

ارزیابی اثرات کاهش بیان ژن $TNF-\alpha$ بر مقاومت به انسولین القاء شده با پالمیتات در سلول‌های عضلانی C2C12

سمیه پاشایی^۱، دکتر سالار بختیاری^۲، دکتر کریمه حقانی^۳، فرج اله ملکی^۴

(۱) گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم تحقیقات فارس، شیراز، (۲) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، (۳) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده‌ی پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، دکتر سالار بختیاری؛
e-mail: bakhtiyari-s@medilam.ac.ir

چکیده

مقدمه: مقاومت به انسولین نقص اصلی در دیابت نوع ۲ و چاقی می‌باشد. طی این اختلال تجمع لیپید همراه با افزایش بیان $TNF-\alpha$ در عضله رخ می‌دهد. هدف پژوهش حاضر ارزیابی اثرات کاهش بیان $TNF-\alpha$ بر مولکول‌های کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین ($IRS-1$ و Akt) و مقاومت به انسولین در رده‌ی سلول‌های عضلانی C2C12 در حضور و عدم حضور پالمیتات بود. **مواد و روش‌ها:** برای کاهش بیان $TNF-\alpha$ ، سلول‌های C2C12 با shRNA حاوی توالی آنتی‌سنس ژن $TNF-\alpha$ موشی ترانسفکت شدند. سپس، میزان بیان $TNF-\alpha$ ، هم‌چنین فسفریلاسیون و بیان پروتئین‌های $IRS-1$ و Akt با استفاده از آزمون وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها: در سلول‌های کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ ، میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ ۵۸٪ کاهش یافت. در شرایط تیمار با پالمیتات ۵/۰ میلی‌مولار و انسولین ۱۰۰ نانومولار، فسفریلاسیون-های تحریک شده با انسولین مولکول‌های $IRS-1$ (Tyr632) و Akt (Ser473) در سلول‌های کاهش بیان یافته نسبت به سلول‌های کنترل، به ترتیب ۱/۷ و ۲/۶ بود. نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد کاهش بیان $TNF-\alpha$ می‌تواند فعالیت عناصر کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین ($IRS-1$ و Akt) را افزایش داده و در نتیجه‌ی بهبود مقاومت به انسولین در میوتیوب‌ها را سبب گردد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند $TNF-\alpha$ می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در درمان مقاومت به انسولین القا شده با اسید چرب که در دیابت نوع ۲ و سندروم متابولیک مشاهده می‌شود، مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور-آلفا ($TNF-\alpha$)، RNA سنجاق سری کوچک (shRNA)،

مقاومت به انسولین، کاهش بیان، پالمیتات

دریافت مقاله: ۹۲/۱/۱۷ - دریافت اصلاحیه: ۹۲/۲/۲۱ - پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۲۸

مقدمه

مقاومت به انسولین ماهیچه‌ی اسکلتی یک فاکتور کلیدی در پیشرفت دیابت نوع ۲ می‌باشد. اگرچه سازوکار دقیق آن در انسان به طور کامل مشخص نیست، ولی طی چندین دهه‌ی گذشته تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای به منظور درک سازوکار این اختلال صورت گرفته است.^{۱،۲} از آنجا که عضله مسئول برداشت به طور تقریبی ۷۵٪ گلوکز بدن است،

شناسایی علت ایجاد مقاومت به انسولین در این بافت دارای اهمیت باشد.^{۳-۵} در حالت مقاومت به انسولین، به علت عدم حساسیت سلول‌های چربی به انسولین، غلظت اسیدهای چرب آزاد در پلاسما افزایش می‌یابد که ویژگی دیابت نوع ۲ است؛ این موضوع مویّد توسعه‌ی مقاومت به انسولین و نقص در عملکرد سلول‌های بتا می‌باشد.^{۶-۹} پالمیتات فراوان‌ترین اسید چرب آزاد پلاسما است و به طور معمول در پژوهش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.^۴

محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBSⁱ 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 می‌شد. بعد از این زمان میوتیوب‌ها تشکیل شدند.

برای وارد کردن پلاسمید حاوی shRNA علیه ژن TNF- α به درون میوبلاست‌های C2C12، از روش کلسیم فسفات استفاده شد.^{۲۹،۳۰} به طور خلاصه، تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت داده شد. روز بعد ترانسفکشن با غلظت ۱۵ میکروگرم از پلاسمید انجام شد. برای بررسی کارآمدی روش ترانسفکشن در یکی از چاهک‌ها از پلاسمید GFPⁱⁱ استفاده گردید و ۴۸ ساعت بعد با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد.

برای تایید کاهش بیان TNF- α از روش وسترن بلات استفاده شد. به این منظور ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، عصاره‌ی پروتئینی سلول‌های C2C12 از راه هم‌ورژن کردن آن‌ها در بافر RIPA (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱٪ تریتون X-100، ۲٪ سدیم داکسی کولات، ۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۱ میلی‌مولار PMSF) استخراج شده و غلظت آن بر اساس روش برادفورد اندازه‌گیری شد. ۳۰-۲۰ میکروگرم از عصاره‌ی پروتئینی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس سلول‌ها از ژل به غشا نیتروسلولز منتقل شده و سپس به مدت ۱ شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول ۲٪ BSA انکوبه گردید. در مرحله‌ی بعد، غشا با آنتی‌بادی اولیه علیه TNF- α یا β -actin به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. پس از ۴ بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای بافر TBST، غشا به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP انکوبه گردید. ۴ 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 تثبیت ظاهر گردید. فیلم اسکن شده و به طور نیمه کمی غلظت پروتئین با نرم‌افزار Scion Image مورد تجزیه و تحلیل قرار

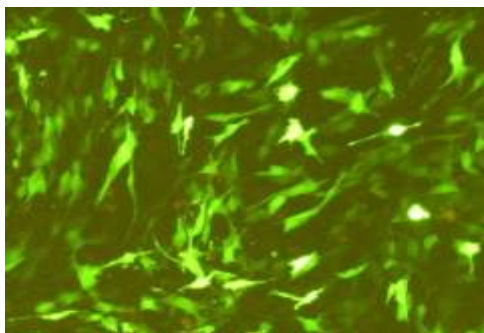
بررسی‌های *in vivo* و *in vitro* نشان داده پالمیتات سبب ایجاد مقاومت به انسولین در بافت‌های هدف انسولین می‌گردد.^{۱۰،۱۱} افزایش غلظت پالمیتات می‌تواند مسیر پیام‌رسانی انسولین را توسط فسفوریلاسیون سوبسترا گیرنده‌ی انسولین-۱ (IRS-1)، گیرنده‌ی انسولین (IR) و فعالیت پروتئین کیناز B مهار کند،^{۱۱-۱۴} و یا این که سبب القا بیان سیتوکین‌های التهابی نظیر فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور-آلفا (TNF- α) گردد.^{۱۵} اگرچه سازوکار دقیق این وقایع مشخص نمی‌باشد، ولی شواهد نشان می‌دهد افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد می‌تواند سبب تجمع فراورده‌های متابولیکی به دست آمده از اسیدهای چرب آزاد، کاهش پیام‌رسانی سلولی و در نتیجه ایجاد مقاومت به انسولین گردد.^{۱۶-۱۹} به علاوه، در چاقی ترشح پروتئین‌هایی تحت عنوان آدیپوکین از بافت چربی افزایش یافته که می‌تواند سبب اختلال در مسیر پیام‌رسانی انسولین و روندهای واسطه شونده توسط انسولین نظیر هموستاز گلوکز و سوخت و ساز لیپید گردد.^{۲۰،۲۱} از بین این پروتئین‌ها، TNF- α به عنوان رابطی بین چاقی و مقاومت به انسولین پیشنهاد شده^{۲۱} و می‌تواند مقاومت به انسولین را در حیوانات چاق و ساطت نماید.^{۲۲،۲۳} هم‌چنین، تیمار سلول‌های کبدی کشت داده شده با این فاکتور می‌تواند سبب ایجاد مقاومت به انسولین شود که ممکن است به واسطه‌ی مهار پیام‌رسانی انسولین صورت پذیرد.^{۲۴،۲۵} در چندین پژوهش نشان داده شده اسیدهای چرب اشباع، به ویژه پالمیتات، بیان TNF- α را در سلول‌های عضلانی افزایش می‌دهد.^{۲۶-۲۸} به هر حال، سازوکار مولکولی که به وسیله‌ی آن TNF- α سبب اختلال در مسیر پیام‌رسانی انسولین شده و این که نقش این فاکتور در مقاومت به انسولین القاء شونده توسط پالمیتات چیست به طور کامل شناسایی نشده است. بنابراین، هدف پژوهش حاضر ارزیابی اثرات کاهش بیان TNF- α بر میزان فسفوریلاسیون‌های مفید عناصر کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین (IRS-1 و Akt) در سلول‌های عضلانی C2C12 در حضور و عدم حضور پالمیتات بود.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام کشت سلولی میوبلاست‌های C2C12 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیدند. این سلول‌ها در

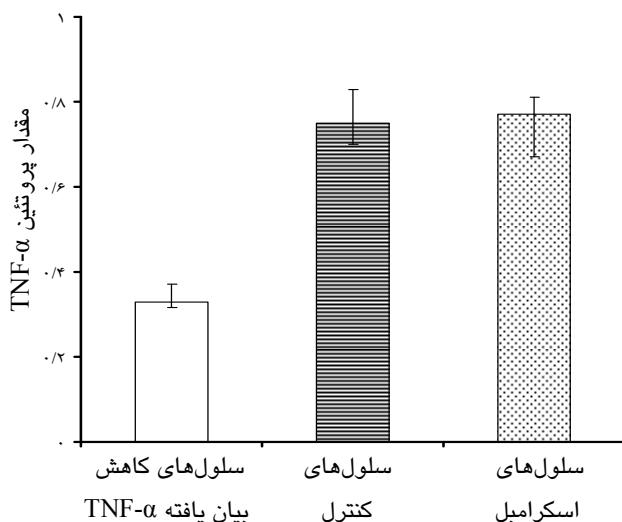
i- Fetal bovine serum

ii - Green fluorescent protein



شکل ۱- سلول‌های C2C12 ترانسفکت شده با پلاسمید GFP. سلول‌هایی که این پلاسمید را دریافت نموده‌اند به رنگ سبز دیده می‌شوند.

به منظور تاکید کاهش بیان ژن $TNF-\alpha$ آزمون وسترن بلات انجام شد. یافته‌های به دست آمده از وسترن بلات برای سه دسته از کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای حاوی shRNA علیه $TNF-\alpha$)، سلول‌های کنترل (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای فاقد shRNA) و سلول‌های Scramble (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی shRNA ای که با هیچ‌کدام از mRNAهای داخل سلولی تداخل نمی‌کند) نشان داد میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در سلول‌های کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ نسبت به دو دسته دیگر حدود ۵۸٪ کاهش یافته و این میزان کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) بود (شکل ۲).



شکل ۲- میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ در سلول‌های C2C12 به دنبال ترانسفکشن پلاسمیدهای (۱) shRNA $TNF-\alpha$ ، (۲) پلاسمیدهای فاقد $TNF-\alpha$ shRNA، (۳) پلاسمیدهای Nonsense shRNA (اسکرامبل) با استفاده از روش کلسیم فسفات. سلول‌های C2C12 با ۲۰ میکروگرم از پلاسمیدهای (۱-۳) ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد، برای $TNF-\alpha$ و β -Actin (کنترل داخلی) وسترن بلات انجام شد. مقدار بیان پروتئین $TNF-\alpha$ با

گرفت. سپس با تقسیم دانسیته‌ی باند $TNF-\alpha$ به دانسیته‌ی باند β -actin متناظرش، مقدار بیان ژن مدنظر نرمالیزه شد. تمام آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده مونوکلونال بوده و تنها با پروتئین مربوطه‌ی موشی واکنش دادند و هیچگونه واکنش متقاطع‌ی با پروتئین‌های مشابه نداشتند. هر آزمایش کمینه سه بار انجام شد. به علاوه، به منظور ارزیابی اثر پالمیتات بر مسیر پیام‌رسانی انسولین سلول‌ها با پالمیتات تیمار شدند و میزان فسفوریلاسیون دو مولکول کلیدی این مسیر، یعنی تیروزین ۶۳۲ مولکول IRS-1 و سرین ۴۷۳ مولکول Akt از راه آزمایش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای این که پالمیتات بتواند در دسترس سلول قرار گیرد با BSA فاقد اسید چرب کونژوگ گردید. به این منظور، غلظت‌های مورد نظر از سدیم پالمیتات در اتانول ۵۰٪ حل شده و این محلول به DMEM حاوی ۱٪ BSA اضافه شد. سپس این محیط به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد روی شیکر (Shaker) انکوبه گردید. پس از ۲ ساعت، این محیط فیلتر شد و در اختیار میوتوب‌های C2C12 قرار گرفت.

تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS13 انجام شد. هر آزمایش کمینه سه بار تکرار گردید. مقایسه بین تمام گروه‌ها با استفاده از آزمون ANOVA انجام شد. اگر تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشت، آزمون تی مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

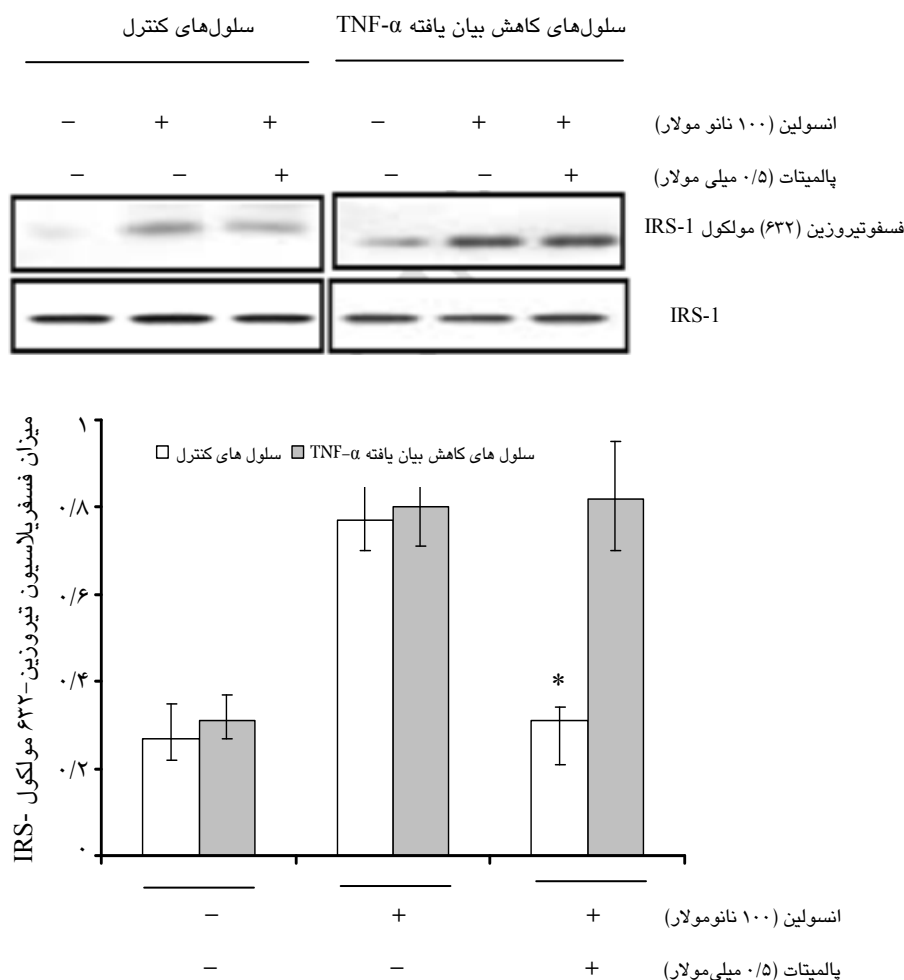
یافته‌ها

همان‌گونه که در بخش روش‌ها آورده شده به منظور بررسی کارایی ترانسفکشن به روش کلسیم فسفات، سلول‌های C2C12 با پلاسمیدهای GFP ترانسفکت شدند. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده، بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت اینورت نشان داد که این روش، یک روش کارآمد برای ترانسفکشن می‌باشد.

استفاده از مقدار پروتئین β -Actin نرمالایز گردید. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند * $P < 0.05$.

همان‌طور که در قسمت روش‌ها آورده شده به منظور بررسی مولکول‌های کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین آزمون وسترن بلات انجام شد. یافته‌های به دست آمده از آزمون وسترن بلات نشان داد تیمار با پالمیتات ۰/۵ میلی مولار

میزان فسفریلاسیون تیروزین ۶۳۲ مولکول IRS-1 را هم در سلول‌های کاهش بیان یافته $\text{TNF-}\alpha$ و هم در سلول‌های طبیعی کاهش می‌دهد. با این وجود، میزان این فسفریلاسیون در حضور پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار در سلول‌های کاهش بیان یافته $\text{TNF-}\alpha$ به طور تقریبی ۱/۷ برابر ($P < 0.05$) سلول‌های کنترل می‌باشد (شکل ۳).



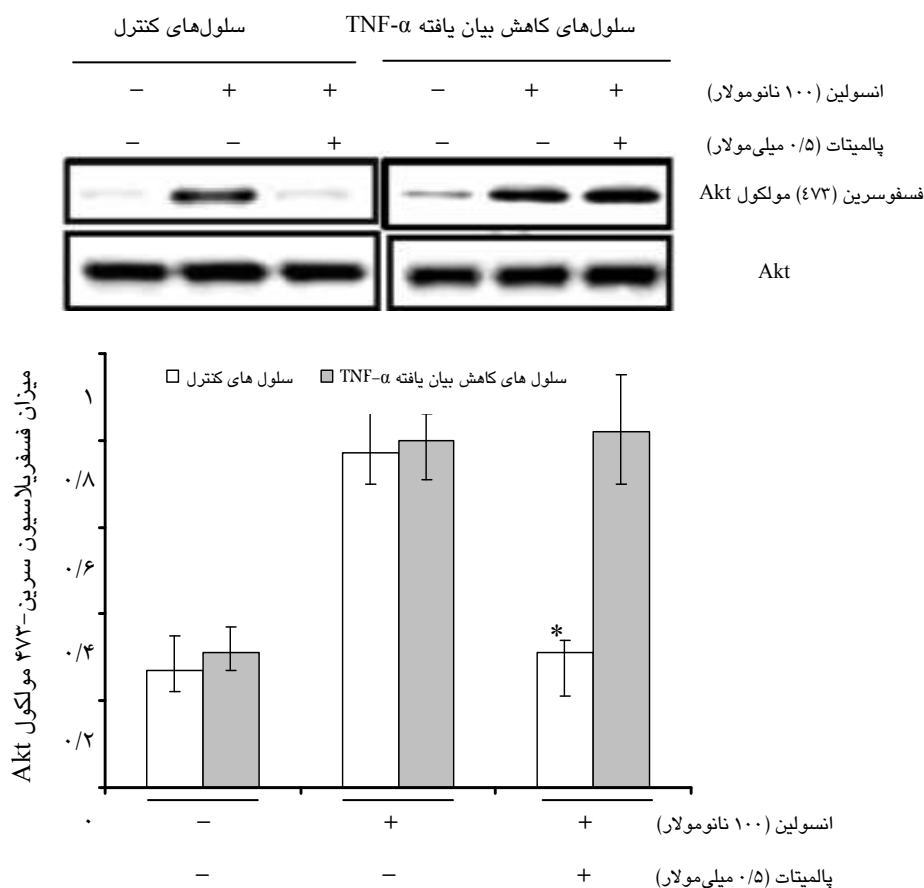
شکل ۳- اثر پالمیتات روی میزان بیان پروتئین IRS و فسفریلاسیون تیروزین ۶۳۲ مولکول IRS-1 در سلول‌های C2C12 کاهش بیان یافته $\text{TNF-}\alpha$ و سلول‌های طبیعی. سلول‌ها با پالمیتات تیمار شده و قبل از جمع‌آوری در حضور و عدم حضور انسولین (Ins) انکوبه گردیدند. آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه فسفوتیروزین ۶۳۲ مولکول IRS-1 و IRS-1 (کنترل داخلی) انجام شد. میزان فسفریلاسیون تیروزین ۶۳۲ مولکول IRS-1 با میزان بیان پروتئین IRS-1 متناظرش نرمالایز گردید. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند * $P < 0.05$.

مولکول Akt را هم در سلول‌های کاهش بیان یافته $\text{TNF-}\alpha$ و هم در سلول‌های طبیعی کاهش می‌دهد. با این وجود، میزان این فسفریلاسیون در حضور پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار در

یافته‌های به دست آمده از آزمون وسترن بلات برای فسفریلاسیون سرین ۴۷۳ مولکول Akt نشان داد تیمار با پالمیتات ۰/۵ میلی‌مولار میزان فسفریلاسیون سرین ۴۷۳

حضور پالمیتات وجود نداشت ($P < 0.05$). در مجموع کاهش بیان $TNF-\alpha$ در میوتیوب‌های C2C12، فعالیت عناصر کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین را حتی در حضور پالمیتات حفظ می‌نماید.

سلول‌های کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ به طور تقریبی ۲/۶ برابر ($P < 0.05$) سلول‌های طبیعی می‌باشد (شکل ۴). در ضمن، تفاوت معنی‌داری بین میزان فسفریلاسیون IRS-1 و Akt در سلول‌های کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ و سلول‌های طبیعی، در



شکل ۴- اثر پالمیتات روی میزان بیان پروتئین Akt و فسفریلاسیون سرین ۴۷۳ مولکول Akt در سلول‌های C2C12 کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ و سلول‌های کنترل. میوتوب‌ها با پالمیتات تیمار شده و قبل از جمع‌آوری در حضور و عدم حضور انسولین (Ins) انکوبه گردیدند. آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه فسفوسرین ۴۷۳ مولکول Akt و Akt (کنترل داخلی) انجام شد. میزان فسفریلاسیون سرین ۴۷۳ مولکول Akt با میزان بیان پروتئین Akt متناظرش نرمالیز گردید. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند * $P < 0.05$.

بحث

دیابت نوع ۲ موثر می‌باشد. چاقی یک عامل مهم برای افزایش مقاومت به انسولین و سندرم متابولیکی بوده و در بیشتر افراد با دیابت نوع ۲ دیده می‌شود. در حالت مقاومت به انسولین با وجود طبیعی بودن انسولین خون، انسولین قادر به انجام عمل بیولوژی خود نبوده که منجر به تغییر هموستاز گلوکز و سوخت و ساز لیپید می‌گردد. ۲۲، ۲۱، ۲۰-۲۸

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند فاکتورهای ژنتیکی و محیطی با مقاومت به انسولین مرتبط می‌باشند. در همین ارتباط، نقش ژن‌های مختلفی در مقاومت به انسولین مورد

دیابت نوع ۲ یک بیماری مزمن است که با تغییراتی در ترشح و عملکرد انسولین مشخص می‌گردد، این تغییرات منجر به بالا رفتن قند خون می‌گردد. به طور تقریبی مشخص نیست کدامیک از این دو نقش ارجحی در این فرآیند دارند. با این وجود برخی از شواهد و پژوهش‌ها بر نقش مهم‌تر مقاومت به انسولین تاکید دارند و چنین به نظر می‌رسد که شناسایی افراد با مقاومت به انسولین در پیشگیری و تاخیر

عضله نشان می‌دهد. جالب آن که نشان داده شده اسید چرب پالمیتات میزان بیان $TNF-\alpha$ را در سلول‌های عضلانی C2C12 افزایش می‌دهد.^{۴۳} به این منظور و برای بررسی دقیق‌تر نقش $TNF-\alpha$ در مقاومت به انسولین القا شده توسط پالمیتات، در پژوهش حاضر بیان ژن $TNF-\alpha$ با استفاده از shRNA در سلول‌های عضلانی C2C12 کاهش داده شده، و اثر این کاهش بر میزان فعالیت مولکول‌های کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین یعنی IRS-1 و Akt بررسی گردید. همان‌طور که انتظار می‌رود، انسولین فسفریلاسیون‌های مفید IRS-1 و Akt را در سلول‌های کاهش بیان یافته $TNF-\alpha$ و سلول‌های کنترل C2C12 تحریک می‌نماید. فسفریلاسیون تیروزین مولکول IRS-1 به طور غیرمستقیم با فعال نمودن PI-3K منجر به فعال شدن Akt می‌گردد. فسفریلاسیون سرین ۴۷۳ مولکول Akt نیز در سازوکار گلوکز القا شده با انسولین در کبد و عضله اهمیت دارد.^{۴۴،۴۵} یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد کاهش بیان $TNF-\alpha$ با اثر گذاری بر فسفریلاسیون‌های مفید IRS-1 و Akt سبب حفظ مسیر پیام‌رسانی انسولین و به احتمال زیاد بهبود حساسیت به انسولین می‌گردد که حتی در حضور پالمیتات نیز این اثر حفظ می‌گردد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد پالمیتات می‌تواند از راه کاهش فعالیت مولکول‌های کلیدی مسیر پیام‌رسانی انسولین یعنی IRS-1 و Akt سبب مختل شدن مسیر پیام‌رسانی انسولین گردد. همچنین، کاهش بیان $TNF-\alpha$ می‌تواند سبب حفظ مسیر پیام‌رسانی انسولین حتی در حضور پالمیتات شود. مجموعه‌ی این یافته‌ها $TNF-\alpha$ را به عنوان یک کاندیدای مناسب درمانی برای درمان بیماران مبتلا به مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲، چاقی، اختلالات لیپید خون و سندروم متابولیک مطرح می‌سازد.

بررسی قرار گرفته که $TNF-\alpha$ یکی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که $TNF-\alpha$ سبب اختلال در مسیر پیام‌رسانی انسولین از راه کاهش فعالیت کینازی گیرنده‌ی انسولین و یا افزایش فسفریلاسیون سرین در IRS-1 می‌گردد. در موش‌های چاق استفاده از مهارکننده-های $TNF-\alpha$ ، مانند پنتوکسی فیلین منجر به طبیعی نمودن بیان آن در بافت چربی و بهبود مقاومت به انسولین می‌گردد.^{۳۳-۳۶} همچنین، در موش‌های چاق، فقدان $TNF-\alpha$ منجر به کاهش سطح اسیدهای چرب آزاد شده و از اختلال در مسیر پیام‌رسانی انسولین در دو بافت چربی و عضله جلوگیری می‌کند.^{۳۷} به علاوه، مشاهده شده بیان $TNF-\alpha$ بافت چربی در افراد چاق و مقاوم به انسولین به طور غیرطبیعی افزایش می‌یابد.^{۳۸} پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند افزایش غلظت پلاسمایی اسید چرب پالمیتات (فراوان‌ترین اسید چرب اشباع موجود در پلاسما) منجر به ایجاد مقاومت به انسولین در بافت‌های هدف انسولین می‌گردد،^{۳۹-۴۲} با این وجود فرایند این سازوکار به طور دقیق شناسایی نشده است. بررسی‌های In vivo زیادی به منظور نشان دادن اثر حذف $TNF-\alpha$ بر پیام‌رسانی انسولین و مقاومت به انسولین القا شده با رژیم غذایی پرچرب صورت گرفته، با این حال اثر مستقیم $TNF-\alpha$ بر تنظیم منفی پیام‌رسانی انسولین در حضور و عدم حضور یک اسید چرب (پالمیتات) کمتر شناخته شده است. در پژوهشی که توسط Uysal و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد عدم بیان $TNF-\alpha$ در In vivo از توسعه‌ی مقاومت به انسولین با وجود رژیم غذایی پرچرب جلوگیری می‌نماید.^{۴۴} در حالی که یافته‌های پژوهش حاضر روی رده‌ی سلولی عضلانی C2C12، شواهد بیشتری را در مورد اثر کاهش بیان پروتئین $TNF-\alpha$ بر مقاومت به انسولین القا شده با پالمیتات را در

References

1. Boden G, Chen X, Ruis J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994; 93: 2438-46.
2. Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J* 1964; 93: 652-65.
3. 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.
4. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 1981; 30: 1000-7.
5. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 1990; 322: 223-8.
6. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44: 863-70.
7. Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake

- in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 17-21.
8. Reaven GM, Hollenbeck CB, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1020-4.
 9. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1213-7.
 10. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 101-9.
 11. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation sufficient to account for the inhibition of the insulin stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 1999; 274: 24202-10.
 12. Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem* 1999; 266: 17-25.
 13. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 10297-303.
 14. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signalling and ceramide and diacylglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 101-9.
 15. Weigert C, Brodbeck K, Staiger H, Kausch C, Machicao F, Häring HU, et al. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 2004; 279: 23942-52.
 16. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277: 50230-6.
 17. Razak F, Anand SS. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. *N Engl J Med* 2004; 350: 664-71. *Vasc Med* 2004; 9: 223-4.
 18. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambd) activities. *Diabetes* 2001; 50: 1901-10.
 19. Kim YB, Shulman GI, Kahn BB. Fatty acid infusion selectively impairs insulin action on Akt1 and protein kinase C lambda/zeta but not on glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2002; 277: 32915-22.
 20. Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner VH, Brunnberg M, Perbeck L, et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 1085-91.
 21. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. 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.
 22. Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF- α . *Endocrinology* 1998; 139: 4928-35.
 23. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
 24. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-8.
 25. Inadera H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *Int J Med Sci* 2008; 5: 248-62.
 26. Haversen L, Danielsson KN, Fogelstrand L, Wiklund O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis* 2009; 202: 382-93.
 27. Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNF- α expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2005; 135: 1841-6.
 28. Jove M, Planavila A, Sánchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Palmitate induces tumor necrosis factor- α expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation. *Endocrinology* 2006; 147: 552-61.
 29. Bakhtiyari S, Meshkani R, Taghikhani M, Larijani B, Adeli K. Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) knockdown improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Lipids* 2010; 45: 237-44.
 30. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-52.
 31. Kahn SE. Beta cell failure: causes and consequences. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; 123: 13-8.
 32. Morley JE. Diabetes and aging: epidemiologic overview. *Clin Geriatr Med* 2008; 24: 395-405.
 33. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4854-8.
 34. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 1994; 94: 1543-9.
 35. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997; 272: 971-6.
 36. Nisoli E, Briscini L, Giordano A, Tonello C, Wiesbrock SM, Uysal KT, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8033-8.
 37. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance

- in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-4.
38. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-15.
39. Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem* 1999; 266: 17-25.
40. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 10297-303.
41. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 1999; 274: 24202-10.
42. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signalling and ceramide and diacylglyceride accumulation 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 101-9.
43. Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 2007; 86: 94-104.
44. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 165-9.
45. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: 413-22.

Original Article

Investigating the Effects of TNF- α knockdown Gene on Insulin Resistance in C2C12 Muscle Cells in the Presence and Absence of Palmitate

Pashaei S¹, Bakhtiyari S², Haghani K², Maleki F³

¹Department of Biochemistry, Fars Science and Technology Branch, Islamic Azad University, Shiraz, ²Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam ³Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Paramedicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, I.R. Iran

e-mail: bakhtiyari-s@medilam.ac.ir

Received: 06/04/2013 Accepted: 18/05/2013

Abstract

Introduction: Insulin resistance plays a major role in type 2 diabetes and obesity. In this disorder, lipid accumulation is accompanied by increased TNF- α expression in the muscle. The aims of this study were to evaluate the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene knockdown on key elements of insulin signaling pathway (IRS-1 and Akt) and insulin resistance in C2C12 muscle cells in the presence and absence of palmitate. **Materials and Methods:** To knockdown protein expression of TNF- α , the C2C12 cells were transfected with the shRNA containing antisense sequence of murine TNF- α gene. The analysis of TNF- α protein expression and phosphorylation and protein levels of IRS-1 and Akt were subsequently detected by western blot. **Results:** In TNF- α knockdown cells, the protein expression level of TNF- α was reduced by 58%. Under treatment with palmitate, insulin stimulated phosphorylation of IRS-1 (Tyr632) and Akt (Ser473) in knockdown cells was increased 1.7 and 2.6 fold, respectively, compared to the controls. **Conclusions:** Our findings showed that decreasing the TNF- α protein level can enhance the activity of the important elements of insulin signaling pathway (IRS-1 and Akt), leading to the improvement of insulin resistance in myotubes, data suggesting that TNF- α may potentially be a therapeutic target for fatty acid induced insulin resistance observed in type 2 diabetes and metabolic syndrome.

Keywords: Tumor necrosis factor- α , Short hairpin RNA interference, Insulin resistance, Knockdown, Palmitate