دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی توانایی تکوین برون‌تنی تخمک و بیان میکرو RNAهای سلول‌های کومولوس گوسفند در پاسخ به اثرات التهاب‌زایی لیپوپلی‌ساکارید

سارا عطایی نظری[۱]، عبداله محمدی سنگ‌چشمه[۲]، احمد افضل‌زاده[۳]، محمدرضا بختیاری‌زاده[۴]، علی اسدی الموتی[۵] و علی فولادی‌نشتا[۶]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران
۲- استادیار، دانشگاه تهران (نویسنده مسوول: amohammadis@ut.ac.ir)
۳- استاد، دانشگاه تهران
۴- دانشیار، دانشگاه تهران
۵- استادیار، دانشگاه تهران
۶- استاد، دانشگاه لندن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۳
صفحه: ۱۱۸ تا ۱۲۵

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر لیپوپلی‌ساکارید بر بلوغ، توانایی تکوین تخمک و تغییر بیان میکروRNAهای سلول‌های کومولوس در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید انجام شد. برای این منظور تخمک‌ها با غلظت‌های صفر (شاهد) و یک میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. بعد از بلوغ برون‌تنی، درصد بلوغ هسته و پراکندگی سلول‌های کومولوس بررسی شد. همچنین درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست محاسبه شد. تعیین میزان بیان میکروRNAها به‌روش کمّی به‌وسیله دستگاه Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. افزودن یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ هیچ تأثیر معنی‌داری بر درصد بلوغ هسته و پراکندگی سلول‌های کومولوس نداشت. درصد تسهیم هیچ تفاوتی با گروه شاهد نداشت اما درصد تولید بلاستوسیست به‌طور معنی‌داری در حضور لیپوپلی‌ساکارید کاهش پیدا کرد (p<۰/۰۵). آنالیز PCR نشان داد که در محیط حاوی لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با گروه شاهد بیان میکروRNAهای Mir-200b، Mir-27a، Mir-let7a در سلول‌های کومولوس گوسفند به‌ترتیب، افزایش، افزایش، کاهش یافت هر چند تفاوت معنی‌دار نبود و تنها Mir-150 به‌طور معنی‌داری با افزایش لیپوپلی‌ساکارید در محیط افزایش پیدا کرد (p<۰/۰۵). بر طبق نتایج به‌دست آمده، لیپوپلی‌ساکارید اثر منفی بر توانایی تکوین تخمک‌های میش دارد و این اثرات از طریق تأثیر بر بیان میکروRNAهای سلول‌های کومولوس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری عفونی، پاسخ ایمنی، توانایی تولید مثلی، گسترش کومولوس، گوسفند، میکرو RNA

مقدمه

عفونت‌های ناشی از آلودگی باکتریایی یک مشکل عمده در مدیریت تولید مثل می‌باشد (۲۳،۹). به‌علت کاهش سیستم ایمنی پس از زایمان، اغلب اندام تولیدمثلی دام درگیر عفونت‌های باکتریایی شده که منجر به آزاد سازی لیپوپلی‌ساکاریدها که جزئی از دیواره سلولی باکتری می‌باشند، به داخل گردش خون می‌شود (۲۲). تخمک و سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های تخمدان گاو شیری در یک محیط بیوشیمیایی در اندازه‌های مختلف فولیکولی رشد کرده و بالغ می‌شوند و این محیط با تغییرات غلظت فراسنجه‌های خون در ارتباط است (۵). اغلب عفونت‌های باکتریایی رحم باعث اختلال در عملکرد آن و همچنین عملکرد تخمدان می‌شود و توسط گیرنده‌های Toll-like receptor 4 (TLR4) روی سلول‌های آندومتر شناسایی می‌شوند (۲۱). نتایج پژوهش‌ها نشان داد که سلول‌های اپیتلیال اندومتریوم توانایی شناسایی پاتوژن را داشته و لیپوپلی‌ساکارید باعث افزایش بیان سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها می‌شود (۱۶). لیگاند گیرنده لیپوپلی ساکارید TLR4 می‌باشد که پس از فعال‌شدن، سبب تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها التهابی شده و به‌عنوان مهم‌ترین گیرنده‌ها در ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند. گیرنده TLR4، با یک پاسخ التهابی سبب راه‌اندازی سیگنال درون سلولی می‌شود (۱۹). لیپوپلی‌ساکارید با انباشتگی در مایع فولیکولی موجب کاهش رشد فولیکول، تسریع در پس رفتن فولیکول (آترزیا) و کاهش درصد تکوین تخمک می‌شود (۳،۱۲). همچنین بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را کاهش می‌دهد که منجر به تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد و آسیب بافتی می‌شود (۲). با اتصال LPS به TLR4، سیگنالینگ‌های مرتبط با ژن myD88 و Trif فعال می‌گردند. myD88 سبب فعال‌شدن ژن‌های دخیل در پاسخ‌های التهابی و نهایتاً منجر به فعال‌سازی NF-κB و MAPK گردیده، با فعال‌شدن NF-κB و MAPK ژن‌های پیش التهابی از جمله سایتوکاین‌ها بیان می‌شوند. از طرف دیگر Trif سبب فعال‌شدن ژن‌های اینترفرونی می‌شود (۲۸).

سلول‌های کومولوس احاطه‌کننده تخمک در فولیکول آنترال، نقش مهمی را در بلوغ تخمک بر عهده دارند (۳۳). از جمله فعالیت‌های سلول‌های کومولوس تولید انرژی برای تقسیم میوز در تخمک، تحریک بلوغ مولکولی تخمک و هسته آن، تنظیم رونویسی در تخمک، هماهنگی رشد فولیکول با بلوغ تخمک و محافظت از تخمک می‌باشد (۴).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

بسیاری از عوامل تأثیر گذار بر کیفیت تخمک از جمله ذخیره میکروRNAها و پروتئین‌های مادری در طی تخمک‌زایی درون تخمک رخ می‌دهد. این میکروRNAها تا زمان لازم، ذخیره و نگهداری و سپس توسط تخمک برای تکامل استفاده می‌شوند (۲۷). ژن‌های مادری در تخمک توسط میکروRNAها تنظیم می‌شوند. میکروRNAها خانواده بزرگی از RNA غیر کدکننده هستند که بیان ژن را از طریق سرکوب پس از رونویسی میکروRNAهای هدف تنظیم می‌کنند (۱۴). آن‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم پاسخ ایمنی ظاهر شده‌اند که در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید، تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی مربوط به سیگنالینگ سلولی (از جمله PIK3 و MAPK) را کنترل می‌کنند (۱۷). میکروRNAها در طی تکامل تخمک و جنین وجود دارند که بیان ژن و ترجمه پروتئین را تنظیم می‌کنند. به‌نظر می‌رسد بسیاری از فرآیندهای مولکولی که باعث بلوغ تخمک می‌شوند با الگوی بیان میکروRNAها تنظیم می‌شوند. پروفایل بیان میکروRNAها تخمک و سلول‌های کومولوس هر دو در طی بلوغ تخمک، تغییر می‌کند (۱۵). مطالعات نشان می‌دهند که میکروRNAها مشتق از مجموعه تخمک- کومولوس، ممکن است بلوغ تخمک را به‌روش پاراکرین تحت تأثیر قرار دهند (۱۸). شناسایی بیان میکروRNAها در طی بلوغ برون‌تنی تخمک، نخستین گام مهم برای بررسی عملکرد میکروRNAها در شایستگی تخمک است.

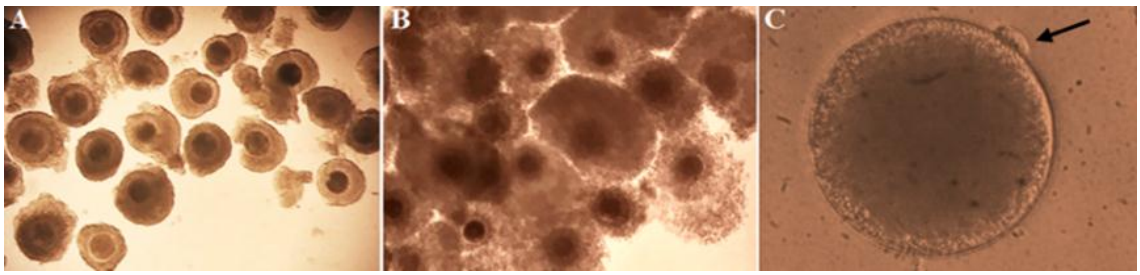
پاسخ تخمدان گوسفند به غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید مشخص شده است و در مطالعه حاضر فرض بر این است که لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی می‌تواند بر تکوین تخمک اثر منفی بگذارد. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی پاسخ‌های القاء شده توسط غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید در محیط بلوغ بر راندمان بلوغ برون‌تنی تخمک، درصد تسهیم و بلاستوسیست و متعاقب آن بیان میکروRNAهای سلول‌های کومولوس بر شایستگی تخمک در طی بلوغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تخمدان‌های گوسفند بلافاصله پس از کشتار از کشتارگاه جمع‌آوری و حداکثر در مدت دو ساعت بعد از کشتار در فلاسک حاوی محلول سرم فیزیولوژیک گرم (۳۲-۳۷ درجه سانتی‌گراد) به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از انتقال، تخمدان‌ها چند بار با سرم فیزیولوژیک استریل گرم شست و شو و به‌روش آسپیراسیون مجموعه تخمک- کومولوس از فولیکول‌هایی با قطر سه تا هفت میلی‌متر با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی‌لیتر استخراج شدند. تخمک‌هایی که دارای حداقل سه لایه سلول‌های کومولوس در اطراف خود بوده و سیتوپلاسم همگن داشتند، انتخاب شدند.

به‌منظور ارزیابی اثر لیپوپلی‌ساکارید بر بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گوسفند، مجموعه تخمک- کومولوس سه بار در محیط کشت HTCM-۱۹۹ (HEPES-buffered Tissue Culture Medium-199) شست و شو و سپس سه بار دیگر در محیط کشت بلوغ تخمک TCM-۱۹۹ (Tissue Culture Medium-199) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، دو و نیم میکروگرم در لیتر هورمون لوتئینه (LH)، دو و نیم میکروگرم در لیتر هورمون محرک فولیکول (FSH)، یک میکروگرم در میلی‌لیتر بتا استرادیول و همچنین غلظت‌های صفر و یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید شست و شو داده شدند. در نهایت در گروه‌های ده تایی به دیش‌های حاوی قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از محیط بلوغ و پوشیده شده با روغن معدنی منتقل شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد گاز کربنیک در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

پس از بلوغ برون‌تنی، برای زدودن کومولوس‌ها، تخمک‌ها به یک میکروتویوپ حاوی TCM-۱۹۹ یک درصد هیالورونید از انتقال داده شدند. سپس تخمک‌های بدون کومولوس در زیر میکروسکوپ استریو برای تعیین مراحل رشد و بلوغ مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر استریومیکروسکوپ از بلوغ هسته‌ای تخمک در شرایط برون تنی. (A) مجموعه تخمک- کومولوس قبل از بلوغ، (B) پراکندگی کامل سلول‌های کومولوس پس از بلوغ، (C) تخمک بالغ شده (پیکان نشان‌دهنده جسم قطبی می‌باشد).

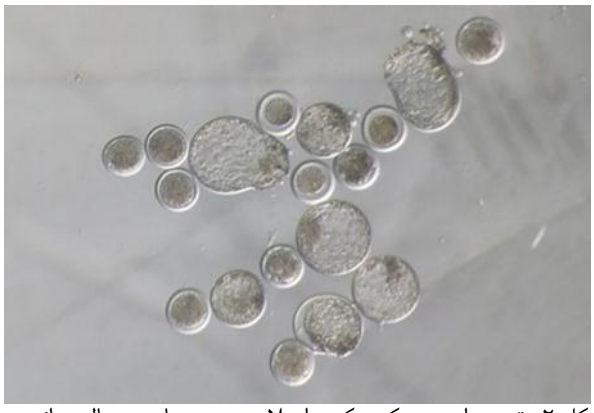
Figure 1. Stereomicroscope image of in vitro oocyte nucleus maturation. (A) cumulus-oocyte complex before maturation, (B) Complete expansion of cumulus cells after maturation, (C) mature oocyte (arrow represents polar body).

بررسی لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر پراکندگی سلول‌های کومولوس پس از گذشت ۲۴ ساعت تخمک‌های کشت شده با استفاده از میکروسکوپ استریو و بر اساس میزان پراکنده شدن سلول‌های کومولوس در سه گروه مختلف طبقه‌بندی شدند: گروه اول سلول‌های کومولوس به‌طور کامل پراکنده شدند. گروه دوم سلول‌های کومولوس نسبتاً پراکنده شدند و گروه سوم سلول‌های کومولوس پراکنده نشدند.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

برای ارزیابی اثر افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست‌ها، تخمک‌های بالغ‌شده سه بار در محیط HEPES-buffered SOF شسته و بلافاصله در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از محیط SOF با چهار واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر هپارین، ۲۰ میکرومولار پنی‌سیلین‌آمین، ۱۰ میکرومولارهایپوتاتورین، یک میکرومولار اپی‌نفرین دو درصد (حجم/ حجم) سرم میش فحل قرار داده شدند. سپس پایوت‌های اسپرم منجمد در آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه ذوب شدند و اسپرم‌ها با تحرک بالا با روش شناورسازی جدا شدند. اسپرم‌های جداشده با غلظت نهایی ۲×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح برون‌تنی که در هر قطره ۱۰ تخمک قرار داده شده بود، اضافه شدند. قطره‌ها در زیر روغن معدنی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد گاز کربنیک و پنج درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن با حداکثر رطوبت به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند.

پس از لقاح، زایگوت‌های احتمالی عاری از سلول‌های کومولوس شدند و در محیط کشت جنینی CR1 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه غیر ضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری به‌مدت نه روز کشت داده شدند. درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست به‌ترتیب در روز سه و نه پس از کشت محاسبه شد (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر استریومیکروسکوپ از بلاستوسیست‌های در حال جوانه زدن
Figure 2. Stereomicroscope image of germinating blastocyst

میزان بیان میکروRNAها در سلول‌های کومولوس گوسفند بین گروه شاهد و گروه حاوی لیپوپلی‌ساکارید توسط تکنیک Real Time PCR سنجیده شد. بدین منظور، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. ۲۴ ساعت پس از بلوغ، سلول‌های کومولوس توسط آنزیم هیالورونیداز یک درصد از تخمک‌ها جدا و به میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر بافر لیز سلولی (RNAX Plus) انتقال داده شدند تا تمامی محتویات سلول (از جمله DNA و RNA) از سلول خارج شوند. غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و سنتز RNA با استفاده از کیت سنتز مرکز تحقیقات بن یاخته انجام شد.

همچنین سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (کیت مرکز تحقیات بن یاخته) صورت گرفت. برای سنتز cDNA با پرایمر PolyA، به پنج میکروگرم RNA، مقدار یک میکرولیتر rATP، دو میکرولیتر PolyA 10x polymerase buffer و دو دهم میکرولیتر PolyA polymerase اضافه شد. واکنش فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بلافاصله پس از واکنش پلی‌آدنیلاسیون، برای واکنش سنتز cDNA به ۱۰ میکرولیتر RNA پلی‌آدنیله، یک میکرولیتر پرایمر RT-adaptor اضافه و حجم هر نمونه با استفاده از آب به ۱۳ میکرولیتر رسانده و در دستگاه ترموسایکلر به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس یک میکرولیتر RT-enzyme، دو میکرولیتر dNTP، چهار میکرولیتر 5xRT buffer و ۱۳ میکرولیتر آب به نمونه‌ها اضافه گردید و در دستگاه ترموسایکلر که مراحل دمایی مورد نیاز طبق دستورالعمل برای واکنش برنامه‌ریزی شده، قرار داده شد.

ژن S۵/۸ به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای بررسی میزان بیان میکروRNAها به‌ازای هر واکنش شش و نیم میکرولیتر Master MIX (شرکت یکتا تجهیز)، یک میکرولیتر پرایمر (جدول ۱) و چهار میکرولیتر آب به یک میکرولیتر cDNA اضافه شد و به‌میزان دو دهم میکرولیتر رنگ ROX به واکنش افزوده شد و نمونه‌ها برای چهل چرخه به دستگاه Real Time PCR منتقل شدند.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

Table 1. primers Sequence

پرایمر	توالی
mir-27a-f	GTT CAC AGT GGc TAA GT
mir-200b-f	CGT AAT ACT GCC TGG TAA
mir-150-f	TCT CCC AAC ATC TGT AC
mir-let7a-f	ACG AGC AGG GTC CG

آنالیز آماری

برای تعیین ارتباط بین متغیر مستقل (تیمارهای آزمایشی) و متغیرهای وابسته (درصد بلوغ، گستردگی سلول‌های کومولوس، تسهیم و بلاستوسیست) از تابعیت لجستیک با مدل خطی تعمیم یافته GLM (Generalized Linear Model) با نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳/۱/۰) استفاده شد (رابطه ۱).

$$y = p + e \qquad \text{(رابطه ۱)}$$
$$logit(p) = Log\ e\ p/(1-p) = X\beta \Rightarrow Exp(X\beta)/(1 + Exp(X\beta))$$

در این فرمول، yوp: به‌ترتیب بیانگر مقدار واقعی متغیر پاسخ (وقوع و یا عدم وقوع بلوغ، گستردگی سلول‌های کومولوس، تسهیم و بلاستوسیست) و احتمال برآورد شدن وقوع آن‌ها می‌باشند. همچنین نماد Exp: مربوط به عدد نپری (برابر با ۲/۷۱۸۲۸)، X: ماتریس ضرایب و β: بردار سازه‌های گنجانده شده در مدل است. داده‌های بیان ژن میکروRNAها با روش 2-۸(DCT) تجزیه و تحلیل شد و در نهایت از آزمون t دو طرفه برای بررسی معنی‌داری تفاوت بین تیمارها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش مربوط به بررسی درصد بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گوسفند و پراکندگی سلول‌های کومولوس به‌ترتیب در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است. هر چند بین گروه شاهد و غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در میزان بلوغ هسته‌ای و پراکندگی سلول‌های کومولوس، وجود نداشت اما در حضور لیپوپلی‌ساکارید درصد آن‌ها کاهش یافت.

جدول ۲- اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر بلوغ برون‌تنی تخمک

Table 2. Effect of added lipopolysaccharide in maturation culture medium on oocyte maturation

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک نابالغ	تعداد (درصد جسم قطبی)
شاهد	۲۳۲	۱۶۱ (۶۹/۳۹)
یک میکروگرم در لیتر	۲۷۹	۱۸۰ (۶۴/۵۱)

داده‌ها میانگینی از ۵ تکرار می‌باشند.

جدول ۳- اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر پراکندگی سلول‌های کومولوس

Table 3. Effect of added lipopolysaccharide in maturation culture medium on expansion of cumulus cells

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک	تعداد (درصد گسترده)	تعداد (درصد تاحدی گسترده)	تعداد (درصد ناگسترده)
شاهد	۹۶	۵۷ (۵۹/۳۷)	۳۰ (۳۱/۲۵)	۹ (۹/۳۷)
یک میکروگرم در لیتر	۹۶	۵۱ (۵۳/۱۲)	۳۳ (۳۴/۳۷)	۱۲ (۱۲/۵)

بلوغ هسته‌ای مجموعه تخمک- کومولوس در حضور غلظت‌های یک و پنج میکروگرم در میلی لیتر لیپوپلی‌ساکارید در طی بلوغ برون‌تنی، کاهش یافت (۳۲). غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید سطح فسفریلاسیون P38MAPK، فعالیت ERK/1، NF-κB و سطح بیان IL6 و TNFα در تخمک را کاهش می‌دهد در نتیجه باعث تحریک فرآیندهای التهابی در تخمک از طریق مسیر TLR4 گردیده و بلوغ هسته‌ای را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲۶). در آزمایشی، لیپوپلی‌ساکارید در مرحله متافاز II، چرخه‌ی سلولی را به تأخیر می‌اندازد. مشخص شد غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکاید موجب کاهش تعداد تخمک‌ها تا مرحله متافاز II می‌شود (۱۲).

پراکندگی سلول‌های کومولوس تخمک برای بلوغ میوز و توانایی تکوین تخمک ضروری است (۳۱). مطالعات نشان می‌دهند پاسخ ایمنی ذاتی ممکن است در گسترش سلول‌های کومولوس نقش داشته باشد. سایتوکاین التهابی IL6 از طریق عملکرد اتوکراینی باعث کاهش گسترش سلول‌های کومولوسی می‌شود (۹). علاوه بر این با فعال‌شدن مسیر سیگنالینگ TLR4 توسط لیپوپلی‌ساکارید بیان IFN α, β در مجموعه تخمک- کومولوس تحریک گردید که منجر به کاهش پراکندگی سلول‌های کومولوس می‌شود (۳۱).

نتایج آزمایش مربوط به افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط بلوغ، به‌منظور ارزیابی درصد تسهیم تخمک‌ها و درصد تولید بلاستوسیست در هفت تکرار و در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان تسهیم تخمک‌های گوسفندی در گروه شاهد (۸۶/۰۶٪) در مقایسه با تیمار لیپوپلی ساکارید (۸۱/۴۵٪) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. این در حالی است که پس از لقاح برون تنی در حضور لیپوپلی ساکارید تولید بلاستوسیست بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($p < ۰/۰۵$).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

جدول ۴- اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و بلاستوسیست

Table 4. The effect of added lipopolysaccharide in the maturation culture medium on the proportion of cleaved oocytes and the proportion of oocytes reaching the blastocyst stage

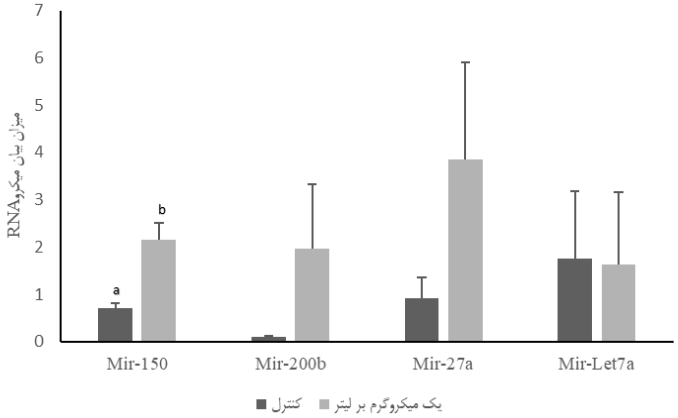
تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک‌های کشت داده شده	تعداد (درصد تسهیم)	تعداد (درصد بلاستوسیست)
شاهد	۱۲۲	۱۰۳ (۸۴/۴۲)	۴۵ (۳۶/۸۸)[a]
یک میکروگرم بر لیتر	۱۱۰	۸۴ (۷۶/۳۶)	۱۹ (۱۷/۲۷)[b]

۱. داده‌ها میانگینی از ۷ تکرار می‌باشند.

a و b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است ($p<0/05$).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد درصد تسهیم در تیمار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما درصد بلاستوسیست به‌طور چشم‌گیری کاهش یافته بود (۱۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهد اگرچه قرار گرفتن تخمک در معرض لیپوپلی‌ساکارید در شرایط برون‌تنی، بر رشد اولیه جنینی تأثیر نمی‌گذارد اما در شرایط درون‌تنی باعث کاهش درصد تسهیم می‌شود (۹). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که افزودن یک دهم و یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به محیط بلوغ تخمک باعث کاهش درصد بلاستوسیست در روز هشتم پس از لقاح می‌شود. حداقل مقدار لیپوپلی‌ساکارید مورد نیاز برای کاهش تکوین زایگوت‌ها به بلاستوسیست در حدود نیم تا یک میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (۲۳).

در این مطالعه میزان بیان میکروRNAهای Mir-200b، Mir-27a، Mir-let7a و Mir-150 در سلول‌های کومولوس گوسفندی بین گروه شاهد و گروه لیپوپلی‌ساکارید با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هر چند بیان Mir-200b و Mir-27a در حضور یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید افزایش و بیان Mir-let7a کاهش پیدا کرد اما با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). تنها بیان Mir-150 نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p<0/05$) (شکل ۳).



شکل ۳- اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر میزان بیان میکروRNAها در سلول‌های کومولوس گوسفندی به‌روش Real Time PCR

Figure 3. Effect of added lipopolysaccharide in maturation culture medium on expression level of microRNAs in sheep cumulus cells determined by Time PCR Real

بیان و عملکرد میکروRNAها در طی بلوغ تخمک و مراحل اولیه‌ی رشد جنینی گزارش شده است، همچنین پژوهش‌ها نشان از نقش مهم آنها در پاسخ التهابی پستانداران دارند (۵). سلول‌های گرانولوزا و تکای گاوی، میکروRNA مجموعه گیرنده TRL4 را در پاسخ به لیپوپلی ساکارید بیان می‌کنند و باعث ایجاد پاسخ التهابی می‌شوند (۲۴). بسیاری از اثرات بیولوژیکی لیپوپلی‌ساکارید ناشی از تغییراتی است که در بیان ژن ایجاد می‌کند و باعث تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند IL1 و TNFα می‌شود (۷).

برخی از میکروRNAها از جمله Mir_Let 7a، Let Mir_7c و Mir_21 نقش مهمی در رشد فولیکول دارند (۲۹). Mir _Let 7a بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای عمده سلولی از جمله آپوپتوز، آسیب DNA و چرخه سلولی را تنظیم می‌کند. بیان بالا Mir_Let 7a در تخمک و جنین نشان‌دهنده نقش تنظیمی آن‌ها در تکوین مراحل اولیه رشد جنینی است (۱). برخی از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که Let Mir_7a در حین پاسخ ایمنی باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند IL_10 ,IL_6 می‌شود (۱۸). نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد در حضور غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید بیان Mir_Let 7a، به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است (۲۲).

ژن STAR باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های تخمدان گوسفند می‌شود و یک ژن هدف برای Mir-150 است. مشخص شده است Mir-150 با تغییر بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروژسترون باعث کاهش آپوپتوز می‌شود (۳۳). هر چند برخی پژوهش‌ها نقش Mir-150 در پیشرفت التهاب در حضور لیپوپلی‌ساکارید، از طریق مسیر-NF-κB /LPS/mir 150 را نشان می‌دهند که هدف آن تنظیم بیان ژن NF-κB

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

است (۱۰). بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه بیان Mir-150 به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد که به‌نظر می‌رسد در کاهش پاسخ‌های التهابی نقش داشته باشد.

Mir-27a نقش مهمی در رشد فولیکول‌های تخمدان دارد و به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی IL-10 شناخته شده است که در سلول‌های ماکروفاژ در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید، با هدف قرار دادن IL-10، بیان آن کاهش می‌یابد (۳۰). تحقیق‌های جدید نشان می‌دهد که TLR4 یک هدف مستقیم Mir-27a است که در حضور لیپوپلی‌ساکارید بیان آن افزایش می‌یابد و باعث ایجاد پاسخ التهابی می‌شود (۲۷).

Mir-200b با هدف قرار دادن مسیر سیگنالینگ TLR4 پاسخ ایمنی ذاتی آنتی‌باکتریایی را تنظیم می‌کند (۲۸). بیان Mir-200b در سلول‌های میکروگلیا در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید کاهش می‌یابد که همراه با کاهش سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد (۶). ولی در مطالعه حاضر، بیان Mir-200b پس از افزوده‌شدن یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ در سلول‌های کومولوسی افزایش پیدا کرد. طبق نتایج به‌دست آمده از تغییر الگوی بیان میکرو RNAها در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید در سلول‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که بیان میکروRNAها در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید به نوع سلول و غلظت آن وابسته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، لیپوپلی‌ساکارید اثرات منفی بر توانایی تکوین تخمک دارند که این اثرات منفی از طریق تأثیر بر بیان میکروRNAهای دخیل در پاسخ‌های ایمنی میانجی‌گری می‌شود.

منابع

1. Alexandri, C., B. Stamatopoulos, F. Rothe, Y. Bareche, M. Devos and I. Demeestere. 2019. MicroRNA profiling and identification of let-7a as a target to prevent chemotherapy-induced primordial follicles apoptosis in mouse ovaries. Scientific Reports, 9(1): 1-10.
2. Bromfield, J.J. and I.M. Sheldon. 2013. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. Biology of Reproduction, 88(4): 98-1.
3. Bromfield, J.J. and I.M. Sheldon. 2011. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. Endocrinology, 152(12): 5029-5040.
4. Diedrich, K., P. Bouchard, F. Dominguez, M. Matzuk, S. Franks, S. Hamamah, C. Simon, P. Devroey, D. Ezcurra and C.M. Howles. 2011. Contemporary genetic technologies and female reproduction. Human Reproduction Update, 17(6): 829-847.
5. Ghojoghi, S., F. Samadi and S. Hasani. 2013. Comparison of Blood Serum Biochemical Compositions and Ovarian Follicular Fluid of Different-Sized Follicles in Dairy Cows. Research on Animal Production (Scientific and Research), 4(7): 106-123.
6. Ibrahim, S., D. Salilew-Wondim, F. Rings, M. Hoelker, C. Neuhoff, E. Tholen and D. Tesfaye. 2015. Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory microrna in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: implication for early embryonic development. PLoS One, 10(3): p. e0119388.
7. Jadhav, S.P., S.P. Kamath, M. Choolani, J. Lu and S.T. Dheen. 2014. microRNA-200b modulates microglia-mediated neuroinflammation via the cJun/MAPK pathway. Journal of Neurochemistry, 130(3): 388-401.
8. Jaiswal, Y.K., M.K. Jaiswal, V. Agrawal and M.M. Chaturvedi. 2009. Bacterial endotoxin (LPS)–induced DNA damage in preimplanting embryonic and uterine cells inhibits implantation. Fertility and Sterility, 91(5): 2095-2103.
9. Lavon, Y., G. Leitner, E. Klipper, U. Moallem, R. Meidan and D. Wolfenson. 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. Domestic Animal Endocrinology, 40(2): 98-109.
10. Liu, Z., D.G. de Matos, H.Y. Fan, M. Shimada, S. Palmer, J.S. Richards. 2009. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. Endocrinology, 22(150): 3360-3368.
11. Ma, Y., Y. Liu, H. Hou, Y. Yao and H. Meng. 2018. MiR-150 predicts survival in patients with sepsis and inhibits LPS-induced inflammatory factors and apoptosis by targeting NF-κB1 in human umbilical vein endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 500(3): 828-837.
12. Mhatre, M.V., J.A. Potter, C.J. Lockwood, G. Krikun and V.M. Abrahams. 2016. Thrombin augments LPS-induced human endometrial endothelial cell inflammation via PAR1 activation. American Journal of Reproductive Immunology, 76(1): 29-37.
13. Magata, F. and T. Shimizu. 2017. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. Reproductive Toxicology, 71: 1-7.
14. Miles, J.R., T.G. McDaneld, R.T. Wiedmann, R.A. Cushman, S.E. Echternkamp, J.L. Vallet and T.P.L. Smith. 2012. MicroRNA expression profile in bovine cumulus–oocyte complexes: Possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. Animal Reproduction Science, 130(1-2): 16-26.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

15. Mondou, E., I. Dufort, M. Gohin, E. Fournier and M.A. Sirard. 2012. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. Molecular Human Reproduction, 18(9): 425-434.
16. Najafi, M., G. Rahimi-Mianji, Y. Guo, N. Jhamat, G. Andersson, P. Humblot and E. Bangcom-Rudllof. 2018. Differential gene expression analysis inb endometrial epithelial cells following by E. coli LPS challenge. Research on Animal Production, 8: 121-130.
17. Naqvi, A.R., S. Zhong, H. Dang, J.B. Fordham, S. Nares and A. Khan. 2016. Expression profiling of LPS responsive miRNA in primary human macrophages. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 8(2): 136.
18. Pan, B. and J. Li. 2018. MicroRNA-21 up-regulates metalloprotease by down-regulating TIMP3 during cumulus cell-oocyte complex in vitro maturation. Molecular and Cellular Endocrinology, 477, 29-38.
19. Rallabhandi, P., A. Awomoyi, K.E. Thomas, A. Phalipon, Y. Fujimoto, K. Fukase and S.N. Vogel. 2008. Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid a acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. The Journal of Immunology, 180(2): 1139-1147.
20. Ricarte-Filho, J.C.M., C.S. Fuziwara, A.S. Yamashita, E. Rezende, M.J. da-Silva and E.T. Kimura. 2009. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. Translational Oncology, 2(4): 236.
21. Schmitz, S., M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer and R.M. Bruckmaier. 2004. Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. Domestic Animal Endocrinology, 26(2): 111-126.
22. Sheldon, I.M., J.G. Cronin, M. Pospiech and M.L. Turner. 2018. Symposium review: Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. Journal of Dairy Science, 101(4): 3655-3664.
23. Sheldon, I.M., G.S. Lewis, S. LeBlanc and R.O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology, 65(8): 1516-1530.
24. Song, J., M. Jun, M.R. Ahn and O.Y. Kim. 2016. Involvement of miR-Let7A in inflammatory response and cell survival/apoptosis regulated by resveratrol in THP-1 macrophage. Nutrition Research and Practice, 10(4): 377-384.
25. Soto, P., R.P. Natzke and P.J. Hansen. 2003. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2α, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. American Journal of Reproductive Immunology, 50(3): 263-272.
26. Storeng, R.I.T.S.A. and B.E.R.I.T. Johne. 1987. Toxic effects of lipopolysaccharide from Bacteroides intermedius and Escherichia coli assessed in the pre-implantation mouse embryo culture system. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology, 95(1-6): 135-139.
27. Tadros, W. and H.D. Lipshitz. 2005. Setting the stage for development: mRNA translation and stability during oocyte maturation and egg activation in Drosophila. Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists, 232(3): 593-608.
28. Tserel, L., T. Runnel, K. Kisand, M. Pihlap, L. Bakhoff, R. Kolde and A. Rebane. 2011. MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. Journal of Biological Chemistry, 286(30): 26487-26495.
29. Wang, Y., X. Zhang, J. Tian, G. Liu, X. Li and D. Shen. 2019. Sevoflurane alleviates LPS-induced acute lung injury via the microRNA-27a-3p/TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway. International Journal of Molecular Medicine, 44(2): 479-490.
30. Wendlandt, E.B., J.W. Graff, T.L. Gioannini, A.P. McCaffrey and M.E. Wilson. 2012. The role of microRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF-κB activation. Innate Immunity, 18(6): 846-855.
31. Wiesel, P., A.P. Patel, N. DiFonzo, P.B. Marria, C.U. Sim, A. Pellacani and S.F. Yet. 2000. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1–deficient mice. Circulation, 102(24): 3015-3022.
32. Xie, N., H. Cui, S. Banerjee, Z. Tan, R. Salomao, M. Fu and G. Liu. 2014. miR-27a regulates inflammatory response of macrophages by targeting IL-10. The Journal of Immunology, 193(1): 327-334.
33. You, J.J., I.P. Jae, J.M. Won, T.M. Phuong, K.C. Moon and Y.C. Sang. 2015. Cumulus cell-expressed type I interferons induce cumulus expansion in mice. Biology of Reproduction, 92(1): 1-20.
34. Zhao, S.J., Y.W. Pang, X.M. Zhao, W.H. Du, H.S. Hao and H.B. Zhu. 2017. Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. Oncotarget, 8(3): 4656.
35. Zhou, R., Y. Miao, Y. Li, X. Li, J. Xi and Z. Zhang. 2019. MicroRNA-150 promote apoptosis of ovine ovarian granulosa cells by targeting STAR gene. Theriogenology, 127: 66-71.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]

Evaluating the Sheep Oocyte *In Vitro* Developmental Competence and Expression of MicrorRNAs in Cumulus Cells in Response to Inflammatory Effects Induced by Lipopolysaccharide

Sara Ataei Nazari[1], Abdollah Mohammadi Sangcheshme[2], Ahmad Afzalzadeh[3], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[4], Ali Asadi Alamouti[5] and Ali Fouladi Nashta[6]

1- PhD. Student, University of Tehran
2- Assistant Professor, University of Tehran
3- Professor, University of Tehran
4- Associate Professor, University of Tehran
5- Assistant Professor, University of Tehran
6- Professor, University of London
Received: April 10, 2020 Accepted: August 3, 2020

Abstract

This study was conducted to investigate the influence of lipopolysaccharide (LPS) on sheep oocyte maturation and developmental competence and changes in the expression of microRNAs in cumulus cells in the inflammatory situations induced by LPS. For this, ewe's oocytes were cultured in medium containing 0 (control) and 1 µg/ml of LPS for 24 hours. After in vitro maturation, the percentage of nucleus maturation and distribution of cumulus cells were evaluated. Moreover, the rate of cleavage and blastocyst production were evaluated. The expression of microRNAs was quantitatively assessed by real-time PCR. The addition of LPS to maturation medium did not show any significant effects on the proportion of nucleus maturation and cumulus cell distribution. Although percentage of cleavage was not affected by LPS, the rate of blastocyst production was significantly reduced in the presence of LPS ($P < 0.05$). Expression of Mir-150 was significantly increased in response to LPS supplementation in culture medium ($P < 0.05$). Also, the expression of Mir-200b and Mir-27a increased in culture medium containing LPS compering to the control group, whereas Mir-let7a expression decreased in response to LPS addition, however, the difference was not statistically significant. The results demonstrate that LPS has detrimental effects on sheep oocyte developmental competence and these effects seem to be mediated through changes in the expression of microRNAs in cumulus cells.

Keywords: Cumulus distribution, Immune response, Infectious disease, Microrna, Reproductive ability, Sheep

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.7.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.31.118]