ارتباط بیان ژن‌های گیرنده هسته‌ای در سلول‌های خون محیطی با میزان تراکم استخوان در افراد چاق

خدیجه میرزایی[۲،۱]، هستی انصار[۱]، آرش حسین‌نژاد[۱*]، ژیلا مقبولی[۱]، مهتاب خسروفر[۱]، سودابه اعلی‌تاب[۱]، اعظم نجم‌افشار[۱]

چکیده

مقدمه: یافته‌های موجود در مورد ارتباط بین چاقی و تراکم توده استخوان (BMD) هنوز ضد و نقیض هستند. از آنجایی که در نقش گیرنده فعال تکثیر پراکسیزوم γ (PPAR γ) در فرایندهای آدیپوژنز و استئوژنز مسیرهای مشترک زیادی دیده شده است، در این تحقیق میزان بیان ژن PPARγ و سطوح سیتوکین‌های مختلف در افراد چاق استئوپنیک و غیر استئوپنیک اندازه‌گیری شدند. همچنین تراکم توده استخوان و میزان سیتوکین‌ها در افراد با مقادیر متفاوت بیان ژن PPARγ نیز مقایسه گردید.

روش‌ها: در مجموع ۲۶۵ نفر در این مطالعه مورد شاهد شرکت کردند. در تمام افراد BMD در نواحی مهره‌های کمری و لگن ارزیابی شده و اساس، شرکت کنندگان به دو گروه استئوپنیک و غیر استئوپنیک تقسیم شدند.

یافته‌ها: از این ۲۶۵ نفر، ۷۷ (۲۹/۰۵٪) نفر مبتلا به استئوپنی بوده و ۱۸۸ (۹۵/۷۰٪) نفر در گروه غیر استئوپنیک قرار گرفتند. غلظت بالاتری از کراس لپس و اینترلوکین ۶ و بالعکس توده بدون چربی کمتری در گروه استئوپنیک نسبت به گروه غیر استئوپنیک مشاهده شد. همچنین بیان ژن PPARγ به طور معنی‌داری در این گروه در مقایسه با گروه غیر استئوپنیک بیشتر بود. به دنبال آن شرکت کنندگان براساس بیان نسبی ژن به دو گروه طبقه‌بندی شدند: افراد با بیان ژن پایین (≤۷۵٪) و افراد با بیان ژن بالا (>۷۵٪). در گروه با بیان ژن PPARγ بالا میزان درصد چربی بدنی، تری‌گلیسرید، LDL، HDL و کلسترول تام بیشتر بود. علاوه بر این در گروه مذکور غلظت اینترلوکین ۱۰ و ۶، TNF α بالاتر گزارش شد. مقادیر کم BMD، T-score و score Z- در گروه بیان ژن بالا، معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کنند که بیان زیاد ژن PPARγ در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) افراد چاق، می‌تواند به عنوان یک شمشیر دو لبه عمل کند به طوری که از یک طرف التهاب را مهار و از طرف دیگر کاهش تراکم استخوان را تحریک کند. البته تعیین نقش دقیق PPARγ در استئوپنی از طریق تاثیر بر تحلیل استخوان در افراد چاق، نیازمند مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: تراکم توده استخوان، چاقی، بیان ژن PPARγ، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۸۹/۱۲/۰۴ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۰۳/۲۰** **تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۴/۱۸**

مقدمه

استئوپروز یک بیماری مزمن بوده که با تراکم پایین استخوان و نقایص ساختاری در اسکلت بدن مشخص می‌گردد و می‌تواند سبب افزایش شکنندگی و احتمال شکستگی در استخوان‌ها شود [۲،۱]. اگرچه به طور کلی اعتقاد بر این است که استئوپروز و چاقی دو مشکل جداگانه در سلامت فرد به شمار می‌روند [۳]، اما در دهه‌های اخیر، شواهد اصل دیگری را نشان داده‌اند [۴]. در چندین مطالعه ارتباط مثبتی بین وزن و کاهش تراکم استخوان به ثبت رسیده است [۵]. همچنین علی‌رغم ضد و نقیض بودن یافته‌ها، پیشنهاد شده که چربی بدنی با دستیابی به حداکثر توده استخوانی و چگالی استخوان همبستگی منفی دارد[۶]. مطالعات اخیر نیز ارتباط منفی بین چاقی و کیفیت و تراکم استخوان را نشان داده‌اند [۷]. از طرف دیگر تغییرات خودبخودی و همزمان در تفکیک سلول‌های چربی و استئوبلاست در مدل حیوانی چاق با رژیم خاص ثابت شده است [۸]. به علاوه داده‌های تجربی مشخص کرده‌اند که آدیپوژنز و استئوژنز، فاکتورهای ژنتیکی مشابه و مسیرهای سیگنالینگ مشترک بسیاری دارند از قبیل: گیرنده ویتامین D، PPAR γ، فاکتور رشد مبدل و مسیرهای Wnt [۳،۹،۱۰].

گیرنده فعال تکثیر کننده پراکسیزوم (PPAR)، یک مجموعه از فاکتورهای ترجمه هستند که به عنوان اعضای کوچکی از یک خانواده بزرگتر گیرنده‌های هسته‌ای در نظر گرفته می‌شوند. این مجموعه تعداد زیادی از ژن‌ها را از طریق فعال‌سازی و یا سرکوب رونویسی وابسته به لیگاند تنظیم می‌کنند و به عبارت دیگر در چندین مسیر فیزیولوژیک نقش تنظیم کننده دارند [۱۱،۱۲]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تغییر در وزن بدن به طور معنی‌دار بر سطح PPARγ mRNA در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) تاثیر می‌گذارد که با تغییر بیان آن در بافت چربی سفید زیر جلدی همراهی ندارد. این نتایج می‌توانند بیانگر این مطلب باشند که احتمالاً بیان ژن PPARγ در PBMCs افراد چاق، شاخص سلولی جدیدی از فعالیت گیرنده هسته‌ای است [۱۳].

این موضوع که بیان PPARγ در PBMCs افراد چاق با تغییر در مشخصه‌های مربوط به چاقی همبستگی دارد، ثابت شده است [۱۴]. همچنین مشاهده شده که در شرایط التهاب در چاقی علاوه بر تغییر در ترشح سیتوکین‌ها، PPAR γ هم به نحوی تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۱۷-۱۵]. چندین مسیر شناخته شده در مورد سیتوکین‌ها و PPARγ که قبلاً گزارش شده [۱۱] مشخص کرده که بیان، تولید و فعالیت PPARγ تحت تاثیر شرایط پیش التهابی ناشی از چاقی قرار می‌گیرند. یافته‌ها در یک مطالعه انسانی پیشنهاد کردند که گیرنده‌های هسته‌ای نیز در این شرایط تغییر می‌کنند [۱۸]. همان طوری که در مطالعات قبلی نشان داده شده است اثرات آنتی اکسیدانی PPARγ مشتقی از اثرات آن بر مسیرهای متابولیسم لیپید و کربوهیدرات داخل سلولی است [۱۹-۱۴]. همچنین نشان داده شده که سیتوکین‌های التهابی می‌توانند برمتابولیسم استخوان اثر داشته باشند [۲۰،۲۱] و از طرفی نیز مطالعات حیوانی حاکی از نقش بالقوه PPARγ در متابولیسم استخوان بودند [۲۲]. جالب است که بیان هر سه ایزوفرم PPAR در حین فازهای تکاملی استئو کلاست از PBMCs انسان تولید می‌شوند [۲۳].

با توجه به اطلاعات جمع‌آوری شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی این مطلب که آیا بیان ژن PPARγ در PBMCs جدا شده از افراد چاق تحت تاثیر فاکتورهای مربوط به چاقی قرار می‌گیرد یا نه انجام گرفت و در کنار ارزیابی تراکم توده استخوان، میزان بیان این ژن نیز در افراد مورد مطالعه سنجیده شد. همچنین میزان بیان ژن PPARγ و سطوح سیتوکین‌های مختلف در افراد چاق استئوپنیک و غیر استئوپنیک در این تحقیق اندازه‌گیری شده و تراکم توده استخوانی در افراد با مقادیر متفاوت بیان ژن PPARγ با هم مقایسه شدند.

روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، تعداد ۲۶۵ شرکت کننده با چاقی درجه ۱ (BMI ۳۰ تا ۳۴/۹) وارد شدند. این مطالعه از طرف کمیته اخلاق پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تایید شده بود. افراد طبق معیارهای ورود به مطالعه اعم از فقدان بیماری التهابی مزمن یا حاد، فشار خون بالا، عدم مصرف الکل و سیگار و عدم بارداری انتخاب شدند. معیارهای خروج شامل ابتلا به بیماری قلبی

عروقی، تیروئید، سرطان، دیابت، ناراحتی قلبی، عفونت حاد یا مزمن، بیماری کبدی یا کلیوی و یا استفاده از آنتاگونیست‌های PPARγ مانند تیازولیدین‌ها، تروگلیتازون، رزیگلیتازون وپیوگلیتازون بودند. شرکت کنندگان با اختلالات استخوانی نظیر هیپر یا هیپوپاراتیروئیدیسم، بیماری پاژه، استئومالاسی، استئوژنز ایمپرفکتا یا سایر بیماری‌های آرتریت روماتوئید یا بیماری کلاژنی و یا آنهایی که داروهایی که بر متابولیسم استخوان اثر داشت از قبیل کورتیکو استروئیدها و ضد تشنج‌ها یا داروهای ضد بارداری خوراکی مصرف می‌کردند، از مطالعه حذف شدند. هیچ یک از افراد چاق تحت درمان با انسولین و داروهای ضد دیابت و یا پیرو رژیم غذایی خاصی نبودند. تمامی افراد پس از پر کردن فرم رضایت‌نامه و با نسبت ۱۳/۸۵٪ (۳۵ نفر) مرد و ۸۶/۴۲٪ (۲۲۹ نفر) زن وارد مطالعه شدند. BMD در نواحی کمر و لگن ارزیابی شده و افراد بر اساس طبقه‌بندی سازمان جهانی بهداشت (WHO) به دو گروه استئوپنیک و غیر استئوپنیک تقسیم شدند. از ۲۶۵ شرکت کننده ۷۷ نفر (۲۹/۵۵٪) مبتلا به استئوپنی و ۱۸۸ نفر (۷۰/۹۵٪) غیر استئوپنیک بودند.

آنالیز کامل ترکیبات بدن

ترکیبات بدنی به وسیله آنالیزر ترکیبات بدن مدل BC-418MA – Tanita (UK) محاسبه شد. این وسیله بدین گونه طراحی شده است که با ارسال یک جریان الکتریکی ضعیف و محاسبه امپدانس یا مقاومت الکتریکی بدن میزان و درصد ترکیبات مختلف بدن را می‌سنجد. افراد در حالت ناشتا پس از یک استراحت کوتاه، بعد از تخلیه ادرار و با پای برهنه و پس از اطمینان از تمیز بودن کف پاها برای عبور بهتر جریان روی دستگاه قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری دقیق درصد چربی بدن و سایر ترکیبات جفت بازوها صاف و به سمت پایین قرارداده شدند. دستگاه مذکور درصد چربی بدن، توده چربی و توده بدون چربی و توده ماهیچه‌ای را بر اساس داده‌های بدست آمده از جذب انرژی اشعه ایکس (DXA) با استفاده از آنالیز امپدانس بیوالکتریکی (BIA) محاسبه می‌کند.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی، هورمونی و غلظت سیتوکین‌های سرم

کلیه نمونه‌های خون بین ساعات ۸ تا ۱۰ صبح در حالت ناشتا جمع‌آوری شدند. سرم‌ها بعد از سانتریفوژ، جداسازی و تقسیم شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همه نمونه‌ها با روش سنجش واحد (single assay) آنالیز شدند. آزمایش‌ها در آزمایشگاه بیونانوتکنولوژی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفتند. پروتئین واکنشگر C سرمی (hs-CRP) که یک مارکر التهابی به شمار می‌رود به وسیله ایمونو توربیدومتری اندازه‌گیری شد (ارزیابی با حساسیت بالا، توسط Hitachi 902). غلظت تمام آدیپوکین‌ها در سه نسخه و ۱۰ تکرار در هر پلیت EIA که به عنوان کنترل کیفیت داخلی استفاده شده بود، اندازه‌گیری شدند. اینترلوکین۶ با استفاده از متد EIA سنجیده شد (شرکت Enzo Life Sciences، حساسیت: ۳/۷۵ pg/ml، inter-assay variability ۳/۷٪ و intra-assay variability ۳/۹٪).

غلظت اینترلوکین۴ با روش EIA تعیین شد (شرکت Enzo Life Sciences، حساسیت کمتر از ۲ pg/ml، intra-assay variability ۴,۳CV٪ و inter-assay variability ۴/۷ CV٪ بود). TNF-α با استفاده از کیت EIA محاسبه گردید (شرکت Enzo Life Sciences، حساسیت: ۸/۴۳ pg/ml، inter-assay variability: ۳/۶٪، intra-assay variability: 6 %).

اندازه‌گیری تراکم توده استخوان

تراکم استخوانی یا BMD با استفاده از تکنیک جذب انرژی اشعه ایکس (DXA) در ناحیه کمری ستون فقرات (مهره‌های L2–L4) و لگن انجام شد. ضریب تغییرات برای اندازه‌گیری‌های BMD در دستگاه DEXA به طور متوسط ۱/۰۴٪ در نظر گرفته شد. تراکم استخوان نرمال به صورت BMD مساوی یا بالای انحراف معیار ۱- نسبت به میزان مطلوب حداکثر چگالی استخوان (T-score) در بزرگسالان جوان سالم در یک جنس تعریف شد. نتایج به صورت مقادیر مطلق گرم بر سانتی‌متر مربع و واحدهای انحراف معیار (Z-score) بر اساس مقایسه با BMD تطبیق داده شده با سن و جنس گزارش شدند [۲۴].

آماده‌سازی (PBMC)

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC's) از خون وریدی (۱۲ میلی‌لیتر، در لوله هپارینه) جدا شده و مونوسیت‌ها از خون محیطی با تکنیک چگالی فایکول استخراج شدند. نمونه‌ها با RPMI 1640 به میزان ۱/۱ رقیق شده و همراه گلوتاماکس-۱ و ۲۵ میلی‌مول HEPES (Belgium،Verviers ،Cambrex Bio Science) و میزان مناسب آنتی بیوتیک (۱۰۰U/ml پنی‌سیلسن و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین) نگهداری شدند. ۲۴ میلی‌لیتر از محلول بر روی ۱۵ میلی‌لیتر از یک محلول با چگالی بالا گذاشته شد (Oslo, Norway،Axis-Shield PoCAS ،LymphoprepTM) و با سرعت ۱۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه میانی که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای محیطی بود جداشده و دو بار شستشو داده شدند. مونوسیت‌ها در RPMI 1640 همراه با گلوتاماکس۱ و ۲۵ میلی‌مول HEPES(Verviers,Cambrex Bio Science Belgium) و آنتی‌بیوتیک (۱۰۰U/ml پنی‌سیلسن و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین) به علاوه ۱۵٪ FCS به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

استخراج RNA و real-time RT-PCR کمی

در هر نوبت 10^6 سلول برداشت شده و استخراج mRNA با استفاده از کیت جداسازی RNA با خلوص بالا (Roche Diagnostics) صورت گرفت. ژن‌های PPARγ و β- اکتین به وسیله real-time کمی ترانس کریپتاز معکوس -(RT) PCR اندازه‌گیری شدند. به طور خلاصه ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم RNA کل توسط کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis رونویسی شد (Fermentase, EU). برای تکثیر RT-PCR بعدی ماکزیمم ۲µl از هر نمونه DNA مکمل برای هر ۲۰ میلی‌لیتر مخلوط PCR استفاده شد. واکنش‌های PCR هم در ول‌های سه نسخه‌ای و هم در سیستم مرحله ۱ real time ABI اجرا شدند (Applied Biosystems, Foster City, CA). معرف مورد نیاز برای PCR از شرکت بیوسیستم خریداری شده و هر نمونه در سه نسخه triplicates در حجم ۲۰ µl برای بیشتر از ۴۰ چرخه با استفاده از شرایط real-time چرخه‌ای استاندارد اجرا شد. حجم‌های Ct با یک منحنی استاندارد نسبی در همان پلیت به عنوان نمونه نرمال شدند. تعریف نسبی بیان ژن هدف با بیان یک ژن housekeeping (بتا-اکتین) برای هر نمونه نرمال شد. داده‌ها به صورت تغییرات برابر در سطوح mRNA در مقایسه با گروه کنترل گزارش شدند.

آنالیزهای آماری

تفاوت‌های کلی گروه‌ها با ANOVA ارزیابی شدند. آزمون Chi-square جهت مقایسه متغیرها بین گروه‌های مختلف در آنالیز بیان ژن استفاده شد. نتایج به صورت مقادیر هدف PPARγ تقسیم بر مقداربتا-اکتین گزارش شدند. سطح معنی‌دار در یک احتمال ۰/۰۵≥ برای همه آزمون‌ها در نظر گرفته شد. آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه SPSS ویرایش ۱۶ (Chicago, IL) انجام گرفت.

یافته‌ها

مشخصات جمعیت مورد مطالعه

کلیه افراد مبتلا به چاقی درجه ۱ بوده و درصد شیوع استئوپنی در ناحیه کمر (L2-L4) ۴۱/۵۰٪ (۱۱۰ نفر) و در لگن ۱۰/۹۴٪ (۲۹ نفر) بود. از ۲۶۵ شرکت کننده، ۷۷ نفر (۲۹/۰۵٪) استئوپنیک بوده و۱۸۸ نفر (۷۰/۹۵٪) در هر منطقه مورد بررسی سالم بودند. مشخصات فردی، ابعاد بدنی و اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی در گروه‌های استئوپنیک و غیر استئوپنیک در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول نشان داده شده هیچ تفاوت آماری معنی‌داری از نظر سن، BMI، درصد چربی، چربی احشایی، چربی بالا تنه‌ای و غلظت اینترلوکین ۴ بین دو گروه دیده نشد. همچنین در گروه استئوپنیک غلظت کراس لپس و اینترلوکین۶ بالاتر و توده بدون چربی به طور معنی‌دار پایین‌تر از گروه غیر استئوپنیک بود. به دلیل اختلافات معنی‌دار بیان ژن PPAR γ بین دو گروه واضح است که بیان این ژن یک واسطه مهم در پیشگویی سایر شاخصه‌ها به شمار می‌رود. بنابراین آنالیز سایر یافته‌ها براساس میزان بیان ژن PPAR γ انجام گرفت.

ارتباط بین بیان ژن PPAR γ در PBMCs و صفات مرتبط با چاقی

شرکت کنندگان براساس درصد بیان نسبی ژن به دو گروه با بیان ژن پایین و بالا تقسیم شدند بدین گونه که افراد با بیان ژن PPAR γ کمتر یا مساوی ۷۵٪ در یک گروه و افراد با بیان ژن PPAR γ بالاتر از ۷۵٪ در گروه دیگر قرار گرفتند. جدول ۲ ویژگی‌های مرتبط با چاقی را در دو گروه براساس سطح بیان ژن PPAR γ نشان داده است. همان طور که در جدول آورده شده، سطوح درصد چربی، توده بدون چربی، تری‌گلیسرید، LDL، HDL و کلسترول تام در گروه با بیان ژن بالای PPAR γ بیشتر بوده و همین طور همبستگی معنی‌داری بین بیان ژن PPAR γ و درصد چربی با توجه به شرایط استخوانی یافت شد.

ارتباط بین بیان ژن PPAR γ در PBMCs و شاخص‌های التهابی

طبق طبقه‌بندی اشاره شده، فاکتورهای التهابی بین گروه‌ها مقایسه شد. همان طورکه در جدول ۳ نشان داده شده در گروه بیان ژن PPARγ بالا غلظت اینترلوکین۱۰ و ۶ و α TNF بالاتر و غلظت hs-CRP پایین‌تر از گروه دیگر بوده است. اما دو گروه هیچ تفاوتی از نظر اینترلوکین۴ با هم نداشتند.

همبستگی بین بیان ژن *PPAR γ* در PBMCs و میزان تراکم استخوان

بیان نسبی PPAR γ، در گروه استئوپنیک در مقایسه با گروه غیر استئوپنیک بالاتر بود (جدول ۱). براساس بیان نسبی طبقه‌بندی شده PPAR γاختلاف معناداری در T-score و Z-score در منطقه لگن وجود نداشت. در مورد مهره‌های کمری (L2-L4) در این منطقه تراکم استخوانی، T-score و Z-score پایین‌تر و معناداری در گروهی که بیان ژن PPAR γ بالا داشتند مشاهده شد (جدول۲). همان طوری که در شکل ۱ نشان داده شده، کاهش در T-score مهره‌های L2 تا L4 با بالا رفتن سن در مقایسه با گروه با بیان پایین PPAR γ شدیدتر بود (جدول۲).

جدول ۱- مشخصات، ابعاد بدنی، تراکم استخوان و اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی در دو گروه استئوپنیک و غیر استئوپنیک

مشخصات	افراد چاق(n=۲۶۵)	
	استئوپنیک(n=۷۷)	غیر استئوپنیک(n=۱۸۸)
سن (سال)	۳۸/۱۷±۱۱/۳۲	۳۶/۵۴±۱۰/۷۰
BMI(kg/m)	۳۴/۲۸±۶/۲۴	۳۴/۴۶±۳/۸۸
وزن (kg)	۸۸/۹۷±۱۷/۲۲	۹۳/۷±۱۷/۴۰
قد(cm)	۱۶۱/۶۷±۸/۰۹	۱۶۲/۶۱±۷/۴۶
درصد چربی(٪)	۳۹/۳۲±۸/۲۳	۳۹/۲۹±۶/۶۳
توده چربی(kg)	۳۶/۰۴±۱۱/۵۹	۳۶/۶۶±۸/۰۱
توده بدون چربی(kg)*	۵۳/۶۳±۸/۹۸	۵۷/۲۷±۱۴/۲۷
چربی احشایی(kg)	۱۰/۱۴±۳/۶۵	۱۰/۴۸±۳/۵۳
چربی بالاتنه(kg)	۱۸/۹۶±۳/۹۰	۱۹/۴۴±۴/۴۳
BMD لگن(gm/cm^2)*	۰/۹۹۲±۰/۱۳۹	۱/۱۲۱±۰/۱۷۱
t-score لگن*	-۰/۱۶۹±۰/۰۹	۰/۷۵۴±۰/۱۶
z-score لگن*	۰/۰۵۰±۰/۰۱۶	۰/۳۰۶±۰/۱۳
BMD مهره‌های L2تاL4 * (gm/cm^2)	۱/۰۴۴±۰/۰۹۰۴	۱/۲۶۳±۰/۱۵۴
L2تا L4 مهره‌های t-score *	-۱/۴۰۰±۰/۵۲۶	۰/۴۵۹±۰/۲
L2تا L4 مهره‌های z-score *	-۱/۶۸۱±۰/۸۸۷	-۰/۱۸۷±۰/۰۶۶
کراس لپس(ng/mL) *	۰/۵۹±۰/۳۷	۰/۴۸۱±۰/۲۷
اینترلوکین۶(pg/ml) *	۲۵/۹۳±۱۹/۲۲	۱۷/۸۵±۱۰/۶۰
اینترلوکین۴(pg/ml)	۱/۸۷±۱/۰۶	۱/۹۵±۱/۱۸
Hs-CRP (mg/L) *	۳/۸۳±۱/۱۳	۳/۱±۲/۷۹
بیان نسبی ژن PPAR γ *	۱/۱۸±۰/۳۴	۱/۰۳±۰/۲۷

*در مقایسه بین دو گروه مقادیر P معنی دار بود (P<۰/۰۵)- مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

BMI, body mass index; BMD, bone mineral density; hs-CRP, Hyper sensivity C-reactive protein; PPAR γ: peroxisome proliferator-activated receptor γ.

جدول ۲- ویژگی‌های مرتبط با چاقی بین دو گروه با سطح بالا و پایین بیان ژن *PPARγ*

ویژگی‌ها	بیان نسبی PPAR γ (n=۲۶۵)	
	بیان بالا(n=۶۴)	بیان پایین(n=۲۰۱)
BMI(kg/mg)	۳۰/۸۱±۸/۵۵	۲۹/۷۶±۷/۰۹
درصد چربی(٪) *	۳۶/۶۵±۱۱/۳۱	۳۳/۰۱±۹/۰۱
توده چربی(kg)	۳۰/۵۸±۱۵/۷۱	۲۷/۹۴±۱۳/۷۵
توده بدون چربی(kg)*	۴۷/۳۷±۸/۱۸	۵۳/۲۸±۱۲/۹۸
چربی احشایی(kg)	۷/۷۱±۵/۴۰	۷/۲۵±۵/۹۱
چربی بالا تنه(kg)	۲۰/۳۳±۲/۲۷	۱۹/۱۵±۶/۸۰
انسولین(µlU/ml)	۱۱/۰۲±۵/۵۸	۱۱/۸±۵/۷۵
تری گلیسرید(mg/dl)	۱۳۸/۷۵±۵۰/۲۸	۱۲۵/۶±۵۲/۷۰
کلسترول تام(mg/dl)*	۱۸۷/۲۵±۲۹/۲۶	۱۶۷/۷۳±۲۵/۳۸
HDL (mg/dl)*	۴۷/۰±۶/۳۷	۴۱/۴±۹/۹۴
LDL (mg/dl) *	۱۰۳/۵±۲۱/۰۰	۹۴/۴±۱۷/۴۴
BMDلگن(gm/cm^2)*	۱/۰۵۹±۰/۰۹۵	۱/۱۰۰۳±۰/۱۳
t-scoreلگن	۰/۴۷±۰/۱	۰/۷۰±۰/۱۰
z-scoreلگن	۰/۱۰±۱/۰۱	۰/۰۶۶±۰/۹۵
BMD مهره های L2تاL4 * (gm/cm^2)	۱/۰۸±۰/۰۲	۱/۲۹±۰/۱۲
L2تا L4 مهره های t-score *	-۰/۷۷۵±۰/۴۳	۰/۶۱۶±۰/۱
L2تا L4 مهره های z-score *	-۱/۴۰±۰/۵۸	۰/۰۶۶±۰/۰۲

*در مقایسه بین دو گروه مقادیر P معنی دار بود (P<۰/۰۵)- مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

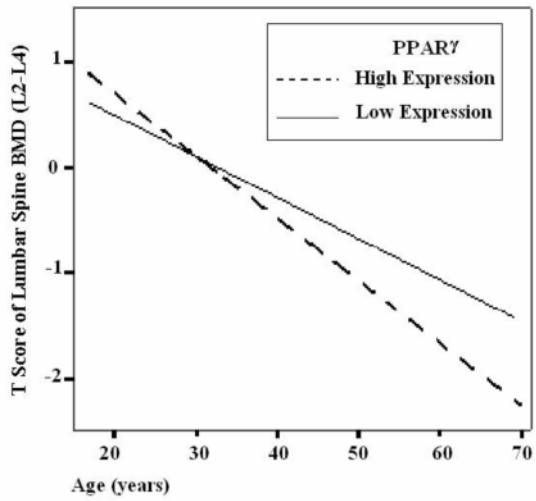
PPAR γ, peroxisome proliferator-activated receptor γ; BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; BMD, bone mineral density.

جدول۳- میزان فاکتورهای التهابی بین دو گروه با سطوح متفاوت بیان ژن *PPARγ*

فاکتورهای التهابی	بیان نسبی PPAR γ	
	بیان بالا	بیان پایین
IL6 (pg/ml) *	۲۶/۱۱±۲/۱۱	۱۰/۱۱±۷/۱۹
IL4(pg/ml)	۰/۷۷±۰/۷۴۲	۲/۳۹±۰/۴۱۲
TNFα(pg/ml) *	۴/۲±۳/۹۹	۳/۲۶±۲/۱۵
IL4 IL10(pg/ml)*	۷/۹۳±۰/۴۴	۷/۷۲±۲/۶۸
hs-CRP (mg/L) *	۲/۳۲±۲/۱۷	۳/۸±۹/۹۰

*در مقایسه بین دو گروه مقادیر P معنی دار بود (P<۰/۰۵)- مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

PPAR γ: peroxisome proliferator-activated receptor γ; BMI, body mass index; BMD, bone mineral density; IL 6, interlukin 6; IL4, interlukin 4; TNFα, tumor necrosis factor-α; IL10, interlukin 10; hs-CRP, Hyper sensivity C-reactive protein



شکل ۱- همبستگی بین نسبت بیان ژن PPARγ به بتا- اکتین و T-score مهره‌های L2-L4 با پیشرفت سن

بحث

گیرنده فعال تکثیر کننده پراکسیزوم γ (PPAR γ)، به عنوان واسطه در بیان ژن‌های اختصاصی چربی و فعال‌سازی برنامه تمایز سلول‌های چربی دخیل است [۲۵]. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که میزان درصد و توده چربی در گروه با بیان ژن بالای γ PPAR بیشتر بود. در حقیقت ما همبستگی مثبت بین بیان نسبی ژن γ PPAR و درصد چربی مشاهده کردیم.

این موضوع نشان داده شده است که هترودیمرشدن PPARγ با گیرنده X رتینوئید (RXR) و با اتصال به لیگاندهای خاص، از طریق اتصال به عناصر پاسخ تکثیر کننده پراکسیزوم (PPREs)آنها، رونویسی از ژن‌های هدف را فعال می‌کند. بیشتر ژن‌های هدف شناخته شده در هیدرولیز تری‌گلیسرید، اسید چرب و برداشت گلیسرول، استریفیکاسیون مجدد اسید چرب و ذخیره لیپید دخالت دارند [۲۶،۲۷].

در بیوپسی ماهیچه افراد چاق غیر دیابتی و افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل لاغر غیر دیابتی سطح بالاتری از mRNA ژن PPARγ گزارش شده است [۲۸]. ماسیاس-گنزالز و همکارانش نشان دادند که میزان بیان PPARγ mRNA در افراد سالم، پایین‌تر از بیماران مبتلا به سندرم متابولیک بود [۲۹]. نتایج مشابهی در مطالعه ما درمورد ویژگی‌های سندرم متابولیک بدست آمد به طوری که سطوح تری‌گلیسرید و LDL در افراد با سطح بالای بیان ژن بیشتر بود. اخیراً به نقش حیاتی آگونیست PPARγ در جهت‌سازی توزیع M1/ M2 ATM لیپیدها در آدیپوسیت‌ها و ایجاد یک شرایط التهابی در چاقی اشاره شده است [۳۰]. چاقی با یک شرایط مزمن و التهاب خفیف شناخته می‌شود [۳۱] که با تجمع ماکروفاژهای پیش التهابی M1 در بافت چربی در ارتباط است [۳۰].

از طرف دیگر، PPARγ نقش مهمی در تنظیم فرایند التهاب [۳۲،۳۳] توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان (PBMC)، از قبیل ماکروفاژها و مونوسیت‌ها بازی می‌کند [۳۴]. شواهدی مبنی بر کمبود این گیرنده در سلول‌های ایمنی وجود دارد که به نفع بیان M1 و نقص بیان مارکر ماکروفاژ M2 در بافت چربی است [۳۵].

در مطالعه حاضر افزایش بیان PPARγ ممکن است به علت سازوکار تنظیمی- متقابل در پاسخ التهابی باشد. بنابراین، این گیرنده واسطه‌های التهابی در ماکروفاژهارا کاهش می‌دهد [۳۶]. نتایج ما نشان دادند که سطوح معنادار و پایین‌تری از hs-CRP و میزان بالاتری از اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروز کننده تومورα در گروه با بیان بالای ژن PPARγ وجود داشت. این موضوع مشخص شده است که اتصال لیگاند PPARγ به گیرنده‌های آن تولید سیتوکین‌های التهابی در مونوسیت‌ها وPBMC را مهار می‌کند [۳۷،۳۸]. چندین سازوکار ضد التهابی پیشنهاد شده است که اظهار می‌دارند فاکتور هسته‌ای کاپا بتا (NF-$K\beta$) توسط PPARγ مهار می‌شود [۳۶]. افزایش سطح بیان ژن گیرنده مذکور همراه التهاب مرتبط با چاقی منطقی به نظر می‌رسد. فرض براین است که این افزایش می‌تواند به آرامی کل التهاب را از طریق سرکوب hs-CRP به عنوان یک واسطه التهابی و افزایش اینترلوکین ۱۰ به عنوان یک سیتوکین ضد التهابی در سیستم ایمنی کاهش دهد. اگرچه که میزان IL6 و TNFα در گروه با بیان ژن بالای PPARγ کماکان بالا بود که ممکن است به دلیل سازوکار جبرانی ناقص در این افراد باشد.

استئوپنی به علت عدم تعادل بین بازجذب و تشکیل استخوان ایجاد می‌گردد. فاکتورهایی که در التهاب دخالت دارند با آنهایی که در فیزیولوژی و بازسازی استخوان نقش حیاتی دارند در ارتباط هستند. این مطلب از تئوری ارتباط التهاب با پاتوژنز استئوپنی حمایت می‌کند [۴۱-۳۹]. در این راستا یافته‌های این مطالعه حاکی از غلظت بالاتر و معنادار IL6 در افراد مبتلا به استئوپنی بود. برخی از مطالعات قبلی پیشنهاد کرده بودند که افزایش سیتوکین‌هایی مانند IL6 و TNFα می‌توانند بر بازجذب و تشکیل استخوان اثر بگذارند و همچنین مقادیر بالاتر این سیتوکین‌ها در بیماران مبتلا به استئوپروز و استئوپنی مشاهده شده است.

یکی از یافته‌های جالب توجه در این مطالعه بیان بالای ژن PPARγ در گروه استئوپنیک در مقایسه با افراد چاق غیر استئوپنیک بود. نتایج این مطالعه نشان دادند که بیان بیش از حد ژن گیرنده در شرایط التهابی مزمن در چاقی می‌تواند سبب کاهش یا بهبود شرایط عمومی التهاب از

طریق کاهش تولید سیتوکین و یک اثر بر جهت‌سازی توزیع M1/M2 ATM لیپیدها در سلول‌های چربی باشد. اگرچه این حالت ممکن است سبب عوارض مربوط به چاقی مانند کاهش تراکم استخوان و استئوپنی گردد. نشان داده شده که فعال‌سازی PPARγ با تحلیل استخوان و افزایش خطر شکستگی همراه است [۴۲]. شواهدی از مدل‌های حیوانی در دسترس هستند که مشخص کرده آگونیست PPARγ "پیوگلیتازون" تحلیل استخوان را در موش‌های بدون تخمدان بسیار افزایش داده است [۴۲].

اعتقاد بر این است که فعال‌سازی PPARγ سبب تکثیر بافت چربی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مغز استخوان به خرج استئوبلاست‌ها شده که منجر به کاهش تراکم استخوان و افزایش چربی مغز استخوان خواهد شد [۴۳]. بر طبق طبقه‌بندی بیان PPARγ در این مطالعه BMD، T-score و Z-score کمتری در مهره‌های کمری در گروه با سطح بالای بیان ژن PPARγ مشاهده شد که معنی‌دار بود.

این نتایج با یافته‌های هارسلوف و همکارانش که در یک مطالعه ۱۴ هفته‌ای روی آگونیست PPARγ، کاهش تراکم استخوان در ناحیه مهره‌های کمر را نشان داد شباهت داشت [۴۳]. جداشدن دو فرایند بازجذب استخوانی و تشکیل مجدد از هم از طریق مسیر PPARγ فرضیه‌ای بود که تحلیل استخوان را توجیه می‌کرد.

مسیر احتمالی دیگر سطح بالای IL6 و TNFα در گروه با سطح بالای بیان ژن PPARγ در مطالعه حاضر ست که با BMD کمتر در این گروه در ارتباط می‌باشد. تداخل بین IL-6، نسبت TNF-α به IL-1 و نسبت استئوپروتگرین (OPG) به فعال کننده گیرنده NF-kappaB، نسبت RANK به لیگاند آن (RANKL) از دیگر فاکتورهای اصلی کنترل کننده در پاتوفیزیولوژی بازجذب استخوانی به شمار می‌روند که اختلال در هر یک از این فاکتورها می‌تواند بر بازگردش استخوان اثرگذار باشد [۴۴].

به طورکلی یافته‌ها در مطالعه کنونی پیشنهاد می‌کنند که بیان بیش از حد ژن PPARγ در PBMCs افراد چاق می‌تواند به عنوان یک شمشیر دولبه عمل کند. چرا که از یک طرف التهاب را مهار کرده و از طرف دیگر می‌تواند از دست‌دهی بافت استخوان را تحریک نماید. اگرچه فراتر از موضوع مورد بحث در این تحقیق نقش احتمالی بیان بیش از حد PPARγ در قابلیت ابتلا به استئوپنی در افراد چاق نیز پیشنهاد شد، البته مطالعات تجربی بیشتر و همچنین مداخلاتی در سطح سلولی مولکولی جهت مشخص کردن نقش دقیق PPARγ در اتیولوژی استئوپنی و اثر بر تحلیل استخوانی پیشنهاد می‌شود.

طراحی یک مطالعه مورد شاهد با حجم نمونه بیشتر ممکن است سبب دست یابی به نتایج بهتری گردد که این موارد جزو محدودیت‌های مطالعه حاضر بود.

سپاسگزاری

این مطالعه تحت حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مأخذ

1. Fulton J. New guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis. National Osteoporosis Foundation. *Med Health R I* 1999; 82:110-1.
2. Mirzaei K, Hossein-Nezhad A, Karimi M, et al. Effect of green tea extract on bone turnover markers in type 2 diabetic patients; A double-blind, placebo-controlled clinical trial study. DARU 2009;17:38-44.
3. Zhao L, Jiang H, Papasian C, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2008; 23:17-29.
4. Xiao W, He J, Zhang H, et al. ALOX12 polymorphisms are associated with fat mass but not peak bone mineral density in Chinese nuclear families. *Int J Obes*. 2011; 35:378-86.
5. Felson D, Zhang Y, Hannan M, Anderson J. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 1993;8:567-73.
6. Weiler H, Janzen L, Green K, et al. Percentage body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. *Bone* 2000; 27:203-7.
7. Rosen C, Bouxsein M. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2:35-43.
8. Chen J, Lazarenko O, Wu X, et al. Obesity reduces bone density associated with activation

of PPARγ and suppression of Wnt/β-catenin in rapidly growing male rats. *PLoS One* 2010; 5:e13704.
9. Deng F, Lei S, Li M, Jiang C, Dvornyk V, Deng H. Genetic determination and correlation of body mass index and bone mineral density at the spine and hip in Chinese Han ethnicity. *Osteoporos Int* 2006;17:119-24.
10. Heim M, Frank O, Kampmann G, et al. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004; 145:848-59.
11. Rühl R, Dahten A, Schweigert F, Herz U, Worm M. Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Invest Dermatol*. 2003; 121:757-64.
12. Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR): From metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 2002; 132:83-91.
13. Bairras C, Redonnet A, Dabadie H, et al. RARgamma and TRbeta expressions are decreased in PBMC and SWAT of obese subjects in weight gain. *J Physiol Biochem* 2010;66:29-37.
14. Garcia-Fuentes E, Murri M, Garrido-Sanchez L, et al. PPARgamma expression after a high-fat meal is associated with plasma superoxide dismutase activity in morbidly obese persons. *Obesity* (Silver Spring) 2010; 18: 952-8.
15. Guo C, Ricchiuti V, Lian B, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 2008; 117:2253-61.
16. Berg A, Scherer P. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res. 2005;96:939-49.
17. Wellen K, Hotamisligil G. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115:1111-9.
18. Kaplan J, Denenberg A, Monaco M, Nowell M, Wong H, Zingarelli B. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in children with septic shock. *Intensive Care Med* 2010; 36:123-30.
19. Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H742-H8.
20. Rosen C, Bouxsein M. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2:35-43.
21. Hossein- Nezhad A, Ahangari G, Behzadi H, Maghbooli Z, Larijani B. The Immunomodulatory effect of Vitamin D in Osteoimmunology. *DARU* 2009; 17:6-12.
22. Stunes A, Westbroek I, Gustafsson B, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha agonist fenofibrate maintains bone mass, while the PPAR gamma agonist pioglitazone exaggerates bone loss, in ovariectomized rats. *BMC Endocr Disord* 2011; 11:11.
23. Chan B, Gartland A, Wilson P, et al. PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. Bone 2007; 40:149-59.
24. Hossein-Nezhad A, Nikoo M, Mirzaei K, Mokhtarei F, Meybodi H. Comparison of the bone turn-over markers in patients with multiple sclerosis and healthy control subjects. *EUROPEAN JOURNAL OF INFLAMMATION* 2010; 8:67-73.
25. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell B, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97:2553-61.
26. Tontonoz P, Spiegelman B. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ. Annu Rev Biochem 2008;77:289-312.
27. Tsai Y, Tsai P, Jiang M, et al. Decreased PPAR gamma expression compromises perigonadal-specific fat deposition and insulin sensitivity. *Mol Endocrinol* 2009 23:1787-98.
28. Park K, Ciaraldi T, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina S, Henry R. PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes Metab* 1997; 46:1230-4.
29. Macias-Gonzalez M, Cardona F, Queipo-Ortuño M, Bernal R, Martin M, Tinahones F. PPARgamma mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 2008;138:903-7.
30. Prieur X, Mok C, Velagapudi V, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes Metab* 2011 60:797-809.
31. Mirzaei K, Hossein-Nezhad A, Chamari M, Shahbazi S. Evidence of a role of ANGPTL6 in resting metabolic rate and its potential application in treatment of obesity. *Minerva Endocrinol* 2011; 36:13-21.
32. Chen X, Bing Z, He J, et al. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in hypertensive atrial fibrillation. *Clin Cardiol* 2009; 32:337-45.
33. Lehrke M, Lazar M. The many faces of PPARγ. *Cell* 2005; 123:993-9.
34. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B-cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108:1667-75.
35. Bassaganya-Riera J, Misyak S, Guri A, Hontecillas R. PPAR gamma is highly expressed in F4/80(hi) adipose tissue macrophages and dampens adipose-tissue inflammation. *Cell Immunol* 2009; 258:138-46.
36. Straus D, Pascual G, Li M, et al. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps

in the NF-κB signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:4844-9.
37. Rühl R, Dahten A, Schweigert F, Herz U, Worm M. Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Invest Dermatol* 2003; 121:757-64.
38. Sharma A, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:386-95.
39. Lencel P, Magne D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses* 2011; 76:317-21.
40. Ginaldi L, Di Benedetto M, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immunity & Ageing* 2005; 2:14.
41. Hossein-Nezhad A., Ahangari G, Larijani B. Evaluating of VDR Gene Variation and its Interaction with Immune Regulatory Molecules in Osteoporosis. *IRANIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH* 2009; 38:27-36.
42. Stunes A, Westbroek I, Gustafsson B, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha agonist fenofibrate maintains bone mass, while the PPAR gamma agonist pioglitazone exaggerates bone loss, in ovariectomized rats. BMC Endocr Disord. 2011; 11:11[Epub ahead of print].
43. Harsløf T, Wamberg L, Møller L, et al. Rosiglitazone decreases bone mass and bone marrow fat. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96:1541-8.
44. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15:49-60.