

بررسی اثرات انسولین و اسیداسکوربیک بر بیان ژن های خانواده ی Bcl-2 در ناحیه ی هیپوکامپ موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین

ایرج جعفری انارکولی*، دکتر مجتبی سنکیان**، شهریار احمدپور***، دکتر حسین حقیر****، دکتر شکوفه بنکداران*****،

دکتر عبدالرضا وارسته*****

نویسنده مسئول: مشهد، بخش ایمونوبیوشیمی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی varasteha@mums.ac.ir

دریافت: ۸۶/۹/۲۰ پذیرش: ۸۶/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: دیابت قندی یک اختلال مزمن متابولیک همراه با افزایش قند خون می باشد که به طور نامطلوبی هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی را درگیر می کند. از آنجا که ژن های خانواده ی Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز دارند، هدف از مطالعه ی حاضر بررسی اثرات انسولین و اسیداسکوربیک بر بیان ژن های خانواده ی Bcl-2 نظیر Bax (الکاننده ی آپوپتوز)، Bcl-2 و Bcl-x_L (مهارکننده ی آپوپتوز) در هیپوکامپ موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین می باشد.

روش بررسی: پنج گروه شش تایی از موش های صحرایی نژاد ویستار شامل گروه کنترل (C) و چهار گروه دیابتی (AA I، D، AA I+AA و AA I) در این مطالعه استفاده شد. دیابت به وسیله ی تزریق استرپتوزوسین (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم، داخل صفاقی) القا شد. شش هفته پس از القای دیابت، گروه I تحت تیمار با انسولین (۴ تا ۶ واحد به ازای هر کیلوگرم در روز، داخل صفاقی)، گروه AA تحت تیمار با اسیداسکوربیک (۲۰۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم در روز، زیرجلدی) و گروه I+AA تحت تیمار با انسولین به اضافه ی اسیداسکوربیک قرار گرفتند. گروه D (دیابتی کنترل) نرمال سالین دریافت کردند. بعد از دو هفته تیمار، میزان بیان ژن های Bcl-2، Bcl-x_L و Bax در سطح mRNA و پروتئین به شکل نیمه کمی بررسی شد.

یافته ها: موش های صحرایی گروه دیابتی (D) افزایش میزان Bax و کاهش میزان Bcl-2 و Bcl-x_L را هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین نشان دادند و هم چنین در این گروه نسبت Bax/Bcl-2 و Bax/Bcl-x_L نیز در مقایسه با گروه C بیشتر بود (به ترتیب $P < 0.01$ و $P < 0.001$). تیمار با انسولین و اسیداسکوربیک به تنهایی و به صورت ترکیبی در سطح mRNA و پروتئین میزان Bcl-2 و Bcl-x_L را افزایش و میزان Bax را کاهش داد. علاوه بر این، نسبت Bcl-2/Bax و Bcl-x_L/Bax نیز در این گروه ها در مقایسه با گروه دیابتی (D) بیشتر بود (برای گروه های I و I+AA، $P < 0.001$ و برای گروه AA، به ترتیب $P < 0.05$ برای Bcl-2 و $P < 0.01$ برای Bcl-x_L).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد استفاده از انسولین و اسیداسکوربیک به تنهایی و به صورت ترکیبی احتمالاً می توانند از طریق افزایش میزان بیان ژن های Bcl-2 و Bcl-x_L و کاهش میزان بیان ژن Bax، آپوپتوز را در هیپوکامپ موش های صحرایی دیابتی مهار کنند. مهار آپوپتوز احتمالاً می تواند نقص در یادگیری و حافظه ی ناشی از تخریب هیپوکامپ را در دیابت کاهش دهد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، اسیداسکوربیک، انسولین، دیابت، هیپوکامپ، Bcl-2، Bcl-x_L، Bax

* دانشجوی دکترای تخصصی علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و واحد تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مربی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
** دکترای تخصصی ایمونولوژی، استادیار مرکز تحقیقات و گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*** دانشجوی دکترای تخصصی علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و واحد تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**** دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشیار گروه علوم تشریحی و واحد تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***** فوق تخصص غدد، استادیار گروه داخلی و مرکز تحقیقات غدد بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***** دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات و گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

دیابت قندی یک اختلال مزمن متابولیک است که با افزایش قند خون (Hyperglycemia) همراه است. دیابت می‌تواند ناشی از فقدان انسولین (دیابت نوع ۱) یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین از سلول‌های β جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع ۲) باشد (۱). بر اساس مطالعات انجام شده، شیوع دیابت در کل سنین در سال ۲۰۰۰ در جهان ۲/۸ درصد بوده و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۱۰ بیش از ۲۰۰ میلیون نفر از مردم جهان به دیابت مبتلا شوند (۲، ۳). در ایران، طبق آمار اعلام شده حدود ۱/۵ میلیون نفر بیمار دیابتی وجود دارد (۴).

دیابت به طور ناخوشایندی هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی را از طریق آپوپتوز نورون‌های پایه‌ای گرفتار می‌کند و افزایش قند خون ناشی از دیابت، عوارض میکروواسکولار شدیدی نظیر نوروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی ایجاد می‌کند. شایع‌ترین عوارض دیابت، نوروپاتی‌های دیابتی هستند که اختلالات سیستم عصبی اتونوم و سیستم عصبی ارادی را به همراه دارند (۵، ۶). اختلالات شناختی ناشی از آسیب نورون‌های هیپوکامپ نیز از عوارض دیابت است و نقص در حافظه، یادگیری و شناخت در افراد دیابتی شایع‌تر از افراد غیردیابتی گزارش شده است (۷، ۸-۳).

هیپوکامپ به عنوان یک مرکز مهم در یادگیری و حافظه نسبت به افزایش قندخون حساس بوده و نورون‌های آن در دیابت نوع I فوق‌العاده آسیب‌پذیر هستند (۹ و ۱۰). هرچند مکانیسم‌های تخریب سلول‌های عصبی ناشی از دیابت در هیپوکامپ کاملاً مشخص نشده است. اما آتروفی دندریتی، تنظیم کاهشی گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید، تغییر بیان گیرنده‌های فاکتور رشد شبه‌انسولینی، کاهش ناقلین انسولین و القای آپوپتوز مطرح شده است (۱۱).

آپوپتوز یک نوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف نقش داشته و با

خصوصیات مورفولوژیک نظیر چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته، تورم غشای سلول و قطعه‌قطعه شدن DNA نوکلئوزومی مشخص می‌شود (۱۲، ۱۳). دو نوع مسیر اصلی برای آپوپتوز شناخته شده است: ۱- مسیر آپوپتوز با واسطه‌ی گیرنده‌های مرگ (خارجی) ۲- مسیر آپوپتوز میتوکندریال (داخلی). در مسیر داخلی پروتئین‌های آپوپتوزی نظیر سیتوکروم C آزاد می‌شوند. اگرچه مکانیسم‌هایی که رها شدن پروتئین‌های آپوپتوتیک میتوکندریال را تنظیم می‌کنند، ناشناخته‌اند ولی اعضای خانواده Bcl-2 نقش اساسی در تنظیم تغییرات نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری ایفا می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های مهارکننده‌ی آپوپتوز خانواده‌ی Bcl-2 نظیر Bcl-2، Bcl-x_L و Bcl-1، سالم بودن غشای خارجی میتوکندری را با اتصال به کانال‌های میتوکندری و در نتیجه بقای سلولی را حفظ می‌کنند. در مقابل اتصال پروتئین‌های پروآپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 نظیر Bax، Bid، Bak و Bcl-x_S به غشای خارجی میتوکندری سبب افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و شروع آپوپتوز می‌شود (۱۴، ۱۵).

انسولین در پیشگیری و یا برگرداندن عوارض عصبی ناشی از دیابت مانند اختلالات یادگیری، ترمیم‌پذیری سیناپسی و هم‌چنین سرعت هدایت عصبی نقش داشته است (۱۶). به علاوه نشان داده شده است که انسولین و فاکتور رشد شبه‌انسولینی از آپوپتوز در الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی و یا رده‌ی سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۱۷-۱۹).

از طرف دیگر استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از علل اصلی تغییرات دژنراتیو مزمن در دیابت مطرح گردیده و تیمار با آنتی‌اکسیدان‌ها از بروز برخی عوارض دیابت کاسته است (۲۰). اسیداسکوربیک به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها را از صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کند (۲۱). اگرچه

مکانیسم‌های دقیق اثر محافظت عصبی اسیداسکوربیک کاملاً شناخته شده نیست، اما اسیداسکوربیک در کاهش مرگ سلولی اکسیداتیو، مهار آپوپتوز ناشی از Fas و محافظت ژنومی از طریق به دام انداختن انواع مولکول‌های دارای اکسیژن فعال داخل سلولی نقش دارد (۲۲). اغلب مطالعات بالینی هنوز نتوانسته‌اند شواهد مناسبی را به نفع استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در اختلالات شناختی ارائه دهند و مطالعات اغلب محدود بوده است (۲۳).

از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ی جامعی در ارتباط با نقش آنتی‌اکسیدان‌ها و انسولین در پیشگیری از روند آپوپتوز نورون‌های هیپوکامپ در دیابت نوع ۱ صورت نگرفته است، بنابراین در این تحقیق اثر اسیداسکوربیک و انسولین به تنهایی و به صورت ترکیبی بر روی آپوپتوز در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین از طریق بررسی تغییرات میزان بیان ژن‌های خانواده Bcl-2 مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی

این مطالعه بر روی ۳۰ سر موش صحرایی (۱۵ سر نر و ۱۵ سر ماده) از نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن تقریبی ۸ تا ۱۰ هفته، تهیه شده از حیوان‌خانه‌ی پژوهشکده‌ی بوعلی انجام شده است. حیوانات در حیوان‌خانه‌ی پژوهشکده و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه‌ی حرارت 23 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات پس از وزن‌کشی و کنترل قند خون از طریق ورید دمی با استفاده از دستگاه (Bioname; Bioname, UK) به طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی شامل گروه کنترل (C) و چهار گروه دیابتی به ترتیب [گروه دیابتی کنترل (D)، گروه دیابتی تحت‌تیمار با انسولین (I)، گروه دیابتی تحت‌تیمار با اسیداسکوربیک (AA) و گروه دیابتی تحت‌تیمار با انسولین

به اضافه‌ی اسیداسکوربیک (I+AA)] تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه‌های دیابتی پس از طی ۲۴ ساعت گرسنگی و بعد از بیهوشی با کلروفرم با داروی استرپتوزوسین (Pharmacia and Upjohn, USA) با یک بار تزریق داخل صفاقی (IP) به مقدار ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دیابتی شدند (۲۴). جهت تزریق، استرپتوزوسین در سرم فیزیولوژی حل شد. گروه C فقط سرم فیزیولوژی دریافت داشتند. سه روز پس از تزریق استرپتوزوسین موش‌های صحرایی با قند خون ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر یا بالاتر دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۵). در پایان هفته‌ی ششم در حالی‌که هر هفته وزن و قند خون حیوانات به طور دقیق کنترل و ثبت شد، گروه I تحت‌تیمار با انسولین پروتامین (NPH) (داروسازی اکسیر بروجرد، ایران) به میزان ۴ تا ۶ واحد در روز به صورت تزریق زیرجلدی (SC)، گروه AA تحت‌تیمار با ویتامین C (داروپخش تهران، ایران) (ال - اسکوربیک‌اسید به فرم قابل تزریق ۵۰۰ میلی‌گرم در ۵ میلی‌لیتر) با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم در روز به صورت تزریق داخل‌صفاقی (۲۵) و گروه I+AA تحت‌تیمار با انسولین به اضافه‌ی اسیداسکوربیک به مدت دو هفته قرار گرفتند. گروه C و D به مقدار مساوی نرمال‌سالین دریافت داشتند. در پایان دوره‌ی درمانی وزن و قند خون موش‌ها صحرایی کنترل و یادداشت شد. موش‌های صحرایی با استفاده از کلروفرم بیهوش و کشته شده، مجموعه‌ی آن‌ها در طول خط وسط باز و مغز موش‌های صحرایی خارج و وزن شد و روی تخته‌ی برش یخ بسته (Ice-cooled) قرار داده شد و پرده‌های مننژ به دقت برداشته شد و سپس هیپوکامپ به دقت تشریح و جدا شده و به تانک ازت مایع متقل و در دمای -70°C درجه‌ی سانتی‌گراد جهت استخراج پروتئین، DNA، RNA و آزمایش‌های دیگر ذخیره گردید.

استخراج RNA تام و ساخت cDNA: RNA تام ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی با استفاده از کیت استخراج

RNA (رژش، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (فرمتاز، لیتوانی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از RNA تام ساخته شد و cDNA ساخته شده برای استفاده‌ی بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - نسخه‌برداری معکوس نیمه‌کمی به طور هم‌زمان (RT-PCR): برای تعیین میزان mRNA

ژن‌های Bcl-2, Bcl-x_L و Bax واکنش RT-PCR نیمه‌کمی مولتی‌پلکس انجام شد. مخلوط RT-PCR (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی بافر Qiagen Multiplex PCR 2x Qiagen, Germany، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های Bcl-2, Bcl-x_L و Bax، هم‌چنین ۱۰ پیکومول از پرایمر ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های Bcl-2, Bcl-x_L و Bax و GAPDH

اندازه‌ی قطعه	پرایمرها	ژن‌ها
۲۲۸ bp	F: 5'-CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG-3'	Bcl-2
	R: 5'-GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG-3'	
۳۵۷ bp	F: 5'-AGG CTG GCG ATG AGT TTG AA-3'	BCL-XL
	R: 5'-TGA AAC GCT CCT GGC CTT TC-3'	
۲۶۳ bp	F: 5'-TTC ATC CAG GAT CGA GCA GA-3'	Bax
	R: 5'-GCA AAG TAG AAG GCA ACG-3'	
۴۶۱ bp	F: 5'-GGC CAA GAT CAT CCA TGA CAA CT-3'	GAPDH
	R: 5'-ACC AGG ACA TGA GCT TGA CAA AGT-3'	

واکنش PCR جهت تکثیر ژن Bax با شرایط دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و طی ۴۰ سیکل (دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) انجام شد. سپس در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت. واکنش PCR برای ژن‌های Bcl-2 و Bcl-x_L با شرایط دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، طی ۵ سیکل (دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۲۵ سیکل (دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه با استفاده از دستگاه

Corbett Research Thermocycler (سیدنی، استرالیا) انجام شد. شرایط PCR به گونه‌ای پایه‌ریزی شده بود که در طی سیکل‌های انجام شده تکثیر کنترل داخلی نیز در فاز تصاعدی باشد و در تکثیر قطعات با پرایمرهای ژن‌های اختصاصی رقابت نداشته باشد. سپس ۵ میکرولیتر از محصول نهایی تکثیر هر نمونه روی یک ژل آگارز ۳ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. در پایان باندها با استفاده از دستگاه Bioimaging System (Syngene, UK) مشاهده و عکسبرداری شدند. دانسیتومتری باندها با استفاده از نرم‌افزار Kodack 1.D (UK) در مقایسه با باندهای ژن GAPDH انجام شد.

وسترن بلائینگ: برای استخراج پروتئین و انجام وسترن بلائینگ، بافت هیپوکامپ ذخیره شده در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ابتدا با استفاده از بافر لیزکننده (۵۰ Tris-HCl)

معنی‌دار در نظر گرفته شده است. از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۱/۵) برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

تغییرات قند و وزن: میزان قند خون موش‌های صحرایی دیابتی سه روز بعد از تزریق استرپتوزوسین برابر یا بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است. در پایان دوره‌ی درمانی میزان قند خون موش‌های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D به طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافته بود ($P < 0/001$). در ابتدا هر پنج گروه وزن تقریباً یکسانی داشتند. در پایان هفته‌ی ششم وزن موش‌های صحرایی گروه‌های دیابتی به طور قابل‌ملاحظه‌ای نسبت به گروه C کاهش یافته بود ($P < 0/01$). همچنین در پایان دوره‌ی درمانی وزن موش‌های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D به طور معنی‌داری ($P < 0/01$) افزایش یافته بود. اختلاف معنی‌داری بین وزن موش‌های صحرایی گروه AA و D و همچنین گروه I و I+AA وجود نداشت (به ترتیب $P = 0/2$ و $P = 0/8$).

RT-PCR: با توجه به اهمیت Bcl-2، Bcl-x_L و Bax در تنظیم مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده، اثرات انسولین و ویتامین C بر روی بیان ژن و مقدار پروتئین این مولکول‌ها تعیین شد. با استفاده از RT-PCR نیمه‌کمی مولتی‌پلکس مشخص شد که میزان mRNA ژن Bax در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه D نسبت به موش‌های صحرایی گروه C افزایش داشته ($P < 0/001$) (شکل‌های ۱A) و میزان mRNA ژن‌های Bcl-2 و Bcl-x_L در موش‌های صحرایی گروه D نسبت به گروه C کاهش داشته است (به ترتیب $P < 0/01$ و $P < 0/001$) (شکل‌های B، C). به علاوه میزان mRNA ژن Bcl-2 و Bcl-x_L در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA بعد از دو هفته تیمار با انسولین و اسیداسکوربیک نسبت به موش‌های صحرایی گروه D به طور

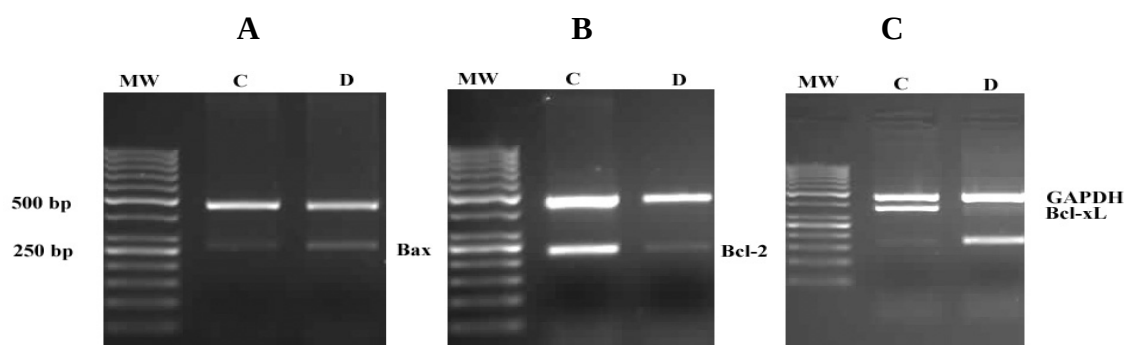
میلی‌مولار ۴/۷= pH، NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار، تریتون ۱۰۰-X و قرص (protease inhibitor cocktail (رژ، آلمان) هموژنیزه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی آن برداشته شد و با استفاده از معرف برادفورد غلظت پروتئین آن تعیین گردید. حدود ۵۰ میکروگرم از هر نمونه پروتئین استخراج شده پس از مخلوط کردن با بافر نمونه‌گذاری (Loading) و جوشاندن به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل چاهک‌های تعبیه شده داخل ژل ریخته شد و توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید (SDS-PAGE) (۱۲/۵ درصد باند‌های پروتئینی تفکیک و الکتروفورز بر اساس روش غیرمستمر (Laemmli) انجام شد (۲۶).

پس از الکتروفورز، باند‌های پروتئینی حاصل به روش الکتروترانسفر به غشای پلی‌وینیلیدین‌دی‌فلوراید (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA) منتقل شدند. غشای بلات شده با استفاده از کوماسی بریلیان‌بلو رنگ‌آمیزی و رنگ‌زدایی شد (۲۷). وسترن بلاتینگ طبق دستورالعمل کیت AttoGlow Western Blot System (Biochain, USA) انجام شد. رقت آنتی‌بادی‌های Bcl-2، Bcl-x_L و Bax (Biovision, USA) به کار برده شده در ایمونوبلات به ترتیب عبارتند از: ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۵۰. در نهایت پس از مجاورت غشای بلات شده با سوبسترا، غشاء از سوبسترا خارج شد و مابین دو لایه سلفون قرار داده شد تا در داخل دستگاه UK, Syngene) Bioimaging System جهت مشاهده و عکسبرداری از باند‌های پروتئینی قرار بگیرد. سپس با روش کمی لومینیسانس از باند‌های پروتئینی در زمان ۵ دقیقه عکس گرفته شد.

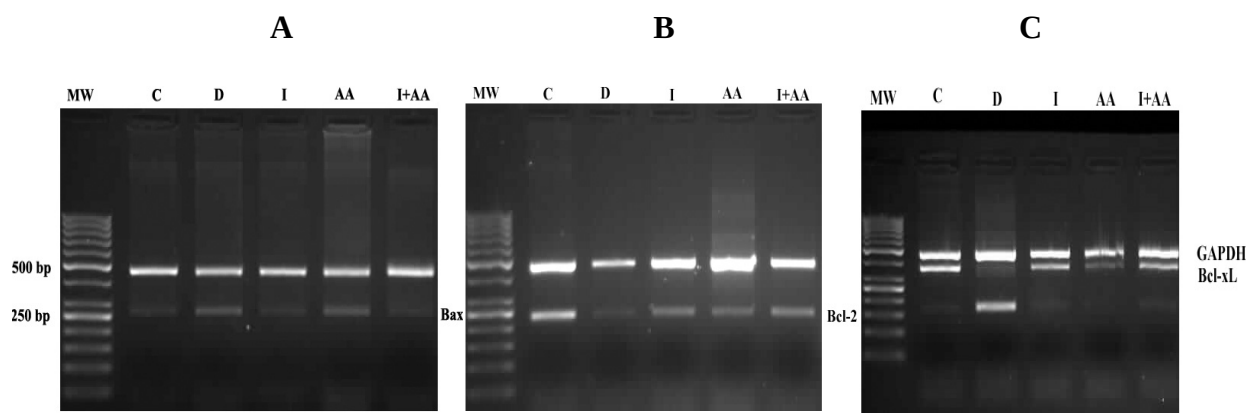
تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه، Tukey test و T-test student استفاده گردید. $P < 0/05$

وسترن بلا تینگ: در تأیید نتایج حاصل از RT-PCR، با استفاده از وسترن بلا تینگ پروتئین‌های Bcl-2، Bcl-x_L و Bax در نمونه‌های بافتی هیپوکامپ موش‌های صحرایی شناسایی شدند. مشخص شد میزان بیان پروتئین القاکننده‌ی آپوپتوز Bax در سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه D (شکل ۵A) نسبت به موش‌های صحرایی گروه C افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. در حالی که بیان پروتئین‌های مهارکننده‌ی آپوپتوز Bcl-2 و Bcl-x_L در موش‌های صحرایی گروه D نسبت به موش‌های صحرایی گروه C کاهش داشته است (شکل‌های B و C). میزان بیان پروتئین‌های مهارکننده‌ی آپوپتوز Bcl-2 و Bcl-x_L در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D افزایش داشته است ولی بین موش‌های صحرایی گروه I+AA، AA و I تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است (شکل‌های B و C). هم‌چنین میزان بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bax در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D کاهش داشته است ولی بین موش‌های صحرایی گروه I+AA، AA و I تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است (شکل ۶A).

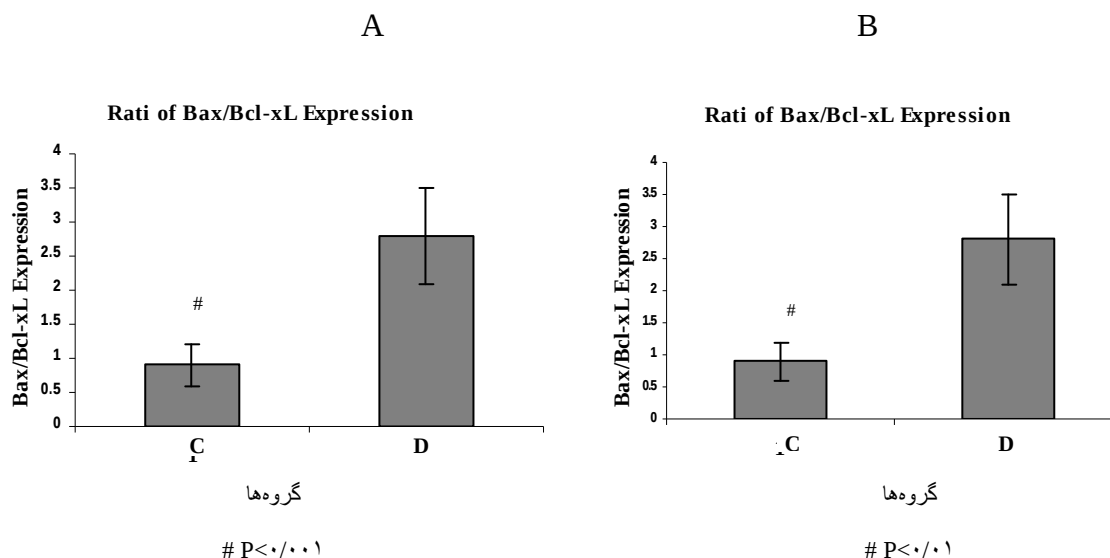
قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داد (برای گروه‌های I و I+AA $P < 0.001$ و برای گروه AA به ترتیب $P < 0.05$ برای Bcl-2 و $P < 0.01$ برای Bcl-x_L) ولی بین موش‌های صحرایی گروه I+AA و I این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل‌های B، C). میزان mRNA ژن Bax نیز در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D بعد از دو هفته تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک کاهش یافته بود (برای گروه‌های I و I+AA $P < 0.001$ و برای گروه AA $P < 0.01$) ولی بین موش‌های صحرایی گروه I+AA، AA و I این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل‌های ۲A، ۲B). در ضمن نسبت Bax/Bcl-x_L و Bax/Bcl-2 در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه D نسبت به موش‌های صحرایی گروه C افزایش یافته بود (به ترتیب $P < 0.01$ و $P < 0.001$) (شکل‌های A و B). هم‌چنین نسبت Bcl-2/Bax و Bcl-x_L/Bax در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D افزایش یافته بود (برای گروه‌های I و I+AA $P < 0.001$ و برای گروه AA به ترتیب $P < 0.05$ برای Bcl-2 و $P < 0.01$ برای Bcl-x_L) ولی بین موش‌های صحرایی گروه I+AA، AA و I این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل‌های A و B).



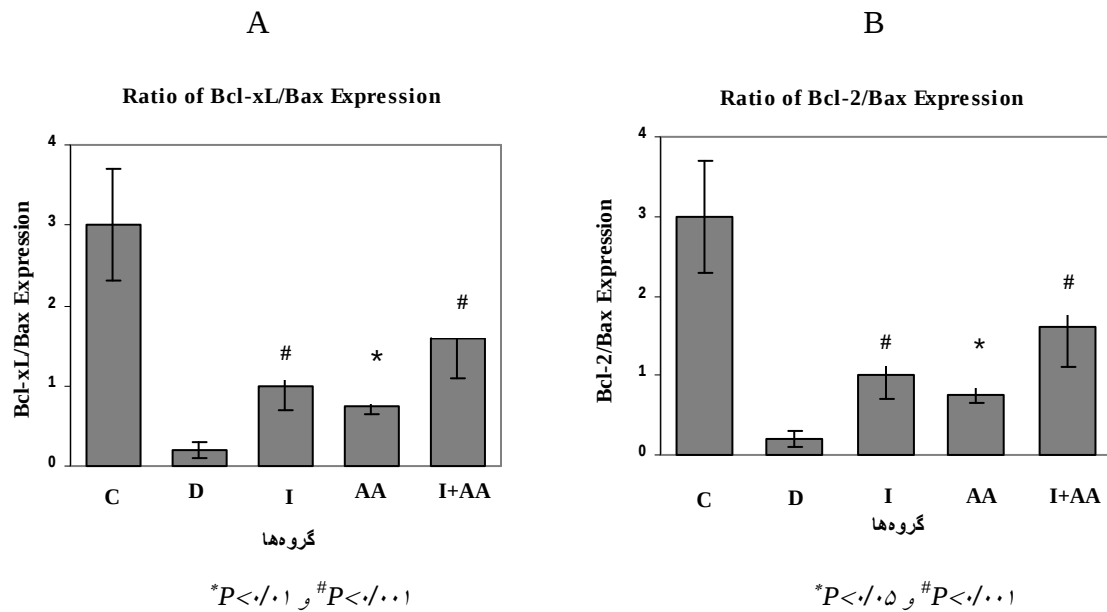
شکل ۱: RT-PCR نیمه کمی برای mRNA هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه کنترل (C) و دیابتی (D) در مورد ژن Bax، Bcl-2 و Bcl-x_L. (A) تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۲۶۳ bp) ژن Bax در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (B) تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۲۲۸ bp) ژن Bcl-2 در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (C) تکثیر قطعه‌ی اختصاصی (۲۵۷ bp) ژن Bcl-x_L در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (تعداد ۳ موش صحرایی در هر گروه) (MW= نشانگر وزن مولکولی استاندارد).



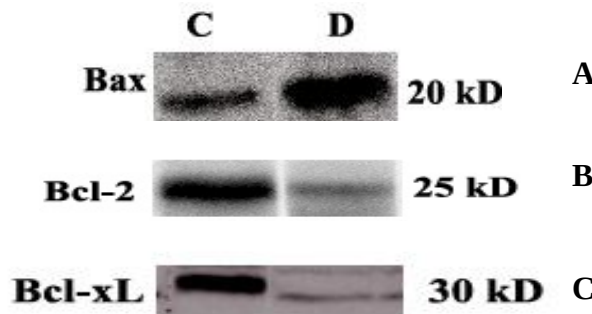
شکل ۲: RT-PCR نیمه کمی برای mRNA هیپوکامپ موش های صحرایی گروه کنترل (C)، کنترل دیابتی (D)، دیابتی تحت تیمار با انسولین (I)، اسیداسکوربیک (AA) و انسولین + اسیداسکوربیک (I+AA) در مورد ژن های Bax، Bcl-2 و Bcl-xL. (A): تکثیر قطعه ای اختصاصی (۲۶۳ bp) ژن Bax در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (B): تکثیر قطعه ای اختصاصی (۲۲۸ bp) ژن Bcl-2 در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (C): تکثیر قطعه ای اختصاصی (۳۵۷ bp) ژن Bcl-xL در مقایسه با GAPDH (۴۶۱ bp). (تعداد=۳ موش صحرایی در هر گروه) (MW= نشانگر وزن مولکولی استاندارد).



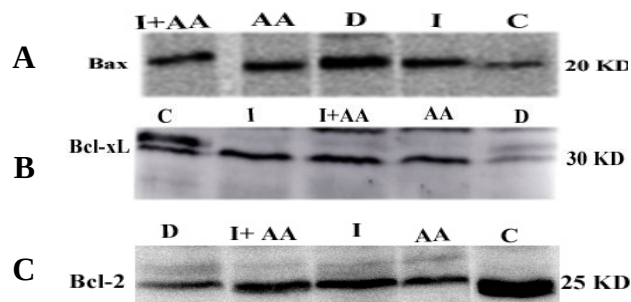
شکل ۳: نسبت Bax/Bcl-2 و Bax/Bcl-xL در سطح mRNA در هیپوکامپ موش های صحرایی گروه دیابتی (D) و گروه کنترل (C) پس از دانستیمتری باندها و نرمال سازی با ژن GAPDH. (A): نسبت Bax/Bcl-xL در مقایسه گروه C. (B): نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه C. داده ها به صورت $Mean \pm E.S.M$ بیان شده است (تعداد=۳ موش صحرایی در هر گروه).



شکل ۴: بررسی اثرات انسولین و اسید اسکوریک بر نسبت $Bcl-x_L/Bax$ و $Bcl-2/Bax$ mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه دیابتی تحت تیمار انسولین (I)، اسید اسکوریک (AA) و انسولین + اسید اسکوریک به صورت ترکیبی (I+AA) پس از دانسیومتری باندها و نرمال‌سازی با ژن $GAPDH$. A: نسبت $Bcl-x_L/Bax$ در مقایسه با گروه D؛ B: نسبت $Bcl-2/Bax$ در مقایسه با گروه D داده‌ها به صورت $Mean \pm E.S.M$ بیان شده است (تعداد=۳ موش صحرایی در هر گروه).



شکل ۵: وسترن بلائینگ هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه کنترل (C)، دیابتی (D)، دیابتی تحت تیمار انسولین (I)، اسید اسکوریک (AA) و انسولین + اسید اسکوریک (I+AA) در مورد پروتئین‌های Bax، Bcl-2، و $Bcl-x_L$. A: بیان پروتئین ۲۰ کیلو دالتون Bax . B: بیان پروتئین ۲۵ کیلو دالتون $Bcl-2$. C: بیان پروتئین ۳۰ کیلو دالتون $Bcl-x_L$. (تعداد=۳ موش صحرایی در هر گروه)



شکل ۶: وسترن بلائینگ هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه کنترل (C) و دیابتی (D) دیابتی تحت تیمار انسولین (I)، اسید اسکوربیک (AA) و انسولین + اسید اسکوربیک (I+AA) در مورد پروتئین‌های Bax، Bcl-2، Bcl-xL و Bcl-2. بیان پروتئین ۲۵ کیلودالتون Bcl-2 (B)، بیان پروتئین ۳۰ کیلودالتون Bcl-xL (C)، بیان پروتئین ۲۰ کیلودالتون Bax (A) (تعداد=۳ موش صحرایی در هر گروه)

بحث

حالی که mRNA و پروتئین ژن‌های Bcl-2 و Bcl-xL نسبت به موش‌های صحرایی گروه C کاهش داشته است. اگرچه در این خصوص مطالعه‌ی دیگری روی هیپوکامپ صورت نگرفته است اما مطالعاتی که بر روی نورون‌های گانگلیون ریشه‌ی خلفی نخاع و عصب سیاتیک صورت گرفته است نشان داده است، افزایش قندخون در موش‌ها صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین از طریق افزایش نسبت Bax/Bcl-2 سبب القای آپوپتوز می‌شود (۲۸)، هم‌چنین این افزایش نسبت در نورون‌های مغزی موش‌های صحرایی تازه متولد شده نیز نشان داده شده است (۲۹)، احتمالاً بالا بودن قند خون با افزایش میزان ROS، مکانیسمی را اعمال می‌کند که با فعال‌سازی پروتئین‌های کیناز فعال شده توسط میتوژن (MAP Kinas) باعث القای آپوپتوز می‌گردد (۳۰). هم‌چنین مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کنند، افزایش قند خون ممکن است از طرق تغییر جریان کلسیم روی نورون‌ها اثر بگذارد (۳۱).

بررسی اثرات انسولین و اسیداسکوربیک در پیشگیری از آپوپتوز سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی نشان داد که استفاده از انسولین و اسیداسکوربیک به تنهایی و نیز به صورت ترکیبی باعث افزایش میزان mRNA و پروتئین

نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش قندخون ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین از طریق افزایش بیان ژن پروآپوپتوزی Bax آپوپتوز را در ناحیه‌ی هیپوکامپ القا می‌کند، انسولین و اسید اسکوربیک نیز از طریق افزایش بیان ژن‌های ضدآپوپتوزی Bcl-2، Bcl-xL این پدیده را مهار می‌کنند. آپوپتوز یکی از فرآیندهای اصلی در نوروپاتی دیابتی است که به بالا بودن قند خون و استرس اکسداتیو نسبت داده می‌شود. به نظر می‌رسد سمیت سطح بالای گلوکز باعث القای آپوپتوز از طریق واکنش اختصاصی اکسیژن (Reactive Oxygen Species [ROS]) و تولید رادیکال‌های آزاد شود (۲۰)، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد افزایش قند خون در موش‌های صحرایی دیابتی همراه با افزایش نسبت Bax/Bcl-xL و Bax/Bcl-2 در نورون‌های هیپوکامپ است و به این ترتیب با افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوز و کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی مرگ سلولی در این سلول‌ها القا می‌شود. همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۵ نشان داده شده است mRNA و پروتئین ژن Bax در موش‌های صحرایی گروه دیابتی (D) نسبت به موش‌های صحرایی گروه کنترل C افزایش داشته در

ژن‌های Bcl-2 و Bcl-x_L و کاهش میزان mRNA و پروتئین Bax می‌گردد. در این راستا مطالعات دیگر نشان داده‌اند، استفاده از انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی به طور قابل ملاحظه‌ای میزان بیان پروتئین القای‌کننده‌ی آپوپتوز (Bax) را در سلول لوله‌های کلیوی کاهش می‌دهد (۳۲). احتمالاً استفاده از انسولین به وسیله‌ی جلوگیری از استرس‌های مختلف سبب پیشگیری از آپوپتوز در نورون‌ها می‌شود (۳۳، ۳۴).

از آن‌جا که جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ممکن است به وسیله‌ی مکانیسم‌های مولکولی متعددی نظیر نوروتروفین‌ها، سنتز فاکتور رشد، تعدیل بیان پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی آپوپتوز انجام شود (۳۵)، استفاده از انسولین که سبب تثبیت گلوکز خون می‌شود احتمالاً به عنوان یک عامل نوروتروفیک می‌تواند سبب محافظت نورون‌ها در برابر آپوپتوز شود. از طرف دیگر مشخص شده انسولین، پروانسولین، پپتید C و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF) اثر ضدآپوپتوزی دارند (۳۶، ۳۷) و درمان با انسولین نیز مستقل از تثبیت قند خون، سبب کاهش آپوپتوز می‌شود (۳۸-۴۱). انسولین اثرات ضدآپوپتوزی خود را از مسیر پیام‌رسانی وابسته به Raf-I که منجر به فعال‌سازی NF-BK از طریق مسیر Pi-3-Kinase می‌شود، اعمال می‌کند (۴۲، ۴۳).

مطالعات قبلی نشان داده است که انسولین از آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی و یا رده‌های سلولی سرطانی کارسینوما جلوگیری می‌کند (۱۹-۱۷). یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از اسیداسکوربیک نیز می‌تواند باعث افزایش میزان mRNA و بیان پروتئین‌های Bcl-2 و Bcl-x_L و کاهش میزان mRNA و بیان پروتئین Bax ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های پژوهش‌های قبلی در خصوص افزایش بیان ژن Bcl-x_L در سلول‌های سرطانی کولون انسانی از طریق تثبیت غشای میتوکندری (۴۴)، تطابق دارد. همسو با

این نتایج، اثر اسیداسکوربیک بر عملکرد Bcl-2، در سلول‌های اندوتلیال انسانی نیز مشاهده شده است (۴۵). علاوه بر مکانیسم فوق، مطالعات قبلی نشان داده‌اند اسیداسکوربیک ممکن است با مهار تولید ROS ناشی از دیابت که سبب مرگ نورون‌ها و سلول‌های نوروگلی می‌شود استرس‌اکسیداتیو را کاهش دهد (۴۶). معتقدند که اسیداسکوربیک عملکردهای حیاتی در مغز دارد و به عنوان یک کوفاکتور برای دوپامین β -هیدروکسیلاز عمل می‌کند و در بیوسنتز کاتکولامین دخالت می‌کند. اسیداسکوربیک هم‌چنین پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا را مهار می‌کند و رادیکال‌های آزاد در مغز را به دام می‌اندازد (۴۷، ۴۸). به طور مشابهی نشان داده شده است که اسیداسکوربیک می‌تواند آپوپتوز ناشی از سرب را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی در حال تکامل در دوران جنینی مهار کند (۴۹). از آن‌جا که بین نتایج به دست آمده از موش‌های صحرایی دیابتی تحت‌تیمار با انسولین و اسیداسکوربیک به تنهایی و به صورت ترکیبی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و در استفاده‌ی هم‌زمان این دو، اثر ضدآپوپتوزی آن‌ها تشدید نگردید و از طرفی مکانیسم‌های دقیق عملکرد اسیداسکوربیک و انسولین ناشناخته است، به نظر می‌رسد هر دو از مسیر مشابهی برای مهار آپوپتوز استفاده می‌کنند. این تحقیق بر اثر مشترک انسولین و اسیداسکوربیک در افزایش بیان پروتئین‌های مهارکننده‌ی آپوپتوز و کاهش بیان پروتئین‌های القاکننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ دلالت دارد. روشن شدن کامل مکانیسم‌های مشترک تأثیرگذاری انسولین و اسیداسکوربیک نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد انسولین و اسیداسکوربیک به تنهایی و به صورت ترکیبی احتمالاً می‌توانند از طریق افزایش میزان بیان ژن‌های Bcl-2 و Bcl-x_L و کاهش میزان

تقدیر و تشکر

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشته‌اند و همکاران بخش ایمنوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمنولوژی مخصوصا سرکار خانم مقدم، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

بیان ژن Bax، آپوپتوز را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی مهار کنند. مهار آپوپتوز احتمالا می‌تواند نقص در یادگیری و حافظه‌ی ناشی از تخریب هیپوکامپ را در دیابت کاهش دهد. به‌علاوه مطالعات آزمایشگاهی و کارآزمایی بالینی بیشتری برای حصول نتایج مطلوب و اثبات آن‌ها نیاز است که انجام شود.

منابع

- 1- Sreemantula S, Kilari EK, Vardhan VA, Jaladi R. Influence of antioxidant (L-ascorbic acid) on tolbutamide induced hypoglycemia/antihyperglycemia in normal and diabetic rats. *BMC Endocrine Disord.* 2005; 5(1): 2.
- 2- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047-53.
- 3- Harris RA. International review of neurobiology: Glucose metabolism in the brain. USA: Elsevier Science; 2002, 7(3): 293-4.
- 4- Larijani B, Khoramshahi Bayat M, khalili Gorgani M, et al. Association between depression and diabetes. *German J Psychiatry.* 2004; 7(3): 62-65.
- 5- Sima AA, Zhang W, Xu G, Sugimoto K, Guberski D, Yorek MA. A comparison of diabetic polyneuropathy in type-II diabetic BBZDR/Wor rats and in type I diabetic BB/Wor rats. *Diabetologia.* 2000; 43(6): 786-93.
- 6- Feldman EL, Stevens MJ, Russell JW, Greene DA. Somatosensory neuropathy. In: Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus. Porte D Jr, Sherwin RS, Baron A, editors. New York: McGraw Hill; 2002, 771-788.
- 7- Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* 2002; 946(2): 221-31.
- 8- Martinez Tellez R, Gomez-Villalobos MJ, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res.* 2005; 1048: 108-15.
- 9- Reagan LP, Magariños AM, McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 893: 126-37.
- 10- Reagan LP. Insulin signaling effects on memory and mood. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7: 633-7.
- 11- Sima AA, Nathaniel V, Bril V, McEwen TA, Greene DA. Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of Axo-glial dysjunction in human diabetic neuropathy. *J Clin Invest.* 1988; 81(2): 349-364.

- 12- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999; 399: 483–7.
- 13- Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*. 2000; 55(11): 1081-93.
- 14- Waldmeier PC, Tatton WG. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *Drug Discov Today*. 2004; 9(5): 210–18.
- 15- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381): 1305–8.
- 16- Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin. *Brain Res*. 1998; 800(1): 125-35.
- 17- Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992; 70: 31-46.
- 18- Merlo GR, Basolo F, Fiore L, Lynes NE. p53-Dependent and p53- independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *J Cell Biol*. 1995; 128(6): 1185-96.
- 19- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318(20): 1315–1321.
- 20- Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol*. 1999; 375: 217–23.
- 21- Desco MC, et al Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*. 2002; 51(4): 1118-24.
- 22- Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997; 46: 38-42.
- 23- Will JC, Byers T. Dose diabetes mellitus increase the requirement for vitamine C? *Nutr Rev*. 1996; 54: 193-202.
- 24- Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Arslan O, Aksoy S. Beneficial effects of vitamin C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutrition Res*. 2005; 25: 625-30.
- 25- Ozkan Y, Yilmaz O, Oztürk AI, Erşan Y. Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and alpha-lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. *Cell Biol Int*. 2005; 29: 754-60.
- 26- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- 27- Wong C, Sridhara S, Bradwell JCA, Jakob U. Heating greatly speed coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*. 2000; 28(3): 426-32.

- 28- Schmeichel AM, Schmetzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2003; 52(1): 165–171.
- 29- Chang SF, Sun YY, Yang LY, et al. Bcl-2 gene family expression in the brain of rat offspring after gestational and lactational dioxin exposure. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1042: 471-80
- 30- Alen DA, Yaghoob MM, Harwood SM. Mechanism of high glucose induced apoptosis and its relationship to diabetic complication. *J Nutr Bioche*. 2005; 16: 705-713.
- 31- Nobuhisa M, Hideyuki Y, Hitoshi I, et al. Altered bcl2 and bax expression and intracellular Ca signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose induced insulin secretion. *Endocrinology*. 1998; 139(3): 1429-39.
- 32- Kumar D, Zimpelmann J, Robertson B, Burns KD. Tubular and Interstitial Cell Apoptosis in the Streptozotocin-Diabetic Rat Kidney. *Nephron Exp Nephrol*. 2004; 96(3): 77-88.
- 33- Kooijman R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17(4): 305-23.
- 34- Russell JW, Windebank AJ, Schenone A, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I and insulin prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Neurobiol*. 1998; 36(4): 455–67.
- 35- Kajta M. Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. *Pol J Pharmacol*. 2004; 56: 689-700.
- 36- Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose induced apoptosis In SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003; 19(5): 375-87.
- 37- Lee-Kwon W, Park D, Basker PV, Kole S, Bernier M. Antiapoptotic signaling by the insulin receptor in chinnese hamster ovary cells. *Biochemistry*. 1998; 37(45): 15747-57.
- 38- Leffler M, Hrach T, Stuerzi M, et al. Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages. *J sur Res*. 2007; 143(2):398-406.
- 39- Yun Z, Takagi M, Yoshiba T. Repeated addition of insulin for dynamic control of apoptosis in serum-free culture of Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*. 2003; 96(1): 59-64.
- 40- LeRoith D, Werner H, Faria TN, Kato H, Adamo M, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function. *Ann NY Acad Sci*. 1993; 692: 22–32.
- 41- Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez GP, Chowen JA, coitia IA. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol*. 2000; 29: 425–37.
- 42- Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997; 275: 661–5.

- 43- Orike N, Middleton G, Borthwick E, et al. Role of PI 3-kinase, Akt and Bcl-2-related proteins in sustaining the survival of neurotrophic factor-independent adult sympathetic neurons. *J Cell Biol.* 2001; 154: 995–1006.
- 44- Wenzel U, Nickel A, Kuntz S, Daniel H. Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis.* 2004; 25(5): 703-12.
- 45- Haendeler J, Zhiher AM, Dimmeler S. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur J Pharmacol.* 1996; 317: 407–11.
- 46- Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Prac.* 1999; 45: 137-46.
- 47- Hosoya K, Minamizono A, Katayama K, Terasaki T, Tomi M. Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood–retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1232-9.
- 48- Agus DB. Vitamin C crosses the blood–brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest.* 1997; 100(11): 2842-8.
- 49- Han JM, Chang BJ, Li TZ, et al. Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain Res.* 2007; 1185: 68-74.

The Study of Effects of Insulin and Ascorbic Acid on Bcl-2 Family Expression in Hippocampus of Streptozotocin -Induced Diabetic Rats

Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour Sh, Haghir H, Bonakdaran Sh, Varasteh A

Corresponding Author's Address: Immuno-Biochemistry Lab, Immunology Research Center,

Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Email: varasteha@mums.ac.ir

Background and objective: Diabetes is a metabolic disorder that has been shown to adversely affect both the central and peripheral nervous system by increasing basal neuronal apoptosis. Since Bcl-2 protein family is considered to play a key role in the regulation of apoptosis, in the present study we have examined the effects of insulin and ascorbic acid on expression of Bcl-2 family members including Bax (pro-apoptotic) and Bcl-2 and Bcl-x_L (anti-apoptotic) on hippocampus of STZ-induced diabetic rats.

Materials and Methods: Five groups of six Wistar rats including one control group (C) and four diabetic groups (D, I, AA and I+AA) were used in this study. Diabetes was induced by injection of 60 mg/kg STZ (IP). After six weeks, rats in group I were treated with insulin (4-6 U/kg/day Sc), rats in group AA were treated with ascorbic acid (200 mg/kg/day IP) and rats in group I+AA were treated with equal dosage of both insulin and ascorbic acid for two weeks. Rats in group D were treated with normal saline and considered as diabetic control group. Two weeks after treatment, expression of Bcl-2, Bcl-x_L and Bax genes were measured at both mRNA and protein levels.

Results: In diabetic control rats (group D), Bax increased whereas Bcl-2 and Bcl-x_L decreased at both mRNA and protein levels compared to group C ($P<0.01$, $P<0.001$ respectively). Interestingly, treatment with insulin (group I), ascorbic acid (group AA) and insulin plus ascorbic acid (group I+AA) could reverse these changes both at mRNA and protein levels ($p<0.001$ for I and AA+I groups, $p<0.05$ (Bcl-2) and $p<0.01$ (Bcl-x_L) for AA group).

Conclusion: It is concluded that insulin and ascorbic acid alone or together can inhibit apoptosis in STZ-induced diabetic rats' hippocampus through increasing the ratio of Bcl-2/Bax and Bcl-x_L/Bax expressions. We suggest that inhibition of apoptosis may prevent cognitive dysfunctions induced by hippocampal damage in diabetic patients as well. In addition, further experimental studies will need to be performed to confirm such effects.

Key words: Apoptosis, Ascorbic acid, Insulin, Diabetes, Hippocampus, Bcl-2, Bcl-x_L, Bax