تولیدات دامی
دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶
صفحه‌های ۵۰۶-۴۹۳

بررسی اثر زنجبیل در مقایسه با ویتامین E بر کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند نژاد افشاری

الهام بیرانوند[۱]، محمدرضا سنجابی[۲]*، محمد زندی[۳]، حمیده افقی[۴]

۱. کارشناسی‌ارشد، پژوهشکدهٔ کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ایران
۲. دانشیار، پژوهشکدهٔ کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ایران
۳. استادیار، پژوهشکدهٔ کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ایران
۴. دانشیار، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر عصارهٔ زنجبیل و ویتامین E بر عملکرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بود. برای این منظور غلظت‌های مختلف از عصاره‌های آبی و هیدروالکی زنجبیل و ویتامین E بر زنده‌مانی، تشکیل کلونی و بیان ژن‌های مهارکننده (*bcl2* و *bcl2l1*) و پیش‌برندهٔ آپوپتوز (*bax*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی آزمایش شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضهٔ گوسفندان کشتارشده با استفاده از روش هضم آنزیمی دو مرحله‌ای استحصال و به‌روش حذف تمایزی خالص‌سازی شد. سپس، با استفاده از رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و بیان شناساگرهای اختصاصی *oct-4* و *c-kit* شناسایی شد. نتایج نشان داد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت حاوی سطوح بالاتر از ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل به‌طور معناداری در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($p<0/05$). در حالی که بیشترین زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هنگام استفاده که ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل بود و با افزایش غلظت ویتامین E (تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افزایش یافت. بیان ژن *bax* در غلظت‌های مؤثر عصارهٔ آبی زنجبیل (۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ویتامین E (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش یافت، در حالی که عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل (۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غلظت‌های بالای عصارهٔ آبی (بیش از ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیان این ژن را افزایش داد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان از غلظت‌های ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل یا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین E به‌منظور بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، آنتی‌اکسیدان، زنجبیل، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، ویتامین *E*.

* نویسنده مسئول
Email: msanjabii@gmail.com

مقدمه

اسپرم‌سازی فرایندی پیوسته در طول عمر تولیدمثلی حیوان نر است که در نتیجهٔ آن مجموعه‌ای از اسپرماتوگونی‌های تمایزیافته تولید می‌شود. این فرایند وابسته به تکثیر و تمایز پیوستهٔ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بافت بیضه است [۵]. از آنجا که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از جمله سلول‌هایی از بدن است که با تقسیم خود ژن‌ها را به سلول‌های نسل بعد منتقل می‌کند، در نتیجه این سلول‌ها منبع ارزش‌مندی برای آزمایش‌های بیولوژیکی، بالینی، فناوری‌های تولیدمثلی و اصلاح نژاد دام است [۸].

کشت طولانی‌مدت، انجماد و انتقال به حیوان گیرنده از جمله موضوعات مهم در زمینهٔ استفادهٔ کاربری از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است [۱۳]. روشی ارائه شده است که با کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش می‌توان سلول‌های تولیدشده را برای چندین ماه یا حتی چندین سال در شرایط آزمایشگاهی تکثیر و اطلاعات ژنتیکی آن را به‌طور بی‌نقصی حفظ کرد که قابلیت کلونی‌زایی در بیضهٔ موش دریافت‌کننده را داشته باشد [۹]. کشت موفق سلول‌های بنیادی زایای موش ثابت کرد که این روش در سایر گونه‌های حیوانات نیز قابل انجام است، به‌خصوص که استفاده از روش‌های اصلاحی و ژنتیکی رایج قابلیت انجام نداشته باشد [۶].

تحقیقات اخیر نشان داده است که اثر تجمعی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تخریب DNA از عوامل کاهش جمعیت و زایایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است، به‌طوری که در بدن حیوان یا در شرایط آزمایشگاهی توانایی خودنوزایی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با افزایش سن کاهش می‌یابد که در نتیجه کاهش بیان ژن‌های مؤثر در خودنوزایی این سلول‌هاست [۷]. به‌منظور ممانعت از ایجاد استرس در ساختار سلولی مانند غشا، ساختار پروتئین، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک، وجود شبکهٔ کاملی از آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌ها در موجود زنده ضروری است. آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد می‌توانند اثر اکسیدکنندگی آن‌ها را خنثی کنند. تاکنون دو نوع آنتی‌اکسیدان شناسایی شده است، شامل نوع آنزیمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و تعداد کمی از سوپراکسید پروکسیدازها و نوع غیرآنزیمی مانند ویتامین E و C [۳]. اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین E مربوط به مهار گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن است [۱۷]. همچنین، ویتامین E باعث کاهش صدمات حاصل از پراکسایش چربی‌ها و موجب کارایی بهتر دستگاه تولیدمثلی در چندین گونه از جمله گوسفند شده است [۱۱].

زنجبیل آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است که از ساخت رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند. گزارش شده است که زنجبیل سبب افزایش بهبود کیفیت اسپرم و نرخ باروری می‌شود، به‌طوری که فرآورده‌های متفاوت زنجبیل برای این منظور ساخته شده است [۱۰]. گزارش‌های متعدد نشان داده است ترکیبات فعال این گیاه مانند جینجرول، شوگول و کورکومین به‌خوبی توانایی مهار تولید پروستاگلاندین‌ها، نیتریت اکسید و حتی اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را دارد. مشخص شده است که ترکیبات جینجرول، شوگول و زینجبرون موجود در زنجبیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. از میان این ترکیبات زینجبرون ترکیب اصلی آن است و خاصیت ضد باکتریایی نیز دارد [۲].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ گیاه زنجبیل در مقایسه با ویتامین E به‌منظور بهبود فرایند کشت بر زنده‌مانی و تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی و بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه عبارت بود از هیالورونیداز نوع- II (سیگما، H2126)، کلاژناز (سیگما، C9891)، تریپسین (اینویتروژن، ۰۵۶-۲۵۲۰۰)، DNase (سیگما، DN25)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین + استرپتومایسین (جیبکو، ۳۶۳۲)، مایتومایسین-C (سیگما، M۴۲۸۷)، DMEM (حاوی هپس، ال-گلوتامین، سدیم بی‌کربنات) (اینوکلون)، DPBS (جیبکو) و Fetal Bovine Serum (FBS) (جیبکو،۱۰۲۷۰). مواد مورد نیاز برای استخراج mRNA، سنتز cDNA و PCR از شرکت سیناکلون تهیه شد. عصاره‌های آبی و هیدروالکلی ریشهٔ زنجبیل از شرکت ابن ماسویهٔ تهران تهیه شد. عصاره‌گیری در شرکت مذکور به‌طور خلاصه به شرح ذیل انجام شد. پس از شستشوی ریشه‌های زنجبیل با آب مقطر، به‌مدت ۲۴ ساعت در آون قرارگرفت تا خشک شود. ریشه‌های خشک‌شده آسیاب شد و به‌منظور عصاره‌گیری به‌کار رفت. به‌منظور تهیهٔ عصارهٔ آبی- الکلی ۴۰ گرم پودر زنجبیل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه، در محلول اتانول۵۰ درصد رقیق‌شده با آب مقطر قرارگرفت و پس از این مدت تمام محتویات ظرف از صافی عبور داده شد. به‌منظور تهیهٔ عصارهٔ آبی از دستگاه سوکسله استفاده شد. برای این منظور ۴۰ گرم پودر زنجبیل در کیسهٔ مخصوص عصاره‌گیری ریخته شد و عصارهٔ قابل‌حل در آب مقطر قرارگرفت. از دستگاه اوپریتور به‌منظور تغلیظ عصاره‌ها استفاده شد. مادهٔ خشک عصاره‌ها به‌ترتیب ۲۲ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر یک از عصاره‌های هیدروالکلی و آبی زنجبیل بود.

برای اندازه‌گیری اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هیدروالکلی و آبی زنجبیل از آزمایش DPPH (1,1- Diphenyl-2-picryl- hydrazyl) استفاده شد [۴]. به‌طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌مولار از محلول DPPH در اتانول تهیه شد. سپس، ۲/۸۵ میلی‌لیتر از آن به ۰/۱۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و هیدروالکی زنجبیل (۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها به‌تنهایی) اضافه شد. پس از مخلوط‌شدن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارگرفت و با استفاده از دستگاه پلیت ریدر با طول موج ۵۱۷nm بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورد مطالعه بر اساس فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به درصد به کمک رابطهٔ (۱) محاسبه شد.

$$RSA\ \% = ((AT - AS)/AT) \times 100 \qquad (1)$$

در این رابطه RSA فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، AT جذب شاهد و AS جذب هر یک از نمونه‌هاست.

غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC_{50}) غلظتی از نمونه است که به‌منظور مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH نیاز است. این مقدار بر اساس معادله‌های رگرسیون در رابطه‌های (۲) و (۳) به‌ترتیب برای عصاره‌های هیدروالکی و آبی زنجبیل محاسبه شد.

$$Y=0.072X+5.049 (R=0.983) \qquad (2)$$

$$Y=0.015X+3.523 (R=0.983) \qquad (3)$$

به‌منظور استحصال سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بیضه‌های بره‌های نژاد افشاری (سه الی پنج ماهه) از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری و در فلاسک در فاصلهٔ زمانی سه ساعت از کشتار به آزمایشگاه منتقل شد. نخست، بیضه‌ها سه‌بار با سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شستشو داده شد. به‌منظور زدودن تمام آلودگی‌ها الکل ۷۰ درصد روی بیضه‌ها اسپری و با سرم فیزیولوژی آبکشی شد. سپس، ۶ تا ۱۰ گرم از بافت بیضه جداشد و در معرض دو مرحله هضم آنزیمی قرارگرفت [۱]. به‌طور خلاصه، در مرحلهٔ نخست هضم آنزیمی چهار آنزیم هیالورونیداز (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کلاژناز (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و DNase (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. نمونه‌ها پس از اضافه‌کردن آنزیم‌ها به‌مدت ۴۰

دقیقه در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجهٔ سلیسیوس قرارگرفت. پس از انجام مرحلهٔ نخست از هضم آنزیمی، نمونه‌ها سه‌بار با DPBS شست‌وشو داده شد. مخلوط آنزیم‌های مرحلهٔ دوم شامل هیالورونیداز (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کلاژناز (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و DNase (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجهٔ سلیسیوس قرارگرفت.

به‌منظور خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، پس از عبور سلول‌ها از فیلترهای نایلونی ۸۰ و ۶۰ میکرومتر، به پتری‌دیش‌های پوشش داده شده با لکتین-BSA منتقل شد. برای تهیهٔ این پتری‌دیش‌ها، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لکتین با منشأ گیاه تاتوره (شرکت سیگما، L۲۷۶۶) در DPBS حل و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به پتری‌دیش‌های ۳۵ میلی‌متری افزوده شد. پس از انکوبه‌کردن به مدت دو ساعت در دمای اتاق، با استفاده از DPBS حاوی ۰/۶ درصد BSA پتری‌دیش‌ها شستشو داده و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، سلول‌ها به پتری‌دیش‌های پوشش داده شده با لکتین-BSA منتقل شد و به مدت شش ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجهٔ سلیسیوس قرارگرفت. در نتیجه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌صورت معلق در محیط کشت باقی ماند و سایر سلول‌ها به لکتین-BSA متصل شد. به‌منظور کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بستری از سلول‌های سرتولی تیمارشده با مایتومایسین-C تهیه شد. برای استحصال و کشت سلول‌های سرتولی پس از دو مرحله هضم آنزیمی که در بالا به آن اشاره کردیم، سلول‌های استحصال‌شده برای پنج پاساژ کشت داده شد. سلول‌های سرتولی به مدت سه ساعت در معرض مایتومایسین-C (۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرارگرفت تا تقسیمات میتوزی آن متوقف شود، ولی قادر به تولید فاکتورهای رشد و ایجاد محیط و بستر مناسب برای زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی باشد. از ۴×۱۰^{۴} سلول در هر سانتی‌مترمکعب به‌منظور تهیهٔ لایهٔ تغذیه‌کننده استفاده شد.

به‌منظور بررسی زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط حاوی غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی و هیدروالکلی زنجبیل (۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ویتامین E (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از آزمایش زنده‌مانی با استفاده از محلول MTT استفاده شد. این آزمایش روشی رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا و شکسته‌شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم انجام می‌شود. برای این منظور به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت به‌همراه ۵۰۰۰ سلول بنیادی اسپرماتوگونی اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض تیمارهای آزمایش قرارگرفت. سپس، به هر چاهک ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه شد و به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 با دمای ۳۷ درجهٔ سلیسیوس قرارگرفت. در طول مدت انکوبه‌کردن MTT با سیستم سوکسینات دهیدروژناز احیا شد که یکی از آنزیم‌های چرخهٔ تنفسی میتوکندری‌هاست. احیا و شکسته‌شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ و دستگاه اسپکتروفتومتر قابل‌تشخیص است. میزان رنگ تولیدشده با تعداد سلول‌های فعال از نظر متابولیک، رابطهٔ مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول است و باید قبل از رنگ‌سنجی با مادهٔ حلالی نظیر SDS به‌حالت محلول درآید [۱۶]. در نتیجه، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول SDS-HCl اضافه شد و به مدت ۱۴ ساعت در گرمخانه قرارگرفت. در نهایت، جذب نوری محلول به‌دست‌آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر بررسی شد.

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های

هیدروالکلی و آبی زنجبیل و ویتامین E بر تشکیل کلونی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های هیدروالکلی و آبی زنجبیل (۰، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، همچنین غلظت‌های مختلف ویتامین E (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شد.

به‌منظور استخراج mRNA، نخست، سلول‌ها به تیوپ‌های تیمارشده با DEPC منتقل و برای تشکیل پلیت با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده به هر تیوپ ۱ میلی‌لیتر RNA-PLUS اضافه و پس از ورتکس به‌مدت ۱ دقیقه، در دمای اتاق به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد و پس از تکان شدید به‌مدت ۱۵ دقیقه درون یخ قرارگرفت. تیوپ‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجهٔ سلیسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله، محتویات تیوپ‌ها به‌صورت سه فاز مشخص تشکیل شد. فاز رویی حاوی RNA بود که پس از جداسازی به تیوپ جدید منتقل و هم‌اندازهٔ آن از ایزوپروپانول استفاده شد. سپس، تیوپ‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. پس از این مرحله، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سلیسیوس سانتریفیوژ شد. پلیت تشکیل‌شده دو بار با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد با سرعت ۷۵۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سلیسیوس به‌مدت ۸ دقیقه شستشو شد. پس از خشک‌کردن پلیت در ۵۰ میکرولیتر آب تیمارشده با DEPC به‌صورت محلول درآمد.

نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آنزیم MMLV و آغازگر oligo-DT بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام پذیرفت و شامل بافر، dNTPs، Taq DNA polymerase، آغازگر پیشرو و پیرو بود. شرایط واکنش شامل واسرشتی در دمای ۹۴ درجهٔ سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه بود. پس از آن، برنامهٔ چرخشی (۳۲ چرخه) شامل ۹۴ درجهٔ سلیسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ویژهٔ اتصال آغازگر (بر اساس جدول ۱) به‌مدت ۳۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجهٔ سلیسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش در مرحلهٔ توسعه در دمای ۷۲ درجهٔ سلیسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید.

جدول۱. مشخصات آغازگرها

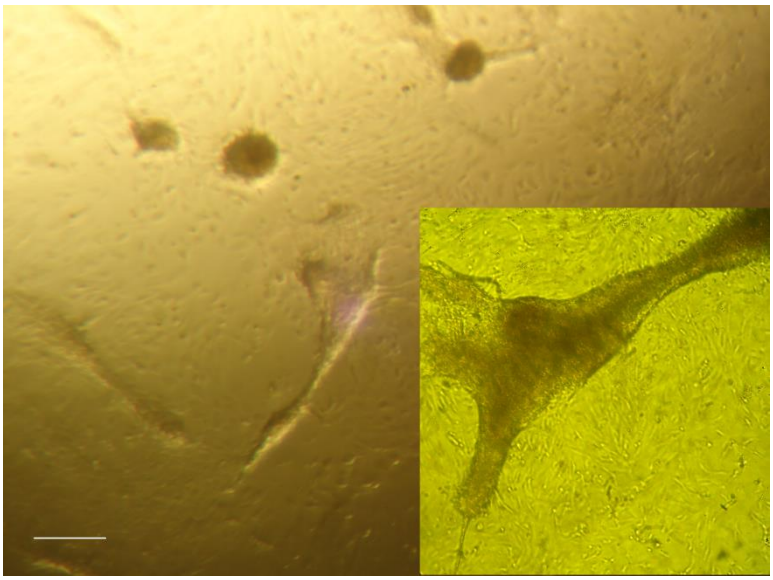
نام ژن	توالی	دمای اتصال	اندازه (bp)	شمارهٔ دسترسی
oct-4	F- 5' CGCCCTATGACTTGTGTGGA3' R- 5' TCGGCTCCAGCTTCTCCTT3'	۵۸	۲۰۱	GU997625.1
c-kit	F- 5' CCAAACCTGAACACCGACAG3' R- 5' CCATTCACCAGCCTGTCATG3'	۵۸	۲۵۰	JN165090.1
bcl2	F- 5' GATGACTTCTCTCGGCGCTA3' R- 5' GACCCCTCCGAACTCAAAGA3'	۶۲	۱۶۵	AY547260.1
bcl2l1	F- 5' CAGGCGATGAGTTTGAACTG 3' R- 5' TCAGGAACCAGCGGTTGAAG 3'	۶۲	۳۶۹	NM001077486.2
bax	F- 5' GTGAGACCTCTAACCCCACC3' R- 5' GGTCAGAGGTCATGAGGAGG3'	۶۲	۱۷۵	GU731063.1
β-actin	F- 5' ACCCAGCACGATGAAGATCA 3' R- 5' GTAACGCAGCTAACAGTCCG 3'	۶۲	۱۸۷	U39357.1

در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. عکسبرداری با دستگاه ژل داک صورت گرفت. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ طراحی و توسط شرکت سینا کلون سنتز شد.

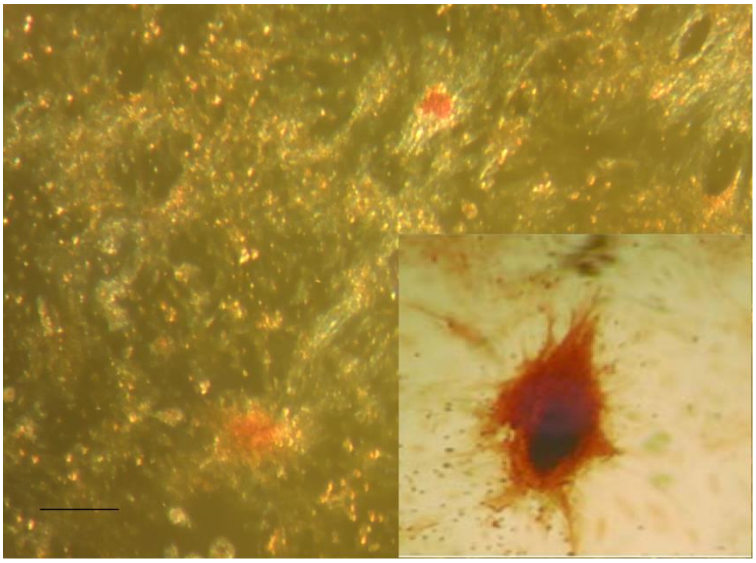
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۱۶ رویهٔ ANOVA تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $p<۰/۰۵$ مقایسه شد. سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شد.

نتایج و بحث

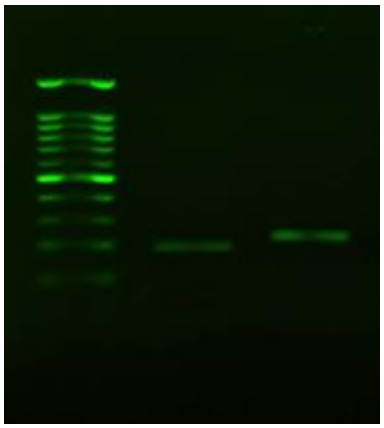
نتایج نشان داد سلول‌های استحصال‌شده از بیضهٔ بره‌های با سن ۳ تا ۵ ماهه قادر به تشکیل کلونی در حدود هفت روز پس از کشت اولیه بود و کلونی‌های تشکیل‌شده با پل‌هایی پس از روز دهم به یکدیگر متصل شد. این خصوصیت از ویژگی‌های این سلول‌هاست (شکل ۱). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با آلکالین فسفاتاز (به‌عنوان نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی) در شکل ۲ نمایش داده شده است. سلول‌های بنیادی تولیدشده پس از رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ جذب رنگ در این سلول‌هاست. همچنین، سلول‌های بنیادی تولیدشده قادر به بیان ژن‌های *oct-4* و *c-kit* بود. این ژن‌ها نشانگرهای اختصاصی در سلول‌های بنیادی است (شکل ۳). غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC_{50}) عصارهٔ هیدروالکلی و آبی زنجبیل به‌ترتیب ۶۲۴ و ۳۰۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل در حدود ۷۰ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای آزمایش DPPH را از خود نشان داد، عصارهٔ آبی زنجبیل در این غلظت تنها ۱۸/۵ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشت (شکل ۴).



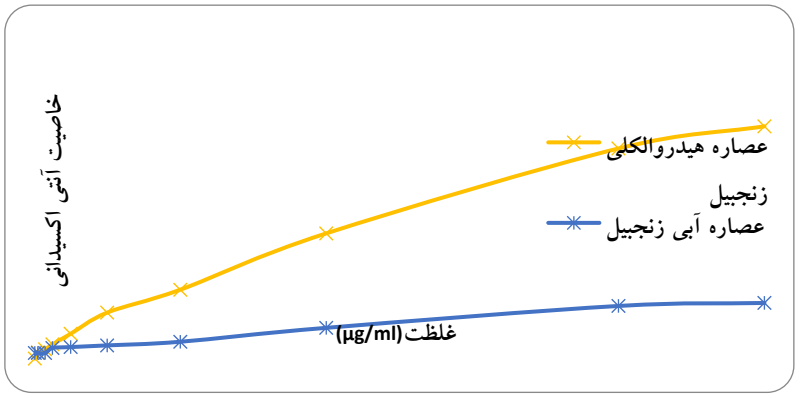
شکل ۱. تشکیل کلونی و پل‌های ارتباطی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Bar = 1 mm)



شکل ۲. رنگ‌آمیزی کلونی‌های سلول‌های بنیادی با استفاده از آلکالین فسفاتاز نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی (Bar = 1 mm)



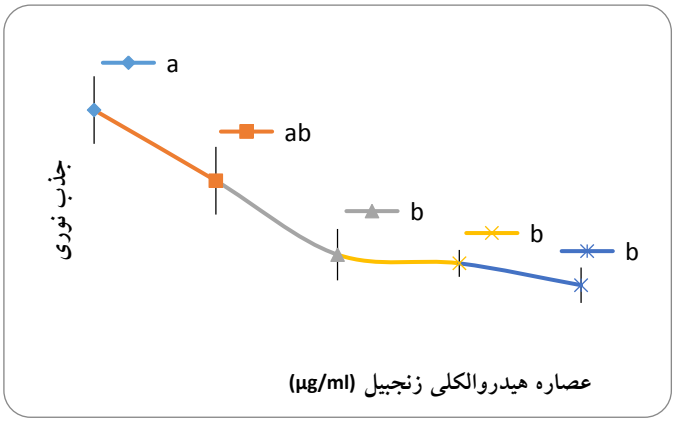
شکل۳. بیان ژن‌های *oct-4* و *c-kit* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند، از چپ به راست به‌ترتیب نشانگر (۱۰۰bp)، *oct-4* و *c-kit*



شکل ۴. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ هیدروالکلی و آبی زنجبیل

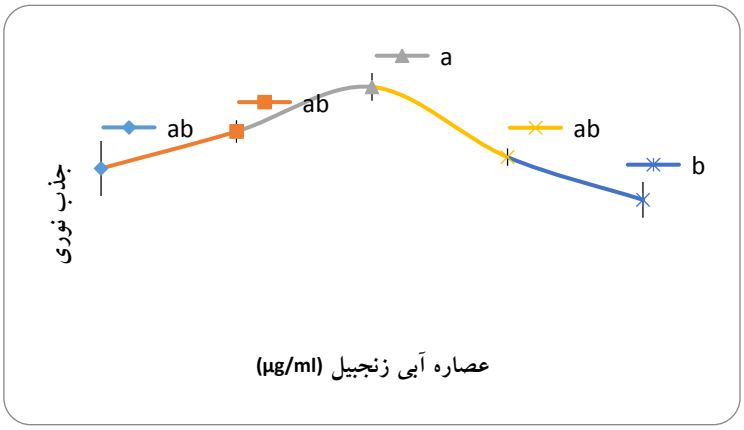
گزارش شده است که عصارهٔ زنجبیل مانع از تولید رادیکال‌های آزاد در بافت بیضهٔ موش صحرایی می‌شود و پراکسایش لیپیدی را با حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد و باعث افزایش تعداد اسپرم می‌شود [۱۲].

با افزایش غلظت عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل، زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کاهش یافت، به‌طوری که غلظت‌های بیش از ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مقایسه با گروه شاهد شد ($p<0/05$؛ شکل ۵). بیشترین زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هنگام استفاده از ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل مشاهده شد و از این نظر تفاوت معناداری با سطح ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشت ($p<0/05$؛ شکل ۶).



شکل ۵. اثر عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (میانگین± انحراف معیار)

a-b تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه معنادار است ($p<0/05$).

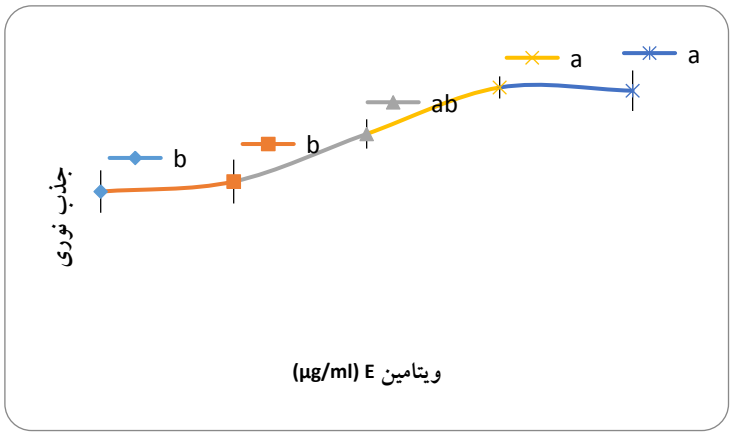


شکل ۶. اثر عصارهٔ آبی زنجبیل بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (میانگین ± انحراف معیار)

a-b تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه معنادار است($p<0/05$).

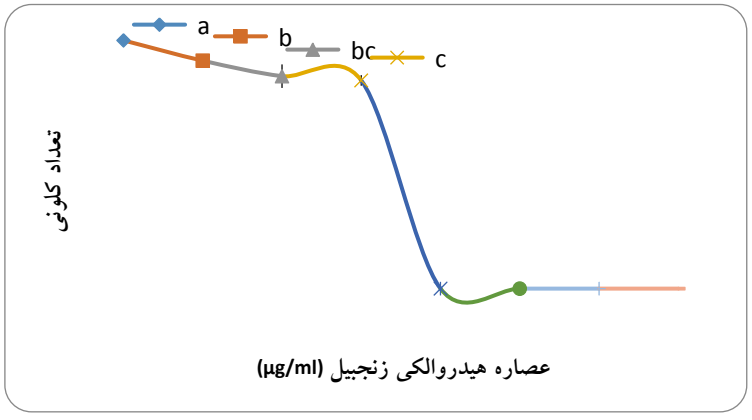
با افزایش غلظت ویتامین E زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افزایش یافت، به‌طوری که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین E به‌طور معناداری زنده‌مانی سلول‌های مورد مطالعه را در مقایسه با شاهد افزایش داد (p<۰/۰۵)، در حالی که اختلاف معناداری بین غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و شاهد مشاهده نشد (شکل ۷).

نتایج حاصل از غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل نشان داد با افزایش غلظت این عصاره تشکیل کلونی در سلول‌های بنیادی کاهش معناداری یافت (p<۰/۰۵) و در غلظت‌های مساوی و بیش از ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل تشکیل کلونی مشاهده نشد (شکل ۸).



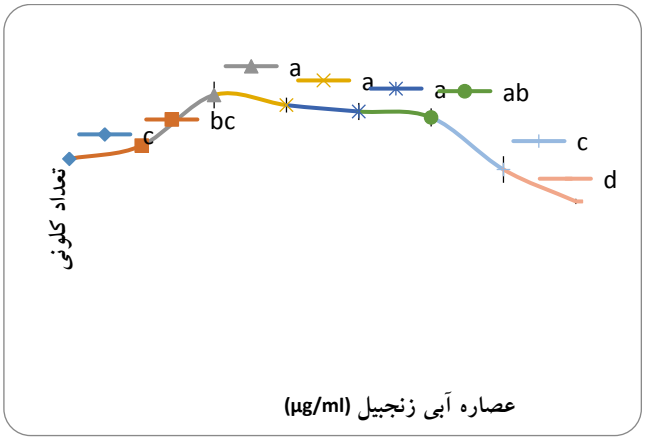
شکل ۷. اثر غلظت‌های مختلف ویتامین E بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (میانگین± انحراف معیار)

a-b تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه معنادار است (p<۰/۰۵).



شکل ۸. اثر عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل بر تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (میانگین ± انحراف معیار)

a-b تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه معنادار است (p<۰/۰۵).



شکل ۹. اثر عصارهٔ آبی زنجبیل بر تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (میانگین± انحراف معیار)

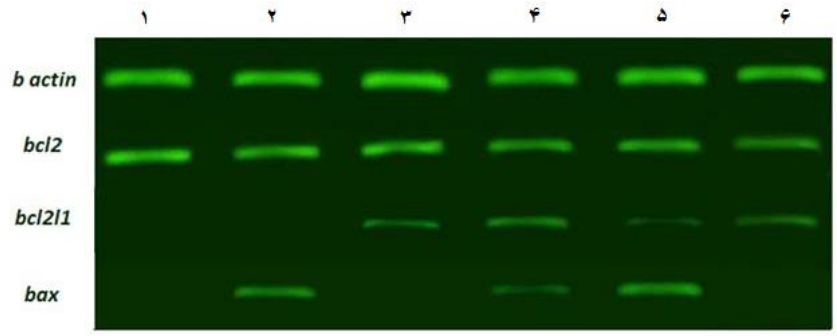
a-b تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه معنادار است (p<۰/۰۵).

زمانی که از غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی زنجبیل به‌منظور بررسی تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد، نتایج نشان داد غلظت‌های ۱۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معناداری با شاهد و سایر غلظت‌ها داشت (p<۰/۰۵؛ شکل ۹).

استفاده از غلظت‌های مختلف ویتامین E بر تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اثری نداشت و اختلاف معناداری بین غلظت‌های مختلف آن مشاهده نشد.

بر اساس نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های زنجبیل و ویتامین E بر تشکیل کلونی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز این سلول‌ها تحت غلظت‌های ۱۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل، غلظت‌های ۱۵۰، ۸۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل و غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین E بررسی شد. در این مطالعه از ژن‌های *bcl2* و *bcl2l1* به‌عنوان ژن‌های مؤثر در مهار آپوپتوز و از ژن *bax* به‌عنوان ژن پیش‌برندهٔ آپوپتوز استفاده شد. بیان ژن *β-actin* به‌عنوان ژن خانه‌بان در تمام تیمارهای مورد مطالعه یکسان بود. در خصوص ژن‌های مهارکنندهٔ آپوپتوز، نتایج نشان داد تفاوت در بیان ژن *bcl2* درتمام تیمارهای مورد مطالعه معنادار نبود، درحالی که ژن *bcl2l1* تنها در تیمارهای عصارهٔ آبی زنجبیل و ویتامین E بیان شد. در خصوص ژن *bax* به‌عنوان ژن پیش‌برندهٔ آپوپتوز، بیشترین بیان در تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل بود. پس از آن این ژن در تیمار عصارهٔ هیدروالکلی (۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل به‌ترتیب کاهش یافت و در سایر تیمارها مشاهده نشد (شکل ۱۰). نتایج نشان داد بیان ژن *bax* رابطهٔ معکوسی با تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد.

استفاده از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل باعث کاهش زنده‌مانی و تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و افزایش بیان ژن پیش‌برندهٔ آپوپتوز (*bax*) شد. در حالی که زنده‌مانی و تشکیل کلونی این سلول‌ها با استفاده از عصارهٔ آبی زنجبیل افزایش یافت، به‌طوری که غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بهترین نتیجه را بر زنده‌مانی و غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بهترین عملکرد را بر تشکیل کلونی داشت (شکل ۶ و ۹).



شکل ۱۰. بررسی بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز سلولی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی زنجبیل و ویتامین E

۱. شاهد،۲. ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل، ۳. ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل، ۴. ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل، ۵) ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل، ۶. ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E

اختلافی در بیان ژن‌های *bcl2* و *bcl2l1* به‌عنوان ژن‌های مهارکنندهٔ آپوپتوز در تیمارهای حاوی غلظت‌های ۱۵۰، ۸۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل مشاهده نشد، اگرچه غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان ژن *bcl2l1* را اندکی افزایش داد. با افزایش غلظت عصارهٔ آبی زنجبیل بیان ژن *bax* افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین بیان در تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی زنجبیل مشاهده شد.

در پژوهشی، با مطالعهٔ اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بر انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گزارش شد که بر اساس بیان ژن‌های *bax* و *bcl2*، نرخ آپوپتوز در زمان استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یافت. آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 و ازبین‌بردن خاصیت آنتی‌اکسیدانی ROS را دارند [۲]. همچنین، استفاده از آلفاتوکوفرول باعث کاهش نرخ آپوپتوز در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شده است. فعالیت پروتئین‌های خانوادهٔ Bcl2 از طریق فعالیت ژن‌های مؤثر در القای آپوپتوز (Bax) یا مهار آن (Bcl2) نقش اساسی در تنظیم آپوپتوز دارد. Bcl2 باعث ممانعت از مرگ آپوپتوزی در برخی سلول‌ها مانند لمفوسیت‌ها می‌شود. همچنین، Bcl2 مرگ سلول‌های زایای بدوی و سلول‌های بنیادی اووگونی را در دورهٔ رویانی تنظیم می‌کند. ژن Bax برای فعال‌شدن ژن‌هایی مؤثر است که به مرگ سلول ختم می‌شود [۳].

آثار حمایتی ویتامین E و گیاه زنجبیل بر سمیت القاشده با سیکلوفسفامید در دستگاه تولیدمثل موش‌های نر، پیش از شروع دورهٔ شیمی‌درمانی گزارش شده است [۱۴]. بررسی اثر حفاظتی عصارهٔ زنجبیل در برابر سمیت ناشی از بیس‌فنل‌آ بر بافت بیضهٔ موش‌های نژاد NMRI نشان داد که وزن بیضه، حجم بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز، قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی، تعداد کل اسپرماتیدها، اسپرماتوسیت‌ها، سلول‌های سرتولی و شاخص‌های اسپرم‌سازی در گروه بیس‌فنل‌آ در مقایسه با شاهد به‌طور معناداری کاهش یافت. احتمالاً زنجبیل آثار نامطلوب بیس‌فنل‌آ بر سیستم تولیدمثلی نر را کاهش می‌دهد [۱۵].

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان از غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی زنجبیل یا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین E به‌منظور بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند استفاده کرد. استفاده از عصارهٔ هیدروالکلی زنجبیل برای کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مناسب نیست.

منابع

[1]. Akbarinejad V, Tajik, P, Movahedin M and Youssefi R (2016) Effect of Removal of Spermatogonial Stem Cells (SSCs) from In Vitro Culture on Gene Expression of Niche Factors in Bovine. Avicenna Journal of Medical Biotechnology 8(3): 133-138.

[2]. Aliakbari F, Sedighi-Gilani MA, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, Yazdekhasti H and Abbasi M (2016) Improving the Efficacy of Cryopreservation of Spermatogonia Stem Cells by Antioxidant. Supplements Cellular Reprogramming18(2): 87-95.

[3]. Aliakbari F, Sedighi-Gilani MA, Yazdekhasti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, Izadyar F, Nejad EK, Khanezad M and Abbasi M (2016) Effects of antioxidants, catalase and a-tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology 28:1-6.

[4]. Andzi-Barhé T, Massala KK, LCO Engonga and Lebibi j (2015) Phytochemical studies, total phenolic and flavonoids content and evaluation of antiradical activity of the extracts of the leaves from *Dischistocalyx sp*. (Acanthacées). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 3(6): 174-178.

[5]. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring H, Mattheus U, Mack A, Wagner H, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert K, Stenzl K and Skutella T (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature 456: 344-349.

[6]. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S and Shinohara T (2003) Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biology of Reproduction 69(2): 612-616.

[7]. Kofman AE, McGraw MR and Payne CJ (2012) Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells Aging. 4(4): 279-89.

[8]. Koruji M, Azizi H, Shahverdi A and H Baharvand (2010) Mouse and Human Spermatogonial Stem Cells. Yakhteh Medical Journal 12(2): 147-158. [in Persian]

[9]. Kubota H, Mary RA and Ralph LB (2004) Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(47): 16489-16494.

[10]. Mazloom Z, Moosavi SFZ, Shabbidar S, Aghasadeghi K and ARF Rajae (2008). The impact of vitamin E on glycemic control and lipid profiles in type 2 diabetes patients. Ofogh-e-Danesh GMUHS Journal 14(3): 64-72. [in Persian]

[11]. Mazochi T, Khamehchyan T and Mousavi SGA (2010) Effect of Ascorbic Acid on Expression of Bax and Bcl-2 Genes and Development of Preanterolate Follicles Isolated from Cryopreservative and Non Cryopreservative Ovaries in Culture. Southern Medicine Quarterly 13(3): 151-162. [in Persian]

[12]. Morakinyo AO, Adeniyi OS and Arikawe AP (2008) Effects of zingiber officinale on reproductive functions in the male rat. African Journal Biomedical Research 11: 329-34.

[13]. Oatley JM, Jerry JR and Derek JM (2004)

Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. Biology of Reproduction 71(3): 942-947.

[14]. Sabik LME and Abd El-Rahman SS (2009) Alpha-tocopheroland ginger are protective on Cyclophosphamide induced gonadal toxicity in adult male albino rats. Basic and Applied Pathology 2(1): 21-9.

[15]. Shariat zadeh SMA, Hasanvand A and H Falah hosseini (2015) Protective Effect of Ginger Extract (*Zingiber officinalis*) on the Toxicity of Bisphenol A on NMRT Rat Testicular Tissue. Medicinal Plants Quarterly 15(2): 151-163 [in Persian]

[16]. Tiwari RP (2009) Laboratorytechniques in microbiology & biotechnology. Abhishek Publications. 189 p.

[17]. Zingg JM (2007) Vitamin E: An overview of major research directions. Molecular Aspects of Medicine 28: 400-22.

Journal of
Animal Production
(College of Abouraihan – University of Tehran)
Vol. 19 ■ No. 2 ■ Summer 2017

The effect of ginger compared with vitamin E on *in Vitro* culture of Spermatogonial Stem Cells (SSCs) of Afshari sheep

Elham Beyranvand[1], Mohammad Reza Sanjabi[2*], Mohammad Zandi[3], Hamideh Ofoghi[4]

1. M.Sc., Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
2. Associate Professor, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
3. Assistant Professor, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
4. Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran

Received: October 31, 2016 **Accepted: December 19, 2016**

Abstract

The goal of this paper was to study the effect of ginger extracts and vitamin E on the performance of ovine Spermatogonial Stem Cells (SSCs). For this purpose, different concentrations of hydro and hydroethanolic extracts of ginger and vitamin E on viability, colony formation and expression of inhibiting (*bcl2ll* and *bcl2*) and inducing (*bax*) apoptosis genes were studied. Spermatogonial Stem Cells (SSCs) were extracted from lamb testes with slaughterhouse origin using two steps enzymatic digestion method and enrichment by differential plating method. The characterization of SSCs was carried by alkaline phosphatase staining and expression of *c-kit* and *oct-4* genes. Results have shown that the viability of SSCs was decreased significantly by using more than 800 µg/mL of hydroethanolic extract of ginger, in comparision with control group ($p<0.05$), while 800 µg/mL of hydro extract of ginger has been resulted to be the most viable cells, and increasing the vitamin E concentration (upto 100 µg/mL) resulted to be the most survival of SSCs. Expression of *bax* in effective concentration of hydro extract of ginger (150 µg/mL) and vitamin E (50 µg/mL) was decreased, but hydroethanolic extract of ginger (150 µg/mL) and higher concentration of hydro extract of ginger (more than 800 µg/mL) increased the expression od *bax*. Based on the results of current study, 150 µg/mL of aqueous extract of ginger or 50 µg/mL of vitamin E can be used to improve ovine SSC culture system.

Keywords: antioxidant, apoptosis, ginger, spermatogonial stem cells, vitamin E.

Email: msanjabii@gmail.com