

بررسی بیان ژن IGF2 در بافت‌های عضلانی و چربی پشت کمر گوسفند کرمانی

فاطمه ابارقی^۱، محمدرضا محمدآبادی^{۲*}، احمد آیت‌اللهی مهرجردی^۳، امین خضری^۴، دیانا شبان جرجندی^۵، مجید

عسکری حسنی^۶ و شکیب سالمی^۷

شماره صفحات

۰۵-۱۷

- ۱) دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان ایران.
- ۲) استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.
- ۳) دانشیار، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.
- ۴) دانشیار، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.
- ۵) دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.
- ۶) دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
- ۷) دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول: mrm@uk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۵

چکیده

فاکتور رشد شبه انسولین ۲ (IGF2) یک شریک پپتیدی بسیار حفاظت‌شده پروتئین‌های سیگنال‌دهنده انسولین/IGF است که عمدتاً با اتصال به گیرنده انسولین (IR) و گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF1R) در تکثیر، رشد و بقای سلولی نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن IGF2 در بافت‌های عضله راسته، عضله سردست، عضله ران و چربی پشت کمر گوسفند کرمانی بود. پس از کشتار، نمونه‌های بافتی از ۳ راس بره ۶ ماهه نر گوسفند کرمانی برداشت شد. سپس RNA کل استخراج و پس از بررسی کیفیت و کمیت آن، ساخت cDNA انجام شد. از واکنش Real Time PCR برای بررسی بیان نسبی ژن‌های IGF2 و B-actin (ژن کنترل داخلی) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR و محاسبه مقدار تغییرات بیان ژن، از نرم‌افزار Prism و Rotor-Gene سری Q استفاده شد. نتایج منحنی‌های Real Time PCR نشان داد که ژن IGF2 در تمام بافت‌های عضلانی و چربی پشت کمر گوسفند کرمانی بیان شد. بیشترین افزایش بیان ژن IGF2 مربوط به بافت عضله راسته (۹/۳۰۷) و سپس بافت عضله ران (۴/۵۶۹) بود. کمترین میزان بیان مربوط به بافت چربی پشت کمر (۱/۱۲۴) بود. اختلاف معنی‌دار بین بافت عضله راسته با عضله سردست، چربی پشت کمر و عضله ران مشاهده شد ($P < 0.01$). شناسایی ژن‌هایی که مرتبط با صفات رشد هستند و تولید گوشت را بهبود می‌بخشند، مانند ژن IGF2 برای تولید دام‌های با کیفیت بالاتر ضروری می‌باشد. این مطالعه درک بهتری از بیان ژن IGF2 در بافت‌های عضلانی و چربی پشت کمر گوسفند کرمانی ارائه کرد.

واژه‌های کلیدی: Real Time PCR، چربی پشت کمر، عضله اسکلتی، فاکتور رشد شبه انسولین ۲ و بیان ژن.

مقدمه

نسخوارکنندگان کوچک، به ویژه انواع نژادهای بومی، نقش مهمی در معیشت بخش قابل توجهی از جمعیت انسانی در مناطق گرمسیری از جنبه‌های اجتماعی و اقتصادی ایفا می‌کنند. بنابراین، تلاش تلفیقی از نظر مدیریت و بهبود ژنتیکی برای افزایش تولید از اهمیت بسزایی برخوردار است (Jafari Ahmadabadi *et al.*, 2023). شناسایی ژن‌هایی که نقش مهمی در رشد بافت عضلانی گوسفند ایفا می‌کنند ممکن است در حین مطالعه پروفایل بیان با تخمین مقدار mRNA ژن‌های خاص در ماهیچه‌ها باشد. پروفایل بیان منعکس‌کننده فعالیت عملکرد ژن‌های منفرد است و فرآیندهای مصنوعی در ماهیچه‌ها را مشخص می‌کند که در برخی از نژادهای گوسفند متفاوت است. همانطور که توسط Hamill *et al.* (2012) در خوک‌ها نشان داده شده است، احتمال زیادی وجود دارد که تغییرات در ساختار ژن‌ها با سطوح بیان بالا تأثیر قابل توجهی بر رشد و توسعه بافت عضلانی در گوسفند داشته باشد. مطالعات پروفایل بیان ژن در عضلات گوسفند توسط LÓbo *et al.* (2012)، ارائه شده است که بیان متفاوتی از ژن‌های ¹MyoD1 و ²IGFBP4 را نشان داد که با نژاد گوسفند و ویژگی‌های تولیدی آنها مرتبط است. IGF2 می‌تواند با افزایش بیان MyoD1 و myogenin تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی گوسفند را تقویت کند (Wei *et al.*, 2018). فاکتور رشد شبه انسولین ۲ (³IGF2) که به عنوان تنظیم‌کننده رشد A یا سوماتومدین A نیز شناخته می‌شود، نقش مهمی در تنظیم رشد جنین، تکثیر تومور و رشد عضلات اسکلتی ایفا می‌کند. عملکرد IGF2 در زندگی قبل از تولد بهتر شناخته شده است. این ژن جفت را از طریق مسیر پروتئین کیناز بی⁴ (AKT) (Kent *et al.*, 2012) و تمایز عضلات اسکلتی (Gardner *et al.*, 2011) تنظیم می‌کند. علاوه بر این، گزارش شده است که تجویز IGF2 در موش‌ها به طور قابل توجهی وزن معده، روده، کبد و پانکراس را افزایش می‌دهد، در حالی که بر وزن قلب، ریه‌ها و کلیه‌ها بی‌تأثیر است، که نشان دهنده نقش IGF2 در رشد این اندام‌ها است (White *et al.*, 2018). بیشتر IGF2 در گردش در یک کمپلکس سه تایی با پروتئین-۳ باند شونده به IGF (IGFBP3) وجود دارد که دسترسی محدودی به بافت‌ها دارد. بنابراین، غلظت IGF2 بافتی که سلول‌های چربی در معرض آن قرار می‌گیرند بسیار کمتر است (۱-۱۰٪ از سطوح گردش خون). اما، هنوز به طور قابل توجهی بالاتر از سطوح انسولین است (Holly and Perks, 2012). بیان IGF2 به شدت با وزن و چاقی مرتبط است؛ همچنین سطح متیلاسیون ژن IGF2 با وزن هنگام تولد مرتبط است و بیان IGF2 در رحم باعث افزایش چربی‌زایی و ذخیره چربی در دوران بارداری می‌شود (Alfares *et al.*, 2018). به طور کلی، نتایج مطالعه Wilson and Rotwein (2006) نشان می‌دهد که IGF2 ممکن است نقشی به عنوان تنظیم‌کننده فیزیولوژیکی رشد و متابولیسم پیش چربی داشته باشد و ممکن است نقش محافظتی در تنظیم ترکیب چربی بدن

¹ Myogenic Differentiation 1

² Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4

³ Insulin Like Growth Factor 2

⁴ Protein Kinase B

ایفا کند. در مطالعه‌ای (Beletskiy *et al.* 2021) دادند که در برخی از گونه‌ها، مانند گاو، گوسفند و برخی پستانداران، نمایه‌های بیان IGF2 بیشتر شبیه انسان است تا جوندگان. تاکنون مطالعات بسیار کمی روی بیان ژن IGF2 در نشخوارکنندگان کوچک، به‌ویژه گوسفند انجام شده است. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن IGF2 در بافت‌های مختلف (عضله راسته، عضله سردست، عضله ران و چربی پشت کمر) گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی ژن IGF2، نمونه‌برداری از بافت‌های عضله ران، عضله سردست، عضله راسته و چربی پشت کمر بره‌های نر کرمانی (از ۳ حیوان و از هر بافت ۲ تکرار) با وزن تقریباً مشابه و حدوداً ۶ ماهه در هنگام کشتار انجام شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از بافت‌ها توسط تیغ جراحی استریل جدا شد و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری بدون RNase قرار داده شدند و به سرعت در داخل تانک ازت گذاشته شدند. نمونه‌های منجمد در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA بایستی در محیطی عاری از RNase انجام می‌شود. برای استخراج RNA کل از بافت، از کیت شرکت دنایزیت (ایران) استفاده شد. برای تعیین کیفیت و کمیت (غلظت) RNA استخراج شده، از روش‌های الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد. با مقایسه‌ی ضخامت و شدت (شارپی) باندهای بدست آمده روی ژل، می‌توان به کیفیت RNA استخراج شده پی برد. در روش نانودراپ از میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت تعیین میزان غلظت و از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نیز برای تعیین میزان آلودگی به پروتئین و الکل (کیفیت RNA) استخراج شده استفاده گردید. در مورد RNA این نسبت‌ها به ترتیب باید بین ۲-۱/۸ و بیشتر از ۱/۸ باشد. RNA استخراج شده به فریزر -80°C منتقل شد تا در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گیرد.

برای سنتز cDNA از کیت شرکت پارس‌توس (ایران) استفاده شد. کیت سنتز cDNA شامل Buffer Mix، Enzyme Mix و Water DEPC بود. جهت یکسان کردن RNA به کار رفته در ساخت cDNA، از مقدار ۱ میکروگرم RNA استفاده شد؛ زیرا ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید. مخلوط واکنش شامل مواد مندرج در جدول ۱ بود. در نهایت محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱- مقدار و مواد مورد استفاده در واکنش سنتز cDNA

Table 1- The amount and materials used in the cDNA synthesis reaction

مقدار مورد استفاده	نوع ماده
1 μg	RNA
1 μg	Buffer-mix
1 μg	Enzyme mix
UP TO 20 μg	Water (ddw)

واکنش‌های PCR برای سنتز cDNA طبق پروفایل حرارتی جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش ساخت cDNA

Table 2- Thermal program of cDNA synthesis reaction

مرحله انجام شده	درجه حرارت	مدت زمان
انکوبه	۲۵°C	۱۰ دقیقه
ساخت cDNA	۴۷°C	۶۰ دقیقه
توقف ساخت	۸۵°C	۵ دقیقه

از آنجا که توالی ژن مورد نظر در بانک ژن موجود بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن طراحی شدند. به این منظور توالی ژن IGF2 از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) گرفته شد و آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی گردیدند (Lima & Garcês, 2006). از ژن بتا اکتین نیز به عنوان کنترل داخلی در آزمایش‌ها استفاده شد (جدول ۳). سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت سینا کلون (ایران) صورت گرفت. برای تهیه محلول ذخیره طبق روش شرکت، مقدار مشخصی آب دیونیزه استریل به آغازگرهای لیوفیلیزه اضافه و سپس برای تهیه محلول کاری مقداری از محلول ذخیره ۱۰ برابر رقیق و سپس تمامی این محلول‌ها در فریزر و در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شدند.

جدول ۳- توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن IGF2 و بتا اکتین در بافت‌های مختلف بره‌های نر کرمانی

Table 3- Sequence of primers used for IGF2 and β -actin gene expression in different tissues of Kermani male lambs

شماره دسترسی	طول قطعه تکثیر شده	توالی آغازگر	نام ژن
accession number	Size of PCR Product (bp)	Primer sequence	Gene Name
NM_001009784.3	۱۰۲	F : CTCACGGAGCGTGGCTACA	β -actin
		R : GCCATCTCCTGCTCGAAGTC	
NM_001009311.1	۱۳۴	F : TGGCATCGTGGAAGAGTGT	IGF2
		R : GGTATGCTGTGAAGTCGTCC	

پس از انجام واکنش‌های PCR معمولی و به دست آوردن شرایط اتصال و دمای مطلوب برای ژن‌ها، Real Time PCR با استفاده از دستگاه QIAGEN Hilden انجام شد. برای ارزیابی میزان نسبی بیان ژن‌ها از واکنش Real Time PCR به روش Syber Green استفاده شد. کیت Syber Green شامل Taq DNA polymerase، MgCl₂، dNTPs، PCR buffer، Syber Green و بدون ROX بود. واکنش‌های Real Time PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش

شامل موادی است که در جدول ۴ ذکر شده است. واکنش‌های Real Time PCR برای تکثیر هر ژن با توجه به مشخصات حرارتی واکنش (جدول ۵) و با انجام ۴۰ سیکل صورت گرفت.

جدول ۴- مواد و مقادیر مورد استفاده در هر واکنش Real Time PCR
Table 4- The Materials and amounts used in each Real Time PCR reaction

مقدار مورد استفاده	نوع ماده
7.5 μ L	syber green Master-Mix
0.75 μ L	Fed primer (10 pmol/ μ)
0.75 μ L	Rev primer(10pmol/ μ)
1 μ L	cDNA(20 ng/ μ)
Up to 15 μ L	Water(ddw)

جدول ۵- برنامه حرارتی Real Time PCR
Table 5- Real Time PCR thermal program

مدت زمان	درجه حرارت	مرحله انجام شده
۵ دقیقه	۹۵C	واسرشت سازی اولیه (جدایی دو رشته DNA)
۲۰ دقیقه	۹۵C	واسرشت سازی هر چرخه
۳۰ دقیقه	۵۸C	اتصال پرایمر به توالی هدف در DNA
۲۰ دقیقه	۷۲C	بسط و ساخت رشته جدید
۸ دقیقه	۷۲C	تکثیر نهایی

داده‌های حاصل از Real Time PCR با استفاده از فرمول Pfaffle (2002) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در مدل Pfaffle:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C P_{\text{target}(\text{control} - \text{sample})}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C P_{\text{ref}(\text{control} - \text{sample})}} \quad \text{رابطه ۱:}$$

E راندمان تکثیر را نشان می‌دهد.

از این روش برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها استفاده می‌شود. مبنای مقایسه تفاوت‌های CT در نمونه‌های مورد مطالعه و

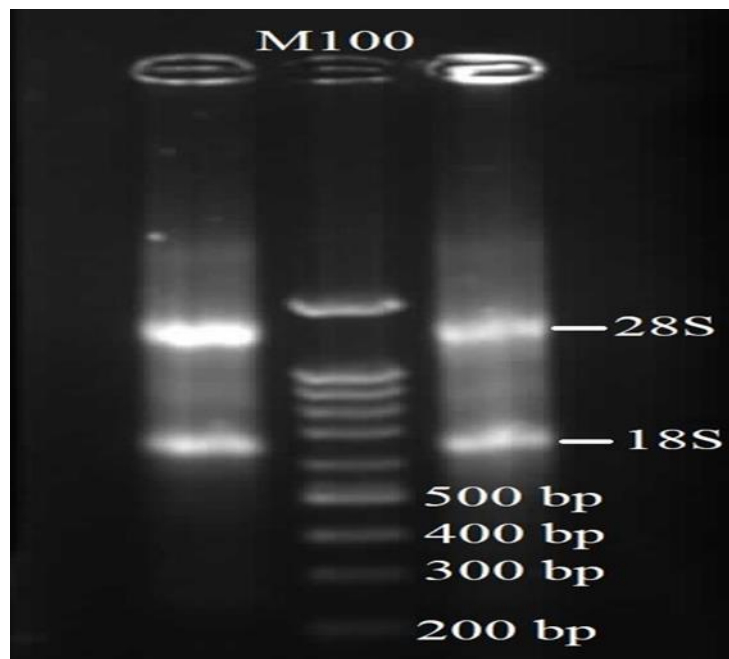
کنترل است. به عبارت دیگر مقادیر CT در نمونه‌هایی که تحت تیمار دارویی یا آزمایش‌های متفاوت بوده‌اند با CT نمونه‌ی نرمال

مقایسه می‌شود. همانند روش نیمه کمی در استفاده از PCR معمولی مقادیر CT هم در نمونه‌ی مورد آزمایش و هم در بافت نرمال نسبت به ژن استاندارد (رفرنس) نرمال‌سازی یا تصحیح می‌شود.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از Real time PCR از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software استفاده شد. همچنین برای آنالیز داده‌ها نرم افزارهای GraphPad prism 8 (<https://www.graphpad.com/updates/prism->) و Excel مورد استفاده قرار گرفتند. جهت بررسی تغییرات بیان ژن بین گروه تیمار و کنترل از آزمون T-test استفاده گردید. همچنین برای مقایسه تغییرات بیان ژن‌ها بین گروه‌های تیمار از روش آنالیز آماری One-way ANOVA استفاده شد. لازم به ذکر است که برای تمام محاسبات آماری انجام شده P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. همچنین برای رسم نمودارها در نرم افزار prism میانگین داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ برای هر گروه نشان داده شده است.

نتایج و بحث

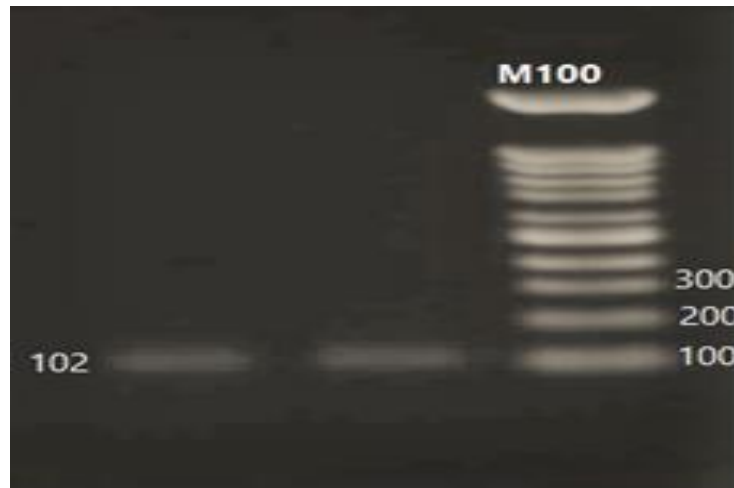
نتایج ژل الکتروفورز نشان داد که کیفیت RNAهای استخراج شده خوب بود. باندهای RNAهای ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S قابل تشخیص بوده و اسمیر میان این دو باند مربوط به mRNAها بود که نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده است (شکل ۱). همچنین نتایج نانودراپ نشان داد که نمونه‌های RNA استخراج شده فاقد آلودگی بودند، زیرا نسبت ۲۶۰ نانومتر: ۲۸۰ نانومتر از ۱/۷۷ تا ۱/۹۰ متغیر بود.



شکل ۱- کیفیت RNA استخراج شده از دو نمونه روی ژل آگارز ۲ درصد

Figure 1- Quality of the extracted RNA from two samples on 2% agarose gel

کیفیت cDNA سنتز شده، از طریق کاربرد آن در یک ران PCR با استفاده از پرایمرهای یک ژن مرجع (بتا‌اکتین) بررسی شد و پس از اطمینان از کیفیت مطلوب، در واکنش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده قطعه‌ی 102bp تکثیرشده نشان دهنده انجام صحیح واکنش ساخت cDNA بود (شکل ۲).

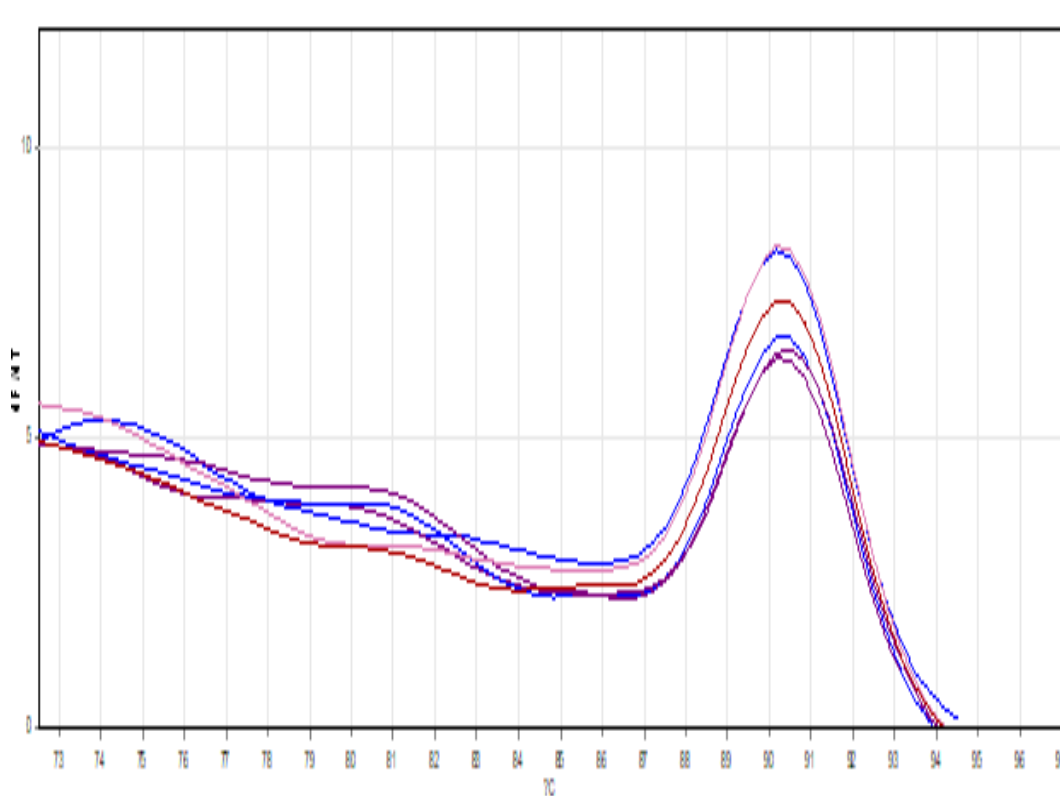


شکل ۲- الکتروفورز cDNA سنتز شده با پرایمر بتا‌اکتین بر روی ژل آگارز ۱ درصد

Figure 2- Electrophoresis of cDNA synthesized with β -actin primer on 1% agarose gel

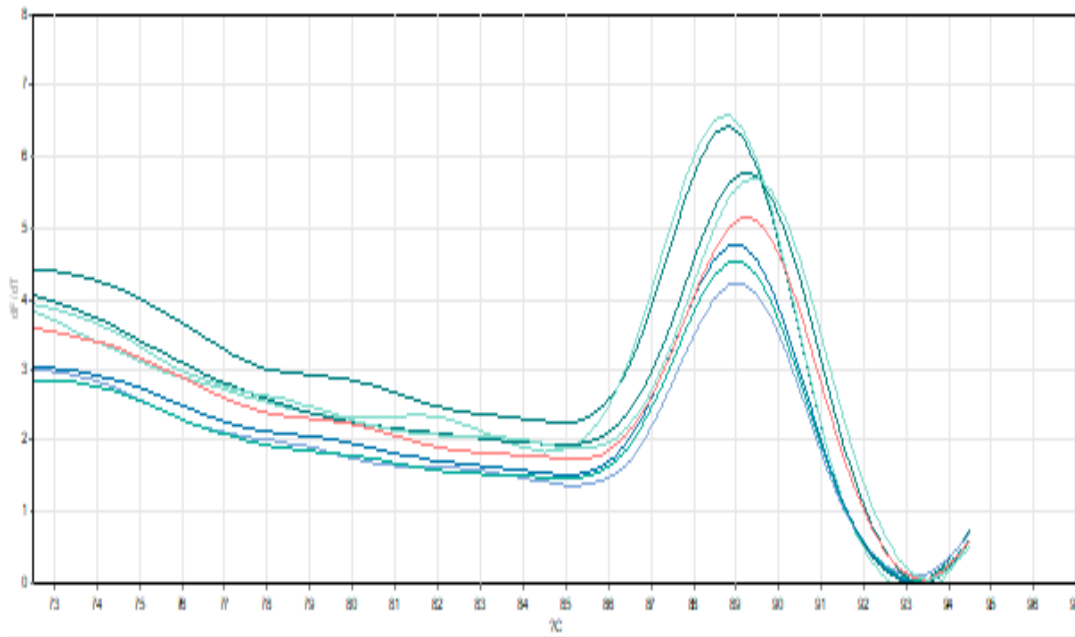
با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، تنها یک قله در منحنی‌های ذوب ژن IGF2 (شکل ۳) و ژن بتا‌اکتین (شکل

۴) محصولات PCR مشاهده شد که نشان‌دهنده تولید یک محصول اختصاصی در این واکنش است.



شکل ۳- منحنی ذوب ژن IGF2 در بافت راسته

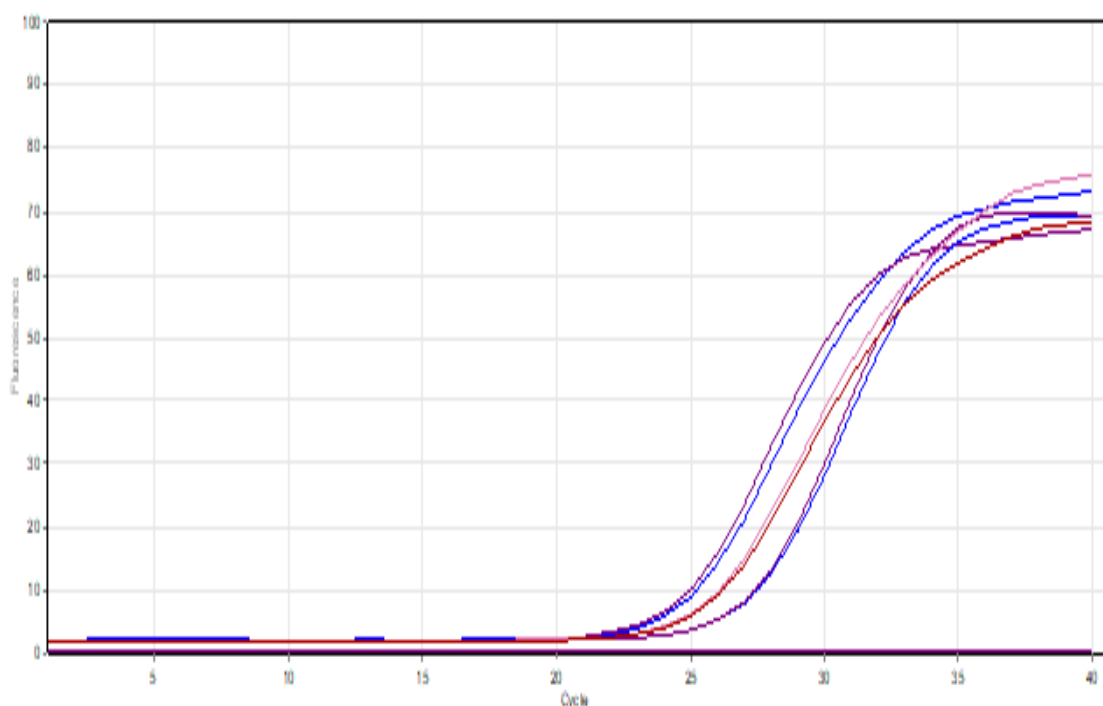
Figure 3- The melting curve of IGF2 gene in the back (loin) muscle tissue



شکل ۴- منحنی ذوب ژن β -actin در بافت راسته

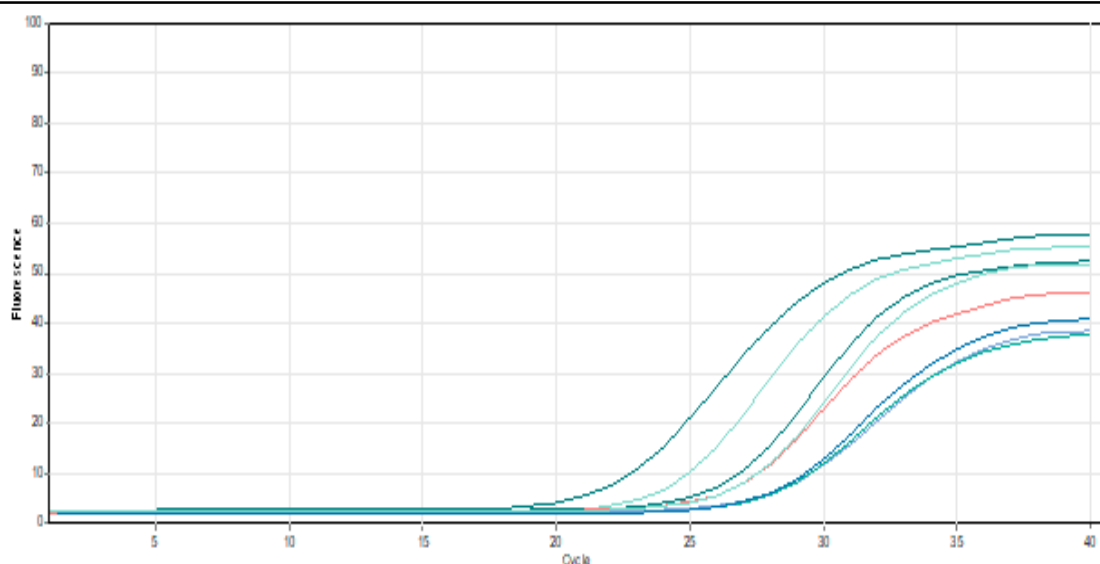
Figure 4- The melting curve of β -actin gene in the back (loin) muscle tissue

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که منحنی تکثیر PCR نمونه‌های ژن IGF2 در بافت راسته (شکل ۵) از چرخه ۲۲ تا ۲۴، شروع به تکثیر کرده و وارد فاز نمایی شد. در مرحله بعد محصولات PCR وارد فاز خطی شدند و در نهایت نمونه‌هایی از بافت راسته از سیکل ۳۶ وارد فاز آستانه شدند. همین روند برای نمونه‌های مورد مطالعه برای ژن بتااکتین مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵- منحنی تکثیر ژن IGF2 در بافت راسته

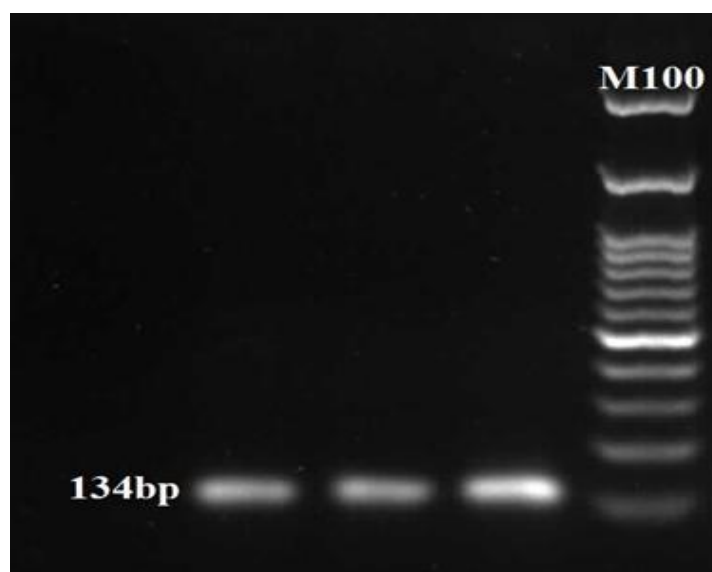
Figure 5- The amplification curve of IGF2 gene in back (loin) muscle tissue



شکل ۶- منحنی تکثیر ژن β -actin در بافت راسته

Figure 5- The amplification curve of β -actin gene in back (loin) muscle tissue

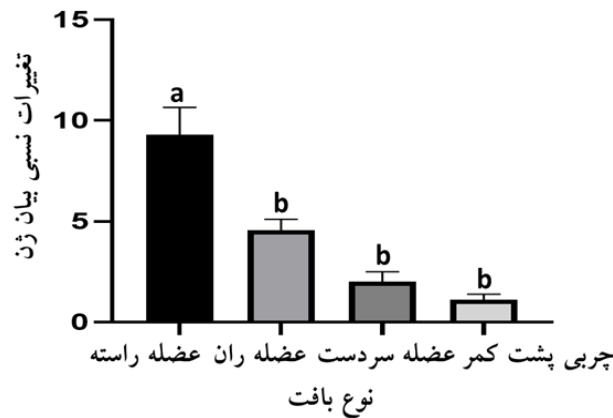
بعد از انجام واکنش Real Time PCR برای اطمینان از انجام صحیح واکنش محصول آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد جداسازی و الکتروفورز گردید. مشاهده قطعه محصول PCR با اندازه ۱۳۴bp، انجام صحیح واکنش را تایید نمود (شکل ۷).



شکل ۷- الکتروفورز محصولات Real Time PCR ژن IGF2 بر روی ژل آگارز ۱ درصد

Figure 7- Electrophoresis of Real Time PCR products of IGF2 gene on 1% agarose gel

ژن IGF2 در همه بافت‌های عضله راسته، عضله ران، عضله سردست، و چربی پشت کمر گوسفند کرمانی به ترتیب به مقدار ۹/۳۰۷، ۴/۵۶۹، ۲/۰۱۹ و ۱/۱۲۴ بیان شد (شکل ۸). بیشترین افزایش بیان ژن IGF2 مربوط به بافت راسته بود. از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بین بافت راسته، عضله ران، عضله دست و چربی پشت کمر مشاهده شد ($P < 0.001$). کمترین میزان بیان مربوط به بافت چربی پشت کمر بود. از طرفی اختلاف معنی‌داری بین بافت‌های عضله ران و عضله دست و همچنین بین بافت‌های عضله دست و بافت چربی پشت کمر مشاهده نشد.



شکل ۸- بیان ژن IGF2 در بافت‌های راسته، عضله ران، عضله دست و چربی پشت کمر. میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

Figure 8- IGF2 gene expression in back (loin) muscle tissues, femur (leg) muscle, humeral muscle and back fat. Comparison of means (mean of three replicates) using one-way ANOVA test. Averages that have at least one letter in common do not have a statistically significant difference. $P < 0.05$ was considered as a significant level.

مقادیر بیشتر mRNA IGF2 در عضله اسکلتی گوسفند نسبت به چربی پشت کمر در این مطالعه با یافته‌های سایر پژوهش‌گران که مقادیر بیشتری mRNA IGF2 را از عضله اسکلتی نسبت به سایر بافت‌ها گزارش کردند (Abo-Al-Sélénou *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2018; Ela *et al.*, 2014; Borensztein *et al.*, 2012; Curchoe *et al.*, 2005) مطابقت دارد. اگرچه، فراوانی نسبی mRNA IGF2 در چربی پشت کمر و ماهیچه ممکن است منعکس کننده تولید IGF2 توسط بافت‌ها نباشد، این نتایج تأیید می‌کند که بافت ماهیچه‌ای بره‌ها دارای مقدار قابل توجهی mRNA IGF2 است و نشان می‌دهد که فراوانی IGF2 در رشد عضلات اسکلتی نقش دارد. یکی از شناخته شده‌ترین و مطالعه شده‌ترین نقش‌های IGF2 نقش آن در میوزن است. IGF2 نقش مستقیمی در تمایز لایه میانی جنینی به سلول عضلانی با تنظیم مثبت بیان MyoD، که یک عامل کلیدی تعیین کننده در سرنوشت عضلات اسکلتی است، ایفا می‌کند. همچنین بر روی هموستاز ماهیچه‌های اسکلتی مخطط و در نتیجه بر بلوغ، نگهداری و التیام چنین عضلاتی تأثیر می‌گذارد (Sélénou *et al.*, 2022). در پژوهشی Ampaporn *et al.*, (2023) گزارش کردند که ژن IGF2 با صفات اقتصادی مهم نژادهای خوک، مانند الگوی ژنوتیپی ژن IGF2 در افزایش ضخامت گوشت قرمز و چربی در خوک‌ها مرتبط است. همچنین Braunschweig (2012) بیان کرد که ژن IGF2 در اندام‌هایی مانند مغز، کبد، ماهیچه‌ها و کلیه‌ها بیان می‌شود. از این رو، محققین ژن IGF2 را ژن کاندید مناسبی برای مطالعات صفات رشد معرفی کردند. در این پژوهش نیز ژن IGF2 در بافت‌های عضله و چربی پشت کمر بررسی شد و نتایج این مطالعه حاکی از این است که این ژن در تمامی بافت‌های مورد مطالعه بیان شد که همسو با نتایج سایر محققین می‌باشد.

فاکتور رشد شبه انسولین ۲ برای میوبلاست‌ها میتوزن است، اما برای تمایز میوبلاست‌ها نیز مورد نیاز است (Florini *et al.*, 1991).

Florini *et al.*, (1991) نشان دادند که تمایز میوبلاست را می‌توان با مسدود کردن بیان IGF2 با یک

الیگنونوکلئوتید آنتی سنس مهار کرد که از این ایده حمایت می‌کند که IGF2 ممکن است با شرکت در تمایز نهایی، میوژن را تعدیل کند. اگرچه IGF2 یک میوژن قوی برای رشد جنین است، در مطالعه‌ای Curchoe et al., (2005) بیان ژن IGF2 را در بافت‌های مختلف سه گروه سنی گاو بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که در بافت‌های مورد بررسی از جمله کبد، ماهیچه و قلب در سه گروه سنی (جنین، گوساله و گاو بالغ) ژن IGF2 بیان می‌شود، که نشان می‌دهد IGF2 نقش مهمی پس از رشد جنین ایفا می‌کند. نتایج بررسی حاضر که در گونه‌ای متفاوت (گوسفند) انجام شده است تأییدکننده نتایج Curchoe et al., (2005) است.

در مطالعه‌ای دیگر Abo-Al-Ela et al., (2014) یک SNP (چند شکلی تک نوکلئوتیدی) در اگزون ۱۰ ژن IGF2 در گاو میش مصری شناسایی کردند. این SNP غیر مترادف بود و منجر به تغییر گلوتامین به هیستیدین شد. از آنجایی که اگزون‌های ۸-۱۰ پیش پروتئین IGF2 را رمزگذاری می‌کنند (Goodall and Schmutz, 2007)، و SNP شناسایی شده در اگزون ۱۰ وجود داشت، بنابراین ممکن است بر عملکرد پروتئین تأثیر بگذارد. در این مطالعه، سه ژنوتیپ (AA، AC و CC) برای SNP در گاو میش‌های مصری شناسایی شد. حیوانات دارای ژنوتیپ AA افزایش وزن روزانه بالاتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر (AC و CC) داشتند. بنابراین، ژن IGF2 را می‌توان به عنوان یک ژن کاندیدا برای رشد و صفات تولید گوشت در نظر گرفت. با این حال بررسی‌های بیشتری برای تأثیر بیان ژن IGF2 بر رشد و صفات تولید گوشت در گونه‌های دیگر نیاز است.

در یک مطالعه Hu et al., (2022) فهرستی از میکرو RNAهای گوسفندی را ارائه کردند که IGF2، MEF2C¹، MYEF2² و RB1³ را تنظیم می‌کنند. آن‌ها گزارش کردند که این فهرست با تمایز ماهیچه‌های اسکلتی، بیان میلین، تمایز میوژنیک و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه‌های اسکلتی گوسفند مرتبط هستند. میکرو RNAهایی که IGF2 را تنظیم می‌کنند شامل miR-133a، miR-214، miR-34a و miR-381 می‌باشند. این میکرو RNAها با اصلاح بیان IGF2 و در نتیجه، تأثیر آن بر تکثیر و تمایز سلول عضلانی، در هموستاز ماهیچه‌های اسکلتی نقش دارند (Sun et al., 2019) که نتایج این بررسی با نتایج پژوهش حاضر که افزایش بیان را در بافت‌های ماهیچه‌ای گوسفند کرمانی نشان می‌دهد مطابقت دارد.

در خوک‌ها، جهش‌های IGF2 باعث ایجاد تغییراتی در ترکیب بدن می‌شوند که با افزایش توده عضلانی و کاهش ضخامت چربی پشتی مشخص می‌شود. به طور خاص، بافت چربی زیر جلدی حیوانات حامل جهش IGF2 محتوای چربی کمتر و سلول‌های چربی کوچکتر را نشان داد (Gardan et al., 2008). قابل ذکر است که سلول‌های چربی از بافت چربی زیر جلدی و احشایی، هم IGF2 و هم گیرنده IGF2 را بیان می‌کنند (Cianfarani, 2012)، بنابراین نقش فیزیولوژیکی IGF2 در چربی را نشان می‌دهد. مطابق با این، IGF2 تکثیر سلول‌های پیش چربی را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می‌کند (Siddals et

¹ Myocyte Enhancer Factor 2C

² Myelin Expression Factor 2

³ Retinoblastoma

(al., 2002). در موش‌های جهش یافته، از دست دادن هر دو ژن IGF2 و Myod در مقایسه با نوزادان نوع وحشی و تک جهش یافته باعث ایجاد هیپرتروفی عظیم بافت چربی قهوه‌ای می‌شود. غیرفعال سازی همزمان Myod و IGF2 تمایز یک رده سلولی سلول‌های پیش چربی قهوه‌ای را تسریع می‌کند و باعث تجمع چربی می‌شود (Borensztein et al., 2012). نتایج مطالعه حاضر که افزایش بیان را در بافت‌های ماهیچه‌ای نسبت به بافت چربی پشت کمر نشان داد تأیید کننده نتایج مطالعات ذکر شده می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه بیان ژن IGF2 در گوسفند کرمانی در سن ۶ ماهگی مطالعه شد و مشاهده بیان این ژن در بافت‌های عضله راسته، عضله سردست، عضله ران و چربی پشت کمر تأیید کننده نتایج مطالعات قبلی است. داده‌های گزارش شده در بالا به شدت نقش متابولیسمی این فاکتور رشد را نشان می‌دهد. لذا، بهتر است مطالعه بیان این ژن در گوسفند در سنین مختلف، از جنینی تا بعد از بلوغ و با در نظر گرفتن و اندازه‌گیری نقش‌های متابولیسمی آن انجام شود تا بتوان با اطمینان بالاتری نتیجه‌گیری نمود.

منابع

- Abo-Al-Ela, HG., El-Magd, MA., El-Nahas, AF., & Mansour, AA. (2014).** Association of a novel SNP in exon 10 of the IGF2 gene with growth traits in Egyptian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production* 46: 947–952.
- Alfares, MN., Perks, CM., Hamilton-Shield, JP., & Holly, JMP. (2018).** Insulin-like growth factor-ii in adipocyte regulation: Depot-specific actions suggest a potential role limiting excess visceral adiposity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 315: E1098–E1107.
- Ampaporn, K., Suwannasing, R., Phongphanich, P., Tunim, S., & Duangjinda, M. (2023).** The variation of insulin like growth factor 2 maker is associated with growth traits in Thai native (Kradon) pigs. *Animal Bioscience* 36: 1350–1356.
- Beletskiy, A., Chesnokova, E., & Bal, N. (2021).** Insulin-like growth factor 2 as a possible neuroprotective agent and memory enhancer—its comparative expression; processing and signaling in mammalian CNS. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 1–46.
- Borensztein, M., Viengchareun, S., Montarras, D., Journot, L., Binart, N., Lombès, M., & Dandolo, L. (2012).** Double Myod and Igf2 inactivation promotes brown adipose tissue development by increasing Prdm16 expression. *Faseb Journal* 26: 4584–4591.
- Braunschweig, MH. (2012). Biallelic transcription of the porcine IGF2R gene. *Gene* 500: 181–185.
- Cianfarani, S. (2012).** Insulin-like growth factor-II: New roles for an old actor. *Frontiers in Endocrinology* 3: 118.
- Curchoe, C., Zhang, S., Bin, Y., Zhang, X., Yang, L., Feng, D., O'Neill, M., & Tian, XC. (2005).** Promoter-specific expression of the imprinted IGF2 gene in cattle (*Bos taurus*). *Biology of Reproduction* 73: 1275–1281.
- DeFronzo, RA., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., & Felber, JP. (1981).** The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30: 1000–1007.
- Erbay, E., Park, IH., Nuzzi, PD., Schoenherr, CJ., & Chen, J. (2003).** IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *The Journal of Cell Biology* 163: 931–936.

- Florini, JR., Magri, KA., Ewton, DZ., James, PL., Grindstaff, K., & Rotwein, PS. (1991).** “Spontaneous” differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *Journal of Biological Chemistry* 266: 15917–15923.
- Gardan, D., Gondret, F., Van den Maagdenberg, K., Buys, N., De Smet, S., & Louveau, I. (2008).** Lipid metabolism and cellular features of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in pigs differing in IGF-II genotype. *Domestic Animal Endocrinology* 34: 45–53.
- Gardner, S., Alzhanov, D., Knollman, P., Kuninger, D., & Rotwein, P. (2011).** TGF- β inhibits muscle differentiation by blocking autocrine signaling pathways initiated by IGF-II. *Molecular Endocrinology* 25: 128–137.
- Gerrard, DE., Okamura, CS., Ranalletta, MAM., & Grant, AL. (1998).** Developmental Expression and Location of IGF-I and IGF-II mRNA and Protein in Skeletal Muscle. *Journal of Animal Science* 76: 1004–1011.
- Goodall, JJ., & Schmutz, SM. (2007).** IGF2 gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. *Animal Genetics* 38: 154–161.
- Hamill, RM., McBryan, J., McGee, C., Mullen, AM., Sweeney, T., Talbot, A., Cairns, MT., & Davey, GC. (2012).** Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat Science* 92: 440–450.
- Holly, JMP., & Perks, CM. (2012).** Insulin-Like Growth Factor Physiology: What we have Learned from Human Studies. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 41: 249–263.
- Hu, G., Do, DN., Davoudi, P., & Miar, Y. (2022).** Emerging Roles of Non-Coding RNAs in the Feed Efficiency of Livestock Species. *Genes (Basel)* 13: 297.
- Jafari Ahmadabadi, SAA., Askari-Hemmat, H., & Mohammadabadi, M. (2023).** The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol Journal*, 15 (1). 217-234.
- Kent, LN., Ohboshi, S., & Soares, MJ. (2012).** Akt1 and insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulate placentation and fetal/postnatal development. *International Journal of Developmental Biology* 56: 255–261.
- Lima, A.O.S. & Garcês, S.P.S. (2006).** Intrageneric primer design: Bringing bioinformatics tools to the class. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34: 332-337.
- LÔbo, AMBO., Guimarães, SEF., Paiva, SR., Cardoso, FF., Silva, FF., Júnior, GAF., & LÔbo, RNB. (2012).** Differentially transcribed genes in skeletal muscle of lambs. *Livestock Science* 150: 31–41.
- Pfaffl, MW., Horgan, GW., & Dempfle, L. (2002).** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30: e36–e36.
- Rosenthal, SM., & Cheng, ZQ. (1995).** Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proceedings of the National Academy Sciences* 92: 10307–10311.
- Sélénou, C., Brioude, F., Giabicani, E., Sobrier, ML., & Netchine, I. (2022).** IGF2: Development, Genetic and Epigenetic Abnormalities. *Cells* 11 (12). 1886.
- Siddals, KW., Westwood, M., Gibson, JM., & White, A. (2002).** IGF-binding protein-1 inhibits IGF effects on adipocyte function: Implications for insulin-like actions at the adipocyte. *Journal of Endocrinology* 174: 289–297.
- Sun, L., Lu, S., Bai, M., Xiang, L., Li, J., Jia, C., & Jiang, H. (2019).** Integrative microRNA-mRNA Analysis of Muscle Tissues in Qianhua Mutton Merino and Small Tail Han Sheep Reveals Key Roles for oar-miR-655-3p and oar-miR-381-5p. *DNA Cell Biology* 38: 423–435.
- Wei, C., Wu, M., Wang, C., Liu, R., Zhao, H., Yang, L., Liu, J., Wang, Y., Zhang, S., Yuan, Z., Liu, Z., Hu, S., Chu, M., Wang, X., & Du, L. (2018).** Long Noncoding RNA Lnc-SEMT Modulates IGF2 Expression by Sponging miR-125b to Promote Sheep Muscle Development and Growth. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49: 447–462.
- White, V., Jawerbaum, A., Mazzucco, MB., Gauster, M., Desoye, G., & Hiden, U. (2018).** IGF2 stimulates fetal growth in a sex- and organ-dependent manner. *Pediatric Research*, 83: 183–189.
- Wilson, EM., & Rotwein, P. (2006).** Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *Journal of Biological Chemistry* 281: 29962–29971.