

بررسی بیان ژن های *Glut2* و گلوکوکیناز در جزایر پانکراس و بافت پانکراس کامل

صادق قربانی دالینی^۱، محمد حسین سنگتراش^۱، نگار آذریپرا^۲، رامین یعقوبی^۲، حمیدرضا سلیمان پور لیچایی^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران. sangtarash@science.usb.ac.ir

۲- مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. negarazarpira@yahoo.com

۳- گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: جزایر پانکراس بخش اندوکراین پانکراس می‌باشند که با ترشح هورمون‌های مختلف موجب تنظیم قند خون و متابولیسم انرژی در بدن می‌گردد. سلول‌های بتا جزایر پانکراس وظیفه ترشح انسولین در پاسخ به تغییرات گلوکز را برعهده دارند. اولین مرحله در این فرآیند شامل ورود گلوکز به درون سلول توسط انتقال دهنده *GLUT2* و سپس فسفوریلاسیون گلوکز توسط گلوکوکیناز به عنوان حس گر گلوکز درون سلولی می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی بیان *Glut2* و گلوکوکیناز در جزایر پانکراس و مقایسه آن با بافت کامل پانکراس می‌باشد.

روش کار: این پژوهش بر روی بافت پانکراس دریافت شده از فرد مرگ مغزی انجام شد. جزایر پانکراس از بافت کامل جدا و به منظور بررسی جداسازی موفق جزایر، سطح بیان ژن *Ptfla* به عنوان مارکر بخش اگزوکراین پانکراس، بررسی شد. سپس بیان ژن‌های *Glut2* و گلوکوکیناز در بافت پانکراس کامل و جزایر جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: عدم بیان ژن *Ptfla* در جزایر پانکراس نشان دهنده جداسازی موفق و خلوص بالای جزایر جدا شده بود. هم چنین ژن‌های *Glut2* و گلوکوکیناز به مقدار زیادی در جزایر پانکراس بیان می‌شدند. هم چنین آنالیزهای آماری نشان دادند که بیان ژن‌های *Glut2* و گلوکوکیناز به طور معنی‌داری در جزایر پانکراس بیشتر از بافت کامل می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده بیان بالا و اهمیت ژن‌های *Glut2* و گلوکوکیناز در بخش اندوکراین پانکراس به عنوان انتقال دهنده و حس گر گلوکز در فرآیند ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز می‌باشد. هم چنین روش مورد استفاده در این پژوهش برای جداسازی جزایر از بافت پانکراس بسیار کارآمد است.

واژه‌های کلیدی: جزایر پانکراس، *GLUT2*، گلوکوکیناز.

مقدمه

سازمان یافته‌ای تشکیل شده که شامل رگ‌های خونی و سلول‌های اندوکراین می‌باشد. این سلول‌ها در جایگاه اختصاصی خود متشکل از ماتریکس بینابینی و پروتئین‌های غشای پایه متشکل از کلاژن نوع IV، لامینین و فیبرونکتین می‌باشند (۱۹، ۷). در مجموع به این ساختار، جزایر لانگرهانس یا جزایر پانکراس می‌گویند. جزایر پانکراس حدود ۱ درصد بافت پانکراس را تشکیل می‌دهند اما برای انجام وظیفه اندوکرینی خود، بیش از ۱۵ درصد جریان خون پانکراس را دریافت می‌کنند (۱۶)،

پانکراس اندام ۱۳ تا ۱۵ سانتی‌متری است که از دو بخش اندوکراین و اگزوکراین تشکیل شده است (۷). بخش اگزوکراین با تولید و ترشح آنزیم‌های مختلف در هضم مواد غذایی شرکت می‌کند. این بخش از سلول‌های آسینار و سلول‌های اپی‌تلیال *ductal* تشکیل شده است. سلول‌های آسینار وظیفه تولید و ترشح زیموژن‌ها (پروآنزیم‌ها و یا پیش‌سازهای غیرفعال آنزیم‌ها) را بر عهده دارند که از طریق سیستم *ductal* آن را به درون دئودنوم می‌ریزند (۳). بخش اندوکراین از واحدهای

۱۱). جزایر پانکراس به تنهایی یک اندام بسیار تخصص یافته متشکل از سلول‌های پارانشیم، سلول‌های α ، سلول‌های β ، سلول‌های δ و سلول‌های PP می‌باشد که در یک ساختار اسفرویدی سه بعدی پراکنده شده‌اند (۶، ۷). این سلول‌ها وظیفه تولید گلوکاکاگون، انسولین، سوماتوستاتین و پلی‌پتید پانکراس را برعهده دارند (۳). تعادل دقیق این هورمون‌ها موجب تنظیم قند خون و متابولیسم انرژی در بدن می‌گردد (۲۴). علاوه بر این سلول‌ها، پانکراس جنینی دارای سلول‌های ترشح کننده گرلین (سلول‌های E) و سلول‌های بیان کننده گاسترین نیز می‌باشد که در اندام بالغ دیده نمی‌شوند (۲). تخمین زده می‌شود که در هر انسان، ۳-۴ میلیون جزیره پانکراس فعال وجود داشته باشد که هر کدام از جزایر دارای ۴۰-۵۰ هزار سلول بوده که ۶۰ درصد آن سلول β می‌باشد (۹). سلول‌های β جزایر پانکراس برای حفظ هموستاز گلوکز، انسولین را ترشح می‌کنند. بدین منظور، مکانیسم حس کردن گلوکز در پاسخ به تغییر غلظت گلوکز در حال گردش در بدن فعال می‌شود. اولین مکانیسمی که فعال می‌گردد، ورود گلوکز به درون سلول توسط انتقال دهنده *GLUT2* می‌باشد. به دلیل K_m و نیز ظرفیت بالای انتقال گلوکز توسط این انتقال دهنده، تعادل سریع غلظت گلوکز در خارج و داخل سلول اتفاق می‌افتد (۳۰، ۲۵). مکانیسم بعدی در سلول‌های β ، ترشح انسولین در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز می‌باشد که توسط فعالیت آنزیم گلوکوکیناز کنترل می‌شود (۵). گلوکوکیناز یک آنزیم متابولیک می‌باشد که در بافت‌های حس کننده گلوکز به ویژه جزایر پانکراس و سلول‌های کبد بیان می‌شود. در این بافت‌ها پروتئین گلوکوکیناز نقش حس گر گلوکز را برعهده دارد که با حس کردن تغییرات گلوکز خون، فعالیت سلولی را تغییر می‌دهد (۱۷). در مقایسه با سلول‌های آسینار، سلول‌های جزایر پانکراس دارای مقاومت زیادی نسبت به تغییرات

ناگهانی غلظت گلوکز خارج سلولی می‌باشند. این مقاومت به دلیل حضور انتقال دهنده غشایی گلوکز (*GLUT2*) در سلول‌های β جزایر پانکراس می‌باشد. از آنجا که انتقال دهنده *GLUT2* در سلول‌های β توسط غلظت‌های بالای گلوکز نیز اشباع نمی‌شود، بنابراین مولکول گلوکز برای این سلول‌ها از نظر اسمولیتیکی غیرفعال می‌باشد. به همین دلیل سلول‌های β نسبت به تغییرات سریع گلوکز مقاوم می‌باشند. اما سلول‌های آسینار به دلیل نداشتن انتقال دهنده *GLUT2* نسبت به تغییرات سریع گلوکز حساس بوده و این تغییرات باعث متورم شدن و شکستن غشای این سلول‌ها می‌گردد (۲۷). سلول‌های β ، بیشترین نوع سلول در جزایر پانکراس انسانی هستند که ۵۰ تا ۷۰ درصد جمعیت سلولی آن را تشکیل می‌دهند (۶). وظیفه اصلی آن‌ها ترشح انسولین به صورت کاملاً تنظیم شده می‌باشد. این فرآیند شامل محرک‌های مختلفی می‌شود که بعضی از آن‌ها وظیفه فعال‌سازی فرآیند در زمان حضور محرک و برخی دیگر وظیفه مهار فرآیند در زمان غیبت محرک را برعهده دارند. به عنوان یک اصل کلی، ورود گلوکز به درون سلول‌های β باعث شروع آبخاری از وقایع می‌گردد که شامل فسفوریلاسیون گلوکز و بسته شدن کانال‌های یونی پتاسیم می‌باشد که خود باعث دپلاریزاسیون غشا و ترشح انسولین می‌گردد (۲۶). پس از ورود گلوکز به درون سلول‌های β ، انسولین در دو مرحله کاملاً مستقل و به شکل نوسانی ترشح می‌شود (۲۱). علاوه بر این، وجود یک مسیر ترشح انسولین مستقل از کانال یونی باعث پیچیدگی بیشتر فرآیند ترشح انسولین می‌گردد (۱۲). در پی افزایش گلوکز خون، گلوکز از طریق انتقال دهنده گلوکز (*GLUT2*) وارد سلول‌های β می‌شود. سپس گلوکز توسط آنزیم گلوکوکیناز فسفوریله شده و وارد مسیر گلیکولیز می‌گردد که باعث تولید پیرووات می‌شود. پیرووات نیز توسط پیرووات دهیدروژناز

انجام گردید. کیفیت و خلوص *RNA* با استفاده از دستگاه نانودراپ (*NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, USA*) و الکتروفورز بر روی ژل (شکل ۱) بررسی گردید. مقدار ۵۰۰ نانوگرم از *RNA* برای ساخت *cDNA* مورد استفاده قرار گرفت. *cDNA* با استفاده از کیت *PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)* و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. به منظور بررسی بیان ژن‌های هدف از واکنش *real-time PCR کمی* و کیت *SYBR® Premix II EX Taq™ (Takara, Japan)* استفاده گردید. واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر *CYBR green I master mix 2X*، ۰/۲ میکرولیتر رنگ *ROX*، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱) و ۱ میکرولیتر از *cDNA* انجام گردید. این واکنش در دستگاه *StepOne Plus (Applied Biosystem, USA)* و با استفاده از شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه، ۶۴-۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام گردید. در پایان آنالیز منحنی ذوب به منظور بررسی خلوص قطعه تکثیر شده انجام شد. اختصاصیت و خلوص نتایج *real-time PCR* بر روی ژل آگاروز مورد بررسی قرار گرفت. ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید. به منظور بررسی خلوص جزایر پانکراس جدا شده، از ژن *Ptf1a*، به عنوان ژنی که تنها در بخش آگزوکرین بیان می‌شود، استفاده شد. هم چنین از رقت‌های ۱۰ تایی از *cDNA* بافت پانکراس برای ترسیم منحنی استاندارد و بررسی خطی بودن واکنش‌ها استفاده گردید. تمامی واکنش‌ها به صورت تکرار ۳ تایی انجام گردید. آنالیز بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ انجام شد. بدین منظور، در ابتدا مقدار $\Delta C_T =$

و پیروات کربوکسیلاز متابولیزه شده و وارد میتوکندری می‌گردد. این فرآیند منجر به تولید *ATP* در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود. *ATP* یک مولکول سیگنالینگ برای ترشح انسولین در سلول‌های β می‌باشد. زیرا سلول‌های β دارای کانال‌های K^+ حساس به *ATP* بوده که در پاسخ به افزایش *ATP* یا افزایش نسبت *ATP/ADP* بسته می‌شوند. از آنجا که کانال K_{ATP} اولین شاخص پتانسیل غشا در سلول‌های β می‌باشد، بنابر این بسته شدن این کانال‌ها باعث دپلاریزاسیون غشا می‌گردد. دپلاریزاسیون غشا باعث باز شدن کانال‌های Ca^{2+} وابسته به ولتاژ نوع *(VDCC)L* و سپس ورود Ca^{2+} به درون سلول و افزایش غلظت Ca^{2+} آزاد درون سلولی می‌گردد. در پایان نیز این افزایش سریع غلظت Ca^{2+} باعث افزایش آگزوسیتوز گرانول‌های انسولین می‌شود (۱، ۱۳).

با توجه به اهمیت انتقال دهنده گلوکز و گلوکوکیناز در مکانیسم ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز، هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن‌های انتقال دهنده گلوکز *GluT2* و گلوکوکیناز (*gck*) در بافت کامل پانکراس و جزایر پانکراس انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

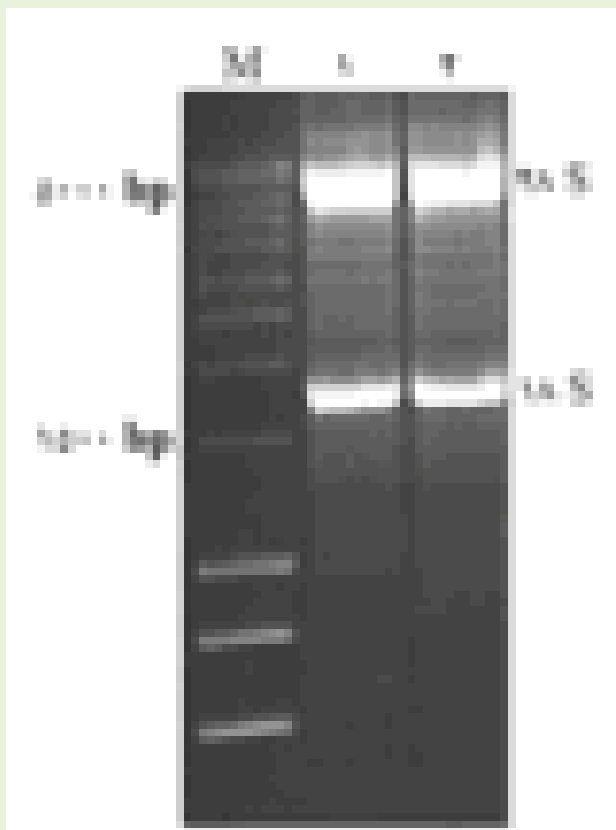
این پژوهش پس از کسب تاییدیه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز بر روی نمونه بافت پانکراس و جزایر پانکراس انجام گردید. بخشی از یک پانکراس سالم از فرد اهدا کننده مرگ مغزی از بخش پیوند بیمارستان نمازی شیراز دریافت گردید. یک قطعه ۰/۵ سانتی‌متر مکعبی از آن برای بررسی بافت کامل پانکراس جدا و مابقی بافت برای استخراج جزایر پانکراس مورد استفاده قرار گرفت. استخراج جزایر با استفاده از روش ارایه شده توسط *Qi* و همکاران (۲۳، ۲۲) انجام گردید. استخراج *RNA* به وسیله کیت *Rna Sol* شرکت *alphabio* و بر اساس پروتکل شرکت سازنده

با بافت پانکراس محاسبه و نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارائه گردید. به منظور بررسی آماری بیان ژن بین بافت پانکراس کامل و جزایر پانکراس از آنالیز آماری t استفاده و سطح معنی داری در $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

برای نمونه‌های $CT_{(gene\ of\ interest)} - CT_{(housekeeping\ gene)}$ جزایر و نیز بافت پانکراس محاسبه گردید. سپس مقدار $\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT_{(1st\ test)} - \Delta\Delta CT_{(pancreas)}$ محاسبه شد. در نهایت با استفاده از مقدار بازده هر واکنش (E)، جدول (۱) و بر اساس فرمول $(1+E)^{-\Delta\Delta C_T}$ میزان بیان ژن‌های *GluT2*، گلوکوکیناز و *Ptfla* جزایر پانکراس در مقایسه

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این پژوهش

هدف	توالی (5'→3')	دما	طول قطعه	بازده
<i>GluT2</i>	F: TGGGGACACACTTGGAAGAATC R: GCCTGAAATTAGCCCACAATATAGTC	۶۴	۱۵۷	٪ ۹۸/۲
<i>Gck</i>	F: AAACCAGCCCGAGGAGAACC R: TCTGCTCTACCTTCTCCTTCTTGG	۵۹	۲۰۰	٪ ۹۷/۳
<i>Ptfla</i>	F: GGTTCATCATCTGCCATCGG R: AGACTTTGGCTGTTCCGGAT	۵۸	۱۴۳	٪ ۹۶
<i>GAPDH</i>	F: GGACTCATGACCACAGTCCA R: CCAGTAGAGGCAGGGATGAT	۶۰	۱۱۹	٪ ۹۹/۷

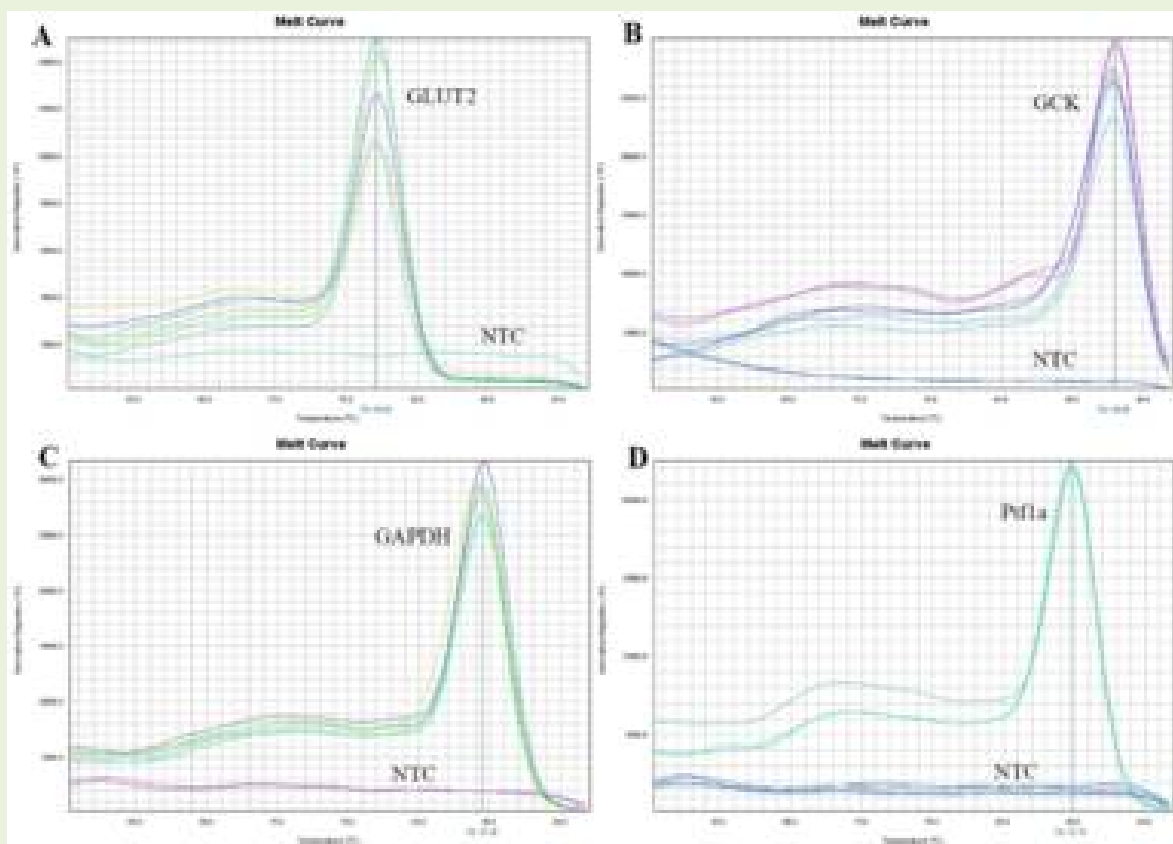


شکل ۱- الکتروفورز بر روی ژل به منظور بررسی جداسازی *RNA* از جزایر پانکراس (ستون ۱) و بافت پانکراس (ستون ۲). نتایج نشان دهنده کیفیت خوب *RNA* استخراج شده می باشد.

نتایج

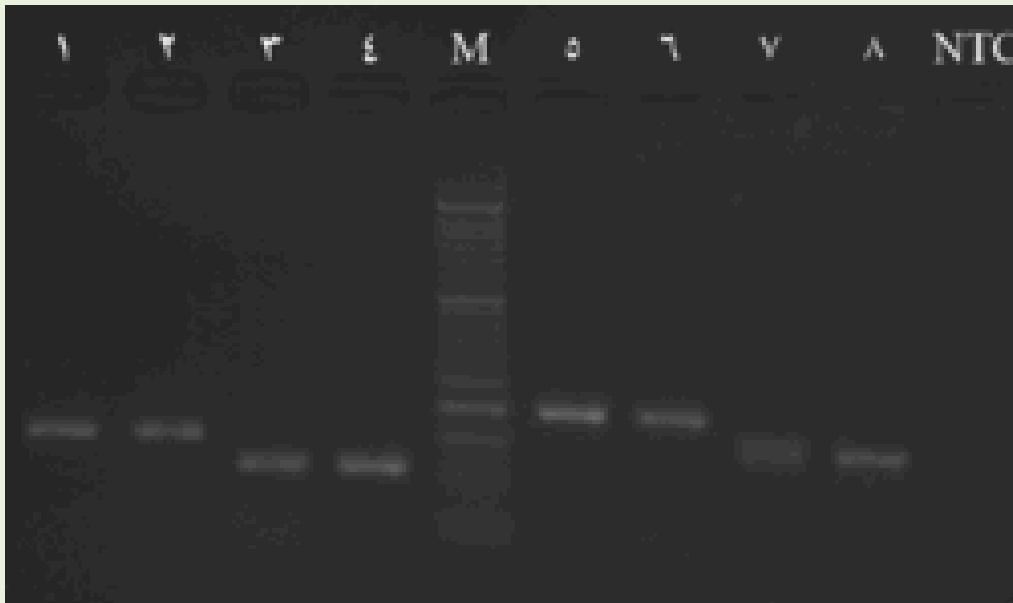
تکثیر اختصاصی ژن هدف توسط *real-time PCR* بود (شکل ۳). بررسی بیان ژن *Ptfla* نشان داد که این ژن در نمونه جزایر پانکراس بیان نمی‌شود ($p=0/002$) (شکل ۱ قسمت D). این مساله نشان دهنده خالص سازی موفق جزایر از بافت پانکراس می‌باشد. هم چنین نتایج نشان دهنده بیان $3/19 \pm 80/78$ برابری ($p=0/002$) ژن *GluT2* و $0/66 \pm 4/48$ برابری ($p=0/04$) ژن گلوکوکیناز در نمونه جزایر نسبت به نمونه پانکراس کامل می‌باشد (شکل ۴).

بررسی منحنی استاندارد نشان دهنده خطی بودن واکنش‌ها (رگرسیون بالاتر از ۰/۹۹۶) با شیب نمودار ۳/۲۴ بود. هم چنین واکنش‌ها دارای بازده بالای ۹۵٪ (جدول ۱) و ضریب R^2 بین ۰/۹۹۸ - ۰/۹۹۴ بودند. نمودار منحنی ذوب دارای یک نقطه حداکثری (*peak*) و بیان‌گر اختصاصیت بالای واکنش‌ها بود (شکل ۲). به منظور تایید اختصاصیت نتایج *real-time PCR*، محصولات ریل تایم بر روی ژل آگاروز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تایید کننده اختصاصیت پرایمرها و



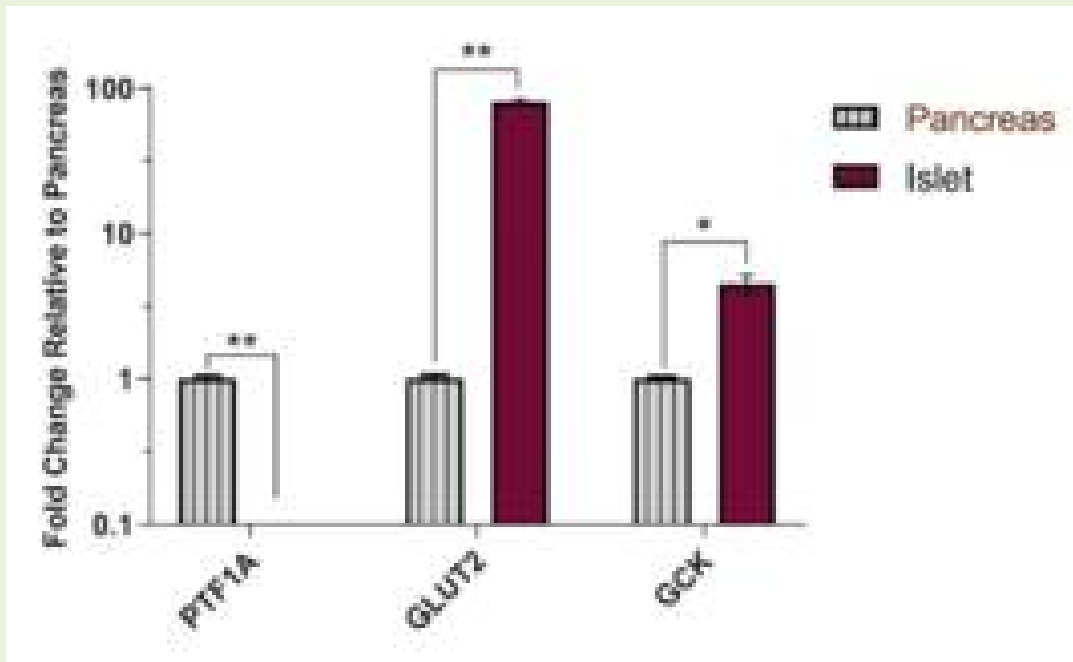
شکل ۲- نمودار منحنی ذوب که بیانگر خلوص بالای واکنش‌ها می‌باشد.

(A) نمودار منحنی ذوب *GLUT2*، (B) نمودار منحنی ذوب گلوکوکیناز، (C) نمودار منحنی ذوب *GAPDH* و (D) نمودار منحنی ذوب *Ptfla*. با توجه به بیان نشدن ژن *Ptfla* در نمونه‌های جزایر پانکراس، نمودار منحنی ذوب آن‌ها در کنار نمونه‌های *NTC* قرار گرفته است.



شکل ۳- بررسی محصول *real-time PCR* بر روی ژل آگاروز. بررسی ها نشان دهنده اختصاصیت بالای واکنش ها برای قطعه هدف می باشد.

۱ و ۲) قطعه ۱۵۷ بازی ژن *GluT2*. ۳ و ۴) قطعه ۱۱۹ جفت بازی ژن *M. GAPDH*. مارکر ۵۰ جفت بازی (*DM1100*). ۵ و ۶) قطعه ۲۰۰ جفت بازی ژن گلوکوکیناز. ۷ و ۸) قطعه ۱۴۳ جفت بازی ژن *Ptf1a* (*NTC*) نمونه کنترل بدون الگو.



شکل ۴- بیان ژن های *Ptf1a*، *GluT2* و گلوکوکیناز در نمونه جزایر در مقایسه با نمونه پانکراس. $p < 0.001$ ***, $p < 0.01$ ** , $p < 0.05$ *.

بیان دو ژن *GluT2* و گلوکوکیناز در جزایر پانکراس انسانی در مقایسه با بافت کامل پانکراس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد که سلول های جزایر پانکراس دارای سطح بیان بالایی از *GluT2* و گلوکوکیناز

بحث و نتیجه گیری

مطالعات مختلف به خوبی نشان داده اند که انتقال دهنده غشایی *GLUT2* و آنزیم گلوکوکیناز دو فاکتور بسیار مهم در شروع فرآیند ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز هستند (۱۵، ۱۳). بنابراین در این پژوهش سطح

نشان دادند که بیان *GLUT2* و گلوکوکیناز در مدت گرسنگی کاهش می‌یابد اما بیان آن‌ها پس از غذادهی مجدد به شدت افزایش می‌یابد (۲۸). هم چنین مطالعات مختلف به خوبی نشان داده‌اند که گلوکوکیناز، ایزوفرمی از هگزوزکیناز می‌باشد. اگر چه هگزوزکیناز در تمامی سلول‌ها بیان می‌شود، اما ایزوفرم گلوکوکیناز (هگزوزکیناز نوع IV) به صورت اختصاصی در کبد و سلول‌های α و β جزایر پانکراس بیان می‌شود (۱۸، ۴). بعلاوه، Basco (۵) و Matschinsky (۱۸) نشان دادند که گلوکوکیناز به عنوان سنسور گلوکز در مهار ترشح گلوکاگون توسط سلول‌های α و نیز القای ترشح انسولین توسط سلول‌های β ایفای نقش می‌کند (۵). بنابراین مشاهده بیان بالای گلوکوکیناز در جزایر پانکراس در مقایسه با بافت پانکراس، نشان دهنده نقش اختصاصی جزایر پانکراس در تنظیم قند خون می‌باشد. نتایج این پژوهش به خوبی نشان می‌دهد که بیان ژن‌های *Glut2* و گلوکوکیناز در سلول‌های β جزایر پانکراس ضروری می‌باشند و بیان آن‌ها در بخش اندوکراین پانکراس بسیار بالا است. هم چنین روش مورد استفاده در این پژوهش برای جداسازی جزایر از بافت پانکراس بسیار کارآمد می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان و نیز دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی کمال تشکر و قدردانی را دارند. هم چنین از اساتید و پرسنل محترم مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز به ویژه آقای نعمت الله ناجی کمال سپاسگزاری را داریم.

می‌باشند. از آن‌جا که بافت کامل پانکراس شامل جزایر پانکراس (بخش اندوکراین) و بخش اگزوکراین می‌باشد، بنابراین مشاهده بیان *Glut2* و گلوکوکیناز در آن دور از انتظار نمی‌باشد. هم چنین، با توجه به این که ژن *Ptfla* فقط در بخش اگزوکراین بیان می‌شود، بنابراین عدم بیان ژن *Ptfla* در جزایر پانکراس نشان دهنده جداسازی موفق جزایر از بخش اگزوکراین در این پژوهش می‌باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر پژوهش‌ها از جمله *Xin* و همکاران (۲۹)، *Fadista* و همکاران (۸) و *Lawlor* و همکاران (۱۴) کاملاً هم‌سو می‌باشد. *Heimberg* و همکاران با بررسی بیان انتقال دهنده‌های غشایی *GLUT1-4* در بافت‌های مختلف رت (*Rat*) نشان دادند که *GLUT2* انتقال دهنده اختصاصی گلوکز در سلول‌های β و کبد می‌باشد. به علاوه آن‌ها نشان دادند که پس از ۱۶ ساعت تیمار گلوکز، بیان *GLUT1* نیز در سلول‌های β افزایش می‌یابد (۱۰). هم چنین *Pang* و همکاران با بررسی بیان *GLUT2* در طی مراحل تکوین در رت نشان دادند که *GLUT2* در جمعیتی از سلول‌های اندودرمی در مرحله پریموردیوم تکوین شروع به بیان می‌کند. در نهایت بیان *GLUT2* در این جمعیت سلولی در مراحل بعدی تکوین حفظ می‌شود و سلول‌های β نیز از این جمعیت سلولی حاصل می‌شوند (۲۰). بنابراین مشاهده بیان بالای *GLUT2* در این پژوهش هم‌سو با بیان و فعالیت اختصاصی این ژن در سلول‌های β می‌باشد. *Tiedge* و همکاران به بررسی بیان *GLUT2* و گلوکوکیناز در بافت کبد و سلول‌های β پانکراس در طی چالش گرسنگی و غذا دهی رت پرداختند. آن‌ها

منابع

1. Affourtit, C., Alberts, B., Barlow, J., Carré, J.E. Wynne, A.G. (2018). Control of pancreatic β -cell bioenergetics. *Biochemical Society Transactions*, 46(3);555-564
2. Arnes, L., Hill, J.T., Gross, S., Magnuson, M.A. Sussel, L. (2012). Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent

progenitor population. *PLoS ONE*, 7(12);e52026
3. Bakhti, M., Böttcher, A. Lickert, H. (2018). Modelling the endocrine pancreas in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 10.1038/s41574-018-0132-z

4. Baltrusch, S., Tiedge, M. (2006). Glucokinase regulatory network in pancreatic β -cells and liver. *Diabetes*, 55(12);S55-S64.
5. Basco, D., Zhang, Q., Salehi, A., Tarasov, A., Dolci, W., Herrera, P. (2018). α -cell glucokinase suppresses glucose-regulated glucagon secretion. *Nature Communications*, 9(1);546.
6. Brereton, M.F., Vergari, E., Zhang, Q., Clark, A. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(8);575-591.
7. Citro, A., Ott, H.C. (2018). Can we re-engineer the endocrine pancreas? *Current diabetes reports*, 18(11);122.
8. Fadista, J., Vikman, P., Laakso, E.O., Mollet, I.G., Esguerra, J.L., Taneera, J., et al. (2014). Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111;13924-13929.
9. Hashemitabar, M., Heidari, E. (2018). Redefining the signaling pathways from pluripotency to pancreas development: In vitro β -cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 10.1002/jcp.27736
10. Heimberg, H., De Vos, A., Pipeleers, D., Thorens, B., Schuit, F. (1995). Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem*, 270(15);8971-8975.
11. Jansson, L., Barbu, A., Bodin, B., Drott, C.J., Espes, D., Gao, X., et al. (2016). Pancreatic islet blood flow and its measurement. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(12);81-95.
12. Kaido, T., Yebra, M., Cirulli, V., Rhodes, C., Diaferia, G., Montgomery, A.M. (2006). Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes*, 55(10);2723-2729.
13. Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., Sato, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of diabetes investigation*, 4(6); 511-516.
14. Lawlor, N., George, J., Bolisetty, M., Kursawe, R., Sun, L., Sivakamasundari, V., et al. (2017). Single-cell transcriptomes identify human islet cell signatures and reveal cell-type-specific expression changes in type 2 diabetes. *Genome research*, 27(2); 208-222.
15. Layden, B.T., Durai, V., Lowe, J., William L. (2010). G-protein-coupled receptors, pancreatic islets, and diabetes. *Nature Education*, 3(9);13.
16. Lifson, N., Lassa, C.V., Dixit, P.K. (1985). Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 249(1); E43-E48.
17. Lindbloom-Hawley, S., LeCluyse, M., Vandersande, V., Lushington, G.H., Schermerhorn, T. (2014). Cloning and characterization of feline islet glucokinase. *BMC Veterinary Research*, 10;130.
18. Matschinsky, F.M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes*, 51(3); S394-404.
19. Morgan, N.G., Richardson, S.J. (2018). Fifty years of pancreatic islet pathology in human type 1 diabetes: insights gained and progress made. *Diabetologia*, 61(12); 2499-2506.
20. Pang, K., Mukonoweshuro, C., Wong, G.G. (1994). Beta cells arise from glucose transporter type 2 (GluT2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20);9559-9563.
21. Perley, M.J., Kipnis, D.M. (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: Studies in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 46(12); 1954-1962
22. Qi, M., Barbaro, B., Wang, S., Wang, Y., Hansen, M., Oberholzer, J. (2009). Human pancreatic islet isolation: Part II: purification and culture of human islets. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 10.3791/1343(27);e1343
23. Qi, M., Barbaro, B., Wang, S., Wang, Y., Hansen, M., Oberholzer, J. (2009). Human pancreatic islet isolation: Part I: digestion and collection of pancreatic tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 10.3791/1125(27);e1125
24. Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3); e219.
25. Song, M.-Y., Wang, J., Ka, S.-O., Bae, E.J., Park, B.-H. (2016). Insulin secretion impairment in *Sirt6* knockout pancreatic β cells is mediated by suppression of the *FoxO1-Pdx1-Glut2* pathway. *Scientific reports*, 6;30321.
26. Straub, S.G., James, R.F., Dunne, M.J., Sharp, G.W. (1998). Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets. *Diabetes*, 47(5);758-763.

27. Thompson, E.M., Sollinger, J.L., Opara, E.C., Adin, C.A. (2018). Selective osmotic shock for islet isolation in the cadaveric canine pancreas. *Cell Transplantation*, 27(3); 542-550.

28. Tiedge, M., Lenzen, S. (1991). Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem J*, 279 (Pt 3); 899-901.

29. Xin, Y., Kim, J., Okamoto, H., Ni, M., Wei, Y., Adler, C., et al. (2016). RNA sequencing of single human islet cells reveals type 2 diabetes genes. *Cell Metabolism*, 24(4); 608-615.

30. Zhang, B., Lai, G., Wu, J., Sun, R., Xu, R., Yang, X., et al. (2016). 20-HETE attenuates the response of glucose-stimulated insulin secretion through the AKT/GSK-3 β /Glut2 pathway. *Endocrine*, 54(2); 371-382.



Archive of SID

Gene Expression Analysis of GluT2 and Glucokinase in Pancreatic Islets and Whole Pancreas Tissue

S. Ghorbani-Dalini¹, **M.H Sangtarash¹**, **N. Azarpira²**, R. Yaghobi², H.R. Soleimanpour-Lichaei³

1. Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. sangtarash@science.usb.ac.ir

2. Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran. negarazarpira@yahoo.com

3. Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Received: 2018.29.12

Accepted: 2019.10.3

Abstract

Introduction & Objective: Pancreatic Islets are endocrine part of the pancreas responsible for several hormone secretions, which regulates blood glucose and involves in metabolism of energy. Islet β cell responsible for secretion of insulin in response to glucose changes. The first step of this process includes glucose entry into the cell using GluT2 transporter followed by glucose phosphorylation by glucokinase as an intra cellular glucose sensor. Therefore, the aim of this study was the analysis of GluT2 and glucokinase gene expression in pancreatic islets in comparison with whole pancreas tissue.

Material and Methods: This study was performed on a pancreatic tissue received from a brain death person. Islets were purified from a total pancreas. To investigate the successful isolation of the islets, the gene expression of Ptf1a, as a marker of the exocrine part of the pancreas, was investigated. Then, gene expression of GluT2 and glucokinase was investigated in both islets and total pancreatic tissue.

Results: The lack of expression of the Ptf1a in the pancreatic islets indicates successful separation and high purity of isolated islets. Moreover, GluT2 and glucokinase genes were highly expressed in pancreatic islets. Furthermore, statistical analysis revealed that gene expression of GluT2 and glucokinase was significantly higher in pancreatic islets than in complete tissue.

Conclusion: The results indicate the high expression and importance of GluT2 and glucokinase genes in the endocrine part of the pancreas as a glucose transporter and sensor, respectively in the process of glucose-stimulated insulin-secretion. In addition, the method used in this study is very efficient for purification of islets from pancreatic tissue.

Keywords: Pancreatic Islets, GluT2, Glucokinase.

Archiv