Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 21, No. 2, May-Jun 2013
Pages: 216-225

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۱، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۲
صفحه: ۲۲۵-۲۱۶

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

تأثیر عصاره زردچوبه بر جابجایی ناقل غشایی گلوکز، ایزوتایپ IV (Glut4) در سلول‌های تمایز یافته C2C12

شهاب الدین اسدی[۱]، جواد محیطی اردکانی*[۲]، فاطمه پوررجب[۳]، جواد زوار رضا[۴]، علی مرادی[۵]

۱- دانشجوی کارشناس 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
۵-۳- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۵

چکیده

مقدمه: کرکمین، ترکیب فنولیک اصلی موجود در گیاه زردچوبه است که سال‌های متمادی در طب سنتی هند مورد استفاده قرار می‌گرفته است. در سال‌های اخیر تحقیقاتی در زمینه اثرات کرکمین در جلوگیری از افزایش قند خون در مدل‌های حیوانی گزارش شده است، هر چند اساس مولکولی این اثرات به خوبی مشخص نشده است. در مطالعه حاضر اثر کرکمین در جلوگیری از افزایش قند خون در سلول‌های عضلانی رده C2C12 مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: امیوتیوب‌های C2C12 در روز ششم تمایز به مدت ۵/۱ ساعت تحت تأثیر غلظت ۴۷/۱ میلی‌گرم بر دسی لیتر (۴۰ میکرومولار) کرکمین قرار گرفتند. سپس از سلول‌ها هموژن تهیه و با سانتریفیوژ در دورهای بالا، اجزاء سیتوزولی و غشایی جدا شدند. غلظت تام فراکشن‌ها با کمک روش برادفورد اندازه‌گیری و سپس پروتئین‌ها از طریق الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریلامید جداسازی و در نهایت با کمک وسترن بلات میزان Glut4 تعیین مقدار شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از برنامه نرم‌افزاری دستگاه Gel documentation، SPSS و آزمون آماری Anova مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: مقایسه سطح Glut4 در سلول‌های C2C12 نشان دادند که در میوتیوب‌هایی که به مدت ۵/۱ ساعت تحت تأثیر ۴۷/۱ میلی‌گرم بر دسی لیتر (۴۰ میکرومولار) کرکمین قرار گرفته بودند، میزان Glut4 در هر دو جزء سیتوزولی و غشایی نسبت به گروه شاهد افزایش یافته و این افزایش در فاصله اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره زردچوبه می‌تواند انتقال غشایی Glut4 را در میوتیوب‌های C2C12 تحریک کند و بیانگر این می‌باشد که عصاره زردچوبه قادر است به نقش تنظیمی سلول‌های فوق در متابولیسم گلوکز کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: کرکمین، رده سلولی C2C12، ناقل گلوکز ایزوتایپ ۴

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۰۲۶۳۳، پست الکترونیکی: mohiti_99@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 at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

مقدمه

دیابت نوع ۲ یک بیماری متابولیک با شیوع جهانی است که علت عمده آن مقاومت به انسولین می‌باشد(۱،۲). عدم کنترل این بیماری منتهی به عوارض خطرناکی از جمله نارسایی کلیوی، اختلالات قلبی عروقی، اسیدوز متابولیک، کوری و حتی مرگ می‌شود(۳). در شرایط طبیعی انسولین عامل اصلی در کاهش گلوکز خون است که به طور عمده از طریق افزایش برداشت گلوکز به ویژه در سلول‌های عضلانی و چربی عمل می‌کند(۴،۵). مکانیسم اصلی انسولین در برداشت گلوکز در ارتباط با مولکول ناقل گلوکز (Glut) است که ایزوتایپ‌های مختلفی دارد(۳،۶) و از آنجا که مهمترین مولکول ناقل گلوکز در عضلات و بافت چربی به عنوان اصلی‌ترین بافت‌های مصرف کننده گلوکز Glut4 است، عمده مطالعات و از جمله مطالعه حاضر بر این مولکول متمرکز است؛ مولکولی که تحت اثر انسولین و در پاسخ به افزایش گلوکز خون، میزان بیان ژن و انتقال آن از سیتوزول به سمت غشاء پلاسمایی افزایش می‌یابد. برای کنترل دیابت نوع ۲ که عمده‌ترین نوع دیابت به حساب می‌آید، روش‌های مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته که یکی از آنها روی آوردن به ترکیبات و داروهای گیاهی است(۷). هر چند ترکیبات گیاهی متعددی در این خصوص مورد مطالعه قرار گرفته و اثرات ضددیابتی آنها تأیید شده‌اند، اما به دلیل اینکه مکانیسم عمل آنها به درستی روشن نشده است در مورد مصرف آنها در درمان دیابت تردید وجود دارد(۱). گیاهانی از قبیل جین سینگ، هندوانه ابوجهل، شنبلیله، چای سبز، دارچین و بسیاری گیاهان دیگر در این رابطه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(۱). در این تحقیق نیز از زردچوبه که مصرف فراوانی به ویژه در جوامع شرقی دارد و مطالعات زیادی نیز در زمینه اثر ضد دیابتی بر روی آن صورت گرفته، استفاده شده است. عصاره زردچوبه حاوی ترکیباتی است که بر اساس مطالعات انجام شده دارای اثرات متعددی از جمله اثرات ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضددیابتی می‌باشد (۸،۹). سه ترکیب اصلی موجود در عصاره زردچوبه شامل کرکمین، دمتوکسی کرکمین و بیس دمتوکسی کرکمین است که جزء ترکیبات پلی‌فنولیک می‌باشند(۱۰). اثر بخشی عصاره زردچوبه در کاهش قند خون از جنبه‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است ولی کمتر به مکانیسم سلولی اثرات آن پرداخته شده است. استفاده از مدلهای کشت سلولی می‌تواند در بررسی مکانیسم‌های احتمالی دخیل در کاهندگی گلوکز خون توسط زردچوبه کمک کننده باشد. از آنجا که عمده مصرف گلوکز خون در بافت‌های عضلانی و چربی انجام می‌شود، مولکول Glut4 که ناقل مهم گلوکز در سلول‌های عضلانی و بافت چربی است، نقش اصلی را در مصرف گلوکز با واسطه انسولین در این بافت‌ها به عهده دارد(۱۱). از آنجا که عضلات اسکلتی مسئول بیش از ۷۵٪ مصرف گلوکز در پاسخ به انسولین است و نیز مهمترین بافت در تعادل انرژی از این طریق می‌باشد، بافت مناسبی برای مطالعه محسوب می‌شود. چندین رده سلولی در ارتباط با عضلات اسکلتی وجود دارد که شامل رده‌های سلولی L6، BC3H1 و C2C12 می‌باشد. با توجه به اینکه مطالعات زیادی در زمینه نحوه فعالیت انسولین در رده BC3H1 انجام نشده بود، بنابراین رده مناسبی برای این مطالعه نبود. اما در دو رده دیگر بررسی‌های زیادی در ارتباط انتقال Glut4 به تحریک انسولین انجام شده است. در رده L6 هم در حالت بنیادی و هم در حالت تمایز یافته، ماشین جابجایی Glut4 فعال می‌باشد و نسبت به عوامل محرک و مهارکننده Glut4 حساسیت کافی را ندارد. اما در رده C2C12 که عمدتاً برای تمایز و تکامل سلول‌های عضلانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به طور معنی‌داری حدود سه برابر افزایش جابجایی Glut4 در پاسخ به انسولین مشاهده شده است(۶). تأثیر عمده بافت عضلانی در متابولیسم گلوکز و ویژگی‌های رده سلولی C2C12، این بافت و این رده را جهت بررسی تأثیر احتمالی عوامل خارجی همچون عصاره گیاهان در ارتباط با بیماری دیابت مطلوب کرده است. مطالعات عمده‌ای در ارتباط با تأثیر عصاره زردچوبه در جلوگیری از افزایش

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

قندخون در مدل‌های حیوانی و انسانی انجام شده است، اما مطالعات سلولی در این زمینه بخصوص در ارتباط با بیان و جابجایی Glut4 محدود می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی بود که جهت بررسی قابلیت سلول‌های C2C12 در جابجایی Glut4 و نیز تأثیر عصاره زردچوبه در افزایش این جابجایی انجام شد.

جهت تهیه عصاره زردچوبه از روش استفاده شده توسط Chearwae و همکارانش پیروی شد(۱۲). ابتدا ریزوم گیاه زردچوبه خریداری شده از بازار که از کشور هند وارد ایران می‌شود آسیاب شد و در اتانول ٪۹۵ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس عصاره الکلی فوق به کمک کاغذ واتمن شماره ۲ صاف و در حرارت ۶۰ درجه خشک گردید. رسوب به دست آمده در ادامه در دی اتیل اتر حل و مجدداً به کمک کاغذ واتمن شماره ۲ صاف و در حرارت ۶۰ درجه خشک شد. رسوب نهایی حاصل شامل مخلوطی از کرکمین (٪۷۸)، دمتوکسی کرکمین(٪۱۶) و بیس دمتوکسی کرکمین(٪۵) به همراه مقادیر جزئی ترکیبات رزینی و روغن‌های طبیعی با ساختار کتونی یا الکلی می‌باشد.

میوبلاست‌های موشی رده C2C12 در محیط کشت DMEM (Sigma cat: D5648) حاوی ٪۱۰ FBS و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۵۰ واحد بر میلی‌لیتر) و آمفوتریسین ب (۵/۲ میکروگرم بر میکرولیتر) که همگی از شرکت سیگما تهیه شده بودند در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد و ٪۵ CO2 و رطوبت ٪۹ در سه فلاسک با تعداد ۲×۱۰۴ سلول در هر کدام، کشت داده شدند. محیط‌های کشت هر ۴۸ ساعت با محیط جدید جایگزین شدند تا زمانی که ٪۸۰ آنها اتصال پیدا کرده و آماده تمایز شدند. در این مرحله سلول‌ها در محیط تمایز شامل DMEM و ٪۲ سرم اسبی (Horse serum, Invitrogen, cat:26050-088)، قرار داده شدند و پس از ۲، ۴ و ۶ روز با محیط جدید جایگزین شدند. در روز هفتم تمایز، میوسیت‌ها جهت بررسی اثر عصاره زردچوبه بر مسیر انتقال پیام انسولین مهیا شدند. فلاسک‌های مورد مطالعه شامل فلاسک کنترل حاوی ۱/۰ درصد دی‌متیل سولفکساید (DMSO)، فلاسک دوم حاوی ۴۰ میکرومولار (۴۷/۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) کرکمین تجاری و فلاسک سوم با ۴۰ میکرومولار (۴۷/۱ میلیگرم بر دسی‌لیتر) عصاره تهیه شده در آزمایشگاه بود. هر سه فلاسک پس از تیمار با مقادیر فوق، به مدت ۵/۱ ساعت انکوبه و در انتها آماده برداشت جهت جداسازی فراکشن‌های سیتوزولی و غشایی شدند.

جهت تهیه فراکشن‌های سلولی از روش شرح داده شده توسط Tortorella با اندکی تغییر استفاده شد(۱۳). میوسیت‌های چسبیده به ته فلاسک توسط اسکراپر برداشته و سه بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها را در بافر هموژن کننده یا HES (۲۲۵ میلی‌مول سوکروز، ۴ میلی‌مول Na2EDTA، ۲۰ میلی‌مول HEPES، ۱/۰ میلی‌مول PMSF و ٪۱ آنتی‌پروتئاز) به خوبی مخلوط کرده و به مدت نیم ساعت به طور متناوب و با حفظ دمای ۴ درجه سانتیگراد بر روی ویبراتور قرار داده شد تا به خوبی مخلوط و همگن شوند(۱۴). سلول‌های همگن شده در بافر HES در اولتراسانتریفیوژ با ۱۷۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت. در ادامه محلول رویی با ۴۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه چرخانده شد و رسوب حاصل که حاوی جزء سیتوزولی بود جمع‌آوری شد. جهت تهیه فراکشن غشایی رسوب مرحله اول را در محلول پرچگال سوکروز (۱۲/۱ مول‌سوکروز، ۱ میلی‌مول Na2EDTA و ۲۰ میلی مول HEPES) ریخته و به مدت ۶۰ دقیقه با ۴۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز میانی تشکیل شده را با سرنگ مخصوص برداشته و در بافر HES قرار داده و به مدت ۲۵ دقیقه با ۲۵۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا جزء غشاء پلاسمایی در رسوب نهایی به دست آید.

پروتئین تام فراکشن‌های به دست آمده از مرحله قبل با

روش برادفورد تعیین مقدار شدند و مقدار ۷۵ میکروگرم پروتئین از هر کدام در چاهک‌های الکتروفورز(SDS-PAGE) با پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد، بارگذاری و به مدت ۵/۱ ساعت و با شدت جریان ۳۴ میلی‌آمپر عمل جداسازی پروتئین‌ها انجام شد. سپس پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل به روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. برای این عمل از شدت جریان ۳۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۲۰ ساعت استفاده شد. پس از انتقال پروتئین‌ها ابتدا با قرار دادن کاغذ نیتروسلولز در محلول بلوکینگ ۵ درصد به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد جایگاه‌های غیراختصاصی مسدود و در ادامه آنتی‌بادی اولیه علیه Glut4 (IF8, Abcam, cat:ab35826) با رقت ۱:۵۰۰ و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد اضافه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با HRP (Goat anti-mouse IgG Santa cruz, cat:sc-2031) با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت سه ساعت و در دمای محیط اضافه و در نهایت با روش کمی لومینسانس و کیت ECL (ECL Advance Western blotting detection kit, Amersham, cat:10270-106) مراحل تشخیص مولکول Glut4 انجام شد. برای این کار ابتدا مخلوط مساوی محلول لومیژن و محلول H2O2 موجود در کیت به طور یکنواخت بر روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و پس از قرار دادن در محفظه تاریک دستگاه Gel documentation و پس از صرف زمان ۵ دقیقه یعنی زمانی که واکنش انجام شد و تولید فوتون آغاز گردید، کاغذ را به سرعت خشک نموده و مجدداً برای تصویربرداری از باندهای پروتئینی حاصل به فواصل زمانی ۲۰ ثانیه در دستگاه قرار گرفت. تصاویر مناسب جهت بررسی و تعیین مقدار باندها با استفاده از نرم‌افزار خود دستگاه (Gene tools) انجام گردید.

داده‌های به دست آمده توسط دستگاه Gel documentation and analysis system با استفاده از نرم‌افزار مخصوص خود دستگاه (Gene tools)، نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA (ضریب اطمینان ٪۹۵ و P<۰۵/۰) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

عصاره زردچوبه (Curcumin) باعث افزایش میزان حضور Glut4 در سیتوزول و غشاء سلولی می‌شود.

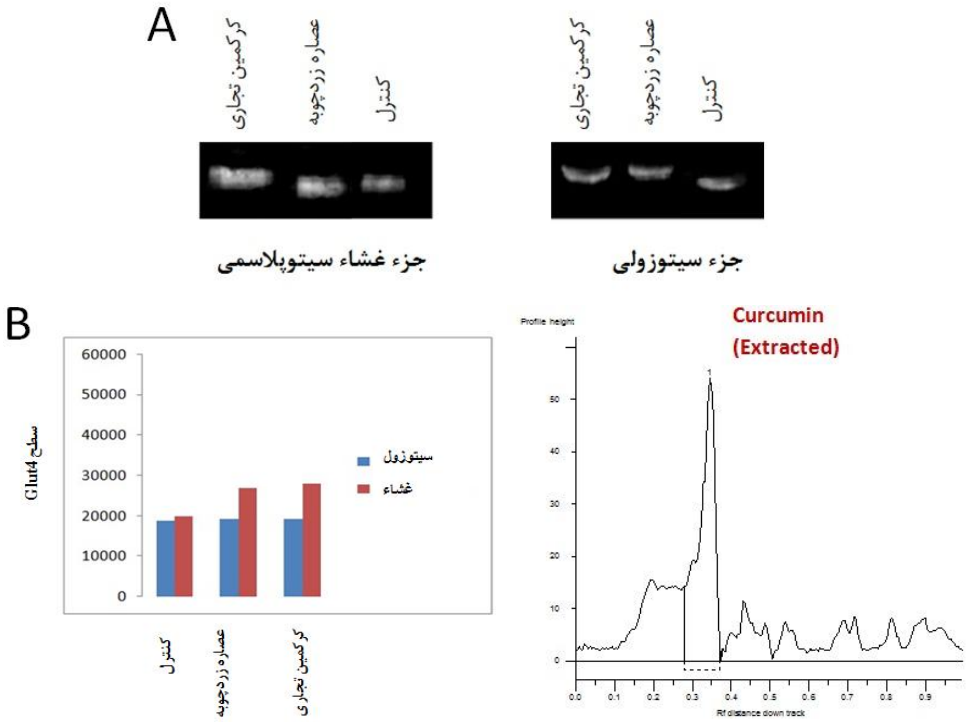
به منظور بررسی نقش عصاره زردچوبه بر متابولیسم گلوکز در سلول‌های عضلانی، اثر غلظت ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه در برداشت گلوکز توسط سلول‌های تمایز یافته C2C12 مورد استفاده قرار گرفت. غلظت ۳ و ۱۰ میکرومولار عصاره زردچوبه می‌تواند باعث القاء برداشت گلوکز در این سلول‌ها شود و در غلظت ۴۰ میکرومولار حداکثر تأثیرگذاری را خواهد داشت. از طرفی غلظت‌های صفر تا ۴۰ میکرومولار کرکمین بر قابلیت زنده ماندن میوتیوب‌ها تأثیر منفی ندارد(۱۴). برای ارزیابی برداشت گلوکز در میوتیوب‌ها علاوه بر عصاره الکلی زردچوبه تهیه شده در آزمایشگاه، نوع تجاری آن (از شرکت Sigma) نیز مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های C2C12 در روز هفتم تمایز با غلظت ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه و نیز کرکمین تجاری به مدت ۱/۵ ساعت تیمار شدند. فراکشن‌های سیتوزولی و غشایی سلول‌های فوق از لحاظ میزان Glut4 مورد بررسی قرار گرفته و پس از شناسایی Glut4 و تعیین مقدار آن نتایج به دست آمده، ارزیابی شد.

داده‌ها نشان دادند که میزان Glut4 غشایی و سیتوزولی در نمونه‌های متأثر از ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه و نیز کرکمین تجاری در مقایسه با نمونه کنترل (متأثر از ٪۱ DMSO) افزایش یافته است.

پس از تیمار سلول‌ها با ۴۰ میکرومولار کرکمین تجاری و عصاره زردچوبه، Glut4 سیتوزولی و غشایی با کمک الکتروفورز جداسازی و با انتقال به کاغذ نیتروسلولز توسط آنتی‌بادی اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفتند (قسمت A شکل ۱) و به کمک نرم‌افزار Gene tools به صورت نموداری ارائه و تعیین مقدار (قسمت B شکل ۱) شدند.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

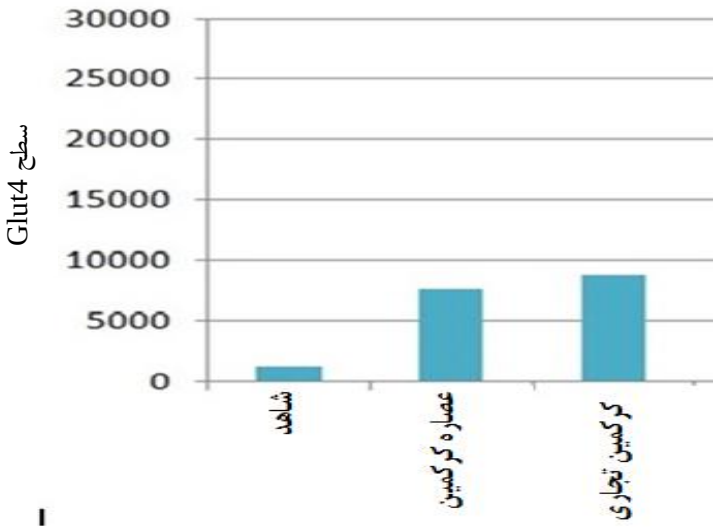
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018



شکل ۱: اثر عصاره زردچوبه و کرکمین تجاری در افزایش Glut4 در جزء سیتوزولی و غشایی

سطح زیر منحنی متناسب با میزان Glut4 در جزء مورد بررسی می‌باشد. منحنی سمت راست به عنوان نمونه از باند مربوط به سلول‌های متأثر از عصاره زردچوبه در جزء سیتوزولی به دست آمده است. همانطور که از نمودارهای ستونی مشخص است، میزان Glut4 به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه حاوی ۰/۱٪ DMSO (کنترل) افزایش پیدا کرده است. (CI =۰/۹۵ ،p<۰/۰۵)

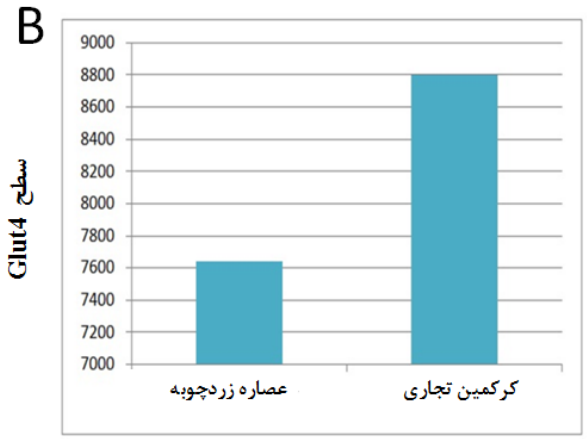
عصاره زردچوبه باعث جابجایی Glut4 به سطح سلول می‌گردد. با تعیین اختلاف بین Glut4 غشایی و سیتوزولی می‌توان میزان جابجایی Glut4 به سطح سلول را مشخص کرد. داده‌ها نشان می‌دهند که جابجایی Glut4 در سلول‌های تحت تأثیر ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه و کرکمین تجاری در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه اختلاف میزان حضور ناقل غشایی Glut4 در غشاء سلولی و سیتوزول

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

سلول‌های C2C12 طی مدت ۵/۱ ساعت تحت تأثیر ۴۰ میکرومولار کرکمین تجاری و نیز عصاره زردچوبه قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده جابجایی قابل توجه ناقل Glut4 به سطح غشاء در مقایسه گروه شاهد (۰/۱٪ DMSO) می‌باشد. (p<۰/۰۵، ۹۵% =CI) (شکل ۲). تأثیر کرکمین تجاری در مقایسه با عصاره زردچوبه بر جابجایی Glut4 بیشتر است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره تهیه شده با روش ذکر شده در مقابله در مقایسه با کرکمین تجاری آماده تأثیر کمتری در میزان Glut4 سیتوزولی و غشایی و نیز جابجایی Glut4 به سطح غشاء داشته است (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه اختلاف غشایی ـ سیتوزولی Glut4 در سلول‌های متأثر از ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه و کرکمین تجاری

بحث و نتیجه گیری

فعالیت‌های بیوشیمیایی و فواید درمانی زردچوبه از جنبه‌های مختلف از جمله نقش آن در کاهش قند خون در چند دهه اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۷-۱۵). به نظر می‌رسد عصاره زردچوبه می‌تواند باعث افزایش جابجایی ناقل گلوکز ایزوتایپ ۴ در سلول‌های C2C12 به سطح سلول شود و این عمل را از طریق تحریک مسیر AMPK/ACC انجام می‌دهد(۱۴)

مطالعاتی که روی بیان Glut4 و جابجایی آن تحت اثر عصاره زردچوبه انجام شده‌اند محدود بوده و همین موضوع اهمیت بررسی‌های بیشتر را ضروری می‌سازد.

Cheng و همکارانش با مطالعه بر روی سلول‌های عضلانی موش به این نتیجه رسیدند که Curcumin از طریق فعال کردن گیرنده‌های موسکارینی M-1 muscarinic cholinoceptors باعث افزایش برداشت گلوکز توسط سلول‌های عضلانی می‌شود و این عمل از طریق مسیر PLC-PI3-kinase انجام می‌شود. همچنین با کمک وسترن بلات میزان پروتئین غشایی GLUT4 اندازه‌گیری شد و مقدار آن افزایش یافته بود(۱۸). با مقایسه نتایج این تحقیق شاید بتوان به این نتیجه رسید که Curcumin نیز که در این مطالعه باعث افزایش Glut4 غشایی شده وابسته به این مکانیسم عمل کرده باشد.

Kang و همکارش به بررسی اثر همزمان انسولین و کرکمین بر متابولیسم گلوکز در سلول‌های عضلانی موش پرداختند. بر طبق این بررسی کرکمین می‌تواند باعث تحریک برداشت گلوکز از طریق مسیر AMPK/ACC شود، ولی بر مسیر PI3-kinase/Akt تأثیری ندارد. از طرفی استعمال همزمان انسولین و کرکمین باعث فعال شدن همزمان هر دو مسیر فوق می‌شود و این فعال‌سازی بیش از زمانی است که تنها از انسولین و در غیاب کرکمین انجام می‌شود. افزایش میزان مولکول ناقل گلوکز یعنی Glut4 در سطح غشاء نیز تأییدی بر این موضوع است(۱۴). با توجه به اینکه مطالعه فعلی تشابهات فراوانی هم از لحاظ نوع سلول مورد مطالعه، هم از لحاظ مداخله انسولین با این مطالعه دارد، می‌توان نتایج مشابه را به

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

هم تعمیم داد. در تحقیق حاضر نیز افزایش واضحی در میزان Glut4 غشایی (انتقال به غشاء) مشاهده شده است و با توجه به اینکه تحریک برداشت گلوکز در اینجا به مسیر AMPK/ACC نسبت داده شده در مطالعه حاضر نیز می‌توان مسیر یاد شده را دارای نقش مهم در ترانس لوکاسیون Glut4 دانست.

Liao و همکارانش اثر گیاه Cirsium japonicum را روی رت‌های دیابتی بررسی کردند. هرچند ترکیبات موجود در این گیاه از نوع ترکیبات پلی‌فنلیک هستند، ولی این ترکیبات نتوانستند میزان بیان مولکول ناقل گلوکز را افزایش دهند و فقط با اثر بر آنزیم‌های مسیر گلیکولیز و افزایش کاتابولیسم گلوکز خواص آنتی‌دیابتی از خود نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که ترکیبات پلی‌فنلی زردچوبه احتمالاً اثری متفاوت با ترکیبات پلی‌فنلی موجود در گیاه Cirsium japonicum داشته باشد، به طوری که کرکمینوئیدهای (Curcuminoid) زردچوبه باعث افزایش میزان جابجایی Glut4 به غشاء سلول می‌شوند و به این طریق میزان مصرف گلوکز توسط میوتیوب‌های C2C12 را بالا می‌برند. با مقایسه این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر چنین نتیجه گرفته می‌شود که بسته به ساختار شیمیایی پلی‌فنل‌ها رفتار آنها می‌تواند متغیر باشد و اثرات متفاوتی داشته باشند.

در مطالعه حاضر مشخص شده است که سلول‌های عضلانی رده C2C12 می‌توانند به عنوان الگوهای مناسبی جهت بررسی نحوه تأثیرگذاری ترکیبات گیاهی بر مسیرهای پیام‌رسانی انسولین که با مولکول ناقل گلوکز ایزوتایپ ۴ مرتبط هستند، باشند. در این مطالعه اثرات عصاره زردچوبه بر افزایش میزان Glut4 در سلول‌های C2C12 مورد تأیید قرار گرفت و مشخص شد که این سلول‌ها تحت تأثیر غلظت ۴۰ میکرومولار عصاره زردچوبه، میزان مولکول Glut4 بیشتری تولید می‌کنند که می‌تواند به طور غیرمستقیم نشان‌دهنده افزایش بیان ژن مربوط به Glut4 باشد. با بررسی یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان این مطلب را عنوان کرد که Curcumin ماده‌ای با ویژگی ضددیابتی است که می‌تواند مورد بررسی‌های بیشتری چه از لحاظ بالینی و چه از بعد سلولی مولکولی قرار گیرد. در این مطالعه سعی شد از عصاره زردچوبه موجود در بازار (وارد شده از هند) که به طور عمومی در بین مردم استعمال می‌شود و نیز عصاره آماده شده که از شرکت سیگما خریداری شده بود استفاده شود و مقایسه‌ای بین آن دو صورت گرفت که مشخص شد Curcumin شرکت سیگما تأثیر بیشتری در جابجایی Glut4 در سلول‌های C2C12 دارد و این موضوع ممکن است به دلیل خلوص بیشتر آن و اشکال تکنیکی در تهیه و خالص‌سازی عصاره زردچوبه در آزمایشگاه باشد.

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

۱) مسیر PI3-kinase/Akt و AMPK/ACC در سلول‌های C2C12 تحت اثر Curcumin مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

۲) میزان بیان مولکول Glut4 در سلول‌های C2C12 متأثر از Curcumin با آزمون RT-PCR بررسی شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمام اساتید و سازمان‌هایی که به نحوی در انجام این تحقیق دخیل بودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

از دکتر بمانعلی جلالی دانشیار گروه بیوشیمی، سرکار خانم عباسی کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی و جناب آقای عبدالرحیم آبسالان دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی تربیت مدرس تهران تشکر و قدردرانی می‌گردد.

References:

1- Hui H, Tang G, Go VL. ***Hypoglycemic herbs and their action mechanisms.*** Chin Med 2009; 4: 11.

2- Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaeili H, Parizadeh SM, et al.

Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender. urbanisation, education, marital status and occupation. Singapore Med J 2008; 49(7): 571-6.

3- Han J, Park SY, Hah BG, Choi GH, Kim YK, Kwen TH, et al. ***Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by - regulating GLUT4 expression in adipocytes.*** Arch Biochem Biophys 2003; 413(2): 213-20.

4- Sparling DP, Griesel BA, Olson AL. ***Hyperphosphorylation of MEF2A in primary adipocytes correlates with downregulation of human GLUT4 gene promoter activity.*** Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 292(4): E1149-56.

5- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, et al. ***Experimental and molecular medicine; resveratrol stimulates glucose transport in c2c12 myotubes by activating amp-activated protein kinase.*** Experimen Molecular Med 2007; 39(2): 222-9.

6- Haney PM, Levy MA, Strube MS, Mueckler M. ***Insulin-sensitive targeting of the glut4 glucose-transporter in L6 myoblasts is conferred by its cooh-terminal cytoplasmic tail.*** J Cell Biol 1995; 129(3): 641-58.

7- Yeh GY, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ, Phillips RS. ***Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes.*** Diabetes Care 2003; 26(4): 1277-94.

8- Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. ***Multiple biological activities of curcumin: a short review.*** Life Sci 2006; 78(18): 2081-7.

9- Strimpakos AS, Sharma RA. ***Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials.*** Antioxid Redox Signal 2008; 10(3): 511-45.

10- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. ***Curcumin: the Indian solid gold.*** Advances in experimental Medicine and Biology 2007; 595: p. 1-75.

11- Richardson JM, Pessin J. ***Identification of a skeletal muscle-specific regulatory domain in the rat Glut4 muscle-fat gene.*** J Biolog Chem 1993; 268: 21021-7.

12- Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandigama K, Ambudkar SV, Limtrakul P. ***Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II and III purified from turmeric powder.*** Biochem Pharmacol 2004; 68(10): 2043-52.

13- Tortorella LL, Pilch PF. ***C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression.*** Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 283(3): E514-24.

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

15- Abdel Aziz MT, El-Asmar MF, El Nadi EG, Wassef MA, Ahmed HH, Rashed LA, et al. ***The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets***. Angiol 2010; 61(6): 557-66.

16- Kim JH, Park JM, Kim EK, Lee JO, Lee SK, Jung JH, et al. ***Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells.*** J Cell Physiol 2010; 223(3): 771-8.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

17- Tang Y, Chen A. ***Curcumin prevents leptin raising glucose levels in hepatic stellate cells by blocking translocation of glucose transporter-4 and increasing glucokinase.*** Br J Pharmacol 2010. 161(5): 1137-49.

18- Cheng TC, Lin CS, Hsu CC, Chen LJ, Cheng KC, Cheng JT. ***Activation of muscarinic M-1 cholinoceptors by curcumin to increase glucose uptake into skeletal muscle isolated from Wistar rats*** 2009; 465(3): 235-41.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018

Effect of curcumin Extract on Ttranslocation of Glut 4 in C2C12 Myotubes

Asadi Sh(MSc)[1], Mohiti-Ardekani J(PhD)[*2], Pourrajab F(PhD)[3], Zavarreza J(PhD)[4], Moradi A(PhD)[5]

[1-5]*Department of Biochemistry and Molecular Biolog, Shahid Sadooghi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 2 Oct 2012 ***Accepted:*** 24 Jan 2013

Abstract

Introduction: Curcumin is a major phenolic compound of Curcuma longa, which has long been used in traditional Indian medicine. Recently, curcumin has been reported to have antihyperglycemic activity in animal models. However, the molecular basis of this action has not been adequatedly described. In the present study the antihyperglycemic effect of curcumin was examined using C2C12 myoblast cells.

Methods: The effects of curcumin were investigated in C2C12 myotubes by treating the cells with 40 µM of curcumin for 1.5 h. C2C12 myotubes were homogenized and the subcellular fractionation was prepared using ultracentrifugation; Then protein assay was performed using Bradford method and Glut4 determination was done using SDS-PAGE. Moreover, western immunoblotting techniques were exerted for semi-quantitative measurement. Data analysis was performed via gene tools software of Gel documentation and SPSS. An ANOVA test was used to compare three groups together.

Results: Comparison of Glut4 levels in C2C12 myotubes showed that myotubes which were exposed to1.5 hours of 40 µM curcunin had higher Glut4 percentages in both cytosolic and membrane fractions and Glut4 percentages were significant with a confidence interval (CI) of 95% ($P<0.05$).

Conclusion: The study results showed that curcumin can strongly induce the increase of Glut4 translocation in differentiated C2C12 cells, indicating its possible regulatory role in the glucose metabolism of skeletal muscle cells

Keywords: Curcumin; C2C12 myoblast cells***;*** Glut4

This paper should be cited as:

Asadi Sh, Mohiti-Ardekani J, Pourrajab F, Zavarreza J, Moradi A. ***Effect of curcumin extract on ttranslocation of Glut 4 in C2C12 myotubes***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(2): 216-225.

****Corresponding author: Tel:+ 98 351 8202633, Email: mohiti_99@yahoo.com***

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 21:34 IRDT on Friday July 20th 2018