همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

الگوی بیان پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید در هیپوتالاموس در گامه‌های فحلی موش صحرایی

فرید پژوهی[۱]؛ محمد رضا جعفرزاده شیرازی[۲]؛ محمد جواد ضمیری[۲]؛ محمد سعید صالحی[*۱]؛ محمد رضا نام‌آور[۳]؛ علی نیازی[۴]؛ امین رمضانی[۴]؛ نادر تنیده[۵]؛ امین تمدن[۶]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ۲ـ بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۳ـ مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز ۵ـ مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۶ـ گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
* نویسنده مسئول: محمد سعید صالحی، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، صندوق پستی: ۶۵۱۸۶-۷۱۴۴۱ sisas33@gmail.com

چکیده

پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید ـ۳ (RFRP-3) در مغز جوندگان در جلوگیری از آزادسازی گونادوتروپین نقش دارد و در حقیقت هومولوگ هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) است. از این رو با توجه به اثر پپتید RFRP-3 بر تراوش گونادوتروپین‌ها، هدف این پژوهش بررسی بیان ژن RFRP در سطح رونویسی و ترجمه در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرایی بود. برای بررسی RFRP-3 mRNA روش Real time PCR و برای بررسی پپتید RFRP-3 روش ایمینوهیستوشیمی به کار برده شد. بیان RFRP-3 mRNA در سراسر چرخه فحلی در داین‌سفالن موش‌های صحرایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) در صورتی که تعداد نورون‌های بیان کننده RFRP-3 در گامه‌های پرواستروس و ابتدای استروس به صورت معنی‌داری از گامه‌های استروس، مت استروس و دای‌استروس کمتر بود (P<۰/۰۵). در نتیجه می‌توان این احتمال را مطرح کرد که ممکن است بیان ژن RFRP-3 در سراسر چرخه فحلی، در سطح رونویسی کنترل نمی‌شود.

واژگان کلیدی: پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید، گامه چرخه فحلی، هیپوتالاموس، موش صحرایی

مقدمه

نورون‌های هیپوتالاموس با آزادسازی فاکتورهای پپتیدی تحریک کننده و مهار کننده، تراوش هورمون‌های هیپوفیز پیشین را تنظیم می‌کنند. تراوش گونادوتروپین ها در درجه اول به وسیله اثر تحریکی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) کنترل می‌شود. در سال ۲۰۰۰ پپتیدی با ۱۲ اسید آمینه در هیپوتالاموس مغز بلدرچین شناسایی شد و به علت توانایی آن در جلوگیری از آزادسازی گونادوتروپین، هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) نام گرفت (Tsutsui et al., 2000). پژوهش‌های بعدی وجود هومولوگ‌های GnIHرا با عنوان "پپتید وابسته به آرژنین – فنیل آلانین – آمید[۱] (RFRP)" در مغز جوندگان (Murakami et al., 2008) و گوسفند (Clarke et al., 2008) شناسایی

[۱]- Arg-Phe-NH2 related peptide

کردند. در موش صحرایی گزارش شده تنها RFRP-3، بر فعالیت گونادوتروپ ها اثر مهاری دارد (Clarke et al., 2009). از این رو با توجه به اثر پپتید RFRP-3 بر تراوش LH از هیپوفیز، هدف این پژوهش بررسی بیان ژن RFRP در سطح رونویسی و ترجمه در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرایی بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش برای بررسی بیان RFRP-3 mRNA روش RT-PCR به کار برده شد. بدین منظور از ۱۵ موش صحرایی (*Rattus norvegicus*) بزرگسال استفاده شد. موش‌های صحرایی پس از تعیین گامه های چرخه فحلی (بررسی میکروسکپی اسمیر واژن) با روش جابجایی مهره‌های گردن کشتار شدند (سه موش صحرایی در هر گامه فحلی). سه موش صحرایی نیز ۱۵ روز پس از تخمدان برداری کشتار شدند (به عنوان گروه شاهد). سپس مغز هر جانور بی درنگ خارج و بخش دایین‌سفالن به نیتروژن مایع انتقال و سپس تا زمان انجام RT-PCR در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. استخراج RNA، تیمار با آنزیم DNase I برای حذف آلودگی‌های ژنومی و سنتز رشته اول cDNA (همگی توسط کیت‌های شرکت فرمنتاز و مطابق دستورالعمل) انجام شد. برای طراحی پرایمر ژن RFRP-3 (NM_023952) و ژن کنترل داخلی GAPDH (M32599) نرم‌افزار ALLELEID 6 به کار برده شد. واکنش Real Time PCR به صورت مقایسه‌ای (Relative) با ۴۰ سیکل و دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی گراد انجام و با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان محاسبه شد:

$$-\Delta\Delta Ct = (CT\ RFRP\text{-}3 - CT\ GAPDH)\ phase - (CT\ RFRP\text{-}3 - CT\ GAPDH)\ OVX$$

برای بررسی الگوی بیان پپتید RFRP-3 روش ایمیونوهیستوشیمی استفاده شد. بدین منظور، بیست موش صحرایی ماده پس از تعیین گامه های چرخه فحلی از راه قلب پرفیوژ شدند. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه دایین سفالون جدا و در محلول سوکروز ۳۰٪ قرار داده شد. نمونه ها با ضخامت ۳۰ میکرومتر برش داده شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، در محلول دارای ماده محافظ یخزدگی (Cryoprotectant) نگهداری شدند. برش های مناسب دارای هسته DMH سه بار و هر بار برای ده دقیقه با محلول فسفات بافر سالین (PSB) شستشو شدند. از سدیم سیترات بافر ۱۰ میلی مولار (PH=6) برای بازیابی آنتی ژن استفاده و پس از سه بار شستشوی مجدد با PBS، از سرم پنج درصد الاغ به عنوان محلول بلوک کننده استفاده شد. آنتی بادی اولیه علیه RFRP-3 با رقت یک به سیصد تهیه و نمونه ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد با این محلول انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان و شستشوی نمونه ها با فسفات بافر سالین، نمونه ها با آنتی بادی ثانویه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از قرار دادن نمونه ها بر لام، تعداد نورون های بیان کننده RFRP-3 در هر برش با میکروسکوپ فلورسنت شمارش شد.

میانگین و انحراف معیار بیان mRNA و پپتید RFRP-3 در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با نرم افزار SPSS مقایسه شدند.

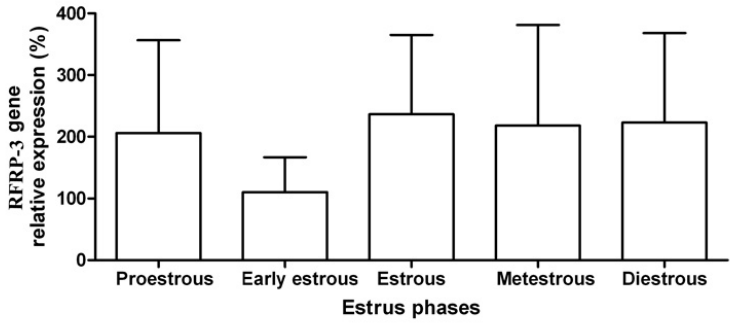
نتایج و بحث

بیان RFRP-3 mRNA در گامه های گوناگون چرخه فحلی در دایین‌سفالن موش‌های صحرایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$؛ نگاره ۱). در صورتی که تعداد نورون‌های بیان کننده RFRP-3 در گامه‌های پرواستروس و ابتدای استروس به صورت معنی‌داری از گامه‌های

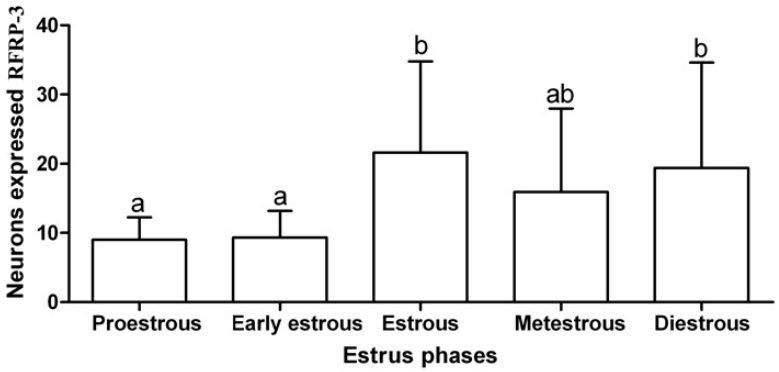
استروس، مت استروس و دای‌استروس کمتربود ($P<0.05$؛ نگاره ۲). پیش‌تر، پپتید RFRP-3 تنها در هسته DMH مغز جوندگان و RFRP-3 mRNA نیز تنها در DMH هامستر شناسایی شده بود (Kriegsfeld et al., 2006). شمار سلول‌های بیان کننده RFRP و فعالیت این سلول‌ها در گامه پرواستروس هامستر کاهش یافت و فعالیت این نورون‌ها در حوالی زمان سرژ GnRH/LH در دوره پیش از تخمک ریزی به صورت چشمگیر مهار می‌شد. بیان شده است که سنتز، تراوش و یا انتقال پپتید RFRP در خلال چرخه تخمدانی تغییر می‌کند (Kriegsfeld et al., 2006). اگرچه در این پژوهش مشاهده شد که مقدار ثابتی RFRP-3 mRNA در نورون‌های RFRP موش صحرایی، در گامه‌های مختلف چرخه فحلی بیان می شود اما بیان پپتید RFRP-3 در خلال چرخه فحلی متفاوت بود و می‌توان این احتمال را مطرح کرد که ممکن است بیان ژن RFRP-3 در سراسر چرخه فحلی، در سطح رونویسی کنترل نمی‌شود.

منابع

1) Clarke, I.J., Y. Qi, I. Puspita Sari, J.T. Smith. 2009. Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. Frontiers in Neuroendocrinology, 30:371-378.
2) Clarke, I.J., I.P. Sari, Y. Qi, J.T. Smith, H.C. Parkington, T. Ubuka, J. Iqbal, Q. Li, A. Tilbrook, K. Morgan, A.J. Pawson, K. Tsutsui, R.P. Millar, G.E. Bentley. 2008. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. Endocrinology, 149:5811-5821.
3) Kriegsfeld, L.J., D.F. Mei, G.E.Bentley, T. Ubuka, A.O. Mason, K. Inoue, K. Ukena, K. Tsutsui, R. Silver. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103:2410-2415.
4) Murakami, M., T. Matsuzaki, T. Iwasa, T. Yasui, M. Irahara, T. Osugi, K. Tsutsui. 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. Journal of Endocrinology, 199:105-112.
5) Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, P.J. Sharp. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochemical and Biophysical Research Communications, 275:661-667.



نگاره ۱ـ میانگین (± انحراف معیار) بیان نسبی ژن RFRP-3 در گامه های چرخه فحلی، در داین سفالن موش صحرایی (n=۳).



نگاره ۲ـ میانگین (± انحراف معیار) بیان پپتید RFRP-3 در گامه های چرخه فحلی، در داین سفالن موش صحرایی (n=۵). میانگین های دارای بند واژه ی همانند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>0.05).

Expression of RFamide-related peptide-3 during estrous cycle in hypothalamus of rat

Farid Pazhoohi [1], Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi [2], Mohammad Javad Zamiri [2], Mohammad saied Salehi *[1], Mohammad Reza Namavar [3], Ali Niazi [4], Amin Ramazani [4], Nader Tanideh [5], Amin Tamadon [6]

1- Graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 3- Histomorphometry and Stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 4- Biotechnology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, 5- Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 6- Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University & Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*** Corresponding author: sisas33@gmail.com**

Abstract

RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) has an inhibitory role in gonadotropin secretion in rodents' brain, and is a homolog of gonadotropin inhibitory hormone (GnIH). The aim of the present study was to evaluate the expression levels of RFRP-3 mRNA and peptide during estrous cycle in the brain of rats. Real time PCR was performed on tissue samples to determine expression of RFRP-3 mRNA and immunohistochemistry analysis was used to determine RFRP-3 peptide expression. The expression of RFRP-3 mRNA was not significantly different in diencephalon of rats during the estrous cycle ($P>0.05$), while number of RFRP-3 expressing neurons was significantly lower at proestrous and early estrous in comparison to estrous, metestrous and diestrous phases ($P<0.05$). It is likely that expression of RFRP-3 gene during the estrous cycle may not be controlled at the transcriptional level.

Keywords: RFamide-related peptide-3, Estrous cycle, Hypothalamus, Rat