

بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت

نسیمه وطن دوست^۱، صدیقه مؤمن زاده^۲، سارا کمالی^۳، دکتر رسول صالحی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری متابولیکی مزمن است که نرخ شیوع آن به سرعت در حال افزایش است و تعداد افراد زیادی را مبتلا می‌کند. علت این بیماری، ناشناخته است و گفته می‌شود برهمکنش عوامل ژنتیک، اپیژنتیک و محیطی از جمله چاقی مستعد کننده‌ی ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ هستند. miRNA به عنوان یکی از عوامل کلیدی در تنظیم بیان ژن با مهار ترجمه و یا تجزیه‌ی mRNA عمل می‌کند و این احتمال وجود دارد که miRNA در رخدادهای مقاومت انسولین و دیابت نوع ۲ نقش داشته باشند. یافته‌های جدید استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را به عنوان منعکس کننده‌ی وضعیت پاتولوژیک بافت‌ها معرفی کرده‌اند که می‌تواند منبع مناسبی جهت مطالعات و تشخیص‌های مولکولی در بیماری‌ها همچون بیماری دیابت نوع ۲ باشد. از جمله miRNAهای دخیل در مراحل مختلف دیابت نوع ۲، به خصوص مقاومت انسولین به عنوان اولین و مهم‌ترین عامل خطر دیابت نوع ۲، miR-103 می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی رت‌های مبتلا به دیابت القا شده به واسطه‌ی رژیم غذایی چرب/تزریق Streptozotocin در دو مرحله‌ی پیش دیابت و دیابت و مقایسه‌ی آن با رت‌های سالم بود.

روش‌ها: مدل حیوانی دیابت نوع ۲ با استفاده از ترکیب رژیم غذایی با چربی بالا و تزریق دوز پایین Streptozotocin (35 mg/kg) ایجاد شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی رت‌های مبتلا در دو مرحله‌ی پیش دیابت (قبل از تزریق Streptozotocin) و دیابت (پس از تزریق) و همچنین رت‌های سالم جداسازی شد. RNA با استفاده از Trizol از سلول‌ها استخراج و سپس به cDNA (Complementary DNA) تبدیل شد. سطح بیان miR-103 به وسیله‌ی تکنیک qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction) و حضور معرف SYBR Green و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی rno-miR-103 LNA TM Primerset سنجیده شد.

یافته‌ها: ترکیب رژیم غذایی چرب همراه با تزریق دوز پایین STZ می‌تواند دیابت نوع ۲ را به خوبی در رت‌ها القا کند. میانگین بیان rno-miR-103 در رت‌ها در مرحله‌ی دیابت و پیش دیابت نسبت به رت‌های سالم تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش حاضر، اهمیت miR-103 را در پاتوژنز دیابت نوع ۲ به خصوص در مراحل اولیه نشان می‌دهد و همچنین امکان مناسب بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را به عنوان یک منبع در دسترس و غیر تهاجمی در مطالعات و یا تشخیص‌های مولکولی برای پیش‌بینی و پیگیری شرایط بیماری دیابت فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، تشخیص غیر تهاجمی، miR-103, microRNA

ارجاع: وطن دوست نسیمه، مؤمن زاده صدیقه، کمالی سارا، صالحی رسول. بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای

خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۵۶-۱۷۴۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

دیابت شایع‌ترین اختلال متابولیکی است که در اثر نقص در تولید، ترشح یا عملکرد انسولین به وجود می‌آید. تعداد افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در جهان در طول سه دهه‌ی اخیر در حدود ۲ برابر افزایش یافته است. بر اساس گزارش‌ها، این رقم در سال ۲۰۱۱ به ۳۶۶ میلیون نفر رسیده است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ به ۵۲۲ میلیون نفر نیز افزایش یابد (۱). نقص در عملکرد انسولین (ناتوانی در بافت هدف در پاسخ به غلظت انسولین خون)، ابتدایی‌ترین و معمول‌ترین علت ایجاد دیابت تیپ ۲ است و کاهش ترشح انسولین پانکراس نقص نسبی در عملکرد ایجاد می‌کند و منجر به افزایش قند خون می‌گردد (۲-۳).

سطح بالای گلوکز خون با گذر زمان منجر به آسیب‌های شدید در چندین ارگان مختلف از جمله آسیب‌های کلیوی، رتینوپاتی، نابینایی، آسیب‌های عصبی و عروقی می‌گردد (۴). علاوه بر این، طولانی بودن مراقبت‌های پزشکی بدون درمان قطعی، این بیماری را به معضل بزرگ اقتصادی در سراسر جهان تبدیل ساخته است. اقدامات پیشگیرانه و تشخیص زودهنگام در صورت وجود یک نشانگر زیستی مناسب با سطوح قابل ردیابی قبل از ایجاد علائم، می‌تواند راه حلی جایگزین در این بیماری باشد.

علل ایجاد دیابت نوع ۲، مجموعه‌ای پیچیده از عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و همچنین تأثیرات محیطی است (۵). در سال‌های اخیر، مطالعاتی برای شناسایی اجزایی با نقش اساسی در شروع و پیشرفت دیابت طراحی شده‌اند (۶). مطالعاتی بر اساس پروتئین و بیان ژن برای مشخص شدن روند و یا

نقص در مسیرهای سیگنال‌دهی در ایجاد بیماری دیابت استفاده شده است. اما مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی دیابت هنوز مشخص نیست.

پس از کشف تنظیمات پس از رونویسی ژنوم، miRNA به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی کلیدی در بیان ژن معرفی شد که به احتمال در روند مقاومت انسولینی و ایجاد دیابت نوع ۲ نیز مؤثر است (۷-۸). miRNAها گروهی از RNAهای غیر کد شونده‌ی درون‌زاد با طول ۱۹-۲۲ نوکلئوتید هستند که توالی آن‌ها در بسیاری از گونه‌ها به صورت حفظ شده است (۹).

این اجزا با اتصال به ناحیه‌ی 3'UTR و در برخی موارد به 5'UTR و یا ناحیه‌ی کد شونده‌ی mRNA هدف، در تنظیم پس از رونویسی ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین‌ها دخالت دارند (۱۰). نحوه‌ی عملکرد این اجزا می‌تواند به وسیله‌ی تجزیه کردن نسخه‌ی رونویسی شده و یا مهار ترجمه‌ی آن به پروتئین باشد و این فرایند، به اتصال کامل یا نسبی بخش بنیادی miRNA (نوکلئوتیدهایی که برای اتصال miRNA به RNA الزامی است) با محل هدف، بستگی دارد (۱۱-۱۲).

با مشخص شدن خاصیت کلیدی تنظیمی miRNA در روندهای فیزیولوژی سلولی و نقش‌های متفاوت بیولوژیکی آن از جمله تمایز، تکثیر، مرگ سلولی، ترشح هورمون و غیره، این اجزا مورد هدف تحقیقات قرار گرفتند (۱۳). بروز تأثیر بیولوژیکی mRNA مستلزم ترجمه‌ی آن‌ها به پروتئین است. در حالی که miRNA می‌تواند واحد عملکردی مستقلی باشد (۱۴). علاوه بر miRNAهایی با هدف منفرد، برخی از آن‌ها می‌توانند گروهی از mRNAهای مرتبط را مورد هدف قرار دهند و از این جهت، تأثیر

ابزار ارتباطی متنوع که به سلول‌های دیگر انتقال می‌یابند، می‌توانند عملکردی مشابه در سلول‌های وارد شده داشته باشند (۲۶-۲۵). بر اساس این گزارش‌ها، می‌توان از miRNAهای خونی به منظور بررسی آثار دیابت استفاده کرد.

با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و اطلاعات موجود در مستندات پیشین، از بین miRNAهای دخیل در دیابت نوع ۲، miRNA با نقش کلیدی در مراحل مختلف دیابت از جمله مقاومت انسولین، گسترش چربی و چاقی و نقص ترشح انسولین در نظر گرفته شد (۳۰-۲۷). miR-103 در این مطالعه مورد هدف قرار گرفت و تغییرات پروفایل بیانی آن در سلول‌های گردش خون در سه گروه رت شامل گروه سالم، گروه پیش دیابت با رژیم غذایی پر چرب (HFD یا High fat diet) و گروه مبتلا به دیابت با القا از طریق STZ (Streptozotocin) و رژیم غذایی پر چرب بررسی شد.

روش‌ها

۱۶ رت Wistar مذکر شش هفته‌ای با متوسط وزن 150 ± 5 gr مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات بر اساس راهنمای نگهداری از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در قفس‌های استاندارد (۳ عدد در هر قفس) و رطوبت کنترل شده با چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

همه‌ی رت‌ها رژیم غذایی طبیعی دریافت کردند. دیابت نوع ۲ (T2D یا Type 2 of Diabetes) طبق پروتکل Reed و همکاران و نیز Srinivasan و همکاران با تغییرات جزئی انجام گرفت (۳۲-۳۱). بعد از یک هفته نگهداری، برای تطابق حیوانات با

زیادی بر کنترل مسیرهای پیچیده‌ی متابولیکی و مؤثر در بیماری‌ها دارند (۱۵). بنابراین در اختلالات چند عاملی، پروفایل بیان یک ژن واحد بازتابی از یک شبکه‌ی گسترده است که حتی یک miRNA منفرد به دلیل عملکرد چندگانه‌ی آن می‌تواند علامتی اختصاصی و قطعی‌تری در مسیرهای پیچیده‌ی سیگنال‌دهی باشد (۱۶).

تغییر در بیان miRNA در بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های چند عاملی پیچیده مانند سرطان، آسیب‌های عصبی و بیماری‌های قلبی-عروقی مشاهده شده است (۱۷). گزارش‌های اخیر نشان داده است که miRNA می‌تواند نقش مهمی در ایجاد بیماری دیابت نوع ۲ از جمله عدم حساسیت به انسولین، تولید انسولین و ترشح آن، چاقی و در معنای گسترده‌تر هموستاز گلوکز و لیپید واضح است. گزارش‌های موجود به خوبی نظریه‌ی پروفایل بیانی miRNA به عنوان نشانگر زیستی برای بررسی اولیه‌ی مراحل آغازین دیابت در بافت‌های مرتبط با دیابت مانند پانکراس، کبد و ماهیچه‌ی اسکلتی و بافت چربی را تأیید می‌کند (۲۲-۱۸). اگر چه مانع مهم در استفاده از این گونه نشانگرهای تشخیصی و غربالگری اولیه، ماهیت تهاجمی و سخت در نمونه‌گیری است که با روند تهیه‌ی بیوپسی همراه است. خون به عنوان نماینده‌ی بافتی معرفی شده است که در تماس مداوم و نزدیک با ارگان‌های مختلف، بازتابی از تغییرات در این ارگان‌ها است و نسخه‌های RNA گردش خون، حوادث فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بافت‌های مختلف بدن را به نمایش می‌گذارد (۲۵-۲۳).

تصور می‌شود miRNAهای آزاد به عنوان یک

محلول ۲۰ درصد گلوکز (۲ gr/kg) دریافت کردند. بعد از آن، غلظت گلوکز خون در زمان‌های ۰،۳۰،۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تجویز گلوکز سنجیده شد. ۲/۵ ml از خون محیطی در تیوب‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) تهیه و برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) با استفاده از گرادیان چگالی (Ficoll-Hypaque- Sigma, St. Louis, MO) طبق پروتکل استاندارد آن جداسازی شد.

RNA تمام با استفاده از Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) و طبق پروتکل سازنده‌ی آن با اصلاحاتی استخراج شد. به طور خلاصه، ۱ ml Trizol به نمونه اضافه و سپس unisp ۶ به نمونه اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۰۰ ml کلروفرم به آن اضافه شد و در ۴ °C به مدت ۳ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. پس از آن در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در ۴ °C سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی RNA به تیوب جدید انتقال یافت و ۵۰۰ μl ایزوپروپانول به آن اضافه شد و در دمای ۷۰ °C- به مدت ۱ ساعت انکوبه شد و پس از آن دوباره در دمای ۴ °C به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و رسوب RNA دو بار در اتانول ۷۵ درصد شسته و در معرض هوا خشک شد و سپس در ۲۵ μl آب فاقد RNase حل گردید و در دمای ۸۰ °C- نگهداری شد. خلوص RNA جداسازی شده در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, ND-۱۰۰۰ Worcester, MA) سنجیده شد و کیفیت

محیط جدید، ۱۶ رت به صورت تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند. یک گروه رژیم غذایی طبیعی (NFD یا Normal fat diet) متشکل از ۶۶ درصد کربوهیدرات، ۲۲ درصد پروتئین و ۱۲ درصد چربی دریافت کردند و گروه دیگر، رژیم غذایی پر چرب شامل ۱۵ درصد کربوهیدرات، ۲۵ درصد پروتئین و ۶۰ درصد چربی دریافت کردند. بعد از ۱۰ هفته رت‌ها وزن شدند و گلوکز ناشتا و سطح انسولین، کلسترول و تری گلیسیرید خون سنجیده شد. دوز پایینی از STZ (۳۵ mg/kg) در محلول سیترات (pH = ۴/۴) به صورت درون صفاقی به رت در حالت ناشتا تزریق شد و گروه شاهد تنها بافر را دریافت کردند. رژیم غذایی ویژه‌ی دو گروه به مدت ۲ هفته ادامه یافت. گلوکز خون در حالت ناشتا و غیر ناشتا روزانه سنجیده شد. پروتکل مرکب از رژیم غذایی با چربی بالا و دوز پایین STZ، برای بروز علائم نزدیک به علائم دیابت نوع ۲ استفاده شد.

سطح گلوکز خون با استفاده از گلوکومتر اندازه‌گیری شد. سطح انسولین سرم با استفاده از کیت Mercodia rat insulin ELISA، تری گلیسیرید با استفاده از کیت Triglycerides LS (GPO-PAP) CO: Ziestchem diagnostics IR (Low density lipoprotein) LDL Enzimatic (Sensitivity: ۱ mg/dl, Expected value: < ۱۳۰/d، Photometric parsazmun از خون لخته در سانتریفیوژ ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد.

برای آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT یا Oral glucose tolerance test)، حیوانات پس از یک شب (۱۲ ساعت) عدم دریافت غذا به صورت گاوآژ

میانگین استاندارد ارائه شده‌اند. اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از Student t test یا One-way ANOVA (One-way analysis of variance) با Post hot multiple comparison سنجیده شدند. آنالیز آماری با استفاده از نسخه‌ی ۲۰ از نرم‌افزار SPSS (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

لقای دیابت تیپ در رت نر گونه‌ی Wistar

ترکیب رژیم غذایی پر چرب و دوز پایین STZ که به طور نزدیک وقایع طبیعی را از مقاومت انسولینی تا عدم عملکرد سلول‌های β تقلید می‌کند، برای ایجاد دیابت نوع ۲ در رت‌ها استفاده می‌شود و به طور مؤثر می‌تواند دیابت نوع ۲ را ایجاد نماید. تأثیر درمان بر وزن، غلظت گلوکز، انسولین، کلسترول و تری‌گلیسرید در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که وزن رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی چربی بالا به طور تقریبی نسبت به رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی رژیم طبیعی (NFD) ۲۰ gr بیشتر بوده است. اگر چه کلسترول و LDL سرم دو گروه، تفاوت معنی‌داری ندارند، اما رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی چربی بیشتر، میزان تری‌گلیسرید و قند خون ناشتای بالاتری نشان می‌دهند (۵/۸۳ mmol/l). در این رت‌ها، سطح انسولین کاهش یافت؛ اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

شکل ۱ سطح گلوکز سرم خون بعد از OGTT را نشان می‌دهد. رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی رژیم غذایی طبیعی، افزایشی در غلظت گلوکز سرم در

آن با الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز بررسی شد. همه‌ی miRNAها به مولکول‌های پلی‌آدنیله تغییر یافتند و با استفاده از کیت سنتز cDNA (Exiqon's miRCURY LNATM, Cat# ۲۰۳۳۰۰) در یک مرحله به cDNA تبدیل شدند. دم پلی A به miRNA بالغ اضافه شد و سنتز cDNA با استفاده از پرایمر پلی T با انتهای ۳' تغییر یافت و یک Universal tag ناحیه‌ی ۵' انجام گرفت. نسخه‌ی cDNA با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی miRNA و LNA-enhanced رفت و برگشت تکثیر شد. غلظت یکسانی از RNA استخراج شده (۲۰۰ ng) در واکنش cDNA با حجم کلی ۲۰ μ l استفاده شد (طبیعی‌سازی به وسیله‌ی مقدار).

بیان miRNA به وسیله‌ی real time SYBR-green I با استفاده از (Cat # ۲۰۳۴۵۰), Exiqon SYBR Green Master Mix) سنجیده شد. مخلوط واکنش PCR (۱۰ μ l) شامل ۴ μ l محصول رونویسی معکوس (۱:۱۰) برای تکثیر محصول RT (Real time) با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی LNA q-PCR بر ۱۰۳-miRNA-rno استفاده شد. PCR با استفاده از دستگاه Step one plus applied biosystems انجام گرفت؛ به صورتی که ابتدا ۱۰ دقیقه در 95°C انکوبه شد و سپس در 40°C چرخه‌ی 95°C به مدت ۱۰ ثانیه و 60°C به مدت ۱ دقیقه قرار گرفت. همه‌ی نمونه‌ها به صورت جفت تکثیر شدند. نتایج با استفاده از روش $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Delta delta CT Method) مقایسه‌ای بررسی شدند. Unisp 6 RNA spik in برای طبیعی‌سازی داده‌های q-PCR استفاده شد (۳۳-۳۴).

همه‌ی اطلاعات به صورت میانگین \pm انحراف از

جدول ۱. متابولیت‌های خونی رت‌های شاهد و پیش دیابت که با رژیم غذایی پر چرب ایجاد شده‌اند

متغیر	بعد از مداخله‌ی رژیم غذایی (۱۰ هفته)		قبل از مداخله‌ی رژیم غذایی	
	مورد (HFD)	شاهد (NFD)	مورد (HFD)	شاهد (NFD)
وزن (gr)	223/50 ± 3/20	191/60 ± 6/51	144/75 ± 3/06	145/75 ± 1/99
TC (mmol/l)	1/55 ± 0/09	1/53 ± 0/13	1/51 ± 0/08	+1/50 ± 0/13
TG (mmol/l)	2/14 ± 0/29	+1/18 ± 0/10	0/88 ± 0/08	1/23 ± 0/16
LDL (mmol/l)	0/88 ± 3/7	0/91 ± 0/33	0/90 ± 0/36	0/90 ± 0/34
FBG (mmol/l)	5/83 ± 0/10	5/34 ± 0/43	5/05 ± 0/17	4/91 ± 0/28
انسولین (ug/l)	0/50 ± 0/03	1/30 ± 0/02	1/20 ± 0/10	1/40 ± 0/10

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند، n = 8 برای هر گروه، n = 6 برای انسولین، P ≤ 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد

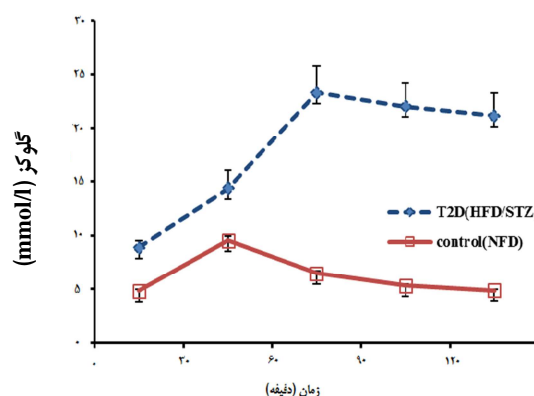
NFD: Normal fat diet; HFD: High fat diet; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; LDL: Low density lipoprotein
FBG: Fast blood glucose

مدت ۳۰ دقیقه (۹/۵ mmol/l) بعد از دریافت گلوکز را نشان می‌دهند که بعد از ۲ ساعت به سرعت به سطح طبیعی می‌رسد (۵ mmol/l). بر عکس، غلظت گلوکز سرم در رت‌های دریافت کننده‌ی رژیم غذایی پر چرب به سرعت افزایش می‌یابد و حتی دو ساعت پس از دریافت گلوکز هم بالا باقی می‌ماند (۲۱ mmol/l).

تحمل گلوکز حیوانات با رژیم غذایی پر چرب که STZ دریافت کرده‌اند، در پی تغییرات گلوکز نقص نشان می‌دهد. سطح گلوکز بالای خون به طور مشخص در گروه HFD/STZ مشاهده شد. گلوکز خون ناشتا در حیوانات HFD/STZ به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده‌ی رژیم غذایی طبیعی و گروه دریافت کننده‌ی رژیم غذایی پر چرب بالاتر است. این سطح بین ۹/۵-۱۱ mmol/l و میانگین گلوکز خون گروه طبیعی ≤ ۱۹ mmol/l بود.

بیان miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

سنجش‌ها به طور موفقیت‌آمیزی در نمونه‌های PBMC ۸ رت گروه NFD، ۸ رت گروه HFD و ۸ رت مدل مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام گرفت. miR-103 در نمونه‌های PBMC سه گروه قابل ردیابی بود و همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیان miR-103 در نمونه‌های PBMC پیش دیابت (HFD) و رت‌های مدل مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه طبیعی افزایش یافته است (به



شکل ۱. آزمایش تحمل گلوکز (OGTT) یا Oral glucose tolerance test در رت‌های گروه NFD (Normal fat diet) و HFD/STZ

(High fat diet/ Streptozotocin). مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند، n = 8 برای هر گروه P ≤ 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد

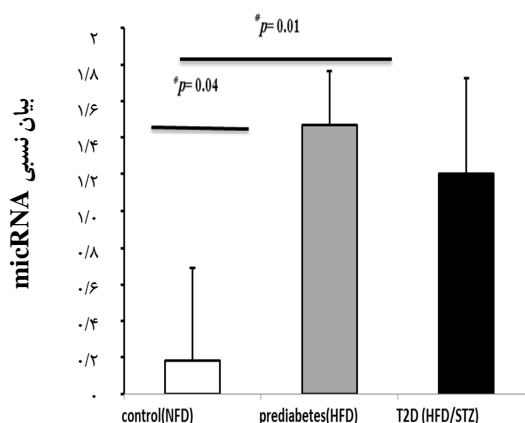
بافت چربی، پانکراس و ماهیچه‌ی اسکلتی متمرکز هستند. جمع‌آوری این بافت‌ها برای تشخیص‌های ژنتیکی دشوار است و شواهد بر وجود miRNA در خون انسان و حیوانات (علاوه بر بافت) دلالت می‌کنند که این miRNA می‌توانند به صورت آزاد در خون و یا درون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی قرار بگیرند (۳۶-۳۷).

برخی انواع ارتباطات درون ارگانی با مبادله‌ی miRNA از ارگان‌های مختلف به ویژه اعضای با اختلال فیزیولوژیکی به خون همراه است و آن را منبع مناسب و غیر تهاجمی جایگزین برای چنین ارگان‌هایی می‌سازد (۳۸).

یافته‌ها نشان می‌دهد که miRNA ترشحاتی آگزوزومی به عنوان خاموش کننده‌ی کلیدی بیان ژن عمل می‌کند و باعث مهار چند نسخه‌ای است که منجر به ایجاد حوادث بیولوژیکی ویژه می‌گردد. PBMCها در سراسر بدن گردش می‌کنند و در تماس نزدیک و مستقیم با ارگان‌های مختلف هستند که به عنوان منبع مهمی برای بیماری‌های همراه با تغییر بیان miRNA به شمار می‌روند. این واقعیت، روش نوینی برای بررسی سلامت افراد با بررسی miRNAهای گردش خون به وجود آورده است.

Zampetaki و همکاران اولین شواهد مبنی بر تغییر miRNAهای پلاسما در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را ارائه دادند (۳۹). الگوی متفاوت بیانی در miRNAهای در گردش مرتبط با دیابت در سرم و خون بیماران مبتلا و همچنین در حیوانات نشان داده شده است. نتایج به دست آمده، مکمل نتایج حاصل از پانکراس و دیگر بافت‌های هدف انسولین است (۴۰-۴۱). اطلاعات کافی در مورد الگوی بیانی

ترتیب با $P = 0.024$ و $P = 0.010$. اختلاف معنی‌داری بین سطح miR-103 در نمونه‌های PBMC بین رت‌های گروه HFD و رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ مشاهده نشد ($P = 0.250$) (شکل ۲).



شکل ۲. آنالیز بیان miRNA به وسیله‌ی qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction) در سلول‌های تک هسته‌ای خون ($n_{pre} = 8$, $n_{T2D} = 8$, $n_{NFD} = 8$, diabetes). مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار در مقیاس \log_2 بیان شده است. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) استفاده گردید.

بحث

شناسایی نقص مولکولی اولیه‌ی دخیل در پاتوفیزیولوژی دیابت، هدف علمی و بالینی مهمی است. مطالعات پیشین، ارتباط بین تغییر بیان miRNA و گسترش دیابت نوع ۲ را نشان داده‌اند (۳۵). نقش واسطه‌ای پیشنهاد شده برای این مولکول‌های کوچک در دیابت نوع ۲، پنجره‌ی جدیدی به سوی تحقیق و آشکار ساختن نشانگرهای زیستی منتخب در دیابت نوع ۲ گشوده است. این مطالعات، به طور عمده بر بیان miRNA در بافت‌های مرتبط با دیابت مانند کبد،

دقیق‌تری به هم ریختگی متابولیکی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را نسبت به مدل‌های جوندگان تک ژنی دیابت/چاقی یا چاقی ایجاد شده با رژیم غذایی در رت و موش نشان می‌دهد.

ایجاد مدل‌های حیوانی مبتلا به دیابت نوع ۲ با رژیم غذایی پر چرب با کربوهیدرات پایین و در پی آن تزریق STZ انجام گرفت. مدل‌های حیوانی که به این روش ایجاد می‌شوند، قبل از تزریق STZ افزایش انسولین خون را نشان می‌دهند. اگر چه در این مطالعه، دوره‌ی طولانی‌تری تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند تا مدل نزدیک‌تری به نقص تحمل گلوکز انسانی (IFG/IGT یا Impaired fasting glucose/impaired glucose tolerance) ایجاد شود.

بر اساس برخی گزارش‌ها، مسیر انتخابی در این مطالعه مناسب‌ترین روش برای تقلید وضعیت پیش دیابت در انسان است. این روش، با تفکر شکل‌گیری حالت مقاومت انسولینی سال‌ها بعد از ایجاد دیابت و عدم عملکرد سلول‌های β همخوانی دارد. با در نظر گرفتن گزارش‌های دیگر که گروهی از miRNAهای مبتلا به دیابت را بررسی نموده‌اند و تغییر مشخصی مشاهده نشد (۲۱)، مطالعه بر روی miR-103 نشان از اهمیت آن در بیماری‌زایی دیابت دارد و می‌تواند در برنامه‌های غربالگری اولیه استفاده شود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

micRNAهای سلول‌های خونی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ که یک نمونه‌ی قابل دسترسی برای تشخیص‌های کلینیکی است، وجود ندارد (۴۲).

در این مطالعه بر اساس سنجش‌های *in silico* و اطلاعات موجود از پایگاه اینترنتی و منابع علمی منتشر شده‌ی مناسب، روی الگوی بیانی miR-103 در نمونه‌های PBMC رت‌های شاهد (NFD)، پیش دیابت (HFD) و مبتلا به دیابت نوع ۲ متمرکز است. miR-103 نقش کلیدی در مراحل مختلف ایجاد دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند. نقش miR-103 در تنظیم چندین mRNA دخیل در مراحل متابولیسم لیپیدی و Acetyl-coA سلولی پیچیده است (۳۰). خاموش کردن miR-103 در موش‌های ob/ob منجر به افزایش حساسیت بافت چربی به انسولین می‌شود. ژن Caveolin1 که یکی از اجزای کلیدی Caveolae است و از واسطه‌های مهم در سیگنال انسولین است، به عنوان یکی از هدف‌های تأیید شده‌ی آزمایشگاهی miR-103 معرفی شده است (۴۳).

همچنین گزارش شده است که miR-103 در کبد موش‌های ob/ob در مقایسه با گروه طبیعی و موش‌های تیمار شده با STZ، افزایش بیان قابل توجهی نشان می‌دهد (۴۴).

در این مطالعه، رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ که با القای HFD/STZ ایجاد شدند، برای کنترل تغییرات rno-miR-103 پس از دریافت رژیم غذایی پر کالری قبل از تزریق STZ به منظور دستیابی به فهم بیشتری از مرحله‌ی تغییر بیان rno-miR-103 از وضعیت پیش دیابت به دیابت استفاده شد. HFD/STZ به طور

References

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(3): 311-21.
- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathophysiology of prediabetes. *Curr Diab Rep* 2009; 9(3): 193-9.
- Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3): 193-205.
- Schlienger JL. Type 2 diabetes complications. *Presse Med* 2013; 42(5): 839-48.
- Sanghera DK, Blackett PR. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *J Diabetes Metab* 2012; 3(198).
- Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19(4): 491-503.
- Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23(4-6): 221-32.
- Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res* 2012; 93(4): 583-93.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434(7031): 338-45.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 523-30.
- Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006; 25(46): 6163-9.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5830-40.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- van Iterson M, Bervoets S, de Meijer EJ, Buermans HP, 't Hoen PA, Menezes RX, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression: adding biological significance to microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(15): e146.
- Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw* 2011; 11(3): 135-54.
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432(7014): 226-30.
- Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009; 15(2): 287-93.
- He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007; 21(11): 2785-94.
- Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, et al. Changes IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(9): e32-e39.
- Rottiers V, Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Gurumurthy S, Zhong L, Li Y, et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 225-33.
- Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 792-7.
- Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, et al. miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 2009; 9: 353.
- Zeng XL, Zhang SY, Zheng JF, Yuan H, Wang Y. Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(23): 4510-6.
- Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med* 2007; 13(10): 422-32.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004; 2(11): e363.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines,

- indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15-20.
29. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 2011; 44(5): 839-47.
 30. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007; 91(3): 209-17.
 31. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000; 49(11): 1390-4.
 32. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005; 52(4): 313-20.
 33. Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PLoS One* 2014; 9(2): e89237.
 34. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50(4): 298-301.
 35. Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Wills QF, Kaisaki PJ, Barrett A, et al. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of Type 2 Diabetes. *BMC Med Genomics* 2009; 2: 54.
 36. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18(10): 997-1006.
 37. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3(11): e3694.
 38. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285(23): 17442-52.
 39. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107(6): 810-7.
 40. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6(8): e22839.
 41. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48(1): 61-9.
 42. Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res Notes* 2013; 6: 491.
 43. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011; 474(7353): 649-53.
 44. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* 2009; 50(9): 1756-65.

Evaluation of miR-103 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetic and Prediabetic Rats

Nasimeh Vatandoust¹, Sedigheh Momenzadeh MSc², Sara Kamali³, Rasoul Salehi PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Type 2 diabetes (T2D) is the most prevalent chronic metabolic disease. MicroRNAs act as regulators of gene expression by inhibiting translation or promoting degradation of target mRNAs. Recent reports indicate that microRNAs can play important role in establishment of diabetes and has roles in type 2 diabetes different aspects including insulin insensitivity. To detect a noninvasive screening method for type 2 diabetes, we evaluated the expression level of miR-103 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples from pre-diabetes and type 2 diabetes rats in compare to normal group (n = 8 in each group) using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Methods: Animal model type 2 diabetes was made with combination of high-fat diet (HFD) and low dose of streptozotocin (STZ) injection. Blood glucose level, serum insulin, and cholesterol, low density lipid and triglyceride levels were measured after 10-weeks diet interference. Peripheral blood mononuclear cells isolated from blood samples of three groups of animals, and then total RNA was obtained using Trizol reagent. All microRNAs converted to cDNA (complementary DNA). Expression level of rno-miR-103 was assessed via one-step SYBR Green I relative real-time polymerase chain reaction, using specific LNA TM qRT-PCR primer set for amplifying rno-miR-103. Statistical analysis was performed using SPSS₂₀ software.

Findings: Combination of high-fat diet and low dose of streptozotocin effectively induced type 2 diabetes in rats. rno-miR-103 expression level in peripheral blood mononuclear cells samples of pre-diabetic (high-fat diet) subjects and type 2 diabetes rats significantly elevated in compare to normal group.

Conclusion: The high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes animal model is the most suitable way for mimicking pre-diabetes and diabetes in men. The result of miRNA expression assay in peripheral blood mononuclear cells indicates the importance of rno-miR-103 in type 2 diabetes pathogenesis in early stages and has potential as a clinically useful noninvasive source to predict the disease status.

Keywords: Type 2 diabetes, MicroRNA, Noninvasive diagnosis, Peripheral blood mononuclear cells, miR-103

Citation: Vatandoust N, Momenzadeh S, Kamali S, Salehi R. **Evaluation of miR-103 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetic and Prediabetic Rats.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1746-56

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir