مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی هفدهم، شماره‌ی ۱، صفحه‌های ۶۲ ـ ۵۳ (فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۹۴)

مقاله‌ی پژوهشی

بررسی اثرات رزیگلیتازون و اپی‌گالوکاتچین گالات بر بیان پروتئین PGC-1α در رده سلول‌های عضلانی C2C12 مقاوم به انسولین القا شده با پالمیتات

دکتر سالار بختیاری[۱]، آذر باباخانی[۲]، دکتر کریمه حقانی[۱]

۱) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ۲) کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده‌ی پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، دکتر کریمه حقانی؛ e-mail: sobhe14@yahoo.com

چکیده

مقدمه: تغییر در سوخت و ساز لیپیدها یکی از سازوکارهای مهم برای درمان مقاومت به انسولین و در نتیجه دیابت نوع ۲ است. از سوی دیگر، PGC-1α به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیوژنز و عملکرد میتوکندری، از راه افزایش بتا-اکسیداسیون لیپیدها، نقش مهمی در بهبود حساسیت به انسولین ایفا می‌کند. در پژوهش حاضر، اثرات اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG)، به عنوان ترکیب ضدچاقی و افزاینده کاتابولیسم چربی، بر بیان پروتئین PGC-1α بررسی شد و با داروی ضددیابتی رزیگلیتازون (RGZ) مقایسه گردید. مواد و روش‌ها: پس از تمایز میوبلاست‌های C2C12 به میوتیوب، مقاومت به انسولین از طریق تیمار پالمیتات القا گردید. سپس میزان بیان پروتئین PGC-1α، پیش و پس از تاثیر انسولین و هم‌چنین پس از تیمار با EGCG و RGZ، با استفاده از روش وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: تیمار با پالمیتات بیان پروتئین PGC-1α را در سلول‌های C2C12 به طور معنی‌داری کاهش داد (P=۰/۰۰۱). تیمار این سلول‌ها با EGCG اثر معنی‌داری بر بیان پروتئین PGC-1α نداشت (P=۰/۶۷)، در حالی‌که تیمار با RGZ بیان این ژن در سطح پروتئین را به طور معنی‌داری افزایش داد (P=۰/۰۰۳). هم‌چنین، این افزایش معنی‌دار در بیان ژن PGC-1α در سطح پروتئین تحت تیمار همزمان با RGZ و EGCG حفظ شد (P=۰/۰۰۱). نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که تاثیر EGCG بر میزان بیان پروتئین PGC-1α معنی‌دار نبود، در حالی‌که RGZ به طور معنی‌داری کاهش بیان القا شده با پالمیتات پروتئین PGC-1α را بهبود داد. در مجموع، به نظر می‌رسد که اثرات ضد دیابتیک EGCG بر خلاف RGZ از راه تاثیر بر بیان ژن PGC-1α اعمال نمی‌گردد.

واژگان کلیدی: مقاومت به انسولین، رده سلول‌های عضلانی C2C12، ژن PGC-1α، رزیگلیتازون، اپی‌گالو کاتچین گالات

دریافت مقاله:۹۳/۷/۵ـ دریافت اصلاحیه: ۹۳/۱۱/۱۳ ـ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۵

مقدمه

دیابت ملیتوس به عنوان یک اختلال مزمن با افزایش سطح گلوکز خون همراه است.[۱] مطالعات ژنومی و ساختاری سلول‌های عضلانی در افراد دیابتی یا افراد در معرض ابتلا به دیابت نشان داده که اختلال در بیان و ساختار ژن‌های کد شونده توسط میتوکندری یکی از عوارض کلیدی دیابت است.[۲-۶] با توجه به روند رو به رشد شیوع دیابت در جهان، شناسایی سازوکارهای ژنتیکی مربوط به اختلالات میتوکندریایی امری ضروری به نظر می‌رسد. بسیاری از عوارض دیابت نوع ۲ اغلب با غلظت بالای اسیدهای چرب غیراستریفیه در سرم مرتبط است. از این رو، مطالعات زیادی در زمینه‌ی اثر اسیدهای چرب غیراستریفیه بر عملکرد انسولین و سوخت و ساز گلوکز انجام شده است.[۷] مصرف

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

رژیم غذایی پر چرب (به ویژه اسیدهای چرب اشباع)، می‌تواند منجر به کاهش حساسیت به انسولین و افزایش احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲ گردد.[۸] مشخص شده است که تیمار سلول‌های C2C12 با اسیدهای چرب اشباع نظیر پالمیتات (فراوان‌ترین اسیدچرب اشباع پلاسما)، سبب کاهش بیان PGC-1α[i] و PGC-1β می‌شود.[۹،۱۰] همین‌طور رژیم غذایی پرچرب در انسان و جوندگان، منجر به کاهش بیان ژن PGC-1α در عضله می‌گردد.[۱۱،۱۲] PGC-1α به عنوان یک کمک فعال‌کننده رونویسی برای PPARs[ii] عمل کرده و بیان ژن‌های درگیر در سوخت و ساز اسیدهای چرب را فعال می‌کند. به تازگی گزارش گردیده تزریق لیپید، بیان ژن‌های میتوکندریایی کدشونده توسط هسته و PGC-1α را در عضله اسکلتی انسان کاهش می‌دهد.[۱۳-۱۵] پژوهش‌های انجام شده در میوتیوب‌های C2C12 مقاوم به انسولین نشان داده که پیام‌رسانی انسولین در حیطه برنامه‌های تنظیمی و انرژی زیستی میتوکندری مختل می‌شود. پیوگلیتازون به واسطه‌ی تاثیر بر پیام‌رسانی انسولین و برنامه‌های تنظیمی و انرژی زیستی میتوکندری، سبب بهبود حساسیت به انسولین و افزایش بیان PGC-1α در این رده از سلول‌ها می‌گردد.[۱۶] RGZ[iii] نیز مانند پیوگلیتازون جزیی از خانواده تیازولیدین‌دیون‌ها است که سبب بهبود کنترل قند خون از راه بهبود حساسیت به انسولین شده و سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد. این دارو آگونیست PPARγ است که در عضله اسکلتی، کبد و بافت‌های چربی انسان به عنوان کلیدی برای شروع فعالیت انسولین عمل کرده و عملکرد ژن‌های حساس به انسولین را کنترل می‌نماید که در تنظیم سوخت و ساز اسیدهای چرب شرکت دارند. به علاوه، RGZ عملکرد انسولین روی گلوکز و سوخت و ساز چربی‌ها را افزایش می‌دهد و به احتمال زیاد اولین دارو در درمان مقاومت به انسولین در افراد چاق مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد.[۱۶،۱۷] به تازگی نشان داده شده است تیمار با RGZ سبب بهبود اثر ضد لیپولیتیکی انسولین در بافت چربی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌گردد.[۱۸] به احتمال زیاد به موازات این اثر، تیازولیدین‌دیون‌ها هم باعث القا توزیع مجدد لیپید درون سلولی، از عضله اسکلتی، کبد و پانکراس به آدیپوسیت‌های محیطی گشته و پیام‌رسانی انسولین را در این بافت‌ها به حالت اولیه برمی‌گردانند.[۱۹] شاید بخشی از سازوکار حساسیت‌زایی تیازولیدین‌دیون‌ها به واسطه‌ی افزایش بیوژنز میتوکندریایی باشد.[۲۰] ترکیب دیگری که در این پژوهش مورد استفاده قرار می‌گیرد، EGCG است که یکی از مهم‌ترین کاتچین‌های چای سبز و دارای اثرات ضد دیابتی در مدل‌های حیوانی است. این ترکیب با مهار پیام‌رسانی پروتئین کیناز C و ½ ERK، از تکثیر سلول‌های عضله صاف جدار عروق خونی که در اثر افزایش گلوکز رخ می‌دهد، جلوگیری می‌نماید. بنابراین EGCG می‌تواند به عنوان یک دارو برای کاهش عوارض قلبی ـ عروقی دیابت به کار رود.[۲۱] با توجه به اثرات ضد دیابتی ترکیبات دارویی ذکر شده و نقش کلیدی PGC-1α در تنظیم سوخت و ساز اسیدهای چرب و بهبود مقاومت به انسولین، در پژوهش حاضر به بررسی اثرات RGZ و EGCG بر میزان بیان ژن PGC-1α در رده سلول‌های عضلانی C2C12 مقاوم به انسولین در حضور و عدم حضور پالمیتات پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام کشت سلولی میوبلاست‌های C2C12 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیدند. این سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS[iv] و ۱٪ آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO2) نگه‌داری گردیدند.

هنگامی که سلول‌ها ۸۰-۷۰٪ کف فلاسک را پر نمودند، به میوتیوب‌ها تمایز داده شدند. برای این کار محیط کشت با محیط تمایز (DMEM حاوی ۲٪ سرم اسب و ۱٪ آنتی‌بیوتیک) تعویض گردید و سلول‌ها ۴ روز در محیط تمایز نگه‌داری شدند و هر روز با محیط تمایز تازه جایگزین گردیدند. بعد از این زمان میوتیوب‌ها تشکیل شدند. به منظور تایید تمایز صورت گرفته در میوبلاست‌های C2C12 از آزمون کراتین کیناز استفاده گردید. این آزمون با استفاده از کیت کراتین کیناز خریداری شده از شرکت Bioassay system انجام شد.

تیمار با پالمیتات و انسولین

برای این که پالمیتات بتواند در دسترس سلول قرار گیرد با BSA فاقد اسید چرب کانژوگه گردید. به این منظور، غلظت‌های مورد نظر از سدیم پالمیتات در اتانول ۵۰٪ حل

i - Peroxisome proliferator-activated receptor-ã coactivator coactivator
ii- Peroxisome proliferator-activated receptor
iii - Rosiglitazone
iv- Fetal Bovine Serum

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

شده و این محلول به DMEM حاوی ۱٪ BSA اضافه شد. سپس این محیط به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوبه شد. پس از ۲ ساعت، این محیط فیلتر گردید و در اختیار میوتوب‌های C2C12 قرار گرفت. سلول‌ها به مدت ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با پالمیتات تیمار شدند. برای تیمار با انسولین، از محیط کشت حاوی BSA فاقد اسید چرب آزاد و انسولین ۱۰۰ نانومولار استفاده شد.[۱۶،۱۷]

به منظور تیمار ۰/۱ میلی‌مولار RGZ و ۰/۴ میلی‌مولار EGCG را به ترتیب در محلول DMSO و آب مقطر حل کردیم، سپس محلول‌های به دست آمده هم به صورت مجزا و هم به صورت همزمان به محیط‌های کشت تیمار شده با پالمیتات و انسولین اضافه گردید.[۱۸-۲۲] در این مرحله از محیط‌هایی استفاده شد که به مدت ۲۴ ساعت با پالمیتات انکوبه شده و بعد تحت تیمار انسولین قرار گرفته بودند.

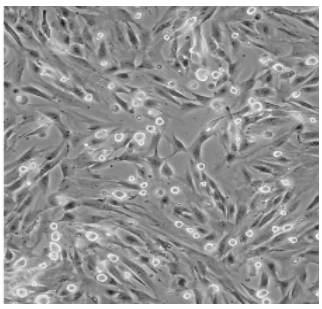
برای بررسی اثرات RGZ و EGCG بر میزان بیان ژن PGC-1α در سطح پروتئین در حضور و عدم حضور پالمیتات از روش وسترن بلات استفاده شد. به این‌منظور عصاره‌ی پروتئینی سلول‌های C2C12 از راه هموژنه کردن آن‌ها در بافر RIPA (۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۱٪ تریتون X-100، ۰/۲٪ سدیم داکسی کولات، ۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۱ میلی‌مولار PMSF) استخراج و غلظت آن بر اساس روش برادفورد اندازه‌گیری شد.[۲۳] ۳۰-۲۰ میکروگرم از عصاره‌ی پروتئینی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس سلول‌ها از ژل به غشا نیتروسلولز منتقل شدند و سپس به مدت ۱ شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول ۲٪ BSA انکوبه گردیدند. در مرحله‌ی بعد، غشا با آنتی‌بادی اولیه علیه PGC-1α یا β-actin به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. پس از ۴ بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای با بافر TBST، غشا به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه با HRP انکوبه شد. چهار بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای انجام شد و سپس غشا با سوبسترای کمی لومینوسانس ECL به مدت ۲-۱ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله‌ی بعد، غشا با فیلم رادیولوژی حساس مجاور شد و فیلم با استفاده از محلول‌های ظهور و ثبوت ظاهر گردید. فیلم اسکن شده و به طور نیمه کمی غلظت پروتئین با نرم‌افزار Scion Image تجزیه و تحلیل گردید.[۲۴] سپس با تقسیم دانسیته‌ی باند PGC-1α به دانسیته‌ی باند β-actin متناظرش، مقدار بیان ژن مورد نظر نرمالیزه گردید. تمام آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده مونوکلونال بودند و تنها با پروتئین مربوطه‌ی موشی واکنش دادند و هیچ‌گونه واکنش متقاطعی با پروتئین‌های مشابه نداشتند. هر آزمایش حداقل سه بار انجام شد.

تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ انجام شد. هر آزمایش کمینه سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شدند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون ANOVA انجام گردید. در شرایط وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌ها، از آزمون Post-hoc توکی[i] استفاده شد. مقادیر $P<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

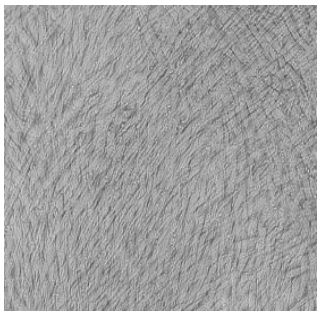
یافته‌ها

سلول‌ها پس از گذشت ۴-۳ روز به میوتیوب تبدیل شده و ویژگی‌هایی شبیه بافت عضلانی پیدا می‌کنند (شکل ۱).

a)



b)

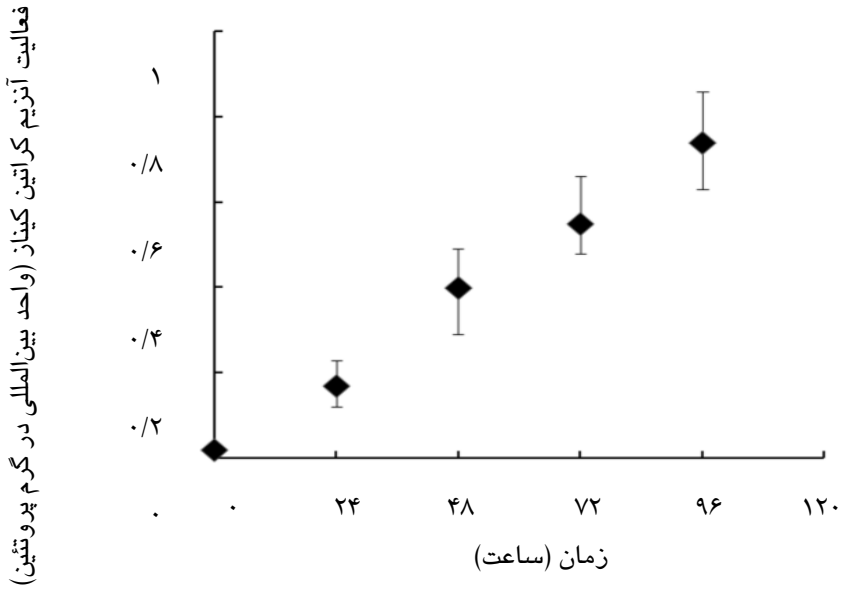


شکل ۱- (a) میوبلاست‌های C2C12 در محیط کشت DMEM. سلول‌ها پس از گذشت چندین روز از حالت کروی اولیه درآمده و آماده تمایز می‌باشند. (b) میوبلاست-های C2C12 در محیط تمایز. سلول‌ها پس از گذشت ۴-۳ روز به میوتیوب تبدیل شده و ویژگی‌هایی شبیه بافت عضلانی پیدا می‌کنند. در هر دو مرحله سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت عکس‌برداری شدند.

i - Tukey

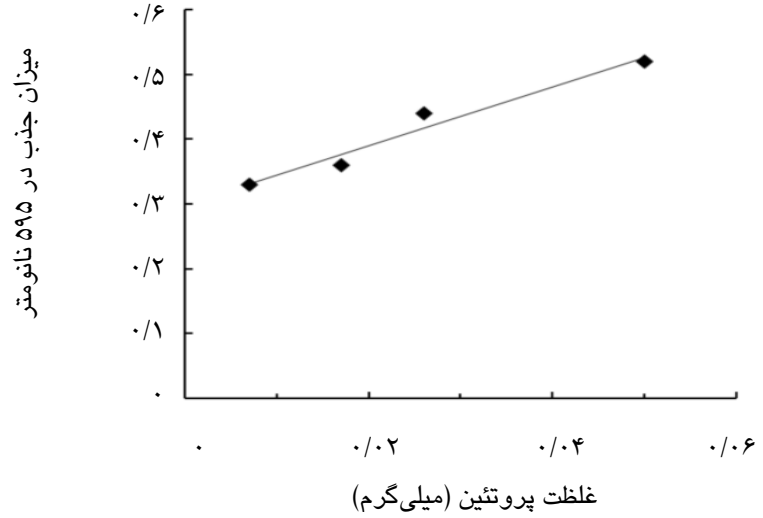
[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

یافته‌های به دست آمده از آزمون کراتین کیناز نشان داد که با هر روز تمایز میوبلاست‌ها به میوتیوب، فعالیت آنزیم کراتین کیناز افزایش پیدا کرده است. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است. ۲۴ ساعت پس از تمایز، فعالیت آنزیم افزایش معنی‌داری را آغاز نموده (P=۰/۰۰۸) و از حدود صفر به ۰/۱۷ رسیده است. فعالیت آنزیم پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۴ و ۰/۵۵ محاسبه گردید.



نمودار ۱- تست کراتین کیناز جهت تایید تمایز سلول‌های میوبلاست به میوتیوب. میزان فعالیت آنزیم کراتین کیناز به ترتیب پس از گذشت ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ ساعت از تمایز افزایش پیداکرده است. تمام اختلافات نسبت به صفر معنی‌دار و در تمامی مقایسه‌ها (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

چهار روز پس از تمایز، بیشترین افزایش فعالیت، معادل ۰/۷۴، مشاهده گردید. به منظور تهیه غلظت‌های برابر از نمونه‌های آزمایش از واکنش برادفورد استفاده شد. همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، غلظت پروتئینی در هر یک از نمونه‌ها با توجه به نمودار استاندارد و OD نمونه‌های مجهول محاسبه گردید. غلظت پروتئین‌های به دست آمده در مرحله بعد برای آزمون وسترن بلات به کار رفت.

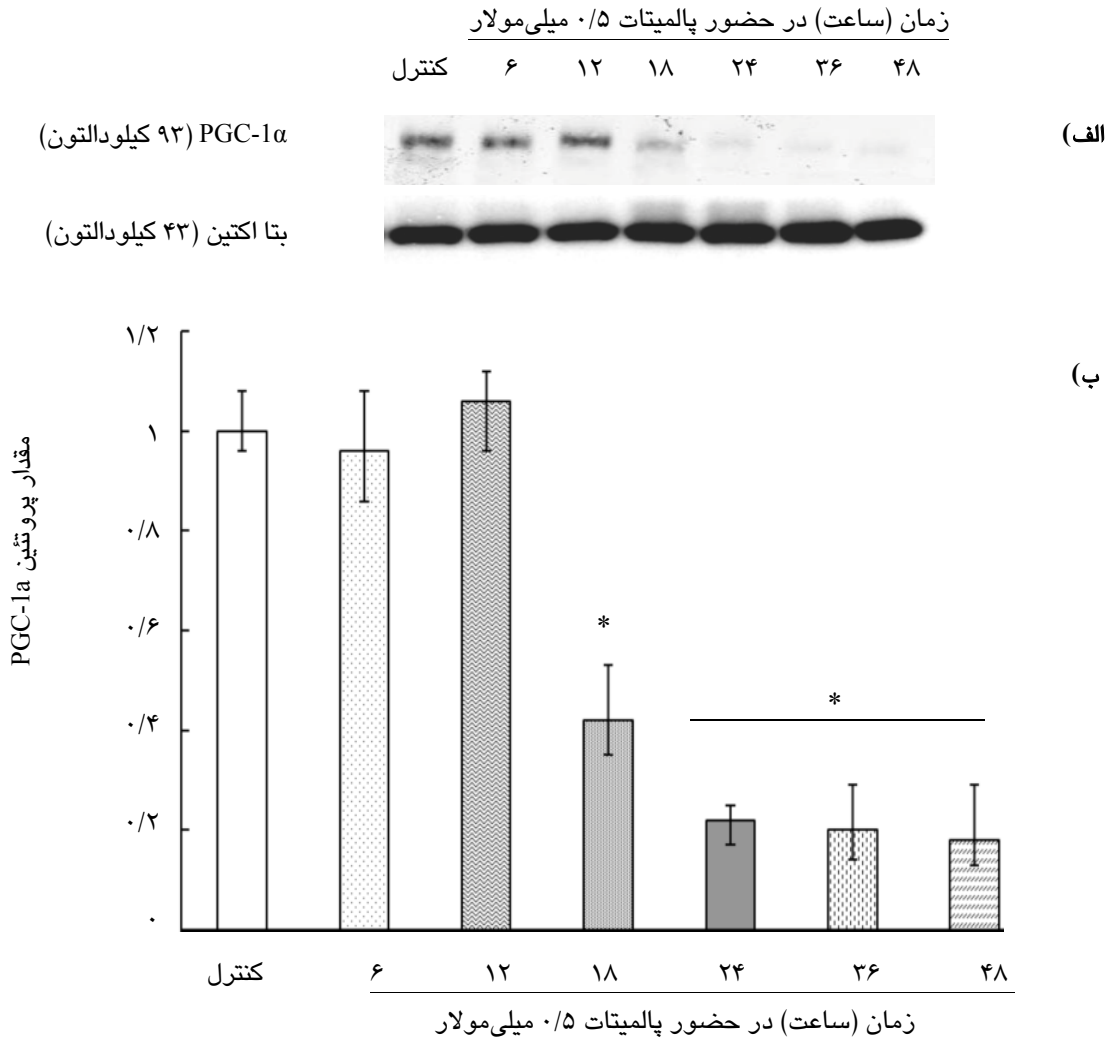


نمودار ۲- نمودار استاندارد واکنش برادفورد جهت تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

تیمار با پالمیتات

به منظور بررسی میزان بیان ژن PGC-1α در سطح پروتئین در حضور و عدم حضور پالمیتات، سلول‌های عضلانی C2C12 تحت تیمار با پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده سلول‌ها به مدت ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با پالمیتات تیمار شدند و برای بررسی میزان بیان پروتئین PGC-1α، آزمایش وسترن بلات برای هر یک از نمونه‌ها ۳ بار تکرار گردید.



شکل ۲- تیمار با پالمیتات. الف) میزان بیان پروتئین PGC-1α در حضور غلظت ۰/۵ میلی‌مولار پالمیتات پس از گذشت ۶ و ۱۲ ساعت نسبت به گروه‌های کنترل تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد (P>۰/۰۵). اما در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن نسبت به گروه‌های کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵ ,*). ب) داده‌های به دست آمده از دانسیتومتری پروتئین PGC-1α در زمان‌های مختلف به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است.

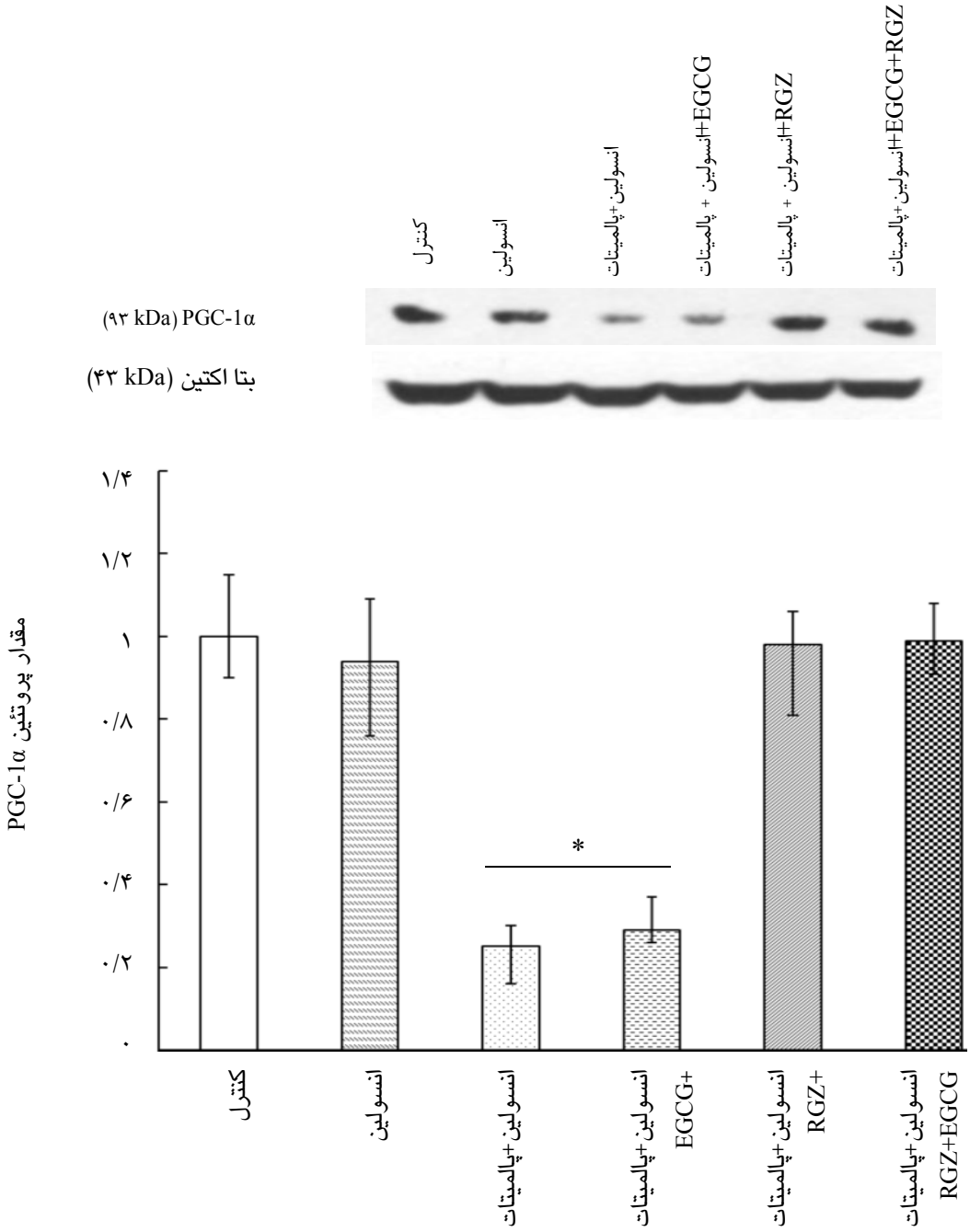
بر اساس یافته‌های به دست آمده میزان بیان پروتئین PGC-1α در حضور غلظت ۰/۵ میلی‌مولار پالمیتات پس از گذشت ۶ و ۱۲ ساعت نسبت به گروه‌های کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداده است (P=۰/۱۵). اما در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن نسبت به گروه‌های کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P=۰/۰۰۱).

براساس یافته‌های به دست آمده بهترین مدت زمان تیمار، ۲۴ ساعت تعیین شد. یافته‌های به دست آمده از آزمایشات وسترن بلات برای پروتئین بتا اکتین نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های مختلف برای این پروتئین وجود ندارد (P=۰/۴۴).

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

تیمار با RGZ و EGCG

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، در سلول‌های مقاوم به انسولین تیمار شده با پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار و انسولین ۱۰۰ نانومولار که تحت تیمار با RGZ و EGCG قرار گرفتند، میزان بیان پروتئین PGC-1α نسبت به گروه‌های کنترل تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد (P=۰/۵۱)، حال اینکه تحت شرایط تیمار با پالمیتات و انسولین و بدون اثر دادن RGZ و EGCG، میزان بیان پروتئین مذکور به طور معنی‌داری (P=۰/۰۰۱) کاهش می‌یابد.



شکل ۳- اثر RGZ و EGCG بر میزان بیان پروتئین PGC-1α در سلول‌های C2C12 مقاوم به انسولین القا شده توسط پالمیتات. الف) سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با پالمیتات تیمار شده و قبل از جمع‌آوری با انسولین انکوبه گردیدند. از چپ به راست: کنترل، تیمار میوتیوب‌های C2C12 با انسولین بدون تیمار با پالمیتات، تیمار سلول‌های C2C12 با انسولین و پالمیتات، تیمار سلول‌های C2C12 با انسولین، پالمیتات و EGCG، تیمار سلول‌های C2C12 با انسولین، پالمیتات و RGZ، تیمار سلول‌های

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

C2C12 با انسولین، پالمیتات، EGCG و RGZ. آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه ژن PGC-1α و بتا اکتین (کنترل داخلی) انجام شد. ب) داده‌های به دست آمده از دانسیتومتری پروتئین PGC-1α در شرایط تیمارهای مختلف به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است (P<۰/۰۵ ,*).

همچنین در حالت تیمار با پالمیتات، انسولین و EGCG ۰/۴ میکرومولار، میزان بیان پروتئین PGC-1α در مقایسه با گروه تیمار شده با پالمیتات و انسولین هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نشان نداده است (P=۰/۶۷)، به این معنا که در این حالت به طور مشخص EGCG بی‌تاثیر بوده است. این در حالی است که در حالت تیمار با RGZ ۰/۱ میکرومولار میزان بیان این پروتئین افزایش یافته و این افزایش نسبت به گروه تیمار شده با پالمیتات و انسولین معنی‌دار بوده است (P=۰/۰۰۳). در حالت تیمار همزمان با این دو ترکیب میزان بیان پروتئین PGC-1α افزایش یافته و این میزان افزایش نسبت به گروه تیمار شده با پالمیتات و انسولین معنی‌دار است (P=۰/۰۰۱). یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهد که RGZ ۰/۱ میکرومولار قادر به حذف اثر پالمیتات در سلول‌های مورد آزمایش می‌باشد.

بحث

رژیم غذایی پرچرب، بی‌تحرکی و دریافت کالری اضافی می‌تواند منجر به افزایش اسیدهای چرب آزاد موجود در گردش خون و نقص در سوخت و ساز اسیدهای چرب گردد.[۲۵] اسیدهای چرب آزاد سبب القا مقاومت به انسولین می‌شود که با آپوپتوز و از دست رفتن جزیی سلول‌های عضلانی در دیابت نوع ۲ همراه است.[۲۶] PGC-1α از جمله کمک فعال‌کننده‌هایی است که نقش کلیدی آن‌ها در تنظیم بیوژنز و عملکرد میتوکندریایی شناسایی شده است.[۲۷] در مطالعات پیشین نشان داده شده که در افراد دیابتی یا افراد مستعد ابتلا به دیابت، بیان ژن PGC-1α و PGC-1β تا ۵۰٪ کاهش می‌یابد.[۵] همچنین مشخص شده که محدودیت شدید کالری سبب بهبود حساسیت به انسولین و افزایش بیان PGC-1α در عضلات اسکلتی افراد چاق می‌گردد.[۲۸] برعکس تزریق لیپید، بیان ژن PGC-1α و برخی از پروتئین‌های کد شونده توسط هسته را کاهش می‌دهد.[۲۹] اسیدهای چرب اشباع به ویژه پالمیتات در رقابت با گلوکز مصرف می‌شوند و افزایش اکسیداسیون آن‌ها سبب ایجاد مقاومت به انسولین می‌گردد.[۲،۳۰] علاوه بر این، پالمیتات برداشت گلوکز تحریک شده با انسولین را در سلول‌های عضلانی C2C12 مهار می‌نماید.[۳۱] در مطالعه‌ی حاضر نیز کاهش بیان PGC-1α در اثر مقاومت به انسولین القا شده با پالمیتات در سلول‌های عضلانی C2C12 تایید شد و در ادامه اثر دو ترکیب دارویی RGZ و EGCG بر بیان PGC-1α در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

برای درمان دیابت از داروهای مختلفی استفاده می‌شود، یکی از داروهای ضد دیابت RGZ از خانواده تیازولیدین‌دیون‌ها است که سطح اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسرید را کاهش داده و سبب پیشگیری از عوارض قلبی ـ عروقی دیابت می‌شود.[۳۲] در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که RGZ باعث تغییر بیان تعدادی از ژن‌های کلیدی دخیل در بیوژنز میتوکندریایی و ظرفیت اکسیداتیو آن در عضلات اسکلتی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود که همراه با تغییر ظرفیت اکسیداتیو عضلات اسکلتی و محتوای لیپیدی آن‌ها می‌باشد.[۳۳] RGZ با مهار فعالیت MAP kinase، کاسپاز ۳ و نیتریک اکسید سنتاز، اختلالات ناشی از اثر دادن پالمیتات در سلول‌های β را کاهش می‌دهد.[۳۴،۳۵] همین‌طور گزارش شده است که RGZ تحت یک سازوکار وابسته به PPAR-γ اثرات مقاومت به انسولین القا شده با پالمیتات را کاهش می‌دهد[۳۶] که این موضوع با یافته‌های به دست آمده از سایر مطالعات انجام شده روی سلول‌های غیر عضلانی هماهنگی نشان می‌دهد.[۳۷،۳۸] مطالعه‌ی انجام شده روی جنبه‌های شیمیایی و پزشکی ترکیب دارویی EGCG نیز نشان داده است که ترکیبات پلی‌فنلی و دیگر کاتچین‌های وابسته مسئول خواص مفید چای سبز نظیر اثرات افزایش‌دهنده حساسیت به انسولین و ضد دیابت، افزایش دهنده بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، بهبود وضعیت قلبی ـ عروقی، افزایش شانس کاهش وزن، حفاظت پوست در مقابل تاثیرات مضر ناشی از اشعه یونیزان و غیره می‌باشد.[۳۹-۴۳] اگر چه در مورد سازوکارهای درمانی RGZ و EGCG مطالعات فراوانی صورت گرفته، ولی تاکنون گزارشی در خصوص اثر این دو بر بیان پروتئین ژن PGC-1α در سلول‌های عضلانی C2C12 و مقایسه اثرات این دو

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

در درمان مقاومت به انسولین القاء شده با اسید چرب اشباع پالمیتات انجام نشده است. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیمار سلول‌های C2C12 با انسولین ۱۰۰ نانومولار، افزایش معنی‌داری در بیان پروتئین PGC-1α ایجاد نکرده، در حالی‌که میزان بیان این ژن در اثر تیمار با پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار به طور معنی‌داری کاهش یافته است. به این معنا که افزایش سطح اسیدهای چرب اشباع پالمیتات، سبب کاهش بیان ژن PGC-1α در سطح پروتئین در عضله، مشخصاً سلول‌های C2C12، می‌گردد. از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهد، تیمار سلول‌های مقاوم به انسولین با EGCG ۰/۴ میکرومولار، تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن PGC-1α نداشته است، در حالی‌که در سلول‌های مقاوم به انسولین تیمار شده با RGZ ۰/۱ میکرومولار میزان بیان ژن PGC-1α افزایش یافته و این افزایش نسبت به گروه سلول‌های مقاوم به انسولین تیمار نشده با دارو معنی‌دار بوده است. در تیمار همزمان سلول‌ها با هر دو ترکیب EGCG و RGZ، میزان بیان ژن PGC-1α افزایش یافته و این میزان افزایش نسبت به گروه تیمار شده با پالمیتات معنی‌دار بوده است. در مجموع یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهد که RGZ با حذف اثر پالمیتات، از کاهش بیان ژن PGC-1α توسط پالمیتات جلوگیری کرده و خواص درمانی چشم‌گیری در بهبود مقاومت به انسولین القا شده با پالمیتات دارد. این در حالی است که EGCG چنین اثری بر بیان ژن PGC-1α نداشته و احتمالاً مکانیسم اثر EGCG در بهبود مقاومت به انسولین متفاوت از بیان ژن PGC-1α می‌باشد. میزان بیان ژن PGC-1α تحت شرایط تیمار همزمان با دو ترکیب EGCG و RGZ، در مقایسه با میزان بیان این ژن در شرایط تیمار با RGZ تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. از این رو نمی‌توان برای این دو ترکیب اثرهم افزای قایل شد و احتمالا این افزایش تنها ناشی از اثر RGZ می‌باشد. تاکنون تاثیر EGCG و RGZ بر بیان پروتئین ژن PGC-1α در سلول‌های عضلانی صورت نگرفته که این نکته می‌تواند یکی از نقاط قوت این مطالعه باشد. البته این یک مطالعه in vitro بوده و بهتر است برای تایید این نتایج مطالعات in vivo انجام شود. هم‌چنین، بهتر است که در مطالعات بعدی میزان برداشت گلوکز در سلول‌های عضلانی و هم‌چنین فعالیت مولکول‌های کلیدی مسیر پیام رسانی انسولین در حضور این دو ترکیب اندازه‌گیری شود.

به طور کلی، یافته‌های پژوهش حاضر نیز در راستای مطالعات پیشین،[۳۳-۴۴، ۴۰، ۳۶] موید اثر RGZ در بهبود مقاومت به انسولین القا شده توسط پالمیتات است. به نظر می‌رسد که اثرات درمانی RGZ با حذف تاثیر پالمیتات و جلوگیری از کاهش بیان ژن PGC-1α صورت می‌گیرد. این در حالی است که EGCG چنین اثری بر بیان ژن مذکور ندارد. بنابراین بر اساس یافته‌های به دست آمده پیشنهاد می‌گردد که این دو ترکیب دارویی، اثرات ضد دیابتیک خود را از طریق سازوکارهای متفاوتی اعمال می‌نمایند.

References

1. Borch-Johnsen K. The new classification of diabetes mellitus and IGT: a critical approach. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S86-93.
2. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes 2002; 51: 2944-50.
3. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet 2003; 34: 267-73.
4. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. J Clin Invest 2005; 115: 3587-93.
5. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 8466-71.
6. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 2004; 350: 664-71.
7. Reynoso R, Salgado LM, Calderon V. High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. Mol Cell Biochem 2003; 246: 155-62.
8. Mann JI. Diet and risk of coronary heart disease and type 2 diabetes. Lancet 2002; 360: 783-9.
9. Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. Am J Clin Nutr 2007; 85: 662-77.
10. Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva WS, Espinoza D. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. J Biol Chem 2007; 282: 15439-50.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

11. Sparks LM, Xie H, Koza RA,Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. Diabetes 2005; 54: 1926–33.
12. Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. J Biol Chem 2005; 280: 33588-98.
13. Miller WC, Bryce GR, Conlee RK. Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol 1984; 56: 78-83.
14. Simi B, Sempore B, Mayet M-H, Favier RJ. Additive effects of training and high-fat diet on energy metabolism during exercise. J Appl Physiol (1985) 1991; 71: 197-203.
15. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, et al. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. J Biol Chem 2005; 280: 10290-7.
16. Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X. PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. J Biol Chem 2008; 283: 22464-72.
17. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. Eur J Clin Invest 2002; 32: 14-23.
18. Kerentz AJ, Bailey CY. Oral antidiabetic agent: current role in type 2 diabetes mellitus. Drugs 2005; 65: 385-411.
19. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2002; 51: 797-802.
20. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. Diabetes 2005; 54: 1392-9.
21. Yung J, Han Y, Sun H, Chen C, He D, Guo J, et al. Epigallocatechin gallate suppresses proliferation of vascular smooth muscle cells induced by high glucose by inhibition of PKC and ERK1/2 signalings, J Agric Food Chem 2011; 59: 11483-90.
22. Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 299: 145-61.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
24. Haghani K, Bakhtiyari S, Nouri AM. In vitro study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. Mol Cell Biochem 2012; 361: 315-20.
25. Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio MA, WattM J. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induce by ceramid and is positively related to insulin resistance. Am J Physiol Endocrinal Metab 2006; 291: 1341-50.
26. Yang M, Wei D, Mo C, Zhang J, Wang X, Han X, et al. Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. Lipids Health Dis 2013; 12: 104.
27. Hundschin C, Splegelman BM. Proxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators energy homeostasis, and metabolism. Endocr Rev 2006; 27: 728-35.
28. Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, Laville M, Langin D. Clonning and mRNA tissue distribution of human PPAR gamma coactivator -1. Int J obes Relat Metab Disord 1999; 23: 1327-32.
29. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J. Lipid infusion decrease the expression of unclear encoded mitochondrial genes and increase the expression of extra cellular matrix genes in human skeletal muscle. J Biol chem 2005; 280: 10290-7.
30. Denser A, Laurent D, Marcucci M , Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol-3 Kinase activity. J Clin Invest 1999; 103: 253-9.
31. Jove M, Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Palmitate induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear- factor kappa B activation and leads to GLUL4 down regulation in skeletal muscle cells, Endocrinology 2005; 146: 3087-95.
32. Dubois M, Vantyghem MC, Schoonjans K, Pattou F. Thiazolidinediones in type 2 diabetes. Role of peroxisome proliferator –activated receptor gamma (PPAR gamma), Ann Endocrinol (Paris) 2002; 63: 511-23.
33. Mensink M, Hesselink MK, Russell AP, Schaart G, Sels JP, Schrauwen P. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activing and restoration of PGC-1 alfa and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabets mellitus. INT J Obes (Lond) 2007; 31: 1302-10.
34. Abaraviciene SM, Lundquist I, Salehi A. Rosiglitazone counteracts palmitate-induced beta-cell dysfunction by suppression of MAP kinase, inducible nitric oxide synthase and caspase 3 activities. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 2256-65.
35. Wu J, Wu JJ, Yang LJ, Wei LX, Zou DJ. Rosiglitazone protects against palmitate-induced pancreatic beta-cell death by activation of autophagy via 5'-AMP-activated protein kinase modulation. Endocrine 2013; 44: 87-98.
36. Meshkani R, Sadeghi A, Taheripak G, Zarghooni M, Gerayesh-Nejad S, Bakhtiyari S. Rosiglitazone, a PPARγ agonist, ameliorates palmitate-induced insulin resistance and apoptosis in skeletal muscle cells. Cell Biochem Funct 2014; 32: 683-91.
37. Wang AP, Li X, Zheng Y, Liu BL, Huang G, Yan X, et al. Thiazolidinediones protect mouse pancreatic beta-cells directly from cytokine-induced cytotoxicity through PPAR gamma-dependent mechanisms. Acta Diabetol 2013; 50: 163-73.
38. Abaraviciene SM, Lundquist I, Salehi A. Rosiglitazone counteracts palmitate-induced β-cell dysfunction by suppression of MAP kinase, inducible nitric oxide synthase and caspase 3 activities. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 2256-65.
39. Liu Y, Zhao B, Mao G, Fang X, Liu Y, huang Y, et al. Epigallocatechin-3-O-gallate, a green tea polyphenol, induces expression of pim-1 kinase via PPARγ in human vascular endothelial cells. Cardiovasc Toxicol 2013; 13: 391-5.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

40. Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomediocal perspectives. Phytochemistry 2006; 67: 1849-55.
41. Ueda M, Nishiumi S, Nagayasu H, Fukuda I, Yoshida K, Ashida H. Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 2008; 377: 286-90.
42. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. Mol Nutr Food Res 2006; 50: 176-87.
43. Sae-Tan S, Grove KA, Kennett MJ, Lambert JD. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the expression of genes related to fat oxidation in the skeletal muscle of high fat-fed mice. Food Funct 2011; 2: 111-6.
44. Timmers S, Schrauwen P, de Vogel J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. Physiol Behav 2008; 94: 242-51.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

Original Article

Investigating the Effects of Rosiglitazone and Epigallocatechin-3-Gallate on PGC-1α protein expression in Palmitate-induced Insulin Resistant C2C12 skeletal Muscle Cells

Bakhtiyari S[1], Babakhani A[2], Haghani K[1]

[1]Department of Biochemistry, School of Medicine, & [2]Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, I.R. Iran

e-mail: sobhe14@yahoo.com

Received: 27/09/2014 **Accepted**: 04/02/2015

Abstract

Introduction: Alterations in lipids metabolism are one of the important mechanisms for the treatment of insulin resistance and, hence for type 2 diabetes. On the other hand, PGC-1α, as a key regulator of mitochondrial biogenesis and function, by increasing β-oxidation of lipids plays an important role in improving insulin sensitivity. In the present study, the effects of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), an anti-obesity and enhancer of lipid catabolism agent, on PGC-1α protein expression was examined and compared with the anti-diabetic drug Rosiglitazone (RGZ). Materials and Methods: After differentiation of C2C12 myoblasts to myotubes, insulin resistance was induced by palmitate treatment. Afterward, PGC-1α protein expression was examined using the western blot method before and after treatment with insulin and after EGCG and RGZ treatment. Results: Palmitate treatment significantly decreased PGC-1 α protein expression in the C2C12 cells (P=0.001). Treatment of these cells with EGCG had no significant effect on the PGC-1α protein expression (P=0.67), whereas treatment with RGZ significantly increased expression of this gene at protein level (P=0.003). In addition, this significant increase in PGC-1α protein expression was maintained by simultaneous treatment with EGCG and RGZ (P=0.001). Conclusion: Our results showed that the effect of EGCG on PGC-1α protein expression was not significant, whereas RGZ significantly improved the palmitate-induced reduction of PGC-1α protein expression. Overall, it seems that anti-diabetic effect of EGCG is not exerted through its effect on the expression of PGC-1α gene, in contrast to that of RGZ.

Keywords: Insulin resistance, C2C12 muscle cells, PGC-1α gene, Rosiglitazone, Epigallocatechin-3-Gallate

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]