

بیان ژن MIF در سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی تحت القاء با ویتامین D و ارتباط آن با میزان متابولیسم افراد چاق

آرش حسین نژاد^{۱*}، خدیجه میرزایی^{۲،۱}، شیلاان اصلانی^۱، سید علی کشاورز^۲، علی طوطی^۱، فرزانه کریمی^۱

چکیده

مقدمه: فاکتور مهار کننده مهاجرت ماکروفاژها (Macrophage migration inhibitory factor) MIF نقش مهمی در التهاب سیستمیک و موضعی و نیز پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی بیان ژن MIF در سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cells) PBMCs افراد چاق و مقایسه آن با افراد با وزن نرمال و بررسی هر نوع ارتباط بالقوه بین میزان متابولیسم پایه و چندین متغیر مرتبط با میزان بیان ژن MIF در PBMC بود. همچنین اثرات ضد التهابی ویتامین D به صورت *in vitro* بر بیان ژن MIF سلول‌های افراد چاق و با وزن نرمال مورد ارزیابی قرار گرفت و الگوی بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC تحت القاء با ویتامین D و گروه کنترل blank در دو گروه چاق و افراد با وزن نرمال مقایسه شد.

روش‌ها: افراد شرکت کننده ۳۰ فرد چاق و ۱۸ فرد با نمایه توده بدنی کمتر از ۳۰ بودند که میزان متابولیسم پایه بدنشان با کالری متری غیر مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان MIF mRNA با استفاده از پرایمرهای ویژه و بیان ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی با دستگاه Real-time PCR ارزیابی شد و نتایج به صورت نسبت میزان بیان MIF بر β -actin گزارش شد. **یافته‌ها:** سطح بیان ژن MIF سلول‌های PBMC تحت القاء با ویتامین D در گروه با نمایه توده بدنی کمتر از ۳۰ افزایش و در افراد چاق کاهش یافت. یکی از یافته‌های جالب مطالعه حاضر مشاهده ارتباط معکوس میزان بیان ژن MIF پس از القاء با ویتامین D با توده و درصد چربی افراد می‌باشد. همچنین مواجهه با ویتامین D به صورت *in vitro* باعث تغییر در پاسخ ایمنی PBMC افراد چاق می‌شود.

نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که تاثیر متفاوت ویتامین D بر بیان ژن عوامل التهابی به علت الگوی فعال ایمنی و وضعیت پیش التهابی موجود در افراد چاق باشد؛ که ممکن است بیانگر ارتباط علیتی آن با چاقی باشد.

واژگان کلیدی: بیان ژن MIF، سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی، ویتامین D، میزان متابولیسم، چاقی

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه تغذیه و بیوشیمی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷، تلفن: ۸-۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

مقدمه

چاقی با افزایش بافت چربی اضافی و اختلالات متابولیکی مختلفی همراه است که به نظر می‌رسد شیوع آن در کشورهای در حال پیشرفت و پیشرفته در حال افزایش است [۱،۲]. چاقی عامل خطر مهمی در ابتلا به اختلالات مختلفی از جمله دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشد و از آنجایی که این بیماری‌ها اپیدمیك شده و هزینه‌های زیادی را بر سیستم سلامت بهداشت جامعه و نیز خود افراد متحمل می‌کنند، باعث افزایش نگرانی در این زمینه شده‌اند [۳].

شواهد فراوانی وجود دارد که اگرچه چاقی بدون علائم بالینی است اما با التهاب مزمن همراه است [۴]. التهاب مزمن با تغییر در تولید سایتوکین‌ها، افزایش سطح واکنش گره‌های فاز حاد و تشدید مسیرهای سیگنال دهنده التهابی شناخته می‌شود [۱،۵]. همچنین شواهدی وجود دارد که با افزایش چاقی ورود ماکروفاژها به بافت چربی افزایش می‌یابد [۶]. بنابر این به نظر می‌رسد ماکروفاژهای وارد شده به بافت چربی منبع عمده سایتوکین‌هایی باشند که در وضعیت التهابی ناشی از چاقی افزایش می‌یابند و باعث پیشرفت مقاومت به انسولین و سایر اختلالات متابولیکی می‌شوند [۷]. برهمکنش موضعی آدیپوسیت‌ها و ماکروفاژهای وارد شده به بافت چربی و تاثیر آن بر عملکرد مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های T در مطالعات پیشین گزارش شده است [۸،۹]. از سوی دیگر شواهدی مبنی بر تاثیر چاقی و افزایش وزن بر وضعیت پیش التهابی سلول‌های تک هسته‌ای وجود دارد [۱].

گیرنده ویتامین D حدود ۳٪ ژنوم انسان را تنظیم می‌کند و نشان داده شد که در سلول‌های ایمنی بیان می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد ویتامین D نقش تنظیم کننده ایمنی^۱ فیزیولوژیکی در سیستم اندوکرین داشته باشد [۱۰]. به علاوه نقش بالقوه کلسی تریول در تنظیم و کنترل برهمکنش آدیپوسیت‌ها و ماکروفاژها پیشنهاد شده است [۱۱]. نکته مهمتر این است که اخیراً عملکرد اساسی کلسیتریول در تنظیم سایتوکین‌ها که در تعادل و متابولیسم انرژی در آدیپوسیت‌ها، ماکروفاژها و عضلات اسکلتی

نقش دارند، نشان داده شده است. از سوی دیگر کلسی تریول در آپوپتوز آدیپوسیت اثر وابسته به دوز دارد و در محل ومقدار ذخیره بافت چربی نقش تنظیمی دارد [۱۲].

نقش MIF در این مسیر با تغییر ترشح سایتوکین‌های پیش التهابی شناخته شده است [۱۳،۱۴]. MIF سایتوکین تنظیم کننده ایمنی است که نقش مهمی در التهاب موضعی و سیستمیک و پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند. MIF برای اولین بار به عنوان فاکتور محلول و ترشح شده از لنفوسیت‌های T فعال شناخته شد [۱۴،۱۵].

امروزه شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد MIF در مقادیر قابل توجهی توسط چندین نوع سلول مانند مونوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال، کراتینوسیت‌ها، سلول‌های هیپوفیز قدامی و استئوبلاست‌ها ترشح می‌شود که بیانگر عملکرد فیزیولوژیکی چندگانه آن علاوه بر نقش آن در سیستم ایمنی است [۱۶-۱۸].

علی‌رغم نام MIF، این سایتوکین نقش مشابه کموکین‌ها در تسهیل تجمع سلول‌ها دارد. نتایج حاصل از چندین مطالعه بالینی نقش MIF را به عنوان بیومارکر پاتوژنز چندین بیماری التهابی مانند عفونت‌های سیستمیک، سپسیس، بیماری‌های اتوایمنی، سرطان، اختلالات متابولیکی مانند دیابت نوع ۲ و چاقی به اثبات رسانده است [۱۹]. گزارش‌هایی در برخی رده‌های سلولی منتشر شده که نشان می‌دهد فعالیت رونویسی این ژن تحت تاثیر پلی مرفیس‌های آن بوده و با خطر ابتلا به چاقی مرتبط است [۲۰] و نیز شواهدی مبنی بر ارتباط پاتوژنز چاقی و MIF وجود دارد [۲]. از سوی دیگر، برخی نقش‌های بیولوژیکی MIF داخل سلولی در فرایند آدیپوژنز شناخته شده است [۲۱،۲۲]. همچنین MIF با تولید و ترشح سایتوکین‌ها نقش پیش التهابی داشته و گفته می‌شود سایتوکین‌های پیش التهابی در آدیپوژنز نقش دارند [۲۳]. بنابراین نقش MIF در آدیپوژنز و چاقی ویژگی منحصر به فرد آن در میان سایر سایتوکین‌های پیش التهابی است [۲]. با این وجود تاکنون به تفکیک نقش آشکار MIF مترشح‌ه از بافت چربی یا سایر بافت‌ها بر چاقی شناخته نشده است [۲]. اگر چه تغییرات بیان ژن MIF سلول‌های PBMC در برخی اختلالات التهابی گزارش شده است [۲۴].

ارزیابی‌های بیوشیمیایی و هورمونی

پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه توسط شرکت کنندگان، نمونه خونشان پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی گرفته شد و بلافاصله سانتریفیوژ شده و پس از تقسیم در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. تمام نمونه‌ها با روش و شرایط مشابهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمام آزمایش‌ها در آزمایشگاه پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

سطح گلوکز سرمی با روش GOD/PAP، تری گلیسرید^۱ [TG] با روش GPO-PAP، کلسترول توتال با روش آنزیماتیک Endpoint، کلسترول لیپوپروتئین با دانسیته بالا^۲ [HDL-C] با ارزیابی کلرینس آنزیماتیک انجام شد. تمام مواد فوق با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی Randox انجام گردید [Hitachi 902]. غلظت سر می hs-CRP^۳ که به عنوان شاخص التهابی شناخته شده، با ارزیابی‌های ایمنوتوربیدی‌متریکی^۴ اندازه‌گیری شد [ارزیابی با حساسیت بالا، با دستگاه Hitachi 902].

غلظت پلاسمایی انسولین با روش ELISA با حساسیت و بین گروهی ۱/۷۶ μIU/ml و به ترتیب با ضریب تغییرات درون گروهی و بین گروهی ۲/۱۹٪ و ۴/۴٪ ارزیابی شد [Human insulin ELISA kit, DRG Pharmaceuticals, GmbH, Germany Sigma].

کلستیریلول از شرکت سیگما خریداری شد [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO].

اندازه‌گیری REE^۵

اندازه‌گیری در تمام نمونه‌ها توسط کارشناس تغذیه کار آزموده و مجرب با استفاده از پروتکل استاندارد انجام شد. پیش از اندازه‌گیری REE ترکیب بدن به دقت با دستگاه Bodystat 1500 ارزیابی شد که با جزئیات بیشتر در بخش بعدی توضیح داده می‌شود. بر طبق پروتکل مصوب قد با استفاده از متر نواری ۲۰۰ درجه‌ای Seca اندازه‌گیری شد [بدون کفش، پاشنه‌ها به هم چسبیده، پاشنه‌ها، کتف و سر به صورت عمودی در امتداد دیوار]. REE با استفاده از

از آنجایی که ویتامین D عملکرد ویژه‌ای به عنوان واسطه در تولید سایتوکاین‌ها و نقش بالقوه مهمی در تعادل انرژی و متابولیسم آدیپوسیت‌ها و ماکروفازها ایفا می‌کند، به نظر می‌رسد که نقش مشابهی در سلول‌های PBMC داشته باشد [۱،۱۲].

این مطالعه به منظور ارزیابی بیان ژن MIF به عنوان پروتئینی با فعالیت شبه کموکاین و بیومارکر واکنش التهابی در سلول‌های PBMC افراد چاق و مقایسه آن با افراد با وزن نرمال طراحی شد. در این مطالعه ارتباط بالقوه میزان متابولیسم پایه و بیان MIF در سلول‌های PBMC در دو گروه ارزیابی شد. همچنین اثرات ضد التهابی 1,25[OH]2D3 بر بیان ژن MIF در افراد چاق و افراد با وزن نرمال مقایسه شد. در نهایت، الگوی تغییر بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC تحت القاء با 1,25[OH]2 D3 در مقایسه با گروه کنترل در تمام افراد شرکت کننده مقایسه گردید.

روش‌ها

جمعیت مورد بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی ۴۸ فرد شرکت نمودند. ۱۸ فرد [۳۷/۵٪] با نمایه توده بدن کمتر از ۳۰ به عنوان گروه I و ۳۰ فرد [۶۲/۵٪] با نمایه توده بدنی برابر یا بیش از ۳۰ به عنوان گروه II در نظر گرفته شدند. پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب شد. شرکت کنندگان براساس معیارهای ورود از جمله دارا بودن سن ۲۲-۵۲ سال، عدم ابتلا به بیماری‌های التهابی حاد یا مزمن، نداشتن سابقه ابتلا به فشار خون بالا، عدم مصرف الکل و دخانیات وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل هر اختلالی که مارکرهای التهابی را تحت تاثیر قرار می‌دهد از جمله ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، کبد، کلیه، تیروئید، سرطان، دیابت، نارسایی قلبی و ابتلا به عفونت‌های حاد یا مزمن بود. توزیع میانگین سن و جنس در گروه‌های مورد و شاهد تفاوت آماری معناداری نداشت.

- 1- Triglyceride
- 2- High density lipoprotein
- 3- Hyper sensitivity c-reactive protein
- 4- Imonoturbidimetric
- 5- Resting energy expenditure

و مقایسه آن با مقادیر نرمال در مدت زمان کوتاهی توسط دستگاه ارائه می‌شود.

آماده‌سازی PBMC و القاء آن با ویتامین D

PBMC [Peripheral blood mononuclear cells] از خون وریدی [۱۲ml]، لوله هپارینه] به دست آمد. مونسیت از خون محیطی با استفاده از روش دانسیته فایکول جدا شد. به طور خلاصه، خون با نسبت ۱/۱ با RPMI 1640 همراه با Cambrex Bio Science,]25mM HEPES, Glutamax-I 100 U/ml] و آنتی‌بیوتیک‌های مناسب [Verviers, Belgium] 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin رقیق شد. ۲۴ محلول به دست آمده در بالای ۱۵ ml محلول با دانسیته بالا [LymphoprepTM, Axis-Shield PoCAS, Oslo,] ۲۰ rpm 1500 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه میانی حاوی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی است که جدا شده و دو مرتبه شستشو داده شد. مونسیت‌ها در RPMI 1640 همراه با Glutamax- Cambrex Bio Science, Verviers,]25mM HEPES,] 100 U/ml] و آنتی‌بیوتیک‌های مناسب [Belgium] 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin به علاوه ۱۵٪ FCS به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. در آزمون موازی، [Sigma-Aldrich, St.] 10-7 M] 1, 25[OH] 2D3، [Louis, MO] به محیط کشت افزوده شد.

استخراج RNA و ارزیابی Real-time -PCR

در هر دور، ۱۰۶ سلول کشت داده شدند و استخراج mRNA با استفاده از کیت جداسازی RNA بسیار دقیق [Roche Diagnostics] انجام شد. بیان ژن‌های MIF و b-actin با استفاده از دستگاه real-time reverse transcriptase [RT]-PCR اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه اینکه ۰/۵ تا ۱ mg از توتال RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA به طور معکوس رونویسی شد [Fermentase,] EU]. برای آمپلیفیکاسیون متوالی RT-PCR حداکثر ۲ μl از هر نمونه cDNA به ازای هر ۲۰ ml PCR-mix استفاده شد. واکنش‌های PCR یا درون ول‌های سه تایی انجام شد و یا در استپ یک ABI سیستم real time انجام شد

کالری‌متری fitmate انجام شد [Cosmed Company, Via dei Piani di Monte Savello 37, Pavona di Albano - Rome I - 00040 ITALY].

FitMate محصول جدیدی است که از آنالیزور متابولیکی کوچک [۲۴x۲۰cm] و ماسک پوشاننده بینی و دهان تشکیل شده است. این دستگاه برای اندازه‌گیری میزان مصرف انرژی و اکسیژن در زمان استراحت و ورزش طراحی شده است. در این دستگاه برای اندازه‌گیری میزان تهویه از توربین فلومتر و برای آنالیز جزء اکسیژن موجود در گازهای تنفسی از مخزن گالوانیک حساس به اکسیژن استفاده شده است. RMR با استفاده از اطلاعات به دست آمده از جمله میزان مصرف اکسیژن، نسبت تنفسی [RQ] ثابت ۰/۸۵ و میزان نیتروژن ادراری محاسبه شده با معادله Weir قابل اندازه‌گیری است.

معادله Weir: REE = مصرف 2 o [لیتر] × ۳/۹۴۱ + تولید co 2 [لیتر] × [۱/۱۱] × 1440 min/d از شرکت کنندگان خواسته شده بود به مدت ۱۲ ساعت پیش از انجام آزمایش ناشتا بوده و از فعالیت جسمی و کشیدن سیگار بپرهیزند. پیش از انجام تست تمام افراد به مدت ۱۵ دقیقه در حالت استراحت مانده و به مدت ۲۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفتند. اگر چه ۵ دقیقه نخست از آنالیز حذف شده و فقط ۱۵ دقیقه برای محاسبه REE استفاده می‌شود.

آنالیز کامل ترکیب بدن

دستگاه Bodystat 1500 برای ارزیابی ترکیب بدن استفاده شد. این دستگاه ۴ کابل متنها به گیره‌هایی دارد که به الکترودهایی متصل می‌باشند. الکترودهای مصرفی به دست و پای راست متصل می‌شوند. قابل ذکر است که آنالیزورهای این دستگاه با باتری‌های تولید کننده سیگنال از بدن و اندازه‌گیری امپدانس در فرکانس ثابت ۵۰ kHz کار می‌کنند. جنس، وزن، قد و سطح فعالیت جسمی از جمله اطلاعاتی است که وارد دستگاه می‌شود. پس از انجام تست، آنالیز کامل ترکیب بدن که شامل درصد و میزان چربی، درصد و میزان توده عضلانی و درصد کل آب بدن

ترتیب ۱۵/۰۳±۹/۱۵ سال، ۱۵۹/۷۵±۶/۱۵ سانتی‌متر و ۸۱/۰۴±۱۱/۰۸ کیلوگرم بود. گروه I شامل ۱۸ فرد [۳۷/۵٪] با نمایه توده بدنی کمتر از ۳۰ و گروه II شامل ۳۰ فرد [۶۲/۵٪] با نمایه توده بدن برابر یا بیش از ۳۰ بودند. ۹۷٪ شرکت کنندگان را زنان و ۷٪ آنان را مردان تشکیل می‌دادند. افراد چاق و گروه کنترل در زمان نمونه‌گیری مشکلات عفونی نداشتند. مشخصات دموگرافیک، ارزیابی‌های آنتروپومتریک و آزمایشگاهی جمعیت مورد مطالعه هر گروه در جدول ۱ خلاصه شده است. توزیع جنسی و میانگین سن در بین دو گروه اختلاف معنادار نداشت. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است نمایه توده بدنی، برآورد میزان متابولیسم پایه، درصد چربی، توده چربی، توده عضلانی، میزان آب کل بدن، چربی احشایی، سطح گلوکز سرمی ناشتا، TG، HDL، CRP، Hs-CRP و میزان متابولیسم در حالت استراحت در میان دو گروه اختلاف معنادار داشت. در مورد سن، سطح کلسترول توتال و میزان متابولیسم در حالت استراحت به ازای کیلوگرم توده عضلانی بین دو گروه اختلاف معناداری مشاهده نشد.

ارزیابی میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC در گروه‌های مورد بررسی

تغییرات سطح بیان ژن MIF سلول‌های PBMC قبل و بعد از القاء با ویتامین D در دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC افراد چاق حدود ۲/۵ برابر گروه با نمایه توده بدن کمتر از ۳۰ بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است؛ بین سن، سطوح HDL و گلوکز سرم در حالت ناشتا با میزان بیان ژن MIF ارتباط مثبتی در گروه I وجود دارد. در گروه II بین سطوح گلوکز سرمی در حالت ناشتا، TG، RMR/kg و RMR/LBM و میزان بیان ژن MIF ارتباط مثبت یافت شد.

[Applied Biosystems, Foster City, CA]. مواد مورد نیاز برای واکنش‌های PCR از Applied Biosystems خریداری شد و هر نمونه ۳ بار در حجم ۲۰ μl و نهایتاً تا ۴۰ سیکل با شرایط real-time انجام شد. مقادیر Ct برای منحنی‌های استاندارد نسبی در پلیت‌های مشابه نمونه نرمال شد. مقادیر نسبی بیان ژن‌های هدف هر نمونه برای ژن housekeeping [beta actin] نرمالیزه شد. اطلاعات به صورت تغییرات چند برابری سطوح mRNA نسبت به گروه کنترل بیان شد.

آنالیزهای آماری

یافته‌های حاصل از مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۳ آنالیز شد. برای مقایسه مقادیر متغیرها در بین گروه‌ها از آزمون مربع کای استفاده شد. اطلاعات به دست آمده با توجه به منابع آن قادر به ارزیابی تفاوت بین میزان بیان ژن در بین گروه‌ها بود. اطلاعات به صورت مقادیر آستانه سیکل [Ct] به صورت تعداد سیکل بر اساس پلات‌های لگاریتمی PCR و مقادیر بر طبق پروتکل کارخانه تولید کننده بیان شدند.

به منظور نرمالیزاسیون نمونه‌ها، Actin-β به عنوان ژن housekeeping در نظر گرفته شد و نتایج به صورت نسبت مقادیر بیان MIF بر β actin گزارش شدند. این ژن پس از ارزیابی در چندین مطالعه و اطمینان از عدم تاثیر شرایط محیط بر میزان بیان آن به عنوان ژن housekeeping انتخاب شد. برای ارزیابی ارتباط بین میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC و متغیرهای مختلف قبل و بعد از القاء با ویتامین D در گروه‌های مورد بررسی از آزمون همبستگی استفاده شد. برای تمام آزمون‌ها مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

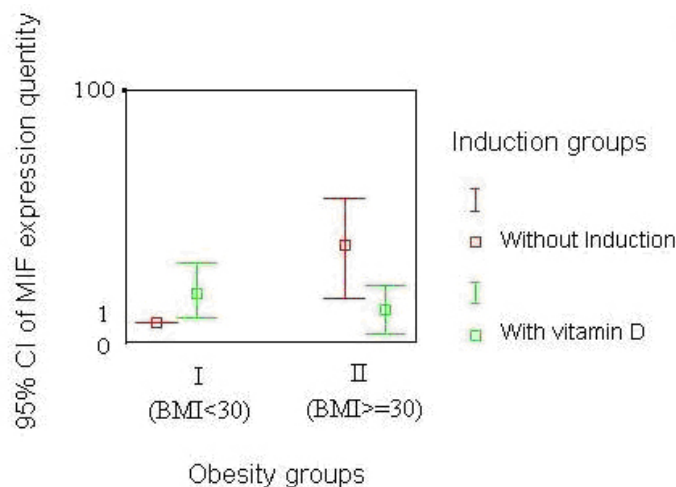
یافته‌ها

مشخصات جمعیت مورد بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی در مجموع ۴۸ فرد شرکت نمودند. میانگین سن، قد و وزن افراد شرکت کننده به

ارزیابی میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC در گروه‌های مورد بررسی بعد از القاء با ویتامین D

ارزیابی میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC بعد از القاء با ویتامین D سطح تغییرات متفاوتی را در گروه‌های مورد بررسی نشان داد که در شکل ۱ نشان داده شده است. افزایش سطح بیان ژن MIF در گروه I و کاهش بیان این ژن در گروه II تحت القاء با ویتامین D مشاهده شد.



شکل ۱- ارزیابی میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC پس از القاء با ویتامین D در دو گروه مورد بررسی
BMI, body mass index; MIF, Macrophage migration inhibitory factor.

جدول ۱- متغیرهای مورد بررسی در دو گروه [نمایه توده بدن کمتر از ۳۰ و گروه افراد چاق]

شرکت کنندگان		متغیر مورد بررسی
BMI بیشتر یا مساوی ۳۰	BMI کمتر از ۳۰	
۳۶/۲±۹/۹۳	۳۴/۴±۹/۱۵	سن (سال)
۳۴/۲۰±۳۳/۳۲	۲۷/۷۲±۱۰/۰۶	BMI (kg/m ²) *
۱۶۱۱/۲±۱۹۷/۲۶	۱۴۴۸/۵۰±۱۵۰/۷۴	برآورد BMR (Kcal/24h) *
۴۰/۸۴±۵/۳۰	۳۴/۴۶±۳/۸۹	درصد چربی (%) *
۳۶/۰۲±۶/۶۰	۲۴/۷۷±۳/۷۱	توده چربی (kg) *
۵۲/۰۷±۶/۷۸	۴۷/۱۵±۵/۵۱	توده عضلانی (kg) *
۳۸/۱۲±۴/۹۷	۳۴/۵۰±۴/۰۲	آب کل بدن (kg) *
۹/۳۳±۲/۲۴	۵/۳۸±۰/۹۷	چربی احشایی (kg) *
۱۲۷/۸۰±۵۷/۲۶	۱۰۴/۸۸±۱۷/۷۶	سطح گلوکز سرم در حالت ناشتا (mg/dl) *
۱۳۴/۰±۵۴/۷۴	۹۳/۱۶±۲۰/۳۲	TG (mg/dl) *
۱۶۵/۴±۴۱/۴۰	۱۶۳/۵۵±۲۷/۹۷	T-Chol (mg/dl)
۴۴/۱۳±۷/۸۰	۵۰/۱۶±۱۲/۶۶	HDL (mg/dl) *
۶/۳±۶/۱۵	۱/۷۳±۱/۸۶	Hs-CRP (mg/L) *
۱۵/۵۶±۶/۷۷	۱۰/۰±۳/۲۷	انسولین (μIU/ml) *

ادامه جدول ۱ در صفحه بعد

ادامه جدول ۱

۱۷۲۶/۱۸±۱۹۸/۵۷	۱۴۹۹/۰۶±۲۴۰/۲۶	(Kcal/24h/kg) RMR
۱۹/۵۷±۱/۹۶	۲۱/۲۵±۳/۴۷	* (Kcal/24h/kg) RMR/kg
۳۲/۷۲±۴/۴۲	۳۲/۳۹±۴/۴۱	(Kcal/24h/kg) RMR/LBM
۳/۳ E+۱۸±۱/۳۲۰ E+۱۹	۱/۴E+۱۸±۵/۹۰۶E+۱۸	میزان بیان ژن MIF
۳۰/۲۳±۳/۱۶	۳۱/۰۰۵±۳/۵۹	غلظت MIF

* P کمتر از ۰/۰۵ معنادار است.

BMI, body mass index; BMR predict, basal metabolic rate prediction by Body STAT devise; RMR, resting metabolic rate; TG, triglyceride; T-chol, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein; hs-CRP, Hyper sensitivity C-reactive protein; RMR/kg, resting metabolic rate/kilogram body weight; RMR/LBM, resting metabolic rate/lean body mass; MIF, Macrophage migration inhibitory factor.

جدول ۲- ارتباط میان میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC و متغیرهای مورد بررسی در دو گروه

گروه‌های مورد بررسی		متغیر
BMI ≥ 30	BMI < 30	
r=۰/۲	r=۰/۷۷	سن (سال)
P=۰/۲۵	P=۰/۰۰۱	
r=-۰/۰۰۶	r=-۰/۱۵	BMI (kg/m2)
P=۰/۹۷	P=۰/۵۴	
r=-۰/۰۹۵	r=-۰/۱۱	برآورد BMR (Kcal/24h)
P=۰/۶۳	P=۰/۶۶	
r=-۰/۰۰۲	r=-۰/۰۰۴	درصد چربی (%)
P=۰/۸۹	P=۰/۹۸	
r=-۰/۰۰۵	r=-۰/۰۰۹	توده چربی (kg)
P=۰/۷۸	P=۰/۹۷	
r=-۰/۰۰۴	r=-۰/۰۱۹	توده عضلانی (kg)
P=۰/۸۱	P=۰/۹۴	
R=-۰/۰۰۴	R=-۰/۰۲۱	آب کل بدن [kg]
P=۰/۸۳	P=۰/۹۳	
r=۰/۰۰۳	r=۰/۵۹	چربی احشایی (kg)
P=۰/۸۵	P=۰/۰۰۹	
r=۰/۰۰۷	r=۰/۷۳	سطح گلوکز سرم در حالت ناشتا (mg/dl)
P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۰۱	
r=۰/۵۱	r=۰/۱۲۶	TG (mg/dl)
P=۰/۰۰۵	P=۰/۶۲	
r=۰/۲۸	r=۰/۱۳	T-Chol (mg/dl)
P=۰/۱۴	P=۰/۹۵	
r=۰/۲۵	r=۰/۷۷	HDL (mg/dl)
P=۰/۱۸	P=۰/۰۰۱	
r=۰/۰۰۹	r=-۰/۰۰۲	Hs-CRP (mg/L)
P=۰/۶۳	P=۰/۹۱	
r=-۰/۱۲	r=-۰/۰۰۶	انسولین (μIU/ml)
P=۰/۵۴	P=۰/۷۹	
r=۰/۴۴	r=۰/۱۹	(Kcal/24h/kg) RMR
P=۰/۰۵۱	P=۰/۴۸	
r=۰/۶۳	r=۰/۱۴	(Kcal/24h/kg) RMR/kg
P=۰/۰۰۳	P=۰/۵۸	
r=۰/۶۳	r=۰/۱۸	(Kcal/24h/kg) RMR/LBM
P=۰/۰۰۲	P=۰/۴۹	

* P کمتر از ۰/۰۵ معنادار است.

BMI, body mass index; BMR predict, basal metabolic rate prediction by Body STAT devise; RMR, resting metabolic rate; TG, triglyceride; T-chol, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein; hsCRP, Hyper sensitivity c-reactive protein; RMR/LBM, resting metabolic rate/lean body mass; MIF, Macrophage migration inhibitory factor.

جدول ۳- ارتباط میان میزان بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC پس از القاء با ویتامین D و متغیرهای مورد بررسی در دو گروه

گروه‌های مورد بررسی		متغیر
BMI ≥ 30	BMI < 30	
r = -0.39 P = 0.05	r = 0.77 P = 0.001	سن (سال)
r = -0.127 P = 0.55	r = -0.16 P = 0.52	BMI (kg/m ²)
r = 0.91 P = 0.001	r = -0.13 P = 0.6	برآورد BMR (Kcal/24h)
r = -0.82 P = 0.001	r = 0.12 P = 0.96	درصد چربی (%)
r = -0.5 P = 0.12	r = -0.17 P = 0.94	توده چربی (kg)
r = 0.916 P = 0.001	r = -0.41 P = 0.87	توده عضلانی (kg)
R = 0.917 P = 0.001	R = -0.43 P = 0.86	آب کل بدن (kg)
r = 0 P = 1	r = 0.59 P = 0.12	چربی احتشایی (kg)
r = -0.144 P = 0.5	r = 0.73 P = 0.001	سطح گلوکز سرم در حالت ناشتا (mg/dl)
r = 0.67 P = 0.001	r = 0.158 P = 0.54	TG (mg/dl)
r = 0.68 P = 0.001	r = 0.113 P = 0.66	T-Chol (mg/dl)
r = -0.25 P = 0.9	r = 0.76 P = 0.001	HDL (mg/dl)
r = -0.27 P = 0.2	r = -0.32 P = 0.902	Hs-CRP (mg/L)
r = -0.33 P = 0.1	r = 0.05 P = 0.82	انسولین (μIU/ml)
r = 0.09 P = 0.69	r = 0.171 P = 0.54	RMR (Kcal/24h/kg)
r = 0.04 P = 0.07	r = 0.133 P = 0.63	RMR/kg (Kcal/24h/kg)
r = 0.68 P = 0.001	r = 0.169 P = 0.54	RMR/LBM (Kcal/24h/kg)

* P کمتر از 0.05 معنادار است.

BMI, body mass index; BMR predict, basal metabolic rate prediction by Body STAT devise; RMR, resting metabolic rate; TG, triglyceride; T-chol, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein; hsCRP, Hyper sensitivity c-reactive protein; RMR/LBM, resting metabolic rate/lean body mass; MIF, Macrophage migration inhibitory factor.

بحث

همانطور که انتظار می‌رفت، نتایج حاصل از مطالعه حاضر اختلاف معناداری را در عوامل خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن ناشی از چاقی مانند غلظت‌های بالای تری‌گلیسرید، توده چربی، میزان چربی احشایی، گلوکز ناشتای سرم و Hs-CRP و نیز غلظت پایین HDL در بین گروه افراد چاق و گروه کنترل نشان داد. اخیراً گزارش‌های منتشر شده از مطالعه‌ای نشان داده که Hs-CRP شاخص جانشینی مهمی در افزایش توده چربی است [۲۵]. یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین که نقش کلیدی MIF را در تجمع تری‌گلیسرید سلول‌های آدیپوسیت 3T3-L1 نشان داده‌اند، همراهی دارد [۲۷] و سطوح بالای بیان ژن MIF را در افراد چاق با سطوح بالای TG نشان می‌دهد.

شواهد به دست آمده از این مطالعه سطح بیان بالاتر ژن MIF را در افراد چاق در مقایسه با افراد با نمایه توده بدنی کمتر از ۳۰ نشان داد. یافته‌های مشابهی از مطالعه Dandona و همکارانش [۲۶] مبنی بر افزایش غلظت پلاسمایی MIF و بیان mRNA در سلول‌های MNC افراد چاق گزارش شده است. این یافته‌ها تا حدودی با وضعیت پیش التهابی چاقی قابل توجیه است. ارتباط مثبت سطح بیان ژن MIF با نمایه توده بدن، غلظت اسیدهای چرب آزاد و CRP نشان داده شده است. یافته‌های مطالعه حاضر نیز ارتباط مثبت بین سطح بیان ژن MIF، سن و سطح گلوکز ناشتا را نشان داد. به طور مشابهی در گروه افراد چاق مورد بررسی در این مطالعه ارتباط مثبت بین سطوح گلوکز سرم در حالت ناشتا، TG، RMR/kg و RMR/LBM یافت شد.

افزایش میزان بیان MIF mRNA در سلول‌های MNC و PBMC بیانگر فعالیت پیش التهابی این سلول‌ها در افراد چاق است [۲۶]. یادآوری این موضوع بسیار مهم است که در حقیقت مونوسیت‌ها جزئی از MNC هستند که وارد دیواره آرتریول‌ها شده و تبدیل به ماکروفاژها می‌شوند و به طور مستمر به درون بافت چربی مهاجرت می‌کنند. این ماکروفاژها قادرند توانایی تولید آدیپوکین‌های بافت چربی [۲۷] و در نهایت پیامدهای ناشی از چاقی را تغییر دهند.

MIF سایتوکاین ذاتی است که نقش آن در پاتورنز چندین التهاب و اختلالات ایمنی شناخته شده است. ویژگی پیش التهابی این سایتوکاین همچنین با تاثیر آن بر افزایش سطوح چندین واسطه پیش التهابی مانند CRP نشان داده شده است [۲۸]. پیشنهاد شده که ممکن است وضعیت پیش التهابی مربوط به مقاومت به انسولین ناشی از اختلال در سیگنال‌های انسولین باشد. منطقی به نظر می‌رسد که افزایش غلظت MIF با تاثیر بر مقاومت به انسولین باعث افزایش سطح گلوکز سرم گردد [۲۶].

همچنین شواهد بسیاری پیشنهاد کرده‌اند MIF در فرایندهای متابولیسمی و التهابی که منجر به اختلالات متابولیسمی مانند اختلال در تنظیم قند خون در دوره‌های استرس می‌شود، نقش تنظیم کننده دارد. همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که در این شرایط ماکروفاژها وارد بافت چربی می‌شوند. از سوی دیگر نتایج یافته‌های مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیکی بیانگر اهمیت نقش MIF در چاقی، اختلالات متابولیسم گلوکز و ایجاد مقاومت به انسولین می‌باشد [۲۸]. در تایید این مطلب Herder و همکارانش ارتباط مثبتی بین غلظت MIF و اختلال تحمل گلوکز نشان دادند [۲۹]. نقش‌های متعدد MIF در ارتباط با بافت چربی در چندین مطالعه گزارش شده است. شواهدی مبنی بر نقش مهاری MIF در انتقال سیگنال انسولین وجود دارد [۳۰]. همچنین، MIF فسفریلاسیون تیروزین^۱ IRS-1 و ارتباط آن را با p85 کاهش داده و در نتیجه از فسفریلاسیون ناشی از انسولین AKT که پیامی برای سنتز ترنسپورتر گلوکز است، ممانعت می‌کند [۲۸].

از سوی دیگر نقش MIF در تولید انسولین و رها شدن آن از سلول‌های β جزایر پانکراس به اثبات رسیده است [۳۱]. عملکرد MIF به عنوان آنزیم در تضعیف و شکست پیوند سولفیدریل نیز گزارش شده است [۳۲] که باعث کاهش فعالیت بیولوژیکی انسولین و کاهش حساسیت گیرنده انسولین دارای پیوندهای سولفیدریل می‌شود [۲۶]. این نوع مقاومت به انسولین برای جبران کاهش حساسیت به انسولین منجر به افزایش ترشح انسولین می‌شود. بنابراین

1- Insulin receptor substrate-1

در مورد نقش MIF در تنظیم گلوکز و مرتبط با چاقی چندین مسیر بالقوه وجود دارد. شواهدی مبنی بر ارزیابی فعالیت PI3-کیناز و فسفریلاسیون AKT وجود دارد که کمبود MIF باعث بهبود حساسیت به انسولین در بافت چربی سفید می‌شود. اگرچه در این مدل اثر آن بر بافت عضله و کبد یافت نشد [۲۸]. یافته‌های مطالعه حاضر سطح بهتر گلوکز سرمی ناشتا و غلظت پایین‌تر انسولین را در افراد با نمایه توده بدن کمتر از ۳۰ و سطح بیان پایین‌تر ژن MIF نشان داد. ممکن است سازوکارهای ذکر شده تا حدودی ارتباط مثبت بین سطح بیان ژن MIF و غلظت گلوکز ناشتای سرم را در هر دو گروه توجیه نماید. یافته‌های حاصل از مطالعات حیوانی تاثیر کمبود MIF را بر توده بافت چربی یا چاقی نیافته‌اند. یافته‌های مطالعه حاضر نیز ارتباطی بین بافت چربی و میزان بیان ژن MIF پیش از القاء یافت نشد که با نتایج پیشین همراهی دارد [۳۳]. نکته جالب این که بین میزان بیان ژن MIF و توده چربی احشایی پس از القای سلول‌های PBMC با ویتامین D در گروه I ارتباط مثبت و در گروه II ارتباط منفی یافت شد. شواهدی مبنی بر ارتباط مثبت میزان بیان ژن MIF در سلول‌های آدیپوسیت و سلول‌های پره-آدیپوسیت کشت داده شده با قطر بافت چربی وجود دارد [۳۴]. بنابراین به نظر می‌رسد نتایج این مطالعه بیانگر نقش احتمالی ویتامین D در بیان ژن MIF و نیز محور آدیپوسیتی است که عملکرد ضد چاقی احتمالی آن را پیشنهاد می‌کند. گزارش‌های پیشین نقش سیگنال دهنده ویتامین D را به عنوان واسطه جدید وابسته به سن در هموستاز بافت چربی نشان داده‌اند [۳۵]. مشابه با یافته‌های مطالعه مذکور، نتایج این مطالعه ارتباط مثبت میزان بیان ژن MIF پیش از مداخله را در گروه با نمایه توده بدنی ۳۰ نشان داد. از یافته‌های مهم مطالعه حاضر کاهش سطح بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC تحت القاء با ویتامین D در افراد چاق و عدم تغییر معنادار آن در گروه کنترل است. همچنین سطح بیان ژن MIF در سلول‌های PBMC تحت القاء با ویتامین D در افراد چاق در مقایسه با میزان پایه بیان آن در همین گروه کمتر بود. این یافته نیز با نتایج مطالعات پیشین

همخوانی دارد [۳۶،۳۷]، اگرچه در ارتباط با نقش 1,25[OH]2D3 در تحقیقات یافته‌های متناقضی منتشر شده است. شواهدی مبنی بر ویژگی‌های ایمونولوژیک 1,25[OH]2D3 در مونسیت‌ها و ماکروفاژها از جمله کاهش بیان رده MHC II و فعال شدن T-سل‌ها، کاهش سطح بیان مولکول‌های دخیل در تحریک و افزایش عملکرد ایمنی مانند فاگوسیتوز و کموتاکسی منتشر شده است [۳۸]. Sun X و همکارانش [۸] نقش تنظیمی کلسی تریول بر بیان ژن MIF را به عنوان واسطه مهم عملکرد و بقاء ماکروفاژها و آدیپوسیت‌های تمایز یافته انسان بررسی نمودند که به نظر می‌رسید کلسی تریول به طور معناداری سطح بیان MIF را افزایش داده است. Larsen و همکارانش [۳۶] نقش تنظیم کننده ایمنی بالقوه اندوژن 1,25[OH]2-کوله کلسی فرول را در سلول‌های مختلف بررسی نمودند. یافته‌های مطالعه آنها نقش مهارى سایتوکاین‌ها در کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و PBMC نشان داد. Giulietti و همکارانش [۳۷] مطالعه‌ای به منظور بررسی نقش مونسیت‌ها در شرایط التهابی sub-clinical و ارزیابی نقش 1,25-dihydroxyvitamin D3 به عنوان عامل ضد التهابی طراحی نمودند. برای این منظور مونسیت‌های بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را با مونسیت‌های افراد سالم و مبتلا به دیابت نوع ۱ مقایسه نمودند. یافته‌های مطالعه آنها نشان داد که به علت نقش 1,25-Dihydroxyvitamin D3 در تنظیم ایمنی بیان TNF- α ، IL-6، IL-1 و IL-8 در این سلول‌ها کاهش می‌یابد. یافته‌های مطالعه حاضر نتایج مشابه یافته‌های Giulietti و همکارانش [۳۷] مبنی بر نقش تنظیم‌گر التهابی 1,25-dihydroxyvitamin D3 در مونسیت‌های کشت داده شده از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ یافت. یافته‌های این مطالعه نشان داد که مونسیت‌های افراد چاق ویژگی پیش التهابی داشته و 1,25-dihydroxyvitamin D3 قادر به تنظیم التهاب در این سلول‌هاست. از زمان انتشار اثرات تحریکی 1,25-[OH]2D بر آدیپوژنز در *in vitro* در چندین مطالعه، یکی از موضوعات جالب قابل توجه در سال‌های اخیر یافتن ارتباط علیتی بین 1,25-[OH]2D و ابتلا به چاقی است

گزارش‌های مطالعه مذکور تغییرات معنادار سطوح mRNA ژن‌های پیش التهابی وابسته به NF- κ B از جمله فاکتور نکروز توموری α و MIF در طول دوره‌های کاهش و افزایش وزن می‌باشد [۱]. از سوی دیگر شواهدی وجود دارد که ویتامین D باعث القاء IkappaBalpha به عنوان مهار کننده NF-kappaB در رده های خاص سلولی می‌شود [۴۵]. بنابراین ممکن است سطوح مختلف NF- κ B در افراد چاق و غیر چاق نقش مهمی در توجیه سازوکارهای مسئول تغییرات متفاوت میزان بیان ژن MIF در گروه‌های مورد بررسی این مطالعه ایفاء کند.

این مطالعه دیدگاه جدیدی در ارتباط با نقش ویتامین D در تنظیم میزان بیان ژن MIF به صورت in vitro در افراد چاق و غیر چاق ارائه نموده است. به نظر می‌رسد اثر ویتامین D به عنوان عامل ضد التهابی یا پیش التهابی در سلول‌های PBMC بستگی به ویژگی‌های سلول افراد دارد. یافته‌های مطالعه حاضر نقش تنظیم‌گر ویتامین D را در بیان ژن MIF به عنوان سایتوکاین درگیر در تنظیمات ایمنی نشان داد. همچنین تغییر پاسخ ایمنی در مواجهه به ویتامین D در افراد چاق از یافته‌های جالب این مطالعه می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد این تغییرات پاسخ ایمنی ارتباط علیتی بالقوه‌ای با چاقی داشته باشد. برای آشکار شدن نقش ویتامین D در شرایط التهاب سیستمیک و موضعی افراد چاق مطالعات بیشتری در آینده پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه انجام این طرح توسط مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین شده است.

[۳۹]. همچنین شواهدی مبنی بر نقش 1,25-[OH] $_2$ D در تنظیم تعادل متابولیکی از طریق تنظیم بیان uncoupling protein 2 در آدیپوسیت‌ها وجود دارد [۴۰]. کمبود شدید ویتامین D در افراد چاق شایع است [۴۱] و نیز غلظت ویتامین D سرم در افراد با چاقی شدید به طور معناداری پایین است [۴۲]. ممکن است کمبود ویتامین D ناشی از چاقی به علت کاهش زیست دسترسی ویتامین D3 حاصل از پوست و منابع رژیمی و یا تجمع آن در بافت چربی بدن باشد [۴۳]. به نظر می‌رسد که تاثیر 1,25[OH] $_2$ D3 در کاهش بیان عامل پیش التهابی در افراد چاق از طریق کمبود ویتامین D این افراد و افزایش تراکم VDR در سلول‌های PBMC آنها قابل توجیه باشد. با توجه به نحوه تغییرات بیان ژن MIF در گروه II به نظر می‌رسد که تاثیر کلسی تریول از طریق تحریک فاکتور نکروز توموری در ماکروفاژها قابل توجیه باشد. البته این اثرات توسط آنتاگونیست کانال کلسیم و یا عوامل uncoupling میتوکندریایی مهار می‌شوند [۸]. بررسی‌های انجام شده بر موش‌های knocked out-VDR نشان داده که سطح Uncoupling protein-1 [جدا کننده تنفس سلولی از تولید انرژی] در بافت چربی سفید ۲۵ برابر بیشتر می‌شود. همچنین در موش‌های knocked out-VDR گزارش شده که به رژیم‌های پرچرب افزاینده وزن مقاوم می‌باشند [۳۵]. بنابراین به نظر می‌رسد در افراد چاق در مقایسه با افراد با وزن نرمال که غلظت ویتامین D پایین‌تر و دانسیته VDR بالاتر است، سطوح Uncoupling protein-1 نیز کمتر باشد. Oshima و همکارانش مکانیسم‌های بالقوه‌ای برای تغییرات معنادار سطوح بیان ژن MIF در پاسخ به ویتامین D پیشنهاد نمودند [۴۴]. از جمله فرضیات آنها تغییر فعالیت NF- κ B به عنوان تنظیم کننده بیان ژن MIF بود. از

مآخذ

1. Sheu W, Chang T, Lee W, et al. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesity [Silver Spring]* 2008; 16:1033-8.
2. Ikeda D, Sakaue S, Kamigaki M, et al. Knock-down of macrophage migration inhibitory factor disrupts adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 2008; 149: 6037-42.
3. Haslam D, James W. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-209.
4. Trayhurn P, Beattie J. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 329-39.
5. Yanovski S, Yanovski J. Obesity. *N Engl J Med* 2002; 346: 591-602.

6. Weisberg S, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, R.L. L, Ferrante Jr A. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
7. Bouloumié A, Curat C, Sengenès C, Lohmède K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 347-54.
8. Sun X, Zemel M. Calcitriol and calcium regulate cytokine production and adipocyte-macrophage cross-talk. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 392-9.
9. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-8.
10. Prietl B, Pilz S, Wolf M, et al. Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases? *Isr Med Assoc J* 2010; 12: 136-9.
11. Sun X, Zemel M. Calcium and 1,25-[OH]₂-D₃ regulation of adipokine expression in murine and human adipocytes and aP2-agouti transgenic mice. *Obesity [Silver Spring]* 2007; 15: 340-8.
12. Zemel M, Sun X. Calcitriol and energy metabolism. *Nutr Rev* 2008; 66: S139-46.
13. Calandra T, Bernhagen J, Metz C, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; 377: 68-71.
14. Bloom B, Bennet B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153: 80-2.
15. David J. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1966; 56:72-7.
16. Jacquin C, Koczon-Jaremko B, Aguila H, et al. Macrophage migration inhibitory factor inhibits osteoclastogenesis. *Bone* 2009; 45: 640-9.
17. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993; 365: 756-9.
18. Nishihira J, Y. K, Mizue Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. *Cytokine* 1998; 10: 199-205.
19. Grieb G, Merk M, Bernhagen J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor [MIF]: a promising biomarker. *Drug News Perspect* 2010; 23: 257-64.
20. Sakaue S, Ishimaru S, Hizawa N, et al. Promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is associated with obesity. *Int J Obes* 2006; 30: 238-42.
21. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 791-800.
22. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 2000; 408: 211-6.
23. Ohsumi J, Sakakibara S, Yamaguchi J, et al. Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 1994; 135: 2279-82.
24. Willeke P, Gaubitz M, Schotte H, et al. Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R43.
25. Gentile M, Panico S, Rubba F, et al. Obesity, overweight, and weight gain over adult life are main determinants of elevated hs-CRP in a cohort of Mediterranean women. *Eur J Clin Nutr* 2010 64:873-8.
26. Dandona P, Aljada A, Ghanim H, et al. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor [MIF] and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5043-7.
27. Armani A, Mammi C, Marzolla V, et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem* 2010; 110: 564-72.
28. Kleemann R, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm* 2010; 610-479.
29. Herder C, Kolb H, Koenig W, et al. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg. Survey 4 [KORA S4] *Diabetes Care* 2006; 29: 368-71.
30. Atsumi T, Cho Y, Leng L, et al. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J Immunol* 2007; 179: 5399-406.
31. Waeber G, Calandra T, Roduit R, et al. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet β cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4782-7.
32. Baugh J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002; 30: S27-S35.
33. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009; 105: 99-107.
34. Koska J, Stefan N, Dubois S, et al. mRNA concentrations of MIF in subcutaneous abdominal adipose cells are associated with

- adipocyte size and insulin action. *Int J Obes [Lond]* 2009; 33: 842-50.
35. Narvaez C, Matthews D, Broun E, Chan M, Welsh J. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. *Endocrinology* 2009 150: 651-61.
36. Larsen C, Kristensen M, Paludan K, et al. 1,25[OH]₂-D₃ is a potent regulator of interleukin-1 induced interleukin-8 expression and production. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1020-6.
37. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 47-57.
38. Xu H, Soruri A, Gieseler R, Peters J. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand J Immunol* 1993; 38 535-40.
39. Kong J, Li Y. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E916-24.
40. Shi H, Norman A, Okamura W, Sen A, Zemel M. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits uncoupling protein 2 expression in human adipocytes. *FASEB J* 2002; 16: 1808-10.
41. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1159-65.
42. Lin E, Armstrong-Moore D, Liang Z, et al. Contribution of Adipose Tissue to Plasma 25-Hydroxyvitamin D Concentrations During Weight Loss Following Gastric Bypass Surgery. *Obesity [Silver Spring]* 2010.
43. Wortsman J, Matsuoka L, Chen T, Lu Z, Holick M. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 690-3.
44. Oshima S, Onodera S, Amizuka N, et al. Macrophage migration inhibitory factor-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone loss. *FEBS Lett* 2006; 580: 1251-6.
45. Hansdottir S, Monick M, Lovan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake G. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state. *J Immunol* 2010; 184: 965-74.