



تأثیر بذر گیاه خارمریم بر بیان ژن GPx در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین B₁

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

۱- دانش آموزگان مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه بیرجند ۲- استادیار دانشگاه بیرجند ۳- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه تهران

* mojtabafrozanmehr@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق اثرات آفلاتوکسین B₁ و بذر گیاه خار مریم در جیره جوجه‌های گوشتی بر بیان ژن گلوپکسیناز (GPx) 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 کیلوگرم خوراک، ۴) ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ و ۱ درصد بذر گیاه خار مریم در هر کیلوگرم 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 پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ژن گلوپکسیناز صورت گرفت. محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت نمایان سازی بر روی ژل الکتروفورز برده شد. نتایج نشان داد که آفلاتوکسین بیان ژن GPx را کاهش داد، اما بذر گیاه خار مریم بیان ژن GPx را افزایش داد. واژه‌های کلیدی: گلوپکسیناز، آفلاتوکسین B₁، بذر گیاه خار مریم، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)، بیان ژن.

مقدمه

آفلاتوکسین B₁ سمی ترین و سرطانزاترین نوع آفلاتوکسین هاست که سرطانزایی آن در انسان و حیوان به اثبات رسیده است (۱). کبد و کلیه، اندام‌های اصلی تجمع آفلاتوکسین‌ها هستند، زیرا آن‌ها در تبدیلات زیستی سم درگیر می باشند (۸). مطالعات انجام شده در آسیا و آفریقا نشان می‌دهد که جیره‌های غذایی حاوی آفلاتوکسین از عوامل ایجاد سرطان کبد در انسان هستند. به علت اثر مشخص آفلاتوکسین - B₁ در ایجاد سرطان کبدی در حیوانات آزمایشگاهی، تصور بر این است که تماس مزمن انسان با این سم می‌تواند یکی از عوامل ممکن در ایجاد کارسینومای هیپاتوسلولار، که یکی از متداول‌ترین تومورها در دنیا است، باشد (۳). اثر مستمر آفلاتوکسین بر روی سلول‌های کبدی شامل؛ عمل متقابل با DNA و ممانعت از عمل پلی‌مرازهایی که مسئول سنتز DNA و RNA هستند، جلوگیری از فعالیت mRNA، تغییر دادن مورفولوژی یا شکل هسته و کاهش در بیوسنتز پروتئین می باشد. شواهد موجود حکایت از آن دارد که سیلی مارین‌های موجود در گیاه دارویی خار مریم به روش‌های مختلفی عمل می‌کند: سیلی مارین می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل کرده و از فعالیت رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند (۷). و سیستم آنزیمی مرتبط با گلوپکسین و سوپر اکسید دیسموتاز را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد (۹). همچنین به عنوان تنظیم و تثبیت کننده تراوایی غشای سلولی که مانع از ورود سموم کبدی به درون سلول‌های کبدی می‌شود و در سنتز RNA ریبوزومی نقش دارد که باعث بازسازی سلول‌های کبد می‌شود (۴). مطالعات زیادی تاکنون نشان داده‌اند که سیلی مارین موجود در گیاه خار مریم آثار سوئی بر بافت‌های بدن ندارد و قادر به کاهش زیان‌های آفلاتوکسین نیز می‌باشد (۲). لذا، از گیاه خار مریم می‌توان به عنوان یک داروی گیاهی مناسب از بین بردنده آثار سوء آفلاتوکسین بر کبد نام برد.

مواد و روش‌ها



چهار تیمار اعمال شده در این پژوهش بدین ترتیب بود؛ (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. 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 توسط 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 ژن‌ها در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. تمام نمونه های cDNA ابتدا از نظر بیان ژن مرجع (House Keeping) ارزیابی شدند. ژن مرجع انتخاب شده در این پژوهش، گلیسر آلدهید فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase: GAPDH) بود.

توالی آغازگرهای به کار رفته برای ژن GAPDH و GPx بترتیب عبارت بودند از؛

آغازگر رفت: CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG

آغازگر برگشت: CAACATCAAATGGGCAGATG

آغازگر رفت: TTGTAAACATCAGGGGCAAA

آغازگر برگشت: TGGGCCAAGATCTTTCTGTAA

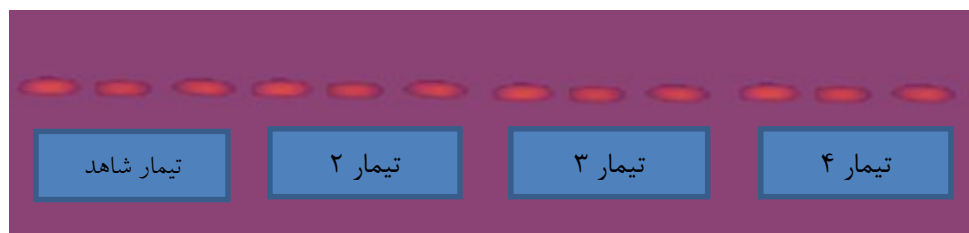
برنامه دمایی تکثیر عبارت بود از؛ ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (بسط آغازگرها) و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ (بسط نهایی آغازگرها) دقیقه بود. محصول هر واکنش RT-PCR 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 و بر اساس اندازه باندهای مشاهده شده تفسیر صورت گرفت.

نتایج و بحث

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز در درون پراکسیزوم‌ها و گلوکاتایون پراکسیدازها درون سیتوزول در تبدیل پراکسید هیدروژن (که یک عامل اکسید کننده قوی و بطور بالقوه بسیار مضر می‌باشد) به آب و هیدروژن مولکولی نقش دارند (۵). اگر پراکسید هیدروژن بر روی غشای داخلی میتوکندری و درون ماتریکس میتوکندری تجزیه گردد به این نقاط آسیب وارد می‌کند. در حالی که، تجزیه پراکسید هیدروژن در خارج از میتوکندری به غشای خارجی میتوکندری و یا به سیتوزول آسیب وارد می‌آورد. پیش بینی می‌شود سلول‌هایی که مقدار این آنزیم‌ها در آن‌ها کم باشد به آسیب‌های اکسیداتیو آسیب پذیر خواهند بود (۱۰). شکل (۱-۱) نشان دهنده باندهای ایجاد شده در بیان ژن کنترل می باشد و همانطور که در شکل دیده می شود هیچ اختلافی بین تیمارهای مختلف مشاهده نمی شود. بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز در تیمار دوم که به تنهایی آفلاتوکسین مصرف شده بود در مقایسه با تیمار شاهد کاهش پیدا کرد که این نتایج با نتایج تحقیق (۱۱) مطابقت داشت. اما در تیمار سوم که از بذر گیاه خار مریم به تنهایی استفاده شده بود افزایش پیدا کرد که بنظر می‌رسد سیلی‌مارین‌های موجود در بذر گیاه خار مریم باعث افزایش بیان این ژن گردیده است. همچنین بیان ژن مذکور در تیمار چهارم که از بذر



گیاه خار مریم و آفلاتوکسین همزمان استفاده شده بود افزایش پیدا کرد (شکل ۱-۲). با توجه به اینکه متابولیت‌های سمی بوجود آمده از آفلاتوکسین در صورتیکه با گلوکاتایون پراکسیداز باند شود از بدن دفع می‌شود، این گیاه را می‌توان به عنوان یک داروی بسیار مناسب برای از بین بردن اثرات مضر آفلاتوکسین مفید دانست. کاهش در بیان ژن آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون پراکسیداز باعث ایجاد اختلال در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و تداوم رادیکال‌های هیدروکسیل در سلول‌های کبدی می‌شود. افزایش سطح پراکسید هیدروژن درون سلول باعث کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز می‌گردد و بدین وسیله موجب افزایش سطح سوپر اکسید در درون سلول و کاهش فعالیت دیگر آنزیم آنتی‌اکسیدانی یعنی کاتالاز می‌گردد (۶).



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 GPx بر روی ژل آگاروز می‌باشد

منابع

۱. آزاد بخت، ن.، خسروی نژاد، ک.، طراحی، م.، ج.، ۱۳۸۷. بررسی میزان آلودگی ضایعات نان به آفلاتوکسین در استان لرستان. فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی لرستان. دوازدهم. شماره سوم.
۲. جمشیدی، ا.، ح.، احمدی آشتیانی، ح.، ر.، غلامحسینی، ب.، بکایی، س.، ۱۳۸۶. مطالعه اثرات تجویز عصاره گیاهی خار مریم بر تغییرات بافتی و بیوشیمیایی ناشی از آفلاتوکسین در جوجه های گوشتی. فصل نامه گیاهان دارویی. سال ششم. دوره چهارم. شماره مسلسل بیست و چهارم.
3. Chen, C. J., Y. J. Zhang., S. N. Lu., R. M. Santella. 1992. Aflatoxin B₁ DNA adducts in smeared tumor tissue from patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology. 16: 1150-1155.
4. Frascini, F., Demartini, G., Esposti, D., 2002. Pharmacology of silymarin. Clin Drug Invest. 22: 51-65.
5. Liska, D. J. 1998. The detoxification enzyme system. Altern Med Rev. 3:187-198.
6. 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.
7. Mira, L., M. Silva., C. F. Manso. 1994. Scavenging of reactive oxygen species by silybin dihemisuccinate. Biochem. Pharmacol. 48:753-759.



8. Sawhney, D.S., D.V. Vadehra, and R.C. Baker, 1973. The metabolism of 14c aflatoxins in laying hens. Pult. Sci. 52:1302-1309.
9. Tedesco, D., S. Steidler., S. Galletti., M. Tameni., O. Sonzogni., L. Ravarotto. 2004. Efficacy of Silymarin-Phospholipid Complex in Reducing the Toxicity of Aflatoxin B₁ in Broiler Chicks. Poult Sci j. 83:1839-1843.
10. Tiedge, M., S. Lortz., R. Munday., S. Lenzen. 1998. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. Diabetes. 47: 1578-1585.
11. 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 Glutathione Peroxidase (GPx) in broiler chickens fed with Aflatoxin B₁ and Milk Thistle seeds (*Silybum Marianum*)

M. Frouzanmehr^{1*}, M.B. Montazertorbati², M.S. Mokhtari³, A. Shibak¹ and O. Fani Makki¹

1- MSc student, University of Birjand, 2-Assistant professor, University of Birjand, 3- Phd student of genetic & animal breeding, University of Tehran

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

Abstract

In this study, the effects of Aflatoxin B₁ and thistle seeds on GPx 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 GPx. 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 GPx in the second, but the in third and fourth treatments increased.

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