Original Article

Effect of Ghrelin on Viability, Proliferation, and Apoptosis in Human Granulosa Cells, In Vitro

Faeze Astine Goorabi[1], *Farzaneh Nazari Serenjeh*[1], *Mohammad Hadi Bahadori*[2*]

[1]*Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.*

[2]*Cellular & Molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Mohammad Hadi Bahadori;** Cellular & molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran;

Email: bahadori@gums.ac.ir

Received: 22 Sep, 2018
Accepted: 26 Jan, 2019

Abstract

Background and Objectives: Ghrelin is a peptide hormone that was initially derived from stomach and introduced as an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. Ghrelin is fundamentally involved in regulation of nutrition and energy homeostasis in the body. It has been shown that ghrelin has an important role in fertility in women. The purpose of the present study was to assess the effect of ghrelin on viability, growth, and apoptosis of human granulosa cells culture *in vitro*.

Methods: In this experimental-laboratory study, granulosa cell samples were collected from patients with tubal or male infertility factors, who were treated with IVF or ICSI for the first time. The cells were cultured in a medium containing DMEM-F12 with FBS 10% and penicillin 1% and streptomycin, then, ghrelin was tested in cells at concentrations of 100, 250, 500, 1000, and 10000 pm for 24 hours. The MTT method was used to detect the viability and growth of the cells and hoechst staining was used for detection of apoptosis.

Results: Treatment of granulosa cells with ghrelin dose-dependently increased the viability and growth of the cells. Significant growth was observed with 500 and 1000 pm at the significance level of $p<0.05$ and with 10000 pm at the significance level of $p<0.001$. No significant effect was observed at the concentrations of 100 and 250 pm. Also, ghrelin treatment at the concentrations of 100, 500, 1000 pm decreased apoptosis in these cells.

Conclusion: The results of the current study revealed that ghrelin administration can increase growth and viability in granulosa cells, and in contrast, decrease apoptosis in these cells.

Keywords: Ghrelin; Granulosa cells; Cell proliferation.

DOI: 10.29252/qums.13.2.11

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره دوم، اردیبهشت ۹۸
صفحه ۱۱ الی ۱۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر گرلین بر روی بقای رشد و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای انسانی در محیط کشت

فائزه آستینه گورابی[۱]، فرزانه نظری سرنجه[۱]، محمدهادی بهادری[۲*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
محمدهادی بهادری؛ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
bahadori@gums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۳۱
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۶

چکیده

زمینه و هدف: گرلین یک هورمون پپتیدی است که اولین‌بار از معده استخراج شد و به‌عنوان لیگاند درون‌زاد گیرنده محرک هورمون رشد شناسایی گردید. گرلین اساساً در تنظیم تغذیه و هومئوستازی در بدن نقش دارد. مشخص شده است گرلین در زنان نیز نقش مهمی در باروری ایفا می‌کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر گرلین بر روی بقا، رشد و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای انسانی در محیط کشت انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، نمونه سلول‌های گرانولوزای انسانی از بیماران دارای فاکتورهای ناباروری مردانه یا لوله‌ای که برای اولین‌بار تحت درمان IVF یا ICSI قرار می‌گرفتند، جمع‌آوری شد. سلول‌ها در محیط کشت حاوی DMEM-F12 به‌اضافه FBS10%، پنی‌سیلین ۱٪ و استرپتومایسین کشت داده شدند، سپس گرلین در غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ پیکومولار به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول‌ها آزمایش شد. از روش MTT برای تشخیص بقای رشد سلول‌ها و از رنگ‌آمیزی Hoechst برای تشخیص آپوپتوز استفاده گردید.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های گرانولوزا با گرلین به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش رشد و بقای سلول‌ها گردید. رشد معنی‌دار در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پیکومولار با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ و ۱۰۰۰۰ پیکومولار با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۰۱$ مشاهده گردید. در غلظت‌های ۱۰۰و ۲۵۰ پیکومولار، اثر معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین گرلین در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ پیکومولار، آپوپتوز را در این سلول‌ها کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد گرلین می‌تواند رشد و بقا را در سلول‌های گرانولوزا افزایش و در مقابل آپوپتوز را در این سلول‌ها کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: گرلین؛ سلول گرانولوزای؛ رشد سلول.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Astine Goorabi F, Nazari Serenjeh F, Bahadori MH. Effect of ghrelin on viability, proliferation, and apoptosis in human granulosa cells, in vitro. Qom Univ Med Sci J 2019;13(2):11-18. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

گرلین، یک هورمون پپتیدی ۲۸ اسیدآمینه‌ای است که اولین‌بار از سلول‌های معده استخراج شد و به‌عنوان لیگاند درون‌زاد گیرنده ترشحی هورمون رشد (GHS-R) شناسایی گردید (۱). گیرنده‌های گرلین متعلق به خانواده گیرنده‌های مرتبط با G- پروتئین بوده و دارای دو فرم GHS-R1a و GHS-R1b می‌باشند. این گیرنده‌ها در بافت‌های مختلف بیان می‌شوند (۱). گرلین با داشتن عملکردی چندگانه، علاوه بر کنترل جذب غذا و تعادل انرژی در بدن، نقش مهمی در تنظیم ترشح هورمون رشد ((GH، تنظیم آزادسازی هورمون‌های انسولین، آدرنوکورتیکوتروپیک (ACTH) و پرولاکتین دارد، همچنین بر عملکردهای فیزیولوژیکی مانند خواب، حرکات معدی، فعالیت قلبی - عروقی، رفتار و تکثیر سلولی تأثیرگذار است (۲-۶). از طرفی، این هورمون با تأثیر بر ساخت و ترشح هورمون‌های جنسی و تنظیم عملکرد تخمدان، در تولیدمثل و باروری نقش اساسی ایفا می‌کند (۷-۸). بیان mRNA گیرنده گرلین در سلول‌های اپی‌تلیوم سطحی تخمدان تأیید شده است (۹). بیان این گیرنده‌ها هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین در تخمک‌های گوسفند، همچنین در رویان بلاستولایی حاصل از تخمک لقاح‌یافته در in vitro مشاهده شده است (۱۰).

فولیکول‌های تخمدانی، حاوی تخمک‌هایی هستند که توسط مجموعه‌ای از سلول‌های گرانولوزا احاطه شده‌اند. رشد فولیکول‌های تخمدانی، تمایز سلول‌های گرانولوزا، بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری، از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر باروری موفق، می‌باشد (۱-۲). همچنین سلول‌های گرانولوزا از طریق فعالیت‌های آندوکراین و سیگنال‌رسانی، در رشد و بلوغ تخمک مؤثرند و تکوین غیرطبیعی سلول‌های گرانولوزا و ناکارآمدی آن‌ها ازجمله علل ناباروری محسوب می‌گردد (۱۱-۱۶). مطالعات نشان داده‌اند گرلین بر روی تکثیر سلول تخمدانی اثر مستقیم دارد و سبب افزایش تکثیر سلولی در تخمدان‌های خوک (۱۷)، جوجه (۱۸) و خرگوش (۱۹) می‌شود. در سلول‌های گرانولوزا و سراسر دیواره‌های فولیکولار تجزیه‌شده تخمدان جوجه، درمان با گرلین منجر به تحریک مارکرهای تکثیر سلولی مانند PCNA (آنتی‌ژن تکثیرکننده هسته) که یک مارکر فاز S در چرخه سلولی است و Cyclin B1 به‌عنوان مارکر فاز G2 می‌شود (۱۸-۲۱). علاوه بر این، بیان PCNA در سلول‌های گرانولوزای خرگوش تیمارشده با گرلین در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد (۱۹). از طرفی، در کشت همزمان سلول‌های گرانولوزا و تکا، گرلین خارجی به‌طور معنی‌داری تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد (۱۸). مطالعات متعدد نشان داده‌اند گرلین تکثیر سلول تخمدانی را تحریک کرده که این یک فرآیند مهم در عملکرد تخمدان محسوب می‌شود؛ زیرا آزادسازی تخمک‌ها و تولید هورمون‌ها در روند باروری زنان ضروری است (۱۷). از طرف دیگر، در تخمدان طی دوره نوزادی پس از تولد، مرگ سلولی به‌عنوان بخشی از تکوین طبیعی تخمدان زیاد اتفاق می‌افتد. گرلین اثرات ضدآپوپتوزی در تخمدان دارد؛ به‌عنوان‌مثال در سلول‌های تخمدان خوک، گرلین از آپوپتوز سلولی به‌وسیله کاهش فعالیت کاسپاز-۳ (Caspase-3) و قطعه‌قطعه شدن DNA جلوگیری می‌کند (۱۷). در سلول‌های گرانولوزای تخمدان جوجه نیز گرلین بیان مارکرهای آپوپتوز مانند Caspase-3، bax و bcl2 را کاهش می‌دهد (۱۸). نتایج مطالعات پیشین نشان داده است گرلین به‌وسیله تنظیم اثرات آپوپتوزی به‌عنوان یک فاکتور بقا در سلول‌های تخمدانی عمل می‌کند (۱۹)؛ بنابراین با توجه به اینکه تحقیقات در زمینه نقش گرلین در بقا و رشد سلول‌های گرانولوزا، بر روی حیوانات انجام شده است، در مطالعه حاضر اثرات این نورون بر روی بقا، رشد و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای انسانی در محیط کشت، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی پس از کسب رضایت کتبی آگاهانه، سلول‌های لوتئال گرانولوزا ((GLCs) از مایع فولیکولار ۴۶ زن (در سنین کمتر از ۴۰ سال) جدا شد. این افراد ناباروری لوله‌ای یا فاکتور مردانه داشتند و برای اولین‌بار تحت درمان IVF یا ICSI قرار می‌گرفتند. سلول‌های گرانولوزای جمع‌آوری‌شده به‌صورت تک‌لایه در فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌مترمربع حاوی (Dulbecco's Modified Eaegle's Medium) (DMEM-F12)، به‌اضافه FBS10% (Fetal Bovine Serum)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ مول برمیلی‌لیتر) در محیط مرطوب،

International License Creative Commons Attribution License 4.0

دی‌اکسیدکربن ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. گرلین از شرکت Abnova خریداری و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس جهت تهیه غلظت‌های مختلف با استفاده از محیط کشت رقیق شد.

برای تشخیص اثر گرلین بر روی بقای سلول‌های گرانولوزا، از روش MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium) استفاده گردید. سلول‌های گرانولوزا درون پلیت ۹۶ خانه‌ای با تراکم 10^4 سلول در هر چاهک، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محیط مرطوب و دی‌اکسیدکربن ۵٪ انکوبه شدند، سپس سلول‌های معلق برداشته شدند و به سلول‌های چسبیده به کف پلیت، محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰ پیکومولار، گرلین اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط قبلی انکوبه شدند. در ادامه، سلول‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (Carl Roth) ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر در PBS) به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها در تاریکی به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند، سپس محیط رویی حاوی MTT هر چاهک برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا کریستال‌های فرومازان حل شوند. جذب نوری (OD) هر چاهک در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA-reader خوانده شد و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر در مورد هر غلظت محاسبه گردید:

توانایی زیستی سلول‌ها=OD نمونه/OD کنترل×۱۰۰

تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد.

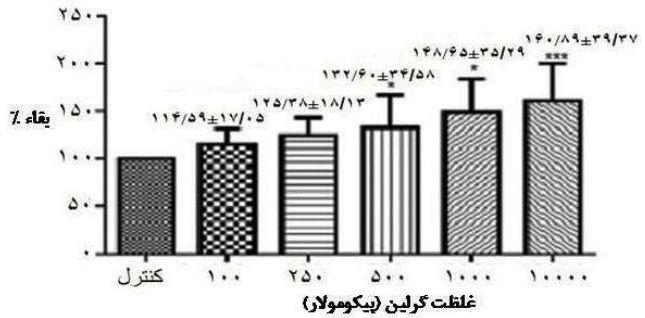
(به‌منظور شناسایی سلول‌هایی که متحمل آپوپتوز شده‌اند از روش رنگ‌آمیزی Hoechst 33342 استفاده می‌شود. سلول‌هایی با هسته‌های جمع‌شده و فلورسنس روشن ناشی از کروماتین فشرده، از ویژگی‌های سلول‌های آپوپتوتیک است.)

سلول‌های گرانولوزای تحت درمان با گرلین و بدون گرلین در پلیت ۹۶ خانه‌ای با فرمالین ۱۰٪ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شده، سپس سلول‌ها با Hoechst 33342 (دوز یک میکروگرم برمیکرولیتر) رنگ‌آمیزی و در محیط تاریک در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند. درادامه، هسته‌های رنگ‌آمیزی‌شده به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنس اینورت مشاهده گردید (Olympus, IX71).

تمامی آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام گرفت. داده‌ها به کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری، $p<0/05$ تجزیه‌وتحلیل شدند. از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ برای رسم نمودار استفاده گردید و داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند.

یافته‌ها

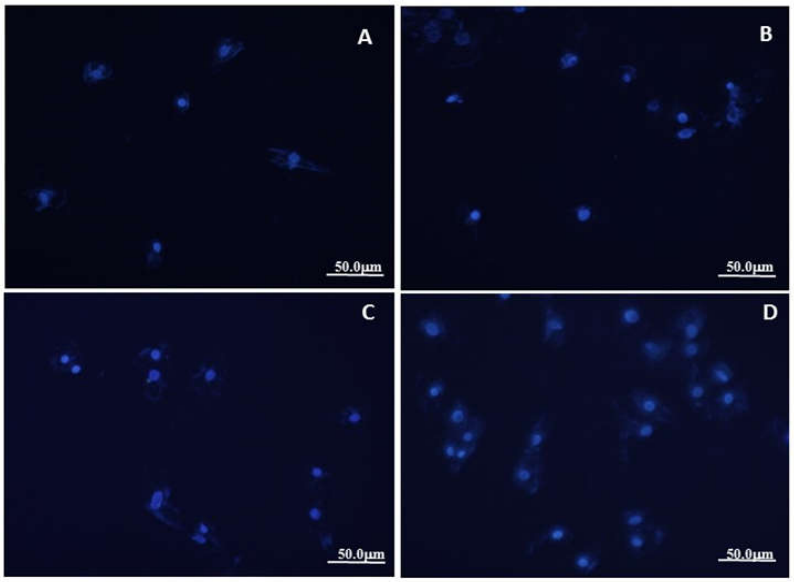
در این مطالعه، اثر مقادیر مختلف گرلین به روش MTT بر روی بقای سلول‌های گرانولوزای انسان در محیط کشت موردبررسی قرار گرفت. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد گرلین به‌صورت وابسته به دوز، سبب افزایش تکثیر سلول‌های گرانولوزای انسانی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین گرلین تکثیر سلول‌های گرانولوزای انسانی را در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پیکومولار با سطح معنی‌داری $p<0/05$ و در غلظت ۱۰۰۰۰ پیکومولار با سطح معنی‌داری $p<0/001$ افزایش داد و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ پیکومولار اثر معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار).



نمودار: آنالیز MTT؛ تأثیر مقادیر مختلف گرلین (۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰ پیکومولار) بر روی بقا و رشد سلول‌های گرانولوزای انسانی
*** با سطح معنی‌داری $p<0/05$ و *** سطح معنی‌داری $p<0/001$ در مقایسه با گروه کنترل.**

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در این مطالعه بررسی اثرات مقادیر مختلف گرلین بر روی میزان آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزای انسانی با استفاده از رنگ‌آمیزی Hoechst نشان داد گرلین سبب کاهش آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزای انسانی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین گرلین در مقادیر ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰ پیکومولار، آپوپتوز را در سلول‌های گرانولوزا کاهش داد (شکل).



شکل: رنگ‌آمیزی Hoechst هم سلول‌های زنده و هم سلول‌های آپوپتوزی را رنگ می‌کند. سلول‌های آپوپتوزی با فلوئورسنس روشن که نتیجه کروماتین فشرده است، مشخص شده است A) گروه کنترل، B) گرلین (۱۰۰ پیکومولار)، C) گرلین (۵۰۰ پیکومولار)، D) گرلین (۱۰۰۰ پیکومولار).

بحث

نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند گرلین به‌عنوان یک پیامبر، ارتباطات درون‌سلولی را میانجیگری می‌کند و دارای اثرات اندوکراین، پاراکراین و اتوکراینی است. گرلین در مایع تخمدانی یافت می‌شود و گیرنده‌های آن در سلول‌های سوماتیک و فولیکولار در سطح تخمک، سلول‌های گرانولوزای لوتئینی و سلول‌های لوتئال جوان، پیر و بالغ وجود دارد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت گرلین یکی از فاکتورهای داخل تخمدانی بوده که بر فولیکوژنز تأثیرگذار است (۲۲). از طرفی، گرلین با برخی اختلالات متابولیک و باروری مرتبط است؛ به‌عنوان‌مثال در زنان برخی نشانگرهای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (تستوسترون پلاسما، لپتین، مقاومت انسولین) به‌صورت منفی در ارتباط با سطوح گرلین پلاسما هستند؛ درحالی‌که برخی نشانگرها بعد از درمان با گرلین کاهش می‌یابند (۲۳)؛ لذا در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف گرلین بر روی بقا، رشد و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای انسانی در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل از تست MTT نشان داد گرلین تکثیر سلول‌های گرانولوزای انسانی را در مقادیر ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پیکومولار ($p<۰/۰۵$) و ۱۰۰۰۰ پیکومولار ($p<۰/۰۰۱$) به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد، اما افزایش رشد در دوزهای ۱۰۰ و ۲۵۰ پیکومولار، معنی‌دار نیست. همچنین در مورد اثر گرلین بر روی آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا، رنگ‌آمیزی Hoechst نشان داد گرلین منجر به کاهش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای انسانی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود.

گرلین نقش مهمی در اعمال مختلف فیزیولوژیکی برعهده دارد. همان‌طور که در مقدمه ذکر گردید گیرنده‌های گرلین بر سطح سلول‌های مختلف بدن بیان می‌شوند. در سراسر تخمدان، سطح فولیکول‌ها و اووسیت‌های موجود در آن، گیرنده‌های $GHS\text{-}R_{1a}$ قابل‌مشاهده هستند. (۲۴-۲۵). Sirotkin و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند گرلین و گیرنده‌های GHS-R در تخمدان جوجه بیان می‌شوند و بیان برخی از مارکرهای تکثیر و آپوپتوز سلول تخمدانی را تنظیم می‌کنند.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

اثر تحریکی غلظت‌های مختلف گرلین (دوز ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم برمیلی‌لیتر) بر روی سطوح PCNA (مارکر فاز G1 و فاز S چرخه سلولی) و Cyclin B1 (مارکر فاز G2) در سلول‌های گرانولوزا، نشان داد گرلین می‌تواند آغازکننده تکثیر سلول‌های تخمدانی باشد. این مشاهدات با نتایج مطالعات پیشین که نشان دادند گرلین بر روی میزان تکثیر چندین نوع سلول غیرتخمدانی مانند سلول‌های آدرنوکورتیکال، سلول‌های آدنوکارسینومای پانکراس، آدیپوسیت‌ها و کاردیومیوسیت اثرات تحریکی دارد، همخوانی داشت (۱۸).Sirotkin and Meszarson در مطالعه‌ای (سال ۲۰۱۰) با بررسی اثر گرلین بر روی سلول‌های گرانولوزای خوک، نشان دادند این هورمون تحریک‌کننده تکثیر و بازدارنده آپوپتوز در این سلول است؛ بنابراین می‌تواند تحریک‌کننده رشد و توسعه فولیکولار باشد (۲۰).

خردمند و همکاران نیز در سال ۱۳۹۳، اثر مستقیم گرلین بر روی عملکرد تخمدان موش صحرایی را نشان دادند و مسیرهای جدیدی برای اثرات تکثیری و ضد آپوپتوزی این هورمون بر روی سلول‌های تخمدانی موش صحرایی شناسایی کردند. همچنین آن‌ها نشان دادند گرلین از طریق جلوگیری از بیان Bax (پروتئین پروآپوپتوتیک سیتوپلاسمی) و افزایش سطح بیان Bcl2 (تنظیم‌کننده‌های مهم آپوپتوز) سبب افزایش بقای سلولی می‌شود (۲۱).Gupta و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بررسی اثر مقادیر مختلف گرلین (دوز ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم برمیلی‌لیتر) بر روی سلول‌های گرانولوزای جداشده از فولیکول تخمدانی بوفالو، سلول‌های گرانولوزا را در غلظت‌های متفاوت گرلین به مدت ۲ روز کشت دادند که نتایج به‌دست‌آمده نشان داد گرلین سبب مهار ترشح E2، مهار بیان آروماتاز و کاهش آپوپتوز از طریق کاهش Bax شده و تکثیر سلولی را با افزایش بیان PCNA افزایش می‌دهد (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر توسط Rak-Mardyla و همکاران (سال ۲۰۱۰) بر روی رده سلول‌های JEG-3 جفتی، مشخص گردید گرلین در مقادیر ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ پیکوگرم برمیلی‌لیتر، تکثیر سلولی را در این سلول‌ها تحریک و فعالیت Caspase-3 را به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز، کاهش می‌دهد (۲۴). Huafang YU و همکاران (سال ۲۰۱۳) نیز در مطالعه خود مشخص کردند گرلین تکثیر سلول‌های IEC-6 را از طریق مسیر ERK1/2 تحریک کرده و سبب تغییر و تبدیل سلول‌های روده‌ای از طریق تأثیر بر تکثیر سلولی می‌شود (۲۵). در این راستا، Chung و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند گرلین تکثیر سلول‌های NSCs (Neural Stem cells) هیپوکامپ موش صحرایی بالغ را از طریق بیان ژن‌های دخیل در چرخه سلولی مانند PCNA و CDC2 که برای میتوز ضروری هستند، افزایش می‌دهد (۲۷).

استفاده از روش Alamar Blue برای تشخیص تکثیر سلولی نیز نشان داده است گرلین در دوزهای ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ پیکوگرم برمیلی‌لیتر، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد. همچنین گرلین در دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ پیکوگرم برمیلی‌لیتر، فعالیت Caspase-3 را به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز و قطعه‌قطعه شدن DNA را کاهش می‌دهد؛ بنابراین کاهش مارکرهای آپوپتوز در راستای افزایش تکثیر سلولی، حاکی از افزایش بقای سلولی تحت‌تأثیر این هورمون می‌باشد (۱۷).

به‌طورکلی نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات متعدد، حاکی از فعالیت تحریکی گرلین بر روی تکثیر فعالیت بازدارندگی این هورمون بر روی آپوپتوز در انواع مختلف سلول‌ها است. در این راستا، در تمامی مطالعات انجام‌شده، گرلین تکثیر سلولی را افزایش و به‌موازات آن آپوپتوز را در این سلول‌ها کاهش داده است. تفاوت در تأثیر مقادیر مختلف این نورون احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع سلول‌های موردبررسی است. در مطالعه حاضر همسو با مطالعات پیشین، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد گرلین اثرات تکثیری و آنتی‌آپوپتوتیک بر روی سلول‌های گرانولوزای انسانی دارد و اثر این هورمون بر روی تکثیر سلولی و رشد در راستای اثر بازدارندگی این هورمون بر روی آپوپتوز سلولی است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات گرلین بر تکثیر سلول‌ها و جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های گرانولوزا به دلیل مفید بودن سلول‌های گرانولوزا برای باروری بهتر و بهبود بخشیدن به کیفیت تکوین جنین، نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند در درمان اختلالات ناباروری موردتوجه قرار گیرد.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کارکنان مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

کد ارکید نویسندگان:

Orcide Code: Faeze Astine Goorabi; 0000-0002-4585-9498.
Orcide Code Farzaneh Nazari-Serenjeh; 0000-0001-7278-3655.
Orcide Code: Mohammad Hadi Bahadori;: 0000-0001-9840-0229.

References:

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999;402(6762): 656-60. PubMed

2. Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr Rev 2004;25(3):426-57. PubMed

3. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes 2001;50(4):707-9. PubMed

4. Gualillo O, Lago F, Gomez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin, a widespread hormone: Insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. FEBS Lett 2003;552(2-3):105-9. PubMed

5. Korbonits M, Grossman AB. Ghrelin: Update on a novel hormonal system. Eur J Endocrinol 2004;151(Suppl 1):S67-S70. PubMed

6. Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GH. Ghrelin - not just another stomach hormone. Regul Pept 2002;105(2):75-81. Link

7. Szczepankiewicz D, Skrzypski M, Pruszynska-Oszmalek E, Zimmermann D, Andralojc K, Kaczmarek P, et al. Importance of ghrelin in hypothalamus-pituitary axis on growth hormone release during normal pregnancy in the rat. J Physiol Pharmacol 2010;61(4):443-9. PubMed

8. Sirotkin AV, Pavlova S, Tena-Sempere M, Grossmann R, Jimenez MR, Rodriguez JM, et al. Food restriction, ghrelin, its antagonist and obestatin control expression of ghrelin and its receptor in chicken hypothalamus and ovary. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2013;164(1):141-53. PubMed

9. Gaytan F, Morales C, Barreiro M, Jeffery P, Chopin LK, Herington AC, et al. Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. J Clin Endocrinol Metab 2005;90(3):1798-804. PubMed

10. Du C, Li H, Cao G, Xilingaowa, Wang C, Li C. Expression of the orexigenic peptide ghrelin and the type 1a growth hormone secretagogue receptor in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced in vitro. Reprod Domest Anim 2010;45(1):92-8. PubMed

11. Danforth DR. Endocrine and paracrine control of oocyte development. Am J Obstet Gynecol 1995;172(2):747–52. PubMed

12. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor (s) secreted by the oocyte. Dev Biol 1990;138(1):16–25. PubMed

13. Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ. Developmental pattern of the secretionof cumulus expansion-enabling factor bymouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. Dev Biol 1990;140(2):307–17. PubMed

International License Creative Commons Attribution License 4.0

14. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci 2004;82–83:431-46. PubMed

15. Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. Semin Reprod Med 2009;27(1):32-42. PubMed

16. Rak A, Gregoraszczuk EL. Modulatory effect of ghrelin in prepubertal porcine ovarian follicles. J Physiol Pharmacol 2008;59(4):781-93. PubMed

17. Sirotkin A, Grossmann R, Maria-Peon M, Roa J, Tena-Sempere M, Klein S. Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. Mol Cell Endocrinol 2006;257-258:15-25. PubMed

18. Tilly JL, Kowalski KL, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. Endocrinology 1991;129(5):2799-801. PubMed

19. Sirotkin AV, Meszarosova M. Comparison of effects of leptin and ghrelin on porcine ovarian granulosa cells. Domest Anim Endocrinol 2010;39(1):1-9. PubMed

20. Kheradmand A, Roshangar L, Taati M, Sirotkin AV. Morphometrical and intracellular changes in rat ovaries following chronic administration of ghrelin. Tissue cell 2009;41(5):311-17. PubMed

21. Gupta M, Dangi SS, Singh G, Sarkar M. Expression and Localization of ghrelin and its reseptore in Ovarian Follicles during different stages of development and the modulatory effect of ghrelin on granulosa cells function in buffalo. Gen comp endocrinol 2015;210:87-95. PubMed

22. Fusco A, Bianchi A, Mancini A, Milardi D, Giampietro A, Cimino V et al. Effects of ghrelin administration on endocrine and metabolic parameters in obese women with polycystic ovary syndrome. J Endocrinol Invest 2007;30(11):948-56. PubMed

23. Caminos, JE, Tena-Sempere M, Gayatan F, Sanches-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. Endocrinology 2003;144(4):1594-602. PubMed

24. Rak-Mardyla A, Gregoraszczuk E. Effect of ghrelin on proliferation apoptosis and secretion of progesterone and hCG in the placental JEG-3 cell line. Reprod Biol 2010;10(2):159-65. PubMed

25. Huafang YU, Guaxiong XU, Xiaoming F. The effect of ghrelin on cell proliferation in small intestinal IEC-6 cells. Biomed Pharmacother 2013;67(3):235-39. PubMed

26. Gupta M, Dangi SS, Singh G, Sarkar M. Expression and localization of ghrelin and its receptor in ovarian follicles during different stages of development and the modulatory effect of ghrelin on granulosa cells function in buffalo. Gen Comp Endocrinol 2015; 210:87-95. Link

27. Chung H, Park S. Ghrelin regulates cell cycle-related gen expression in culture a hypocampal neural stem cell. J Endocrinol 2016;230(2):239-50. PubMed

International License Creative Commons Attribution License 4.0