نسخه پیش از انتشار ، نشریه علوم دامی

واکاوی پروفایل بیانی بافت خون در راستای شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید شیر در گاوهای شیری

آزاده ترابی[۱]، زهرا رودباری[۲*]

۱- استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

* نویسنده مسئول: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI) 10.22092/ASJ.2026.371935.2534

Transcriptomic profiling of blood tissue to identify milk production–related genes in dairy cattle

Azadeh Torabi[1], Zahra Roudbari[2*]

1- Assistant professor, Animal science research institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft. Jiroft. Iran.

*Corresponding author: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

Orcid ID: Zahra Roudbari - 0000-0002-3357-3126

واکاوی پروفایل بیانی بافت خون در راستای شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید شیر در گاوهای شیری

چکیده

تولید شیر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی در گاوهای شیری، نقش اساسی در سودآوری سیستم‌های دامپروری دارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت مرتبط با تولید شیر در بین دو نژاد گاو شیری بود که بتوان مسیرها و فعالیت‌های زیستی درگیر برای این صفت را شناسایی نمود. داده‌های ترانسکریپتوم مورد استفاده در مطالعه حاضر با شماره دسترسی GSE54790 از پایگاه داده GEO دانلود شدند. ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از بسته limma در نرم‌افزار R شناسایی شدند و ژن‌های مشترک بین دو نژاد تعیین گردیدند. به‌منظور بررسی تعاملات پروتئین-پروتئین، ژن‌های مشترک در پایگاه داده STRING تحلیل شدند و مصورسازی شبکه، شناسایی ماژول‌ها و ژن‌های کلیدی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape انجام گرفت. همچنین برای تجزیه مسیر و فرآیندهای زیستی ژن‌های موجود در ماژول‌های معنی‌دار از نرم‌افزار DAVID استفاده شد. در مجموع ٤٤٠ ژن در گاوهای هلشتاین-فریزین و ٢٤٨ ژن در گاوهای قرمز لهستان بیان افتراقی معنی‌دار داشتند (p-value<0.05). نتایج نشان داد ٣ ماژول معنی‌دار تشخیص داده شد که شامل ژن‌های هاب HP، THBS1، PTX3، CAV1 بودند. مهم‌ترین مسیرها و فرآیندهای مرتبط با تولید شیر در این ماژول‌ها ساختار ماتریکس خارج سلولی، پاسخ به یون کلسیم،توسعه بافت پستان، پروتئولیز، چسبندگی کانونی، تعامل گیرنده ECM بودند. اطلاعات به‌دست‌آمده از ژن‌های هاب و مسیرهای کلیدی شناسایی‌شده می‌تواند به‌طور مستقیم برای توسعه نشانگرهای ژنتیکی و افزایش دقت انتخاب ژنومی به‌کار رود و در نتیجه انتخاب دام‌های با پتانسیل بالاتر تولید شیر را در برنامه‌های اصلاح نژادی امکان‌پذیر سازد.

کلمات کلیدی: پروفایل بیانی ، بیان افتراقی، تولید شیر، مسیرهای زیستی

Transcriptomic profiling of blood tissue to identify milk production–related genes in dairy cattle

Abstract

Milk production is one of the most important economic traits in dairy cattle and plays a crucial role in the profitability of livestock production systems. The aim of the present study was to

identify differentially expressed genes associated with milk production between two dairy cattle breeds and to characterize the biological pathways and functional activities involved in this trait. The transcriptomic data used in this study were obtained from the GEO database under accession number GSE54790. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using the *limma* package in R, and the shared DEGs between the two breeds were determined. To investigate protein–protein interactions, the shared genes were analyzed in the STRING database, and network visualization, module detection, and hub gene identification were performed using Cytoscape. Furthermore, functional enrichment and pathway analysis of genes within significant modules were conducted using DAVID. In total, 440 DEGs were identified in Holstein–Friesian cattle and 248 DEGs in Polish Red cattle (p-value<0.05). The results revealed three significant modules, containing the hub genes HP, THBS1, PTX3, and CAV1. The most important pathways and biological processes associated with milk production in these modules included extracellular matrix organization, calcium ion response, tissue development, proteolysis, focal adhesion, and ECM–receptor interaction. The information obtained from the identified hub genes and key biological pathways can be directly applied in breeding programs by supporting the development of genetic markers and improving the accuracy of genomic selection, thereby facilitating the identification of animals with higher milk-production potential.

Keywords: Gene expression profile , Differential gene expression (DGE), Milk production, Biological pathways

مقدمه

تولید شیر در پستانداران که از غده پستانی ترشح می‌شود، فرآیندی پیچیده است. این ماده مغذی از پروتئین، لاکتوز، چربی و انواع ویتامین‌ها تشکیل شده است. مزایای سلامتی بالقوه مصرف شیر اخیراً مورد توجه قرار گرفته است که از جمله می‌توان به محافظت در برابر عفونت، افزایش تکثیر سلول‌های اپیتلیال روده، بهبود اختلالات گوارشی، تراکم استخوان و بهبود وضعیت ویتامین‌ها و مواد معدنی اشاره کرد (Ren و همکاران، ۲۰۲۵). شیر گونه‌ها و نژادهای مختلف از نظر برخی ترکیبات اصلی با یکدیگر تفاوت دارند (Du و همکاران، ۲۰۲۴). این ماده مغذی نقش مهمی در تغذیه و سلامت انسان دارد و به دلیل تولید فرآورده‌های لبنی، از نظر اقتصادی نیز ارزش بالایی دارد. شیر در بسیاری از فرآیندهای بدن از جمله رشد، تأمین انرژی و ترمیم بافت‌ها نقش دارد. با توجه به اینکه شیر و فرآورده‌های لبنی از بهترین منابع پروتئین و کلسیم هستند، در سراسر جهان سرمایه‌گذاری گسترده‌ای در زمینه تولید، تجارت و مصرف آن صورت گرفته است (Cai و همکاران، ۲۰۲۵).

بافت پستان و تولید شیربه دلیل جذب و منبع غنی کلسیم در رشد و نمو نوزاد، ارتباط نزدیکی با تنظیم یون‌های کلسیم دارد. یون‌های کلسیم نقش مهمی در پایداری پروتئین‌های شیر و ویژگی‌های عملکردی آن‌ها در طول فرآوری دارند. بافت پستانی از شبکه‌ای از مجاری و اپیتلیوم آلوئولی تشکیل شده است که توسط سلول‌های میواپیتلیال احاطه شده و تحت تأثیر ماتریکس خارج‌سلولی قرار دارد. رشد غده پستانی عمدتاً پس از تولد رخ

می‌دهد و در دوران آبستنی، سلول‌های آلوئولی تکثیر و تمایز یافته و در دوران شیردهی به ظرفیت عملکردی می‌رسند (Plante و همکاران، ۲۰۱۱).

دانش مربوط به بیان ژن‌های درگیر در شیردهی، درک ما را از مکانیسم‌های بیولوژیکی مورفوژنز پستان، فعالیت‌های متابولیکی و ترکیبات شیر افزایش می‌دهد (Ren و همکاران، ۲۰۲۵). توانایی دستکاری عملکرد شیردهی در نژادهای کمتر بهبودیافته موضوعی مهم است و آگاهی از مسیرهای بیولوژیکی حاکم بر رشد غدد پستانی می‌تواند به بهبود عملکرد شیردهی کمک کند (Du و همکاران، ۲۰۲۴). پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های ترانسکریپتومیکس، امکان شناسایی جامع عوامل مؤثر بر شیردهی را فراهم کرده است (Cai و همکاران، ۲۰۲۵). داده‌های ترانسکریپتومیکس اطلاعات ارزشمندی درباره فراوانی رونوشت‌های mRNA ارائه می‌دهند و تحلیل این داده‌ها می‌تواند ژن‌های با بیان افتراقی را در شرایط مختلف شناسایی کند.

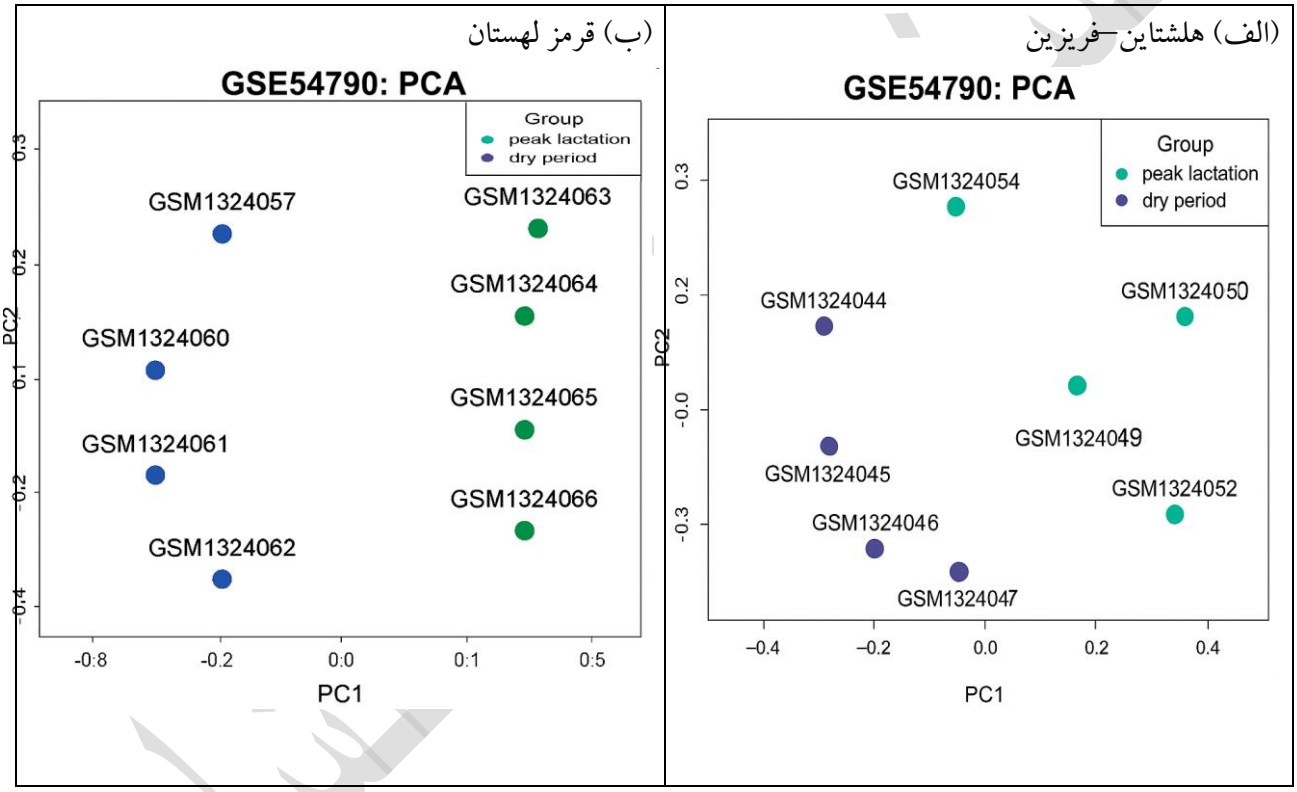
Ren و همکاران، (۲۰۲۵) تفاوت‌های چشمگیری را در پروفایل بیانی گاوهای با عملکرد بالا و پایین گزارش کردند که بر نقش کلیدی شبکه‌های ژنی در راندمان تولید تأکید دارد. علاوه بر ژن‌های کدکننده پروتئین، تحلیل‌های پیشرفته امیکس نشان داده‌اند که تنظیم‌کننده‌های غیرکدکننده از جمله miRNAها، lncRNAها و اصلاحات اپی‌ژنتیکی، لایه‌های پیچیده‌ای از کنترل صفات تولیدی را تشکیل می‌دهند (Cai و همکاران، ۲۰۲۵). آگاهی از رویدادهای مولکولی مؤثر بر لاکتوژنز می‌تواند به توسعه فناوری‌های جدید در مدیریت و اصلاح نژاد دام‌های شیری کمک کند. بنابراین، شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی در مراحل مختلف شیردهی و بین نژادهای مختلف، گامی مهم در جهت درک زیست‌شناسی تولید شیر است. هدف این مطالعه، شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی بین دو نژاد شیری هلشتاین–فریزین و قرمز لهستان با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومیکس است تا مسیرها و فعالیت‌های زیستی مرتبط با صفت تولید شیر مشخص شوند.

مواد و روش ها

داده‌های بیان ژن

داده‌های بیان ژن از پایگاه GEO (GENE EXPRESSION OMNIBUS) استخراج شدند؛ این مخزن عمومی که توسط NCBI مدیریت می‌شود، مجموعه‌های داده ژنومی و ترنسکریپتومی را به‌صورت آزاد در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد (Clough و Barrett، ۲۰۱۶) . در پژوهش حاضر، پروفایل‌های بیان ژن مربوط به بافت خون در دوره خشکی و اوج شیردهی از پایگاه داده GEO ((https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) با شماره دسترسی GSE54790 دریافت شدند. داده‌ها با استفاده از پلتفرم GPL11649 تولید شده‌اند. این مجموعه داده شامل چهار گاو هلشتاین–فریزین و چهار گاو قرمز لهستانی است که از هر حیوان، نمونه خون کامل در دو نقطه زمانی (دوره خشکی و اوج شیردهی) جمع‌آوری شده است. دام‌ها در شرایط استاندارد دامداری نگهداری شده بودند؛

به‌طوری‌که هر دو نژاد تحت مدیریت تغذیه‌ای مشابه، دسترسی آزاد به آب، جیره متعادل‌شده بر اساس نیازهای دوره فیزیولوژیک، و شرایط محیطی کنترل‌شده قرار داشتند. همچنین، تمامی حیوانات از نظر سلامت عمومی پایش شده و بدون علائم بیماری‌های متابولیک یا عفونی گزارش شده‌اند. به‌منظور ارزیابی الگوهای کلی بیان ژن و بررسی میزان تفکیک‌پذیری نمونه‌ها بر اساس وضعیت فیزیولوژیک، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، نمونه‌های دوره خشکی و اوج شیردهی در امتداد مؤلفه اول (PC1) به دو خوشه مجزا تقسیم شدند که بیانگر تفاوت‌های آشکار در پروفایل‌های ترانسکریپتومی میان این دو مرحله است.



شکل ۱- نمودار تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تمایز نمونه‌های نژاد های هلشتاین–فریزین و قرمز لهستان در دوره‌های خشکی و اوج شیردهی

تجزیه بیان ژن‌ها

در این مطالعه، برای شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی میان گروه‌های مورد بررسی، از ابزار آنلاین GEO2R استفاده شد. این ابزار امکان مقایسه دو مجموعه نمونه را در سری‌های GEO فراهم می‌کند و بر پایه الگوریتم‌های آماری بسته Limma در محیط Bioconductor عمل می‌کند. معیارهای شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی شامل $|\text{Fold Change}| > 2$ و $\text{p-Value} \leq 0.05$ بودند. ژن های مشترک بین دو نژاد نیز با استفاده از ابزار تحت وب Venn شناسایی شدند.

تعاملات پروتئین-پروتئین و شناسایی ماژول‌ها مربوط به ژن‌های مشترک بین دو نژاد

هدف پایگاه داده String جمع‌آوری و ادغام اطلاعات داده‌های پروتئین-پروتئین شناخته شده و پیش‌بینی‌شده برای تعداد زیادی از موجودات است (Szklarczyk و همکاران، ۲۰۱۶) . تحلیل شبکه تعاملی پروتئین‌ها با استفاده از پایگاه String نسخه ۱۱/۵ انجام شد. حداقل امتیاز تعامل ۰/۷ در نظر گرفته شد که بیانگر سطح اطمینان بالا است. شش نوع شواهد شامل شواهد تجربی، پایگاه‌های داده، هم‌بیانی، متن‌کاوی، مجاورت ژنی و هم‌رخدادی ژنی در ساخت شبکه به کار رفت. شبکه بر اساس امتیاز ترکیبی۰/۱۵ ساخته شد و گره‌های منفرد حذف شدند.(Szklarczykو همکاران، ۲۰۱۵). شبکه‌های بیولوژیکی معمولاً با استفاده از ابزارهایی مانند Cytoscape موردکاوش قرار می‌گیرند(Paul و همکاران، ۲۰۰۳). برای شناسایی ژن های هاب و ماژول ها، به ترتیب از افزونه‌های CytoNCA وClusterONE مربوط به نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد. معیار شناسایی ژن‌های هاب بر اساس درجه‌ی ارتباط و مرکزیت میانی انجام گرفت ، ، در حالی که برای ماژول‌ها مقادیر با p–Value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

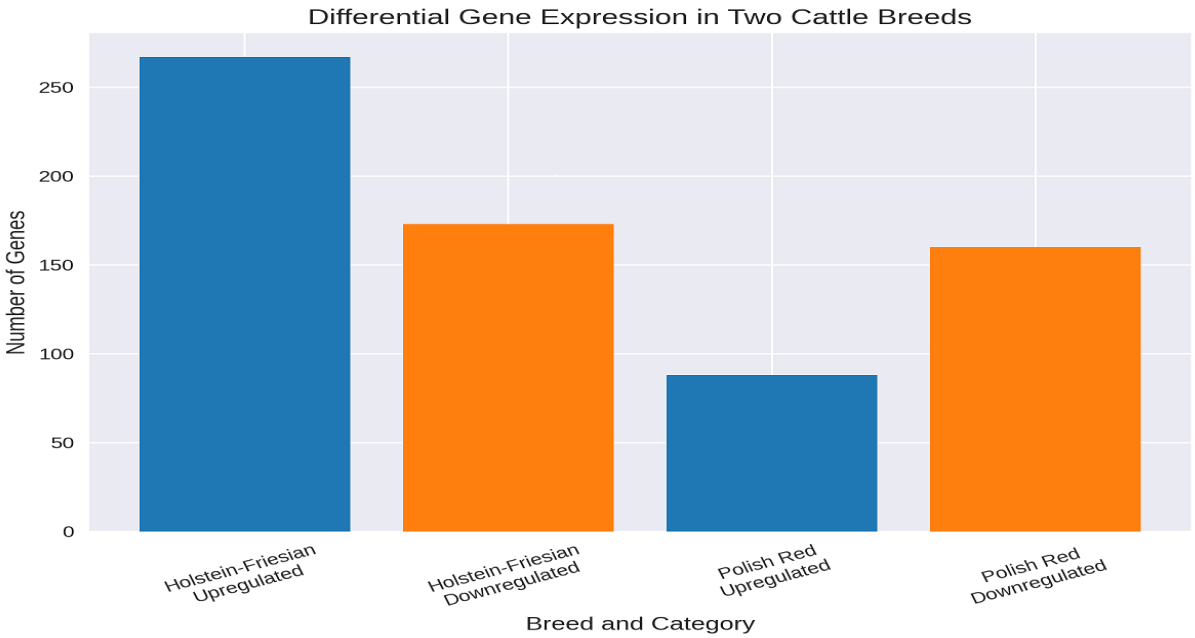
شناسایی مسیرها و فرآیندهای زیستی مربوط به ژن‌های مشترک بین دو نژاد در هر ماژول

برای شناسایی مسیرها و فرآیندهای زیستی مربوط به ژن‌های مشترک با بیان افتراقی بین دو نژاد در ماژول‌ها، از ابزارهای KEGG و GO استفاده شد. برای تفسیر این ژن‌ها نیز براساس پایگاه‌های داده GO وKEGG از نرم‌افزار تحت وب DAVID استفاده گردید (Huang و همکاران، ۲۰۰۷). این نرم‌افزار با استفاده از آماره هایپرژئومتری تست مسیرهای بیولوژی و بخش‌های ژن آنتولوژی مرتبط با این ژن‌ها را نمایش می‌دهد. مسیرهای بیولوژیکی با p–Value کمتر از ۰/۰۵ برای گزارش، انتخاب شد.

نتایج

آنالیز بیان ژن

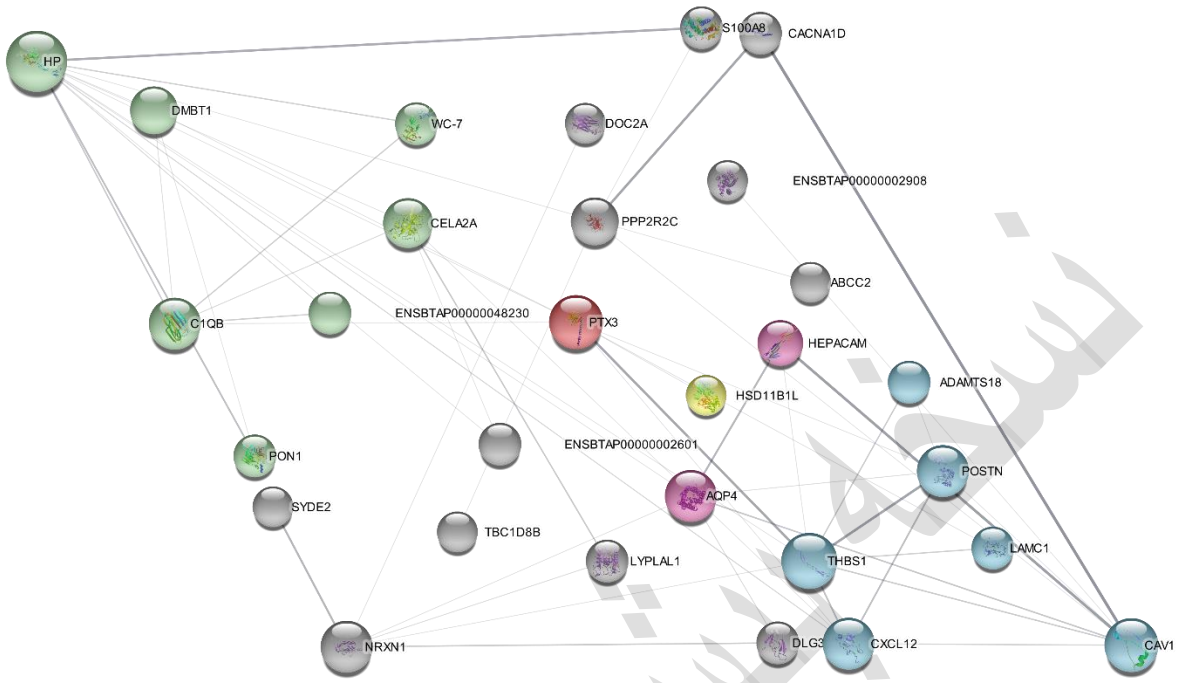
نتایج نشان داد که در مجموع ۴۴۰ ژن در مقایسه دوره شیردهی با دوره خشک در گاوهای هلشتاین-فریزین بیان افتراقی داشتند، که از این میان ۲۶۷ ژن افزایش بیان و ۱۷۳ ژن کاهش بیان نشان دادند. در مقایسه دوره شیردهی و دوره خشک از گاوهای قرمز لهستان به طور کلی ۲۴۸ ژن بیان افتراقی داشتند، که از این میان ۸۸ ژن افزایش بیان و ۱۶۰ ژن کاهش بیان نشان دادند (شکل ۲). در میان این ژن‌ها، ۳۰ ژن بین دو نژاد مشترک بودند.



شکل ۲-بیان افتراقی ژن‌ها در دو نژاد گاو هلشتاین-فریزین و قرمز لهستان

تعاملات پروتئین-پروتئین و شناسایی ماژول‌ها مربوط به ژن‌های مشترک بین دو نژاد

شبکه‌ای از تعاملات پروتئین-پروتئین ژن‌های مشترک با بیان افتراقی بین این دو نژاد با استفاده از نرم‌افزار Stringرسم شد پروتئین‌های متصل نشده حذف شدند (شکل ۳). برای تحلیل بیشتر این تعاملات در نرم‌افزار Cytoscape قرار داده شدند. چهار ژن هاب بر اساس شاخص درجه و مرکزیت میانی که بیشترین تأثیر را روی تولید شیر داشتند، مشخص شدند (جدول ۲). در شبکه ساخته شده ۶ ماژول شناسایی شدند که از بین آنها ۳ ماژول اختلاف معنی دار داشتند ($p-Value < 0.05$) (جدول ۳).



شکل ۳-شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین. رنگ گرهها ژن‌های با بیان متفاوت در هر ماژول معنی‌دار را نشان می-دهد. به ترتیب ژن‌های ماژول A با رنگ صورتی، ماژول B زرد، ماژول C سبز، ژن های مشترک ماژول های A,B آبی، ژن های مشترک ماژول های A,B,C قرمزنشان داده شدند. اندازه گرهها نشان دهنده نقش آن ژن در تولید شیر است هر چه اندازه بزرگ‌تر نقش آن ژن بیشتر است.

جدول۲-ژن‌های هاب بر اساس درجه و مرکزیت میانی در بین ژن های مشترک با بیان افتراقی

نام ژن	ماژول	درجه	مرکزیت میانی
HP	C	۱۳	۳۰۷/۷۲۸۵۸
THBS1	A,B	۹	۱۸۳/۸۴۲۸۵
PTX3	A,B,C	۸	۹۴/۴۵۹۵۲۶
CAV1	A,B	۸	۱۵۶/۶۵

جدول ۳- ماژول‌های معنی دار ژن‌های مشترک در دو نژاد گاو شیری

ماژول	p-Value	ژن
A	۰/۰۰۸	POSTN, THBS1, LAMC1, CAV1, PTX3, CXCL12, HEPACAM, ADAMTS18, AQP4
B	۰/۰۴	ADAMTS18, CAV1, CXCL12,

HSD11B1L, LAMC1, POSTN, PTX3, THBS1		
WC1.3, WC-7, PTX3, PON1, HP, DMBT1, CELA2A, C1QB	۰/۰۵	C

شناسایی مسیرها و فرآیندهای زیستی مربوط به ژن های مشترک بین دو نژاد در هر ماژول

فرایندها و مسیرهای زیستی مرتبط با ژن های مشترک بین دو نژاد در ماژول A، B و C با p–Value کمتر از ۰/۰۵ و دارای نقش موثر در تولید شیر در جدول ۴ ذکر شده است.

جدول٤- فرایندها و مسیرهای زیستی ماژول های معنی دار در دو نژاد گاو شیری

ماژولها	فرایند ها و مسیر های زیستی	p-Value	ژن ها
ماژول A	GO:0030198~extracellular matrix organization	۰/۰۰۱۹۲۱۳۸۲	POSTN, ADAMTS18, PTX3
	GO:0051592~response to calcium ion	۰/۰۱۲۲۳۱۱۸۶	CAV1, THBS1
	GO:0009888~tissue development	۰/۰۱۵۵۰۱۷۴۸	POSTN, LAMC1
	bta04510:Focal adhesion	۰/۰۰۲۷۶۰۱۳	CAV1, LAMC1, THBS1
	bta04512:ECM-receptor interaction	۰/۰۳۸۱۳۳۱۹۷	LAMC1, THBS1
ماژول B	GO:0030198~extracellular matrix organization	۰/۰۰۱۰۴۰۸۱۳	POSTN, ADAMTS18, PTX3
	GO:0051592~response to calcium ion	۰/۰۰۹۱۸۶۹۴۶	CAV1, THBS1
	GO:0009888~tissue development	۰/۰۱۱۶۴۸۳۰۱	POSTN, LAMC1
	bta04510:Focal adhesion	۰/۰۰۲۷۶۰۱۳	CAV1, LAMC1, THBS1
	bta04512:ECM-receptor interaction	۰/۰۳۸۱۳۳۱۹۷	LAMC1, THBS1
ماژول C	GO:0006508~proteolysis	۰/۰۳۸۹۰۷۱۷۲	CELA2A, HP

بحث

این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌ها و شبکه‌های مولکولی در بافت خون که در تنظیم تولید شیر در گاوهای هلشتاین–فریزین و قرمز لهستان نقش دارند، انجام شد. تحلیل بیان ژن نشان‌دهنده تفاوت‌های بالقوه در سازوکارهای تنظیمی بین این دو نژاد است. علاوه بر این، شناسایی سه ماژول معنی‌دار حاوی ژن‌های هاب بیانگر وجود شبکه‌های تنظیمی منسجم مرتبط با تولید شیر است. غنی‌سازی مسیرها و فرآیندهای زیستی در این ماژول‌ها نشان می‌دهد که تولید شیر نه‌تنها تحت تأثیر مسیرهای متابولیکی، بلکه به‌طور قابل‌توجهی وابسته به سیگنال‌دهی ماتریکس خارج سلولی، تنظیم کلسیم و فرآیندهای توسعه و بازآرایی بافتی است. در ادامه، نقش مسیرها و فرآیندهای مرتبط با تولید شیر در این ماژول‌ها و ژن‌های هاب شناسایی‌شده آن ها مورد بحث قرار می‌گیرد.

فرآیندها و مسیرهای مربوط به تولید شیر در ماژول‌ها

مهم‌ترین مسیرها و فرآیندهای مرتبط با تولید شیر در این ماژول‌ها سازمان ماتریکس خارج سلولی، پاسخ به یون کلسیم،توسعه بافت، پروتئولیز، چسبندگی کانونی، تعامل گیرنده ECM بودند.

تنظیم سنتز و ترشح شیر بیشتر از طریق مکانیسم‌های موضعی (داخل پستانی) کنترل می‌شود. برخی از ژن‌های یافت شده در این تحقیق با برخی از مطالعات قبلی مطابقت دارند و در مسیرهای بیولوژیکی مربوط به تولید شیر نقش دارند. ماتریکس خارج سلولی (ECM)، اولین فرآیند زیستی شناسایی شده در ماژول A و B با p–Value کمتر از ۰/۰۵ می باشد که جزء اصلی ریزمحیطی سلولی، نقش مهمی در مورفوژنز بافت طبیعی ایفا می‌کند. اتصال ECM به پروتئین‌های گیرنده غشایی سیگنال‌های بیوشیمیایی و بیومکانیکی را ایجاد می‌کند که معماری سلولی و بیان ژن را کنترل می‌کند. این سیگنال‌های ECM با فاکتورهای رشد و هورمون‌ها برای تنظیم مهاجرت، تمایز و تبدیل سلولی همکاری می‌کنند (Zhu و همکاران، ۲۰۱۴). سیگنالینگ ECM در طول رشد طبیعی غدد پستانی به شدت تنظیم می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سیگنال‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی یکپارچه از ECM و فاکتورهای محلول برای رشد طبیعی غدد پستانی و همچنین پیشرفت سرطان پستان بسیار مهم هستند (Zhu و همکاران، ۲۰۱۴). پاسخ به یون کلسیم دومین فرآیند زیستی معنی‌دار در ماژول‌های A و B در این مطالعه است. غلظت یون CA^{2+} در شیر برای حفظ یکپارچگی اتصالات محکم پستانی در دوران شیردهی ضروری است و رعایت دقیق غلظت آن در ترشحات پستانی بسیار مهم است (Kobayashi، ۲۰۲۳). فرآیند شناخته شده بعدی در این مطالعه که در دو ماژول Aو B قرار دارد توسعه بافت است.کمیت و کیفیت شیر به رشد و نمو بافت پستان بستگی دارد و درک فرآیند توسعه بافت برای طراحی اهرم‌های مؤثر برای بهبود تولید و ترکیب شیر بسیار مهم است (Hurley، ۲۰۱۹) . رشد و نمو بافت پستانی از مرحله جنینی صورت می‌گیرد و سپس در دوره های حساس زندگی که دوران بلوغ، بارداری و شیردهی است ادامه می‌یابد(Ivanova و همکاران،۲۰۲۱). پروتئولیز آخرین فرآیند معنی‌دار شناسایی شده است که در ماژول C قرار دارد. پروتئولیز شیر از طریق تولید اسید در طول هیدرولیز و بی‌ثباتی میسل‌های کازئین، پایداری حرارتی پروتئین شیر را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، پروتئولیز شیر منجر به آزاد شدن تیروزین می‌شود که می‌تواند نشانگر کیفیت ارگانولپتیک شیر باشد (Aouadhi، ۲۰۲۵).

مسیرهای چسبندگی کانونی و تعامل گیرنده ECM دو مسیر مهم معنی‌دار در ماژول A و B در این مطالعه هستند که تعامل گیرنده ECM، حاوی ژن‌هایی است که مسئول مورفوژنز اندام و حفظ ساختار سلولی و بافتی هستند(Smyczynskaو همکاران، ۲۰۲۰) . فعل و انفعالات سلول–ماتریکس خارج سلولی، یا چسبندگی کانونی (FA)، برای هموستاز بافت بسیار مهم هستند (Tsirtsaki و Gkretsi ، ۲۰۲۰) . بازسازی ECM یک جزء کلیدی از مکانیسم تنظیم داخلی کنترل کننده تنوع در تولید شیر قبل و بعد از اوج شیردهی می‌باشد (Song و همکاران، ۲۰۲۲).

مطالعات بر روی مولفه تنظیم غدد درون ریز متمرکز شده‌اند و ترشح و عملکرد هورمون را از طریق سیگنال‌دهی وابسته به ECM نشان داده‌اند(Shi و همکاران، ۲۰۱۷؛ Yang و همکاران، ۲۰۱۸). اتصال سلول‌های اپیتلیال به ECM برای حفظ تولید شیر الزامی است و نقش مهمی در رشد و عملکرد پستان ایفا می‌کند (Chowdhury و همکاران، ۲۰۱۰؛ و Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Williams و همکاران، ۲۰۰۸). مسیر چسبندگی کانونی در تکثیر، تمایز و تحرک سلولی نقش دارند(Smyczynska و همکاران، ۲۰۲۰). کمبود مسیر چسبندگی کانونی کیناز به طور کامل مورفوژنز انشعاب ارگانوئیدهای غدد پستانی را مهار می‌کند (Miltenburg و همکاران، ۲۰۰۹).

ژن‌های کلیدی در ماژول‌های معنی دار

برخی از ژن‌های یافت شده در این تحقیق با برخی از مطالعات قبلی مطابقت دارند و در برخی مسیرهای بیولوژیکی مربوط به تولید شیر نقش دارند.

هاپتوگلوبین (HP) ژن با درجه۱۳ بعنوان هاب‌ترین ژن شناسایی شد که بررسی ها نشان داده است یک پروتئین فاز حاد اصلی (پروتئن پلاسما است که میزان شان در خون در زمان التهاب افزایش می‌یابد) و این ژن در ماژول C قرار دارد و طبق گزارش‌ها در سرم و آب پنیر شیر در طی ورم پستان افزایش می‌یابد و پتانسیل آن را به عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی برجسته می‌کند (Upadhyaya و همکاران، ۲۰۱۶) . غلظت سرمی آن می‌تواند در طول عفونت تا ۱۰۰۰ برابر افزایش یابد (Koca و همکاران، ۲۰۲۱) . سلول‌های اپیتلیال پستانی منبع اضافی خارج کبدی HP هستند و به عنوان منبع احتمالی HP در شیر عمل می‌کنند (Thielen و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به مطالعه حاضر و تحقیقات پیشین این ژن نقش مؤثری در تولید شیر دارد همچنین می‌توان برای تشخیص برخی از بیماری‌ها مانند عفونت باکتریایی در گاو شیری استفاده شود (Thielen و همکاران، ۲۰۰۷).

دومین ژن ترومبوسپوندین ۱ (THBS1) با درجه ۹ است که یک گلیکوپروتئین خارج سلولی می‌باشد. در ماژول‌های A وB قرار داردکه نقش‌های متعددی در تعاملات سلول-ماتریکس و سلول-سلول ایفا می‌کند.THBS1 یک پروتئین چندمنظوره است که در فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی نقش دارد (Huang و همکاران، ۲۰۱۷). در انتقال مکانیکی سیگنال نقش دارد و به طور خاص در سطح القای آپوپتوز شرکت می‌کند (Lawler و همکاران، ۲۰۱۲). یافته‌های قبلی نشان داده‌است که مهار شیردهی در حیواناتی که کمتر دوشیده می‌شوند، که به القای آپوپتوز اپیتلیوم ترشحی ختم می‌شود، ممکن است در نتیجه سیگنال‌هایی که مستقیماً به اتساع پستان گره خورده‌اند رخ دهد و از طریق مسیرهایی که این مولکول را در بر می‌گیرند، پیش می‌رود (Littlejohn و همکاران، ۲۰۱۰). بر طبق یافته‌های مطالعه حاضر این ژن به طور مستقیم و غیرمستقیم در تولید شیر نقش دارد.

ژن هاب بعدی با درجه ۸ که در هر سه ماژول قرار دارد، PTX3 می باشد. آغوز حاوی سطوح بالایی از PTX3 است و سلول های اپیتلیال پستانی و سلول‌های شیر به طور اساسی PTX3 تولید می‌کنند. این ژن در هر سه ماژول

وجود دارد. PTX3 ممکن است یک ابزار درمانی برای درمان عفونت‌های نوزادی باشد و از این دیدگاه حمایت می‌کند که تغذیه با شیر مادر اثرات مفیدی بر سلامت نوزادان دارد (Jaillon و همکاران، ۲۰۱۳). جالب توجه است که PTX3 توسط TNF-A تقویت می‌شود، که نقش مهمی در رشد غدد پستانی و در تنظیم بیان پروتئین شیر ایفا می کند (Chen و همکاران، ۲۰۲۵). بنابراین، حضور PTX3 به‌عنوان ژن هاب در هر سه ماژول و نقش آن در مسیرهای زیستی مرتبط با تولید شیر، با شواهد معتبر پیشین کاملاً هم‌راستا است (JAILLON و همکاران، ۲۰۱۳؛ CHEN و همکاران، ۲۰۲۵).

آخرین ژن هاب شناسایی شده در این تحقیق ژن CAV-1 با درجه ۸ است پروتئین ساختاری اصلی غشای پلاسمایی است در ماژول‌های A و B قرار دارد. در تعدادی از فرآیندهای سلولی، از جمله هموستاز کلسترول و تنظیم انتقال سیگنال نقش دارد. مطالعات قبلی ارتباطی بین سطوح بیان CAV-1 و تولید شیر ایجاد کرده‌اند(Liu و همکاران، ۲۰۱۶). در غده پستانی موش طبیعی، نشان داده شد که سطوح CAV-1 در اواخر بارداری و شیردهی از طریق مکانیسم MAPK RAS-P42/44 کاهش می‌یابد. از دست دادن CAV-1 در سلول‌های اپیتلیال پستانی باعث ایجاد بیش فعال‌سازی اولیه سیگنال‌دهی STAT5A می‌شود، که به طور معمول پیشرفت زمانی لاکتوژنز را در غده پستانی کنترل می‌کند (Sotgia و همکاران، ۲۰۰۶). شواهد موجود به‌خوبی یافته‌های ما را درباره نقش مؤثر CAV-1 در تولید شیر تأیید می‌کنند (Liu و همکاران، ۲۰۱۶؛ Sotgia و همکاران، ۲۰۰۶).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تغییرات بیان ژن در بافت خون می‌تواند بازتاب‌دهنده مکانیسم‌های مولکولی پیچیده‌ای باشد که تولید شیر را در گاوهای شیری تنظیم می‌کنند. شناسایی ماژول‌های شبکه‌ای مرتبط با مسیرهایی نظیر سازمان ماتریکس خارج سلولی، پاسخ به یون کلسیم، توسعه بافت، پروتئولیز و چسبندگی کانونی نقش کلیدی تعاملات سلولی و سیگنال‌دهی وابسته به ECM را در عملکرد غده پستانی برجسته می‌سازد. همچنین، ژن‌های هاب HP، THBS1، PTX3و CAV1 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مرکزی این شبکه‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تولید شیر یا اهداف مولکولی جهت بهبود عملکرد شیردهی مورد استفاده قرار گیرند. شناسایی ژن‌های هاب و مسیرهای کلیدی، چارچوبی مولکولی برای درک تفاوت‌های نژادی فراهم می‌کند و امکان توسعه نشانگرهای ژنتیکی، طراحی پنل‌های هدفمند و افزایش دقت انتخاب ژنومی را فراهم می‌سازد. بنابراین، یافته‌های این پژوهش قابلیت کاربرد مستقیم در برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریت دقیق‌تر گاوهای شیری را دارند.

نسخه پیش از انتشار ، نشریه علوم دامی

منابع

Aouadhi, C. (2025). Comprehending the influence of enzyme sources, environmental parameters, and storage conditions on the proteolytic activity of cow milk. *International Dairy Journal*, 106444. 10.1016/j.idairyj.2024.106444

Cai, W., Cole, J. B., Goddard, M. E., Li, J., Zhang, S., & Song, J. (2025). Mammary gland multi-omics data reveals new genetic insights into milk production traits in dairy cattle. *PLoS Genetics*, *21*(4), e1011675. 10.1371/journal.pgen.1011675

Chen, L.-J., Su, Y.-A., Lin, T.-H., Liao, W.-T., Wu, C.-C., Lin, C.-C., Chen, C.-H., Hsu, T.-C., Yang, Y.-W., & Lee, Y.-J. (2025). Th1 Cytokines Inhibit Acinar Morphogenesis and Milk Protein Expression in 3D Mammary Cultures. *Biomedicines*, *13*(6), 1455. 10.3390/biomedicines13061455

Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y.-C., Tanaka, T. S., Wang, F., & Wang, N. (2010). Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature Materials*, *9*(1), 82–88. 10.1038/nmat2617

Clough, E., & Barrett, T. (2016). The gene expression omnibus database. *Statistical Genomics: Methods and Protocols*, 93–110. 10.1007/978-1-4939-3578-9_5

Du, C., Zhu La, A. L. T., Gao, S., Gao, W., Ma, L., Bu, D., & Zhang, W. (2024). Hepatic transcriptome reveals potential key genes contributing to differential milk production. *Genes*, *15*(9), 1229. 10.3390/genes15091229

Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W., & Lane, H. C. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl_2), W169–W175. 10.1093/nar/gkm415

Huang, T., Wang, L., Liu, D., Li, P., Xiong, H., Zhuang, L., Sun, L., Yuan, X., & Qiu, H. (2017). FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1. *International Journal of Oncology*, *50*(5), 1501–1512. 10.3892/ijo.2017.3923

Hurley, W. L. (2019). Mammary gland development in swine: embryo to early lactation. *Animal*, *13*(S1), s11–s19. 10.1017/S1751731118003433

Ivanova, E., Le Guillou, S., Hue-Beauvais, C., & Le Provost, F. (2021). Epigenetics: new insights into mammary gland biology. *Genes*, *12*(2), 231. 10.3390/genes12020231

Jaillon, S., Mancuso, G., Hamon, Y., Beauvillain, C., Cotici, V., Midiri, A., Bottazzi, B., Nebuloni, M., Garlanda, C., & Frémaux, I. (2013). Prototypic long pentraxin PTX3 is present in breast milk, spreads in tissues, and protects neonate mice from Pseudomonas aeruginosa lung infection. *The Journal of Immunology*, *191*(4), 1873–1882. 10.4049/jimmunol.1202223

Kobayashi, K. (2023). Culture models to investigate mechanisms of milk production and blood-milk barrier in mammary epithelial cells: a review and a protocol. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *28*(1), 8. 10.1007/s10911-023-09536-y

نسخه پیش از انتشار ، نشریه علوم دامی

Koca, N., Deniz, R., Erdugan, M., Yalçinkaya, Y., Artim-Esen, B., Ocal, M. L., Inanc, M., & Gül, A. (2021). Pos1445 retinol binding protein 4 as an acute phase reactant and biomarker in patients with familial mediterranean fever and amyloidosis compared to infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *80*, 1006–1007. 10.1136/annrheumdis-2021-eular.1445

Lawler, P. R., & Lawler, J. (2012). Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and-2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006627. 10.1101/cshperspect.a006627.

Li, D., Zhou, J., Chowdhury, F., Cheng, J., Wang, N., & Wang, F. (2011). Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. *Regenerative Medicine*, *6*(2), 229–240. 10.2217/rme.10.101

Littlejohn, M. D., Walker, C. G., Ward, H. E., Lehnert, K. B., Snell, R. G., Verkerk, G. A., Spelman, R. J., Clark, D. A., & Davis, S. R. (2010). Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiological Genomics*, *41*(1), 21–32. 10.1152/physiolgenomics.00078.2009

Liu, J., Qu, C., Li, H., Zhang, Y., Sun, J., Yang, S., Liu, J., An, L., & Zou, W. (2016). Expression of KCNA5 protein in human mammary epithelial cell line associated with caveolin-1. *The Journal of Membrane Biology*, *249*(4), 449–457. 10.1007/s00232-016-9903-4

Paul, S., Andrew, M., & Owen, O. (2003). Baliga Nitin S, Wang Jonathan T, Ramage Daniel, Amin Nada, Schwikowski Benno, Ideker Trey. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, *13*(11), 2498–2504. 10.1101/gr.1239303

Plante, I., Stewart, M. K., & Laird, D. W. (2011). Evaluation of mammary gland development and function in mouse models. Journal of visualized experiments: JoVE, (53), 2828. 10.3791/2828

Ren, J., Zhang, Z., Tang, M., Wen, Z., Luo, C., Qiang, Z., Cai, X., Wang, H., Wang, Q., & Ji, Y. (2025). A single-cell transcriptomic study of milk cells from dairy cows with divergent lactation performance. *Scientific Reports*, *15*(1), 34803. 10.1038/s41598-024-62052-4

Shi, K., Liu, X., Li, H., Lin, X., Yan, Z., Cao, Q., Zhao, M., Xu, Z., & Wang, Z. (2017). Menin modulates mammary epithelial cell numbers in bovine mammary glands through cyclin D1. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *22*, 221–233. 10.1007/s10911-017-9380-0

Smyczynska, U., Bartlomiejczyk, M. A., Stanczak, M. M., Sztromwasser, P., Wesolowska, A., Barbarska, O., Pawlikowska, E., & Fendler, W. (2020). Impact of processing method on donated human breast milk microRNA content. *PLoS One*, *15*(7), e0236126. 10.1371/journal.pone.0236126

Song, X., Zhao, M., Cao, Q., Wang, S., Li, R., Zhang, X., Zhang, L., & Shi, K. (2022). Transcriptome provides insights into bovine mammary regulatory mechanisms during the lactation cycle. *Journal of Applied Animal Research*, *50*(1), 275–288. 10.1080/09712119.2022.2076528

نسخه پیش از انتشار ، نشریه علوم دامی

Sotgia, F., Schubert, W., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (2006). Genetic ablation of caveolin-1 in mammary epithelial cells increases milk production and hyper-activates STAT5a signaling. *Cancer Biology & Therapy*, *5*(3), 292–297. 10.4161/cbt.5.3.2390

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., & Tsafou, K. P. (2015). STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D447–D452. 10.1093/nar/gku1003

Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., & Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, gkw937. 10.1093/nar/gkw937

Thielen, M. A., Mielenz, M., Hiss, S., Zerbe, H., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Seyfert, H.-M., & Sauerwein, H. (2007). Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, *90*(3), 1215–1219. 10.3168/jds.2006-445

Tsirtsaki, K., & Gkretsi, V. (2020). The focal adhesion protein Integrin-Linked Kinase (ILK) as an important player in breast cancer pathogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, *14*(1), 204–213. 10.1080/19336918.2020.1764537

Upadhyaya, I., Thanislass, J., Veerapandyan, A., Badami, S., & Antony, P. X. (2016). Characterization of haptoglobin isotype in milk of mastitis-affected cows. *Veterinary Sciences*, *3*(4), 29. 10.3390/vetsci3040029

van Miltenburg, M. H. A. M., Lalai, R., de Bont, H., van Waaij, E., Beggs, H., Danen, E. H. J., & van de Water, B. (2009). Complete focal adhesion kinase deficiency in the mammary gland causes ductal dilation and aberrant branching morphogenesis through defects in Rho kinase-dependent cell contractility. *The FASEB Journal*, *23*(10), 3482–3493. 10.1096/fj.09-131664

Williams, C. M., Engler, A. J., Slone, R. D., Galante, L. L., & Schwarzbauer, J. E. (2008). Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Research*, *68*(9), 3185–3192. 10.1158/0008-5472.CAN-07-5087

Yang, L.-J., Zhou, M., Huang, L.-B., Yang, W.-R., Yang, Z.-B., Jiang, S.-Z., & Ge, J.-S. (2018). Zearalenone-promoted follicle growth through modulation of Wnt-1/β-catenin signaling pathway and expression of estrogen receptor genes in ovaries of postweaning piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(30), 7899–7906. 10.1021/acs.jafc.8b02439

Zhu, J., Xiong, G., Trinkle, C., & Xu, R. (2014). Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. Histology and Histopathology, 29(9), 1083. 10.14670/HH-29.1083