

Lactation effect on the mRNAs expression of RFRP-3 and KiSS-1 in dorsomedial and arcuate nuclei of the rat hypothalamus

Seyedeh Leili Asadi Yousefabad¹, Amin Tamadon^{2,3*}, Farhad Rahmanifar⁴, Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi⁵, Fatemeh Sabet Sarvestani¹, Nader Tanideh^{3,6*}, Ali Asghar Abli Moghadam⁷, Ali Niazi⁷

1. Dept. of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Infertility Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

3. Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

4. Dept. of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran

5. Dept. of Animal Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

6. Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

7. Biotechnology Institute, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 20 Apr 2013

Accepted: 19 Jul 2013

Abstract

Introduction: Arginine-phenylalanine-amide-related peptide-3 (RFRP-3) and kisspeptin are believed to be inhibitor and stimulator of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion, respectively. The aim of the present study was to compare the effect of lactation on the expression of RFRP-3 mRNA in dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and KiSS-1 mRNA in arcuate nucleus (ARC) of hypothalamus in lactating and non-lactating rats.

Methods: Fourteen rats of the Sprague-Dawley strain were randomly allocated into three groups. The non-lactating rats (n=5) were separated from their pups immediately upon parturition. The lactating rats were allowed to suckle five pups for eight days (the period of increasing of lactation). Relative expressions of RFRP-3 and KiSS-1 mRNAs compared to the control group were determined in DMH and ARC of hypothalamus, respectively, by using real-time PCR.

Results: Mean of relative expression of RFRP-3 mRNA in DMH in the lactating group was higher than that of the non-lactating rats ($P=0.001$). Relative expression of KiSS-1 mRNA in ARC did not show any difference between the lactating and the non-lactating rats ($P=0.4$).

Conclusion: Increase of RFRP-3 mRNA expression in DMH of hypothalamus during the increase of milk production in rat may be the inhibitory factor for GnRH secretion. Whereas, no change in KiSS-1 mRNA expression in the ARC of the same rats may indicate the lower activity of this nucleus in the expression of the gene in both groups postpartum.

Key words: Lactation, RFRP-3 mRNA, KiSS-1 mRNA, Hypothalamus, Rat

* Corresponding authors e-mail: nadertanideh@yahoo.com
amintamaddon@yahoo.com

Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر شیردهی بر بیان mRNAهای RFRP-3 و KiSS-1 در هسته های پشتی - میانی و کمانی هیپوتالاموس موش صحرایی

سیده لیلی اسدی یوسف آباد^۱، امین تمدن^{۲،۳*}، فرهاد رحمانی فر^۴، محمدرضا جعفرزاده شیرازی^۵، فاطمه ثابت سروسستانی^۱، نادر تنیده^{۳،۶}، علی اصغر ابلی مقدم^۷، علی نیازی^۷

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۳. مرکز تحقیقات فناوری ترانس ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۴. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

۵. بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز

۶. گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۷. پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

پذیرش: ۲۸ تیر ۹۲

دریافت: ۳۱ فروردین ۹۲

چکیده

مقدمه: پپتید وابسته به آرژنین - فنیل - آلانین - آمید (RFRP) و کیس - پپتین به ترتیب به عنوان مهارکننده و محرک ترشح هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) شناخته شده اند. هدف پژوهش کنونی مقایسه اثر شیردهی بر بیان mRNAهای RFRP-3 در هسته پشتی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) و KiSS-1 در هسته کمانی (ARC) هیپوتالاموس موشهای صحرایی شیرده و غیر شیرده بود.

روش ها: چهارده موش صحرایی سویه اسپراگ - داولی انتخاب و به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. ماده های گروه غیرشیرده ($n=5$) بلافاصله پس از زایش از نوزدان خود جدا شدند. ماده های گروه شیرده ($n=5$)، هشت روز (دوره افزایش تولید شیر) به پنج نوزاد شیر دادند. چهار موش صحرایی تخمدان برداری شده به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. با استفاده از روش real-time PCR بیان نسبی mRNAهای RFRP-3 و KiSS-1 (نسبت به گروه کنترل) به ترتیب در DMH و ARC هیپوتالاموس درد و گروه موشهای صحرایی شیرده و غیرشیرده مقایسه شد.

یافته ها: بیان نسبی mRNA RFRP-3 در هسته DMH در موشهای صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود ($P=0/001$). بیان نسبی mRNA KiSS-1 در هسته ARC بین موشهای صحرایی شیرده و غیرشیرده تفاوت معنی داری نداشت ($P=0/4$).

نتیجه گیری: افزایش بیان mRNA RFRP-3 در DMH هیپوتالاموس با افزایش تولید شیر موش صحرایی ممکن است عامل مهار ترشح GnRH در این دوره باشد. در حالی که عدم تفاوت بیان mRNA KiSS-1 در هسته ARC در موشهای صحرایی بیانگر کاهش فعالیت این هسته در تولید این ژن در هر دو گروه پس از زایمان است.

واژه های کلیدی: شیردهی، RFRP-3 mRNA، KiSS-1 mRNA، هیپوتالاموس، موش صحرایی

مقدمه

مختلف در تمام دوره شیردهی مانند انسان [۱۵] و یا بخش کوتاهی از آن مانند گاو [۲] متوقف می شود. در موش صحرایی شیرده، مهار چرخه فعلی بیشتر ناشی از مهار ترشح پالسی هورمون لوتئینیزه کننده (LH) و هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) است [۲۹]. عمل مکیدن سرپستانک محرک مهمی در مهار ترشح پالسی

رشد و تکامل فولیکول و یا تخمک ریزی در پستانداران

nadertanideh@yahoo.com
amintamaddon@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسندگان مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

در تماس نزدیک با فیبرهای RFRP-3 هستند [۹]. عامل کنترل کننده دیگر ترشح GnRH در هیپوتالاموس، کیسپتین، از پیش‌سازی به نام پری‌پروکیسپتین ساخته می‌شود که فرآورده اصلی ژن KiSS-1 است. این پیش‌ساز، ۱۴۵ اسید آمینه دارد که در اثر شکستن، به فرآورده‌های پپتیدی شامل Kisspeptin-10، Kisspeptin-13، Kisspeptin-14 و Kisspeptin-54 تبدیل می‌شود [۱۱]. فرآورده پپتیدی اصلی ژن KiSS-1، پپتیدی دارای ۵۴ آمینو اسید است که بیشتر، از جفت ترشح می‌شود و متاستین نیز نامیده می‌شود [۱۸]. نورون‌های کیسپتین بیشتر در هسته کمائی^۷ (ARC) و هسته پیرابطنی جلویی-شکمی^۸ (AVPV) هیپوتالاموس مغز موش صحرایی یافت می‌شود [۱۷، ۲۶]. این توزیع آناتومیک نورون‌های کیسپتین در هیپوتالاموس دلیلی بر نقش فیزیولوژیکی آن در تنظیم آزاد سازی GnRH است، زیرا هسته‌های ARC و AVPV به ترتیب به عنوان جایگاهی برای کنترل تراوش پالسی و سرژ GnRH در نظر گرفته می‌شوند. کیسپتین، تنظیم کننده کلیدی تراوش GnRH و LH است [۲۵]. وجود گیرنده ER- α روی نورون‌های بیان کننده کیسپتین در AVPV و ARC مشخص شده است [۱۷]. بیان KiSS-1 mRNA در AVPV و ARC به وسیله استروئیدهای جنسی در خون تنظیم می‌شود [۲۶، ۲۳، ۶]. بنابراین انتظار می‌رود کیسپتین، میانجی استرادیول و GnRH باشد. از طرفی چون اثر تحریک‌کنندگی کیسپتین بر تراوش گونادوتروپین‌ها به وسیله آنتاگونیست GnRH مهار می‌شود [۲۰]، می‌توان گفت احتمالاً GnRH هیپوتالاموسی میانجی اثر کیسپتین در آزادسازی گونادوتروپین‌ها است [۲۱]. فزون بر این، گزارش شده است که کیسپتین در کنترل گونادوتروپین‌ها در گامه‌های گوناگون تولیدمثلی مانند شیردهی [۳۷] و آبستنی [۲۲]، نقش دارد. تحریکات شیرخواری در موش‌های صحرایی با مهار فعالیت نورون‌های کیسپتین موجب مهار تراوش پالسی GnRH و LH می‌شود [۱۷].

هدف پژوهش کنونی، بررسی تأثیر شیردهی بر بیان

LH در موش‌های صحرایی شیرده است؛ زیرا در موش‌های صحرایی شیرده در روز ۸ شیردهی (زمان به اوج رسیدن تولید شیر) ترشح پالسی LH به شدت مهار می‌شود ولی با جدا کردن نوزادان از مادر برای ۲۴ ساعت این پالس‌ها دوباره برقرار می‌شوند [۱۳].

تاکنون بر این باور بوده‌اند که تنظیم کننده اصلی ترشح LH و هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH)، و عامل اصلی کنترل کننده تولیدمثل، تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) از هیپوتالاموس است [۱۰]. پپتیدی دیگر به نام هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) که یک پپتید دوازده اسید آمینه‌ای از خانواده پپتیدهای آر اف آمید^۱ (آرژنین - فنیل آلانین) است، نخستین بار در سیستم هیپوتالاموس - هیپوفیزی بلدرچین شناسایی شد [۳۳]. این پپتید به دلیل اثر مهاری بر سنتز و آزادسازی گونادوتروپین‌ها به نام GnIH خوانده شد [۳۶]. GnIH پرنده‌گان، آزاد شدن LH را در همستر [۱۲] و هومولوگ آن یعنی پپتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید (RFRP) آزاد شدن LH را در انسان [۳۵] و گوسفند [۴] مهار می‌کند. نورون‌های RFRP در هسته پیرابطنی^۲ (PVN) هیپوتالاموس پرنده‌گان [۳۴] و هسته پشتی - میانی^۳ (DMH) هیپوتالاموس همستر [۱۲]، موش صحرایی [۸، ۱۲، ۲۳] و موش [۱۲] مشاهده شده‌اند. بیان نورون‌های RFRP در PVN، DMH [۳] و ناحیه پیش-بینایی^۴ (POA) [۷] هیپوتالاموس گوسفند نیز مشاهده شده است. نشان داده شده است که در مغز همستر ماده بیش از ۴۰٪ جسم نورون‌های GnRH پیوندهایی با رشته‌های نورون-های RFRP برقرار کرده‌اند؛ این سیناپس‌ها در موش صحرایی نیز به صورت کیفی مشخص شده‌اند [۱۲]. در پژوهشی دیگر RFRP-3 در جسم نورون‌های موجود در هسته‌های DMH و سرپستانکی^۵ و همچنین، پیرامون هسته شکمی - میانی^۶ (VMN) شناسایی شدند. پژوهش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که ۷۵٪ از سلول‌های GnRH،

1. RFamide peptide
2. Paraventricular nucleus
3. Dorsomedial nucleus
4. Preoptic area
5. Tubermammillary nucleus
6. Ventromedial nucleus

7. Arcuate nucleus

8. Anteroventral periventricular nucleus

کرونال برشی در جلوی ناحیه اپتیک کیاسما و برش بعدی پشت اجسام پستانی بر اساس اطلس مغز موش صحرایی [۱۹] انجام شد. برای جدا کردن ARC از AVPV برش سوم در وسط اپتیک تراکت و دقیقاً جلوی اینفاندیبولوم انجام شد [۲۴]. ناحیه شامل هسته ARC و DMH در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس به فریزر $^{\circ}\text{C} - 80$ منتقل شد.

تمام RNA با استفاده از بافر RNX-Plus (سیناژن، ایران) استخراج شد. به طور خلاصه حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت در ازت مایع پودر شد. سپس پودر بافت به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و به آن ۱ میلی لیتر بافر RNX-Plus اضافه شد. بعد از آن ۵ تا ۱۰ ثانیه میکروتیوب ورتکس شد تا بافت به طور کامل هموژنیزه شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم به میکروتیوب حاوی بافت هموژنیزه شده اضافه شده و به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه به آرامی مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای $^{\circ}\text{C} 4$ سانتریفوژ شد. بعد از اتمام سانتریفوژ، مایع رویی به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید انتقال داده شد و به میزان هم حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده و به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای $^{\circ}\text{C} 4$ سانتریفوژ شد. پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً خالی شد. به میزان ۱ میلی لیتر از اتانول ۷۵٪ به نمونه ها اضافه و به آرامی تکان داده شد و سپس ورتکس شد. بعد از ورتکس، به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ rpm در دمای $^{\circ}\text{C} 4$ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً خالی شد و برای خشک شدن زیر هود قرار گرفت. بعد از خشک شدن به میکروتیوب حاوی نمونه، ۳۵ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق زیر هود قرار گرفت. RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر X ۰/۵ که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود الکتروفورز شد. کمیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر (نانودراپ تکنولوژی، ویلمینگتون، آمریکا) اندازه گیری شد. سپس کیفیت RNA با ران کردن روی ژل آگارز بررسی شد. بعد از انجام نانودراپ

mRNA RFRP-3 در هسته DMH و بیان KiSS-1 mRNA ImRNA در هسته ARC هیپوتالاموس موش های صحرایی شیرده و غیرشیرده بود.

مواد و روش ها

چهارده موش صحرایی سویه اسپراگ-داولی (20 ± 20 گرم) در قفس های انفرادی در اتاقی با دمای $^{\circ}\text{C} 22 \pm 2$ و رطوبت 50 ± 5 درصد و تهویه ۱۲ بار در ساعت و در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. خوراک استاندارد موش صحرایی و آب به طور آزاد در دسترس آنها قرار داده شد. پژوهش بر اساس دستورالعمل مصوب اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. برای گروه کنترل چهار موش صحرایی غیرآبستن و غیرشیرده انتخاب و تخمدان برداری شدند. موش های صحرایی با تزریق درون صفاقی کتامین (100 میلی گرم به کیلوگرم، آلفازین، ووردن، هلند) و زایلازین (8 میلی گرم به کیلوگرم، آلفازین، ووردن، هلند) بیهوش شده و با روش آسپتیک برشی در زیر ناف بطول ۳ سانتیمتر در ناحیه خط میانی بدن ایجاد شد و پس از نمایان شدن تخمدان، با کنترل خونریزی، موش های صحرایی تخمدان برداری شدند و دو هفته پس از عمل جراحی به روش اخلاقی کشته شدند.

ده موش صحرایی آبستن به صورت تصادفی به دو گروه پنج تایی تقسیم شدند. دوره مطالعه از زمان زایمان تا روز هشتم پس از زایش بود. پنج موش صحرایی به عنوان گروه غیرشیرده بی درنگ پس از زایش از نوزادان خود جدا شدند. به موش های صحرایی گروه شیرده اجازه داده شد تا برای هشت روز به نوزادان خود شیر دهند. تنظیم تعداد نوزادان (پنج نوزاد برای هر ماده) از روز زایش تا هشتمین روز پس از زایش انجام شد. روز هشتم پس از زایش (همزمان با به اوج رسیدن تولید شیر)، در آغاز موش های صحرایی شیرده و غیرشیرده مادر وزن شدند و سپس موش های صحرایی مادر پس از بیهوشی با اتر به روش اخلاقی کشته شدند. پس از خارج کردن مغز از مجسمه و برداشتن قشر مخ، داینسفالون خارج شد و به شیوه

استفاده از cDNA استخراج شده به عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اجرا شد. قطعه cDNA تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱ میکرولیتر پرایمر Forward (۱۰ μM)، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۱۰ μM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ mM)، ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase و ۱۳/۶ میکرولیتر آب DEPC بود. چرخه حرارتی واکنش شامل ۲ دقیقه در ۹۴°C و ۴۰ سیکل آن در ۹۴°C برای ۱۰ ثانیه، ۵۷°C برای ۱۵ ثانیه و ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه است. بعد از ۴۰ سیکل نتایج این سیکل از ۹۵°C تا ۵۰°C ذوب شد.

به وسیله اطلاعات کمی real-time PCR، بیان نسبی KiSS1 و RFRP-3، بر اساس روش سیکل آستانه‌ای (CT)، محاسبه شد. CT هر نمونه برای ژن اصلی و کنترل داخلی با استفاده از نرم افزار Line-gene K محاسبه شد. بیان mRNAهای هدف بیش از مقادیر مرجع بود که توسط معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. در آن ΔCT با تفریق مقدار مربوط به CT GAPDH (کنترل داخلی) از CT مربوط به نمونه اصلی (KiSS-1 یا RFRP-3) محاسبه شد. $\Delta\Delta CT$ با کم کردن ΔCT هر نمونه از میانگین ΔCT گروه کنترل (موش‌های صحرایی تخمدان‌برداری شده) به دست آمد.

بعد از تایید نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-سمیرنوف، مقایسه میانگین بیان نسبی mRNAهای KiSS-1 و RFRP-3 در دو گروه موش‌های صحرایی شیرده و غیرشیرده با آزمون t مستقل انجام شد (نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵). $P < 0/01$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

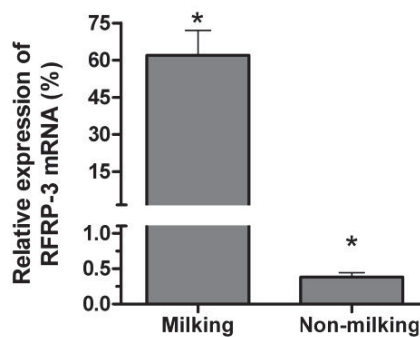
بیان نسبی mRNA RFRP-3 در هسته DMH در موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود ($P = 0/001$ ، شکل ۱). در موش‌های صحرایی شیرده میانگین بیان

RNA با توجه به روش موجود در کیت DNase (فرمنتاز، آلمان) تیمار انجام شد. ۱/۱ میکرولیتر total RNA و ۵ میکرولیتر آب DEPC و ۲ میکرولیتر آنزیم DNase میکرولیتر بافر DNase باهم مخلوط شده و با آب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس به میکروتیوب حاوی مواد مورد نظر ۲ میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ mM اضافه و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شد. در اینجا تیمار DNase به پایان رسید، در این مرحله کیفیت و کمیت RNA به وسیله نانودراپ اندازه‌گیری شد و برای اطمینان از کیفیت روی ژل آگارز ۱٪ در بافر ۱X ۰/۵ برده شد. سپس نمونه‌های استخراج شده در دمای ۸۰°C -نگه‌داری شد. رشته اول cDNA با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (First Strand cDNA Synthesis Kit) سنتز شد. ابتدا ۱۱ میکرولیتر total RNA و ۱ میکرولیتر Oligo dT (۱۰ μM) بر روی یخ به یک میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس ۴ میکرولیتر بافر ۵X و ۱/۵ میکرولیتر RNase inhibitor و ۱ میکرولیتر آنزیم Mulv و ۱ میکرولیتر آب DEPC به آنها افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲°C و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. پرایمرها با نرم افزار Allele ID 7 (Premier Biosoft International، آمریکا) برای ژن مرجع KiSS-1 (NM_181692) و RFRP-3 (NM_023952) طراحی شدند. ژن گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) در موش صحرایی (M32599) به عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد (جدول ۱).

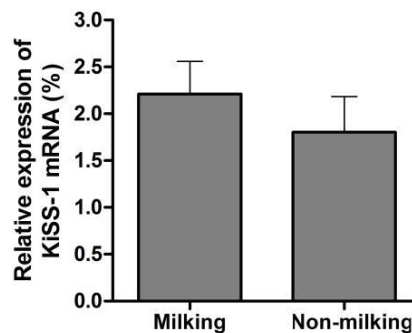
میکروتیوب حاوی رشته اول cDNA در دمای ۲۰°C -نگهداری شد. رشته اول cDNA سنتز شده بر روی ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و از کیفیت مطلوب آن که یک اسمیر از زیر چاهک به پایین ژل است، اطمینان حاصل شد. در حین سنتز cDNA نمونه‌ای نیز به عنوان کنترل منفی گذاشته شد به طوری که در این نمونه آنزیم Mulv اضافه نشد تا آلودگی ژنومی مشخص شود. با

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های KiSS-1، RFRP-3 و GAPDH در موش صحرایی

Primer	Primer sequence	Amplicon length (bp)
KiSS-1-F	5' TGCTGCTTCTCCTCTGTG 3'	116
KiSS-1-R	5' CCAGGCATTAACGAGTTCC 3'	
RFRP-3-F	5' CTCAGCAGCCAACCTTCC 3'	165
RFRP-3-R	5' AAACCAGCCAGTGTCTTG 3'	
GAPDH-F	5' AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC 3'	112
GAPDH-R	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG 3'	



شکل ۱- میانگین و خطای استاندارد میزان بیان نسبی RFRP-3 mRNA در هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) موش‌های صحرایی شیرده و غیر شیرده ($n=5$ و $*P<0.05$).



شکل ۲- میانگین و خطای استاندارد میزان بیان نسبی KiSS-1 mRNA در هسته کمانی (ARC) هیپوتالاموس موش‌های صحرایی شیرده و غیر شیرده ($n=5$).

نشان داد. یافته‌های پژوهش پیشین ما با روش ایمینوهیستوشیمی نشان داد که تعداد نورون‌های بیان کننده نوروپتید RFRP-3 در هسته DMH موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود [۱]. این دو یافته نشان دهنده اثر کنترلی RFRP-3 در سطح رونویسی و ترجمه در زمان شیردهی بر مهار تولیدمثل موش صحرایی است. از سوی دیگر افزایش سطح پرولاکتین ممکن است به طور مستقیم در مهار تراوش GnRH نقش داشته باشد [۱۶]. نشان داده شده است که RFRP در موش صحرایی، محرک ترشح پرولاکتین

RFRP-3 mRNA بیش از ۱۶۰ برابر موش‌های صحرایی غیرشیرده بود. بیان نسبی KiSS-1 mRNA در هسته ARC بین موش‌های صحرایی شیرده و غیرشیرده تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0.04$ ، شکل ۲).

بحث

یافته‌های پژوهش کنونی افزایش بیان RFRP-3 mRNA در نورون‌های هسته DMH موش‌های صحرایی شیرده را

پایانه‌های عصبی GnRH که در ME وجود دارند سبب تحریک آزادسازی GnRH می‌شوند [۳۷]. در موش صحرایی نورون‌های کیس‌پتین در هسته AVPV میانجی اثر بازگشتی مثبت استرادیول بر تراوش ناگهانی GnRH و LH و در هسته ARC میانجی اثر بازگشتی منفی استرادیول بر تراوش پالسی GnRH و LH هستند.

افزایش بیان RFRP-3 mRNA در DMH هیپوتالاموس با افزایش تولید شیر موش صحرایی در روز هشتم بعد از زایمان ممکن است عامل مهار ترشح GnRH در این دوره و غیرفعال بودن فعالیت تخمدانی باشد. در حالی که در موش-های پس از زایمان شیرده و غیرشیرده، عدم تغییر میزان بیان KiSS-1 mRNA در هسته ARC احتمالاً نشان دهنده کاهش فعالیت این هسته در تولید KiSS-1 mRNA بعد از زایمان در موش صحرایی است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند. هزینه‌های این پژوهش از محل بودجه طرح شماره ۹۰-۰۱-۶۷-۳۹۴۰ معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز و مدیریت امور علمی دانشگاه شیراز تأمین شد.

است [۵]. فزون بر این، تزریق بروموکریپتین (آگونیست دوپامین) نتوانست کاهش ایجاد شده در بسامد پالس‌های LH در نیمه اول دوره شیردهی را به حالت اولیه باز گرداند [۱۴، ۲۷، ۳۰]، که نشان می‌دهد پرولاکتین در مهار ترشح LH در اوایل و اواسط دوره شیردهی اهمیت کمتری دارد [۲۸، ۳۱، ۳۲]. بنابراین بیان بیشتر RFRP-3 در نورون‌های DMH ممکن است به طور مستقیم سبب مهار محور تولیدمثلی شود.

در پژوهش کنونی بیان ژن KiSS-1 در ARC موش‌های صحرایی شیرده با موش‌های صحرایی غیرشیرده تفاوت نداشت. متفاوت با نتایج این پژوهش نشان داده شد که تحریکات شیرخواری در موش صحرایی شیرده تخمدان‌برداری شده بیان KiSS-1 mRNA در هسته ARC و گیرنده‌های GPR54 در AVPV را کاهش می‌دهد و بر بیان KiSS-1 mRNA در AVPV و POA اثر معنی‌داری نداشت [۳۷]. علاوه بر تعداد نوزادان شیرخوار در این پژوهش (۸ نوزاد) نسبت به پژوهش کنونی (۵ نوزاد)، موش‌های صحرایی پژوهش کنونی تخمدان‌برداری نشدند تا اثر شیردهی در حضور تخمدان بررسی شود. از طرفی تزریق کیس‌پتین به موش‌های صحرایی تخمدان‌برداری شده شیرده با افزایش بیان KiSS-1 موجب افزایش تراوش پالسی GnRH و LH شد [۳۷]. نورون‌های کیس‌پتین در هسته ARC به وسیله گیرنده GPR54 بر روی نورون‌های GnRH در POA و یا با فعالیت

References

- [1] Adavi H, Jafarzadeh Shirazi M, Zamiri M, Namavar M, Tanideh N, Tamadon A, Effect of lactation on the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in dorsomedial and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 164-172.
- [2] Butler WR, Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 60-61 (2000) 449-457.
- [3] Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinol* 149 (2008) 5811-5821.
- [4] Dardente H, Birnie M, Lincoln GA, Hazlerigg DG, RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Endocrinol* 20 (2008) 1252-1259.
- [5] Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M, New

- neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 703-708.
- [6] Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA, Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of kiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinol* 80 (2004) 264-272.
- [7] Jafarzadeh Shirazi MR, Namavar MR, Tamadon A, Expression of gonadotropin inhibitory hormone in the preoptic area and its relation with phases of estrous cycle of ewe. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 90-96.
- [8] Jafarzadeh Shirazi MR, Pazhoohi F, Zamiri MJ, Salehi MS, Namavar MR, Tamadon A, Tanideh N, Zarei A, Tsutsui K, Expression of RFamide-related peptide in the dorsomedial nucleus of hypothalamus during the estrous cycle of rats. *Physiol Pharmacol* 17 (2013) 72-79.
- [9] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51 (2007) 171-180.
- [10] Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM, Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod* 56 (1997) 303-309.
- [11] Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M, The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276 (2001) 34631-34636.
- [12] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 2410-2415.
- [13] Maeda K-I, Tsukamura H, Uchida E, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A, Changes in the pulsatile secretion of LH after the removal of and subsequent resuckling by pups in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol* 121 (1989) 277-283.
- [14] Maeda KI, Uchida E, Tsukamura H, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A, Prolactin does not mediate the suppressive effect of the suckling stimulus on luteinizing hormone secretion in ovariectomized lactating rats. *Endocrinol Jpn* 37 (1990) 405-411.
- [15] McNeilly AS, Lactational control of reproduction. *Reprod Fertil Dev* 13 (2001) 583-590.
- [16] McNeilly AS: Suckling and the control of gonadotropin secretion; in Neill JD (ed) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. St. Louis, MO, USA, Academic Press, 2006, pp 2511-2551.
- [17] Ohkura S, Uenoyama Y, Yamada S, Homma T, Takase K, Inoue N, Maeda K, Tsukamura H, Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides* 30 (2009) 49-56.
- [18] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M, Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411 (2001) 613-617.
- [19] Paxinos G, Watson C, editors *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. New York: Academic Press, 2007.
- [20] Richard N, Galmiche G, Co rvaissier S, Caraty A, Kottler ML, KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 20 (2008) 381-393.
- [21] Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 30 (2009) 57-66.
- [22] Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M, Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinol* 147 (2006) 2864-2878.
- [23] Salehi MS, Jafarzadeh Shirazi MR, Zamiri MJ, Pazhoohi F, Namavar MR, Niazi A, Ramezani A, Tanideh N, Tamadon A, Hypothalamic expression of KiSS1 and RFamide-related peptide-3 mRNAs during the estrous cycle of rats. *Int J Fertil Steril* 6 (2013) 304-309.
- [24] Salehi MS, Namavar MR, Jafarzadeh Shirazi MR, Rahmanifar F, Tamadon A, A simple technique for

- separation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei in the rat hypothalamus. *Anatomy* (2013) in press.
- [25] Smith JT, Clarke IJ, Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord* 8 (2007) 1-9.
- [26] Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26 (2006) 6687-6694.
- [27] Smith MS, The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. *Biol Reprod* 19 (1978) 77-83.
- [28] Smith MS, Grove KL, Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol* 23 (2002) 225-256.
- [29] Tsukamura H, Maeda KI, Nonmetabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res* 133 (2001) 187-205.
- [30] Tsukamura H, Maeda KI, Ohkura S, Uchida E, Yokoyama A, Suppressing effect of the suckling stimulus on the pulsatile luteinizing hormone release is not mediated by prolactin in the rats at mid-lactation. *Jpn J Anim Reprod* 37 (1991) 59-63.
- [31] Tsukamura H, Ohkura S, Coen CW, Maeda KI, The paraventricular nucleus and corticotrophin-releasing hormone are not critical in suppressing pulsatile LH secretion in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol* 137 (1993) 291-297.
- [32] Tsukamura H, Ohkura S, Maeda KI, The endogenous opioids do not mediate the suckling-induced suppression of LH secretion in lactating rats. *J Reprod Dev* 38 (1992) 159-164.
- [33] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 661-667.
- [34] Tsutsui K, Saigoh E, Yin H, Ubuka T, Chowdhury VS, Osugi T, Ukena K, Sharp PJ, Wingfield JC, Bentley GE, A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotrophin-inhibitory hormone in birds: discovery, progress and prospects. *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 271-275.
- [35] Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS ONE* 4 (2009) e8400.
- [36] Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K, Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinol* 147 (2006) 1187-1194.
- [37] Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda K-I, Tsukamura H, Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148 (2007) 2226-2232.