

## مطالعه تغییرات بیان ژن لپتین در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

نصرت اله ضرغامی<sup>۱\*</sup>، بهرنگ علنی<sup>۱</sup>، حبیب عنصری<sup>۲</sup>، اکرم تمیزی<sup>۱</sup>، مهران مسگری<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** لپتین، یک هورمون پپتیدی است که محصول ژن ob می باشد. نقش این هورمون لیپواستاتیک، کنترل و تنظیم وزن بدن از طریق کاهش اشتها یا افزایش صرف انرژی در انسان و جوندگان است. در این مطالعه تغییرات بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی دیابتی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بررسی شدند.

**روش‌ها:** تعداد ۴۰ موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ دالی انتخاب شدند. ۲۰ رت پس از تزریق داخل صفاقی ۶۰mg/kg استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. میزان قند خون به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز، لپتین به روش ایمنواسی و انسولین به روش الیزا اندازه گیری شدند. بعد از یک هفته، از هر دو گروه بافت چربی اپیدیدیم، کبد و طحال برداشت گردید. برای بررسی تغییرات بیان ژن لپتین، RNA بافتی استخراج گردیده و cDNA لپتین با تکنیک RT-PCR بعنوان ژن مورد مطالعه به همراه cDNA بتا اکتین، به عنوان کنترل داخلی بدست آمد و متعاقباً PCR انجام گردید. محصول عمل RT-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

**یافته‌ها:** میانگین غلظت سرمی لپتین در قبل از ایجاد دیابت  $0/45 \pm 5/23$  نانوگرم در میلی لیتر محاسبه شد. این مقدار پس از دیابتی کردن رت‌ها با استرپتوزوتوسین به مقدار  $0/25 \pm 0/79$  نانوگرم در میلی لیتر رسید که این کاهش کاملاً معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). بین میانگین غلظت لپتین با انسولین در رت‌های دیابتی، همبستگی مستقیم و معنی داری مشاهده شد ( $r = 0/37, P < 0/05$ ). در صورتی که این همبستگی در قبل از تیمار با استرپتوزوتوسین معکوس و معنی دار بود ( $P < 0/05$ ،  $r = -0/28$ ). مطالعه بیان ژن لپتین با روش RT-PCR در بافت‌های چربی اپیدیدیم، کبد و طحال، نشان داد که شدت باند لپتین با وزن ملکولی ۴۵۳ bp در رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های سالم کاهش یافته بود. ولی شدت باند بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی با وزن ملکولی ۴۰۳ bp در هر دو گروه ثابت باقی مانده بود. بعلاوه کاهش بیان ژن لپتین در بافت چربی اپیدیدیم نسبت به دو بافت کبد و طحال کاملاً چشمگیر بود.

**نتیجه‌گیری:** از این یافته می توان استنباط کرد که بیان ژن لپتین تحت کنترل سازوکار است که می تواند وابسته به انسولین باشد و شاید با تعدیل تنظیم بیان ژن لپتین در بیماران دیابتی بتوان از آن در موارد کاربردی بالینی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** بیان ژن لپتین، دیابت نوع یک، استرپتوزوتوسین

۱- مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند

\* **نشان‌ی:** تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، آزمایشگاه رادیوفارماسی، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۲۲۳۴

داخلی ۲۴۱؛ پست الکترونیک: zarghami@tbzmed.ac.ir

## مقدمه

چاقی به عنوان عامل مستعد کننده برای ابتلا به بیماری‌های دیابت نوع یک و دو در انسان و جوندگان محسوب می‌شود [۱]. اگرچه ژنتیک سندرم دیابت در انسان به میزان کمی شناخته شده است با این حال جایگاه مربوط به ژن چاقی بر روی کروموزوم جوندگان مختلف و انسان شناسایی شده است [۲].

ژن *ob* در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار در موش و سپس همولوگ آن در انسان کشف شد. محصول این ژن، لپتین نامگذاری شد که از واژه یونانی *Leptin* به معنی لاغر مشتق شده است. این هورمون با وزن ملکولی ۱۶ کیلودالتون و ۱۶۷ اسید آمینه دارای یک ساختمان مارپیچ مشابه سایتوکاین‌ها است [۳]. لپتین بطور عمده در بافت چربی سفید بیان می‌شود اما سطح کمتری از آن در جفت، عضلات اسکلتی معده، اپیتلیوم پستان و مغز نیز دیده شده است [۴،۵]. لپتین در داخل رگ‌های خونی ترشح می‌شود و می‌تواند به عنوان یک عامل پیام رسان در یک سامانه پس‌نورد در مغز باشد. هورمون لپتین نقش مهمی را در تنظیم ذخیره چربی و تعادل انرژی بدن، افزایش مصرف انرژی در طی فعالیت مغز، کاهش اشتها و کاهش وزن بدن دارا می‌باشد. میزان لپتین بطور کل وابسته به ذخایر تری‌گلیسیرید و توده بافت چربی است [۶].

اثر تحرکی انسولین در بیان ژن لپتین و ترشح آن شناخته شده است. انسولین باعث افزایش رونویسی ژن *ob* در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی می‌شود [۷]. از طرف دیگر لپتین ترشح انسولین را یا به وسیله فعال کردن کانال *KATP* و یا به وسیله مهار فیدبکی بیان ژن انسولین، مهار می‌کند. این امر نشان می‌دهد که انسولین و هورمون‌های استروئیدی در تنظیم بیان لپتین دخالت دارند [۸]. لذا در این مطالعه سعی ما بر این خواهد بود که تغییرات بیان ژن لپتین در موش‌های دیابتی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین<sup>۱</sup> مورد بررسی قرارگیرد.

## روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش، ۴۰ موش صحرایی (*Rat*) جنس نر از نوع آلبینو و نژاد *Sprague Dawley* با میانگین وزنی ۲۰۰-۳۵۰ گرم بودند که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شده و در مرکز نگهداری حیوانات در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت شرایط کنترل شده از نظر دما و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. تغذیه حیوانات از غذای آماده که تفاله غلات بود به همراه مقدار آب کافی انجام گرفت. حیوانات در دو گروه ۲۰ تایی مورد (دیابتیک) و شاهد انتخاب شدند. وزن رت‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۲ گرم اندازه‌گیری شد.

به گروه شاهد سالیین تزریق شد. دیابتی کردن رت‌ها با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین (شرکت فارماسیا<sup>۲</sup>) انجام شد. این ویال در ۹/۵ میلی لیتر محلول نرمال سالیین (سرم فیزیولوژی سدیم کلراید ۰/۹ درصد استریل) حل شد و به مقدار ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی تزریق شد. طبق این روش ۷۲ ساعت پس از تزریق، موش‌های صحرایی دیابتی می‌شوند. خونگیری از ورید سینوس اربیتال گوشه داخلی چشم بوسیله لوله هماتوکریت انجام شد. پلاسمای نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شد و تا زمان اندازه‌گیری لپتین، انسولین و گلوکز در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند.

مقدار گلوکز خون سرم به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز با استفاده از کیت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. در تمامی موش‌های صحرایی، غلظت گلوکز سرمی بالای ۳۵۰ mg/dl مشخص شد که حاکی از دیابتی شدن آنها بود. غلظت پلاسمایی لپتین به روش ایموناسی از نوع ساندویچی و رقابتی (کیت شرکت *IBL*، ژاپن) با استفاده از لپتین رت نوترکیب بعنوان استاندارد و دو آنتی بادی اختصاصی ضد لپتین اندازه‌گیری شد. برای سنجش سطح سرمی انسولین از روش الیزا شامل آنتی بادی‌های با میل ترکیبی بالا و اختصاصی (آنزیم کنژوگه و ثابت شده)

<sup>۲</sup> Pharmacia<sup>۱</sup> Sterptozotocin

اپندروف‌های جدید منتقل شده، مقدار ۶۰۰ μl ایزوپروپانل ۲۰°C- به آن اضافه شد و مواد داخل بمدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی به آرامی خارج شده و رسوب RNA حاصل با اتانل ۷۵ درصد سرد شست‌و‌شو داده و پس از سانتریفیوژ بمدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰x g ، رسوب باقیمانده در ۳۰ μl از Depc water حل شد و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۷۰ °C - نگهداری گردید. کیفیت RNA استخراج شده با روش اندازه گیری میزان جذب ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید.

طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار الیگو ویرایش پنجم انجام گرفت. اطلاعات مربوط به توالی های پرایمر در جدول ۱ آورده شده است. طی بررسی های به عمل آمده در NCBI ، مشخص شد که برخی از نواحی ژن مورد بررسی با برخی نواحی ژن‌های دیگر همولوگ بوده و بنابراین طراحی پرایمر از این نواحی منجر به ایجاد باندهای دیگر خواهد شد. به این ترتیب، پرایمر اختصاصی و منحصر به فرد ژن که هی‌چگونه مشابهتی با

دارای نواحی متفاوت و شاخص اپی توپی و با استفاده از سیستم بیوتین- استرپتوودین ( کیت شرکت DRG، آلمان ) استفاده شد.

پس از اطمینان از دیابتی شدن، حیوانات توسط اتر بیهوش شده و بافت چربی، اپیدیدیم، کبد و طحال موش‌های دیابتیک و شاهد به روش بیوسی خارج گردید. بافت‌ها با استفاده از نیتروژن مایع پودر شده و پس از آن تا زمان استفاده آنها برای استخراج RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA با استفاده از روش TRIzol™ (کیت شرکت Gibco BRL ) انجام گردید. مقدار ۰/۲۵ گرم از نمونه پودر شده با افزودن مقدار یک میلی لیتر از معرف ترایزول داخل لوله های اپندروف بشدت بهم زده شد و نمونه ها در دمای ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه قرارداده شد. سپس ۲۰۰ μl محلول کلورفرم: ایزوآمیل الکل سرد( با نسبت ۴۹:۱ ) به نمونه ها اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه قرار داده شدند. لوله ها بمدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰x g سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

آغازگر	توالی	درجه حرارت اتصال	G+C درصد مقدار
Lp 1	5'- TCACACACGCAGTCGGTATC-3'	۶۲	۵۵
LP 2	5'-CATGATTCTTGGGAGCCTGG -3'	۶۲	۵۵
BA 1	5'- ACCGTGAAAAGATGACCCAG-3'	۶۲	۵۵
BA 2	5'-CCATACCCAAGAAGGAAGGC-3'	۶۰	۵۰

جدول ۲- وزن و سطوح سرمی لپتین، انسولین و گلوکز نمونه ها قبل و بعد از تیمار با استرپتوزوتوسین

تیمار با استرپتوزوتوسین	سالم	متغیر *
میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
۲۱۰ ± ۳۳	۲۹۶ ± ۴۵	وزن (گرم)
۰/۷۹ ± ۰/۲۵	۵/۲۳ ± ۰/۴۵	لپتین (ng/ml)
۰/۱۳ ± ۰/۰۵	۰/۸۰ ± ۰/۱۸	انسولین (ng/ml)
۴۸۵/۱۳ ± ۱۲/۱۱	۹۵/۱۱ ± ۸/۳۶	گلوکز (mg/dl)

\* در همه موارد مقادیر P از لحاظ آماری معنی دار بود (P<۰/۰۵)

در دمای ۹۴ درجه، ۲۵ سیکل شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر بمدت ۹۰ ثانیه در دمای، سنتز DNA بمدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه، تک رشته‌ای شدن DNA های سنتز شده بمدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ و یک سیکل جهت تکمیل اتصال پرایمر و تکمیل سنتز DNA بمدت ۲ دقیقه بترتیب در دماهای ۳۱ و ۷۲ بر روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید. بعد از اتمام PCR، کلیه محصولات PCR همراه با نشانگرهای ملکولی DNA بر روی ژل آگارز اکریل آمید ۱۵ درصد الکتروفورز شدند. از ژل‌ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی با آب مقطر، در زیر نور UV توسط دستگاه UVPDoc عکس برداری شد.

محاسبه آماری داده‌های حاصل با استفاده از ویرایش شماره ۱۱/۵ نرم افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد. از آزمون t مزدوج جهت مقایسه تفاوت میانگین های کمی استفاده گردید. اختلاف آماری به میزان  $P < 0/05$ ، دو دنباله معنی دار در نظر گرفته شد. تمام نتایج به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین گزارش گردید.

## یافته‌ها

مشخصات دموگرافیک و سطوح سرمی شاخص‌های اندازه‌گیری شده، قبل و بعد از ابتلا به دیابت در جدول ۲ مقایسه شده‌اند. همانگونه که پیداست کاهش وزن در رت‌ها یک هفته پس از دیابتی شدن نسبت به حالت قبل از دیابتی شدن کاملاً معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). میانگین غلظت سرمی لپتین در قبل از ایجاد دیابت  $0/45 \pm 5/23$  نانوگرم در میلی لیتر محاسبه شد. این مقدار پس از دیابتی کردن رت‌ها با استرپتوزوتوسین به مقدار  $0/25 \pm 0/79$  نانوگرم در میلی لیتر رسید که این کاهش مقدار کاملاً معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). غلظت انسولین پلاسما در نمونه‌های قبل از دیابتی شدن  $0/18 \pm 0/80$  نانوگرم بر میلی لیتر بود که در نمونه‌های دیابتی به  $0/05 \pm 0/13$  نانوگرم در میلی لیتر کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). سطح سرمی گلوکز در نمونه های اولیه  $8/36 \pm 95/11$  mg/dl بود که این مقدار پس از دیابتی شدن به  $12/11 \pm 485/13$  mg/dl افزایش یافت.

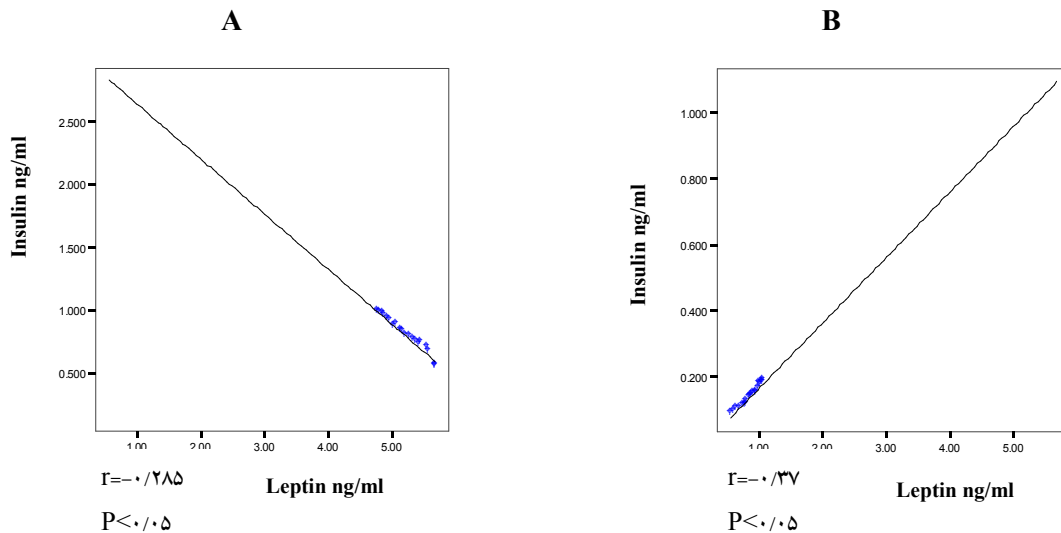
سایر نواحی مربوط به ژن‌های دیگر را نداشته باشد طراحی شد. از آنجایی که برای مطالعه بیان ژن نیازمند استفاده از ژنهای خانه دار هستیم، پرایمر اختصاصی بتا اکتین برای آن نیز طراحی شد. استفاده از ژنهای خانه دار بدلیل بیان یکسان آنها در تمام بافت‌ها در شرایط مختلف بوده بنابراین استفاده از آن برای مقایسه میزان بیان ژن مورد مطالعه در قیاس با بیان یکسان ژن خانه دار می باشد. به منظور بهینه‌سازی شرایط RT، غلظت واکنش‌گرها بر اساس دستورالعمل کیت شرکت شرکت Gibco BRL برای حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ تا ۵۰۰ نانوگرم از Total RNA، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از اولیگو dT و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم در داخل لوله های میکرو اپندورف آماده شد. نمونه ها در دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس فوراً در داخل یخ خنک شدند. در مرحله بعد ۵ میکرولیتر از بافر رشته اول، ۲ میکرولیتر از محلول ۰/۲ مولار دی تیوتریتول و ۱ میکرولیتر از آنزیم مهار کننده ریبونوکلئازی به همراه ۱ میکرولیتر از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به مخلوط اضافه شد. نمونه ها در دمای ۴۲ درجه به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه شدند و پس از آن جهت غیر فعال کردن واکنش نمونه ها بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه حرارت داده شدند.

مخلوط هر یک از واکنش های PCR بر اساس بکار گیری از جفت پرایمرهای توالی ژن لپتین تحت عناوین LP1 و LP2 به عنوان متغیر و بتا اکتین تحت عناوین BA1 و BA2 به عنوان کنترل (جدول ۱) شامل ۵ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۰/۴ واحد از آنزیم Taq DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از dNTP ها، ۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، منیزیم کلرید با غلظت ۱/۵ میلی مولار، ۲ میکرولیتر از cDNA به همراه ۳۸/۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تهیه شد. پس از آماده سازی واکنشگرهای PCR چند گانه، برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندروف<sup>۱</sup> آمریکا) تنظیم گردید. در این برنامه یک سیکل جهت تک رشته‌ای شدن کلی DNA اولیه بمدت ۳ دقیقه

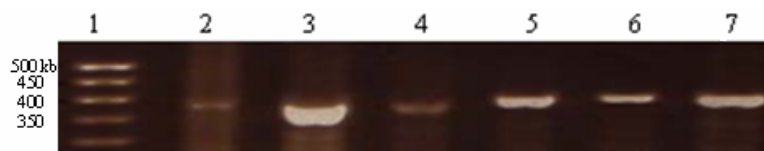
<sup>1</sup> Eppendorf

برای بررسی بیان ژن لپتین بافت‌های چربی اپیدیدیم، کبد و طحال مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور واکنش PCR طراحی و انجام شد. برای مقایسه میزان بیان ژن لپتین بعنوان متغیر و ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی پس از بهینه کردن روش RT-PCR، در مرحله

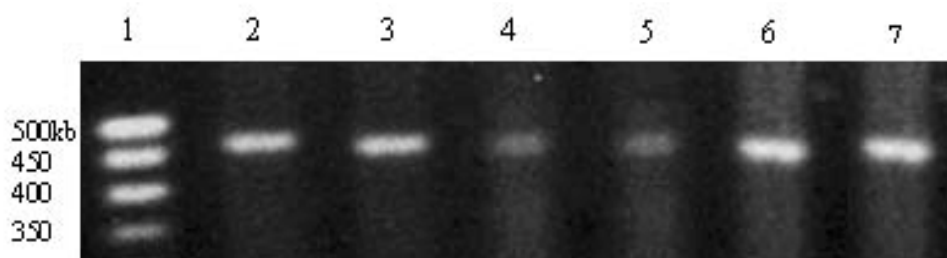
(جدول ۲) ( $P < 0/05$ ) همبستگی مستقیم و معنی داری نیز بین مقادیر لپتین و انسولین در افراد بیمار ( $r = 0/37$ ) مشاهده شد که این همبستگی قبل از دیابتی شدن معکوس ( $r = -0/285$ ) و معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۱).



شکل ۱ - نمودار ارتباط پراکنده‌گی Leptin در مقابل Insulin در نمونه های سالم و دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نمودار A قبل و نمودار B پس از دیابتی شدن، \*حجم نمونه = ۴۰،  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد



شکل ۲- محصول RT-PCR ژن لپتین به طول ۴۵۳ bp همراه با DNA مارکر M50 بر روی ژل اکریل آمید ۱۵ درصد در بافت های مختلف که به ترتیب، ۱- نشانگر، ۲- بافت اپیدیدیم تیمار شده با استرپتوزوتوسین، ۳- بافت اپیدیدیم سالم، ۴- بافت طحال تیمار شده، ۵- بافت طحال سالم، ۶- بافت کبد تیمار شده و ۷- بافت کبد سالم، نشان داده می شوند. اندازه نشانگرهای ملکولی DNA در سمت راست شکل نشان داده شده است.



شکل ۳- محصول RT-PCR ژن بتا-اکتین به طول ۴۰۳bp به همراه DNA مارکر M50 بر روی ژل اکریل آمید ۱۵ درصد در بافت های مختلف که به ترتیب ۱- نشانگر، ۲- بافت اپیدیدیم تیمار شده، ۳- بافت اپیدیدیم سالم، ۴- بافت طحال تیمار شده، ۵- بافت طحال سالم، ۶- بافت کبد تیمار شده و ۷- بافت کبد سالم، نشان داده می شوند. اندازه نشانگرهای ملکولی DNA در سمت راست شکل نشان داده شده است.

شاهد دچار افت شدید می‌شود. غلظت انسولین پلاسما در نمونه‌های دیابتی کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت. در مطالعات مختلف گزارش شده است که لپتین و انسولین سرمی در حیواناتی که با استروپتوزوتوسین دیابتی شده اند افت شدیدی را نشان می‌دهد. در مطالعه ما نیز کاهش بسیار بالای لپتین و انسولین ظرف ۳ روز پس از تزریق مشاهده شد [۹-۱۰]. در مطالعات مختلف هم این مدت زمان را تأیید می‌کنند. البته روش تزریق و دوز دارو نیز می‌تواند بر زمان ابتلا به بیماری دیابت تأثیر گذارد. چرا که Havel و همکارانش در مطالعه ای که بر روی رت‌ها انجام دادند، نشان دادند که غلظت سرمی لپتین در رت‌ها دو هفته بعد از تیمار با استروپتوزوتوسین بطور قابل برجسته ای کاهش می‌یابد [۱۱]. برای بررسی بیان ژن لپتین، بافت‌های چربی اپیدیدیم، کبد و طحال مورد استفاده قرار گرفت. شدت باند های لپتین و بتا اکتین در رت‌های شاهد و بیمار گویای این مطلب است که میزان بیان ژن لپتین در رت‌های بیمار نسبت به رت‌های سالم کاهش یافته است. نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعاتی که قبلاً در این مورد صورت گرفته بود مطابقت نشان می‌دهد. بطوری که Abbas ZG و همکارانش با بررسی روی بیان لپتین در بیماران دیابتی نوع ۲ چاق و نرمال، یکی از علل اختلاف در میزان بیان لپتین را به سطوح انسولین و حساسیت به انسولین نسبت دادند و بیان می‌دارند که این به خاطر تحریک بیان لپتین به وسیله انسولین می‌باشد [۱۲]. Sliker و همکارانش نشان دادند که تیمار انسولین، ترشح لپتین را تنها ۲۵-۲۰٪ افزایش می‌دهد. ایشان نشان دادند که اثرات انسولین بر روی بیان ob mRNA متفاوت می‌باشد که احتمالاً منعکس کننده مشکل اندازه گیری تغییرات کوچک در RNA به وسیله آنالیز نورترن بلات باشد. همچنین آنها نشان دادند که انکوباسیون آدیوسیت ها با ۲۵mM گلوکز هیچ تأثیری بر روی بیان ob mRNA ندارد که این نشان دهنده این است که احتمالاً بیان ob بطور مستقیم بوسیله گلوکز تنظیم نمی‌شود. بطور مشابهی یک گزارش اخیر به وسیله Saladin و همکارانش نشان داد که تزریق انسولین تنها بدون وابسته به غلظت گلوکز بیان ob mRNA را

دوم از روش PCR چندگانه<sup>۱</sup> استفاده شد. شرایط انجام PCR و میزان بار واکنشگرها، در تمامی موارد یکسان در نظر گرفته شدند. بررسی قطعات به دست آمده نشان داد که طبق پیش بینی، در نتیجه انجام PCR، دو قطعه به طول‌های ۴۰۳bp مربوط به لپتین و ۴۵۳bp مربوط به بتا اکتین بدست آمد. اعداد مربوطه از طریق مقایسه باندهای بدست آمده با نشانگر ملکولی M50 که دارای باندهای DNA با اندازه بین ۵۰۰ bp تا ۱۰۰ bp تعیین گردید.

شدت باند های لپتین و بتا اکتین بصورت کیفی در افراد شاهد و بیمار در دو شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شوند. همان‌طور که مشاهده می‌شود؛ میزان پهنای باند در رت‌های سالم بمراتب بیشتر از رت‌های بیمار می‌باشد بنابراین میزان بیان ژن لپتین در رت‌های بیمار دیابتیک نسبت به رت‌های سالم کاهش یافته است. از طرف دیگر مقایسه شدت باند مربوط به لپتین در بافت چربی اپیدیدیم در افراد شاهد بیشتر از باند لپتین در طحال و کبد می‌باشد؛ بنابراین میزان بیان آن در بافت چربی بیشتر از سایر بافت هاست. با این‌که پس از دیابتی شدن رت‌ها میزان بیان ژن لپتین در هر سه نمونه کاهش یافته اما بیشترین کاهش شدت باند در چربی بافت اپیدیدیم قابل مشاهده بوده و در بافت کبد و طحال بمراتب این کاهش شدت باند کمتر می‌باشد (شکل ۲). از طرف دیگر میزان بیان ژن بتا اکتین در افراد شاهد و بیمار هر نمونه بافتی تفاوت چندانی نداشته و این میزان بیان در افراد بیمار و شاهد یکسان می‌باشد. به عبارت دیگر عدم تغییر در بیان ژن بتا اکتین نشانگر صحت انجام مراحل بررسی بیان ژن لپتین بعنوان متغیر می‌باشد (شکل ۳).

## بحث

در این مطالعه تغییرات بیان ژن لپتین در موش‌های دیابتی هدف مورد مطالعه بوده است. طبق نتایج بدست آمده از این مطالعه، پس از دیابتی شدن موش‌های صحرائی مشاهده شد که میانگین غلظت سرمی لپتین بطوری کاملاً معنی‌دار، در نمونه‌های دیابتی نسبت به گروه

<sup>1</sup> Multiplex PCR

از طرف دیگر مقایسه شدت باند مربوط به لپتین در بافت چربی اپیدیدیم در افراد شاهد بیشتر از باند لپتین در طحال و کبد می‌باشد؛ بنابراین میزان بیان آن در بافت چربی بیشتر از سایر بافت هاست. با این‌که پس از دیابتی شدن رت‌ها میزان بیان ژن لپتین در هر سه نمونه کاهش یافته؛ اما بیشترین کاهش شدت باند در چربی بافت اپیدیدیم قابل مشاهده بوده و در بافت کبد و طحال به مراتب این کاهش شدت باند کمتر می‌باشد.

چندین برابر افزایش می‌دهد [۱۳]. Murakami و همکارانش گزارش کردند که تیمار آدیپوسیت‌ها با انسولین در آزمایشگاه تنها ۱۰٪ بیان *ob* mRNA را افزایش می‌دهد [۱۴]. مطالعه دیگری که بر روی تنظیم بیان ژن *ob* صورت گرفته، نشان داده است که یک کمپلکس پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالی وجود دارد که تحریک سنتز لپتین بوسیله انسولین را واسطه‌گری می‌کند [۱۵]. پس به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که انسولین قادر به افزایش بیان لپتین می‌باشد.

## مآخذ

- Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989; 149:1514-20.
- Leiter EH. Obesity genes and diabetes induction in the mouse. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1993; 33: 333-8.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:413-37.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends. Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-32.
- Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 83: 1407-13.
- Friedman, J.M., Halaas, J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395:763-770.
- Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996; 8; 271: 5301-4.
- Felber JP, Haesler E, Jequier E. Metabolic origin of insulin resistance in obesity with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1221-9.
- Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohoue P, Haynes W, Leibel RL. Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 1998; 47: 584-91.
- Ramsay TG, White ME. Insulin regulation of leptin expression in streptozotocin diabetic pigs. *J Anim Sci* 2000; 78: 1497-503.
- Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, Keen CL, Ahren B. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt 2):R1482-91.
- Abbas ZG a,b, Lutale JKb, Ahrén Bc. Leptin Levels in Obese and Non-Obese African and Caucasian Subjects With Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol Metab* 2004; 2: 61-65.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995; 377: 527-9.
- Murakami T, Iida M, Shima K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 1260-7.
- Bradley RL, Cheatham B. Regulation of *ob* gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 1999; 48: 272-8.