

Alteration of Genes Expression Related to Implantation in Human Endometrial Stromal Cells Cultured in the Presence of Ovarian Hormones

Marzieh Rahimipour¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Mina Jafarabadi³

1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: salehnm@modares.ac.ir*

Received: 06/Mar/2017, Accepted: 14/May/2017

Abstract

Objective: This experimental study evaluated the effect of ovarian hormones on the expression of genes related to implantation in human endometrial stromal cells in vitro.

Methods: After confirmation of normal endometrial tissue collected from hysteroscopy according to hematoxylin and eosin staining, we isolated the endometrial cells with collagenase type 1. The cells were passed through 100 and 40 μ m filters. We cultured the collected stromal cells in DMEM/F-12 medium to the fourth passage. Passage-4 cells were examined for 7 days in two groups - control (without hormones) and experimental groups with different concentrations of estrogen (E2; 0.3, 0.7 and 1 nmol/L) and a constant concentration of progesterone (P4; 63.5 nmol/L). After culture, the cell viability, proliferation and the expression of genes related to implantation, α v and β 3 integrins, leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), and interleukin-1 receptor (IL-1R) were assessed by staining with propidium iodide and acridine orange, the MTT assay, and real time RT-PCR. The data were analyzed using SPSS software.

Results: There were 99.9% viable cells in all groups. Cell proliferation increased significantly in the 0.3 nmol/L treated group compared with the control group and the group treated with 0.7 nmol/L ($P \leq 0.04$). However, the group treated with 1 nmol/L did not significantly change compared to the other groups. In contrast to IL-1R and LIFR, expressions of the α v and β 3 integrins significantly increased in the 0.3 nmol/L treated group compared to the control ($P \leq 0.02$).

Conclusion: The combined use of estrogen and progesterone in an endometrial stromal cell culture had an effect on the proliferation and expression of some genes related to implantation.

Keywords: Endometrial stromal cell, Estrogen, Progesterone, Gene expression, Implantation

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017-2018), No.1, Pages: 29-42

تغییر بیان ژن‌های دخیل در لانه گزینی در سلول‌های استرومایی آندومتر انسانی کشت شده در حضور هورمون‌های تخمدانی

مرضیه رحیمی پور^۱، مؤده صالح نیا^{۲*}، مینا جعفرآبادی^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۲/۲۴

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۱۵

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه تجربی بررسی تأثیر هورمون‌های تخمدانی بر بیان ژن‌های دخیل در لانه گزینی در سلول‌های استرومایی آندومتر انسان در محیط کشت بود.

مواد و روش‌ها: پس از تأیید نرمالیتی بافت‌های آندومتر حاصل از هیسترسکوپی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، سلول‌های آندومتر به کمک کلاژناز تیپ ۱ جداسازی و از فیلترهایی به ابعاد ۱۰۰ و ۴۰ میکرومتر عبور داده شدند. سلول‌های استرومایی حاصل در محیط DMEM/F-12 تا پاساژ ۴ کشت شد و سپس به مدت ۷ روز در دو بخش مطالعه شد: گروه کنترل (بدون هورمون) و گروه‌های آزمون با غلظت‌های متفاوت استروژن (E2)؛ ۰/۳، ۰/۷ و ۱ نانومول بر لیتر و غلظت ثابت پروژسترون (P4)؛ ۶۳/۵ نانومول بر لیتر پس از کشت حیات و تکثیر سلول‌ها با رنگ‌آمیزی دوگانه پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنج و آزمون MTT و بیان ژن‌های دخیل در لانه گزینی؛ اینترگین‌های αv و $\beta 3$ ، گیرنده عامل مهارکننده لوسمی و گیرنده اینترلوکین ۱ با روش real time RT-PCR ارزیابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج: ۹۹/۹ درصد از سلول‌ها در همه گروه‌ها زنده بودند. تکثیر سلول‌ها در گروه تیمار شده با دوز ۰/۳ نانومول بر لیتر نسبت به گروه‌های کنترل و تیمار شده با دوز ۰/۷ نانومول بر لیتر افزایش معنی‌دار ($P \geq 0/04$) داشت اما گروه تیمار شده با دوز ۱ نانومول بر لیتر تغییر معنی‌داری نسبت به دیگر گروه‌ها نداشت. نسبت بیان ژن‌های αv و $\beta 3$ برخلاف گیرنده اینترلوکین ۱ و گیرنده عامل مهارکننده لوسمی در گروه ۰/۳ نانومول بر لیتر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ($P \geq 0/02$).

نتیجه‌گیری: استفاده همزمان استروژن و پروژسترون در کشت سلول‌های استرومایی آندومتر می‌تواند بر تکثیر و بروز برخی از ژن‌های لانه گزینی مؤثر باشد.

کلید واژگان: سلول‌های استرومایی آندومتر، استروژن، پروژسترون، بیان ژن و لانه گزینی

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات: ۲۹-۴۲

مقدمه

استروئیدهای تخمدانی تأثیرات زیادی را بر آندومتر رحم دارند که موجب افزایش پذیرندگی (Reception) آندومتر به منظور لانه‌گزینی جنین می‌گردند [۱]. بنابراین در زنان با نارسایی تخمدان، دریافت مکمل‌های حاوی استروژن (Estradiol: E2) و پروژسترون (Progesterone: P4) برای رسیدن آندومتر به یک پذیرندگی بهینه اولیه لازم است [۲]. طی فاز پذیرندگی رحم P4 واکنش دسیدوایی (Decidual reaction) را ایجاد می‌کند که این تغییرات شامل تغییر سلول‌های استرومایی شبه فیروپلاست آندومتر به سلول‌های گرد و بزرگتر است و به علاوه در این فرآیند تغییرات فراساختاری در سطح راسی اپیتلیوم مجرا (Luminal epithelium) ایجاد می‌شود که می‌توان به ظهور پینوپودها (Pinopodes) و ناپدید شدن میکروویلی‌های سلول‌های پوششی اشاره کرد [۳-۵].

در تمامی پستانداران، پروژسترون برای لانه‌گزینی و برقراری بارداری ضروری است. در حالی که ضرورت استروژن برای لانه‌گزینی جنین وابسته به گونه است [۱]. در موش و رت برخلاف دیگر گونه‌ها (خوک، خوکچه، همستر و خرگوش) برقراری پنجره لانه‌گزینی وابسته به استروژن و پروژسترون است [۱]. در انسان ابتدا لازم است آندومتر رحم در معرض اولیه استروژن قرار گیرد و سپس تحت تأثیر پروژسترون پذیرندگی آن تکمیل شود [۶].

گیرنده‌های استروژن و پروژسترون در سلول‌های اپیتلیالی و استرومایی بیان می‌شوند. بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های استرومایی و غدد آندومتر در طول فاز فولیکولی انسان توسط استروژن القا می‌شود. بروز این گیرنده‌ها و غلظت هورمون‌ها هر دو در موفقیت لانه‌گزینی دارای اهمیت هستند [۷-۹].

به دلیل محدودیت‌های اخلاقی و نیز تأثیرات عوامل متعدد دیگر به شکل سیستماتیک که در بافت یا سرم وجود دارد ارزیابی تأثیر هورمون‌های تخمدانی به تنهایی بر پذیرش آندومتر و بیان ژن‌های درگیر در لانه‌گزینی در داخل بدن

(in vivo) امکان‌پذیر نیست یا در صورت انجام می‌تواند نتیجه‌گیری‌های متفاوتی داشته باشد. به همین منظور از مدل‌های لانه‌گزینی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) استفاده می‌شود. به کارگیری مدل‌های لانه‌گزینی نتایجی را چه در سطح مولکولی و چه در سطح ساختاری ارائه کرده است [۱۰-۱۳]. به عنوان مثال استروژن به تنهایی باعث افزایش بیان ماتریکس متالوپروتیناز ۲/۹ (Metalloproteinase 2/9) در سلول‌های اپیتلیالی آندومتر می‌شود [۱۴] یا به کارگیری استروژن به همراه پروژسترون موجب افزایش بیان موسین ۱ (Mucin 1) در آندومتر می‌شود [۱۵]. همچنین یاماگاتا (Yamagata) و همکاران نیز نشان دادند که بیان DNA متیل ترانسفراز توسط استروژن و پروژسترون کاهش یافته و طی فاز ترشچی از میزان آن کاسته می‌شود [۱۳]. بنابراین هورمون‌های مذکور دارای عملکردهای تنظیمی در بیان ژن‌هایی هستند که با فرآیند دسیدوایی شدن ارتباط دارند [۱۳]. به علاوه استروژن و پروژسترون طی دوره قاعدگی خانواده اندوتلین‌ها (Endothelins) را تنظیم کرده که می‌تواند نشانگر نقش آن‌ها طی فرآیند لانه‌گزینی جنین باشد [۱۰].

رحم به واسطه بیان تعدادی از سیتوکین‌ها (Cytokines)، عوامل رشد، کموکین‌ها (Chemokines) و مولکول‌های اتصال برای لانه‌گزینی جنین آماده می‌شود [۱۴-۱۶]. کوچکترین ناهماهنگی در بیان هر یک از این عوامل می‌تواند منجر به ایجاد تغییرات پاتولوژیک و به دنبال آن ناباروری شود [۱۷]. مطالعات پیشین نشانگر بالاترین سطح بیان برخی از عوامل در طول پنجره لانه‌گزینی است؛ از جمله عوامل یاد شده می‌توان به عامل مهارکننده لوسمی (Leukemia inhibitory factor: LIF) [۱۸]، ایتروکین ۱ (Interleukin-1) [۱۹] و ایتتگرین‌های αv (Integrin αv) و $\beta 3$ (Integrin $\beta 3$) [۲۰] اشاره کرد.

LIF یک سیتوکین پیش‌التهابی است که به خانواده IL-6 تعلق دارد. این عامل هم از طریق برهم کنش با گیرنده مربوط

RT-PCR پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق به استثنای موارد ذکر شده از شرکت Sigma Aldrich (آلمان) خریداری شد.

نمونه‌گیری بافت آندومتر انسان

بافت آندومتر از زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهران در محدوده سنی ۲۵-۳۵ سال در فاز تکثیری و بدون علائم پاتولوژیکی مرتبط با آندومتر که تحت عمل هیستروسکوپی (Hysteroscopy) قرار گرفتند تهیه شد (n=۵). این بیماران به مدت سه ماه قبل از جراحی هورمونی دریافت نکردند. این بخش از تحقیق طبق موازین مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (کد ۱۳۹۴/۱۳۷) و با کسب رضایت نامه آگاهانه از بیماران انجام گرفت.

بررسی بافت شناسی و آسیب شناختی نمونه‌ها

به منظور ارزیابی ریخت شناسی بافت‌ها، قطعات آندومتر در محلول بوئن تثبیت و مراحل معمول پاساژ بافتی انجام شد. سپس از قطعات بافتی برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر تهیه و با هوماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and eosin) رنگ آمیزی شد. در نهایت مقاطع رنگ آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و سلامت بافت آندومتر تأیید شد.

آماده‌سازی هورمون

در ابتدا هورمون‌های استروژن و پروژسترون برای تهیه محلول‌های X₁₀₀ از غلظت‌های مورد نظر در اتانول ۱۰۰ درصد (Merck آلمان) حل شد. سپس به منظور تهیه غلظت نهایی، مقادیر معینی از محلول اولیه به محیط کشت حاوی ۱۰

(LIF receptor: LIFR) مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی مختلف را آغاز می‌کند [۲۱]. این گیرنده متشکل از دو زیر واحد LIFR β و gp130 است. gp130 به‌عنوان زیر واحد مشترک در سیتوکین‌های خانواده IL-6 محسوب می‌شود. درحالی‌که LIFR β به‌عنوان زیر واحد اختصاصی تلقی می‌شود [۲۲]. در زنان بالاترین سطح LIF و LIFR در میانه فاز ترشهی [بین ۶ تا ۹ روز بعد از اوج LH (Luteinizing hormone)] مقارن با تشکیل پینوپودها در اپیتلیوم غددی و اپیتلیوم سطحی بیان می‌شود [۲۳]. در طول بارداری در انسان LIF و LIFR در دسیدوا و پرزهای جفتی سه ماهه اول قابل تشخیص است [۳].

IL-1 توسط سلول‌های استرومایی دسیدوایی و سلول‌های تروفوبلاستی (Trophoblast cells) و گیرنده آن (IL-1R: IL-1 receptor) توسط سلول‌های اپیتلیال آندومتر و سلول‌های تروفوبلاستی تولید می‌شوند [۲۴]. IL-1 دارای عملکردهای مختلفی در پنجره لانه گزینی است؛ به‌طوری‌که باعث تحریک ترشح پروستاگلاندین E₂ (Prostaglandin E₂)، LIF و اینتگرین β 3 در بخش مادری و القای تهاجم تروفوبلاست می‌شود [۲۵، ۲۶].

بیان اینتگرین‌ها در فاز پذیرندگی آندومتر افزایش می‌یابد که به عنوان شاخصی برای پنجره لانه گزینی محسوب می‌شود [۲۷، ۲۸]. الگوی بیان اینتگرین‌های آندومتر نشان دهنده تنظیم هورمونی آن‌ها است [۲۹]. به‌عنوان مثال هم استروژن و هم پروژسترون موجب القای بیان اینتگرین β 3 در اپیتلیوم آندومتر می‌شوند [۸] و اینتگرین‌های α V β 3 و α 4 β 1 به‌عنوان شاخص‌های پذیرندگی رحم محسوب می‌شوند [۳۰، ۳۱].

با توجه به نبودن اطلاعات کافی در رابطه با تأثیر هورمون‌های استرویدی تخمدان بر بیان ژن‌های α V، β 3، IL-1R و LIFR و نیز به علت اهمیت این ژن‌ها در لانه گزینی، در این مطالعه به ارزیابی تأثیر دوزهای متفاوت E₂ به همراه P4 بر زنده مانی و تکثیر سلول‌های استرومایی آندومتر و بیان ژن‌های مذکور با به‌کارگیری روش real-time

تغییر بیان ژن‌ها در سلول‌های استرومایی آندومتر در حضور هورمون‌های تخمدانی

تاریکی و دمای اتاق رنگ آمیزی شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شدند. رنگ سبز و رنگ قرمز به ترتیب نشان دهنده سلول‌های زنده و مرده بود.

درصد سرم اضافه شد. در نهایت برای تبخیر اتانول، محیط کشت حاوی هورمون به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد [۳۲].

MTT assay

به منظور مقایسه تکثیر سلول‌های استرومایی در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] استفاده شد. در این آزمون فعالیت دهیدروژناز میتوکندریایی به عنوان نشانه‌ای از حیات سلول سنجیده می‌شود. در این بخش در هر گروه تعداد $10^3 \times 15$ سلول (۳ بار تکرار) به مدت ۷ روز کشت داده شد. پس از اتمام دوره کشت با حذف محیط، ۲۰۰ میکرولیتر معرف MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) (Roth، آلمان) به سلول‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. معرف MTT با فعالیت متابولیکی سلول‌های زنده کاهش می‌یابد. بنابراین کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان (Formazan) ایجاد و داخل سلول‌ها رسوب می‌کند. با برداشت محلول MTT و افزودن ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO: Dimethyl sulfoxide) غشای سلول‌ها پاره و کریستال‌ها حل می‌شود [۳۷]. در نهایت نمونه‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و برای خوانش جذب نوری در دستگاه الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) قرار گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA

با استفاده از کیت سنتز RNA (RNeasy Mini Kit) (Qiagen، آمریکا) مجموع RNA سلول‌های استرومایی در هر گروه استخراج و به منظور حذف آلودگی‌های DNA با DNase تیمار شد. سپس غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و به منظور ساخت cDNA استفاده شد. در آخر cDNA با استفاده از کیت (Thermo، اروپا) و به حجم ۲۰ میکرولیتر ساخته شد و تا زمان استفاده در دمای

جداسازی و کشت سلول‌های آندومتر

برای جداسازی سلول‌ها در ابتدا بافت آندومتر در بافر فسفات سالین (PBS: Phosphate buffered saline) شستشو و سپس در محیط کشت DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Hams F-) (۱۲ (PAN-Biotech، آلمان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Fetal bovine serum) (PAN-Biotech، آلمان) با استفاده از تیغ بیستوری به قطعات بسیار کوچکی تبدیل شد. به منظور هضم آنزیمی ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلاژناز نوع ۱ (Invitrogen، انگلستان) و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر DNAase I به قطعات بافتی اضافه شد. پس از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سوسپانسیون حاصل به منظور حذف بخش‌های اپی تلایالی از فیلترهایی به ابعاد ۱۰۰ و ۴۰ میکرومتر (Becton Dickinson، آمریکا) عبور داده شد [۳۳]. سرانجام سلول‌های استرومایی حاصل تا پاساژ ۴ با استفاده از محیط کشت DMEM/F-12 و سرم ۱۰ درصد در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شد. به منظور انجام مطالعات، کشت سلول‌های استرومایی پاساژ ۴ به مدت ۷ روز در دو بخش انجام شد: گروه کنترل (بدون هورمون) و گروه‌های آزمون با غلظت‌های متفاوت E_2 ۰/۳، ۰/۷ و ۱ نانومول بر لیتر [۳۴، ۳۵] توام با غلظت ثابت P_4 ۶۳/۵ نانومول بر لیتر [۳۶].

ارزیابی حیات سلول با AO و PI

ارزیابی حیات سلول‌ها توسط یک رنگ آمیزی دوگانه انجام شد. به نحوی که سلول‌ها با استفاده از PI (Propidium iodide) (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) و AO (Acridine orange) (۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت ۳۰ ثانیه در

۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۳ بار تکرار).

Real-time RT-PCR

برای ارزیابی‌های مولکولی، آغازگرها (Primers) با استفاده از بانک ژن طراحی و توسط شرکت سیناژن (ایران) ساخته شد. در این تحقیق از بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). این بخش با استفاده از دستگاه Applied Biosystem real time thermal cycler و مطابق با کیت QuantiTect SYBR Green RT-PCR انجام شد.

مجموع عملکرد دستگاه در سه مرحله خلاصه می‌شود: مرحله توقف (Holding) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۰ دقیقه)، مرحله چرخش (Cycling) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه) و ۶۰ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و مرحله منحنی ذوب (Melt curve) در ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه)، ۶۰ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه). به منظور تأیید محصول تکثیر یافته از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. همچنین ارزیابی کمی این بخش با استفاده از فرمول Pfaffl انجام گرفت.

جدول ۱ آغازگرهای الیگونوکلوئیدی

ژن هدف	جفت توالی‌های آغازگر (5'-3')	شماره دستیابی	اندازه قطعه (جفت باز)	دما (درجه سانتی گراد)
αV	ATCTCAGAGGTGGAACAGGA TGGAGCATACTCAACAGTCTTTG	NM_002210.4	۲۱	۵۸/۰۹
$\beta 3$	AGTAACCTGCGGATTGGCTTC GTCACTCGTCAGTTAGCGT	NM_000212.2	۲۱	۶۰/۶۸
LIFR	TGTAAACGACAGGGGTTCAGT GAGTTGTGTGTGGGTCACTAA	NM_001127671.1	۲۰	۵۸/۵۸
IL1-R	GGCACACCCTTATCCACCAT GCGAAACCCACAGAGTTCTCA	NM_001261419.1	۲۲	۵۸/۴۶
β actin	TCAGAGCAAGAGGGCATCC GGTCATCTTCTCACGGTTGG	NM_001101.3	۲۰	۵۹/۷۴
			۲۱	۶۰/۵۴
			۲۰	۶۰/۵
			۲۰	۶۰/۵

تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance: ANOVA)، T-test و آزمون تکمیلی توکی (Turkey) برای آزمون MTT و independent-samples t-test برای تحلیل مولکولی انجام شد. تمام داده‌ها سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

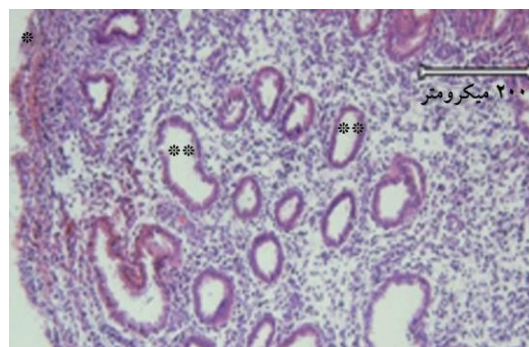
مطالعه بافتی و آسیب‌شناختی

طبیعی بودن ریخت‌شناسی تمامی بافت‌ها توسط میکروسکوپ نوری تأیید شد. به طوری که پوشش سطحی آندومتر به صورت یک لایه اپیتلیوم استوانه‌ای ساده و استروما حاوی سلول‌های استرومایی دوکی شکل به همراه غدد رحمی با مجاری باریک و تقریباً توخالی مشاهده شد (شکل ۱).

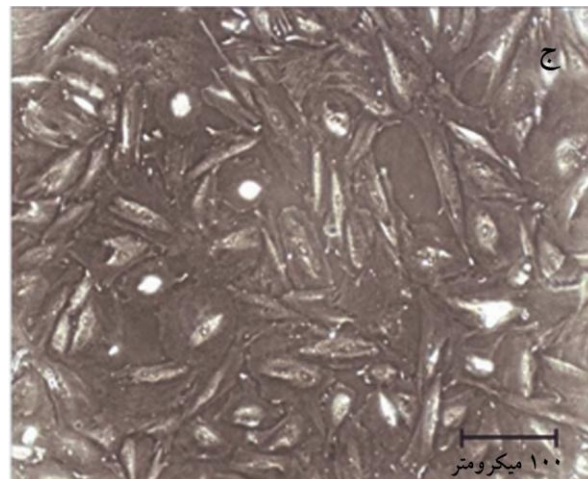
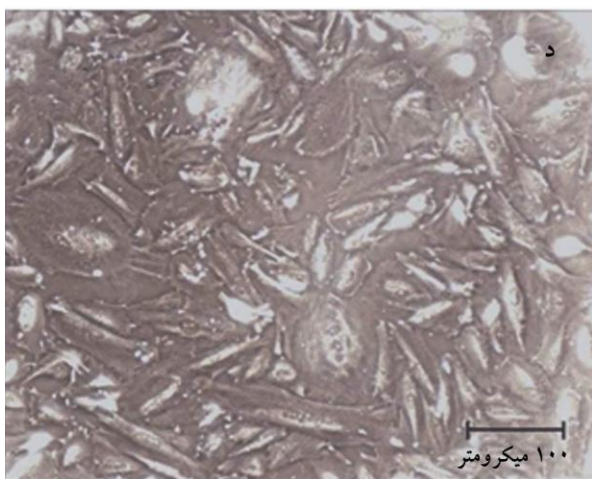
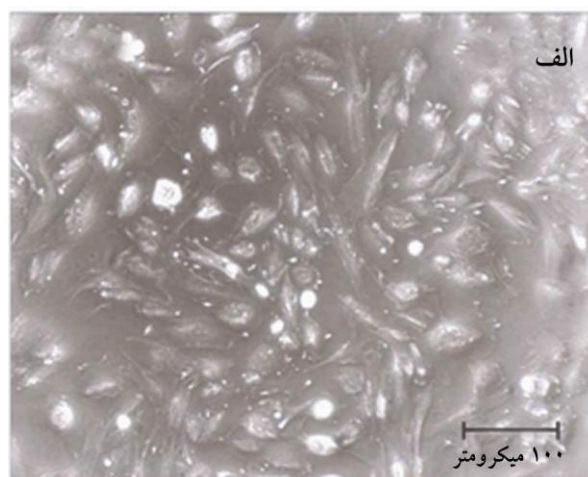
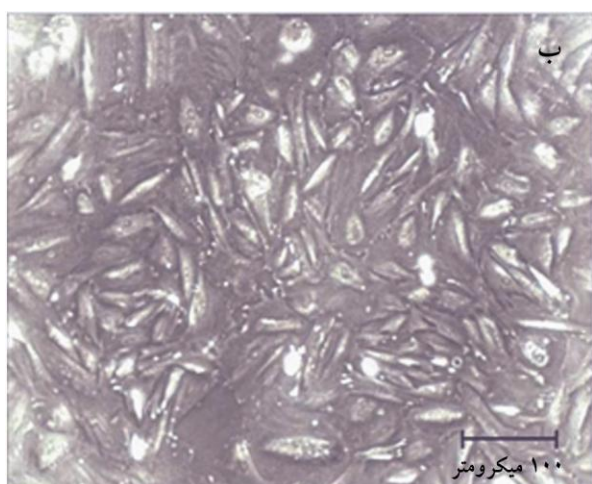
تغییر بیان ژن‌ها در سلول‌های استرومایی آندومتر در حضور هورمون‌های تخمدانی

زنده مانی سلول و آزمون MTT

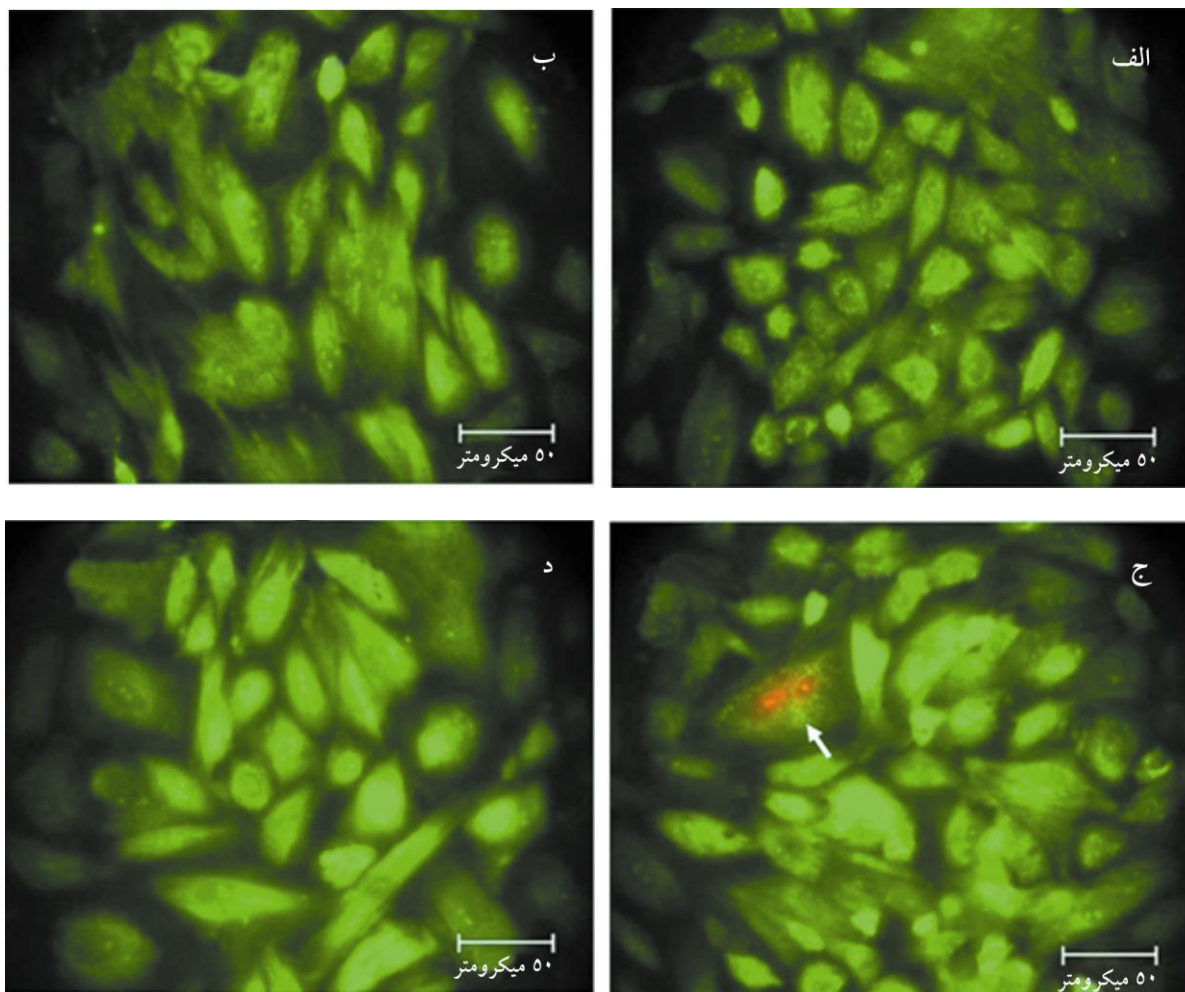
پس از ۷ روز کشت و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هورمونی ریخت شناسی سلول‌ها طبیعی و به‌صورت دوکی شکل مشاهده شد. به‌علاوه اینکه بعد از این مدت حداکثر تراکم سلولی در تمامی گروه‌ها دیده شد (شکل ۲). همچنین مشاهدات حاصل نشانگر حیات حدود ۹۹/۹ درصدی سلول‌ها در همه گروه‌ها بود. به‌طوری که تفاوتی بین گروه‌ها دیده نشد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود رنگ سبز نشان‌گر سلول‌های زنده و رنگ قرمز نشان‌گر سلول‌های مرده است.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ نوری از بافت آندومتر انسان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. (*) اپیتلیوم، (**) غدد



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ معکوس از سلول‌های استرومایی آندومتر انسان بعد از ۷ روز کشت در حضور غلظت‌های مختلف استروژن و تک غلظت پروژسترون؛ (الف) کنترل (بدون هورمون)، (ب) غلظت ۰/۳ نانومول بر لیتر استروژن، (ج) غلظت ۰/۷ نانومول بر لیتر استروژن، (د) غلظت ۱ نانومول بر لیتر استروژن



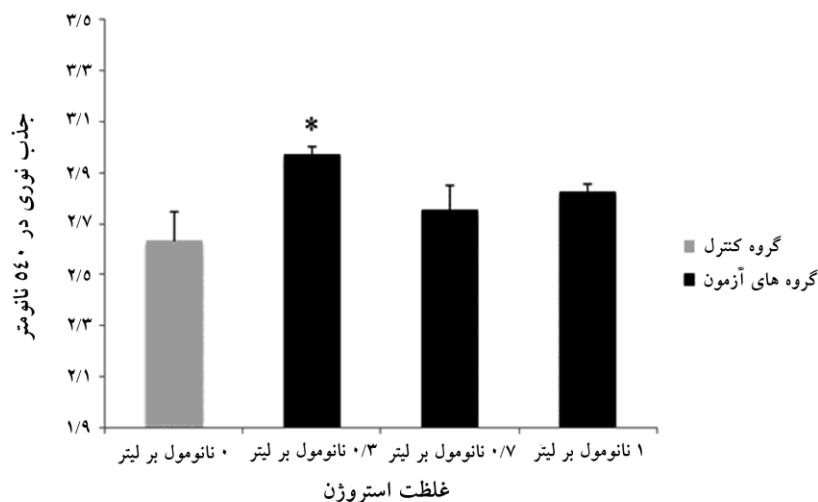
شکل ۳ تصاویر فلورسنت از سلول‌های استرومایی آندومتر انسان بعد از ۷ روز کشت در حضور غلظت‌های مختلف استروژن و تک غلظت پروژسترون با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه PI/AO. رنگ سبز نشان‌گر سلول‌های زنده و رنگ قرمز نشان‌گر سلول‌های مرده (نوکلئوس در تصویر ج) است. الف) کنترل (بدون هورمون)، ب) غلظت ۰/۳ نانومول بر لیتر استروژن، ج) غلظت ۰/۷ نانومول بر لیتر استروژن، د) غلظت ۱ نانومول بر لیتر استروژن

Real time RT-PCR

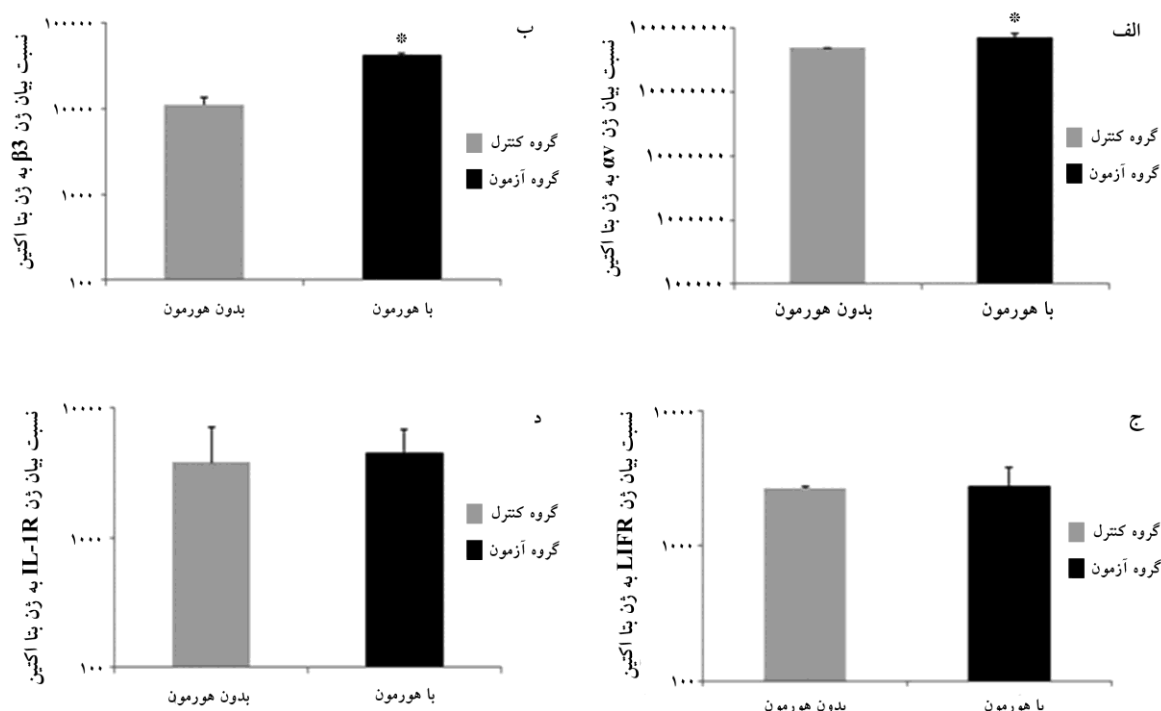
بیان ژن‌های αv ، $\beta 3$ ، IL1-R و LIFR در گروه هورمونی و کنترل ارزیابی شد. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود نسبت بیان ژن‌های αv و $\beta 3$ به ژن کنترل داخلی (بتا اکتین) به‌ترتیب در گروه هورمونی ($420/814 \pm 111/22/348$) و $704/582 \pm 1122/348$) در مقایسه با گروه کنترل ($420/814 \pm 111/22/348$) افزایش داشت. ولی بیان IL1-R و LIFR از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری نداشت.

همچنین تحلیل داده‌های حاصل از آزمون MTT نشان دهنده افزایش معنی‌دار تکثیر سلول‌ها در گروه آزمون تیمار شده با دوز ۰/۳ نانومول بر لیتر E2 نسبت به گروه کنترل ($P \leq 0/004$) و گروه تیمار شده با ۰/۷ نانومول بر لیتر E2 ($P \leq 0/04$) بود. در حالی که در گروه تیمار شده با دوز ۱ نانومول بر لیتر E2 تغییر معنی‌داری نسبت به دیگر دوزها و گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۴). به همین جهت غلظت ۰/۳ نانومول بر لیتر به‌عنوان دوز مناسب E2 برای ارزیابی‌های بعدی استفاده شد.

تغییر بیان ژن‌ها در سلول‌های استرومایی آندومتر در حضور هورمون‌های تخمدانی



شکل ۴ مقایسه تکثیر سلول‌های استرومایی آندومتر انسان بعد از ۷ روز کشت در گروه‌های هورمونی با گروه کنترل. علامت * نشان‌گر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل



شکل ۵ مقایسه بیان ژن‌های دخیل در لانه‌گزینی با ژن کنترل داخلی (بتا اکتین) در سلول‌های استرومایی آندومتر انسان بعد از ۷ روز کشت در گروه هورمونی و گروه کنترل؛ الف) نسبت بیان ژن αv به بتا اکتین، ب) نسبت بیان ژن $\beta 3$ به بتا اکتین، ج) نسبت بیان ژن LIFR به بتا اکتین، د) نسبت بیان ژن IL-1R به بتا اکتین، علامت * نشان‌گر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

بحث

در اولین بخش از این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف استروژن به همراه یک غلظت ثابت پروژسترون روی حیات و تکثیر سلول‌های استرومایی آندومتر مطالعه شد. نتایج حاصل از این بخش نشان داد که حیات سلول‌ها در تمامی گروه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف استروژن قرار نگرفته و به عبارتی مرگ سلولی در این گروه‌ها القا نشد و هیچ‌کدام از این غلظت‌ها برای سلول‌ها سمی و کشنده نبود. از سوی دیگر دوز ۰/۳ نانومول بر لیتر استروژن باعث افزایش تکثیر سلولی شد. بنابراین این غلظت به عنوان دوز بهینه در ادامه این تحقیق استفاده شد.

این نتایج همگی بیان‌گر آثار القایی استروژن بر تکثیر سلول‌های آندومتر بود که قبلاً نیز این مسئله تأیید شده است، همان‌گونه که در شرایط داخل بدن (in vivo) آندومتر در پاسخ به این هورمون طی فاز تکثیری دچار تقسیمات متعدد میتوزی می‌شود که این عملکرد استروژن به واسطه اتصال این هورمون با گیرنده‌های موجود بر سطح سلول‌های هدف صورت می‌پذیرد [۳۸، ۳۹]. این در حالی است که در شرایط بدن استروژن موجب افزایش تکثیر (Hyperplasia) و اندازه سلول‌های اپیتلیال (Hypertrophy) آندومتر می‌شود و به دنبال آن پروژسترون با تغییر عملکرد استروژن پاسخ تکثیر را از اپیتلیوم به سمت استروما هدایت می‌کند [۳۹]. اما این عملکرد می‌تواند با تغییرات دوز این هورمون تحت تأثیر قرار بگیرد. علاوه بر این؛ افزایش تکثیری سلول‌های استرومایی در حضور همزمان استروژن و پروژسترون در شرایط آزمایشگاهی نیز قبلاً گزارش شده بود [۳۹-۴۱]. مطالعات دیگری نیز نشان دهنده عملکرد تکثیری طبیعی استروژن در بافت‌های دیگر از جمله سلول‌های اپیتلیال پستان و سلول‌های کبدی است [۴۲-۴۴]. همچنین مطالعه‌ای که اخیراً توسط لی (Li) و همکاران انجام شد نشان داد که ظرفیت تکثیری و زمان ماندگاری در فازهای مختلف چرخه سلولی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی توسط عوامل بیرونی همچون غلظت

استروژن قابل تنظیم است [۴۵].

نتایج حاصل نشانگر افزایش بیان ایتگرین‌های αv و $\beta 3$ در حضور غلظت ۰/۳ نانومول بر لیتر استروژن و ۶۳/۵ نانومول بر لیتر پروژسترون بود. درحالی‌که تحت تأثیر این دوز استروژن و پروژسترون در بیان ژن‌های IL1-R و LIFR تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. عدم بیان ژن‌های اخیر را می‌توان به عدم حضور جنین و در نتیجه فقدان پیام‌های جنینی و برهم کنش جنین و آندومتر نسبت داد چرا که بیان LIF و IL-1 و نیز گیرنده‌های مربوط (LIFR و IL1-R) در هر دو سطح مادری و جنینی در اثر برهم کنش جنین و آندومتر رخ می‌دهد [۳، ۲۳].

از سوی دیگر؛ عدم بیان ژن‌های مذکور می‌تواند به دلیل دوز هورمون‌های به کار گرفته شده در این بخش از تحقیق باشد چرا که عملکرد هورمون‌ها وابسته به دوز است [۹].

عملکردهای استروژن و پروژسترون بر سلول‌ها از طریق گیرنده‌های آن‌ها انجام می‌شود به نحوی که این گیرنده‌ها به صورت عوامل رونویسی عمل می‌کنند و به توالی‌های خاص DNA تحت عنوان عناصر پاسخ‌دهنده به استروئید برای بیان یا سرکوب ژن‌های هدف متصل می‌شوند. بنابراین استروژن و پروژسترون از طریق گیرنده‌های اختصاصی، تکثیر سلولی، تمایز و تولید پروتئین‌های ترشحی را در رحم تنظیم می‌کنند [۳۸]. سطوح گیرنده و همچنین غلظت هر یک از این هورمون‌ها در برقراری یک لانه‌گزینی موفق از اهمیت یکسانی برخوردار است [۹، ۴۶]. ما (Ma) و همکاران نشان دادند که اگرچه استروژن در غلظت‌های مختلف می‌تواند لانه‌گزینی را آغاز کند اما در سطوح پایین‌تر استروژن می‌تواند دوره پذیرندگی آندومتر را طولانی‌تر کند [۹] و همچنین وابوئنا (Valbuena) و همکاران در یک مدل لانه‌گزینی نشان دادند که غلظت‌های بالای استروژن باعث کاهش اتصال جنین می‌شود [۴۷]. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط زندیه و همکاران انجام شد نیز نشان داد که بیان ژن گیرنده‌های شبه Toll در رده سلولی حاصل از لوله فالوپ انسان طی تیمار با

تغییر بیان ژن‌ها در سلول‌های استرومایی آندومتر در حضور هورمون‌های تخمدانی

پس در نتیجه افزایش پذیرندگی آندومتر به دنبال افزایش بروز ژن‌ها در این ناحیه صورت می‌گیرد. در مجموع تحقیق حاضر نشان داد که غلظت ۰/۳ نانومول بر لیتر استروژن توام با غلظت ۶۳/۵ نانومول بر لیتر پروژسترون در کشت سلول‌های استرومایی آندومتر بر تکثیر و بروز ژن‌های لانه‌گزینی می‌تواند مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد سلول‌های بنیادی انجام شده است.

استرادیول و پروژسترون وابسته به دوز است [۴۸]. بنابراین تنظیم دقیق سطوح استروژن یکی از عوامل مهم در راستای پیشبرد باروری به خصوص در روش‌های کمک باروری است [۹].

هورمون‌های استرویدی موجب بیان مجموعه خاصی از ژن‌ها در مراحل اولیه بارداری می‌شود. از جمله این ژن‌ها می‌توان به کلسی‌تونین (Calcitonin) [۴۹]، آدیپونکتین (Adiponectin) [۵۰] و LIF [۱۸] اشاره کرد. بیان این ژن‌ها سرانجام منجر به ساخت پروتئین‌های جدیدی شده که رحم را برای دریافت جنین آماده می‌سازد [۴۹]. آلجاندرو (Alejandro) و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که عدم موفقیت مکرر لانه‌گزینی در برخی موارد به دلیل اختلالات بیان ژنی در پی اشکال در پیام‌های پروژسترون است [۴۶].

منابع

- [1] Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25(3): 341-73.
- [2] de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 1998; 39(1-2): 149-66.
- [3] Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int J Dev Biol* 2010; 54(2-3): 313-22.
- [4] Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(2): 151-61.
- [5] Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296(5576): 2185-8.
- [6] Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev* 2006; 27(1): 17-46.
- [7] Garcia E, Bouchard P, De Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E, Perrot-Applanat M. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(1): 80-7.
- [8] Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* 2003; 68(10-13): 809-15.
- [9] Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(5): 2963-8.
- [10] Keator CS, Mah K, Ohm L, Slayden OD.

- Estrogen and progesterone regulate expression of the endothelins in the rhesus macaque endometrium. *Hum Reprod* 2011; 26(7): 1715-28.
- [11] Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001; 64(2): 590-601.
- [12] Shan B, Li W, Yang SY, Li ZR. Estrogen up-regulates MMP2/9 expression in endometrial epithelial cell via VEGF-ERK1/2 pathway. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(10): 826-30.
- [13] Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod* 2009; 24(5): 1126-32.
- [14] Kämmerer U, von Wolff M, Markert UR. Immunology of human endometrium. *Immunobiology* 2004; 209(7): 569-74.
- [15] Young SL. A review of endometrium and implantation. *Semin Reprod Med* 2014; 32(5): 335.
- [16] Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005; 11(6): 613-30.
- [17] Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 2008; 55(5): 795-810.
- [18] Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(7): 3115-20.
- [19] Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37(1): 64-72.
- [20] Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 188-95.
- [21] Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005; 130(2): 131-45.
- [22] Ernst M, Inglese M, Waring P, Campbell IK, Bao S, Clay FJ, Alexander WS, Wicks IP, Tarlinton DM, Novak U, Heath JK, Dunn AR. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *J Exp Med* 2001; 194(2): 189-203.
- [23] Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 1: 808-14.
- [24] Bischof P, Campana A. Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14(5): 801-14.

- [25] Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bischof P. Effects of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 α , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor β on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(3): 252-60.
- [26] Viganò P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I. Maternal-conceptus cross talk--a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S56-61.
- [27] Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR, Fritz MA. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000; 73(4): 779-87.
- [28] Reddy KV, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue Cell* 2003; 35(4): 260-73.
- [29] Yoshimura Y. Integrins: expression, modulation, and signaling in fertilization, embryogenesis and implantation. *Keio J Med* 1997; 46(1): 16-24.
- [30] Lessey BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3: 247-58.
- [31] Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A, Sinatra F, Nardo F. Synchronous expression of pinopodes and $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 4 \beta 1$ integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *J Reprod Med* 2003; 48(5): 355-61.
- [32] Shen Z, Fahey JV, Bodwell JE, Rodriguez-Garcia M, Kashuba AD, Wira CR. Sex hormones regulate tenofovir-diphosphate in female reproductive tract cells in culture. *PLoS One* 2014; 9(6): e100863.
- [33] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 70(6): 1738-50.
- [34] Yang H, Han S, Kim H, Choi YM, Hwang KJ, Kwo HC, Kim SK, Cho DJ. Expression of integrins, cyclooxygenases and matrix metalloproteinases in three-dimensional human endometrial cell culture system. *Exp Mol Med* 2002; 34(1): 75-82.
- [35] Lalitkumar PG, Lalitkumar S, Meng CX, Stavreus-Evers A, Hambiliki F, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007; 22(11): 3031-7.
- [36] Tan Y, Tan D, He M, Gu M, Wang Z, Zeng G, Duan E. A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice. *Biol Reprod* 2005; 72(3): 556-61.
- [37] Sugawara J, Fukaya T, Murakami T, Yoshida H, Yajima A. Hepatocyte growth factor stimulated proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1997; 57(4): 936-42.
- [38] Pawar S, Hantak AM, Bagchi IC, Bagchi MK. Minireview: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. *Mol Endocrinol* 2014; 28(9): 1408-22.
- [39] Xiao CW, Goff AK. Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *J Reprod Fertil* 1998; 112(2): 315-24.
- [40] Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ.

- Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF beta-receptors in human endometrial tissue: localization and in vitro action. *Endocrinology* 1992; 130(4): 2373-85.
- [41] Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1991; 129(5): 2385-92.
- [42] Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 1997; 57(22): 4987-91.
- [43] Lippman ME, Osborne CK, Knazek R, Young N. In vitro model systems for the study of hormone-dependent human breast cancer. *N Engl J Med* 1977; 296(3): 154-9.
- [44] Batmunkh B, Chojookhuu N, Srisowanna N, Byambatsogt U, Synn Oo P, Noor Ali M, Yamaguchi Y, Hishikawa Y. Estrogen Accelerates Cell Proliferation through Estrogen Receptor α during Rat Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Acta Histochem Cytochem* 2017; 50(1): 39-48.
- [45] Li JN, Zhang Y, Wang YF, Chen JY. Effect of pregnancy on the proliferation of rat adipose-derived stem cells. *Genet Mol Res* 2017; 16(1).
- [46] Tapia-Pizarro A, Figueroa P, Brito J, Marín JC, Munroe DJ, Croxatto HB. Endometrial gene expression reveals compromised progesterone signaling in women refractory to embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 92.
- [47] Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril* 2001; 76(5): 962-8.
- [48] Zandieh Z, Amjadi F, Ashrafi M, Aflatoonian A, Fazeli A, Aflatoonian R. The Effect of Estradiol and Progesterone on Toll Like Receptor Gene Expression in A Human Fallopian Tube Epithelial Cell Line. *Cell J* 2016; 17(4): 678-91.
- [49] Bagchi IC, Li Q, Cheon YP. Role of steroid hormone-regulated genes in implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 68-76.
- [50] Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M, Szeszko K, Maleszka A, Kaminski T. The effect of estrone and estradiol on the expression of the adiponectin system in the porcine uterus during early pregnancy. *Theriogenology* 2017; 88: 183-96.