ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹
صفحه ۱۱۰ - ۱۰۳

تاثیر اسید اورسولیک بر تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای در جوجه‌های بومی

The effect of ursolic acid on proliferation and differentiation of satellite cells in native chickens

هنگامه مرادی*[۱]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۱]، سیم زر حسین‌زاده[۲]، سید داوود شریفی[۱]، احسان سیدجعفری[۳]، عبدالرضا صالحی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکترا تخصصی، استادیار، دانشیار، دانشیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، گروه علوم دام و طیور

۲- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی

۳- دانشیار، پردیس علوم دانشگاه تهران، گروه بیوتکنولوژی

Moradi H*[1], Mohammadi-Sangcheshmeh A[1], Hosseinzadeh S[2], sharifi SD[1], Seyedjafari E [3], Salehi A[1]

1- PhD Student, Assistant Professor, Associate Professor, Associate Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Tissue engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hengameh.moradi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۲)

چکیده

اسید اورسولیک یک ترکیب طبیعی تری ترپن پنتا سیکلیک است که در گل‌ها و میوه‌ها و همچنین در برخی گیاهان دارویی همانند نعناع و ریحان و مرزه یافت می‌شود و روی ماهیچه اسکلتی تاثیر می‌گذارد. در این مطالعه اثر اسید اورسولیک بر سلول‌های C2C12 و سلول‌های ماهواره‌ای (SC) جدا شده از جوجه‌های بومی یک روزه مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها با استفاده از روش pre-plating کشت داده شدند. سپس، برای تعیین دوز مناسب اسید اورسولیک از تکنیک MTT استفاده شد. برای بررسی بیان ژن‌های دخیل در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. تصاویر میکروسکوپی و نتایج تکنیک فلوسیتومتری با استفاده از آنتی‌بادی PAX7، ماهیت سلول‌های ماهواره‌ای رو تایید کرد. نتایج نشان داد که اسید اورسولیک در غلظت ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بیان ژن‌های دخیل در تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای نظیر PAX7، MyoD و Myogenin را افزیش داد ($p<0/05$). با توجه به نتایج این آزمایش، اسید اورسولیک با افزایش بیان ژن‌های PAX7، Myogenin و MyoD موجب هیپرتروفی عضله در جوجه‌های بومی می‌شود. درنتیجه، می‌توان استفاده از اسید اورسولیک را به‌عنوان یک مکمل غذائی برای بهبود رشد جوجه‌های بومی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی

اسید اورسولیک
سلول‌های ماهواره‌ای
جوجه‌های بومی
هیپرتروفی ماهیچه اسکلتی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان ملل متحد که که در سال ۲۰۱۹ منتشر شده است، انتظار می‌رود که جمعیت جهان در ۳۰ سال پیش‌رو دو میلیارد نفر رشد کند و از ۷ میلیارد و ۷۰۰ میلیون نفر در حال حاضر به ۹ میلیارد و ۷۰۰ میلیون نفر درسال ۲۰۵۰ افزایش یابد. بر همین اساس، صنعت پرورش طیور نیز همگام با رشد جمعیت از رشد چشمگیری برخوردار بوده است به‌طوری که تولید گوشت مرغ در سال ۲۰۱۶، ۱۱۵ میلیون تن بوده است و بر اساس نظر سازمان غذا و کشاورزی جهانی (فائو) انتظار می‌رود این میزان تا سال ۲۰۲۵ میلادی به ۱۳۱ میلیون تن برسد. فشار وارده بر صنعت تولید گوشت مرغ سبب شده تا سرعت رشد پرنده، بازده خوراک و حجم عضله افزایش یابد (Halevy et al. 2000). با توجه به محدودیت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و بسیاری از محرک‌های رشد مصنوعی به‌دلیل مشاهده آثار جانبی و گاهی زیان‌آور آن‌ها بر انسان، شناسائی روش‌های جدید و طبیعی به‌منظور بهبود رشد و ترکیب لاشه ضروری است (Bell et al. 2007). از آنجایی که رشد ماهیچه در جوجه‌ها از طریق هیپرتروفی عضله اسکلتی رخ می‌دهد، لذا بیشتر مطالعات بر تقویت فرایند هیپرتروفی عضلانی متمرکز شده است.

هیپرتروفی عضله اسکلتی به نوبه خود تحت کنترل جمعیت میوبلاست بالغ است که از آن‌ها به‌عنوان سلول‌های ماهواره‌ای نیز یاد می‌شود. که این سلول‌های تک هسته‌ای عضلانی ساکن عضله اسکلتی دارای ویژگی‌های بنیادی بودن یعنی قابلیت خودنوسازی و تمایز هستند (Morgan et al. 2010). در پرندگان، رشد ماهیچه‌ای پس از خروج از تخم وابسته به فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای و در نتیجه هایپرتروفی ماهیچه هاست که این سلول‌ها پس از خروج از تخم کاملا فعال هستند، اما در هفت روزگی فعالیت میتوزی آن‌ها به یک سوم زمان خروج از تخم کاهش می‌یابد (Moore et al. 2005). بنابراین دسترسی به مواد مغذی مناسب برای جوجه‌ها بعد از خروج از تخم (دوره آغازین)، شرط ضروری برای تحریک تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و در نتیجه ادغام آن‌ها در میوفیبرها و رشد ماهیچه‌ای است (Fernandes et al. 2009). به‌طوری که طی این دوره، اختلال در دسترسی به غذا منجر به کاهش فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود (Velleman et al. 2010). مستندات علمی موجود نشان می‌دهد که سلول‌های ماهواره‌ای به‌شدت به‌وسیله‌ی عوامل خارجی نظیر عامل رشد تغییرشکل‌دهنده‌ی بتا (TGF-β)، عامل رشد فیبرو بلاستی (FGF)، میوستاتین و چندین فاکتور رونویسی مثل Pax7، عامل تنظیمی مایوژنیک (MRF)، عامل ۱ تمایز مایوژنیک (MyoD) و میوژنین تنظیم می‌شوند (Dhawan and Rando 2005; Cameron-Smith 2002). بنابراین، شناخت این عوامل و چگونگی عملکرد آن‌ها، مسیر جدیدی رابه‌منظور توسعه‌ی برنامه‌های بهبود عملکرد در طیور گوشتی باز خواهد کرد.

در سال‌های اخیر تلاش زیادی برای درک سازوکارهای سلولی و مولکولی هیپرتروفی و آتروفی عضلانی صورت گرفته است (Rahimi et al. 2011). یکی از رویکردهایی که در راستای رشد عضلانی هیپرتروفی مورد نظر قرار گرفته است، استفاده از مواد طبیعی با منشاء گیاهی مثل اسید اورسولیک است (Li et al. 2014). اسید اورسولیک در واقع یک ترکیب چربی‌دوست می‌باشد که در پوست سیب، نعناع، رزماری، پونه کوهی، آویشن، آلو و مرزه وجود دارد (Garcia et al. 2006). تاکنون، اثرات بیولوژیکی مختلفی برای این ترکیب گزارش شده است که می‌توان به فعالیت ضدتوموری از طریق مهار مسیر STAT، ضد التهاب، ضد دیابت، ضد HIV، ضد باکتری، ضد اکسیداتیو و محافظت از کبد اشاره نمود (Nuredin 2015; Garcia et al. 2006; Chu et al. 2015). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اورسولیک اسید ضمن ممانعت از تحلیل ماهیچه اسکلتی، باعث افزایش حجم و قدرت آن در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (Kunkel et al. 2011). گزارش شده است که اورسولیک اسید با کاهش بیان ژن‌های مسئول تحلیل عضلانی (MURF1 و atrogin-1) و افزایش بیان ژن‌های مسیر آنابولیک (پروتئین کینازB)، باعث افزایش حجم ماهیچه اسکلتی می‌شود (Kunkel et al. 2011). به‌نظر می‌رسد که اسید اورسولیک با فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای باعث بهبود عملکرد و افزایش سرعت رشد در هفته اول بعد از هچ شود. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر افزودن اسید اورسولیک به سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از ماهیچه اسکلتی جوجه های یک روزه بومی است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

مواد و روش‌ها

اسید اورسولیک از شرکت Enzo Life Sciences با خلوص ۹۰ درصد خریداری شد. FBS، DMEM، پنی سیلین-استرپتومایسین، آنزیم‌های گوارشی مانند کلاژناز نوع اول و چهارم و همچنین دیسپاز از شرکت GIBCO (گراند آیلند، نیویورک) خریداری شدند. آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای β-actin، PAX7، Myogenin و MyoD از شرکت بیوتکنولوژی سانتا کروز (سانتا کروز) و آباکام خریداری شدند. فسفات بافر نمکی-EDTA، ژلاتین، کیت سنتز DNA، PCR Master Mix، از شرکت سیگماآلدریچ و سایر مواد شیمیایی از شرکت Merck خریداری شدند. جداسازی سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه اسکلتی با استفاده از روش pre-plating صورت گرفت (Wu et al. 2012). از آنجایی که سلول‌های ماهواره‌ای در ماهیچه طیور جوان‌تر بیشتر یافت می‌شوند، لذا برای دست‌یابی به جمعیت خالص‌تری از این سلول‌ها از جوجه‌های بومی در سنین ابتدایی استفاده شد. سپس، ماهیچه اسکلتی به قطر ۱ میلی‌متر از سینه طیور گوشتی جدا شده و درون فالکون حاوی محلول آنزیمی (۰/۱ درصد کلاژناز نوع ۱، ۰/۱ درصد کلاژناز نوع ٤ و ۱/۷۵ u/mg دیازپاز) به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا هضم انجام شود. بعد از ٢٤ ساعت، نمونه‌ها به مدت سه و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، نمونه‌ها از یک صافی با منفذهای ۷۰ میلی‌متری عبور داده شدند و به مدت ۲ دقیقه در با دور ۱۲۵۰ سانتریفیوژ شدند. سپس سلول‌های جدا شده با افزودن به محیط کشت حاوی D-MEM و FBS ۱۰٪، سوسپانسیون تک سلولی کشت شده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. اولین مرحله از pre-plating، با ذخیره سلول‌های غیرقطبی و سلول‌های جداشده توسط بافر فسفات سالین-EDTA انجام گرفت. این مرحله هر روز تکرار شد و سلول‌ها در یک فلاسک حاوی محیط کشت داده شدند. در نهایت، برای تشخیص سلول‌های کشت داده‌شده از فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX7 استفاده شد.

در این مرحله، شناسایی سلول‌های ماهواره‌ای با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی اولیه PAX7 انجام شد. سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری (شامل PBS و سرم یک درصد) به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدئید ٤ درصد تثبیت شدند. در مرحله بعدی، سلول‌ها با آنتی بادی PAX7 متصل به یک آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس، به مدت یک ساعت انکوبه شدند. بعد از تثبیت مجدد سلول‌ها با پارافرمالدئید یک درصد، نمونه‌ها برای بررسی بیان نشانگر سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Dekenson Bectin و نرم‌افزار 8/MDI2 Win در آزمایشگاه هیستوژنوتک بررسی شدند. در نهایت سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از ماهیچه اسکلتی در محیط کشت فیبرو بلاست (DMEM با محتوای گلوکز بالا به عبارتی ٤/۵ میلی گرم در میلی لیتر) حاوی FBS 10 درصد (v/v)، گلوتامین یک درصد (w/v) و پنیسیلین/استرپتومایسین یک درصد (w/v) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوای مرطوب قرار داده شدند. سلول‌ها در یک پلیت ۹۸ خانه‌ای که در هر خانه ۲۰۰۰ سلول قرار داشت، به مدت ٤٨ ساعت کشت شدند. سپس، سلول‌های ماهواره‌ای به مدت ۷ روز با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۱ ، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) تیمار شدند.

جهت بررسی اثر سایتوتوکسیتی اسید اورسولیک، از روش رنگ سنجی MTT (۳-(٤،۵) - دی متیل تیازول)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم برمید) استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنول یا بافر PBS حل شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند. اساس این تست شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌صورت محلول در می‌آیند. برای بهینه‌سازی غلظت اسید اورسولیک، سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه با غلظت‌های مختلفی اسید اورسولیک و یک میلی‌لیتر DMSO به مدت ۷ روز متوالی تیمار شدند. بعد از ٤ ساعت انکوباسیون با معرف MTT در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ، ۱۰۰ میلی‌لیتر DMSO اضافه شد و سپس چگالی نوری (OD) هر چاهک با استفاده از میکرو پلیت ریدر در ٤۹۰ نانومتر خوانده و سرانجام، درصد مرگ سلولی طبق فرمول ذیل (Hazary et al. 2001) اندازه‌گیری شد:

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

درصد مرگ سلول‌های ماهواره‌ای= (OD نمونه کنترل منفی - OD نمونه اسید اورسولیک) / OD نمونه کنترل منفی * ۱۰۰

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

سطح mRNA نمونه‌ها با استفاده از تکنیک qRT-PCR اندازه‌گیری شد (Kunwar et al. 2012). به‌طور خلاصه، با استفاده از معرف Trizol، RNA کل از نمونه‌ها استخراج شده و در آب حاوی دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) طبق دستورالعمل شرکت سازنده حل شد. در ادامه، cDNA از ۳ میکروگرم RNA سنتز شده و سپس qRT-PCR با استفاده از دستگاه Rotor Gene 3000 (Corbett Research) انجام شد. جهت اجرای qRT-PCR، مسترمیکس۱۰ ایکس SYBR green PCR با ۱۰ میکرولیتر cDNA برای جوجه‌های تحت تیمار با اسید اورسولیک و ۸ میکرولیتر برای جوجه‌های کنترل و همچنین ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رو به جلو و عقب (جدول ۱) مخلوط شد و سپس حجم مخلوط واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر طبق مراحل زیر انجام شد: مرحله ۱) دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه؛ مرحله ۲) دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ۳) اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه؛ مرحله ٤) گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه؛ مرحله ۵) آنالیز منحنی ذوب. مراحل ۱ تا ٤ برای ٤۰ چرخه تکرار شدند و تکثیر برای هر ژن در سه تکرار انجام شد. اختصاصیت آمپلیکون توسط آنالیز منحنی ذوب تأیید شد و برای محاسبه تغییر بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار REST-384 (نسخه ۲) (بیکمن) از استانداردهای چرخه آستانه استفاده شد (Beekman et al. 2016). بیان ژن‌ها در برابر ژن خانه‌دار (β-actin) نرمال شد و به‌عنوان تغییر نسبی در بیان با توجه به کنترل ترسیم شد. علاوه بر این به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده نمونه‌ها از ژل الکتروفوز و دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ استفاده شد. دستگاه نانودراپ میتواند مقادیر کم نمونه را با دقت و حساسیت بالا اندازه‌گیری کند. این اطلاعات از طریق جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موجهای ۲۳۰، ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست می‌آید. همچنین کل RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار گرفت تا rRNAsهای 18S و 28S مشاهده شود. حداقل غلظت کل RNA استخراج شده ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. از RNA خالص برای سنتز cDNA و انجام مراحل بعدی Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد.

جدول ۱- فهرست پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

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

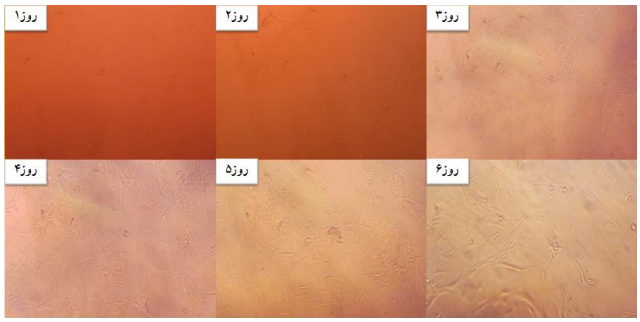
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

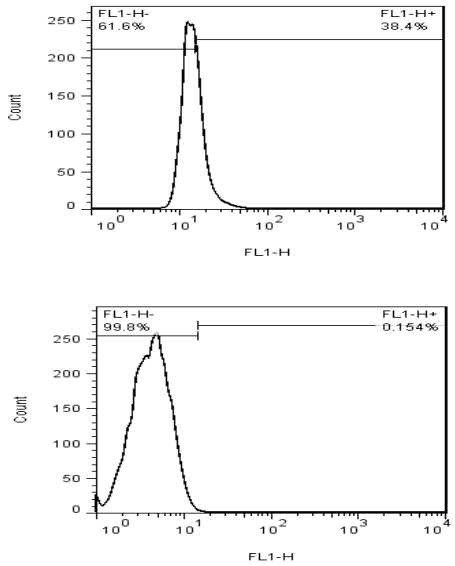
داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از آزمون t-student و با استفاده از نرم‌افزار SPSS مقایسه شدند. نمودارها نیز با استفاده از Excel ترسیم شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز تصاویر میکروسکوپی، هویت سلول‌های ماهواره‌ای را تایید کرد. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای با گذشت زمان افزایش یافت به‌طوری که تفاوت آن در روز ششم با روز اول محسوس بود. بررسی فلوسیتومتری با آنتی‌بادی PAX7 ماهیت این سلول‌ها را نیز تاییدکرد (شکل ۲).

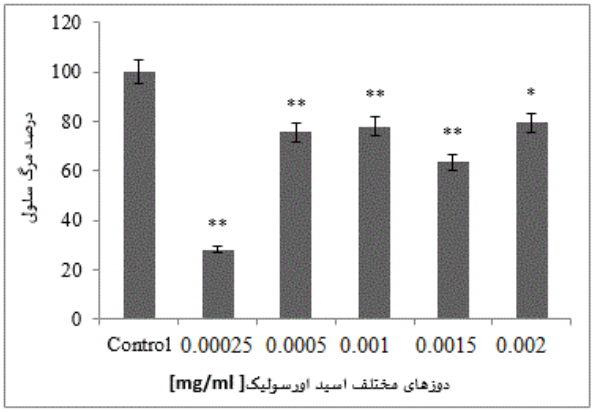


شکل ۱- تصاویر سلول‌های ماهواره‌ای جداشده از بافت سینه جوجه گوشتی بومی تیمارشده با اسید اورسولیک از روز یکم تا ششم.



شکل ۲- نتایج فلوسیتومتری آنتی‌بادی PAX7. بالا: نمونه بافت ماهیچه حاوی سلول‌های ماهواره‌ای و پایین: کنترل منفی.

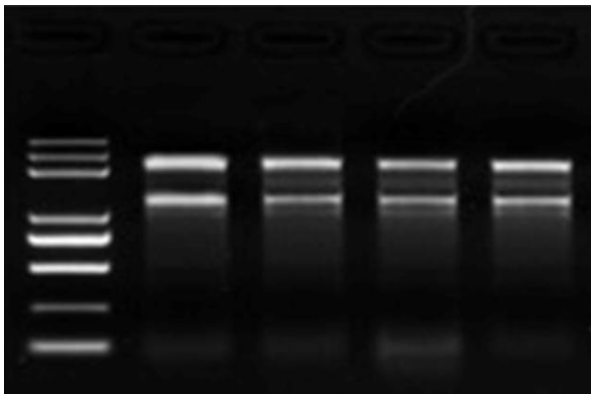
نتایج حاصل از آزمون MTT مربوط به تعیین درصد مرگ سلولی برای دوزهای مختلف اسید اورسولیک نشان داد که کمترین کشندگی سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه مربوط به دوز ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با توجه به این موضوع، ابتدا دوز ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های ماهواره‌ای اعمال شد و سپس بیان ژن‌های مؤثر بر تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای PAX7، Myogenin و MyoD با روش qRT-PCR بررسی شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- نتایج آزمایش MTT برای تعیین درصد مرگ سلولی در دوزهای مختلف اسید اورسولیک. * و** به‌ترتیب اختلاف معنی‌داری را بین گروه تحت درمان با گروه شاهد با P <0.05 و P <0.01 نشان دادند.

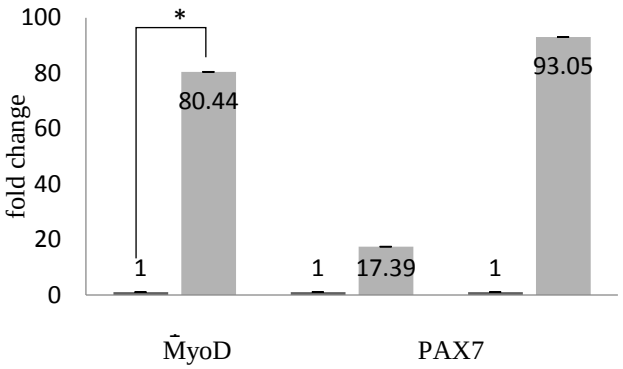
در راستای مطالعه تاثیر اسید اورسولیک بر بیان ژن‌های PAX7، Myogenin و MyoD با روش qRT-PCR، ارزیابی خلوص و کیفیت RNA انجام شد. نتایج ارزیابی خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که نسبت OD 260/280 تمام نمونه‌های استخراج شده در حدود ۱/۹۲ تا ۱/۹۷ بود که نشان از کیفیت خوب استخراج بود. همچنین، ارزیابی کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از روش ژل الکتروفورز و مشاهده باندهای 18S و 28S مرتبط با RNA ریبوزومی به‌عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج‌شده نشان داد که تخلیص مولکول RNA دارای کیفیت مناسبی برای ادامه کار می‌باشد (شکل ۳).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]



شکل ۳- تفکیک RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱/۵. M: مارکر مولکولی؛ ۱ و ۲: نمونه تیمار؛ ۳ و ٤: نمونه کنترل.

بعد از تایید خلوص و کیفیت RNA، qRT-PCR اجرا شد. بعد از تیمار سلول‌های ماهواره‌ای با اسید اورسولیک، سطح بیان ژن‌های PAX7، Myogenin و MyoD ترتیب حدود ۹۳، ۸۰ و ۱۷ برابر در مقایسه با کنترل افزایش یافت (نمودار ۲). افزایش چشمگیر سطح بیان MyoD و PAX7 در سلول‌های ماهواره‌ای به‌عنوان شاخص طلایی حالت فعال‌شدن سلول‌های ماهواره‌ای شناخته شده است (Zammit 2004).



نمودار ۲- بیان ژن‌های PAX7، Myogenin و MyoD در سلول‌های ماهواره‌ای بعد از تیمار اسید اورسولیک در مقایسه با کنترل. علامت‌های ستاره گویای وجود اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد بین نمونه تیمارشده با اسید اورسولیک و کنترل است.

بحث

تولید فرآورده‌ای گوشتی همانند مرغ همگام با رشد جمعیت مستلزم اتخاذ رویکردهای مختلف مانند تقویت فرآیند هیپرتروفی فیبر عضلانی است که به نوبه خود تحت کنترل جمعیت میوبلاست یا سلول‌های ماهواره‌ای می‌باشد (Zammit 2004). با توجه به این موضوع، مطالعه اثر اسید اورسولیک بر تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای در جوجه‌های گوشتی حائز اهمیت است. بنابراین، مطالعه ما با هدف بررسی اثر اسید اورسولیک بر سلول‌های C2C12 و سلول‌های ماهواره‌ای (SC) جدا شده از جوجه‌های بومی یک روزه اجرا شد. نتایج حاصل از آنالیز تصاویر میکروسکوپی، هویت سلول‌های ماهواره‌ای را تایید کرد. بر اساس مقایسه این تصاویر، تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای با گذشت زمان افزایش یافت به‌طوری که تفاوت آن در روز ششم با روز یکم محسوس بود. این نتایج با یافته‌های کانکل و همکارن (۲۰۱۱) مطابقت داشت (Kunkel et al. 2011). آن‌ها در پژوهش خود بر روی بررسی اثر اسید اورسولیک بر تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای نشان دادند که اثر این ترکیب بر سلول‌های ماهواره‌ای وابسته به زمان است به‌طوری‌که با گذشت زمان بر تعداد سلول‌های ماهواره‌ای افزوده می‌شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار اسید اورسولیک باعث افزایش چشمگیر سطح MyoD و PAX7 در سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود که بیان هم‌زمان این دو فاکتور بعنوان شاخص طلایی حالت فعال‌شدن سلول‌های ماهواره‌ای در نظر گرفته می‌شود (Zammit 2004). افزایش بیان ژن MyoD وابسته به PAX7 است که نشان می‌دهد PAX7 برای رفتار معمول سلول‌های ماهواره‌ای و بازسازی عضلات اسکلتی ضروری است (Martin 2012). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، القاء بیان Pax7 در سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه موش توسط Bakhtiyari et al. (2016) نیز گزارش شده است. آن‌ها پیشنهاد کردند که این ژن نقشی مهمی در تغییر بیان ژن‌های درگیر در تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای دارد. هم‌چنین، نشان داده شده است که این عامل توانایی تحریک سلول‌های ماهواره‌ای غیرفعال را داشته و از تولید میوبلاست‌های مشتق شده از سلول‌های ماهواره‌ای ممانعت به‌عمل می‌آورد (Peter et al. 2006). بنابر این می‌توان اینگونه استنباط کرد که اسید اورسولیک از طریق افزایش بیان PAX7 باعث تقویت تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود.

علاوه بر ژن PAX7، خانواده‌ی MRF (فاکتور تمایز مایوژنیک) شامل فاکتورهایی همچون Myogenin و MyoD نیز در فرایند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای درگیر هستند. این فاکتورها در سلول‌های ماهواره‌ای فعال بیان می‌شوند اما در سلول‌های ماهواره‌ای غیرفعال بیان نمی‌شوند (Alison et al. 2006). فاکتور MyoD، یکی از اولین نشانگرهای شناخته‌شده در فرایند عضله‌زائی است و در تنظیم تمایز عضله ایفای نقش می‌کند (Christian 1999)، به‌طوری که بیان MyoD، فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای را افزایش می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیان ژن MyoD باعث افزایش بیان ژن Myogenin و متعاقبا ارتقاء تمایز نهایی سلول‌های عضله اسکلتی می‌شود (Nakatsuka et al. 2010). هم‌چنین، فاکتور Myogenin باعث تمایز سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود و به‌عنوان یک نشانگر مفید در توسعه داخل سلولی ماهیچه استفاده می‌شود (Nakatsuka et al. 2010). بنابراین، مکانسیم احتمالی اثرگذاری تیمار اسید اورسولیک بر سلول‌های ماهواره‌ای را می‌توان به فعالسازی ژن Myog و توسعه داخل‌سلولی ماهیچه نسبت داد. افزایش بیان Myogenin و MyoD در سلول‌های ماهواره‌ای تیمارشده با اسید اورسولیک به نوبه خود توانایی این ترکیب را در تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای منعکس می‌نماید. بدین ترتیب، به‌نظر می‌رسد که اسید اورسولیک از طریق فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای بر فرایند هیپرتروفی عضله اسکلتی تاثیر می‌گذارد. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که اسید اورسولیک می‌تواند حجم عضله را با فعال شدن سنتز پروتئین و مهار اتروفی عضله افزایش دهد (Chu et al. 2015).

نتیجه‌گیری کلی

سلول‌های ماهواره‌ای به‌عنوان اصلی‌ترین سلول‌های بنیادی مشارکت‌کننده در هیپرتروفی عضله اسکلتی تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای مختلف قرار می‌گیرند، بدین معنی که فعال‌شدن و تکثیر و تمایز این سلول‌ها متاثر از فاکتورهای داخلی و تغذیه‌ای است. پژوهش اخیر نشان داد که اسید اورسولیک قادر به فعال‌سازی سلول‌های ماهوارهای از طریق افزایش بیان ژن‌های PAX7، Myogenin و MyoD است. به‌نظر می‌رسد که این افزایش بیان نیز به نوبه خود باعث تقویت تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و افزایش حجم ماهیچه اسکلتی در جوجه‌های بومی شود. با اینحال، درک دقیق مکانسیم‌های درگیر در این تاثیرگذاری و بهبود حجم ماهیچه اسکلتی نیازمند مطالعات بیشتر است.

منابع

Alison D, Jason B, Foster C, and McGuigan R (2006) Using session RPE to monitor different methods of resistance exercise. Sports Science and Medicine 5: 289-295.

Beekman L, Tohver T, Leguillette R (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: 153-161.

Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE (1999) Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hind limb unloading. Am Journal Physiol 277:R601-6.

Cameron-Smith D (2002) Exercise and skeletal muscle gene expression. Clin Exp Pharmacol Physiol 29: 209-13.

Chu X, He X, Shi Z, et al. (2015) Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and β-oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle. Mol Nutr Food Res 59:1491-503.

Dhawan J and Rando TA (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. Trends in Cell Biology 15: 666-73.

Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S et al (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. Molecular Cell 12: 51-62.

Feige JN and Auwerx J (2008) Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology, Current Opinion *in* Cell Biology 20: 303-309.

Fernandes J IM, Murakami AE, Martins EN, Sakamoto M. I, Garcia ER M (2009). Effect of arginine on the development of the pectoralis muscle and diameter and the protein: deoxyribonucleic acid rate of its skeletal myofibers in broiler . poultry Science. 88: 1399-1406.

Garcia VP, Catala-Gregori F, Hernandez MD, Megras A, Madrid J (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.

Hall IR, Tomann A, Bauermann U (2008) Effect of a graded supplementation of savory in broiler feed on growth and carcass traits. Archive for Geflugelk 72: 129-135.

Halevy OA, Geyram M, Barakm Z and Sklan D (2000) Early posthatch starvation decreases satellite cell

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]

proliferation and skeletal muscle growth in chicks. The Journal of Nutrition 130:858-864.
Hazary RC, Chaudhuri D, Wishart GJ (2001) Application of an MTT reduction assay for assessing sperm quality and predicting fertilizing ability of domestic fowl semen. British Poultry Science 42: 115-117.
Jeong JW, Shim JJ, Choi ID, et al (2015) Apple pomace extract improves endurance in exercise performance by increasing strength and weight of skeletal muscle. Journal of Medicinal Food 18: 1380-1386.
Jung SH, Ha YJ, Shim EK, et al (2007) Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. Biochem Journal 403: 243-250.
Kunwar A, Jayakumar S, Bhilwade HN, et al (2016) Protective effects of selenocystine against gamma-radiation-induced geno-toxicity in Swiss albino mice. Radiation and Environmental Biophysics 50: 271-280.
Kunkel SD, Suneja M, Ebert SM, et al (2011) mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. Cell Metabolism 13: 627–638.
Li S, Liao X, Meng F, et al (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.
Momtaz S, and Abdollahi M (2010) An update on pharmacology of Satureja species; from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyper lipidemic to reproductive stimulation. International Journal of Pharmacology 6: 454-461.
Moss FP, and Leblond CP (1971) Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. The Anatomical Record 170: 421-435.
Nakatsuka R, Nozaki T, Uemura Y, et al (2010) 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. Archives of Oral Biology 55: 350-357.
Nuredin B (2015) Ursolic acid induces myoglobin expression and skeletal muscle remodeling in mice. Physiology and Pharmacology 18: 373-382.
Peter SZ, Frederic R, Yosuke N, et al (2006) Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. Journal of Cell Science 119: 1824-1832.
Rahimi SZ, Teymouri-Zadeh MA, Karimi-Torshizi R, Omidbaigi A, Rokni H (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.
Sherwood CC, Holloway RL, Erwin JM, Schleicher A, Zilles K, Hof PR (2004) Cortical orofacial motor representation in Old World monkeys: great apes, and humans: II. Stereologic analysis of chemoarchitecture. Behavior and Evolution 63: 82-106.
Velleman SG, Nestor KE, Coy CS, Harford I and Anthony NB (2010) Effect of posthatch feed restriction on broiler breast muscle development and muscle transcriptional regulatory factor gene and heparan sulfate proteoglycan expression. International Journal Poultri Science 9: 417-425.
Wu H, Yu R, Shuo L, et al (2012) In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. Cell Biology International 36: 579-587.
Williams P and Losa R (2001) The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. World's Poultry Science Journal 17: 14-15.
Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? The Journal of cell biology 166:347-357
Martin NR, Lewis MP (2012) Satellite cell activation and number following acute and chronic exercise: a mini review. Cellular and Molecular Exercise Physiology 1(1):e3.
Moore T., Ferket P. R. and Mozdziak P. E. (2005) Muscle development in the late embryonic and early post-hatch poult. International Journal of Poultry Sciences 4: 138-142.
Morgan JE, Zammit PS (2010) Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. Experimental cell research 316: 3100-3108.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.2.5]