Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 3, Aug. – Sep. 2016, Pages: 34-41

Original Article

Ginger Accelerates GLUT4 Translocation to the Cell Membrane of C2C12 Myotubes

Marjan Tajik kord, Fatemeh Poorrajab*, Javad Mohiti Ardekani, Manizheh Azari, Alireza Raeissi

Departement of Biochemistry, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran

Received: 17 Apr, 2014 Accepted: 8 Jun, 2014

Abstract

Backgrounds and Objectives: Diabetes type 2 is a metabolic disorder that affects many organs through chronic high blood levels of glucose. The GLUT4 translocation from cytosolic component to the cell membrane is the most important mechanism and strategy to compensate this situation. At the present study, we aimed to investigate the molecular mechanism of anti-diabetic and hypoglycemic effects of ginger, through evaluating the translocation of GLUT4 in C2C12 myotubes.

Material and Methods: In an experimental study, the C2C12 cells were treated with 50µgr/mL concentration of ethyl acetate ginger extract for 3 hours. Sub-cellular fractions were made by centrifugation from homogenized myotubes. After preparation of cytosolic and membrane fractions, the amount of GLUT-4 (an important glucose transporter) was determined using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS PAGE) electrophoresis, western blotting and chemiluminescent methods. Finally, gel documents software gene tools were used to analyze sub-cellular expression of the transporter.

Results: The expression of GLUT4 was considerably higher in the ginger-treated cells (112.2±2.41) compared to the control (the DMSO-treated cells) (98.62±3.92) (P value < 0.05). Also, the amount of GLUT4 in membrane fraction of cells treated with ginger extract (100±0) was higher compared to the DMSO-treated cells (78.46±5.84). The amount of GLUT4 in cytosolic fraction of cells treated with ginger extract (12.22±2.41) was lower compared to the control (the DMSO-treated cells) (20.15±2.56). These results show an enhanced translocation of GLUT4 from cytosolic fraction to the cell membrane fraction in the ginger-treatments.

Conclusion: One of the mechanisms and also the most important anti-diabetic effects of ginger would be to decrease insulin resistance increasing GLUT4 translocation to the cell membrane, which declines following diabetic complications.

Keywords: Ginger, Type 2 diabetes mellitus, GLUT4 protein, Myoblasts

*Corresponding author:
E-mail: mina_poorrajab@yahoo.com

Citation: Tajik kord M, Poorrajab F, Mohiti Ardekani J, Azari M, Raeissi A. Ginger Accelerates GLUT4 Translocation to the Cell Membrane of C2C12 Myotubes. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(3):34-41.

مقاله پژوهشی

افزایش انتقال ناقل غشایی گلوکز ایزوفرم ۴(GLUT4) تحت اثر عصاره زنجبیل در سلولهای تمایز یافتهC2C12

مرجان تاجیک کرد، فاطمه پوررجب*، جواد محیطی اردکانی، منیژه آذری، علیرضا رییسی

گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۲۸ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸

چکیده

زمینه و اهداف: دیابت نوع ۲ یک اختلال متابولیکی است که میلیونها نفر از آن و اثرات درازمدت آن رنج می برند. در ارتباط با متابولیسم گلوکز، سلولهای ماهیچه ای نقش بسزایی دارند و در سلولهای میوبلاست انتقال ناقل گلوکز (GLUT4) از بخش سیتوزولی به بخش غشایی (ترانس لوکاسیون) از اهمیت ویژه ای در جذب گلوکز پلاسما برخوردار است.

در این مطالعه اثر عصاره اتیل استات زنجبیل دارای خواص هایپوگلایسمیک و ضد دیابتی، بر ترانس لوکاسیون GLUT4 (ناقل مهم گلوکز) در سلولهای عضلانی C2C12 را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر از جمله مطالعات تجربی است. در این مطالعه ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتیل استات زنجبیل را بر سلولهای C2C12 اثر داده (به مدت ۳ ساعت) و پس از تهیه فراکشن های مجزای سیتوزولی و غشایی، میزان پروتئین GLUT4 را با روش الکتروفورز SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ و در نهایت با کمک نرم افزار ژل داکیومنت سنجش کردیم.

یافته ها: میزان بیان GLUT4 در نمونه های سلولی تیمارشده با عصاره زنجبیل بسیار بیشتر (۱۱۲/۲±۲/۴۱) از نمونه های کنترل (۹۸/۶۲±۳/۹۶) بود. همچنین انتقال GLUT4 در بخش غشایی در اثر تیمار با عصاره (۱۰۰±۰) افزایش قابل توجهی یافت که در مقایسه با سلولهای تیمار نشده (۷۸/۴۶±۵/۸۴) به نحو بارزی بالاتر بود. از طرفی میزان GLUT4 در نمونه سیتوزولی حاوی عصاره (۱۲/۲۲±۲/۴۱)، کمتر از نمونه کنترل (۲۰/۱۵±۲/۵۶) بود. این نتایج نشان از افزایش ترانسلوکاسیون GLUT4 از بخش سیتوزولی به بخش غشایی در حضور عصاره زنجبیل دارد.

نتیجه گیری: عصاره گیاه زنجبیل با افزایش بیان و نیزترانس لوکاسیون پروتئین GLUT4 در سلولهای میوبلاستی می‌تواند باعث کاهش میزان قند خون و عوارض ناشی از دیابت گردد.

کلید واژه ها: عصاره زنجبیل، دیابت نوع ۲، پروتئینGLUT4 ، سلول های میوبلاستی.

*ایمیل نویسنده رابط: mina_poorrajab@yahoo.com

مقدمه

دیابت یک اختلال متابولیکی متداول است که کنترل و مدیریت این بیماری یک چالش محسوب می شود (۴-۱). عوامل مختلفی در بروز این بیماری دخالت دارد و بیشترین علامت آن افزایش گلوکز خون تشنگی و تکرر ادرار است (۵). افراد مبتلا به دیابت در دراز مدت با مشکلات رتینوپاتی، کاتاراکت، نروپاتی، نفروپاتی، آترواسکلروزیس و تاخیر در بهبود زخم مواجه می‌شوند (۶). در این بیماری در بیشتر موارد هم تولید انسولین و هم عملکرد آن دچار نقص شده است؛ بنابراین گلوکز به داخل بافتها و ماهیچه ها وارد نمی شود و در خون تجمع می یابد و سبب آسیب به قسمتهای مختلف بدن می شود (۱).

در بافت ماهیچه ای انسولین مهمترین عامل در برداشت گلوکز است (۷،۸) و این مکانیسم به کمک مولکول ناقل گلوکز (GLUT4) انجام می شود (۱۰،۹). تحت اثر انسولین این پروتئین (GLUT4) از بخش سیتوزولی به بخش غشایی جهت برداشت گلوکز انتقال می یابد (ترانس لوکاسیون)(۱۴-۱۱).

سالهاست که اثرات دارویی گیاهان در درمان بسیاری از بیماری ها مطرح است. به عنوان مثال چای سبز که خطر بیماری قلبی عروقی را کاهش می دهد و به عنوان یک آنتی اکسیدان معرفی شده است که در پیشگیری از بسیاری از سرطانها می‌تواند موثر باشد؛ شنبلیله که هم برگ و هم دانه های آن برای درمان دیابت به طریق سنتی به کار می رود. دارچین که ریسک فاکتورهای مربوط به دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی و نیز HbA1C را کاهش می دهد (۱۶-۱۵-۴).

قبل از اثر درمانی انسولین، دیابت بوسیله گیاهان سنتی درمان می شده است و در کشورهای جنوب آسیا گیاهان داروئی زیادی که البته خوراکی هم هستند برای درمان دیابت استفاده می شده است (۱۶،۱۷). برای بعضی از بیماران که نمی‌توانند عوارض جانبی برخی داروها را تحمل کنند و یا استطاعت مالی تهیه داروهای گران را ندارند نیاز به این داروهای سنتی افزایش یافته است (۴). بسیاری از این گیاهان دارویی اثرات ضد دیابتی خود را از طریق افزایش انتقال GLUT4 به بخش غشایی (ترانس لوکاسیون) انجام می دهند (۱۸).

زنجبیل ریزوم گیاه Zingiber Officinale Roscoe که یک است، گیاه علفی همه ساله است (۶،۱۹). این گیاه دارای برگهای سبز روشن، باریک و چمن مانند است و گلهای سبز مایل به زرد با رگه های بنفش دارد (۵). این گیاه هم به عنوان ادویه در آشپزی و هم گیاه داروئی با اثرات درمانی کاربرد دارد (۶،۱۹). زنجبیل دارای چندین جزء فعال است که همگی ترکیبات فنولی هستند، جزء عمده آن که طعم تند زنجبیل بیشتر ناشی از آن است ۶ gingerol است. جزء دیگر shogaols است که از دهیدراتاسیون gingerol حاصل می شود (۵،۱۹،۲۰). اثرات داروئی مختلفی برای زنجبیل اشاره می شود از جمله برای درمان آرتریت، دردهای ماهیچه‌ای، گلو درد، روماتیسم، رگ به رگ شدن، گرفتگی، سوء هاضمه، فشار خون بالا و ... (۵،۶،۲۰). همچنین در تحقیقات مختلف اشاره می شود که زنجبیل اثرات هایپوگلایسمی دارد و برای درمان دیابت موثر است (۲۱-۱۹).

با توجه به اهمیت بیماری دیابت و با توجه به نقش هایپوگلایسمی زنجبیل و اثراتی که در کنترل بیماری دیابت دارد که در مقالات مختلف اشاره شده است، در این تحقیق ما با توجه به اهمیت GLUT4 در برداشت گلوکز و با توجه به اهمیت بافت ماهیچه در برداشت گلوکز، اثر زنجبیل را بر ترانس لوکاسیون پروتئین GLUT4 در رده سلولی C2C12 بررسی کردیم.

مواد و روش ها

محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle) و سرم جنین گاوی (FBS)، سرم اسب و تریپسین از شرکت Gibco BRL تهیه شد. دی اتیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت Sigma تهیه شد. آنتی بادی اولیه Glut4(mouse monoclonal IgG) و همینطور آنتی بادی ثانویه (goat anti mouse IgG-HRP) از شرکت santacruz تهیه شد. پنی سیلین، استرپتومایسین از شرکت BiochROMA تهیه شد. کاغذ نیتروسلولز از شرکت Millipor و کیت ECL وسترن بلاتینگ از شرکت GE- Healthcare Amersham. تهیه شد.

جهت تهیه عصاره گیاه زنجبیل ابتدا زنجبیل تازه از گونه Zingiber Officinale Roscoe را به میزان ۲۰۰ گرم تهیه و خشک کرده و با حداکثر رطوبت ۱۰٪ بوسیله آسیاب به صورت پودر در می-آوریم. سپس پودر حاصل از ۲۰۰ گرم زنجبیل را در ۰/۵ لیتر اتیل استات حل می کنیم و آن را بر روی اجاق ۴۵ درجه قرار می دهیم ۲روز و هر روز ۳ بار محلول را هم می زنیم و در روز چهارم محلول رویی را در ۳ مرحله با صافی های مختلف تا ۰/۲ میکرون صاف می کنیم، محلول صاف شده را با استفاده از دستگاه خشک کن در خلاء (vacuum evaporator) در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد آبگیری می کنیم. عصاره بر جای مانده را بوسیله دستگاه فریز درایر کاملا خشک و از پودر حاصل برای استفاده در محیط کشت stock تهیه می کنیم. برای این منظور پودر حاصل را در DMSO حل می کنیم (۶).

سلولها از مرکز ناباروری یزد تهیه شدند و پس از شمارش با تریپان بلو و مشاهده با میکروسکوپ اینورت، تعداد $۸-۱۰\times۱۰^{۴}$ سلول از سوسپانسیون سلولی در فلاسکهای ۵۰ میلی لیتری مخصوص کشت سلول، کشت داده شد و در حضور محیط کشت DMEM و FBS (۱۲٪)، در شرایط استریل کشت و در انکوباتور استریل با دمای ۳۷ °C، رطوبت ۹۵ درصد و Co2 ۵ درصد نگهداری شد. بعد از رشد سلولها و اشغال ۸۰ درصد از کف فلاسک، سلولها در این مرحله در فلاسکهای جداگانه برای تمایز به میوتیوبها در محیط حاوی DMEM و ۲٪ سرم اسب و آنتی بیوتیک کشت داده شدند. بعد از گذشت ۶ تا ۸ روز و بررسی میوتیوبهای چندهسته ای، مقدار µgr ۵۰ در میلی لیتر عصاره اتیل استات اثر داده شد.

غلظتهای مختلف ۱۰-۵۰-۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و نیز DMSO به عنوان کنترل برای تیمار سلولها در نظر گرفته شد. ابتدا سمیت عصاره برروی سلولها از طریق روش رنگ آمیزی با رنگ حیاتی تریپان بلو بررسی شد و سلولها تحت تاثیر غلظتهایی از عصاره قرار گرفتند که اثر سمی برای غلظتهای اشاره شده بدست نیامد. سپس با روش MTT assay میزان رشد سلولها و غلظتهای غیرسمی عصاره اتیل استات برای سلولها تعیین شد. بدین طریق که µl ۱۰۰ از محلول MTT (۵ mg/ml MTT در PBS) به هر چاهک اضافه شد و پس از گذشت ۳ ساعت در دمای ۳۷°c ، مایع رویی برداشته شد، کریستال فورمازان تشکیل شده دردرون سلولها با کمک DMSO حل و از سلول استخراج شد و جذب آن در ۵۴۰ nm بوسیله اسپکتروفوتومتر خوانده شد. با توجه به نتایج MTT و نیز بررسی مطالعات پیشین،مقدارml /۵۰µgr برای اثر دادن عصاره انتخاب شد(۱۹،۲۲).

برای تهیه هموژن سلولی سلولها به مدت ۳ ساعت تحت اثر عصاره قرار داده شدند سپس با Scraper جدا شدند و ۳ مرحله با PBS شستشو داده شدند (افزودن بافر و انجام سانتریفوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه) و سپس رسوب سلولی بدست آمده در بافر مخصوص هموژنیزه سلول (بافر HES حاوی ماده HEPES و ترکیبات نمکی و سوکروز: ۲۲۵ میلی مول (۷۷/۰۱ گرم) سوکروز، ۴ میلی مول (۱/۴ گرم) Na2EDTA، ۲۰ میلی مول (۴/۷۷ گرم) HEPES) قرار داده شد و در ۸۰- درجه منجمد شد سپس از انجماد خارج کردیم و وقتی ذوب شد ورتکس کرده تا غشا شکسته شد.

برای جداکردن فراکشن های غشایی و سیتوزولی، هموژن سلولی به دست آمده از مرحله قبل را طی چند مرحله تحت اولتر سانتریفوژ قرار دادیم.

مرحله اول: سانتریوفوژ با نیروی **g**۱۹۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه که محلول رویی حاصل برای جزء سیتوپلاسمی و رسوب آن برای جزء غشایی استفاده شد.

مرحله دوم: محلول رویی حاصل از مرحله قبل با نیروی **g**۱۰۰۰۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه سانتریوفوژ شد و رسوب حاصل از این مرحله برای انجام مراحل بعدی در بافر فسفات نگهداری و فریز شد.

مرحله سوم: رسوب حاصل از مرحله اول جهت تهیه بخش غشایی استفاده شد به این ترتیب که در بافر پرچگال سوکروز حل شده و با نیروی **g**۱۰۰۰۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شد که از جزء سه حاصل، جزء میانی حاوی جزء غشایی است.

مرحله چهارم: در این مرحله بخش میانی مرحله قبل را با سرنگ برداشته و در بافر HES ریخته و با نیروی **g**۴۰۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریوفوژ نمودیم آنچه در انتها به دست آمد شامل بخش غشای سیتوپلاسمی است که در PBS فریز کردیم (۷).

به عنوان کنترلی برای سنجش میزان بیان پروتئین GLUT4 در بخش های سیتوزولی و غشایی توسط SDS-PAGE، ابتدا غلظت پروتئین تام موجود در فراکشن های سلولی بوسیله روش برادفورد سنجش شد.

مقدار ۷۰µgr از هر فراکشن سلولی از نمونه های مختلف در ژل تهیه شده الکتروفورز PAGE-SDS لود شد و پس از پایان مرحله الکتروفورز به کاغذ نیتروسلولز طی ۲۴ ساعت منتقل شد، سپس دوباره کاغذ در محلول انسدادگر (۲٪ پودر بلوکه کننده در PBS) ۲۴ ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد کاغذ ۳ مرتبه بوسیله بافر حاوی توین ۲۰ شستشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در آنتی بادی مونوکلونال اولیه (mouse GLUT4 monoclonal IgG) با رقت ۱:۴۰۰ قرار داده شد و پس از شستشوی مجدد به مدت ۳ ساعت در معرض آنتی بادی ثانویه (goat anti mouse IgG-HRP) با رقت ۱:۱۵۰۰ قرار داده شد. پس از شستشو، طبق دستور کیت ECL و بوسیله محلولهای کمی لومینسانس، باندها ظاهر شدند و با دستگاه Gel document مقادیر نسبی GLUT4 سنجش و نمودارهای مربوطه رسم و بررسی شدند (تصویر شماره ۱).

مراحل آزمون ۳ مرتبه تکرار شده و طی این مرحله، باندهای به دست آمده از مراحل قبل به طور جداگانه در نرم افزار مخصوص دستگاه سنجش شده و آزمون t-test و One-way Anova بر روی نتایج عددی به دست آمده انجام شد.

یافته ها

تست حیاتی تریپان بلو و همچنین میزان سایتوتوکسیسیتی عصاره در غلظتهای ۱۰-۵۰-۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد و سمیتی در این غلظتها برای سلولها به دست نیامد (درصد بقا بیشتر از ۹۸٪ بود). سلولها تا مرحله تمایز، بهم پیوستن میوبلاستها و تشکیل میوتیوب‌های چند هسته‌ای، کشت داده شدند و سپس مورد تیمار با عصاره اتیل استات زنجبیل قرار گرفتند.

اما بر طبق مطالعات قبلی، مقدار ۵۰µgr/ml عصاره اتیل استات زنجبیل برای اثر دادن بر سلولها، انتخاب شد و سلولها ۳ ساعت تحت اثر عصاره قرار گرفتند (۲). در مرحله تمایز، نمونه‌های کشت سلولی به دوگروه تقسیم شدند؛ گروه ۱: سلولهای کشت داده شده بدون عصاره و تیمار شده با حلال DMSO (به عنوان کنترل). گروه ۲: سلولهای کشت داده شده با ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیترعصاره اتیل استات زنجبیل به مدت ۳ ساعت. بعد از کشت، هموژن سلولی تهیه شد و سپس فراکشن ها از هم جدا شدند. به روش برادفورد و به منظور لودکردن مقادیر یکسان پروتئین در روش الکتروفورز، میزان پروتئین تام هر فراکشن سنجش شد. با روش SDSPAGE و به دنبال آن وسترن بلاتینگ باندها ظاهر و سنجش شدند. مقادیر GLUT4 در نمونه های مختلف بوسیله نرم افزار دستگاه Gel document آنالیز شده و سطح زیر نمودار پروتئین GLUT4 مشخص گردید و مقدار کمی پروتئین در نمونه ها به طور نسبی تعیین شد. میزان نسبی پروتئین GLUT4 در نمونه حاوی عصاره (۱۱۲/۲±۲/۴۱) بیشتر از نمونه کنترل (۹۸/۶۲±۳/۹۶) بود. (میزان نسبی، بر اساس مقایسه با نمونه دارای بیشترین سطح زیر نمودار محاسبه شد، که در هر ۳ مرحله انجام آزمایش سطح زیر نمودار حاصل از آنالیز نرم افزار Gene tools برای نمونه ۲ بیشترین مقدار را نشان داد که در محاسبه بر اساس کوانتیتی مقدار نسبی پروتئین آن ۱۰۰ در نظر گرفته شد و بقیه بر اساس آن به طور نسبی سنجش شد).

تعیین اثر عصاره بر میزان انتقال GLUT4 به سطح غشا در سلولهای میوبلاستی تمایز یافته C2C12

بعد از آماده سازی فراکشن های غشایی (نمونه های ۲ و ۳) و سیتوزولی (نمونه های ۱ و ۴)، میزان کمی GLUT4 در نمونه‌های غشایی و سیتوزولی سنجیده شد. توسط نرم افزار Gene Tools سطح زیر نمودار پروتئین GLUT4 بصورت عددی مشخص گردید. در نمونه ۱یعنی فراکشن سیتوزولی سلولهای تیمار شده با عصاره زنجبیل سطح زیر نمودار پروتئین GLUT4 (۳۳۸۹۸۱۸/۷۷±۲۰۷۰۲/۶۰)، نمونه ۲ یعنی فراکشن غشایی سلولهای تیمار شده با عصاره زنجبیل سطح زیر نمودار (۳۶۶۸۱۵۰۵۷/۴±۱۵۸۷۴۷۰۶/۹۳)، نمونه ۳ یعنی فراکشن غشایی سلولهای تیمار شده با حلال DMSO (فراکشن غشایی کنترل)

سطح زیر نمودار(۱۸۶۲۵۱۲۷۵/۱±۳۳۷۴۱۹۶/۱۶)، نمونه ۴ یعنی فراکشن سیتوزولی سلولهای تیمار شده با حلال DMSO (فراکشن سیتوزولی کنترل) سطح زیر نمودار (۱۲۱۸۵۷۶۰/۴۴±۲۹۷۰۶۷/۷۴) به دست آمد.

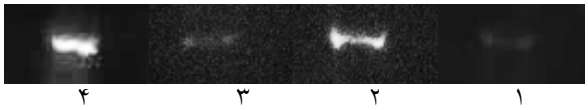
سپس مقدار کمی پروتئین در نمونه ها توسط نرم افزار Gene Tools به طور نسبی تعیین شد. بدین ترتیب مقادیر پروتئین GLUT4 در نمونه‌های بدست آمده از فراکشنهای غشایی و سیتوزولی سنجیده و با هم مقایسه شدند. (توجه: در مرحله آنالیز، مقدار کمی پروتئین در نمونه با بیشترین سطح زیر نمودار ۱۰۰ در نظر گرفته شد و مقادیر کمی سایر نمونه ها بر مبنای آن سنجش شد) (مقدار نسبی GLUT4 در نمونه غشایی تیمار شده با عصاره ۰±۱۰۰ ، نمونه سیتوزولی تیمار شده با عصاره ۲/۴۱±۱۲/۲۲ ، نمونه غشایی کنترل ۵/۸۴±۷۸/۴۶، نمونه سیتوزولی کنترل ۲/۵۶±۲۰/۱۵)

میزان نسبی پروتئین GLUT4 در نمونه غشایی که دارای عصاره بود در مقایسه با نمونه غشایی بدون عصاره (کنترل فراکشن غشایی) به طور قابل توجهی بیشتر بود (p< ۰/۰۵). (مقدار نسبی GLUT4 در نمونه غشایی تیمار شده با عصاره ۰± ۱۰۰و در نمونه غشایی کنترل ۵/۸۴±۷۸/۴۶) (نمودار ۱).

میزان نسبی پروتئین GLUT4 در نمونه سیتوزولی حاوی عصاره در مقایسه با نمونه سیتوزولی بدون عصاره (کنترل فراکشن سیتوزولی) کمتر بود (p< ۰/۰۵). (مقدار نسبی GLUT4 در نمونه سیتوزولی تیمار شده با عصاره ۲/۴۱±۱۲/۲۲ و در نمونه سیتوزولی کنترل ۲/۵۶±۲۰/۱۵) (نمودار ۱).

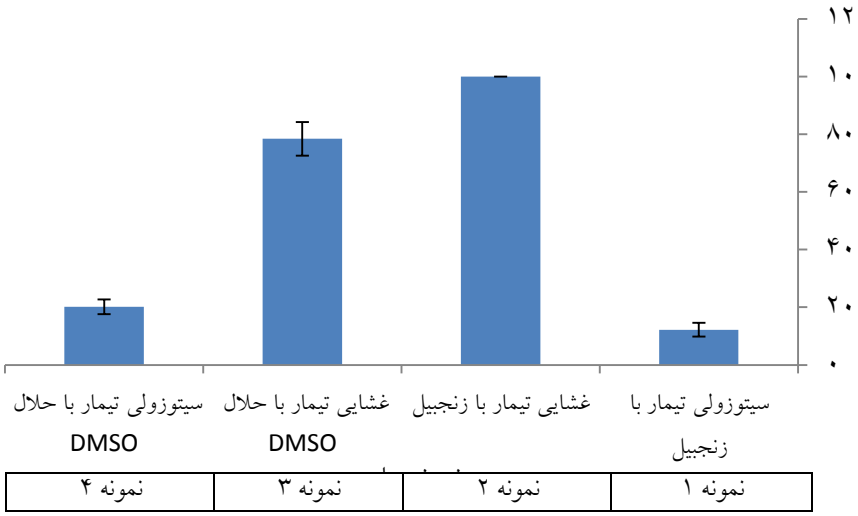
میزان نسبی پروتئین GLUT4 در نمونه غشایی حاوی عصاره در مقایسه با نمونه سیتوزولی حاوی عصاره به میزان قابل توجهی بالاتر بود (p< ۰/۰۵). (مقدار نسبی GLUT4 در نمونه غشایی تیمار شده با عصاره ۰±۱۰۰ و در نمونه سیتوزولی تیمار شده با عصاره ۲/۴۱±۱۲/۲۲) (نمودار ۱).

میزان نسبی پروتئین GLUT4 در نمونه غشایی بدون عصاره در مقایسه با نمونه سیتوزولی بدون عصاره بالاتر بود (p< ۰/۰۵). (نمونه غشایی کنترل ۵/۸۴±۷۸/۴۶، نمونه سیتوزولی کنترل ۲/۵۶±۲۰/۱۵) (نمودار ۱)



تصویر ۱: باندهای GLUT4 ظاهر شده بوسیله روش کمی لومینسانس ، به ترتیب از سمت راست به چپ ۱ تا ۴.

نمونه ۱: فراکشن سیتوزولی سلولهای تیمار شده با عصاره زنجبیل
نمونه ۲: فراکشن غشایی سلولهای تیمار شده با عصاره زنجبیل
نمونه ۳: فراکشن غشایی سلولهای تیمار شده با حلال DMSO
نمونه ۴: فراکشن سیتوزولی سلولهای تیمار شده با حلال DMSO



نمودار ۱: مقایسه میزان نسبی پروتئین GLUT 4 در نمونه های ۱ تا ۴: همانگونه که مشخص است میزان کمی GLUT4 در نمونه غشایی سلولهای تیمار شده با زنجبیل (نمونه ۲=۰±۱۰۰) بطور معنی داری بیشتر از نمونه غشایی سلولهای تیمار شده با DMSO (نمونه ۳= ۵/۸۴±۷۸/۴۶) می باشد (p< ۰/۰۵). میزان کمی GLUT4 در نمونه سیتوزولی سلولهای تیمار شده با زنجبیل (نمونه ۱=۲/۴۱±۱۲/۲۲) بطور معنی داری کمتر از نمونه سیتوزولی سلولهای تیمار شده با DMSO (نمونه ۴= ۲/۵۶±۲۰/۱۵) می باشد (p< ۰/۰۵). و نیز میزان نسبی GLUT 4 در جزء غشایی هر یک از نمونه های سلولی تیمار شده با زنجبیل و نیز تیمار شده با حلال DMSO، به طور معنی داری از جزء سیتوزولی مربوطه بیشتر است (p< ۰/۰۵).

بحث

دیابت یک اختلال متابولیکی متداول است که میلیونها نفر را در سراسر دنیا تحت تاثیر قرار داده است (۱). در این بیماری توانایی بدن برای انتقال گلوکز به داخل بافتها بویژه بافت ماهیچه دچار اختلال می گردد (۱). اهمیت میوتیوبها از این نظر قابل توجه است که بیشتر از ۵۰٪ حجم بدن را اختصاص داده و بیشترین مصرف کننده و تاثیر گذار بر متابولیسم و جذب گلوکز پلاسما در بدن می باشند. تجمع گلوکز در خون سبب آسیب به قسمتهای مختلف بدن می شود. در بافت ماهیچه‌ای انسولین مهمترین عامل در برداشت گلوکز است (۴،۵) و این مکانیسم به کمک مولکول ناقل گلوکز (GLUT4) انجام می شود (۹،۱۰). تحت اثر انسولین این پروتیین (GLUT4) از بخش سیتوزولی به بخش غشایی جهت برداشت گلوکز انتقال می یابد (ترانس لوکاسیون) (۱۱).

امروزه مطالعات زیادی در زمینه اثرات ضد دیابتی گیاهان با ترکیبات فنولی انجام می شود. زیرا که تاکید بر روی استفاده از عصاره های گیاهی با پایه طبیعی می باشد. من جمله در مطالعات متعدد به نقش ضد دیابتی و هایپوگلایسمیک ریزوم زنجبیل اشاره شده است. از طرفی مکانیسم تاثیر این عصاره‌ها و نیز تاثیر آنها بر روی بیان و انتقال GLUT4، بسیار مورد توجه است (۵،۶،۱۷،۱۹).

Rani و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که زنجبیل می تواند برداشت گلوکز را در سلولهای L6 افزایش دهد و می‌تواند به عنوان یک ترکیب خوراکی طبیعی با اثرات چندگانه مصرف شود (۶).

Rani و همکاران در تحقیق دیگری اشاره کردند که با افزایش غلظت‌های عصاره زنجبیل در محیط c2c12، اثرات مهارکنندگی زنجبیل بر آنزیم α گلوکوزیداز افزایش می یابد و با توجه به نقش این انزیم در دیابت، نشان دادند که زنجبیل اثرات ضد دیابتی دارد (۱۹).

Kadur و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که عصاره های متانول و اتیل استات زنجبیل چاقی موشها را کاهش می‌دهد و سطح گلوکز را پایین می‌آورد وی پیشنهاد کرد که زنجبیل مقاومت به انسولین را در این حیوان بهبود می بخشد (۲۰).

AL-Amin و همکاران مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ جهت بررسی اثرات ضددیابتی زنجبیل انجام دادند و نتیجه گرفتند که زنجبیل، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید سرم موشهای دیابتی را کاهش می‌دهد (۵).

Ahmadipour و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای روی محیط c2c12 انجام دادند و کورکومین (ترکیب فنولی) را بر سلولها اثر دادند و دیدند که کورکومین موجب افزایش GLUT4 در محیط c2c12 می شود(۲۳).

Kang و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی اثر سینرژیسم کورکومین (کورکومین مانند زنجبیل ساختار فنولی دارد) و انسولین بر متابولیسم گلوکز در سلولهای موشی (در محیط c2c12) کار کردند و اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی دیابتی کورکومین را بررسی کردند و بعد از بررسی های فسفریلاسیون AMPK و Acc و همچنین GLUT4 در سیتوزول و غشا به این نتیجه رسیدند که درمان با کورکومین به طور موثری برداشت گلوکز و فسفریلاسیون AMPK و Acc را تحریک می کند و نشان دادند که کورکومین فعالسازی AMPK و برداشت گلوکز را از طریق افزایش GLUT4 در سلولهای ماهیچه ای افزایش می دهد و به عنوان یک عامل درمانی ضد دیابت است (۸).

با توجه به این مطالعات و نیز اثر ضد دیابتی زنجبیل، در این مطالعه هدف بررسی تاثیرعصاره ریزوم زنجبیل بر روی بیان و انتقال پروتئین GLUT4، در رده سلولی C2C12 می باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتیل استات زنجبیل به طور قابل ملاحظه‌ای میزان بیان پروتئین GLUT4 را در سلولهای میوبلاستی افزایش می‌دهد. از طرفی در نمونه های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه های فاقد عصاره میزان ترانس لوکاسیون پروتئین GLUT4 به سطح غشایی، بسیار بالاتر از نمونه-های تیمار نشده سلولهای C2C12 بود.

نتیجه گیری

ریزوم زنجبیل حاوی ترکیبات فنولی / پلی فنولی با اثرات دارویی مفید، اثر ضد دیابتی خود را با افزایش میزان بیان GLUT4 در میوبلاستها و نیز افزایش میزان حضور آن در سطح سلولها می-گذارد. احتمالا زنجبیل می‌تواند به عنوان یک دارو با اثرات ضد دیابتی، مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همه عزیزانی که در به انجام رسیدن این پروژه تحقیقاتی بنده را یاری نمودند سپاسگزاری می نمایم. از دانشگاه علوم پزشکی یزد جهت پشتیبانی مالی این طرح تحقیقاتی تشکر می نمایم. از جناب آقای دکتر بمانعلی جلالی دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی یزد، جناب آقای دکتر جواد زواررضا استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی یزد، جناب آقای دکتر محمد ابراهیم رضوانی استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی یزد، سرکار خانم فرنگیس غلامی و جناب آقای شهاب الدین اسدی، کارشناسان ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی یزد، تشکر و قدردانی می نمایم.

References

1. Traore SF, Bui QA, Ruan KH. Type-II Diabetes and Herbal Medicine. *AJIM* 2012; **1**(2): 2-13.
2. Harbilas DHD, Martineau LCMLC, Harris CSHCS, Adeyiwola DCAASDCA, Saleem ASA, Lambert JLJ, et.al. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can Physiol Pharm* 2009; **87**(6): 479-492.
3. Zhang M, Chen L. Berberine in type 2 diabetes therapy: a new perspective for an old antidiarrheal drug? *APSB* 2012; **2**(4): 379-386.
4. Xie W, Zhao Y, Zhang Y. Traditional chinese medicines in treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. *Evid-Based Compl Alt* 2011.
5. Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (Zingiber officinale) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brit J Nutr* 2006; **96**(4): 660-666.
6. Rani MP, Krishna MS, Padmakumari KP, Raghu KG, Sundaresan A. Zingiber officinale extract exhibits antidiabetic potential via modulating glucose uptake, protein glycation and inhibiting adipocyte differentiation: an in vitro study. *J Sci Food Agr* 2012**;** **92.9**(2012): 1948-1955.
7. 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): E1149-1156.
8. 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): 222-229.
9. 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): 213-220.
10. 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): 641-658.
11. 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): 1277-1294.
12. 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 Cardiovas* 2011; **21**(7): 526-533.
13. Kim T, Davis J, Zhang AJ, He X, Mathews ST. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **388**(2): 377-382.
14. Thong FSL, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology* 2005; **20**(4): 271-284.
15. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hébrard S, Amouyal C, Mounier R, et.al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 2009; **14**: 33-80.
16. Cheng Z, Pang T, Gu M, Gao AH, Xie CM, Li JY, et.al. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Bba-Gen Subjects* 2006; **1760**(11): 1682-1689.
17. Noipha K, Ratanachaiyavong S, Ninla-Aesong P. Enhancement of glucose transport by selected plant foods in muscle cell line L6. *Diabetes Res Clin Pr* 2010; **89**(2): e22-e26.
18. Hui H, Tang G, Go VL. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chin Med* 2009; **4**: 11-18.
19. Priya Rani M, Padmakumari K, Sankarikutty B, Lijo Cherian O, Nisha V, Raghu K. Inhibitory potential of ginger extracts against enzymes linked to type 2 diabetes, inflammation and induced oxidative stress. *Int J Food Sci Nutr* 2011; **62**(02): 106-110.
20. Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (< i> Zingiber officinale</i> Roscoe): A review of recent research. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**(2): 409-420.
21. Puengphian C, Sirichote A. (6)-gingerol content and bioactive properties of ginger (Zingiber officinale

Roscoe) extracts from supercritical CO2 extraction. *AJOFI* 2008, **1**(1): 29-36.

22. Kang C, Kim E. Synergistic effect of curcuma and insulin on muscle cell glucose metabolism. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**(8): 2366-2373.

23. Ahmadipour F, Vakili T, Absalan A, Mohiti-Ardakani J, Hadinedoushan H, Khalili M, et.al. C2C12 Cell Line is a Good Model to Explore the Effects of Herbal Extracts on GLUT4 Expression and Translocation. *IJDO* 2012; **(4)**4: 143-151.