دوره پانزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۸
Archive of SID
DOI: 10.22055/ivj.2018.105608.1983

بررسی بیان ژن‌های IFN-γ، MX1، MX2، MX3 و HSP70 در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با چای سبز (*Camellia sinensis*)

نجمه شیخ‌زاده[۱*]، شهاب نوتاش[۲]، علی خانی‌اوشانی[۳]، شلاله موسوی[۴] و کیوان طاهاپور[۵]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۰

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر اثرات چای سبز (*Camellia sinensis*) بر روی بیان برخی ژن‌های مرتبط با فعالیت ضد ویروسی شامل، IFN-γ، MX1، MX2، MX3 و HSP70 در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. ۱۲۰ ماهی (با میانگین وزن ۲/۵±۲۳/۵ گرم) در چهار گروه با رژیم‌های غذایی حاوی ۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک چای سبز به مدت ۳۵ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد چای سبز با مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سطح بیان ژن IFN-γ را در کلیه و کبد افزایش داد در حالی که مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سبب افزایش بیان ژن IFN-γ در بافت طحال گردید. تمام دوزهای چای سبز سبب افزایش بیان ژن MX1 در کبد شد و بیان ژن MX1 در طحال، با مقادیر ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز افزایش یافت. سطح بیان ژن MX2، در بافت کلیه با دوز بالای چای سبز و در بافت طحال با تمام مقادیر افزایش یافت. در ماهیانی که چای سبز به میزان ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم دریافت کردند، بیان ژن MX3 در بافت کلیه افزایش یافت. در ماهیان تغذیه شده با مقادیر ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز، افزایش بیان ژن HPS70 در بافت کلیه مشاهده شد. مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کند چای سبز به ویژه در مقادیر بالاتر می‌تواند بیان برخی از ژن‌های مرتبط با فعالیت ضدویروسی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، چای سبز، ویروس، بیان ژن، دفاع غیراختصاصی

مقدمه

داروهای گیاهی مشتق شده از عصاره‌های گیاهی برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های بالینی به طور فزاینده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. فلاوونوئیدها گروهی از ترکیبات پلی‌فنولی هستند که در میوه‌ها و سبزیجات، چای و کاکائو به وفور یافت می‌شوند (El-Beshbishy et al. 2005). چای سبز با نام علمی *Camellia sinesis*، به عنوان منبع اصلی فلاوونوئیدها، دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد پرولیفریتیو، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد انگلی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد (Crespy and Williamson 2004, Cabrera et al. 2006, Meltzer et al. 2009). در برخی مطالعات، اثرات مثبت چای سبز بر روی رشد، سیستم ایمنی، مقاومت در برابر استرس و محافظت در برابر عوامل بیماری‌زا و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی

[۱*] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران E-mail: nsheikh@tabrizu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۳] دانشجوی دکترای شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۴] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۵] دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شده است (Abdel-Tawwab et al. 2010, Cho et al. 2007, Ebrahimi et al. 2015, Harikrishnan et al. 2011, Hwang et al. 2013, Nootash et al. 2013, Sheikhzadeh et al. 2011, Thawonsuwan et al. 2010). مطالعات زیادی در خصوص اثرات ضد ویروسی چای سبز علیه پاپیلوما ویروس انسانی، هپاتیت، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، روتا ویروس، انتروویروس و ویروس آنفولانزا وجود دارد (Cabrera et al. 2006, Cheng et al. 2002, Meltzer et al. 2009, Taylor et al. 2005). اما در زمینه‌ی اثرات چای سبز علیه بیماری‌های ویروسی ماهی اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد.

اینترفرون به عنوان یک سیتوکاین، نقش مهمی در دفاع در برابر عفونت‌های ویروسی دارد. این سیتوکاین سبب تحریک بیان ژن پروتئین ضد ویروس MX می‌شود (Das et al 2007). تا به حال، اثرات ضد ویروسی پروتئین MX در برخی از گونه‌های ماهی مانند فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) و قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشخص شده است (Tafalla et al. 2007). در حال حاضر، عملکرد HSP70 در عفونت‌های ویروسی شناخته شده است و اثرات ضد ویروسی آن بر علیه ویروس‌های آنفولانزا، رینوویروس، ویروس نقص ایمنی انسانی مشخص شده است (Unoshima et al. 2003). همچنین HPS70 نقش مهمی در مهار ویروس سندرم لکه سفید در میگو در دمای بالا دارد (Lin et al. 2011).

با توجه به اثرات ضد ویروسی چای سبز در پزشکی و دامپزشکی و اثرات مثبت چای سبز در گونه‌های مختلف ماهی، به نظر می‌رسد که استفاده از این ترکیب قادر به ایجاد تأثیرات مثبت در دفاع ضد ویروسی غیراختصاصی در ماهی باشد. با این پیش فرض، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات چای سبز بر روی بیان ژن‌های مهم در دفاع در برابر عفونت‌های ویروسی شامل IFN-γ، MX1، MX2، MX3 و HSP70 صورت گرفته است.

مواد و روش کار

این مطالعه در مزرعه‌ی پرورش ماهی در فیروزکوه انجام گرفت. آداپتاسیون ماهی‌های قزل آلا با وزن ۲/۵±۲۳/۵ گرم به مدت ۸ روز با غذای تجاری (فرادانه) انجام گرفت. فرمول رژیم غذایی پایه مشابه مطالعه قبلی بود (Nootash et al. 2013) که در جدول ۱ آمده است. ماهی‌ها در تانک‌های سیمانی به ابعاد ۱/۸×۰/۲۲×۰/۳۵ متر، داخل محوطه‌ی بسته با سرعت جریان آب ۰/۵ لیتر در ثانیه، دمای آب ۱ ± ۱۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در آب بیش‌تر از ۸ میلی‌گرم در لیتر، آمونیاک کم‌تر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، نیتریت کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، میزان سختی آب ۲۷۵ میلی‌گرم در لیتر و pH معادل ۷/۸ نگهداری می‌شدند. در مجموع ۱۲۰ ماهی در چهار گروه به صورت کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی در هر تانک سیمانی قرار داده شدند. جیره‌ی مورد استفاده در این مطالعه، با افزودن ۲۰ و ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از برگ چای سبز (کیمیای سبز کامو، ایران) به غذای تجاری پایه به دست آمد. جیره‌های تهیه شده در سه گروه تیمار مورد استفاده قرار گرفت به طوری که چای سبز آسیاب شده، با اسپری کردن ۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم غذا افزوده شد. در گروه شاهد نیز خوراک پایه فاقد چای سبز مورد مصرف قرار گرفت. جهت یکسان سازی، به خوراک گروه شاهد تنها ۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم غذای پایه اسپری گردید. غذای تهیه شده تا زمان استفاده در بسته‌های پلاستیکی هواگیری شده و در دمای ۱۰–۸ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

در روز ۳۵ مطالعه، تمام ماهی‌های هر مخزن در حمام عصاره‌ی گل میخک (۵۰ میکرولیتر بر لیتر) بیهوش شدند. نمونه‌های کبد، کلیه و طحال تمام گروه‌ها به صورت مجزا برای بررسی بیان ژن‌های مورد نظر با روش Real-time PCR جداسازی شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰– درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج RNA بافت‌های کبد، طحال و قدام کلیه پس از افزودن DNase با استفاده از AccuZol® (Bioneer, South Korea) انجام گرفت. به طور خلاصه ۱ میلی‌لیتر از محلول AccuZol به ۵۰ میلی‌گرم از هر یک از بافت‌های کلیه و کبد و طحال اضافه شد و پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم، ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس ۱۵ دقیقه در ۱۳۷۰۰xgدر ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی به میکروتیوب جدید انتقال یافت و هم حجم آن ایزوپروپانول افزوده شد و ۱۰ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه در ۱۳۷۰۰xg در ۴ درجه‌ی سانتریفیوژ گردید. مایع رویی خارج شد و رسوب حاصله با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد شستشو داده شد. مجدداً در دمای ۴ درجه و در ۱۳۷۰۰xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی خارج شد و رسوب حاوی RNA در دمای اتاق خشک گردید و پس از اضافه کردن آب تیمار شده با دی اتیل پیرو کربنات (DEPC)، نسبت به مطالعه‌ی کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA استخراج شده، با انجام الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد اقدام گردید. RNA استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از RNase قرار گرفت و تا زمان انجام آزمایش در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از نسبت A260/A280 میزان ناخالصی به طور متوسط ۱/۹ محاسبه شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت Fermentas مطابق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده انجام گرفت. به طور خلاصه ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر (Fermentas)، به ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده اضافه گردید و حجم نهایی توسط آب تیمار شده با دی اتیل پیرو کربنات (DEPC)، به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به ترکیب فوق، ۴ میکرولیتر reaction buffer، ۲ میکرولیتر dNTP mix۱۰ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (Fementas) و ۱ میکرولیتر M-MuLV reverse transcriptase افزوده شد و به ترتیب در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سپس دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه و در نهایت در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. cDNA حاصل در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون Real time PCR با استفاده از SYBR® Premix Ex TaqTM II (TAKARA) با سه تکرار (تکرار تکنیکی در دستگاه) انجام شد. مواد مورد استفاده جهت آزمون Real time PCR شامل ۱۰ میکرولیتر از SYBR green mix، ۱/۲ میکرولیتر از cDNA و ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر بود که با افزودن آب مقطر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید (تعداد کل نمونه‌ها ۳۵ عدد بود). ژن بتا اکتین نیز به منزله‌ی ژن شاهد انتخاب شد. توالی پرایمرها و برنامه‌ی Real time PCR به ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است.

جدول ۲: پرایمرهای انتخابی جهت بررسی بیان ژن‌های انتخاب شده در بافت‌های کلیه، طحال و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

ژن هدف	توالی پرایمر	Accession no.	طول محصول (bp)
HSP70	F: 5’ AGTGGCCATGAACCCCACAA 3’ R: 5’ ACTCCACTTGGACCTTGGGC 3’	BT073047	146
MX1	F: 5’ AAACGCCTGATGAAGGCACG 3’ R: 5’ ACGCCAAACCCCACTGAAAC 3’	U47944	144
MX2	F: 5’ CGCTCCCTTGGCGTAGAGAA 3’ R: 5’ GCACGGAGCTCTTCCCTGAA 3’	U47945	82
MX3	F: 5’ TCGGAGAAAAGGGACACGCA 3’ R: 5’ CAGGGACGCACCTTCTCCTC 3’	U47946	130
IFN-γ	F: 5’ AAGGGCTGATGTGTTTCTG 3’ R: 5’ TGTACTGAGCGGCATTACTCC 3’	FM864346	68
β-Actin	F:5’ TCACCCACACTGTGCCCATCTA 3’ R:5’CAGCGGAACCGCTCATTGCCAA 3’	AK098751	130

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: شرایط آزمون Real time PCR برای بیان ژن‌های انتخاب شده در کلیه، طحال و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

ژن هدف	درجه حرارت (ºC)	زمان(S)	سیکل
HSP70	۶۵	۴۵	۴۵
MX1	۶۰	۶۰	۴۵
MX2	۶۰	۶۰	۴۵
MX3	۶۰	۶۰	۴۵
IFN-γ	۶۵	۵۰	۴۵
β-Actin	۶۰	۴۰	۴۵

چرخه‌ی آستانه برای هر اجرا به طور دستی تعیین شد. آنالیز منحنی ذوب برای هر سیکل در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه ، ۶۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۹۹ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۰ ثانیه، با نرخ بارگیری ۰/۱ درجه‌ی سانتی‌گراد بر ثانیه و ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد (Nootash et al. 2013). مقایسه‌ی میزان بیان ژن نمونه‌ها با گروه شاهد با استفاده از نرم‌افزار REST© software 2009 انجام گرفت.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ با استفاده از تحلیل آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد سنجش قرار گرفته و با استفاده از روش LSD مقایسه‌ی بین گروه‌ها انجام شد. P<۰/۰۵ نیز سطح معنی-دار تلقی شد.

نتایج

میزان بیان ژن اینترفرون گاما

در بافت کلیه و کبد ماهیانی که ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز دریافت نمودند، میزان بیان ژن اینترفرون گاما نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. در طحال ماهیانی که مقادیر ۲۰ و ۱۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم چای سبز دریافت نمودند نیز میزان بیان این ژن به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج تغذیه با چای سبز بر بیان ژن IFN-γ در کلیه و طحال و کبد قزل‌آلای رنگین کمان در پایان دوره آزمایش (*P< 0.05)

گروه	کلیه	طحال	کبد
شاهد	۰/۳۱±۰/۹۳	۰/۴۰±۰/۹۹	۰/۳۳±۱/۰۱
۲۰ mg/kg	۰/۴۶±۱/۲۰	*۱/۲۰±۷/۵۳	۰/۲۹±۰/۶۸
۱۰۰ mg/kg	۱/۲۰±۱/۹۷	*۱/۲۴±۷/۵۸	۰/۳۷±۰/۶۹
۵۰۰ mg/kg	*۴/۶۳±۱۳/۸۵	۰/۲۱±۰/۶۳	*۴/۰۳±۱۰/۰۸

میزان بیان ژن MX1

در بافت کلیه تفاوت معناداری در میزان بیان ژن MX1 در گروه‌های مختلف تغذیه شده با چای سبز مشاهده نشد در حالیکه در طحال، بیان این ژن در ماهیان تغذیه شده با مقادیر ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت. در کبد تمامی گروه‌های تغذیه شده با چای سبز، بیان ژن MX1 نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود (جدول ۵).

جدول ۵: نتایج تغذیه با چای سبز بر بیان ژن MX1 در کلیه و طحال و کبد قزل‌آلای رنگین کمان در پایان دوره آزمایش (*P<0.05)

گروه	کلیه	طحال	کبد
شاهد	۰/۱۷±۱/۲۶	۰/۲۰±۱/۲۵	۰/۱۸±۱/۳۰
۲۰ mg/kg	۰/۲۸±۱/۲۰	۰/۱۹±۱/۱۸	*۰/۵۱±۴/۳۷
۱۰۰ mg/kg	۰/۱۸±۱/۱۹	*۰/۹۳±۵/۸۱	*۰/۴۴±۴/۸۷
۵۰۰ mg/kg	۰/۲۰±۱/۲۱	*۱/۳۷±۲۲/۶۷	*۲/۴۵±۳۳/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

میزان بیان ژن MX2

در بافت کلیه، بیان ژن MX2 در ماهیان تغذیه شده با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز، به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. در طحال، تمام گروه‌های تغذیه شده با چای سبز افزایش معنی‌دار بیان ژن MX2 را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. در بافت کبد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۶).

جدول ۶: نتایج تغذیه با چای سبز بر بیان ژن MX2 در کلیه و طحال و کبد قزل‌آلای رنگین کمان در پایان دوره آزمایش (*P<0.05)

گروه	کلیه	طحال	کبد
شاهد	۰/۲۸±۱/۰۲	۰/۳۳±۱/۲۳	۰/۷۸±۱/۲۸
۲۰ mg/kg	۰/۳۰±۱/۰۹	*۰/۴۹±۴/۵۶	۰/۱۹±۱/۲۰
۱۰۰ mg/kg	۰/۵۷±۱/۸۳	*۰/۵۲±۴/۱۲	۰/۳۳±۰/۹۸
۵۰۰ mg/kg	*۰/۵۲±۴/۲۷	*۰/۳۹±۵/۸۲	۰/۴۵±۱/۲۰

میزان بیان ژن MX3

در بافت کلیه، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن ماهیان دریافت کننده‌ی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز، نسبت به گروه شاهد وجود داشت در حالی که تفاوت‌ها در بافت طحال و کبد معنی‌دار نبود (جدول ۷).

جدول ۷: نتایج تغذیه با چای سبز بر بیان ژن MX3 در کلیه و طحال و کبد قزل‌آلای رنگین کمان در پایان دوره آزمایش (*P<0.05)

گروه	کلیه	طحال	کبد
شاهد	۰/۱۸±۰/۹۸	۰/۳۰±۱/۱۰	۰/۲۰±۰/۹۵
۲۰ mg/kg	۰/۴۰±۱/۵۱	۰/۴۲±۰/۸۵	۰/۴۰±۱/۲۳
۱۰۰ mg/kg	۰/۸۷±۲/۱۵	۰/۲۷±۱/۲۶	۰/۲۱±۰/۸۷
۵۰۰ mg/kg	*۰/۲۱±۳/۴۷	۰/۳۳±۱/۰۹	۰/۵۳±۱/۳۱

میزان بیان ژن HSP70

در بافت کلیه، میزان بیان ژن HSP70 افزایش معنی‌داری در گروه‌های دریافت کننده‌ی ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز، نسبت به گروه شاهد داشت در حالی که تفاوت معنی‌داری در بافت‌های طحال و کبد در گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده نگردید (جدول ۸).

جدول ۸: نتایج تغذیه با چای سبز بر بیان ژنHSP70 در کلیه و طحال و کبد قزل‌آلای رنگین کمان در پایان دوره آزمایش (*P<0.05)

گروه	کلیه	طحال	کبد
شاهد	۰/۲۵±۱/۱۹	۰/۲۵±۱/۱۸	۰/۲۸±۱/۱۶
۲۰ mg/kg	۰/۳۷±۰/۸۹	۰/۳۷±۱/۲۹	۰/۳۳±۱/۱۵
۱۰۰ mg/kg	*۰/۳۳±۱/۸۸	۰/۲۲±۰/۱۲	۰/۲۷±۱/۱۶
۵۰۰ mg/kg	*۰/۴۱±۱/۸۴	۰/۲۶±۱/۱۵	۰/۳۴±۱/۰۹

بحث

قرن‌هاست که گیاهان به عنوان مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات زیادی در زمینه‌ی اثرات مثبت ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد توموری و ایمنی‌زایی گیاهان جهت کاهش خطر ابتلا به انواع بیماری‌ها و سرطان‌ها انجام گرفته است (Lin et al. 2004). به عنوان مثال، خواص ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی و ایمنی‌زایی چای سبز به طور گسترده‌ای مشخص است (Cabrera et al. 2006, Crespy and Williamson 2004, Meltzer et al. 2009). ترکیبات چای سبز مانند کاتشین‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها و اسیدهای فنولی رنگدانه‌های گیاهی موجب تحریک فعالیت اینترلوکین‌های تحریک کننده‌ی ایمنی و مهار اینترلوکین‌های سرکوب کننده‌ی ایمنی می‌شوند (Meltzer et al. 2009, Mir and Agrewala 2008, Wen et al. 2011). به خصوص کاتشین‌ها با فعال‌سازی لنفوسیت‌های T، سبب آزاد شدن فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور و اینترفرون گاما شده و از طرفی با تحریک ماکروفاژها، موجب فعالیت سیتوکاین‌های تحریک‌کننده‌ی ایمنی می‌شوند. این عوامل سبب جذب سلول‌های مونوسیت،

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت‌ها و سلول‌های کشنده‌ی طبیعی و سلول‌های T-helper برای کمک به پاسخ‌های ایمنی می‌شوند (Meltzer et al 2009). نتایج مشابهی در مطالعه‌ی حاضر و مطالعه‌ی قبلی (Nootash et al. 2013) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به دست آمد.

اینترفرون گاما، به عنوان یک سیتوکاین کلیدی، نقشی اساسی در ایمنی ذاتی و ایمنی تطبیقی در برابر ویروس‌ها و باکتری‌های داخل سلولی ایفا می‌کند. اینترفرون گاما سبب تحریک عمل فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها، تنظیم سیتوکاین‌های پیش التهابی و القای پروتئین‌هایی است که با اتصال به آهن و محدود کردن دسترسی آهن مورد نیاز به پاتوژن‌ها، سبب مهار آن‌ها می‌شود (Ponnuraj et al. 2015). در این مطالعه اینترفرون گاما به طور قابل توجهی در کلیه و کبد ماهیان دریافت‌کننده‌ی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز افزایش یافت در حالی که افزایش آن در بافت طحال، در مقادیر ۲۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز مشاهده گردید. مشابه همین نتایج در افزایش بیان ژن اینترفرون گاما در بافت کلیه‌ی ماهی *Catla catla* تغذیه شده با گیاه سیب چوبی(*Limonia acidissima*) در مقایسه با گروه شاهد به دست آمد (Ponnuraj et al. 2015).

در مطالعات انجام گرفته، افزایش بیان ژن ایزوفرم‌های MX در مواجهه با ویروس یا سایر تحریک‌کننده‌ها مانند Poly.I.C در ماهی قزل‌آلا مشاهده شد (Tafalla et al. 2007). اما مطالعات کمی به بررسی القای MX پس از تغذیه با تحریک کننده‌های مختلف ایمنی در گونه‌های متفاوت ماهی پرداخته‌اند. به عنوان مثال، M-glucan، مخمر کامل یا RNA آن تأثیری در افزایش یا کاهش بیان ژن MX در مرحله‌ی پار ماهی آزاد اطلس نداشت (Salinas et al. 2004). در مقابل، بیان پروتئین MX در طحال و کلیه قدامی ماهی هامور (*Epinephelus fuscoguttatus*) تغذیه شده با افزودنی سدیم آلجینات و پس از تزریق Poly I.C به طور معنی‌داری افزایش یافت (Cheng et al. 2012). نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر برای نخستین بار نشان داد بیان ژن MX در بافت‌های خون‌ساز بدن ماهی قزل‌آلا، در پاسخ به دوزهای متفاوت چای سبز، متغیر است. در بافت کلیه، بیان ژن MX2 و MX3 در تمام مقادیر استفاده شده چای سبز در این مطالعه، به ویژه در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت. در طحال، بیان ژن MX1 و MX2 به خصوص در دوزهای ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت و در کبد الگوی بیان ژن ایزوفرم‌های مختلف MX در مقادیر مختلف چای سبز متفاوت بود، به طوری که ژن MX1 بیان بیش‌تری را به ویژه در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نشان داد. این که آیا الگوهای بیان ژن مربوط به ایزوفرم‌های MX تأثیری در عملکرد و ویژگی‌های ضد ویروسی این ترکیبات دارد، نیاز به بررسی‌های بیش‌تر دارد.

HSP70 وظایف مختلفی از جمله، حفظ هموستاز سلولی و حفاظت در برابر استرس از طریق افزایش پاسخ‌های ایمنی بر عهده دارد (Liu et al. 2013). القای HSP70 از طرفی باعث افزایش فعالیت ضدویروسی در مواجهه با بیماری‌های ویروسی مختلف مانند ویروس‌های آنفولانزا و سندایی (Sendai) می‌گردد (Unoshima et al. 2003). HSP70 همچنین از طریق واکنش با برخی فاکتورهای حیاتی ویروس سندرم لکه سفید در میگو، مانع از تکثیر ویروس این بیماری می‌شود (Lin et al. 2011). با توجه به مطالعات قبلی، مبنی بر نقش HSP در تحریک ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T جهت ترشح سیتوکاین‌های التهابی مانند اینترفرون گاما و فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور (Mosca et al. 2013)، افزایش بیان ژن HSP70 و اینترفرون گاما در بافت‌های مختلف ماهیان دریافت‌کننده‌ی چای سبز دور از انتظار نبود. در این مطالعه، افزایش بیان ژن HSP70 به طور معنی‌داری در بافت کلیه‌ی ماهیان دریافت‌کننده‌ی مقادیر ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم چای سبز در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود. نتایج مشابهی نیز در مطالعات پیشین به دست آمد. به عنوان مثال، مصرف فروکتوگلیکوساکارید سبب افزایش بیان ژن

www.SID.ir

Archive of SID

HSP70 و HSP90 در ماهی blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) گردید (Zhang et al. 2014). در مطالعه‌ای دیگر، میزان بیان ژن HSP70 کبدی، در ماهی کپور (Allogynogenetic crucian carp) تغذیه شده با ۴۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم الیگوساکارید mannan، نسبت به گروه کنترل در روزهای ۲ و ۷ پس از آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا افزایش یافت (Liu et al. 2013). همچنین در ماهی (*Megalobrama amblycephala* Yih) دریافت کننده‌ی ۰/۱ درصد عصاره‌ی anthraquinone، افزایش بیان ژن HSP70 در بافت کبد، ۶ ساعت پس از مواجهه با عفونت مشاهده گردید (Liu et al. 2012). بنابراین در کنار اثرات مختلف HSP70 می‌توان این طور نتیجه گرفت که این پروتئین با مصرف چای سبز سبب تقویت اثرات ضد ویروسی در ماهی می‌شود.

در مطالعه‌ی حاضر، کلیه‌ی قدامی الگوی بیان ژن‌های متفاوتی را در مقایسه با طحال و کبد نشان داد. در تأیید این نتیجه، در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) دریافت‌کننده‌ی ۲ گرم در کیلوگرم *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، الگوی بیان ژن HSP70 در سه بافت روده، کبد و کلیه تفاوت داشت به صورتی که اختلاف معنی‌داری در روده مشاهده نشد در حالی که در کبد بیان این ژن کاهش یافت و در کلیه نیز افزایش معنی‌داری در بیان ژن در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (Huang et al. 2015). این اختصاصیت بافتی در الگوی بیان ژنی ایزوفرم‌های MX در بافت‌های طحال، کلیه و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز در پاسخ به ژن G ویروس سپتی‌سمی خون‌ریزی دهنده (VHS)، poly I:C و VHSV مشخص شد (Tafalla et al. 2007). به نظر می‌رسد اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مختلف در سری مختلف زمانی قادر به توجیه نتایج مختلف و حتی متضاد در گونه‌های مختلف ماهی، ژن‌های بررسی شده، زمان نمونه‌گیری و بافت هدف باشد (Nootash et al. 2013).

به طور کلی، مصرف خوراکی چای سبز به خصوص دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، موجب افزایش بیان ژن-های مرتبط با دفاع غیراختصاصی علیه بیماری‌های ویروسی در سه بافت مهم کلیه، کبد و طحال در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گردید هر چند در بافت‌های مختلف، الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی بسیار متفاوت بود. در کل می‌توان نتیجه گرفت که چای سبز قادر به ایجاد اثرات مثبت علیه بیماری‌های ویروسی در ماهی می-باشد اما تست‌های چالش علیه ویروس‌های ماهی نیز در مطالعات آینده مهم به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام گرفته است.

منابع

Abdel-Tawwab, M.; Ahmad, M.H.; Seden, M.E.A. and Sakr, S.F.M. (2010). Use of green tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* infection. The Journal of the World Aquaculture Society, 41: 203-213.

Cabrera, C.; Artacho, R. and Gime´nez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—A review. Journal of the American College of Nutrition, 25: 79-99.

Cheng, H.Y.; Lin, C.C. and Lin, T.C. (2002). Antiviral properties of prodelphinidin B-2 3′-O-gallate from green tea leaf. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 13: 223-229.

www.SID.ir

Archive of SID

Cheng, W.; Tsai, R.T. and Chang, C.C. (2012). Dietary sodium alginate administration enhances Mx gene expression of the tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* receiving poly I:C. Aquaculture, 324-325: 201-208.

Cho, S.H.; Lee, S.M.; Park, B.H.; Ji, S.C.; Lee, J.; Bae, J. and Oh, S.Y. (2007). Effect of dietary inclusion of various sources of green tea on growth, body composition and blood chemistry of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Physiology and Biochemistry, 33: 49-57.

Crespy, V. and Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. American Society of Nutrition Science, 3431-3440.

Das, B.K.; Collet, B.; Snow, M. and Ellis, A.E. (2007). Expression of interferon type I and Π, Mx and γIP genes in the kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar*, is induced during smolting. Fish and Shellfish Immunology, 23: 514-520.

Ebrahimi, V.; Salati, A.P.; Azarm, H.M. and Hasanpour, S. (2015). Effects of dietary green tea (*Camellia sinensis* L) on acute stress responses in sturgeon hybrid (*Huso huso*♂ × *Acipenser ruthenus* ♀). Aquaculture Research, 1-6. doi:10.1111/are.12908.

El-Beshbishy, H.A. (2005). Hepatoprotective Effect of Green Tea (*Camellia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38: 563-570.

Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. and Heo, M.S. (2011). Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. Fish and Shellfish Immunology, 30: 972-979.

Huang, L.; Ran, C.; He, S.; Ren, P.; Hu, J.; Zhao, X. and Zhou, Z. (2015). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* culture or live cells with *Bacillus amyloliquefaciens* spores on growth performance, gut mucosal morphology, hsp70 gene expression, and disease resistance of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 438: 33-38.

Hwang, J.H.; Lee, S.W.; Rha, S.J.; Yoon, H.S.; Park, E.S.; Han, K.H. and Kim, S.J. (2013). Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Aquaculture International, 21: 525-538.

Lin, Y.R.; Hung, H.C.; Leu, J.H.; Wang, H.C.; Kou, G.H. and Lo, C.F. (2011). The role of aldehyde dehydrogenase and Hsp70 in suppression of white spot syndrome virus replication at high temperature. Journal of Virology, 85(7): 3517-3525.

Lin, S.J.; Tsai, J.H.; Tsai, C.H.; Lin, Y.C.; Hsu, H.T.; Xu, F.L. and Yang, C.C. (2004). The in vivo effects of cytokines modulation for BALB/C mice fed with a traditional combined chinese herb-soaked solution, Yi-Fey Ruenn-Hou tea. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 26: 435-444.

Liu, B.; Ge, X.P.; Xie, J.; XU, P.; Cui, Y.T.; Ming, J.H. et al. (2012). Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the physiological responses and HSP70 gene expression of *Megalobrama amblycephala* under *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology, 32: 1-7.

Liu, B.; Xu, L.; Ge, X.; Xie, J.; Xu, P.; Zhou, Q. et al. (2013) Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus* gibelio) under *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology, 34: 1395-1403.

Meltzer, S.M.; Monk, B.J. and Tewari, K.S. (2009). Green tea catechins for treatment of external genital warts. The American Journal of Obstetrics and Gynecology, 200:233.e1-233.e7

Mir, M.A. and Agrewala, J.N. (2008). Dietary polyphenols in modulation of the immune system. In: Vassallo N, editor. Polyphenols and Health: New and recent advances, Nova, Science Publishers, Pp: 245-72.

Mosca, F.; Romano, N.; Malatesta, D.; Ceccarelli, G.; Brunetti, A.; Bulfon, C. et al. (2013). Heat shock protein 70 kDa (HSP70) increase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L 1758) thymus after vaccination against *Listonella anguillarum*. Fish Physiology and Biochemistry, 39: 615-616.

Nootash, S.; Sheikhzadeh, N.; Baradaran, B.; Khani Oushani, A.; Maleki Moghadam, M.R.; Nofouzi, K. et al. (2013). Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 35: 1916-1923.

Ponnuraj, S.; Kanagarajan, M.; Jaganathan, D.; Priya, T. and Deivamarudachalam, D. (2015). Expression analysis of IL-10 and IFN-γ genes in head kidney of *Catla catla* (Ham.) fed with *Limonia acidissima* L. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2: 218-223.

www.SID.ir

Archive of SID

Salinas, I.; Lockhart, K.; Bowden, T.J.; Collet, B.; Secombes, C.J. and Ellis, A.E. (2004). An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. Fish and Shellfish Immunology, 17: 159-170.

Sheikhzadeh, N.; Nofouzi, K.; Delazar, A. and Khani Oushani, A. (2011). Immunomodulatory effects of green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 31: 1268-1269.

Tafalla, C.; Chico, V.; Pe´rez, L.; Coll, J.M. and Estepa, A. (2007). In vitro and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. Fish and Shellfish Immunology, 23: 210-221.

Taylor, P.W.; Hamilton-Miller, J.M.T. and Stapleton, P.D. (2005). Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Science and Technology Bulletin, 2: 71-81.

Thawonsuwan, J.; Kiron, V.; Satoh, S.; Panigrahi, A. and Verlhac, V. (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry, 36: 687-697.

Unoshima, M.; Iwasaka, H.; Eto, J.; Takita-Sonoda, Y.; Noguchi, T. and Nishizono, A. (2003). Antiviral effects of geranylgeranylacetone: Enhancement of MxA expression and phosphorylation of PKR during influenza virus infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(9): 2914-2921.

Wen, Z.S.; Xu, Y.L.; Zou, X.T. and Xu, Z.R. (2011). Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. Marine Drugs, 9: 1038-1055.

Zhang, C.N.; Tian, H.Y.; Li, X.F.; Zhu, J.; Cai, D.S.; Xu, C. et al. (2014). The effects of fructooligosaccharide on the immune response, antioxidant capability and HSP70 and HSP90 expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high heat stress. Aquaculture, 433: 458-466.

www.SID.ir

Vol. 15, No. 3, Autumn, 2019
Arc DOI: 10.22055/ivj.2018.105608.1983

Expression analysis of IFN-γ, MX1, MX2, MX3 and HSP70 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) administrated with green tea (*Camellia sinensis*)

Sheikhzadeh, N.[1]; Nootash, Sh.[2]; Khani Oushani, A.[3]; Mousavi, Sh.[4] and Tahapour, K.[5]

Received: 12.01.2018 Accepted: 02.10.2018

Abstract

In the present study, the effects of green tea (*Camellia sinensis*) on some antivirus-related gene expressions including IFN-γ, MX1, MX2, MX3 and HSP70 were evaluated in rainbow trout. One hundred and twenty fish (mean weight 23.5 ± 2.5 g) in four groups were fed on diets containing 0, 20, 100 and 500 mg/kg for 35 days. Results showed that green tea at 500 mg kg^{-1} enhanced IFN-γ gene expression in the kidney and liver whereas 20 and 100 mg kg^{-1} green tea upregulated IFN-γ transcription in spleen tissue. All doses of green tea upregulated MX1 transcription in the liver, while MX1 gene expression was upregulated in the spleen of fish received 100 and 500 mg kg^{-1} green tea. MX2 gene expression was upregulated in the kidney of a high dose of green tea and spleen of all doses of green tea. In fish received green tea at 100 and 500 mg/kg, MX3 gene expression in the kidney tissue was upregulated. In fish fed 100 and 500 mg kg^{-1} green tea, upregulation of HSP70 gene in kidney were shown. The present study suggests that green tea, especially at higher doses may effectively modulate the expression of some genes related to antiviral activity in rainbow trout.

Key words: Rainbow trout, Green tea, Virus, Gene expression, Non-specific defence

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3- PhD Student of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5- DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Sheikhzadeh, N., E-mail: nsheikh@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir