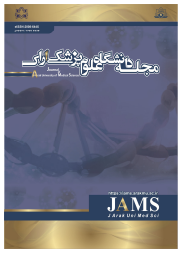
JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و یک، شماره پنج، مهر و آبان ۱۳۹۷
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

نقش محدودیت کالری بر بیان ژن پروتئین‌های پوشش‌دهنده بافت چربی و مقاومت به انسولین پس از ۸ هفته رژیم غذایی پرکالری در رت‌های نر

محسن ثالثی[۱]، محمد مهرتاش[۱*]، فرهاد دریانوش[۱]، نادر تنیده[۲]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۳

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۸/۱۵

واژگان کلیدی

پروتئین‌های پوشش‌دهنده چربی

پری‌لیپین ۱ و ۵

محدودیت کالری

مقاومت به انسولین

*نویسنده مسئول:

محمد مهرتاش

آدرس پستی: ایران، شیراز، دانشگاه شیراز، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: 8825 342 913 98+

نمابر: 8622 3226 34 98+

E-mail:
m_mehrtash_67@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: تجمع بیش از حد چربی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های ابتلا به دیابت نوع ۲ و ایجاد مقاومت به انسولین است. بر همین اساس، در این مطالعه تأثیر محدودیت کالری بر پروتئین‌های پوشش‌دهنده بافت چربی که از لیپولیز بافت چربی جلوگیری می‌کنند را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از ۳۰ سر رت نر بالغ نژاد اسپراگوداولی (وزن ۲۰±۲۰۰) استفاده شد. ابتدا رت‌ها به دو گروه (غذایی استاندارد و رژیم غذایی پرکالری) تقسیم شدند. سپس گروه رژیم غذایی پرکالری پس از ۸ هفته به‌صورت تصادفی در دو زیرگروه کنترل و محدودیت کالری قرار گرفتند. در نهایت، مقدار بیان ژن پری‌لیپین ۱ و ۵ به روش Pcr و مقاومت به انسولین نیز با استفاده از شاخص هما مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: وزن و مقاومت به انسولین گروه غذای پرچرب افزایش معنی‌داری نسبت به گروه محدودیت کالری و غذای استاندارد داشت ($p\leq۰/۰۰۵$). مقاومت به انسولین بین گروه محدودیت کالری و غذای استاندارد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p=۰/۳۹۴$). بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت چربی گروه پرکالری به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از گروه محدودیت کالری بود ($p\leq۰/۰۰۵$). بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت عضلانی در گروه غذای پرچرب نسبت به گروه محدودیت کالری و غذای استاندارد افزایش معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۰۵$). گروه محدودیت کالری از بیان ژن پری‌لیپین ۵ بیش‌تری نسبت به گروه غذای پرچرب و گروه غذای استاندارد برخوردار بود ($p\leq۰/۰۰۵$).

نتیجه‌گیری: محدودیت کالری احتمالاً از طریق تأثیر بر پروتئین‌های پوشش‌دهنده بافت چربی و درنتیجه کاهش تجمع چربی می‌تواند از ایجاد مقاومت به انسولین جلوگیری کند.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

مصرف غذاهای چرب و کم‌تحرکی به‌عنوان عوامل اصلی چاقی در نظر گرفته شده‌اند (۱). ارتباط نزدیکی بین همه‌گیر شدن چاقی و دیابت نوع ۲ وجود دارد و هنوز مطالعات برای درک این‌که تغییرات در متابولیسم لیپیدها چگونه موجب توسعه مقاومت به انسولین می‌شود، ادامه دارد. تجمع بیش‌ازحد چربی در داخل هر بافتی به‌غیر از بافت چربی موجب دیابت نوع دوم می‌شود. عضله یکی از مهم‌ترین این بافت‌ها می‌باشد. چاقی با تجمع بیش‌ازحد چربی و عدم تعادل در دریافت و مصرف انرژی مشخص می‌شود. هم‌چنین، با گسترش بیش‌ازحد بافت چربی، مقاومت به انسولین و نیز اختلالات متابولیکی مانند افزایش فشارخون (فشار خون بالا)، افزایش قند خون (دیابت) و سطوح لیپید نیز به وقوع می‌پیوندد (۲). علاوه بر بیماری‌های متابولیکی، چاقی می‌تواند با پیامدهای جسمانی، روانی و اجتماعی نیز همراه باشد (۳).

تجمع بیش‌ازحد چربی در هر بافتی به‌ویژه عضله اسکلتی و کبد منجر به وقوع مقاومت به انسولین می‌شود. تجمع دی آسیل گلیسرول با فعال شدن اعضای خانواده پروتئین کیناز C همراه است. پروتئین کیناز C ریشه سرین در سوبسترای گیرنده‌های انسولین (IRS-1) را فسفوریلاسیون کرده و موجب مهار فعالیت و مسدود کردن انتقال پیام پایین‌دست آن می‌شود. اختلال در مسیر سیگنالینگ پایین‌دست منجر به کاهش جذب گلوکز و سوخت‌وساز در پاسخ به انسولین می‌شود که در این حالت مقاومت به انسولین رخ می‌دهد (۴). از سوی دیگر، افزایش چربی خون در زمان چاقی یکی دیگر از دلایل مقاومت به انسولین است. اگرچه هنوز مکانیسم اصلی این پدیده مشخص نیست، اما داده‌های بالینی متعدد نشان می‌دهند که چاقی علت مقاومت به انسولین است. درواقع این چربی است که به توسعه تغییرات متابولیک و مقاومت به انسولین منجر می‌شود (۵). عوامل محیطی ازجمله دریافت غذاهای پرکالری و فقیر از مواد مغذی، غنی از قندهای ساده و چربی‌های اشباع و کاهش فعالیت بدنی در بروز چاقی دخالت دارند. با اندکی تعمق در سبک زندگی امروزی، نقش عوامل محیطی پررنگ‌تر می‌گردد (۶). بر همین اساس، استراتژی‌های زیادی برای مبارزه با چاقی و جلوگیری از آن شامل رژیم غذایی، داروهای گیاهی، فعالیت بدنی و غیره با هدف به حداقل رساندن عوارض جانبی مورداستفاده قرارگرفته است (۷). هم‌چنین، رژیم‌های غذایی پرچرب و تزریق چربی هر دو موجب افزایش چربی درون عضلانی می‌شوند. رژیم‌های کاهش وزن از طریق کاهش چربی عضلانی، بهبود مقاومت به انسولین را به همراه داشته‌اند. (۸).

تغییرات در چربی رژیم غذایی می‌تواند در تجمع تری‌گلیسرید درون عضلانی (IMTG) تغییر ایجاد کند. ماهیت متنوع قطرات چربی احتمالاً در پاتوژنز اختلالات مختلف و یا بیماری‌ها مانند چاقی و دیابت نوع ۲ نقش دارد. کاهش وزن علاوه بر بهبود حساسیت به انسولین، باعث کاهش تجمع تری‌گلیسرید درون عضلانی شده و اکسیداسیون چربی و عملکرد میتوکندری را نیز بهبود می‌بخشد (۴).

قطرات چربی توسط یک تک لایه فسفولیپید ساختاری احاطه شده است. این گروه شامل پری‌لیپین‌ها، ADRP (آدیپوفیلین)، Tip-47 (پروتئین ۴۷ کیلو دالتون)، S3-12 و OXPAT هستند که درمجموع خانواده PAT نام‌گذاری می‌شوند. اخیراً زیرواحدهای پری‌لیپین بر اساس PLIN1، PLIN2، PLIN3، PLIN4 و PLIN5 معرفی شده‌اند (۹). درواقع این پروتئین‌ها به‌عنوان یک سد فیزیکی در اطراف قطرات چربی قرارگرفته‌اند تا از تجزیه چربی‌ها توسط لیپازها جلوگیری کنند. در این میان، PLIN1 تنها در بافت چربی وجود دارد و PLIN5 نیز به‌طور عمده در بافت‌های با ظرفیت اکسیداتیو بالا مانند بافت چربی قهوه‌ای، عضلات اسکلتی، قلب و کبد بیان می‌شوند (۱۰). موتاگوی-تابار و همکاران نشان دادند که حداکثر میزان تجزیه چربی ناشی از نورآدرنالین نسبت به زنان لاغر تقریباً در افراد چاق دو برابر است و در پی آن پروتئین پری‌لیپین در سلول‌های چربی زنان چاق ۵۰ درصد کاهش داشته است. آن‌ها در پایان بیان کردند پری‌لیپین برای تنظیم تجزیه چربی در سلول‌های چربی انسان از اهمیت بالایی برخوردار است. آن‌ها پیشنهاد دادند که محتوای پایین پری‌لیپین نیز با فعالیت بالای لیپولیتیک داخل بدن مرتبط است؛ بنابراین، پری‌لیپین می‌تواند یک عامل

اختلال در تجزیه چربی در شرایط مقاوم در برابر انسولین نیز باشد (۱۱). بنابراین، Plin1 غیر فسفریله، مانع عمل لیپاز می‌شود، درحالی‌که Plin1 فسفریله منجر به لیپولیز می‌شود؛ بنابراین Plin1 برای فعالیت حداکثر لیپولیتیک نیز موردنیاز است (۱۲). پری‌لیپین ۵ به میزان زیادی در عضله اسکلتی بیان می‌شود که نقش آن در کنترل چربی‌های درون عضلانی، عملکرد انسولین و استفاده از سوبسترا هنوز مشخص نشده است. بیان بیش‌ازحد پری‌لیپین ۵ در عضله رت‌ها تجمع تری گلیسرید را افزایش می‌دهد که این امر نقش عمده آن را در اندازه سلول چربی نمایان می‌کند؛ اما با توجه به افزایش تری گلیسرید درون عضلانی توسط پری‌لیپین، تأثیری بر عملکرد انسولین ایجاد نمی‌شود. برخی محققین اعلام کردند که پری‌لیپین ۵ می‌تواند به غشای میتوکندری متصل شود و به‌صورت مستقیم اسید چرب را برای بتا اکسیداسیون از قطرات چربی به داخل میتوکندری انتقال دهد. این‌که آیا پروتئین PLIN با تعادل انرژی و یا حساسیت به انسولین مرتبط است هنوز هم موضوع موردبحث است (۲). رینانکوسکی و همکاران نشان دادند که موازی با آسیب دیدن حساسیت انسولین، بیان پری‌لیپین ۵ و تری گلیسرید درون عضلانی به‌صورت چشمگیری پس از رژیم پرچربی افزایش می‌یابد. آن‌ها گزارش کردند که ارتباط پروتئین‌های پری‌لیپین با تعادل انرژی و یا حساسیت انسولین هنوز در ابهام است. هم‌چنین بیان کردند، تغییر در رژیم غذایی می‌تواند تغییرات تری گلیسرید درون عضلانی را بهبود بخشد اما تأثیر چنین مداخله‌هایی روی بیان پروتئین‌های پری‌لیپین هنوز باید موردبررسی قرار گیرد (۱۳).

با توجه به مطالعات اندک در زمینه پروتئین‌های پوشش‌دهنده بافت چربی و اهمیت بافت چربی به‌عنوان یک بافت متابولیک در ایجاد مقاومت به انسولین، در این مطالعه سعی بر آن داشتیم تا تأثیر یک دوره محدودیت کالری را پس از یک دوره رژیم غذایی پرکالری بر وزن بدن، میزان بیان ژن پری‌لیپین ۱ و ۵ و مقاومت به انسولین در رت‌های نر مورد بررسی قرار دهیم.

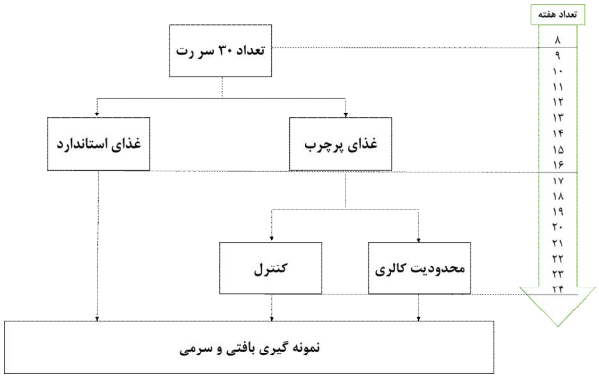
۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد IR.SUMS.REC.1394.S444 به تأیید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسیده است.

۳. مواد و روش‌ها

برای این بررسی، ۳۰ سر رت نر بالغ نژاد اسپراگوداولی (وزن ۲۰۰±۲۰) از مرکز آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردیدند و به آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی منتقل شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد) نگهداری شدند. بر همین اساس، ابتدا رت‌ها در دو گروه قرار گرفتند. یک گروه به مدت ۸ هفته از رژیم غذایی استاندارد (تعداد ۱۰ سر رت) و گروه دیگر نیز به مدت ۸ هفته از رژیم غذایی پرکالری (تعداد ۲۰ سر رت) استفاده کردند. غذای پرچرب حاوی کالری و چربی بیش‌تر در مقایسه با غذای استاندارد بود (کالری غذا ۴/۸۴ کیلوکالری در برابر ۳/۸۶ کیلوکالری و درصد انرژی غذا از چربی ۳۹ درصد در برابر ۳/۲ درصد). سپس گروه رژیم غذایی پرکالری پس از ۸ هفته به‌صورت تصادفی در دو زیرگروه کنترل و محدودیت کالری قرار گرفتند تا مطالعه حاضر روی سه گروه کنترل با غذای استاندارد، کنترل با غذای پرکالری و گروه محدودیت کالری انجام شود (شکل ۱).

گروه محدودیت کالری روزانه تحت مداخله غذایی قرار گرفت. غذای گروه محدودیت کالری دو هفته تحت نظر قرار گرفته شد تا میانگین غذای دریافتی هر قفس مشخص شود. سپس این گروه به مدت ۸ هفته در معرض محدودیت کالری قرار گرفتند. گروه محدودیت کالری به میزان ۴۰ درصد از کالری دریافتی محدود شد (۱۴) و گروه‌های غذای پرچرب و استاندارد ۱۰۰ درصد غذای موردنیاز خود را به‌صورت آزادانه دریافت کردند. از آن‌جا که ژن‌های مدنظر در نمونه‌های چاق و طبیعی متفاوت است، علاوه بر گروه غذای استاندارد یک گروه با رژیم غذایی پرچرب به عنوان گروه کنترل جهت مقایسه دقیق تغییرات با گروه محدودیت کالری نیز استفاده شد.



شکل ۱. زمان‌بندی اجرای پژوهش و ایجاد رژیم پرکالری و محدودیت کالری

در پایان هفته ۱۸، تمامی رت‌ها به‌وسیله تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. نمونه‌های خونی از ورید اجوف فوقانی جمع‌آوری و سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم جداشده در اپندورف‌های مخصوص در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درنهایت عضله نعلی، چربی احشایی و صفاقی خلفی استخراج و سپس بلافاصله برای سنجش‌های بعدی در دمای ۸۰- فریز شده و برای آزمایش‌های سلولی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس، استخراج RNA بر اساس دستورالعمل YTA Total RNA Extraction Mini Kit Cat No: YT9065 و با استفاده از محلول‌های کیت و پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. استخراج RNA با استفاده از ۵۰ میلی‌گرم بافت به‌طور جداگانه و به روش ستونی و بر اساس دستورالعمل موجود صورت گرفت. غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه پیکودراپ با طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. میانگین ODهای خوانده شده ۱/۹۲ بود که نشان‌دهنده کارآیی مناسب RNA استخراج‌شده بود. سپس از RNA موجود cDNA تهیه گردید. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1622) تهیه گردید. cDNA آماده شده جهت انجام RT- PCR مورد استفاده قرار گرفت و مقداری جهت نگهداری به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

پس از بهینه‌سازی واکنش، cDNA مربوط به گروه‌های مورد آزمایش تحت واکنش RT-PCR قرار گرفتند. جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-Time PCR تمام پرایمرها توسط نرم‌افزار primer3 طراحی شدند و از ژن β2m به‌عنوان کنترل داخلی جهت کمی‌سازی داده‌ها استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

PLIN1	Forward	GTGGCTCTCAGCTGCATGT
	Reverse	ATTAGCAGCTGTGAACTGGGT
PLIN5	Forward	CCATCTTGCCTATCAACACTCT
	Reverse	TGCATATGCTGGATCAGCTC
B2m	Forward	CGTGCTTGCCATTCAGAAA
	Reverse	ATATACATCGGTCTCGGTGG

تمامی پرایمرها به صورت اتصال اگزون-اگزون طراحی شدند. اصول انجام RT-PCR مشابه PCR معمولی بود، با این تفاوت که به‌جای Master Mix معمولی از Master Mix حاوی سایبرگرین (تاکارا) استفاده گردید. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه Real-Time PCR استخراج و درنهایت Ct میانگین سه مرتبه ثبت گردید. هم‌چنین برای هر نمونه cDNA نیز یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر β2m به‌عنوان کنترل داخلی و برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف موردنظر از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد. غلظت انسولین سرم به روش الایزا اندازه‌گیری شد. گلوکز نیز به روش آنزیمی رنگ‌سنجی با فن‌آوری گلوکز اکسیداز و با استفاده از کیت گلوکز (شرکت پارس آزمون ایران) اندازه‌گیری شد. شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

HOMA-IR = غلظت گلوکز (میلی‌مول بر لیتر) × غلظت انسولین (میلی‌واحد بر لیتر) ÷ ۲۲/۵

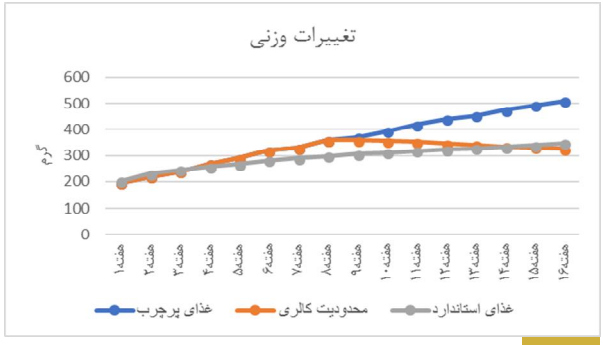
اطلاعات موردنظر پس از جمع‌آوری، توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ تحلیل گردید و کلیه نتایج نیز به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان و در سطح معنی‌داری p≤۰/۰۵ پردازش و سپس تحلیل شد. جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف–اسمرینوف استفاده شد. برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها نیز آزمون واریانس یک‌طرفه (آنوا) و آزمون تعقیبی توکی مورد استفاده قرار گرفت.

۴. یافته‌ها

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه ما پس از ۸ هفته استفاده از غذای پرچرب تفاوت معنی‌داری بین گروه غذای استاندارد و گروه پرچرب ایجاد شد. در پایان هفته شانزدهم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در وزن بین گروه غذای پرچرب (۵۰۹/۶±۸/۰۱ گرم)، محدودیت کالری (۳۲۶/۲۰±۲/۱۶ گرم) و گروه با غذای استاندارد (۳۴۷/۲±۴/۰۸ گرم) وجود داشت (p≤۰/۰۰۵). بر همین اساس، گروهی که غذای پرچرب را ادامه داده بود از وزن بالاتری برخوردار بود و گروهی که پس از ۸ هفته غذای پرچرب تحت محدودیت کالری قرارگرفته بود از وزن کم‌تری نسبت به گروه غذای پرچرب و غذای استاندارد برخوردار بود (جدول ۲) (شکل ۱).

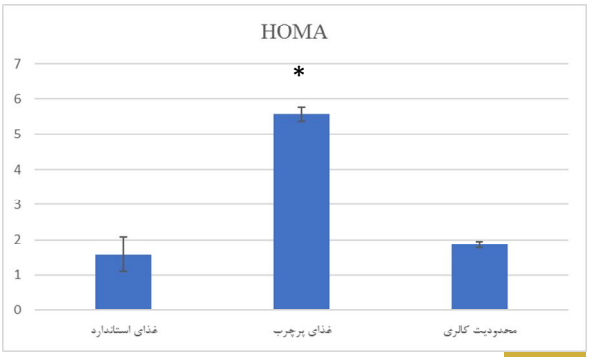
جدول ۲. مقایسه گروه‌ها از لحاظ مصرف غذای استاندارد، غذای پرچرب و محدودیت کالری. *تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه غذای استاندارد، ¥ تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه غذای پرچرب و Ÿ تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه محدودیت کالری. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نوشته شده‌اند.

شاخص	غذای استاندارد	غذای پرچرب	محدودیت کالری
وزن هفته اول (گرم)	۲۰۱/۶±۲/۴	۱۹۵/۷±۹/۱۲	
وزن هفته هشتم (گرم)	۲۹۷/۶±۶/۳۴	*۳۵۹/۳±۱/۵۱	
وزن هفته شانزدهم (گرم)	¥۳۴۷/۲±۴/۰۸	*۵۰۹/۸±۶/۰۱	¥*۳۲۶/۲۰±۲/۱۶
گلوکز (میلی مول بر لیتر)	¥۵/۳۸±۰/۷۸	Ÿ *۹/۲۱±۰/۲۲	¥ ۵/۸۱±۰/۲۱
انسولین (uIU/mL)	¥۶/۵۴±۱/۰۴	Ÿ *۱۳/۵۵±۰/۲۲	¥ ۷/۲۰±۰/۲۰
شاخص مقاومت به انسولین (HOMA)	¥۱/۵۹±۰/۴۹	Ÿ *۵/۵۵±۰/۲۰	¥ ۱/۸۶±۰/۰۸
پری‌لیپین ۱ در بافت چربی (اختلاف Ct)	Ÿ¥ ۱۱/۴۳±۰/۲۱	Ÿ *۸/۹۴±۰/۲۸	¥*۱۰/۶۷±۰/۲۷
پری‌لیپین ۱ در عضله (اختلاف Ct)	¥۲/۸۹±۰/۲۲	Ÿ *۲/۳۳±۰/۳۷	¥ ۲/۷۹±۰/۲۰
پری‌لیپین ۵ در عضله (اختلاف Ct)	Ÿ ¥ ۹/۳۶±۰/۳۷	Ÿ *۸/۱۸±۰/۵۲	¥*۶/۳۳±۰/۷۲



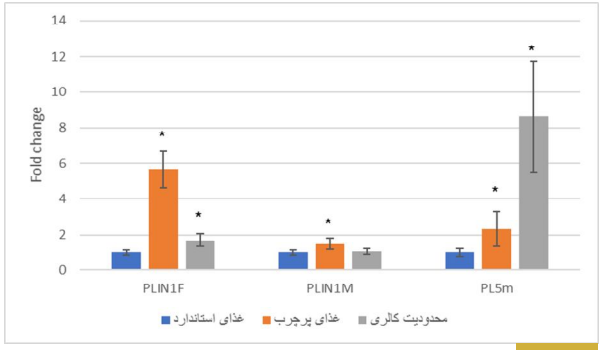
شکل ۱. مقایسه گروه‌ها از لحاظ مصرف غذای استاندارد، غذای پرچرب و محدودیت کالری با توجه به تغییرات وزنی

پس از محاسبه شاخص مقاومت به انسولین مشخص شد که گروه غذای پرچرب از بیش‌ترین مقدار مقاومت به انسولین (۱۳/۰±۵۵/۲۲) نسبت به گروه غذای استاندارد (۱/۰±۵۹/۴۹) و گروه محدودیت کالری (۱/۸۶±۰/۰۸) برخوردار بود (p≤۰/۰۰۵)؛ اما در مقایسه گروه محدودیت کالری و غذای استاندارد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۳۹۴) (نمودار ۱).



نمودار ۱. میزان مقاومت به انسولین بین گروه غذای استاندارد، غذای پرچرب، محدودیت کالری. *اختلاف معنی‌دار بین گروه غذای پرچرب و محدودیت کالری و غذای استاندارد (p≤۰/۰۰۵)

مقایسه سطوح بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت چربی نشان داد که بیان این ژن در گروه غذای پرچرب به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از گروه محدودیت کالری بود و کم‌ترین بیان این ژن در گروه غذای استاندارد بود و تفاوت معنی‌داری بین هر سه گروه مشاهده شد ($p\leq۰/۰۰۵$). هم‌چنین بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت عضلانی نشان داد که بین گروه غذای استاندارد و گروه محدودیت کالری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و میزان این ژن در گروه غذای پرچرب افزایش داشت ($p\leq۰/۰۰۵$). مقایسه بیان ژن پری‌لیپین ۵ در بافت عضلانی نشان می‌دهد که بیش‌ترین بیان در گروه محدودیت کالری وجود دارد و هم‌چنین بیان این ژن در گروه غذای پرچرب نیز نسبت به گروه غذای استاندارد بیش‌تر بود ($p\leq۰/۰۰۵$). هم‌چنین گروه محدودیت کالری از بیان ژن بیش‌تری نسبت به گروه غذای پرچرب برخوردار بود ($p\leq۰/۰۰۵$) (جدول ۲). در نمودار ۲ میزان تغییرات هر یک از ژن‌ها به تفکیک ارائه شده است



نمودار ۲. میزان تغییرات بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت چربی، پری‌لیپین ۱ در بافت عضله و پری‌لیپین ۵ در بافت عضله. *اختلاف معنی‌دار بین گروه غذای پرچرب و محدودیت کالری و غذای استاندارد ($p\leq۰/۰۰۵$). PLIN1F: پری لیپین ۱ بافت چربی، PLIN1M: پری لیپین ۱ عضله، PLN5M: پری لیپین ۵ عضله.

۵. بحث

یکی از کاربردی‌ترین یافته‌های این تحقیق تغییرات وزن می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که ۸ هفته رژیم غذایی پرکالری موجب افزایش معنی‌دار وزن گروه غذای پرچرب گردید. هم‌چنین در پایان هفته ۱۶ مشاهده شد که گروه محدودیت کالری کم‌ترین وزن را به خود اختصاص داده و گروهی که مصرف غذای پرچرب را ادامه داده بودند بیش‌ترین وزن را داشتند. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، در پایان هفته ۱۶ همراه با افزایش وزن میزان مقاومت به انسولین در گروه غذای پرچرب افزایش معنی‌داری داشت که این امر می‌تواند به علت اختلال متابولیک و جذب چربی بیش‌ازحد توسط عضلات و بافت چربی ایجاد شده باشد. هم‌چنین التهاب حاصل از سلول‌های چربی نیز می‌تواند در وقوع مقاومت به انسولین نقش ویژه‌ای داشته باشد. پس از ایجاد محدودیت کالری تفاوت معنی‌داری با گروه غذای استاندارد مشاهده نشد و میزان مقاومت به انسولین در دامنه طبیعی خود قرارگرفته بود که این امر می‌تواند نشان‌دهنده بهبود اختلال متابولیکی و یا جلوگیری از تجمع بیش‌ازحد چربی در پی محدودیت کالری باشد که توانسته است مقاومت به انسولین را در دامنه طبیعی خود حفظ کند.

همسو با افزایش وزن در گروه غذایی پرچرب و افزایش مقاومت به انسولین در این گروه بیان ژن پری‌لیپین ۱ در بافت چربی و بافت عضلانی و پری‌لیپین ۵ در عضله افزایش داشت که این امر نشان‌دهنده تشکیل بیش‌تر قطرات چربی در این قسمت‌ها می‌باشد. با توجه به مبانی نظری، تشکیل قطرات چربی مستلزم حضور ژن پری‌لیپین است که این ژن علاوه بر تشکیل تری‌گلیسریدها از لیپولیز بافت چربی نیز جلوگیری می‌کند. برخلاف این نظریه که پری‌لیپین‌ها به تجمع چربی کمک می‌کنند بیان پری‌لیپین ۵ در عضله اسکلتی گروه محدودیت کالری از سطح بالایی برخوردار بود، اما وزن این گروه کم‌ترین مقدار را داشت که این کاهش وزن می‌تواند به فراخوانی میتوکندری و نزدیک‌کردن میتوکندری به قطرات چربی ربط داشته باشد. از این طریق می‌توان برداشت کرد که با افزایش پری‌لیپین ۵ و از سوی دیگر فعال شدن مسیر SIRT-1 و AMPK در پی محدودیت کالری بایوژنز میتوکندری افزایش داشته و موجب شده است تا اکسیداسیون چربی‌ها افزایش یافته و از تجمع بیش‌ازحد چربی در عضله که یک عامل ایجاد مقاومت به انسولین می‌باشد جلوگیری نماید.

ریچل و همکاران بیان کردند که تجمع چربی در عضله اسکلتی می‌تواند موجب مقاومت به انسولین و دیابت نوع دوم

شود. عدم توانایی در تجزیه تری‌گلیسرید و یا بسیج چربی در عضله اسکلتی موجب ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود (به علت تجمع بیش‌ازحد تری گلیسرید) (۲).

درواقع بیان بیش‌ازحد پری‌لیپین ۵ در عضله اسکلتی تجمع تری گلیسرید را افزایش می‌دهد. ریچل و همکاران میزان پری‌لیپین ۵ را در موش‌ها افزایش دادند تا نقش پری‌لیپین ۵ را در کنترل متابولیک و مقاومت به انسولین بررسی کنند. آن‌ها مشاهده کردند که همراه با افزایش پری‌لیپین ۵ در عضله اسکلتی، مقاومت به انسولین کاهش پیدا کرده است (۲) و یا افزایش تری‌گلیسرید درون عضلانی آسیبی مقاومت به انسولین ایجاد نکرده بود (۱۵). آن‌ها بیان کردند که این کاهش مقاومت به انسولین می‌تواند به علت نقش پری‌لیپین ۵ در اتصال قطرات چربی به میتوکندری باشد که توانسته است فسفوریلاسیون چربی‌ها را افزایش داده و از افزایش تری گلیسرید جلوگیری کرده باشد. در پایان محققین بیان کردند که افزایش بیان ژن پری‌لیپین ۵ می‌تواند برای بهبود مقاومت به انسولین مفید باشد (۲).

در همین راستا بوسما و همکاران از طریق الکتروپوریشن بیان پری‌لیپین ۵ را در عضله رت‌هایی که از رژیم غذایی پرکالری استفاده می‌کردند افزایش دادند. پس از ۸ روز، برداشت گلوکز به‌واسطه انسولین را در رت‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش بیان ژن پری‌لیپین ۵ اندازه سلول‌های چربی افزایش یافته بود. علی‌رغم افزایش محتوای تری گلیسرید درون عضلانی حساسیت به انسولین آسیب ندیده بود. آن‌ها مشاهده کردند که بیان بیش‌ازحد پری‌لیپین ۵ در عضله اسکلتی موجب بیان ژن‌های PGC1-a می‌شود که در کاتابولیسم چربی و اکسیداسیون میتوکندری نقش ویژه‌ای دارد (۱۵).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر پری‌لیپین ۵ در گروه با محدودیت کالری بیش‌ترین بیان را داشت، درحالی‌که گروه محدودیت کالری از وزن کم‌تری نسبت به گروه پرکالری و غذای استاندارد برخوردار بود. از آن‌جا که محدودیت کالری می‌تواند مسیر SIRT-1 و AMPK را فعال کرده و موجب بایوژنز میتوکندری شود، درواقع می‌توان تفاوت بین دو گروه را به فعال شدن مسیر SIRT-1 نسبت داد که توانسته است در گروه محدودیت کالری بایوژنز میتوکندری و در پی آن اتصال میتوکندری به قطرات چربی را افزایش داده و موجب فسفوریلاسیون بیش‌تر چربی‌ها شود. پری‌لیپین ۵ توسط پروتئین کیناز A فسفوریله می‌شود و در هسته توسط PGC1a و SIRT-1 نسخه‌برداری می‌شود. پری‌لیپین ۵ از طریق رهاکردن فعالیت دی استیلاز SIRT-1 عملکرد کواکتیویتور PGC-1 را افزایش می‌دهد؛ بنابراین پری‌لیپین ۵ می‌تواند از نقص میتوکندریایی جلوگیری کند. نویسندگان بیان کردند که پری‌لیپین ۵ ارتباط مستقیمی با تجمع تری‌گلیسرید و اکسیداسیون پالمیتات دارد (۱۶).

در مطالعه دیگر بیان شده است که پری‌لیپین ۱ غیر فسفوریله اطراف قطرات چربی را پوشانده است. از سوی دیگر، در شرایط لیپولیتیک ATGL و HSL (دو آنزیم کلیدی در لیپولیز چربی‌ها) داخل سیتوزول قرار دارند و از سوبسترای خود جدا هستند. در مقابل، CGI-58 بر روی قطره چربی و متصل به پری‌لیپین ۱ غیر فسفوریله قرار گرفته است. پری‌لیپین ۱ با AKAP ارتباط دارد و پروتئین کیناز نوع ۱ و ۲ را در سطح قطرات چربی تنظیم می‌کند. در تحریک بتا آدرنرژیک پری‌لیپین ۱ و لیپاز حساس به هورمون به‌وسیله پروتئین کیناز ۱ تحریک می‌شود. درنتیجه، لیپاز حساس به هورمون، به پری‌لیپین ۱ فسفوریله متصل شده و CGI-58 از پری‌لیپین فسفوریله جداشده و به ATGL متصل می‌گردد که درنهایت منجر به فعال شدن لیپولیز خواهد شد؛ بنابراین آن‌ها بیان کردند که پری‌لیپین ۱ غیر فسفوریله یک سد در برابر لیپازها و لیپولیز می‌باشد که می‌تواند به تجمع چربی‌ها کمک کند (۱۷).

در یک مطالعه که از موش‌های فاقد پری‌لیپین استفاده کرده بودند مشاهده شد که این موش‌ها در مقایسه با موش‌هایی که از میزان ژن طبیعی برخوردار بودند بیش‌تر در معرض لیپولیز قرار داشتند. موش‌های فاقد پری‌لیپین از چربی کم‌تری نسبت به موش‌های سالم برخوردار بودند (۱۸). هم‌چنین مطالعات دیگری که پری‌لیپین ۱ را در موش‌ها حذف کرده بودند نشان دادند که این موش‌ها از چربی کم‌تری برخوردار هستند و در

برابر چاقی ناشی از رژیم‌های پرکالری و یا چاقی ژنتیک مقاوم هستند (۱۹). با توجه به نتایج مطالعه حاضر پری‌لیپین ۱ هم در بافت چربی و هم در عضله اسکلتی گروه پرکالری افزایش داشت که این امر می‌تواند نشان‌دهنده تجمع بیش‌ازحد چربی در این بافت‌ها باشد. هم‌چنین از آن‌جا که گروه غذای پرچرب هیچ محرکی برای لیپولیز را تجربه نکرده بود، از این‌رو می‌تواند موجب عدم فسفوریله شدن پری‌لیپین ۱ شده و از لیپولیز چربی در این گروه جلوگیری شده باشد. از سوی دیگر، با توجه به این‌که گروه محدودیت کالری می‌تواند تحریک بتا آدرنرژیک را افزایش دهد، بنابراین بخشی از پری‌لیپین حاضر در قطرات چربی فسفوریله شده و این امر موجب فعالیت بیش‌تر لیپازها و لیپولیز بیش‌تر چربی‌ها می‌شود (۱۷).

۶. نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، محدودیت کالری احتمالاً می‌تواند موجب بیان پری‌لیپین ۵ شده که همسو با فراخوانی میتوکندری و اتصال آن‌ها به قطرات چربی می‌تواند اکسیداسیون چربی‌ها را افزایش داده و از تجمع بیش‌ازحد چربی جلوگیری نماید. هم‌چنین، کاهش بیان پری‌لیپین ۱ در بافت چربی و کاهش وزن در گروه محدودیت کالری می‌تواند نشان‌دهنده این امر باشد که پری‌لیپین فسفوریله در قطرات چربی افزایش‌یافته که موجب لیپولیز بیش‌تر چربی‌ها شده و از تجمع چربی جلوگیری کرده است. در پایان با کاهش چربی در گروه کنترل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً محدودیت کالری می‌تواند از طریق کاهش تجمع چربی از ایجاد مقاومت به انسولین جلوگیری و یا حتی موجب کاهش مقاومت به انسولین در نمونه‌های با مقاومت به انسولین بالا شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تأثیر دیگر مداخله‌ها ازجمله فعالیت ورزشی، داروها و غیره بر این پروتئین‌ها مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین توصیه می‌شود همراه با پری‌لیپین ۵ بایوژنز میتوکندریایی را نیز موردبررسی قرار گیرد.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری در دانشگاه شیراز می‌باشد و هیچ گونه حامی مالی نداشته است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر محسن ثالثی، دکتر فرهاد دریانوش و دکتر نادر تنیده که در انجام این مطالعه یاری نمودند تقدیر به عمل آورند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

References

1. Borch-Johnsen K. The metabolic syndrome in a global perspective. The public health impact--secondary publication Dan Med Bull. 2007; 54(2):157-9.
2. Mason RR, Mokhtar R, Matzaris M, Selathurai A, Kowalski GM, Mokbel N, et al. PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle. Molecular metabolism. 2014; 3(6):652-63.
3. Alizadeh H, Safarzadeh A, Talebi-Garakani E. Effect of Resistance Training on Serum Meteorin-like Hormone Level and Insulin Resistance Index in Overweight Adolescent Boys. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2017; 20(7): 54-64.
4. Rinnankoski-Tuikka R. The effects of physical activity and diet change on intracellular lipids and metabolism in mice with diet-induced obesity. Studies in sport, physical education and health. 2014(210).
5. Tkachuk VAe, Vorotnikov AV. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance Development. Diabetes mellitus. 2014; 17(2): 29-40.
6. Khajebishak Y, Payahoo L, Homayouni Rad A, Shokrvash B. The Role of Intestinal Microbiota in The Health and A Short Review on The Probiotic and Prebiotic Supplements in Obesity Prevention. Arak Medical University Journal. 2014; 17(90): 18-26.
7. Braithwaite I, Stewart AW, Hancox RJ, Beasley R, Murphy R, Mitchell EA, et al. The worldwide association between television viewing and obesity in children and adolescents: cross sectional study. PLoS One. 2013; 8(9): e74263.
8. Morton TL, Galior K, McGrath C, Wu X, Uzer G, Uzer GB, et al. Exercise increases and browns muscle lipid in high-fat diet-fed mice. Frontiers in endocrinology. 2016; 7:80.
9. Shaw CS, Shepherd SO, Wagenmakers AJ, Hansen D, Dendale P, Van Loon LJ. Prolonged exercise training increases intramuscular lipid content and perilipin 2 expression in type I muscle fibers of patients with type 2 diabetes. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2012; 303(9): E1158-E65.
10. Chang BH-J, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC, et al. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. Molecular and Cellular Biology. 2006; 26(3):1063-76.
11. Mottagui-Tabar S, Ryden M, Löfgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes A, et al. Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. Diabetologia. 2003; 46(6):789-97.
12. Tansey J, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush D, Zee J, Gavrilova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001; 98(11): 6494-9.
13. Rinnankoski-Tuikka R, Hulmi JJ, Torvinen S, Silvennoinen M, Lehti M, Kivelä R, et al. Lipid droplet-associated proteins in high-fat fed mice with the effects of voluntary running and diet change. Metabolism-Clinical and Experimental. 2014; 63(8):1031-40.
14. Liu Y, Ni Y, Zhang W, Sun Y-E, Ma Z, Gu X. Antinociceptive effects of caloric restriction on post-incisional pain in nonobese rats. Scientific reports. 2017; 7(1):1805.
15. Bosma M, Sparks L, Hooiveld G, Jorgensen J, Houten S, Schrauwen P, et al. Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2013; 1831(4):844-52.
16. Gallardo-Montejano VI, Saxena G, Kusminski CM, Yang C, McAfee JL, Hahner L, et al. Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1α/SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. Nature communications. 2016; 7:12723.
17. Sztalryd C, Kimmel AR. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. Biochimie. 2014; 96:96-101.
18. Gjelstad I, Haugen F, Gulseth H, Norheim F, Jans A, Bakke S, et al. Expression of perilipins in human skeletal muscle in vitro and in vivo in relation to diet, exercise and energy balance. Archives of physiology and biochemistry. 2012; 118(1): 22-30.
19. Beylot M, Neggazi S, Hamlat N, Langlois D, Forcheron F. Perilipin 1 ablation in mice enhances lipid oxidation during exercise and does not impair exercise performance.

Metabolism-Clinical and Experimental. 2012; 61(3):415-23.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(5)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

The Role of Caloric Restriction on Lipid Coat Proteins Gene Expression and Insulin Resistance after 8 Weeks High Caloric Diet in Male Rats

Mohsen Salesi[1], Mohammad Mehrtash[1], Farhad Daryanoosh[1], Nader Tanide[2]

1. Department of Exercise Physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Stem Cell Research Center, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history
Received: *03 February 2017*
Accepted: *13 June 2018*
Published online: *06 November 2018*

Keywords
Calorie restriction
Insulin resistance
Lipid coat proteins
Perilipin 1 and 5

**** Corresponding Author:***
Mohammad Mehrtash; Department of Exercise Physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
Tel: *+98 913 342 8825*
Fax: *+98 34 3226 8622*
Email: *m_mehrtash_67@yahoo.com*

ABSTRACT

Background and Aim: Excessive fat accumulation is one of the most important mechanisms of type 2 diabetes and insulin resistance. Accordingly, in this study, we will examine the effect of caloric restriction on lipid coat proteins that prevent lipolysis of the adipose tissue.

Materials and Methods: In this study, 30 adult male Sprague-Dawley rats (200 ± 20 weight) were used. First, rats were divided into 2 groups (standard and high-calorie diet). After 8 weeks, the high-calorie diet group was randomly assigned to two subgroups: caloric restriction and high-fat diet. Finally, the amount of perilipin 1 and 5 genes expression evaluated by Pcr and insulin resistance evaluated by HOMA index.

Findings: The weight and insulin resistance of the high-fat diet group was significantly higher than the standard and calorie restriction group ($p \leq 0.005$). Insulin resistance was not significantly different between the caloric restriction and standard group ($p = 0.394$). The expression of perilipin 1 in the adipose tissue of the high-fat diet was significantly higher than the caloric restriction group ($p \leq 0.005$). The expression of perilipin 1 gene in skeletal muscle in the high-fat diet group was significantly higher than the calorie restriction and standard diet groups ($p \leq 0.005$). The calorie restriction group had more perilipin 5 expressions than the high-fat diet and the standard group ($p \leq 0.005$).

Conclusion: The caloric restriction may be due to the effect on lipid coat proteins and, as a result, a decrease in fat accumulation, that it can prevent insulin resistance.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Salesi M., Mehrtash M., Daryanoosh F., et al. The Role of Caloric Restriction on Lipid Coat Proteins Gene Expression and Insulin Resistance after 8 Weeks High Caloric Diet in Male Rats. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(5): 21-31.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).