

# التعبير الجيني لع *igf1* النمو شبيه الأنسولين الجرذان البالغة وغير البالغة

\* حسين خضير عبيس الميالي\*\* و آلاء محمد حسون الجسيني\*\*\*

\* فرع الفلسفة والأدوية، كلية الطب البيطري، جامعة القادسية، العراق [jbr20042002@yahoo.com](mailto:jbr20042002@yahoo.com)

\*\* فسلجة الحيوان قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة القادسية، العراق [huseinal-mayali@yahoo.com](mailto:huseinal-mayali@yahoo.com)

\*\*\*مدرس علم فسلجة الحيوان، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة القادسية، العراق [alaa.alaa1115@yahoo.com](mailto:alaa.alaa1115@yahoo.com)

أجريت الدراسة الحالية بهدف تقدير مستويات تعبير لحمض النووي الرايبوزي المراسل لجين عامل النمو شبيه الأنسولين *igf1* في ذكور الجرذان خلال مرحلتين ما قبل البلوغ وبعده. أخذت نماذج خصى من ثمانية من ذكور جرذان الوستر لكل من الأعمار 25 35 45 55 و65 يوماً لغرض إجراء الدراسة الجزيئية عليها باستخدام تقانة الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمرة الكمية qRT-PCR. أظهرت نتائج زيادة تدريجية في مستوى تعبير جين *igf1* في انسجة ولغاية 45 يوماً 55 يوماً بعد البلوغ فقد كانت الزيادة أكثر معنوية بلوغ ثم انخفضت بصورة غير معنوية عند عمر 65 يوماً. يستنتج من النتائج الحالية أن لعامل النمو شبيه الأنسولين من النوع الأول دوراً مؤازراً لعملية البلوغ الجنسي في ذكور الجرذان.

الكلمات المفتاحية: عامل النمو شبيه الأنسولين من النوع *igf1*

\*

## Study of *igf1* gene expression levels in pre- and post-pubertal rat testis

Jabbar A. A. Al-Sa'aidi\*; Hussein K.O. Al-Mayali\*\*; Alaa M. H. Al-Husseini\*\*\*

\*Prof. Endocrinol. & Reprod. Physiol., College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq. [jbr20042002@yahoo.com](mailto:jbr20042002@yahoo.com)

\*\* Asst. Prof. Physiol., College of Education, Al-Qadisiya Univ., Iraq. [huseinal-mayali@yahoo.com](mailto:huseinal-mayali@yahoo.com)

\*\*\* PhD Student, Physiol., College of Science, Al-Qadisiya Univ., Iraq. [alaa.alaa1115@yahoo.com](mailto:alaa.alaa1115@yahoo.com)

## Summary

The present study has been conducted to estimate the mRNA expression level of *igf1* gene in pre-and post pubertal male rat testis. Eight testis from eight male rats in each of the following ages: 25, 35, 45, 55, and 56 days, have been obtained for molecular study using qRT-PCR. The results revealed gradual increase of testicular *igf1* expression levels with the progress of age until 45 day period of the pre-pubertal stage. In post-pubertal stage, the expression level of *igf1* showed sharp increase in 55 day period, but it showed non significant decrease in 65 day period. It can be concluded that IGF1 has an important synergistic role in sexual pubertal processes of male rats.

**Key words:** *igf1*, testis, sexual puberty.

يتحدد وجود عوامل النمو شبيهة الانسولين (IGFs) في أبسط الكائنات الحية في الخلايا العصبية في أماكن السيطرة على السلوك والتغذية وتوازن الطاقة ونمو الخلية (1) هذه العوامل قليل إلا أنها تمتلك صفات ووظائف بايولوجية واسعة حيث لا يقتصر إنتاجها على الدماغ فقط بل يشمل كل الانسولين (2) ليساهم في تنظيم العمليات الفسيولوجية (3).

شبيهة الانسولين هي هرمونات ببتيدية (Peptide hormones) 70 حامض أميني  
 الإنسولين الكبيرة (Insulin superfamily) (4). في اللبائن يُعرف شكلان رئيسيان لـ النمو شبيهة الانسولين هما عامل شبيه الأنسولين (IGF1) النمو شبيه الأنسولين (IGF2) وكلاهما عبارة عن مفردة من الببتيد المتعدد (Polypeptides) مع أوزان جزيئية تبلغ حوالي 7649Da و 7471Da (5)، يتميز التركيب الرباعي لهذه العوامل الى أربع مناطق سائدة هي A B C D وتشابه المنطقتان A B الأنسولين في حين لا تشابه C تلك الموجودة في الانسولين D فهي غير موجودة في الانسولين (6).  
 يتواجد شبيهها الانسولين من النوع الأول والثاني بتركيز عالية نسبياً في الدم الدائر وتمتلك صفات هرمونات نمو في الأنسجة، حيث أن افراز هرمون النمو (GH) من النخامية الغدية (Adenohypophysis) العاملين شبيهي الانسولين من النوع الأول والثاني بشكل رئيس في الكبد (Peripheral circulation) يحف الرئة والكلية والغدة الزعترية والطحال والقلب والعضلات والمناسل ومن ثم يزداد تركيزه تأثيراتها الصمية (Endocrine effects) خلايا الهدف (7).

هناك صنفين من الاستنساخ للحامض النووي الرايبوزي المرسل لعامل النمو شبيه الانسولين الأول (IGF-1 mRNA) كلاهما يشفر للبيبتيد الناضج نفسه. أحدهما يشفر IGF1 (Hepatic IGF1) والآخر يشفر IGF1 غير الكبدية (Non hepatic IGF1) IGF-1 mRNA الحاوي على منطقة غير مترجمة تبدأ بالاكسون 2 (5-untranslated region starting in exon-2) يُعتقد أنه يشفر الشكل الصماوي لـ IGF-1 تحت سيطرة هرمون النمو في IGF1 mRNA الحاوي على منطقة غير مترجمة تبدأ بالاكسون 1 (5-untranslated region) (starting in exon 1) فهو يوجد في معظم الانسجة غير الكبدية ويُنظَّم بواسطة عوامل أخرى إضافة الى هرمون النمو (8).  
 تزداد مستويات IGF1 بعد الولادة في أنسجة الخصى حيث Wang et al., (9) إلى أن تركيز IGF1 يرتفع في أنسجة خصى الفئران من اليوم السابع بعد الولادة إلى أن يصل الى ذروته في اليوم 24 ذ يُعد IGF1 الخصى لكونه يحور عمل انزيمات بناء الستيرويدات. يقع إنتاج IGFs في المناسل جزئياً تحت سيطرة هرمون النمو ليبيدي تأثيره (Auto and paracrine effects) حيث لوحظ أن معاملة خصى الفئران البالغة الناقصة IGF1 *in vitro* بهرمون النمو تؤدي الى زيادة مستوى IGF1 وزيادة تحرير التستوستيرون (10).  
 ذلك فقد لوحظ أن إنتاج بروتين IGF1 IGF1 mRNA في الخصية يُحفز بدرجة كبيرة بواسطة محرضات الاقناد (Gonadotropins) حيث اشارت الدراسات خارج الجسم وداخله الى أن ارتفاع مستويات كل من الهرمون المصفر (LH) الهرمون محفز الجريب (FSH) يزيد IGF1 في خلايا يدك وخلايا (11).

## حيوانات التجربة Experimental animals

تم اختيار الجرذ البيض في هذه الدراسة بوصفها نموذجاً يمثل الحيوانات اللبونة وربيت في ظروف مختبرية مناسبة، إذ بين 22 25 مئوية و 14 10 ساعات ظلام طول مدة الدراسة. وغذيت الحيوانات العليقة الغذائية المختبرية القياسية (نسبة بروتين 19% 3000 سرعة حرارية) والماء بصورة حرة *ad Libidum*. 40 جرذاً ذكراً غير ناضجاً بعمر (25) يوماً، تمت التضحية بثمانية جرذان منها في الأعمار 25 35 45 55 يوماً، بعد تخديرها بحقن مزيج من (0.3) مل كيتامين و (0.1) مل زايلازين لكل كغم من وزن الجسم في البريتون، ثم استؤصلت خصاها لغرض إجراء الدراسة الجزيئية المتمثل بفحص الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمره للاستنساخ العكسي الكمي qRT-OCR لتقدير مستوى تعبير جين عامل النمو شبيه الانسولين من النوع الأول IGF1.

## التحليل الجزيئي Molecular analysis

عدد قياس الوقت الحقيقي لـ :  
Bioneer بكوريا الجنوبية باستخدام Primers التالية والخاصة بـ IGF1 GAPDH. الكمي المجهزة من شركة

Primer	Sequence	Product size	ACCESSION No.
IGF1	F ACAGAAAATGCCACGTCACC	74bp	NM_001082477.2
	R ATTTGGCAGGTGTTCCGATG		
GAPDH	F TGCCACTCAGAAGACTGTGG	85bp	NM_017008
	R GGATGCAGGGATGATGTTCT		

فحص تفاعل سلسلة البلمره للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (RT-qPCR): تم قياس مستوى

(mRNA) الذي يستنسخ من الخصى للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجين *igf1* استخدام جين الـ *GapDH* gene كجين محافظ قياسي Housekeeping gene لحساب التعبير الجيني. وتم إجراء هذا الفحص حسب الخطوات الآتية:

1- النوية Total RNA extraction : الرابيوزي الكلي Total RNA

الترايذول (Trizol kit) المجهز من قبل شركة بايونير الكورية وحسب تعليمات الشركة المصنعة

استئصالها بـ النتروجين السائل ثم وضعت في أنابيب أبندورف epindorf tube 0.5 DEPC

جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين بعدها تم سحب الدبك وبقاء عينات الخصى فقط بعدها أضيف

0.5 Trizol ثم سحقت عينات الأنسجة بـ micropistells وبعد هرسها لها جيداً الأنابيب

Trizol. بعدها تم vortex (200) مايكروولتر ورجت الأنابيب بجهاز vortex 5

بعدها الأنابيب جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة نقل الرائق في أبندورف جديد (500) مايكروولتر من

الأيزوبروبانول isopropanol ورجت الأنابيب بجهاز vortex 10 بعدها جهاز الطرد

15 دقيقة وبسرعة 15000 دورة/دقيقة بعدها تم سحب الطافي وبقاء المترسب pellet فقط وأضيف عليه ملتر واحد من

الكحول الأثيلي (80%) بجهاز vortex الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه 12000 دوره/دقيقه لمدة 5

pellet سب جيداً بقلب الأبندورف على ورق نشاف وتركه بدرجه حراره الغرفة لمدة 10

بعدها تم إضافة 50 مايكروولتر من الدبك لا نقلت الأنابيب الى حمام 70 10 .

2- قياس كمية ونقاوة الحمض النووي الرابيوزي Assessy RNA yield and qualilty: تم الكشف عن الحمض النووي RNA

المستخلص من العينات تحديد تركيز الحمض النووي RNA (ng/ml) باستخدام جهاز UV/VIS Spectrophotometer Nanodrop

(OPTIZEN POP. MECASYS Korea) وقياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260 280

. توثيق وجود الحمض النووي RNA باستخدام الترحيل الكهربائي Electrophoresis.

### 3- المعاملة بأنزيم (DNase1) **DNase inactivation Treatment** RNA

DNase I treatment تخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم طبق للطريقة التي وصفتها تعليمات شركة Promega company, USA.

### 4- تصنيع الحامض النووي الريبوزي منقوص الأوكسجين **cDNA synthesis** : طريقة تصنيع الحمض النووي

الذي أوكسي ريبوزي المكمل cDNA A من عينات الحمض النووي RNA وذلك لاستخدامه في تضخيم جينات تعبير جين *igf1* والجين المحافظ *GAPDH* Real-Time PCR، حيث تم استخدام EdAccupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من شركة بايونير الكورية. تم اجراء هذا ال طبقا لتعليمات الشركة حيث تم توحيد تراكيز جميع عينات RNA DNase لنفس التركيز المقاس ب DEPC ثم حولت جميع عينات RNA cDNA بواسطة تحضير تفاعل PreMix reaction للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي.

### 5- **Quantitative Real-Time PCR (qPCR)** : qRT-PCR لعينات cDNA Accupower

Green Star Real-Time PCR kit وجهاز Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block المجهزين من شركة بايونير الكورية، و يعتمد هذا الفحص على صبغة سايبير الخضراء Syber Green

qRT-PCR PreMix والذي صمم لتضخيم ال PCR cDNA لجين *igf1* primer وجين *GapDH* كجين محافظ (قياسي) لتقدير كمية عدد النسخ الناتجة من ال PCR مقارنة بعدد النسخ للمنحني القياسي للجينوم الناتج من qPCR. السايبير الأخضر الموجودة في الكت لجين المستهدف والجين المحافظ بعدها تم تسجيل الاشارات الومضية (Fluorescent signals) جهاز الدوار الحراري (Thermocycler Real Time PCR). ينشأ المنحني القياسي الجينومي من جين *GapDH* *Rattus norvegicus* (27.9Mbp) والذي تم الحصول عليه م بنك الجين NCBI-Gene Bank بما يقارب ( $1 \times 10^7$ ) كمنحني قياسي لـ Genomic DNA.

### 6- تحليل بيانات **data analysis of Real-Time PCR** : تحليل البيانات الناتج

الحقيقي الكمي طريقة Livak and Schmittgen (13).

### التحليل الإحصائي **Statistical Analysis**

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي بهدف معرفة معنوية الفروق بين معدلات المعايير المدروسة وأجريت

تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA1). وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال (5%) .

جميع التحليلات الإحصائية باستخدام برنامج Genstat discovery edition (VSN international)

المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق م LSD وعلى مستوى احتمالية 0.05.

## Result

**تركيز ونقاوة ال RNA** : أظهرت تراكيز الحامض النووي الريبوزي الكلي Total RNA

تراكيز عالية وبكميات كافية للبدء بفحص تفاعل . كما أشارت نتائج الدراسة الى أن النسبة بين الكثافة

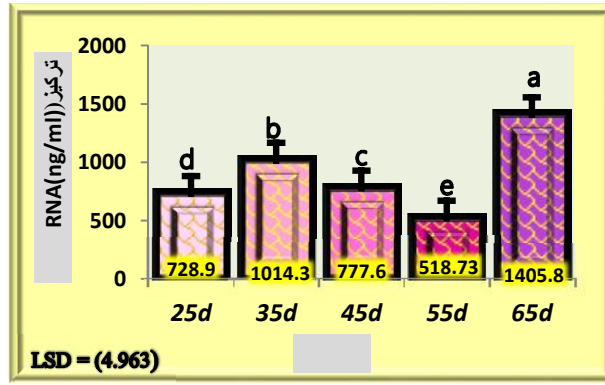
البصرية optical density عند الطولين الموجيين 260 280 نانومتر كانت تتراوح ما بين 1.8 2.1 التي تشير الى

RNA عينات الأنسجة التي أشتملت عليها الدراسة. مبينة في (1) زيادة معنوية ( $p < 0.05$ ) تركيز

RNA (ng/μl) 35 يوماً مقارنة بـ 25 يوماً ثم انخفضت هذه

الزيادة تدريجياً عند وصول الحيوان الى مرحلة البلوغ عند العمرين 45 55 يوماً وكان الانخفاض أكثر معنوية 55 يوماً

مقارنة بالأعمار الأخرى ثم عادت للزيادة مرة 65 ي لتسجل أعلى مستوى بين الأعمار.



(1) يبين تركيز RNA

• الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية ( $P < 0.05$ ) بين المجاميع العمرية.

تفاعل سلسلة البلمرة للأستنساح العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (qPCR): تحليل بيانات فحص تفاعل qPCR على صبغة سايبير الخضراء SYBR®green قسمين هما:

1. تقدير كفاءة البادئ Primer efficiency estimation احتساب نتائج بيانات عدد دورات العتبة threshold

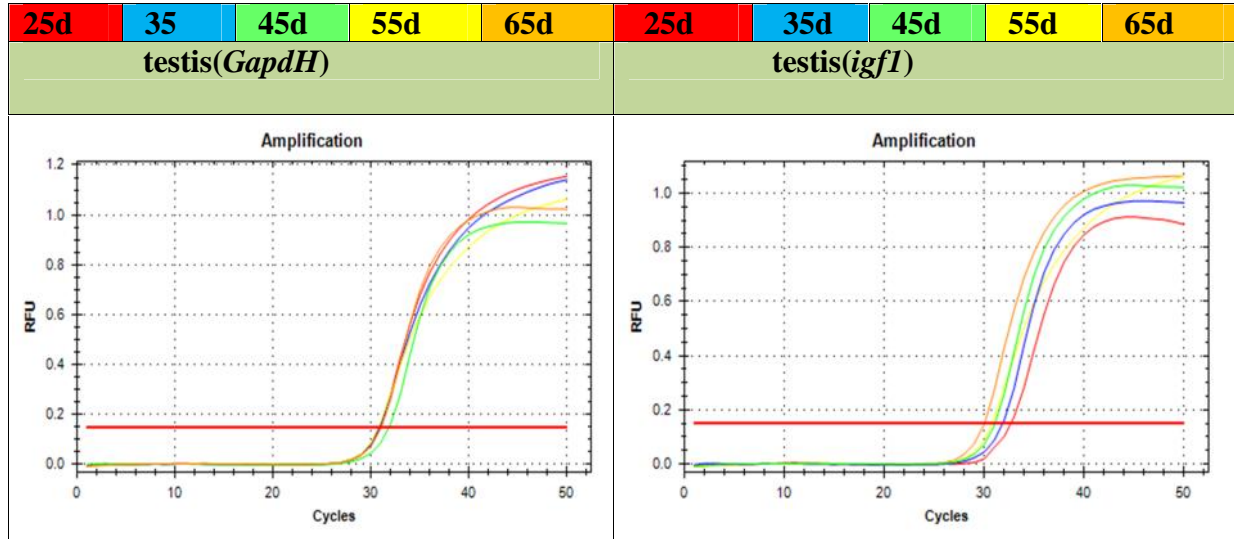
(Ct) cycle من مسار التضخيم Amplification plot في جهاز فحص تفاعل qPCR ( )

Exponential phase (الومضية) لصبغة سايبير الخضراء المتحددة ببادئ الجين الـ

أشتملت عليه الدرا (igf1) المتفاعل مع الحامض النووي منقوص الأوكسجين المتمم (cDNA) mRNA

Linear regression ومن مسار تضخيم دورة العتبة

بالاعتماد على نقاط البيانات ومنه ا كفاءة البادئ من الميل slope (2- )



(2): منحنيات التغير التضاعفي لجينات GAPDH igf1

2. الكمية النسبية لتعبير الجينات المستهدفة: تم احتساب نسبة تعبير الجين الهدف في الدراسة الحالية (igf1)

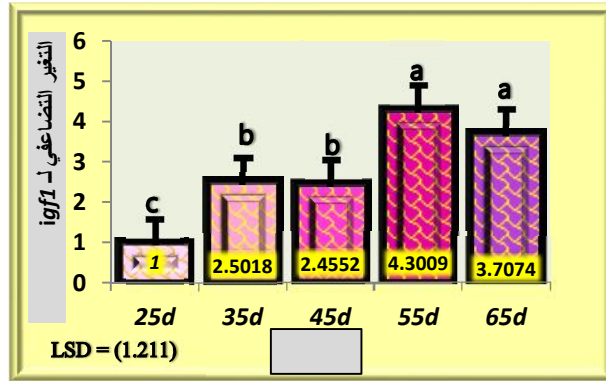
( $2^{-Ct}$ ) وذلك بتصحيح تعبير الجين الهدف مع تعبير الجين المحافظ كجين تصحيح. وأعتبر

تعبير الجين بعمر 25 يوماً للسيطرة أو قياسي تصحيح عدد دورات العتبة للجين الهدف

بواسطة جين التصحيح لكل الأ تصحيح قيمة Ct 35 45 55 65 يوماً الى قيمة Ct للعينة

القياسية (25 يوماً) بعدها تم حساب نسبة التعبير والتي عبر عنها بالتغيير التضاعفي Fold changes. ظهرت

نتائج المبينة في (3) تعبير جين *igf1* لأنسجة الخصى يزداد تقدم العمر، حيث مستوى تعبير جين معنوياً ( $p < 0.05$ ) ليصل الى حوالي ضعفين ونصف عند العمرين 35 45 يوماً بصورة غير معنوية ( $p > 0.05$ ) الزيادة أقصاها عند العمر 55 يوماً (4.301) بصورة غير معنوية ( $p > 0.05$ ) 65 يوماً (3.7073).



(3): التغير التضاعفي لجين *igf1*  
 الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية ( $P < 0.05$ ) بين المجموعات العمرية

#### تركيز RNA

سجلت نتائج الدراسة الحالية زيادة مستويات RNA الكلي لأنسجة الخصى خلال المراحل العمرية (fluctuated) قد حصلت زيادة 25 يوماً إذ ت بعدها تدريجياً عند العمرين 45 55 يوماً 65 يوماً. بناء البروتين والحالة التكاثرية داخل النبيب المنوي (Seminiferous tubules) في الأنسجة البينية للخصية وبشكل خاص خلايا يدك وهذا يعكس وظيفة الخصية في عملية تكوين النطف وتصنيع الستيرويدات، حيث يُعد IGF1 عوامل التي تلعب دوراً هاماً قبل البلوغ وبعده كما أنه يسيطر على أستتباب homeostasis الأنسجة خلال الحياة من خلال تنظيمه تقسام الخلايا وتمايزها فضلاً عن Apoptosis للخلايا. في خصى اللبائن يعمل IGF1 IGF2 على تحفيز تكاثر الخلايا الجرثومية وتمايزها إما بشكل مباشر أو غير مباشر كما يؤثران في بناء الستيرويدات وإفراز بروتينات خلايا سرتولي في الجزء النبيب. إذ يؤثر العامل IGF1 وتمايز خلايا يدك المنشأة (PLC) والغير ناضجة (ILC) كما يزداد مستوى التعبير الجيني لأنزيمات بناء الستيرويدات كذلك مستقبلات الأندروجين والأستروجين وIGF1R (9). وما يؤكد دور IGF1 في هذه المرحلة هو ما توصل اليه Wang et al. (14) حيث لاحظ عدد خلايا يدك البالغة في خصى الفئران الفاقدة لجين *igf1* 35 يوماً بعد الولادة. الزيادة RNA (35) يوماً مستوى النشاط العالي لأنسجة الخصى قبل دخول الحيوان بمرحلة البلوغ من خلال تهيئة أنزيمات تصنيع الستيرويدات وتهيئة مستقبلات الهرمونات التكاثرية التي تزداد عند البلوغ، كما لوحظ عودة الزيادة مرة أخرى بعد البلوغ 65 يوماً حيث كتمل النضج الوظيفي لأنسجة الخصى بدليل اكتمال تمايز خلايا يدك البالغة (9).

الكمية النسبية لتعبير الجين المستهدف (*igf1*)

مع ما توصل اليه Moore et al.

تعبير جين *igf1*

IGF1 هذه الزيادة ترافقها زيادة

IGF1mRNA

(15) الذي

ذي يعود إلى تأثير المحور المحرض للنمو الجسمي في بناء وإفراز IGF1 من أنسجة الخصى حيث تنتشر مستقبلات

GHR هرمون النمو في أنسجة الخصى التي قد تتحفز بواسطة زيادة الإفراز النبضي لهرمون النمو عند البلوغ في خلايا يدك المنشأة وغير الناضجة والبالغة في الجرذان (16)، كما أشير الى GHR في عدّة انسجة في الجرذان ومنها أنسجة الخصى التي يزداد عددها مع التقدم بالعمر (17).

قد تعود زيادة مستويات تعبير جين *igf1* زيادة الهرمونات المحرّضة للأقناده (FSH LH) البلوغ والناتج من تنشيط محور HPG وهذا ما أكده Cailleau *et al.* (18) حيث لاحظ ان معاملة خلايا سرتولي بهرمون FSH ومعاملة خلايا يدك بهرمون LH ينتج عنه زيادة تعبير IGF1 mRNA . من جهة أخرى قد تؤثر زيادة مستويات تعبير الجين *igf1 igf2* في أنسجة الخصى على زيادة تعبير جين *insl3* (9) حيث توصل الى أن غياب IGF1 في السائل البيني للخصية يؤدّي إلى انخفاض مستوى INSL3mRNA نتيجة لعدم اكتمال التمايز التام لخلايا ليدك والتي تعتمد على نقل إشارة IGF1 حيث يكون LH تأثيراً في تحفيز خلايا يدك (14). كما يمكن أن يؤثر IGF1 عن طريق تأثيره في تمايز خلايا لايدك وتحفيز زيادة تنظيم جينات و بروتينات التي تحفز بناء الستيرويدات ومن ضمنها عامل استتساخ SF-1 ينشط جين *insl3* (19) يمكن أن يعمل بصورة غير مباشرة عن طريق تأثيره في خلايا سرتولي حيث يتوسط عمل FSH في زيادة افراز خلايا سرتولي للبروتينات وعوامل النمو والسايوتوكاينات التي تحفز تكاثر خلايا لايدك وتمايزها (20).

1. **Kenyon, C.** (2001). A conserved regulatory system for aging. *Cell*, 105: 165–168.
2. **Porte, D.Jr.; Baskin, D.G.; and Schwartz, M.W.** (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from celegans to humans. *Diabet.*, 54: 1264-1276.
3. **Holzenberger, M.; Dupont, J.; Ducos, B.; Leneuve, P.; Geloan, A.; Even, P.C.; Cervera, P.; and Le Bouc, Y.** (2003). IGF-1 receptor regulate slifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nat.*, 421: 182-187.
4. **Spicer, L.J.; Voge, J.L.; and Allen, D.T.** (2004). Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells. *Mol. Cell. Endocr.*, 227: 1–7.
5. **Rinderknecht, E.; and Humbel, R.E.** (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, 253: 2769-2776.
6. **Le Roith, D.; Bondy, C.; Yakar, S.; and Liu, J.L.** (2001). The somatomedin hypothesis. *Endocr. Rev.*, 22: 53-74.
7. **Firth, S.M.; and Baxter, R.C.** (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.*, 23: 824-854.
8. **Le Roith, D.; and Roberts, C.T.Jr.** (1991). Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine *versus* local action? *Mol. Cell. Endocr.*, 77: 57-61.

9. **Wang, G.**; O'shaughnessy, P.J.; Chubb, C.; Robaire, B.; and Hardy, M.P. (2003). Effects of Insulin-Like Growth Factor I on Steroidogenesis. *Endocr.*, 144: 5058–5064.
10. **Chandrashekar, V.**; and Bartke, A. (1993). Induction of endogenous insulin-like growth factor-I secretion alters the hypothalamic-pituitary-testicular function in growth hormone-deficient adult dwarf mice. *Biol. Reprod.*, 48: 544-551.
11. **Rockville, P.**; and Bethesda, M.D. (1994). IGFs and testicular function. Secretion and action of IGF-1on leydig cells. *Contraception & Fertil Sex*, 22(9): 551-586.
12. **Cheon, M.**; Park, D.; Kim, K.; Park, S.D.& Ryu, K. (1999). Homologous upregulation of GnRH receptor mRNA by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. *Endocrine*, 11: 49–55.
13. **Livak, K.J.**; and Schmittgen, T.D. (2001). Analsis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-410.
14. **Wang, G.**; and Hardy, M.P. (2003). Development of leydig cells in the insulin like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol. Reprod.*, 70(3): 632–639.
15. **Moore, A.**; and Morris, I.D. (1993). The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J. Endocrinol.*, 138: 107-114.
16. **Bartke, A.** (2003). Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinol.*, 78: 210–216.
17. **Carlsson, B.**; Billig, H.; Rymo, L.; and Isaksson, O.G.P. (1990). Expression of the growth hormone binding protein messenger RNA in the liver and extrahepatic tissues in the rat: co-expression with the growth hormone receptor. *Mol. Cell Endocrinol.*, 73: 1-6.
18. **Cailleau, J.**; Vermeire, S. and Verhoeven, G. (1990). Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, 69: 79-89.
19. **Hu, G.X.L.**; Chen, G.R.; Chen, B.B.; Lian, Q.Q.; Hardy, D.O.; Zirkin, B.R.; and Ge, R.S. (2010). Deletion of the IGF-1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development. *J. Androl.*, 31(4): 379-387.
20. **Ge, R.S.S.**; Li, X.; and Hardy, M.P. (1996). Pubertal development of Leydig Cells, in: The Leydig Cell, A.H.H. Payne, M.P.; Russell, L.D., Editor, *Cache River Press: Vienna, IL*.