Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 21, No. 4, Sep-Oct 2013
Pages: 482-492

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۱، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۲
صفحه: ۴۹۲-۴۸۲

بررسی اثر کورکومین بر میزان فسفریلاسیون AMPK و ACC در سلول‌های ماهیچه‌ای رده C2C12

فاطمه قنبرزاده*[1]، جواد محیطی اردکانی[2]، جواد زواررضا[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲

چکیده

مقدمه: کیناز وابسته به AMP (AMPK) به عنوان تنظیم‌کننده اصلی متابولیسم سلول، نقش عمده‌ای در فعال کردن مسیرهای کاتابولیک نظیر جابه‌جایی گلوکز و اکسیداسیون اسید چرب دارد. بنابراین فعال کنندگان این مسیر می‌تواند در درمان سندرم‌های متابولیک و دیابت کاربرد داشته باشد. مطالعات مختلف حاکی از مؤثر بودن پلی‌فنول موجود در ریززوم زردچوبه (کورکومین) بر دیابت و عوارض مرتبط با آن است. این مطالعه به بررسی اثر کورکومین به عنوان فعال کننده مسیر AMPK در سلول‌های ماهیچه‌ای C2C12 می‌پردازد.

روش بررسی: این مطالعه روی رده سلولی C2C12 که نوعی میوبلاست عضله اسکلتی است، انجام شد. سلول‌ها در دو گروه مجزا تحت تیمار با کورکومین با غلظت۴۰ μM و DMSO با غلظت ۰/۱درصد به عنوان کنترل منفی قرار گرفتند. میزان پروتئین کیناز وابسته به AMP (AMPK) فسفریله واستیل کوآکربوکسیلاز (ACC) فسفریله با استفاده از تکنیک وسترن بلات مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

نتایج: در هموژن سلولی گروه تیمار شده با کورکومین میزان پروتئین AMPK فسفریله برابر ۱۳۲/۶ درصد و میزان پروتئین ACC فسفریله ۳۶۶/۴۷ درصد ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد میزان پروتئین AMPK و ACC فسفریله در سلول‌های تیمار شده با کورکومین نسبت به کنترل منفی بیشتر است. بنابراین کورکومین به عنوان فعال کننده AMPK در این سلول‌ها فعالیت داشته و می‌تواند در طراحی داروهای دارای پتانسیل درمانی ضددیابت که با انسولین اثر هم افزا دارند، کمک کننده باشد.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، پروتئین کیناز وابسته به AMP، استیل کوآکربوکسیلاز، C2C12

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۷۳۸۱۰۴۱۸، پست الکترونیکی:ghanbarzadeh_bio@yahoo.com

- این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

بافت عضله اسکلتی و کبدی در متابولیسم گلوکز نقش عمده‌ای دارند. در این میان مهم‌ترین بافت مصرف‌کننده گلوکز، ماهیچه اسکلتی است(۱،۲). به طور کلی دو مسیر انتقال پیام منجر به تنظیم متابولیسم گلوکز در سلول ماهیچه‌ای می‌شوند: ۱- مسیر انتقال پیام انسولین که با اتصال انسولین به گیرنده موجود در سطح سلول و فسفریلاسیون‌های پی‌درپی رخ می‌دهد. ۲- مسیر انتقال پیام مستقل از انسولین که از طریق کیناز وابسته به AMPK (AMP- Activated Protein Kinase) رخ می‌دهد(۳). اختلالات متعددی در مسیر سیگنالینگ وابسته به انسولین مشاهده شده است. کمبود انسولین منجر به بیماری دیابت نوع ۱ و هرگونه تغییر در عملکرد پروتئین‌های درگیر در مسیر انتقال پیام انسولین از جمله کاهش فسفریلاسیون گیرنده انسولین یا کاهش تعداد و فعالیت آن، در نهایت منجر به بیماری دیابت نوع ۲ می‌شود(۴)

سیستم AMPK سنسور انرژی داخل سلولی است که در پاسخ به افزایش نسبت AMP/ATP، فعال می‌شود. استرس متابولیک، افزایش مصرف ATP یا کاهش تولید آن طی شرایط فقدان اکسیژن یا گلوکز منجر به افزایش این نسبت می‌شوند. کمپلکس AMPK از زیر واحد کاتالیک α و زیر واحدهای تنظیمی β و γ تشکیل شده است. زیر واحد γ مسئول تشخیص نسبت AMP/ATP است. AMPK خود یک سرین ترئونین کیناز است که با فسفریله شدن در ترئونین (Thr-172) موجود در زیر واحد α توسط کینازهای فرادستی، فعال می‌شود. با فعال شدن این کیناز بسیاری از سوبستراهای فرودست از جمله مسیرهای آنابولیک و مصرف کننده ATP مانند تولید اسید چرب و کلسترول که در کوتاه مدت برای زنده ماندن موجود لازم نیستند، مهار می‌شود(۶). همچنین بسیاری از مسیرهای کاتابولیک و تولیدکننده ATP نظیر جابه جایی گلوکز، گلیکولیز و اکسیداسیون اسید چرب را فعال ساخته و نیز باعث تغییر در ژن و بیان پروتئین‌ها در طولانی مدت می‌شود. AMPK به عنوان تنظیم کننده اصلی متابولیسم سلول، نقش عمده‌ای در تنظیم متابولیسم گلوکز، پروتئین و چربی در سلول‌های مختلف دارد(۷). آنزیم استیل کوآکربوکسیلاز (ACC) یکی از مهم‌ترین سوبستراهای AMPK است که فسفریله ساختن آن منجر به غیرفعال شدن آن می‌شود. فسفریله شدن ACC ضمن مهار تولید اسید چرب در سلول، ورود اسید چرب به میتوکندری از طریق کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ را تسریع کرده و بدین ترتیب اکسیداسیون اسید چرب را افزایش می‌دهد(۸).

دیابت نوع ۲، سندرم‌های متابولیک و چاقی همگی اختلالاتی از تعادل انرژی است. از آن جایی که سیستم AMPK تنظیم کننده تعادل انرژی است و تاکنون اختلالی در فعال شدن این مسیر گزارش نشده است، بنابراین طراحی و گسترش دادن فعال‌کنندگان قوی AMPK امیدی برای درمان دیابت و بیماری‌های متابولیک است(۹).

پلی‌فنول‌های خوراکی منبع غنی برای کشف و توسعه داروهای نوین محسوب می‌شوند. هر چند ترکیبات گیاهی متعددی در این خصوص مورد مطالعه قرار گرفته و اثرات ضددیابتی آنها تأیید شده‌اند(۱۰)، اما به دلیل اینکه مکانیسم مولکولی عملکرد آنها در سلول به درستی روشن نشده است در مصرف آنها برای درمان دیابت تردید وجود دارد. زردچوبه، پودر حاصل از ساقه زیرزمینی گیاه زردچوبه با نام علمی Curcuma Longa است. اثربخشی عصاره زردچوبه در کاهش قندخون از جنبه‌های مختلفی مورد بررسی قرارگرفته است، ولی کمتر به مکانیسم سلولی اثرات آن پرداخته شده است(۱۳-۱۱). با توجه به این که مدل‌های کشت سلولی در تعیین مکانیسم خالص عملکرد ترکیبات مختلف کارایی بیشتری دارند، در این تحقیق از سلول‌های C2C12 که قابلیت تمایز به ماهیچه اسکلتی دارند برای بررسی مسیر مولکولی فعال شده توسط کورکومین استفاده می‌شود.

روش بررسی

سلول‌های C2C12 مورد استفاده در این پژوهش از مؤسسه پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت و تمامی مواد بجز مواد ذکر شده از شرکت سیگما تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

پنی‌سیلین و استرپتومایسین در شرایط استریل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 با غلظت ۵٪ نگهداری گردید. هر ۲ روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شده و فلاسک‌هایی که سلول‌ها حدود ۸۰٪ کف ظرف را پوشانده‌اند با استفاده از سرم اسب (Horse Serum- Invitrogen) با غلظت ۲٪ فرایند تمایز رده سلولی به میوبلاست القاء شد.

سلول‌ها پس از تیمار ۱ ساعته با کورکومین ۴۰μM یا ۱DMSO٪ به عنوان کنترل، ۳ بار با PBS سرد شستشو داده، سپس فلاسک‌ها را روی یخ قرار داده و با اسکراب سلول‌ها از کف ظرف جدا شدند. ۵۰۰ μl بافر لیزکننده RIPA (50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM EDTA, 1 mM, PMSF, (0.25% sodium deoxycholate, 1 mM NaF 1%Tween20 اضافه کرده و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت ورتکس شد. عصاره سلولی حاصل را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ۶۰۰۰g سانتریفوژ کرده و مقدار پروتئین در عصاره سلول با روش برادفورد سنجیده شد. با مقایسه با نمودار استاندارد برادفورد، غلظت نهایی پروتئین تعیین گردید.

الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) بدین صورت انجام شد که ۷۵μg از پروتئین‌های موجود در عصاره سلولی در چاهک‌های ژل نمونه‌گذاری شده و در ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ جداسازی گردیدند. عمل جداسازی پروتئین‌ها به مدت ۱ ساعت و با شدت جریان ۵۰ میلی آمپر انجام شد. پروتئین ACC وزن مولکولی ۲۸۰ کیلو دالتون دارد، بنابراین الکتروفورز در زمان بیشتر (حدود ۷۵ دقیقه) انجام شد. در پایان این مدت، رنگ برومو فنول بلو موجود در بافر نمونه به انتهای ژل رسید و جریان قطع شد.

پس از تفکیک شدن پروتئین‌های موجود در عصاره سلول، به منظور انتقال پروتئین‌ها از ژل به کاغذ نیتروسلولز، ژل به سمت قطب منفی و کاغذ نیتروسلولز به سمت قطب مثبت قرار گرفته و عمل انتقال در بافر انتقال تحت جریان ۲۸۰ میلی‌آمپر به مدت یک شبانه روز انجام گرفت.

با توجه به این که شناسایی دو پروتئین با وسترن بلات مدنظر است و این دو پروتئین از نظر وزن مولکولی در دو محدوده متفاوت هستند، از دو نوع بافر انتقال استفاده می‌شود که از نظر میزان سدیم دودسیل سولفات (SDS) و متانول متفاوت است. پس از انتقال کاغذ نیتروسلولز با پانسو S رنگ‌آمیزی شده تا انتقال پروتئین‌ها به آن تأیید شود.

سپس با قرار دادن صفحات نیتروسلولز در بافر TBST حاوی ۵٪ شیر خشک بدون چربی، بلوکه می‌گردند. در مرحله بعد به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر حاوی آنتی‌بادی اولیه ضد ACC(Ser79) و AMPKα (Thr 172) پلی‌کلونال ایجاد شده در خرگوش (شرکت Cell Signaling) با رقت ۱:۱۰۰۰ و بتا اکتین (ایجاد شده در موش) با غلظت ۱:۲۰۰۰ در حالی که بر روی روتاتور با دور ملایم قرار داشت، نگهداری شد. پس از ۳ بار شستشو با TBST، برای شناسایی آنتی‌بادی‌های اولیه ACC و AMPK، کاغذ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در بافر حاوی آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با HRP (Goat anti Rabbit IgG Razi biotech,) با رقت ۱:۲۰۰۰ قرار گرفت. برای شناسایی بتا اکتین از آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با HRP (Goat anti Mouse IgG, Santacrus) به مدت دو ساعت و در دمای محیط استفاده شد. سپس طبق دستور کیت کمی لومینسان (ECL Advance Western blotting detection kit,Amersham) سوبسترا افزوده شد. طی مدت ۵ دقیقه واکنش انجام شده و پس از خشک کردن کاغذ، از فوتون‌های ساطع شده با دستگاه Gel Document در شرایط بدون نور عکسبرداری شد. تجزیه و تحلیل عکس‌های حاصل در نرم افزارخود دستگاه (Gene tools) انجام گردید.

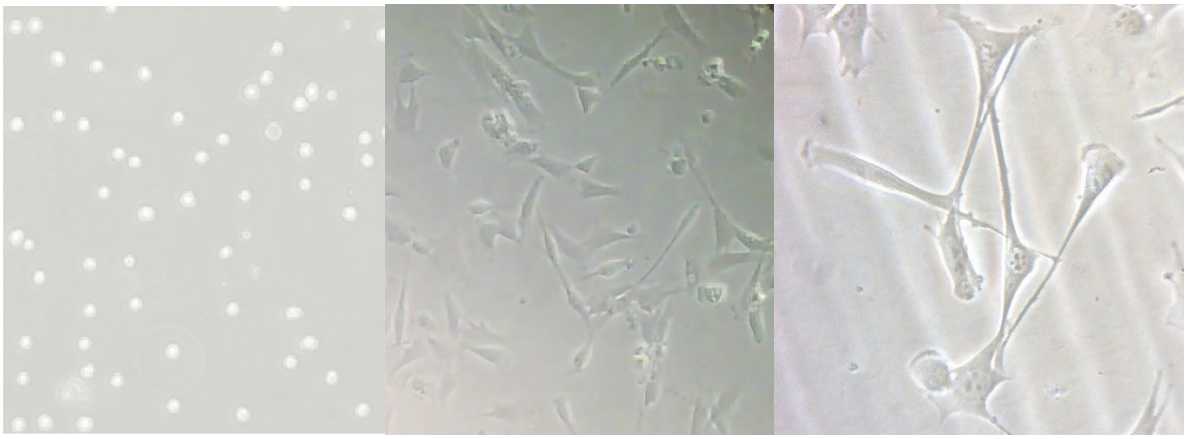
در هر گروه ۳ بار آزمایش تکرار شده و نتایج حاصل در ضریب اطمینان ۹۵٪ و با آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

سلول‌های میوبلاست C2C12 از نوع سلول‌های شبیه به فیبروبلاست هستند که به صورت تک لایه رشد نموده، سرعت رشد آنها بالاست و در شرایط مناسب کف ظرف محیط کشت را بطور کامل می‌پوشانند. پس از رسیدن سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد، برای تمایز سلول‌های از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

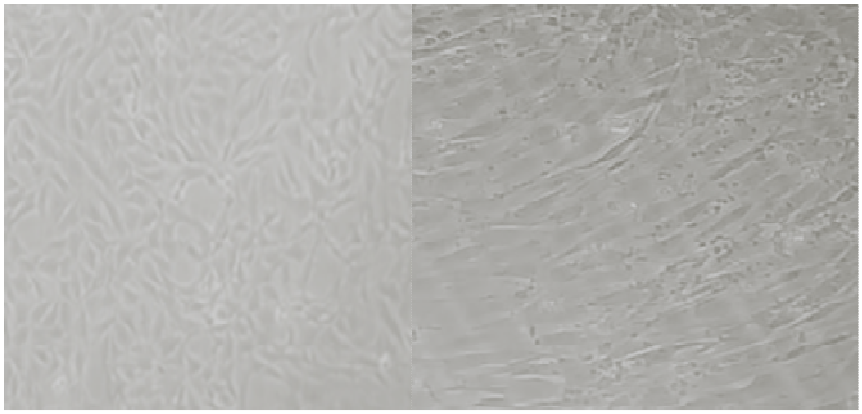
غلظت ۲ درصد سرم اسب (Horse Serum) در محیط کشت ۹۸٪ DMEM استفاده گردید. طی ۵ روز سلول‌ها به تمایز کامل رسیدند(اشکال ۳-۱).



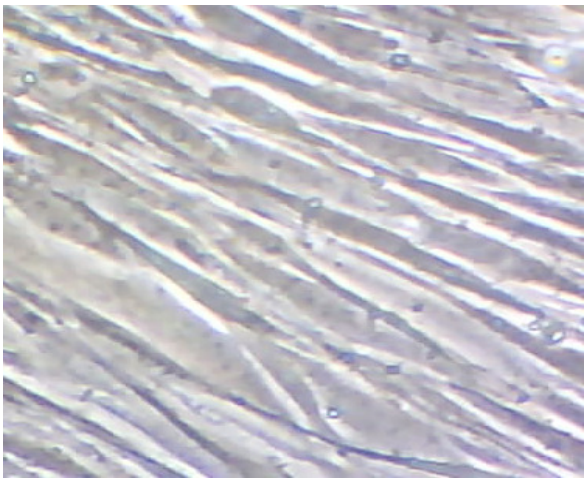
(الف) (ب) (ج)

شکل ۱: مراحل تکثیر سلول‌های C2C12 سلول‌ها

الف) در ابتدا شناور بوده ولی پس از چند ساعت به ته فلاسک متصل می‌شوند. (ب) سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از کشت تکثیر یافته‌اند ×۲۰ (ج) سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از کشت ×۴۰



شکل ۲ : سلول‌های C2C12 پس از ۴۸ ساعت با بزرگنمایی ×۱۰ و ×۲۰ .
در این وضعیت سلول‌ها ۸۰٪ کف فلاسک را پوشانده‌اند



شکل ۳: پنج روز پس از شروع تمایز با بزرگنمایی×۲۰
میوتیوب‌های چند هسته‌ها ایجاد و کاملاً کف فلاسک را پوشانده‌اند

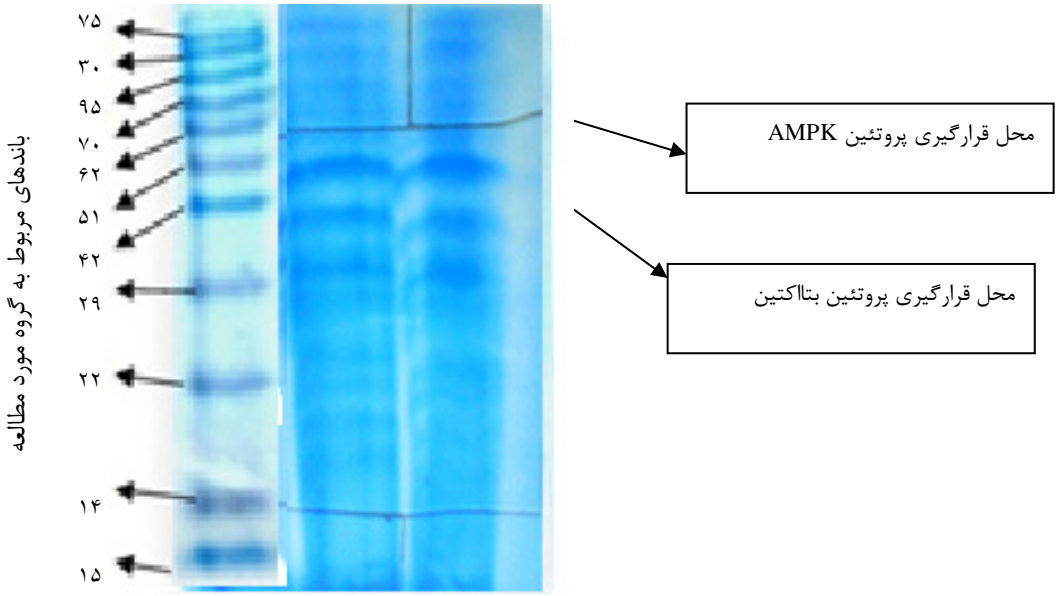
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

پس از لیز کردن سلول‌ها میزان پروتئین‌های تمام نمونه‌ها به روش برادفورد و با کمک منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. در هر چاهک الکتروفورز ۷۵ میکروگرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها در نظر گرفته شده است. نتایج کار در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول۱: خلاصه‌ای از نحوه اندازه‌گیری غلظت پروتئین در گروه تحت تیمار با کورکومین ۴۰μM و به مدت یک ساعت

	کنترل	کورکمین	متفورمین
غلظت پروتئین (μg/μl)	۲/۷۳	۲/۲	۲/۳
حجم معادل ۷۵μg پروتئین(μl)	۲۷/۴۷	۳۴/۰۹	۳۲/۶۰

به منظور شناسایی پروتئین SDS-PAGE الکتروفورز پروتئین‌های هموژن سلولی و وستون بلات در ژل ۱۰ درصد انجام شد. برای سنجش هر پروتئین ژل مجزا ساخته شد. نیمی از هر ژل با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد تا حرکت الکتروفورزی آنها تأیید و با توجه به مارکر جایگاه پروتئین مورد سنجش مشخص گردد(شکل ۴).



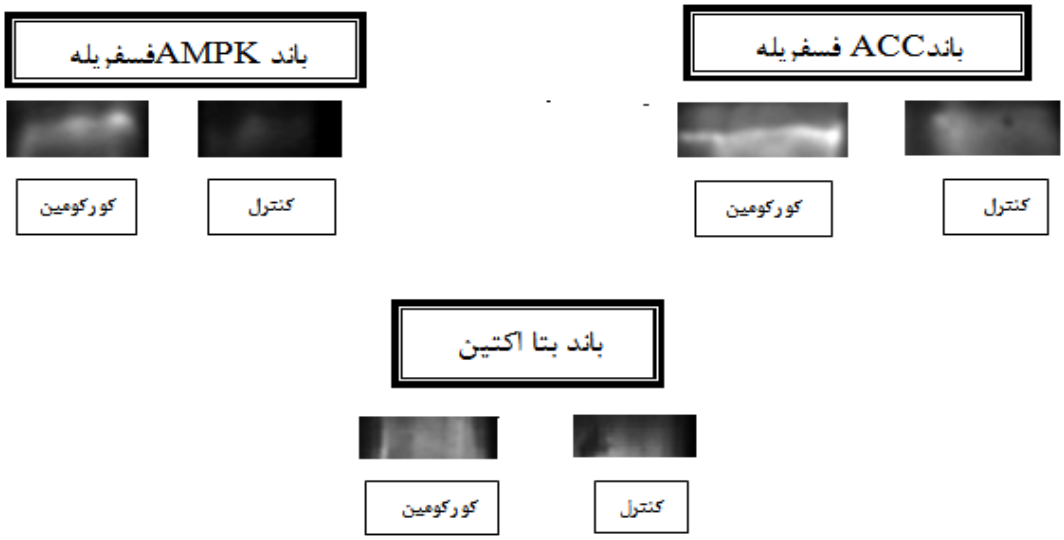
شکل۴: ژل الکتروفورز رنگ شده با کوماسی بلو. عصاره سلولی حاصل از دو گروه تحت تیمار تحت الکتروفورز روی ژل ۱۰٪ قرار گرفت.

مشاهده و تجزیه و تحلیل باندهای ACC وAMPK فسفریله با کمک دستگاه Gel Documentation انجام پذیرفت. پس از انتقال پروتئین‌ها به غشای نیترو سلولز و انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه و ثانویه کنژوگه با HRP و انجام شستشوهای لازم، معرف ایجاد کننده سیگنال نوری (سوبسترای آنزیم) را اضافه کرده و با قرار دادن کاغذ در دستگاه عکس گرفته شده و در نهایت با نرم افزار Gene Tools تجزیه و تحلیل انجام شد (شکل ۵).

برای بررسی کلی نتایج و مقایسه گروه‌های مختلف، سطح زیر منحنی مربوط به هر باند بر سطح زیر منحنی مربوط به بتااکتین تقسیم شد. اعداد به دست آمده را بر حسب درصد محاسبه شد. درصدهای محاسبه شده در برنامه Excel وارد

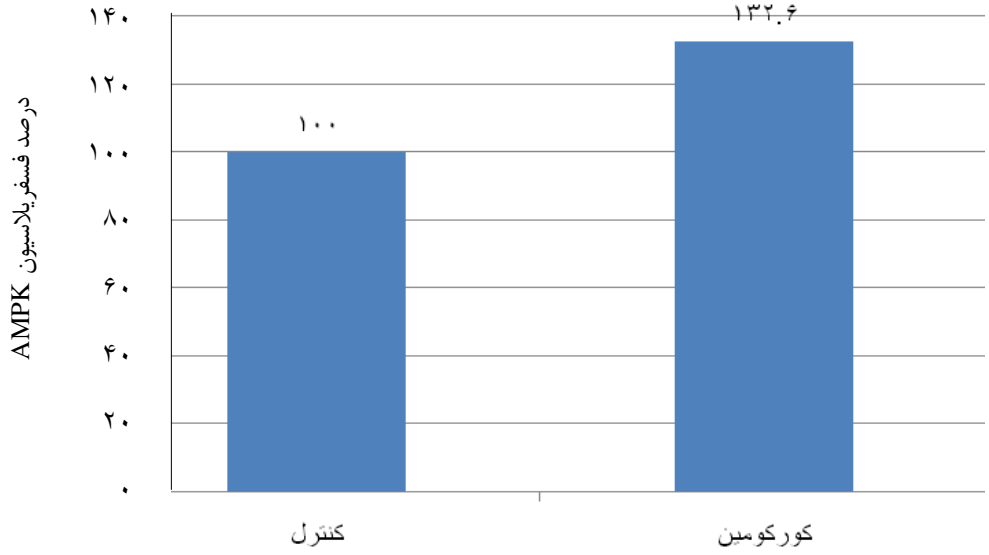
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

کرده و نمودار ستونی مربوطه رسم شد. نمودار ۱ و ۲ درصد نسبی دو پروتئین فسفریله را نشان می‌دهند.



شکل ۵: باندهای ACC و AMPK فسفریله و بتا اکتین در محلول حاصل از لیز میوسیت‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation

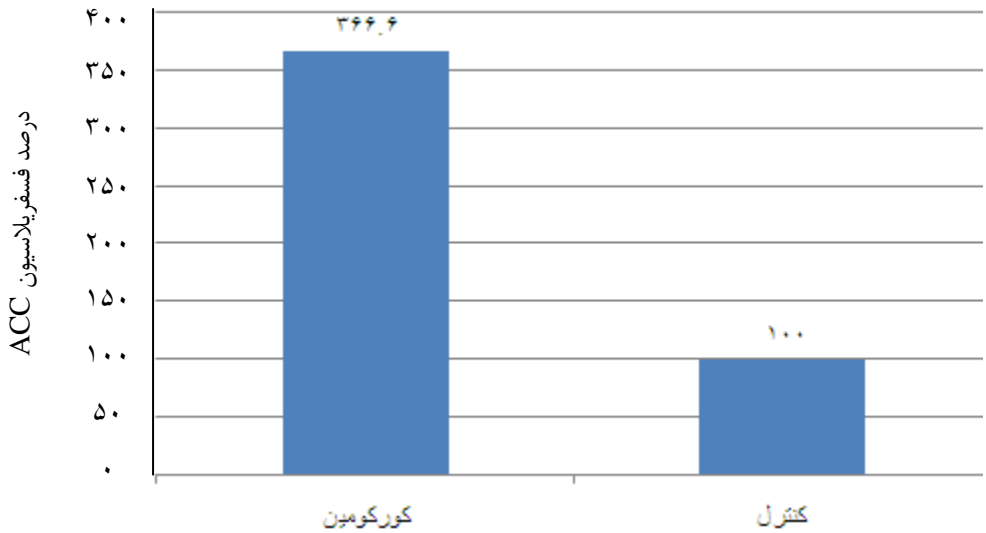
با توجه به نمودار ۱ می‌توان تفاوت‌هایی را در نمونه‌های مختلف تشخیص داد. میزان نسبی AMPK فسفریله در نمونه‌ای که تحت تیمار با کورکومین بوده در مقایسه با نمونه کنترل (۱٪ DMSO) بیشتر است. بنابراین غلظت ۴۰ میکرومولار کورکومین پس از تیمار یک ساعته در میوسیت‌های C2C12 می‌تواند مسیر AMPK را فعال کند. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۵).



نمودار ۱ : میزان نسبی AMPK فسفریله در نمونه‌ای که تحت تیمار با کورکومین بوده در مقایسه با نمونه کنترل

میزان نسبی ACC فسفریله در نمونه‌ای که تحت تیمار با کورکومین بوده در مقایسه با نمونه کنترل (۱٪ DMSO) بیشتر است. بنابراین غلظت ۴۰ میکرومولار کورکومین پس از تیمار یک ساعته در میوسیت‌های C2C12 می‌تواند آنزیم ACC را فسفریله و غیرفعال سازد. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



نمودار ۲: میزان نسبی ACC فسفریله در نمونه‌ای که تحت تیمار با کورکومین بوده در مقایسه با نمونه کنترل

بحث و نتیجه گیری

توانایی برداشت گلوکز به واسطه AMPK در بیماران T2DM دست نخورده مانده در حالی که برداشت گلوکز به واسطه انسولین مختل است. کیناز وابسته به AMP با فسفریله ساختن AS160 (سوبسترای AKT) در جایگاه اختصاصی منجر به آزاد شدن مهار از روی ویزیکول‌های داخل سلولی GLUT4 و اگزوسیتوز این ویزیکول‌ها می‌شود. از سوی دیگر رونویسی ژن GLUT4 نیز افزایش می‌یابد. بنابراین فعال شدن AMPK می‌تواند به عنوان روش مؤثری در افزایش جابجایی گلوکز به داخل سلول در شرایط مقاوم به انسولین مطرح باشد(۱۴). آنزیم ACC یکی از سوبستراهای کیناز وابسته به AMP است که تحت تأثیر آن فسفریله و غیرفعال می‌شود. بنابراین با کاهش تولید مالونیل کوآ، سنتز اسید چرب کاهش یافته و ورود اسید چرب به میتوکندری برای اکسیداسیون افزایش می‌یابد. بدین ترتیب از تجمع حد واسطهای فعال لیپیدی نظیر دی اسیل گلیسرول و سرآمید که خود عامل مقاومت به انسولین هستند، ممانعت می‌شود.

مطالعات بسیاری وجود دارند که خواص ضددیابتی گیاهان دارویی را با بررسی مسیر سیگنالینگ فعال شده توسط آنها بررسی کرده‌اند. پلی‌فنول‌های گیاهی مختلف که در متابولیسم قند و چربی مؤثرند عمدتاً منجر به فعال سازی مسیر غیروابسته به انسولین می‌شوند. فعالیت ضددیابتی بسیاری از پلی‌فنول‌ها نظیر پلی‌فنول موجود در انگور قرمز(۱۵) تری ترپنوئید مشتق از Bitter Melon(۱۶)؛ در دو رده متفاوت از سلول‌های ماهیچه‌ای یعنی میوتیوپ L6, C2C12 مورد بررسی قرار گرفته و همگی مکانیزم درگیر در جابجایی GLUT4 در سلول‌ها را مسیر AMPK می‌دانند.

امروزه خواص متعددی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و اثر بر چربی خون برای کورکومین ذکر شده است. کورکومین اهداف مولکولی متنوعی داشته و بر مسیرهای بیوشیمیایی، عوامل رونویسی و رشد، سیتوکین‌ها و آنزیم‌های متعددی تأثیرگذار است. عمده مطالعات انجام شده در مورد تأثیر کورکومین بر دیابت به صورت In vivo بوده است. این مطالعات غالباً مکانیزم مولکولی درگیر را مورد بررسی قرار نداده‌اند. بررسی مکانیزم مولکولی در سلول‌های رده ماهیچه‌ای نیز غالباً در سلول‌های L6 انجام گرفته است.

مطالعه حاضر نشان داد غلظت ۴۰ میکرومولار کورکومین پس از تیمار یک ساعته در میوسیت‌های C2C12 می‌تواند مسیر AMPK را فعال کند. همچنین در سلول‌های تیمار شده با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل، فرم فسفریله آنزیم ACC افزایش یافته است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

قسمت‌هایی از نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعه Teayoun Kim و همکاران روی سلول‌های رده هپاتوسیت انسانی و هپاتوما رت مطابقت دارد. از جمله فعال شدن AMPK و ACC تحت تأثیر کورومین مطابقت دارد(۱۷). این مطالعه نیز اثر کورکومین بر هومئوستاز گلوکز را از طریق مسیر AMPK می‌داند و از این نظر با مطالعه اخیر مشابهت دارد. هر چند رده مورد استفاده هپاتوسیت است.

عمده مطالعات In vivo بوده و حاکی از تأثیر کورکومین بر دیابت و عوارض آن است. از جمله در سال ۲۰۰۲ میلادی گزارش شد کورکومین در رت‌های دیابتی باعث کاهش سطح گلوکز خون و هموگلوبین گلیکوزیله شده و استرس اکسیداتیو و فعالیت سوربیتول دهیدروژناز را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد(۱۱). همچنین ترکیبات موجود در زردچوبه باعث برداشت ROS ها و افزایش غلظت گلوتاتیون به عنوان یک ترکیب مقابله کننده با استرس اکسیداتیو ایجاد شده طی دیابت می‌شود(۱۸). Lakshmanan و همکاران افزایش بیان پروتئین-های مختلفی از جمله p-AMPKα و GLUT4 را در مغز رت‌هایی که از طریق STZ دیابتی شده و ۱۰۰mg/kg کورکومین به صورت خوراکی دریافت کرده‌اند، مشاهده کردند و نتیجه گرفتند کورکومین هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو را از طریق فعال کردن AMPK در مغز رت‌های دیابتی شده از طریق STZ تعدیل می‌کند(۱۹). این مطالعه نیز همانند مطالعه حاضر اثر ضدهیپرگلیسمی کورکومین را فعال کردن مسیر AMPK می‌داند.

مطالعه Na و همکاران نشان داد استفاده از کورکومین طی۷ هفته با دوز ۱۵۰mg/kg در موش‌های دیابتی شده توسط STZ و با رژیم غذایی پرچرب؛ باعث افزایش تحمل گلوکز، کاهش گلوکز و لیپیدهای پلاسما می‌شود. همچنین استفاده از کورکومین ۱۰μmol/l توانست در سلول‌های L6 تیمار شده با پالمیتات، باعث افزایش بیان GLUT4 در غشای این سلول‌ها شده و منجر به فسفریلاسیون AMPK، CD36 و کارنیتین پالمیتویئل ترانسفراز ۱ و نیز ACC شود(۲۰). به هر حال نتایج حاصل از In vivo, In vitro در این مطالعه با نتایج حاصل از این پژوهش تطابق دارد. این مطالعه روی رده L6 انجام شده و به همین دلیل غلظت کورکومین مورد استفاده متفاوت است.

در سال ۲۰۱۰ میلادی بررسی اثر همزمان انسولین و کورکومین بر متابولیسم گلوکز در سلول‌های C2C12 انجام شد(۲۱). این مطالعه نیز اثر کورکومین بر برداشت گلوکز را از طریق مسیر AMPK/ACC دانسته و نشان می‌دهد کورکومین میزان فسفریلاسیون این دو پروتئین را افزایش می‌دهد. این مطالعه فعلی تشابهات فراوانی با پژوهش حاضر از لحاظ نوع سلول مورد مطالعه و غلظت کورکومین مورد استفاده دارد و نتایج آن را تأیید می‌کند.

در این مطالعه سعی شد فعال شدن مسیر AMPK توسط کورکومین با کنترل مقایسه و مشخص شود، کورکومین نقش مؤثری در فسفریله و فعال ساختن مسیر AMPK سلول‌های C2C12 دارد. کیناز AMPK سوبستراهای متعددی دارد. یکی از سوبستراهای مهم آنزیم ACC است که این کیناز ACC را فسفریله و غیرفعال می‌کند. بدین ترتیب کورکومین در متابولیسم لیپید در عضله اسکلتی نقش قابل توجهی دارد. با فسفریله شدن ACC لیپوژنز مهار و اکسیداسیون لیپیدی تسریع گشته و بدین ترتیب منجر به کاهش متابولیت‌هایی که خود عامل ایجاد کننده مقاومت به انسولین است، می‌شود. از سوی دیگر کیناز وابسته به AMP منجر به برداشت گلوکز مستقل از انسولین می‌شود. به طور کلی این مسیر توجیه‌کننده اثرات ضددیابتی و هیپرلیپدمی کورکومین در مطالعات In vivo, In vitro قبلی است.

با توجه به یافته‌های به دست آمده می‌توان برای مطالعات آینده این پیشنهادات را مطرح کرد:

۱-با استفاده از مهار کننده AMPK و PI3K فعال شدن مسیر AMPK در این رده سلولی تأیید شود.

۲) برای بررسی تأثیر کورکومین بر متابولیسم چربی میزان پروتئین‌های درگیر در متابولیسم چربی نظیر CD36 و کارنیتین پالمیتویئل ترانسفراز ۱ نیز مورد بررسی قرار گیرد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

References:

1- Nedachi T, Kanzaki M. ***Regulation of glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes.*** Am J Physiol Endocrinol Metab 2006; 291(4): E817-28.

2- Martin S, Slot JW, James DE. ***GLUT4 trafficking in insulin-sensitive cells. a morphological review.*** Cell Biochem Biophys 1999; 30(1): 89-113.

3- Kramer HF, Witczak CA, Fuji N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, et al. ***Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle.*** Diabetes 2006; 55(7): 267-76.

4- Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg- Henriksson A, et al. ***Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects.*** Diabetes 1998; 47(8): 1281-6.

5- Towler MC, Hardie DG. ***AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling.*** Circ Res 2007; 100(3): 328-41.

6- Zhang BB, Zhou G, Li C. ***AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome.*** Cell Metab 2009; 9(5): 407-16.

7- Oakhill JS, Scott Jw, Kemp BE. ***Stracture and function of AMP-activated protein kinase.*** Iacta Physiol (Oxf) 2009; 196(1): 3-14.

8- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. ***Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle.*** J Appl Physiol 2000; 88(6): 2219-26.

9- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. ***Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.*** J Clin Invest 1996; 97(12): 2859-65.

10- Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. ***Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome.*** Endocrine 2006; 29(1): 91-100.

11- Arun N, Nalini N. ***Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats.*** Plant Foods Hum Nutr 2002; 57(1): 41-52.

12- El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-sisi SF, Ahmed AF. ***The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF-alpha and free fatty acids.*** Food Chem Toxicol 2011; 49(5): 1129-40.

13- Pari L, Murugan P. ***Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats.*** J Basic Clin Physiol Pharmacol 2005; 16(4): 257-74.

14- Hardie DG. ***AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism.*** Int J Obes (Lond) 2008; 32 (Suppl 4): S7-12.

15- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, et al. ***Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase.*** Exp Mol Med 2007; 39(2): 222-9.

16- Tan MJ, Ye JM, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke CQ, Tang CP, Chen T, et al. ***Antidiabetic activities of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chem Biol 2008; 15(3): 263-73.

17- Kim T, Davis J, Zhang AJ, He Y, Mathews ST. ***Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells.*** Biochem Biophys Res Commun 2009; 388(2): 377-82.

18- Osawa T, Kato Y. ***Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia.*** Ann N Y Acad Sci 2005; 1043: 440-51.

19- Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, Sari FR, Meilei H, Soetikno V, et al. ***Curcumin attenuates hyperglycaemia-mediated AMPK activation and oxidative stress in cerebrum of streptozotocin-induced diabetic rat.*** Free Radic Res 2011; 45(7): 788-95.

20- Na LX, Zhang YL, Li Y, Liu LY, Li R, Kong T, et al. ***Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats.*** Nutr Metab Cardiovasc Dis 2011; 21(7): 526-33.

21- Kang C, Kim E. ***Synergistic effect of curcumin and insulin on muscle cell glucose metabolism.*** Food Chem Toxicol 2010; 48(8-9): 2366-73.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

Effect of Curcumin on Phosphorylation of AMPK and ACC in C2C12 Skeletal Muscle Cells

Ghanbarzadeh F(MSc)*[1], Mohiti J(PhD)[2], Zavarreza J(PhD)[3]

[1-3]*Department of Biochemistry & Molecular Biology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 30 Dec 2012 ***Accepted:*** 23 May 2013

Abstract

Introduction: AMP activated protein kinase (AMPK) as key regulators of cell metabolism, plays a major role in the activation of catabolic pathways, such as glucose transport and fatty acid oxidation. Thus, activation of this pathway can be used in the treatment of diabetes and metabolic syndrome. Many studied proposed the effectiveness of the polyphenols present in rhizomes of turmeric (curcumin) on diabetes and its related complications. Therefore, this study investigated the effects of curcumin as an activator of AMPK pathway in C2C12 muscle cells.

Methods: This study was done on C2C12 skeletal muscle cell line. The cells were classified into two distinct groups: first group was treated with 40µM curcumin and the second one with 0.1% DMSO as a negative control. The phosphorylated (AMPK) and phosphorylated acetyl COA carboxylase (ACC) were evaluated and compared by Western blotting technique.

Results: intracellular phosphorylated AMPK protein content in Curcumin-treated group was 132.6% and ACC protein phosphorylated was 366.47%.

Conclusion: This study showed that the levels of phosphorylated AMPK and ACC protein in cells treated with curcumin are higher than the negative control. Thus curcumin can be regarded as an activator of AMPK activity in these cells and can assist as a potential target for making anti diabetic medecine that has a synergistic activity with insulin.

Keywords: AMPK; ACC; C2C12; Curcumin

This paper should be cited as:

Ghanbarzadeh F, Mohiti Ardakani J, Zavarreza J. ***Effect of curcumin on phosphorylation of ampk and acc in C2C12 skeletal muscle cells***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(4): 482-92.

Corresponding author: Tel: +98 9173810418, Email: ghanbarzadeh_bio@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]