

بیان ژن آدیپونکتین و گیرنده ۲ آن (AdipoR2) در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر افشاری پیش از بلوغ

محمد دورونکی^{۱*} - بهنام رستمی^۲ - طاهر هرکی نژاد^۳ - محمدحسین شهیر^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۵

چکیده

آدیپونکتین هورمونی است که عمدتاً از بافت چربی ترشح می‌شود و شواهد اخیر حاکی از نقش آن در تنظیم سیستم تولیدمثلی پستانداران است. هدف از این پژوهش بررسی پروفیل بیان ژن آدیپونکتین و گیرنده ۲ آن (AdipoR2) در نواحی مختلف مجرای تولیدمثلی بره‌های نر نژاد افشاری در دوره پیش از بلوغ بود. بدین منظور، ۲۰ رأس بره نر نابالغ نژاد افشاری به چهار گروه سنی مختلف شامل: گروه‌های سنی ۱ تا ۲، ۲ تا ۳، ۳ تا ۴ و ۴ تا ۵ ماه اختصاص یافتند، سپس دام‌ها به روش جراحی اخته شدند و از چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه هر دام نمونه‌برداری به عمل آمد. بیان دو ژن آدیپونکتین و AdipoR2 با استفاده از تکنیک Real Time-QPCR در هر نمونه بافت بررسی شد. بطور خلاصه، بیان مداوم ژن‌های آدیپونکتین و AdipoR2 در تمام مراحل رشد، قبل و هنگام بلوغ مشاهده شد. اگرچه میزان بیان آدیپونکتین و AdipoR2 در بین گروه‌های سنی مختلف به لحاظ آماری متفاوت بود، با این حال تفاوت آماری معنی‌داری در مقدار بیان آن‌ها در بین چهار بافت مختلف پارانشیم بیضه و سر، بدنه و دم اپیدیدیم بره‌های نر نابالغ مشاهده نشد. نتایج بررسی حاضر نشان داد که آدیپونکتین و گیرنده ۲ آن (AdipoR2) به طور مداوم در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر نابالغ بیان می‌شوند و سطح بیان آنها با افزایش سن تغییر می‌کند. با توجه به تاگی این موضوع، نتایج این مطالعه می‌تواند زمینه ساز مطالعات بیشتر در این زمینه مهم باشد.

واژه‌های کلیدی: آدیپونکتین، بیان ژن، بیضه، تولید مثل، قوچ افشاری.

مقدمه

انرژی کل بدن، حساسیت به انسولین و متابولیسم چربی/کربوهیدرات در انسان و حیوانات بازی می‌کند (۱۱). آدیپونکتین اعمال خودش را با اتصال به دو گیرنده اصلی خود، AdipoR1 و AdipoR2، انجام می‌دهد (۲۹). گرچه آدیپونکتین عمدتاً از سلول‌های چربی ترشح می‌شود با این حال بیان آن در بافت‌های مختلف چندین گونه شامل غده آدرنال و کبد انسان و جوندگان (۱۶ و ۲۱)، غده هیپوفیز پیشین و عضله اسکلتی جوجه (۵ و ۲۴)، اپیدیدیم، کلیه و قلب خوک (۹ و ۱۵)، و تخمدان گاو (۱۳ و ۲۷) تشخیص داده شده است. همچنین بیان آدیپونکتین و AdipoR2، در کبد، غده آدرنال، عضله اسکلتی و تخمدان موش صحرایی (۶)؛ کلیه، تخمدان، طحال و غده هیپوفیز جوجه (۵ و ۲۴)، قلب، شش و اپیدیدیم خوک (۹ و ۱۵) و همین‌طور انواع سلول‌های تخمدانی گاو (۱۳ و ۲۷) شناسایی شده‌اند.

چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که آدیپونکتین قادر است از طریق اثرات مرکزی بر روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز (۲۵ و ۲۸) و از طریق اثرات جانبی بر روی تخمدان (۱۳، ۱۴ و ۲۷)، بیضه (۳، ۲۰، ۲۳) و رحم (۱۵) و یا از طریق اثرات مستقیم بر روی اووسیت (۱۰) و رویان (۷) سیستم تولیدمثلی را تحت تأثیر قرار دهد. به‌علاوه، بیان

این دیدگاه سنتی که بافت چربی فقط به عنوان یک منبع برای ذخیره چربی به کار می‌رود امروزه معتبر نیست. اکنون مشخص شده که بافت چربی تعدادی از پپتیدهای فعال زیستی موسوم به آدیپوسیتوکین‌ها را تولید و ترشح می‌کند که در هر دو سطح موضعی (اتوکین/پاراکین) و سیستمیک (اندوکین) عمل می‌کنند (۱۲). آدیپونکتین یکی از این آدیپوسیتوکین‌ها است که اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

آدیپونکتین یک آدیپوسیتوکین ۳۰ کیلودالتونی است که به طور عمده از بافت چربی ترشح می‌شود و نقشی مهم در تنظیم هومئوستاز

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان،

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان،

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

*- نویسنده مسئول: (Email: m.dorounaki@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v1i1.50174

RNA با ۱ واحد از DNase (VivantisInc[®], Malaysia) تیمار شدند.

واکنش زنجیری پلیمرز-رونویسی معکوس (Reverse Transcriptase-PCR)

cDNA مطابق دستورالعمل تولیدکننده (Vivantis Inc[®], Malaysia) در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری ساخته شد. در مرحله اول مخلوط RNA-primer تهیه شد که شامل این مواد بود: ۲ میکرولیتر Total RNA، ۱ میکرولیتر Oligo d(T)₁₈، ۱ میکرولیتر 10mM dNTPs mix و ۶ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (تا حجم ۱۰ میکرولیتر). در مرحله دوم، ابتدا مخلوط سنتز cDNA شامل: ۲ میکرولیتر 10X Buffer M-MuLV، ۰/۵ میکرولیتر M-MuLV Reverse Transcriptase و ۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (تا حجم ۱۰ میکرولیتر) تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن به هر تیوب حاوی مخلوط RNA-primer حاصل از مرحله اول اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Reverse Transcriptase) انکوبه شدند.

Quantitative real time-PCR

آنالیز Real time-QPCR کمی برای تعیین کمیت تغییرات نسبی بیان آدیپونکتین و AdipoR2 با استفاده از یک گرداننده حرارتی (Corbett Research[®], Australia)، روش ریپورترهای غیر اختصاصی (EvaGreen) و GAPDH¹ به عنوان ژن مرجع انجام شد. واکنش‌های qPCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر cDNA و ۱۷ میکرولیتر مخلوط qPCR انجام شدند که مخلوط qPCR خود شامل HotTaq DNA پلیمرز (۱ واحد)، پرایمرهای forward و reverse (۱۰ pmol/μL)، 1xqPCR buffer E (۱۰ mM) و ۲/۵ MgCL₂ (۲۰۰ mM) dNTPs بود. تمام واکنش‌ها با برنامه زیر انجام شدند: یک واسرشتگی اولیه و نیز فعال‌سازی آنزیم پلیمرز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، متعاقباً ۴۵ چرخه متشکل از واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال مخصوص پرایمر به مدت ۶۰ ثانیه، و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. نمونه‌های کنترل بدون cDNA در تمام آزمایشات استفاده شدند که هیچ محصولی را تکثیر نکردند. خصوصیات مربوط به پرایمرهای ژن‌های مورد نظر در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

همه یا برخی از ژن‌های سیستم آدیپونکتین در تخمدان گونه‌های مختلف از جمله خوک (۹ و ۱۴)، انسان و موش صحرایی (۶)، جوجه (۱۷ و ۲۴) و اخیراً گاو (۱۳، ۱۹ و ۲۷) شناسایی شده‌اند.

بیان آدیپونکتین و AdipoR2 در بافت‌های بیضه‌ای گونه‌های مختلف از جمله: انسان (۲)، خوک (۹)، جوجه (۲۰) و موش صحرایی (۳) تشخیص داده شده است. در تازه‌ترین مطالعه، ژن‌های آدیپونکتین، AdipoR1 و AdipoR2 در قسمت‌های مختلف مجرای تولیدمثلی قوچ‌های بالغ شامل پارانیشیم بیضه و سر، بدنه و دم اپیدیدیم، مجرای دفران، و غدد وزیکولار و کوپر یافت شدند و سطح بیان AdipoR2 بیشتر از AdipoR1 گزارش شد (۲۳). تاکنون تحقیقی در مورد بیان آدیپونکتین و گیرنده آن (AdipoR2) در مجرای تولیدمثلی نشخوارکنندگان نر نابالغ انجام نشده است. مطالعات بیشتر ما را در فهم دقیق‌تر ساز و کارهای بیولوژیکی عملکرد بیضه یاری می‌کند. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات بیان موضعی ژن‌های آدیپونکتین و AdipoR2 در چهار بافت مختلف سر، بدنه، دم، اپیدیدیم و پارانیشیم بیضه بره‌های نر در حال رشد نژاد افشاری با استفاده از تکنیک real-time QPCR بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری بافت

ابتدا تعداد ۲۰ رأس بره نر نابالغ نژاد افشاری، بدون ناهنجاری ظاهری، برحسب سن در چهار گروه سنی (۵ رأس در هر گروه)؛ ۱ تا ۲ ماه (گروه اول)، ۲ تا ۳ ماه (گروه دوم)، ۳ تا ۴ ماه (گروه سوم) و ۴ تا ۵ ماه (گروه چهارم) قرار گرفتند و سپس به روش جراحی اخته شدند. همچنین نمونه‌های بافتی مشابه از قوچ‌های کاملاً بالغ (۳ تا ۴ ساله) در مدت ۲۰ دقیقه پس از کشتار در کشتارگاه جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بافت اخذ شده از بره‌ها و قوچ‌ها بلافاصله بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

کل RNA از هر نمونه بافت (سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانیشیم بیضه) با استفاده از کیت استخراج RNA، CinnaPureRNA Kit (CinnaPureRNA Kit[®], Tehran, Iran)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و همچنین با تعیین نسبت جذب چگالی نوری OD_{۲۶۰nm}/OD_{۲۸۰nm} بین ۱/۷ و ۲، با استفاده از اسپکتروفتومتری نانودراپ (Thermo scientific[®], UK) تأیید شد. به منظور حذف هرگونه آلودگی DNA باقیمانده احتمالی، نمونه‌های

1- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

جدول ۱ - خصوصیات پرایمرهای RT-PCR مورد استفاده

Table 1- The traits of RT-PCR primers

ژن Gene	توالی Sequence	شماره Accession No	Product size (bp)	Tm ¹ (°C)
Adiponectin	F ² CAAGTCTGGCTCAAGGTGTA	XM-004003053	241	52
	R ³ AGATCTTYGTAAGCGAATG			
AdipoR2	F AGCATTTTCAGAATACACAC	XM-004007604	268	50
	R ATCAGAAGAGCAATACCAGA			
GAPDH	F CACTGCCACCCAGAAGACTG	NM-001190390	196	54
	R GGTCAGATCCACAACGGACA			

¹ دمای اتصال پرایمر

² پرایمر رفت

³ پرایمر برگشت

¹ Annealing temperature

² Forward primer

³ Reverse primer

دم)، غدد وزیکولار و کوپر و مجرای دفران قوچ‌های بالغ شناسایی شده‌اند (۲۳).

بیان ژن آدیپونکتین و AdipoR2 در بین گروه‌های سنی مختلف

ارزیابی مقادیر رونوشت ژن آدیپونکتین در سرتاسر دوره رشد پیش از بلوغ، بیان مداوم آن را در مجرای تولیدمثلی تمام گروه‌های سنی نشان داد و این درحالی بود که سطوح نسبی آدیپونکتین در طول مراحل بلوغ متفاوت بودند. در واقع، مقادیر نسبی آدیپونکتین در ابتدا بالا بودند، سپس به تدریج در طی مراحل پیش از بلوغ کاهش یافتند و دوباره در هنگام بلوغ و نیز در گروه قوچ‌های بالغ بطور کامل افزایش یافتند ($P < 0.05$)؛ (شکل ۱). به طور کلی، آدیپونکتین در گروه حیوانات بالغ بیشترین سطح mRNA را داشت و مقدار بیان آن در گروه سنی سوم (۳ تا ۴ ماه) بره‌ها در مقایسه با سایر گروه‌های سنی کمترین بود ($P < 0.05$) (شکل ۱).

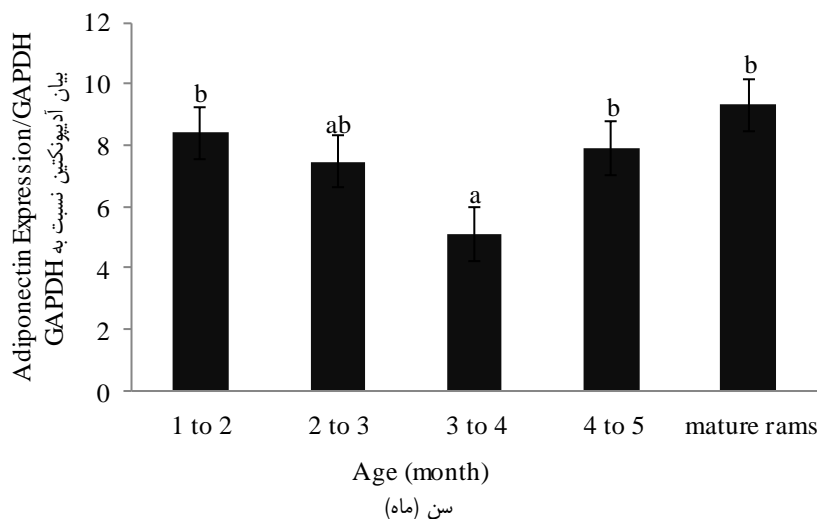
مشابه با لیگاند، بیان پیوسته رونوشت ژن AdipoR2 در مجرای تولیدمثلی تمام دام‌ها در طول دوره رشد پس از تولد مشاهده شد (شکل ۲). مقادیر نسبی AdipoR2 نیز مانند آدیپونکتین به طور قابل توجهی در طول سن تغییر کرد؛ مقادیر متوسط در گروه‌های ابتدایی ملاحظه شدند که پس از آن در طی مراحل پیش از بلوغ کاهش یافتند، و سپس در زمان بلوغ و نیز در گروه قوچ‌های بالغ به تدریج کاملاً افزایش یافتند ($P < 0.05$)؛ (شکل ۲). به طور کلی، مشابه با لیگاند، سطح بیان رونوشت ژن AdipoR2 در گروه قوچ‌های بالغ بیشترین و در گروه سنی سوم (۳ تا ۴ ماه) کمترین مقدار بود ($P < 0.05$)؛ (شکل ۲).

آنالیز آماری

روش $\Delta\Delta Ct$ مقایسه‌ای (۲۲) برای تعیین کمیت خروجی‌های Real Time-QPCR استفاده شد. در این روش، داده‌های Ct (Threshold Cycle) خام ژن‌های هدف با استفاده از نرم افزار GenEx Enterprise توسط Ct ژن مرجع (GAPDH) و همچنین کارایی پرایمرهای هر دو ژن هدف و ژن GAPDH برای هر واکنش جداگانه نرمال‌سازی شدند و سپس داده‌های نهایی که همان Fold Changes بودند مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از رویه Mixed نرم افزار آماری SPSS در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار (گروه سنی) و ۵ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح ۹۵ درصد اطمینان ($P < 0.05$) انجام شد.

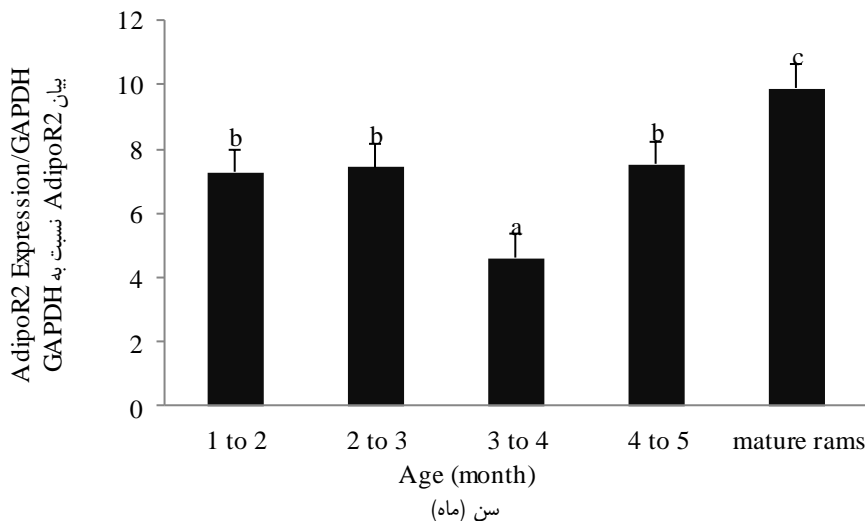
نتایج و بحث

گرچه تاکنون گزارشات متعددی نشان داده‌اند که آدیپونکتین و AdipoR2 در بافت‌های تولیدمثلی جنس نر چندین گونه بیان می‌شوند، اما بیان آنها تاکنون در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر در دوره پیش از بلوغ بررسی نشده است. نتایج یک تحقیق نشان داد که آدیپونکتین، AdipoR1 و AdipoR2 در بخش‌های بیضه‌ای موش صحرائی بالغ بیان می‌شوند (۳). در مطالعه دیگری، بیان بالای آدیپونکتین و AdipoR1 در سلول‌های لیدینگ و پارانشیم بیضه جوجه گزارش شده است (۲۰). به علاوه، mRNA هر دو گیرنده عملکردی آدیپونکتین (AdipoR1/R2) در بیضه انسان شناسایی شده است (۲). همچنین، آدیپونکتین، AdipoR1 و AdipoR2 در اپیدیدیم خوک نیز یافت شد (۹). علاوه بر این، در تازه‌ترین تحقیق، رونوشت ژن‌های آدیپونکتین، AdipoR1 و AdipoR2 در بیضه، اپیدیدیم (سر، بدنه و



شکل ۱- سطوح بیان ژن آدیپونکتین نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین گروه‌های سنی مختلف دام‌ها. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌های کمی به صورت Mean ± SEM ارائه شده‌اند.

Figure 1- Adiponectin expression levels relative to GAPDH mRNA among different age groups. Different letters above each bar represent significant difference at $P < 0.05$. Data are expressed as Mean ± SEM.



شکل ۲- سطوح بیان ژن AdipoR2 نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین گروه‌های سنی مختلف دام‌ها. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان می‌باشد ($P < 0.05$). داده‌های کمی به صورت Mean ± SEM ارائه شده‌اند.

Figure 2- AdipoR2 expression levels relative to GAPDH mRNA among different age groups. Different letters above each bar represent significant difference ($P < 0.05$). Data are expressed as Mean ± SEM.

جمعیت نوع بالغ سلول‌های لیدینگ و سلول‌های اپیتلیال مجرای اپیدیدیم در ارتباط باشد.

بیان ژن آدیپونکتین و AdipoR2 در بین بافت‌های تولیدمثلی مختلف بره‌های نابالغ

رونوشت ژن آدیپونکتین در پارانثیم بیضه و بخش‌های مختلف اپیدیدیم (سر، بدنه و دم) بره‌های نر پیش از بلوغ مشاهده شد. به طور کلی، سطح بیان mRNA آدیپونکتین در پارانثیم بیضه در مقایسه با دیگر بخش‌های مجرای تولیدمثلی بره‌ها بطور عددی کمتر بود، اما تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند ($P > 0.05$)؛ (شکل ۳). تفاوت معنی‌داری در میزان بیان آدیپونکتین در بین سه بافت مختلف اپیدیدیم بره‌های نر نابالغ دیده نشد، اگرچه مقدار بیان آن در قسمت سر اپیدیدیم بیشتر بود ($P > 0.05$)؛ (شکل ۳).

علاوه بر لیگاند، گیرنده ۲ آن یعنی AdipoR2 نیز در چهار بافت پارانثیم بیضه و سر، بدنه و دم اپیدیدیم بیان شد (شکل ۴). برخلاف لیگاند، سطح بیان AdipoR2 در پارانثیم بیضه در مقایسه با دیگر بخش‌های مجرای تولیدمثلی بره‌ها به طور عددی بیشتر بود ($P > 0.05$)؛ (شکل ۴). همانند آدیپونکتین، تفاوت معنی‌داری در میزان بیان AdipoR2 در بین بافت‌های مختلف مجرای تولیدمثلی بره‌های نر نابالغ مشاهده نشد ($P > 0.05$)؛ (شکل ۴). مشابه با لیگاند، سطح بیان رونوشت AdipoR2 در سر اپیدیدیم به طور عددی بیشتر از بیان آن در دو بخش دیگر بود ($P > 0.05$)؛ (شکل ۳ و ۴).

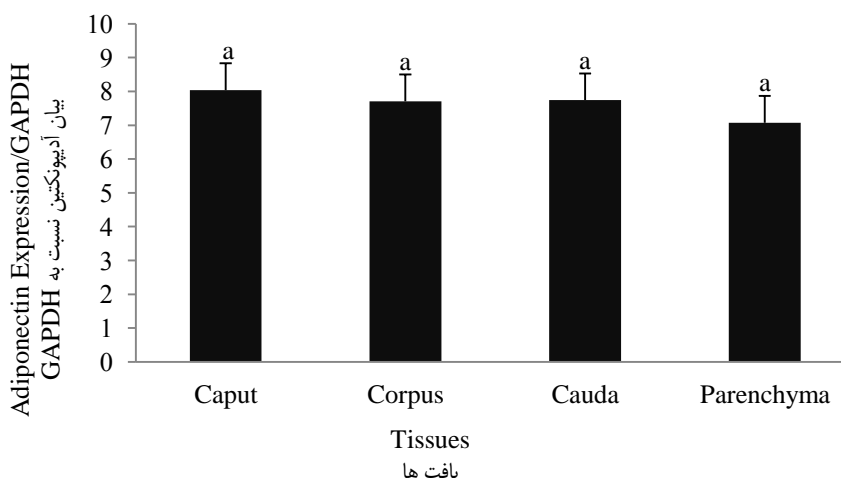
مطابق با مشاهدات ما، رونوشت mRNA آدیپونکتین و AdipoR2 در بخش‌های مختلف مجرای تولیدمثلی بره‌ها شامل: پارانثیم بیضه و سر، بدنه و دم اپیدیدیم تشخیص داده شد هرچند تفاوت معنی‌داری در میزان بیان آنها وجود نداشت. با در نظر گرفتن این نکته که انتقال دهنده‌های گلوکز (SLC2A1 و SLC2A3)، که در تمام سلول‌های لوله‌های منی‌ساز موش صحرایی وجود دارند (۴)، و همچنین با توجه به اثرات مشخص آدیپونکتین بر عملکردهای متابولیکی مختلف مانند مصرف گلوکز، هومئوستاز انرژی و ایمنی (۱۸، ۲۶ و ۲۹)، تصور می‌شود آدیپونکتینی که به صورت موضعی از سلول‌های بیضه‌ای و اپیتلیال ترشح می‌شود ممکن است برای تنظیم وظایف مختلف سلول‌های تولیدمثلی ضروری باشد. هرچند مشاهدات کنونی ما نشان دهنده نقش بالقوه آدیپونکتین در تنظیم مستقیم عملکرد سلولی در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر در حال رشد می‌باشد با این حال، تعیین موقعیت دقیق ژن‌های آدیپونکتین و AdipoR2، به‌خصوص در پارانثیم بیضه، به فهم دقیق‌تر ساز و کارهای عملکرد آدیپونکتین در این حیوانات کمک می‌کند.

در این مطالعه، بیان مداوم آدیپونکتین و AdipoR2 در طی دوره رشد پیش و پس از بلوغ در مجرای تولیدمثلی بره‌ها و قوچ‌های بالغ مشاهده شد. مشابه با نتایج ما، پیش از این نیز محققین دیگری بیان مداوم آدیپونکتین و AdipoR2 را در بیضه موش صحرایی (۳) و جوجه (۲۰) گزارش کردند. به علت تغییرات وابسته به رشد در مقادیر رونوشت آدیپونکتین و AdipoR2 در بین گروه‌های سنی مختلف، به نظر می‌رسد که سطوح بیان آنها تحت تنظیم عوامل وابسته به رشد و نیز فاکتورهای هورمونی باشد (۳). شباهت در پروفیل بیان آدیپونکتین و AdipoR2 با افزایش سن، با مقادیر متوسط mRNA قبل از بلوغ که به طور معنی‌داری بعد از بلوغ افزایش یافت، پیشنهاد می‌کند که آنها ممکن است در توسعه جمعیت نوع بالغ سلول‌های لیدینگ که در طی دوره گذار بلوغ اتفاق می‌افتد نقش داشته باشند (۳). هرچند این موضوع هنوز کاملاً تأیید نشده است.

افزایش در میزان AdipoR2 mRNA که در زمان بلوغ مشاهده شد، مشابه با لیگاند، ممکن است تحت تنظیم عوامل وابسته به رشد و گنادوتروپین‌ها باشد زیرا پیش از این نشان داده شده است که سوپراگونیسست‌های LH، hCG به طور قابل توجهی سطوح AdipoR2 را در بیضه موش صحرایی افزایش می‌دهند، هرچند بر روی بیان آدیپونکتین بی تأثیر بودند (۳). به نظر می‌سد که سرژ آدیپونکتین در زمان بلوغ توسط مکانیزم‌های غیرگنادی وساطت می‌شود زیرا، تفاوت‌های برجسته‌ای بین ترشحات گنادی جنس نر و ماده وجود دارد (۸).

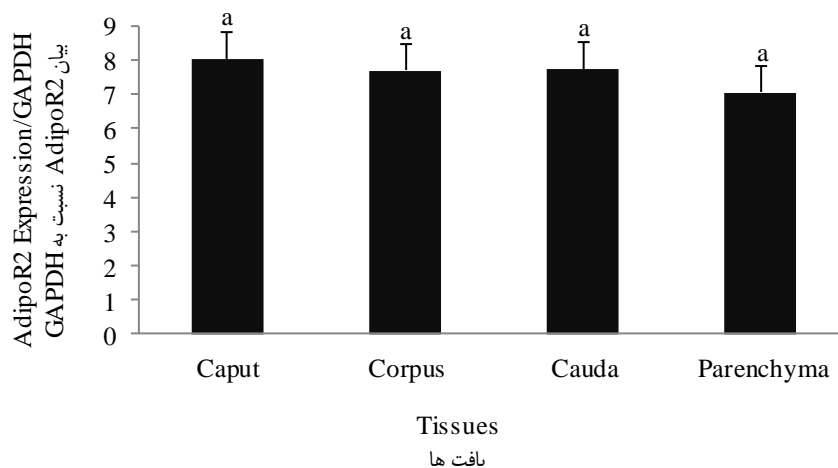
موافق با نتایج آزمایش حاضر، پیش از این گزارش شده است که آدیپونکتین و AdipoR2 همبستگی مثبتی با یکدیگر دارند (۱). همچنین، به نظر می‌رسد که AdipoR2 برای عملکرد صحیح بیضه موش حیاتی باشد، به طوری که موش‌های فاقد ژن AdipoR2 کاهش وزن بیضه را نشان دادند که این با آتروفی لوله‌های منی‌ساز و آسپریمیا مشخص شد (۲). به‌علاوه، در مجرای تولیدمثلی قوچ‌های بالغ، بیان بیشتر AdipoR2 نسبت به AdipoR1 مشاهده شد (۲۳). بنابراین بر اساس مطالعات قبلی و نتایج حاصل از این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که AdipoR2 گیرنده مهم‌تری برای نقش‌های فیزیولوژیک آدیپونکتین در بافت‌های تولیدمثلی قوچ در مقایسه با AdipoR1 باشد. علاوه بر این، ما تصور می‌کنیم که ممکن است تفاوت‌های گونه‌ای در اولویت انتخاب گیرنده برای پیام‌رسانی آدیپونکتین وجود داشته باشد زیرا مشخص شده است که در اپیدیدیم خوک بالغ AdipoR1 بیشتر از AdipoR2 بیان می‌شود (۹).

اگرچه تا این تاریخ توضیح دقیقی برای تغییرات در مقادیر mRNA آدیپونکتین و AdipoR2 در طول سن، به‌خصوص درست پیش از بلوغ، در مجرای تولیدمثلی نشخوارکنندگان وجود ندارد ولی به نظر می‌رسد که با آغاز فرآیندهای مربوط به بلوغ و همچنین توسعه



شکل ۳- سطوح بیان آدیپونکتین نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه بره‌های نر نابالغ (داده‌های کمی به صورت $MEAN \pm SEM$ ارائه شده‌اند).

Figure 3- The expression levels of adiponectin relative to GAPDH mRNA among different tissue samples from immature male lambs (Data are expressed as mean \pm SEM).



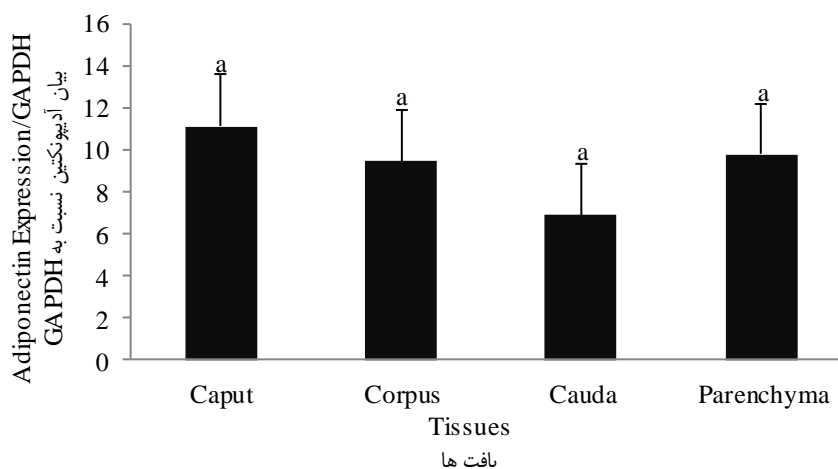
شکل ۴- سطوح بیان ADIPOR2 نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه بره‌های نر نابالغ (داده‌های کمی به صورت $MEAN \pm SEM$ ارائه شده‌اند).

Figure 4- The expression levels of AdipoR2 relative to GAPDH mRNA among different tissue samples from immature male lambs (Data are expressed as Mean \pm SEM).

دیده شد، ولی تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند ($P > 0.05$)؛ (شکل ۵ و ۶). جالب اینکه پروفیل بیان هردو ژن آدیپونکتین و AdipoR2 در بین بافت‌های قوچ‌های بالغ کاملاً مشابه بود (شکل ۵ و ۶). آنالیز همبستگی پیرسون، همبستگی مثبت بالایی ($r = 0.72$) بین آدیپونکتین و AdipoR2 نشان داد ($P < 0.001$).

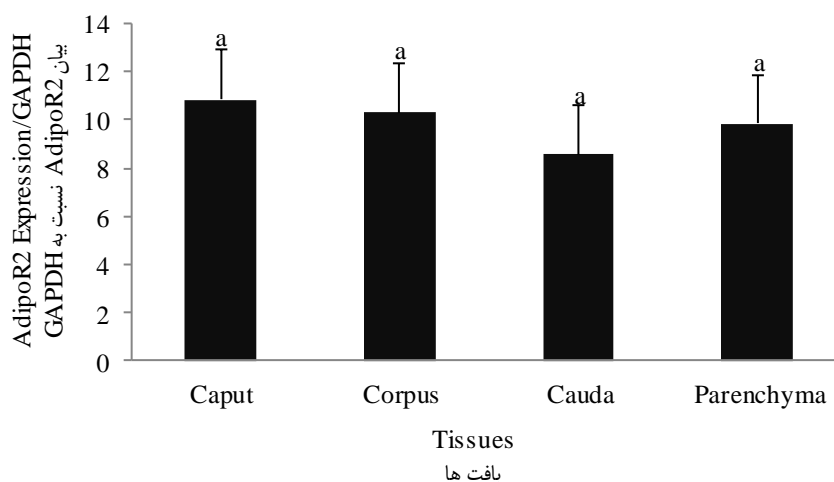
بیان ژن آدیپونکتین و AdipoR2 در مجرای تولیدمثلی قوچ‌های بالغ

مشابه با بره‌های نابالغ، رونوشت mRNA آدیپونکتین و AdipoR2 در چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه قوچ‌های بالغ نیز مشاهده شد. بیشترین مقدار بیان آدیپونکتین و AdipoR2 در بخش جلویی اپیدیدیم (سر و بدنه) در مقایسه با دم



شکل ۵- سطوح بیان آدیپونکتین نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه قوچ‌های بالغ (داده‌های کمی به صورت Mean±SEM ارائه شده‌اند).

Figure 5- Adiponectin expression levels relative to GAPDH mRNA among four parts of reproductive tract of adult rams (Data are expressed as Mean±SEM).



شکل ۶- سطوح بیان AdipoR2 نسبت به مقدار رونوشت GAPDH در بین چهار بافت سر، بدنه، دم اپیدیدیم و پارانشیم بیضه قوچ‌های بالغ (داده‌های کمی به صورت Mean±SEM ارائه شده‌اند).

Figure 6- AdipoR2 expression levels relative to GAPDH mRNA among four parts of reproductive tract of adult rams (Data are expressed as Mean±SEM).

مقایسه با دم اپیدیدیم مشاهده شد، با این حال تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند. طبق اطلاعات ما از این پژوهش، به‌خصوص در قوچ‌های بالغ، حداکثر بیان آدیپونکتین و AdipoR2 در بخش‌های جلویی اپیدیدیم، جایکه اسپرم به حداکثر توان جنبایی خود می‌رسد، ممکن است تغییرات خاص وابسته به بلوغ در اسپرم و یا جنبندگی اسپرم را تحت

مشابه با تحقیق دیگری که بر روی قوچ‌های بالغ انجام شد (۲۳)، نتایج مطالعه حاضر نیز بیان رونوشت‌های آدیپونکتین و گیرنده آن ۲ آن را در پارانشیم بیضه و سه قسمت مختلف اپیدیدیم (سر، بدنه و دم) مجرای تولیدمثلی قوچ‌های بالغ نشان داد. اگرچه در بخش جلویی اپیدیدیم (سر و بدنه) بیان بیشتر آدیپونکتین و AdipoR2 در

که آدیپونکتین موضعی می‌تواند یک فاکتور تنظیمی مهم در ارتباط با عملکردهای خاص سلولی و همچنین یک عامل تأثیرگذار در آغاز فرآیندهای بلوغ در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر پیش از بلوغ باشد. با این حال، شفاف‌سازی دقیق‌تر مکانیزم‌های عملکرد آدیپونکتین در گندهای نشخوارکنندگان موارد زیر را می‌طلبد: ۱) سطوح پلاسمایی آدیپونکتین و اثرات متقابل آن با هورمون‌های استروئیدی بخصوص تستوسترون، ۲) تعیین موقعیت دقیق آدیپونکتین و AdipoR2 در مجرای تولیدمثلی هم نشخوارکنندگان بالغ و هم نابالغ، بخصوص در پارانشیم بیضه و همچنین، ۳) پروفیل وابسته به رشد بیان ژن‌های آدیپونکتین و AdipoR2 در دستگاه تولیدمثلی نشخوارکنندگان ماده در دوره پیش از بلوغ. با توجه به جدید بودن این مشاهدات، مطالعات بیشتری برای مشخص کردن نقش‌های مولکولی دقیق‌تر آدیپونکتین در مجرای تولیدمثلی نشخوارکنندگان نر لازم است.

تأثیر قرار دهد به طوری که بیان AdipoR2 در تاژک اسپرم جوجه نیز پیش از این گزارش شد (۲۰). کاهش تدریجی جالبی که در سطوح mRNA آدیپونکتین و AdipoR2 از سر تا دم اپیدیدیم مشاهده شد ممکن است نشان دهنده اهمیت کمتر ژن‌های سیستم آدیپونکتین در دم اپیدیدیم باشد. چنین سیستمی ممکن است در تنظیم یکپارچگی ساختاری و عملکردی اپیدیدیم و پارانشیم بیضه نیز نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور خلاصه، برای اولین بار ما رونوشت‌های mRNA آدیپونکتین و AdipoR2 را در مجرای تولیدمثلی بره‌های نر پیش از بلوغ مشاهده کردیم و این بررسی مشخص کرد که مقادیر mRNA این ژن‌ها با افزایش سن تغییر می‌کند. اگرچه نقش‌های دقیق آدیپونکتین در بافت‌های تولیدمثلی نشخوارکنندگان نر بالغ و نابالغ هنوز کاملاً آشکار نشده است ولی نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهند

منابع

- 1- Bauche, I. B., E. I. Ait., S. Mkadem., R. Rezsohazy., T. Funahashi., N. Maeda., L. M. Miranda, and S. M. Brichard. 2006. Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345: 1414-1424.
- 2- Bjursell, M., A. Ahnmark., Y. M. Bohlooly., L. William-Olsson., M. Rhedin., X. R. Peng., K. Ploj., A. K. Gerdin., G. Arnerup., A. Elmgren., A. L. Berg., J. Oscarsson, and D. Linden. 2007. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes*, 56: 583-593.
- 3- Caminos, J. E., R. Nogueiras., F. Gaytan., R. Pineda., C. R. Gonzalez., M. L. Barreiro., J. P. Castano., M. M. Malagon., L. Pinilla., J. Toppari., C. Dieguez, and M. Tena-Sempere. 2008. Novel Expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology*, 149:3390-3402.
- 4- Ceddia, R. B., R. Somwar., A. Maida., X. Fang., G. Bikopoulos, and G. Sweeney. 2005. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*, 48: 132-139.
- 5- Chabrolle, C., L. Tosca., S. Crochet., S. Tesseraud, and J. Dupont. 2007. Expression of AdipoR1 and AdipoR2 in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domestic Animal Endocrinology*, 33: 480-487.
- 6- Chabrolle, C., L. Tosca, and J. Dupont. 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction*, 133: 719-731.
- 7- Chappaz, E., M. S. Albornoz., D. Campos., L. Chea., M. F. Palin, and D. Bruce. 2008. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domestic Animal Endocrinology*, 35: 198-207.
- 8- Combs, T. P., A. H. Berg., M. W. Rajala., S. Klebanov., P. Iyengar., J. C. Jimenez Chillaron., M. E. Patti., S. L. Klein., R. S. Weinstein, and P. E. Scherer. 2003. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, 52: 268-276.
- 9- Dai, M. H., T. Xia., G. D. Zhang., X. D. Chen., L. Gan, and S. Q. Feng. 2006. Cloning, expression and chromosome localization of porcine adiponectin and adiponectin receptors genes. *Domestic Animal Endocrinology*, 30: 117-125.
- 10- Dupont, J., C. Chabrolle., C. Rame., L. Tosca, and S. Coyral-Castel. 2008. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Research*, 2008:1-9.
- 11- Kadowaki, T. and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, 26: 439-51.
- 12- Kershaw, E. E. and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89: 2548-2556.
- 13- Lagaly, D. V., P. Y. Aad., J. A. Grado-Ahuir., L. B. Hulsey, and L. J. Spicer. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 284: 38-45.
- 14- Ledoux, S., D. B. Campos., F. L. Lopes., M. Dobias-Goff., M. F. Palin, and B. D. Murphy. 2006. Adiponectin

- induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology*, 147: 5178-5186.
- 15- Lord, E., S. Ledoux., B. D. Murphy., D. Beaudry, and M. F. Palin. 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *Journal of Animal Science*, 83: 565-578.
 - 16- Ma, H., V. Gomez., L. Lu., X. Yang., X. Wu, and S. Y. Xiao. 2009. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(2): 233-237.
 - 17- Maddineni, S., S. Metzger., O. Ocon., G. I. I. I. Hendricks, and R. Ramachandran. 2005. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 1464: 250-256.
 - 18- Maeda, N., I. Shimomura., K. Kishida., H. Nishizawa., M. Matsuda., H. Nagaretani., N. Furuyama., H. Kondo., M. Takahashi., Y. Arita., R. Komuro., N. Ouchi., S. Kihara., Y. Tochino., K. Okutomi., M. Horie., S. Takeda., T. Aoyama., T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine*, 8: 731-737.
 - 19- Maillard, V., S. Uzbekova., F. Guignot., C. Perreau., C. Rame., S. Coyral-Castel, and J. Dupont. 2010. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8:23-38.
 - 20- Ocoñ-Grove, O. M., S. M. Krzysik-Walker., S. R. Maddineni., G. L. Hendricks, and R. Ramachandran. 2008. Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken testis: influence of sexual maturation on testicular ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA abundance. *Reproduction*, 136: 627-638.
 - 21- Paschke, L., T. Zemleduch., M. Rucinski., A. Ziolkowska., M. Szyszka, and L. K. Malendowicz. 2010. Adiponectin and adiponectin receptor system in the rat adrenal gland: ontogenetic and physiologic regulation, and its involvement in regulating adrenocortical growth and steroidogenesis. *Peptides*, 31(9): 1715-1724.
 - 22- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45.
 - 23- Rahmanifar, F, and M. R. Tabandeh. 2012. Adiponectin and its receptors gene expression in the reproductive tract of ram. *Small Ruminant Research*, 105: 263-267.
 - 24- Ramachandran, R., O. M. Ocon-Grove, and S. L. Metzger. 2007. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domestic Animal Endocrinology*, 33 (1): 19-31.
 - 25- Rodriguez-Pacheco, F., A. J. Martinez-Fuentes., S. Tovar., L. Pinilla., M. Tena-Sempere., C. Dieguez., J. P. Castano, and M. M. Malagon. 2007. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*, 148: 401-410.
 - 26- Schaffler, A., J. Scholmerich, and B. Salzberger. 2007. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in Immunology*, 28: 393-399.
 - 27- Tabandeh, M. R., N. Golestani., M. Kafi., A. Hosseini., M. Saeb, and P. Sarkoohi. 2012. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, 131: 30-40.
 - 28- Wena, J. P., W. S. Lv., J. Yang., A. F. Nie., X. B. Cheng, and Y. Yang. 2008. Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371: 756-761.
 - 29- Yamauchi, T., J. Kamon., Y. Ito., A. Tsuchida., T. Yokomizo., S. Kita., T. Sugiyama., M. Miyagishi., K. Hara., M. Tsunoda., K. Murakami., T. Ohteki., S. Uchida., S. Takekawa., H. Waki., N. H. Tsuno., Y. Shibata., Y. Terauchi., P. Froguel., K. Tobe., S. Koyasu., K. Taira., T. Kitamura., T. Shimizu., R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941): 762-769.



Gene Expression of Adiponectin and Its Receptor2 (AdipoR2) in Reproductive Tract of Growing Prepubertal Afshari Male Lambs

M. Dorounaki^{1*} - B. Rostami² - T. Harkinezhad³ - M. H. Shahir³

Received: 27-09-2015

Accepted: 03-04-2016

Introduction Adiponectin, a novel adipocytokine mainly produced from adipocytes, acts through binding to its two functional receptors, AdipoR1 and AdipoR2. Some evidence has already suggested that adiponectin can be involved in the regulation of male reproductive functions. Our purpose was to detect of adiponectin and AdipoR2 mRNA transcripts in the reproductive tissues of growing pre-pubertal male lambs as well as adult rams.

Materials and Methods At first, Afshari prepubertal male lambs (n=20), with no apparent abnormalities, were allocated to four different age groups (n=5/age group) including; 1-2 (Group 1), 2-3 (Group 2), 3-4 (Group 3), and 4-5 (Group 4) months of age, afterward were surgically castrated. At a local slaughterhouse, reproductive tissues from five adult Afshari rams (3-4 years-old), with no evident abnormalities, were also collected within 20 minutes after the rams were slaughtered. Both fresh whole testes for lambs and those for adult rams were instantly transported to the laboratory on ice and were frozen in the liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Total RNA extracted from each tissue sample, converted to cDNA and finally, the relative expression levels of adiponectin and AdipoR2 transcripts were assessed by Quantitative Real time-PCR. Comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used for quantification of Real-Time PCR outputs. By GenEx enterprise software, obtained fold changes were statistically analyzed.

Results and Discussion By real-time PCR, local gene expression of adiponectin and AdipoR2 was demonstrated in testis parenchyma and three different parts of epididymis (caput, corpus and cauda) for both immature male lambs and adult rams. The results showed that adiponectin and AdipoR2 levels persistently changed during pre-pubertal and pubertal developmental stages. There were no significant differences in adiponectin, and AdipoR2 mRNA levels among various tissues ($p>0.05$); but, mRNA quantities significantly varied among different age groups ($p<0.05$). A high positive correlation ($r=0.72$) was observed between ligand and AdipoR2. Because of developmental changes in adiponectin and AdipoR2 mRNAs levels among different age groups, expression levels appear to be under regulation of developmental cues and hormonal factors such as gonadotropins. It has already been demonstrated that AdipoR2, but not adiponectin, levels noticeably enhances by hCG (the superagonists of LH). Similar expression profiles of Adiponectin and AdipoR2, with increased expressions exactly before puberty to sexually mature animals, suggest that adiponectin may be involved to the expansion of the adult-type leydig cell population that takes place along the puberty transition. Since, Adiponectin affects glucose transporters (SLC2A1 and SLC2A3) expression in seminiferous tubular cells, and plays a major role in several metabolic functions such as glucose utilization, energy homeostasis and immunity; we speculated that adiponectin, locally expressed by testicular and epithelial cells, might be key regulator of various functions of reproductive cells.

Conclusion The results of current study showed that adiponectin, locally expressed by testes and epididymis of prepubertal male lambs, can be engaged in onset of pubertal processes and affect male fertility as well. In summary, our study is the first to describe the local expression of adiponectin and its functional receptor2 (AdipoR2) transcripts in the genital tract of immature/growing ruminants. We also suggest that the AdipoR2 is probably a more important receptor for adiponectin.

Keywords: Adiponectin, Afshari Ram, Gene Expression, Reproduction, Testis.

1- MSc. Student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran,
2- Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran,
3- Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.
(*- Corresponding Author Email: m.dorounaki@gmail.com)