Animal Production Research

Vol. 14, No. 2, 2025 (19-29)
doi: 10.22124/ar.2025.29152.1868
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

IGF-2 gene expression in liver and muscle tissue of fattening lambs under the influence of organic zinc-methionine supplement and calcium salt of flaxseed oil supplement in the diet

M. Nazari*, Z. Alipour, S. Rostami, G. Mohammadi Ahvazi

Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 04-12-2024 – Revised: 29-01-2025 – Accepted: 29-01-2025 – Available online: 28-03-2025)

Abstract

Introduction: Insulin-like growth factors (IGFs) are known as regulators of cell growth and development. This protein plays an essential role in growth and development before birth. Studies suggest that insulin-like growth factor 2 (*IGF-2*) promotes the growth and division (proliferation) of cells in many different tissues. Zinc is one of the most limiting trace mineral elements and is required for body growth, structure, hormonal and enzyme activity, nutrient metabolism, cell division, and the immune system. It has been found that zinc deficiency is associated with reduced food intake and reduced growth. Zinc is one of the important factors in the regulation of IGF family gene expression in many tissues. Also, zinc is effective in desaturating linoleic acid. Zinc can prevent lipid peroxidation. In general, there is a significant relationship between fat metabolism and zinc. On the other hand, flaxseed oil, also known as flax oil or linseed oil, is made from flax seeds that have been ground and pressed to release their natural oil. Flaxseed oil contains both omega-3 and omega-6 fatty acids, which are needed for health. Flaxseed oil contains the essential fatty acid alpha-linolenic acid (ALA), which the body converts into eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are the omega-3 fatty acids found in fish oil. Omega-3 fatty acids are essential to health and have been associated with benefits like reduced inflammation, improved heart health, and the protection of the brain against aging. Some researchers showed that the essential fatty acid alpha-linolenic acid (omega-3) is related to the functions of the *IGF-2* in the body. Because of the adverse effects of unprotected fatty acids (FAs) on the rumen environment through altering the direct pathway of rumen biohydrogenation and altering the FAs profile in the fore-stomach, methods should be used to protect polyunsaturated fatty acids in the rumen. Protection methods include either encapsulating unsaturated FAs inside a microbial-resistant shell (such as lipid encapsulation) or modifying the FAs' structure by blocking the carboxyl group (such as calcium salts or fatty amides) to resist microbial enzymes. Because of the commercial availability of calcium salt, researchers have used this form of protection in assessing the flow of FAs in the duodenum. This research was conducted to investigate the effect of adding zinc-methionine organic supplement to diets with and without calcium salt of flaxseed oil on the *IGF-2* gene expression in liver and muscle tissue of fattening lambs.

Materials and methods: In this research, 44 Arab male lambs were used with a 2×2 factorial experiment in a completely randomized design with four treatments and 11 replications. The four experimental diets were: 1) Basal diet without Ca-salt of flaxseed oil supplement and zinc-methionine supplement (CON), 2) Basal diet without Ca-salt of flaxseed oil supplement containing 0.083% zinc-methionine supplement (equivalent to 120 mg of zinc) per kg of dry matter, ZM), 3) Basal diet containing 3% Ca-salt of flaxseed oil supplement without zinc-methionine supplement (CFO), and 4) Basal diet containing 3% Ca-salt of flaxseed oil supplement plus 0.083% zinc-methionine supplement (CFO+ ZM). After the fattening period, three heads of lambs from each treatment

* Corresponding author: M.nazari@asnrukh.ac.ir

were slaughtered. The liver and muscle tissues were taken to the laboratory in liquid nitrogen. After extracting RNA and measuring its quality, cDNA synthesis was performed. Finally, the expression of the *IGF-2* gene was evaluated using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. In this method, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene was used as a housekeeping gene to normalize the gene expression data in the quantitative RT-PCR.

Results and discussion: The presence of only one peak in the melting curves of the *IGF-2* and *GAPDH* genes in the RT-PCR reaction confirmed the production of a specific product in this reaction. The observation of a single band in the range of 203 bp for the *IGF-2* gene and the range of 78 pairs of nucleotides for the *GAPDH* gene on gel electrophoresis indicated the correctness of the test and amplification of the desired fragment by the PCR. The results of this study showed that adding zinc supplementation significantly increased the *IGF-2* gene expression in the liver ($P<0.01$). In comparison, this effect was not significant in the muscle. The effect of calcium salt of flaxseed oil supplementation on the *IGF-2* gene expression was significant in both tissues. The interaction effects of zinc-methionine supplementation and calcium salt of flaxseed oil supplementation were non-significant. Adding organic zinc-methionine supplement to diets containing calcium salt of flaxseed oil supplementation increased the *IGF-2* gene expression. *IGF-2* is known as a key growth factor in metabolic processes and tissue growth. This gene is known as an important factor in tissue growth and development, especially in liver and muscle tissue, and plays a vital role in regulating fat and protein metabolism. In recent years, attention has increased to the effect of nutritional supplements in improving the performance and health of livestock, as well as improving gene expression in various tissues. One of the supplements of interest in this field is zinc-methionine, which is known as an organic-mineral compound. Several experiments have been conducted in this field, which have shown that feeding diets with sufficient zinc increases the expression of *IGF-2* compared to diets with zinc deficiency. Incorporating these supplements into the diet can directly affect protein and amino acid metabolism, thereby increasing the expression of growth-related genes.

Conclusions: Adding a zinc-methionine organic supplement to diets containing calcium salt of flaxseed oil increased the *IGF-2* gene expression. This will likely increase growth and ultimately production.

Keywords: Fattening lamb, Gene expression, Zinc, Flaxseed oil, *IGF-2* gene

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Nazari, M., Alipour, Z., Rostami, S., & Mohammadi Ahvazi, G. (2025). *IGF-2* gene expression in liver and muscle tissue of fattening lambs under the influence of organic zinc-methionine supplement and calcium salt of flaxseed oil supplement in the diet. *Animal Production Research*, *14*(2), 19-29. doi: 10.22124/ar.2025.29152.1868

تحقیقات تولیدات دامی

سال چهاردهم/شماره دوم/تابستان ۱۴۰۴ (۲۹-۱۹)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد و ماهیچه بره‌های پرواری تحت تاثیر مکمل آلی روی-متیونین و مکمل نمک کلسیمی روغن کتان در جیره

محمود نظری*، زینب علی پور، سپیده رستمی، غزال محمدی اهوازی

گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰ – تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۱/۰۸)

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی همزمان اثر تغذیه‌ای مکمل آلی روی-متیونین و مکمل چربی غیراشباع (مکمل نمک کلسیمی روغن کتان) بر بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد و ماهیچه بره‌های نر پرواری بود. در این مطالعه از ۴۴ راس بره نر عربی با آزمایش فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و ۱۱ تکرار استفاده شد. چهار جیره آزمایشی عبارت بودند از: ۱) جیره پایه بدون مکمل کلسیمی روغن کتان و بدون مکمل روی-متیونین (گروه شاهد)، ۲) جیره پایه بدون مکمل کلسیمی روغن کتان حاوی ۰/۰۸ درصد مکمل روی-متیونین (معادل ۱۲۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک، ۳) جیره پایه حاوی سه درصد مکمل کلسیمی روغن کتان بدون مکمل روی-متیونین، و ۴) جیره پایه حاوی سه درصد مکمل کلسیمی روغن کتان بعلاوه ۰/۰۸ درصد مکمل روی-متیونین. پس از پایان دوره پروار، سه راس بره از هر تیمار کشتار شد و نمونه‌های بافت ماهیچه و کبد بلافاصله در ازت مایع ذخیره شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری کیفیت آن، ساخت cDNA انجام شد. در نهایت، بیان ژن *IGF-2* با استفاده از روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن مکمل روی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن *IGF-2* در کبد شد ($P<0/01$)، در حالی که این تغییر در ماهیچه معنی‌دار نبود. اثر مکمل نمک کلسیمی روغن کتان بر بیان ژن *IGF-2* در کبد و ماهیچه معنی‌دار شد. آثار متقابل مکمل روی-متیونین و مکمل نمک کلسیمی روغن کتان معنی‌دار نشد. افزودن مکمل آلی روی-متیونین به جیره‌های حاوی مکمل نمک کلسیمی روغن کتان سبب افزایش بیان ژن *IGF-2* می‌شود. افزایش بیان ژن *IGF-2* در کبد و ماهیچه بره‌ها احتمالاً منجر به افزایش رشد و در نهایت، افزایش تولید دام خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: بره پرواری، بیان ژن، عنصر روی، روغن کتان، ژن *IGF-2*

* نویسندهٔ مسئول: M.nazari@asnrukh.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2025.29152.1868

مقدمه

افزودن مکمل‌های آلی به جیره غذایی دام‌ها به‌ویژه در بره‌های پرواری، به‌منظور بهبود عملکرد رشد و سلامت عمومی، دارای اهمیت ویژه‌ای است. یکی از این مکمل‌ها، روی-متیونین است که به‌عنوان منبع کلیدی از عنصر روی (Zn) شناخته می‌شود. این ترکیب می‌تواند آثار مثبتی بر سوخت و ساز و بیان ژن‌ها داشته باشد. عنصر روی از مهم‌ترین مواد مغذی برای سلامت حیوانات است. بسیاری از پروتئین‌ها، آنزیم‌های حیاتی و فاکتورهای رونویسی به روی متصل می‌شوند و این عنصر به‌عنوان یک جزء حیاتی، در عملکردهای زیستی آن‌ها تاثیرگذار است. این عنصر در فرآیندهای بیوشیمیایی متعددی از جمله تنفس سلولی، استفاده از اکسیژن، حفظ یکپارچگی غشای سلولی، خنثی-سازی رادیکال‌های آزاد و حفاظت در برابر پراکسیداسیون لیپیدی نقش دارد (Sloup et al., 2017). عنصر روی که به‌صورت ترکیبات آلی و غیر آلی وجود دارد جزء بیش از ۳۰۰ آنزیم درگیر در ایمنی، سوخت و ساز، رشد و عملکردهای تولیدمثلی است. این عنصر با دخالت در تعادل الکترولیت‌ها و اسید و باز در بدن و مخصوصاً در زمان تنش، نقش ایفا می‌کند (Nazari et al., 2020). عنصر روی برای ساختار کروماتین DNA (Salabi et al., 2014)، فعالیت فاکتورهای رونویسی (پروتئین انگشت روی مانند) و RNA پلیمراز مهم است. کمبود روی،ساخت RNA را کاهش داده و می‌تواند بر تنظیم بیان ژن از مسیر فعال کردن یا مهار رونویسی ژن‌های دخیل در تشکیل پروتئین تاثیر بگذارد. کمبود روی می‌تواند بر عملکرد حیوانات از راه کاهش اشتها و کاهش رشد تاثیر بگذارد (Salabi et al., 2011; Nazari et al., 2017). همچنین، اهمیت بالایی برای رشد و تمایز سلولی طبیعی، ساخت DNA و بیان ژن دارد. بعلاوه، عنصر روی، یکی از اجزای ضروری در جیره این حیوانات به‌شمار می‌رود، که در سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش کلیدی دارد (Vierboom et al., 2003). عنصر روی، یک عنصر لیپوژنیک است و در فرآیندهای لیپوژنز و مهار لیپولیز از مسیر سیگنال‌دهی انسولین، دخالت دارد (Oh & Choi, 2004).

مطالعات زیادی نشان دادند که استفاده از عنصر روی به فرم آلی، فراهمی زیستی بیشتری نسبت به فرم غیرآلی دارد. منابع مواد معدنی کم نیاز از نظر فراهمی زیستی برای حیوانات به دو فرم غیرآلی و آلی تقسیم می‌شوند که پیشنهاد شده فرم آلی مواد معدنی کم نیاز، فراهمی زیستی بیشتری نسبت به فرم غیرآلی خود دارد. مکمل‌های غیرآلی مواد معدنی کم نیاز معمولاً شامل سولفات و اکسید مواد معدنی کم نیاز هستند، در حالی که منابع آلی موجود شامل مواد معدنی کم نیاز به شکل پروتئینات، کیلات‌های اسیدآمینه، کیلات‌های هیدروکسیل و مخمرهای غنی‌شده با متیونین هستند. مصرف روی-متیونین باعث افزایش رشد و کارآیی تغذیه در حیوانات نشخوارکننده شده و کیفیت لاشه را بهبود می‌بخشد (Spears, 1989). تحقیقات نشان داده است که استفاده از روی-متیونین در جیره موش در مقایسه با سولفات روی، موجب افزایش بیشتر بیان ژن *IGF-1* در کبد می‌شود (Yu et al., 2005). محققین نشان دادند که افزایش غلظت روی-متیونین در جیره گوسفند باعث افزایش روزانه مصرف ماده خشک (DMI) و غلظت *IGF-1* پلاسما می‌شود (Jafarpour et al., 2015). همان‌طور که اشاره شد مطالعات زیادی آثار مکمل روی-متیونین را بر بیان ژن *IGF-1* بررسی کردند، اما تاکنون مطالعه‌ای که تأثیر مکمل روی-متیونین بر بیان ژن *IGF-2* بافت کبد و ماهیچه بره‌های پرواری نشان دهد گزارش نشده است. بنابراین، بررسی تأثیر مکمل روی-متیونین بر بیان ژن *IGF-2* بافت کبد و ماهیچه گوسفند پرواری می‌تواند مفید باشد. ژن *IGF-2* یکی از عوامل کلیدی در رشد و توسعه بافت‌ها است و به‌ویژه در بافت کبد تولید می‌شود. این عامل، نقش مهمی در تنظیم سوخت و ساز و رشد سلولی دارد و می‌تواند به افزایش ساخت پروتئین و کاهش تجزیه پروتئین در بافت‌های مختلف کمک کند (Hao et al., 2023). همچنین، *IGF-2* به‌عنوان یک عامل تنظیم‌کننده سلول با ساختاری مشابه انسولین است و در بافت‌های مختلف در طول مرحله جنینی به‌طور گسترده بیان می‌شود. در بزرگسالی، بیان *IGF-2* به‌طور قابل توجهی سرکوب می‌شود و عمدتاً در کبد ساخته می‌شود و به بخش‌های مختلف بدن منتقل می‌شود. در پستانداران، *IGF-2* دارای عملکردهای محافظتی متعددی است (Younis et al., 2018). عملکرد آن عمدتاً از مسیر ترکیب با گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF-1R) و گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین ۲ (IGF-2R) است، یا می‌تواند با پروتئین اتصال‌دهنده فاکتور رشد شبه انسولین (IGFBP) رقابت کند. IGFBP ها

سطوح گردشی، نیمه عمر و فعالیت *IGF-2* را در بافت‌های هدف با اتصال رقابتی تنظیم می‌کنند (Yi et al., 2020). *IGF-2* که به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد A یا سوماتومدین A نیز شناخته می‌شود، نقش مهمی در تنظیم رشد جنین، تکثیر تومور و رشد عضلات اسکلتی ایفا می‌کند. عملکرد *IGF-2* در دوران جنینی، بهتر شناخته شده است. این ژن از طریق مسیر پروتئین کیناز B (AKT) (Kent *et al.*, 2012) در تنظیم رشد، عملکرد جفت و تمایز عضلات اسکلتی (Gardner et al., 2011) نقش دارد. علاوه بر این، گزارش شده است که تجویز *IGF-2* در موش‌ها به‌طور قابل توجهی وزن معده، روده، کبد و پانکراس را افزایش می‌دهد، در حالی که بر وزن قلب، ریه‌ها و کلیه‌ها بی‌تأثیر است، که نشان دهنده نقش *IGF-2* در رشد این اندام‌ها است (White et al., 2018). محققین نشان دادند که *IGF-2* ممکن است نقشی به‌عنوان تنظیم‌کننده فیزیولوژیکی رشد و سوخت و ساز پیش چربی داشته باشد و ممکن است نقش محافظتی در تنظیم ترکیب چربی بدن ایفا کند (Wilson & Rotwein, 2006).

در این تحقیق از نمک کلسیمی روغن کتان به‌عنوان منبع اسیدچرب غیراشباع استفاده شد. مصرف نمک کلسیمی اسیدهای چرب می‌تواند بدون تأثیر منفی بر جمعیت میکروبی شکمبه و قابلیت هضم الیاف، آثار منفی ناشی از توازن منفی انرژی را کاهش دهد (Palmquist & Jenkins, 2017). برخی اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتیک علاوه بر انرژی‌زایی، آثار مثبتی بر تولید شیر، میزان چربی شیر و راندمان خوراک دارند (De Souza & Lock, 2018). اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و لینولنیک در ساختمان غشاهای سلولی و به‌عنوان پیش‌ساز سایر اسیدهای چرب غیراشباع، نقش کلیدی در تنظیم سوخت و ساز سلولی در تمامی پستانداران دارند (McCarthy et al., 2015). اسیدهای چرب غیراشباع به‌وسیله میکروارگانیسم‌های شکمبه تحت واکنش‌های بیوهیدروژناسیونی قرار می‌گیرند. همچنین، اسیدهای چرب، به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر، با ورود به محیط شکمبه، می‌توانند باعث جلوگیری از فعالیت‌های میکروبی و در نتیجه، کاهش هضم الیاف شوند. ولی، مکمل‌سازی اسیدهای چرب غیراشباع به شکل نمک‌های کلسیمی می‌تواند این آثار را به حداقل برساند (Pavkovych et al., 2015). با توجه به اهمیت نقش عنصر روی در سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، در این پژوهش به‌طور همزمان از مکمل آلی روی-متیونین و مکمل نمک کلسیمی روغن کتان استفاده شد تا آثار همزمان آنها مورد بررسی قرار گیرد. از طرف دیگر، چون هر دو مکمل می‌توانند بر بیان ژن‌های *IGF* تاثیرگذار باشند، هدف از این پژوهش، بررسی اثر تغذیه‌ای مکمل آلی روی-متیونین و مکمل نمک کلسیمی روغن کتان بر بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد و ماهیچه بره‌های پرواری بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، تعداد ۴۴ راس بره نر عربی دو تا سه ماه انتخاب شدند. آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل ۲×۲ در قالب چهار تیمار و ۱۱ تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه بدون مکمل کلسیمی روغن کتان و بدون مکمل روی-متیونین (گروه شاهد)، ۲) جیره پایه بدون مکمل کلسیمی روغن کتان حاوی ۰/۰۸ درصد مکمل روی-متیونین (معادل ۱۲۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک، ۳) جیره پایه حاوی سه درصد مکمل کلسیمی روغن کتان بدون مکمل روی-متیونین، و ۴) جیره پایه حاوی سه درصد مکمل کلسیمی روغن کتان بعلاوه ۰/۰۸ درصد مکمل روی-متیونین بودند. مکمل نمک کلسیمی روغن کتان (پرشیالین) از شرکت کیمیا دانش الوند (ایران) و مکمل روی-متیونین از شرکت زینپرو (ایالات متحده آمریکا) تهیه شد. بره‌ها در طول دوره آزمایش در قفس‌های انفرادی قرار گرفته بودند و به آب آشامیدنی تازه و خوراک، دسترسی داشتند. مقدار خوراک عرضه شده روزانه به‌گونه‌ای تنظیم شده بود که حداقل مقدار ۱۰ درصد از خوراک در آخور باقی می‌ماند. طول دوره آزمایش، ۹۴ روز شامل ۱۰ روز عادت‌پذیری و ۸۴ روز آزمایش اصلی بود. حیوانات به‌مدت ۸۴ روز با جیره‌های آزمایشی دارای ۸۵ درصد کنسانتره تغذیه شدند. در انتهای آزمایش و برای بررسی بیان ژن *IGF-2*، سه بره نر از هر تیمار کشتار شدند و بلافاصله، قطعات کوچکی از بافت کبد و ماهیچه با تیغ جراحی استریل جدا شد و در تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس، نمونه‌ها به‌سرعت در داخل تانک ازت گذاشته شدند. نمونه‌های منجمد در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای استخراج RNA کل بافت، از کیت شرکت دنازیست استفاده شد. برای تعیین کیفیت و کمیت (غلظت) RNA استخراج شده، از روش الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد. RNA استخراج شده به فریزر در دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد تا در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گیرد.

جهت یکسان کردن RNA به‌کار رفته در ساخت cDNA از مقدار یک میکروگرم RNA استفاده شد. در نهایت، محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای ساخت cDNA از کیت شرکت سیناکلون استفاده شد.

توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، توالی آغازگر برای *IGF-2* با نرم افزار Vector NTI 11 طراحی و به‌وسیله شرکت سیناکلون (ایران) ساخته شد. جهت انجام واکنش Real Time PCR از کیت Real IQ plus Master Mix Green High Rox (آمپلیکون، دانمارک) استفاده شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix Green High Rox ، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر cDNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. در ادامه، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر شرکت بایورَد با برنامه حرارتی به شرح زیر جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌ها قرار داده شدند: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه انجام شد. نمودار ذوب برای بررسی اختصاصی بودن پرایمرها بین ۶۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس رسم شد. در پژوهش حاضر، تغییرات نسبی بیان ژن‌ها نسبت به ژن *GAPDH* (ژن مرجع) نرمال شد. بیان نسبی ژن نسبت به *GAPDH* با فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Pfaffl et al., 2002). پس از محاسبه مقدار Fold Change، کلیه داده‌های این طرح با استفاده رویه GLM نرم‌افزار SAS و با آزمایش فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت مقایسه میانگین تیمارها از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

جهت تعیین کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز نمونه‌های RNA روی ژل آگارز دو درصد و با استفاده از الکتروفورز افقی انجام شد. نتایج ژن الکتروفورز نشان داد که کیفیت RNAهای استخراج شده خوب بود. باندهای RNA ریبوزومی 18s و 28s قابل تشخیص بوده و اسمیر میان این دو باند مربوط به mRNA ها بود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده بود. همچنین، نتایج نانودراپ نشان داد که نمونه‌های RNA استخراج شده فاقد آلودگی بودند زیرا نسبت ۲۶۰ نانومتر: ۲۸۰ نانومتر از ۱/۷۷ تا ۱/۹۰ متغیر بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده ۲۰۳ جفت نوکلئوتید برای ژن *IGF-2* و در محدوده ۱۴۴ جفت نوکلئوتید برای ژن *GAPDH* در مورد همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر است (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهند که ژن *IGF-2* در ماهیچه و کبد گوسفند بیان می‌شوند. این نتایج مطابق با نتایج سایر محققان است. در مطالعه‌ای که روی گوسفند انجام شد مشخص شد که ژن *IGF-2* در تمام بافت‌های عضلانی و چربی پشت کمر گوسفند بیان می‌شوند (Wei et al., 2018; Abareghi et al., 2023).

نتایج اثر افزودن نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل آلی روی-متیونین بر بیان ژن IGF-2 در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد افزودن مکمل روی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن *IGF-2* در کبد شده است ($P<0/01$)، در حالی که این اثر در ماهیچه، معنی‌دار نشده است. اثر مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان بر بیان ژن *IGF-2* در کبد و ماهیچه، معنی‌دار شد. همچنین، افزودن همزمان مکمل روی-متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن *IGF-2* نشد ($P>0/05$). عنصر روی، یکی از ریزمغذی‌های ضروری برای سلامتی و رشد نشخوارکنندگان است. این عنصر به‌عنوان یک کوفاکتور در بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی و متابولیکی عمل می‌کند و نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها، به‌ویژه ژن *IGF-2* ایفا می‌کند.

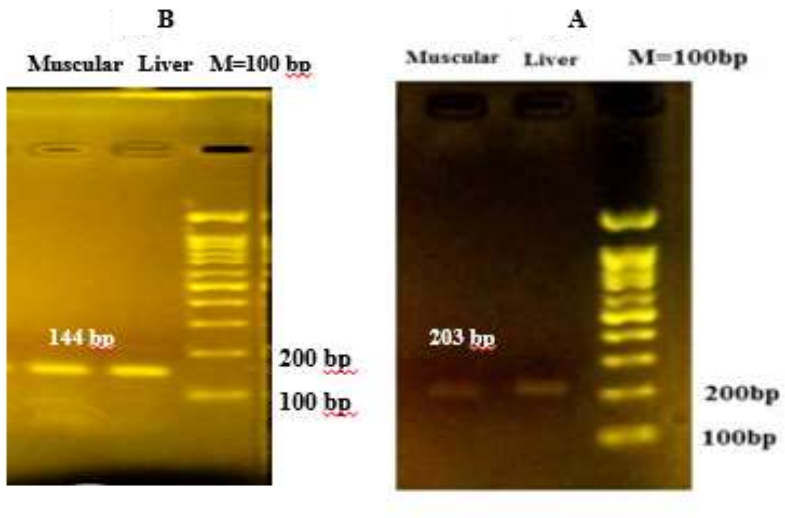

Fig. 1. A sample of electrophoresis of PCR products for (A) IGF-2 (B) GAPDH of liver and muscular on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp

شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های IGF-2 (A) و GAPDH (B) برای کبد و ماهیچه روی ژل آگارز دو درصد. M: نشانگر ۱۰۰ bp

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده (درصد در ماده خشک) و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی بره‌های پرواری

Table 1. Constituents (percentage in dry matter) and chemical composition of experimental diets of fattening lambs

Diet components	Diets[1]			
	Fat-free		With fat	
	Without zinc	With zinc	Without zinc	With zinc
Alfalfa	15	15	15	15
Barley	44	44	44	44
Corn	14.80	14.72	12.50	12.42
Soybean meal	9	9	9	9
Bran	15	15	15	15
Calcium salt of flaxseed oil[2]	0	0	3	3
Calcium carbonate	1.4	1.4	0.7	0.7
Zinc-methionine supplement[3]	0	0.08	0	0.08
Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamin-mineral supplement[4]	0.5	0.5	0.5	0.5
Chemical composition				
Dry matter	88.8	88.8	89.0	89.0
Crude protein	16.1	16.1	15.9	15.9
Crude fat	3.0	3.0	5.8	5.8
Insoluble fibers in neutral detergent	24.7	24.7	24.4	24.4
Acid detergent insoluble fibers	13.3	13.3	13.2	13.2
Non-fiber carbohydrates	49.5	49.5	46.9	46.9
Zinc (mg/kg dry matter)	31.4	130.9	30.5	129.0
Metabolizable energy [5]	3.14	3.14	3.25	3.25

[1] Calcium salt of flaxseed oil, Persialin, Danesh Alvand Chemical Company, Iran. Contains 85% fat and 8% calcium (10% C16:0, 7% C18:0, 21% C18:1, 18% C18:2 and 42% C18:3).

[2] Organic zinc-methionine complex, Zinpro Company, USA, containing 120 g of zinc element per kilogram of dry matter.

[3] Each kilogram of the supplement contains 800,000 IU of vitamin A, 150,000 IU of vitamin D, 2,000 IU of vitamin E, 2 g of antioxidants, 160 g of calcium, 20 g of phosphorus, 40 g of magnesium, 4 g of manganese, 3 g of iron, 3 g of copper, 3 g of zinc, 80 milligrams of iodine, 50 milligrams of cobalt, and 60 milligrams of selenium.

[4] Calculated with NRC (2007).

جدول ۲- لیست توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. The sequence list and characteristics of the primers used in this study

Gene name		Primer sequence	Accession number	Amplicon size
IGF-2	Sense primer	F: 5- GACCGCGGCTTCTACTTCAG -3	NM_001009311.1	203
	Antisense primer	R: 5- AAGAACTTGCCCACGGGGTAT -3		
GAPDH	Sense primer	F:5- CCAGGCAGAGAACGGGAAG -3	XM_027961471.3	144
	Antisense primer	R:5 - GCCTTCTCCATGGTAGTGAAG-3		

جدول ۳- اثر تیمارهای مختلف بر بیان ژن *IGF-2* ماهیچه و کبد گوسفند

Table 3. Effect of different treatments on the *IGF-2* gene expression in liver and muscle of sheep

Treatment	Main effects		*IGF2* (L)	*IGF2* (M)
Basal diet + Zinc-methionine	0		3.02^{b}	3.64
	0.08		7.55^{a}	3.51
SEM			0.53	0.96
Base diet + Calcium salt of flaxseed oil	0		3.8^{b}	1.47^{b}
	3		6.77^{a}	5.67^{a}
SEM			0.53	0.96
Interactions				
Basal diet (control)	0	0	1	1
Basal diet + Zinc-methionine	0.083	0	6.61	1.95
Base diet + Calcium salt of flaxseed oil	0	3	5.05	6.28
Basal diet + Zinc-methionine + Calcium salt of flaxseed oil	0.083	3	8.49	5.06
SEM			0.75	1.36
P-value				
Base diet + Calcium salt of flaxseed oil			0.00	0.92
Basal diet + Zinc-methionine			0.00	0.01
Basal diet + Zinc-methionine + Calcium salt of flaxseed oil			0.19	0.44

[a-b] Values with different superscripts within a column are significantly different ($P<0.05$). L: Liver; M: Muscle; SEM: Standard error of the means

IGF-2 به‌عنوان یک عامل رشد کلیدی در فرآیندهای متابولیکی و رشد بافت‌ها شناخته می‌شود. این ژن به‌عنوان یک عامل مهم در رشد و توسعه بافت‌ها، به‌ویژه در بافت کبد و ماهیچه شناخته شده است و نقش حیاتی در تنظیم سوخت و ساز چربی و پروتئین ایفا می‌کند (Wang et al., 2020). در سال‌های اخیر، توجه به تأثیر مکمل‌های غذایی در بهبود عملکرد و سلامت دام‌ها و همچنین، بهبود بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف افزایش یافته است. یکی از مکمل‌های مورد توجه در این زمینه، روی-متیونین است که به‌عنوان یک ترکیب آلی معدنی شناخته می‌شود. آزمایشات متعددی در این زمینه انجام شده است که نشان داده تغذیه با جیره‌های دارای عنصر روی کافی در مقایسه با جیره های دارای کمبود روی باعث افزایش بیان *IGF-2* می‌شود.

در این مطالعه به بررسی تأثیر افزودن مکمل آلی روی-متیونین به جیره حاوی چربی غیراشباع بر بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد و ماهیچه پرداخته شد. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مکمل روی متیونین باعث افزایش میزان بیان ژن *IGF-2* می‌شود که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که مکمل‌های حاوی روی-متیونین می‌توانند به بهبود عملکرد رشد و تغذیه دام‌ها کمک کنند. قرار دادن این مکمل‌ها در جیره می‌تواند به‌طور مستقیم بر سوخت و ساز پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه تأثیر بگذارند و به این ترتیب باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد شوند. در یک مطالعه، افزودن روی-متیونین به جیره موجب افزایش سطح *IGF-2* در بافت کبد و بهبود صفات رشد شد (Yang et al., 2023).

در پژوهشی دیگر بیان شد که *IGF-2* به‌عنوان یک فاکتور رشد، نقش حیاتی در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی دارد. این پروتئین قادر است با افزایش ساخت پروتئین‌ها و تنظیم سوخت و ساز چربی، به بهبود عملکرد کبد کمک کند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که مکمل روی-متیونین می‌تواند به‌واسطه تعدیل مسیرهای سیگنالینگ سلولی و افزایش دسترسی به مواد مغذی، بیان ژن *IGF-2* را در بافت کبد تحریک کند (Beletskiy et al., 2021). تحقیقات اخیر حاکی از آن است که مکمل‌سازی با روی-متیونین نه تنها به بهبود رشد دام‌ها کمک می‌کند، بلکه به‌طور مستقیم بر بیان ژن *IGF-2* تأثیر مثبت دارد. این موضوع می‌تواند به بهبود وضعیت متابولیکی و سلامت کبد منجر شود و در نتیجه، عملکرد کلی دام‌ها را افزایش دهد. لازم است که در مطالعات آینده، ساز و کارهای دقیق‌تر اثرگذاری این مکمل‌ها و دوز بهینه آن‌ها بررسی شود تا بتوان به نتایج بهتری در زمینه ژنتیک اصلاح نژاد دام دست یافت (Wynn et al., 2012).

در مطالعه‌ای که محققان روی گوسفند داشتند نشان داده شد که افزودن عنصر روی به جیره غذایی می‌تواند آثار قابل توجهی بر سوخت و ساز انرژی و پروتئین داشته باشد. روی به‌عنوان یک عامل اساسی در فعالیت آنزیم‌ها و ساخت پروتئین شناخته شده است و نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های مؤثر در سوخت و ساز دارد. در این زمینه، شواهد موجود نشان می‌دهند که عنصر روی می‌تواند به تنظیم بیان *IGF-2* در بافت کبد کمک کند و در نتیجه به بهبود رشد و سلامت عمومی دام‌ها منجر شود (Deng et al., 2024). همچنین، تحقیقات دیگر نشان دادند که افزودن مکمل روی-متیونین به جیره‌های حاوی چربی‌های غیراشباع می‌تواند آثار مثبتی بر بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد داشته باشد که این آثار می‌توانند به بهبود رشد و افزایش کارآیی غذایی در بره‌های پرواری منجر شوند (Mahmoudi et al., 2023).

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مکمل نمک کلسیمی روغن کتان، بیان ژن *IGF-2* در بافت کبد و ماهیچه بره‌های نر پرواری را افزایش می‌دهد. مشخص شده است که *IGF-2* به‌عنوان یک هورمون رشد کلیدی، نقش مهمی در فرآیندهای متابولیک و رشد ژنتیکی ایفا می‌کند. این پروتئین در بافت‌های مختلف بدن تولید می‌شود و تأثیر مستقیمی بر ساخت پروتئین و سوخت و ساز چربی دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که افزودن اسیدهای چرب غیراشباع به رژیم غذایی می‌تواند باعث افزایش بیان این ژن در بافت‌های کبد و ماهیچه شود. شواهد تجربی حاکی از آن است که بیان ژن *IGF-2* به‌طور معنی‌داری در گاوهای شیری که رژیم غذایی آن‌ها حاوی اسیدهای چرب غیراشباع بوده، افزایش یافته است (Coyne et al., 2011; Coelho et al., 2022).

اشاره شده است که با وجود بیان فراوان *IGF-2* در بافت جنینی، این ماده در بافت‌های بالغ نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تحقیقات نشان داده‌اند که *IGF-2* در فرآیندهای آنابولیک و کاتابولیک بافت‌های ماهیچه‌ای و کبد نقش دارد. بنابراین، تأثیر مکمل کتان بر بیان این ژن می‌تواند به بهبود کارآیی تولید و کیفیت محصولات دامی منجر شود (Ahmad et al., 2023). مطالعات انجام شده دیگر بیان داشتند که مکمل‌سازی جیره غذایی گاوهای شیری با دانه کتان، که غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ است، آثار مثبتی بر عملکرد این گاوها دارد. همچنین، این مکمل‌ها فعالیت‌های سیستم IGF و فرآیندهای تولیدمثلی را تحت تاثر قرار می‌دهند.

در مطالعه دیگری، محققین به بررسی تأثیر اسیدهای چرب امگا-۳ بر بیان ژن *IGF-2* در گوسفند پرداختند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که افزودن روغن ماهی به رژیم غذایی گوسفندها منجر به افزایش بیان ژن *IGF-2* در بافت‌های عضلانی و کبدی می‌شود. این افزایش بیان ژن می‌تواند به بهبود کیفیت گوشت و افزایش وزن زنده کمک شایانی نماید (Ndandala et al., 2024).

نتیجه‌گیری کلی

افزودن مکمل آلی روی-متیونین و مکمل نمک کلسیمی روغن کتان به جیره بره‌های پرواری سبب افزایش بیان ژن *IGF-2* می‌شود. افزایش بیان ژن *IGF-2* در کبد و ماهیچه احتمالاً منجر به افزایش رشد و در نهایت، بهبود تولید دام خواهد شد. در نهایت، افزودن مکمل آلی روی-متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان در جیره بره‌های پرواری توصیه می‌شود.

فهرست منابع

Abareghi, F., Mohammadabadi, M., Ayatollahi Mehrjardi, A., Khezri, A., Shaban Jorjandy, D., Askari-Hesni, M., & Salemi, S. (2023). Examining of IGF2 gene expression in muscular and back fat tissues of Kermani sheep. *Breeding and Improvement of Livestock*, *3*(2), 5-17. [In Persian]

Ahmad, S. S., Chun, H. J., Ahmad, K., Shaikh, S., Lim, J. H., Ali, S., & Choi, I. (2023). The roles of growth factors and hormones in the regulation of muscle satellite cells for cultured meat production. *Journal of Animal Science and Technology*, *65*(1), 16-31. doi: 10.5187/jast.2022.e114

Beletskiy, A., Chesnokova, E., & Bal, N. (2021). Insulin-like growth factor 2 as a possible neuroprotective agent and memory enhancer—its comparative expression, processing and signaling in mammalian CNS. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1849. doi: 10.3390/ijms22041849

Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. (2022). Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions. *Foods*, *11*(15), 2276. doi: 10.3390/foods11152276

Coyne, G. S., Kenny, D. A., & Waters, S. M. (2011). Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on bovine uterine endometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. *Theriogenology*, *75*(3), 500-512. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.018

De Souza, J., & Lock, A. L. (2018). Long-term palmitic acid supplementation interacts with parity in lactating dairy cows: Production responses, nutrient digestibility, and energy partitioning. *Journal of Dairy Science, 101*(4), 3044-3056. doi: 10.3168/jds.2017-13946

Deng, K., Li, X., Liu, Z., Su, Y., Sun, X., Wei, W., & Wang, F. (2024). IGF2BP2 regulates the proliferation and migration of endometrial stromal cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Hu sheep. *Journal of Animal Science*, *102*, skae129. doi: 10.1093/jas/skae129

Gardner, S., Alzhanov, D., Knollman, P., Kuninger, D., & Rotwein, P. (2011). TGF-β inhibits muscle differentiation by blocking autocrine signaling pathways initiated by IGF-II. *Molecular Endocrinology*, *25*(1), 128-137. doi: 10.1210/me.2010-0292

Hao, K. L., Zhai, Q. C., Gu, Y., Chen, Y. Q., Wang, Y. N., Liu, R., & Hu, S. J. (2023). Disturbance of suprachiasmatic nucleus function improves cardiac repair after myocardial infarction by IGF2-mediated macrophage transition. *Acta Pharmacologica Sinica*, *44*(8), 1612-1624. doi: 10.1038/s41401-023-01059-w

Jafarpour, N., Khorvash, M., Rahmani, H.R., Pezeshki, A., & Hosseini Ghaffari, M. (2015). Dose–responses of zinc–methionine supplements on growth, blood metabolites and gastrointestinal development in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*, 668-675. doi: 10.1111/jpn.12286

Kent, L. N., Ohboshi, S., & Soares, M. J. (2012). Akt1 and insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulate placentation and fetal/postnatal development. *The International journal of Developmental Biology*, *56*(4), 255. doi: 10.1387/ijdb.113407lk

Mahmoudi, T., Nouri, S., Zarei, F., Najafabadi, Z. N., Sanei, M., Sayedsalehi, S., & Zali, M. R. (2023). Insulin-like growth factor binding protein 3 promoter variant (rs2854744) is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, *68*, e230017. doi: 10.20945/2359-4292-2023-0017

Markljung, E., Jiang, L., Jaffe, J. D., Mikkelsen, T. S., Wallerman, O., Larhammar, M., & Andersson, L. (2009). ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth. *PLoS Biology*, *7*(12), e1000256. doi: 10.1371/journal.pbio.1000256

McCarthy, M. M., Mann, S., Nydam, D. V., Overton, T. R., & McArt, J. A. A. (2015). Concentrations of nonesterified fatty acids and β-hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *Journal of Dairy Science*, *98*(9), 6284-6290. doi: 10.3168/jds.2015-9446

Ndandala, C. B., Zhou, Q., Li, Z., Guo, Y., Li, G., & Chen, H. (2024). Identification of Insulin-like Growth Factor (IGF) family genes in the Golden Pompano, Trachinotus ovatus: Molecular cloning, characterization and gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(5), 2499. doi: 10.3390/ijms25052499

Nazari, M., Salari, S., & Ghorbani, M. R. (2017). Effects of zinc supplementation and betaine substitution to methionine on hepatic betaine - homocysteine methyltransferase and lipogenic genes expression in laying hens under heat stress. *Agricultural Biotechnology Journal*, *9*(1), 95-110. [In Persian]

Nazari, M., Sallari, S., & Ghorbani, M. R. (2020). Effect of Zinc supplementation and Betaine substitution to methionine on performance and blood parameters of laying hens under heat stress. *Veterinary Research & Biological Products*, *33*(1), 61-70. [In Persian]

Oh, Y. S., & Choi, C. B. (2004). Effects of zinc on lipogenesis of bovine intramuscular adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *17*(10), 1378-1382. doi: 10.5713/ajas.2004.1378

Palmquist, D. L., & Jenkins, T. C. (2017). A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science, 100(12),* 10061-10077. doi: 10.3168/jds.2017-12924

Pavkovych, S., Vovk, S., & Kruzhel, B. (2015). Protected lipids and fatty acids in cattle feed rations. *Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica*, *14*(3), 3-4.

Pewan, S. B., Otto, J. R., Huerlimann, R., Budd, A. M., Mwangi, F. W., Edmunds, R. C., & Malau-Aduli, A. E. O. (2020). Genetics of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid metabolism and meat eating quality in Tattykeel Australian White lambs. *Genes*, *11*(5), 587. doi: 10.3390/genes11050587

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, *30*(9), e36-e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36

Salabi, F., Boujarpoor, M., Fayazi, J., Salari, S., & Nazari, M. (2011). Effects of different levels of zinc on the performance and carcass characteristics of broiler reared under heat stress condition. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *10*(10), 1332-1335. doi: 10.3923/javaa.2011.1332.1335

Salabi, F., Nazari, M., Chen, Q., Nimal, J., Tong, J., & Cao, W. (2014). Myostatin knockout using zinc-finger nucleases promotes proliferation of ovine primary satellite cells in vitro. *Journal of Biotechnology*, *192*, 268-280. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.038

Sloup, V., Jankovská, I., Nechybová, S., Peřinková, P., & Langrová, I. (2017). Zinc in the animal organism: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, *48*(1), 13-21. doi: 10.1515/sab-2017-0003

Sobeková, A., Piešová, E., Maková, Z., Szabóová, R., Sopková, D., Andrejčáková, Z., & Faixová, Z. (2023). Duration of the flaxseed supplementation affects antioxidant defense mechanisms and the oxidative stress of fattening pigs. *Veterinary Sciences*, *10*(9), 586. doi: 10.3390/vetsci10090586.

Spears, J. W. (1989). Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing heifers. *Journal of Animal Science*, *67*(3), 835-843. doi: 10.2527/jas1989.673835x

Vierboom, M. M., Engle, T. E., & Kimberling, C. V. (2003). Effects of gestational status on apparent absorption and retention of copper and zinc in mature Angus cows and Suffolk ewes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *16*(4), 515-518. doi: 10.5713/ajas.2003.515

Wang, X., Lin, L., Lan, B., Wang, Y., Du, L., Chen, X., & Wang, Y. (2020). IGF2R-initiated proton rechanneling dictates an anti-inflammatory property in macrophages. *Science Advances*, *6*(48), eabb7389. doi: 10.1126/sciadv.abb7389

Wei, C., Wu, M., Wang, C., Liu, R., Zhao, H., Yang, L., Liu, J., Wang, Y., Zhang, S., Yuan, Z., Liu, Z., Hu, S., Chu, M., Wang, X., & Du, L. (2018). Long noncoding RNA Lnc-SEMT modulates IGF2 expression by sponging miR-125b to promote sheep muscle development and growth. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *49*(2), 447-462. doi: 10.1159/000492979

White, V., Jawerbaum, A., Mazzucco, M. B., Gauster, M., Desoye, G., & Hiden, U. (2018). IGF2 stimulates fetal growth in a sex-and organ-dependent manner. *Pediatric Research*, *83*(1), 183-189. doi: 10.1038/pr.2017.221

Wilson, E. M., & Rotwein, P. (2006). Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 29962-29971. doi: 10.1074/jbc.M605445200

Wynn, P. C., & Sheehy, P. A. (2012). Minor proteins, including growth factors. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 317-335). Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4614-4714-6_11

Yang, H., Zhang, F., Sun, S., Li, H., Li, L., Xu, H., & Lyu, F. (2023). Brushite-coated Mg–Nd–Zn–Zr alloy promotes the osteogenesis of vertebral laminae through IGF2/PI3K/AKT signaling pathway. *Biomaterials Advances*, *152*, 213505. doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213505

Yi, T., Wang, T., Shi, Y., Peng, X., Tang, S., Zhong, L., & Li, Q. (2020). Long noncoding RNA 91H overexpression contributes to the growth and metastasis of HCC by epigenetically positively regulating IGF2 expression. *Liver International*, *40*(2), 456-467. doi: 10.1111/liv.14300

Younis, S., Schönke, M., Massart, J., Hjortebjerg, R., Sundström, E., Gustafson, U., & Andersson, L. (2018). The ZBED6–IGF2 axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(9), E2048-E2057. doi: 10.1073/pnas.1719278115.

Yu, Z. P., Le, G. W., & Shi, Y. H. (2005). Effect of zinc sulphate and zinc methionine on growth, plasma growth hormone concentration, growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *32*(4), 273-278. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04183.x