Physiology and Pharmacology, 17 (3), 286-297
Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

Study of sex differences in the expression of β-actin gene in various tissues of the rat

Nematollah Ahangar[1], Khadijeh Sharifi[2], Leila Sattarian[2], Masoumeh Jorjani[2*]

1. Pharmaceutical Sciences Research Center & Dept. of Toxicology/Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Dept. of Pharmacology &Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 8 Jul 2013 **Accepted: 29 Aug 2013**

Abstract

Introduction: Beta-actin is a housekeeping gene, which is used as an internal standard in various biological studies. Recently, it was reported that the expression of commonly used housekeeping genes including ß–actin changes in disease states or under certain experimental conditions. Based on the reports about the effects of sex hormones on the expression of the ß- actin gene, in this study, we examined the sex differences in the expression levels of ß- actin gene in different tissues of the rat.

Methods: Total RNA was extracted from the brain, spinal cord, heart, kidney and liver tissues in male and female rats as well as uterus in females. The RT-PCR method was used to measure the levels of ß-actin gene expression in all tissues.

Results: The expression of ß-actin gene in the brain and spinal cord of male rats was significantly higher than its expression in female animals ($P<0.05$). It was also found that the expression of ß-actin gene in the heart and uterus of females were significantly higher in comparison with other tissues ($P<0.001$ and $P<0.05$ respectively). Similarly, ß-actin gene expression in the heart tissue of male rats was significantly higher than other tissues ($P<0.001$).

Conclusion: It is suggested to validate the constancy of ß-actin gene expression under the experimental condition, before using this house keeping gene as an internal standard in molecular biology studies.

Key words: ß-actin, Sex differences, Rat tissues, RT-PCR

* Corresponding author e-mail: msjorjani@sbmu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۳)، ۲۸۶ – ۲۹۷
پاییز ۱۳۹۲

IRANIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY
انجمن فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
تاسیس ۱۳۴۷

بررسی تفاوت جنسی در بیان ژن بتا اکتین در بافت‌های مختلف موش صحرایی

نعمت الله آهنگر[۱]، خدیجه شریفی[۲]، لیلا ستاریان[۲]، معصومه جرجانی[۲*]

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی و گروه سم شناسی/ داروشناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری

۲. گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۷ تیر ۹۲ پذیرش: ۷ شهریور ۹۲

چکیده

مقدمه: بتا اکتین نوعی ژن House Keeping است که به عنوان استاندارد داخلی، در مطالعات مختلف بیولوژی سلولی و مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق برخی مطالعات، بیان اینگونه ژنها تحت تأثیر بیماریها و یا شرایط آزمایش قرار می‌گیرد. با توجه به وجود گزارشاتی مبنی بر نقش هورمونهای استروئیدی جنسی در بیان ژن بتا اکتین، در مطالعه حاضر تفاوت جنسی این ژن در بافت‌های مختلف موش صحرایی را مورد بررسی قرار دادیم.

روش ها: RNA کل از نمونه های بافتی مغز، نخاع، قلب، کلیه، کبد هر دو جنس و نیز رحم حیوان ماده استخراج شده، با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی بیان ژن بتا اکتین در تمامی نمونه ها اندازه گیری و با هم مقایسه گردید.

یافته ها: مقایسه بیان این ژن در بافت‌های مختلف دو جنس حاکی از بیان معنی دار و بالاتر این ژن در بافت مغز و نخاع حیوان نر نسبت به حیوان ماده می‌باشد ($P<۰/۰۵$). همچنین مشخص شد در حیوانات ماده ، بیان ژن بتا اکتین در بافتهای قلب و رحم به مراتب بیشتر از سایر بافت‌ها می‌باشد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ و $P<۰/۰۵$). در جنس نر نیز میزان بیان این ژن در بافت قلب اختلاف معنی داری با سایر بافتها داشت ($P<۰/۰۱$).

نتیجه گیری: توصیه می‌شود در مطالعات بیولوژی مولکولی، پس از بررسی بیان ژن House Keeping مورد نظر در شرایط خاص آن آزمون و حصول اطمینان از عدم تغییر میزان بیان ژن مربوطه، به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بتا اکتین، تفاوت جنسی، بافت‌های موش صحرایی، RT-PCR

مقدمه

بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در بافتهای مختلف امری رایج و کارآمد بوده و به منظور اندازه گیری و مطالعه تغییرات بیان آنها و مقایسه سطوح mRNA از تکنیکهای مختلفی استفاده می‌شود. RT- PCR کمی یکی از روش‌های رایج برای انجام این کار می‌باشد که امروزه این تکنیک به همراه micro-array به میزان گسترده ای برای اندازه گیری بیان ژنها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۶، ۳۵]. البته وجود اشتباهات کوچک ناشی از تنوع در مقدار RNA در شروع این آزمایش‌ها می‌تواند نتایج آن را تحت تأثیر قرار داده و تفسیر آنها را با مشکل مواجه سازد. این موضوع به ویژه در مواقعی که نمونه ها از افراد مختلف به دست آمده باشد بیشتر مطرح است [۲۲، ۲۸]. به طور کلی دو شیوه مختلف برای اندازه گیری بیان ژن به کار برده می‌شود: کمی مطلق و کمی نسبی یا نیمه کمی. در روش کمی مطلق، تعداد نسخه های یک ژن با توجه به منحنی استاندارد رسم شده برای یک ژن هدف با تعداد نسخه های مشخص استخراج می‌شود در حالیکه در تعیین مقدار نیمه کمی سطوح ژن مورد نظر نسبت به یک ژن مرجع که ژن کنترل داخلی یا استاندارد داخلی نامیده می‌شود و تصور

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: msjorjani@sbmu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

می‌شود بیان آن در شرایط مختلف ثابت است، اندازه گیری می‌شود [۶، ۲۷].

بنابراین استفاده از ژن‌هایی به عنوان استاندارد داخلی که Housekeeping Gene (HKG) نیز نامیده می‌شوند، جهت نرمال سازی داده‌ها در روش نیمه کمی، یک امر مهم و ضروری خواهد بود [۶، ۱۹، ۲۷]. متداول‌ترین HKG که مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از:آلبومین [۸] بتا و گاما اکتین [۲۵، ۳۳]، سیکلوفیلین [۱۶، ۲۵، ۳۳]، یوبی کوئیتین [۲۵]، GAPDH [۳۲، ۳۳]، آلفا و بتا توبولین [۱۱، ۳۳]، 18S و 28s rRNA [۲، ۹] و HPRT [۲۹]. بر طبق گزارشات موجود بیش از ۹۰٪ مطالعاتی که نسخه برداری از RNA را آنالیز نموده‌اند و در نشریات معتبر هم نتایج خود را منتشر کرده‌اند تنها از یک HKG استفاده نموده‌اند [۲۶].

اگرچه مدت‌های مدید تصور می‌شد که این گونه ژن‌ها در تمامی سلول‌ها ظهور ثابتی داشته و حضور آنها در سلول‌های مختلف متغیر نیست [۶، ۳۴]، اما این بدان معنا نیست که بیان آن‌ها توسط فاکتورها و عوامل خارجی تنظیم نمی‌شود [۲۵، ۲۷]. در سال‌های اخیر با به کارگیری روش‌های RT-PCR و Real time PCR گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر عواملی چون هایپوکسی [۳۹]، پیوند [۲۴]، بیماری‌هایی مانند آسم [۱۲] و استروئیدهای جنسی [۳۴] بر تغییر بیان HKGs ارائه شده است.

بتا اکتین ازجمله HKGs است که جهت نرمال کردن داده‌ها و به عنوان استاندارد داخلی، در مطالعات مختلف بیولوژی سلولی و مولکولی مانند ارزیابی تغییرات بیان ژنها بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۰]. اکتین فراوان‌ترین پروتئین موجود در سلولهای یوکاریوت را تشکیل می‌دهد که شامل ۳ ایزوفرم اصلی α ,β,γ می‌باشد. این پروتئین‌ها نقش‌های کلیدی در حرکت و اسکلت سلولی ایفا می‌کنند [۱۴]. β وγ اکتین تقریباً در تمام انواع سلول‌ها یافت می‌شوند در حالیکه α اکتین معمولاً به سلولهای عضلانی صاف محدود می شود [۱۴، ۳۱].

علی رغم استفاده گسترده از ژن بتا اکتین بعنوان یک استاندارد داخلی، در مورد ثبات بیان آن در شرایط مختلف نمی‌توان با قطعیت اظهار نظر کرد [۱۰، ۱۸] و نتایج برخی تحقیقات بیانگر این است که بتا اکتین HKG مناسبی بعنوان کنترل داخلی نبوده و عواملی نظیر ویروس HSV-1 [۳]، هورمونها [۱۳]، افزایش قند خون [۴]، روزه داری و گرسنگی و عادات غذایی [۱۵، ۳۷]، ورزش [۱۷] و هیپوکسی [۳۹] می‌توانند بیان بتا اکتین را دستخوش تغیر کنند. در مورد تأثیر جنسیت و شرایط هورمونی بر بیان ژن اکتین، گرچه گزارشاتی در مهره داران غیر پستاندار و نیز در مورد تأثیر هورمون اگزوژن بر روی بیان ژن ارائه شده است، لیکن تنها در یک مطالعه بر روی هپاتوسیتهای موش صحرایی تفاوت میزان بیان این ژن در موش صحرایی گزارش شده است [۳۴].

با توجه به اینکه ارگانهای مختلف بدن و بویژه سیستم عصبی مرکزی، تحت تأثیر هورمونهای جنسی قرار دارد [۲۱] و از طرفی بتا اکتین به طور گسترده و بدون توجه به جنس حیوان و نوع بافت مورد مطالعه به عنوان استاندارد داخلی در مطالعات بیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد بر آن شدیم تا در این مطالعه تأثیر تفاوت جنسی بر بیان این ژن کلیدی در بافت‌های مختلف موش صحرایی را مورد بررسی قرار دهیم تا از این رهگذر علاوه بر پی بردن به اختصاصیت بافتی در بیان ژن بتا اکتین، رهنمودی نیز برای محققین در به کارگیری استاندارد داخلی مناسب ارائه گردد.

مواد و روش ها

از موشهای صحرایی نر و ماده، بالغ و دست نخورده، نژاد Wistar استفاده شد. وزن نمونه ها معادل۲۰۰ تا۲۵۰ گرم بود. در طول دوره‌ی مطالعه، نمونه ها در حیوان خانه با شرایط یکسان نگهداری می‌شدند. این شرایط شامل دوره‌ی تاریکی و روشنایی۱۲ساعته و منظم، حرارت ۲±۲۳ درجه‌ی سانتیگراد و فراهم بودن آب و غذا در طول شبانه روز، به غیر از زمان آزمون بود. تمامی آزمایشات این تحقیق مطابق با اصول رعایت اخلاق در مطالعات حیوانی مورد تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

حیوانات متعاقب ۲۰ ثانیه مواجهه با گاز CO_2 بیهوش شده، توسط جراحی، بافت‌های مختلف مغز، نخاع، قلب، کبد، کلیه و رحم (در حیوان ماده) از بدن حیوان خارج شد. نمونه های بافت پس از جداسازی به میکروتیوب استریل

جدول ۱- توالی ها و مشخصات پرایمرهای استفاده شده در PCR

Gene	Sequence	position	Anneal temperature (°C)	PCR product size (bp)	GeneBank accession number
β-Actin	F 5´-gaagtaccccattgaacacg-3´	282-301	55	849	EF156276
	R 5´-gacagtgaggccaggataga-3´	1130-1111			

منتقل شده، تا زمان استخراج RNA در نیتروژن مایع (دمای ۱۸۰ ^{o}C-) نگهداری می‌شدند.

از روش RT-PCR به منظور ارزیابی تغییر در میزان بیان ژن β-actin استفاده شد. بدین منظور ۱μg از RNA استخراج شده به همراه مخلوط واکنشی که در ادامه می‌آید، در حجم نهایی ۲۰μl جهت واکنش RT و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت: (بافر ۱X واکنش RT، ۲۵۰mMKCl، ۲۰mM $Mgcl_2$، ۵۰mMDTT، ۲۵۰mM Tris HCl، pH ۸/۳ و ۲۵^{o}C) به میزان ۵μl، آنزیم M-Mulv ۲۰iu/μl (Fermentas) به میزان ۱μl، Rnasin۴۰iu/μl (Fermentas) به میزان ۰/۵μl، dNTP ۲۵mM (سیناژن) به میزان ۱/۵μl، DEPC Water به میزان ۶/۵μl و ۰/۵μg/μl OligodT (Fermentas) به میزان ۰/۱μl واکنش RT در دمای ۴۲^{o}C به مدت ۶۰ دقیقه انجام و در انتها برای غیرفعال کردن آنزیم M-Mulv در دمای ۷۰^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

از cDNA به دست آمده از هر نمونه بافتی، جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی β-actin انجام پذیرفت. توالی و دمای annealing پرایمرهای اختصاصی PCR برای β-actin در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. پرایمرهای اختصاصی β-actin با استفاده از نرم افزار Primer3 در سایت http://www.genome.wi.mit.edu طراحی شده و توسط نرم افزار BLAST در سایت NCBI به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov مورد تأیید مجدد قرار گرفت. محصول PCR تولید شده توسط پرایمرهای β-actin جهت تأیید، تعیین توالی شده (VCB biotech, Austria) و نتایج آن در GeneBank ایندکس شد. پرایمرها ساخت شرکت سیناژن ایران بودند.

اندازه‌ی قطعه‌ی مورد انتظار برای انجام واکنش PCR، ۸۴۹ جفت باز بود. جهت انجام PCR از cDNA به میزان ۵μl به همراه مخلوط واکنشی زیر در حجم نهایی ۵۰μl استفاده شد: ۲۵mM dNTP۲μl، $Mgcl_2$۱/۵μl، ۵iu/μlTaq۰/۵μl (سیناژن)، ۱۰X PCR buffer ۵μl، ۱۰μM ۱μl از هرکدام از پرایمرهای پیش رو و پس رو و در نهایت آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۵۰μl.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه Touchgene Gradient thermocycler (Techne, UK) و با شرایط زیر انجام گرفت:

۱. ۹۴^{o}C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)
۲. ۳۰ سیکل شامل: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴^{o}C، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵^{o}C ، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲^{o}C
۳. ۷۲^{o}C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل).

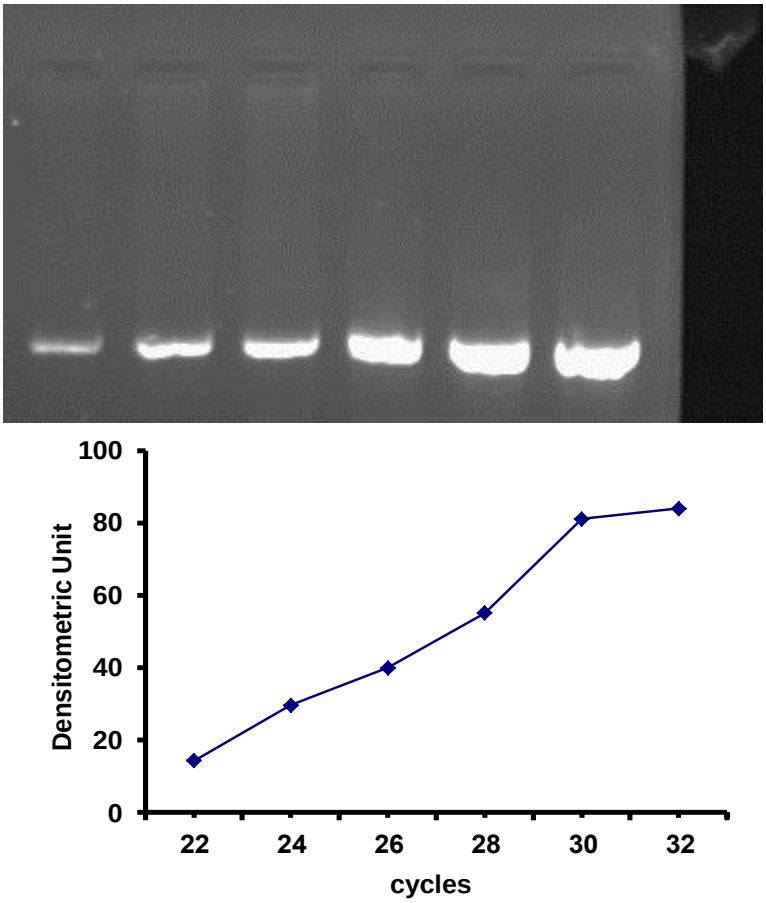
شرایط واکنش PCR شامل تعداد سیکل‌ها و میزان cDNA استفاده شده، به گونه ای تنظیم شد تا میان تعداد سیکل‌ها و محصول PCR و نیز میزان cDNA ورودی و محصول PCR رابطه ای خطی برقرار باشد.

۵μl از محصول هر PCR پس از مخلوط شدن با بافر مخصوص loading به چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ اضافه شدند. در دو طرف نمونه ها، دو نمونه از DNA ladder با فواصل ۱۰۰bp اضافه گردید. الکتروفورز به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت و در دمای آزمایشگاه انجام و ژل مورد استفاده در هنگام ساخت توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel documentation قرار گرفته و تحت نور UV با زمان acquisition ۱ ثانیه، از آن عکس برداری و تصویر به دست آمده ذخیره گردید.

با استفاده از نرم افزار Lab works (UVP, UK)، دانسیته ی باند مربوطه محاسبه و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021



شکل ۱- رابطه‌ی میزان محصول PCR با تعداد سیکل ژن بتااکتین

در گروه‌های مختلف آزمایشی نتایج بر حسب Densitometric Unit و به صورت Mean + SEM ارائه گردیده است. مقایسه‌ی بین میانگین گروه‌ها در بیان ژن بتا اکتین با استفاده از روش One Way ANOVA, Tukey Post-test یا t-test انجام شد. در این مطالعه P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی میزان محصول PCR نسبت به تعداد سیکل تکثیر واکنش PCR برای قطعه ای از ژن بتا اکتین به طول ۸۴۹bp نشان داد که میزان محصول در فاصله ۳۰-۲۲ سیکل تکثیر، به طور خطی افزایش می‌یابد (شکل ۱).

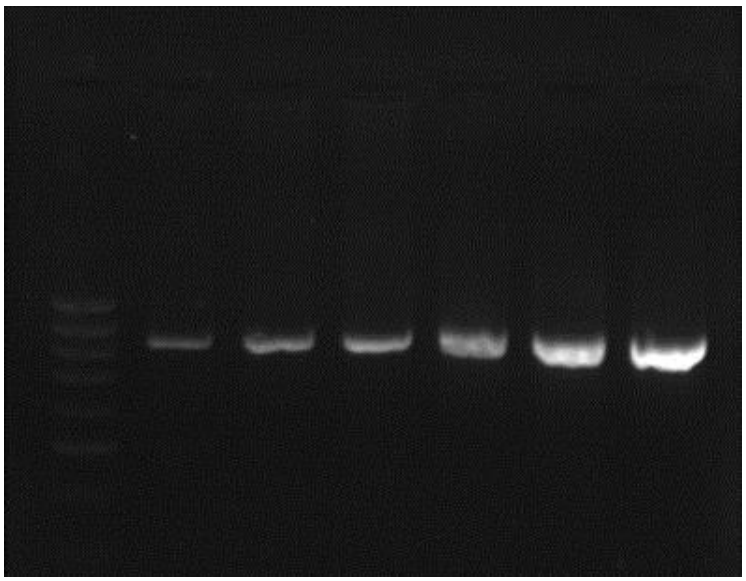
بررسی میزان محصول PCR پس از ۳۰ سیکل نسبت به حجم اولیه cDNA استفاده شده برای تکثیر قطعه ای از ژن بتا اکتین به طول ۸۴۹ bp نشان داد که میزان محصول در محدودهٔ ۶-۱ میکرولیتر خطی است (شکل۲).

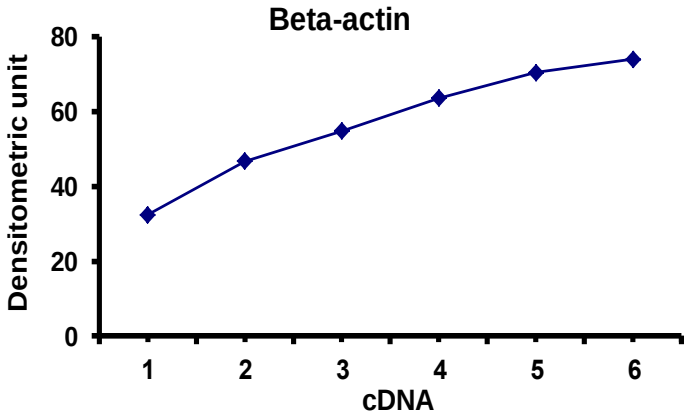
میزان بیان ژن بتا اکتین در بافت قلب (۵۶/۸۹±۷/۴۹) حیوان ماده نسبت به همه بافت‌ها اختلاف معنی داری داشته و بالاتر است (P<۰/۰۵ در مقایسه با رحم و P<۰/۰۰۱ در مقایسه با سایر بافتها). به همین ترتیب میزان بیان این ژن در بافت رحم (۳۱/۸۱±۶/۴۹) به میزان معنی داری (P<۰/۰۵) بیش‌تر از سایر بافتها (به غیر از قلب) می‌باشد (شکلهای ۳ و ۴).

جالب اینکه در جنس نر هم میزان بیان این ژن در بافت قلب (۶۹/۹۵±۱۵/۳۷) نسبت به همه‌ی بافتها اختلاف معنی داری داشته (P<۰/۰۱ در مقایسه با مغز و نخاع و P<۰/۰۰۱ در مقایسه با کبد و کلیه) و بالاتر است (شکل‌های ۵ و۶).

مقایسه‌ی بیان ژن بتا اکتین در بافتهای مختلف دو جنس نر و ماده نشان داد که گرچه در ظاهر بیان ژن در بافتهای مختلف متفاوت است، اما چنانچه در شکل ۷ نیز دیده می‌شود میزان بیان ژن در بافت مغز و نخاع حیوانات نر در مقایسه با

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021





شکل ۲- رابطهٔ میزان محصول PCR با میزان cDNA برای ژن بتااکتین

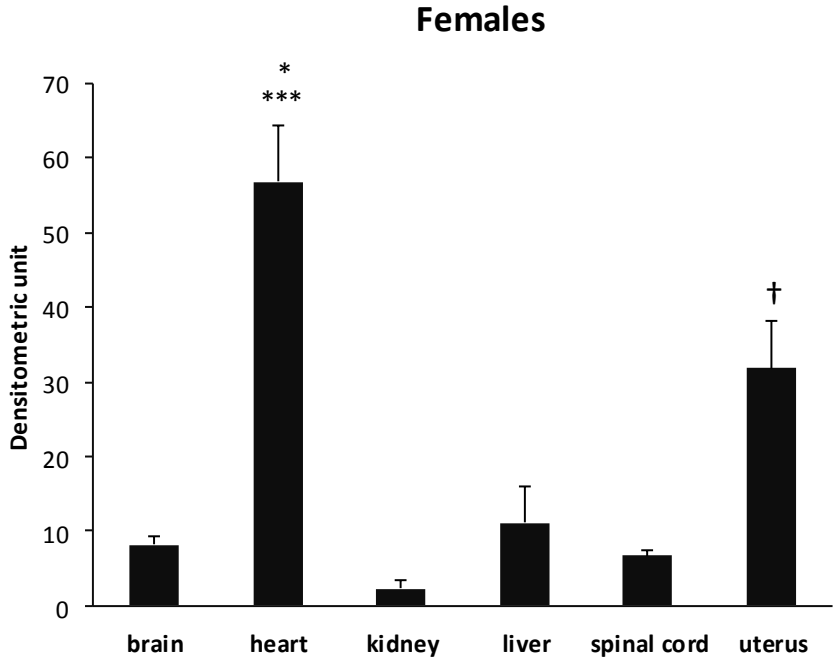
حیوانات ماده مشخصاً بالاتر بوده (حدود ۲ برابر) و این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار بود (P<۰/۰۵).

بحث

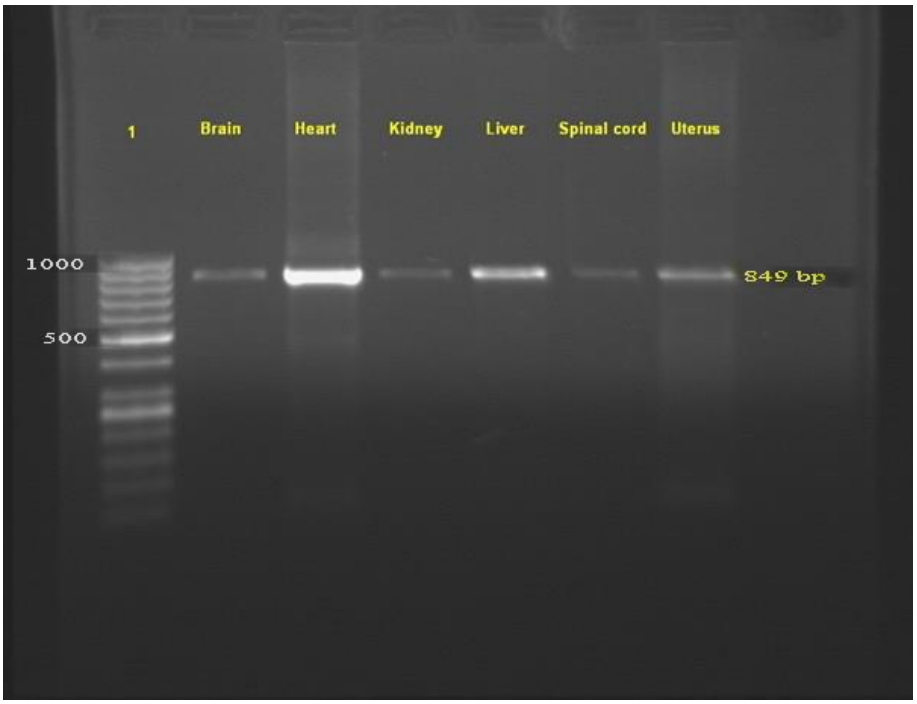
با توجه به استفاده‌ی گسترده از ژن بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی در مطالعات بیولوژی مولکولی، به عنوان یک HKG و نیز ارائه‌ی برخی مطالعات حاکی از تغییر بیان این ژن‌ها تحت تأثیر شرایط مختلف، این مطالعه به منظور بررسی بیان این ژن در بافتهای مختلف موش صحرایی در هر دو جنس نر و ماده انجام گردیده است.

نتایج حاصله حاکی از عدم ثبات بیان ژن در بافت‌های مختلف حیوان ماده بوده است که این موضوع با ادعای محققین دیگر مبنی بر یکسان بودن و عدم تغییر بیان این ژن در بافت‌های مختلف [۵، ۲۳]، هم خوانی ندارد. بیان بالاتر ژن بتا اکتین در بافت قلب به احتمال زیاد به دلیل ساختار عضلانی این بافت، شباهت آن به عضله‌ی اسکلتی، استحکام بافتی و نوع انعطاف پذیری آن می‌باشد. این موضوع به ویژه در بیماری‌های مادرزادی قلب و یا بیماری‌های عروق کرونر و نقص دیواره بین بطنی اهمیت می‌یابد؛ چرا که تفاوت بیان ژن بتا اکتین در این حالات با تکنیک RT-PCR رقابتی نیز گزارش شده است [۲۰]. پروتئین‌های اسکلت سلولی مانند اکتین در اعمال بیولوژیک سلولهای قلب از جمله حفظ یکنواختی مکانیکی سلولی، پاسخ‌های استرسی جبرانی، حرکت و سایر عملکردهای این عضله اهمیت ویژه ای دارند؛ به نحوی که بروز موتاسیون در ژن بتا اکتین یا پروتئین متصل شونده به آن موجب بروز میوپاتی های قلبی و غیر قلبی شده است. در واقع اهمیت حفظ سلولهای این ارگان حیاتی توسط

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021



شکل ۳- مقایسه میزان بیان ژن بتا اکتین در بافت های مختلف موش های ماده. داده ها به صورت Mean + S.E.M. ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ سر بود. P<۰/۰۵ :* در مقایسه با رحم، P<۰/۰۰۱ :*** در مقایسه با سایر بافتها (بجز رحم)، P<۰/۰۵ :† در مقایسه با سایر بافت ها (بجز قلب)

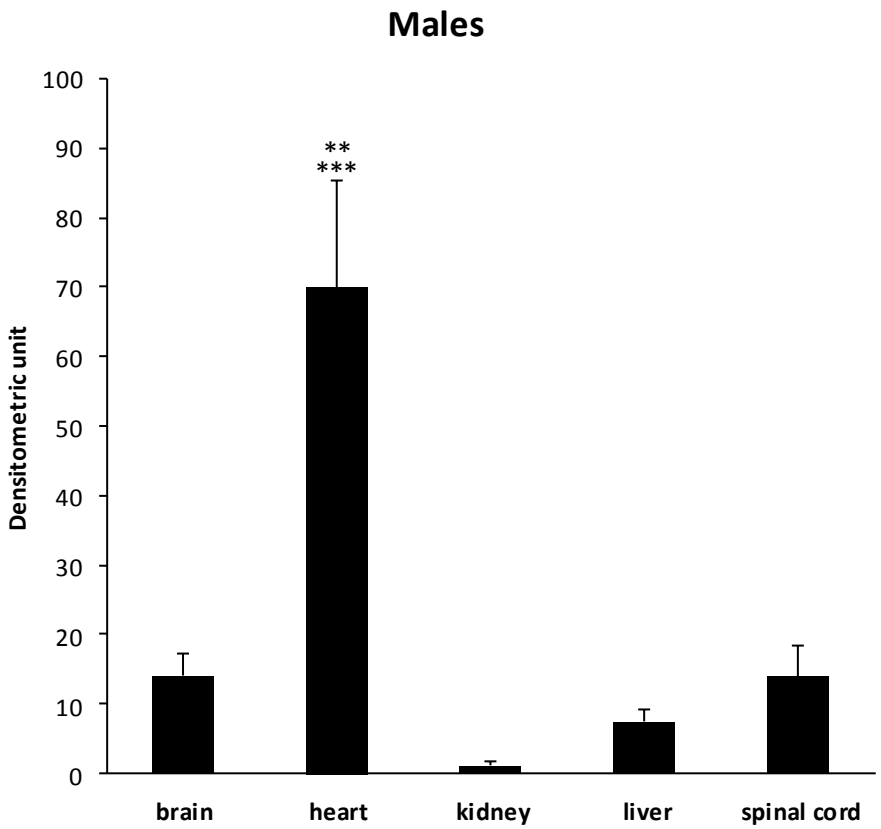


شکل٤- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن β-actin در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی ماده. ردیف ۱: ۱۰۰ bp DNA ladder

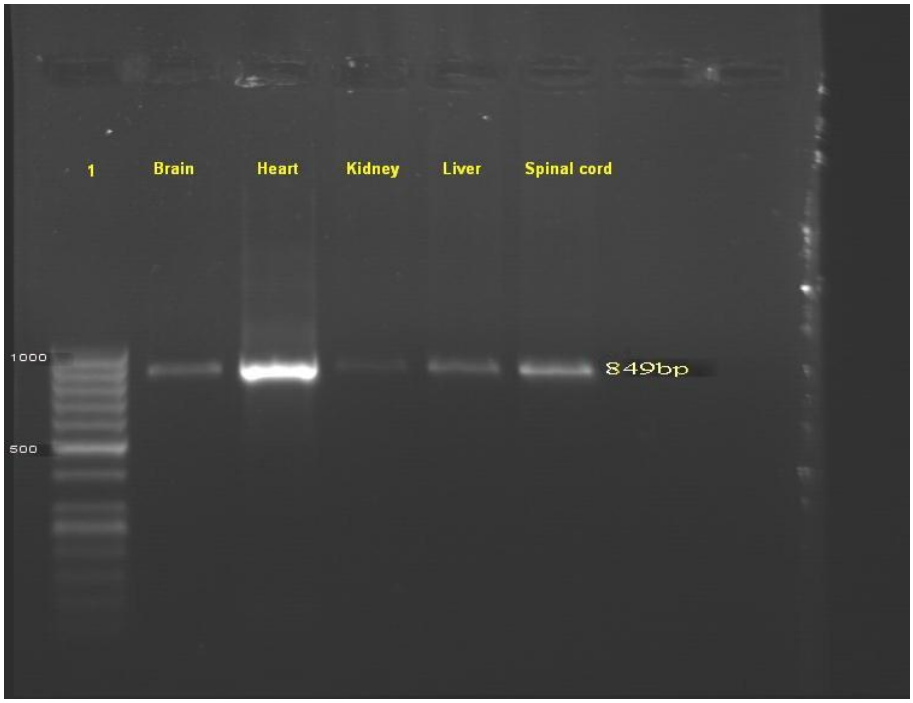
ساختار سلولی و بالابردن مقاومت قلب در مقابل استرسها و فشارهای وارده و قابلیت تطبیق با آنها ضرورت وجود مقادیر بالایی از پروتئینهای سازنده‌ی اسکلت مانند بتا اکتین را مطرح می‌سازد.

در بافت رحم نیز مسئله‌ی ساختار خاص بافت عضله‌ی صاف رحم و حضور برخی هورمونها در آن مطرح می‌گردد که با توجه به تأثیر این عوامل بر بیان این ژن، می‌توان بیان بالای این ژن در رحم را انتظار داشت. Wu X و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند که میزان بیان mRNA ایزوفرم گاما اکتین در میومتر رحم باردار انسان با میزان آن در

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

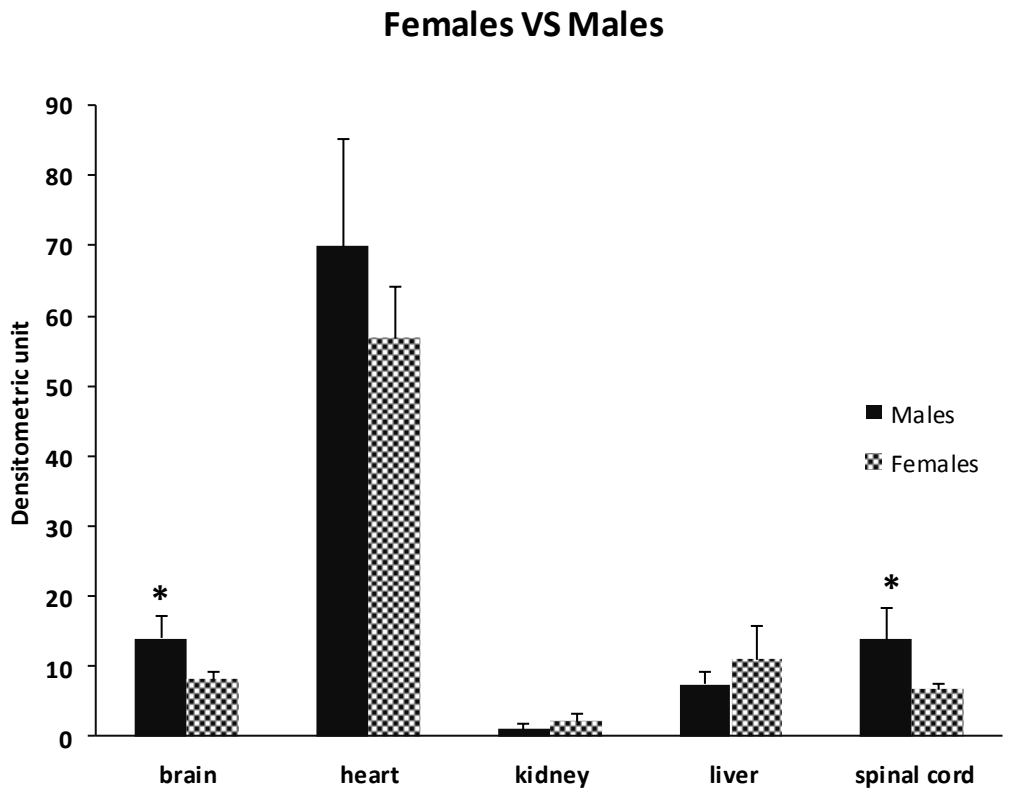


شکل۵- مقایسه ی میزان بیان ژن بتا اکتین در بافت های مختلف موش های صحرایی نر. داده ها به صورت Mean+S.E.M ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ سر بود. P<۰/۰۱ :** در مقایسه با نخاع و مغز، P<۰/۰۰۱ :*** در مقایسه با کبد و کلیه



شکل ٦- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن β-actin در بافت های مختلف موش های صحرایی نر. ردیف ۱: ۱۰۰ bp DNA ladder

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021



شکل ۷- مقایسه ی میزان بیان ژن بتا اکتین در بافت های مختلف دو جنس نر و ماده. داده ها به صورت Mean + S.E.M. ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ سر بود. P<۰/۰۵ :* بیان بیشتر ژن بتا اکتین در بافت مغز و نخاع حیوان نر در مقایسه با حیوان ماده

دوران باروری و نیز دوران یائسگی که میومتر در شرایط مختلف هورمونی قرار دارد، تفاوت قابل توجهی دارد. با توجه به اینکه سلولهای میومتر رحم از قابلیت تکثیر بیشتری برخوردار هستند و نیز به کمک تکنیک PCR با اندازه گیری بیان mRNA در واقع به گونه ای میزان تخریب اسیدهای نوکلئیک اندازه گیری می‌شود، لذا احتمال بالابودن mRNA ژن هدف بیشتر است. شاید اندازه گیری DNA که از ثبات بیشتری برخوردار است در اینگونه بافتها منطقی‌تر باشد [۳۶].

تفاوت بیان ژن در بافت‌های دو جنس نر و ماده و به ویژه مغز و نخاع ممکن است احتمال تأثیر هورمونهای جنسی بر بیان این ژن را قوی‌تر سازد. Gorzelniak و همکارانش نیز در تحقیقات خود بر این مطلب اشاره کرده‌اند [۱۳]. با توجه به تفاوت‌های مشاهده شده در بافت مغز و نخاع به نظر می‌رسد این تأثیر پذیری در بافتهای سیستم عصبی مرکزی بیشتر باشد.

استروئیدهای جنسی اعم از استروژنها، پروژستین ها و آندروژنها بسیاری از اعمال بیولوژیک خود را از طریق تأثیر بر گیرنده های اختصاصی موجود در سیتوپلاسم یا هسته اعمال می‌نمایند. پس از اتصال استروئید به گیرنده، کمپلکس لیگاند-گیرنده بخش‌های خاصی از DNA تحت عنوان Hormone Response Element را تحت تأثیر قرار داده و موجب سنتز mRNA و تولید پروتئین‌هایی می‌شوند که اثرات فیزیولوژیک آنها را در بافتهای مختلف موجب می‌گردند. بنابراین استروئیدهای جنسی به خوبی قادرند بر بیان ژنها اثر بگذارند. سنتز قابل توجه این استروئیدها در بافت عصبی (نورواستروئیدها) که به طور مستقل از محیط هم صورت می‌گیرد، در دو جنس نر و ماده یکسان نبوده و عامل مهمی در بروز دوگانگی جنسی خصوصیات آناتومیک و عملکردی سیستم عصبی مرکزی و رفتارهای خاص می‌باشند [۷، ۲۱]. در گزارشی که به بررسی تفاوت جنسی در بیان ژنها در هیپوتالاموس نوزاد موش صحرایی پرداخته است، اثرات غالب تستوسترون بر تغییرات ساختاری مغز و تنظیم افزایشی بیان ژنها در نقاطی از سیستم عصبی مرکزی مطرح شده است [۳۸]. البته امروزه اثرات متعددی از استرادیول که در واقع

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

متابولیت فعال تستوسترون نیز می‌باشد، بر روند تکامل ساختارهای عصبی، سیناپتوژنز، نوروژنز، فعالیت و مرفولوژی سلولهای گلیال، هدایت با واسطه نوروترانسمیتر ها و بسیاری از اعمال سیستم عصبی در مغز و نخاع شناخته شده است که توجیه کننده دوگانگی جنسی در بروز رفتارها و عملکرد فیزیولوژیک پستانداران می‌باشد. با توجه به مکانیسم اثر ژنومیک تستوسترون و سایر استروئید های جنسی بسیاری از رخدادهای سلولی و مولکولی حاصل تغییر بیان و فعالیت ژنها در سیستم عصبی مرکزی است [۷] که احتمال می‌رود بیان بیشتر ژن بتا اکتین در بافتهای عصبی جنس نر نیز حاصل تفاوت اثر وضعیت هورمونی دو جنس باشد. ما نیز در مطالعات قبلی خود تفاوت بیان ژن نوعی کانال پتاسیمی تحت عنوان GIRK2 را در دو جنس و در شرایط مختلف هورمونی نشان داده‌ایم که در بروز تفاوت احساس درد در دوجنس نقش داشته‌اند [۱]. توجه به تفاوتهای جنسی در بیان ژن بتا اکتین در مغز و نخاع می‌تواند علاوه بر توضیح برخی دوگانگی‌های جنسی در سطح ساختاری و عملکردی در سیستم عصبی مرکزی به حصول نتایج دقیق‌تر در مطالعات سلولی و مولکولی که از بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی استفاده می‌نمایند نیز کمک نماید.

تفاوتهای وابسته به جنس در بیان ژن بتا اکتین و سایر HKG توسط سایرین نیز گزارش شده است [۳۴]. این گزارشات علاوه بر نشان دادن دوگانگی جنسی در بیان و تنظیم ژنهای HKG باورهای موجود در خصوص ثبات بیان این ژنها را در بافتها و شرایط مختلف فیزیولوژیک یا پاتولوژیک دچار تردید می‌سازد. بدیهی است بررسی تغییرات این ژنها در شرایط محرومیت حیوان از هورمون و در حیوانات گنادکتومی شده و یا با ایجاد اختلال در محور اندوکرین تولید استروئیدهای اندوژن از طریق هیپوفیزکتومی می‌تواند جزئیات بیشتری از پدیده تنظیم وابسته به جنس HKGs را روشن سازد. بررسی تأثیر هورمونهای جنسی چه در شرایط In vivo از طریق جایگزین درمانی هورمونی در حیوانات گنادکتومی شده نر و ماده و چه در شرایط In vitro نیز می‌تواند به تکمیل اطلاعات در این زمینه کمک نموده و در عین حال نوع هورمون جنسی مسئول در بروز این تغییرات را مشخص نماید. نکته دیگر استفاده از تکنیکهای کمی مانند Real time PCR است که می‌تواند تغییرات دقیق‌تری را نشان دهد.

در مجموع و بر اساس نتایج این مطالعه و نیز سایر گزارشات موجود در خصوص تأثیر فاکتور جنس بر بیان ژن بتا اکتین و لزوم اعتبار سنجی این ژن در شرایط مختلف آزمون، توصیه می‌شود در مطالعات بیولوژی مولکولی پس از بررسی بیان HKG مورد نظر در شرایط خاص آن آزمون و حصول اطمینان از عدم تغییر میزان بیان ژن مربوطه، به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل از یافته های پژوهشی طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. ضمن تشکر از مسئولین محترم این مرکز، از همکاری خانمها دکتر افسانه حمیدی نیا و دکتر سیده عاطفه میرشفا نیز قدردانی می گردد.

References

[1] Ahangar N, Kazemi B, Jorjani M, Effects of gonadal steroid hormones on GIRK2 gene transcription in the rat central nervous system. ***Neurosci Lett*** 431 (2008) 201-205.

[2] Aswal APS, Raghav S, DE S, Thakur M, Goswami SL, Datta TK, Expression stability of two housekeeping genes (18S rRNA and GAPDH) during in vitro maturation of follicular oocytes in buffalo (Bubalusbubalis). ***Animal Reproduct Sci*** 103 (2008) 164-171.

[3] Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML, Utility of the Housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate- dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. ***Scand J Immunol*** 59 (2004) 566-573.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

[4] Bémeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Hazell AS, Vachon L, Butterworth R, Montgomery J, Decreased beta-actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. ***Neurosci Lett*** 357 (2004) 211-214.

[5] Bustin SA, Absolute quantification of mRNA using real-time reversetranscription polymerase chain reaction assays. ***J Mol Endocrinol*** 25 (2000) 169-193.

[6] Dhar AK, Bowers RM, Licon KS, Veazey G, Read B, Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. ***Mol Immunol*** 46 (2009) 1688-1695.

[7] Dubrovsky BO, Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. ***Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat*** 29 (2005) 169-192.

[8] Elrige SR, Butterworth BE, Goldsworthy TL, Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodent. ***Environ Health Perspect*** 5 (1993) 211-218.

[9] Finnegan MC, Goepel JR, Hancock BW, Goyns MH, Investigation of the expression of housekeeping genes in non-Hodgkin`s lymphoma. ***Leuk Lymphoma*** 10 (1993) 387-393.

[10] Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP, Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. ***Anim Biotechnol*** 9 (1998) 67-78.

[11] Giraldi A, Serels S, Autieri M, Melman A, Christ GJ, Endothelin-1 as a putative modulator of gene expression and cellular physiology in cultured human corporal smooth muscle cells. ***J Urol*** 160 (1998) 1856-1862.

[12] Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH, Beta-actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels. ***Thorax*** 57 (2002) 754-756.

[13] Gorzelniak K, Janke, Engeli S, Sharma AM, Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. ***Horm Metab Res*** 33 (2001) 625-627.

[14] Hunter T, Garrels JI, Characterization of the mRNAs for alpha-, beta- andgamma-actin. ***Cell*** 12 (1977) 767-781.

[15] Janovick-Guretzky NA, Dann HM, Carlson DB, Murphy MR, Loor JJ, Drackley JK, Housekeepinggene expression in bovine liver is affected byphysiological state, feed intake, and dietary treatment. ***J Dairy Sci*** 90 (2007) 2246-2252.

[16] Jaschke A, Mi H, Tropschug M, Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity. ***J Mol Biol*** 277 (1998) 763-769.

[17] Jemiolo B, Trappe S, Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. ***Biochem Biophys Res Commun*** 320 (2004) 1043-1050.

[18] Krussel JS, Huang HY, Simon C, Behr B, Pape AR, Wen Y, Bielfeld P, Polan ML, Single blastomeres within human preimplantation embryos express different amounts of messenger ribonucleic acid for beta-actin and interleukin-1 receptor type I. ***J Clin Endocrinol Metab*** 83 (1998) 953-959.

[19] Li Z, Yang L, Wang J, Shi W, Ajit R, Liu Y, Xu C, Cong W, Hu Q, Lu T, Xia F, Guo W, Zhao M, Zhang Y, Beta-actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole Cynoglossussemilaevis challenged with LPS or Vibrio Anguillarum. ***Fish Shellfish Immunol*** 29 (2010) 1-5.

[20] Mao D, Lee JK, VanVickle SJ, Thompson RW, Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. ***Biochem Biophys Res Commun*** 261 (1999) 904-910.

[21] McCarthy MM, The Two Faces of Estradiol: Effects on the Developing Brain. ***Neuroscientist*** 15 (2009) 599-610.

[22] Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV, Both β-actin and GADPH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. ***The Prostate*** 68 (2008) 1555-1560.

[23] Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A, Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. ***Biochem Biophys Res Commun*** 313 (2004) 856-862.

[24] Rokahr KL, Sharland AF, Sun J, Paradoxical early immune activation during acceptance of liver allografts compared with rejection of skin grafts in a rat model of transplantation. ***Immunology*** 95 (1998) 257-263.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 0:46 +0430 on Thursday June 24th 2021

[25] Ruan W, Lai M, Actin a reliable marker of internal control? ***Clinic Chimica Acta*** 385 (2007) 1-5.

[26] Sellayah D, Sek K, Anthony FW, Hanson MA, Cagampang FR, Sensitivity of housekeeping genes in the hypothalamus to mismatch in diets between pre- and postnatal periods in mice. ***Neurosci Lett*** 447 (2008) 54-57.

[27] Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving M, Griffiths L, Actin-an unsuitable internal control for RT-PCR. ***Mol Cell Probes*** 15 (2001) 307-311.

[28] Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, GiudicelliY,Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. ***Mol Cell Probes*** 12 (1998) 283-291.

[29] Straus DS, Marten NW, Hayden JM, Burke EJ, Protein restriction specifically decreases the abundance of serum albumin and transthyretin nuclear transcripts in rat liver. ***J Nutr*** 124 (1994) 1041-1051.

[30] Sturzenbaum SR, Kille P, Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. ***Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*** 13 (2001) 281-289.

[31] Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR, Control selection for RNA quantitation, ***Biotechniques*** 29 (2000) 332-337.

[32] Teng X, Zhang Z, He G, Yang L, Li F, Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects. ***J Insect Sci*** 12 (2012) 1-17.

[33] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman D, Coumans G, Hennen T, Housekeeping genes as internal standards: use and limits. ***J Biotechnol*** 75 (1999) 291-295.

[34] Verma AS, Shapiro BH, Sex-dependent expression of seven housekeeping genes in rat liver. ***J Gastroenterol Hepatol*** 21 (2006) 1004-1008.

[35] Weyrich A, Axtner J, Sommer S, Selection and validation of reference genes for real-time RT-PCR studies in the non-model species Delomyssublineatus, an endemic Brazilian rodent. ***Biochem Biophys Res Commun*** 392 (2010) 145-149.

[36] Wu X, Englund K, Lindblom B, Blanck A, mRNA-expression of often used housekeeping genes and the relation between RNA and DNA are sex steroid-dependent parameters in human myometrium and fibroids. ***Gynecol Obstet Invest*** 55 (2003) 225-230.

[37] Yamada H, Chen D, Monstein HJ, Hakanson R, Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. ***Biochem Biophys Res Commun*** 231 (1997) 835-838.

[38] Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M, Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. ***J Reproduc Develop*** 49 (2003) 547-552.

[39] Zhong H, Simons JW, Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. ***Biochem Biophys Res Commun*** 259 (1999) 523-526