● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست و یکم، شمارهٔ ۵، ص ۳۹۳-۳۸۴، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

اثر آدیپونکتین بر بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در سلول‌های عضله صاف رگ‌ها

مریم صانعی‌پور[۱]، کیهان قطره سامانی*[۲]، اسفندیار حیدریان[۳]، عفت فرخی[۴]

خلاصه

مقدمه: آترواسکلروز یکی از عوامل عمده مرگ و میر می‌باشد. آدیپونکتین در کاهش خطر بیماری قلبی دخالت دارد و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP-9 یا Matrix metalloproteinase-9) نیز در تشکیل و گسترش پلاک آترواسکلروز نقش دارد. هدف این مطالعه، بررسی روند تأثیرگذاری آدیپونکتین بر بیان ژن MMP-9 بود. این هورمون شاید می‌تواند از مسیر کاهش MMP-9 در کاهش خطر آترواسکلروز موثر باشد.

روش: سلول‌های عضله صاف عروق آئورت انسانی را در محیط F12K در شرایط مناسب کشت داده، با ۵ µg/ml آدیپونکتین تیمارکردیم. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، RNA سلول‌های تیمار شده استخراج و cDNA مربوط ساخته شد. ژن MMP-9 با روش PCR (Real time PCR) و با استفاده از سایبرگرین نسبت به ژن گلیسیرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع مورد سنجش قرار گرفت. مقدار پروتئین MMP-9 نیز با روش لکه‌برداری Western در مقابل پروتئین بتا اکتین به عنوان پروتئین مرجع تخمین زده شد.

یافته‌ها: آدیپونکتین در زمان ۲۴ ساعت تغییراتی بر بیان ژن MMP-9 نشان نداد، اما در مدت زمان ۴۸ ساعت بیان این ژن را کاهش داد (به‌ترتیب ۱/۱- و ۵/۵- برابر) و مقدار پروتئین نیز به دنبال کاهش بیان ژن MMP-9 در ۴۸ ساعت نسبت به پروتئین بتا اکتین کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: آدیپونکتین با کاهش بیان ژن و مقدار پروتئین MMP-9 تغییراتی در ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کند که می‌تواند باعث کاهش خطر و عوارض آترواسکلروز گردد.

واژه‌های کلیدی: آترواسکلروز، آدیپونکتین، ماتریکس متالوپروتئیناز ۹، سلول‌های عضله صاف عروق

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۲- استادیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۴- دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** kgsamani@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۶/۳ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۲/۹/۲۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۲/۱۰/۴

مقدمه

آترواسکلروز یکی از عوامل عمده مرگ و میر در اکثر کشورها می‌باشد. در دهه‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه پاتوژنز آترواسکلروز و راه‌های پیشگیری و درمان آن صورت گرفته است (۱).

چاقی به ویژه توده چربی احشایی اضافه، باعث التهاب مزمن می شود و به توسعه بیماری های وابسته به چاقی از جمله آترواسکلروز منجر می‌شود (۴-۲). بافت چربی مواد فعال بیولوژیکی زیادی را از آدیپوسایتوکاین‌ها و آدیپوکاین‌ها ترشح می کند (۲). از جمله این پپتیدها می‌توان به آدیپونکتین اشاره کرد.

تنظیم ناقص در تولید آدیپوسایتوکاین ها در پاتوژنز بیماری های قلبی- عروقی و حالت های التهابی دخالت دارد (۶، ۵). آدیپونکتین با وزن مولکولی بالا فعال ترین شکل هورمون است و به مقدار زیادی در بافت‌های چربی بیان می‌شود (۹-۷). در مطالعات ثابت شده است که این هورمون ویژگی های ضد التهابی و ضد آتروژنیک دارد (۱۱، ۱۰)، پس می تواند تولید آتروم را در دیواره عروق کاهش دهد (۱۲). تعدادی از مطالعات بالینی نشان دادند که غلظت پایین آدیپونکتین یک فاکتور خطرزا برای بیماری‌های قلبی- عروقی است (۱۳)، در حالی که غلظت بالای پلاسمایی آن با کاهش خطرات بیماری‌های قلبی در افراد سالم همراه می‌باشد.

سلول‌های عضله صاف عروق (VSMCs یا Vascular smooth muscle cells) دسته مهمی از سلول‌های درگیر در فرایند آترواسکلروز هستند. در جریان تشکیل آتروم تغییراتی چون تکثیر، مهاجرت و تغییر شکل در این سلول‌ها دیده می‌شود (۱۴). مطالعات معدودی در مورد اثر آدیپونکتین بر روی سلول های VSMCs یافت می شود که تنها تأثیرآدیپونکتین بر روی تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها بررسی شده است. آدیپونکتین بر روی رشد و مهاجرت سلول‌های عضله صاف عروقی از طریق مهار فعالیت ERK (Extracellular-signal-regulated kinases) تأثیرگذار می باشد (۱۵). آدیپونکتین از طریق اتصال به فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet-derived growth factor یا PDGF) از تحریک شدن ERK ممانعت می کند و در نهایت باعث مهار کامل فعالیت رشد و تعدیل تغییرات فنوتیپی در سلول‌های VSMC می‌شود (۱۶). طبق یافته های دیگری، پروتئین آدیپونکتین با اتصال به فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و مشتق از پلاکت‌ها از عمل تکثیری آن‌ها بر VSMCها جلوگیری می کند (۱۸، ۱۷).

ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases یا MMPs)، یک خانواده از پروتئازهای وابسته به روی هستند که به وسیله VSMCها و ماکروفاژها و انواع دیگر سلول‌ها تولید می‌شوند (۱۹). تنظیم شدید تولید و فعالیت MMPs یک قسمت تعیین کننده از هومئوستاز ماتریکس خارج سلولی است. این تنظیم در سطح رونویسی ژن، فعال شدن pro-MMPs و مهار کننده‌های داخلی صورت می گیرد (۲۰). تنظیم ناقص MMPs در مراحلی از آترواسکلروز مثل نفوذ لکوسیت ها، مهاجرت VSMC، ساخت و تجزیه ماتریکس داخل پلاک تأثیر می گذارد (۲۱). یکی از فعالیت‌های MMP-9 در آترواسکلروز، کمک به مهاجرت VSMC و گسترش پلاک است. MMP-9 باعث کاهش فعالیت مهاجرت و توانایی انقباض کلاژن می گردد و همچنین افزایش MMP-9 در آترواسکلروز باعث پارگی و ناپایداری پلاک می‌شود (۲۲).

با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر آدیپونکتین بر مقدار MMP-9 صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف بررسی روند تأثیرگذاری این هورمون بر بیان و مقدار MMP-9 انجام شد. از آن جایی که آدیپونکتین در کاهش خطر بیماری قلبی دخالت دارد و همچنین MMPs نیز در تشکیل و گسترش پلاک آترواسکلروز درگیر هستند، به‌نظر می‌رسد با بررسی روند تأثیرگذاری

آدیپونکتین بر بیان MMP9 بتوان به چشم اندازهای تازه تری درباره بیماری آترواسکلروز دست یافت یا حتی بتوان از این هورمون در کاهش خطر بیماری یا مراحل درمانی بیماری آترواسکلروز کمک گرفت.

روش بررسی

کشت رده سلولی: این مطالعه بر روی سلول‌های عضلات صاف عروق آئورت انسانی (HA-VSMC, ATCC, CRL-1999) انجام گردید. سلول‌ها از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت اختصاصی این سلول Ham's F12K است که حاوی ۰/۰۵ mg/ml اسکوربیک اسید، ۰/۰۱ mg/ml انسولین، ۰/۰۵ mg/ml ترانسفرین، ۱۰ ng/ml سدیم سلنیت، ۰/۰۳ mg/ml مکمل‌های رشد سلول‌های اندوتلیال (EGFs یا Endothelial growth factors)، ۱۰ درصد FBS (Phosphate buffered saline)، HEPES ۱۰ mM [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ µg /ml استرپتومایسین و ۰/۰۱ درصد آمفوتریسین می‌باشد. سلول‌ها در فلاسک مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 و رطوبت مناسب کشت داده شد. زمان دو برابر شدن سلول‌ها حدود ۲۵ ساعت است که بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها، از پاساژ ۶-۴ برای انجام آزمایشات استفاده گردید.

تیمار سلول‌ها با آدیپونکتین: برای تیمارسلول‌ها با آدیپونکتین، ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های ۱۲ خانه به میزان ۱۵۰۰۰ سلول در هر چاهک توزیع گردید.

پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ درصد، سلول‌ها با ۵ µg/ml آدیپونکتین (Adiponectin HMW rich human, BioVendor, Germany) تیمار شدند (۱۸). سپس سلول‌های تیمار شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۵ و ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. سلول‌ها در مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با آدیپونکتین مجاور شدند (۱۸) و پس از مدت زمان لازم، سلول‌ها تریپسینه و جمع‌آوری شدند تا در مراحل بعد RNA آن‌ها استخراج گردد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA با استفاده از محلول بیوزول (Bioflux- China) انجام گردید. در حدود ۱ میلیون سلول با ۵۰۰ میکرولیتر بیوزول مجاور گردید و RNA طبق دستورالعمل مربوط استخراج شد. غلظت RNA و کیفیت آن توسط نانودراپ تعیین و تأیید گردید. سپس با استفاده از کیت ساخت cDNA (Thermo- Canada) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت از روی RNA به دست آمده، cDNA ساخته شد. در حدود ۳ میکروگرم از هر نمونه RNA، برای سنتز cDNA استفاده گردید.

بررسی بیان ژن MMP-9: بیان ژن MMP-9 با روش Real time-PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین (Qiagen-Germany) توسط دستگاه Rotor-Gene (Corbett 3000-Australia) بررسی گردید. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد و میزان بیان ژن در گروه‌های تیمار شده و شاهد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است (۲۳،۲۴).

جدول ۱. *توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول محصول*

ژن	توالی پرایمر (5'_3')	طول محصول (bp)
GAPDH	Forward:ACACCCACTCCTCCACCTTTG Reverse:TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	۱۱۲
MMP-9	Forward:GCTCACCTTCACTCGCGTGTA Reverse:TCCGTGCTCCGCGACA	۷۰

شرایط انجام آزمایش: شامل فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه می باشد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. قبل از آنالیز داده‌ها، نمودار منحنی ذوب (Melting curve) برای هر ژن مورد بررسی قرار گرفت تا صحت مربوط به پیک ژن مورد نظر و عدم پرایمر دایمر تأیید شود. میزان بیان ژن MMP-9 با روش کمی نسبی و تعیین ΔΔCT و استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نرم‌افزار GraphPad Prism۵ ارزیابی گردید. در نهایت داده‌ها با آزمون آماری Kruskal–Wallis در نرم‌افزار فوق آنالیز و تفسیر شدند.

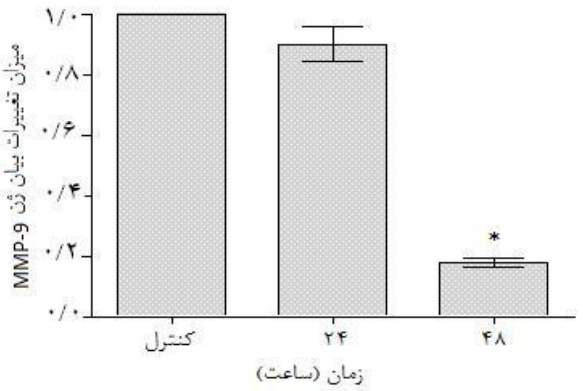
جهت بررسی بازدهی و شرایط حاکم بر واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از cDNA تهیه و برای آن‌ها واکنش Real time-PCR انجام گردید. از میزان CT و غلظت های حاصل از آن جهت رسم منحنی استاندارد و تعیین بازدهی واکنش استفاده شد.

Western Blotting: جهت تأیید تغییرات بیان ژن و تخمین مقدار پروتئین MMP-9 از روش Western blot استفاده شد. به این منظور ابتدا سلول‌های تیمار شده و شاهد پس از شستشو با بافر PBS سرد، در مجاورت بافر RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ به طور کامل لیز شدند و پس از سانتریفوژ، پروتئین هر نمونه با نانودراپ تعیین غلظت شد. محصولات لیز سلولی با بافر نمونه (Sample buffer 2X) به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد و به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر چاهک، بر روی ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۰ درصد جدا شد. سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ PVDF (Polyvinylidenedifluoride) منتقل شد. کاغذ در بافر TBS (Tris-buffered saline) حاوی Tween ۰/۱ درصد و شیر خشک بدون چربی (Skim milk) به مدت یک شب قرار گرفت تا سطوحی از کاغذ که عاری از پروتئین است، با پروتئین کازئین شیر پوشانده شود.

کاغذ به مدت ۲ ساعت در آنتی‌بادی پلی کلونال اولیه (Anti-MMP9, abcam, USA) و پس از مراحل شستشو، با آنتی‌بادی پلی کلونال ثانویه (HRP-Gout anti rabbit, abcam, USA) به مدت ۹۰ دقیقه بر روی Shaker قرار داده شد. پس از شستشو با افزودن سوبسترا (BM Blue POD Substrate, Roche, Germany) باندها ظاهر گردید. در این مرحله به عنوان پروتئین مرجع از بتا اکتین استفاده شد.

نتایج

در نمودار ۱ اثر آدیپونکتین بر بیان ژن MMP-9 نشان داده شده است. تأثیر آدیپونکتین با غلظت ۵ µg/ml بر روی سلول‌های VSMC در مدت زمان ۲۴ ساعت تغییراتی بر بیان ژن MMP-9 نشان نداد، اما در مدت زمان ۴۸ ساعت بیان این ژن را کاهش داد؛ به طوری که میزان تغییرات (Fold change) بیان ژن MMP-9 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۱- و ۵/۵- بوده است که نسبت به گروه شاهد فقط در زمان ۴۸ ساعت معنی‌دار بوده است ($P < ۰/۰۵$) (۱۸).

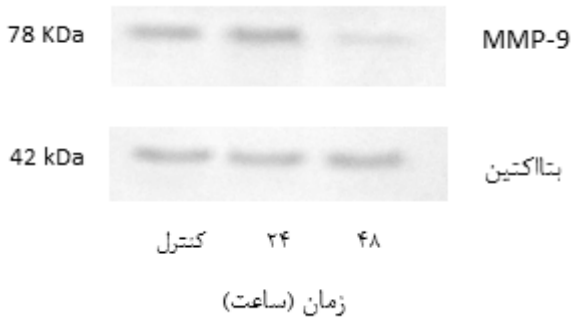


نمودار ۱. *تأثیر آدیپونکتین بر بیان ژن MMP-9 در رده سلولی VSMC (Vascular smooth muscle cells) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت*

* P< ۰/۰۵

با رسم منحنی استاندارد بـرای ژن مرجـع (GAPDH) و ژن MMP-9، میزان بازده واکنش با استفاده از شیب منحنی استاندارد ۹۵ درصد محاسبه شد. نمودار حاصـل از منحنـی ذوب، تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر و عـدم جفـت شدن پرایمرها را نشان داد.

کاهش در مقدار پروتئین به دنبـال کـاهش بیـان ژن MMP-9 تحت تأثیر آدیپـونکتین در زمـان‌هـای ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Western blot نیز تأیید شد. با توجه به نیمـه کمی بودن روش Western blot، کاهش پـروتئین MMP-9 بعد از ۴۸ ساعت به دنبال کاهش بیان ژن مشاهده گردیـد که در شکل ۱ نشان داده شده است. از پروتئین بتا اکتین به عنوان شاهد استفاده شد.



شکل ۱. *نتایج Western blot مربوط به تأثیر آدیپونکتین بر مقدار پروتئین MMP-9 در رده سلولی VSMC (Vascular smooth muscle cells) در زمان‌های مختلف*

بحث

آترواسکلروز از بیماری‌هایی است که نه تنها هزینه‌های سنگینی را به جامعه تحمیل می‌کنـد بلکـه عامـل مـرگ بسیاری از افراد در جوامع مختلف است. لذا مطالعه بر روی عوامل کاهش دهنده خطر این بیماری اهمیت ویژه‌ای دارد. این مطالعه با هدف نقش آدیپونکتین به عنوان تعدیل کننده فرایندهای التهابی بر روی بیان ژن و مقدار پروتئین MMP-9 به عنوان یک محرک قـوی در پـاتوژنز التهـاب (۲۵) در آزمایشگاه طراحی گردید.

یافته‌های این مطالعه، کاهش وابسته به زمـان بیـان ژن MMP-9 را در حضور آدیپونکتین نشان داد.

همچنین ارتباط بین کاهش سطح آدیپونکتین در پلاسما با افزایش بیماری‌های قلبی عروقی نشـان داده شـده اسـت (۲۶). آدیپونکتین با خواص ضد التهـابی و از طریـق مهـار NF-κB باعث کاهش سطح CRP,IL-8 و پروتئین‌های چسبنده اتصالی در سلول‌های اپی‌تلیال می‌شود و تولیـد TNF-α را در ماکروفاژها تقلیل می‌دهد (۲۷). افزایش غلظت MMP-9 در التهاب و همچنین تأثیر آن بر مهـاجرت تکثیـر و مـرگ سلول‌های دیواره عـروق نشـان داده شـده اسـت (۲۸). از این‌رو، با توجه به خواص ضد التهابی آدیپونکتین و نقـش التهابی MMP-9 در کاهش بیـان ژن توسـط آدیپـونکتین نتایجی که در این مطالعه دیده شد، دور از انتظار نبوده است. با توجه به بررسی نتایج مربوط به غلظت پروتئین، کـاهش نسبی نشان داده شده در شکل بـه دلیـل کـاهش ترجمـه mRNA مربوط به MMP-9، ناشی از کاهش بیان ژن به دنبال تیمار با آدیپونکتین بوده است. افزایش پروتئین MMP-9 به مهار کننده این پروتئین که در بعضی مطالعات در بیمـاران قلبی ارتباط معکوس با سطح آدیپونکتین داشته اسـت (۲۹) تا حدی با یافته‌های این مطالعه همسو است.

آدیپونکتین باعث کاهش تبدیل ماکروفاژ به سلول‌های کفی (Foam cell) (۳۰)، کاهش در پرولیفراسیون سلول‌های عضلات صاف (۱۵) و کاهش ضخامت اینتیمـای جدیـد عروق می‌شود و کاهش تنگ شـدن عـروق را بـه دنبـال خواهد داشت (۱۶) که در نهایت به کاهش بیمـاری‌هـای قلبی عروقی منجر خواهد شد. نتایج مطالعه حاضر نیز دلالت بر این نکته دارد که آدیپونکتین با کاهش MMP-9 می‌تواند در کاهش خطر بیماری قلبی مؤثر باشد.

از آن جایی که فعالیت MMPs با مهار کننده‌های ویـژه (TIMPs یـا Tissue inhibitor of metalloproteinases) کنتـرل می‌شود و افزایش این مهار کننده‌ها تحت تأثیر آدیپونکتین در سلول‌های ماکروفاژی به اثبات رسیده است (۳۱)، ایـن

احتمال وجود دارد که در مطالعه حاضر قسمتی از کاهش پروتئین دیده شده مربوط به افزایش مهار کننده MMP9 باشد؛ ولی چون کاهش بیان ژن MMP-9 در این مطالعه دیده شده است، کاهش مقدار پروتئین در سلول‌های VSMC بیشتر مربوط به کاهش بیان ژن MMP-9 می‌شود. به عبارت دیگر، این تأثیر مستقیم و از طریق تغییر در بیان ژن MMP-9 انجام شده است و تغییرات غیر مستقیم از طریق مهار کننده‌ها در سلول‌های VSMC، برعکس آن چه در سلول‌های ماکروفاژی اتفاق می‌افتد، کمتر مطرح می‌شود.

پیشرفت ضایعات آترواسکلروز به غلظت MMPs و مهار کنندهای آن مربوط است. همچنین پایداری ضایعات آتروم با تغییرات غلظت MMPs و مهار کنندهای آن تغییر می‌کند (۳۲). بدیهی است که یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد آدیپونکتین با کاهش بیان ژن و مقدار پروتئین MMP-9 می‌تواند گسترش ضایعات را در آترواسکلروز محدود و و از پارگی آتروم نیز جلوگیری نماید.

در تعدادی از مطالعات در تأیید وابستگی بین افزایش سطح آدیپونکتین و کاهش خطر بیماری‌های قلبی- عروقی نتایج متضادی دیده شده است که البته ممکن است بتوان این نتایج متناقض را مربوط به اختلافاتی مثل جنس، نژاد و... در بین جمعیت‌های مورد مطالعه دانست (۳۵-۳۳). در راستای مطالعات بالینی انجام شده، بعضی مطالعات آزمایشگاهی نقش کلیدی برای آدیپونکتین در پیشرفت آترواسکلروز تعیین کردند، این در حالی است که یافته مطالعه حاضر و همچنین بسیاری مطالعات دیگر بر نقش محافظتی آدیپونکتین تکیه دارد (۱۲-۱۰).

مطالعه انجام شده بر روی مدل موشی که Apo-E آن غیرفعال (Knockout) شده بود، نشان داد تشکیل ضایعه آترواسکلروتیک با دریافت آدیپونکتین به واسطه آدنوویروس کاهش می‌یابد (۳۶). به علاوه، بررسی‌ها در موش‌های فوق، افزایش تشکیل ضایعات را در نئواینتیمال عروقی نشان داد (۳۷). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی این مدل موش که با رژیم غذایی آتروژنیک هم تغذیه شده بودند، انجام گرفت کاهش آدیپونکتین اتساع عروق وابسته به آندوتلیوم آسیب دیده را نشان داد (۳۸). تأثیرات ذکر شده بر روی ضایعات آتروم به دنبال تجویز یا حذف آدیپونکتین در این مطالعات، شاید به دلیل تغییراتی است که در ماتریکس خارج سلولی اتفاق افتاده و این تغییرات در ماتریکس خارج سلولی در مطالعه حاضر به صورت تغییرات در غلظت MMP-9 نشان داده شده است.

در یک نگاه کلی بر اساس یافته‌های این مطالعه، آدیپونکتین با کاهش بیان ژن و مقدار پروتئین MMP-9 تغییراتی در ماتریکس ایجاد می‌کند که می‌تواند باعث ثبات ضایعه آتروم شود. همچنین شانس پارگی (Rupture) آتروم را پایین آورده، باعث کاهش خطر و عوارض آترواسکلروز می‌گردد. امید است که این یافته در فهم پاتولوژی بیماری آترواسکلروز یا در درمان آن کمک کننده باشد.

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های این طرح توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأمین شده و در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در قالب پایان‌نامه کارشناس ارشد اجرا گردیده است که به این وسیله از آن معاونت و کلیه همکاران مراکز تحقیقاتی آن دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423): 801-9.
2. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 85-97.
3. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(10): 802-15.
4. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117(1): 175-84.
5. Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, et al. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem* 2011; 286(40): 34552-8.
6. Wei Z, Peterson JM, Lei X, Cebotaru L, Wolfgang MJ, Baldeviano GC, et al. C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *J Biol Chem* 2012; 287(13): 10301-15.
7. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1784-92.
8. Wang Y, Xu LY, Lam KS, Lu G, Cooper GJ, Xu A. Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics* 2006; 6(13): 3862-70.
9. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006; 29(6): 1357-62.
10. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 2008; 34(1): 12-8.
11. Basati G, Pourfarzam M, Movahedian A, Samsamshariat SZ, Sarrafzadegan N. Reduced plasma adiponectin levels relative to oxidized low density lipoprotein and nitric oxide in coronary artery disease patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(7): 1129-35.
12. Kishida K, Kim KK, Funahashi T, Matsuzawa Y, Kang HC, Shimomura I. Relationships between circulating adiponectin levels and fat distribution in obese subjects. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18(7): 592-5.
13. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Sumitsuji T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23: 85-9.
14. Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis. *Exp Gerontol* 2001; 36(7): 969-87.
15. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 2002; 105(24): 2893-8.

16. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002; 277(40): 37487-91.

17. Wang Y, Lam KS, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, et al. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem* 2005; 280(18): 18341-7.

18. Ding M, Xie Y, Wagner RJ, Jin Y, Carrao AC, Liu LS, et al. Adiponectin induces vascular smooth muscle cell differentiation via repression of mammalian target of rapamycin complex 1 and FoxO4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(6): 1403-10.

19. Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52(5): 410-28.

20. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 2002; 91(9): 852-9.

21. Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation* 2001; 104(16): 1878-80.

22. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827-39.

23. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Oie E, Dahl A, Michelsen A, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 2007; 115(8): 972-80.

24. Safshekan F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R, Hemmati A. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2012; 36(12): 1065-71.

25. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 2003; 92(8): 827-39.

26. Kim JY, Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. The Stimulation of CD147 Induces MMP-9 Expression through ERK and NF-?B in Macrophages: Implication for Atherosclerosis. *Immune Netw* 2009; 9(3): 90-7.

27. Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114(5): 361-74.

28. Ouchi N, Walsh K. A novel role for adiponectin in the regulation of inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28: 1219-21.

29. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3): 614-24.

30. Cheng M, Hashmi S, Mao X, Zeng QT. Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute

with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 2007; 165(2): 164-74.

35. Lawlor DA, Davey SG, Ebrahim S, Thompson C, Sattar N. Plasma adiponectin levels are associated with insulin resistance, but do not predict future risk of coronary heart disease in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10): 5677-83.

36. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* 2012; 94(10): 2137-42.

37. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 106(22): 2767-70.

38. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 25863-6.

coronary syndrome. *Can J Cardiol* 2008; 24(5): 385-90.

31. Furukawa K, Hori M, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Adiponectin down-regulates acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(3): 831-6.

32. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004; 109(17): 2046-9.

33. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, et al. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 100(5): 533-40.

34. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S, Langenberg C. Association of adiponectin

The Effect of Adiponectin on Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Vascular Smooth Muscle Cells

Maryam Saneipour, B.Sc.[1], Keyhan Ghatreh Samani, Ph.D.*[2], Esfandiar Heydarian, Ph.D.[3], Efat Farrokhi, M.Sc.[4]

1. M.Sc Student, Department of Biochemistry, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

3. Associate Professor, Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4. Ph.D. Student, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; E-mail: kgsamani@yahoo.com

(Received: 25 August 2013 Accepted: 25 Dec. 2013)

Abstract

Background & Aims: Atherosclerosis is a major cause of morbidity and mortality. Adiponectin reduces the risk of heart disease, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is involved in the formation and development of atherosclerotic plaque. The aim of this study was the investigation of the effect of adiponectin on MMP-9 gene expression. It seems this hormone can reduce the risk of atherosclerosis by MMP-9 gene expression reduction.

Methods: Human aorta smooth muscle cells were cultured in F12K media in appropriate environment and conditions, then, the cells were treated with 5 µg/ml adiponectin. After 24 and 48 hour, total RNA was extracted and corresponding cDNA was made.

After drawing standard curve and determining the efficiency of the reaction, MMP-9 gene expression was measured by the SYBR Green kit and real time PCR method. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was the reference gene. The amount of MMP-9 protein, compared to the β-actin protein as reference protein, was estimated with Western blot method.

Results: adiponectin did not cause a ch ange in gene expression of MMP-9 in 24 hours, but in 48 hours reduced gene expression (-1.1, and -5.5, respectively). As a result of MMP-9 gene expression reduction, protein also reduced after 48 hours compared to β-actin protein.

Conclusion: Through the reduction of MMP-9 protein and gene expression, adiponectin changes extra cellular matrix which may reduce the risk and complications of atherosclerosis

Keywords: Atherosclerosis, Adiponectin, Matrix metalloproteinase-9, Vascular smooth muscle cells

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(5): 384-393