

تغییرات بیان گیرنده‌ی IGF-I و پروتئین شماره‌ی ۱ متصل شونده به آن در نواحی مختلف مغز مدل حیوانی مقاوم به انسولین

دکتر آریتا پروانه تفرشی^۱، دکتر راضیه جلال^۲، شمیلا درویش‌علی‌پور^۱، دکتر حوری سپهری^۳، دکتر خسرو عادلی^۴

۱) پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ۲) دانشکده‌ی شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۳) گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ۴) بخش بیوشیمی بالینی، بیمارستان کودکان، دانشگاه تورنتو، کانادا، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، صندوق پستی ۱۶۱-۱۴۹۶۵، دکتر آریتا پروانه تفرشی؛ e-mail: tafreshi@nigeb.ac.ir

چکیده

مقدمه: اطلاعات کمی در زمینه‌ی متابولیسم گلوکز در مغز که از بافت‌های غیر حساس به انسولین است، موجود می‌باشد. بیان گیرنده‌های انسولین در نواحی مختلف مغز و تشکیل هیبرید با گیرنده‌ی فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-IR)، نقش گیرنده‌ی IGF-I را در انتقال سیگنال پیشنهاد می‌کند. در این مطالعه تغییرات در بیان رسپتور IGF-I و پروتئین متصل شونده به IGF به عنوان عامل جایگزین انسولین در بافت مغز مورد بررسی قرار گرفته است. **مواد و روش‌ها:** با خوراندن آب فروکتوز دار (۱۰٪)، مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی نژاد ویستار القا و سطح بیان گیرنده‌ی IGF-I و پروتئین متصل شونده به آن با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. **یافته‌ها:** میزان بیان رسپتور IGF-I و پروتئین متصل شونده به آن (IGFBP1 (IGF binding protein I) در اغلب نواحی مغزی بدون تغییر ماند. **نتیجه‌گیری:** عدم تغییر در بیان گیرنده‌ی IGF-I و پروتئین متصل شونده به IGF به معنی عدم دخالت مسیر سیگنالی وابسته به گیرنده‌ی IGF-I نیست، بلکه پژوهش‌های بیشتری در زمینه‌ی فعال شدن آبشار درون‌سلولی IGF-I را می‌طلبد که در مطالعه‌های آتی به آن پرداخته خواهد شد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، مقاومت به انسولین، مغز، پروتئین شماره‌ی ۱ متصل شونده به IGF، گیرنده‌ی IGF-I

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۷ - دریافت اصلاحیه: ۸۸/۶/۱۶ - پذیرش مقاله: ۸۸/۶/۱۷

مقدمه

دیابت از گروه بیماری‌های متابولیک و چند عاملی است که با افزایش مزمن قند خون یا هیپرگلیسمی ناشی از اختلال ترشح یا عملکرد انسولین و یا هر دوی آنها مشخص می‌شود. دیابت با اختلال در متابولیسم گلوکز، پروتئین و چربی همراه است و افزایش مزمن قند خون موجب اختلال عملکرد، نارسایی و تحریک در ارگان‌های مختلف به ویژه چشم، کلیه، اعصاب، قلب و عروق خونی می‌شود. بیماری دیابت به دو گروه عمده تقسیم

می‌شود: دیابت نوع ۱ یا دیابت وابسته به انسولین (IDⁱ) و دیابت نوع ۲ یا دیابت غیر وابسته به انسولین (NIDⁱⁱ) که با نام مقاومت به انسولین نیز خوانده می‌شود. با توجه به این که مقاومت به انسولین از اختلال در عملکرد گیرنده‌ی انسولین و عدم انتقال سیگنال انسولین ناشی می‌شود، ناهنجاری در هر یک از مولکول‌های مسیر سیگنال‌دهی انسولین، از گیرنده‌ی انسولین گرفته تا مولکول‌های انتهایی مسیر، می‌توانند در پاتولوژی مقاومت به انسولین نقش داشته باشند. تاکنون بالغ بر ۵۰ جهش

i- Insulin Dependent Diabetes

ii - Non-Insulin Dependent Diabetes

در دو گروه (شاهد و تیمار شده) با تعداد ۸ حیوان در هر گروه قرار گرفتند. حیوانات گروه تیمار شده به وسیله‌ی آب حاوی ۱۰٪ فروکتوز و حیوانات گروه شاهد به وسیله‌ی آب معمولی تغذیه شدند ولی هر دو گروه از غذای معمولی استفاده کردند. با الهام گرفتن از مطالعه‌های انسانی و حیوانی، از غذا و یا آب دارای حجم بالای فروکتوز برای ایجاد مدل حیوانی مقاوم به انسولین استفاده شد.^{۶،۷} بر اساس مطالعه‌های انجام شده در این زمینه، از شاخص‌های ایجاد مقاومت به انسولین هیپرانسولینیمی و هیپرلیپیدیمی است.^{۶،۷} به منظور تعیین مقاومت حیوان به انسولین میزان گلوکز، تری‌گلیسرید و انسولین خون هر دو هفته یک بار اندازه‌گیری شد. طی انجام آزمایش پس از ماه چهارم افزایش معنی‌داری در سطح تری‌گلیسرید و انسولین در گروه تیمار شده با فروکتوز نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

پرفیوژن (perfusion) و آماده‌سازی بافتی: پرفیوژن یا به عبارتی گذراندن سریع فیکساتیو از بدن حیوان همزمان با قربانی کردن آن موجب ابقای آنتی‌ژن‌ها در بافت مورد نظر می‌شود. به عبارت دیگر، از انهدام پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های متعدد در سطح سیتوپلاسم و هسته جلوگیری به عمل می‌آید. نوع فیکساتیو بسته به نوع روش ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده مانند ایمونوفلورسانس یا سیستم HRP و غیره می‌تواند متفاوت باشد. با توجه به سیستم HRP-Streptavidin مورد استفاده در این مطالعه، فیکساتیو گلوটারالدئید - پارافرمالدئید به کار رفت. برای انجام پرفیوژن، محلول‌های فیکساتیو و بافر فسفات تازه تهیه شده به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر برای هر حیوان مورد استفاده قرار گرفت. پس از ایجاد بیهوشی عمیق توسط محلول ۲۰٪ کلرال هیدرید حیوان پرفیوژن انجام گرفت. پس از خاتمه‌ی پرفیوژن، پس فیکساسیون مغز به مدت ۲۴ ساعت در همان فیکساتیو انجام شد. سپس بافت به مدت دو هفته به محلول ۳۰٪ سوکروز در فرمالین ۱۰٪ منتقل شد و برای تهیه‌ی برش‌های انجمادی آماده شد. برای نگهداری بافت‌ها به مدت طولانی می‌توان از محلول ۳۰٪ سوکروز در فسفات بافر نمکی (PBS) حاوی ۰/۰۵٪ سدیم آزاید در دمای ۴°C استفاده کرد. به منظور آماده‌سازی بافت‌ها برای بررسی ایمونوهیستوشیمی از لام‌های coat شده با (Sigma) پلی‌ال‌لایزین استفاده شد. برش‌های انجمادی از بافت مغز غوطه‌ور شده در ماده‌ی O.C.T با استفاده از دستگاه کرایوستات تهیه شدند. برای آشکارسازی IGF در بافت مغز از سیستم HRP-Streptavidin (DAKO) و DAB (DAKO) استفاده شد. از مراحل کلیدی کار برای انجام روش

در ژن گیرنده‌ی انسولین در کاهش سنتز گیرنده‌ی انسولین، میزان اتصال انسولین به گیرنده، میزان تجمع درون سلولی رسپتور و فعالیت تیروزین‌کینازی آن کشف شده‌اند.^۱ بر خلاف اثر محیطی انسولین در مصرف گلوکز و انرژی، عدم عبور آن از سد خونی - مغزی و سنتز کم آن در مغز، عملکرد آن را در مغز ناممکن می‌سازد.^۲ در مقابل، وجود IGF-I^۱ و گیرنده‌اش به میزان وافر در نورون‌های مغزی و بیان بالای آن در سلول‌های گلیا در زمان آسیب‌های مغز و در مغز در حال تکوین متناسب با مصرف بالای گلوکز بیان‌گر نقش آنابولیکی این فاکتور در مغز است.^۳ گیرنده‌ی IGF-IR^۴ از نظر ساختاری ۶۰٪ هومولوژی با گیرنده‌ی انسولین دارد و بیان ژن این گیرنده تحت تأثیر مراحل مختلف تکوینی، تحریک‌های هورمونی، فاکتورهای تغذیه‌ای و شرایط پاتولوژیک متعدد مانند سرطان و دیابت تغییر می‌کند. رسپتور IGF-I گلیکوپروتئینی در سطح غشای سلول است و یک هتروتترامر شامل دو زیر واحد α و دو زیر واحد β می‌باشد که توسط پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند.^۴ دو دایمر با تشکیل پیوند دی‌سولفیدی هتروتترامر $\alpha_2\beta_2$ را می‌سازند. شش پروتئین متصل شونده با تمایل متفاوت برای اتصال به IGF وجود دارند که از IGFBP-1 تا IGFBP-6 نامگذاری شده‌اند. این پروتئین‌ها هومولوژی ساختاری داشته، یک سری تغییرات بعد از ترجمه، بر تمایل اتصال آن‌ها به IGF تأثیر می‌گذارند.^۵ اتصال IGF به IGFBP ها، سه پیامد مهم به دنبال دارد که شامل انتقال IGF، محافظت از آن در مقابل از هم پاشیدگی و تنظیم واکنش آن با گیرنده است. از آن‌جا که این پروتئین‌ها تمایل بیشتری از IGF برای اتصال به IGF-I-R دارند، در غلظت‌های بالا مانع از واکنش IGF با گیرنده‌اش شده، باعث مهار عملکرد IGF می‌شوند.^۵ در مجموع با توجه به بیان گیرنده‌ها و پروتئین‌های متصل شونده به IGF-I در مغز و با توجه به داده‌های کم موجود در مورد میزان تغییرات در بیان این پروتئین‌ها در مغز مدل مقاوم به انسولین، در این مطالعه به بررسی تغییرات احتمالی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

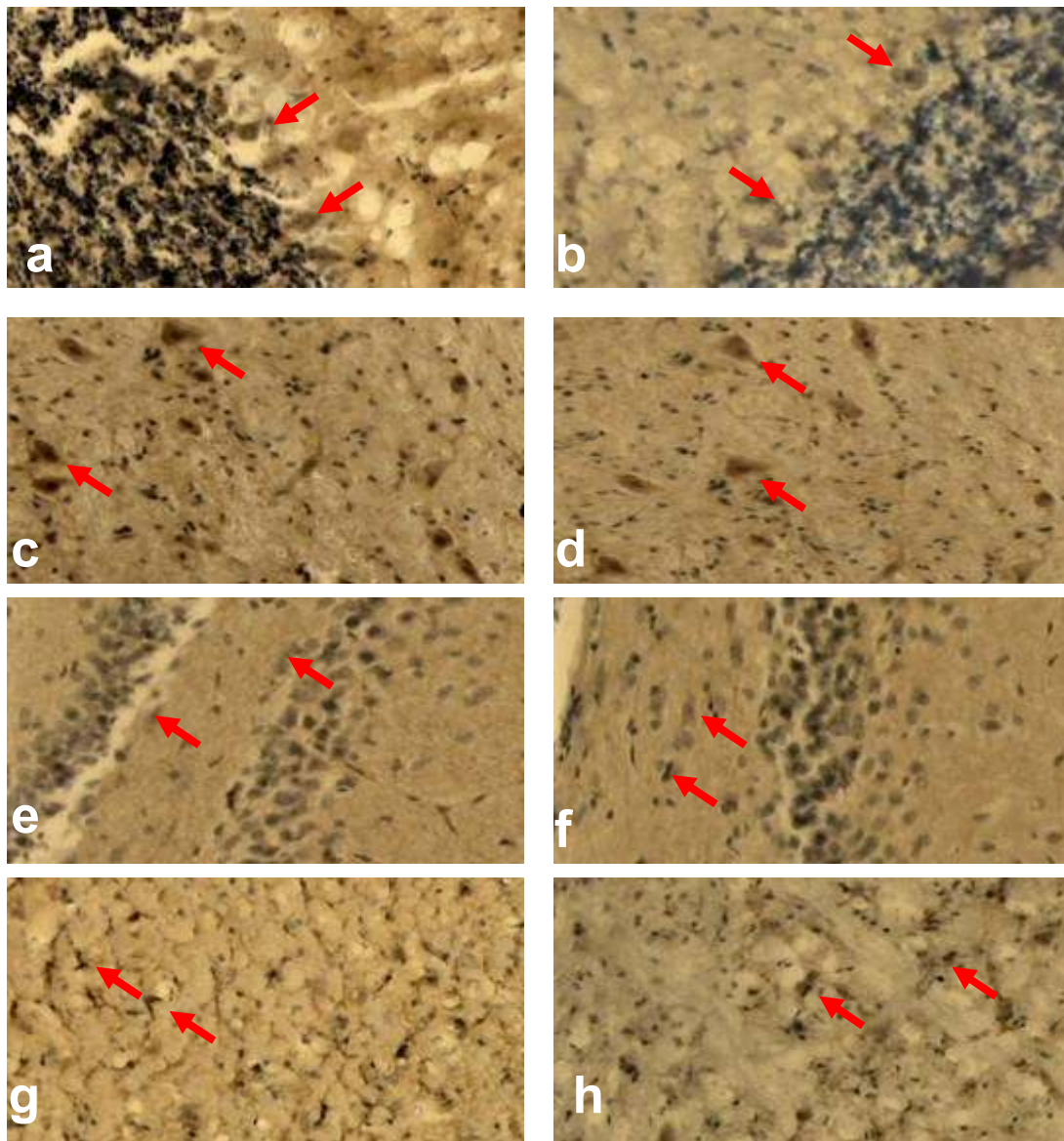
ایجاد مدل حیوانی مقاوم به انسولین: موش‌های صحرایی نژاد ویستار با وزن حدود ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. حیوانات، ابتدا وزن شده، سپس به صورت جداگانه در قفس‌های پلکسی کوچک دسته‌بندی شدند. حیوانات

یافته‌ها

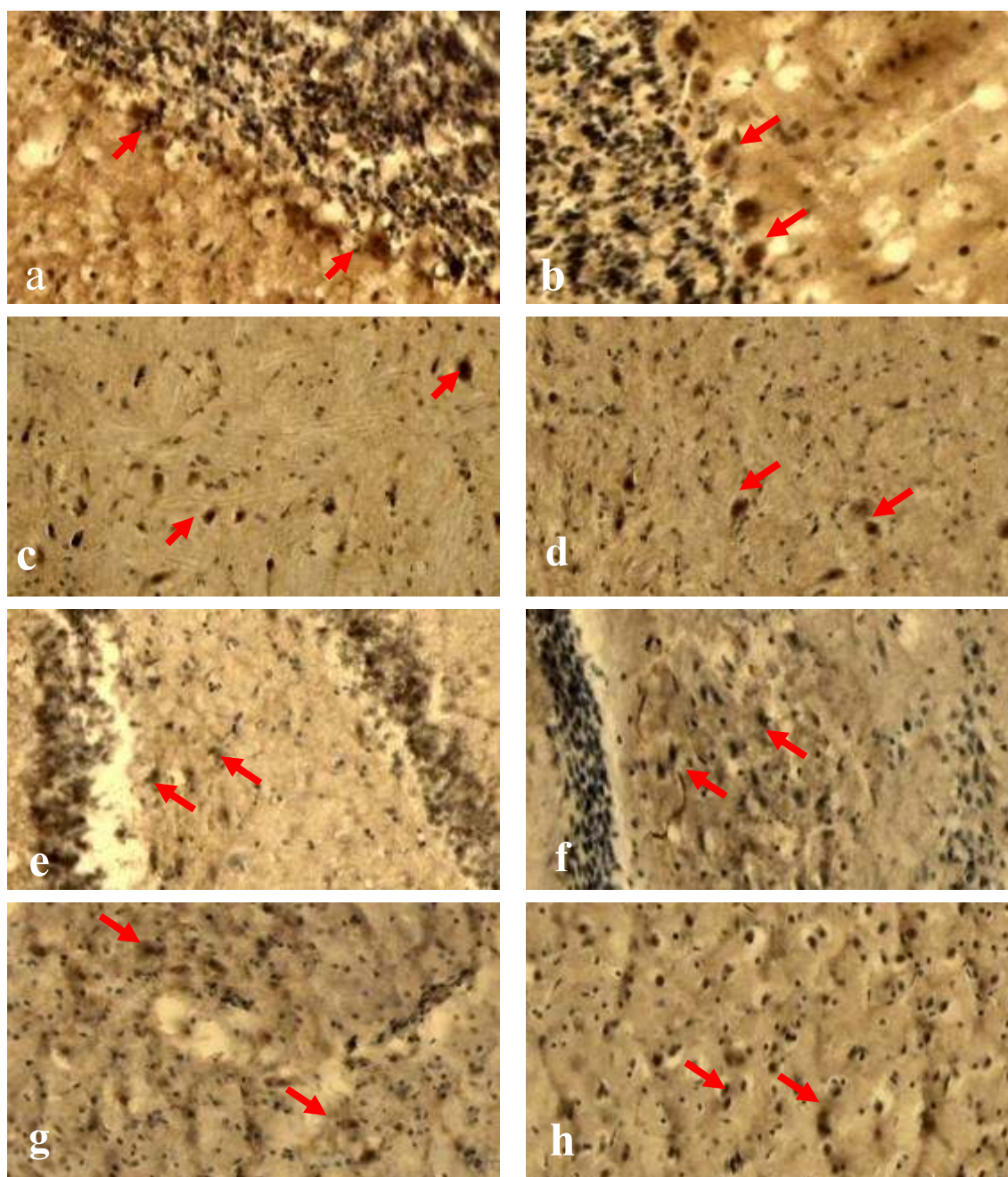
یافته‌های ایمونوراکتیویته‌ی گیرنده‌ی (IGFI-R):

ایمونوراکتیویته‌ی گیرنده‌ی IGF-IR در نواحی مختلف مغزی حیوانات گروه تیمار شده با فروکتوز و حیوانات گروه شاهد با یکدیگر مقایسه شدند و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان این گیرنده بین دو گروه مشاهده نشد (شکل ۱).

ایمونوهستیتوشیمی، آشکارسازی قوی‌تر IGF با استفاده از محلول سیترات به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و حذف آنتی‌ژن‌های زمینه با استفاده از محلول پریودیک اسید (۰/۱٪) و محلول سدیم بوروهیدرید (۰/۱٪) بودند. غلظت آنتی‌بادی‌های مورد استفاده (anti-IGF-IR (cell signaling) و anti-IGFBP-1 (۱/۵۰) بود که در محیط مرطوب و در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت.



شکل ۱- فتومیکروگراف از ایمونوراکتیویته‌ی پروتئین IGF-IR گروه تیمار شده با فروکتوز: (a) سلول‌های پورکنژ (c) ساقه‌ی مغز (e) هیپوکامپ (g) تالاموس. گروه شاهد: (b) سلول‌های پورکنژ (d) ساقه‌ی مغز (f) هیپوکامپ (h) تالاموس. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان این پروتئین بین دو گروه در نواحی مختلف مغزی مشاهده نشد. مقیاس: Scale bar در شکل‌ها حذف شده‌اند ۱ سانتی‌متر = ۹۰ میکرومتر



شکل ۲- فتومیکروگراف از ایمونوراکتیویته‌ی پروتئین IGFBP-1 شاهد گروه تیمار شده با فروکتوز: (a) سلول‌های پورکنژ (c) ساقه‌ی مغز (e) هیپوکامپ (g) تالاموس. گروه شاهد: (b) سلول‌های پورکنژ (d) ساقه‌ی مغز (f) هیپوکامپ (h) تالاموس. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان این پروتئین بین دو گروه در نواحی مختلف مغزی مشاهده نشد. مقیاس: Scale bar در شکل‌ها حذف شده‌اند ۱ سانتی‌متر = ۹۰ میکرومتر

مقایسه شدند و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان این پروتئین بین دو گروه مشاهده نشد (شکل ۲).
به منظور کمی کردن یافته‌های ایمونوهیستوشیمی، شدت بیان پروتئین‌های مورد بررسی با نور ثابت و در بزرگنمایی

یافته‌های ایمونوراکتیویته‌ی IGFBP-1: ایمونوراکتیویته پروتئین IGFBP-1 در نواحی مختلف برش‌های مغزی حیوانات گروه تیمار شده با فروکتوز و حیوانات گروه شاهد

ثابت در نمونه‌های شاهد (تعداد=۵) و نمونه‌های مورد (تجربی) (تعداد=۵) مقایسه شدند و یافته‌ها به صورت (کم=+) و (متوسط=++) و یا (شدید=+++)) ارزیابی و به کمک آزمون‌های آماری من‌ویتنی و کروسکال والیس تجزیه و تحلیل شدند. شدت ایمونوراکتیویته در گروه تیمار شده با فروکتوز و گروه شاهد به تفکیک مناطق مخچه، ساقه‌ی مغز، هیپوکامپ و تالاموس انجام شد و بر اساس ارزیابی سطح معنی‌داری، اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمار شده مشاهده نشد ($P < 0.01$) (جدول‌های ۱ و ۲).

جدول ۱- مقایسه‌ی شدت بیان پروتئین IGF-IR در نواحی مختلف مغز در دو گروه تیمار شده (F) و شاهد (C)

IGF-IR				
شماره حیوان	مخچه	ساقه مغزی	هیپوکامپ	تالاموس
۱	F+ C+	F+C+	F+C+	F+C+
۲	F+ C+	F++C+	F+C+	F+++C+
۳	F+ C+	F+C+	F+C+	F+ C+
۴	F++ C+	F+C+	F+C+	F++C+
۵	F++ C+	F++C+	F+C+	F+C+
	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)
				سطح معنی‌داری (P)

جدول ۲- مقایسه‌ی شدت بیان پروتئین IGFBP1 در نواحی مختلف مغز در دو گروه تیمار شده (F) و شاهد (C)

IGFBP1				
شماره حیوان	مخچه	ساقه مغزی	هیپوکامپ	تالاموس
۱	F+C++	F+C++	F+C++	F+C++
۲	F+C+++	F+C+++	F+C+	F++C+
۳	F+C++	F+C++	F+C+	F+C+
۴	F++C+	F++C+	F+ C+++	F+C++
۵	F+C+	F++C+	F++C+	F++C+
	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)	($P < 0.01$)
				سطح معنی‌داری (P)

این امر به دلیل سرعت و سهولت القای این نوع دیابت در این روش است. این در حالی است که مطالعه‌ی حاضر از معدود مطالعه‌ها در مدل حیوانی مقاوم به انسولینی با استفاده از رژیم غنی از فروکتوز با صرف حداقل زمان حدود ۴ ماه است که البته یافته‌های حاصل از آن همخوانی قابل تعمیم برای انواع انسانی را در بر دارد. فقر یافته‌هایی درباره‌ی تغییرات در بیان پروتئین‌های وابسته به IGF-I در سیستم اعصاب مرکزی در مدل مقاوم به انسولین در سال‌های اخیر،

بحث

با مروری بر مطالعه‌های موجود در زمینه تغییرات در بیان پروتئین‌های وابسته به IGF-I در سیستم اعصاب مرکزی ناشی از مقاومت به انسولین، فقدان شدید منابع اطلاعاتی در این زمینه به ویژه در مدل حیوانی تغذیه شده با رژیم غنی از فروکتوز احساس می‌شود. بیشتر مطالعه‌های اخیر به کار درباره‌ی مدل‌های حیوانی دیابت نوع ۱ آن‌هم از طریق تزریق ماده‌ی استرپتوزوتوسین متمرکز شده است و

صحرائی که استرپتوزوتوسین دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌دار IGF-IR mRNA را در هیپوتالاموس و نه مخچه و کاهش معنی‌دار در IGFBP-1 آنها در مخچه گزارش کردند و این تغییرات را بر حسب نواحی خاص مغزی^۱ خواندند. در هر حال هیچ‌یک از گزارش‌ها و مطالعه‌های انجام شده‌ی قبلی بیان‌گر تغییرات در بیان IGF-I در مغز در مدل حیوانات مقاوم به انسولین نبوده‌اند و یافته‌های ارائه شده در این مطالعه برای اولین بار بازگوکننده‌ی این تغییرات است و مقایسه‌های انجام شده تنها تضادها و تشابه‌های بین دو مدل دیابت نوع ۱ و ۲ را بیان می‌کند. از طرف دیگر، مشاهده‌ی عدم تغییر در میزان بیان گیرنده‌ی IGF-IR و IGFBP در مطالعه‌های ما نیز به معنی عدم دخالت و فعالیت مسیر سیگنالی وابسته به گیرنده‌ی IGF-I نیست. این امر جایگاهی در مطالعه‌های آتی ایجاد می‌کند تا فاکتورهای درون سلولی دخیل در فعال شدن آبخار پیام‌رسانی IGF-I مورد ارزیابی و بررسی بیشتری قرار گیرند.

i- Region Specific

References

1. Tritos NA, Mantzoros CS. Clinical review 97: Syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3025-30.
2. Cheng CM, Reinhardt RR, Lee WH, Joncas G, Patel SC, Bondy CA. Insulin-like growth factor I regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10236-41.
3. Bondy CA, Cheng CM. Insulin-like growth factor-1 promotes neuronal glucose utilization during brain development and repair processes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 51: 189-217.
4. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47: 235-53.
5. Yu J, Iwashita M, Kudo Y, Takeda Y. Phosphorylated insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits while non-phosphorylated IGFBP-1 stimulates IGF-I-induced amino acid uptake by

انگیزه‌ای برای آغاز این مطالعه بود. بر اساس یافته‌های حاصل از ایمونوهیستوشیمی در مطالعه‌های ما، تغییر محسوسی در بیان گیرنده‌ی IGF-I و پروتئین IGFBP-1 پس از القای مقاومت به انسولین مشاهده نمی‌شود. با نگاهی بر یافته‌های حاصل از پژوهش‌های درباره‌ی مدل حیوانی دیابت نوع ۱ با استفاده از تزریق استرپتوزوتوسین که به صورت غالب در مطالعه‌ها جلوه‌گر می‌شوند، یافته‌هایی در توافق و تضاد با یافته‌های حاصل یافت می‌شود. یکی از یافته‌های موافق با مطالعه‌ی ما، مطالعه‌های ریگان و همکاران^۶ (۱۹۹۹) است که در آن عدم وجود تغییر معنی‌دار در سطح IGF-IR mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرائی که استرپتوزوتوسین دریافت کرده بودند، همچنین، براساس مطالعه‌های انسانی کلارک (۱۹۹۰)^۹ در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱، با وجود تغییرات محیطی در بیان گیرنده‌ی IGF-I، تغییرات معنی‌داری در میزان mRNA در مغز مشاهده نشد. از طرف دیگر، بوسیگوئینا و همکاران^{۱۰} (۱۹۹۶) در موش‌های

6. cultured trophoblast cells. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 65-70.
6. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6: 120-6.
7. Harati M, Ani M, Messripour M. Effect of Vanadyl Sulfate on Fructose-Induced Insulin Resistance Rat. *Iranian Biomedical Journal* 2003;7: 179-82.
8. Reagan LP, Magarinos AM, McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 126-37.
9. Clarke DW. Growth, Genetics, and Hormones. Special Report: The Annual Meeting of the American Diabetes Association, Atlanta, Georgia. 1990.
10. Busiguina S, Chowen JA, Argente J, Torres-Aleman I. Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. *Endocrinology* 1996; 137: 4980-7.

Original Article

Investigation on the Levels of IGF-I Receptor and IGF-I Binding Protein I in the Brain of Insulin Resistant Rats

Parvaneh Tafreshi A¹, Jalal R², Darvishalipour S¹, Sepehri H³, Adeli K⁴

¹The National Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, ²Department of Chemistry, Ferdowsi University, Mashad, ³Department of Physiology, Faculty of Sciences, Mashad, I. R. Iran, ⁴Department of Clinical Biochemistry, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Canada

e-mail: tafreshi@nigeb.ac.ir

Received: 07/06/2009 Accepted: 08/09/2009

Abstract

Introduction: There is limited knowledge available on the metabolism of glucose in the brain, an insulin insensitive organ. Insulin receptors hybridize with insulin like growth factor receptor (IGF-I) to transduce the signals in different areas of the brain. In this article we aimed at investigating whether the expression of IGF-I receptor and IGF-I binding proteins (IGFBP1) is changed in the brain of the diabetic animal model. **Materials and Methods:** To induce insulin resistance, adult wistar rats were fed with fructose in their drinking water (10%). The expression of IGF-I receptor and its binding protein were examined immunohistochemically. **Results:** Our findings demonstrated that the expression of IGF-I receptor and IGF-I binding protein were not changed in different areas of the brain in insulin resistant rats, compared to those in the control rats. **Conclusion:** The unchanged expression levels of IGF-I receptor and its binding protein I not imply the lack of involvement of the IGF-I signal transduction pathway in the insulin resistant brain, further investigations are to clarify the issue.

Keywords: Diabetes type II, Insulin Resistance, Brain, IGF binding protein I, IGF-I receptor