

## اثر متفورمین بر بیان ژن Pdx-1 طی تکامل پانکراس موش

ملک سلیمانی مهربنجانی<sup>۱</sup>، محمود هاشمی تبار<sup>۲</sup>، حمیدرضا مؤمنی<sup>۱</sup>، سمیه بهرام‌زاده<sup>۱</sup>

(۱) گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه اراک، (۲) مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جندی شاپور اهواز؛ **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی جندی شاپور اهواز، محمود هاشمی‌تبار؛  
e-mail: hashemi\_tabar@hotmail.com

### چکیده

**مقدمه:** متفورمین یک داروی خوراکی است که برای درمان دیابت نوع ۲ مورد استفاده قرار می‌گیرد. داروی متفورمین آنالوگ (GLP-1) است و مشخص شده است که GLP-1 سبب القای بیان ژن‌های **Pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1)**، انسولین و گلوکز ترانسپورتر-۲ (Glut-2) می‌گردد. پژوهش حاضر به بررسی اثر متفورمین بر تنظیم عملکرد سلول‌های بتا از طریق اثر بر بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 می‌پردازد. **مواد و روش‌ها:** موش‌های حامله‌ی نژاد C57BL/6 به صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. به گروه شاهد نرمال‌سالین تزریق شد و در گروه تیمار شده، متفورمین با غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نرمال‌سالین حل و با روش تزریق داخل صفاقی از روز ۸/۵ حاملگی به صورت روزانه تجویز شد. سپس، در روز ۱۹/۵ حاملگی، نیمی از موش‌های حامله به روش قطع مهره‌های گردنی کشته شدند و پس از خارج کردن جین‌ها، پانکراس آنها جداسازی شد. نیمی دیگر از موش‌های حامله زایمان کرده و غده‌ی پانکراس نوزادهای یک‌روزه جداسازی شد. سپس به وسیله‌ی روش‌های **Semi-quantitative RT-PCR** بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 در پانکراس جین‌ها و موش‌های یک‌روزه مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** پژوهش حاضر نشان داد که دوزهای مختلف داروی متفورمین در مقایسه با گروه شاهد سبب ایجاد تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 نمی‌شود ( $P > 0.05$ ). **نتیجه‌گیری:** اثر متفورمین بر تنظیم عملکرد سلول‌های بتا ممکن است وابسته به بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 نباشد و این دارو احتمالاً از طریق سایر مسیرها مانند اثر بر بیان ژن‌های مسیر گلوکوکورتیز اعمال اثر می‌کند.

**واژگان کلیدی:** دیابت، متفورمین، پانکراس، Pdx-1، انسولین، گلوکز ترانسپورتر-۲

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۲۱ - دریافت اصلاحیه: ۸۸/۱۲/۲۷ - پذیرش مقاله: ۸۹/۱/۱۶

### مقدمه

دیابت قندی یک سندرم مزمن متابولیک است که در جهان حدود ۲۰۰ میلیون نفر به آن مبتلا هستند و تخمین زده می‌شود که این تعداد در سال ۲۰۳۰ دو برابر شود. دو نوع دیابت قندی وجود دارد: دیابت نوع ۱ یا دیابت قندی وابسته به انسولین که به دلیل فقدان ترشح انسولین ناشی از تخریب سلول‌های بتای پانکراسی ایجاد می‌شود و دیابت نوع ۲ یا

دیابت قندی یک سندرم مزمن متابولیک است که در جهان حدود ۲۰۰ میلیون نفر به آن مبتلا هستند و تخمین زده می‌شود که این تعداد در سال ۲۰۳۰ دو برابر شود. دو نوع دیابت قندی وجود دارد: دیابت نوع ۱ یا دیابت قندی وابسته به انسولین که به دلیل فقدان ترشح انسولین ناشی از تخریب سلول‌های بتای پانکراسی ایجاد می‌شود و دیابت نوع ۲ یا

دیابت قندی غیر وابسته به انسولین که بر اثر کاهش حساسیت بافت‌های هدف نسبت به آثار متابولیک انسولین ایجاد می‌گردد.<sup>۱</sup> در واقع، همه‌ی اشکال دیابت به صورت مشترک ناشی از فقدان عملکرد مناسب توده‌ی سلول‌های بتا هستند (فقدان مطلق سلول‌های بتا در دیابت نوع ۱ و نسبی آنها در دیابت نوع ۲) و به این ترتیب، نقص انسولین سبب

با توجه به این که GLP-1 سبب القای بیان ژن Pdx-1 می‌شود<sup>۱۷</sup> و داروی متفورمین آنالوگ GLP-1 است،<sup>۴</sup> این سؤال مطرح می‌شود که آیا متفورمین به عنوان آنالوگ GLP-1 قادر است بر بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 مؤثر باشد؟ هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر دوزهای مختلف داروی متفورمین بر بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 با استفاده از روش semi RT-PCR quantitative در جنین ۱۹/۵ روزه و نوزاد یک روزه‌ی موش بود.

## مواد و روش‌ها

موش‌های نژاد C57BL/6 با میانگین وزن  $25 \pm 5$  گرم از مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی جندی شاپور اهواز تهیه و در شرایط استاندارد (دمای  $21 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد و نور کنترل شده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) با دسترسی به آب و غذای کافی در خانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز نگهداری شدند.

پس از قرار دادن موش‌های نر و ماده در کنار هم و سپس تأیید وجود پلاگ واژینال در موش‌های ماده در صبح روز بعد، موش‌های حامله جدا شدند. روز مشاهده‌ی پلاگ واژینال به عنوان روز ۰/۵ در نظر گرفته شد. موش‌های حامله به صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تیمار شده تقسیم شدند: گروه شاهد (تعداد=۴) نرمال‌سالین به صورت داخل صفاقی دریافت نمود. در گروه تیمار شده (تعداد=۱۲)، متفورمین با غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نرمال‌سالین حل و با روش تزریق داخل صفاقی از روز ۸/۵ حاملگی به صورت روزانه تجویز شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها به ترتیب زیر کشته شدند: در روز ۱۹/۵ حاملگی نیمی از موش‌های حامله به روش قطع مهره‌های گردنی کشته و پس از خارج کردن جنین‌ها، در زیر استریومیکروسکوپ غده پانکراس آنها جداسازی شدند. دوره‌ی تیمار برای این گروه ۱۱ روز بود.

نیمی دیگر از موش‌ها زایمان کردند و بررسی بر روی نوزادها، یک روز پس از تولد آنها انجام شد. به این ترتیب، که ابتدا نوزادها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در فریزر -۷۰- درجه

هیپرگلیسمی می‌شود.<sup>۲۳</sup> متفورمین، یک داروی خوراکی متعلق به دسته‌ی بی‌گوانیدها است که بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ به صورت رایج از آن استفاده می‌کنند. این دارو با کاهش تولید گلوکز کبدی از طریق مهار گلوکونئوژنز یا کاهش مقاومت به انسولین بدون اثر مستقیم بر ترشح انسولین به صورت مؤثر سبب کاهش سطح گلوکز سرم می‌شود.<sup>۴،۵</sup> اثر متفورمین بر سلول‌های بتا پانکراس کاملاً روشن نشده است.<sup>۶</sup> از آن جا که این دارو سبب بقا و حفظ سلول‌های بتا می‌گردد، بنابراین، ممکن است اثر ناشی از افزایش گلوکز و اسیدهای چرب را خنثی سازد.<sup>۷</sup> در بررسی اثر تراژون متفورمین در مدل‌های موش، هیچ مدرکی دال بر تراژون بودن این دارو یافت نشده است.<sup>۸</sup> مطالعه‌های انجام شده در انسان نشان داده است که به ظاهر تداوم مصرف متفورمین در دوران حاملگی فاقد ضرر و آسیب است.<sup>۹</sup>

داروی متفورمین آنالوگ یک هورمون<sup>۱۰</sup> است. GLP-1 موجب افزایش رها شدن انسولین وابسته به گلوکز، مهار ترشح گلوکاگون، تحریک بیوسنتز انسولین، توسعه‌ی توده‌ی سلول‌های  $\beta$  و افزایش فنوتیپ سلول‌های  $\beta$  از طریق مسیر وابسته به Pdx-1<sup>۱۱</sup> می‌شود.<sup>۴</sup> بیان ژن Pdx-1 که روی کروموزوم شماره‌ی ۵ موش (5 G3; 5 82.0 cM) قرار دارد،<sup>۱۱</sup> توسط عوامل رونویسی HNF1<sup>iii</sup>، Foxa1<sup>iv</sup>، Pax6<sup>v</sup> کنترل می‌شود.<sup>۱۲</sup> عامل رونویسی PDX-1 در دوره‌ی جنینی تنظیم‌کننده‌ی اصلی تکامل پانکراس است و در تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سمت سلول‌های بتا مؤثر است.<sup>۱۳</sup> PDX-1 در بزرگسالان نیز به عنوان تنظیم‌کننده‌ی ویژه‌ی سلول‌های بتا و دلتا برای بیان ژن‌های انسولین، سوماتواستاتین، پپتید آمیلوئید، گلوکوکیناز و گلوکز ترانسپورتر-۲ (Glut-2) ضروری است.<sup>۱۴،۱۵</sup> عامل رونویسی PDX-1 از طریق اتصال به ناحیه‌ی پروموتور ژن‌های انسولین، گلوکوکیناز و Glut-2 بیان این ژن‌ها را کنترل می‌کند.<sup>۱۶،۱۷</sup> جایگاه دو ژن انسولین و گلوکز ترانسپورتر ۲ به ترتیب روی کروموزوم‌های شماره‌ی ۷ (7 F5; 7 69.1 cM) و ۳ (3 A3; 3 14.4 cM) موش است.<sup>۱۱</sup>

i - Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

ii - Pancreatic duodenal homeobox 1

iii - Hepatocyte nuclear factor 1

iv - Forkhead box protein a1

v - Paired box gene 6

سانتی‌گراد قرار گرفته و کشته شدند و سپس پانکراس آنها جداسازی شد. دوره تیمار برای این گروه، ۱۲ روز بود.

به منظور جداسازی جزایر لانگرهانس پانکراس در جنین و نوزاد، پانکراس‌ها زیر استریومیکروسکوپ از بدن موش‌ها خارج، و با هدف حذف تریپسین رها شده توسط بافت پانکراس، سه بار با بافر فسفات سالین (PBS)<sup>i</sup> شستشو داده شدند. پانکراس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱ میلی‌لیتر PBS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز تیپ IV (سیگما-آمریکا) انکوبه شد. پس از انجام عمل شیک و پیپت کردن، به منظور خاتمه‌ی فرایند هضم سه بار شستشو با PBS سرد انجام شد.

به منظور تشخیص بافت جزایر لانگرهانس، جزایر جدا شده توسط دیتیزون (DTZ)<sup>ii</sup> (سیگما-آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند. دیتیزون یک عامل متصل‌شونده به روی<sup>iii</sup> است که به صورت انتخابی سلول‌های بتا پانکراس را به رنگ قرمز در می‌آورد زیرا این سلول‌ها دارای مقادیر زیادی روی هستند. برای تهیه‌ی محلول کار DTZ، ۵۰ میلی‌گرم دیتیزون در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)<sup>iv</sup> حل کرده و سپس از فیلتر نایلونی ۰/۲ میکرونی عبور داده شد. به ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت (DMEM)<sup>v</sup> دارای جزایر لانگرهانس، ۱۰ میکرولیتر محلول کار دیتیزون افزوده و پس از مدت ۲۰ دقیقه، شستشو با PBS انجام شد. سرانجام، جزایر لانگرهانس توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند.<sup>۱۸</sup>

پانکراس‌های جدا شده از ۶ جنین و نیز ۵ نوزاد در شرایط استریل در کرایوتیوب قرار گرفتند و به سرعت به نیتروژن مایع منتقل شدند. پس از گذشت حدود یک ساعت پانکراس‌های فریز شده از نیتروژن مایع خارج و در شرایط استریل و فاقد RNase در هاون دارای نیتروژن مایع به پودر تبدیل شدند.

RNA از بافت پانکراس با استفاده از کیت RNeasy Plus Mini (کیاژن-آمریکا) استخراج شد. برای تبدیل RNA استخراج شده به cDNA از کیت (EU-Fermentas)<sup>vi</sup> استفاده شد. سپس cDNA طی واکنش زنجیری پلیمرازی (PCR)<sup>vii</sup>

i - Phosphate Buffered Saline

ii - Ditzzone

iii - Zinc-chelating agent

iv - Dimethyl Sulfoxide

v - Dulbecco's Modified Eagle Medium

vi - RevertAid First Strand cDNA Synthesis

vii - Polymerase Chain Reaction

۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۵-۴۵ سیکل: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴-۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) به DNA تبدیل شد. به منظور جلوگیری از اشباع شدن باندها و قبل از رسیدن واکنش PCR به مرحله‌ی کفه (plateau) بر اساس نوع پرایمر پس از انجام پیلوت‌های مختلف، برای ژن‌های Gapdh و انسولین، ۳۵ سیکل و برای ژن‌های Pdx-1 و گلوکز ترانسپورتر-۲، ۴۵ سیکل انتخاب شد. در سیکل‌های ذکر شده، همه‌ی ژن‌های مورد نظر در مرحله exponential می‌باشند و به راحتی می‌توانند تغییرات نیمه‌کمی مربوط به مقایسه‌ی ژن‌های Pdx-1، گلوکز ترانسپورتر ۲ (Glut-2) و انسولین با ژن Gapdh (ژن استاندارد) را نشان دهند. توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

5'-Pdx-1F :5-TCGCTGGGATCACTGGAGCA-3

Pdx-1R :GGTTCCGCTGTGTAAGCACC-3

5'-Glut-2F :5-GAGCCAAGGACCCCGTCTTA-3

Glut-2R :GTGAAGACCAGGACCACCCC-3

InsulinF :5-TCCGCTACAATCAAAAACCAT-3

InsulinR: 5-GCTGGGTAGTGGTGGGTCTA-3

ژن Gapdh از محلول موجود در کیت استفاده شد.<sup>۱۹</sup>

محصولات PCR به ژل ۱/۷٪ آگارز منتقل شدند. سپس، ژل فوق در دستگاه Gel documentation تحت تأثیر اشعه‌ی فرابنفش قرار گرفت و از آن تصویر تهیه شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار UVIDoc نسخه‌ی ۱۲/۸ میزان بیان ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن منبع (Gapdh) ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه<sup>viii</sup> و آزمون تکمیلی توکی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ انجام شد و یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شدند. سطح معنی‌دار آزمون‌ها  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

viii - One-way ANOVA

## یافته‌ها

لانگرهانس و رنگ آمیزی آنها با رنگ دیتیزون انجام شد. در اثر رنگ آمیزی، جزایر لانگرهانس قرمز رنگ شدند (شکل ۱).

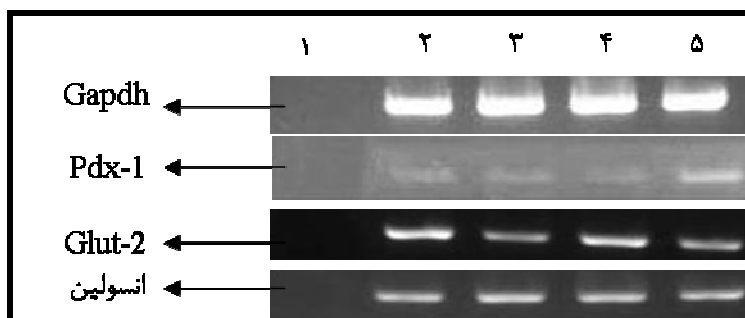
به منظور تشخیص بافت جزایر لانگرهانس پانکراس در جنین ۱۹/۵ روزه و نوزاد یک روزه، جداسازی جزایر



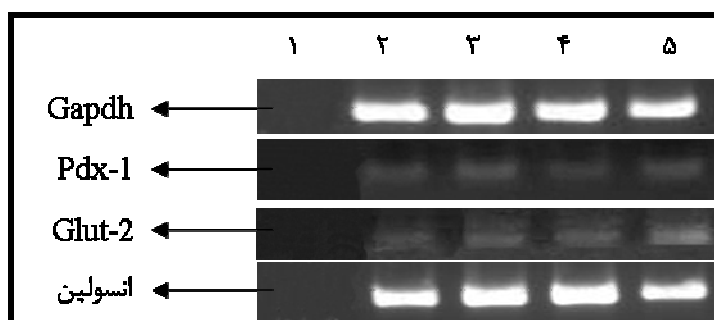
شکل ۱- جزایر لانگرهانس که توسط رنگ دیتیزون رنگ آمیزی شده‌اند. الف) جزیره لانگرهانس در جنین ۱۹/۵ روزهی موش ب) جزایر لانگرهانس در نوزاد یک روزهی موش. بزرگمایی: ۲۰X

انجام شد. در بررسی بیان ژن‌های Pdx-1، Glut-2، انسولین و Gapdh به ترتیب باندهایی با وزن ۲۷۴، ۱۵۰، ۴۱۱ و ۴۹۶ جفت باز<sup>۱</sup> به دست آمد (شکل‌های ۲ و ۳).

آنالیز نیمه کمی بیان ژن‌های Pdx-1، Glut-2 و انسولین در مقایسه‌ی تأثیر دوزهای مختلف داروی متفورمین (۷۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه شاهد (که نرمال سالیین دریافت کرده بود) با استفاده از روش RT-PCR بیان ژن‌های Pdx-1، Glut-2، انسولین و Gapdh



شکل ۲- بیان ژن‌های Gapdh، Pdx-1، گلوکز ترانسپورتر-۲ (Glut-2) و انسولین در پانکراس جنین ۱۹/۵ روزهی موش. ستون ۱: نمونه‌ی کنترل منفی (که فاقد RNA است)، ستون ۲: گروه شاهد (نرمال سالیین)، ستون ۳: متفورمین با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ستون ۴: متفورمین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ستون ۵: متفورمین با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.



شکل ۳- بیان ژن‌های *Gapdh*، *Pdx-1*، گلوکز ترانسپورتر ۲- (*Glut-2*) و انسولین در پانکراس نوزاد یک روزه‌ی موش. ستون ۱: نمونه‌ی کنترل منفی (که فاقد RNA است)، ستون ۲: گروه شاهد (ترمال سالین)، ستون ۳: متفورمین با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ستون ۴: متفورمین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ستون ۵: متفورمین با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

یافته‌های حاصل از روش Semi-quantitative RT-PCR در جنین ۱۹/۵ روزه و نوزاد یک روزه نشان داد که دوزهای مختلف داروی متفورمین در مقایسه با گروه شاهد سبب ایجاد تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های *Pdx-1*، *Glut-2* و انسولین نمی‌شوند ( $P > 0.05$ ) (جدول‌های ۱ و ۲).

سپس، با استفاده از روش Semi-quantitative RT-PCR میزان شدت باندهای مربوط به ژن‌های *Pdx-1*، *Glut-2* و انسولین نسبت به شدت باند استاندارد (*Gapdh*) در گروه‌های مختلف آزمایش به صورت نیمه‌کمی ارزیابی شد.

جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین میزان بیان ژن‌های *Pdx-1* و *Glut-2* و انسولین نسبت به بیان ژن *Gapdh* (کنترل مثبت) در گروه‌های مختلف تیمار در جنین ۱۹/۵ روزه، ۱۱ روز پس از تیمار با متفورمین (۲۵۰، ۱۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

| گروه‌ها                            | انسولین                     | <i>Glut-2</i>  | <i>Pdx-1</i>   |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| شاهد                               | ۱/۰۷۲۹±۰/۵۷۰۱۳ <sup>†</sup> | ۱/۱۰۵۳±۰/۸۴۱۴۷ | ۰/۹۴۷۰±۰/۴۰۹۵۸ |
| متفورمین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)  | ۱/۰۴۱۷±۰/۵۴۳۳۳              | ۱/۱۶۲۴±۰/۹۱۷۹۵ | ۰/۹۲۹۳±۰/۴۰۸۵۰ |
| متفورمین (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) | ۰/۹۹۷۷±۰/۵۲۲۸۳              | ۱/۲۴۹۵±۰/۹۷۲۱۷ | ۰/۹۵۴۹±۰/۴۵۱۲۸ |
| متفورمین (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) | ۰/۹۸۶۴±۰/۵۴۸۵۶              | ۱/۳۸۵۵±۰/۹۴۶۲۱ | ۱/۰۴۱۶±۰/۳۸۱۲۸ |

\* میانگین بیان ژن‌های *Pdx-1*، *Glut-2* و انسولین در گروه‌های مختلف بیمار در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ( $P > 0.05$ ); <sup>†</sup> اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌های *Pdx-1* و *Glut-2* و انسولین نسبت به بیان ژن *Gapdh* (کنترل مثبت) در گروه‌های مختلف تیمار در نوزاد یک روزه، ۱۳ روز پس از تیمار با متفورمین (۲۵۰، ۷۵، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

| گروه‌ها*                                   | انسولین                     | <i>Glut-2</i>  | <i>Pdx-1</i>   |
|--------------------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| شاهد                                       | ۱/۵۵۸۹±۰/۴۹۱۵۷ <sup>†</sup> | ۱/۶۳۹۷±۰/۳۱۳۳۷ | ۱/۳۳۲۷±۰/۲۲۰۰۸ |
| متفورمین (۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)  | ۱/۷۱۲۶±۰/۵۴۵۷۸              | ۱/۶۷۹۶±۰/۳۶۹۵۴ | ۱/۲۶۹۷±۰/۲۳۰۸۱ |
| متفورمین (۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) | ۱/۷۴۰۲±۰/۵۸۴۹۳              | ۱/۷۳۳۲±۰/۳۰۱۴۱ | ۱/۲۸۳۳±۰/۲۴۶۲۴ |
| متفورمین (۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) | ۱/۵۸۳۷±۰/۵۷۳۹۵              | ۱/۹۵۴۶±۰/۲۲۴۸۸ | ۱/۳۲۴۲±۰/۲۶۴۱۴ |

\* میانگین بیان ژن‌های *pdx-1*، *Glut-2* و انسولین در گروه‌های مختلف تیمار در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ); <sup>†</sup> اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

## بحث

و دلتا برای بیان ژن‌های انسولین، سوماتواستاتین و همچنین آمیلوئیدپپتید، گلوکوکیناز و Glut-2 ضروری است،<sup>۱۴</sup> بنابراین، در این پژوهش به بررسی اثر متفورمین بر بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 با استفاده از روش semi quantitative RT-PCR در جنین ۱۹/۵ روزه و نوزاد یک روزه پرداخته شد.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که متفورمین در جنین ۱۹/۵ روزه و نیز نوزاد یک روزه تغییر معنی‌داری را در بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 ایجاد نکرد. این یافته‌ها با یافته‌های ویگنری و همکاران<sup>۲۴</sup> و نیز بایلی و همکاران<sup>۲۵</sup> که نشان دادند متفورمین بدون اثر مستقیم بر ترشح انسولین به صورت مؤثر سبب کاهش مقاومت به انسولین می‌شود، مطابقت دارد.

در یک بررسی که توسط ریچاردسون و همکاران<sup>۶</sup> بر اثر متفورمین بر بیان ژن‌های Pdx-1 و پروانسولین در سلول‌های بتا پانکراس انجام شد، مشخص شد که متفورمین اثر قابل ملاحظه‌ای بر تنظیم فرایند رونویسی در سلول‌های بتای پانکراسی و نیز در جزایر لانگرهانس جدا شده از رت دارد. آنها نشان دادند که متفورمین سبب تحریک سطح پروتئین PDX-1 می‌گردد و اینکه اثر متفورمین بر بیان ژن در سلول‌های بتا پانکراس به دوره قرارگیری در معرض گلوکز و غلظت گلوکز وابسته است. ریچاردسون و همکاران پیشنهاد کردند که داروی ضد دیابت متفورمین که به صورت گسترده تجویز می‌شود، ممکن است نقش ناشناخته‌ای را در تنظیم مستقیم عملکرد سلول‌های بتا ایفا کند. آنها گزارش کردند که مطالعه‌های بیشتری برای مشخص نمودن سازوکار سیگنال‌های سلولی درگیر در تنظیم وقایع ذکر شده مورد نیاز است.<sup>۶</sup>

پژوهش حاضر با هدف شناسایی سازوکار سیگنال‌های سلولی درگیر در تنظیم مستقیم عملکرد سلول‌های بتا در اثر متفورمین طراحی شد. داده‌ها نشان‌دهنده‌ی این موضوع بودند که سازوکار اثر متفورمین بر تنظیم عملکرد سلول‌های بتا از طریق اثر بر بیان ژن‌های Pdx-1، انسولین و Glut-2 نیست و این دارو احتمالاً از طریق اثر بر بیان ژن‌های مسیر گلوکونئوژنز سبب کاهش سطح گلوکز خون می‌شود.

با توجه به این که اثر متفورمین بر بیان ژن در سلول‌های بتای پانکراس به دوره‌ی قرارگیری در معرض گلوکز و غلظت گلوکز وابسته است، یکی از دلایل تفاوت

داروی ضد دیابت متفورمین که یک داروی خوراکی متعلق به دسته‌ی بی‌گوانیدها است، آنالوگ (GLP-1)<sup>i</sup> می‌باشد. GLP-1 پپتید آزادکننده انسولین معدی-روده‌ای است که موجب افزایش رها شدن انسولین وابسته به گلوکز می‌شود. علاوه بر آن، سبب مهار ترشح گلوکاگون، تحریک بیوسنتز انسولین، توسعه‌ی توده‌ی سلول‌های بتا و افزایش فنوتیپ سلول‌های بتا از طریق مسیر وابسته به PDX-1 می‌شود.<sup>۴</sup>

پرفتی<sup>ii</sup> و همکاران اثر GLP-1 را بر پانکراس رتها بررسی کردند. آنها نشان دادند که تیمار با GLP-1 به مدت دو روز سبب افزایش چهار برابری بیان پروتئین PDX-1 می‌شود.<sup>۱۷</sup> از آن جا که وایبر<sup>iii</sup> و همکاران<sup>۱۵</sup> و نیز هابنر<sup>iv</sup> و همکارانش<sup>۱۶</sup> نشان داده بودند که PDX-1 به صورت اختصاصی سبب فعال شدن ناحیه‌ی پروموتور ژن‌های انسولین، گلوکوکیناز و Glut-2 می‌شود و نیز پرفتی و همکاران نشان داده بودند که GLP-1 در شرایط in vivo سبب افزایش بیان ژن‌های انسولین، گلوکوکیناز و Glut-2 در موش‌های صحرایی و بزرگسال می‌شود، بنابراین، این گروه تحقیقاتی سرانجام مسیری را طراحی کردند که به موجب آن GLP-1 بیان ژن Pdx-1 را up-regulate می‌کند و PDX-1 نیز ژن‌های انسولین، گلوکوکیناز و Glut-2 را up-regulate می‌کند.<sup>۱۷</sup>

مشخص شده است که کاهش سطح mRNA انسولین و Glut-2 که ناشی از پیری است توسط تیمار با GLP-1 برگشت داده می‌شود.<sup>۲۰</sup>

از آن جا که متفورمین آنالوگ GLP-1 است<sup>۴</sup> و به عنوان یک داروی رایج در بیماری‌های دیابت قندی نوع ۵.II، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک،<sup>۲۱</sup> بیماری کبد چرب غیر الکلی<sup>۲۲</sup> و بلوغ زودرس<sup>۲۳</sup> استفاده می‌شود و از آنجا که عامل رونویسی PDX-1 در دوره‌ی جنینی علاوه بر این که تنظیم‌کننده‌ی اصلی تکامل پانکراس است، در تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سمت سلول‌های بتا نیز مؤثر است<sup>۲۴</sup> و در بزرگسالان نیز به عنوان تنظیم‌کننده‌ی ویژه‌ی سلول‌های بتا

i - Glucagon-Like Peptide-1

ii - Perfetti

iii - Perfetti

iv - Habener

سیاسگزاری: نویسندگان این مقاله از شبکه‌ی سلول‌های بنیادی کشور و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی جندی شاپور اهواز که امکان اجرای این طرح را فراهم کرده‌اند، قدردانی می‌نمایند.

یافته‌های این پژوهش با پژوهش ریچاردسون و همکاران<sup>۶</sup> احتمالاً ناشی از عدم لحاظ کردن غلظت‌های مختلف گلوکز در پژوهش حاضر است، بنابراین پیشنهاد می‌شود که در بررسی سازوکار اثر متفورمین بر بیان ژن‌های پانکراس، شاخص غلظت گلوکز در محیط کشت نیز اعمال شود.

## References

- Guerra SD, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and Molecular Defects of Pancreatic Islets in Human Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 727-35.
- Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 2004; 47: 581-9.
- Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?. *Science* 2005; 307: 380-4.
- Green BD, Irwin N, Duffy NA, Gault VA, O'harte FP, Flatt PR. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol* 2006; 547: 192-9.
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 550-4.
- Richardson H, Campbell SC, Smith SA, Macfarlane WM. Effects of rosiglitazone and metformin on pancreatic beta cell gene expression. *Diabetologia* 2006; 49: 685-96.
- Hull RL, Shen ZP, Watts MR, Kodama K, Carr DB, Utzschneider KM, et al. Long-term treatment with rosiglitazone and metformin reduces the extent of, but does not prevent, islet amyloid deposition in mice expressing the gene for human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 2005; 54: 2235-44.
- Denno KM, Sadler TW. Effects of the biguanide class of oral hypoglycemic agents on mouse embryogenesis. *Teratology* 1994; 49: 260-6.
- Hague WM, Davoren PM, Oliver J, Rowan J. Contraindications to use of metformin. Metformin may be useful in gestational diabetes. *BMJ* 2003; 326: 762.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 471-8.
- Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 2003; 120: 65-80.
- Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 99-108.
- Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* 1998; 431: 362-6.
- Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox domain. *Molecular Endocrinology* 1996; 10: 1327-34.
- Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 12-21.
- Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 2000; 141: 4600-5.
- Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione. *Stem Cells* 2002; 20: 284-92.
- Palumbo MO, Levi D, Chentoufi AA, Polychronakos C. Isolation and characterization of proinsulin-producing medullary thymic epithelial cell clones. *Diabetes* 2006; 55: 2595-601.
- Wang Y, Perfetti R, Greig NH, Holloway HW, DeOre KA, Montrose-Rafizadeh C, et al. Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 2883-9.
- Lord JM, Flight IHK, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 327: 951-3.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001; 358: 893-4.
- Ibáñez L, Ong K, Valls C, Marcos MV, Dunger DB, de Zegher F. Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2888-91.
- Vigneri R, Goldfine ID. Role of metformin in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1987; 10: 118-22.
- Bailey CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 1992; 15: 755-72.

## Original Article

# Effect of Metformin on the Pdx-1 Gene Expression During Development of Mouse Pancreas

Soleimani Mehranjani M<sup>1</sup>, Hashemitabar M<sup>2</sup>, Momeni H<sup>1</sup>, Bahramzadeh S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Arak University, Arak, I.R.Iran, <sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, Jundi Shapour Medical Sciences University, Ahvaz, I.R. Iran  
e-mail: Hashemi\_tabar@hotmail.com

Received: 05/04/2010 Accepted: 11/01/2010

### Abstract

**Introduction:** Metformin, an oral medicine used to treat type 2 diabetes, is a Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) analogue, which has been demonstrated to stimulate the expression of Pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1), Insulin and Glucose transporter 2 (Glut-2) genes. In this study, the regulatory effect of metformin on beta cells function through the expression of Pdx-1, Insulin and Glut-2 genes was investigated. **Materials and Methods:** Pregnant C57BL/6 mice were randomly divided into 2 groups. Normal saline was given to the control group and the experimental group received 75, 150 and 250 mg/kg metformin daily by intraperitoneal injection from day 8.5 of pregnancy. Half the pregnant animals were then sacrificed by cervical dislocation on day 19.5 of pregnancy and the pancreases of embryos were dissected. The other half of pregnant animals were allowed to deliver their pups and the pancreases of one day old mice were dissected. The dissected pancreases were then used for assessment of Pdx-1, Insulin and Glut-2 genes expression by semi-quantitative RT-PCR method. **Results:** Results showed that the administration of various doses of metformin caused no changes in the expression of Pdx-1, Insulin and Glut-2 genes compared to the control group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** The regulatory effect of metformin on beta cells function might not be related to the expression of Pdx-1, Insulin and Glut-2 genes and may be related to the expression of gluconeogenesis pathway genes.

**Keywords:** Diabetes, Metformin, Pancreas, Pdx-1, Insulin, Glut-2