

Role of SHIP2 in Oleate Induced De-Novo Lipogenesis

Reza Meshkani¹, Sattar Gorgani-Firuzjaee^{2*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Dyslipidemia is one of the key risk factors for cardiovascular disease in type 2 diabetes (T2D). The dyslipidemia is characterized by increased plasma concentration of triglycerides (TG), reduced concentration of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and an increased concentration of small dense low density lipoprotein (LDL) cholesterol. Evidence from both animal and human studies suggests that insulin resistance (in adipose and liver tissues) is an important underlying cause of hypertriglyceridemia in subjects with metabolic syndrome and T2D. Hepatic de-novo lipogenesis and production of triglyceride rich VLDL are regulated via the phosphoinositide 3-kinase cascade. However, the role of a negative regulator of this pathway, the SH2 domain containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) remains unknown.

Methods and Materials: In the present study, we studied the molecular mechanisms linking SHIP2 expression to metabolic dyslipidemia using overexpression or suppression of SHIP2 gene in HepG2 cells exposed to oleate (0.5 mM).

Results: The results showed that, comparing to the control group, the overexpression of the wild type SHIP2 gene (SHIP2-WT) led to a higher total lipid content (28%), whereas overexpression of the dominant negative SHIP2 gene (SHIP2-DN) reduced total lipid content in oleate treated cells by 40%. Overexpression of SHIP2-WT also lead to a significant increase in increased intra and extracellular triglyceride levels and enhanced the expression of lipogenic genes such as SREBP1c, FAS and ACC. On the other hand, overexpression of the SHIP2-DN gene prevented oleate-induced de-novo lipogenesis in HepG2 cells.

Discussion and Conclusion: All in all, these findings suggest that SHIP2 expression level is an important determinant of hepatic lipogenesis and its inhibition can potentially be a target in treatment of dyslipidemia in diabetic patients.

Keywords: De-novo lipogenesis, Oleate, SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) and Insulin resistance.

*(Corresponding author) Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical sciences, Tehran, Iran.

نقش ژن SHIP2 در لیپوزن القاوی توسط اولئات

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

^۱ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: مقاومت به انسولین یک وضعیت پاتولوژیکی است که میزان انسولین طبیعی خون قادر به ایجاد پاسخ بیولوژیکی طبیعی نیست. این کاهش پاسخ میتواند تمام اثرات متابولیک انسولین را متاثر سازد. فسفاتازها از جمله پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTP- (LAR) Leukocyte common antigen-related protein، (PTP^{1B}) Protein-tyrosine phosphatase 1B)، (SHP-2، PTP- α ، Sigma) گروهی از آنزیمها هستند که نقش مهمی در کنترل مسیر انتقال پیام انسولین بر عهده دارند. SHIP2 SRC homology 2 domain (SH2)-containing inositol 5-phosphatase عضو مهم این خانواده بوده که در کنترل مسیرهای انتقال پیام بویژه انتقال پیام انسولین نقش دارد. لیپوزن کبدی و تولید لیپوپروتئین غنی از تری گلیسرید از طریق مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول کیناز (PI3K) تنظیم میگردد. با این وجود نقش تنظیم کننده منفی این مسیر یعنی SHIP2 در این فرایند (لیپوزن کبدی) به خوبی مشخص نمیشود.

مواد و روشها: در مطالعه حاضر مکانیسم مولکولی ارتباط دهنده بین بیان SHIP2 و دیس لیپیدمی دیابتی با استفاده از افزایش و کاهش بیان ژن SHIP2 به کمک سیستم رتروویرس در حضور اولئات (۵/۰ میلی مولار) بررسی گردید.

یافتهها: نتایج مطالعه نشان داد که افزایش بیان ژن SHIP2 به میزان ۲۸٪ سبب افزایش لیپوزن و مهار فعالیت SHIP2 از طریق افزایش بیان فرم جهش یافته این پروتئین، به میزان ۴۰٪ سبب کاهش لیپوزن در مقایسه با گروه کنترل شده است. همچنین افزایش بیان SHIP2 از طریق افزایش بیان ژنهای FAS، SREBP1c و ACC سبب تحریک لیپوزن (افزایش تری گلیسرید داخل و خارج سلولی) در حضور اولئات گردید. از طرف دیگر مهار SHIP2 از طریق کاهش بیان ژنهای دخیل در لیپوزن سبب بهبود لیپوزن القاوی توسط اولئات شد.

بحث و نتیجه گیری: مجموعاً نتایج مطالعه حاضر بیانگر اهمیت SHIP2 در لیپوزن کبدی در شرایط مقاومت به انسولین بوده و مهار آن میتواند بالقوه در درمان دیس لیپیدمی دیابتی مطرح شود.

کلمات کلیدی: لیپوزن کبدی، اولئات، مقاومت به انسولین و ژن SHIP2

مقدمه

عمده دیس لیپیدمی دیابتی بوده که منجر به اختلال در متابولیسم دیگر لیپوپروتئینها نظیر لیپوپروتئین با وزن مخصوص پایین (LDL) و لیپوپروتئین با وزن مخصوص بالا (HDL) می گردد. افزایش تولید VLDL در دیابت نوع دو به علت تغییر در متابولیسم لیپید و آپولیپوپروتئین B می باشد (۱).

دیس لیپیدمی دیابتی به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای بیماری قلبی در بیماران دیابت نوع دو مطرح بوده که شامل ناهنجاریهای کمی و کیفی لیپیدهای دارای خاصیت آتروژنیک می باشد. افزایش تولید لیپوپروتئین با وزن مخصوص بسیار پایین (VLDL) تظاهر بالینی

* (نویسنده مسئول) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
شماره تماس: ۰۹۱۲۵۳۶۹۲۷۱ آدرس الکترونیک: gorgani59@gmail.com

انسولین در متابولیسم لیپیدها نقش مرکزی داشته و در بافت چربی با مهار لیپاز حساس به هورمون با نقش ضد لیپولیزی به ذخیره تری گلیسیریدها در بافت چربی و ممانعت از آزادسازی اسیدهای چرب آزاد به گردش خون کمک می کند. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که انکوباسیون سلول های کبدی موش و انسان با انسولین سبب کاهش لیپوژنز کبدی می گردد (۲). این نتایج به وسیله مطالعات *invivo* نیز مورد تأیید قرار گرفته است. انسولین نه تنها از طریق کاهش میزان اسیدهای چرب آزاد گردش خون بلکه از طریق تأثیر مستقیم بر کبد باعث کاهش ترشح VLDL می گردد. با این وجود مکانیسم مولکولی دقیق آن به خوبی مشخص نمی باشد. مطالعات نشان داده اند که ممکن است این مهار از طریق مسیر PI3K بوده که در این مسیر نهایتاً با فسفریله شدن Akt اثرات متابولیک انسولین اعمال می گردد (۳). این عمل به دنبال فسفریله شدن واحدهای تیروزین سوبستراهای گیرنده انسولین مثل IRS۱ یا IRS۲ صورت می گیرد. این فسفریلاسیون سبب فعال شدن PI3K شده و در نهایت باعث تولید PIP۳ بیشتری شده که این ترکیب قادر به فعال کردن Akt می باشد. Akt یک کیناز بوده که از واسطه های متابولیک انسولین می باشد (۴).

مطالعات متعدد حاکی از افزایش لیپوژنز در افراد چاق و مقاوم به انسولین با افزایش فعالیت آنزیمهایی مثل آسیل کوآ کربوکسیلاز، سنتز کننده اسید چرب (Fatty acid synthase) و استئاریل کوآ دسچوراز می باشد (۵). لیپوژنز کبدی به دنبال افزایش بیان پروتئین اتصال به عناصر پاسخ دهنده به کربوهیدرات (ChREBP) و پروتئین اتصال به عنصر تنظیمی استرول-۱c۱ (cSREBP) تحریک می گردد. افزایش فعالیت گیرنده X کبدی (LXR) نیز سبب افزایش بیان و تجویز آگونیست های LXR سبب افزایش سنتز اسید چرب کبدی می شود (۶، ۱).

سلول های هدف انسولین دارای تنظیم کننده های منفی سیگنالینگ انسولین نظیر فسفاتازها (پروتئین تیروزین فسفاتازها و لیپید فسفاتازها) بوده که از طریق دفسفریلاسیون واسطه های کلیدی فسفریله در سیستم پیام رسانی انسولین سبب تضعیف یا قطع سیگنالینگ انسولین می گردند (۷). از جمله لیپید فسفاتازهای سیگنالینگ انسولین می توان به SHIP۲ اشاره نمود (۸). حداقل دو خانواده از لیپید فسفاتاز وجود داشته که شامل Phosphatase and

tensin homolog (SHIP و PTEN) ها می باشند. PTEN از جایگاه شماره ۳ اینوزیتول، فسفات جدا کرده اما SHIP ها از جایگاه ۵ اینوزیتول، فسفات جدا می کنند (۹). تاکنون حدود ۱۰ SHIP 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 می کنند. نقش مهمی SHIP۲ در انتقال پیام انسولین هم در *in vivo* و هم در *in vitro* نشان داده شده است (۱۰). افزایش بیان این فسفاتاز که دارای فعالیت کاتالیتیک ۵ فسفاتازی بوده، برداشت گلوکز وابسته به فعالیت Akt را مهار می نماید. تاکنون دو نوع هموزیگوت و هتروزیگوت موشهای فاقد این ژن طراحی شده اند. موش های هموزیگوت در سه روز اول تولد به علت هیپوگلیسمی شدید از بین رفته اند اما موش هتروزیگوت دارای حساسیت به انسولین بوده و بدون آسیب زنده مانده اند. علاوه بر این در این موشها سطوح پلاسمایی تری گلیسرید و اسیدهای چرب آزاد پلازما پایین می باشد (۱۱). همچنین پلی مورفیسمی از SHIP۲ در مطالعه کهورت (هم گروهی) در چین بیانگر نقش محافظتی این پلی مورفیسم در برابر مقاومت به انسولین می باشد (۱۲). در مجموع به نظر می رسد که تغییر در بیان SHIP۲ و یا تغییر در میزان فعالیت این آنزیم نقش بسیار زیادی در هموستاز گلوکز و بالانس انرژی دارد (۱۱). مطالعات متعدد نشان دهنده نقش این فسفاتاز در انتقال پیام انسولین می باشد، به گونه ای که مهار آنتی سنس این آنزیم سبب بهبود حساسیت به انسولین در جوندگان مقاوم به انسولین می شود (۱۳). همچنین افزایش بیان این ژن توسط سیستم آدنوویروس باعث ایجاد مقاومت به انسولین و استفاده توالی Dominant negative این ژن با استفاده از سیستم آدنوویروس سبب بهبود مقاومت به انسولین می گردد (۱۴). 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 پرداخته اند 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 می شود. 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 به بررسی نقش SHIP۲ بر لیپوژنز سلول های کبدی (De novo lipogenesis) پرداخته و اثر افزایش

انسولین در متابولیسم لیپیدها نقش مرکزی داشته و در بافت چربی با مهار لیپاز حساس به هورمون با نقش ضد لیپولیزی به ذخیره تری گلیسیریدها در بافت چربی و ممانعت از آزادسازی اسیدهای چرب آزاد به گردش خون کمک می کند. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که انکوباسیون سلول های کبدی موش و انسان با انسولین سبب کاهش لیپوژنز کبدی می گردد (۲). این نتایج به وسیله مطالعات *invivo* نیز مورد تأیید قرار گرفته است. انسولین نه تنها از طریق کاهش میزان اسیدهای چرب آزاد گردش خون بلکه از طریق تأثیر مستقیم بر کبد باعث کاهش ترشح VLDL می گردد. با این وجود مکانیسم مولکولی دقیق آن به خوبی مشخص نمی باشد. مطالعات نشان داده اند که ممکن است این مهار از طریق مسیر PI3K بوده که در این مسیر نهایتاً با فسفریله شدن Akt اثرات متابولیک انسولین اعمال می گردد (۳). این عمل به دنبال فسفریله شدن واحدهای تیروزین سوبستراهای گیرنده انسولین مثل IRS۱ یا IRS۲ صورت می گیرد. این فسفریلاسیون سبب فعال شدن PI3K شده و در نهایت باعث تولید PIP۳ بیشتری شده که این ترکیب قادر به فعال کردن Akt می باشد. Akt یک کیناز بوده که از واسطه های متابولیک انسولین می باشد (۴).

مطالعات متعدد حاکی از افزایش لیپوژنز در افراد چاق و مقاوم به انسولین با افزایش فعالیت آنزیمهایی مثل آسیل کوآ کربوکسیلاز، سنتز کننده اسید چرب (Fatty acid synthase) و استئاریل کوآ دسچوراز می باشد (۵). لیپوژنز کبدی به دنبال افزایش بیان پروتئین اتصال به عناصر پاسخ دهنده به کربوهیدرات (ChREBP) و پروتئین اتصال به عنصر تنظیمی استرول-۱c۱ (cSREBP) تحریک می گردد. افزایش فعالیت گیرنده X کبدی (LXR) نیز سبب افزایش بیان و تجویز آگونیست های LXR سبب افزایش سنتز اسید چرب کبدی می شود (۶، ۱).

سلول های هدف انسولین دارای تنظیم کننده های منفی سیگنالینگ انسولین نظیر فسفاتازها (پروتئین تیروزین فسفاتازها و لیپید فسفاتازها) بوده که از طریق دفسفریلاسیون واسطه های کلیدی فسفریله در سیستم پیام رسانی انسولین سبب تضعیف یا قطع سیگنالینگ انسولین می گردند (۷). از جمله لیپید فسفاتازهای سیگنالینگ انسولین می توان به SHIP۲ اشاره نمود (۸). حداقل دو خانواده از لیپید فسفاتاز وجود داشته که شامل Phosphatase and

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.

یافته‌ها

اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر محتوای تام لیپیدی سلول
جهت بررسی نقش ژن SHIP2 در لیپوژنز کبدی، سلول‌هایی که بیان ژن SHIP2 در آنها تغییر یافته است توسط اسید چرب اولئات به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و لیپد توتال توسط رنگ آمیزی Oil Red O مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). همانطور که در شکل ۱ الف مشاهده می‌گردد تیمار با اولئات سبب القا لیپوژنز در سلول‌های HepG2 و GFP شد. کاهش عملکرد ژن SHIP2 با استفاده از افزایش بیان شکل جهش یافته این آنزیم (DN) سبب کاهش لیپوژنز القاء شده توسط اولئات و افزایش بیان نوع طبیعی این ژن (WT) سبب القای لیپوژنز در سلول‌های کبدی می‌گردد. به منظور نشان دادن نتایج به صورت کمی، رنگ آمیزی Oil Red O با محلول نمودن رنگ در DMSO و قرائت جذب نوری در ۵۱۰ نانومتر انجام پذیرفت. نتایج نشان می‌دهد افزایش بیان فرم طبیعی SHIP2 در مقایسه با GFP به میزان ۳۰٪ سبب افزایش لیپوژنز شده، ولی افزایش بیان فرم جهش یافته SHIP2 در مقایسه با GFP به میزان ۲۶٪ باعث کاهش لیپوژنز القاء شده توسط اولئات می‌گردد (شکل ۱ ب).

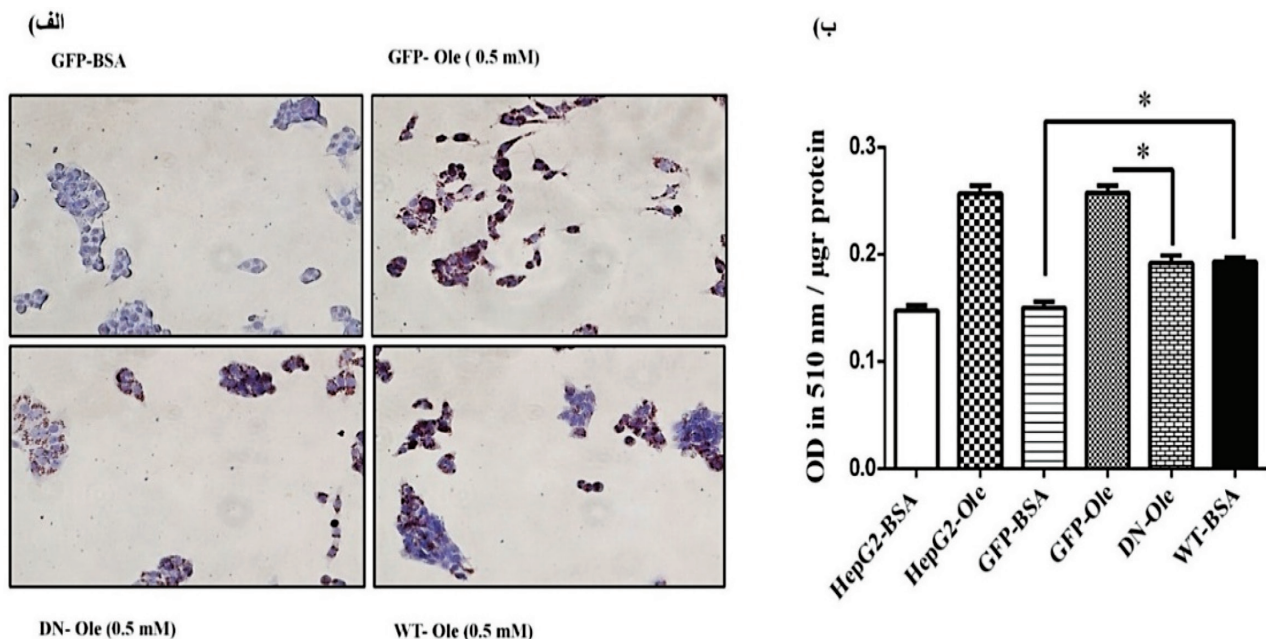
داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. ($P < 0.05$) در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده ویروس GFP.

اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر تولید تری گلیسرید داخل و خارج سلولی در آزمایش دیگر و جهت بهتر نشان دادن نقش تغییرات SHIP2 در لیپوژنز سلول‌های کبدی، میزان تری گلیسرید خارج و داخل سلولی توسط کیت حساس شرکت Biovision با قدرت اندازه‌گیری ۰/۰۱ نانومول اندازه گرفته شد. نتایج نشان داد افزایش بیان شکل طبیعی SHIP2 سبب افزایش تولید تری گلیسرید داخل سلولی به میزان ۱/۲۲ برابر و کاهش فعالیت SHIP2 از طریق افزایش بیان شکل جهش یافته ژن SHIP2 سبب کاهش ۲۴ درصدی تری گلیسرید داخل سلولی در مقایسه با گروه کنترل (GFP) شد (شکل ۲ الف). همچنین نتایج مطالعه نشان می‌دهد افزایش بیان شکل طبیعی SHIP2

بیان ژن طبیعی و توالی غالب منفی SHIP2 (Dominant Negative) بر میزان لیپوژنز کبدی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از سلول‌های HepG2 استفاده شده که در محیط DMEM در آتمسفر مرطوب دارای ۵٪ CO_2 و در دمای $37^\circ C$ کشت شدند. به منظور بررسی نقش ژن SHIP2 در لیپوژنز با استفاده از سیستم رتروویروس بیان این ژن افزایش و کاهش یافته است. جهت القا لیپوژنز، سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه و فلاسک ۲۵ سانتی مترمربع توسط غلظت ۰/۵ میلی مولار اسید چرب اولئات به مدت ۲۴ ساعت به شرح زیر تیمار شدند. ابتدا مقدار مورد نیاز اولئات در اتانول ۵۰٪ حل شده و محلول فوق به محیط DMEM حاوی ۱٪ وزنی حجمی آلبومین عاری از اسید چرب اضافه شد. برای کنتر و گه نمودن اسیدهای چرب، محلول فوق همراه با تکان‌های ملایم به صورت شبانه یا دو ساعت در دمای $37^\circ C$ قرار داده شده و سپس این محیط فیلتر گردید. در مرحله بعد سلول‌های HepG2 آماده تیمار به مدت ۴ ساعت در محیط عاری از سرم که شامل DMEM همراه با ۱٪ W/V آلبومین عاری از اسید چرب است، تیمار شدند. در مرحله نهایی این محیط کشت با محیط کشت کنتر و گه شده با اسید چرب جایگزین شده و سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت آماده بهره‌برداری برای مراحل بعدی تحقیق گردیدند. سلول‌های کنترل در این مطالعه با محیط دارای ۱٪ آلبومین عاری از اسید چرب تیمار شدند. جهت بررسی لیپوژنز از رنگ آمیزی Oil Red O به عنوان شاخص لیپید تام سلولی استفاده شده است. نتایج کیفی Oil Red O توسط محلول نمودن رنگ و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در ۵۱۰ نانومتر به صورت کمی گزارش شده است. میزان تری گلیسرید داخل و خارج سلولی با استفاده از کیت حساس شرکت Biovision اندازه گرفته شده است. به منظور بررسی نقش ژن SHIP2 در لیپوژنز القایی، بیان ژنهای دخیل در لیپوژنز مثل ACC، FAS، SREBP1c در سطح mRNA از تکنیک Real time PCR و در سطح پروتئین از تکنیک وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی در سلول‌هایی که بیان SHIP2 در آنها تغییر یافته است (WT: افزایش بیان SHIP2، DN: کاهش فعالیت SHIP2 و GFP سلول کنترل) ارزیابی شده است. تمام نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SD)

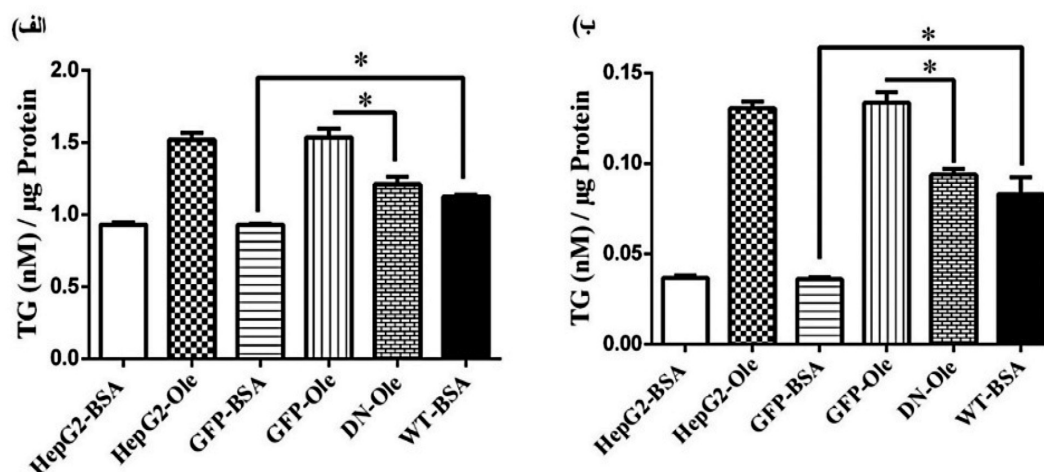


شکل ۱- اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر محتوای تام لیپیدی در حضور اولئات. الف) نتایج کیفی رنگ آمیزی Oil Red O (ب) نتایج کمی رنگ آمیزی Oil Red O: BSA: آلبومین سرم گاو، Ole: اولئات ۰/۵ میلی مولار، DN: شکل جهش یافته ژن SHIP2، WT: شکل طبیعی ژن SHIP2، سلول HepG2 حاوی ویروس GFP: جذب نوری در ۵۱۰ نانومتر

اثر تغییر بیان SHIP2 بر بیان ژنهای دخیل در لیپوژنز در سطح mRNA

در ادامه مطالعه و جهت تأیید داده‌های قبلی، اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر بیان ژنهای مهم در لیپوژنز مورد ارزیابی قرار گرفت. از این ژنها می‌توان به ژن SREBP1c اشاره نمود که به عنوان یک فاکتور رونویسی در تنظیم رونویسی ژنهای دیگر دخیل در لیپوژنز (ACC و FAS) مطرح می‌باشد. FAS و ACC دو آنزیم مهم

سبب افزایش تولید تری گلیسرید خارج سلولی به میزان ۲/۳ برابر و کاهش فعالیت SHIP2 سبب کاهش ۳۰ درصدی در مقایسه با گروه کنترل (GFP) می‌شود (شکل ۲ ب). 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.



شکل ۲- اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر تولید تری گلیسرید. الف) تری گلیسرید داخل سلولی. ب) تری گلیسرید خارج سلولی. BSA: آلبومین سرم گاو، Ole: اولئات ۰/۵ میلی مولار، DN: شکل جهش یافته ژن SHIP2، WT: شکل طبیعی ژن SHIP2، سلول HepG2 حاوی ویروس GFP

فاکتور باعث خروج آن از هسته و کاهش رونویسی از ژنهای دخیل در لیپوژنز می‌گردد. بنابراین افزایش فسفریلاسیون FoxO1 سبب کاهش بیان SREBP1c و کاهش لیپوژنز می‌گردد (۱۸, ۱۹). نتایج این تحقیق بیانگر این است که افزایش بیان شکل طبیعی SHIP2 سبب افزایش بیان پروتئین SREBP1c به میزان ۲/۵۱ برابر و کاهش بیان پروتئینهای p-FoxO1 و p-ACC به ترتیب به میزان ۳۳٪ و ۱۳٪ می‌گردد. همچنین کاهش فعالیت SHIP2 در سلولهای SHIP2-DN سبب کاهش بیان SREBP1c به میزان ۵۵٪ و افزایش بیان p-ACC و p-FoxO1 به ترتیب به میزان ۳/۱ و ۱/۹۳ برابر در مقایسه با گروه کنترل (GFP) گردید (شکل ۴).

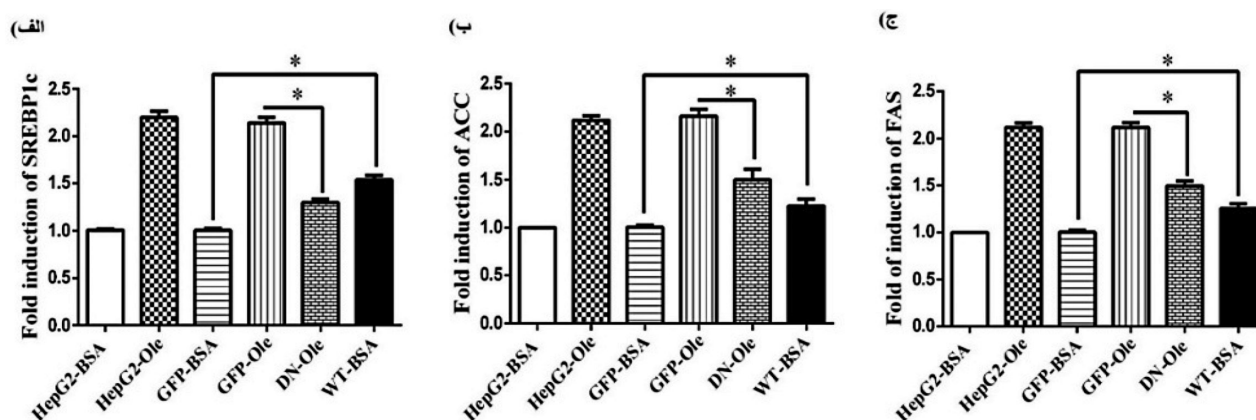
بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر شواهد آزمایشگاهی فراهم شد که نشان می‌دهد اولئات با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به عنوان یک القاء کننده مطلوب لیپوژنز قادر است لیپید توتال، بیان ژنها و پروتئینهای دخیل در لیپوژنز را القاء نماید. مهار SHIP2 با استفاده از ژن موتانت غالب منفی SHIP2، باعث کاهش لیپوژنز القاء شده توسط اولئات و افزایش بیان SHIP2 به تنهایی و در عدم حضور اولئات سبب افزایش لیپوژنز در سلولهای HepG2 می‌شود. علاوه بر این، تغییرات SHIP2 مراحل مختلف لیپوژنز را از طریق القای بیان ژنهای لیپوژنیک مثل FAS و ACC و فاکتورهای رونویسی مثل SREBP1c و FoxO1 تحت تأثیر قرار می‌دهد. پس از مشخص شدن اثر تغییرات SHIP2 بر لیپوژنز کبدی، سوال

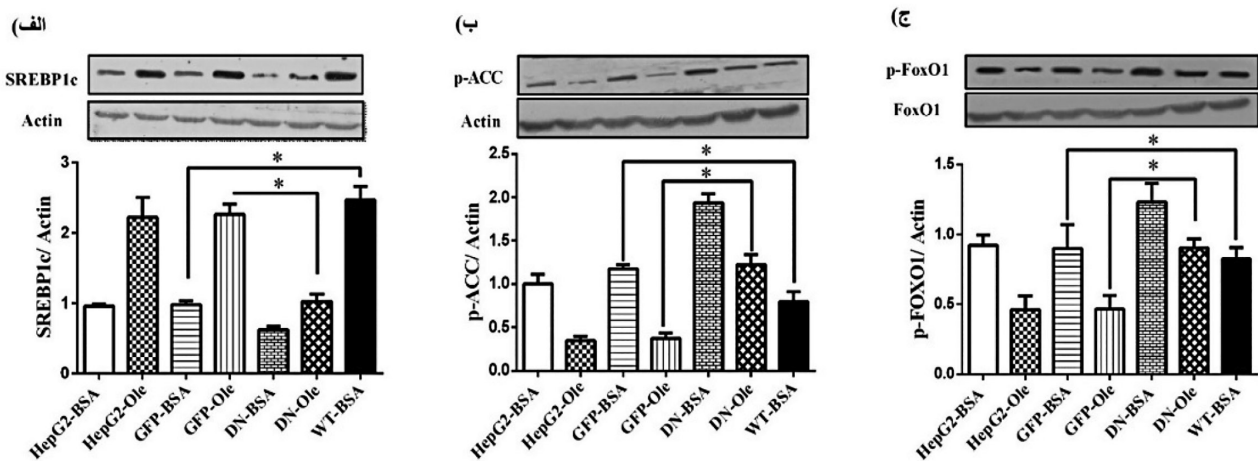
لیپوژنز می‌باشند. ACC فراهم کننده سوسترای لیپوژنز بوده و FAS آخرین آنزیم سنتز کننده اسید چرب می‌باشد. مطالعات متعدد روی حیوانات ترانسژنیک فاقد این دو آنزیم نقش کلیدی این دو آنزیم را در لیپوژنز کبدی نشان داده‌اند (۱۶, ۱۷). نتایج این تحقیق مبین این مسأله است که افزایش بیان شکل طبیعی SHIP2 سبب افزایش بیان ژنهای SREBP1c, ACC و FAS به ترتیب به میزان ۱/۵۳, ۱/۲۸ و ۱/۳ برابر شده و کاهش فعالیت SHIP2 در سلولهای SHIP2-DN سبب کاهش ۴۰, ۳۱ و ۳۰ درصدی بیان ژنهای فوق در مقایسه با گروه کنترل (GFP) گردید (شکل ۳).

اثر تغییر بیان SHIP2 بر بیان ژنهای مهم لیپوژنز در سطح پروتئین

به منظور تأیید نتایج مرحله قبل، اثر تغییر بیان ژن SHIP2 بر بیان ژنهای مهم لیپوژنز در سطح پروتئین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در بخش قبلی بطور مختصر به اهمیت فاکتور رونویسی SREBP1c و آنزیمهای لیپوژنیک FAS و ACC پرداخته شد. یکی از فاکتورهای رونویسی مهم تنظیم کننده دیگر متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها فاکتور FoxO1 می‌باشد. این فاکتور رونویسی به خانواده Forkhead box class-O transcription factor (FoxO1) تعلق داشته و یکی از واسطه‌های عملکردی انسولین و فاکتورهای رشد می‌باشد. این فاکتور به مقدار زیادی در کبد بیان شده و در تنظیم گلوکونئوژنز و لیپوژنز کبدی نقش دارد. فسفریلاسیون وابسته به Akt/PKB این



شکل ۳- نقش تغییر بیان ژن SHIP2 بر بیان ژنهای مهم لیپوژنز. (الف) ژن SREBP1c (ب) ژن ACC (ج) ژن FAS. BSA: آلبومین سرم گاو، Ole: اولئات ۰/۵ میلی‌مولار، 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. *، $P < 0.05$ در مقایسه با سلولهای دریافت کننده ویروس GFP.



شکل ۴- نقش تغییر بیان ژن SHIP2 بر بیان پروتئین‌های مهم لیپوژنز. الف) پروتئین SREBP1c (ب) پروتئین p-ACC (ج) پروتئین p-FoxO1. BSA: آلبومین سرم گاو، Ole: اولئات ۵٪ میلی مولار، 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. *، $P < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده ویروس GFP.

تحقیق فراهم آورده‌اند. در همین ارتباط مطالعات گذشته نشان داده که فقدان SHIP2 کبدی در مدل حیوانی، باعث بهبود تحمل گلوکز و افزایش حساسیت به انسولین در موش‌های دیابتی از طریق تأثیر بر متابولیسم گلوکز می‌گردد (۲۲). Fukui و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مدل حیوانی با استفاده از سیستم آدنوویروس نشان دادند افزایش بیان فرم طبیعی SHIP2 سبب القا مقاومت به انسولین و هیپرگلیسمی گردیده و کاهش فعالیت SHIP2 از طریق افزایش بیان فرم موتانت آن سبب بهبود مقاومت به انسولین شده است. علاوه بر این، این مطالعه نقش SHIP2 را در کنترل متابولیسم گلوکز از طریق مسیر Akt/PKB نشان داد (۲۳). در مطالعه دیگری Sleeman و همکارانش نشان دادند عدم وجود SHIP2 در مدل حیوانی با استفاده از خاموش نمودن ژن، باعث حساسیت به انسولین شدید، هیپوگلیسمی و مقاومت به چاقی القا شده توسط رژیم پرچربی می‌گردد (۲۴). گفتنی است این مطالعه‌ها اثر SHIP2 را بر متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین مورد بررسی قرار نداده‌اند. در مجموع مطالعه حاضر شواهدی را فراهم آورده که تغییرات SHIP2 سبب تغییر در لیپوژنز سلول‌های کبدی می‌گردد. به گونه‌ای که افزایش SHIP2 سبب القا لیپوژنز و مهار SHIP2 از بهبود سیگنالینگ انسولین لیپوژنز القا شده توسط غلظت بالای گلوکز در سلول‌های کبدی می‌شود.

مطرح شده این است که SHIP2 از طریق چه مکانیسم مولکولی بر لیپوژنز اثر می‌گذارد؟ مکانیسمی که توسط آن SHIP2 قادر به تأثیر بر متابولیسم لیپید است احتمالاً از طریق اثر بر مسیر انتقال پیام انسولین باشد. از آنجایی که انسولین تنظیم کننده متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین‌ها است، تنظیم لیپوژنز کبدی و تولید لیپوپروتئین‌ها به شدت توسط عملکرد صحیح انسولین کنترل می‌گردد (۱). انسولین از طریق مکانیسم وابسته به PI3K-Akt سبب القاء SREBP1c و لیپوژنز می‌گردد (۲۰)، با این حال عوامل و حواسط‌های پایین دست این مسیر به درستی شناخته شده نیستند. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش بیان SHIP2 علیرغم کاهش فعالیت Akt باعث افزایش بیان SREBP1c و ژنهای هدف آن می‌شود (۲۱). با توجه به مطالعات قبلی که نشان از وابستگی SREBP1c به Akt داشتند، به نظر می‌رسد اثرات SHIP2 بر لیپوژنز و بطور دقیق‌تر بر SREBP1c از طریق یک مکانیسم غیر وابسته به Akt در سلول‌های HepG2 اعمال می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد که SHIP2 احتمالاً سرعت لیپوژنز را تحت تأثیر قرار داده که نهایتاً سبب فراهم شدن سوسترای تولید و ترشح VLDL در سلول‌های کبدی می‌گردد. اگرچه تاکنون هیچ مطالعه‌ای مستقیماً به نقش SHIP2 در متابولیسم لیپید و لیپوپروتئین نپرداخته است، برخی مطالعات انجام شده شواهد غیر مستقیمی را در حمایت از داده‌های این

References

- 1- Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical biochemistry*. 2009;42 (13): 1331-46.
- 2- M, Zhong S, Khalil MB, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *Journal of lipid research*. 2010;51 (1): 150-61.
- 3- Parvaneh L, Meshkani R, Bakhtiyari S, MohammadTaghvaei N, GorganiFiruzjaee S, TaheriPak G, et al. Palmitate and inflammatory state additively induce the expression of PTP1B in muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;396 (2): 467-71.
- 4- Gorgani-Firuzjaee S, Meshkani R. 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;89: 679-89.
- 5- Khodabandehloo H, Gorgani-Firuzjaee S, Panahi G, Meshkani R. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction. *Translational Research*. 2016;167 (1): 228-56.
- 6- Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica chimica acta*. 2006;368 (1): 1-19.
- 7- Nasimian A, Taheripak G, Gorgani-Firuzjaee S, Sadeghi A, Meshkani R. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) modulates palmitate-induced cytokine production in macrophage cells. *Inflammation Research*. 2013;62 (2): 239-46.
- 8- Gorgani-Firuzjaee S, Ahmadi S, Meshkani R. Palmitate induces SHIP2 expression via the ceramide-mediated activation of NF- κ B, and JNK in skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450 (1): 494-9.
- 9- Gorgani-Firuzjaee S, Bakhtiyari S, Golestani A, Meshkani R. Leukocyte antigen-related inhibition attenuates palmitate-induced insulin resistance in muscle cells. *Journal of Endocrinology*. 2012;215 (1): 71-7.
- 10- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes & Development*. 2000;14 (5): 505-20.
- 11- Wada T, Sasaoka T, Funaki M, Hori H, Murakami S, Ishiki M, 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): 1633-46.
- 12- Sasaoka T, Wada T, Tsuneki H. Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;112 (3): 799-809.
- 13- Buettner R, Ottinger I, Gerhardt-Salbert C, Wrede CE, Schölmerich J, Bollheimer LC. 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): E1871-E8.
- 14- Gorgani-Firuzjaee S, Adeli K, Meshkani R. 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): 441-6.
- 15- Ramirez-Zacarias J, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 1992;97 (6): 493-7.
- 16- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118 (3): 829.
- 17- Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes & metabolism*. 2008;34 (6): 643-8.
- 18- Deng X, Zhang W, InSug O, Williams JB, Dong Q, Park EA, et al. FoxO1 inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene expression via transcription factors Sp1 and SREBP-1c. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287 (24): 20132-43.
- 19- Haeusler RA, Hartil K, Vaitheesvaran B, Arrieta-Cruz I, Knight CM, Cook JR, et al. Integrated control of hepatic lipogenesis versus glucose production requires FoxO transcription factors. *Nature communications*. 2014;5.
- 20- Park Y, Yuk T, Lee J. Nobiletin Attenuates High Glucose-induced Lipid Accumulation in HepG2 Hepatocytes through Activation of AMP-activated Protein Kinase-dependent Signaling. *The FASEB Journal*. 2015;29 (1 Supplement): 917.4.
- 21- Vakili S, Ebrahimi SSS, Sadeghi A, Gorgani-Firuzjaee S, Beigy M, Pasalar P, et al. Hydrodynamic-based delivery of PTP1B shRNA reduces plasma glucose levels in diabetic mice. *Molecular medicine reports*. 2013;7 (1): 211-6.
- 22- Gorgani-Firuzjaee S, Khatami S, Meshkani R. 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): 1028-33.
- 23- Fukui K, Wada T, Kagawa S, Nagira K, Ikubo M, Ishihara H, 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): 1958-67.

24- Sleeman MW, Wortley KE, Lai K-MV, Gowen LC, Kintner J, Kline WO, et al. Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nature medicine*. 2005;11 (2): 199-205.