

تغییر بیان ژن (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase) SHIP2 با استفاده از سیستم رتروویروس در سلول‌های کبدی HepG2

ستار گرگانی فیروزجایی^{۱*}، رضا مشکانی^۲

چکیده

مقدمه: دیس لیپیدمی به عنوان یکی از فاکتورهای خطر بیماریهای قلبی عروقی در افراد دیابتی مطرح می‌باشد. دیس لیپیدمی به وسیله افزایش غلظت تری‌گلیسرید پلاسما، کاهش HDL کلسترول و افزایش LDL به خصوص small dense LDL تشخیص داده می‌شود. شواهد متعدد از مطالعات انسانی و حیوانی بیانگر نقش مقاومت به انسولین به عنوان علت اصلی افزایش تری‌گلیسرید در بیماران دیابتی و افراد مبتلا به سندرم متابولیک می‌باشد. لیپوژنز کبدی و تولید لیپوپروتئین غنی از تری‌گلیسرید از طریق مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول کیناز (PI3K) تنظیم می‌گردد. با این وجود نقش تنظیم کننده منفی این مسیر SHIP2 (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase) در این فرایند (لیپوژنز کبدی) به خوبی مشخص نمی‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر با استفاده از سیستم رتروویروس بیان ژن SHIP2 تغییر یافته و عملکرد داخل سلولی آن در سیگنالینگ انسولین مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داده که افزایش بیان SHIP2 سبب کاهش فسفریلاسیون Akt به عنوان یکی از واسطه‌های سیگنالینگ انسولین شده و کاهش عملکرد SHIP2 فسفریلاسیون Akt را افزایش داده و سبب بهبود پیام رسانی داخل سلولی انسولین در سلولهای کبدی HepG2 می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نقش کلیدی فسفریلاسیون Akt در متابولیسم گلوکز و لیپید، از مدل سلول تولید شده می‌توان در مطالعات متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: ژن SHIP2، انتقال پیام انسولین و لیپوژنز

مقدمه

داشته که شامل PTEN (Phosphatase and tensin homolog) و SHIP2 می‌باشند. PTEN از جایگاه شماره ۳ اینوزیتول، فسفات جدا کرده اما SHIP2 ها از جایگاه ۵ اینوزیتول، فسفات جدا می‌کنند (۳). تاکنون حدود ۱۰ تا SHIP2 در پستانداران شناسایی شده که با دفسفریله کردن جایگاه ۵ نقش بسیار مهمی در فرایندهای مختلف از قبیل فاگوسیتوز، انتقال پروتئینی، بالانس انرژی و تنظیم هموستاز گلوکز و چربی ایفا می‌کنند. نقش مهمی SHIP2 در انتقال پیام انسولین هم در *in vivo* و هم در *in vitro* نشان داده شده است (۴). افزایش

SHIP2، لیپید فسفاتاز ۱۴۲ کیلو دالتونی دارای دومین SH2 در انتهای N، دومین کاتالیتیک مرکزی و دومین PRD در انتهای C می‌باشد. ژن آن روی کروموزوم ۱۴-۱۱q۱۳ قرار دارد. این فسفاتاز (۳،۴،۵) PI^۳ را به PI^۳ (۳،۴) تبدیل می‌نماید PI^۳ (۳،۴،۵) در اثر فعالیت PI^۳K حاصل شده و از طریق فعال نمودن کیناز شماره یک وابسته به فسفاتیدیل اینوزیتول (PDK1) باعث فسفریله و فعال شدن Akt/ PKB می‌شود (۱، ۲). حداقل دو خانواده از لیپید فسفاتاز وجود

۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران (*نویسنده مسئول)

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نگهداری شدند. دو نوع سیستم رترو ویروس جهت کاهش و افزایش بیان SHIP2 طراحی گردید. جهت کاهش بیان SHIP2، از توالی غالب منفی (Dominant Negative) ژن SHIP2 استفاده شد. برای افزایش بیان ژن SHIP2 نیز از توالی cDNA نوع طبیعی این ژن استفاده گردید. سلول‌های کنترل در این مطالعه دارای توالی ژن GFP در وکتور پایه رترو ویروس (pBABE) بودند. وکتور pBABE حاوی توالی ژن SHIP2 و توالی غالب منفی آن به صورت اهدایی از آزمایشگاه دکتر Erneux، دانشگاه Libre de Bruxelles کشور بلژیک تهیه شد. وکتور pBABE حاوی ژن GFP به صورت تجاری خریداری شد. وکتورهای رترو ویروسی به همراه وکتورهای کمکی تولید رترو ویروس (سنتز کننده gag، pol و Env) به سلول‌های T۲۹۳ ترانسفکت گردیده و پس از تولید ویروس در سلول‌های مذکور، ویروس‌های تولید شده پس از تغلیظ به کمک اولتراسانتیفیوژ، به سلول‌های HepG2 همراه با پلی برن (۲ µg/ml) ترانسداکت شدند. پس از ۶ تا ۸ ساعت محیط حاوی رترو ویروس از روی سلول بر داشته شده و محیط معمولی به سلول‌ها اضافه شد. پس از سه روز سلول‌ها با محیط حاوی پورومایسین (۲ µg/ml) به مدت سه هفته تیمار شده و هر سه روز محیط سلول‌ها تعویض گردید (۱۰). از آنجایی که وکتور pBABE دارای مقاومت به پورومایسین می‌باشد، سلول‌های مقاوم به پورومایسین سلول‌هایی هستند که ویروس مورد نظر را دریافت نموده‌اند. پس از تکثیر سلول‌های مقاوم به پورومایسین تغییر بیان ژن SHIP2 در سطح mRNA با استفاده از تکنیک Real time PCR و در سطح پروتئین با استفاده از سترن بلات و آنتی بادی اختصاصی مورد تأیید قرار گرفته و جهت بررسی عملکرد تغییر بیان ژن SHIP2، فسفریلاسیون Akt بوسیله و سترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تولید سلول کبدی تغییر یافته، جهت مطالعات آینده در ازت مایع نگهداری می‌گردند. تمام نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شدند. تفاوت میان گروه‌ها توسط تست One-way ANOVA و Tukey multiple comparison در نرم افزار SPSS تعیین گردید و سطح معنی دار بودن در $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

ترانسفکت وکتورها به سلول T۲۹۳: انتقال وکتورها به سلول

بیان این فسفاتاز که دارای فعالیت کاتالیتیک ۵۰ فسفاتازی بوده، برداشت گلوکز وابسته به فعالیت Akt را مهار می‌نماید (۵). تاکنون دو نوع هموزیگوت و هتروزیگوت موش‌های فاقد این ژن طراحی شده‌اند. موش‌های هموزیگوت در سه روز اول تولد به علت هیپوگلیسمی شدید از بین رفته‌اند اما موش هتروزیگوت دارای حساسیت به انسولین بوده و بدون آسیب زنده مانده‌اند. علاوه بر این در این موش‌ها سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید و اسیدهای چرب آزاد پلاسما پایین می‌باشد (۶). همچنین پلی مورفیسمی از SHIP2 در مطالعه کهورت (هم گروهی) در چین بیانگر نقش محافظتی این پلی مورفیسم در برابر مقاومت به انسولین می‌باشد (۷). در مجموع به نظر می‌رسد که تغییر در بیان SHIP2 و یا تغییر در میزان فعالیت این آنزیم نقش بسیار زیادی در هموستاز گلوکز و بالانس انرژی دارد (۶). مطالعات متعدد نشان دهنده نقش این فسفاتاز در انتقال پیام انسولین می‌باشد، به گونه‌ای که مهار آنتی سنس این آنزیم سبب بهبود حساسیت به انسولین در جوندگان مقام به انسولین می‌شود (۸). همچنین افزایش بیان این ژن توسط سیستم آدنو ویروس باعث ایجاد مقاومت به انسولین و استفاده توالی Dominant negative این ژن با استفاده از سیستم آدنو ویروس سبب بهبود مقاومت به انسولین می‌گردد (۹). با توجه به اهمیت و نقش این فسفاتاز بر هموستاز گلوکز مطالعات زیادی به بررسی نحوه حساسیت به انسولین در اثر افزایش یا کاهش ژن این آنزیم و یا تغییر در نحوه فعالیت آن پرداخته‌اند و نتایج حاکی از آنست که افزایش بیان یا فعالیت این آنزیم سبب مقاومت به انسولین و کاهش بیان یا فعالیت آن سبب بهبود حساسیت به انسولین می‌شود. با توجه به اینکه دیس لیپیدمی یکی از اختلالات شایع دیابت نوع دو بوده و مقاومت به انسولین نقش کلیدی در دیس لیپیدمی دارد. در این مطالعه تغییر (افزایش و کاهش) بیان ژن و فعالیت SHIP2 با استفاده از سیستم رترو ویروسی و توالی Dominant Negative ایجاد شده و عملکرد تغییر بیان SHIP2 توسط بررسی میزان فسفریلاسیون Akt در حضور انسولین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از سلول‌های HepG2 در محیط DMEM استفاده شده است. سلول‌ها در آتمسفر مرطوب دارای ۵٪ CO2 در دمای ۳۷°C

از تیمار سلول‌ها در حضور پورومایسین (غلظت ۲ میکرومولار) استفاده گردید (۱۰). پس از سه هفته تیمار، سلول‌های مقاوم به پورومایسین جهت ادامه کار انتخاب شدند.

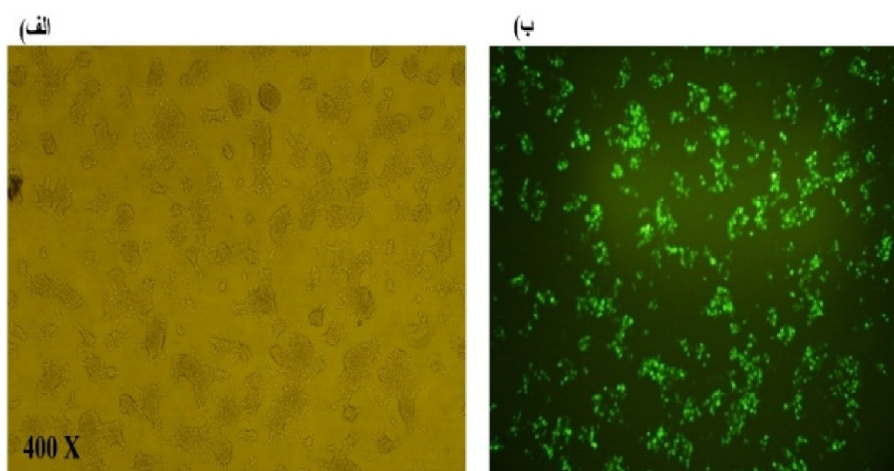
تأیید تغییر بیان ژن SHIP2 در سلول‌های تولید شده: پس از پایدار سازی سلول‌های HepG2 و جهت تأیید کارایی ویروس‌های تولید شده، بیان ژن SHIP2 در سطح mRNA و پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان نوع طبیعی (SHIP2-WT) و نوع جهش یافته (SHIP2-DN) به ترتیب به میزان ۳/۲ و ۲/۹ برابر سلول‌های دریافت کننده GFP (به عنوان کنترل) می‌باشند و این نتایج در سطح پروتئین نیز (به ترتیب ۳/۵ و ۳/۱) مورد تأیید قرار گرفت. الف) تغییر بیان SHIP2 در سطح mRNA. ب) تغییر بیان SHIP2 در سطح پروتئین. DN: شکل جهش یافته ژن SHIP2، WT: شکل طبیعی ژن SHIP2، GFP: سلول HepG2 حاوی ویروس GFP، داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. *، $p < 0.005$ در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده ویروس GFP.

تأیید عملکردی تغییر بیان ژن SHIP2: تا این بخش از مطالعه تغییر بیان ژن SHIP2 در سلول‌های HepG2 اعمال گردید. سوال مطرح شده در ادامه این بوده که آیا ژن SHIP2 دستکاری شده در سلول‌های HepG2 کارا می‌باشد یا نه؟ برای تأیید کارایی SHIP2 بایستی فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری کرد. با توجه به وجود شباهت‌های بسیار بین انواع فسفاتازهای درون سلولی، عملاً در حال حاضر سنجش فعالیت این آنزیم‌ها بطور اختصاصی مشکل می‌باشد. بدین منظور

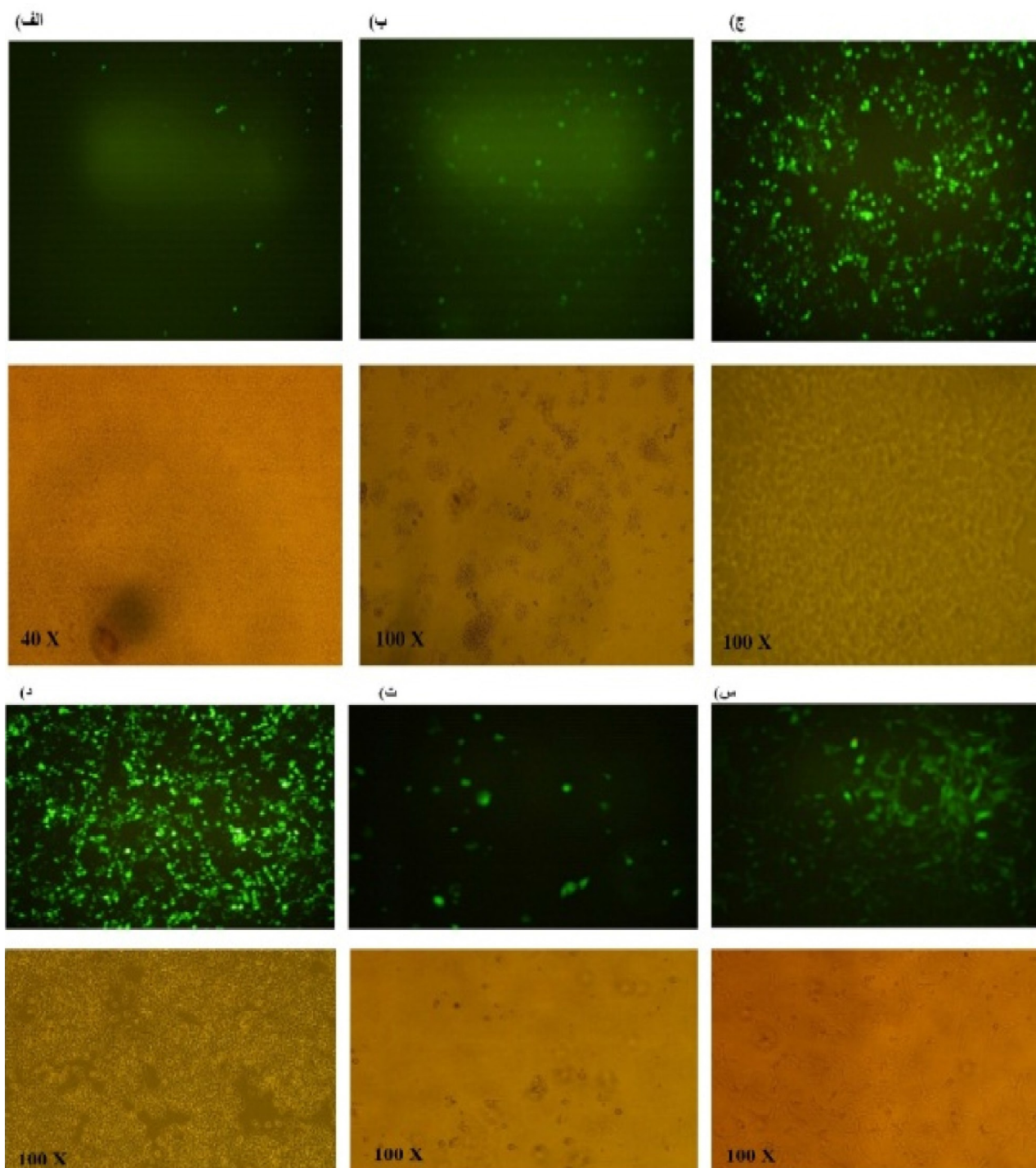
میزبان تولید کننده ویروس (T293) به روش شیمیایی کلسیم-فسفات انجام شد. جهت تأیید انتقال وکتور، از وکتور pBABE-GFP بصورت Trans استفاده شد. پس از انتقال وکتور، سلول به وسیله میکروسکوپ فلورسانس اینورت جهت ارزیابی رنگدانه سبز مورد ارزیابی قرار گرفت و وجود این رنگدانه در داخل سلول T293 مورد تأیید قرار گرفت.

تأیید تولید ویروس (ترانسداکت ویروس حاوی GFP به سلول HepG2): پس از تأیید انتقال وکتور به سلول میزبان، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و سپس محیط رویی سلول که حاوی ویروس بوده جمع‌آوری شد. برای افزایش کارایی و تغلیظ ویروس، مایع جمع‌آوری شده حاوی ویروس به وسیله اولتراسانتریفیوژ تغلیظ گردیده و حجم به یک میلی‌لیتر رسانده شد. سپس برای تأیید تولید ویروس، در حضور پلی‌برن، ویروس به سلول T293 ترانسداکت شد. وجود رنگ فلورسانس سبز پس از دو روز مواجهه سلول با ویروس تأیید کننده تولید ویروس می‌باشد. پس از تأیید تولید ویروس و تغلیظ آن، با رتروویروس حاوی GFP به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید. سپس ویروس تولید شده حاوی GFP به همراه ویروس‌های تولید شده با دیگر وکتورها به سلول HepG2 ترانسداکت شدند.

دریافت ویروس توسط سلول HepG2 با بررسی رنگ فلورسانس سبز توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد تأیید قرار گرفت. از آنجایی که وکتور pBABE و ویروس تولید شده از آن دارای توالی مقاومت به پورومایسین می‌باشند، جهت انتخاب سلول‌های حاوی ویروس،



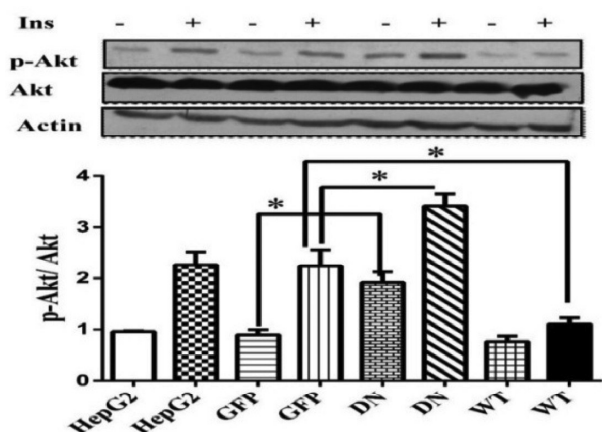
شکل ۱- تأیید انتقال وکتور به سلول T293. الف) بررسی سلول با نور معمولی ب) بررسی سلول با نور فلورسانس



شکل ۲- تأیید تولید ویروس. الف) ترانسداکت سلولهای ۲۲۹۳ با مایع رویی سلولهای تولید کننده ویروس (تغلیظ نشده). ب) ترانسداکت سلولهای ۲۲۹۳ با رترو ویروس تغلیظ شده حاوی GFP. ج) ترانسداکت سلولهای ۲۲۹۳ با ویروس تغلیظ شده به عنوان کنترل مثبت د) ترانسداکت سلولهای ۲۲۹۳ با رترو ویروس تغلیظ شده (در این سلولها برای افزایش کارایی دو بار به فاصله ۶ ساعت سلول HepG با ویروس ترانسداکت شدند). ت) سلولهای HepG2 حاوی ویروس پس از ۲۱ روز تیمار با پورومایسین. س) سلولهای HepG2 حاوی ویروس پس از ۳۵ روز تیمار با پورومایسین.

حضور انسولین به عنوان فعال کننده مسیر انتقال پیام انسولین، میزان فسفریلاسیون Akt به ترتیب به میزان ۲/۳۶ و ۲/۵۱ برابر در مقایسه با وضعیت عدم حضور انسولین در سلولهای HepG2 و

در این مطالعه از ارزیابی میزان فسفریلاسیون Akt برای تأیید کارایی SHIP2 استفاده گردید. گفتنی است که Akt سوپسترای داخل سلولی SHIP2 می باشد. همانطور که در شکل ۴۵ ملاحظه می شود در

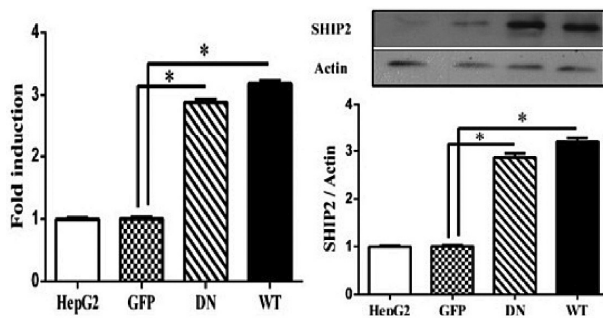


شکل ۴- تأیید کارایی تغییر بیان ژن SHIP2

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 زمینه در ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی، پرفشاری خون، عوارض کلیوی، عصبی و چشمی، بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی در کشورهای مختلف به مطالعه پاتوفیزیولوژی این بیماری می‌پردازند. مقاومت به انسولین بعنوان هسته مرکزی بیماری دیابت نوع ۲ مطرح می‌باشد. بعلاوه پیچیدگی و نقش عوامل متعدد، مکانیسم سلولی و مولکولی مقاومت به انسولین کاملاً شناخته نشده است. به نظر می‌رسد چاقی ناشی از شیوه زندگی و تغذیه نامناسب از عوامل اصلی ایجاد کننده مقاومت به انسولین باشند، گرچه نمی‌توان از اهمیت عوامل ژنتیکی نیز صرف‌نظر کرد (۱۱).

در حالت فیزیولوژیک انسولین از طریق کاهش میزان اسیدهای چرب آزاد گردش خون و همچنین از طریق تأثیر مستقیم بر کبد باعث کاهش ترشح VLDL می‌گردد. با این که مکانیسم مولکولی دقیق این پروسه به خوبی شناسایی نشده، مطالعات نشان داده‌اند که ممکن است اثر انسولین بر تولید VLDL از طریق مسیر PI3K بوده که در این مسیر نهایتاً با فسفریله شدن Akt اعمال می‌گردد (۱۲). Akt فعال شده با کاهش فعالیت پروتئین فسفاتاز B1 (PTP1B) و با توجه به اثر منفی PTP1B بر ER60 (سیستئین پروتئاز مرتبط با شبکه آندوپلاسمی) سبب افزایش تخریب و حذف آپو B100 در نهایت کاهش سنتز VLDL می‌گردد (۱۳، ۱۴). در وضعیت مقاومت به انسولین، عکس اتفاقات ذکر شده رخ داده و با کاهش فعالیت



شکل ۳- تأیید تغییر بیان ژن SHIP2

GFP افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میزان فسفریلاسیون Akt در حضور و عدم حضور انسولین بین سلول HepG2 و GFP مشاهده نمی‌گردد.

افزایش فعالیت PI3K و به دنبال آن افزایش میزان PIP3 یکی از نقاط کلیدی مسیر انتقال پیام انسولین می‌باشد. PIP3 افزایش یافته سبب فعالیت PKB و نهایتاً فسفریلاسیون Akt می‌گردد. با توجه به نقش SHIP2 (دفسفریلاسیون PIP3 و تبدیل آن به PIP2) انتظار می‌رود که افزایش بیان و فعالیت SHIP2 سبب کاهش فسفریلاسیون Akt شده و کاهش فعالیت SHIP2 موجب افزایش فسفریلاسیون Akt گردد. نتایج این مطالعه فرضیه مطرح شده را تأیید نمود و نشان داد که افزایش بیان SHIP2 سبب ۵۱٪ کاهش فسفریلاسیون Akt در مقایسه با گروه کنترل (GFP) شده، در حالیکه کاهش عملکرد SHIP2 باعث افزایش فسفریلاسیون Akt به میزان ۱/۵۲ برابر در مقایسه با گروه کنترل (GFP) در حضور انسولین می‌گردد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در عدم حضور انسولین سلول‌های SHIP2-DN نسبت به سلول‌های SHIP2-WT و GFP به ترتیب به میزان ۲/۴۹ و ۲/۱۴ برابر بیشتر فسفریلاسیون Akt دارند. این یافته بیانگر بهبود سیگنالینگ انسولین در سلول‌های SHIP2-DN حتی در عدم حضور انسولین می‌باشد. در تأیید یافته فوق نتایج نشان می‌دهند که افزایش بیان SHIP2 سبب ۱۵٪ کاهش فسفریلاسیون Akt در مقایسه با سلول GFP در عدم حضور انسولین می‌گردد که بیانگر تضعیف پیام رسانی انسولین می‌باشد.

Ins: انسولین ۱۰۰ نانومولار، DN: شکل جهش یافته SHIP2، WT: شکل طبیعی ژن SHIP2، سلول HepG2 حاوی ویروس GFP، داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. *، $p < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده ویروس GFP.

تولید VLDL را بر عهده دارد. بنابراین می توان انتظار داشت عوامل اثر گذار بر مسیر انتقال پیام انسولین و بویژه Akt، از تنظیم کنندگان متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین باشند. در همین راستا در این مطالعه پروتئین و آنزیم SHIP2 یک تنظیم کننده منفی مسیر انتقال پیام انسولین که Akt را هدف قرار می دهد، انتخاب گردید. SHIP2 از طریق دفسفریله نمودن PIP3 باعث کاهش فعالیت Akt می گردد. با این پیش زمینه می توان چنین فرض کرد که با توجه به نقش SHIP2 در کنترل فعالیت مسیر انتقال پیام انسولین، این پروتئین بالقوه قادر است متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین ها را نیز تنظیم نماید. لذا در این مطالعه SHIP2 مد نظر قرار گرفته بیان آن تغییر داده شد تا در مطالعات آینده نقش آن در تنظیم متابولیسم لیپید بررسی گردد.

Akt افزایش سنتز ApoB و در پی آن افزایش تولید VLDL مشاهده می گردد (۱۵). در وضعیت هیپرتری گلیسریدمی همچنین افزایش سنتز لیپید (لیپوژنز) در سلول های کبدی رخ می دهد. مقاومت به انسولین سبب افزایش لیپوژنز کبدی گردیده و به نظر می رسد این افزایش از طریق مسیر SREBP1c اعمال می گردد (۱۶). افزایش لیپوژنز منجر به تولید بیشتر تری گلیسرید و در پی آن آماده شدن بستر برای تولید بیشتر VLDL در شرایط مقاومت به انسولین خواهد بود. همانطور که اشاره گردیده، مقاومت به انسولین نقش محوری در ایجاد هیپرتری گلیسریدمی دارد. در وضعیت مقاومت به انسولین عمدتاً اختلال در مسیر انتقال پیام انسولین مشاهده می گردد. در مسیر انتقال پیام انسولین Akt یک مولکول کلیدی است که کنترل

References

- 1- Murakami, S., et al., Impact of Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 2 on the regulation of insulin signaling leading to protein synthesis in 3T3-L1 adipocytes cultured with excess amino acids. *Endocrinology*, 2004. 145 (7): p. 3215-3223.
- 2- Onnockx, S., et al., The association between the SH2-containing inositol polyphosphate 5-Phosphatase 2 (SHIP2) and the adaptor protein APS has an impact on biochemical properties of both partners. *Journal of cellular physiology*, 2008. 214 (1): p. 260-272.
- 3- Sly, L.M., et al., SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Experimental hematology*, 2003. 31 (12): p. 1170-1181.
- 4- Rohrschneider, L.R., et al., Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes & Development*, 2000. 14 (5): p. 505-520.
- 5- Khodabandeloo, H., et al., Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and beta cell dysfunction. *Translational Research*, 2015.
- 6- Wada, T., et al., Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Molecular and Cellular Biology*, 2001. 21 (5): p. 1633-1646.
- 7- Sasaoka, T., T. Wada, and H. Tsuneki, Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacology & therapeutics*, 2006. 112 (3): p. 799-809.
- 8- Buettner, R., et al., Antisense oligonucleotides against the lipid phosphatase SHIP2 improve muscle insulin sensitivity in a dietary rat model of the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007. 292 (6): p. E1871-E1878.
- 9- Fukui, K., et al., Impact of the liver-specific expression of SHIP2 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2) on insulin signaling and glucose metabolism in mice. *Diabetes*, 2005. 54 (7): p. 1958-1967.
- 10- Drobná, Z., et al., shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. *Chemical research in toxicology*, 2006. 19 (7): p. 894-898.
- 11- Larijani, B. and F. Zahedi, Epidemiology of diabetes mellitus in Iran. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2002. 1 (1): p. 7-.
- 12- Gorgani-Firuzjaee, S. and R. Meshkani, SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) inhibition ameliorates high glucose-induced de-novo lipogenesis and VLDL production through regulating AMPK/mTOR/SREBP1 pathway and ROS production in HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015.
- 13- Gorgani-Firuzjaee, S., S. Ahmadi, and R. Meshkani, Palmitate induces SHIP2 expression via the ceramide-mediated activation of NF-κB, and JNK in skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2014. 450 (1): p. 494-499.
- 14- Nasimian, A., et al., Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) modulates palmitate-induced cytokine production in macrophage cells. *Inflammation Research*, 2013. 62 (2): p. 239-246.
- 15- Gorgani-Firuzjaee, S., K. Adeli, and R. Meshkani, Inhibition of SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2)



ameliorates palmitate induced-apoptosis through regulating Akt/FOXO1 pathway and ROS production in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015. 464 (2): p. 441-446.

16- Gorgani-Firuzjaee, S., S. Khatami, and R. Meshkani, SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) regulates de-novo lipogenesis and secretion of apoB100 containing lipoproteins in HepG2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015. 464 (4): p. 1028-1033.

Changes in Gene Expression SHIP2 (SHIP2 Domain Containing Inositol 5-Phosphatase) with the Use of HepG2 Liver Cell Rtrvrvrsdr

Sattar Gorgani Firoozjaei^{*1}, Reza Meshkani²

Abstract

Introduction: Dyslipidemia is one of the risk factors of cardiovascular disease in diabetics. Dyslipidemia is diagnosed by increasing in plasma triglyceride density, decreasing HDL Cholesterol, and increasing LDL especially small LDL. Several evidences from human and animal studies indicate that the role of insulin resistance is a major cause of hypertriglyceridemia in diabetics and people with metabolic syndrome, respectively. Hepatic lipogenesis and the production of rich lipoproteins from triglyceride are set by the inositol phosphatidylinositol kinase (PI3K). However, the negative regulator of route SHIP2 is not well defined in this process (hepatic lipogenesis).

Materials and Methods: In this study, the gene expression SHIP2 has been modified by the retroviruses system and the function of intracellular insulin signaling has been studied.

Findings: The results show that increasing in expression SHIP2 is lead to decreasing in AKT phosphorylation as one of the mediators of insulin signaling; in addition, reducing performance of SHIP2 increase the AKT phosphorylation and improves the intracellular insulin signaling in the liver cells Hep G2.

Discussion and Conclusion: Based on the key role AKT phosphorylation in glucose metabolism and lipid, cell models produced can be used in the studies of metabolism of lipids and lipoproteins.

Keywords: Gene SHIP2, insulin signal transduction and lipogenesis

1- (*Corresponding author) Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Postal code: 1411718594

2- Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran