دانشگاه علوم پزشکی کرمان
حسب‌وارده تا کورداشی یکی
کتابخانه مرکزی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثرات آگونیست و آنتاگونیست microRNA-33 بر بیان AMPK، SIRT1 و SREBP-2 در مسیر AMPK-SIRT1 در کبد موش

توسط: بیداله شاهوزهی

استاد راهنما: دکتر غلامعباس محمدی

استاد مشاور: دکتر حسین فلاح

سال تحصیلی: ۱۳۹۷-۱۳۹۶

Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree PhD of Clinical Biochemistry

Title:

Effects of microRNA-33- agonist and - antagonist on AMPK, SIRT1 & SREBP-2 expression in AMPK-SIRT1 pathway in mice liver

By:

Beydolah Shahouzehi

Supervisor:

Dr. Gholamabbas Mohammadi

Advisor:

Dr. Hossein Fallah

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مرکز توسعه تحقیقات و کوردانش بیجی
کتابخانه مرکزی

Year: 2017-2018

چکیده:

مقدمه و اهداف: بیماریهای قلبی عروقی هنوز هم عامل اصلی مرگ و میر در سراسر دنیا به حساب می آیند. گیرنده های X کبدی (LXRs) و پروتئین های اتصالی عنصر تنظیم کننده ی استرول (SREBPs) نقش های مهمی در هوموستاز چربی بازی میکنند. LXR ها فعالیت SREBP را تحت تاثیر قرار داده و سنتز چربی و انتقال معکوس کلسترول (RCT) را افزایش میدهند. microRNA ها RNAهای کوچکِ درون زاد و غیرکد کننده هستند که نقش حیاتی در تنظیم متابولیسم و سایر جنبه های بیولوژی سلولی بازی میکنند. miR-۳۳ سبب کاهش بیان ژنهای AMPK، ABCA1 و CPT1 میشود. از طرف دیگر، SIRT1 از طریق داستیلاسیون قادر است فعالیت LXR و SREBP را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه ی حاضر اثر ترکیب آگونیست LXR همراه با miR-۳۳ mimic و یا مهار کننده ی miR-۳۳ را روی بیان AMPK، SIRT1، LXR-α، SREBPs و ABCA1 در کبد موش سوری بررسی کردیم.

روش: سی و شش سر موش سوری در ۶ گروه تقسیم شدند (۶ موش در هر گروه) و مدت تیمار ۷ روز بود. گروه یک غذای استاندارد، گروه دو 30 mg/kg/48h آگونیست LXR (T0901317)، گروه سه 1mg/kg/48h miR-33 mimic، و گروه چهار 1 mg/kg/48h mR-33 inhibitor دریافت کردند. گروه پنج ترکیب آگونیست LXR و miR-33mimic، و گروه شش ترکیب آگونیست LXR و مهار کننده ی miR-33 دریافت کردند. همه ی تیمارها بصورت تزریق داخل صفاقی انجام شدند. بعد از ۷ روز حیوانات سر بریده شده و نمونه سرم و بافت کبد جمع آوری گردید. میزان بیان miR-33 و ژنهای Abca1, AMPK, Lxr-α, Sirt1, Srebf2, Srebf1c با روش Real-timePCR تعیین گردید، و تغییرات میزان پروتئین های SREBP-2، SIRT1، LXR-α، AMPK و ABCA1 بوسیله ی روش وسترن بلاتینگ انجام شد. لیپیدهای سرم نیز با استفاده از روشهای آنزیمی اندازه گیری شدند.

یافته ها: نتایج ما نشان داد که T0901317 (گروه ۲)، مهارکننده ی miR-33 (گروه ۴) و ترکیب این دو (گروه ۶) بطور معنی داری سبب افزایش HDL-c سرم شد و miR-33mimic (گروه ۳) بطور معنی داری باعث کاهش آن گردید. در گروه ۲ که آگونیست LXR دریافت کرد، افزایش miR-33 و SREBP-2 مشاهده شد اما ترکیب آگونیست LXR و مهار کننده ی miR-33 بیان SREBP-2 و miR-33 را کاهش داد. T0901317 همچنین سبب کاهش بیان AMPK شد اما این تغییر معنی دار نبود.

مهار miR-33 و همچنین miR-33 mimic به طور معنی داری سبب، بترتیب افزایش و کاهش بیان AMPK شد. بیان SIRT1 در گروه های مورد مطالعه اختلاف معنی داری نشان نداد. یافته های ما نشان میدهند که فعال شدن LXR منجر به افزایش بیان LXR-α و ABCA1 شد و مهار miR-33 اثر افزاینده یT0901317 روی بیان LXR-α را برمیگرداند. T0901317 و ترکیب T0901317 همراه با miR-33 mimic بطور معنی داری بیان SREBP-1c را افزایش و مهارکننده ی miR-33 بیان ژن SREBP-1c را کاهش دادند. ترکیب T0901317 همراه با miR-33 mimic بطور معنی داری میزان تری گلیسرید سرم را افزایش دادند. علیرغم تغییر کلسترول در گروههای مورد مطالعه، این تغییرات معنی دار نبودند.

نتیجه گیری: علیرغم پیشرفتهای انجام شده در کشف داروها برای آترواسکلروز و بیماریهای متابولیک، این بیماریها به طور کامل کنترل نشده اند. به نظر میرسد یک اثر هم افزایی میان T0901317 و مهار miR-33 وجود دارد که غلظت تری گلیسرید و همچنین سطوح استرول داخل سلولی را کاهش داده و انتقال کلسترول به سلولهای کبدی را افزایش میدهد، از این رو ترکیب این دو به عنوان درمان جایگزین در مورد آترواسکلروز و بیماریهای قلبی عروقی میتواند مدنظر قرار گیرد. مطالعه ی حاضر در شرایط فیزیولوژیک انجام شد و با توجه به نتایج امیدوارکننده ی بدست آمده از تجویز همزمان آگونیست LXR و مهار miR-33 میتوان اثرات تجویز همزمان این دو را در مدل های حیوانی آترواسکلروتیک، دیابتی و همچنین در رت های چاق مورد مطالعه قرار داد.

کلمات کلیدی: آترواسکلروز، آگونیستLXR، miR-33، AMPK، SREBP، LXR-α

Abstract:

Background and objectives: Cardiovascular diseases (CVD) are still the leading cause of mortality and morbidity worldwide. Liver X receptors (LXRs) and sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) play an important role in lipid homeostasis. LXRs affect SREBPs and increase lipid synthesis and reverse cholesterol transport (RCT). MicroRNAs are endogenous, non-coding, short RNAs which play pivotal roles in regulating metabolism and other aspects of cell biology. MicroRNA-33 down regulates AMPK, ABCA1 and CPT1 mRNA. On the other hand, SIRT1 affects LXR and SREBP activity through deacetylation. In this study we evaluated effect of co-administration of miR-33 mimic, inhibitor and LXR activator on AMPK-SIRT1, LXR-α, SREBPs and ABCA1 expression in mice liver.

Materials and methods: Thirty six mice were divided into six groups (n=6) and the study duration was 7 days. Group I received standard chow without any treatment, group II received 30 mg/kg/48h LXR agonist (T0901317), group III received 1 mg/kg/48h "LNA miR-33 mimic", group IV received 1 mg/kg/48h "in vivo LNA anti-miR-33", group V received both T0901317 and "LNA miR-33 mimic", and group VI received both T0901317 and "in vivo LNA anti-miR-33". All treatments were administrated through i.p injection. After 7 days, mice were sacrificed and liver tissues were excised and blood samples were collected. miR-33, Abca1, AMPK, Lxr- α , Sirt1, Srebf2 and Srebf1c gene expression were quantified by real time PCR, and ABCA1, AMPK, LXR-α, SIRT1 and SREBP-2 protein expression by western blotting. Serum lipid profile also was measured. Serum lipid profile was assayed by enzymatic methods.

Results: Our results showed that T0901317, anti-miR-33 and co-administration of T0901317 and anti-miR-33 significantly increased HDL-c levels and miR-33 mimic significantly reduced it. T0901317 increased SREBP-2 and miR-33 levels but co-administration of T0901317 and anti-miR-33reduced srebf2 and miR-33 levels. AMPK was reduced by T0901317 insignificantly. Anti-miR-33 and miR-33 mimic significantly increased and decreased AMPK expression respectively. Sirt1 gene and protein expression remained unchanged in all six groups. Our results showed that LXR activation cause LXR-α and ABCA1 elevation and miR-33 inhibition attenuates T0901317 effect on LXR-α expression. T0901317 and combination of T0901317 and miR-33 mimic significantly increased and anti-miR-33 reduced SREBP-1c gene expression. T0901317 and combination of T0901317 and miR-33 mimic significantly increased TG levels.

Discussion: In spite of progress in drug discovery for atherosclerosis and metabolic diseases, these disorders are not fully controlled. It seem that there is a synergistic effect between T0901317 and anti-miR-33 which reduce serum TG levels, and also reduce intracellular sterol levels and increase cholesterol transport to hepatocytes, therefore this can be considered as a therapeutic alternative in atherosclerosis and cardiovascular diseases.

Key words: Atherosclerosis, LXR agonist, miR-33, AMPK, SREBP, LXR

بسمه تعالی

تاریخ .....:

شماره.....:

پیوست.....

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی **آقای بیداله شاهوزهی** دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته **بیوشیمی بالینی** دانشکده **پزشکی** دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان" اثرات آگونیست و آنتاگونیست miR-33 بر بیان AMPK، SIRT1 و SREBP2 در مسیر پیام رسانی AMPK-SIRT1 بر کبد موش " در ساعت ۹:۳۰ صبح روز شنبه مورخ **۹۶/۹/۱۱** با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف:استاد راهنما	**جناب آقای دکتر غلامعباس محمدی**	
ب: استاد مشاور	**جناب آقای دکتر حسین فلاح**	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	**جناب آقای دکتر غلامرضا اسدی کرم**	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	**جناب آقای دکتر احمد غلامحسینیان**	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	**جناب آقای دکتر حمید نمکی شوشتری**	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	**جناب آقای دکتر ارسطو بدویی**	
ه :نماینده تحصیلات تکمیلی	**سرکار خانم دکتر لادن لنگرودی**	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه ..... عالی ..... و نمره ..... ۱۸/۷۵ ..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور