مجله دانشکده پیراپزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال نهم ● شماره ۲ ● پاییز و زمستان ۱۳۹۳ ● شماره مسلسل ۱۶

مقاله پژوهشی

اهمیت LAR (leukocyte common antigen related) در مقاومت به انسولین عضلانی القا شده توسط پالمیتات

ستار گرگانی فیروزجایی[۱و۲]، سالار بختیاری[۳]، رضا مشکانی[۴]

چکیده

مقدمه: مقاومت به انسولین در پاتوژنز دیابت نوع ۲، بیماریهای قلبی عروقی و سندرم متابولیک نقش دارد. از آنجایی که تقریبا ۸۰٪ برداشت وابسته به انسولین گلوکز توسط عضله انجام می‌گیرد این بافت نقش بسیار مهمی در هموستاز گلوکز بدن دارد. leukocyte common antigen related (LAR) بعنوان عضوی از خانواده تیروزین فسفاتازهای متصل به غشا در عملکردهای متعدد سلولی نظیر ایجاد و حفظ شبکه‌های نورونی، آپوپتوزیس و هموستاز گلوکز نقش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که این آنزیم در سیگنالینگ انسولین نقش مهاری داشته و در این مطالعه، به بررسی اثر اسید چرب پالمیتات بر بیان LAR و اثر کاهش بیان این ژن بر برداشت گلوکز پرداختیم.

مواد و روش‌ها: ابتدا اثر دو غلظت پالمیتات بر بیان ژن LAR سلول عضلانی C۲C۱۲ در سطح mRNA و پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس بیان ژن LAR سلول عضلانی C۲C۱۲ به کمک تکنیک shRNA کاهش یافته و توسط پالمیتات ۰/۵mM جهت القا مقاومت به انسولین، تیمار شده‌اند. پس از جمع آوری سلولها تست برداشت گلوکز انجام شده است.

نتایج: پالمیتات در سلول C۲C۱۲ حدود ۶۵٪ در سطح mRA و ۵۲٪ در سطح پروتئین باعث القا LAR شده است. سلولهای حاوی shRNA در مقایسه با گروه کنترل بیان ژن LAR در آنها حدود ۶۵٪ کاهش یافته است. در سلولهای حاوی shRNA در مقایسه با گروه کنترل برداشت گلوکز بهبود یافته است. P< ۰/۰۵

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داده است که پالمیتات سبب القا LAR در سلول عضلانی می‌گردد. همچنین نتایج مطالعه ما شواهدی فراهم آورده که مهار LAR باعث بهبود مقاومت به انسولین القا شده توسط پالمیتات در سلول عضلانی می‌گردد.

کلمات کلیدی: پالمیتات، مقاومت به انسولین و LAR

مقدمه

مقاومت به انسولین نقش بسیار مهمی در ایجاد بیماریهایی مثل دیابت نوع دو، بیماریهای قلبی- عروقی و سندرم متابولیک ایفا می‌کند (۱). مقاومت سلولی به عمکرد انسولین سبب کاهش برداشت انسولین توسط عضله و افزایش تولید و ترشح گلوکز و لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (VLDL) از کبد و افزایش لیپولیز از بافت چربی می‌گردد (۲). از آنجایی که تقریبا ۸۰٪ برداشت گلوکز عضلانی به کمک انسولین انجام می‌گیرد، مقاومت به انسولین عضلانی نقش بسیار مهمی در هموستاز گلوکز بدن ایفا می‌کند (۳).

مکانیسم دقیق مقاومت به انسولین در سطح مولکولی به خوبی مشخص نمی‌باشد. تصور می‌گردد که افزایش اسیدهای چرب آزاد پلاسما باعث مقاومت به انسولین در عضله افراد چاق می‌گردند

۱ـ دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲ـ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش
۳ـ استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۴ـ دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(۴). سابقا تصور می‌شده است که چرخه گلوکز-اسید چرب باعث مقاومت به انسولین القا شده توسط اسید چرب می‌شود اما مطالعات جدید نشان داده‌اند که اختلال در سیگنالینگ انسولین سبب مقاومت به انسولین عضلانی می‌گردد (۵). گزارشات متعددی از مطالعات انسانی و حیوانی بیانگر نقش اسیدهای چرب آزاد در ایجاد مقاومت به انسولین عضلانی می‌باشند. کاهش اتوفسفریلاسیون گیرنده انسولین و کاهش فعالیت کیناز شماره ۳ فسفاتیدیل اینوزیتول (PI۳K) و پروتئین کیناز B (PKB) در بافت‌های چربی و عضله بیماران دیابتی گزارش شده است (۶, ۷). مطالعات اخیر گروه تحقیقاتی دکتر مشکانی نشان داده‌اند که اسید چرب پالمیتات و التهاب باعث القا مقاومت به انسولین در سلولهای عضلانی از طریق افزایش بیان پروتئین فسفاتاز ۱ B (PTP۱B) می‌گردند (۲, ۵, ۶, ۸, ۹).

پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPs) خانواده بزرگ آنزیمی هستند که نقش تنظیمی مثبت و منفی در انواع سلولها و بافتها به عهده دارند. شبیه پروتئین تیروزین کینازها (PTKs)، تغییر فعالیت PTP ها در پاتوژنز بیماریهای انسان نقش دارد. این خانواده شامل تقریبا ۱۱۲ آنزیم است که مهمترین آنها PTP۱B و LAR می‌باشند (۱۰). Leukocyte common antigen-related protein (LAR): این ژن به دلیل اینکه اولین بار با استفاده از پروبهای cDNA آنتی ژن عمومی لوکوسیت (Leukocyte common antigen) یا CD۴۵ شناسایی شده به این نام مشهور شده است. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده (۱۱-۱۴) بنظر می‌رسد که بایدارتباطی بین افزایش سرامید و افزایش فسفاتازها در بیماران دیابتی وجود داشته باشد. همچنین علت افزایش بیان LAR در بافتهای ماهیچه، چربی وکبد افراد مقاوم به انسولین چاق و دیابتی ناشناخته می‌باشد. با توجه به مقادیر افزایش یافته پالمیتات 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 پالمیتات در القای بیان ژن LAR در سلولهای ماهیچه انجام نشده است. شناسایی نقش فسفاتازها بویژه LAR در مقاومت به انسولین القا شده توسط پالمیتات 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 وضعیت دیس‌لیپیدمی مطرح باشد. در این مطالعه با استفاده از رده سلولی ماهیچه موشی (C۲C۱۲)، اثر غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵ میلی مولار پالمیتات بر میزان mRNA و پروتئین LAR مورد بررسی قرار گرفته و با کمک shRNA بیان ژن LAR کاهش یافته و برداشت گلوکز بعنوان شاخص حساسیت به گلوکز بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

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°C نگهداری شدند.

تمایز و ایجاد سلولهای میوتیوب

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.

تیمار سلولها با غلظت‌های مختلف سرامید

بعد از ایجاد میوتیوب، این سلولها در مجاورت غلظتهای ۰/۲ (تقریباً غلظت فیزیولوژیک) و ۰/۵ (تقریباً غلظت پاتولوژیک) میلی مولار پالمیتات به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. ابتدا مقدار مورد نیاز پالمیتات را وزن کرده و آنرا در ۱۰۰ میکرولیتر آب و الکل ۵۰٪ در ۵۶ درجه سانتیگراد حل نموده و به محیط DMEM حاوی ۱٪ وزنی/حجمی آلبومین اضافه گردید. سلول‌های کنترل در این مطالعه با محیط حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب و الکل ۵۰٪ تیمار شدند.

استخراج RNA

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 (۱۵).

لکه‌گذاری وسترن یا وسترن بلات

جهت بررسی اثر غلظت‌های متفاوت پالمیتات 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 Chime 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 (۱۴).

آماده سازی پلاسمید

اولیگونوکلئوتید دو رشته‌ای حاوی توالی معکوس تکراری از shRNA ژن LAR (۵´-) AGATTCGTGGCTACCAGGTCACCTAT-۳´) با استفاده از نرم افزار pSilencer طراحی شده و در وکتور pRS کلون شده است. از توالی scramble بعنوان کنترل استفاده شده است. حضور توالی مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی وکتور توسط BamHI و HindIII مورد تایید قرار گرفته است.

انتقال وکتور به میوبلاست (ترانسفکشن)

با استفاده از روش کلسیم فسفات پلاسمیدهای حاوی shRNA و scramble و GFP به سلول عضله ترانسفکت شده است. بطور خلاصه، روز قبل از ترانسفکشن ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر یک از چاهکهای پلیت ۶ خانه کشت داده شد. سلولها بوسیله ۱۰ میکروگرم پلاسمیدهای حاوی shRNA و scramble و GFP ترانسفکت شده است. از وکتور GFP بعنوان کنترل استفاده شده است. بعد از ۴۸ ساعت از ترانسفکشن، سلولها تریپسینه شده و در محیط حاوی پورومایسین (سیگما آلدریچ) پاساژ داده شد و به مدت ۲ هفته هر ۴-۳ روز محیط تعویض شده و در مرحله بعد سلولهای مقاوم به پورومایسین انتخاب شده و جهت ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. تغییر بیان ژن LAR در سطح پروتئین مورد تایید قرار گرفته است.

تست برداشت گلوکز (Glucose uptake assay)

به منظور ارزیابی اثر LAR بر مقاومت به انسولین القا شده بوسیله پالمیتات تست برداشت گلوکز انجام شده است. تست برداشت گلوکز به صورت تریپلیکیت و سه بار انجام شده است. بطور خلاصه، پس از ۴ روز تمایز سلولها بوسیله پالمیتات ۰/۵ میلی مولار به مدت ۱۶ ساعت تیمار شده‌اند سپس سلولها در حضور و عدم حضور پالمیتات به مدت ۳۰ دقیقه با انسولین تیمار شدند و با بافر شستشو (هپس (HEPES) ۲۰ میلی مولار با pH=۷/۴، NaCl ۱۴۰ میلی مولار، KCL ۵ میلی مولار، $MgSO_4$ ۲/۵ میلی مولار و $CaCl_2$ ۱ میلی مولار) شسته شدند سپس سلولها در بافر مخصوص که حاوی ۰/۵ میکرو کوری [۳H]۲-DOG (داکسی گلوکز نشاندار شده با تریتیوم) در میلی لیتر و ۱۰ میکرومولار ۲-DOG (داکسی گلوکز) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده‌اند. سپس سلولها در سود ۰/۰۵ میلی مولار لیز شده و میزان رادیواکتیویته شمارش شده است.

آنالیزهای آماری

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.

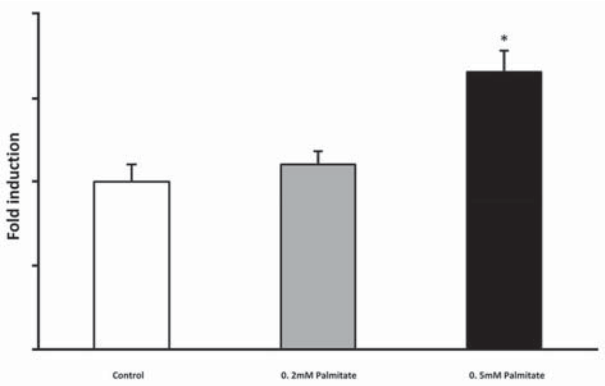
نتایج

اثر پالمیتات بر بیان ژن LAR در سطح mRNA و پروتئین در سلولهای C۲C۱۲ تمایز یافته

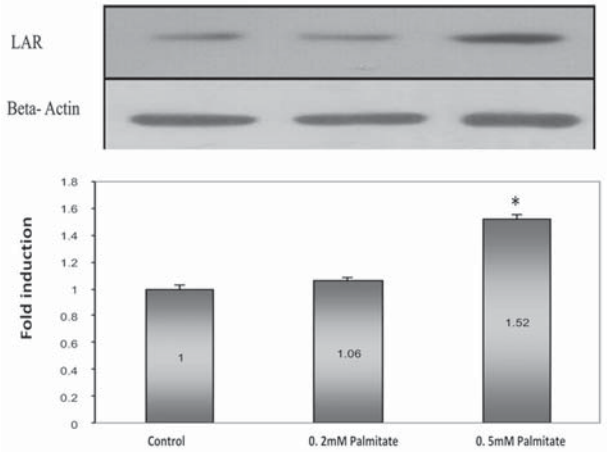
به منظور بررسی اثر پالمیتات بر بیان ژن LAR در سطح mRNA، سلولهای C۲C۱۲ تمایز یافته به مدت ۱۶ ساعت بوسیله پالمیتات ۰/۲ و ۰/۵ میلی مولار تیمار شده‌اند. غلظت ۰/۲ میلی مولار پالمیتات به صورت معنی‌دار سبب تغییر بیان mRNA ژن LAR نشده است. اما غلظت ۰/۵ میلی مولار به صورت معنی‌دار سبب افزایش بیان ژن LAR در سطح mRNA) ۶۵٪، P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل یعنی سلولهای تیمار شده با BSA شده است (شکل شماره ۱). نتایج در سطح mRNA نیز در سطح پروتئین بوسیله وسترن بلات مورد تایید قرار گرفته و تنها پالمیتات ۰/۵ میلی مولار در سطح پروتئین (۵۲٪، P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل سبب افزایش معنی‌دار شده است (شکل شماره ۲).

کاهش بیان ژن LAR در سلولهای عضلانی C۲C۱۲

جهت نشان دادن نقش LAR در مقاومت به انسولین القاء شده بوسیله پالمیتات، سلولهایی که ژن LAR آنها با استفاده از shRNA کاهش بیان یافته است تولید شده است. پلاسمیدهای pRS و EGFP-C۱ با موفقیت به روش کلسیم فسفات وارد سلول عضلانی شده است. میزان کاهش بیان ژن LAR در سطح پروتئین به روش وسترن بلات



شکل ۱- اثر پالمیتات بر بیان ژن LAR در سطح mRNA در سلولهای C۲C۱۲ تمایز یافته. پس از تمایز میوتیوب به مدت ۱۶ ساعت بوسیله غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی مولار پالمیتات کونژوگه شده با BSA و یا محیط حاوی BSA بعنوان کنترل تیمار شده‌اند. تغییر بیان LAR در سطح mRNA توسط Real Time PCR سنجیده شده و بوسیله ژن بتا اکتین نرمالیز شده است.
*** P< ۰/۰۱ در برابر کنترل.**

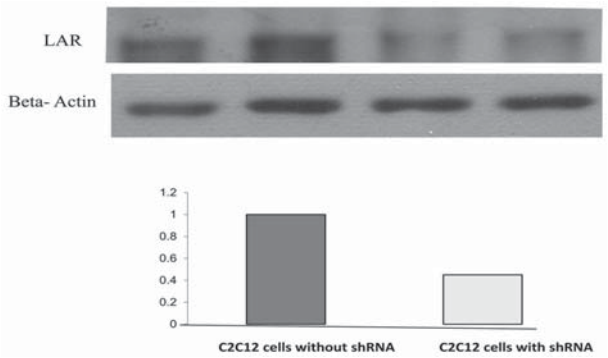


شکل ۲- اثر پالمیتات بر بیان ژن LAR در سطح پروتئین در سلولهای C۲C۱۲ تمایز یافته. پس از تمایز میوتیوب به مدت ۱۶ ساعت بوسیله غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی مولار پالمیتات کونژوگه شده با BSA و یا محیط حاوی BSA بعنوان کنترل تیمار شده‌اند. تغییر بیان LAR در سطح پروتئین توسط وسترن بلات سنجیده شده و بوسیله بتا اکتین نرمالیز شده است.
*** P< ۰/۰۱ در برابر کنترل.**

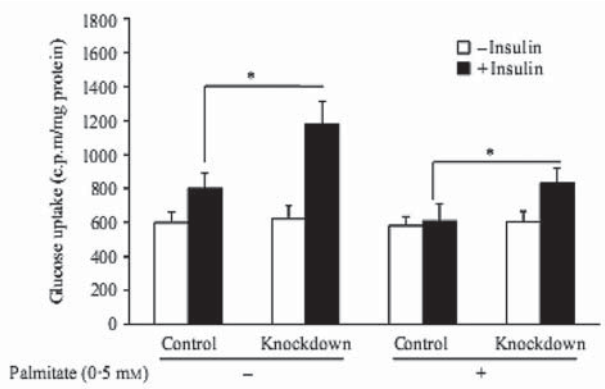
مورد تایید قرار گرفته است که حدود ۶۵٪ بیان آن کاهش یافته است (شکل شماره ۳).

افزایش برداشت گلوکز توسط سلولهایی که ژن LAR در آنها کاهش یافته است.

جهت نشان دادن نقش LAR در مقاومت به انسولین عضلانی، برداشت [^{3}H]۲-DOG در حضور و عدم حضور پالمیتات در حالت پایه و در حالت تحریک با انسولین اندازه‌گیری شده است. در حالت پایه بین برداشت گلوکز توسط سلول کاهش بیان یافته (Stable)



شکل ۳- کاهش بیان ژن LAR در سلولهای عضلانی C۲C۱۲ با استفاده از shRNA. پس از بدست آوردن کلون حاوی shRNA و تکثیر آن، سلولها جمع آوری و پروتئین آن اسخراج شده وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی انجام شده است میزان تغییر بیان پروتئین LAR بوسیله بتا اکتین نرمالیز شده است.



شکل ۴- اثر پالمیتات بر برداشت گلوکز توسط سلولهایی که ژن LAR در آنها کاهش یافته و گروه کنترل. سلولهای عضلانی در حضور و عدم حضور پالمیتات به مدت ۱۶ ساعت تیمار شده و سپس به مدت ۲ ساعت در محیط DMEM حاوی ۱٪ BSA نگهداری شده است (serum starvation). در حضور و عدم حضور انسولین تست برداشت گلوکز انجام شده است. * P<۰/۰۱.

و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است (شکل شماره ۴) اما تحریک توسط انسولین سبب افزایش برداشت گلوکز در هر دو گروه شده است در حالیکه سلولهایی که LAR آنها کاهش بیان یافته بود در مقایسه با گروه کنترل حساسیت به انسولین بالاتری داشته‌اند (۹۳٪ در مقابل ۳۵٪، P<۰/۰۰۱). برداشت گلوکز تحریک شده توسط پالمیتات در حضور پالمیتات در هر دو سلول کنترل و کاهش بیان یافته (Stable) به ترتیب ۳۳٪ و ۵۱٪ (P<۰/۰۱) کاهش یافته است. اما بطور قابل توجه، در حضور همزمان انسولین و پالمیتات، سلولی که LAR آن کاهش بیان یافته (Stable) نسبت به گروه کنترل (۱۶) از حساسیت به انسولین بالاتری برخوردار بوده است. نتایج نشان داده‌اند که مهار LAR باعث القا حساسیت به انسولین در سلول C۲C۱۲ حتی در حضور پالمیتات می‌شود.

بحث

یکی از عوامل مسبب مقاومت به انسولین در بافت عضله افزایش اسیدهای چرب آزاد پلاسما خصوصا پالمیتات می‌باشد. در حال حاضر به طور کلی پذیرفته شده است که افزایش لسیدهای چرب آزاد پلاسما خصوصا پالمیتات سبب کاهش فعالیت تیروزین کینازی گیرنده انسولین در سلولهای عضلانی می گردد (۱۷). با این وجود، مولکول هدف اصلی برای اسیدهای چرب در سیگنالینگ انسولین به خوبی مشخص نیست. اخیرا نشان داده شد که پالمیتات از طریق افزایش بیان PTP۱B سبب القا مقاومت به انسولین در بافت عضله می‌گردد (۱۸, ۱۹). 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 (۹, ۲۰, ۲۱). 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 (۲). مطالعات 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 (۸, ۹, 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. این آنزیم به طور 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 (۲۱). این مدل‌ها مقاومت به انسولین عمومی داشته و فسفریلاسیون IRS۱ و فعالیت IP۳K در آنها حدود ۳۵٪ کاهش می‌یابد (۲۲). از طرف دیگر مهار ژن LAR به روش آنتی‌سنس در این مدل، باعث افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ انسولین می‌گردد. مدل حیوانی فاقد ژن LAR نشان داد که در این حیوانات مقدار انسولین و گلوکز پایین و مقدار تولید گلوکز کبدی نیز کم است (۲۱). مجموعه اطلاعات بدست آمده حاکی از نقش مهم LAR در کنترل مسیر سیگنالینگ انسولین می‌باشد. همچنین همسو با مطالعات انجام شده بر روی PTP۱B

(۹)، بررسی بیماران دیابتی و چاق نشان داده است که این بیماران مقادیر افزایش یافته بیان این ژن را دارا هستند 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 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 (۵, ۸, ۹, ۱۸). 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 (۲۱). 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 می‌پردازد.

در این مطالعه جهت بررسی اثر پالمیتات از دو غلظت پالمیتات بر میزان بیان ژن و پروتئین LAR استفاده شده است. یکی از این غلظت‌ها معادل غلظت فیزیولوژیک (۰/۲ mM) و دیگری در حد پاتولوژیک (۰/۵ mM) مشاهده شده در بیماران دیابتی و مقاوم به انسولین می‌باشد (۸). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در غلظت‌های فیزیولوژیک پالمیتات بر میزان بیان mRNA و پروتئین LAR در مقایسه با کنترل اثر معنی‌داری ندارد، درحالیکه غلظت‌های بالاتر و پاتولوژیک پالمیتات باعث القای بیان mRNA و پروتئین LAR در مقایسه با کنترل می‌گردند. نتایج نشان می‌دهند که ممکن است افزایش اسیدهای چرب پلاسما، یکی از علل القای ژن LAR مشاهده شده در بیماران دیابتی باشد. اگرچه بایستی نقش عوامل دیگر از قبیل آدیپوکینها، انسولین وگلوکز 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 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. برای بیشتر آشکار شدن نقش LAR، بیان این ژن بوسیله shRNA کاهش یافته و اثر آن بر برداشت گلوکز توسط سلول عضلانی در حضور و عدم حضور پالمیتات بررسی شده است و نتایج نشان داده‌اند که سلولهای که بیان ژن LAR آنها کاهش یافته است از حساسیت به انسولین بالاتری برخوردارند (شکل شماره ۴).

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 (۲). 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 (۲۲). از طرف دیگر نتایج بدست آمده از مطالعات حیوانی نشان از نقش مستقیم LAR در تنظیم مسیر سیگنالینگ انسولین دارد. این مقاومت به انسولین به احتمال زیاد وابسته به دفسفریلاسیون فسفوتیروزین تنظیمی در ساختمان IRS۱ می‌باشد (۲۱). 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 (۲۳). بنابراین مجموعه یافته‌های مطالعه حاضر در کنار نتایج تحقیقات دیگران روشن می‌سازد که افزایش 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 متابولیت اسیدهای چرب مثل سرامید بر فسفاتازها بویژه LAR مشخص گردد.

References

1- Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem. 1999;274: 1865-8.
2- Meshkani R AK. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Clinical Biochemistry. 2009;42: 1331–46.
3- Pessin JE SA. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation. 2000; 106: 165–9.
4- Reynoso R SL, Calderon V. High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. Molecular and Cellular Biochemistry. 2003;246: 155–62.
5- Bakhtiyari S MR, Taghikhani M, Larijani B & Adeli K. Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) knockdown improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. Lipids. 2010;45: 237–44.
6- Kruszynska YT WD, Ofrecio J, Frias JP, Macaraeg G & Olefsky JM. Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2002;87: 226–34.
7- Bjo¨ rnholm M KY, Lehtihet M & Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. Diabetes. 1997;46: 524–7.
8- 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).
9- Parvaneh L, Meshkani R, Bakhtiyari S, MohammadTaghvaie N, GorganiFiruzjaee S, TaheriPak GR, et al. Palmitate and inflammatory state additively induce the expression of PTP1B in muscle cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010;396: 467–71.
10- 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.
11- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 1993;11: 1026-30.
12- Roach P, Zick Y, Formisano P, Accili D, Taylor SI, Gorden P. A novel human IR gene mutation uniquely inhibits insulin binding without impairing post-translational processing. Diabetes Care. 1994;43: 1096-102.
13- Roith DLaYZ. Recent Advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. Diabetes Care. 2001;24: 588-92.
14- Shulman JI. Cellular mechanism of insulin resistance. J Clin Invest. 2000;106: 171-6.
15- 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.
16- !!! INVALID CITATION !!!
17- MP C. Fat targets for insulin signaling. Molecular Cell. 2002;9: 695–6.
18- MohammadTaghvaei N MR, Taghikhani M, Larijani B & Adeli K. Palmitate enhances protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) gene expression at transcriptional level in C2C12 skeletal muscle cells. Inflammation. 2011;34: 43–8.
19- MohammadTaghvaei N TG, Taghikhani M & Meshkani R. Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor kB (NF-kB) activation. Cellular Signalling. 2012;24: 1964–70.
20- Gorgani-Firuzjaee S, et al. Leukocyte antigen-related inhibition attenuates palmitate- induced insulin resistance in muscle cells. Journal of Endocrinology. 2012;215: 71–7.
21- 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.
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- K. DT. Insulin Receptor Signaling Is Augmented by Antisense Inhibition of the Protein Tyrosine Phosphatase LAR the jornal of biological chemistry. 1997; 270: 2435-8.

Importance of leukocyte common antigen related (LAR) in muscle palmitate induced insulin resistance

Sattar Gorgani-Firuzjaee[1,2], Salar Bakhtiyari[3], Reza Meshkani[1,4]

Abstract

Background: Insulin resistance plays a major role in the development of some diseases such as type 2 diabetes (T2D) and metabolic syndrome. Muscle insulin resistance has a key role in whole body glucose homeostasis, as almost 80% of insulin-dependent glucose uptake in the body occurs in this tissue. Leukocyte antigen-related (LAR) as a receptor-like tyrosine phosphatase has some roles in different cellular functions such as establishing and maintaining neuronal networks, apoptosis, and glucose homeostasis. There are several lines of evidence that LAR acts as inhibitor of insulin action. In this study, we aimed to investigate the importance of inhibition of LAR expression on insulin stimulated glucose uptake at the presence in muscle cells.

Material and method: We established stable C2C12 cell line which knocking down LAR with shRNA and for insulin resistance induction, treated C2C12 and stable C2C12 cells with palmitate. Harvest cells, RNA and protein extracted and gene expression in mRNA and protein level with Real time PCR and western blot analyzed. In order to address insulin sensitivity we performed glucose-uptake assay.

Results: LAR protein level was decreased by 65% in the stable cell line compared with the control cells. Palmitate (0.5mM) significantly induced LAR mRNA (65%) and protein levels (40%) in myotubes compared with untreated cells. LAR depletion improved insulin-stimulated glucose uptake in myotubes treated with palmitate.

Discussion: Results reveal that palmitate induces LAR expression in C2C12 cells. We also provided evidence that the inhibition of LAR attenuates palmitate-induced insulin resistance in myotubes.

Keywords: Insulin resistance, Palmitate and LAR.

1- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Department of laboratory sciences, Paramedical faculty, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran
3- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4- Endocrinology and Metabolism Research Centre, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran