مجله دیابت و متابولیسم ایران. آذر- دی ۱۳۹۲؛ دوره ۱۳ (شماره ۲) ۱۱۰-۱۰۲

تأثیر ۷ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن RBP4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع دو

ملیحه آوسه[۱]، روح الله نیکویی[۱]، فرشته عتابی[۲]، زهرا میرزایی‌زاده[۳]، کبری امیدفر*[۳]، باقر لاریجانی[۲]

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر ۷ هفته تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن RBP4 در عضلات نعلی، باز کننده طویل انگشتان (EDL)، کبد، چربی احشایی و زیر پوستی رت‌های دیابتی نوع دو بود.

روش‌ها: تعداد ٤٠ رت نژاد ویستار نر در سن ٥ هفتگی با میانگین وزنی ۸/۹± ۹۳/۷ گرم تهیه و به‌طور تصادفی به ٤ گروه کنترل سالم(C)(۱۰ = n)، تمرینی سالم(T)(۱۰ = n)، کنترل دیابتی(DC)(۱۵ = n) و تمرینی دیابتی(TD)(n=۱۵)تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین و مصرف غذای پر چرب ایجاد شد. جهت تایید وقوع مقاومت انسولین از مقادیر HOMA-IR استفاده گردید. پس از اعمال ۷ هفته تمرین استقامتی، بیان mRNA RBP4 در بافت-های فوق اندازه‌گیری گردید. از روش Realtime-PCR برای سنجش محتوی mRNA RBP4 استفاده شد.

یافته‌ها: بعد از ۷ هفته القاء دیابت نوع دو مقدار mRNA RBP4 کبد (۲/۳۷ برابر)، چربی احشایی (۲/۳۳ برابر) و چربی زیرپوستی (۱/۸۳ برابر)، نعلی (۱/۲۱ برابر) و EDL (۲/۰۳ برابر) درگروه DC بیشتر از گروه C بود (شکل ٦). با اعمال ۷ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری بین گروه DT و CD فقط در چربی احشایی (P<۰/۰۵)، چربی زیرپوستی (۰/۰۵) و EDL (P < ۰/۰۵) یافت شد (شکل ٦). علی‌رغم کاهش قابل ملاحظه در بیان mRNA RBP4 بعد از ۷ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری در محتوی mRNA RBP4 کبد(P < ۰/۰۱)، چربی زیرپوستی (P <۰/۰۱) و EDL (P < ۰/۰۱) بین گروه-های T و TD وجود داشت.

نتیجه‌گیری: دیابت نوع دو به‌طورقابل توجهی بیان RBP4 را در عضله اسکلتی به روش وابسته به تار افزایش می‌دهد. این افزایش در بافت‌های کبد، چربی احشایی و زیر پوستی نیز دیده می‌شود. ضمن اینکه تمرینات استقامتی بیان RBP4 در عضله EDL، چربی احشایی و زیر پوستی را کاهش داد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، تمرین استقامتی، بیان ژن RBP4

۱- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی- مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

***نشانی:** امیرابادشمالی، خ جلال آل احمد، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات بیوسنسور، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک : omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۲۰ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۱۳۹۲/۰۸/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۰۸/۱۹

مقدمه

یکی از دلایل عمده بروز دیابت نوع دو، اختلال در عمل انسولین در بافت‌های چربی، عضلات و کبد به‌عنوان بافت‌های اصلی مصرف کننده گلوگز می‌باشد و زمانی که ترشح انسولین اضافی نتواند برداشت گلوکز در این بافت‌ها را تضمین نماید، مقاومت انسولین و به‌دنبال آن هایپرگلیسمیا اتفاق می‌افتد [۲، ۱]. مهم‌ترین سازوکار شناخته شده درگیر، تنظیم منفی GLUT4[1] در بافت‌های چربی است درحالی‌که در عضلات اسکلتی این عامل، کمتر محدود کننده است. تحت شرایط فیزیولوژیک طبیعی، عضلات اسکلتی مهم‌ترین منبع برداشت گلوکز ناشی از تحریک انسولین به‌شمار می‌روند درحالی‌که بافت‌های چربی گلوکز کمتری را در مقایسه با عضلات اسکلتی برداشت می‌کنند. تحقیقات حاضر نشان می‌دهند که بافت-های چربی در پاسخ به کاهش غلظت درون سلولی گلوکز، از طریق ترشح بعضی فاکتورها به جریان خون به‌عنوان عاملی تنظیم‌گر در متابولیسم گلوکز ایفای نقش می‌کنند [۳، ۲].

RBP4[2] یکی از این آدیپوکین‌ها می‌باشد که غلظت سرمی آن در مدل‌های گوناگون رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ و افرادی که دچار مقاومت انسولین و یا دیابت نوع دو هستند [۵-۳]، افزایش می‌یابد. این آدیپوکین از بافت‌های چربی احشایی و زیرپوستی به درون جریان خون ترشح می‌شود و متابولیسم گلوکز خون سیستمیک را از طریق گلوکونئوژنز کبد تنظیم می‌کند [۲]. نقش RBP4 در توسعه مقاومت انسولین در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است [۵، ۳، ۱]. در واقع RBP4 گلوکونئوژنز کبدی را افزایش و سیگنالینگ انسولین در عضله‌های اسکلتی را تضعیف می کند [۱]. در مطالعاتی که از خاموش کردن ژن GLUT4 در بافت‌های چربی رت استفاده کرده‌اند، افزایش سطوح mRNA RBP4 در بافت چربی گزارش شده است [۱].از طرف دیگر، درمان همین رت‌ها با rosigilitazon– داروی افزایش دهنده حساسیت انسولین – بیان mRNA RBP4 را در بافت چربی و غلظت سرمی آن را کاهش می‌دهد [۱].

از آنجایی که بافت چربی احشایی و زیرپوستی تفاوت‌های متابولیکی قابل توجهی با هم دارند، بافت چربی احشایی نسبت به چربی کل بدن ارتباط نزدیک‌تری با مقاومت انسولین را از خود نشان می‌دهد [۸-۶]. دلیل این مسئله ممکن است تولید بیشتر RBP4 در چربی احشایی نسبت به چربی زیر پوستی باشد [۱۰، ۹]. با این که نقش سلول‌های چربی در ترشح RBP4 به خوبی ثابت شده است، ارتباط ضعیفی بین بیان RBP4 بافت چربی و سطح‌های RBP4 سرم در انسان گزارش شده است که نشان دهنده این است که بافت چربی ممکن است نقش کم اهمیت‌تری در تعیین سطوح RBP4 سرم در انسان نسبت به حیوانات داشته باشد.

این یافته‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً بافت‌های دیگر نیز می‌توانند عامل افزایش غلظت RBP4 سرم دردیابت نوع دو باشند. اخیراً عضله اسکلتی به‌عنوان محل اصلی مصرف گلوکز در نظر گرفته شده و می‌تواند متابولیسم گلوکز خود را تحت موقعیت کاهش قند خون (هایپوگلیسیما) با ترشح میوکین‌ها از جمله اینترلوکین ٦ (IL6) و RBP4 تنظیم کند [۱۱]. افزایش در mRNA RBP4 عضله اسکلتی رت بعد از یک جلسه تمرین استقامتی شدید گزارش شده است [۱۲] که این بافت را به‌عنوان یک منبع ترشح کننده RBP4 معرفی کرده است. در واقع عضله اسکلتی در پاسخ به افزایش فعالیت انقباضی، میوکین‌هایی را تولید و رها می-کند که می‌تواند بر متابولیسم دیگر بافت‌ها تأثیرگذار باشد [۱۱]. در عین حال اثر القای دیابت بر mRNA RBP4 در عضله اسکلتی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین علی‌رغم اثبات اثرات مفید فعالیت بدنی در درمان و پیشگیری دیابت نوع دو، اثرات مفید احتمالی این نوع تمرینات در کاهش سطوح mRNARBP4 عضله اسکلتی تاکنون در شرایط دیابت نوع دو مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین هدف از تحقیق حاضر تعیین تأثیرالقاء دیابت نوع دو و اثر ۷ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن RBP4 در عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو و سالم بود. لذا در تحقیق حاضر جهت تعیین اثر وابسته به

1- glucose transporter 4
2- retinol binding protein 4

تار دیابت نوع دو۲ و تمرین استقامتی بر بیان mRNA RBP4، بیان این آدیپوکین در دو عضله نعلی و EDL[1] که از لحاظ متابولیکی ناهمگن هستند و همچنین در بافت‌های کبد، چربی احشایی و زیر پوستی به عنوان منابع مهم در تولید RBP4 اندازه‌گیری گردید.

روش‌ها

تعداد ٤٠ رت نژاد ویستار نر در سن ٥ هفتگی با میانگین وزنی ۸/۹ ± ۹۳/۷ گرم از انستیتوی پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی ٤ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ساعت تاریکی – روشنایی نگهداری شدند. وزن بدن به‌طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲ هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب)، رت‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه کنترل سالم (C) (۱۰ = n)، تمرینی سالم (T) (۱۰ =n)، کنترل دیابتی (DC) (۱۵ =n) و تمرینی دیابتی (TD) (۱۵ = n) تقسیم و گروه‌ها بر اساس وزن همسان سازی شدند. در نهایت در تجزیه و تحلیل داده‌ها، در سنجش بیان ژن از هر گروه ٦ راس و در آنالیزهای بیوشیمیایی از گروه کنترل سالم، تمرینی سالم، کنترل دیابتی و تمرینی دیابتی به ترتیب ۷، ۸، ۹، ۹ استفاده شد. دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب تزریق استرپتوزوتوسین[2](STZ) و مصرف غذای پُرچرب[3] ایجاد شد [۱۹]. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود و عناصر تشکیل دهنده آن در جدول ۱ گزارش شده است. این ترکیب غذایی به‌وسیله محقق به صورت دست ساز و با همکاری شرکت کانی دام و موسسه واکسن سازی و سرم‌سازی رازی ایران انجام گرفت. رت‌های گروه دیابتی به مدت ۲ هفته تحت مصرف غذای پُرچرب قرارگرفتند درحالی‌که گروه کنترل سالم غذای طبیعی[4] مصرف می‌کرد. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ mg/kg در بافر سیترات 0.1 M (PH 4.5) بعد از ٦ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت [۱۹]. ٤٨ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم با3000 g, 10 min,4Ĉ انجام و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از300 mg/dl به‌عنوان دیابت تعریف [۱۹] و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند.

جدول۱- ترکیب غذای پُرچرب و عناصر تشکیل دهنده آن

عناصرتشکیل دهنده	گرم / کیلوگرم
پودر غذای طبیعی رت	۳٦٥
روغن گیاهی	۳۱۰
کازئین	۲٥۰
کلسترول	۱۰
ویتامین و مواد معدنی	٦۰
متیونین	۳
کلراید سدیم	۱
جوش شیرین	۱

پروتکل تمرینی

تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، هر روز بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد (جدول ۲). به دلیل شرایط خاص رت‌های تحقیق (دیابت شدید)، اعمال مدت‌های طولانی‌تر تمرینی بیشتر از ۳۵ دقیقه امکان‌پذیر نبود و این مدت به‌عنوان مدت نهایی در اواخر تمرین در نظر گرفته شد و هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند.

1- extensor digitorumlongus
1- streptozotocin
3- high fat diet
4- standard pellet diet

جدول ۲- مشخصات پروتکل تمرینی

زمان	آشنا سازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته۳	هفته٤	هفته۵	هفته ٦	هفته۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

تست HOMA- IR

٢٤ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی نمونه خونی به میزان 1ml از چشم حیوان جمع آوری و جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در 3000 g, 10 min, 4˚C انجام و جهت اندازه‌گیری گلوکز و انسولین ناشتایی جهت تعیین HOMA-IR در ۸۰- نگهداری شد. اندازه‌گیری انسولین به روش ELISA و با کیت ساخت شرکت Millipore با حساسیت اندازه‌گیری 1 ng/ml.، catalog number: # EZRMI-13K و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید.

مقادیر HOMA-IR با استفاده از فرمول زیرمحاسبه گردید:

HOMA-IR = Insulin [µU/ml] * Glucose [mmol/l] / 22.5

واجد شرایط بودن مقاومت انسولین منوط به داشتن دو شرط زیر بود:

۱- مقادیر HOMA-IR بالاتر از ۲/۵ [۱۳]

۲- مقادیر انسولین ناشتایی بالاتر از60 pmol [۱۳] و تنها رت‌هایی که شرایط فوق را دارا بودند در تجزیه و تحلیل نهایی وارد شدند.

استخراج نمونه

٤٨ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها به‌وسیله تزریق درون صفاقی کتامین [90 mg/kg] و زایلازین [10 mg/kg] بیهوش و عضلات نعلی، EDL و چربی زیرپوستی و احشایی و کبد بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد. نمونه خونی نیز مستقیم از قلب حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم با سانتریفیوژ کردن در 3000 g, 10 min, 4˚C انجام شد.

Real time – PCR

حدود ۵۰ میلی گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج totalRNA به نسبت ۱ به ۱۰ در IsolRNA-Lysis reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در 12000 g, ˚C 10 min, 4 سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با Isol اولیه با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در 12000g, 15 ˚C min, 4 سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در 12000 g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰µL آب RNAs-Free حل گردید. غلظت RNA با استفاده از دستگاه nono drop سنجیده و نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA تعدادی از RNA های تخلیص شده به‌طور تصادفی روی ژل آگارز ۲ درصد الکترفورز شد و مشاهده باندهای RNA های ریبوزومی 18S و 28S به‌طور منفک صحت تخلیص را تایید کرد. سنتز cDNA با استفاده از 1µg از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mulv Reverse transcriptase انجام گرفت. برنامه Real time - PCR شامل: ۹۵ در جهبه مدت ۱۰ دقیقه – ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰ درجه به مدت ۱ دقیقه (تکرار ٤۰ سیکل) بود. از 18S به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. میزان بیان این ژن به‌صورت توامان با هر ژن اندازه-گیری شد و میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

ژن	Forward primer	Reverse primer
RBP4	GGTGAGCAGCTTCAGAGTC	ACCATGTCTGCACACACTTC
18 S	GTCGGCATCGTTTATGGTCG	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از اینکه نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون K – S تایید شد، جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری ONE WAY ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. مقدار α در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن

وزن گروه‌های تحقیق در انتهای مطالعه در جدول ٤ گزارش شده است. کاهش اندک در وزن بدن در هفته بعد از تزریق STZ در گروه‌های دیابتی مشاهده و بعد از آن روند افزایش وزن در تمامی گروه‌ها به صورت طبیعی ادامه یافت. بعد از گذشت ٤ هفته از زمان شروع مصرف غذای پُرچرب توسط گروه‌های دیابتی، اختلاف وزن بین گروه کنترل دیابتی و سایر گروه‌ها معنی‌دار شد و این اختلاف تا پایان تحقیق ادامه داشت.

جدول ۴- متغیرهای فیزیولوژیک و آنتروپومتریک گروه‌های تحقیق در انتهای مطالعه

متغیر	کنترل سالم	تمرینی سالم	کنترل دیابتی	تمرینی دیابتی
وزن [g]	* ۲۹۹/۷۹ ± ۳۰/ ۸۱	* ۳۰۳/۸۲ ± ۲٦/۰٦	# ۳۳۱/۷ ± ۱۸/۱٤	* ۲۹۱/۱۷ ± ۲۵/۲۱
گلوکز[ng/dl]	* ۱۰٦/٤ ± ۹/۲٦	* ۱۰۱/٦۲ ± ۹/۰۲	# ۳۹٤/٤٤ ± ٤۸/۷٤	*# ۳۰۱/۷ ± ٤۷/۹۵
انسولین [µU/ml]	* ٦/۲۵ ± ۱/۱۵	* ۵/۷۳ ± ۰/٦۸	# ۱۰/۵۵ ± ۱/۱۲	*# ۸/۹۵ ± ۰/۷۸
شاخص HOMA-IR	* ۱/٦۲ ± ۰/۲٤	* ۱/٤۵ ± ۰/۱۹	# ۱۰/٤۸ ± ۱/٤٤	*# ٦/٦۸ ± ۱/۳۱

اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی، # اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم *

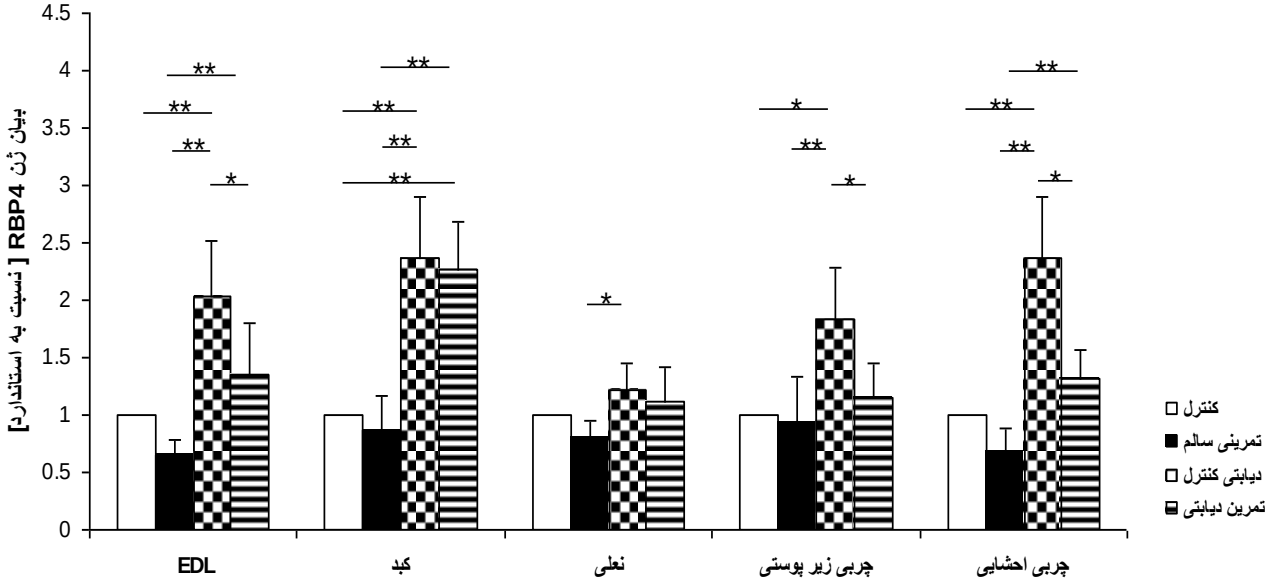
تاثیرSTZ و غذای پُرچرب بر متغیرهای متابولیک

جدول ٤ تاثیر STZ و غذای پُرچرب بر متغیرهای متابولیک را نشان می‌دهد. نتایج تست تایید دیابت قبل از شروع تحقیق افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون (Pre glucose) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد (p<۰/۰۰۱). نتایج آزمون HOMA-IR در پایان تحقیق نیز اختلاف معنی‌دار بین سطوح گلوکز خون پلاسما بین گروه‌های دیابتی و گروه کنترل سالم را نشان داد (p <۰/۰۰۱).

اثر دیابت و تمرین بر بیانmRNA RBP4

در تمامی نتایج زیر محتوی mRNA RBP4 در گروه کنترل در هر بافت برابر ۱۰۰ در نظر گرفته شده است و محتوی mRNA RBP4 آن بافت نسبت به گروه کنترل گزارش گردیده است. بعد از ۷ هفته القاء دیابت نوع دو مقدار mRNA RBP4 کبد (۲/۳۷ برابر)، چربی احشایی (۲/۳۳ برابر) و چربی زیرپوستی (۱/۸۳ برابر)، نعلی (۱/۲۱ برابر) و EDL (۲/۰۳ برابر) در گروه DC بیشتر از گروه C بود (شکل ٦). با اعمال ۷ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری بین گروه DT و CD فقط در چربی احشایی (P < ۰/۰۵)، چربی زیرپوستی (P < ۰/۰۵) و EDL (۰/۰۵

P >) یافت شد (شکل ٦). علی‌رغم کاهش قابل ملاحظه در بیان mRNARBP4 بعد از ۷ هفته تمرین استقامتی، تـفاوت معنی‌داری در محتوی mRNA RBP4 کبد (۰/۰۱ > P)، چربی زیرپوستی (۰/۰۱ > P) و EDL (۰/۰۱ > P) بین گروه‌های T و TD وجود داشت (شکل ۱).



شکل ۱- میزان بیان ژن RBP4 در گروه های تحقیق در انتهای مطالعه

(کنترل سالم (n = 6)، تمرینی سالم (n = 6)، کنترل دیابتی (n = 6)، تمرین دیابتی (n = 6))

* اختلاف معنی‌دار (۰/۰۵ > P)، ** اختلاف معنی‌دار (۰/۰۱ > P)

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر با القاء دیابت نوع دو در رت‌های ویستار شروع و با تعیین اثرات القاء دیابت نوع دو و ۷ هفته تمرین استقامتی بر mRNA RBP4 در عضلات اسکلتی نعلی و EDL، کبد، چربی احشایی و چربی زیرپوستی به پایان رسید. اهم نتایج تحقیق به شرح زیر بود: ۱) دیابت نوع دو به طور قابل توجهی بیان RBP4 را در عضله اسکلتی به روش وابسته به تار افزایش می‌دهد. ۲) این افزایش در بافت‌های کبد، چربی احشایی و زیر پوستی نیز دیده می‌شود. ضمن اینکه تمرینات استقامتی بیان RBP4 در EDL، چربی احشایی و زیر پوستی را کاهش می‌دهد.

در مطالعه حاضر اطمینان از وقوع دیابت نوع دو، با غلظت بالای گلوکز و ایجاد مقاومت انسولین توسط مقادیر بالای مشاهده شده در شاخص HOMA -IR و غلظت انسولین ناشتای پلاسما [۱۵ ،۱٤] مورد تأیید قرار گرفت. همان‌طور که در رت‌ها در گروه DC دیده شد، مصرف رژیم غذایی با درصد چربی بالا در ترکیب با تزریق دوز پایین از STZ، سطح گلوکز خون، تری گلیسیرید و کلسترول را تحت تأثیر قرار داد. به علت رقابت سوبسترایبین اسید چرب آزاد و گلوکز، افزایش قند خون (هایپر گلیسیمیا) سطح چربی خون را افزایش داد [۱٦] و در نتیجه سطح گلوکز و تری گلسیرید (داده های گزارش نشده) گروه کنترل دیابتی افزایش یافت.

در طول مطالعه حاضر، همانند مطالعات گذشته [۱۸ ،۱۷] روند افزایش وزن در گروه‌های غیر دیابتی طبیعی بود در حالی که در گروه DC افزایش در وزن سریع‌تر اتفاق افتاد همان‌طور که قبلاً در مطالعات دیگر نشان داده شده است [۱۹، ۱۸، ۱۵] بنابراین تغذیه HFD در یک دوره ۹ هفته‌ای،

باعث ایجاد رت‌های مبتلا به سندرم مقاومت به انسولین گردید که با افزایش وزن بدن (چاقی)، افزایش قند خون، افزایش تری گلیسیرید و افزایش جبرانی انسولین در جهت حفظ هموستاز گلوکز همراه بود که می‌تواند صحت اعمال دیابت نوع دو در تحقیق حاضر را تأیید کند.

از طرف دیگر، ۷ هفته تمرین استقامتی غلظت گلوکز ناشتای پلاسما را در حیوانات TD نسبت به گروه DC کاهش داد. تمرین استقامتی می‌تواند از طریق افزایش حساسیت انسولین [۲۰]، افزایش بیان GLUT4 در غشای سارکولمای عضله اسکلتی [۲۱] و افزایش انتقال آن به غشای پلاسمایی [۲۲] غلظت گلوکز پلاسما را در شرایط دیابت نوع دو کاهش دهد. همچنین در پایان تحقیق غلظت انسولین پلاسما در گروه TD نسبت به گروه DC کاهش معنی‌دار داشت. این کاهش ناشی از تمرین می‌تواند از طریق افزایش در بیان IRS-2، افزایش فعالیت مسیرPI3P و MAPK [۲۳] رخ دهد.

نکته منحصر به فرد تحقیق حاضر این بود که این اولین مطالعه‌ای است که تاثیر بلند مدت تمرین استقامتی بر محتوی mRNA RBP4 در عضله اسکلتی را در شرایط دیابت نوع دو مورد بررسی قرار داده است. مطالعات انجام شده در زمینه تغییرات RBP4 و تمرین در شرایط دیابت نوع دو به تعداد معدودی تحقیق و آن هم در سطح تغییرات سرم [۲۵، ۲٤] و اثرات حاد تمرین [۱۲] منتهی می‌شوند. با این وجود مطالعه حاضر نشان داد که RBP4 به آن دسته از ژن هایی تعلق دارد که در پاسخ به تمرین افزایش می‌یابد، هر چند که بالاتر بودن بیان آن در گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم دلالت بر این دارد که بیان این ژن تحت تاثیر تغییرات متابولیکی نیز واقع می‌شود.

در مطالعه حاضر بیان RBP4 در چربی احشایی و زیر پوستی متفاوت بود. همچنین پاسخ این دو بافت به تمرین نیز متفاوت بود، به این صورت که بیان RBP4 در بافت چربی احشایی در پاسخ به تمرین از چربی زیر پوستی بیشتر بود. این نتیجه با یافته‌های تحقیقات دیگر که بیان بیشتر RBP4 در چربی احشایی را نشان داده اند [۲۷، ۲٦] همخوانی دارد. تفاوت در بیان ژن RBP4 بین دو ذخایر چربی می‌تواند با تصفیه ماکروفاژی بیشتر در چربی احشایی در مقایسه با چربی زیرپوستی تفسیر شود [۲۸]. نشان داده شده است که بعضی از عوامل سیگنالی مشتق شده از عمل ماکروفاژها نظیر TNF-α می‌تواند منجر به بیان متفاوت و بیشتر RBP4 در بافت چربی احشایی شود [۲۹]. عامل احتمالی دیگر تنظیم منفیGLUT4 در شرایط دیابت نوع دو است که بین بافت‌های چربی احشایی و زیر پوستی متفاوت است. نشان داده شده است که بین بیان GLUT4 در بافت چربی احشایی و بیان RBP4 رابطه معکوس وجود دارد [۲۷]. از آنجایی که تنظیم منفیGLUT4 در بافت چربی احشایی نسبت به چربی زیر پوستی بیشتر اتفاق می‌افتد، این عامل می‌تواند افزایش بیشتر RBP4 در این بافت را تفسیر نماید. بیان RBP4 در چربی زیرپوستی و احشایی تحت تاثیر تمرین استقامتی کاهش معنی‌دار از خود نشان داد. اندازه سلول‌های چربی در مطالعات پیشین به‌عنوان یک مارکر مستقل برای مقاومت انسولین توصیف شده است [۳۰] و نشان داده شده است که انجام تمرین استقامتی می‌تواند توده و سایز سلول‌های چربی را در رت‌هایی که رژیم غذایی پُرچرب مصرف می‌کردند را در حد نرمال نگه دارد [۳۱]. با وجود اینکه در تحقیق حاضر اندازه‌گیری مستقیم از توده چربی گروه‌های دیابتی به عمل نیامد، لیکن با توجه به کاهش معنی‌دار وزن در گروه TD نسبت به CD در انتهای مطالعه می‌توان این امر را محتمل دانست که کاهش بیان RBP4 چربی بعد از ۷ هفته تمرین استقامتی ممکن است با حفظ سایز سلول چربی توضیح داده شود.

در مطالعه حاضر mRNA RBP4 در هر دو عضله کند و تند انقباض نعلی و EDL قابل اندازه‌گیری بود. عضله اسکلتی یک اندام است که مانند غده درون ریز عمل می‌کند که میوکین‌ها از جمله RBP4 و IL6 را در پاسخ به انقباض تولید و آزاد می‌کند که می‌تواند بر متابولیسم دیگر بافت‌ها و اعضاء تأثیر گذارد. گزارش شده است که تمرین استقامتی حاد می‌تواند غلظت RBP4 سرم و بیان آن در عضله دو قلو را بدون تغییر در بیان RBP4 کبدی و بافت‌های چربی، افزایش دهد [۱۲]. با توجه به نتایج تحقیقات گذشته [۱۲] و

اینکه در این تحقیق mRNA RBP4 در هر دو عضله EDL و نعلی یافت شد و همچنین بیان RBP4 در عضله EDL تحت تاثیر تمرین استقامتی کاهش یافت، می‌توان این فرضیه را توسعه داد که عضله اسکلتی می‌تواند RBP4 را تحت شرایط هایپوگلیسیما که در دیابت نوع دو و تمرین استقامتی دیده می‌شود، تولید و به درون جریان خون آزاد کند. در مطالعه حاضر به دنبال القای دیابت بیان mRNARBP4 در هر دو عضله EDL و نعلی در گروه DC نسبت به C افزایش داشت. نشان داده شده است که افزایش سطوح تری‌گلیسیرید درون عضلانی (IMTG)در شرایط چاقی و دیابت نوع دو با مقاومت انسولین در ارتباط است [۳۳] و اینکه افزایش سطوح IMTG کبدی می‌تواند باعث افزایش بیان RBP4 در این بافت شود [۳۲]. این احتمال وجود دارد که افزایش سطوح IMTG عضلانی نیز همین نقش را در مورد افزایش بیان RBP4 عضلات اسکلتی در تحقیق حاضر ایفا نماید. به‌دلیل این که در این تحقیق سطوح IMTG اندازه‌گیری نشد، اظهار نظر قطعی در این مورد امکان‌پذیر نیست. به‌علاوه تغییرات بیان RBP4 در عضلات اسکلتی وابسته به تار بود به این معنی که میزان تغییرات در تارهای کند و تند انقباض نعلی و EDL متفاوت و در عضله EDL بیشتر بود.

نشان داده شده است که تارهای کند انقباض نسبت به تارهای تند انقباض حساسیت بیشتری به انسولین دارند و دارای ظرفیت اکسید اتیو بالاتری نیز می‌باشند. به‌دلیل داشتن این ویژگی‌ها، این فیبرها اتکای کمتری به متابولیسم گلوکز دارند و تغییرات میوکین‌هایی از قبیل RBP4– که با هموستاز گلوکز سر و کار دارند – در پاسخ به اختلالات متابولیسم گلوکز در این فیبرها کمتر است. تحقیقات بیشتری لازم است که نقش عضلات اسکلتی در بیان RBP4 و نقش‌هایی که این عامل می‌تواند تحت شرایط هایپوگلیسیمیا در عضله اسکلتی بازی کنند را تعیین نماید.

به‌طور خلاصه، نتایج نشان داد که دیابت نوع دو بیان RBP4 را در سطح mRNA در عضلات اسلکتی رت، کبد، چربی زیرپوستی واحشایی افزایش می‌دهد تمرینات استقامتی می‌تواند این افزایش را تعدیل و به سطح نرمال برساند.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و موسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی کرج به جهت همکاری در تهیه غذای پُرچرب ابراز می‌دارند.

ماخذ

1- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436:356– 362.
2- Abel ED, Peronie O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001; 409:672– 673.
3- Anita O, Anna D, Martin L, EriksonU, Fredrik HN, Peter S. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes .*FASEB* J 2007; 21, 3696 –3704.
4- Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006; 354:2552–2563.
5- Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S. Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(7):2712-9.
6- Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus: 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 2010; 34:1055–1058.
7- Haffner SM, Stern MP, Mitchell BD, Hazuda HP, Patterson JK, Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes* 1990; 39:283–288.
8- Kissebah AH, Peiris AN, Evans DJ. Mechanisms associating body fat distribution to glucose intoler-

ance and diabetes mellitus: window with a view. *Acta Med ScandSuppl* 1988; 723:79–89.

9- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007; 56:1010–1013.

10- Weiping J, Haiya W, Yuqian B, Wang C, Lu J, Zhu J, et al. Association of Serum Retinol-Binding Protein 4 and Visceral Adiposity in Chinese Subjects with and without Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(8):3224–3229.

11- Bente KP, Mark AF. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; 88: 1379–1406.

12- Josef B, Timothy EG, Katja SC, Christopher W, Laurie JG, Barbara BK. Acute exercise increases serum retinol binding protein 4 concentrations. *The FASEB Journal* 2007; 21:764.6.

13- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28, 412–419.

14- SharmaAK, SrinivasanBP. Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 38 433–444.

15- Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism character. *Exp Anim* 2003;52(5):401-7.

16- 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; 1:785–789.

17- Goodyear LJ, Hirshman MF, Knutson SM, Horton ED, Horton ES. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats.*J Appl Physiol* 1988; 65: 844–851.

18- Enoki T, Yuko Y, Hideo Hand Arend B. Exercise training alleviates MCT1 and MCT4 reductions in heart and skeletal muscles of STZ induced diabetic rats. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2433–2438.

19- Viswanad KB, Lydia A, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening Srinivasan. *Pharmacological Research* 2005; 52 313–320.

20- Becker ZK. Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L,Schewenen M. Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia* 1982; 22:468–474.

21- Kraniou GN, Smith D, Hargreaves M. Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity.*J Appl Physio* 2006; 101, 934–937.

22- Furtado ML, Poon V, Klip A. GLUT4 activation: thoughts on possiblemechanisms. *Acta Physiol Scand* 2003; 178:287–296.

23- Frosig C, Rose AJ, Treebak JT, Bente K, Erik AR, Jørgen FP. Effects of endurance exercise training on insulin 110chleiche in human skeletal muscle: interactions at the level of PI3-K, Akt and AS160. *Diabetes* 2007; 56, 2093–2102.

24- Choi KM, Kim TN, Yoo HJ, Lee KW, Cho GJ, Hwang TG, et al. Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2, and RBP4 levels in obese women. *Clin Endocrinol* 2009; 70(4):569-74.

25- SooL, Sung HC, In-Kyong J, Kim JH, Moon MK, Park KS, et al. Insulin-sensitizing Effects of Exercise on Adiponectin and Retinol Binding Protein-4 Concentrations in Young and Middle-aged Women. *J Clin Endocrin Metab* 2008; 15: 2021-2028.

26- Klotig N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, et al. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 2007; 6: 79-87.

27- Bajzova M, Kovacikova M, Vitkova E, Klimcakova E, Polak J, Kovacova Z, et al. retinol-Binding Protein 4 Expression in Visceral and Subcutaneous Fat in Human Obesity. *Physiol Res* 2008; 57: 927-934.

28- Cancello R, Tordjman J, Pitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 1554-1561.

29- Sell H, Eckel J. Regulation of retinol binding protein 4 production in primary human adipocytes by adiponectin, troglitazone and TNF-α. *Diabetologia* 2007; 10: 2221-2223.

30- Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and "hyperleptinaemia". *Diabetologia* 2007; 50: 625–633.

31- Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E495–E504.

32- Varman TS, Zhen XL, Xianqin Q, Benjamin DE, Stefan B, Douglas Befroy, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279:32345–3253.

33- Moro C, Bajpeyi S, Smith SR. Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E203–E2

THE EFFECT OF SEVEN WEEKS ENDURANCE TRAINING ON RBP4 GENE EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE IN TYPE 2 DIABETIC RATS

Malihe Aveseh [1], Rohollah Nikooie [1], Fereshteh Atabi [2], Zahra Mirzaie zadeh [3], Kobra Omidfar [*3], Bagher Larijani [2]

1. *Shahid Bahonar University of kerman, Faculty of physical education and sport science, Kerman, Iran*
2. *Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular -Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: the aim of this study was to investigate the effect of seven weeks endurance training on RBP4 gene expression in Soleus and Extensor Digitrum Longouse (EDL) Muscles, liver, visceral and subcutaneous fat in type 2 diabetic rats.
Methods: 50 male wistar rats (5 weeks years old, weight = 93.7 ± 8.9) were purchased and randomly divided into four groups: Control (n=10) (C), Trained (n=10) (T), Diabetic Control (n=15) (DC) and Trained diabetic (n=15) (TD). Diabetes was induced by injection of low dose of streptozotocin (STZ) and feeding with high fat diet. Insulin resistance accuracy was confirmed by HOMA-IR index and Real-time PCR was used for mRNA content.
Results: After seven weeks of diabetes induction, the RBP4 mRNA content of the liver (2.37-fold; $P < 0.01$), visceral fat (2.33-fold; $P < 0.01$), and subcutaneous fat (1.83-fold; $P < 0.05$), soleus (1.21-fold; $P < 0.05$) and EDL (2.03-fold; $P < 0.05$) were increased. After seven weeks of endurance training significant decrease in RBP4 mRNA content was found in visceral fat ($P < 0.05$), subcutaneous fat ($P < 0.05$) and EDL ($P < 0.05$) between DC and CD. In addition, significant difference between T and TD groups was found for RBP4 mRNA content in liver ($p < 0.01$), subcutaneous fat ($P < 0.01$) and EDL ($P < 0.01$) after seven weeks of endurance training.
Conclusion: Type 2 diabetes considerably increases skeletal muscle RBP4 expression in isoform-specific manner. This increase is also seen in liver, subcutaneous and visceral fat. In addition, endurance training decreases the RBP4 expression in EDL, subcutaneous and visceral fat.

Keywords: Type 2 diabetes, Endurance training, RBP4 gene expression

* Floor 5th , Shariati Hospital, North Karegar St., Tehran, Iran, Post code:1411413137, Tel: +98(21)88220037, Fax: +98(21)88220052, Email: omidfar@tums.ac.ir