



مقایسه بیان ژن *ANGPTL4* در سلول‌های PBMC بیماران دیابتی و افراد سالم

میلاذ ایجادی: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
ابوالفضل امیدفای فر: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
حمید قاندری: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
فرانک کازرونی: دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
f_kazerouni@sbm.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

دیابت نوع دو،
ANGPTL4
آنژیوپوئین

زمینه و هدف: دیابت نوع ۲ یک اختلال فراگیر شایع متابولیکی است که با ابتلا به بیماری‌های قلبی، کلیوی و سکته مغزی مرتبط می‌باشد. ژن *Angiotensin-like 4 (ANGPTL4)* یک پروتئین مهم ترشحی محسوب می‌شود که در تنظیم هومئوستاز نقش داشته و مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر حاکی از ارتباط این پروتئین با بیماری دیابت نوع ۲ است. در این مطالعه قصد داشتیم میزان بیان ژن *ANGPTL4* را در افراد مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۵۰ نفر بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۵۰ نفر از افراد سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان شهیدای تجریش وارد مطالعه شدند. میزان قند خون ناشتا (FBS) با استفاده از اتوانالایزر هیتاچی و سطح انسولین با روش الایزا اندازه‌گیری شد. لکوسیت‌های تک هسته‌ای (PBMC) را با استفاده از شیب چگالی ایجاد شده به وسیله محلول فایکول جداسازی نمودیم. پس از استخراج RNA، PBMC را با استفاده از کیت Gene All استخراج کردیم و برای بررسی میزان بیان ژنی از روش RT-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژنی *ANGPTL4* در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. با این وجود، این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود ($p < 0.0625$). علاوه بر این، نتایج نشان داد که میان *ANGPTL4* و *FBS* و بیان ژن *ANGPTL4* همبستگی مثبت وجود دارد ($r = 0.214, p < 0.067$).

نتیجه‌گیری: میزان بیان *ANGPTL4* در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه سالم کاهش یافته اما این کاهش معنادار نیست. باوجود مطالعات انجام شده در زمینه ارتباط *ANGPTL4* و دیابت نوع دو، فهم ما از ارتباط و مکانیسم احتمالی آن کامل نبوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Ijadi M, Omidifar A, Ghaedi H, Kazerouni F. Comparison of *ANGPTL4* gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Razi J Med Sci.* 2021;28(1):23-33.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با **CC BY-NC-SA 3.0** صورت گرفته است.



Comparison of ANGPTL4 gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects

Milad Ijadi: Department of Medical Laboratory Sciences, school of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abolfazl Omidifar: Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Hamid Ghaedi: Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Faranak kazerouni: Associate Professor of Clinical Biochemistry, Department of Medical Laboratory Sciences, school of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) f_kazerouni@sbmu.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Type two diabetes mellitus (T2DM) is recognized as a metabolic disorder related to various complications such as heart disease, renal disease, and ischemic stroke. Type 2 diabetes is characterized by a defect in the insulin receptors on the cell membrane of the target cells, which in fact causes a kind of resistance or reduction of insulin sensitivity in the body. In recent years, various studies have been conducted on genes involved in diabetes, and research has revealed the fact that genes and gene interactions play an important role in pathogenesis as well as increasing the risk of diabetes. Given that type 2 diabetes accounts for about 25% to 25% in developed countries and even higher in developing countries, the prevention and care of this type of diabetes is of particular importance. The prevalence of type 2 diabetes has increased significantly in recent years in the world and in our country. In addition, unfortunately, we are witnessing a decrease in the age of onset of this disease. The ANGPTL4 is recognized as crucial protein that modulates glucose homeostasis and recent data suggest that ANGPTL4 may be correlated with the risk of type two diabetes. This protein is encoded in humans by the ANGPTL4 gene. This gene is a member of the angiopoietin family, which encodes a glycosylated secretory protein with an amino terminal domain containing compressed screws and a carboxyl end domain such as fibrinogen (11). This protein is expressed in mice and humans in a wide range of cells. In humans, it is more expressed in muscle, liver, kidney and intestine than other tissues, but the highest rate of expression is observed in humans in liver tissue. We sought to investigate ANGPTL4 expression in type 2 diabetic patients compared to healthy participants.

Methods: This study was a case-control study. Fifty patients with type 2 diabetes (15 males and 35 females) were included in the study group and 50 healthy individuals (18 males and 32 females) were included in the study. The subjects were gender matched. We recruited 50 patients with type 2 diabetes mellitus and 50 healthy individuals that referred to Shohadaye Tajrish Hospital. FBS and insulin circulating levels were measured using Hitachi auto-analyzer and ELISA method respectively. We separated mononuclear leukocytes (PBMC) using a density gradient process following ficoll solution. Upon extraction of PBMC, we extracted RNA using Gene All kit. Then Real-time PCR method performed to assess the transcript levels of ANGPTL4. Written consent was obtained from all eligible individuals to agree to participate in the study, assuring them that the samples taken would only be used in this research project and

Keywords

Individual Motivation,
Organizational
Motivation,
Athletes' Health,
Provincial Sports
Committees

Received: 01/12/2020

Published: 05/04/2021

that the results would be valid. This review will remain confidential. Quantitative data were analyzed using Kolmogorov-Smirnov test and if normal, using quantitative t test, quantitative data were compared between the two groups. Abnormal data were analyzed using Mann-Whitney test. Chi-square test was used to compare qualitative data between the two groups. Prism 6 software was used to analyze the data and data with $p < 0.05$ were considered significant.

Results: This study was performed as a case-control study on 50 patients with type 2 diabetes and 50 healthy individuals as a control group. The demographic and clinical characteristics of the subjects are shown in Table 1. Due to the abnormal distribution of data, the data using the median and IQR, as well as to compare the differences between the two groups, the Mann-Whitney test was used. As shown in the table, the age range was 57 (43-69) in the diabetic group and 55 (49-64) in the healthy group ($p=0.058$). The ANGPTL4 gene expression in type 2 diabetic group was decreased compared with the healthy participants, but it was not statistically significant ($p < 0.065$). Overall, our results demonstrate that there is a positive correlation between FBS and ANGPTL4 expression ($r = 0.214$, $p < 0.0067$). The average body mass index in the diabetic group was 27.9 (29-24) Kg / m² and in the healthy group was 26 (28-23) Kg / m². The results also showed that the mean blood sugar in the diabetic group was 139 (125.3-180) and in the healthy group was 91 (99-84). Statistical analysis showed that there was a significant difference between the blood sugar results of the two groups ($p=0.001$).

Conclusion: Recent studies have shown that ANGPTL4 plays an important role in glucose homeostasis, pathogenesis of diabetes as well as metabolic syndrome. However, studies have not been sufficient and in some studies, contradictory results are observed. Therefore, the present study was designed to evaluate and compare the expression of ANGPTL4 gene with indices associated with people with type 2 diabetes compared with healthy individuals. In this study, it was found that serum levels of FBS (P value < 0.001) and HOMA-IR in the diabetic group increased compared to the control group. While no significant difference was observed between other parameters such as BMI. Also, due to matching the control and patient groups in terms of age and selection from both male and female groups, no significant difference in terms of age and sex was observed between the two groups. The level of expression of ANGPTL4 in participants with type 2 diabetes has diminished. The results of the present study showed that the expression level of ANGPTL4 gene in diabetic individuals decreases compared to healthy individuals. In addition, the expression of this gene is positively correlated with fasting blood sugar. However, the association of this molecule with glucose metabolism as well as the pathogenesis of diabetes has not been fully investigated. It seems that despite the studies on the relationship between ANGPTL4 and type 2 diabetes, our understanding of this relationship and mechanism is still incomplete and more studies are needed in this field. It is suggested that in future studies, the level of ANGPTL4 in the serum of individuals Diabetes and its relationship with biochemical parameters such as HDL-c and LDL-c as well as the enzyme lipoprotein lipase should be examined. It seems that despite studies on the relationship between ANGPTL4 and type 2 diabetes, we unable to describe the possible relationship and mechanism of ANGPTL4 in metabolic pathways. Further studies are needed to investigate this notion.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Ijadi M, Omidifar A, Ghaedi H, Kazerouni F. Comparison of ANGPTL4 gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects. Razi J Med Sci. 2021;28(1):23-33.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

رژیم غذایی و به‌طور کلی تغییر سبک زندگی فرد بیمار، این بیماری را کنترل نمود و از پیشرفت عوارض آن جلوگیری کرد. ولی بسیاری از بیماران با وجود اطلاع از عوارض بیماری به توصیه‌های پزشکی و درمانی به‌طور کامل عمل نمی‌کنند و در نتیجه احتمال گسترش عوارض مربوط به دیابت افزایش می‌یابد (۶،۷).

در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی بر روی ژن‌های دخیل در دیابت انجام شده است و تحقیقات این حقیقت را آشکار ساخته است که ژن‌ها و برهمکنش‌های ژنی نقش مهمی در بیماری‌زایی و همچنین افزایش خطر ابتلا به دیابت را دارا می‌باشند (۸). ژن *Angiotensin-like protein 4 (ANGPTL4)* از جمله ژن‌هایی است که در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی بر روی انجام شده است و نشان داده شده است که این پروتئین با دیابت نوع دو مرتبط می‌باشد. *ANGPTL4* پروتئینی را کد می‌کند که توسط کبد و بافت چربی سفید ترشح شده و می‌تواند فعالیت لیپوپروتئین لیپاز را تحریک کند (۹). این پروتئین در انسان به‌وسیله ژن *ANGPTL4* کد می‌شود. این ژن یکی از اعضای خانواده *angiopoietin* است که یک پروتئین ترشحی گلیکوزیله به همراه دامین انتهایی آمینو حاوی پیچ‌های فشرده و دامین انتهایی کربوکسیل همانند فیبرینوژن را کد می‌کند (۱۱). این پروتئین در موش و انسان در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها بیان می‌شود. در انسان در ماهیچه، کبد، کلیه و روده بیان بیشتری نسبت با سایر بافت‌ها داشته اما بیشترین میزان بیان آن در انسان در بافت کبد مشاهده می‌شود (۸،۱۲). مطالعات نشان داده است که میزان بیان ژنی *ANGPTL4* در افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی افزایش می‌یابد. برخلاف این موضوع، مطالعات بیشتر نشان داده است که بیان ژن *ANGPTL4* در حالت دیابت نوع دو کاهش می‌یابد. علاوه بر این تحقیقات نشان داده است که سطح سرمی *ANGPTL4* در افراد مبتلا به دیابت نوع دو افزایش می‌یابد. *ANGPTL4* می‌تواند به‌طور موثری کلیرانس تری‌گلیسرید را مهار کند و باعث افزایش تری‌گلیسرید سرم از طریق مهار آنزیم لیپوپروتئین لیپاز شود. مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که *ANGPTL4* باعث تبدیل فرم فعال لیپوپروتئین لیپاز (LPL) به فرم غیرفعال آن (مونومر)

امروزه معضل بیماری‌های غیر عفونی، بسیاری از باورهای بهداشتی را تحت‌الشعاع قرار داده و توجه جوامع علمی را به خود معطوف داشته است (۱). در گذشته‌ای نه چندان دور مشکل اصلی جامعه و مردم، بیماری‌های واگیر و مرگ و میر بالای ناشی از این بیماری‌ها بود، در حالی که در حال حاضر به علت کنترل بیماری‌های واگیر، توسعه شهرنشینی، پیشرفت صنعت و زندگی ماشینی، شیوع بیماری‌های غیرواگیر افزایش یافته و رفته‌رفته بیماری‌های واگیر جای خود را به بیماری‌های غیرواگیر داده‌اند، به صورتی که امروزه مهم‌ترین علل مرگ و میر در جوامع، بیماری‌های غیرواگیر خصوصاً بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان‌ها و سوانح و حوادث می‌باشد. به عبارتی ۵۲٪ کل مرگ‌های دنیا و ۲۰٪ بار جهانی بیماری‌ها ناشی از بیماری‌های غیرواگیر است که مسئول ۷۴٪ هزینه‌های پزشکی هستند (۲). دیابت یک بیماری مزمن غده درون‌ریز می‌باشد که ویژگی آن سوء عملکرد در سوخت‌وساز گلوکز، ناشی از اشکالاتی در تولید یا بهره‌گیری از هورمون انسولین است. این بیماری سه شکل اصلی دارد: ۱- نوع یک یا وابسته به انسولین T1D ۲- نوع دو یا غیر وابسته به انسولین T2DM ۳- دیابت بارداری

دیابت نوع دو، با نقص در گیرنده‌های انسولین بر روی غشاء سلولی سلول‌های هدف مشخص می‌گردد که در واقع در این حالت نوعی مقاومت یا کاهش حساسیت به انسولین در بدن ایجاد می‌شود. دیابت نوع دو، در اثر برهمکنش متقابل عوامل وراثتی، محیطی و رفتاری در افراد به وجود می‌آید (۳،۴). در عین حال شواهد زیادی بیان‌کننده این مطلب هستند که فاکتورهای خطر قابل تعدیل مانند چاقی و کم‌تحركی به‌عنوان مهم‌ترین عوامل غیر ژنتیکی ایجاد این بیماری محسوب می‌شوند. اگرچه درمان‌های پزشکی نقش مهمی در کاهش عوارض مخرب این بیماری دارد اما معمولاً قادر به بر طرف کردن همه آن‌ها و همچنین برگرداندن سطح گلوکز خون به حد نرمال نیستند (۵). به عبارتی علیرغم پیشرفت‌های موجود در عرصه پزشکی، درمان قطعی‌ای برای این بیماری یافت نشده است، ولی می‌توان از طریق کاهش وزن بدن، افزایش فعالیت بدنی و تغییرات

مورد مطالعه از لحاظ جنسیت همسان‌سازی شدند. گروه سالم شامل افراد در محدوده سنی بین ۳۵-۷۵ سال بود که گلوکز ناشتای زیر 100 mg/dl داشته و از بین داوطلبین مراجعه‌کننده به مرکز بیمارستان شهدای تجریش تهران انتخاب شدند. گروه بیمار شامل افراد در همین محدوده سنی بودند که با توجه به معیار انجمن دیابت آمریکا (ADA)، قند خون ناشتای بیش از 126 mg/dL یا HbA1C بیش از $6,5$ و یا قند دو ساعته بیش از 200 mg/dL داشتند. معیارهای ورود به مطالعه برای افراد مبتلا به T2DM عبارت بودند از: ۱- تشخیص پزشک متخصص غدد ۲- عدم سابقه بیماری‌های اندوکراین از قبیل پرکاری یا کم کاری تیروئید ۳- عدم سابقه بیماری‌های کبدی از قبیل هپاتیت ۴- عدم ابتلا به بیماری‌های عفونی و التهابی ۵- عدم دریافت انسولین. همچنین معیارهای ورود به مطالعه برای گروه کنترل عبارت بودند از: ۱- گلوکز ناشتای کافی ۲- عدم ابتلا به بیماری‌های کبدی، عفونی و التهابی ۳- نداشتن سابقه فامیلی دیابت در بستگان درجه یک. در صورت نداشتن هر یک از معیارهای ذکر شده، افراد از مطالعه خارج شدند.

از همی افراد واجد شرایط برای شرکت در پژوهش، رضایت‌نامه‌ی کتبی جهت موافقت و همراهی در این کار اخذ گردید و به آن‌ها این اطمینان داده شد که نمونه‌های گرفته‌شده فقط در این پروژه‌ی تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته و نتایج حاصل از این بررسی به صورت محرمانه باقی خواهد ماند. همچنین، این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تأیید قرار گرفت (IR.SBMU.RETECH.REC.1397.1101). داده‌های تن‌سنجی (قد، وزن، دور کمر، فشارخون، BMI) نیز برای هر دو گروه کنترل و بیمار اندازه‌گیری شد و در پرسشنامه ثبت گردید. میزان قند خون ناشتا (FBS) به وسیله دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی و انسولین با استفاده از روش الایزا در آزمایشگاه بیمارستان شهدای تجریش اندازه‌گیری شدند. به دلیل دسترسی راحت و آسان، برای جداسازی لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌های انسانی (لکوسیت‌های تک‌هسته‌ای، (PBMCs) از خون محیطی به‌عنوان منبع اصلی استفاده می‌شود. جداسازی لنفوسیت‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به روش شیب

شده و بدین ترتیب لیپوپروتئین لیپاز را غیر فعال می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اروپایی و آمریکایی انجام گرفته است، نشان داده شده است که ANGPTL4 رابطه معکوسی با HDL دارد. در مطالعه اخیر نیز نشان داده شده است که سطح سرمی ANGPTL4 در افراد مبتلا به دیابت نوع دو و سندرم متابولیک افزایش یافته و این پروتئین با HDL در این بیماران رابطه معکوس دارد.

T2DM یک اختلال ژنتیکی هتروژن است که فاکتورهای محیطی، ژنتیکی و رفتاری در بیماری‌زایی آن نقش دارند (۱۳). مطالعات اخیر بیشترین تأکید را بر اهمیت فاکتورهای ژنتیکی در بیماری‌زایی دیابت نوع دو دارند. براین اساس ژن‌های متعددی در ارتباط با دیابت نوع دو مورد بررسی قرار گرفته‌اند ولی هنوز مکانیسم ژنتیکی خاصی برای آن شناخته نشده است (۱۴،۱۵). با توجه به اینکه دیابت نوع دو، در کشورهای توسعه‌یافته حدود ۶۵ درصد و در کشورهای در حال توسعه حتی درصد بالاتری از انواع بیماری دیابت را شامل می‌شود بنابراین پیشگیری و مراقبت از این نوع دیابت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شیوع دیابت نوع دو طی سالیان اخیر در دنیا و نیز در کشور ما افزایش قابل توجهی یافته است. علاوه بر این متأسفانه شاهد کاهش سن ابتلا به این بیماری می‌باشیم. با توجه به آخرین آمارهای سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۲، برآورد می‌شود که در حدود ۱۴۹ میلیون نفر در سراسر جهان یا ۵,۱ درصد از جمعیت بالغ، مبتلا به دیابت باشند و این رقم تا سال ۲۰۲۵ به ۳۳۳ میلیون یا ۶,۳ درصد افزایش خواهد یافت. در همین راستا با توجه به شیوع بالای دیابت نوع دو در کشور، در صورتی که ارتباط بیان ژنی ANGPTL4 با دیابت نوع دو مشخص گردد، ممکن است بتواند به فهم بهتر مکانیسم این بیماری و همچنین در کنترل و بهبود این بیماری ثمربخش باشد.

روش کار

این مطالعه به روش مورد-شاهدی انجام گرفت. ۵۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو (۱۵ نفر مرد و ۳۵ نفر زن) به‌عنوان گروه بیمار و ۵۰ فرد سالم (۱۸ نفر مرد و ۳۲ نفر زن) به‌عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. افراد

در صورت نرمال بودن با استفاده از آزمون Sample t test داده های کمی میان دو گروه مقایسه شدند. داده های غیرنرمال با استفاده از آزمون من ویتنی مورد بررسی قرار گرفتند. برای مقایسه داده های کیفی بین دو گروه از آزمون کای دو استفاده شد. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار Prism 6 استفاده شد و داده های با $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

این مطالعه به عنوان یک مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام شد. مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. به دلیل توزیع غیر نرمال داده ها، داده ها با استفاده از میانه و IQR و همچنین برای مقایسه تفاوت بین دو گروه نیز از آزمون Mann-whitney بهره گرفته شده است. همان طور که در جدول نشان داده شده است محدوده سنی در گروه دیابتی ۵۷ (۴۳-۶۹) و در گروه سالم ۵۵ (۴۹-۵۴) بود ($p=0.058$).

علاوه بر این، میانگین شاخص توده بدن در گروه دیابتی 27.9 Kg/m^2 (۲۴-۲۹) و در گروه سالم 26 Kg/m^2 (۲۳-۲۸) بوده است. همچنین نتایج نشان داد که میانگین قند خون در گروه دیابتی ۱۳۹ (۱۲۵/۳-۱۸۰) و در گروه سالم ۹۱ (۸۴-۹۹) بود. آنالیز های آماری نشان داد که تفاوت معناداری میان نتایج قند خون دو گروه وجود دارد ($p=0.001$).

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است میزان بیان ژنی ANGPTL4 در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. با این وجود، این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود ($p < 0.065$). نتایج نشان داد که میزان بیان ANGPTL4 در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به میزان حدوداً ۰/۲ برابر کاهش یافته است اما این کاهش معنادار نمی باشد.

علاوه بر این، نمونه ای از منحنی ذوب و تکثیر که توسط دستگاه ریل تایم رسم شده است در شکل ۲ و شکل ۳ آورده شده است. از منحنی ذوب نمونه ها برای بررسی اختصاصیت پرایمرها در واکنش PCR استفاده گردید. وجود یک تک پیک نشان دهنده عدم دایمر

چگالی روشی سریع و پرکاربرد بوده که می تواند لنفوسیت ها و مونوسیت ها را از گرانولوسیت ها و اریتروسیت ها جدا نماید. در این مطالعه، جداسازی PBMCs با استفاده از شیب چگالی ایجاد شده به وسیله محلول جداسازی فایکول با چگالی 1.077 g/cm^3 انجام گرفت. برای استخراج PBMCs در مدت زمان کمتر از دو ساعت از زمان خونگیری، لوله های ضدانعقاد حاوی نمونه خون به آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشکده پیراپزشکی انتقال داده شد و سپس مراحل استخراج با استفاده از پروتکل مربوطه انجام شد. استخراج RNA در محیط استریل و عاری از هرگونه آلودگی انجام شد. کلیه مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی گراد و بر روی یخ انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت (NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific). سنتز cDNA طبق پروتکل کیت تاکارا و با استفاده از پرایمرهای oligodt و Random hexamer به عنوان الگو انجام شد. برای بررسی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. از رنگ فلوروسانس سایبرگرین طی یک واکنش دو مرحله ای جهت سنجش بیان ژن استفاده شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از:

ژن: GAPDH

Forward – 5'TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'

Reverse – 5'GGCATGGACTGTGGTCATGAG3'

ژن: ANGPTL4

Forward – 5'TCTCCGTACCCTTCTCCACT3'

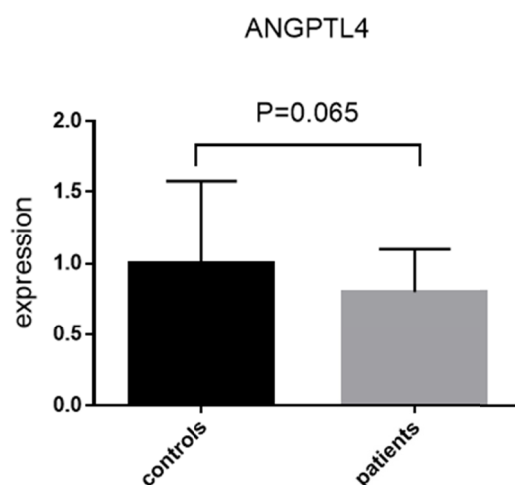
Reverse – 5'AGTACTGGCCGTTGAGGTTG3'

همچنین، اندازه گیری تغییرات غلظت سرمی انسولین بیماران دیابتی با استفاده از کیت الایزا (آمریکا) Monobind انجام شد. حساسیت این کیت 0.75 $\mu\text{IU/ml}$ می باشد و محدوده قابل سنجش در این کیت 0.7-25 $\mu\text{IU/ml}$ می باشد.

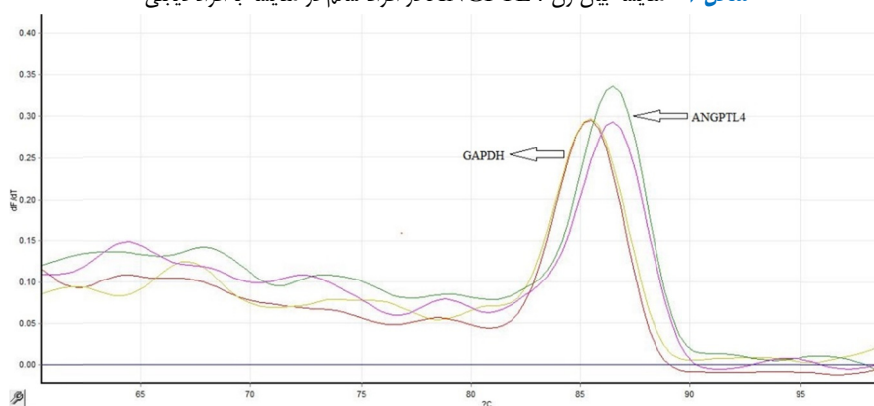
تجزیه و تحلیل نتایج: داده های کمی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفتند

جدول ۱- ویژگی‌های بیوشیمیایی و تن‌سنجی افراد مورد مطالعه

Characteristics	Diabetes	Healthy controls	Mann-Whitney U p-value
	Median (IQR)	Median (IQR)	
Age (yr)	57(43-69)	55 (49-64)	0.058
BMI (kg/m ²)	27.9 (24-29)	26 (23-28)	0.818
Weight(Kg)	69.5(58-80)	66(50-75)	0.68
Height(cm)	163(152.3-170.9)	161(153.2-168.5)	0.116
FBS (mg/dL)	139(125.3-180)	91 (84-99)	0.001*
Insulin	17.10(9-28)	9-14.7(13.5)	0.021*
HbA1c	7.2(6.8-7.9)	5.2 (4.7-5.5)	0.011*
HOMA-IR	6.13(3.5-9.87)	1.5 (1.1-2.3)	0.001*



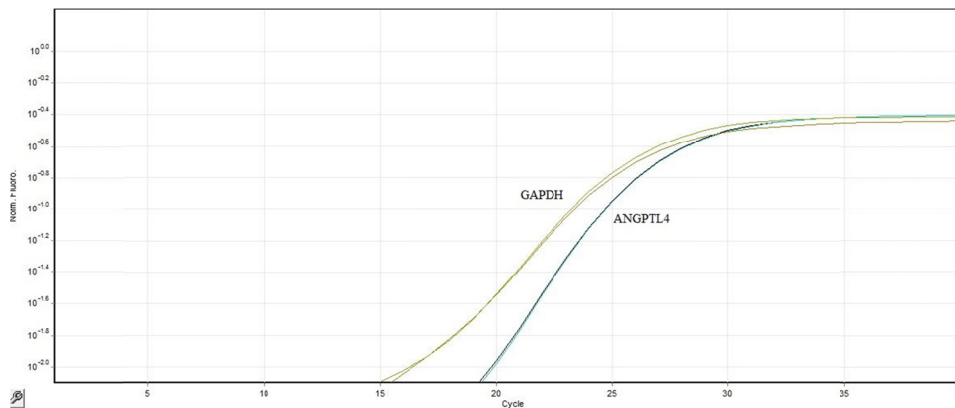
شکل ۱- مقایسه بیان ژن ANGPTL4 در افراد سالم در مقایسه با افراد دیابتی



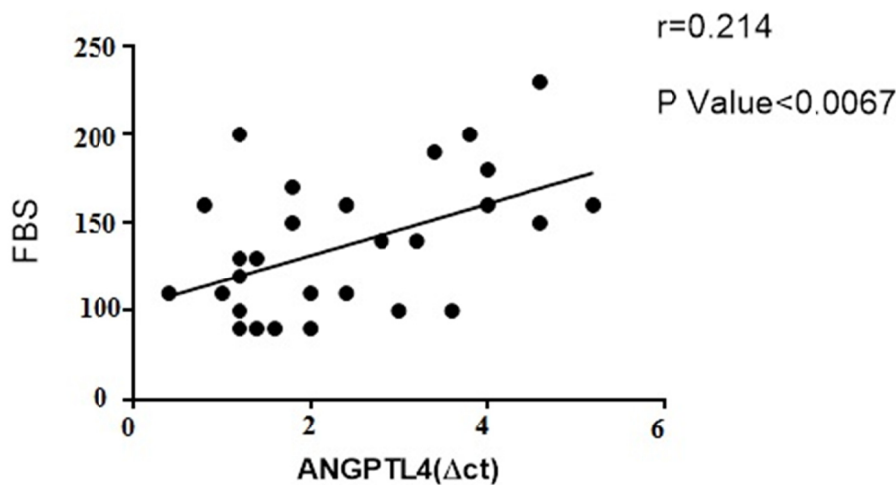
شکل ۲- منحنی ذوب مربوط به ژن‌های GAPDH و ANGPTL4

تکثیر لگاریتمی و کفه ای (Plateau) کاملاً واضح می‌باشد. فاز لگاریتمی جهت ارزیابی بیان ژن در سیستم Real Time PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای بررسی ارتباط بین بیان ژن ANGPTL4

پرایمر و قطعات غیراختصاصی در محصول PCR است. منحنی تکثیر بیانگر صحت انجام واکنش PCR می‌باشد که برای هر واکنش PCR رسم و قابل بررسی است. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود فازهای



شکل ۳- منحنی تکثیر مربوط به ژن های GAPDH و ANGPTL4



شکل ۴- همبستگی مثبت میان FBS و بیان ژنی ANGPTL4

ANGPTL4 یکی از اعضای این خانواده است که به تازگی مطالعات مختلفی بر روی آن معطوف شده است. ژن ANGPTL4 پروتئینی را کد می کند که باعث تحریک گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسی زومی (PPAR γ) شده و همچنین به عنوان یک هورمون موجود در سرم باعث تنظیم هومئوستاز گلوکز، متابولیسم لیپید و حساسیت به انسولین می شود (۱۷، ۱۸). این پروتئین همچنین به عنوان یک فاکتور حیاتی در فرآیند آپوپتوز برای سلول های اندوتلیال عروقی محسوب می شود و می تواند با مهار رشد عروق خونی و تهاجم سلول های توموری از متاستاز جلوگیری کند (۱۹، ۲۰).

بیشترین میزان ANGPTL4 در سلول های کبدی، ماهیچه ای، آدیپوسیت ها، سلول های گلیا و ماکروفاژها

با پارامترهای بیوشیمیایی و فاکتورهای آنتروپومتریکی از linear regression استفاده شد. نتایج نشان داد که میان FBS و بیان ANGPTL4 همبستگی وجود دارد. در واقع میان بیان ژنی ANGPTL4 و FBS ارتباط مستقیم وجود دارد ($r=0/214$ ، $p=0/0067$).

بحث

باتوجه به روند روبه گسترش و عوارض گسترده دیابت نوع ۲ تلاش های بسیاری در سراسر جهان در راستای دستیابی به درمان قطعی دیابت در حال انجام می باشد. مطالعات مختلفی بر روی ژن های دخیل در متابولیسم و بویژه ژن های موثر بر سندرم متابولیک، دیابت و چاقی انجام گرفته است (۱۶). از میان این ژن ها، خانواده angiopoietin مورد توجه محققان قرار گرفته است.

وجود دارد. نتایج این مطالعه همسو با مطالعه Romeo و همکاران می‌باشد که در آن مطالعه نشان داده شد که همبستگی معکوسی میان FBS و ANGPTL4 وجود دارد (۶). Yang و همکاران در مطالعه‌ای سطح سرمی ANGPTL4 را در افراد دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار دادند. علاوه بر این ارتباط سطح سرمی ANGPTL4 با پارامترهای بیوشیمیایی همچون HDL، LDL و تری گلیسیرید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی ANGPTL4 در بیماران T2DM افزایش می‌یابد (۹). همچنین میان سطح سرمی ANGPTL4 و LDL و HDL ارتباط معناداری وجود داشت. در مطالعه حاضر سایر پارامترهای بیوشیمیایی همچون HDL، LDL، TG مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین سطح سرمی ANGPTL4 نیز در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفته است. علاوه بر این، در برخی مطالعات مختلف ارتباط این ژن با برخی آنزیم LPL و HDL بررسی شده است. در مطالعه Lafferty و همکاران نشان داده شده است که افزایش فعالیت LPL در موش‌های ANGPTL4-null می‌تواند باعث کاهش میزان تری گلیسیرید در خون شود (۲۱). Metha و همکاران در مطالعه‌ای جمعیت اروپایی و آمریکایی را مورد مطالعه قرار دادند (۲۲). نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه معکوسی میان ANGPTL4 و HDL وجود دارد. مطالعه انجام شده توسط Dewey و همکاران نیز نتایج مشابهی را در پی داشت. در این مطالعه واریانت‌های مختلف ANGPTL4 در جمعیت اروپایی مورد شناسایی قرار گرفت (۲۳). به طور مثال این مطالعه نشان داد افرادی که حاوی جهش E40K در ANGPTL4 می‌باشند، میزان HDL بالاتری را نسبت به افرادی دارند که این جهش را نداشته‌اند و در نتیجه در افراد حامل جهش در E40K، ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی به مراتب کمتر می‌باشد. علاوه بر این، در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Tjeerdema و همکاران انجام گرفته است، نشان داده شده است که سطح سرمی ۴ ANGPTL در افراد مبتلا به T2DM و سندرم متابولیک افزایش می‌یابد در حالی که میزان HDL در هر دو این بیماران کاهش می‌یابد (۲۴).

وجود دارد (۷). ANGPTL4 در حالت ترشحی با جدا شدن ناحیه تنظیمی در انتهای آمینی و قسمت مونومریک انتهای کربوکسیلی به فرم کامل و فعال خود در می‌آید. انتهای آمینی این پروتئین مسئول اولیگومریزاسیون بوده که باعث می‌شود ANGPTL4 بتواند فعالیت LPL را مهار کند. قسمت انتهای کربوکسیلی با اینتگرین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی برهمکنش می‌کند تا به چسبندگی و مهاجرت مولکول کمک کند (۱۱).

نتایج مطالعات اخیر حاکی از آن بوده است که ANGPTL4 در هومئوستاز گلوکز، پاتوزن دیابت و همچنین سندرم متابولیک نقش مهمی را ایفا می‌کند. با این وجود، مطالعات انجام شده کافی نبوده و در برخی از مطالعات نیز نتایج متناقض مشاهده می‌شود. به همین دلیل مطالعه حاضر جهت بررسی و مقایسه بیان ژنی ANGPTL4 با شاخص‌های مرتبط با افراد مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد سالم طراحی گردید. در این راستا در این مطالعه مشخص شد که سطوح سرمی FBS ($P \text{ value} < 0.001$) و HOMA-IR در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. در حالی که بین سایر پارامترها از جمله BMI هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین به دلیل همسان کردن گروه کنترل و بیمار از نظر سن و انتخاب از هر دو گروه مرد و زن، تفاوت معناداری از نظر سن و جنس بین دو گروه مشاهده نشد. از دیگر نتایج این مطالعه این بود که میزان بیان ژنی ANGPTL4 در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود ($p < 0.065$). در واقع نتایج نشان داد که بیان ANGPTL4 در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم به میزان حدوداً ۰٫۲ برابر کاهش یافته است اما این کاهش از لحاظ آماری معنادار نیست. در مطالعه انجام شده توسط NAGAIKE و همکاران نشان داده شده است که میزان بیان ANGPTL4 در افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم به طور معناداری کاهش می‌یابد (۸). در این پژوهش نیز ANGPTL4 در گروه دیابتی کاهش نشان داد اما این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود. علاوه بر این، در مطالعه حاضر نشان داده شد که میان بیان ژنی ANGPTL4 و FBS همبستگی معکوسی

9. Yang X, Cheng Y, Su G. A review of the multifunctionality of angiopoietin-like 4 in eye disease. *Biosci Rep*. 2018;38(5).

10. van der Kolk BW, Vink RG, Jocken JWE, Roumans NJT, Goossens GH, Mariman ECM, et al. Effect of diet induced weight loss on angiopoietin like protein 4 and adipose tissue lipid metabolism in overweight and obese humans. *Physiol Rep*. 2018;6(13):e13735.

11. Martínez-González MÁ, de la Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, et al. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *Br Med J*. 2008;336(7657):1348-51.

12. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol Series A*. 2018;73(3):318-26.

13. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047.

14. Aldossari KK. Cardiovascular outcomes and safety with antidiabetic drugs. *Int J Health Sci*. 2018;12(5):70-83.

15. McHugh KR, DeVore AD, Mentz RJ, Edmonston D, Green JB, Hernandez AF. The Emerging Role of Novel Antihyperglycemic Agents in the Treatment of Heart Failure and Diabetes: A Focus on Cardiorenal Outcomes. *Clin Cardiol*. 2012;12(4): 8-16

16. Barfeie F, Salehi M, Najafi I. Predicting diabetes using artificial neural network. *Razi J Med Sci*. 2015; 22 (135) :29-37

17. Wynne K, Devereaux B, Dornhorst A. Diabetes of the Exocrine pancreas. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;8(2):235-239.

18. Stull AJ. Lifestyle Approaches and Glucose Intolerance. *Am J Lifestyle Med*. 2016;10(6):406-16.

19. Ribeiro RA, Bonfleur ML, Batista TM, Borck PC, Carneiro EM. Regulation of glucose and lipid metabolism by the pancreatic and extra-pancreatic actions of taurine. *Amino Acids*. 201;12(1).

20. Ajčević M, De Dea F, Barbieri G, Accardo A, editors. A Mobile App for the Self-management of Type 1 Diabetes as Tool for Preventing of Exercise-Associated Glycemic Imbalances. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*. 2018.

21. Lafferty MJ, Bradford KC, Erie DA, Neher SB. Angiopoietin-like Protein 4 Inhibition of Lipoprotein Lipase: EVIDENCE FOR REVERSIBLE COMPLEX FORMATION. *J Biol Chem*. 2013;288(40):28524-34.

22. Mehta N, Qamar A, Qu L, Qasim AN, Mehta NN, Reilly MP, et al. Differential Association of Plasma Angiopoietin-Like Proteins 3 and 4 with Lipid and Metabolic Traits. *Arterioscleros Thrombos Vasc Biol*. 2014;34(5):1057-63.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژنی ANGPTL4 در افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم کاهش پیدا میکند. علاوه بر این میزان بیان این ژن با قند ناشتای خون همبستگی مثبت دارد. با این وجود ارتباط این مولکول با متابولیسم گلوکز و همچنین پاتوژنز بیماری دیابت به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. به نظر می رسد با وجود مطالعات انجام شده در زمینه ارتباط ANGPTL4 و دیابت نوع دو هنوز فهم ما از این ارتباط و مکانیسم کامل نبوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه می باشد. پیشنهاد می شود در مطالعات آتی، میزان ANGPTL4 در سرم افراد دیابتی و ارتباط آن با پارامترهای بیوشیمیایی از جمله HDL-c و LDL-c و همچنین آنزیم لیپوپروتئین لیپاز مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(Suppl 1):S62-S9.
2. Arabi M, Rasi V. The relation between body mass index and prevalence of ischemic heart disease in type 2 diabetic patients. *Razi J Med Sci*. 2019;26(2):85-92
3. Fonseca VA, Kirkman MS, Darsow T, Ratner RE. The American Diabetes Association Diabetes Research Perspective. *Diabetes Care*. 2012;35(6):1380.
4. Health Quality O. Behavioural Interventions for Type 2 Diabetes: An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technol Assess Series*. 2009;9(21):1-45.
5. Health Quality O. Continuous Subcutaneous Insulin Infusion (CSII) Pumps for Type 1 and Type 2 Adult Diabetic Populations: An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technol Assess Series*. 2009;9(20):1-58.
6. Romagnolo DF, Selmin OI. Mediterranean Diet and Prevention of Chronic Diseases. *Nutr Today*. 2017;52(5):208-22.
7. Kastorini C-M, Panagiotakos DB. Mediterranean diet and diabetes prevention: Myth or fact? *World J Diabetes*. 2010;1(3):65-7.
8. Ortega-Senovilla H, van Poppel MNM, Desoye G, Herrera E. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is related to gestational weight gain in pregnant women with obesity. *Sci Rep*. 2018;8:12428.

23. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, Gottesman O, Trejos J, Hunt C, et al. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. *N Eng J Med.* 2016;374(12):1123-33.

24. Tjeerdema N, Georgiadi A, Jonker JT, van Glabbeek M, Dehnavi RA, Tamsma JT, et al. Inflammation increases plasma angiopoietin-like protein 4 in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2014;2(1):e000034.