ردیابی تغییرات بیان ژن ویتلوژنین در کبد و تخمدان ماهی سفید دریای خزر *(Rutilus frisii Kutum)* در مواجهه با فیتواستروژن های جنیستئین و بتاسیتوسترول

داود محمدرضائی

*d.mrezaei@malayeru.ac.ir

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

لغات کلیدی: جنیستئین، بتاسیتوسترول، ویتلوژنین، بیان ژن ، ماهی سفید

ویتلوژنین پیش ماده پروتئین زرده تخم است که در غلظت های بالا در پلاسمای ماهی ماده بالغ و در پاسخ به استروژن های تخمدان در کبد تولید می گردد (ناجی و همکاران، ۱۳۹۳). ژن ویتلوژنین در کبد ماهی نر و ماده و همچنین در تخمدان ماهی با قرار گرفتن در معرض ترکیبات استروژنی فعال می گردد (Folmar *et al.*, 1996). لذا از ویتلوژنین می توان به عنوان یک شاخص زیستی بسیار مفید جهت تشخیص حضور ترکیبات شبه هورمونی در محیط آبی استفاده نمود (Sumpter and Jobling, 1995). جنیستئین[1]، یک ترکیب شبه استروژنی ضعیف، با افزایش فعالیت آنزیم آروماتاز می تواند منجر به تولید یا افزایش سطح زرده در آبزیان شود (Cederroth *et al.*, 2012). بتاسیتوسترول، دیگر ترکیب گیاهی نیز به دلیل شباهت ساختاری با استروئیدها می‌تواند در فرایند تولید مثل اخلال ایجاد نماید (Orrego *et al.*, 2010).

افزایش نگرانی ها از مسائل محیط آبی، توجهات را به سمت استفاده از ابزار حساس تر و خاص تر (شاخص زیستی) با ظرفیت پیش بینی اثرات برهم زننده های غدد درون ریز متمرکز کرده است. بر این اساس، ابزار سلولی و مولکولی جدید محققان را به مطالعه مکانیسم های اصلی عملکرد هورمون های تولید مثلی طبیعی و برهم زننده های درونی نظیر استروژن های بیرونی قادر می سازند (Meucci and Arukwe, 2005). رایج ترین روش برای سنجش ویتلوژنین روش الیزا (ELISAs[2]) بوده که به دلیل تفاوت روش کار الیزا در آزمایشگاه های مختلف، معمولا نتایج قابل مقایسه نمی باشند. تکنیک های مولکولی نظیر بیان ژن، یکی از روش های رایج امروزی است که در مقایسه با روش های آنزیمی محدودیت کمتر و دقت بالاتری دارند (Jensen and Ankley, 2006).

ماهی سفید (*R. frisii Kutum*) از گونه‌های رودکوچ و اقتصادی دریای خزر است که طی ماه‌های اسفند و فروردین جهت تکمیل فرایند تولیدمثلی وارد رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌شود (عبدالملکی، ۱۳۸۵). در طی این مدت مولدین با ترکیبات و آلاینده‌های مختلفی از جمله فیتواستروژن‌ها مواجه خواهند شد. هدف تحقیق حاضر بررسی چگونگی اثر دو ترکیب جنیستئین و بتاسیتوسترول بر میزان بیان نسبی ژن ویتلوژنین در

[1] Genistein

[2] Enzyme-linked Immune-sorbent Assays

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]

جنس ماده ماهی سفید مهاجر به رودخانه می باشد.

مواد و روش کار

تعداد ۴۹ عدد مولد ماده ماهی سفید (*R. frisii Kutum*) با میانگین وزن ۱۵±۶۸۰ گرم از رودخانه شیرود صید و پس از ۴۸ ساعت سازگاری در تانک‌های ۳۰۰ لیتری به‌طور مجزا در معرض سه سطح جنیستئین و سه سطح بتاسیتوسترول با غلظت‌های (۵۰۰، ۵۰ و ۱۰ نانوگرم بر لیتر) (سیگما آلدریچ- آلمان) قرار گرفتند. پس از ۲۱ روز در معرض قرار گیری، از هر تیمار به‌طور تصادفی با رعایت اصول قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انتخاب و از بافت تخمدان و کبد آنها نمونه برداری صورت گرفت.

استخراج RNA مورد نیاز از بافت ها، با استفاده از ترایزول و رسوب با ایزوپروپانول تحت شرایط عاری از RNase صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA به روش نانو دراپ (۲۶۰/۲۸۰nm) و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد ارزیابی شد (آرامون و همکاران، ۱۳۹۳). پس از حذف آلودگی احتمالی DNA توسط تیمار DNase (DNase 1 Kit, Thermoscientific, USA)، رشته cDNA بر اساس دستورالعمل کیت تاکارا (ژاپن) ساخته شد.

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) به منظور دسترسی و ارزیابی ژن ویتلوژنین در نمونه های کبد و تخمدان از توالی های سایر ماهیان: (EU930850) *Rutilus rutilus*، (AB331884) *Cyprinus carpio*، (EF190987) *Catla catla*، (DQ061948) *Rutilus rutilus* توسط نرم افزار AlleleID (Niazi *et al.*, 2014) استفاده و تائید BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای طراحی شده ژن ویتلوژنین

Table 1: List of designed primer for vitellogenin gene.

Primer name	Primer sequences (5-3)	Tm	PCR product size (bp)
Rfc-F	GAAGTGCGTCGTATCTTGCCAACAG	۶۲/۹	۲۱۸
Rfc-R	ATCACAGCAAAGGTCTGGAGAGCAA	۶۳/۴	

روش Real-time PCR با استفاده از SYBRgreen (تاکارا، ژاپن) برای بررسی بیان ژن ویتلوژنین با حجم واکنش نهایی ۲۰ میکرولیتر (ده میکرو لیتر آنزیم Gold Taq، بافر کیت،۲-۰ میکرومولار از هر آغازگر و ۲۰ نانوگرام cDNA) استفاده شد. شرایط واکنش شامل ۹۵ درجه سانتی گراد اولیه به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ چرخه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای بسط آنزیم ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد.. نتایج بدست آمده به صورت کمی سیکل آستانه (Ct) به روش پافی و آنالیز مبتنی بر بازدهی واکنش PCR طبق فرمول ذیل انجام گرفت (Pfaffl, 2001).

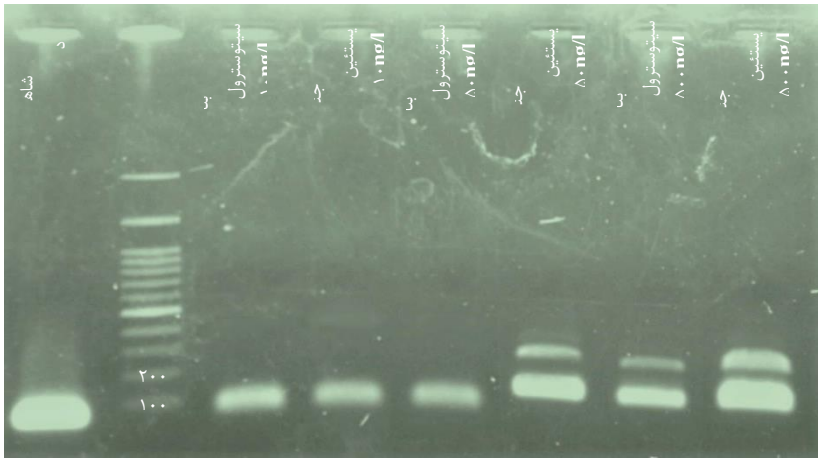
$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target(control-sample)}}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref(control-sample)}}}$$

E_{target} : راندمان Real-time PCR بیان ژن هدف، E_{ref}: راندمان Real-time PCR بیان ژن رفرنس (β actin)

در پایان نرمال بودن داده ها با آزمون ANOVA بررسی و مقایسه میانگین در نرم افزار SPSS 17 به روش LSD و دانکن صورت گرفت.

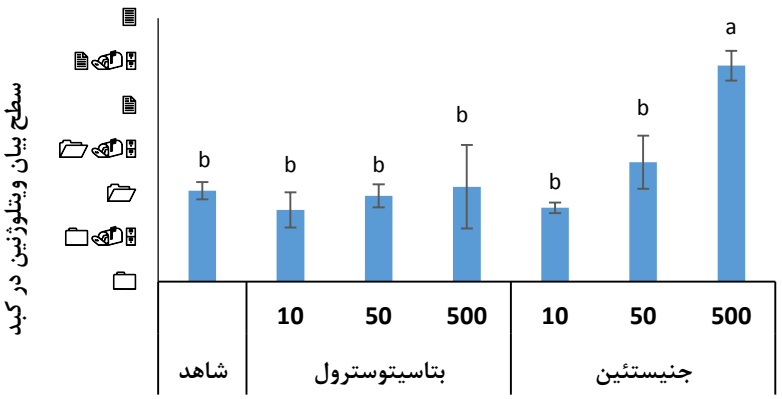
نتایج نشان داد که جنیستئین می تواند در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر در مولدین ماده ماهی سفید دریای خزر در مقایسه با سایر گروه ها سبب افزایش بیان ژن ویتلوژنین در بافت کبد شود (شکل ۱). درحالی که سطوح مختلف بتاسیتوسترول تفاوتی را با گروه شاهد نشان نداد (شکل ۲).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]



شکل ۱ : قطعه تکثیر شده ژن ویتلوژنین در کبد ماهی سفید در معرض سطوح مختلف بتاسیتوسترول و جنیستئین

Figure 1: Multiplied vitellogenin gene in the liver of Kutum that exposed to different levels of β-sitosterol and Genistein.

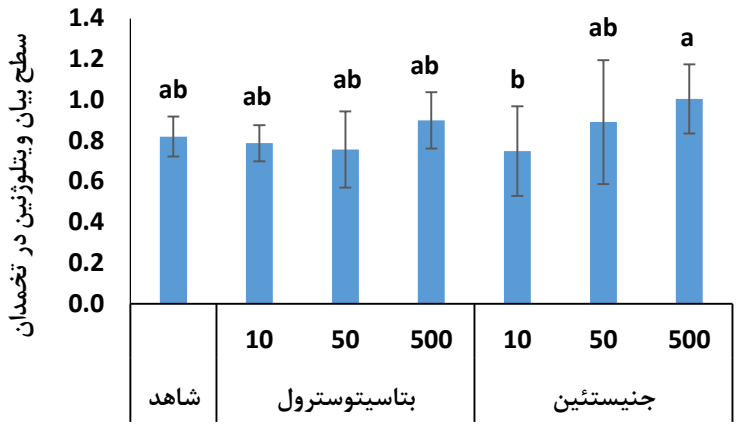


شکل ۲: بیان نسبی ژن ویتلوژنین در کبد ماهی سفید ماده در معرض غلظت های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول (نانوگرم بر لیتر) پس از ۲۱ روز در معرض قرار گیری. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها (a < b < c) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار بین ستون‌ها است (P< ۰/۰۵).

Figure 2: Relative expression of the vitellogenin gene in Kutum liver after 21 days exposed to different levels of β-sitosterol and Genistein (ng / L). The similar letter on the columns (a <b <c) indicates a significant difference between the treatment (P <0.05).

مطابق با شکل۳ در بافت تخمدان ماهیان درمعرض جنیستئین ۵۰۰ در مقایسه با غلظت ۱۰ نانوگرم بر لیتر افزایش بیان ژن مشاهده شد. در صورتی که ماهیان در معرض بتاسیتوسترول کلیه تیمارها اختلافی بایکدیگر و گروه شاهد نشان ندادند (p>۰/۰۵). (شکل ۳). با توجه به نتایج و بر اساس داده های خروجی Real-time PCR ، ژن ویتلوژنین در بافت کبد دارای شدت بیان بیشتری در مقایسه با بافت تخمدان می باشد. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر دو ترکیب شبه هورمونی گیاهی بر سطح بیان ژن ویتلوژنین در مولدین ماده ماهی سفید دریای خزر بررسی شد. بیان ژن ویتلوژنین توسط استروژن تنظیم می گردد، استروژن با نفوذ به درون هسته سلولی یک فاکتور رونویسی تشکیل داده که منجر به فعال شدن ژن حاوی عناصر پاسخ استروژنی (EREs) و در نتیجه فعالیت ژن ویتلوژنین می‌شود (Fu *et al.*, 2006).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]



شکل ۳: بیان نسبی ژن ویتلوژنین در تخمدان ماهی سفید ماده در معرض غلظت های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول (نانوگرم بر لیتر) پس از ۲۱ روز در معرض قرار گیری. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها (a < b < c) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار بین ستون‌ها است (P< ۰/۰۵).

Figure 3: Relative expression of the vitellogenin gene in Kutum ovary after 21 days exposed to different levels of β-sitosterol and Genistein (ng / L). The similar letter on the columns (a <b <c) indicates a significant difference between the treatment (P <0.05).

جنیستئین از ترکیبات ایزو فلاونی شناخته شده در سویا بوده که ماهیان در معرض آن، سطح بالایی از ویتلوژنین را در بافت کبد نشان می دهند (Kausch *et al.*, 2008). جنیستئین و بتاسیتوسترول بسته به نوع بافت یا گیرنده استروژونی و همچنین سطح استروژن درونی می تواند نقش آگونیست یا آنتی گونیست داشته باشند (Morito *et al.*, 2001). در نمونه کبد ماهی به نظر می رسد جنیستئین با افزایش سطح بیان نسبی ویتلوژنین اثر آگونیستی را نشان داده باشد. اثرات جنیستئین بر عملکرد تولید مثل در گونه ماهی مداکا (Kiparissis *et al.*, 2003)، قزل آلا (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001) و ماهی سفید دریای خزر (محمدرضائی و همکاران، ۱۳۹۵) بیان شده است. در ماهی سفید جنیستئین و بتاسیتوسترول سبب تغییر عملکرد تولید مثل، افزایش فعالیت آروماتازی و هورمون استرادیول گردید، این افزایش خارج از فصل تولید مثل به فعالیت آگونیستیک جنیستئین نسبت داده شد در حالی که مولدین در معرض بتاسیتوسترول چنین روندی مشاهده نگردید (محمدرضائی و همکاران، ۱۳۹۵).

برخی محققین القاء زرده سازی در ماهیان در معرض پساب های کارخانه چوب کاغذ گزارش نمودند (Orrego *et al.*, 2010). عدم وجود اختلاف معنی دار در مولدین ماده در معرض بتاسیتوسترول با گروه شاهد در بیان ژن ویتلوژنین، می تواند ناشی از اختلاف گونه ای و یا وجود سایر ترکیبات در پساب کارخانه کاغذ سازی (Orrego *et al.*, 2010) و فاکتورهای دیگری نظیر جنس و نوع بافت باشد (Cleveland, 2014). طبق نتایج سطح بیان نسبی ژن ویتلوژنین در بافت کبد در مقایسه با بافت تخمدان از بالاتری بود. این امر را می توان به شروع زرده سازی داخلی تحت تاثیر تیمار جنیستئین نسبت داد. چراکه بیان شده در مولدین در معرض جنیستئین حجم زرده و به تناسب قطر تخمک افزایش می یابد (Yousefi *et al.*, 2014). بافت کبد جایگاه اصلی تولید زرده در ماهیان می باشد. در تاس ماهی ایرانی در معرض نونیل فنل نیز ژن ویتلین کبد در مقایسه با سایر بافت ها بیان بالاتری داشت (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۲).

در پایان طبق نتایج حاصل از این بررسی می توان بیان کرد، از آن جا که محل اصلی ساخت ویتلوژنین تحت تاثیر ترکیبات استروژنی درونی (استرادیول) بافت کبد در ماهیان می باشد، حضور ترکیبات فیتواستروژنی نظیر

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]

جنیستئین می تواند با القاء گیرنده هـای اسـتروژنی درون سلولی سبب افزایش بیان نسبی ژن مـذکور در ماهیـان در معرض غلظت های بالا این ترکیب شود.

تشکر و قدردانی:

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه ملایر و معاونت پژوهشی آن دانشگاه (۳۳۶-۱-۸۴/۵) به انجام رسید که بدین وسیله نویسنده مراتب تشکر و قدر دانی خویش را اعلام می دارد.

منابع

آرامون، ا.، فرحمند، ح.، میرواقفی، ع.ر. و نعمت الهی، م.ع.، ۱۳۹۳. بیان ژن کدکنندۀ ویتلوژنین در کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* تحت تأثیر پساب کارخانه‌های کاغذ ایران. نشریه شیلات، ۶۷ (۲):۱۶۳-۱۴۹. DOI: 10.22059/JFISHERIES.2014.51644

جمشیدی، ش.، کلباسی، م.ر.، صادقی زاده، م. و یزدانی ساداتی، م.ع.، ۱۳۹۲. تاثیر نونیل فنل بر تغییرات بیان ژن‌های ویتلوژنین و زوناپلوسیدا در بافت‌های کبد، طحال، آبشش و عضله تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). علوم و فنون شیلات، ۲(۲): ۱۰-۱.

عبدالملکی، ش.، ۱۳۸۵. بررسی رونـد تغییـرات ذخـایر مـاهی سفید دریای خزر (ایران). مجله علمی شـیلات ایـران، سـال پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۸۷ تا ۹۹. DOI: 10.22092/ISFJ.2006.113985

محمدرضائی، د.، مجازی امیری، ب.، نعمت الهی، م.ع.، مخدومی، چ. و هاشمی، صمد.، ۱۳۹۵. اثر فیتواستروژن‌های جنیستئین و بتاسیتوسترول بر برخی شاخص‌های موثر در تولیدمثل ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frisii Kutum*) . نشریه شیلات، ۶۹ (۴):۴۶۱-۴۵۲. DOI: 10.22059/jfisheries.2017.63863

ناجی، ط.، حسین زاده صحافی، ه. و صفاری،م. ۱۳۹۳. بررسی اثرات فیتواستروژنی عصاره بابونه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و رسیدگی اووسیت‌های ماهی گورامی سه خال *(Trichogaster trichopterus)*. مجله علمی شیلات ایران. ۲۳(۱):۹۵-۸۵. DOI: 10.22092 isfj. 2017.110. 110165

Bennetau-Pelissero, C., Breton, B.B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B., Helou, C. and Kaushik, S.J., 2001. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). General and Comparative Endocrinology, 121(2):173–187. DOI:10.1006/gcen.2000.7585

Cederroth, C.R., Zimmermann, C. and Nef, S., 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health, "Review". Molecular and Cellular Endocrinology, 355:192–200.DOI: 10.1016/j.mce. 2011.05.049

Cleveland, BM., 2014. In vitro and in vivo effects of phytoestrogens on protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 165: 9-16. DOI:10.1016/j.cbpc.2014.05.003

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J. and Guillette, L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. Aquatic Toxicology, 73:1–10. DOI:10. 1016/ j.aquatox.2005.03.021

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]

Environmental Health Perspectives, 104(10): 1096–1101. PMID: 8930552

Fu, K.Y., Chen, C.Y. and Chang, W., 2006. Application of a yeast estrogen screen in non-biomarker species (*Varicorhinus barbatulus)* with two estrogen receptor subtypes to assess xenoestrogens. Toxicology in Vitro, 21:604 – 612. DOI:10.1016/j.tiv.2006.12.003

Jensen, K.M. and Ankley, GT., 2006. Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow *(Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safty, 64:101:105. DOI:10.1016/j.ecoenv.2006.02.011

Kausch, U., Alberti, M., Haindl, S., Budczies, J. and Hock, B., 2008. Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology, 23:15–24. DOI:10.1002/tox.20306

Kiparissis, Y., Balch, G.C., Metcalfe, T.L. and Metcalfe, C.D., 2003. Effects of the Isoflavones Genistein and Equol on the Gonadal Development of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives, 111 (9):1158–1163. PMID: 12842767

Meucci, V. and Arukwe, A., 2005. Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol.

Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J. and Hirakawa, T., 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24:351–356. DOI:10.1248/bpb.24.351

Niazi, A., Ramezani, A. and Dinari, A., 2014. GSTF1 Gene Expression Analysis in Cultivated Wheat Plants under Salinity and ABA Treatments. Molecular Biology Research Communications, 3(1): 9-19. PMID: 27843973

Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R. and Holdway, D., 2010. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. Aquatic Toxicology, 99:160–167. DOI:10.1016/j.aquatox.2010.04.016

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research, 29(9):e45.

Sumpter, J.P. and Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives, 103 (7):173–178. PMID: 8593867

Yousefi Jourdehi, A., Sudagar, M., Bahmani, M., Hosseini, SA., Dehghani, A.A. and Yazdani, M.A., 2014. Comparative study of dietary soy phytoestrogens genistein and equol effects on growth parameters and ovarian development in farmed female beluga sturgeon, *Huso huso*. Fish Physiology and Biochemistry, 40: 117-128.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]

Identification of vitellogenin gene expression patterns in liver and ovary of *Rutilus frisii Kutum* exposed to genistein and β-sitosterol

Mohammadrezaei D.*

*d.mrezaei@malayeru.ac.ir

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environmental, Malayer University, Malayer, I.R. Iran

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.3.11.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117009]

Abstract:

The vitellogenin gene expression can be altered by some estrogenic plant compounds like Genistein and β-sitosterol. Therefore, the measurement of vitellogenin gene expression can be used as an indicator to determine their effect on reproductive performance of aquatic animals. In order to evaluate the effects of genistein and β-sitosterol on the expression of vitellogenin gene in the liver and ovary of Rutilus frisii Kutum, the fish were separately exposed to 3 levels of genistein and beta-sitosterol (500, 50 and 10 ng/L). After 21 days, the RNA extracted and expression of vitellogenin gene in both the liver and ovary was investigated by Real-time PCR. The results showed the level of vitellogenin gene expression in fish exposed to genistein was higher in liver than control and β-sitosterol treatment. This difference was not observed in the ovarian tissue. Because the main site of vitellogenin synthesis expressed liver and it was controlled by endogenous estrogen (E_2), so, it seems phytoesterogenic compound such as genistein has been able to increase the relative expression of this gene in fish Exposed to 500 ng/L.

Keyword: Genistein, β-sitosterol, Vitellogenin, Gene expression, *Rutilus frisii Kutum*

*Corresponding author