

## تعیین اثر اسید الاییدیک بر بیان ژن PPAR $\gamma$ در رده سلولی ماکروفاژی RAW 264.7

### چکیده

حسین منتخب یگانه

حسین بابا احمدی رضایی

محمود دوستی\*

گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۱۷

**زمینه و هدف:** عوامل متعددی در ایجاد بیماری‌های قلبی - عروقی دخیل‌اند، از جمله اسیدهای چرب ترانس، که به‌طور عمده طی فرآیندهای اشیاع‌سازی روغن‌های گیاهی به‌وجود می‌آیند. این فرآیندها موجب تشکیل روغن‌های نیمه‌جامد می‌شود، امروزه مشخص شده است که این ماده غذایی عامل خطر مهمی در بروز و پیشرفت آتروسکلروز است؛ از طرف دیگر مشخص شده است که، تعدادی از گیرنده‌های هسته‌ای از جمله PPARها (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) در هموستاز لیپید و پاتوژنز بیماری‌های قلبی - عروقی دخالت داشته و نقش‌های به‌سزایی ایفا می‌کنند؛ از این رو در این مطالعه تاثیر اسید الاییدیک بر بیان ژن PPAR $\gamma$  مورد بررسی قرار گرفته شد. **روش بررسی:** سلول‌های ماکروفاژی RAW264.7 با غلظت‌های ۰/۵mM، یک و دو اسید الاییدیک به‌مدت شش ساعت تیمار گردیدند. گروه کنترل نیز حاوی اتانول ۵۰٪ (به‌عنوان حلال) معادل مقدار اتانول استفاده شده در غلظت دو میلی‌مولار لحاظ گردید. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA میزان بیان ژن PPAR $\gamma$  با روش Real-Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** اسید الاییدیک بعد از تیمار شش ساعته در هر سه غلظت ۰/۵mM، یک و دو میزان بیان ژن PPAR $\gamma$  را در رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7 در مقایسه با گروه کنترل، به‌ترتیب ۱/۳۶، ۱/۶۸ و ۳/۲۴ برابر کاهش داد (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری:** اسید الاییدیک، از طریق کاهش بیان ژن گیرنده هسته‌ای PPAR $\gamma$  باعث بروز، تشدید و یا تسریع بیماری‌های قلبی و عروقی به‌خصوص آتروسکلروز می‌شود و این یافته اهمیت کاهش مصرف این ماده غذایی را نشان می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** کشت سلول، اسید الاییدیک، آتروسکلروز، بیان ژن، اسید چرب ترانس، PPAR $\gamma$ .

\* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، تلفن: ۰۲۱-۶۴۰۵۳۲۶۵ E-mail: doostimd@sina.tums.ac.ir

### مقدمه

اسیدهای چرب در پاتوژنز بیماری‌های قلبی - عروقی به‌خصوص آتروسکلروز دارای اهمیت برجسته‌ای هستند. امروزه مشخص شده است اسیدهای چرب علاوه بر نقش‌های متعددی که دارند، می‌توانند به‌عنوان لیگاندی برای گیرنده‌های هسته‌ای مهمی از جمله PPARها عمل کنند. Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) از مهم‌ترین گیرنده‌های هسته‌ای است که نقش به‌سزایی در متابولیسم لیپید به‌عهده دارد، این گیرنده هسته‌ای قادر است ژن‌های هدف بسیاری از جمله ATP-Binding Cassette, sub-family A1

اسیدهای چرب (Fatty acids) از اصلی‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده لیپیدها محسوب می‌شوند، که به‌عنوان یکی از مواد سه‌گانه بخش قابل توجهی از سبب غذایی خانوار را شامل می‌شوند؛ از آنجایی که لیپیدها نسبت به سایر مواد سه‌گانه از پتانسیل انرژی‌زایی بالاتری برخوردارند، لذا توجه به کمیت، کیفیت و نیز نوع اسید چرب تشکیل‌دهنده آن امری ضروری و حایز اهمیت است.<sup>۱</sup> از طرفی

اثرات خود را اعمال می‌کنند، به‌طور قطع می‌تواند کمک موثری در کنترل این بیماری‌ها داشته باشد. از این رو احتمالاً می‌تواند در طراحی راه‌کارهای عملی در جهت پیشگیری و یا جلوگیری از وخیم‌تر شدن آن مورد استفاده قرار گیرد.

## روش بررسی

مطالعه کنونی از نوع تجربی-بنیادی بوده و در سال ۱۳۹۰ در گروه بیوشیمی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. مواد مورد استفاده عبارتند از: رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7 از مرکز ذخایر ژنتیک خریداری شد. محیط کشت سلولی DMEM (Cat. No. E15-883)، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) (FBS) (F1051 Cat. No.)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Cat. No. 15140) و گلوتامین (Cat. No. G7513) از (GIBCO Co., USA) تهیه گردید. کیت‌های استخراج RNA، یا plus Mini RNeasy (Cat. No. 74134) و سنتز cDNA یا QuantiTect Reverse Transcription (Cat. No. 205311) و هم‌چنین پرایمر ژن‌های PPAR $\gamma$  (Cat. No. QT00100296) و  $\beta$ -Actin (Cat. No. QT01136772) از (Qiagen Co., Germany) هم‌چنین کیت green Real Time PCR SYBER (Cat. No. PR081A) از (TAKARA Co., Japan) تهیه گردید. تجهیزات مصرفی نیز از (JETBIOFIL Co., Canada) خریداری گردید. مراحل انجام بررسی به‌ترتیب در ذیل آورده شده است.

الف- کشت رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7: این سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) که دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۲۵٪ گلوتامین و هم‌چنین ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین بود، کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO $_2$  قرار داده شد. بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها و انجام پاساژ، سلول‌های پاساژ دهم برای انجام مراحل بعدی انتخاب گردید. ب- تعیین دوز سمی و کشنده (آزمون MTT): این آزمون برای مشخص نمودن غلظت کشنده اسید الاییدیک بر روی سلول صورت می‌گیرد که طی مراحل زیر صورت پذیرفت: در هر میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای تعداد ۲۰ هزار سلول توزیع گردید و به‌مدت دو ساعت انکوبه شد. بعد از تهیه محلول کاری MTT با

(ABCA1)، (ATP-Binding Cassette, sub-family G1 (ABCG1)، Interleukin 6 (IL6) و غیره را فعال نماید. ژن‌های مذکور از فاکتورهای دخیل بسیار مهم در متابولیسم لیپید محسوب می‌شوند و لذا اختلال در فعالیت هر کدام از این ژن‌ها می‌تواند خطر ابتلا به آتروسکلروز را افزایش دهد.<sup>۲</sup>

با توجه به اعمال متفاوتی که متعاقب فعال یا غیر فعال شدن PPARها بروز می‌کند، مشخص شده است که نوع اسید چرب در فعالیت و هم‌چنین بیان این گیرنده هسته‌ای نقش تعیین‌کننده‌ای دارد.<sup>۳</sup> به‌طور مثال در مطالعات بسیاری نشان داده شده است که اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه (Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) دارای آرایش فضایی سیس و به‌خصوص اسیدهای چرب  $\omega^3$  بیان ژن PPAR $\gamma$  را افزایش می‌دهند. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که اسیدهای چرب غیراشباع ترانس موجود در روغن‌های صنعتی دارای اثر مخالف اسیدهای چرب نوع سیس می‌باشد و به‌عنوان یک فاکتور خطر بیماری‌های قلبی-عروقی شناخته شده است. لذا با توجه به اثرات مضر و نامطلوب اسیدهای چرب ترانس انتظار می‌رود این اسیدهای چرب برخلاف اسیدهای چرب سیس بیان ژن PPAR $\gamma$  را کاهش دهند.<sup>۴</sup>

اسید الاییدیک C18:9:1 که فراوان‌ترین اسید چرب ترانسی است که به‌طور صنعتی تشکیل می‌گردد، به‌عنوان عامل خطر مهمی در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های قلبی-عروقی (به‌خصوص آتروسکلروز) شناخته شده است. علی‌رغم این‌که نشان داده شده که ایزومرهای دیگر اسیدهای چرب ترانس که به‌طور طبیعی در فرآورده‌های لبنی وجود دارند، اثری بر لیپوپروتئین‌های خون نمی‌گذارند،<sup>۵</sup> اما در مطالعات انجام شده بر روی اسید الاییدیک مشخص شده است که این نوع از اسیدهای چرب با تغییر پروفایل لیپیدی به‌طور مثال با افزایش لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) و از طرف دیگر با کاهش لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) عامل مستعدکننده مهمی در بروز آتروسکلروز است.<sup>۶</sup>

از طرفی همان‌طور که گفته شد، با توجه به نقش برجسته‌ای که گیرنده‌های هسته‌ای مذکور و به‌خصوص PPAR $\gamma$  در بیماری‌های قلبی-عروقی و در راس آن آتروسکلروز دارند، لذا وجود ارتباط بین اسید الاییدیک و PPAR $\gamma$  بسیار منطقی به‌نظر می‌رسد. در واقع مشخص شدن مکانیسم‌هایی که از طریق آن اسیدهای چرب ترانس

آن برای انجام Real Time PCR با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific Co., USA) در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید.

ی- بررسی بیان ژن PPAR $\gamma$ : با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Real Time PCR (6000) و با به کارگیری دستورالعمل مربوطه کیت SYBER green شرکت تاکارا (Japan)، ژن PPAR $\gamma$  و هم‌چنین ژن  $\beta$ -Actin به‌عنوان ژن مرجع، تکثیر گردید، و میزان بیان ژن در گروه‌های تیمار شده و کنترل، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. Real Time PCR به‌صورت دو مرحله‌ای (Two step) اجرا گردید؛ که چگونگی برنامه اجرایی آن در جدول-۱ آورده شده است. در نهایت داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ و آزمون آماری ANOVA آنالیز و تفسیر شدند (معنی‌دار بودن اختلاف در صورتی قابل قبول خواهد بود که  $P < 0.05$  باشد).

## یافته‌ها

نتایج آزمون MTT: با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT، غلظت کشنده اسید الاییدیک بر روی سلول‌ها (غلظتی که در آن بیش از ۵۰٪ سلول‌ها کشته شوند)، غلظت ۴mM و بالاتر را نشان می‌دهد. بعد از تیمار سلول‌های ماکروفاژی RAW264.7 با پنج غلظت مختلف اسید الاییدیک و گذشت مدت زمانی ۲۴ ساعت به کمک آزمون MTT، میزان زنده ماندن سلول‌ها توسط دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار-۱).

تعیین غلظت RNA: همان‌طور که گفته شد غلظت RNA با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری و سپس به‌میزان ۱ $\mu$ g از RNA مورد نظر برای سنتز cDNA استفاده گردید. سپس بیان ژن PPAR $\gamma$  توسط روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت؛ و همان‌گونه که در

غلظت ۰/۵mg/ml، این محیط جایگزین محیط RPMI گردید، سپس سلول‌ها به‌مدت سه ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردیدند. در مرحله بعد محیط کاری MTT با Dimethyl Sulfoxide (DMSO) جایگزین و مجدداً به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت میزان جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط الیزا ریدر قرائت گردید.

ج- کونژوگاسیون اسید الاییدیک با آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin, BSA). لازمه ورود اسید الاییدیک به درون سلول‌های کشت داده شده، این است که به‌صورت یک ترکیب محلول باشد، محلول‌سازی اسید الاییدیک با اتصال به آلبومین سرم گاوی (BSA) حاصل گردید. بدین‌صورت که در ابتدا مقدار مورد نظر از اسید الاییدیک، در حداقل مقدار ممکن اتانول ۵۰٪ حل گردیده و سپس با محیط حاوی یک درصد وزن حجمی آلبومین عاری از اسید چرب به حجم مطلوب رسانیده شد و سپس غلظت‌های ۰/۵mM، یک و دو اسید الاییدیک تهیه گردید. در انتها محیط حاصله به‌مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار، در دمای ۳۷ °C قرار گرفت و جهت استریل کردن آن از فیلتر با قطر ۰/۲ میکرون استفاده گردید.

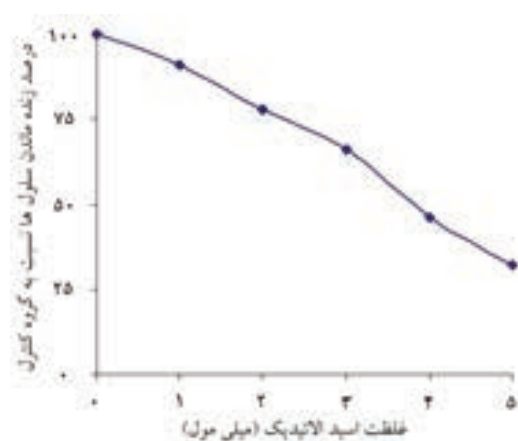
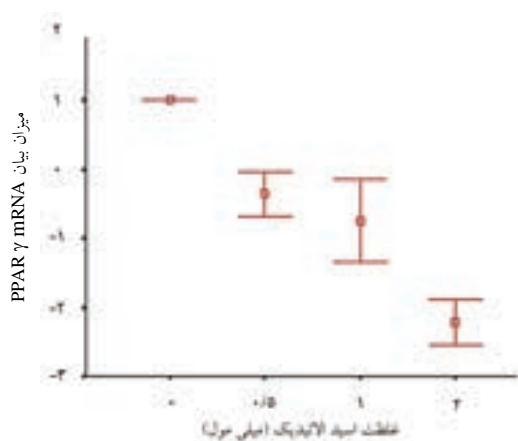
د- تیمار سلول‌ها با اسید الاییدیک: بعد از دور ریختن محیط کشت، سلول‌ها با محیط کشت تازه که حاوی غلظت‌های ۰/۵mM، یک و دو اسید الاییدیک کونژوگه است، تیمار گردید و سپس سلول‌های تیمار شده به‌مدت شش ساعت در ۳۷ °C انکوبه گردید. گروه کنترل نیز طوری لحاظ گردید که حاوی تمام ترکیبات موجود در گروه‌های تیمار شده به‌جز اسید الاییدیک باشد؛ هم‌چنین به‌منظور جلوگیری از ایجاد تداخل در نتایج، به گروه کنترل اتانول ۵۰٪ معادل مقدار موجود در گروه تیمار شده با غلظت دو میلی‌مولار افزوده گردید.

ه- استخراج RNA و ارزیابی آن از نظر کیفیت و کمیت: با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت کیاژن و طبق دستورالعمل مربوطه، RNA سلول‌ها استخراج شد. سپس غلظت RNA از طریق جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰nm توسط نانودراپ تعیین و کیفیت RNA به‌وسیله ژل آگارز مورد تایید قرار گرفت.

و- سنتز cDNA: با استفاده از کیت شرکت کیاژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، از روی RNA حاصله cDNA ساخته شد. غلظت cDNA نیز به‌منظور اطمینان از کافی بودن غلظت

جدول-۱: برنامه اجرایی Real Time PCR به‌صورت دو مرحله‌ای (two step)

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	دریافت سیگنال
وقفه ابتدایی	۹۵	۱۵	-
دور اول	۹۵	۵	-
دور دوم	۶۰	۴۵	+



نمودار ۲: نتایج آزمون Real Time PCR بیان PPAR $\gamma$  mRNA در رده سلولی RAW264.7

نمودار ۱: نتایج آزمون MTT. غلظت‌های 1، 2، 4، 8 میلی مول، سه، چهار، و پنج اسید الاییدیک به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های RAW264.7 تیمار شده و درصد زنده ماندن سلول‌ها با آزمون MTT بر اساس میزان جذب توسط دستگاه نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مصرف اسیدهای چرب ترانس و بیماری‌های قلبی - عروقی را اثبات نموده‌اند.

مطالعات اخیر تحقیقات خود را به روی نقش‌های تنظیمی اسیدهای چرب به‌عنوان لیگاند، و تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها متمرکز نموده‌اند. اما بحث‌های ضد و نقیضی در مورد اثرات، پیامد و مکانیسم دقیق متعاقب مصرف اسید چرب ترانس وجود دارد. در این مطالعه اثر غلظت‌های 0.5، 1، 2 و 4 میلی مول اسید الاییدیک بر روی بیان ژن PPAR $\gamma$  مورد بررسی قرار گرفت. مدت زمان تیمار سلول با اسید الاییدیک شش ساعت در نظر گرفته شد. اسیدهای چرب جریان خون در غلظت‌های بالا، یکی از عوامل تشدیدکننده و مهم در ایجاد فشار خون بالا (1-2 mmHg) و افزایش لیپوپروتئین‌های مضر مثل LDL (1-2 mmHg) محسوب می‌شوند. لذا در طرح حاضر غلظت‌های مذکور اسید الاییدیک برای تیمار بر روی سلول‌ها انتخاب گردید تا بتواند مکانیسم احتمالی و نقش این ایزومری از اسید چرب در پیامدهای منجر به اختلالات مذکور را روشن نماید. نتایج حاصل از این بررسی نشان دادند که اسید الاییدیک در هر سه غلظت مذکور بیان ژن PPAR $\gamma$  را در مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب 1/36، 1/68، 3/24 برابر کاهش می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

نتایج این بررسی که به‌صورت In vitro انجام شد، نتایج مطالعه دیگری که در آن اثر اسیدهای چرب ترانس به روی بیان ژن PPAR $\gamma$

نمودار ۲ - مشهود است، اسید الاییدیک در غلظت‌های 0.5، 1، 2، 4 و 8 میلی مول در مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب 1/36، 1/68 و 3/24 برابر کاهش داده است ( $P < 0.05$ ).

RNA حاصله از رده سلولی RAW264.7 تحت تیمار با غلظت‌های 0.5، 1، 2 و 4 میلی مول اسید الاییدیک با تکنیک Real Time PCR تکثیر گردید. میزان بیان PPAR $\gamma$  mRNA برای سه غلظت مذکور در مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب 1/36، 1/68 و 3/24 برابر کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) (هر آزمون برای هر سه غلظت سه بار تکرار گردید).

## بحث

امروزه بیماری‌های قلبی - عروقی و در راس آن‌ها آتروسکلروز از مهم‌ترین علل مرگ و میر در دنیا و به‌خصوص در جوامع پیشرفته و در حال پیشرفت به‌شمار می‌آید.

از مهم‌ترین عوامل مستعدکننده این بیماری‌ها می‌توان به سابقه فامیلی، نوع رژیم غذایی، جنسیت، سن، استرس، شرایط روحی و رژیم غذایی اشاره نمود. از این میان رژیم غذایی به‌عنوان یک عامل مهم و از طرفی قابل کنترل از نظر کمی و کیفی عامل بسیار تعیین‌کننده‌ای است. مطالعات گسترده اپیدمیولوژیکی ارتباط بین

در نهایت به منظور جمع‌بندی مطلب، همان‌گونه که پیش‌تر مطرح شد PPAR $\gamma$  بیان ژن‌های مختلفی که در هموستاز لیپیدها به‌خصوص کلسترول نقش دارند را کنترل و تنظیم می‌کند. از طرف دیگر اسیدهای چرب (به‌خصوص اسیدهای چرب غیراشباع ترانس و یا سیس) به‌عنوان لیگاند برای PPARها عمل می‌کنند؛<sup>۱۵</sup> در واقع متعاقب اتصال لیگاند به PPAR $\gamma$  کمپلکسی تشکیل می‌گردد که با اتصال به پروموتور ژن‌های هدف موجب فعال شدن آن‌ها می‌شود.<sup>۱۶</sup> چربی‌های جامد علاوه بر اسیدهای چرب اشباع حاوی مقادیر بالایی اسیدهای چرب ترانس بوده، و این ماده غذایی بخش قابل توجهی از رژیم غذایی به‌خصوص در کشورهای صنعتی را شامل می‌شوند. از طرف دیگر با توجه به پیشروی به‌سمت صنعتی‌تر شدن زندگی، افزایش روز افزونی در مصرف غذاهای آماده (به‌عنوان منبع سرشاری از اسیدهای چرب ترانس) مواجه هستیم. لذا بررسی تاثیرات اسیدهای چرب ترانس و روشن شدن مکانیسم و اعمال متفاوت آن می‌تواند کمک موثری در جهت کاهش بروز سکت‌های قلبی و عروقی و مرگ‌های ناگهانی ارایه نماید.

نتایج این مطالعه تایید دیگری بر این امر است که، مصرف کم‌تر و یا بیش‌تر یک ماده غذایی ممکن است بر مقدار انرژی مصرفی تاثیرگذار باشد، اما نوع و در واقع کیفیت مواد غذایی نقش بسیار تعیین‌کننده‌تری بر روی پیامدهای متعاقب مصرف مواد غذایی دارد.<sup>۱۷</sup> هم‌چنین برای دست‌یابی به این هدف، پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات آینده، بررسی اثر اسیدهای چرب ترانس به روی بیان ژن‌های هدف PPAR $\gamma$  به‌خصوص ABCA1, ABCG1, apoA1, CETP و Lipoprotein Lipase (LPL) و هم‌چنین گیرنده‌های هسته‌ای دیگر مرتبط مثل Liver X Receptor (LXR) و Farnesoid X Receptor (FXR)ها که از جمله مهم‌ترین پروتئین‌ها و عوامل شناخته شده دخیل در هموستاز لیپیدها هستند انجام پذیرد،<sup>۱۸</sup> چرا که اختلال در بیان و یا فعالیت هر کدام از این پروتئین‌ها می‌تواند تسریع و یا بروز آتروسکلروز را موجب شود.

سپاسگزار: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر اسید الاییدیک بر بیان ژن ABCA1 و PPAR $\gamma$  در رده سلولی ماکروفاژی RAW 264.7" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۹ و کد ۱۴۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

مورد بررسی قرار گرفته را تایید می‌کند؛ به‌طوری که در این مطالعه In vivo که بر روی چند گروه از موش‌های صحرایی صورت پذیرفت، نشان داده شد که اسید چرب ترانس باعث کاهش معنی‌دار و قابل توجهی (در حدود ۴۰٪) در بیان ژن PPAR $\gamma$  می‌شود.<sup>۸</sup> از طرف دیگر در تحقیق دیگری که به روی ۲۴ فرد داوطلب انجام گردید، بعد از یک دوره شش هفته‌ای با یک رژیم غذایی از اسیدهای چرب ترانس، نتایجی متناقض با نتایج این مقاله به‌دست آمد، چرا که مشخص شد، اسیدهای چرب ترانس باعث افزایش بیان PPAR $\gamma$  می‌شود. نکته جالب در این مطالعه این بود که میزان افزایش بیان PPAR $\gamma$  در مردان نسبت به زنان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر است.<sup>۹</sup>

با توجه به این دست‌آوردها، از طرفی می‌توان تفاوت‌های مربوط به بیان PPAR $\gamma$  را به نوع اسیدهای چرب رژیم غذایی نسبت داد و از طرفی می‌توان تفاوت‌های جنسیتی مثل شرایط هورمونی را دخیل دانست. البته در برخی بررسی‌ها، تفاوت‌های ملاحظه شده به پلی‌مورفیسم ژن PPAR $\gamma$  نیز نسبت داده شده است.<sup>۱۰</sup> در مجموع از آنجایی که تاکنون در هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ای، بررسی اثر اسید الاییدیک بر روی بیان ژن PPAR $\gamma$  به‌صورت In vivo انجام نگرفته است، انجام مطالعه‌ای در این زمینه ضروری و حایز اهمیت به‌نظر می‌رسد. اگر چه در مطالعه حاضر اسید الاییدیک بیان ژن PPAR $\gamma$  را کاهش داد ولی با توجه به مغایرت‌های دیده شده با دیگر مطالعات به‌نظر می‌رسد نه تنها اسید الاییدیک بلکه عوامل دیگری در بیان ژن PPAR $\gamma$  نقش تعیین‌کننده داشته باشند.

از طرف دیگر با توجه به این یافته‌ها و هم‌چنین مطالعات بسیار گسترده دیگری که در این زمینه انجام شده است، می‌توان استدلال نمود که اسید الاییدیک علاوه بر کاهش بیان ژن PPAR $\gamma$  از طریق دخالت در مسیرهای دیگر نیز با تغییر در پروفایل لیپیدی منجر به ایجاد اختلال در متابولیسم لیپیدها و متعاقباً بروز و پیشرفت بیماری‌هایی مثل آتروسکلروز می‌شود. به‌طور مثال در موارد بسیاری پیامدهای اسیدهای چرب ترانس را به افزایش بیان فاکتورهای التهابی مثل CRP, TNF $\alpha$  و IL6 مرتبط نموده‌اند.<sup>۱۱,۱۲</sup> در مطالعات دیگری عنوان شده است که اسیدهای چرب ترانس می‌تواند با جای‌گیری در ساختمان غشاهای سلول‌های ماکروفاژی، اندوتلیوم و چربی مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به غشا را مختل نموده و پیامدهای قلبی-عروقی و التهابی را موجب شود.<sup>۱۳,۱۴</sup>

## References

- Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem* 1990;1(2):68-79.
- Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 2009;73(2):214-20.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997;11(6):779-91.
- Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr* 2006;83(6 Suppl):1520S-1525S.
- Lacroix E, Charest A, Cyr A, Baril-Gravel L, Lebeuf Y, Paquin P, et al. Randomized controlled study of the effect of a butter naturally enriched in trans fatty acids on blood lipids in healthy women. *Am J Clin Nutr* 2012;95(2):318-25.
- Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2006;354(15):1601-13.
- Attia-Skhirri N, Fournier N, Pourci ML, Paul JL. Trans fatty acids: effects on lipoprotein metabolism and cardiovascular risk. *Ann Biol Clin (Paris)* 2009;67(5):517-23.
- Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 2005;153(1):159-65.
- Kuhnt K, Flotho S, Benjamin S, Boerchers T, Schubert R, Jahreis G, Spener F. Gene expression after dietary intervention with trans fatty acids (trans-11/trans-12 18:1) in humans. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009;111(5):442-50.
- Paradis AM, Fontaine-Bisson B, Bossé Y, Robitaille J, Lemieux S, Jacques H, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha Leu162Val polymorphism influences the metabolic response to a dietary intervention altering fatty acid proportions in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2005;81(2):523-30.
- Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43(3):445-52.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2004;79(6):969-73.
- Ruth MR, Wang Y, Yu HM, Goruk S, Reaney MJ, Proctor SD, et al. Vaccenic and elaidic acid modify plasma and splenocyte membrane and mitogen-stimulated cytokine production in obese insulin resistant JCR: LA-cp rats. *Nutrients* 2010;2:181-97.
- Mozaffarian D. Trans fatty acids-effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl* 2006;7(2):29-32.
- Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(6):2160-4.
- Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2005;25:317-40.
- Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 2011;364(25):2392-404.
- Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004;45(12):2161-73.

## Determining effects of elaidic acid on PPAR- gamma expression in RAW 264.7 macrophage cell line

### Abstract

Received: January 03, 2012 Accepted: June 06, 2012

Hossein Montakhab Yegane  
M.Sc.  
Hossein Babaahmadi Rezaei  
Ph.D.  
Mahmood Doosti Ph.D.\*

Department of Biochemistry, School  
of Medicine Tehran University of  
Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Background:** Several dietary factors are involved in cardiovascular coronary heart diseases, including trans fatty acids, which are generally formed during hydrogenation of vegetable oils, a process that causes conversion of liquid oils into semisolid fats. Nowadays, it is well-known that trans fatty acids form a major risk factor in the occurrence and progression of atherosclerosis. On the other hand, it has been identified that some nuclear receptors, such as PPARs, are involved and play important roles in lipid homeostasis and pathogenesis of cardiovascular diseases. Therefore, we studied the effect of elaidic acid on gene expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ).

**Methods:** Murine macrophage RAW264.7 cells were treated by 0.5, 1, and 2 mM concentrations of elaidic acid for 6 h. The control group was treated by 50% ethanol (as solvent), equivalent to the amount of ethanol used in 2 mM concentration of elaidic acid. Later, the total RNA was extracted and its cDNA was synthesized. Finally, the quantity of PPAR $\gamma$  gene expression was measured by real-time PCR.

**Results:** Overall, 0.5, 1, and 2 mM concentrations of elaidic acid decreased PPAR $\gamma$  gene expression in RAW264.7 macrophage cell line by -1.36, -1.68, and -3.24 folds compared with the control group, respectively.

**Conclusion:** By decreasing the expression of nuclear receptor PPAR $\gamma$ , elaidic acid causes, intensifies or accelerates the occurrence of cardiovascular diseases, especially atherosclerosis. This finding shows the importance of reducing the consumption of elaidic acid containing foods.

**Keywords:** atherosclerosis, cell culture, elaidic acid, gene expression, trans fatty acids, PPAR $\gamma$ .

\* Corresponding author: Dept. of Clinical Biochemistry, Keshavarz Blvd., Ghods St., Poorsina St., Tehran University of Medical Sciences, School of Medicine, Tehran, Iran.  
Tel: +98-21-64053265  
E-mail: doostimd@sina.tums.ac.ir