Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال یازدهم ● شماره ۲ ● صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۳ ● تابستان ۱۳۹۲

القاء ژن LAR (Leukocyte common antigen-related) در سطح mRNA و پروتئین توسط مشتق پالمیتات (سرامید) در رده سلول عضلانی C2C12

*ستار گرگانی فیروزجایی [۱]، اکرم نژادی [۲]، محمد سلیمانی [۳]، رادینا اشتیاقی [۴]

تاریخ اعلام وصول: ۹۱/۱۲/۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۲/۲/۴

چکیده

سابقه و هدف: بیماری دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری متابولیکی ناشی از مقاومت به انسولین در بافت‌های چربی، کبد و عضله می‌باشد. عضله مهم‌ترین بافت در مقاومت به انسولین بوده که ۸۰-۷۰ درصد برداشت گلوکز وابسته به انسولین در این بافت رخ می‌دهد.LAR عضو مهم خانواده تیروزین فسفاتازها بوده که در سیگنالینگ انسولین، از طریق دفسفریلاسیون رسپتور انسولین و سوبستراهای آن نقش دارد. مطالعات بیانگر افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط مقاومت به انسولین، چاقی و دیابت می‌باشد. جهت کمک به شناخت مکانیسم مولکولی القا مقاومت به انسولین توسط اسید چرب و متابولیت‌های آن، تاثیر دو غلظت سرامید را بر بیان LAR در سطح mRNA و پروتئین مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی سلول‌های C۲C۱۲ پس از کشت بوسیله سرم اسب ۲٪ به سلول‌های میوتیوب تمایز داده شدند و توسط غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار سرامید تیمار شدند. RNA سلول‌ها استخراج و cDNA سنتز گردید، میزان بیان ژن LAR با روش Real-Time PCR و مقدار پروتئین با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: غلظت ۵۰ mM سرامید در سطح mRNA و پروتئین در مقایسه با کنترل سبب افزایش بیان ژن LAR نشد، اما غلظت ۱۰۰ mM سرامید در مقایسه با کنترل بطور معنی‌دار سبب افزایش بیان ژن LAR در سطح mRNA و پروتئین شد (P< ۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه شواهدی را فراهم آورده که سرامید در غلظت پاتولوژیک (۱۰۰ mM) سبب القا LAR می‌گردد. نتایج این مطالعه در تایید نتایج مطالعات متعدد انسانی و حیوانی بیانگر افزایش فعالیت LAR در عضله افراد چاق، مقاوم به انسولین و دیابتی نوع ۲ می‌باشد.

کلمات کلیدی: چاقی، مقاومت به انسولین سرامید

مقدمه

چاقی یکی از ریسک فاکتورهای بسیار مهم بیماری دیابت نوع دو، فشار خون، بیماری عروق کرونر قلب و... می‌باشد، با توجه به شیوه زندگی کم تحرک و رژیم غذایی پرکالری، شیوع چاقی بطور پیش رونده در جوامع بشری رو به پیشرفت می‌باشد. به گونه‌ای که دو سوم جمعیت آمریکا دارای اضافه وزن و ۳۰٪ آنها چاق می‌باشند (۱). یکی از مشکلات چاقی ایجاد و گسترش مقاومت به انسولین در بافت‌های هدف انسولین از جمله عضله است. دو مکانیسم برای توجیه مقاومت به انسولین در افراد چاق مطرح می‌باشد: ۱- با افزایش مواد غذایی سلولها یا بافت‌ها بدنبال افزایش اکسیداسیون یا

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی
تلفن: ۸۵۹۵۳۵۳۵ آدرس الکترونیک: gorgani59@gmail.com
۲- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
۳- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات بیولوژیک تسنیم
۴- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، گروه غدد و متابولیسم

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

ذخیره سازی، متابولیت‌هایی در این بافت‌ها تولید می‌شوند که باعث مهار عملکرد انسولین می‌شوند. ۲- افزایش بافت چربی سبب القا التهاب مزمن شده که افزایش ترشح سایتوکاین‌های التهابی توسط بافت چربی یا ماکروفاژهای مقیم بافت چربی را موجب می‌شود. این واسطه‌های التهابی بطور مستقیم باعث اختلال در سیگنالینگ انسولین می‌شوند (۲). افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد گردش خون یکی از یافته‌های شایع بالینی در چاقی است. اسیدهای چرب اشباع بلند زنجیره مثل پالمیتات که بخشی از اسیدهای چرب پلاسما را تشکیل می‌دهند، پیش ساز سنتز اسفنگولیپیدها (سرامید) هستند. اسفنگولیپیدها معروف به لیپیدهای فعال از نظر بیولوژیک (bioactive lipids) هستند و علاوه بر نقش‌های بیولوژیک متعدد، بطور پاتولوژیک سبب اختلال در سیگنالینگ انسولین می‌شوند و بعنوان یکی از عوامل کلیدی در ایجاد مقاومت به انسولین ناشی از چاقی مطرح می‌باشند (۳). سرامید تعدادی از کینازهای فعال شونده با انسولین شامل پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز C را مهار می‌کند. اخیراً مشخص شده است که سرامید باعث فعالیت پروتئین کیناز غیر معمول ζ (زتا) نیز می‌گردد (۴). هر چند که مکانیسم‌های متعددی جهت بررسی ارتباط مقاومت به انسولین و افزایش غلظت پلاسمایی سرامید مطرح شده است، اما مکانیسم دقیق آن هنوز مشخص نشده است. یکی از مکانیسم‌های مطرح، اثر سرامید بر فعالیت آنزیمهای خانواده پروتئین تیروزین فسفاتازها می‌باشد (۵). پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPs) خانواده بزرگ آنزیمی هستند که نقش تنظیمی مثبت و منفی در انواع سلولها و بافتها به عهده دارند (۶). تغییر فعالیت PTPها مانند پروتئین تیروزین کینازها (PTKs)، در پاتوژنز بیماریهای انسان نقش دارد. این خانواده شامل تقریبا ۱۱۲ آنزیم است که مهمترین آنها PTP۱B و LAR می‌باشند (۷). (LAR): Leukocyte common antigen-related protein این ژن به دلیل اینکه اولین بار با استفاده از پروبهای cDNA آنتی ژن عمومی لوکوسیت (Leukocyte common antigen) یا CD۴۵شناسایی شده به این نام مشهور شده است. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده (۷) به نظر می‌رسد که باید ارتباطی بین افزایش سرامید و افزایش فسفاتازها در بیماران دیابتی وجود داشته باشد. همچنین علت افزایش بیان LAR در بافتهای عضله، چربی وکبد افراد مقاوم به انسولین چاق و دیابتی ناشناخته است. با توجه به مقادیر افزایش یافته سرامید در پلاسمای افراد مقاوم به انسولین، این فاکتور می‌تواند بطور بالقوه یک عامل اساسی در القای بیان ژن LAR باشد که تحقیق در این خصوص موضوع این مطالعه بوده است. تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با نقش سرامید در القای بیان ژن LAR در سلولهای ماهیچه انجام نشده است. شناسایی نقش فسفاتازها بویژه LAR در مقاومت به انسولین القا شده توسط سرامید به عنوان یک فاکتور مهم در پاتوژنز بیماریهای قلبی عروقی، دیابت، چاقی و سندرم متابولیک، علاوه بر کمک به شناسایی علت مقاومت به انسولین، می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی بالقوه، بویژه در دیس‌لیپیدمی مطرح باشد. در این مطالعه با استفاده از رده سلولی عضله موشی (C۲C۱۲)، اثر غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار سرامید بر میزان mRNA و پروتئین LAR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌های C۲C۱۲ که از انستیتو پاستور خریداری و در محیط DMEM کشت داده شدند. این محیط کشت در هر لیتر حاوی ۹/۹۹ گرم DMEM، ۳/۷ گرم بیکربنات سدیم، ۳/۵۷ گرم HEPES و ۰/۶ گرم L-گلوتامین می‌باشد که pH آن ۷/۴ می‌باشد. همچنین به محیط کشت FBS اضافه می‌گردد تا فاکتورهای رشد مورد نیاز سلول تامین گردد. استرپتومایسین و پنی‌سیلین نیز بعنوان آنتی‌بیوتیک به محیط اضافه می‌گردد. سلول‌ها در آتمسفر مرطوب دارای ۵٪ CO_2 در دمای ۳۷ ºC نگهداری شدند.

ابتدا سلولهای C۲C۱۲ (میوبلاست‌ها) باید به میوتیوب تبدیل شوند. بدین منظور ابتدا سلولهای میوبلاست به تعداد ۱۵۰۰۰۰ در پلیت ۶خانه کشت داده شد و پس از گذشت یک روز که حدود ۶۰٪ چاهک توسط سلول پر شده، محیط معمول با محیط تمایز جایگزین گردید. محیط تمایز حاوی DMEM به همراه سرم اسب ۲٪ می‌باشد. تمایز کامل سلول‌ها با تعویض روزانه محیط تمایز به مدت ۴ روز انجام گرفت.

بعد از ایجاد میوتیوب، این سلولها در مجاورت غلظتهای ۵۰ (تقریبا غلظت فیزیولوژیک) و ۱۰۰ (تقریبا غلظت پاتولوژیک) میلی مولار سرامید به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. ابتدا مقدار مورد نیاز سرامید از استوک برداشته و به محیط DMEM حاوی ۱٪ وزنی/حجمی آلبومین اضافه شد. سلول‌های کنترل در این مطالعه با محیط

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

دارای ۰/۰۱٪ DMSO تیمار شدند.

از سلول‌های تیمار شده با اسید چرب توسط کیت RNAeasy ساخت شرکت کیاژن، RNA تام سلولی استخراج شد. کیفیت مطلوب RNA توسط الکتروفورز و کمیت آن بوسیله دستگاه نانودراپ مورد تایید قرار گرفت. برای سنتز cDNA و انجام Real-time PCR ، از کیت شرکت تاکارا استفاده شد. شرایط و چگونگی انجام واکنش مطابق با پروتکل کیت تاکارا بوده و نتایج تغییر بیان ژن به روش Delta Delta Ct آنالیز گردید (۸).

جهت بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سرامید بر میزان بیان پروتئین LAR از روش وسترن بلات استفاده گردید. مقدار ۳۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده از سلولها، SDS-PAGE شد سپس باندهای تفکیک شده به کمک جریان الکتریسیته به غشای PVDF منتقل گردید. بعد از بلاکینگ با آلبومین گاوی توسط آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی بر علیه پروتئین LAR (رقت ۱/۱۰۰۰) و بتا اکتین (رقت ۱/۵۰۰۰) از کمپانی Cell Signaling، مورد شناسایی قرار گرفت و کمپلکس حاصل توسط آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP (رقت ۱/۲۰۰۰۰) شناسایی شد. با استفاده از سیستم Enhanced Chemi Luminance (ECL)، محل باند پروتئین مورد نظر روی فیلم رادیولوژی حساس مشخص شد. با استفاده از نرم افزار densitometry محصول شرکت Bio-Rad دانسیته باندهای مختلف پروتئین اندازه‌گیری شده و گزارشات بر اساس نسبت دانسیته باند پروتئین مورد نظر به پروتئین بتا اکتین ارائه شد. (۹).

تمام نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شدند. تفاوت میان گروه‌ها توسط تست One-way ANOVA (درجه آزادی: ۲ و F: ۴/۶) و Tukey multiple comparison تعیین گردید و سطح معنی‌دار بودن در P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

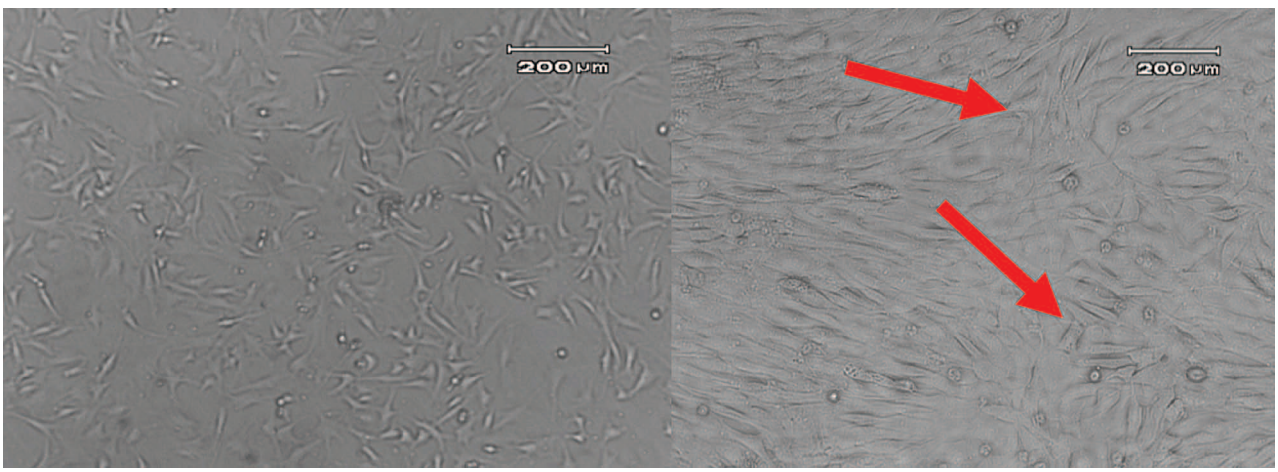
یافته‌ها

سلولهای میوبلاست (C۲C۱۲) در محیط DMEM کشت داده شدند. در روز دوم هنگامی که حدود ۶۰٪ سطح پلیت حاوی سلول شد جهت تمایز به محیط کشت سلولها بجای FBS از سرم اسب ۲٪ استفاده شد. تشکیل شبکه‌های در هم تنیده بیانگر تمایز و تشکیل میوتیوب می‌باشد (شکل ۱).

تیمار با سرامید در غلظت ۵۰ mM که تقریبا برابر با غلظت فیزیولوژیک سرامید در بدن می‌باشد منجر به افزایش معنی‌دار در بیان mRNA ژن LAR نسبت به گروه کنترل (که تنها BSA و DMSO دریافت کرده بودند) نگردید. در حالیکه غلظت ۱۰۰ mM سرامید که تقریبا برابر غلظت پاتولوژیک سرامید در هیپرلیپدمی و دیابت می‌باشد، باعث القای معنی‌دار LAR- mRNA در مقایسه با کنترل گردید. (p<۰/۰۵) (شکل ۲).

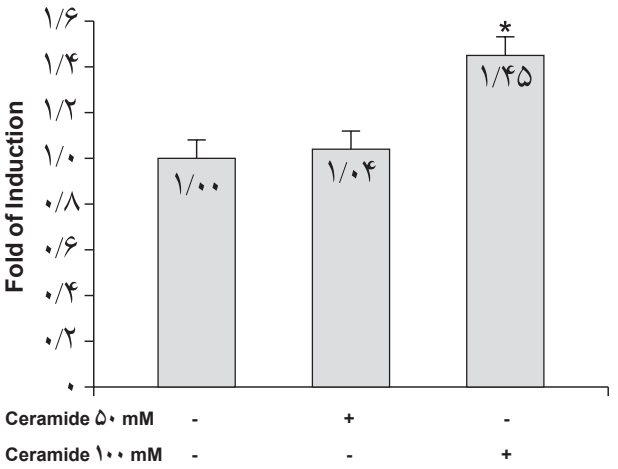
بحث و نتیجه‌گیری

دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری متابولیک، یکی از بزرگترین مشکلات بهداشتی جوامع مختلف می‌باشد و با توجه به سیر پیشرفت این بیماری در جهان و نقش آن بعنوان عامل زمینه‌ای در ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی، پرفشاری خون، عوارض کلیوی، عصبی و چشمی بسیاری از گروههای تحقیقاتی در کشورهای مختلف به مطالعه آن پرداخته‌اند. مقاومت به انسولین بعنوان هسته مرکزی

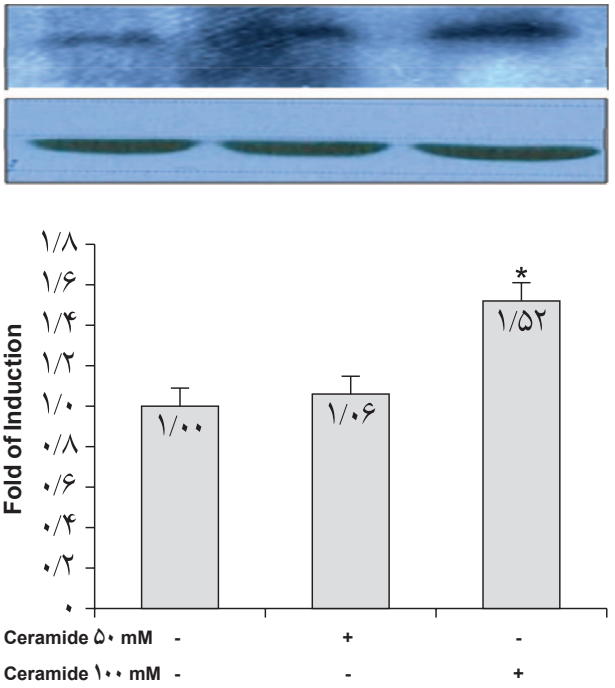


شکل ۱- (الف) میوتیوب (سلولهای C۲C۱۲ تمایز یافته) (ب) میوبلاست (سلولهای C۲C۱۲ تمایز نیافته)

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018



شکل ۲- اثر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰میلی مولار سرامید بر بیان ژن LAR در سلول‌های C۲C۱۲. میزان بیان mRNA توسط روش Delta Delta CT آنالیز شد. غلظت ۵۰ mM سرامید دارای اثر معنی‌دار نبوده اما غلظت ۱۰۰mM بطور معنی‌دار باعث القا ژن LAR گردید. P < ۰/۰۵* سرامید =Cer



شکل ۳- آنالیز وسترن بلات. غلظت ۱۰۰mM سرامید دارای افزایش معنی‌دار نسبت به کنترل در سطح پروتئین LAR بوده و با نتایج mRNA همخوانی دارد. اما غلظت ۵۰ mM افزایش معنی‌دار در سطح پروتئین LAR نداشته است. P < ۰/۰۱* سرامید =Cer

بیماری دیابت نوع ۲ مطرح می‌باشد. بعلت پیچیدگی و نقش عوامل متعدد، مکانیسم سلولی و مولکولی مقاومت به انسولین شناخته نشده است. بنظر می‌رسد چاقی ناشی از شیوه زندگی و تغذیه نامناسب بعنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده مقاومت به انسولین باشد. مطالعات زیادی جهت شناسایی ارتباط بین چاقی و مقاومت به انسولین انجام شده و مکانیسم‌های مختلفی نیز در این راستا مطرح شده‌است. افزایش اسیدهای چرب (FFA) پلاسما که یکی از تظاهرات بالینی چاقی است، بعنوان یکی از علل مقاومت به انسولین مطرح شده است. اگر چه ارتباط بین اسیدچرب و مقاومت به انسولین از یک دهه قبل مطرح شده، با این حال مکانیسم دقیق اثر اسیدهای چرب بر مقاومت به انسولین تا کنون بطور کامل شناخته نشده است (۱۰). مطالعات نشان داده است که افزایش غلظت اسیدچرب پلاسما باعث مهار فعال شدن سوبسترای گیرنده انسولین (IRS۱) و PI۳K می‌شود. علاوه بر این فسفریله شدن تیروزین گیرنده انسولین کاهش یافته در حالیکه فسفریله شدن دیگر عناصر مسیر سیگنالینگ انسولین از قبیل پروتئین کیناز B بنظر طبیعی می‌باشد. افزایش اسیدچرب عضله منجر به افزایش دو متابولیت مهم آن یعنی سرامید و دی آسیل گلیسرول می‌شود. دی آسیل گلیسرول سبب انتقال پروتئین کیناز C (PKC) به غشاء پلاسمایی می‌گردد. افزایش PKC منجر به فعال شدن NF-KB (Nuclear factor- kappa B) می‌شود که نهایتا منجر به فسفریله شدن جایگاه‌های سرین و ترئونین می‌شود که این مساله منجر به غیر فعال شدن گیرنده انسولین و مسدود شدن مسیر سیگنالینگ انسولین می‌گردد. پیامد این قضیه غیرفعال شدن PI۳K و عدم انتقال GLUT۴ به غشاء پلاسمایی می‌باشد. شواهد دیگر نیز حاکیست که عوامل و مولکولهای دیگری نیز در پروسه القای مقاومت به انسولین توسط اسیدهای چرب در بافت عضله نقش دارند. از جمله آنها متابولیت دیگر پالمیتات یعنی سرامید مطرح می‌باشد. از طرف دیگر نقش آنزیمهای پروتئین تیروزین فسفاتازها در مطالعات متعددی نشان داده شده است (۱۱-۱۴). در این مطالعه اثر سرامید بر یکی از این فسفاتازها یعنی LAR مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPs) خانواده بزرگ آنزیمی هستند که نقش تنظیمی مثبت و منفی انواع مسیرهای سیگنالینگ را در انواع سلولها و بافتها به عهده دارند (۱۴-۱۶). تا کنون نقش چندین فسفاتاز این خانواده در مقاومت به انسولین مورد ارزیابی قرار گرفته است که از جمله می‌توان به PTP۱B، SHIP۲، PTEN و LAR اشاره کرد. PTP۱B مهمترین و شناخته شده‌ترین عضو این خانواده بوده و نقش بسیار کلیدی آن در کنترل مسیر سیگنالینگ انسولین توسط بسیاری از محققین مورد تاکید قرار گرفته است (۱۷). مطالعات

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

بسیاری در مورد نقش PTP۱B در مسیر سیگنالینگ انسولین، افزایش بیان آن در بیماران دیابتی و چاق و عوامل القاء کننده این ژن انجام شده است. همچنین در مدلهای حیوانی تیمار شده با رژیم غذایی پرچرب نیز مقادیر افزایش یافته این ژن نشان داده شده است. همچنین شواهد بدست آمده توسط این گروه تحقیقاتی نشان داده است که اسیدهای چرب سبب القای بیان PTP۱B در سلولهای عضلانی می‌گردند (۱۷-۱۹). بنابراین می‌توان فسفاتازها را بعنوان یکی از نقش‌آفرینان مهم در پروسه مقاومت به انسولین القا شده توسط اسیدهای چرب مد نظر قرار داد.

LAR آنزیم دیگر خانواده فسفاتازها هست که توجه محققین را در ارتباط با نقش آن در مقاومت به انسولین به خود جلب نموده است. LAR بطور اختصاصی فسفوتیروزین جایگاه ۱۱۵۰ در ساختار IRSs را دفسفریله می‌کند. مطالعات بر روی حیوانات ترانس ژنیک با افزایش بیان ژن LAR به صورت اختصاصی در بافت عضله، نشان داده است که این حیوانات دارای سطح پلاسمایی انسولین بالاتر (۲/۵ برابر)، قند خون ناشتای (FBS) طبیعی و کاهش برداشت گلوکز توسط عضله در حدود ۵۰٪-۳۹ می‌باشند که مجموعاً بیانگر مقاومت به انسولین در این مدل حیوانی می‌باشد (۲۰). این مدل‌ها مقاومت به انسولین عمومی داشته و فسفریلاسیون IRS۱ و فعالیت IP۳K در آنها حدود ۳۵٪ کاهش می‌یابد (۱۴). از طرف دیگر مهار ژن LAR به روش آنتی‌سنس در این مدل، باعث افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ انسولین می‌گردد (۲۱). مدل حیوانی فاقد ژن LAR نشان داد که در این حیوانات مقدار انسولین و گلوکز پایین و مقدار تولید گلوکز کبدی نیز کم است. (۱۴). مجموعه اطلاعات بدست آمده حاکی از نقش مهم LAR در کنترل مسیر سیگنالینگ انسولین می‌باشد. همچنین همسو با مطالعات انجام شده بر روی PTP۱B (۱۵)، بررسی بیماران دیابتی و چاق نشان داده است که این بیماران مقادیر افزایش یافته بیان این ژن را دارا هستند (۱۶) با این حال مکانیسم مولکولی القای LAR مشخص نبوده و تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه گزارش نشده است. عوامل گوناگونی بالقوه قادرند که سبب القا، LAR گردند که از آن جمله می‌توان به انسولین، گلوکز، TNF-α و اسیدهای چرب اشاره کرد. در مطالعه قبلی ما اسیدهای چرب بطور عمده پالمیتات به عنوان یکی از عوامل اصلی مقاومت به انسولین انتخاب شده و اثر آنها بر بیان ژن و پروتئین LAR مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است که نشان داده شد غلظت‌پاتولوژیک پالمیتات باعث القای LAR در سطح mRNA و پروتئین می‌گردد (۱۵).

در این مطالعه جهت ارزیابی نقش LAR در مقاومت به انسولین القا شده بوسیله اسیدهای چرب از سلول‌های C۲C۱۲ استفاده شد. این رده سلولی مدلی است که در مطالعات متعددی به منظور ارزیابی مقاومت به انسولین بافت عضلانی استفاده شده است. بافت عضله یکی از بافت‌های هدف اصلی انسولین بوده و نقش بسیار مهمی در هموستاز گلوکز دارد. طی پیشرفت مقاومت به انسولین در بافت عضله، نقص برداشت گلوکز و کاهش حساسیت به انسولین دیده شده که به افزایش اسید چرب مربوط می‌باشد. از طرف دیگر شواهد بسیاری وجود دارد که میزان فسفاتازها بویژه LAR در افراد چاق، مقاوم به انسولین غیردیابتی و بیماران دیابتی افزایش دارد (۲۲). هیچ کدام از مطالعات ذکر شده اشاره‌ای به علت القای فسفاتازها نداشته‌اند و مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به شناسایی علت القاء LAR با تکیه بر اسیدهای چرب و متابولیت آن می‌پردازد.

در این مطالعه جهت بررسی اثر سرامید از دو غلظت سرامید بر میزان بیان ژن و پروتئین LAR استفاده شده است. یکی از این غلظت‌ها معادل غلظت فیزیولوژیک (۵۰ mM) و دیگری در حد پاتولوژیک (۱۰۰ mM) مشاهده شده در بیماران دیابتی و مقاوم به انسولین می‌باشد (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در غلظت‌های فیزیولوژیک سرامید بر میزان بیان mRNA و پروتئین LAR در مقایسه با کنترل اثر معنی‌داری ندارد، درحالیکه غلظت‌های بالاتر و پاتولوژیک سرامید باعث القای بیان mRNA و پروتئین LAR در مقایسه با کنترل می‌گردند. نتایج نشان می‌دهند که ممکن است افزایش اسیدهای چرب پلاسما و سرامید بعنوان یکی از مشتقات آن، یکی از علل القای ژن LAR مشاهده شده در بیماران دیابتی باشد. اگرچه بایستی نقش عوامل دیگر از قبیل آدیپوکینها، انسولین و گلوکز را نیز مد نظر قرار داد. مطالعات کامل و جامع‌تری لازم است تا نقش هرکدام از عوامل فوق در القای ژن LAR مورد ارزیابی قرار گیرد. با این حال بدلیل نداشتن نتایج اثر اسیدهای چرب و سرامید بر فعالیت آنزیم LAR، این استنتاج بایستی با ملاحظه صورت پذیرد. عدم اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از محدودیتهای مطالعه بوده که بایستی در مطالعات بعدی به آن پرداخته شود.

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر توسط مطالعات انسانی انجام گرفته نیز حمایت می‌شود. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که فسفاتازها در عضله افراد چاق و بیماران دیابت نوع ۲ افزایش بیان دارد (۲۴).همچنین گروه تحقیقاتی فوق در مطالعه‌ای جداگانه به بررسی میزان فعالیت فسفاتازها در بافت چربی و عضله افراد چاق و افراد لاغر غیر دیابتی پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که LAR و PTP۱B در بافت‌های چربی و عضله افراد چاق افزایش بیان دارد. (۲۰). از طرف دیگر نتایج بدست آمده از مطالعات حیوانی نشان از نقش مستقیم LAR در تنظیم مسیر سیگنالینگ انسولین دارد. (۲۰). این مقاومت به انسولین به احتمال زیاد وابسته به دفسفریلاسیون فسفوتیروزین تنظیمی در ساختمان IRS۱ می‌باشد. (۲۵). در مطالعه‌ای موش‌های LAR (–/–) ایجاد کردند که این موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل سطح پلاسمایی گلوکز و انسولین پایین داشتند که بیانگر حساسیت به انسولین می‌باشد (۱۱). بنابراین مجموعه یافته‌های مطالعه حاضر در کنار نتایج تحقیقات دیگران روشن می‌سازد که افزایش سرامید بعنوان یکی از مشتقات اسیدهای چرب ممکن است یکی از عوامل اصلی القای بیان ژن LAR در بافت عضله بیماران دیابتی و چاق باشد. هر چند که این یافته‌ها به میزان اندک در شنایایی علت مقاومت به انسولین القاء شده توسط اسیدهای چرب کمک می‌کند. اما بنظر می‌رسد اثر القاء کنندگی اسیدهای چرب بر فسفاتازهای مهم از قبیل PTP۱B و LAR یک مکانیسم پیشنهادی جهت مقاومت به انسولین در بافت عضله باشد. با این وجود مطالعات تکمیلی لازم است تا نقش دقیقتر اثر اسیدهای چرب و سرامید بر فسفاتازها بویژه LAR مشخص گردد. در مطالعات بعدی نیاز است که اثر این دو غلظت سرامید بر میزان مقاومت به انسولین (برداشت گلوکز) و نقش کاهش بیان ژن LAR و بررسی میزان مقاومت به انسولین القا شده توسط اسیدهای چرب بررسی شود.

References

1- Degroot LG, Jameson L. Endocrinology, 5th Edition. W B Saunders Co; 2001.
2- Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. Anesthesiology 2008; 109 (1): 137-48.
3- Atkison MA, Malaren NK. The pathogenesis of non-insulin dependent diabetes. N Engl J Med 1994; 331: 1428-36.
4- Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. Prog Lipid Res 2006; 45: 42–72.
5- Lang CH, Dubresco C, Begby GI. Tumour necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. Endocrinology 1992; 130: 43-52.
6- Steil GM, Ader M, Moore DM, Rebrin K, Bergman RN. Trans-endothelial insulin transport is not saturable in vivo. No evidence for a receptor-mediated process. J Clin Invest 1996; 97: 1497-503.
7- Roith DL, Zick Y. Recent Advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. Diabetes Care 2001; 24: 588-97.
8- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 1993; 11: 1026-30.
9- Towbin H, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 1979; 76: 4350-4.
10- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest 1996; 97: 2859–65.
11- Shulman JI. Cellular mechanism of insulin resistance. J Clin Invest 2000; 106: 171-6.
12- Loril K, Paul F. C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 283: E514–E24.
13- Lim J, Lee H, Suh J, Kim W. Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signaling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. Diabetologia 2006; 49: 1924–36.
14- Ren JM, Li PM, Zhang WR, Sweet LJ, Cline G, Shulman GI, et al. Transgenic mice deficient in the LAR protein tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. Diabetes 1998; 47: 493-7.
15- Liu G, Trevillyan M. Protein tyrosine phosphatase 1B as a target for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Curr Opin Invest Drug 2002; 3: 1608-16.
16- VanVactor D, Reilly AM, Neel BG. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatasee. Curr Opin Genet Dev 1998; 8: 112-26.
17- Parvaneh L, Meshkani R, Bakhtiyari S, Mohammad-Taghvaie N, GorganiFiruzjaee S, TaheriPak GR, et al. Palmitate and inflammatory state additively induce the expression of PTP1B in muscle cells. Biochem Bioph Res Co 2010; 396: 467–71.

18- Bakhtiyari S, Meshkani R, Taghikhani M, Larijani B, Adeli K. Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP-1B) Knockdown Improves Palmitate-Induced Insulin Resistance in C2C12 Skeletal MuscleCells. Lipids 2010; 45: 237–44.

19- MohammadTaghvaei N, Meshkani R, Taghikhani M, Larijani B, Adeli K. Palmitate Enhances Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Gene Expression at Transcriptional Level in C2C12 Skeletal Muscle Cells. Inflammation 2010; 34 (343-351).

20- Zabolotny JM, Kim Y, Peroni OD, Kim JK, Pani MA, Boss O, et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. PNAS 2001; 98 (9): 5187–92.

21- Mander A, Hodgkinson CP, G.J. S. Knock-down of LAR protein tyrosine phosphatase induces insulin resistance. FEBS Lett 2005; 579 (14): 3028-.

22- Mooney RA, LeVea CM. The leukocyte common antigen-related protein LAR: candidate PTP for inhibitory targeting. Curr Top Med Chem 2003; 3 (37): 809-19.

23- Majumdar I, Mastrandrea LD. Serum sphingolipids and inflammatory mediators in adolescents at risk for metabolic syndrome. Endocrine 2012; 41: 442–9.

24- Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR without effects on Pref-1 expression. Endocrinology 1997; 138: 2776–83

25- Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. J Clin Invest 1994; 93: 2438–46.

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

J Army Univ Med Sci. 2013 July; 11 (2) : 107-113

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 10:07 +0330 on Saturday January 13th 2018

Ceramide can induce Leukocyte common antigen-related (LAR) gene at mRNA and Protein level in C2C12 muscle cells

*Sattar gorgani-Firuzjaee[1], Akram Nejhadi[2], Mohammad Soleimani[3], Radina Eshtiaghi[4]

Received: 25 Feb 2013 Accepted: 24 Apr 2013

Abstract

Background: Type 2 diabetes results from two defects, insulin resistance and beta cell dysfunction. At the molecular and cellular levels, there is a connection between fatty acid accumulation and insulin resistance in muscles. Although several mechanisms involved in FFA-induced muscle insulin resistance, the exact mechanism is poorly understood. Recent studies show that the defect in insulin signaling pathway might be underlying mechanism for FFA-induced insulin resistance in the muscle. Protein tyrosine phosphatases like Leukocyte common antigen-related (LAR) are the key elements of insulin signaling and they can be a candidate in FFA induced insulin resistance. Studies have shown that type 2 diabetes involved and obese individuals have had increased levels of LAR in their tissues. However, the responsible factor for LAR over-expression is not well understood. In this study we investigate ceramide effect on LAR expression in the muscle cells.

Materials and Methods: In this laboratory study C2C12 cells (mouse skeletal) after differentiation to myotubes using 2% of horse serum for 4 days, treated with 50 and 100 mMs of C2ceramide for 16h. RNA extracted, cDNA synthesized and Real Time PCR using specific primers for LAR and beta actin used. To detect LAR protein levels western blot was used.

Results: 100 mMs Ceramide (45%, $P<0.01$) significantly induced LAR mRNA expression but there was not significant difference between 50mM ceramide and untreated cells. The results from real time confirmed by protein data. 100 mMs Ceramide (52%, $P<0.01$) significantly induced LAR protein levels in comparison of control.

Conclusion: The data from this study provide evidence that ceramide around pathologic concentration induce LAR expression. Results supported by human studies that were showed that diabetic and obese persons have a high level of LAR expression and revealed ceramide can be one of the responsible factors for inducing LAR expression in diabetic patients. However, further investigations are needed to clarify exact role of LAR in FFA induced insulin resistance.

Keywords: Leukocyte common antigen-related (LAR), Insulin Resistance, Ceramides

1- (*Corresponding Author) Researcher, Department of laboratory sciences, Paramedical faculty, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran. Tel: +98 21 85953535 E-mail: gorgani59@gmail.com
2- Researcher, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Tasnim molecular-biology Research Center, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Endocrinology, Medicine faculty, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran