دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

کاهش بیان نسبی ژن‌های مرتبط با آپوپتوسیز در سلول گرانولوزا با افزودن استرادیول

عیسی دیرنده[۱]، زربخت انصاری پیرسرائی[۲] و رضا معصومی[۳]

۱- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: dirandeh@gmail.com)
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار، دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۱/۲۸

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات آپوپتوتیک افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا و افزایش استرادیول بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با آپوپتوسیز (Bcl-2، Bax و GADD45β) و چرخه سلول (CCDN-2) بود. به همین منظور بعد از جمع‌آوری تخمدان گاوها از کشتارگاه، سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های ۴ تا ۸ میلی‌متری جداسازی شدند. سپس تعداد سلول‌های زنده شمارش شده و نمونه سلول‌های گرانولوزا برای شش روز کشت داده شدند. تیمارها شامل ۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر مایع کشت (کنترل)، ۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میلی‌لیتر مایع کشت (گروه آپوپتوتیک: افزایش تراکم دلیل آپوپتوتیک بودن است) و ۳) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میلی‌لیتر مایع کشت و افزودن استرادیول از روز دوم کشت (گروه آپوپتوتیک + استرادیول) بودند. همچنین، بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوسیز و چرخه سلولی و غلظت استرادیول نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد بیان نسبی ژن‌های Bax و GADD45β در گروه آپوپتوتیک نسبت به دو گروه دیگر بیشینه بود، ولی با افزودن استرادیول بیان نسبی آنها کاهش یافت و به سطح کنترل بازگشت. نسبت Bcl-2 به Bax در گروه آپوپتوتیک نسبت به دو گروه دیگر کاهش یافت، در حالی که با افزودن استرادیول این نسبت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ولی همچنان مقدار آن نسبت به گروه کنترل کمتر بود. بیان نسبی ژن CCDN-2 در گروه آپوپتوتیک نسبت به دو گروه دیگر کمینه بود ولی اختلاف معنی‌داری بین گروه استرادیول و گروه کنترل دیده نشد. به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد استرادیول می‌تواند سلول‌های گرانولوزا را در برابر آپوتوزیس ناشی از افزایش تراکم محافظت کند و این کار را ممکن است از راه افزایش سرعت چرخه سلولی گامه G_1 به S انجام دهد.

واژه‌های کلیدی: سلول گرانولوزا، استرادیول، آپوپتوسیز

مقدمه

بیشتر از ۹۹ درصد فولیکول‌های تخمدان موفق به تخمک‌ریزی نمی‌شوند و در گامه‌های مختلف تکامل متحمل تحلیل می‌شوند. تحلیل فولیکول از راه آپوپتوسیز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، سلول‌های گرانولوزا و تیکا اتفاق

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

می‌افتد (۷). آپوپتوسیز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) این فرصت را به موجود چندسلولی می‌دهد تا سلول‌های ناخواسته و مضر را در پاسخ به فرسته‌های تکاملی و محرک‌های سمی حذف کند (۱۳). سلول‌های گرانولوزا که سرعت تقسیم بیشتری دارند نسبت به آپوپتوسیز حساس‌تر هستند (۱۳).

آپوپتوسیز از راه دو سازوکار عمده در تخمدان اتفاق می‌افتد؛ سازوکار اول به‌وسیله فرسته‌هایی که در داخل سلولی تولید می‌شود اتفاق می‌افتد و در برگیرنده میتوکندری و پروتین‌های خانواده Bcl-2 است و مسیر میتوکندریایی نامیده می‌شود. سازوکار دوم به‌وسیله فعال‌کننده‌های مرگ و از راه اتصال به گیرنده‌های مرگ در سطح سلول اتفاق می‌افتد و مسیر گیرنده‌های مرگ نامیده می‌شود. گونادوتروپین‌ها (LH و FSH) و فاکتورهای رشد داخل تخمدانی که به صورت موضعی تولید می‌شوند ساخت و آترزی فولیکول را تنظیم می‌کنند (۱۵).

پروتین‌های خانواده مهارکننده‌های آپوپتوسیز (Bcl-Xl و Bcl-2) که در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند با حفظ غشای میتوکندری سبب زنده مانی سلول می‌شوند. فرسته‌های منفی داخل سلولی (محرک‌های هورمونی ناکافی یا افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن) یا آسیب داخلی سلول فعال شدن پروتین‌های محرک آپوپتوسیز (Bax) می‌شود. پروتین‌های خانواده Bax از راه همودایمریزاسیون نفوذپذیری غشای میتوکندری را مختل کرده و سبب ایجاد حفره در آن می‌شوند که در نهایت سبب رهاسازی دو پروتین میتوکندریایی (سیتوکروم C و فاکتور محرک آپوپتوسیز[1] (AIF) می‌شود که نقشی مهم در فرایند آپوپتوسیز دارند (۶،۲).

تراوش استرادیول شاخصی از تخمک‌ریزی موفق فولیکول است. فزون بر نقش آن در رهاسازی غلیان پیش از تخمک‌ریزی گونادوتروپین‌ها، استرادیول فاکتور رشد، تمایز و زنده‌مانی داخل تخمدانی است (۱۹). استرادیول از راه افزایش ظرفیت FSH در تحریک بیان گیرنده‌های LH، تمایز سلول گرانولوزا را تعدیل می‌کند (۱۶). در پژوهشی پدیدار شدن گیرنده‌های LH در زمان انتخاب فولیکول در گاو، رشد و تمایز فولیکولی را افزایش داد (۴). تفاوت قابل تشخیص بین فولیکول غالب و دومین فولیکول غالب در زمان انتخاب فولیکول به دلیل تفاوت در ظرفیت سلول گرانولوزا در ساخت استرادیول بود (۱۷). بنابراین افزایش سطح استرادیول با زنده‌مانی سلول همبستگی مثبت داشت (۱۴).

فرض ما این بود که استرادیول می‌تواند سبب کاهش آپوپتوسیز در سلول گرانولوزا به ویژه در شرایط افزایش تراکم شود و اثرات منفی فرسته‌ها را کاهش دهد. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر استرادیول بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با آپوپتوسیز (Bcl-2، Bax و GADD 45β) و چرخه سلول (CCDN-2) بود.

1- Apoptosis inducing factor

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

مواد و روش‌ها

محیط کشت DMEM/F12، بی‌کربنات سدیم، سلنیت سدیم، آلبومین سرم گاوی، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، ترانسفرین، ترکیب اسیدهای آمینه غیرضروری، فانگیزون و اندروستندایون از شرکت اینوتروژن (برلینگتون، انتاریو، کانادا) و استرادیول از سیگما تهیه شد. تخمدان گاوها از کشتارگاه جمع‌آوری شد و سپس در سرم فیزیولوژیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. تخمدان‌ها در سرم فیزیولوژیک که دارای پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰۰U/L) و استرپتومایسین (mg/L ۱۰۰۰۰۰) بود شستشو داده شدند (۳).

سلول گرانولوزا فولیکول‌های ۴ تا ۸ میلی‌متری از راه قطعه قطعه کردن تخمدان و پس از سه مرحله شستشو، سانتریفیوژ و دور ریختن سطح بالایی جدا شد و با استفاده از تریپان بلو ۰/۴ درصد تعداد سلول‌ها شمارش شدند. سلول‌ها در محیط کشت پایه DMEM/F12 که به آن بی‌کربنات سدیم (۱۰Mm)، سلنیت سدیم (ng/ml ۴)، آلبومین سرم گاوی (۱۰%)، پنی‌سیلین (U/ml ۱۰۰)، استرپتومایسین (μg/ml ۱۰۰)، ترانسفرین (μg/ml ۲/۵)، ترکیب اسیدهای‌آمینه غیرضروری (mM ۱/۱)، فانگیزون (mg/ml ۱) و اندروستندایون ($۱۰^{-۷}$ M) اضافه شده بود و در پلیت‌های ۲۴ تایی کشت داده شد. پلیت‌ها درون انکوباتور، با پنج درصد دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بیشینه رطوبت نسبی (۹۸ درصد) برای شش روز کشت داده شدند و هر یک روز در میان ۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با محیط کشت جدید جایگزین شد (۵). در روزهای صفر، دوم و چهارم به تمامی تیمارها انسولین گاوی اضافه شد. فزون بر آن، به منظور رشد سلول‌ها، در روزهای دوم و چهارم هورمون FSH گاوی (AFP-5332B, NIDDK, ۱ ng/ml Bethesda, MD, USA) به محیط کشت اضافه شد. در تیمار دارای استردیول، روز دوم و چهارم کشت ۱۰ ng/ml استرادیول به محیط کشت اضافه شد. کشت فوق با شرایط مشابه در سه هفته متوالی تکرار شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمارها شامل ۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت (کنترل)، ۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت (گروه آپوپتوتیک: افزایش تراکم دلیل آپوپتوتیک بودن است) و ۳) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت و افزودن استرادیول از روز دوم کشت (گروه آپوپتوتیک+استرادیول) بود. طول مدت کشت شش روز بود.

بیان ژن

استخراج RNA با استفاده از ترایزول و بر مبنای روش کار شرکت سازنده (اینویتروژن) صورت گرفت. به منظور رفع آلودگی ناشی از وجود DNA، ابتدا یک واحد DNase به RNA اضافه شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه انکوبه شد سپس به مدت سه دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تهیه cDNA از کیت Quantifast Revears-Transcriptase شرکت کیاژن استفاده شد. بر اساس پروتکل مربوطه، پس از افزودن

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

محلول gDNA به محلول RNA استخراج شده، نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لازم به ذکر است که حجم کل در این مرحله µL ۱۴ بود. مستر میکس RT که شامل µL ۱ آنزیم نسخه بردار معکوس، پیش مخلوطی باµL ۴ بافر QRT وµL ۱ آغازگر RT بود تهیه شد. به µL ۶ از مستر میکس حاصل، µL ۱۴ از محلول RNA اضافه شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از ترموسایکلر (peQLab primus25) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و پس از آن به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. cDNA حاصل پس از اتمام کارها و حل نمودن آن در آب بدون یون و استریل، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد. آغازگرهای مورد استفاده برای اطمینان از تکثیر با استفاده از یک cDNA و Real-time PCR (Applied Biosystems, ABI Prism 7300) آزمایش شدند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت سایبرگرین (کیاژن) واکنش‌های Real Time PCR انجام شدند. پس از تایید توالی و صحت طول قطعه تولیدی با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI، آغازگرهای موردنظر ساخته شدند (جدول ۱). برای استفاده بهینه از کیت، واکنش‌ها برای حجم µl ۲۵ تنظیم شدند (مسترمیکس سایبرگرین µl ۱۲/۵، جفت آغازگر اختصاصی µl ۱+۱، cDNA، µl ۱، آب دوبار تقطیر شده µl ۹/۵). از ۱۸s به عنوان ژن استاندارد استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در واکنش‌های Real - Time PCR

Accession number	bP	Reverse (5-3)	Forward (5-3)	ژن
XM_586976	۱۴۱	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCAT	CGCATCGTGGCCTTCTTTGAGTT	Bcl-2
NM_173894	۱۶۷	CCTTGGTGCACAGGGCCTTGAG	TTGCTGATGGAAGCTACAACTG	Bax
AV616939	۱۵۰	GTCCTCCTCTTCCTCGTCGAT	TACGAGTCGGCCAAGCTGAT	GADD45β
NM_001076372	۱۶۳	GATCTTTGCCAGGAGATCCA	CCAGACCTTCATCGCTCTGT	CCDN-2
DQ222453	۱۵۰	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	GTAACCCGTTGAACCCCATT	18S

اندازه‌گیری استرادیول

در روز ششم کشت، کل محیط کشت جمع‌آوری شد و غلظت استرادیول در نمونه‌ها بر اساس روش رادیوایمونواسی (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX, USA، ۱) و با دو تکرار برای هر نمونه انجام گرفت. حساسیت استرادیول pg ۱۰ به ازای هر لوله بود.

تجزیه و تحلیل آماری

برای نرمال کردن داده‌های حاصل از بیان ژن از تبدیل لگاریتمی استفاده شد. سپس آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) انجام شد، اثر حیوان به‌عنوان اثر ثابت و تکرار کشت (هر هفته) به‌عنوان اثر تصادفی در آزمون F در نظر

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

بیان نسبی ژن Bax همانطور که انتظار می‌رفت در گروه آپوپتوتیک نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (P = ۰/۰۰۱) ولی افزودن استرادیول به این گروه سبب کاهش بیان نسبی این ژن شد (P = ۰/۰۳) و اثرات تحریکی آن بر آپوتوزیس را مهار کرد. بین گروه کنترل و استرادیول اختلاف معنی‌داری در بیان نسبی ژن Bax وجود نداشت (P = ۰/۶۲ ، شکل ۱).

بیان نسبی ژن Bcl-2 در گروه کنترل نسبت به دو گروه بیشینه بود (P = ۰/۰۲) ولی بین گروه آپوپتوتیک و گروه استرادیول اختلاف معنی‌داری دیده نشد هر چند در گروه استرادیول میل به افزایش داشت (P <۰/۰۸). نسبت Bcl-2 به Bax در گروه کنترل به صورت معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر بود (P = ۰/۰۱). در گروه آپوپتوتیک این نسبت کاهش یافت ولی با افزودن استرادیول این نسبت افزایش یافت اگرچه به سطح کنترل نرسید (P = ۰/۰۴، شکل ۱).

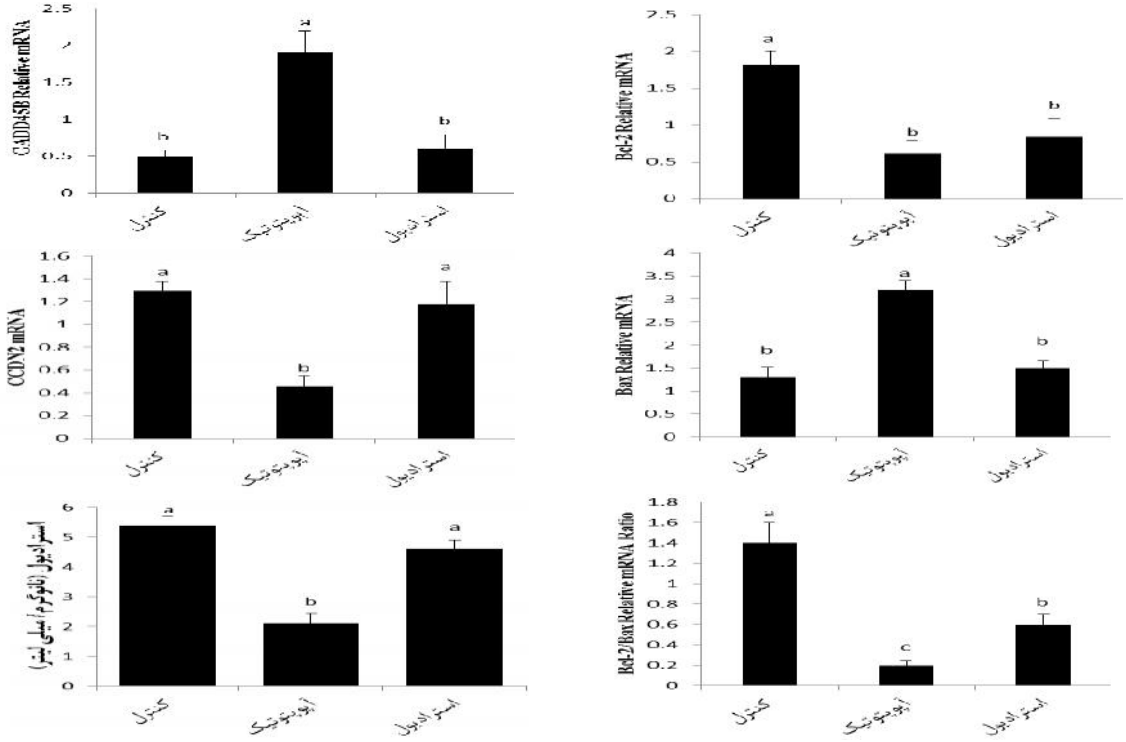
نتایج پژوهش حاضر نشان داد در گروه آپوپتوتیک بیان نسبی ژن Bax افزایش و بیان نسبی ژن Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax کاهش یافت ولی تیمار استرادیول این اثرات آپوپتوتیک را مهار کرد، به طوریکه بیان نسبی ژن Bax کاهش و نسبت Bcl-2 به Bax افزایش یافت. اولتوای و همکاران (۱۰) گزارش کردند نسبت Bcl-2 به Bax در تعیین مقدار حساسیت به استرادیول بسیار مهم است. یانگ و همکاران (۲۲) گزارش کردند طی تحلیل فولیکول نسبت Bcl-2 به Bax کاهش یافت. مطالعه روی فولیکول‌های با اندازه مختلف نشان داد نسبت Bcl-2 به Bax در فولیکول‌های کوچک متغیر بود در حالی‌که سطح Bax در فولیکول‌های متوسط و بزرگ بیشتر بود که نشان می‌دهد بیشتر فولیکول‌های متوسط و بزرگ متحمل آترزی شدند (۲۳). نسبت Bcl-2 به Bax در فولیکول‌های اترتیک کاهش یافت (۸). آترزی فولیکول غالب ناشی از تزریق پروژسترون با افزایش معنی‌دار سطح پروتین Bax در ارتباط بود. بین غلظت استرادیول در مایع فولیکولی و وقوع آپوتوزیس در سلول‌های گرانولوزا غیرزنده ارتباط معکوس وجود دارد (۸). کاهش تولید استرادیول طی آترزی فولیکول ممکن است در تنظیم بیان پروتین‌های پاسخ‌دهنده به تنش اکسیداتیو دارای نقش باشد (۲۳).

بیان نسبی ژن GADD45β که با آسیب DNA در ارتباط بود در گروه آپوپتوتیک بیشینه بود (P۰= /۰۱) ولی با افزودن استرادیول به گروه آپوپتوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد (P = ۰/۰۲) به طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه استرادیول و گروه کنترل دیده نشد (شکل ۱). استفاده از استرادیول سبب کاهش بیان نسبی ژن GADD45β شد که به دنبال آپوپتوسیز افزایش یافته بود و سطح آن را به حالت کنترل برگرداند. ژن GADD45β که در پاسخ به تنش در بسیاری از سلول‌ها بیان آن

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

افزایش می‌یابد می‌تواند بخشی از یک سازوکار محافظتی سلول باشد (۱۲،۹).

بیان نسبی ژن CCDN-2 که مرتبط با پیشرفت چرخه سلولی از گامه G_1 به S بود در گروه آپوپتوتیک نسبت به دو گروه دیگر کمینه بود (P ۰/۰۱) ولی با افزودن استرادیول به این گروه به سطح عادی بازگشت به طوریکه اختلاف معنی‌داری بین گروه استرادیول و گروه کنترل دیده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن‌های Bcl-2، Bax، GADD 45β، CCDN-2 و غلظت استرادیول

استرادیول سبب افزایش بیان ژن CCDN-2 شده این ژن در انتقال از گامه G1 به S بسیار مهم است (۲۰). سایکلین D2 برای تکثیر سلول‌های گرانولوزا مورد نیاز است (۲۱). نتایج پژوهش حاضر مشابه با مطالعات رابکر و ریچاردز (۱۸) و کوییرک و همکاران (۱۴) بود که گزارش کردند استرادیول بیان نسبی ژن سایکلین D2 را در سلول‌های گرانولوزا موش‌های صحرایی نا بالغ از راه سازوکاری که به واسطه گیرنده استرادیول است افزایش می‌دهد. در پژوهش‌ها استفاده از آنتاگونیست استرادیول، کنش استرادیول را از راه گیرنده آلفا و بتا استرادیول مهار کرد (۱۴). تیمار سلول گرانولوزا با روسکوویتین پیشرفت از گامه G_0 به G_1 و اثرات مثبت استرادیول در برابر آپوپتوسیز ایجاد شده بوسیله FasL را مهار کرد. به نظر می‌رسد سلول گرانولوزا در گامه G_0 به G_1 در برابر آپوپتوزیس مقاوم باشد. سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های پیش از تخمک‌ریزی که در معرض غلیان LH بودند نسبت به آپوتوزیس مقاوم بودند و این اثر وابسته به حذف

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

آنها از چرخه سلول بود (۱۳،۱۱). فزون بر این گزارش شده Bcl-2 که در زنده مانی سلول نقش دارد از ورود سلول‌های خاموش[1] به چرخه سلول جلوگیری می‌کند. تیمار با داروی میموزین سلول‌ها را در گامه G1 چرخه سلول متوقف کرد در حالی‌که استرادیول سبب پیشرفت چرخه سلول از G1 به S شد که این امر با افزایش مقاومت در برابر آپوپتوسیز القایی به‌وسیله FasL در ارتباط بود (۱۳).

افزودن استرادیول به گروه آپوپتوتیک سبب افزایش غلظت استرادیول شد، به طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه آپوپتوتیک وجود نداشت (شکل ۱). پورتلا و همکاران (۱۲) گزارش کردند افزایش تراکم سلول سبب کاهش بیان نسبی ژن‌های استروژنیک شد. ولی افزودن استرادیول با کاهش بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوسیز سبب افزایش تولید استرادیول در گروه آپوپتوتیک و برگشت غلظت استرادیول به حالت طبیعی شد. این پژوهش نشان داد استرادیول می‌تواند سلول گرانولوزا را در برابر آپوپتوزیس ناشی از افزایش تراکم محافظت کند که این اثر ممکن است وابسته به پیشرفت چرخه سلولی از گامه G_1 به S باشد.

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد استرادیول می‌تواند سلول‌های گرانولوزا را در برابر آپوتوزیس ناشی از افزایش تراکم محافظت کند.

منابع

1. Belanger, A., J. Couture, S. Caron, R. Roy. 1990. Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. Annual New York Academic Science, 595: 251-9-251.
2. Boumela, I., Y. Guillemin, J.F. Guérin and A. Aouacheria. 2009. The Bcl-2 family pathway in gametes and preimplantation embryos, Gynécol Obsterique Fertility, 37(9): 720-732.
3. Cetica, P.D., L.N. Pintos, G.C. Dalvit and M.T. Beconi. 2001. Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte in Vitro Maturation. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 51: 57-64.
4. Ginther, O.J., M.C. Wiltbank, P.M. Fricke, J.R. Gibbons and K. Kot. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. Biology of Reproduction, 55: 1187-1194.
5. Gutierrez, C.G., B.K. Campbell and R. Webb. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. Biology of Reproduction, 56: 16-608.
6. Gürsoy, E., K. Ergin, H. Başaloğlu, Y. Koca and K. Seyrec. 2008. Expression and localisation of Bcl-2 and Bax proteins in developing rat ovary, Research Veterinary Science, 84: 56-61.
7. Hsu, S.Y. and A.J.W. Hsueh. 1997. Hormonal regulation of apoptosis. An ovarian perspective. Trends in Endocrinology & Metabolism, 8: 207-213.
8. Jolly, P.D., D.J. Tisdall, D.A. Heath, S. Lun and K.P. McNatty. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 30,

1- Quiescent

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

50-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia. Biology of Reproduction, 51: 934-944.

9. Mihm, M., P.J. Baker, L.M. Fleming, A.M. Monteiro and P.J. O'Shaughnessy. 2008. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. Reproduction, 135: 65-253.
10. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vitro with a conserved homology, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 74: 609-619.
11. Porter, D.A., R.M. Harman, R.G. Cowan and S.M. Quirk. 2001. Susceptibility of ovarian granulosa cells of apoptosis differs in cells isolated before or after the preovulatory LH surge. Molecular Cellular Endocrinology, 176: 13-20.
12. Portella, V.M., Z. Gustavo and C.A. Price. 2010. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. Fertility and Sterility, 93(6): 2050-2055.
13. Quirk, S.M., R.G. Cowan and R.M. Harman. 2004. Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. Endocrinology, 145: 5033-5043.
14. Quirk, S.M., R.G. Cowan and R.M. Harman. 2006. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. J. Endocrinol, 189: 441-453.
15. Richards, J.S. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocrine Review. 15: 725-751.
16. Richards, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiology Review, 60: 51-89.
17. Rivera, G.M. and J.E. Fortune. 2001. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. Trends in Endocrinology & Metabolism., 65: 112-118.
18. Robker, R.L. and J.S. Richards. 1998a Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. Trends in Endocrinology & Metabolism, 59: 476-482.
19. Rosenfeld, C.S., J.S. Wagner, R.M. Roberts and D.B. Lubahn. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction, 122: 215-226.
20. Sherr, C.J. and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Devlopment. 13: 1501-1512.
21. Sicinski, P., J.L. Donaher, Y. Geng, S.B. Parker, H. Gardner, M.Y. Park, R.L. Robker, J.S. Richards, L.K. McGinnis and J.D. Biggers. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. Nature, 384-470.
22. Yang, M.Y. and R. Rajamahendran. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. Biology of Reproduction, 62: 1209-1217.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]

Decreasing the Relative Gene Expressions Associated With Apoptotic Factors in Granulosa Cells by Adding Estradiol

Essa Dirandeh[1], Zarbakht Ansari Pirsaraei[2] and Reza Masoomi[3]

1- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: dirandeh@gmail.com)
2- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor, University of Zanjan
Received: February 15, 2014 Accepted: March 17, 2014

Abstract

The objective of this study was to evaluate the apoptotic effects of increasing granulosa cell density and increasing estradiol on relative gene expression associated with apoptosis factors (Bcl-2, Bax and GADD45β) and cell cycle (CCDN-2). For this reason after collecting ovaries of cows from an abattoir, granulosa cells were separated from 4- to 8-mm follicles. Then, viable cells were counted and granulosa cell samples were cultured for 6 days. Treatments were included 1) 500,000 cell/1000 ml liquid culture (Control), 2) 500,000 cell/500 ml liquid culture (apoptotic group: increasing cell density cause apoptosis), 3) 500,000 cell/500 ml liquid culture and estradiol from day two of culture (apoptotic group+estradiol). Also, expression of genes associated with apoptosis factors and cell cycle, and estradiol of samples were evaluated. Results showed relative gene expression of Bax and GADD45β was greatest in apoptotic group compared to two other groups; but, with adding estradiol expression of these two genes decreased to control level. Bcl-2/Bax ratio decreased in apoptotic group compared with two other groups; while, adding estradiol significantly increased this ration, but, still it was lower than control group. Relative gene expression of CCDN-2 was lowest in apoptotic group compared to two other groups; but, no significant difference was observed between control and estradiol group. Overall results of the present study showed that estradiol can protect granulosa cells against apoptosis induced with increasing in cell density and probably it was done through progression of the cell cycle from G_1 to S stage.

Keywords: Granulosa cell, Estradiol, Apoptosis

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-10]