تأثیر تزریق مرکزی Oxyntomodulin برگیرنده های GLP-1R درتنه مغز مرغان گوشتی

علی غضنفری مقدم[1،3،4]، محمد مهدی یعقوبی[3] ، حسین جنیدی[2] ، مهدی عباس نژاد[4] ، مسعود ترکزاده[3] و حوری سپهری[1]

[1] دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی، گروه فیزیولوژی

[2] کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

[3] کرمان، مرکز بین المللی علوم وتکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

[4] کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: 87/1/29 تاریخ پذیرش: 87/7/20

چکیده

GLP-1 یا پپتید شبه گلوکاگن -1 و oxyntomodulin هورمونهایی قوی هستند که از دستگاه گوارش ترشح شده و دارای اثرات مهمی در بافتهای محیطی و سیستم عصبی مرکزی بویژه در تنظیم اشتها می‌باشند. فیبرها و پایانه‌های عصبی حاوی گیرنده GLP-1 به میزان وسیعی در مغز توزیع شده‌اند و بخصوص تراکم بالائی در هیپوتالاموس، تالاموس و مناطق سپتال مغزی دارند. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تزریق مرکزی Oxyntomodulin بر بیان گیرنده Glp-1 در تنه مغز مرغان گوشتی به روش RT-PCR می‌باشد . نتایج حاصل نشان داد که در زمانهای 30 و 90 دقیقه پس از تزریق OXM بیان ژن-GLP 1R کاهش پیدا می‌کند. این یافته‌ها حاکی از وجود اثر تنظیمی منفی OXM بر بیان GLP-1R در تنه مغز مرغان گوشتی می‌باشد.

واژه های کلیدی: oxyntomodulin,GLP-1R؛ تنه مغز ؛ مرغ گوشتی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 03426226611، پست الکترونیک:yaghoobim@icst.ac.ir

مقدمه

پپتید شبه گلوکاگن-1(GLP-1) (Glucagon like peptide1) یکی از پپتیدهای کاهش‌دهنده اشتها در مغز پستانداران است (16). این پپتید به همراه Oxyntomodulin(OXM) محصولات نهایی پری‌پرو گلوکاگن است(2). تزریق داخل بطن جانبی مغز (ICV), GLP-1 (Interacerebroventricular) در جوجه‌های مرغ باعث مهار رفتارهای تغذیه‌ای جوجه‌ها شده می‌شود (6). مطالعات نشان داده که GLP-1 و یا آنالوگهای کاهش‌دهنده اشتها در میان پستانداران و پرندگان هستند (7، 10، 13 و 14). کشف نورونهای حاوی GLP-1 در مغز جوجه مرغها به اهمیت فیزیولوژیکی این پپتید افزوده است (3 و 8).

مطالعات زیادی در مورد انتشار GLP-1 در مغز پستانداران صورت گرفته است. رونوشت پروگلوکاگن(که پیش‌ساز گلوکاگن است)، گلیسنتین، OXM ،GLP-2 ،GLP-1 و رونوشت گیرنده‌های آنها در نواحی مغزی کنترل کننده تغذیه از جمله هسته‌های هیپوتالاموسی موش و هسته منفرد (Nucleus of the solitary tract)(NTS) مشاهده

شده اند (8، 11، 12 و 15). از آنجا که اکثر نقاط عصبی درگیر در تنظیم اشتها در پرندگان در ساقه مغز قرار دارد (10)، بررسیها نشان داده که در این نواحی مغزی پرندگان نیز GLP-1 وجود دارد (15).

OXM یکی از مهار کننده های تغذیه و یکی از آگونیست های GLP-1 است (1 و 2) که می تواند بر روی گیرنده-های GLP-1R اثر گذاشته و باعث کم و زیاد شدن آنها در هسته‌های هیپوتالاموسی گردد (6 و 15). علی رغم مطالعات زیاد هنوز نحوه کنترل اشتها در هسته های هیپوتالاموسی توسط پپتید OXM معلوم نیست. هدف از این مطالعه تأثیر تزریق مرکزی درون بطن جانبی OXM بر بیان GLP-1R در ساقه مغز جوجه‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر سؤ ال مورد بررسی این بود که آیا بیان GLP-1R در ساقه مغز در حضور OXM تغییر می کند یاخیر؟

مواد و روشها

حیوانات: جوجه های نر یک روزه (نژاد رأس) از شرکت مرغ مادر ماهان کرمان خریداری شده و تحت نور مداوم و در هفته اول در دمای 2±32 ؛ در هفته دوم در دمای 2±28؛ در هفته سوم در دمای 2±24 به صورت گروهی و درهفته چهارم و بعد از آن در دمای 1±22 درجه سانتی گراد و به صورت انفرادی نگهداری شدند(5). پرندگان دسترسی آزاد به یک رژیم غذائی متداول شامل 20 درصد پروتئین و 2864 کیلوکالری برکیلوگرم انرژی (شرکت تعاونی مرغداران کرمان) را داشتند.

مواد: Oxyntomodulin و Angiotensin خریداری شده از شرکت Tocris انگلستان، پنتو باربیتون سدیم (Pentobarbitone Sodium) ساخت کشور بلژیک و داروهای دیازپام، آتروپین، آمپی سیلین 400 میلی گرمی.

تزریق دارو: در ابتدای هفته چهارم تعداد 12 مرغ گوشتی پرورش یافته در شرایط ذکر شده بالا با وزنهای مشابه به قفسهای انفرادی منتقل شده و برای مدت یک هفته آب و غذا به آنها داده شد. در انتهای هفته پس از وزن کشی مجدد و اطمینان از یکسان بودن وزن آنها (750 گرم) به منظور کانول گذاری و تزریق مورد عمل جراحی قرار گرفتند. بدین صورت که ابتدا هر پرنده سه ساعت از خوردن غذا محروم شد و پس از قطع پرهای روی سر آنها با تزریق درون وریدی پنتوباربیتال سدیم (10mg/kg) و دیازپام بیهوش گردیدند (4). پس از اطمینان از بیهوشی سر حیوان در دستگاه استرئوتاکسی ثابت گردید. با استفاده از اطلس استرئوتاکسی و مشخص کردن برکما براساس مختصات 6/7 میلی متر در امتداد خط میانی به طرف جلو برگما و 0/7 میلی متر از خط میانی به طرف سمت راست و عمق 3/7 میلی متر از سطح سخت شامه در داخل مغز کانول گذاری صورت گرفت (9 و 18). برای اطمینان از کانول گذاری پس از سه روز استراحت دادن با تزریق 150 نانوگرم آنژیوتنسین 2 به درون بطن جانبی مغز، آن تعداد از مرغهایی که کانول صحیح کارگذاری شده بود شروع به خوردن مقدار زیادی آب نمودند (4) .

در ابتدای هفته پنجم 10 میکرولیتر محلول نمکی سالین به 6 مرغ گروه کنترل و 10 میکرولیتر Oxyntomodulin با غلظت 4 نانو مول به شش مرغ مورد مطالعه تزریق شد. 30 دقیقه پس از تزریق سه مرغ از گروه کنترل و سه مرغ از گروه مورد مطالعه انتخاب شده و با تزریق وریدی پنتو باربیتال سدیم بیهوش شده و مغز آنها سریعاً برداشته شد. ساقه مغز هرکدام جدا گردید و سریعاً در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس به فریزر 80- درجه سانتی گراد منتقل گردید تا در زمان مناسب RNA آنها استخراج شود. همین کار برروی حیوانات باقیمانده به فاصله 90 دقیقه پس از تزریق تکرار شد.

مراحل بررسی بیان ژن به روش RT-PCR: الف) استخراج RNA: برای استخراج RNA با استفاده از تیغ استریل ساقه مغز با دقت جدا شده و داخل لوله سانتریفوژ قرار داده و با استفاده از محلول RNX ^{PLUS} (شرکت

سیناژن) و با کمک pellet mixer کاملاً له شد. بعد از تجزیه کامل بافت بقیه مراحل طبق دستورالعمل شرکت به پیش رفت. در نهایت RNA کل که شامل rRNA، mRNA، tRNA می باشد به دست آمد. به منظور تعیین کمیت RNA جذب آن را در طول موجهای 260 و 280 نانومتر اندازه گیری و غلظت آن محاسبه شد. در ادامه کیفیت RNA نیز روی ژل آگارز بررسی گردید.

ب) واکنش ساخت cDNA : یک میکروگرم از RNA کل به همراه نیم میکروگرم پرایمر Oligo-dt داخل لوله دیواره نازک ریخته ودر دمای 70 درجه سانتی گراد قرار داده وسریعاً روی یخ منتقل شد. سپس مخلوط نوکلئوتیدها، آنزیم مهار کننده RNase و بافر آنزیم به آن افزوده شده و در نهایت پس از افزودن آنزیم M-MLVRT (Fermentas) به مدت یک ساعت در دمای 42 درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد. در انتها cDNA ساخته شده را برداشته ودر فریزر 20 – درجه سانتی گراد نگهداری گردید. دو لوله کنترل منفی (یکی بدون الگوی RNA) برای شناسایی آلودگی عمومی و دیگری بدون آنزیم MMLV-RT برای شناسایی آلودگی احتمالی با DNA ژنومی در هربار انجام آزمایش نیز گذاشته می‌شد.

ج) واکنش PCR به‌منظور تکثیر cDNA رسپتور Oxyntomodulin (glp1r): 2 میکرولیتر از مخلوط cDNA برای واکنش PCR با آنزیم Tag-polymerase (سیناژن) و پرایمرهای اختصاصی glp1-r (XM_426129) و ژن کنترل داخلی gapdh (NM_204305)(به غلظت 400 نانومول) با شرایط زیر وارد دستگاه ترموسایکلر (MasterCycler®, Eppendorf)شد :

1- واسرشتگی اولیه (جدا سازی دو رشته DNA) در 94 درجه سانتی گراد به مدت 4 دقیقه، واسرشتگی هر چرخه در 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمر به توالی هدف در DNA در 57 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، امتداد وساخت رشته جدید در 72 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه، امتداد نهائی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه. مراحل2-4 به صورت متوالی 35 مرتبه تکرارگردید.

پس از اتمام واکنش PCR محصول از دستگاه بر داشته و به فریزر 20- درجه سانتی گراد منتقل شد و در زمان مناسب در ژل الکتروفورز آگارز 1 درصد تفکیک شده و پس از رنگ آمیزی با EtBr در دستگاه G BOX HR (syngene) عکس برداری شد. دمای بهینه برای هر پرایمر و تعداد سیکل مناسب برای هر محصول PCR در دستگاه ترموسایکلر با شیب دمایی(MasterCylcer® gradient) به دست آمد. توالی پرایمرهای استفاده شده به شرح ذیل می‌باشد.

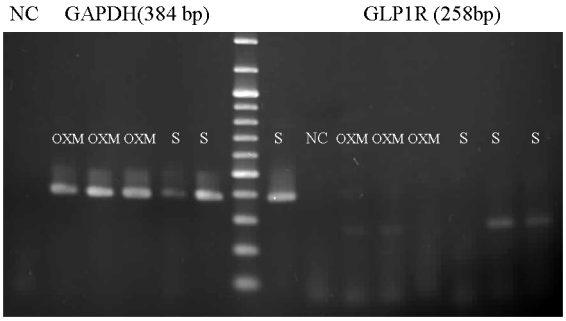
glp1r F: CCCATGAGGTCATCTTTGCC
glp1r R: TGCCTCCACTACTGATGCTG
gapdh F: AGAGGGTAGTGAAGGCTGCT
gapdh R: CAGGCTGAGGAAGAAATTGG

نتایج

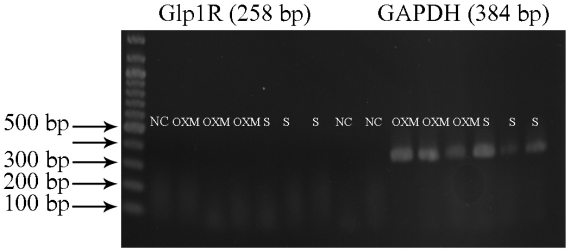
نتایج بررسی بیان ژن glp1r در زمان 30 دقیقه پس از تزریق سالین و OXM نشان می‌دهد که باند مربوط به glp1r در مرغ اول و دوم که سالین تزریق شده است مشاهده می شود، اما در مرغ سوم باند مورد انتظار دیده نمی‌شود (شکل-1). در مورد مرغهایی که به آنها OXM تزریق شده است پس از گذشت 30 دقیقه از تزریق در مرغ اول هیچ باندی وجود ندارد و در مرغ دوم و سوم یک باند ضعیف نسبت به باندهای مربوط به تزریق سالین مشاهده می‌شود. این در حالی است که باند مربوط به ژن کنترل داخلی gapdh با شدت تقریباً یکسانی در هر شش مورد (به جز یکی از موارد تزریق سالین)مشاهده می شود (شکل 1).

در مرغهایی که پس از 90 دقیقه تزریق بررسی بیان ژن صورت گرفت، مشاهده می شود که هیچ باندی برای

glp1r نه در مورد سالین و نه در مورد OXM وجود ندارد(شکل 2). این در حالی است که در هر شش مورد بیان ژن کنترل داخلی gapdh دیده می‌شود (شکل-2). روی هم رفته نتایج نشان می دهد که ژن glp1r 30 دقیقه پس از ترزیق محلول نمکی یا داروی OXM بیان می‌شود، اما بیان آن در حالت تزریق دارو کمتر شده است. 90 دقیقه پس از تزریق (چه دارو و چه محلول نمکی) بیان این ژن در هر دو حالت متوقف می شود.



شکل-1 نتایج سنجش بیان ژن glp-1r به روش RT-PCR در زمان 30 دقیقه پس از تزریق OXM . از راست به چپ: سه نمونه اول باند تکثیر شده ژن Glp-1r را به طول 258 جفت باز در مرغهایی که به آنها محلول سالین تزریق شده است را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است، از سه نمونه در دوتای اول باند مورد نظر دیده می شود، یعنی اینکه ژن بیان شده است. سه نمونه بعدی مربوط به مرغهایی است که به آنها داروی OXM تزریق شده است. از این سه نمونه تنها در دو مورد باند ضعیفی دیده می‌شود. نمونه بعد (NC) کنترل منفی است. شش نمونه پس از آن نیز بیان ژن کنترل داخلی gapdh به طول 384 جفت باز را در سه مرغ تیمار شده با محلول سالین و سه مرغ تیمار شده با OXM نشان می‌دهد. آخرین نمونه نیز کنترل منفی با پرایمرهای کنترل داخلی است.



شکل-2 نتایج سنجش بیان ژن Glp-1r به روش RT-PCR در زمان 30 دقیقه پس از تزریق OXM. در اینجا نیز بیان ژن glp-1r و ژن کنترل داخلی gapdh در نمونه مرغ تیمار شده با محلول سالین و سه مرغ تیمار شده با داروی OXM بررسی شد. همانطور که شکل نشان می‌دهد، بیان کنترل داخلی در هر شش مورد ثابت شده است (از راست به چپ، شش نمونه اول). اما باند glp-1r در هیچ کدام از نمونه‌ها (نه سالین و نه OXM) دیده نمی‌شود. به عبارت دیگر بیان این ژن در این زمان متوقف شده است.

بحث

کنترل اشتها و میزان غذای ورودی یکی از مباحث مورد توجه محققین می باشد. این مسئله از آن جهت مورد اهمیت واقع شده است که چاقی و اضافه وزن یکی از مشکلات جوامع امروزی شده است. اشتها در سطح هسته-های هیپوتالاموس تنظیم می‌شود و هورمونهایی که از دستگاه گوارش ترشح می‌شوند در آن نقش دارند. یکی از این هورمونها Oxyntomodulin است که از پیش ساز اولیه پروگلوکاگن حاصل می‌شود. گیرنده‌هایی که این هورمون و اعضای هم خانواده آن مانند GLP-1 به آن متصل می شوند در نواحی مختلف مغز از جمله هسته های

هیپوتالاموس شناسایی شده‌اند (17). اما هنوز معلوم نیست که برای تنظیم اشتها در سطح مولکولی چه اتفاقی می‌افتد. این پژوهش به دنبال بررسی اثر OXM بر روی بیان گیرنده GLP-1 بوده است. نتایج حاکی از آن است که بیان ژن گیرنده 30 دقیقه پس از تزریق OXM کاهش معنی‌داری را نسبت به تزریق محلول نمکی نشان می‌دهد. از این بابت OXM همانند خیلی از نوروترانسمیترهای دیگر عمل می‌کند. به عبارت دیگر در حضور غلظت بالای لیگاند بیان ژن مربوط به گیرنده‌ها کاهش می‌یابد. بررسی مشابه نشان می دهد که بیان ژن پروگلوکاگن در مرغهایی که 24 ساعت گرسنگی کشیده‌اند نیز کاهش یافته است (15). مطالعات اخیر نیز حاکی از آن است که تزریق درون بطنی OXM به مرغهای منجر به کاهش سطح فاکتور رونویسی c-FOS در هسته‌های region lateralis شده اما در عوض میزان بیان آن در هسته infundibuli hypothalami افزایش یافته است. با توجه به آنکه c-FOS یک فاکتور رونویسی است احتمالاً تأثیر OXM بر روی بیان ژنها از طریق همین فاکتور باشد که این مسئله نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

مقایسه باندها در زمانهای 30 و 90 دقیقه پس از تزریق نشان می دهد که اثر مهاری OXM با افزایش زمان کاملتر شده ؛ به طوری که در زمان 90 دقیقه پس از تزریق هیچ باندی دیده نمی شود .

همچنین مشاهده باند در خصوص بعضی از مرغهای دریافت کننده سالین شاید مربوط به این باشد که هر نوع تزریق حجمی ویا اتساع بطن جانبی مغز می تواند منجر به افزایش OXM داخلی و در نتیجه کاهش بیان glp1r باشد ؛ البته بررسی کامل آن نیازمند پژوهشهای بعدی بوده که در دست انجام است.

منابع

1. Carles BC, Jarrousse C, Niel H, Martinez J, Bataille D 1991 Oxyntomodulin and its (19–37) and (30–37) fragments inhibit histamine-stimulated gastric acid secretion in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 203:245–252.
2. Chaudhri, O., C. Small, and S. Bloom. 2006. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Phil Trans R Soc B*. 361:1187–1209.
3. Cline, M., C. Bowden, W. Nandar, and J. Rogers. 2008. Central oxyntomodulin causes anorexigenic effects associated with the hypothalamus and alimentary canal in chicks (Gallus gallus). *Comp Biochem Physiol A*. 149:405-410.
4. Denbow DM, 1985. Food and water intake response of turkeys to intracerebroventricular injections of angiotensin II. *Poult Sci*, 64(10):1996-2000.
5. Denbow DM, Van Krey HP, 1987. Ionostatic control of food intake in the domestic fowl. *Poult Sci* 66 :1229-1235.
6. Furuse M, Matsumoto R, Mori K, Sugahara K, and Hasegawa S, (1997a) Influence of fasting and neuropeptide Y on the suppressive food intake induced by intracerebroventricular injection of glucagon-like peptide-1 in the neonatal chick, *Brain Res* 764:289–292.
7. Furuse M, Matsumoto R, Okumura J, Sugahara K and Hasegawa S (1997b), Intracerebroventricular injection of mammalian and chicken glucagon-like peptide-1 inhibits food intake of the neonatal chick, *Brain Res* 755 : 167–169.
8. Goke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP 1995 Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci* 7:2294–2300.
9. Kuenzel WJ, Masson M. (1988). A stereotaxic atlas of the brain of the chicks. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
10. Kuenzel WJ, (1994) Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. *J Nutr* 124: 1355S–1370S.
11. Larsen PJ, Tang-Christensen M,. Holst JJ and Orskov C, (1997) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 77: 257–270.

12. Merchenthaler I, Lane M and Shughrue P (1999) Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system, *J Comp Neurol* 403: 261–280.

13. Siegel EG, Gallwitz B, Scharf G, Mentlein R, Morys-Wortmann C, Fölsch UR, Schrezenmeir J, Drescher K, Schmidt WE. (1999) Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications. *Regul Pept* 79:93–102.

14. Siegel EG, Scharf G, Gallwitz B, Mentlein R, Morys-Wortmann C, Fölsch UR, Schmidt WE. (1999) Comparison of the effect of native glucagon-like peptide 1 and dipeptidyl peptidase IV-resistant analogues on insulin release from rat pancreatic islets. *Eur J Clin Invest* 29:610–614.

15. Tachibana T, Hiramatsu K, Furuse M, Hasegawa S, Yoshizawa F and Sugahara K. (2005) Distribution of proglucagon mRNA and GLP-1 in the brainstem of chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 140(2): 203-207.

16. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J and Bloom SR, A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding, *Nature* 379 (1996), pp. 69–72.

17. Uttenthal LO, Toledano A, Blazquez E (1992) Auto radiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1 (7–36) amide in rat brain. *Neuropeptides* 21:143–146.

18. Tienhoven VA, Juhaz LP, (1962). The chicken telencephalon, diencephalons and mesencephlon in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol* 118: 185-197.

Effect of central injection of Oxyntomodulin on GLP-1R expression in the brainstem of chicks

Ghazanfari Moghaddam, A.[1,2,4], Yaghoobi M. M.[4], Jonaidi H.[3], Abbasnejad M.[2], Torkzadeh Mahani M.[4], and Sepehri H.[1]

[1]School of Physiology, University Collage of Sciences, University of Tehran, I.R. of IRAN

[2] Dept of biology, School of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

[3] School of Veterinary, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

[4] Dept. of Biotechnology, Research Institute of Environmental Sciences, International Centre for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

Glucagon-like peptid-1 (GLP-1) and Oxyntomodulin are potent hormone released fro gut and have important actions on peripheral tissues and CNS including appetite control. GLP-1 nerve fibers and terminals are widely distributed throughout the brain, with the highest density occurring in the hypothalamus, thalamus and septal regions. The aim of the present study was to investigate the effect of central oxyntomodulin (OXM) injection on expression of GLP-1R mRNA in the brainstem of chicks. RT-PCR results revealed that expression of GLP-1R mRNA was decreased 30 and 90 min after injection of OXM. The present finding shows a negative regulatory effect of OXM on GLP-1R mRNA expression in the brainstem of chicks.

Keywords: oxyntomodulin, chicks, GLP-1R mRNA, brainstem