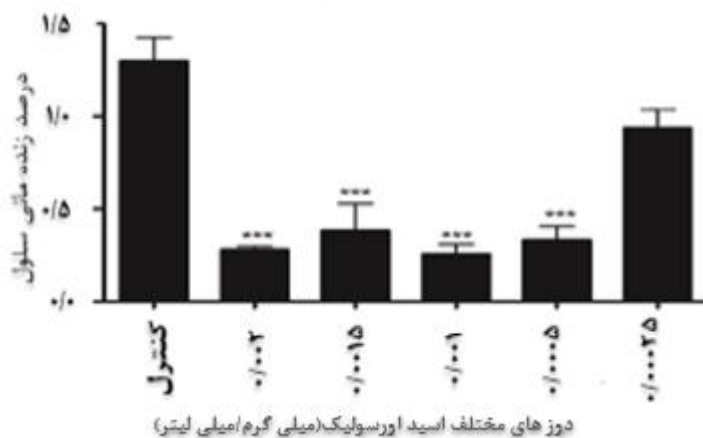


شکل ۱- نتایج فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX-7. چپ: نمونه بافت حاوی سلول ماهواره‌ای، راست: کنترل منفی  
Figure 1. Flow cytometric results of PAX-7 antibody. Left: Muscle tissue sample containing satellite cells and right: Negative control

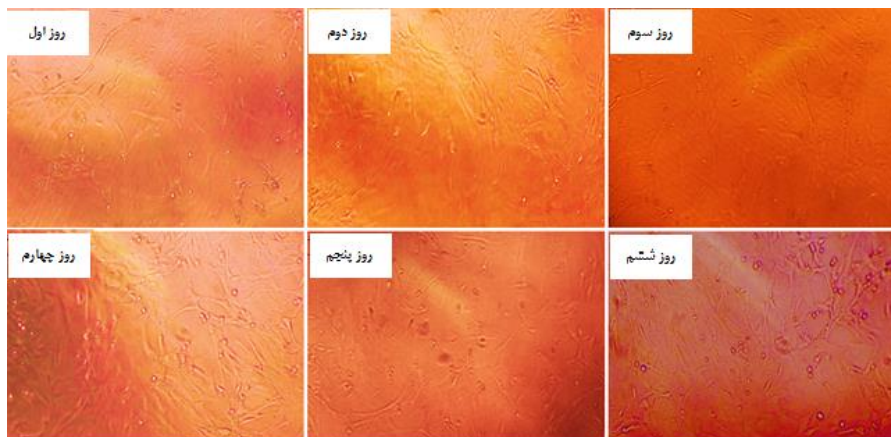
همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای در طول زمان افزایش یافت. به طوریکه تفاوت در روز اول و ششم مشهود بود. این موضوع آشکار می‌سازد که اورسولیک اسید توانایی بهبود هایپرتروفی عضلات اسکلتی را دارد.

### بررسی اثر سمیت اسید اورسولیک

نتایج MTT برای تعیین درصد زنده مانی سلولی برای دوزهای مختلف اورسولیک اسید نشان داد که بیشترین زنده مانی سلول‌های C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 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.



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

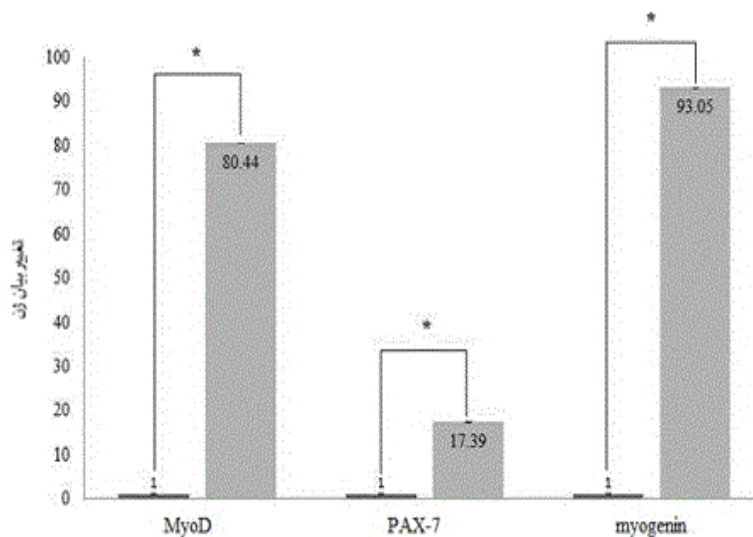


شکل ۳- تصویر سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از بافت سینه جوجه‌های گوشتی تیمار شده با اسید اورسولیک برای شش روز متوالی  
Figure 3. Satellite cell images isolated from breast tissue of native broiler chickens treated with ursolic acid for seven days

که شاخص کیفیت RNA استخراج شده است، نشان داد که خلص سازی مولکول RNA کیفیت مناسبی برای ادامه داشته است. پس از اینکه PCR انجام شد، در هر دو آزمایشات *In vivo* و *In vitro* 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).

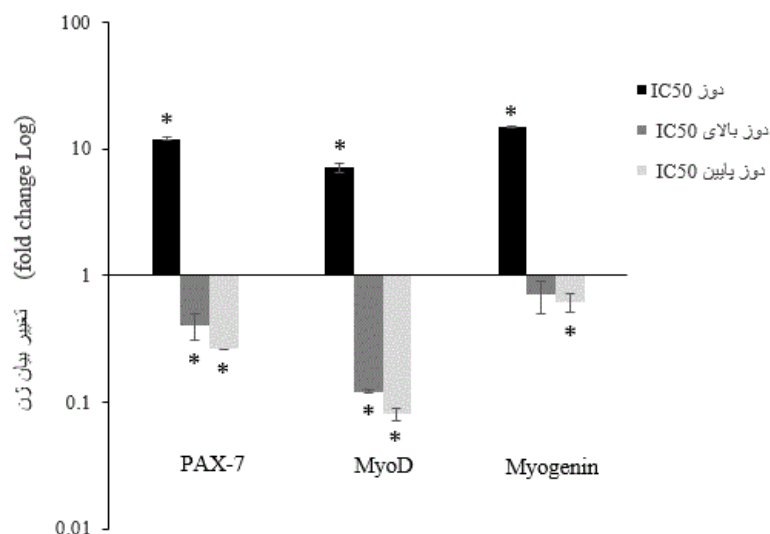
### بررسی اثر اسید اورسولیک بر بیان ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای

در این مرحله، درجه تأثیر این ترکیب طبیعی پنج حلقه‌ای روی بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین جهت آشکار کردن مکانیسم‌های پرتروپی عضلات که ناشی از اسید اورسولیک است بررسی شد. آزمایش خلص سازی RNA استخراج شده بوسیله اسپکتروفتومتر نشان داد که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ در تمام نمونه‌های استخراج شده 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 ۱۸S و ۲۸S در ارتباط با RNA ریبوزومی



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.



شکل ۵- بیان ژن‌های PAX-7، MyoD و میوژنین در سلول‌های ماهواره‌ای بعد از تیمار اسید اُرسولیک 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.

MRFs در سلول‌های ماهواره‌ای خاموش بیان نمی‌شوند، اما بمحض فعال‌شدن و تکثیر، MyoD و Myf5 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 mr4 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، میوژنین نقش مهمی در تمایز نهایی آنها دارد و mr4 تا حدودی هر دو نقش را ایفا می‌کند.

مکانیسم احتمالی اثر اُرسولیک 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 تیمار شده با اُرسولیک اسید در توانایی تکثیر سلول‌های بنیادیمکس می‌شود. توانایی اُرسولیک اسید به تحریک تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای بوسیله جونگ و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده است (۱۴). آنها

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. 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 اُرسولیک اسید افزایش پیدا کرد. افزایش بیان PAX-7 بنظر می‌رسد مرتبط با اثر اُرسولیک اسید بر روی فعالیت SIRT 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 مشتق شده 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).

علاوه بر PAX-7، بیان ژن‌های MyoD و میوژنین پس از تیمار با اُرسولیک 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،

ارسولیک اسید بر روی فیتنس فیزیکی، از دست دادن توده عضله اسکلتی هزینه انرژی و چاقی نقش دارند. این سازوکارها شامل: (۱) بهبود فیتنس فیزیکی از طریق SIRT1 و بیان SMPGC- $\alpha$  (۲) بهبود توده عضله اسکلتی از طریق مهار MURF1، فعال سازی MTOR، ترشح IGF-1، فعال سازی هورمون رشد (۳) توسعه ترموژنیز از طریق بیان زیاد UCP1، فعال سازی AMPK، و تنظیم فاکتور رونویسی آدیپوسیت. در نتیجه، مکمل سازی با ارسولیک اسید می تواند یک درمان جنینی برای پیشگیری و درمان پیامدهای متابولیسمی مرتبط با توده عضله در انسان باشد و همچنین می تواند دوره رشد را کوتاه کرده و رشد عضله اسکلتی در جوجه های گوشتی را افزایش دهد.

بطور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد ارسولیک در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بطور معنی داری بیان ژن های درگیر در تکثیر و تمایز سلول های ماهوارای یعنی PAX-7، MyoD و میوژنین را افزایش داد و همچنین هایپرتروفی عضله را بهبود بخشید. در نتیجه، ارسولیک اسید می تواند بعنوان یک ماده مؤثر در کاهش دوره پرورش و افزایش سرعت رشد عضله اسکلتی در جوجه های گوشتی بومی پیشنهاد شود.

نشان دادند که تیمار سلول های ماهوارای با ارسولیک اسید استخراج شده از پوست سیب منجر به افزایش پاسخ به دوز در بیان SIRT1، AMPK، و PGC1 $\alpha$  در سلول های عضله شد. همچنین محققان مشاهده کردند که ارسولیک اسید بیان پروتئین های IGF1، AKT و Mtor را که باعث القای هایپرتروفی عضله می شوند و همچنین پروتئین های درگیر در آتروفی عضلات را کاهش می دهد (۱۴). بنابراین محققان پیشنهاد کردند که ارسولیک اسید قادر به تنظیم پروتئین های درگیر در بیوژنیز میتوکندریایی، افزایش هایپرتروفی و آتروفی عضله است. بختیاری و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ارسولیک اسید بطور مستقیم SIRT را فعال می کند (۴). آنها گزارش کردند که ارسولیک اسید به سطح خارجی SIRT متصل می شود و منجر به اتصال محکم سوپسترا به آنزیم می شود. آنها همچنین نشان دادند که ارسولیک اسید، SIRT را به سمت شکل فعال آنزیم انتقال می دهد. لذا محققان پیشنهاد کردند که ارسولیک اسید فعالیت SIRT در سلول ها را تقویت می کند. بختیاری (۲) همچنین نشان داد که ارسولیک اسید، نئومیوژنیز را از طریق هایپربلازیا و توسعه تعداد سلول های ماهوارای در عضله اسکلتی القا می کند. کاتاشیما و همکاران (۱۵) در یک مرور سیستماتیک نشان دادند که برخی از مکانیسم های فیزیولوژیکی و مولکولی در اثر بخشی

## 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  $\beta$ -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.



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 Poultry 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.



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

Hengameh Moradi<sup>1</sup>, Abdullah Mohammadi Sang Cheshmeh<sup>2</sup>, Seyed Davood Sharifi<sup>3</sup>, Sim Zar Hosseinzadeh<sup>4</sup>, Ehsan Seyed Jafari<sup>5</sup> and Abdolreza Salehi<sup>3</sup>

- 
- 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<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells and satellite cells (SCs) isolated from native broiler chicks. First in the in vitro experiment, the C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 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<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 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