مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۵/هفته اول تیر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

ارتباط بین ژنوتیپ‌های واجد یا فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل خطرساز متابولیکی در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت

دکتر غلام بساطی[۱]، زهرا ولیزاده[۲]، دکتر فاطمه کشاورزی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نقش متابولیک دو آلل مهم گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR یا Growth hormone receptor)، که یکی از آن‌ها دارای اگزون ۳ و دیگری فاقد این اگزون است، در ارتباط با عوامل خطرساز متابولیک دیابت نوع ۲ در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت، در مقایسه با افراد سالم، هنوز به‌درستی مشخص نشده است. در این مطالعه، ارتباط این ژنوتیپ‌ها با عوامل خطرساز متابولیک دیابت نوع ۲ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: برای این مطالعه، ۴۰ فرد مرحله‌ی پیش‌دیابت و ۴۰ فرد سالم بر اساس شاخص‌های بالینی و آزمایشگاهی انتخاب شدند. برای تعیین ژنوتیپ‌ها، نمونه‌ی DNA لکوسیت‌های خون محیطی استخراج و با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب (Multiplex PCR) تکثیر گردید. ژنوتیپ نمونه‌های تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشخص شد. بقیه‌ی عوامل خطرساز مطابق روش‌های استاندارد و کیت‌های مربوط تعیین گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ [Exon 3 (+/+) GHR] در افراد بیمار به طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر بود ($P < ۰/۰۰۱$)؛ در حالی که فراوانی ژنوتیپ‌های Exon 3 (+/-) GHR و Exon 3 (-/-) GHR، در افراد شاهد بیشتر از افراد بیمار بود ($P < ۰/۰۰۱$). کاهش میزان عوامل خطرساز متابولیک در افراد با ژنوتیپ Exon 3 (-/-) GHR چشم‌گیر بود ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: وجود آلل فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه در حالت هموزیگوس، با کاهش عوامل خطرساز متابولیک دیابت نوع ۲ ارتباط دارد. بنابراین احتمال می‌رود که گیرنده‌ی هورمون رشد فاقد اگزون ۳ فعالیت بیولوژیکی و متابولیکی قوی‌تری داشته باشد تا بتواند در مقابل دیابت نوع ۲ مقاومت نماید.

واژگان کلیدی: اگزون ۳، گیرنده‌ی هورمون رشد، عامل خطرساز، دیابت نوع ۲

ارجاع: بساطی غلام، ولیزاده زهرا، کشاورزی فاطمه. **ارتباط بین ژنوتیپ‌های واجد یا فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل خطرساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۵): ۶۰۰-۵۹۱

مقدمه

دیابت نوع ۲ (Type 2 diabetes mellitus یا T2DM) یک بیماری چند عاملی (Multi factorial) و یک مشکل روزافزون در سراسر جهان است. محور هورمون رشد Growth hormone یا GH) فاکتور رشد شبه انسولینی I (IGF-I) نقش مهمی در کنترل متابولیکی دارد (۱). هورمون رشد اثرات رشد و متابولیکی خود را از طریق تعامل با گیرنده‌ای که میل

۱- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، سنندج، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه کشاورزی
Email: gol.keshavarzi@gmail.com

ترکیبی زیادی برای آن دارد، اعمال می‌کند (۲).

گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR یا Growth hormone receptor) از یک ناحیه‌ی خارج سلولی متصل شونده به لیگاند، یک ناحیه‌ی عبور غشایی و یک بخش داخل سلولی تشکیل شده است که بعد از دی‌مریزه شدن، از طریق فعال کردن مسیرهای JAK-STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) و MAPK (Mitogen-activated protein kinases)، باعث انتقال پیام می‌شود (۳). قسمت خارج سلولی گیرنده‌ی هورمون رشد به صورت محلول در خون نیز یافت می شود و به پروتئین متصل شونده به هورمون رشد (Growth hormone binding protein یا GHBP) معروف است (۴). منشأ GHBP در انسان و خرگوش ناشی از قطع پروتئولیتیکی GHR با یک مکانیسم ناشناخته است (۵). شواهد نشان می‌دهند که در اثر عمل پروتئولیتکی متالوپروتئیناز TACE (آنزیم مبدل فاکتور نکروز تومووری آلفا) بر روی GHR، GHBP جدا می گردد (۶)؛ فرایند کنده شدن GHBP با میانجی‌گری پروتئین کیناز C وساطت می‌شود (۷).

در ارتباط با بخش کد کننده ی ناحیه‌ی خارج سلولی GHR، دو ایزوفرم دارای اگزون ۳ (Exon 3) و بدون آن، یعنی به ترتیب GHR (+) E3 و GHR (-) E3 پیشنهاد گردیده است. ایزوفرم بدون اگزون ۳ پلی‌پپتیدی را به وجود می‌آورد که فاقد ۲۲ اسید آمینه در ناحیه‌ی N- ترمینال است (۸).

آلل GHR (+) E3 در مقایسه با آلل GHR (-) E3 پاسخ قوی‌تری نسبت به GH درمانی نشان می‌دهد (۹). به نظر می‌رسد که هموزیگوسیتی GHR (-) E3 اثرات پیش گیرانه‌ای در ابتلا به T2DM داشته باشد هرچند که این اثرات در حضور مقادیر بالای بعضی از عوامل خطرساز متابولیکی مانند پروتئین فعال C با حساسیت بالا (High-sensitivity C-reactive protein یا hsCRP) و شاخص توده بدنی (Body mass index یا BMI) تغییر می‌کند (۱۰). بعضی تحقیقات نشان داده است که GHR (+) E3 در مقایسه با GHR (-) E3 ارتباط قوی تری با عوامل خطرساز متابولیک در افراد چاق دارد (۱۱).

دو واریانت GHR (+) E3 و GHR (-) E3 ممکن است در مرحله ی ژنومی (۱۲) یا در مرحله ی قطع و وصل (۱۳) به وجود آیند؛ اگر چه، حالت قطع و وصل در انسان هنوز تأیید نشده است (۱۳).

با این حال، ارتباط کاملی بین ژنوتیپ و الگوی بیان mRNA ایزوفرم های اگزون ۳ وجود دارد که نشان می دهد، اگزون ۳ در سطح ژنی حذف شده و به علت قطع و وصل متغیر (Alternative splicing) به وجود نیامده است (۱۴، ۱۱). از آن جایی که هر دو آلل GHR (+) E3 و GHR (-) E3 در افراد هتروزیگوت به صورت هم‌بارز بیان می‌شوند، هر دو ایزوفرم را می توان در سطح رونویسی و همین طور، در سطح پروتئینی تشخیص داد (۱۱).

آلل GHR (-) E3 در مقایسه با آلل GHR (+) E3 اثرات بیشتری بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و بالینی در بیماران آکرومگالی دارد (۱۵). وجود حداقل یک آلل GHR (-) E3 در افراد جوان سالم و کودکان با ترشح بیشتر انسولین ارتباط دارد و ممکن است نقش مهمی در بالا بردن ظرفیت جبرانی سلول های بتای پانکراس داشته باشد (۱۶). به تازگی، ارتباط بین محور هورمون رشد- فاکتور رشد شبه انسولینی (GH/IGF1) با ژنوتیپ‌های دارای آلل GHR (-) E3

در بیماران آکرومگالی مورد تردید واقع شده است (۱۷). این در حالی است که، اثر ضد دیابتی GHR (-) E3 از طریق ارتباط آن با هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولینی اعمال می‌گردد (۱۵،۱۰). از طرفی، در دختران مبتلا به سندرم ترنر، هموزیگوسیتی برای ژنوتیپ‌های دارای آلل GHR (-) E3 با تأثیر گذاری بیشتر هورمون رشد و کاهش BMI ارتباط نشان داده است (۱۸).

نقش متابولیکی آلل‌های GHR (+) E3 و GHR (-) E3 در ارتباط با عوامل خطرساز متابولیک دیابت نوع ۲ (مانند میزان لیپید، گلوکز،هموگلوبین گلیکولیزه (HbA1c) و hsCRP) در افراد مستعد ابتلا به دیابت نوع ۲ یعنی افراد پیش دیابت هنوز بررسی نگردیده است. بررسی ارتباط آلل‌های مذکور در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت در مقایسه با افراد سالم، نقش عملکرد پاتولوژیک این آلل‌ها را بهتر مشخص می‌سازد و در ارایه‌ی راهکارهای درمانی برای جلوگیری از ابتلا به دیابت نوع ۲ کمک می‌کند. بدین ترتیب، در این مطالعه نقش آلل‌های مذکور در پاتوژنز بیماری دیابت از طریق تأثیر بر عوامل خطرساز متابولیکی دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مشاهده‌ای مورد- شاهدی (Observational case-control)، ۴۰ بیمار که بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی مانند میزان گلوکز خون ناشتای ۱۲۶mg/dL و تست تحمل گلوکز در مرحله‌ی پیش‌دیابت تشخیص داده شدند. همچنین، ۴۰ فرد سالم بر مبنای گلوکز خون ناشتای کمتر از ۱۲۵mg/dL به عنوان گروه شاهد در این مطالعه جای گرفتند (گلوکز خون ناشتا در همه‌ی افراد سالم کمتر از ۱۰۰mg/dL بود). افراد بیمار و شاهد از لحاظ سن و جنس با هم مطابقت داشتند. افرادی که دارای سابقه‌ی مصرف هر نوع داروی کاهنده‌ی چربی خون بودند و نیز افراد مبتلابه بیماری‌های التهابی مزمن یا حاد در این مطالعه وارد نگردیدند.

از همه‌ی افراد، یک نمونه‌ی خون ناشتای کامل (۶ میلی‌لیتر) با استفاده از ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic) تهیه گردید. سپس، یک بخش از آن به سرعت برای تهیه ی DNA ژنومی جدا شد. نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. یک بخش دیگر از خون کامل هم برای سنجش HbA1c جدا شد؛ مابقی آن نیز برای جدا سازی پلاسما به کار رفت. پلاسما نیز در بخش‌های متعدد قسمت بندی شد و برای سنجش بقیه ی فاکتورهای مورد سنجش به کار رفت. این نمونه ها تا زمان سنجش در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

از همه‌ی افراد برای شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه دریافت گردید و این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب گردید.

DNA ژنومی با استفاده از یک کیت استخراج (Gentra, Puregene, USA) Cat No.158467 DNA مطابق دستورالعمل سازندگان آن از نمونه‌ی خون کامل جدا شد. میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر (OD_{260nm}) برای نمونه‌های DNA استخراج شده در محدوده‌ی ۱/۰-۰/۱ بود. همچنین، نسبت جذب OD_{260}/OD_{280} برای آن‌ها در محدوده‌ی ۱/۹-۱/۷

بود. برای بررسی انسجام و یک پارچگی (Integrity) DNA به دست آمده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، همراه بافر 0.5X TE (۵ mM از Tris-HCl و ۰/۵ mM EDTA با pH برابر ۷/۵) و مارکر DNA و حدود ۵-۱ µg از DNA نمونه های استفاده کردیم. قطعات DNA به دست آمده تا ۲۰۰ kb (اغلب ۱۵۰-۵۰ kb) طول داشتند. همان طور که پیشتر ذکر شد، این نمونه‌های DNA ژنومی در لوله‌های اپندورف تا زمان انجام PCR در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب (Multiplex PCR)

برای انجام PCR هر یک از آلل های ژن GHR، یعنی GHR (+) E3 و GHR (-) E3 به طور جداگانه با استفاده از پرایمرهای G1، G2 و G3 (Genebank Accession NO. AF155912) در یک واکنش استاندارد زنجیره‌ای پلیمراز حاوی آنزیم TAQ پلیمراز (Invitrogen, USA) و دیگر اجزای لازم، تکثیر شد. پرایمرها مورد استفاده به صورت زیر بود:

G1) :5'-TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG-3', nucleotides 3258-3304 (

G2) :5'-AGTCGTTCCTGGGACAGAGA-3', nucleotides 6534-6515 (

G3) :5'-CCTGGATTAACACTTTGCAGACTC-3', nucleotides 4219-4196 (

این پرایمرها برای تکثیر محصولات دارای اگزون ۳ [(۹۳۵ bp)، جفت پرایمر G2 + G1] و بدون اگزون ۳ [(۵۳۲ bp)، جفت پرایمر G3 + G1] به کار می‌روند (۱۶).

پارامترهای تنظیم ترموسایکلر به صورت زیر بود:

دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، جفت و جور شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، و یک مرحله‌ی طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد.

این فرایند منجر به تولید محصولات PCR به طول ۹۳۵ bp برای DNAهای حاوی اگزون ۳ و به طول ۵۳۲ bp برای DNAهای فاقد اگزون ۳ شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و اندازه‌ی آن‌ها از طریق مقایسه با DNA ladder به طول قطعات ۱۰۰ bp تخمین زده شد. برای ظاهر کردن باندهای جدا شده روی ژل آگاروز از دستگاه ژل داکیومنتیشن (BioRadm, USA) استفاده شد.

افراد بر حسب داشتن آلل‌های GHR (+) E3 و GHR (-) E3 در سه گروه هموزیگوس برای آلل طبیعی [دارای دو آلل GHR (+) E3]، هتروزیگوس [دارای یک آلل GHR (+) E3 و یک آلل GHR (-) E3] و هموزیگوس برای آلل دارای حذف [دارای دو آلل GHR (-) E3] تقسیم بندی شدند. فراوانی آلل‌های مورد انتظار در همه‌ی افراد و نیز در افراد بیمار و سالم با استفاده از تعادل Hardy–Weinberg محاسبه شد.

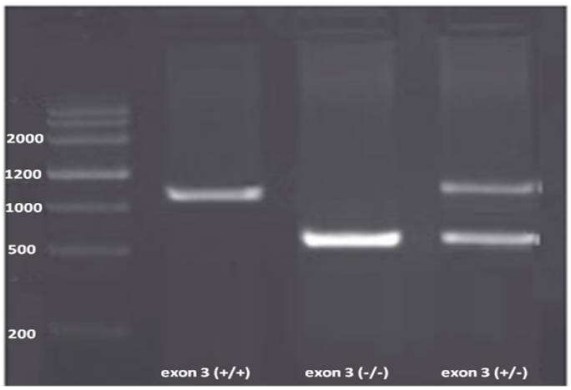
میزان گلوکز سرم در حالت ناشتا با روش گلوکز اکسیداز پراکسیداز تعیین گردید. میزان پروفایل لیپیدی پلاسما در حالت ناشتا با روش آنزیماتیک کالری‌متری و با استفاده از کیت‌های مربوط (پارس آزمون، کرج) اندازه‌گیری شد. میزان hsCRP با

استفاده از روش ایمونوتوربیدیمتری تقویت شده با لاتکس و کیت مربوط (پارس آزمون، کرج) سنجش گردید. میزان گلوکز پلاسما نیز با روش گلوکز اکسیداز و کیت مربوط (پارس آزمون، کرج) تعیین شد. میزان HbA1c گلبول‌های قرمز با استفاده از یک روش استاندارد کروماتوگرافی دفع ژلی (Gel exclusion chromatography) (پارس آزمون، کرج) سنجش شد. این روش دارای همه ی مزایا از لحاظ اختصاصیت و صحت است و آسان و مقرون به صرفه نیز می‌باشد.

داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین ± انحراف معیار یا درصد گزارش گردید. برای بررسی تفاوت فراوانی‌های ژنوتیپی بین افراد از آزمون χ^2 استفاده شد. برای مقایسه‌ی داده‌های بالینی بین سه گروه ژنوتیپی از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری در حد $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات بالینی افراد تحت مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود، میزان عوامل خطرساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت بیشتر از افراد شاهد است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول تکثیر شده‌ی ژن گیرنده‌ی هورمون رشد
باندهای ستون اول سمت چپ مربوط به DNA ladder است.
ستون‌های بعدی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Exon 3 (+/+) GHR، Exon 3 (-/-) GHR و Exon 3 (+/-) GHR می‌باشد.

جدول ۱. مشخصات بالینی افراد تحت مطالعه

متغیر	افراد بیمار (۴۰ نفر)	افراد شاهد (۴۰ نفر)	مقدار P
سن (سال)	۵۵/۷۸ ± ۱۱/۶۸	۵۶/۹۶ ± ۸/۳۰	۰/۵۶
مرد [تعداد(درصد)]	۳۲(۸۰)	۳۵(۸۷)	۰/۴۰
شاخص توده‌ی بدنی (BMI) (kg/m^2)	۲۵/۷۹ ± ۲/۳	۲۵/۹ ± ۰/۷	۰/۴۸
گلوکز (mmol/l)	۵/۱ ± ۰/۶	۴/۸ ± ۰/۴	۰/۵۱
کلسترول (mg/dl)	۱۹۲/۹ ± ۳۶/۳	۱۷۸/۸ ± ۴۷/۰	۰/۰۷
تری‌گلیسرید (TG) (mg/dl)	۱۵۹/۹ ± ۸۰/۴	۱۴۷/۴ ± ۹۷/۳	۰/۰۸
LDL (mg/dl)	۱۰۹/۴ ± ۲۳/۸	۹۶/۷ ± ۲۵/۵	۰/۰۱
HDL (mg/dl)	۴۴/۴ ± ۹/۵	۴۲/۵ ± ۴/۵	۰/۱۲
hsCRP (mg/l)	۴/۹ ± ۱/۷	۲/۹ ± ۱/۳	۰/۰۱
HbA1c (درصد)	۵/۸ ± ۰/۶	۴/۷ ± ۰/۲	۰/۰۲

داده‌ها برحسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.
LDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین؛ HDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا؛

hsCRP: پروتئین فعال C با حساسیت بالا؛ HbA1c: هموگلوبین گلیکوزیله

جدول ۲. فراوانی (نسبی) ژنوتیپ اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد (Exon 3 GHR).

ژنوتیپ	افراد بیمار (۴۰ نفر)	افراد شاهد (۴۰ نفر)	مقدار P
Exon 3 (+/+) GHR	۲۵(۶۲/۵)	۴(۱۰/۰)	< ۰/۰۰۰۱
exon 3 (+/-) GHR	۷(۱۷/۵)	۱۶(۴۰/۰)	۰/۰۰۰۳
exon 3 (-/-) GHR	۸(۲۰/۰)	۲۰(۵۰/۰)	< ۰/۰۰۰۵

Exon 3 (+/+) GHR: ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد؛ Exon 3 (+/-) GHR: ژنوتیپ هتروزیگوت فاقد اگزون ۳؛
Exon 3 (-/-) GHR: ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد.

جدول ۳. مقایسه عوامل خطرساز متابولیک بین ژنوتیپ‌های مختلف در کل افراد

پارامتر	همه‌ی افراد (۸۰نفر)	Exon 3 (+/+) GHR (۲۹ نفر)	Exon 3 (+/-) GHR (۲۳ نفر)	Exon 3 (-/-) GHR (۲۸ نفر)	مقدار P
سن (سال)	۵۶/۳۷ ± ۹/۹۹	۵۵/۹۶ ± ۸/۳۹	۵۵/۸۹ ± ۷/۳۳	۵۶/۲۴ ± ۳/۸۱	۰/۶۸
مرد [تعداد(درصد)]	۶۷(۸۴)	۲۳(۷۹)	۱۹(۸۲)	۲۵(۸۶)	۰/۴۳
شاخص توده‌ی بدنی (BMI) (kg/m^2)	۲۵/۸۵ ± ۱/۵۰	۲۶/۵۶ ± ۳/۶۸	۲۵/۹۸ ± ۲/۴۱	۲۵/۰۱ ± ۰/۴۱	۰/۲۰
گلوکز (mmol/l)	۴/۹۵ ± ۰/۳۳	۵/۹۵ ± ۰/۶۲	۴/۶۵ ± ۰/۲۴	۴/۳۲ ± ۰/۳۴	۰/۰۲
کلسترول (mg/dl)	۱۸۵/۸۵ ± ۳۷/۵۳	۱۹۸/۶۲ ± ۴۵/۳۵	۱۸۹/۹۸ ± ۵۷/۳۷	۱۶۹/۲۳ ± ۱۳/۱۳	۰/۰۳
تری‌گلیسرید (TG) (mg/dl)	۱۵۳/۶۵ ± ۸۸/۸۵	۱۷۶/۸۵ ± ۹۱/۵۵	۱۵۹/۶۳ ± ۷۸/۳۳	۱۲۴/۷۱ ± ۸۱/۴۶	۰/۰۱
LDL (mg/dl)	۱۰۳/۰۵ ± ۲۴/۶۵	۱۱۴/۲۵ ± ۳۴/۰۵	۱۰۹/۳۵ ± ۲۷/۲۲	۸۶/۲۷ ± ۱۲/۲۶	۰/۰۱
HDL (mg/dl)	۴۳/۴۵ ± ۵/۷۱	۳۹/۱۵ ± ۶/۱۱	۴۴/۳۵ ± ۳/۶۶	۴۷/۱۶ ± ۴/۰۶	۰/۰۴
hsCRP (mg/l)	۳/۹۰ ± ۱/۴۰	۴/۶۰ ± ۰/۶۰	۴/۲۰ ± ۰/۹۰	۳/۶۰ ± ۱/۲۰	۰/۱۲
HbA1c (درصد)	۵/۲۵ ± ۰/۵۱	۶/۰۷ ± ۰/۷۱	۵/۵۷ ± ۰/۴۴	۴/۱۴ ± ۱/۰۱	۰/۰۲

داده‌ها برحسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

LDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین؛ HDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا؛ hsCRP: پروتئین فعال C با حساسیت بالا؛ HbA1c: هموگلوبین گلیکوزیله

الکتروفوز قطعات DNA آلل‌های ژن گیرنده‌ی هورمون رشد، وجود ژنوتیپ Exon 3 (+/+) GHR، Exon 3 (-/-) GHR و Exon 3 (+/-) GHR را نشان داد (شکل ۱). ملاحظه می‌شود که ژنوتیپ‌های هموزیگوت Exon 3 (+/+) GHR، Exon 3 (-/-) GHR هر کدام دارای یک باند و ژنوتیپ هتروزیگوت Exon 3 (+/-) GHR دارای دو باند بر روی ژل آگاروز است.

فراوانی ژنوتیپی افراد بیمار و شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپی در کل افراد، و نیز در گروه بیماران و افراد شاهد، از تعادل Hardy–Weinberg پیروی می‌کرد (P = ۰/۲۵، P = ۰/۱۸، P = ۰/۲۱). در جدول مشخص است که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد [Exon 3 (+/+) GHR] در افراد بیمار به طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر بوده است؛ در حالی که فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و همین طور هموزیگوت فاقد اگزون ۳ این گیرنده

[Exon 3 (+/-) GHR و Exon 3 (-/-) GHR]، به ترتیب در افراد شاهد بیشتر از افراد بیمار است.

مقایسه عوامل خطرساز متابولیک بر حسب ژنوتیپ‌های مختلف در میان کل افراد نشان داد که عمده‌ی آن‌ها در افراد حامل آلل Exon 3 (-) GHR به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابند و این وضعیت در افراد با ژنوتیپ Exon 3 (-/-) GHR بیشتر مشهود است (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه مشخص گردید که فراوانی ژنوتیپ‌های حاوی حذف اگزون گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ آن، یعنی Exon 3 (-/-) GHR، در افراد شاهد سالم بسیار بیشتر از افراد بیمار مرحله‌ی پیش‌دیابت است. همچنین، هنگام بررسی میزان عوامل خطرساز متابولیک مربوط به دیابت در کل افراد، مشخص گردید که میزان این عوامل خطرساز در افراد دارای ژنوتیپ فاقد اگزون ۳، به ویژه ژنوتیپ هموزیگوت آن، به طور معنی‌داری نسبت به افراد با ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳، یعنی Exon 3 (+/+) GHR، پایین‌تر است. فراوانی ژنوتیپ‌های فاقد اگزون ۳ در کل افراد مورد مطالعه در این تحقیق ۶۳ درصد بود که با فراوانی این ژنوتیپ در مطالعات دیگر هم‌خوانی دارد (۲۱-۱۹).

ارتباط بین ژنوتیپ فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل خطرساز متابولیک در بیماران مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه‌ی Gao و همکاران، اثر محافظتی آلل فاقد اگزون ۳ ژن گیرنده‌ی هورمون رشد در پایین آوردن BMI، کاهش دادن مقاومت به انسولین و در نتیجه، کاهش سندرم متابولیک در کودکان دارای اضافه وزن و چاق گزارش گردیده است (۲۲). همچنین، اثر محافظتی این آلل در افزایش دادن میزان ترشح انسولین در کودکان و نوجوانان سالم مشاهده شده است (۱۶). از این لحاظ، کاهش میزان عوامل خطرساز متابولیک در افراد فاقد اگزون ۳ ژن گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی ما با نتایج مطالعات پیش‌گفته مطابقت دارد. اهمیت متابولیکی آلل فاقد اگزون ۳ زمانی بیشتر مشخص گردید که در یک مطالعه بر روی بیماران مبتلا به آکرومگالی ثابت شد که افراد دارای آلل فاقد اگزون ۳، BMI پایین‌تر و تحمل گلوکز بهتری نسبت به افراد واجد این آلل دارند (۲۳).

مطالعه‌ی Strawbridge و همکاران نشان داد که هموزیگوسیتی برای ژنوتیپ فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، دارای اثرات پیش‌گیرانه در برابر دیابت نوع ۲ است (۱۰). کاهش چشم‌گیر عوامل خطرساز متابولیک، به ویژه در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی حاضر، هم‌خوانی بسیار نزدیکی با نتایج مطالعات این محققین دارد.

کاهش فراوانی آلل فاقد اگزون ۳ در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت در مطالعه‌ی حاضر ممکن است نشان‌دهنده‌ی این باشد که بعضی از اثرات محافظتی در مقابل دیابت نوع ۲ ممکن است مربوط به وجود این آلل باشد. کاهش شدید عوامل خطرساز متابولیک دیابت نوع ۲ در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی حاضر، تأیید بیشتری بر این مطلب است. البته باید در نظر داشت که افزایش عوامل خطرساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت تنها یک نشانه از استعداد ابتلا به

دیابت نوع ۲ است و عوامل متعدد دیگری نیز در این امر دخیل هستند؛ به ویژه آن که، در بین بیماران مرحله‌ی پیش‌دیابت تعدادی دارای ژنوتیپ‌های فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد نیز بودند ولی با این وجود در مرحله‌ی پیش‌دیابت بودند. آن چه از یافته‌های این مطالعه برمی‌آید اینست که وجود آلل فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه در حالت هموزیگوس، با کاهش عوامل خطرساز متابولیک دیابت مانند گلوکز ناشتا، HbA1c، و پروفایل لیپیدی در کل افراد ارتباط دارد. از طرفی، فراوانی این ژنوتیپ در افراد سالم نیز بسیار بیشتر است. بنابراین احتمال دارد که گیرنده‌ی مذکور فعالیت‌های بیولوژیک و متابولیک قوی‌تری داشته باشد تا در مقابل دیابت نوع ۲ مقاومت نماید. نتایج بعضی از مطالعات این ایده را تأیید می‌کنند (۱۹، ۱۰). با توجه به اهمیت ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، یعنی GHR Exon 3 (+/+)، به عنوان یک عامل خطرساز به ظاهر قوی در ایجاد دیابت نوع ۲، ضرورت بررسی این ژنوتیپ در افراد با خطر بالای دیابت نوع ۲ احساس می‌شود. برای روشن‌تر شدن نتایج این مطالعه نیاز به مطالعاتی با جمعیت گسترده‌تر و در مقیاس وسیع‌تر وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام، به دلیل فراهم نمودن شرایط لازم برای انجام این تحقیق، کمال تشکر را دارند. همچنین، از همکاری صمیمانه‌ی مسؤولین محترم بیمارستان مصطفی خمینی ایلام سپاسگزاری می‌شود. در آخر نیز از کمک‌های صمیمانه‌ی دکتر امیر نادر امامی رضوی پژوهشگر انستیتو کانسر تهران در انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم. این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی به شماره‌ی ۶۱۵۳۰۵۱۳۹۰۲۰۰۱ و محل تصویب و اجرای طرح دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان و دانشگاه علوم پزشکی ایلام بوده است.

References

1. Dominici FP, Argentino DP, Munoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. Growth Horm IGF Res 2005; 15(5): 324-36.
2. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature 1987; 330(6148): 537-43.
3. Postel-Vinay MC, Kelly PA. Growth hormone receptor signalling. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1996; 10(3): 323-36.
4. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. J Clin Endocrinol Metab 1986; 62(1): 134-41.
5. Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J. Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. Endocrinology 1993; 132(4): 1863-5.
6. Zhang Y, Jiang J, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. Endocrinology 2000; 141(12): 4342-8.

7. Takagi K, Saito Y, Sawada J. Proteasome inhibitor enhances growth hormone-binding protein release. Mol Cell Endocrinol 2001; 182(2): 157-63.
8. Urbanek M, MacLeod JN, Cooke NE, Liebhaber SA. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. Mol Endocrinol 1992; 6(2): 279-87.
9. Dos SC, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. Nat Genet 2004; 36(7): 720-4.
10. Strawbridge RJ, Karvestedt L, Li C, Efendic S, Ostenson CG, Gu HF, et al. GHR exon 3 polymorphism: association with type 2 diabetes mellitus and metabolic disorder. Growth Horm IGF Res 2007; 17(5): 392-8.
11. Seidel B, Glasow A, Schutt M, Kiess W, Wu Z, Strasburger CJ, et al. Association between the GH receptor/exon 3 genotype and the level of exon 3-positive GH-binding protein in human serum. Eur J Endocrinol 2003; 148(3): 317-24.
12. Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger CJ, Heinrich U, Amselem S. Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(4): 1705-10.
13. Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. J Biol Chem 1993; 268(25): 19025-32.
14. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. J Biol Chem 2000; 275(25): 18664-9.
15. Mercado M, Gonzalez B, Sandoval C, Esquenazi Y, Mier F, Vargas G, et al. Clinical and biochemical impact of the d3 growth hormone receptor genotype in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(9): 3411-5.
16. Sorensen K, Aksglaede L, Munch-Andersen T, Aachmann-Andersen NJ, Leffers H, Helge JW, et al. Impact of the growth hormone receptor exon 3 deletion gene polymorphism on glucose metabolism, lipids, and insulin-like growth factor-I levels during puberty. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94(8): 2966-9.
17. Kamenicky P, Dos SC, Espinosa C, Salenave S, Galland F, Le BY, et al. D3 GH receptor polymorphism is not associated with IGF1 levels in untreated acromegaly. Eur J Endocrinol 2009; 161(2): 231-5.
18. Binder G, Trebar B, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. Homozygosity of the d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with a high total effect of GH on growth and a low BMI in girls with Turner syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 2008; 68(4): 567-72.
19. Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F. Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(22): 12394-9.
20. Padidela R, Bryan SM, Abu-Amero S, Hudson-Davies RE, Achermann JC, Moore GE, et al. The growth hormone receptor gene deleted for exon three (GHRd3) polymorphism is associated with birth and placental weight. Clin Endocrinol (Oxf) 2012; 76(2): 236-40.
21. Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(2): 659-64.
22. Gao L, Zheng Z, Cao L, Shen S, Yang Y, Zhao Z, et al. The growth hormone receptor (GHR) exon 3 polymorphism and its correlation with metabolic profiles in obese Chinese children. Pediatr Diabetes 2011; 12(4 Pt 2): 429-34.
23. Montefusco L, Filopanti M, Ronchi CL, Olgiati L, La-Porta C, Losa M, et al. d3-Growth hormone receptor polymorphism in acromegaly: effects on metabolic phenotype. Clin Endocrinol (Oxf) 2010; 72(5): 661-7.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.02.2013
Vol. 31, No. 235, 1st Week, July 2013
Accepted: 30.04.2013

Relationship between Exon 3 (+/-) Genotypes of Growth Hormone Receptor and Metabolic Risk Factors in Patients in Pre-diabetic State

Gholam Basati PhD[1], Zahra Valizadeh MSc[3], Fatemeh Keshavarzi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Metabolic impacts of two important alleles of the growth hormone receptors (GHR), one with retention of exon 3 [exon 3 (+) GHR] and the other with the deletion of it [exon 3 (-) GHR], on the metabolic risk factors of type 2 diabetes mellitus (T2DM) are really unknown. We aimed to evaluate relationships between the genotypes and metabolic risk factors of T2DM.

Methods: In the present study, 40 patients in pre-diabetic state and 40 healthy subjects were selected based on their clinical and laboratory evidence. For genotyping, DNA was extracted from the leukocytes of peripheral blood and amplified by multiplex polymerase chain reaction method. Genotypes of the amplified DNA samples were resolved using 1.5% agarose gel electrophoresis. Other risk factors were also determined by using standard methods and appropriate kits.

Findings: Frequency of the homozygote exon 3 retained genotype [exon 3 (+/+) GHR] was significantly higher in the subject in pre-diabetic state ($P < 0.001$); the frequency of exon 3 (+/-) GHR and exon 3 (-/-) GHR genotypes were significantly higher in the control subjects ($P < 0.001$). The decrease of metabolic risk factors was profound in subjects with exon 3(-/-) GHR genotype ($P < 0.001$).

Conclusion: The presence of exon 3 deleted allele of GHR, especially in the homozygosity situation, was associated with decreased levels of the metabolic risk factors of type 2 diabetes mellitus. So, the exon 3 deleted GHR may have more robust biological and metabolic activities lead to the resistance against T2DM.

Keywords: Exon 3, Growth hormone receptor, Risk factor, Type 2 diabetes mellitus

Citation: Basati G, Valizadeh Z, Keshavarzi F. **Relationship between Exon 3 (+/-) Genotypes of Growth Hormone Receptor and Metabolic Risk Factors in Patients in Pre-diabetic State.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(235): 591-600

1- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Allied Medical Science, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
2 Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kurdistan Science and Research Branch, Sanandaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Keshavarzi PhD**, Email:** gol.keshavarzi@gmail.com