

بررسی اثر کاهش بیان ژن پروتئین تیروزین فسفاتاز-1B (PTP-1B) بر میزان برداشت گلوکز و غلظت تری گلیسرید سلول‌های عضلانی تیمار شده با پالمیتات

سالار بختیاری^۱، رضا مشکانی^{۲*}، محمد تقی خانی^۳، باقر لاریجانی^۴

چکیده

مقدمه: مقاومت به انسولین، یک نقص کلیدی در چاقی و دیابت نوع ۲ می‌باشد. طی مقاومت به انسولین، تجمع لیپید و افزایش بیان ژن PTP-1B در عضله اسکلتی رخ می‌دهد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر کاهش بیان PTP-1B بر مقاومت به انسولین القاء شده توسط پالمیتات می‌باشد.

روش‌ها: از پلاسמיד حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B برای کاهش بیان PTP-1B در میوبلاست‌های C2C12 استفاده شد. تأیید کاهش بیان PTP-1B با وسترن بلاتینگ انجام گردید. سپس میزان برداشت گلوکز و غلظت تری گلیسرید در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های طبیعی در حضور اسید چرب پالمیتات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه نشان داده شد که میزان بیان PTP-1B در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B نسبت به سلول‌های طبیعی ۵۸٪ کاهش یافته است ($P < 0/05$). بعلاوه، برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حالت بدون تیمار در مقایسه با پالمیتات ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار به ترتیب ۲/۳، ۲/۵ و ۳ برابر سلول‌های طبیعی می‌باشد ($P < 0/01$). نتایج حاصل از سنجش محتوای تری گلیسرید نیز نشان می‌دهد که در حالت تیمار با ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات، غلظت تری گلیسرید در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B به ترتیب تقریباً ۱/۲۵ و ۱/۴۲ برابر میوتیوب‌های طبیعی می‌باشد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کاهش بیان PTP-1B ضمن افزایش میزان تری گلیسرید درون سلولی، منجر به افزایش حساسیت به انسولین در سلول‌های C2C12 شده که این حساسیت حتی در حضور پالمیتات نیز حفظ می‌شود. بنابراین، PTP-1B می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی بالقوه برای درمان مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ مطرح باشد.

واژگان کلیدی: پروتئین تیروزین فسفاتاز-1B، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲، برداشت گلوکز، پالمیتات

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

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

۳- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تلفن: ۰۹۱۲۴۹۰۱۰۹۶، نمابر: ۰۲۱-۶۴۰۵۳۳۸۵، پست الکترونیک: rmeshkani@tums.ac.ir

مقدمه

دیابت نوع ۲، یک اختلال متابولیکی است که از طریق مقاومت به انسولین و کاهش نسبی تولید انسولین ایجاد می‌گردد. مقاومت به انسولین کاهش توانایی سلول یا بافت‌ها در پاسخ به غلظت‌های فیزیولوژیک انسولین می‌باشد. عوامل ژنتیکی و محیطی از قبیل افزایش سن، چاقی، عدم تحرک و استرس، با مقاومت به انسولین در ارتباط هستند [۱]. به نظر می‌رسد که افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد پلازما از طریق تداخل با مسیر پیام‌رسانی انسولین، منجر به کاهش حساسیت به انسولین در بافت‌های هدف انسولین (به ویژه عضله) می‌شوند [۲]. مهمترین اسید چرب آزاد موجود در گردش خون، پالمیتات است [۳]. مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده‌اند که پالمیتات در بافت‌های هدف انسولین منجر به مقاومت به انسولین می‌شود [۶-۴]. با توجه به این که عضله اسکلتی ۸۰٪ برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین را بر عهده دارد، مهمترین بافت هدف برای این انسولین است [۷، ۸]. با این وجود، هنوز سازوکاری که از طریق آن اسیدهای چرب آزاد پلازما منجر به مقاومت به انسولین در عضله اسکلتی می‌شوند، بطور دقیق شناسایی نشده است.

مجموعه‌ای از مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که یک رابطه نزدیک بین افزایش محتوای تری‌گلیسرید عضله اسکلتی و مقاومت به انسولین وجود دارد [۹]. اما اخیراً نشان داده شده است افزایش سنتز تری‌گلیسرید در عضله اسکلتی منجر به بهبود حساسیت به انسولین می‌شود [۱۰]. در حال حاضر مشخص شده که افزایش پالمیتات منجر به افزایش تجمع حد واسط‌های لیپیدی، از قبیل دی‌آسیل گلیسرول (DAG) و سرامید در سلول‌های عضله اسکلتی شده که این حد واسط‌ها از طریق مهار پیام‌رسانی انسولین، باعث القای مقاومت به انسولین می‌شوند [۱۱، ۱۲]. مجموعاً این که امروزه بیشتر تحقیقات در این زمینه بر روی مسیر پیام‌رسانی انسولین متمرکز شده و به نظر می‌رسد اختلالات مسیر پیام‌رسانی انسولین در پی افزایش اسید چرب، عامل اصلی مقاومت به انسولین باشد [۱۳]. لذا شناسایی عوامل موثر در این مسیر می‌تواند در شناسایی سازوکار مولکولی القای مقاومت به انسولین توسط اسید چرب کمک شایانی نماید.

پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPs)، گروهی از آنزیم‌ها بوده که کنترل بسیاری از مسیرهای متابولیکی به ویژه مسیرهای پیام‌رسانی سلولی را بر عهده دارند [۱۴]. مطالعات *In vitro* و *In vivo* و مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که PTP-1B، مهمترین آنزیم این خانواده بوده و به عنوان تنظیم کننده منفی اصلی مسیر پیام‌رسانی انسولین مطرح می‌باشد که گیرنده انسولین و سوسترای آن را دفسفریله می‌کند [۱۵، ۱۶]. مطالعات انسانی و حیوانی نشان دهنده این مطلب است که در افراد چاق و بیماران دیابتی، فعالیت و بیان PTP-1B افزایش می‌یابد [۱۷، ۱۸]. از طرف دیگر، در مدل حیوانی موش فاقد ژن PTP-1B ($PTP1B^{-/-}$)، افزایش حساسیت به انسولین، طولانی بودن مدت اتوفسفریلاسیون گیرنده انسولین، مقاومت به چاقی تحت رژیم غذایی پرچرب، افزایش میزان متابولیسم پایه و مصرف انرژی و افزایش قابل توجه در مصرف گلوکز مشاهده شد [۱۹]. همچنین کاهش بیان PTP-1B با استفاده از الیگونوکلوئید آنتی‌سنس و مهارکننده‌های غیراختصاصی PTP-1B سبب افزایش فسفریلاسیون تیروزین گیرنده انسولین و افزایش حساسیت به انسولین می‌شود [۲۲-۱۹]. مجموعه این یافته‌ها شواهد مطمئنی را فراهم می‌آوردند که PTP-1B در تنظیم مسیر پیام‌رسانی انسولین نقش داشته و بنابراین این آنزیم می‌تواند در پاتوژنز مقاومت به انسولین، سندرم متابولیک و دیابت نوع ۲ نقش داشته باشد. در نتیجه، به نظر می‌رسد که کاهش بیان PTP-1B به عنوان یک هدف درمانی مهم در بهبود مقاومت به انسولین القاء شده توسط اسید چرب پالمیتات مفید باشد.

در این مطالعه اثر کاهش بیان ژن PTP-1B بر مقاومت به انسولین القاء شده با پالمیتات و همچنین بر میزان تری‌گلیسرید درون سلولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش‌ها

تهیه پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B

پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B (*ptpn1*) از شرکت OriGene خریداری شد. این پلاسمیدها با روش کلرید کلسیم به درون باکتری *E. coli* سوش DH5 α

سپس پروتئین‌ها از ژل به غشای PVDF منتقل شده و یک شب در ۲ درصد BSA انکوبه گردید تا از اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی با غشاء ممانعت شود. در مرحله بعد، غشاء با آنتی‌بادی اولیه علیه PTP-1B یا β -actin به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. پس از ۴ بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای، غشاء به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه با HRP انکوبه گردید. ۴ بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای انجام شد و سپس غشاء با سوبسترای کمی لومینوسانس ECL به مدت ۱-۲ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله بعد، غشاء با فیلم رادیولوژی حساس مجاور شد. سپس فیلم با استفاده از محلول‌های ظهور و تثبیت ظاهر گردید. فیلم اسکن شده و غلظت پروتئین با نرم‌افزار Scion Image آنالیز گردید. سپس با تقسیم غلظت باند PTP-1B به غلظت باند β -actin متناظرش، مقدار بیان PTP-1B نرمالیزه بدست آمد. هر آزمایش حداقل سه بار انجام شد.

تیمار با پالمیتات

برای اینکه پالمیتات بتواند در دسترس سلول قرار گیرد، باید با BSA فاقد اسید چرب کانژوگه گردد. به این منظور، غلظت‌های مورد نیاز از سدیم پالمیتات در اتانول ۰/۵٪ حل شده و این محلول به DMEM حاوی ۱ درصد BSA اضافه شد. سپس این محیط به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی تکان دهنده (Shaker) انکوبه گردید. پس از ۲ ساعت، این محیط فیلتر گردید و در اختیار میوتیوب‌های C2C12 قرار گرفت.

آزمایش برداشت گلوکز (Glucose uptake)

این آزمایش با استفاده از $[^3\text{H}]-2$ - داکسی گلوکز ($[^3\text{H}]-2$) (DOG) انجام شد. در این روش، میوتیوب‌های C2C12 با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات تیمار شدند. ۱۶ ساعت بعد، میوتیوب‌ها در حضور و عدم حضور انسولین ۱۰۰ نانومولار به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردیدند. سپس سه بار با بافر شستشو (۲۰ میلی‌مولار HEPES، ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl، ۵ میلی‌مولار KCl، ۲/۵ میلی‌مولار MgSO_4 و ۱ میلی‌مولار CaCl_2) شستشو داده شدند. در مرحله بعد، میوتیوب‌ها در بافر ترانسپورت (بافر شستشوی

ترانسفورم گردید. بعد از انتخاب با آمپی‌سیلین، یک کلونی رشد داده شد و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Qiagen، پلاسمید از آن استخراج گردید. این پلاسمید برای کاهش بیان PTP-1B در آزمایش ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول

میوبلاست C2C12 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. این سلول در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2) نگهداری گردید. هنگامی که سلول‌ها ۸۰-۷۰ درصد کف فلاسک را پر نمودند، به میوتیوب تمایز داده شدند. برای این کار، محیط کشت با محیط تمایز (DMEM حاوی ۲ درصد سرم اسب و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک) تعویض گردید.

ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات

برای وارد کردن پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن ptpn1 به درون میوبلاست‌های C2C12، از روش کلسیم فسفات استفاده شد [۲۴،۲۳]. بطور خلاصه، تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت داده شد. روز بعد ترانسفکشن با غلظت ۱۵ میکروگرم از پلاسمید انجام شد. برای بررسی کارآمدی روش ترانسفکشن در یکی از چاهک‌ها از پلاسمید GFP (Green Fluorescent Protein) استفاده گردید و ۴۸ ساعت بعد با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد.

وسترن بلائینگ

۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، عصاره پروتئینی سلول‌های C2C12 از طریق همورژنه کردن آنها در بافر RIPA (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱ درصد تریتون-X100، ۰/۲ درصد سدیم داکسی‌کولات، ۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۱ میلی‌مولار PMSF) استخراج شده و غلظت آن بر اساس روش برادفورد اندازه‌گیری شد. ۲۰-۳۰ میکروگرم از عصاره پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد.

پلاسمید به درون میوبلاست‌های C2C12 است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، سلول‌هایی که پلاسمید GFP را دریافت می‌کنند، پس از ۴۸ ساعت در زیر نور ماوراء بنفش رنگ به رنگ سبز دیده می‌شوند.

نتایج حاصل از ترانسفکشن با پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B

برای بررسی میزان کاهش بیان PTP-1B در میوبلاست‌های ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B، وسترن بلاتینگ انجام شد. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ نشان می‌دهد که میزان بیان PTP-1B در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B تا ۵۸٪ کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$) (شکل ۲).

نتایج حاصل از برداشت گلوکز

نتایج برداشت گلوکز نشان می‌دهد که میزان برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حالت بدون تیمار با پالمیتات ۲/۳ برابر، در حالت تیمار با ۰/۵ میلی‌مولار پالمیتات برابر و در حالت تیمار با ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات ۳ برابر میوتیوب‌های طبیعی می‌باشد ($P < 0.001$). این مطلب نشان می‌دهد که اثر مهار پالمیتات بر روی برداشت گلوکز در سلول‌های طبیعی بیشتر از سلول‌های کاهش بیان یافته است. تفاوت معناداری در برداشت گلوکز پایه (بدون تحریک با انسولین) بین میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و میوتیوب‌های طبیعی وجود نداشت ($P < 0.001$). در ضمن، این آزمایش نشان می‌دهد که پالمیتات بطور معناداری باعث القای مقاومت به انسولین (کاهش برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین) هم در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و هم میوتیوب‌های طبیعی می‌شود (شکل ۳).

نتایج حاصل از سنجش تری‌گلیسرید

برای بررسی اثر کاهش بیان ژن PTP-1B بر محتوای لیژییدی درون سلولی، میزان تری‌گلیسرید اندازه‌گیری شد. نتایج

حاوی ۰/۵ میلی‌کوری $[^3H]2\text{-DOG}$ در میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌مولار (2-DOG) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیدند. سپس سلول‌ها ۳ بار با بافر فسفات سرد شستشو داده شدند تا واکنش برداشت گلوکز متوقف گردد. در مرحله بعد، سلول‌ها در ۰/۰۵ مولار NaOH لیز شده و با استفاده از شمارشگر بتا میزان تشعشع بتای آنها اندازه‌گیری گردید. برداشت غیر اختصاصی گلوکز برای هر تیمار در حضور و عدم حضور سیتوکالازین ۱۰ میکرومولار محاسبه شد. مقدار شمارش بتای هر نمونه با توجه به غلظت پروتئین آن نرمالیزه گردید.

اندازه‌گیری محتوای تری‌گلیسرید

استخراج لیپید بر اساس روش Floch انجام شد [۲۵]. سپس ۱۰ میکرولیتر از لیپید استخراج شده برای اندازه‌گیری تری‌گلیسرید استفاده گردید. اندازه‌گیری تری‌گلیسرید با استفاده از کیت RANDOX و بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. سپس مقدار تری‌گلیسرید هر نمونه با توجه به غلظت پروتئین آن نرمالیزه گردید.

آنالیز آماری

تمام آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۳ انجام شد. مقایسه‌های بین تمام گروه‌ها با استفاده از آزمون ANOVA انجام گردید. اگر تفاوت معنادار آماری وجود داشت، از آزمون Tukey post hoc استفاده شد. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

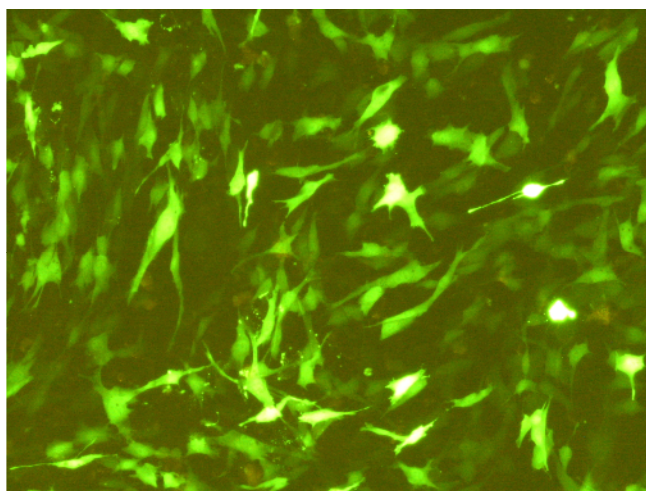
یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی کارایی ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات

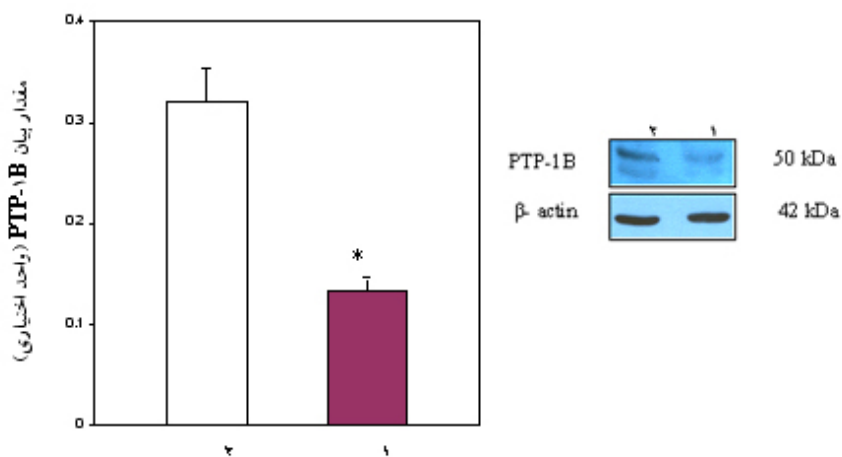
همانطور که در بخش روش‌ها ذکر شد، برای بررسی کارایی روش ترانسفکشن با کلسیم فسفات از پلاسمید GFP استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که این روش بسیار کارآمد برای وارد نمودن

میلی مولار پالمیتات، غلظت تری گلیسرید در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B به ترتیب تقریباً ۱/۲۵ و ۱/۴۲ برابر میوتیوب‌های طبیعی می‌باشد ($P < 0/05$) (شکل ۴).

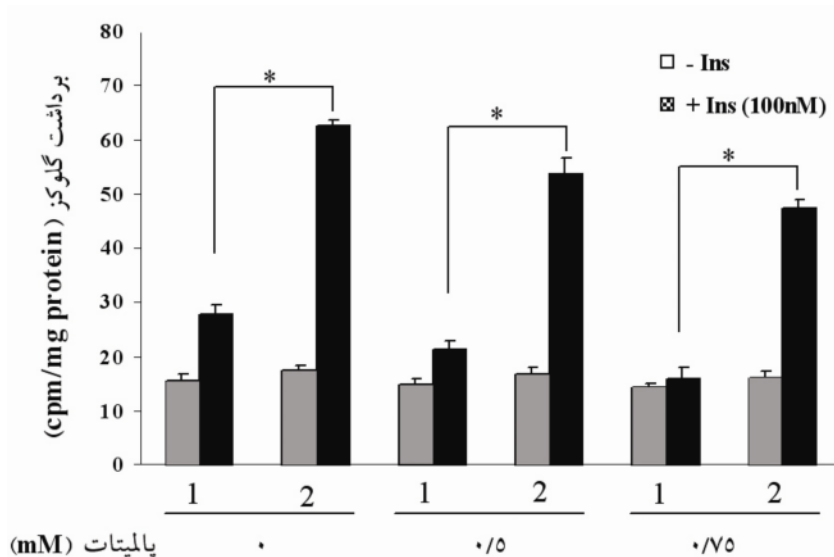
حاصل از سنجش محتوای تری گلیسرید نشان می‌دهد که میزان این ترکیب در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و میوتیوب‌های طبیعی در حالت بدون تیمار با پالمیتات تفاوت معناداری ندارد، اما در حالت تیمار با ۰/۵ و ۰/۷۵



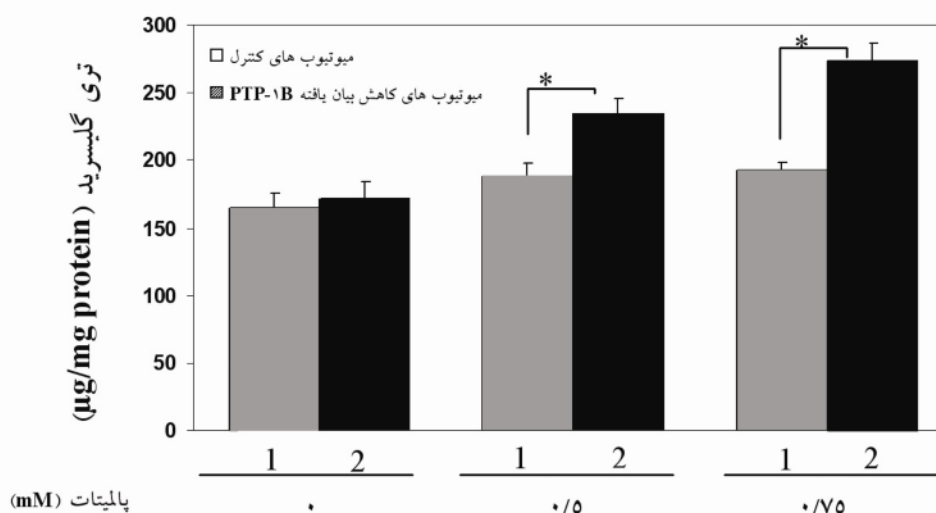
شکل ۱- میوبلاست‌های C2C12 ترانسفکت شده با پلاسمید GFP. میوبلاست‌هایی که این پلاسمید را دریافت نموده‌اند، در نور ماوراء بنفش با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شوند.



شکل ۲- نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ میوبلاست‌های C2C12 ترانسفکت شده با پلاسمید فاقد shRNA و پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن PTP-1B. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. *، $P < 0/01$.



شکل ۳- آزمایش برداشت گلوکز در میوتیوب‌های طبیعی و میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حضور و عدم حضور پالمیتات. برداشت گلوکز پایه (-Ins) به صورت مستطیل‌های خاکستری و برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین ۱۰۰ نانومولار (+Ins) به صورت مستطیل‌های سیاه رنگ نشان داده شده‌اند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. *، $P < 0.001$.



شکل ۴- سنجش غلظت تری‌گلیسرید در میوتیوب‌های طبیعی و میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حضور و عدم حضور پالمیتات. غلظت تری‌گلیسرید در میوتیوب‌های طبیعی به صورت مستطیل‌های خاکستری و غلظت تری‌گلیسرید در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B به صورت مستطیل‌های سیاه رنگ نشان داده شده‌اند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. *، $P < 0.05$.

سویسترای گیرنده انسولین به عنوان آنتاگونیست عملکرد انسولین عمل می‌کند [۱۵]. نشان داده شده است که فقدان ژن PTP-1B در عضله اسکلتی موش منجر به افزایش حساسیت به انسولین، افزایش فسفریلاسیون تیروزین گیرنده انسولین و سویسترای گیرنده انسولین و افزایش محتوای تری‌گلیسرید در عضله شده و این حیوانات نسبت

بحث

مطالعات In vitro و In vivo بسیاری نقش PTP-1B را به عنوان تنظیم کننده منفی اصلی گیرنده انسولین (IR) و عملکرد انسولین تأیید نموده‌اند [۲۶]. PTP-1B از طریق دفسفریلاسیون مستقیم تیروزین گیرنده انسولین و

به چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب مقاوم می‌باشند [۱۹-۲۲]. همچنین نشان داده شده است که در عضله اسکلتی موش‌های طبیعی تحت رژیم غذایی پرچرب، افراد چاق، افراد مقاوم به انسولین و افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ بیان PTP-1B افزایش می‌یابد [۱۷،۱۸].

مطالعات متعدد در بیماران دیابتی و غیردیابتی نشان دهنده این مطلب است که افزایش اسید چرب باعث افزایش مقاومت به انسولین در این افراد می‌گردد. از بین اسیدهای چرب، پالمیتات دارای بیشترین غلظت در خون بوده و مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پالمیتات باعث القای مقاومت به انسولین در عضله اسکلتی می‌شود [۳-۵]. همچنین نشان داده شده است که القای مقاومت به انسولین توسط پالمیتات منجر به افزایش بیان PTP-1B در میوتیوب‌های C2C12 می‌شود [۲۷]. در واقع، در حالت تیمار با پالمیتات، افزایش بیان PTP-1B در میوتیوب‌های C2C12 رخ می‌دهد. با توجه به اینکه PTP-1B تنظیم کننده منفی اصلی مسیر پیام‌رسانی انسولین می‌باشد، افزایش بیان آن منجر به افزایش دفسفریلاسیون تیروزین گیرنده انسولین و سوبسترای گیرنده انسولین شده که در نتیجه پیام‌رسانی فرودست انسولین کاهش می‌یابد. کاهش پیام‌رسانی انسولین در نهایت منجر به کاهش فعال‌سازی PKB (یا Akt) شده که نقش مهمی در برداشت گلوکز ایفا می‌نماید. در این مطالعه نشان داده شد که کاهش بیان ژن PTP-1B در سلول‌های عضلانی منجر به کاهش مقاومت به انسولین حتی در حضور اسید چرب پالمیتات می‌گردد. اگرچه مقادیر فزاینده پالمیتات منجر به افزایش مقاومت به انسولین در سلول‌های عضلانی شده است، با این وجود کاهش بیان PTP-1B باعث حفظ حساسیت به انسولین حتی در غلظت‌های بالای پالمیتات گردیده است. این مطلب نشان دهنده اهمیت PTP-1B در پدیده مقاومت به انسولین می‌باشد.

در شرایط تیمار با پالمیتات، این ماده وارد میوتیوب‌ها شده و در آنجا به شکل فعال پالمیتوئیل-CoA تبدیل می‌گردد. این ترکیب در سلول، چند مسیر را می‌تواند دنبال نماید؛ (۱) به عنوان سوخت مورد استفاده قرار گرفته و وارد مسیر بتا-اکسیداسیون شود، (۲) با دو واکنش استریفیه کردن گلیسرول ۳-فسفات، دی‌آسیل گلیسرول (DAG) و با یک واکنش

استریفیه کردن دیگر DAG، تری‌گلیسرید را سنتز کند و یا (۳) با سرین ترکیب شده و در نهایت منجر به سنتز سرامید شود [۲۸]. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تری‌گلیسرید عضلات، به خودی خود عملکرد انسولین را در سلول‌های عضلانی تحت تاثیر قرار نمی‌دهد، بلکه به عنوان مخزنی از اسیدهای چرب عمل می‌کند [۲۹]. در صورتی که غلظت اسیدهای چرب، بیش از ظرفیت این مخزن افزایش یابد، سنتز متابولیت‌های حد واسط از قبیل DAG و سرامید افزایش می‌یابد. این مولکول‌های از لحاظ متابولیکی فعال، منجر به راه‌اندازی یک آبشار سرین/تریونین کینازی می‌گردند که باعث فسفریلاسیون سرین/تریونین جایگاه‌هایی در گیرنده انسولین و سوبسترای گیرنده انسولین شده و بدین ترتیب آنها را غیرفعال می‌نماید. این امر به نوبه خود فعال‌سازی مولکول‌های فرودست مسیر پیام‌رسانی انسولین را کاهش می‌دهد و در نهایت منجر به کاهش برداشت گلوکز می‌شود [۳۰،۳۱]. بنابراین افزایش سنتز تری‌گلیسرید می‌تواند غلظت این حد واسط‌ها را کاهش داده و از این طریق حساسیت به انسولین را حفظ نماید. در این مطالعه نشان داده شد که در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B، برداشت گلوکز افزایش می‌یابد که این وضعیت حتی در حالت تیمار با پالمیتات نیز این حساسیت با انسولین حفظ می‌گردد.

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این مسأله است که کاهش PTP-1B منجر به افزایش معناداری در میزان تری‌گلیسرید درون سلول‌های عضلانی تیمار شده با پالمیتات می‌شود. به نظر می‌رسد که تغییر مسیر درون سلولی پالمیتات مانع از فعال شدن مسیرهای فرودست القاء کننده مقاومت به انسولین گردد. این یافته در راستای مطالعات دیگر است که نشان می‌دهد تجمع تری‌گلیسرید باعث کاهش مقاومت به انسولین می‌شود [۱۰].

مجمعه یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش بیان PTP-1B در سلول‌های عضلانی باعث کاهش مقاومت به انسولین در این سلول‌ها می‌گردد و این کاهش مقاومت به انسولین حتی در حضور غلظت‌های فزاینده پالمیتات حفظ می‌شود. به نظر می‌رسد که کاهش PTP-1B از طریق افزایش تجمع تری‌گلیسرید درون سلول و در پی آن کاهش

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

متابولیت‌های مضر پالمیتات از قبیل سرامید و DAG باعث کاهش مقاومت به انسولین القاء شده با پالمیتات می‌گردد. مجموعه این یافته‌ها، PTP-1B را به عنوان یک کاندید مناسب برای درمان مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ مطرح می‌سازد.

مأخذ

1. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta* 2007; 375:20-35.
2. Czech MP. Fat targets for insulin signaling. *Mol Cell* 2002; 9:695-6.
3. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38:1213-7.
4. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 2003; 19:101-9.
5. Reynoso R, Salgado LM, 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. *Mol Cell Biochem* 2003; 46:155-62.
6. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 1999; 274:24202-10.
7. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1:785-9.
8. Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J* 1964; 93:652-65.
9. Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:1-14.
10. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007; 117:1679-89.
11. Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, Takata M, et al. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3708-17.
12. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 1999; 274:24202-10.
13. 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.
14. Tonks NK. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* 2003; 46:140-8.
15. Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, et al. Protein tyrosine phosphatase B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 1996; 45:1379-85.
16. Goldstein BJ. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001; 1:265-75.
17. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 1997; 100:449-58.
18. McGuire MC, Fields RM, Nyomba BL, Raz I, Bogardus C, Tonks NK, et al. Abnormal regulation of protein tyrosine phosphatase activities in skeletal muscle of insulin-resistant humans. *Diabetes* 1991; 40:939-42.
19. Delibegovic M, Bence KK, Mody N, Hong EG, Ko HJ, Kim JK, Kahn BB, and Neel BG. Improved Glucose Homeostasis in Mice with Muscle-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 7727-7734.
20. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Alvaro C, Rondinone CM, Valverde AM, and Lorenzo M. Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Myocytes Show Increased Insulin Sensitivity and Protection Against Tumor Necrosis Factor- α -Induced Insulin Resistance. *Diabetes* 2007; 56: 404-413.
21. Xue B, Kim YB, Lee A, Toschi E, Bonner-Weir S, Kahn CR, Neel BG and Kahn BB. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency reduces insulin resistance and the diabetic

- phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 23829-23840.
22. Na MK, Kim KA, Oh H, Kim BY, Oh WK, and Ahn JS. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity of Amentoflavone and Its Cellular Effect on Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptors. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 379-381.
 23. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; 52:456-67.
 24. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2745-52.
 25. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226:497-509.
 26. Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA, et al. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 2003; 52:21-8.
 27. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 2007; 6:307-19.
 28. Timmers S, Schrauwen P, de Vogel J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* 2008; 94:242-51.
 29. Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, et al. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: 554-60.
 30. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999; 103:253-9.
 31. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IκBα. *Diabetes* 2002; 51:2005-11.