



تأثیر بذر گیاه خارمریم بر بیان ژن اینترلوکین 6 (IL-6) در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین B₁

مجتبی فروزان مهر^{۱*}، محمد باقر منتظر تربتی^۲، نظر افضلی^۳، امید فانی مکی^۱، عباس شیبک^۱

۱- دانش آموختگان مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه بیرجند ۲- استادیار دانشگاه بیرجند ۳- دانشیار دانشگاه بیرجند

* mojtabafrozanmehr@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق اثرات آفلاتوکسین B₁ و بذر گیاه خار مریم در جیره جوجه‌های گوشتی بر بیان ژن اینترلوکین 6 به روش نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۶ تکرار صورت گرفت. چهار تیمار اعمال شده عبارت بودند از: (۱) شاهد (بدون دریافت آفلاتوکسین B₁ و بذر گیاه خار مریم)، (۲) ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ در هر کیلو گرم خوراک، (۳) ۱ درصد بذر گیاه خار مریم در هر کیلو گرم خوراک، (۴) ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ و ۱ درصد بذر گیاه خار مریم در هر کیلو گرم خوراک. کشتار جوجه‌ها در سن ۳۵ روزگی انجام گرفت و از هر تکرار به طور تصادفی ۳ نمونه بافتی کبد جمع آوری گردید. پس از استخراج RNA از بافت کبد رونویسی معکوس به عمل آمد و سپس واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن اینترلوکین 6 صورت گرفت. محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای پلی‌مراز جهت نمایان سازی بر روی ژل الکتروفورز برده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن اینترلوکین 6 در تیمار دوم و چهارم کاهش، اما در تیمار سوم افزایش پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین 6، آفلاتوکسین B₁، بذر گیاه خار مریم، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، بیان ژن.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که بوسیله گونه‌های خاصی از جنس آسپرژیلوس بویژه فلاووس و پارازیٹیکوس تولید می‌شوند (۵). متابولیت‌های ثانویه تولید شده به وسیله این قارچ‌ها شامل انواع B₁، B₂، G₁ و G₂ می‌باشند (۲). از عواقب این متابولیت‌ها در حیوانات؛ اختلال در سیستم ایمنی، جهش زایی، سرطان زایی و ناقص الخلقه زایی هستند (۶). با توجه به اینکه ذرت از مواد خوراکی پایه در تغذیه طیور می‌باشد و محیط کشت مناسبی برای رشد آفلاتوکسین‌ها محسوب می‌گردد استفاده از مواد خوراکی خنثی کننده آثار آفلاتوکسین در جیره طیور امری ضروری می‌باشد. بذر گیاه خار مریم می‌تواند این آثار را از بین ببرد. در بذر خار مریم ماده‌ای به نام سیلی‌مارین وجود دارد که خود شامل سه ایزومر اصلی به نام‌های سیلی‌بین (A) و (B)، سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین می‌باشد (۱۰). سیلی‌بین مؤثرترین ماده موجود در سیلی‌مارین است که به عنوان آنتی اکسیدان و محافظ کبد شناخته شده است (۴). سیلی‌مارین با اثر بر فعالیت‌های مربوط به هسته سلول و تأثیر بر میکروزوم سلولی کبدی، می‌تواند رادیکال‌های آزاد ناشی از مصرف سم آفلاتوکسین را کاهش، و فعالیت سلولی جهت سنتز پروتئین را افزایش دهد (۷). آفلاتوکسین از طریق اختلال در نقل و انتقال اسیدهای آمینه و رونوشت برداری m-RNA از سنتز پروتئین و DNA ممانعت کرده و در نتیجه آنتی‌بادی‌ها در سطوح پایین تولید می‌شوند (۹). IL-6 در ایمنی ذاتی، موجب ساخته شدن پروتئین‌های مرحله حاد توسط هپاتوسیت‌ها می‌شود و در نتیجه در اثرات سیستمیک التهاب یا پاسخ مرحله حاد دخالت دارد. اما در ایمنی اکتسابی موجب رشد لنفوسیت‌های B می‌گردد، که به تولید کننده آنتی‌بادی تبدیل می‌شوند (۱).



مواد و روش‌ها

چهار تیمار اعمال شده در این پژوهش بدین ترتیب بود: (۱) شاهد (بدون دریافت آفلاتوکسین B₁ و بذر گیاه خار مریم)، ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ در هر کیلو گرم خوراک، (۳) ۱ درصد بذر گیاه خار مریم در هر کیلوگرم خوراک، (۴) ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ و ۱ درصد بذر گیاه خار مریم در هر کیلوگرم خوراک. در سن ۳۵ روزگی از هر تیمار به طور تصادفی سه جوجه کشتار گردید و از بافت کبد آن‌ها نمونه گیری به عمل آمد. نمونه‌های کبد برداشت شده بلافاصله درون میکروتیوب‌های استریل قرار داده شده و بلافاصله در داخل تانک حاوی ازت مایع فریز گردیدند. به منظور استخراج RNA از نمونه‌های بافتی کبد، کیت Total RNA isolation kit خریداری شده از شرکت DENAzist Asia مورد استفاده قرار گرفت. مراحل انجام کار بر اساس پروتوکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. پس از بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از بافت کبد مقدار مشخصی از هر نمونه برای انجام مرحله نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت Reverse Aid H Minus، شرکت فرمنتاز مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی بیان ژن در سطح RNA به روش RT-PCR، تمام نمونه‌های cDNA ابتدا از نظر بیان ژن مرجع (*House Keeping gene*) ارزیابی شدند. ژن مرجع در این پژوهش، گلیسر آلدهید فسفات دهیدروژناز (*Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase: GAPDH*) بود. توالی آغازگرهای به کار رفته در RT-PCR برای ژن های GAPDH و IL-6 به ترتیب عبارت بودند از؛

آغازگر رفت: CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG

آغازگر برگشت: CAACATCAAATGGGCAGATG

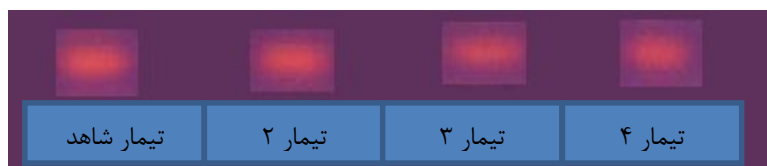
آغازگر رفت: GACTCGTCCGGAGAGGTTG

آغازگر برگشت: CGCACACGGTGAACCTTCTT

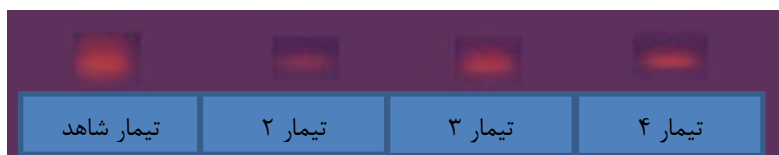
برنامه دمایی تکثیر عبارت بود از؛ ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (بسط آغازگرها) و ۷۲ درجه سانتی گراد (بسط نهایی آغازگرها) ۱۰ دقیقه بود. محصول هر واکنش RT-PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. این مرحله با ولتاژ ثابت ۷۵ و به مدت ۱ ساعت انجام گردید و در نهایت پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ژل داکيومنتیشن از ژل عکسبرداری و شدت باندهای حاصل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات در این پژوهش نشان دهنده این مطلب می‌باشد که بیان ژن کنترل همانطور که انتظار می‌رفت در همه تیمارها یکسان بود (شکل ۱-۱). اما بیان ژن اینترلوکین 6 در همه تیمارهای آزمایشی با یکدیگر متفاوت است. در تیمار دوم که در آن جوجه‌ها ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ در هر کیلوگرم خوراک دریافت کرده بودند نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد و بلعکس در تیمار سوم که بذر گیاه خار مریم به تنهایی مورد استفاده قرار گرفته بود باندهای بزرگتری بر روی ژل الکتروفورز تشکیل گردید. اما در تیمار چهارم که آفلاتوکسین B₁ به همراه بذر گیاه خار مریم مورد استفاده قرار گرفته بود بیان ژن مذکور کاهش پیدا کرد. شدت باندهای تشکیل شده در روی ژل الکتروفورز در شکل (۱-۲) نشان داده شده است.



شکل ۱-۱ نشان دهنده باندهای تشکیل شده در ژن GAPDH بر روی ژل آگاروز می‌باشد



شکل ۱-۲ نشان دهنده باندهای تشکیل شده در ژن IL-6 بر روی ژل آگاروز می‌باشد

نتایج این پژوهش یافته‌های (۱۰) را تأیید می‌نماید، نتایج مطالعه آن‌ها کاهش بیان ژن اینترلوکین ۶ را در جوجه‌هایی که آفلاتوکسین B₁ (۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خوراک) دریافت کرده بودند نشان داد. اما با افزودن زرد چوبه (۷۴ میلی گرم در هر کیلوگرم خوراک) به جیره بیان این ژن افزایش پیدا کرد. با توجه به یافته‌های این پژوهش و بررسی پژوهش‌های دیگر ما پیشنهاد می‌کنیم که گیاه دارویی خار مریم می‌تواند بازجذب کننده خوبی برای آفلاتوکسین B₁ باشد، اما باید مقادیر بالاتری از آن در جیره گنجانده شود. همچنین (۳) اثر آفلاتوکسین B₁ را بر بیان ژن‌های IL-1 و IL-6 در موش‌های صحرایی جنس نر بررسی کردند، آن‌ها نتیجه گرفتند که اثرات آفلاتوکسین بر روی سیستم ایمنی هم می‌تواند تحریک کننده و هم بازدارنده باشد.

منابع

۱. غضنفری، ط.، یارایی، ر.، ۱۳۸۰. ایمونولوژی سلولی و مولکولی (ترجمه). چاپ چهارم. انتشارات پورسینا. ص ۷۰۶.
2. Ellis, W.O., J.P. Smith, B.K. Simpson, and J.H. Olsham., 1991. Aflatoxins in food occurrence, biosynthesis, effect on organisms, detection and methods of control. Critical Rev. Food Sci. and Nutr. 30: 403-439.
3. Hinton, D. M., HMyers M. J., HRaybourne, R. A., HFrancke-Carroll, S., HSotom Shaddock R. E., Warbritton, A. H., HChou M. W., 2003. Immunotoxicity of aflatoxin B₁ in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. Toxicol. Sci. 73: 362-377.
4. Lorenz, D., Luckner, P. W., Mennicke, W. H., 1984. Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 6: 655-661.
5. Miazzo, R., C.A.R. Rosa, E. C. De Queiroz Carvalho, C. Magnoli, S. M. Chiacchiera, G. Palacio, M.Saenz, A. Kikot, E. Basaldella, and A. Dalcero., 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chickens. J. Poult. Sci. 79:1-6.
6. Patterson, D.S.P., 1983. Aflatoxicosis in farm animals. Vet. Res. Common., 7: 135-140.
7. Radco, L., W. Cybulski., 2007. Application of silymarin in humam and animal medicine. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, Vol 1, No 1, 022-026.
8. Thaxton, J.P., H.T. Tung., P.B. Hamilton. 1974. Immunosuppression in chicken by aflatoxin. the Chicken Broiler Fattening. Poult Sci. 53: 721-725.



9. Vogel, G., Trost, W., Brraatz, R., 1975. Pharmacodynamics, site and mechanism of action *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 1. Acute toxicology or tolerance, general and specific (liver-) Pharmacology. *Arzneimittelforschung*, 25 (1): 82-89.
10. Yarru, L.P., Settivari, R.S., Gowda, N.K. S., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E. 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult Sci J*. 88 :2620-2627.

Hepatic gene expression of interleukin 6 (IL-6) in broiler chickens fed with Aflatoxin B₁ and Milk Thistle seeds (*Silybum Marianum*)

M. Frouzanmehr^{*1}, M.B. Montazertorbat², N. Afzali³, O. Fani Makki¹ and A. shibak¹

1- MSc student, Department of Animal Science, University of Birjand – Birjand – Iran. 2-Assistant professor, Department of Animal Science, University of Birjand – Birjand – Iran. 3- Associate professor, Department of Animal Science University of Birjand – Birjand – Iran.

* Corresponding author E-mail address: mojtabafrouzanmehr@yahoo.com

Abstract

In this study, the effects of Aflatoxin B₁ and thistle seeds on interleukin 2 gene expression was evaluated by semi-quantitative method. The experiment in a completely randomized design with 4 treatments and 6 replicates were. The four treatments were applied: 1) control (without aflatoxin B₁ and thistle seeds), 2) ppb 500 aflatoxin B₁ per kg of feed, 3) 1 percent of thistle seeds per kg of feed, 4) ppb 500 Aflatoxin B₁ plus 1 percent of thistle seed plant per kg feed. Slaughter chickens at 35 days old were randomly selected from each of three replicate samples of liver tissue were collected. RNA extraction and reverse transcription was performed in liver tissue and polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of genes were IL-6. Polymerase chain reaction products by gel electrophoresis was used to detect the building. Banding on agarose gel in various experimental treatments were compared. The results showed that decreased expression of IL-6 in the second and fourth treatments, but the third treatments increased.

Key words: Interleukin 6, Aflatoxin B₁, Thistle seeds, Polymerase chain reaction (PCR), Gene expression.