

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

بهزاد مهدی خبازیان^۱، دکتر عباس قنبری نیکی^۲، دکتر فاطمه رهبری زاده^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 - عروقی داشته باشد. به منظور بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان این ژن ۱۰ عدد موش صحرائی 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 اکسیدانسی 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 (۱۱-۹،۶،۲). 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،۴،۳،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^۱ یا دارای حداقل لیپید^۲ که این فرآیند توسط ناقل ABCA^۳ میانجی‌گری شده و به تشکیل ذرات Pre Beta HDL منجر می‌شود (۶). (۲) خروج بیشتر کلسترول به Pre Beta HDL و تشکیل ذرات صفحه‌ای بزرگ‌تر HDL، (۳) استریفه شدن کلسترول از طریق آنزیم لسیتین کلسترول اسیل ترانسفراز^۴ 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^۵ BI (SR-BI) با تشکیل ذرات HDL کوچک‌تر و آپولیپو پروتئین‌های A-I دارای حداقل لیپید^۶ (۱۴).

نقش ABCA^۱ به عنوان صادر کننده چربی سلول، زمانی معلوم گشت که کشف شد این ژن، ژن معیوب در بیماران تانزیه ABCA^۱ می‌باشد (۱۸-۱۵). در غیاب ژن ABCA^۱

-
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 تائزیه دارای HDL بسیار کم بوده، قادر به خارج کردن کلسترول از سلول به Apo A-I نمی‌باشند و تجمع کلسترول استر در بسیاری از بافت‌ها به ویژه سرخرگ‌های آنها دیده می‌شود (۱۹). آرترو اسکلروزیس زود هنگام نیز از دیگر عوارض این بیماری است. علاوه بر نمونه‌های انسانی، فقدان عملکرد ژن ABCA1 در موش‌ها نیز منجر به تولید عوارض مشابهی مانند بیماران تائزیه می‌شود (۲۰). اختلال در ژن ABCA1 در مدل حیوانی جوجه^۱ 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 بیش از حد^۲ ژن ABCA1 در موش‌های تراریخته، منجر به کاهش معنی‌دار در اندازه و پیچیدگی آسیب‌های آترواسکلروتیک، افزایش خروج کلسترول از سلول و در نهایت افزایش میزان و ترکیب HDL پلاسما می‌شود (۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲). نتایج این مطالعات به روشنی نشان می‌دهد که عملکرد ABCA1 نقشی کلیدی در فرآیند انتقال معکوس کلسترول دارد. به همین علت تلاش برای درک فعال‌کننده‌های این ژن احتمالاً^۳ می‌تواند برای پیشگیری از آترواسکلروزیس بسیار سودمند باشد (۲۶).

اگر چه تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی می‌تواند منجر به بهبود برخی مراحل کلیدی در فرآیند انتقال معکوس کلسترول مانند افزایش میزان و ترکیب HDL (۲۷)، افزایش خروج کلسترول از سلول (۲۸)، افزایش تشکیل و اندازه Apo A-I (۲۹، ۳۰)، افزایش Pre Beta HDL پلاسما (۳۱، ۳۲) و افزایش فعالیت آنزیم LCAT (۳۳، ۲۹، ۳۴) شود اما تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر تظاهر ژن ABCA1، که اولین مرحله در فرآیند انتقال معکوس کلسترول می‌باشد، نپرداخته است. با توجه به این که تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر تظاهر ژن ABCA1 نپرداخته است، پژوهش حاضر به بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر تظاهر ژن ABCA1 کبدی می‌پردازد.

1. Wisconsin hypoalpha mutant
2. Overexpression

روش تحقیق

تعداد ۱۰ عدد موش نر سفید نژاد ویستار^۱ 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 (23 ± 1 درجه سانتی گراد) و رطوبت (50 ± 3 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 می‌رفتند 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 سریعاً "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.

تخلیص mRNA و بررسی بیان ژن توسط PT-PCR

مقدار ۵۰ میلی گرم 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^۲،

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^۱ پوشیده شده، با اولیگو^۲ dt با درجه خلوص بالا و کیفیت مناسب که قادر به جداسازی mRNA است، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده گردید. از هر یک از موش ها، نیم میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA به کار گرفته شد. در این تحقیق، برای ساخت cDNA از آغازگر (پرایمر^۳) اولیگو dT که مکمل دم‌های poly A در mRNA است و دمای ۴۲ درجه سانتی گراد 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^۴ 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 می کنند 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'

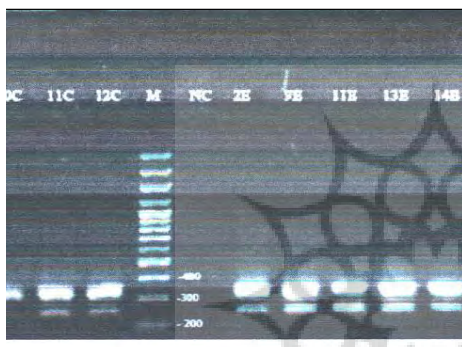
بوده و یک قطعه ۳۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین را تکثیر می کنند. بتا اکتین یک ژن همیشه بیان شونده^۵ است و می تواند شاهد خوبی برای بررسی کل فرآیند تخلیص mRNA باشد. مراحل PCR شامل ۳۵ تکرار از سه مرحله: (۱) دناتوراسیون^۶ ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۲) دمای جفت شدن^۷ ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و (۳) دمای طویل شدن^۸ ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه بود. برای به دست آوردن بهترین غلظت cDNA الگو، غلظت‌های مختلف cDNA بررسی و نهایتاً "بهترین غلظت برای PCR نهایی به کار گرفته شد. آزمون‌های این تحقیق لااقل سه بار تکرار شد. بررسی نیمه کمی باندها با کمک

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

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

نتایج

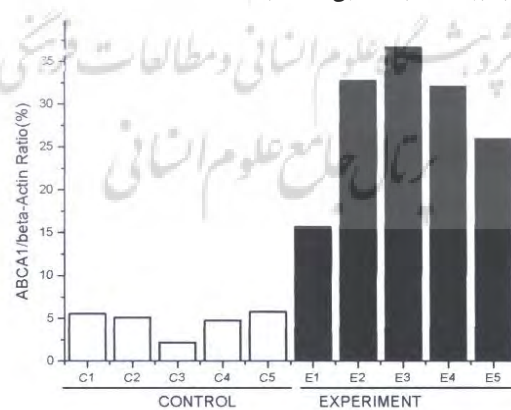
با استفاده از RT-PCR بیان ژن ABCA1 بررسی شد. نتایج به روشنی نشان می‌دهد که بیان ABCA1 در پاسخ به ۶ هفته تمرین استقامتی افزایش می‌یابد.



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز ژن‌های بتا اکتین و ABCA1 در موش‌های کنترل و تجربی. ۱C تا ۱E گروه کنترل، ۲E تا ۷E گروه تجربی، M مارکر و NC کنترل منفی می‌باشد.

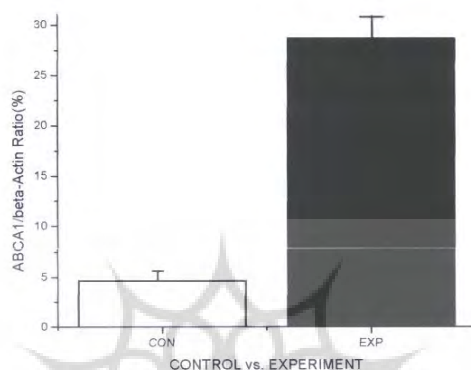
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، ژن بتا اکتین به عنوان کنترل تکثیر ژن ABCA1 به کار رفته، در تمام نمونه‌ها بیان شده است. بیان ژن ABCA1 در موش‌های گروه کنترل، بسیار کم و در موش‌های گروه تجربی، به وضوح دیده می‌شود. پس از این مرحله، بررسی نیمه کمی باندها با کمک دانسیومتر کامپیوتری (Kodak, CT) انجام و سطح

بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتا اکتین محاسبه شد.



شکل ۲. درصد بیان mRNA ژن ABCA1 نسبت به بتا اکتین در هر یک از نمونه‌های گروه‌های کنترل و تجربی

همان‌طور که از شکل فوق مشخص است، بیان ژن ABCA1 در گروه تجربی، در مقایسه با گروه کنترل بیشتر می‌باشد.



شکل ۳. بیان ژن ABCA1 در مجموع در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل

همان‌گونه که در شکل بالا مشاهده می‌شود، بیان ژن ABCA1 در مجموع در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه، بررسی ژن کبدی ABCA1 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 فواید بی‌شمار ورزش منظم برای سلامتی، مربوط به تغییرات مفیدی باشد که در نیم رخ لیپو پروتئین‌های خون رخ می‌دهد (۲۷). این تغییرات اغلب، شامل کاهش تری‌گلیسیرید، LDL، VLDL 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 ABCA1 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 تانزیه 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 ABCA1 شد (۳۸). انجام مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی فاقد ژن ABCA1 بر عملکرد این ژن در انتقال معکوس کلسترول و تشکیل ذرات بالغ HDL صحنه گذاشته است (۳۹). از سوی دیگر اخیراً چند آزمایشگاه به تولید موش‌های تراریخته‌ای اقدام کردند که دارای بیان بیش از حد ABCA1 می‌باشد (۴۰-۴۲). به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل ابتدایی این موش‌ها آثار مفید افزایش بیان ABCA1 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 ABCA1 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 ABCA1 توسط تمرین استقامتی با شدت متوسط بیان می‌شود. بدین ترتیب احتمالاً "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 Coronary Heart Disease with pre-HDL Concentrations in Japanese Men. *Clinical Chemistry*. 50:3, 598-595.
2. Oram JF. (2003). "HDL Apolipoproteins and ABCA1: Partners in the Removal of Excess Cellular cholesterol". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23: 720-727.