تحقیقات تولیدات دامی

سال پنجم/شماره دوم/تابستان ۱۳۹۵ (۷۱-۶۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقایسه بیان ژن‌های لاکتوفرین و TLR4 در سلول‌های سوماتیک شیر گاو هلشتاین، بومی گیلان و آمیخته‌های حاصل از آنها

پری ناز رضوانی[۱]، سید حسین حسینی مقدم[۲*]، میثاق مریدی[۳]، محمد روستایی علی مهر[۴]

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

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

۳- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۱)

چکیده

هدف تحقیق حاضر مقایسه بیان ژن‌های لاکتوفرین و TLR4 در سلول‌های سوماتیک شیر گاو و بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و آمیخته‌گری بر بیان ژن‌های سیستم ایمنی و همچنین اثرات ورم پستان بر بیان ژن‌های مذکور است. RNA کل از سلول‌های سوماتیک شیر تازه ۳ گاو سالم هلشتاین، ۳ گاو بومی گیلان و ۳ گاو از آمیخته‌های نسل F_1 حاصل از آنها در مرکز اصلاح نژاد گاو بومی گیلان و ۳ گاو هلشتاین دارای علائم خفیف ورم پستان بالینی استخراج شد. پس از ساخت cDNA، بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR نسبت به ژن مرجع GAPDH اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد درحالی‌که متوسط بیان هر دو ژن در آمیخته‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از والدین بود (P>۰/۰۵)، انحراف استاندارد بیان ژن لاکتوفرین در جمعیت آمیخته‌ها نیز بالا بود. بیان ژن TLR4 در گاوهای هلشتاین با علائم ورم پستان نسبت به هلشتاین بدون ورم پستان به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P>۰/۰۵)، اما تفاوت معنی‌داری در بیان ژن لاکتوفرین بین گاوهای هلشتاین سالم و هلشتاین با ورم پستان مشاهده نشد (P>۰/۰۵). این مطالعه ضمن نشان دادن عدم تفاوت معنی‌دار بیان هر دو ژن مورد بررسی در گاوهای هلشتاین و بومی، اثر آمیخته‌گری را بر بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت ژنتیکی به خوبی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های سوماتیک شیر، گاو بومی گیلان، لاکتوفرین، Real-time PCR، TLR4

* نویسندهٔ مسئول: hosseini@guilan.ac.ir

مقدمه

شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین درمان در گله‌های گاو شیری مربوط به ورم پستان است که سبب حضور باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در شیر نیز می‌شود (Chaves *et al*., 2001). عمده‌ترین عوامل ایجاد کنندهٔ ورم پستان در گاو باکتری-های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس (*Streptococcus*) هستند (Barrett *et al*., 2005). سلول‌های سوماتیک شیر شامل ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپیتلیوم (Epithelial cells) ترشح‌کننده شیر هستند. از آنجایی که در زمان عفونت پستان، گلبول‌های سفید از خون به فضای داخلی آلوئول‌های پستان مهاجرت می‌کنند لذا تعداد سلول‌های سوماتیک شیر شاخصی برای سلامتی غده پستان محسوب می‌شود (Kehrli and Schuter, 1994; Kharrati Koopaei *et al*., 2012). هجوم نوتروفیل‌ها به بافت پستان برای مبارزه با عفونت دلیل اصلی افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر بوده و بیش از ۹۰ درصد سلول‌های سوماتیک شیر را تشکیل می‌دهد (Harmon, 1994). بر اساس تنها گزارشی که از شمارش سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای بومی و آمیخته در استان گیلان موجود است این تعداد به ترتیب $۱۳۸/۶۱\times۱۰^{۳}$ و $۲۶۱/۴۹\times۱۰^{۳}$ اندازه‌گیری شده است (آیت اللهی ، ۱۳۹۲).

عوامل محلول درگیر در ایمنی ذاتی به طور عمده شامل پپتیدها و پروتئین‌هایی مانند لیزوزیم (Lyzozyme)، لاکتوپروکسیداز (Lactoperoxidase) و لاکتوفرین (Lactoferrin) هستند. لاکتوفرین علاوه بر تنظیم عملکرد سلول‌های ایمنی دارای خواص ضد باکتریایی و ضد توموری و ضد ویروسی است (Pawlik *et al*., 2009). لاکتوفرین گلیکوپروتئینی است که به آهن متصل شده و در بسیاری از مایعات زیستی بدن مانند خون، بزاق، شیر و غیره وجود دارد (Lee *et al*., 2004). شیر انسان حاوی ۱ الی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لاکتوفرین است، در مقابل غلظت لاکتوفرین در شیر گاو حداکثر به ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌رسد (Molenar *et al*., 1996). غلظت لاکتوفرین موجود در شیر گاو از تمامی پستانداران دیگر کم‌تر است. با این وجود در مدت زمان تولید آغوز یا عفونت باکتریایی پستان غلظت لاکتوفرین شیر به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد (Lee *et al*., 2004). لاکتوفرین با اتصال به آهن و غیرقابل دسترس نمودن آن باعث جلوگیری از رشد باکتری‌ها می‌شود. همچنین مشخص شده است که این گلیکوپروتئین می‌تواند روی دیواره سلولی باکتری‌ها اثر گذاشته و با جدا کردن لیپوپلی-ساکارید از دیواره سلولی، حساسیت این باکتری‌ها را نسبت به آنتی‌بادی‌ها و لیزوزوم‌ها افزایش دهد. به علت رابطه لاکتوفرین با ایمنی ذاتی، پیشنهاد شده که این ژن می‌تواند به عنوان یک ژن کاندیدا در صفت مقاومت به ورم پستان در نظر گرفته شود (Pawlik *et al*., 2009).

گیرنده‌های Toll-Like (TLR) جزء خانواده TLR-interleukin هستند و نقش مهمی در شناسایی پاتوژن‌ها و ایمنی ذاتی دارند (Seabury *et al*., 2007). گیرنده‌های Toll-Like نیز با ورم پستان مرتبط هستند (Carvajal *et al*., 2013). جهش‌هایی در گیرنده Toll-Like چهار شناسایی شدند که می‌توانند سبب افزایش حساسیت میزبان به پاتوژن‌ها شوند (Vangroenweghe *et al*., 2004). حضور رونوشت‌های گیرنده‌های Toll-Like در سلول‌های تک هسته‌ای خون، ماکروفاژهای آلوئولی (Alveolar macrophage)،کارتینوسایت‌ها (Keratinocyte) و گره‌های لنفاوی گوسفند تایید شده است (Chang *et al*., 2009). بیان گیرنده Toll-Like چهار در ماکروفاژها و سلول‌های اپیتلیال ریه، روده کوچک، کبد، طحال، کلیه و قرنیه برای خوک، سگ و گاو نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Tirumurugaan *et al*., 2010). گیرنده‌های Toll-Like یک، دو، سه، شش و نه به ترتیب شامل پنج، دو، پنج، سه، چهار و دو اگزون بوده و گیرنده‌های Toll-Like پنج، هفت، هشت و ده تک اگزونی هستند (Cargill and Womack, 2007; Seabury *et al*., 2007). فعالیت گیرنده‌های Toll-Like منجر به تحریک بیان سیتوکین‌های التهابی و سایر میانجی‌های مرتبط با پاسخ ایمنی، تمایز سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شوند (Ibeagha-Awemu *et al*., 2008). اهمیت سیتوکین‌های التهابی برای پاسخ ایمنی موثر در برابر ورم پستان در تحقیقات متعددی ثابت شده است (Bur-venich *et al*., 2003; Bannerman, 2009). بسیاری از ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی میزبان، همانند BoLA-DRB3، ß-defensin، لیزوزیم، CXCR1،

CXCR2، CRD15، BRCA1، لیزوزستافین، LF و گیرنده Toll-Like چهار تا حد زیادی در طول عفونت‌های پستانی بیان می‌شوند (Vangroenweghe *et al.*, 2004). در ژنوتیپ های مختلف گاو چندشکلی زیادی در جایگاه گیرنده Toll-Like چهار مشاهده می‌شود (White *et al.*, 2003) و بیان آن مرتبط با عفونت غدد پستانی است، بنابراین در انتخاب ژنتیکی گاوهای شیری به منظور افزایش مقاومت به ورم پستان، بیان گیرنده Toll-Like چهار می‌تواند به عنوان یک نشانگر بالقوه مورد استفاده باشد (Panigrahi *et al.*, 2014).

برتری‌های ژنتیکی دام‌ها ممکن است خود را در بیان بیشتر و یا کمتر ژن‌های نشانگری نظیر LF و TLR4 که مرتبط با سیستم ایمنی هستند نشان دهد و معرفی برای حساسیت و یا مقاومت به بیماری باشد. با توجه به این که در این زمینه تحقیقات اندکی روی بیان ژن‌های مختلف دام‌های بومی انجام شده است (Aminafshar *et al.*, 2014 a and b) و روی این دام‌ها هم بیان این دو ژن بررسی نشده است، لذا در این تحقیق بیان ژن‌های LF و TLR4 در سلول‌های سوماتیک شیر در گاو بومی گیلان، هلشتاین سالم و آمیخته‌های حاصل از آنها بررسی شد. بعلاوه در شرایط بیماری انتظار این است که بیان این ژن ها بیشتر باشد و به این دلیل مقایسه بیان ژن در گاو هلشتاین سالم و بیمار نیز انجام شد.

مواد و روش‌ها

دام‌های مورد استفاده در این آزمایش همگی در ماه چهارم تا ششم شیردهی بوده و شکم دوم زایش را سپری می‌کردند. گاوها از نظر مدیریت، تغذیه و بهداشت از شرایط یکسانی برخوردار بوده و دو بار در روز (۶ صبح و ۶ بعد از ظهر) شیردوشی می‌شدند. شمارش سلول‌های سوماتیک سه بار در طی سه ماه متوالی و هر بار در سه تکرار (سه روز) با استفاده از دستگاه اکومیلک اسکن[1] (ساخت کشور بلغارستان) و دستورالعمل مربوطه انجام شد. شناسایی گاوهای ورم پستانی با استفاده از محلول شیرآزما[2] و معاینه بالینی انجام شد.

شیر تازه ۱۲ رأس گاو شامل سه راس گاو بومی، سه راس آمیخته نسل اول بومی×هلشتاین، سه راس هلشتاین سالم و سه رأس گاو هلشتاین که دارای علائم خفیف درمانگاهی ورم پستان بودند (Fonseca *et al.*, 2011) از مرکز اصلاح نژاد گاو بومی گیلان واقع در حسین کوه فومن جمع‌آوری شد. به منظور تهیه سلول تازه نمونه‌های شیر سه ساعت بعد از شیردوشی صبح به کمک دست از چهارکارتیه هر گاو دوشیده و در کنار یخ طی حداکثر یک ساعت و نیم به آزمایشگاه منتقل شد.

برای گرفتن توده سلولی و استخراج RNA بر اساس روش ویکراماسینگ (Wickramasinghe *et al.*, 2011) مقدار ۵۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار به ۵۰ میلی‌لیتر شیر تازه اضافه شد و با قدرت ۱۸۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با ۱۰ میلی‌لیتر PBS با pH ۷/۲ و ۱۰میکرولیتر EDTA نیم مولار مخلوط شد و مجدداً با همان شرایط سانتریفیوژ شد. پس از حذف فاز رویی، استخراج RNA از توده سلولی رسوب کرده با استفاده از تریزول و دستورالعمل مربوطه (TRIzol-Invitrogene) انجام شد.

غلظت و کیفیت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (NANO DROP-2000 Thermo Scientific) تعیین و سپس با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تایید شد. ساخت cDNA از نمونه‌های دارای جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۷ تا ۲ با استفاده از کیت شرکت Fermentas انجام شد و از PCR جهت تعیین موفقیت‌آمیز بودن واکنش ساخت cDNAها استفاده شد. در این مطالعه ژن گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع انتخاب شد (Leutenegger *et al.*, 2000). به این منظور با استفاده از نرم‌افزار geNorm این ژن (GAPDH) مورد آزمون قرار گرفت و با توجه به میانگین ژئومتریک قابل قبول (M-value=1.35) این ژن مورد تأیید قرار گرفت. آغازگرهای مستقیم و معکوس مورد استفاده با استفاده از نرم افزار Primer Premier طراحی شدند (جدول ۱). آغازگرها به نحوی طراحی شدند که نواحی اگزون را در ژن‌های لاکتوفرین (اگزون‌های شماره ۷ و ۸ به همراه ناحیه برش[3] GG)، گیرنده Toll-Like چهار (اگزون شماره ۳) و GAPDH (اگزون شماره ۱۱) تکثیر نمایند.

Real-time PCR با استفاده از دستگاه Bio-Rad CFX96 در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر cDNA،

1. Ekomilk Scan(Bulgaria)
2. California Mastitis Test
3. Splice site

۶/۲۵ میکرولیتر مستر میکس SYBR Green (فرمنتاز)، ۰/۴ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها و آب عاری از نوکلئازها در سه تکرار انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل سه مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال برای ژن LF و GAPDH، دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد و برای ژن گیرنده Toll-Like چهار، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط که دمای آن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از به‌دست آوردن اطلاعات C_T نمونه‌ها از دستگاه Real Time PCR، مقادیر عددی C_T به نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 منتقل شد. بیان ژن ها با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta CT}$ (Livak, 2001) برای هر نمونه در سه تکرار محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی با نمونه‌برداری (چند مشاهده در هر واحد آزمایشی) تجزیه شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای مستقیم و معکوس و دمای اتصال بهینه آن‌ها

Table 1. Forward and reverse primers and their optimized annealing temperature

Gene	Primers	Annealing temperature (◦C)
LF	F: 5'-TGGATGCGTTCAAGGAGTG-3'	61
	R: 5'-TGAGGTTCTTCAAGGTGGTC-3'	
TLR4	F:-5' CTGCCTTCACTACAGGGACTT-3'	60
	R:-5' GGGACACCACGACAATAACC-3'	
GAPDH	F: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	61
	R: 5'-CATTGCCCTCAACGACCA-3'	

نتایج و بحث

میانگین تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای بومی $۲۰۸/۰۸\times۱۰^{۳}$، آمیخته $۲۴۰/۷۵\times۱۰^{۳}$، هلشتاین سالم $۱۱۴/۰۶\times۱۰^{۳}$ و هلشتاین با ورم پستان $۱۲۵/۰۰\times۱۰^{۴}$ به دست آمدند. بر این اساس امتیاز سلول‌های سوماتیک (SCS) در گاوهای بومی، آمیخته، هلشتاین سالم و هلشتاین با ورم پستان به ترتیب برابر ۵/۳۲±۰/۰۱۸۶، ۵/۳۱±۰/۰۴۲، ۵/۰۴۴±۰/۰۷۲ و ۶/۰۹±۰/۰۳۵ محاسبه شدند. شمارش سلول‌های سوماتیک در سه جمعیت بومی، آمیخته و هلشتاین تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$)، اما به طور معنی‌دار با گروه هلشتاین دارای ورم پستان متفاوت بود ($P<۰/۰۵$). شکل ۱ متوسط امتیاز سلول‌های سوماتیک در چهار جمعیت تحت مطالعه را با خطای استاندارد روی هر ستون نشان می‌دهد. شمارش سلول-های سوماتیک گاوهای آمیخته تحت مطالعه در مرکز اصلاح نژاد گاو بومی گیلان در فومن با گزارش آیت اللهی و همکاران (۱۳۹۲) که بر مبنای نمونه یکصد رأسی از تمام مناطق استان گیلان بود مطابقت داشت و بیشتر از گاوهای بومی نیز بود. متوسط تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای هلشتاین بسیار کمتر از برآوردها در سایر گزارش ها بود. متوسط تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای هلشتاین ایران برای شکم دوم زایش ۳۵۹۸۳۳ سلول در هر میلی‌لیتر شیر برای یک دوره ۱۶ ساله از سال ۱۳۷۳ تا ۱۳۸۹ گزارش شده است (قاسمی و همکاران ، ۱۳۹۲) که تفاوت زیادی با شمارش سلول‌های سوماتیک گاوهای هلشتاین در این مرکز (۱۱۴۰۵۵ سلول) دارد. این مقدار حتی از تعداد گزارش شده برای گاوهای هلشتاین شکم اول زایش در مقاله مذکور که برابر با ۲۶۵۴۶۲ سلول در هر میلی لیتر شیر است نیز کمتر بوده که نشان‌دهنده برنامه‌ریزی در انتخاب اسپرم‌های مناسب و مدیریت صحیح گله است.

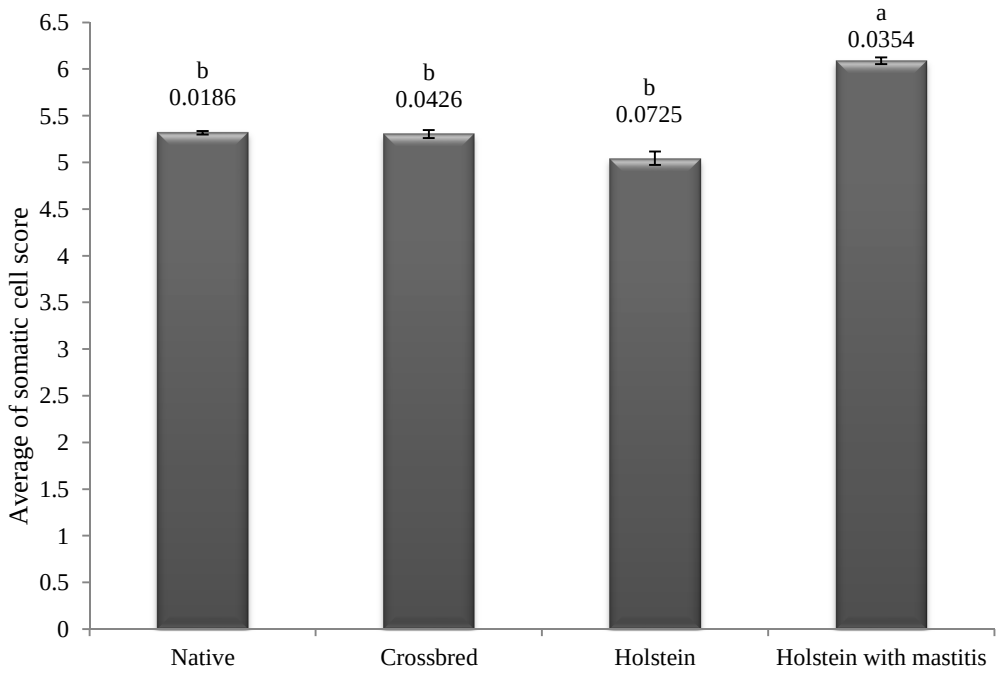

Fig. 1. Average of milk somatic cells score of studied cattle

شکل ۱- متوسط امتیاز سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای مورد بررسی

جدول۲ بیان نسبی ژن‌های LF و گیرنده Toll-Like چهار را در نژادهای بومی گیلان، هلشتاین بدون ورم پستان و آمیخته‌های حاصل از آنها و هلشتاین با ورم پستان نشان می‌دهد. بیان هر دو ژن در سلول‌های سوماتیک شیر آمیخته ها بیشتر از گاوهای بومی و گاوهای اصیل هلشتاین است. همچنین بیان هر دو ژن در گاوهای هلشتاین با ورم پستان بیشتر از گاوهای سالم است. مقایسه بیان ژن ها در گاوهای بومی و هلشتاین سالم نیز نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها در گاو هلشتاین کمتر از گاو بومی است. بیان ژن LF در جمعیت گاوهای بومی ۰/۰۶۹±۰/۰۰۷، آمیخته ۰/۱۷۲±۰/۰۲۶، هلشتاین سالم ۰/۰۳۱±۰/۰۰۹ و مبتلا به ورم پستان ۰/۰۴۵±۰/۰۱ به دست آمد. بیان ژن گیرنده Toll-Like چهار در جمعیت گاوهای بومی، آمیخته، هلشتاین سالم و مبتلا به ورم پستان به ترتیب برابر ۰/۰۶۵±۰/۰۰۴، ۰/۱۵۸±۰/۰۲۸، ۰/۰۲۱±۰/۰۰۳ و ۰/۱۲۸±۰/۰۳۷ به دست آمد.

نتایج نشان داد که بیان ژن LF در سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای آمیخته (۰/۱۷۲±۰/۰۲۶) نسبت به بومی (۰/۰۶۹±۰/۰۰۷)، هلشتاین بدون ورم پستان (۰/۰۳۱±۰/۰۰۹) و هلشتاین مبتلا به ورم پستان (۰/۰۴۵±۰/۰۱۰) تفاوت معنی‌داری دارد ($P<۰/۰۵$). میزان نسبی بیان ژن LF در دام‌های مبتلا به ورم پستان نسبت به گاوهای هلشتاین سالم مقدار بیشتری را نشان داد، اما تفاوت معنی‌دار از نظر آماری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). بین گروه بومی و هلشتاین بدون ورم پستان و هلشتاین با ورم پستان نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). با توجه به غلظت کم LF در شیر گاو نسبت به بافت پستان(Pfaffl *et al.*, 2003) انتظار این بود که به طور کلی بیان ژن LF در شرایط عادی در تمام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کم باشد که نتایج مذکور آن را تأیید می‌نماید. مشخص شده که بیان ژن LF در بافت پستان حدود ۲۰ برابر بیشتر از سلول‌های شیر و ۱۷۰۰ برابر بیشتر از سلول‌های خون است (Pfaffl *et al.*, 2003). بیان ژن گیرنده Toll-Like چهار در آمیخته‌ها و گاوهای هلشتاین با ورم پستان نسبت به دو جمعیت بومی و هلشتاین بدون ورم پستان تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- بیان ژن‌هایLF و TLR4 در گاوهای مورد بررسی

Table 2. LF and TLR4 genes expression in the studied cattle

Genes	Native	Crossbred	Holstein	Holstein with mastitis
LF	0.069±0.007 [b]	0.172±0.026 [a]	0.031±0.009 [b]	0.045±0.01[b]
TLR4	0.065±0.004 [b]	0.158±0.028[a]	0.021±0.003 [b]	0.128±0.037 [a]

Similar letters within a row show no significant differences (P>0.05).

در این مطالعه گاوهای آمیخته بیان بیشتری در هر دو ژن در سلول‌های سوماتیک شیر نسبت به والدین خود نشان دادند. در بررسی دیگری که آیت اللهی (۱۳۹۲) در خصوص ارتباط چندشکلی در یک ژنگاه از ژن لاکتوفرین (LF) با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر در گاوهای بومی و آمیخته استان گیلان انجام داد مشخص شد که فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده سه ژنوتیپ AA، AB و BB در گاوهای بومی گیلان به ترتیب برابر ۵۲، ۳۹ و ۹ درصد است، در حالی‌که در آمیخته‌های F_1 حاصل از آمیخته‌گری با گاوهای هلشتاین فراوانی این سه ژنوتیپ به ترتیب مقادیر ۴۱، ۵۷ و ۲ درصد را نشان دادند. بنابراین در آمیخته‌ها نسبت به بومی‌ها فراوانی ژنوتیپ AB بیشتر بود. مطالعه بیان ژن لاکتوفرین در تحقیق حاضر نیز تفاوت آمیخته‌ها را با والدین آن‌ها نشان داد. بیان بالاتر ژن‌ها در آمیخته‌ها می‌تواند به علت اثرات آمیخته‌گری باشد. به طور کلی گاوهای آمیخته حاصل از تلاقی گاوهای بومی گیلان با هلشتاین، ضمن تولید شیر بیشتر از گاوهای بومی، از لحاظ ایمنی نسبت به هلشتاین بسیار مقاوم‌تر بوده و به‌ندرت به ورم پستان مبتلا می‌شوند.

در رابطه با اثر نژاد در میزان لاکتوفرین در شیر، داده‌های بسیار اندکی وجود دارد که همین داده‌ها نیز متناقض هستند (Lopez *et al*., 2009). در حالیکه در آزمایشی مشاهده شد تفاوت‌های معنی‌داری در غلظت لاکتوفرین بین هلشتاین، جرزی و آمیخته‌های هلشتاین و جرزی وجود ندارد (Back and Thomson, 2005) و در آزمایش دیگری نیز غلظت لاکتوفرین در شیر حاصل از شیردوشی عصر در اواسط شیرواری گاوهای جرزی و هلشتاین متفاوت نبود (Farr *et al*., 2007) ولی Soyeurt *et al*. (2007) نشان دادند که غلظت لاکتوفرین در شیر گاوهای جرزی به طور معنی‌داری بالاتر از شیر گاو هلشتاین است. همچنین در گذشته نیز گزارش شده که گاوهای جرزی نسبت به هلشتاین غلظت لاکتوفرین بالاتری در کلستروم دارند (Tsuji *et al*., 1990).

غلظت لاکتوفرین شیر گاوها از تمامی پستانداران دیگر کمتر است، ولی در زمان تولید آغوز و یا بروز عفونت باکتریایی غلظت آن افزایش معنی‌داری می‌یابد (Li *et al*., 2004). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن LF در جمعیت هلشتاین سالم و هلشتاین با علائم ورم پستان تفاوت معنی‌داری نداشته است (P>۰/۰۵)، که می‌تواند به علت نمونه‌گیری سریع بعد از مشاهده عفونت باشد. بیان ژن LF در سلول‌های آلوده با اشرشیاکلی بعد از یک ساعت به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما در نمونه‌های تیمار شده با استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ ساعت افزایش در بیان نشان داده شد (P> ۰/۰۵) (Griesbeck-Zilch *et al*., 2008).

هر دو ژن در گاوهای هلشتاین با ورم پستان بیان بالاتری نسبت به هلشتاین سالم نشان دادند که این تفاوت در مورد ژن گیرنده Toll-Like چهار معنی‌دار و در ژن LF غیرمعنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). Wolfs *et al.* (2009) بیان گیرنده Toll-Like چهار و گیرنده Toll-Like دو را پس از عفونت در سلول‌های اپیتلیال کلیه تایید کردند. Fonseca *et al.* (2011) با مطالعه بیان ژن‌های اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸، اینترلوکین ۱۲، اینترفرون گاما، فاکتور نکروز تومور آلفا و TLR-2 در سلول‌های شیر دام‌های آمیخته هلشتاین-زبو نشان دادند که بیان ژن گیرنده Toll-Like دو در گاوهای با ورم پستان ۲/۵ برابر بیشتر از گاوهای سالم بود (P>۰/۰۵). در مطالعه ذکر

شده تفاوتی در بیان سایر ژن‌های مورد مطالعه بدست نیامد ($P>$ ۰/۰۵).

Fonseca *et al.* (2009) اختلاف معنی‌داری در بیان ژن-های اینترلوکین ۲ و اینترفزن گاما دردو نژاد هلشتاین سیاه و سفید و جرزی مشاهده کردند ($P<$۰/۰۰۱)، بطوریکه بیان هر دو ژن در هلشتاین‌های سیاه و سفید بالاتر بود. همچنین در این مطالعه بیان ژن‌های اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸، اینترلوکین ۱۰، اینترفرون گاما و فاکتور نکروز تومور آلفا در سلول‌های شیر گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی در نژادهای هلشتاین سیاه و سفید و جرزی بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در هلشتاین سیاه و سفید و جرزی مبتلا به ورم پستان در مقایسه با گاوهای سالم بالاتر بود، در حالی‌که سایر ژن‌های تحت مطالعه تفاوت معنی‌داری در بیان نشان ندادند. در تحقیق حاضر نیز بیان گیرنده Toll-Like چهار در دام‌های با ورم پستان نسبت به گروه سالم تفاوت معنی‌دار نشان داد درحالیکه ژن دیگر(LF) به این صورت نبود.

نسبت تغییر بیان هر دو ژن در جمعیت‌های تحت مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. این نسبت به خوبی نتایج ذکر شده را نشان می دهد. بیان ژن LF و گیرنده Toll-Like چهار در گاوهای هلشتاین با ورم پستان نسبت به گاوهای هلشتاین سالم به ترتیب درحدود ۱/۴۵ و ۶/۱ برابر بیشتر بود. بیان هر دو ژن در گاوهای آمیخته تمایل به افزایش داشته است به طوریکه ژن LF ۵/۵۴ برابر بیشتر از گاوهای هلشتاین بدون ورم پستان، ۲/۴۹ برابر بیشتر از گاوهای بومی و ژن گیرنده Toll-Like چهار، ۷/۵۲ برابر بیشتر از گاوهای هلشتاین بدون ورم پستان و ۲/۴۹ برابر بیشتر از گاوهای بومی بیان شده است. در آمیخته‌ها ژن گیرنده Toll-Like چهار ۱/۲۳ برابر و ژن LF ۳/۸۲ برابر بیشتر از گاوهای هلشتاین دارای ورم پستان بیان شده است. هر دو ژن در گاوهای هلشتاین سالم کمترین بیان را داشته‌اند به طوری‌که نسبت تغییر بیان در این نژاد به نژادهای دیگر در مورد هر دو ژن کمتر از یک شده است. شکل ۲ بیان هر دو ژن را به همراه خطای استاندارد در جمعیت‌های تحت مطالعه نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌هایی که تعداد سلول‌های سوماتیک شیر بیشتری داشته‌اند بیان هر دو ژن در آنها نیز بالاتر بوده است به عبارتی بین این دو رابطه‌ای می‌توان جستجو کرد. در تحقیقی همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی بین مقدار لاکتوفرین شیر و رتبه سلول‌های سوماتیک را به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۳۱ برآورد کردند. این مقادیر نشان می‌دهد که مقدار لاکتوفرین شیر به نسبت رتبه سلول‌های سوماتیک تا حدودی قابل افزایش است (Arnould *et al.*, 2009).

نمونه‌های شیر از تعداد معدود گاو مبتلا به ورم پستان نیز بعد از تشخیص علائم بالینی جمع‌آوری شدند. بنابراین کنترلی روی زمان عفونت، سویه ایجاد کننده عفونت ورم-پستان و یا آلودگی با انواع دیگر عفونت‌ها نبوده است. برای دستیابی به نتایج قطعی لازم است مطالعه دیگری با تعداد نمونه ورم پستانی بیشتر و همچنین تعیین عامل ایجاد کننده ورم پستان انجام شود تا با مقایسه بیان این ژن‌ها و سایر ژن‌های مسئول پاسخ ایمنی در گاوهای سالم و گاوهای دارای ورم پستان بالینی الگوی بیان ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی گاوهای مبتلا به ورم پستان بیشتر شناخته شود. اگرچه در بررسی حاضر نیز با آزمایش دو ژن در دام‌های مختلف (بومی، آمیخته و اصیل) و دو وضعیت بیماری و سلامت، مقایسات توانست اطلاعات مفیدی برای آزمایشات بعدی فراهم نماید. این بررسی که نخستین گزارش کشوری از استخراج RNA از سلول‌های سوماتیک شیر و بیان ژن در این سلول‌ها است نشان داد که جداسازی سلول‌های سوماتیک شیر از گاوهای بومی با درصد چربی بسیار بالا نیز امکان پذیر بوده و با حذف چربی در اولین مرحله از دستورالعمل ارائه شده در این مقاله می‌توان رسوب لازم را بدست آورد. بعلاوه مشخص شد روش کار برای جداسازی سلول‌های سوماتیک شیر گاو ورم پستانی با گاو سالم نیز تفاوت ندارد.

جدول ۳- نسبت تغییر بیان ژن LF و TLR4در گاوهای مورد بررسی*

Table 2. Expression change ratio of LF and TLR4 genes in the studied cattle

	Native		Crossbred		Holstein		Holstein with mastitis	
	LF	TLR4	LF	TLR4	LF	TLR4	LF	TLR4
Native	1.00	1.00	0.40	0.41	2.23	3.9	1.53	0.51
Crossbred	2.49	2.43	1.00	1.00	5.54	7.52	3.82	1.23
Holstein	0.44	0.32	0.18	0.13	1.00	1.00	0.69	0.16
Holstein with mastitis	0.65	1.96	0.65	0.81	1.45	6.1	1.00	1.00

* Above ratios are results of left column animals' values on top row of them.

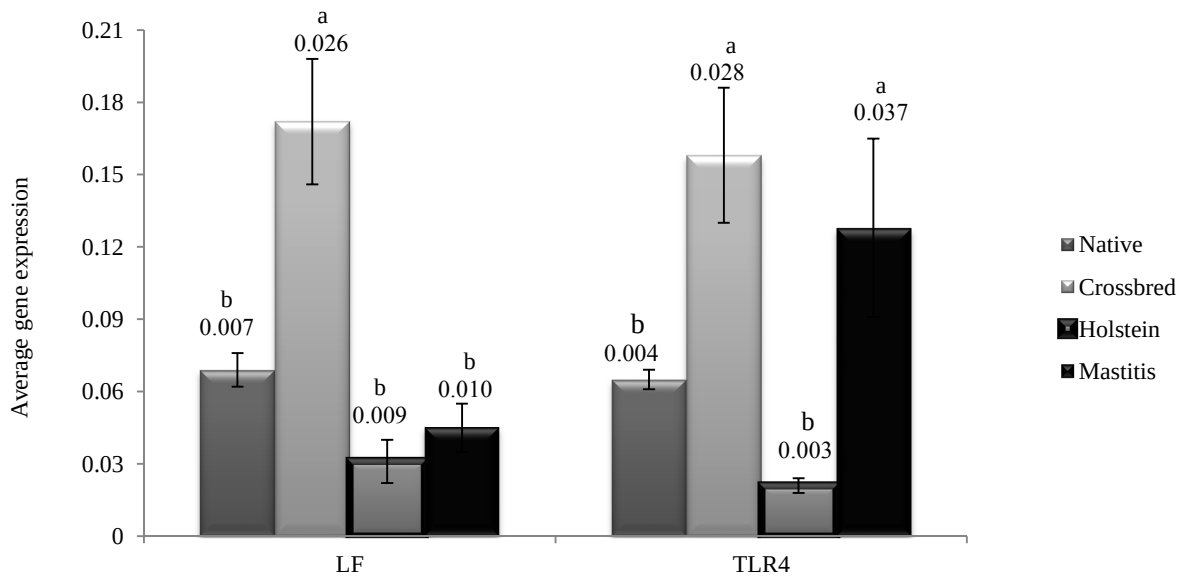

Fig. 2. LF and TLR4 gene expressions in the studied cattle

شکل ۲- بیان ژن‌های LF و TLR4 در گاوهای مورد بررسی

سپاسگزاری

نمونه‌های این تحقیق از ایستگاه اصلاح نژاد گاو بومی گیلان (شهرستان فومن) و شرکت کشاورزی و دامپروری سفیدرود رشت انتخاب شدند که بدینوسیله از مدیران و کارشناسان این واحدها تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

آیت اللهی م. ۱۳۹۲. مطالعه چندشکلی ژن لاکتوفرین در گاو بومی استان گیلان و آمیخته‌های آن با هلشتاین. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.

آیت اللهی م.، حسینی مقدم س. ح.، میرحسینی س. ض. و قوی حسین زاده ن. ۱۳۹۴. مطالعه چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ژن لاکتوفرین و ارتباط آن با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای دورگ استان گیلان. تحقیقات تولیدات دامی، ۴(۲): ۹۴-۸۷ .

قاسمی ز.، اسلمی نژاد ع. ا.، طهمورث پور م.، رکوعی م و فرجی آروق ه. ۱۳۹۲. برآورد اثرات ژنتیکی، محیطی و فنوتیپی و همبستگی بین صفات تولیدی و نمره سلول‌های بدنی گاوهای هلشتاین ایران. مجله دانش و پژوهش علوم دامی، ۱۳: ۵۰-۳۷.

Acuña C. N., Chertcoff R. E., Martínez M. B. and Nimo J. M. 2001. Udder pathogens prevalence in dairy cows from Argentina. 40th Annual Meeting Proceedings of National Mastitis Council, Madison, pp. 177–178.

Aminafshar M., Bahrampour V., Baghizadeh A., Emamjomeh N. and Mohammadabadi M. R. 2014a. Expression of CD44 Gene in Goat's Oocytes and Embryos. Greener Journal of Biological Sciences, 4(5): 139-145.

Aminafshar M., Bahrampour V., Baghizadeh A., Emamjomeh N. and Mohammadabadi M.R. 2014b. CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal Kermani, Baluchi sheep and Rayeni, Tali goats. Journal of cell and Animal Biology, 8(8): 156-160.

Arnould V. M., Soyeurt H., Gengler N., Colinet F. G., Georges M. V., Bertozzi C., Portettlle D. and Renaville R. 2009. Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk. Journal of Dairy Science, 92: 2151-2158.

Back P. and Thomson N. A. 2005. Exploiting cow genotype to increase milk value through production of minor milk components. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 65: 53-58.

Barrett D. J., Healy A. M., Leonard F. C. and Doherty M. L. 2005. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland. Irish Veterinary Journal, 58: 333-337.

Bannerman D. D., Rinaldi M., Vinyard B. T., Laihia J. and Leino L. 2009. Effects of intra mammary infusion of cis-urocanic acid on mastitis-associated inflammation and tissue injury in dairy cows. American Veterinary Research, 70: 373-382.

Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A. and Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Veterinary Research, 34: 521-564.

Cargill E. J. and Womack J. E. 2007. Detection of polymorphisms in bovine Toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. Genomics, 89: 745–755.

Chang J. S., Russell G. C., Jann O., Glass E. J., Werling D. and Haig D. M. 2009. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1–10 in sheep. Veterinary Immunology Immunopathology, 127: 94–105.

Farr V. C., Prosser C. G., Clark D. A., Tong M., Cooper C. V., Willix-Payne D. and Davis S. R. 2002. Lactoferrin concentrations is increased in milk from cows milked once-daily. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 62: 225-226.

Fonseca I., Silva P. V., Lange C. C. and Guimarães M. F. M. 2009. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. Genetics and Molecular Biology, 32: 776-781.

Fonseca I., Antunes G. R., Paiva D. S., Lange C. C., Guimarães S. E. F and Martins M. F. 2011. Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreed dairy cows. Genetics and Molecular Research, 10(3): 1295-1303.

Griesbeck-Zilch B., Meyer H. H., Kuhn C. H. and Schwerin M. 2008. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science, 91: 2215-2224.

Harmon R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. Journal of Dairy Science, 77: 103-2112.

Ibeagha-Awemu E. M., Lee J. W., Ibeagha A. E., Bannerman D. D., Paape M. J. and Zhao X. 2008. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Research, 39: 11

Kharrati koopaei H., Mohammadabadi M. R., Tarang A., Kharrati koopaei M. and Esmailizadeh Koshkoiyeh A. 2012. Study of the association between the allelic variations in DGAT1 gene with mastitis in Iranian Holstein cattle. Modern Genetics Journal, 7(1): 101-104.

Kehrli M. E and Shuster D. E. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. Journal of Dairy Science, 77:619–627

Leutenegger C. M., Alluwaimi A. M., Smith W. L., Perani L. and Cullor J. S. 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerasechain reaction. Veterinary Immunology Immunopathology, 77: 275-287.

Lee N. Y., Kawai K.., Nakamura I., Tanaka T., Kumura H. and Shimazaki K.. 2004. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. Veterinary Medical Science, 66: 1267-1269.

Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402-408.

Lopez-Villalobos N., Davis S. R., Beattie E. M., Melisa J., Berry S., Holroyd S. E., Spelman R.J. and Snell R. G. 2009. Breed effects for lactoferrin concentration determined by Fourier transform infrared spectroscopy. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 69: 60-64.

Molenaar A. J., Kuys Y. M., Davis S. R., Wilkins R. J., Mead P. E. and Tweedie J. W. 1996. Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. Journal of Dairy Science, 79: 1198-1208.

Panigrahi M., Arjava S. H. and Bhushan B. 2014. Molecular characterization and expression profile of partial TLR4 gene in association to mastitis in crossbred cattle. Animal Biotechnology, 25(3), 188-199.

Pawlik A., Sender G. and Korwin-Kossakowska A. 2009. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance. A review. Animal Science, 27: 263-271.

Pfaffl M. W., Wittmann S. L., Meyer H. H. D. and Bruckmaier R. M. 2003. Gene expression of immunologically important factors in blood cells, milk cells and mammary tissue of cows. Journal of Dairy Science, 86: 538–545.

Riollet C., Rainard P. and Poutrel B. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clinical Diagnosis Laboratory Immunology, 7: 161-167.

Roberge C. H., Normandeau E., Einum S., Guderley H. and Bernatchez L. 2008. Genetic consequences of interbreeding between farmed and wild Atlantic salmon: insights from the transcriptome. Molecular Ecology, 17: 314-324.

Seabury C. M., Cargill E. J. and Womack J. E. 2007. Sequence variability and protein domain architectures for bovine Toll-like receptors 1, 5, and 10. Genomics, 90: 502–515.

Soyeurt H., Colinet F. G., Arnould V. M. R., Dardenne P., Bertozzi C., Renaville R., Portelle D. and Gengler N. 2007. Genetic variability of lactoferrin content estimated by mid-infrared spectrometry in bovine milk. Journal of Dairy Science, 90: 4443-4450.

Tirumurugaan K. G., Dhanasekaran S., Raj G. D., Raja A., Kumanan K. and Ramaswamy V. 2010. Differential expression of Toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat, *Capra hircus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 133: 296–301.

Tsuji S., Hirata Y., Mukai F. and Ohtagaki S. 1990. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. Journal of Dairy Science, 73: 125-128.

Vangroenweghe F., Duchateau L. and Burvenich C. 2004. Moderate inflammatory reaction during experimental Escherichia coli mastitis in primiparous cows. Journal of Dairy Science, 87: 886–895.

White S. N., Taylor K. H., Abbey C. A., Gill C. A. and Womack J. E. 2003. Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 10364–10369.

Wickramasinghe S., Hua S., Rincon G., Islas-Trejo A., German J. B., Lebrilla C. B. and Medrano J. F. 2011. Transcriptome profiling of bovine milk oligosaccharide metabolism genes using RNA-Sequencing. PLoS One, 6: e18895.

Wolfs T. G., Buurman W. A., van Schadewijk A., de Vries B., Daemen M. A., Hiemstra P. S. and van't Veer C. 2002. In vivo expression of Toll-likereceptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. Immunology, 168: 1286–1293.

Animal Production Research

Vol. 5, No. 2, 2016 (61-71)

University of Guilan

Comparison of lactoferrin and TLR4 genes expression in milk somatic cells of Holstein and Guilan native cattle and their crossbreds

P. Rezvani[1], S. H. Hosseini Moghaddam[2*], M. Moridi[3], M. Roostaei-Ali Mehr[4]

1. MS.c student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
2. Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
3. Ph.D student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
4. Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan

(Received: 18-2-2015 – Accepted: 10-5-2016)

Abstract

The aim of the present study was to compare the expression of lactoferrin and TLR4 genes in cow milk somatic cells to investigate genetic differences effects and crossbreeding on the gene expression of the immune system as well as the effect of mastitis. Total RNA was extracted from fresh milk cells of 3 healthy Holstein, 3 Guilan Native and 3 F1 crossbred cattle belong to the National Animal Breeding Center of Iran and 3 Holstein with mild symptoms of clinical mastitis. After cDNA synthesis genes expression was measured using Real-time PCR relative to the reference gene GAPDH. The results showed while in crossbred cows the average expression of both genes was higher than parents ($P<0.05$), but the standard deviation of the lactoferrin gene expression was high in crossbred group. TLR4 gene expression in Holstein with clinical mastitis was significantly higher than Holstein without clinical mastitis ($P<0.05$), but no significant difference was observed in lactoferrin gene expression between healthy and diseased cattle ($P>0.05$). This study indicated that while there was non-significance difference between Guilan native and Holstein, but the crossbreeding clearly affected on the expression of two genes associated with genetic resistance.

Keywords: Milk somatic cells, Guilan native cow, Lactoferrin, Real-time PCR, TLR4

*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir