تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر تظاهر ژن ABCA۱ کبدی موش ویستار

بهزاد مهدی خبازیان [۱]، دکتر عباس قنبری نیاکی[۲]، دکتر فاطمه رهبری‌زاده[۳]، دکتر سید علیرضا حسینی کاخک [۴]، مهدی جباری نوقابی[۵]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار دانشگاه تربیت معلم سبزوار
۴. استادیار دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوتکنولوژی پزشکی
۵. کارشناس ارشد آمار

تاریخ دریافت مقاله:۸۶/۲/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله:۸۶/۷/۱۴

چکیده

افزایش ۱ میلی‌گرم HDL می‌تواند منجر به کاهش ۲ تا ۳ درصدی بیماری‌های قلبی شود. این عمل پیشگیرانه HDL در وقوع بیماری‌های قلبی، به دلیل نقش آن در فرآیند انتقال معکوس کلسترول رخ می‌دهد. فرآیند انتقال معکوس کلسترول شامل جمع‌آوری کلسترول اضافی از بافت‌های پیرامونی و بازگرداندن آن به کبد، برای تشکیل صفرا است. اولین مرحله انتقال معکوس کلسترول که شامل خروج کلسترول و فسفولیپید از سلول است، توسط ناقل ABCA۱ میانجی‌گری می‌شود. فقدان ABCA۱ در مدل‌های انسانی و حیوانی، با کاهش بسیار شدید HDL و وقوع آرترواسکلروزیس همراه است؛ در صورتی که افزایش آن با افزایش HDL و پیشگیری از آرترواسکلروزیس همراه می‌باشد. بدین ترتیب احتمالاً شناخت فعال کننده‌های این ژن می‌تواند تأثیر مفیدی بر پیشگیری از بیماری‌های قلبی ـ عروقی داشته باشد. به منظور بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان این ژن ۱۰ عدد موش صحرایی نر از نژاد ویستار به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هفته، با شدت ۲۶ متر در دقیقه و به مدت ۹۰ دقیقه، تحت تمرین روی نوارگردان قرار گرفتند. نتایج، افزایش بیان ژن ABCA۱ در موش‌های گروه تجربی نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که یک مکانیزم مثبت فعالیت بدنی منظم در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، بیان ژن ABCA۱ باشد که اولین مرحله فرآیند انتقال معکوس کلسترول است.

کلید واژه‌های فارسی: ژن ABCA۱ ، انتقال معکوس کلسترول، HDL، تمرین استقامتی.

مقدمه

بیماری کرونری قلبی یکی از علل مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌باشد. این بیماری با افزایش میزان لیپو پروتئین کم چگال (LDL) و لیپو پروتئین بسیار کم چگال (VLDL) پلاسما رابطه مستقیم و با لیپو پروتئین پر چگال (HDL- C) رابطه معکوس دارد (۸-۱). اگر چه، HDL نقش آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی دارد، (۵) ولی باور عمومی بر آن است که HDL از طریق انتقال معکوس کلسترول در پیشگیری از بیماری‌های قلبی _ عروقی مؤثر است (۱۱- ۲،۶،۹). انتقال معکوس کلسترول به فرآیند جمع‌آوری کلسترول اضافی از بافت‌های پیرامونی، از جمله ماکروفاژهای دیواره سرخرگی و بازگرداندن آنها به کبد، همراه با تغییر شکل HDL، گفته می‌شود (۱۳،۳،۴،۱۲).

بر اساس مطالعات اخیر مراحل انتقال معکوس کلسترول عبارتند از: ۱) خروج کلسترول از سلول روی آپولیپو پروتئین A-I (Apo A-I) عاری از لیپید[1] یا دارای حداقل لیپید[2] که این فرآیند توسط ناقل ABCA۱[3] میانجی‌گری شده و به تشکیل ذرات Pre Beta HDL منجر می شود (۶). ۲) خروج بیشتر کلسترول به Pre Beta HDL و تشکیل ذرات صفحه‌ای بزرگ‌تر HDL، ۳) استریفه شدن کلسترول از طریق آنزیم لسیتین کلسترول اسیل‌ترانسفراز[4] که منجر به ساخت HDL کروی می‌گردد. ۴) بالغ شدن HDL یعنی تشکیل ذرات بزرگ‌تر HDL توسط کسب و استریفه شدن بیشتر کلسترول از لیپو پروتئین‌های دیگر یا توسط ترکیب با ذرات کوچک‌تر HDL و ۵) تغییر شکل HDL بالغ توسط عمل کلسترول استر ترانسفر پروتئین (CETP)، فسفولیپید ترانسفر پروتئین (PLTP)، لیپاز کبدی و گیرنده‌های رفتگر نوع BI[5] (SR-BI) با تشکیل ذرات HDL کوچک‌تر و آپولیپو پروتئین‌های A-I دارای حداقل لیپید[6] (۱۴).

نقش ABCA۱ به عنوان صادر کننده چربی سلول، زمانی معلوم گشت که کشف شد این ژن، ژن معیوب در بیماران تانژیه[7] ABCA۱ می‌باشد (۱۸-۱۵). در غیاب ژن ABCA۱

1. Free- Lipidated
2. Poorly-Lipidated
3. ATP- Binding cassette transporter protein
4. LCAT
5. Scavenger receptor type BI
6. Minimally-lipidated
7. Tangier

بیماران تانژیه دارای HDL بسیار کم بوده، قادر به خارج کردن کلسترول از سلول بـه Apo A-I نمی‌باشند و تجمع کلسترول استر در بسیاری از بافت‌ها به ویژه سرخرگ‌های آنها دیـده می‌شود (۱۹). آرترو اسکلروزیس زود هنگام نیز از دیگر عوارض این بیماری اسـت. عـلاوه بر نمونه‌های انسانی، فقدان عملکرد ژن ABCA۱ در موش‌هـا نیـز منجـر بـه تولیـد عـوارض مشابهی مانند بیماران تانژیه می‌شود (۲۰). اختلال در ژن ABCA۱ در مدل حیوانی جوجـه [1] WHAM (تنها مدل حیوانی شناخته شده طبیعی با کمبود خود به خودی HDL) نیز منجر به کاهش ۹۵ درصدی در HDL و Apo A-I می‌شود (۲۱).

از سویی بیان بـیش از حـد[2] ژن ABCA۱ در مـوش‌هـای تراریختـه، منجـر بـه کـاهش معنی‌دار در اندازه و پیچیدگی آسیب‌هـای آترواسـکلروتیک، افـزایش خـروج کلـسترول از سلول و در نهایت افزایش میزان و ترکیب HDL پلاسما مـی‌شـود (۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲). نتـایج این مطالعات به روشنی نشان می‌دهد که عملکرد ABCA۱ نقشی کلیـدی در فرآینـد انتقـال معکوس کلسترول دارد. به همین علت تلاش برای درک فعال کننده‌هـای ایـن ژن احتمـالا" می‌تواند برای پیشگیری از آرترواسکلروزیس بسیار سودمند باشد (۲۶).

اگر چه تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی می‌تواند منجر بـه بهبـود برخـی مراحـل کلیدی در فرآیند انتقال معکوس کلسترول مانند افزایش میزان و ترکیبHDL(۲۷)، افزایش خروج کلسترول از سلول (۲۸)، افزایش تشکیل و انـدازه Apo A-I (۲۹،۳۰)، افـزایش Pre Beta HDL پلاسما (۳۱،۳۲) و افزایش فعالیت آنزیم LCAT (۳۳،۲۹، ۳۴) شود اما تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر تظـاهر ژن ABCA۱، کـه اولـین مرحلـه در فرآینـد انتقال معکوس کلسترول می‌باشد، نپرداخته است. با توجه به این که تاکنون هیچ مطالعه‌ای بـه بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر تظاهر ژن ABCA۱ نپرداخته است، پژوهش حاضـر بـه بررسـی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر تظاهر ژن ABCA۱ کبدی می‌پردازد.

1. Wisconsin hypoalpha mutant
2. Overexpression

روش تحقیق

تعداد ۱۰ عدد موش نر سفید نژاد ویستار[1] از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس، تحت شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت (۳±۵۰ درصد) در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند و در سرتاسر دوره تحقیق توسط یک نفر جابجا و دستکاری می‌شدند. پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط انسان، به طور تصادفی به دو گروه شاهد و تجربی همسان از لحاظ وزن تقسیم شدند. تمرین گروه تجربی با شدت ۱۵ متر در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در روز آغاز شد و به تدریج، در مدت دو هفته با افزایش ۱ متر در دقیقه و ۷ دقیقه و ۱۵ ثانیه‌ای در روز به شدت و مدت نهایی ۲۶ متر در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه رسید (۴۹). سپس موش‌ها ۶ هفته دیگر، هفته‌ای ۵ جلسه با این شدت و مدت به تمرین ادامه دادند.

لازم به ذکر است که این تمرین یک تمرین استقامتی متوسط معادل ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی برآورد می‌شود (۴۳-۴۸). گروه شاهد نیز هفته‌ای سه جلسه و هر جلسه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ متر در دقیقه روی نوارگردان راه می رفتند تا تمام شرایط از جمله دستکاری موش‌ها توسط محقق برای هر دو گروه یکسان شده و تنها تفاوت گروه شاهد و تجربی در برنامه تمرینی باشد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها در حالتی که یک شب کامل ناشتا بودند (۱۴ ساعت ناشتایی) از طریق تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلوزین بیهوش شدند. بافت کبد سریعا" جدا و به داخل میکروتیوب منتقل شد و در نیتروژن مایع قرار گرفت. سپس بافت منجمد شده جهت تخلیص mRNA در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

تلخیص mRNA و بررسی بیان ژن توسط PT-PCR

مقدار ۵۰ میلی‌گرم از بافت منجمد کبد با روش هموژنیزه کردن سرد پودر شد و برای تخلیص mRNA مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از روش گوانیدینیوم تیوسیانات[2]،

1. Wistar rat
2. Guanidinium thiocyanate method

RNA بافتی، محافظت و جداسازی گردید. به منظور جداسازی mRNA، از کیت تخلیص RNA شرکت Roche که با استفاده از ذرات مغناطیسی[1] پوشیده شده، با اولیگو dt[2] با درجه خلوص بالا و کیفیت مناسب که قادر به جداسازی mRNA است، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده گردید. از هر یک از موش‌ها، نیم میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA به کار گرفته شد. در این تحقیق، برای ساخت cDNA از آغازگر (پرایمر[3]) اولیگو dT که مکمل دم‌های poly A در mRNA است و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد. کیت مذکور از شرکت Fermentase آلمان خریداری گردید. سطح نسبی mRNA ی ژن ABCA۱ در عضله با روش RT-PCR نیمه کمی[4] اندازه گیری شد. این روش به کمک پرایمرهای ویژه ABCA۱ شامل:

ABCA۱- Forward: ۵′- CGT CCT CCT TGT CAT CTC TG -۳′

ABCA۱ – Reverse: ۵′- TAA CTT TCT TTC ACT TTC TCG TC-۳′

که یک قطعه ۲۳۸ جفت بازی را در این ژن تکثیر می‌کنند انجام گردید. برای کنترل تکثیر این ژن از پرایمرهای ویژه B-actin استفاده شد. این پرایمرها شامل:

B-actin- Forward:۵′ - TCC TGC GGC ATC CAT GAA ACT-۳′

B-actin –Reverse: ۵′ - ATC GTG CAC CGC AAA TGG TTC-۳′

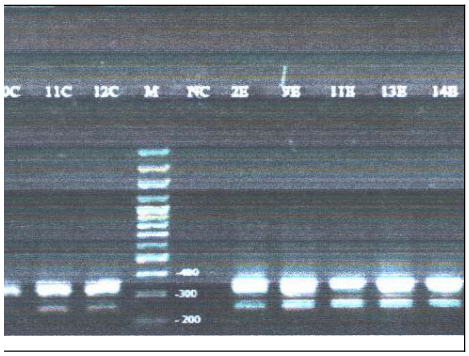
بوده و یک قطعه ۳۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین را تکثیر می‌کنند. بتا اکتین یک ژن همیشه بیان شونده[5] است و می‌تواند شاهد خوبی برای بررسی کل فرآیند تخلیص mRNA باشد. مراحل PCR شامل ۳۵ تکرار از سه مرحله: ۱) دناتوراسیون[6] ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ۲) دمای جفت شدن[7] ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۳) دمای طویل شدن[8] ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه بود. برای به دست آوردن بهترین غلظت cDNA الگو، غلظت‌های مختلف cDNA بررسی و نهایتا" بهترین غلظت برای PCR نهایی به کار گرفته شد. آزمون‌های این تحقیق لااقل سه بار تکرار شد. بررسی نیمه کمّی باندها با کمک

1. Magnetic particles
2. Oligo (dt)
3. Primer
4. Semiquantitative PCR
5. House Keeping gane
6. Denaturation
7. Annealing
8. Extension

دانسیومتر کامپیوتری (Kodak, CT) انجام و سطح بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتا اکتین محاسبه شد.

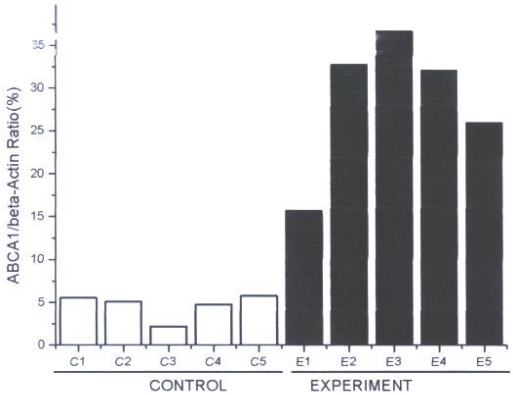
نتایج

با استفاده از RT-PCR بیان ژن ABCA۱ بررسی شد. نتایج به روشنی نشان می‌دهد که بیان ABCA۱ در پاسخ به ۶ هفته تمرین استقامتی افزایش می‌یابد.



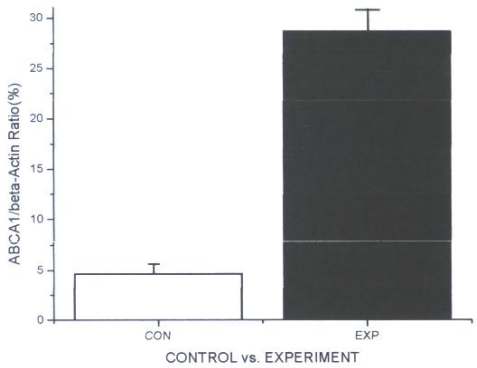
شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز ژن‌های بتا اکتین و ABCA۱ در موش‌های کنترل و تجربی. ۱C تا ۵C گروه کنترل، ۱E تا ۵E گروه تجربی، M مارکر و NC کنترل منفی می‌باشد.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، ژن بتا اکتین به عنوان کنترل تکثیر ژن ABCA۱ به کار رفته، در تمام نمونه‌ها بیان شده است. بیان ژن ABCA۱ در موش‌های گروه کنترل، بسیار کم و در موش‌های گروه تجربی، به وضوح دیده می‌شود. پس از این مرحله، بررسی نیمه کمی باندها با کمک دانسیومتر کامپیوتری(Kodak, CT) انجام و سطح بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتا اکتین محاسبه شد.



شکل۲. درصد بیان mRNA ژن ABCA ۱ نسبت به بتا اکتین در هر یک از نمونه‌های گروه‌های کنترل و تجربی

همان‌طور که از شکل فوق مشخص است، بیان ژن ABCA۱ در گروه تجربی، در مقایسه با گروه کنترل بیشتر می‌باشد.



شکل ۳. بیان ژن ABCA۱ در مجموع در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل

همان‌گونه که در شکل بالا مشاهده می‌شود، بیان ژن ABCA۱ در مجموع در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه، بررسی ژن کبدی ABCA۱ بر اثر ۶ هفته تمرین استقامتی، با شدت متوسط در موش‌های صحرایی نر بود.

زندگی بدون تحرک با افزایش بیماری‌های قلبی _ عروقی همراه است؛ در حالی که آمادگی بدنی و اجرای ورزش منظم، احتمال ابتلاء به بیماری قلبی _ عروقی را کاهش می‌دهد(۳۵). به نظر می‌رسد بخشی از فوائد بی‌شمار ورزش منظم برای سلامتی، مربوط به تغییرات مفیدی باشد که در نیم رخ لیپو پروتئین‌های خون رخ می دهد(۲۷). این تغییرات اغلب، شامل کاهش تری گلیسیرید، VLDL, LDL و افزایش HDL یا زیر مجموعه‌های آن می‌باشد (۲۷، ۳۰، ۳۶). نشان داده شده که HDL از طریق دفع کلسترول اضافی از سلول‌های پیرامونی و بازگرداندن آنها به کبد، در فرآیندی تحت عنوان انتقال معکوس کلسترول، نقش مؤثری در پیشگیری از بیماری‌های قلبی _ عروقی دارد (۳۷).

ناقل ABCA۱ خارج کننده اصلی کلسترول و فسفولیپید از سلول به آپولیپو پروتئین عاری از لیپید یا دارای حداقل لیپید، جهت تشکیل ذرات Pre Beta HDL است. بیماری نادر تانژیه که بیماری اختلال در متابولیسم چربی‌ها است و تاکنون حدود ۶۰ مورد از آن در جهان گزارش شده، منجر به تشخیص عملکرد ژن و پروتئین ABCA۱ شد (۳۸). انجام مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی فاقد ژن ABCA۱ بر عملکرد این ژن در انتقال معکوس کلسترول و تشکیل ذرات بالغ HDL صحه گذاشته است (۳۹). از سوی دیگر اخیرا" چند آزمایشگاه به تولید موش‌های تراریخته‌ای اقدام کردند که دارای بیان بیش از حد ABCA۱ می‌باشد (۴۰-۴۲). به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل ابتدایی این موش‌ها آثار مفید افزایش بیان ABCA۱ در شرایط in vivo را تأیید می‌کند (۳۹).

اگر چه تحقیقات زیادی در طول سال‌های گذشته به تأثیر فعالیت‌های بدنی بر HDL پرداخته‌اند، (۲) اما تعداد تحقیقاتی که مکانیزم‌های افزایش HDL را بررسی کرده باشند بسیار محدود است. با توجه به اهمیت ژن ABCA۱ در اولین مرحله انتقال معکوس کلسترول و نیز نقش مهم آن در تشکیل ذرات بالغ HDL، این تحقیق برای نخستین بار در جهان به مطالعه بیان این ژن توسط فعالیت منظم بدنی پرداخت. همان طور که از نتایج این مطالعه مشخص است ژن ABCA۱ توسط تمرین استقامتی با شدت متوسط بیان می‌شود. بدین ترتیب احتمالا" یک مکانیزم افزایش HDL توسط فعالیت بدنی می‌تواند افزایش بیان و در نتیجه خروج بیشتر کلسترول از سلول توسط این ناقل باشد.

منابع:

1. Hiroaki H, Takeshi K, Tohru E, Eiji S, Takayuki F, Sadao T, Takahashi M, Cooper I, Jackie A, Stepanova, Irina P. Nazeem N, and Miller NE.(2004). Association of Cornary Heart Disease with pre-HDL Concentrations in Japanese Men. Clinical Chemistry. 50:3, 598-595.
2. Oram JF. (2003). "HDL Apolipoproteins and ABCA۱: Partners in the Removal of Excess Cellular cholesterol". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23: 720-727.