ORIGINAL ARTICLE

Effect of Medium-Chain Triglycerides on Gene Expression of ATP-Citrate Lyase and H3K27ac in Developing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in an Animal Model

Monir Hassani Parvar[1],
Saeed Karima[2],
Majid Sirati-Sabet[3],
Afsaneh Goudarzi[2]

[1]Master Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 21, 2021 ; Accepted October 28, 2021)

Abstract

Background and purpose: Increase in ATP-dependent Citrate Lyase (ACLY) is observed in individuals with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). One of the compounds considered for the prevention of fatty liver is Medium chain triglycerides (MCT). In this study, the preventive effect of MCT on ACLY enzyme gene expression and the level of histone 3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) were investigated in an animal model.

Materials and methods: In this study, 18 male Wistar rats were divided into three groups: control (n=6), fructose-fed (n=6), and fructose+MCT (n=6). Six weeks after the initiation of diets, the mice were sacrificed. ACLY gene expression was measured by Real-time qPCR. Also, H3K27 acetylation was investigated by western blotting. Data were analysed by one-way analysis of variance.

Results: The liver index in mice fed with fructose+MCT showed a significant increase compared to those fed with fructose alone ($P<0.05$). Accumulation of triglyceride droplets in the slides prepared from the fructose+MCT group did not show significant changes compared to the fructose fed group ($P<0.05$). Fructose increased ACLY gene expression, but the changes were not found to be significant in the fructose+MCT group compared to the controls and fructose-fed group ($P<0.05$). Fructose+MCT significantly reduced the amount of H3K27ac compared to the control and fructose-fed groups ($P<0.05$).

Conclusion: The study showed that MCT alongside fructose is ineffective at preventing the development of non-alcoholic fatty liver.

Keywords: non-alcoholic fatty liver, ATP-dependent citrate lyase enzyme, medium chain triglycerides, Histone acetylation

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 11-22 (Persian).

* **Corresponding Author: Afsaneh Goudarzi-** School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: Afsaneh.goudarzi@sbmu.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 203 آذر سال 1400 (22-11)

تاثیر تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر بر میزان بیان ژن آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP و H3K27ac در ایجاد مدل حیوانی کبد چرب غیرالکلی

منیر حسنی پرور[1]
سعید کریما[2]
مجید سیرتی ثابت[3]
افسانه گودرزی[2]

چکیده

سابقه و هدف: افزایش آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP (ACLY)، در افراد با کبد چرب غیرالکلی(NAFLD) مشاهده شده است. یکی از ترکیباتی که امروزه جهت پیشگیری از کبد چرب مورد توجه قرار گرفته است، تاثیر تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر (MCT) می‌باشد. در این مطالعه تاثیر پیشگیرانه MCT بر روی تغییرات بیان ژن آنزیم ACLY و میزان استیلاسیون لیزین 27 هیستون 3 (H3K27ac) در مدل حیوانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه 18 سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار به سه گروه 6 تایی کنترل، تغذیه شده با رژیم فروکتوز و تغذیه شده با رژیم فروکتوز+MCT تقسیم شدند. پس از 6 هفته تغذیه با رژیم‌های ذکر شده، موش‌ها کشته شدند، بیان ژن آنزیم ATP سیترات لیاز با استفاده از روش Real-time qPCR ارزیابی شد. همچنین استیلاسیون H3K27 از طریق وسترن بلاتینگ بررسی شد. آنالیز واریانس یک‌طرفه با شرط P< 0/05 بکار گرفته شد.

یافته‌ها: ایندکس کبدی در موش‌های تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه فروکتوز افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0/05). میزان تجمعات قطرات تری‌گلیسرید در لام‌های تهیه شده از گروه تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز تغییر چشمگیری نداشت. اگرچه فروکتوز بیان ژن ACLY را افزایش داد، اما تغییرات بیان ژن ACLY در گروه تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز معنی‌دار نبود(P<0/05). فروکتوز+MCT، میزان H3K27ac را نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز به‌صورت معنی‌داری کاهش داد(P<0/05).

استنتاج: براساس یافته‌های مطالعه حاضر استفاده از MCT به همراه فروکتوز در پیشگیری از ایجاد کبد چرب غیرالکلی بی‌تاثیر است.

واژه های کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP، تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر، استیلاسیون هیستون

مقدمه

کبد چرب غیرالکلی یا NAFLD (Nonalcoholic Fatty Liver Disease) به صورت تجمع لیپید اضافی در کبد افرادی تعریف می‌شود که به وضوح بیماری کبدی ندارند و مصرف الکل روزانه‌شان کم‌تر از 30 و 20 گرم

مولف مسئول: افسانه گودرزی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی E-mail: Afsaneh.goudarzi@sbmu.ac.ir
1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1400/3/31 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1400/4/12 تاریخ تصویب :1400/8/6

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

به‌ترتیب در مردان و زنان است(1). به عبارت دیگر، NAFLD با تجمع مزمن لیپیدها (به خصوص تری‌گلیسریدها) که بیش‌تر از 5 تا 10 درصد از وزن کبد را در غیاب مصرف الکل اضافی تشکیل می‌دهد، مشخص می‌شود و به آسیب کبدی اشاره دارد که در انواع مختلفی از کبد چرب ساده تا سیروز پیشرونده دیده می‌شود(4-2). این بیماری به‌طور تیپیک بدون علامت و حتی ممکن است خوش‌خیم بوده و با کاهش وزن و ورزش برگشت‌پذیر باشد(6،5)، اما در 20 درصد افراد مبتلا شده یک استئاتوزیز ساده کبدی می‌تواند منجر به یک فرم شدید بیماری به نام NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) شود(9-6). لیپیدهای کبدی ممکن است از طریق مواد غذایی، استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد پلاسما (FFA) یا فرایند لیپوژنز دنوو هپاتوسیتی (De novo lipogenesis: DNL) حاصل شود. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که عامل اصلی در ایجاد کبد چرب غیرالکلی فرآیند DNL ست و دو عامل دیگر نقش اساسی ندارند(11،10،5). مشخصه NAFLD تجمع تری‌گلیسرید در سیتوپلاسم هپاتوسیت ها است که ناشی از عدم تعادل بین مقدار دریافتی (برداشت اسیدهای چرب و لیپوژنز دنوو) و مصرفی (اکسیداسیون میتوکندریایی اسید چرب و خروج به عنوان جزئی از ذره VLDL) تری‌گلیسرید است. NAFLD اغلب با چاقی و دیابت نوع دو (T2DM) به این علت که ویژگی‌های مشابه سندروم متابولیک مانند التهاب و مقاومت به انسولین را دارند، در ارتباط است(15-12). تحقیقات تجربی ثابت کرده‌اند که تری‌گلیسریدهای تجمع یافته در کبد افراد مبتلا به NAFLD از 3 منبع سرچشمه می‌گیرند: 59 درصد از تری‌گلیسریدهای داخل کبدی از اسید چرب در حال گردش، 26 درصد از لیپوژنز دنوو و 15 درصد از چربی مواد غذایی مشتق می‌شود(17،16). اگرچه تفاوت معنی‌داری بین میزان اسیدچرب آزاد شده از بافت چربی در کبد بیماران مبتلا به NAFLD با میزان اسید چرب آزاده شده از بافت چربی در کبد افراد سالم (کنترل) مشاهده نشده است اما میزان بیان ژن‌های دخیل در لیپوژنز دنوو، 3 برابر میزان بیان این ژن‌ها در نمونه‌های کنترل (افراد سالم) است(17،16). بنابراین این مسئله مارا به این مسیر سوق می‌دهد که افزایش لیپوژنز دنوو در هپاتوسیت‌ها، منبع اصلی تجمع تری‌گلیسریدها در کبد و بروز NAFLD است. با توجه به اثبات تجربی تاثیر لیپوژنز دنوو در تجمع تری‌گلیسریدها در بیماران مبتلا به NAFLD، جهت پیدا کردن راه حلی برای پیشگیری و درمان این اختلال کبدی نیاز است که ترکیبات با پتانسیل درمانی بر این اختلال را از جهت تاثیر آن بر مسیر لیپوژنز دنوو بررسی کنیم. فروکتوز به‌عنوان اصلی‌ترین منبع تامین سوبسترای لیپوژنز دنوو شناخته شده است. فروکتوز پس از ورود به سلول‌های انتروسیت، هپاتوسیت و سلول‌های توبولار کلیه شکسته شده و تریوز فسفات‌های دی‌هیدروکسی استون فسفات (DHAP) و گلیسرآلدئید 3-فسفات (GA3P) را تولید می‌کند. در ادامه GA3P می‌تواند سبب افزایش تولید اسید لاکتیک و افزایش گلوکونئوژنز شده و دی‌هیدروکسی استون فسفات نیز تولید گلیسرول 3-فسفات را افزایش می‌دهد(17). آنزیم ACLY یک آنزیم لیپوژنیک نوکلئوسیتوپلاسمی است که توانایی تولید استیل کوآ از سیترات را در هسته و سیتوپلاسم دارد(18). با توجه به اینکه لیپوژنز دنوو یک فرآیند شیمیایی سنتز اسیدهای چرب از استیل کوآ است، بنابراین مهار آنزیم ACLY می‌تواند نقش کلیدی در مهار پروسه لیپوژنز دنوو داشته باشد(20،19). بررسی‌ها در مدل حیوانی رت نشان داده است که مهار آنزیم ACLY توسط هیدروکسی سیترات (HCA)، سنتز اسیدچرب، کلسترول و متعاقبا میزان تری‌گلیسرید و کلسترول پلاسما را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد. همچنین پس از مهار این آنزیم توسط مهارکننده رقابتی کاهش چشمگیری در وزن رت‌ها مشاهده شده است. دست یافتن به این اطلاعات ما را به سمت این فرضیه سوق می‌دهد که احتمالا مهار آنزیم ACLY بتواند به عنوان یک

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

هدف پیشگیری و درمانی برای کبدچرب، دیس لیپیدمیا و چاقی در نظر گرفته شود(23-21). به عنوان مثال در تحقیقات تجربی که موش‌ها در دو گروه با رژیم پرچرب و کم چرب تغذیه شده بودند، Knock down آنزیم ACLY توسط آدنوویروس‌ها، مقدار استیل کوآ و مالونیل کوآی (مقدار این محصولات توسط روش HPLC اندازه‌گیری شدند) هپاتوسیت‌ها (در هر دو گروه رژیم کم چرب و پرچرب) و به‌دنبال آن سطح تری‌گلیسرید و اسیدچرب آزاد (به دلیل کاهش لیپوژنز دنوو) را به‌طور چشمگیری کاهش داد(19). امروزه فروکتوز به عنوان قند لیپوژنیک شناخته شده است و تجزیه آن منجر به تولید متابولیت‌های DHAP و GA3P می‌شود که متابولیت‌های ذکر شده سبب تحریک فاکتورهای رونویسی SREBPc1[1] و ChREBP[2] می‌شود. SREBPc1 و ChREBP بیان ژن آنزیم‌های دخیل در لیپوژنز دنوو که شامل ACLY، FASN[3]، ACACA[4] و آسیل ترانسفرازها هستند را افزایش می‌دهد و همان‌طورکه پیش‌تر ذکر شد ACLY با افزایش تولید استیل کوآنزیم آ در سیتوپلاسم و هسته به‌ترتیب تولید اسیدهای چرب و احتمالا استیلاسیون هیستون (H3K27ac) را افزایش می‌دهد(17). در پاسخ به مصرف کربوهیدرات، افزایش بیان آنزیم ACLY از طریق تولید بیش‌تر استیل کوآ، سنتز لیپید و استیلاسیون هیستون‌ها را میانجی‌گری کرده و در نتیجه میزان بیان ژن‌های دخیل در گلوکونئوژنز و لیپوژنز دنوو نیز افزایش می‌یابد(25،24،17). در آرابیدوپسیس نشان داده شده است که افزایش استیلاسیون لیزین 27 هیستون H3 (H3K27ac) وابسته به ACLY و هیستون استیل ترانسفراز GCN5 است(26). همچنین نشان داده شده است که هدف قراردان ACLY در *in vivo* و *in vitro* استیلاسیون لیزین 27 هیستون H3 (H3K27ac) راکاهش می‌دهد(27). تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر (MCT) شامل یک اسکلت گلیسرولی و سه زنجیره اسیدچرب با طول 6 تا 12 اتم کربن هستند(29،28). اسید کاپروئیک با 6 اتم کربن، اسید کاپریلیک با 8 اتم کربن، اسید کاپریک با 10 اتم کربن، اسید لوریک با 12 اتم کربن از انواع MCT هستند(30). امروزه از روغن MCT جهت پیشگیری از برخی اختلالات متابولیکی و التهابی مزمن مانند مقاومت به انسولین و چاقی استفاده می‌شود. همچنین به دلیل سرعت بالای جذب و اکسیداسیون این ترکیبات می‌توان از آن‌ها در تغذیه تزریقی بیماران (افرادی که امکان تغذیه دهانی ندارند) استفاده کرد(31). مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که مصرف ترکیبات MCT در انسان می‌تواند سبب افزایش مصرف انرژی، افزایش سیری و در نهایت تغییر ترکیبات بدن و کاهش وزن بدن شود. اثر MCT بر روی میزان تجمع چربی در کبد (استئاتوز) و مقدار تری‌گلیسرید وکلسترول کبدی در بازه‌های زمانی مختلف، متفاوت و همچنان قابل بحث است(29). همچنین، با توجه به یافته‌های مختلف، تجویز MCT به منظور کاهش وزن در انسان متفاوت است(29). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که از MCT به مدت 8 هفته به منظور پیشگیری از کبد چرب استفاده شده بود، اثرات حفاظتی MCT با بهبود پروفایل لیپیدی سرم، کاهش کلسترول تام کبدی و کاهش وزن بدن مشاهده شد(32). درحالی که برخی مطالعات دیگر نشان داده‌اند که مصرف طولانی مدت MCT با دوز بالا علی‌رغم کاهش تجمع چربی بدن و مقاومت به انسولین، اثرات مخربی روی کبد داشته است. به‌طور مثال، تجویز MCT به همراه فروکتوز به‌مدت 12هفته (مدت طولانی) سبب افزایش تری‌گلیسرید و کلسترول کبدی و استئاتوزیز شده است(31،29). با توجه به مطالبی که بیان شد و عدم درمان قطعی و مشخص برای کبد چرب و تناقض‌های مشاهده شده در ارتباط با مصرف MCT، یافتن راه حلی جهت پیشگیری از کبد چرب و شواهدی در ارتباط با آشکار ساختن نقش حفاظتی و یا مضر MCT به همراه فروکتوز بسیار ضروری است. بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی

1. Sterol regulatory element-binding protein c1
2. Carbohydrate response element binding protein
3. Fatty Acid Synthase
4. Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

تاثیر پیشگیرانه MCT به همراه فروکتوز بر روی تغییرات بیان آنزیم لیپوژنیک ACLY و میزان H3K27ac در مدل حیوانی است.

مواد و روش ها

گروه بندی تحقیق

18 سر رت نر به صورت تصادفی، به 3 گروه 6تایی تقسیم و در قفس‌های پلی‌استیرن قرار گرفتند. اصول نگهداری این حیوانات براساس قوانین بین‌المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و به تصویب کمیته اخلاق (IR.SBMU.MSP.REC.1399.314) دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید. گروه‌ها شامل، گروه 1 (شاهد سالم)، گروه 2 (تغذیه با رژیم غنی از فروکتوز) و گروه 3 (تغذیه با رژیم غنی از فروکتوز به همراه تیمار با MCT) یا گروه پیشگیری از کبد چرب بود.

روش القای کبد چرب غیر الکلی

طبق مطالعات، حدود مدت زمان مورد نیاز برای القای کبد چرب در مدل موش‌های صحرایی، به مدت 5 هفته می‌باشد(33). میزان مصرفی روغن MCT با مشاوره یک متخصص تغذیه، در گروه های پیشگیری به میزان 35 درصد انرژی روزانه محاسبه شد. روغن به صورت گاواژ به رت‌ها داده شد. رت‌ها تقریبا 15 گرم در روز خوراک مصرف می‌کنند. بنابراین با محاسبه انرژی 15 گرم خوراک بر اساس جدول رژیم غذایی، مقدار انرژی کل در 15 گرم از رژیم محاسبه شد. سپس با محاسبه 35 درصد انرژی روزانه، میزان مصرف روغن MCT، 2/22 میلی‌لیتر برآورد شد.

جمع‌آوری نمونه

در پایان دوره، برای جراحی، رت‌ها به مدت 8 ساعت در حالت ناشتا قرار گرفتند. سپس به وسیله کتامین زایلازین بیهوش شدند (لازم به ذکر است که قبل از کشتن رت‌ها وزن آن‌ها ثبت شد). پس از بیهوشی کامل، جراحی انجام شد. سپس با سرم فیزیولوژی عمل پرفیوژن انجام شد و بافت کبد حیوان استخراج گردید. بافت کبد بلافاصله وزن شد و پس از آن به 3 قسمت تقسیم شد. بخش اول داخل فالکون حاوی فرمالین 10 درصد قرار گرفت. بخش دوم و سوم جهت استخراج RNA و پروتئین، به فریزر 80- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

ارزیابی ایندکس کبدی

ایندکس کبدی شاخصی از میزان استئاتوزیز کبدی است که به صورت نسبت وزن کبد به وزن موش × 100 محاسبه می‌شود. جهت محاسبه ایندکس کبدی در طی 6 هفته‌ای که رت‌ها تغذیه شدند، هفته‌ای یک مرتبه (آخر هفته) وزن‌کشی شدند. درهفته ششم پس از کشتن رت‌ها وزن کبد آن‌ها اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که به هنگام محاسبه ایندکس کبدی، وزن هفته آخر از وزن هفته اول کم شد (به این عمل total body weight increment گفته می‌شود) و سپس طبق فرمول وزن کبد رت‌ها بر وزن به‌دست آمده تقسیم و در 100 ضرب شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژی

بافت‌های کبدی داخل فرمالین فیکس و در پارافین قالب‌گیری شدند، سپس برش‌های بافتی با ضخامت 5 میکرون تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد(34). برش بافتی بر روی لام فیکس شد و دو مرتبه در زایلول، هر بار به‌مدت 10 دقیقه برای پارافین‌زدایی، قرار داده شد. سپس لام، در سیر نزولی الکل شامل اتانول مطلق، اتانول 96 درصد، اتانول 70 درصد و آب مقطر، هر کدام به مدت 5 دقیقه به منظور آبدهی، قرار گرفت. لام آبدهی شده، در رنگ هماتوکسیلین، به مدت 6 دقیقه برای رنگ‌آمیزی هسته، قرار داده شد. سپس در آب جاری، به مدت 5 دقیقه برای شست و شو، قرار گرفت. سپس لام در رنگ ائوزین به مدت 3 دقیقه جهت رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم، قرار داده شد. فرآیند آب گیری با استفاده از سیر صعودی الکل شامل اتانول

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

70 درصد، اتانول 96 درصد و اتانول مطلق، هر کدام به مدت 1 دقیقه انجام شد. لام دو مرتبه در زایلول برای شفاف‌سازی، هر بار به مدت 5 دقیقه قرار گرفت. در نهایت بر روی لام کمی انتالن ریخته و بر روی قسمت برش بافت، لامل قرار داده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری از نظر رسوب چربی بررسی شدند.

نحوه اندازه‌گیری بیان ژن

استخراج RNA

استخراج RNA از بافت کبد توسط کیت ViraGene انجام شد. بدین‌منظور، ابتدا به میزان حداکثر 10 میلی‌گرم از بافت کبد برداشته شد و 400 میکرولیتر از Cell Lysis Buffer به بافت اضافه و سپس با سرنگ هموژن شد. میکروتیوب حاوی هموژن بافت کبدی، به مدت 2 دقیقه با دور 12000 rpmدر دمای 4 درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت به میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتر RNase free، دیگری اضافه شد. به ازای نصف حجم آن الکل مطلق اضافه شد. 600 میکرولیتر از این مخلوط برداشته و به ستون استخراج، اضافه شد. ستون استخراج، به مدت 30 ثانیه با دور 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس مایع جمع شده در زیر ستون استخراج، دور ریخته و ستون با Wash Solution A و Wash Solution B شستشو شد. سپس ستون استخراج در یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتر RNase free دیگری، قرار داده شد. به ستون 100-50 میکرولیتر از Elution Buffer اضافه شد. ستون به مدت 1 دقیقه با دور 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع زیر ستون استخراج، حاوی RNA می‌باشد. برای بررسی خلوص RNA استخراج شده جهت نشان دادن حضور RNA و آلودگی احتمالی با DNA و پروتئین از نسبت جذب 260/280 و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از 1 میکروگرم RNA، طبق پروتکل کیت Solis BioDyne انجام شد.

Real time-qPCR

بیان ژن ACLY با استفاده از مسترمیکس سایبرگرین Ampliqon و روش RT-qPCR اندازه‌گیری شد(35). توالی پرایمرها در جدول شماره 1 ارائه شده است. برنامه RT-qPCR شامل سیکل اول: 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، سیکل دوم: 15 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، سیکل سوم: 20 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و سیکل چهارم: 25 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (سیکل‌های دوم تا چهارم 40 مرتبه تکرار شدند). از بتا 2 میکروگلوبولین (B2M) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت کمی‌سازی بیان نسبی ژن ACLY از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

جدول شماره 1: توالی و خصوصیات پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	طول محصول
ACLY	F:ACCCAGAGGAAGCCTACATTGC	22	169
	R: TTCGCCAGTTCGTTGACACC	20	
B2M	F: TGCTTGCCATTCAGAAAACTCC	22	111
	R: TTTGAGGTGGGTGGAACTGAG	21	

وسترن بلاتینگ

استخراج هیستون ها

به منظور بررسی میزان H3K27ac، 100 میلی‌گرم از بافت کبد توسط ترازو وزن شد و پس از آن داخل هموژنایزر در حالی که 500 میکرولیتر بافر لیز RIPA به همراه مهارکننده پروتئاز اضافه شده بود، هموژن شد. محلول به‌دست آمده پس از هموژن کردن بافت، 3 مرتبه با زمان‌های 20 ثانیه، 15 ثانیه و 10 ثانیه با استفاده از دستگاه سونیکاتور، سونیکیت شد. سپس، هموژن به‌دست آمده به مدت 15 الی 20 دقیقه روی یخ نگه داشته شد. بعد از طی این زمان پروتئین تام توسط یک لایه گاز استریل صاف شد و در دور 1000 g به‌مدت 4 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ با 100 µl از بافر لیز RIPA شسته شد. 200 µl از H2SO4 با غلظت 0/2 مولار به بافت هموژن شده اضافه شد و به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به‌مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

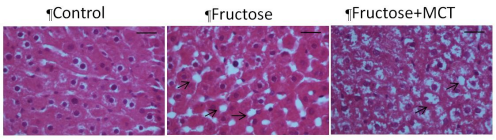
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

در دور 1200 g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا شد و 20TCA درصد جهت رسوب پروتئین‌ها به‌صورت قطره قطره به آن اضافه شد. سپس، 30 دقیقه روی یخ نگه‌داشته شد تا تمام پروتئین‌ها رسوب کنند. میکروتیوب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 10 دقیقه در دور 16000 g سانتریفیوژ و رسوب آن توسط مخلوط 0/1 Aceton/HCl درصد شسته شد. در انتها، پس از خالی کردن محلول شستشو، بر روی رسوب به‌دست آمده 30 µl اوره 8 مولار اضافه گردید. هیستون‌های استخراج شده تا زمان استفاده در 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(34). به منظور مطالعه H3K27ac، وسترن بلات انجام شد. 20 میکروگرم هیستون استخراج شده از نمونه‌های مربوط به گروه‌های کنترل، تغذیه شده با فروکتوز، تغذیه شده با فروکتوز +MCT الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز ژل از تانک خارج و پروتئین‌ها بر روی غشای نیتروسلولز منتقل شدند. سپس بسته به آنتی‌بادی مورد استفاده، غشا توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) یا شیر خشک بدون چربی (SkimmedMilk) بلاک شد. 3 میلی‌لیتر از آنتی‌بادی اولیه (H3K27ac) رقیق شده در Milk 5 درصد یا BSA 5 درصد (بسته به نوع آنتی‌بادی) تهیه گردید و داخل ظرف ریخته شد و سپس ظرف حاوی غشا و آنتی‌بادی اولیه رقیق شده در Cold chamber دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب (overnight) برروی stirrer قرار داده شد. سپس3 میلی‌لیتر از آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده (حاوی 3 میکرولیتر از Anti-Rabbit به عنوان آنتی‌بادی ثانویه در 3 میلی‌لیتر Blocking) اضافه شد و غشا به‌مدت 45 دقیقه برروی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. سپس آنتی‌بادی ثانویه برداشته شد و غشا در 3 مرحله، هر بار به مدت 10دقیقه با TBS-T شست و شو داده شد. ECL بر روی غشا ریخته شد و سیگنال به دست آمده بر روی فیلم رادیوگرافی ظاهر شد(34). از آنتی‌بادی H3 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

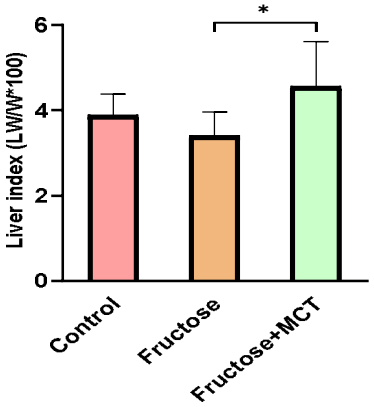
یافته ها

- یافته های ایندکس کبدی

لام‌های تهیه شده از بافت‌های کبد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین تجمع تری‌گلیسرید را در گروه تغذیه شده با فروکتوز و فروکتوز +MCT نشان داد، در حالی که در گروه کنترل تجمع قطرات تری‌گلیسرید مشاهده نشد (تصویر شماره 1). ایندکس کبدی رت‌هایی که با فروکتوز +MCT در فاز پیش‌گیری تغذیه شده بودند نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$)، حال آن که انتظار می‌رفت میزان ایندکس کبدی پس از مصرف MCT با فروکتوز (پیشگیری از NAFLD) کاهش یابد (نمودار شماره 1).



تصویر شماره 1: مقایسه استئاتوزیز کبدی بین گروه‌های کنترل، فروکتوز و فروکتوز+MCT با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. حباب های سفید، لیپیدها هستند که با پیکان نشان داده شده اند (بزرگ‌نمایی 40X). Scale bar: 10µm.

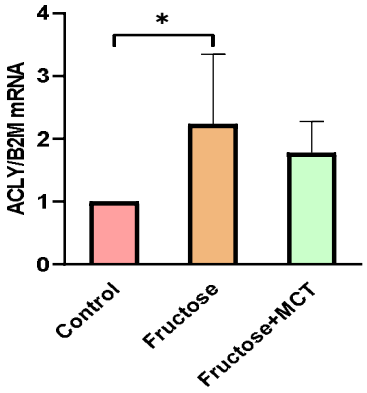


نمودار شماره 1: مقایسه تغییرات ایندکس کبدی بین گروه های کنترل (n=6)، فروکتوز (n=6) و فروکتوز+MCT (n=6). نمودار بر اساس میانگین ± خطای استاندارد رسم شده است $p < ۰/۰۵$ *

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

- *یافته‌های بیان ژن ACLY*

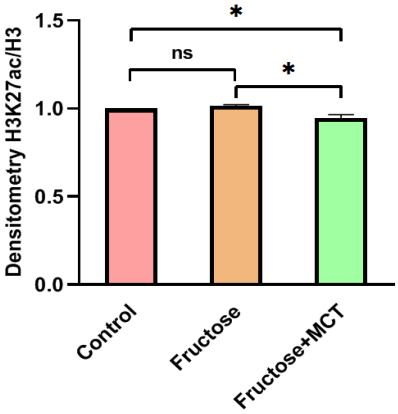
اندازه‌گیری بیان ژن ACLY در بافت کبد سه گروه رت (کنترل، تغذیه شده با فروکتوز، تغذیه شده با فروکتوز+MCT) صورت گرفت که با نرمال‌سازی داده‌ها به‌وسیله میزان بیان ژن بتا 2 میکروگلوبولین (B2M) به میزان واقعی بیان ژن مورد نظر دست یافتیم. بیان ژن ACLY در نمودار شماره 2 نشان داده است. بیان ژن ACLY در گروه فروکتوز نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (P <0/05).



نمودار شماره 2: مقایسه تغییرات بیان ژن ACLY بین گروه‌های کنترل (n=5)، فروکتوز (n=5) و فروکتوز+MCT (n=5). نمودار بر اساس میانگین ± خطای استاندارد رسم شده است P < 0/05 *

- *یافته های تغییرات H3K27ac*

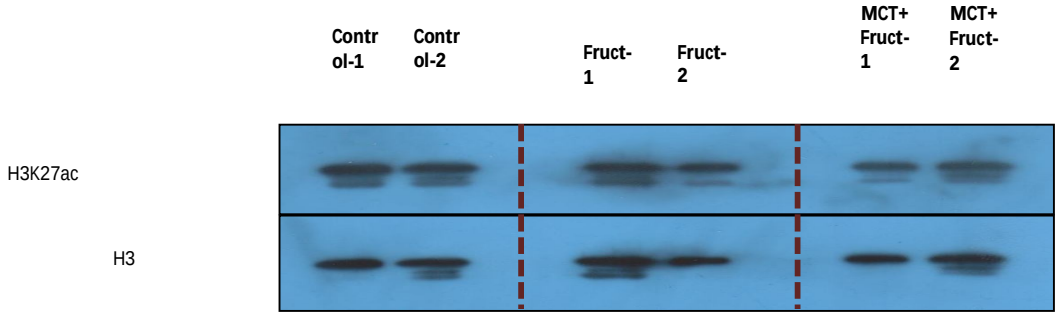
همان‌طور که نتایج در نمودار شماره 3 و تصویر شماره 2 نشان می‌دهد فروکتوز +MCT میزان H3K27ac را نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز به‌طور معنی‌دار کاهش داد (P<0/05). تفاوت معنی‌داری بین H3K27ac در گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز مشاهده نشد.



نمودار شماره 3: آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی H3K27ac و هیستون های استخراج شده از بافت کبد گروه های کنترل، فروکتوز و فروکتوز +MCT.

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی میزان تاثیرگذاری MCT به همراه فروکتوز در ایجاد NAFLD بود. بدین‌منظور در یک گروه از رت‌ها با استفاده از فروکتوز، مدل NAFLD ایجاد شد و گروه دیگر رت‌ها با فروکتوز و MCT به مدت 6 هفته تغذیه شدند(33) تا اثر MCT به همراه فروکتوز در ایجاد NAFLD بررسی شود. نتایج به‌دست آمده از مطالعه



تصویر شماره 2: مقایسه تغییرات دانسیته H3K27ac بین گروه های کنترل (n=3)، فروکتوز (n=3) و فروکتوز +MCT (n=3). دانسیته H3K27ac با نرم افزار Image J اندازه گیری و نمودار بر اساس میانگین ± خطای استاندارد رسم شده است P < 0/05 *

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

حاضر حاکی از افزایش ایندکس و استئاتوزیزکبدی پس از مصرف MCT به همراه فروکتوز در بازه زمانی 6 هفته بود، اگرچه فروکتوز نیز به تنهایی در بازه زمانی ذکر شده تجمع قطرات لیپیدی را نشان داد، اما افزایش ایندکس کبدی در این گروه از رت‌ها مشاهده نشد. به عبارتی به نظر می‌رسد مصرف MCT سبب تشدید اثرات فروکتوز در ایجاد NAFLD شده است. مطالعه Guimarães و همکارانش در سال 2019 نشان داد تجویز MCT به همراه فروکتوز به مدت 12 هفته (مدت طولانی) در موش‌های C57bl/6 سبب افزایش تری‌گلیسرید، کلسترول کبدی و استئاتوزیز می شود(29)، یافته‌های مطالعه حاضر نیز نشان داد که مصرف 6 هفته‌ای MCT به همراه فروکتوز، اثرات فروکتوز در تجمع تری‌گلیسرید را معکوس نکرده است و کبدچرب غیرالکلی ایجاد شده است، لذا تاییدی بر اثرات غیر حفاظتی MCT به همراه فروکتوز فراهم آورد. مصرف فروکتوز از طریق افزایش بیان آنزیم ACLY با تولید استیل کوآ که می‌تواند به مالونیل کوآ و دیگر آسیل کوآهای کوتاه زنجیر تبدیل و برای سنتز لیپیدها در سیتوزول استفاده شود در ایجاد NAFLD موثر است(20،36،37). رت‌های تغذیه شده با فروکتوز افزایش بیان ACLY را مشابه با مطالعه Softic و همکارانش نشان دادند(37). MCT به همراه فروکتوز بر میزان بیان ACLY بی‌تاثیر بود اما میزان استیلاسیون لیزین 27 هیستون را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز و کنترل کاهش داد. اگرچه مصرف فروکتوز به تنهایی افزایش بیان ACLY را به همراه داشت اما میزان H3K27ac از افزایش ACLY بی‌تاثیر بود حال آن‌که مطالعه پیشین توسط Chen و همکاران در سال 2017 القای H3K27ac تحت تاثیر افزایش ACLY را نشان داده است(26). احتمال می‌رود میزان افزایش یافته ACLY به واسطه مصرف فروکتوز در مطالعه حاضر برای ایجاد تغییرات در H3K27ac کافی نبوده باشد و اثرات MCT به همراه فروکتوز بر کاهش میزان H3K27ac ناشی از تغییرات بیان آنزیم‌های دیگر دخیل در القای استیلاسیون هیستون باشد، به‌طور مثال آنزیم Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2 (ACSS2) سنتز استیل‌کوآ از استات را با استفاده از ATP کاتالیز می‌کند. ACSS2 به عنوان تنظیم‌کننده استیلاسیون هیستون از طریق بازیافت استات به استیل‌کوآ و به کارگیری هیستون استیل ترانسفرازهای CBP/p300 شناخته شده است(38). مطالعه Zhao و همکارانش در سال 2020 افزایش بیان ACSS2 در پاسخ به مصرف فروکتوز را نشان داده است(39) و تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تاثیر MCT به همراه فروکتوز بر میزان بیان ACSS2 نپرداخته است. بنابراین، بررسی بیان ACSS2 در گروه‌های مورد آزمایش و مصرف MCT به تنهایی که در این مطالعه میسر نشد، می تواند مکانیسم کاهش استیلاسیون به واسطه مصرف هم‌زمان فروکتوز و MCT را روشن سازد.

به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده بی‌تاثیر بودن مصرف MCT به همراه فروکتوز در پیشگیری از ایجاد کبد چرب غیرالکلی است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACLY و بررسی پروتئین آن با روش وسترن بلاتینگ است که پیشنهاد میشود در پژوهش‌های آینده مورد بررسی قرار گیرند. با توجه به این‌که مطالعات طراحی شده کافی برای بررسی اثر همزمان MCT و فروکتوز در ایجاد کبدچرب غیرالکلی با تمرکز بر بیان ژن آنزیم‌های دخیل در فرآیند لیپوژنز و استیلاسیون هیستون در دسترس نمی‌باشد، نتایج قابل مقایسه با یافته‌های این پژوهش محدود بود.

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند کمال سپاسگزاری را داریم. مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی خانم منیر حسنی پرور با شماره ثبت 149 در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

References

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology (Baltimore, Md) 2012; 55(6): 2005-2023.
2. Bagci R, Sahinturk V, Sahin E. Azoramide ameliorates fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. Tissue cell 2019; 59: 62-69.
3. Germani G, Becchetti C. Liver transplantation for non-alcoholic fatty liver disease. Minerva gastroenterologica e dietologica 2018; 64(2): 138-146.
4. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Mijic M, Jakopcic I, Milic S, Hrstic I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation-Where do we stand? World J Gastroenterol 2018; 24(14): 1491-1506.
5. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. Dig Dis Sci 2016; 61(5): 1282-1293.
6. Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. Lipids in health and disease 2016; 15(1): 159.
7. Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. Gut 2010; 59(7): 969-974.
8. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. J Hepatol 2015; 62(5): 1148-1155.
9. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. J Hepatol 2013; 59(3): 550-556.
10. Diraison F, Beylot M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. Am J Physiol 1998; 274(2): E321-327.
11. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2014; 146(3): 726-735.
12. Chen G, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T. Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci 2016; 17(9): 1379.
13. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Biomolecules 2015; 5(3): 1563-1579.
14. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. Jama 2003; 289(22): 3000-3004.
15. Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22(7): 1086-1091.
16. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 2005; 115(5): 1343-1351.

17. ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Nutrients 2017; 9(9): 981.
18. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Acetyl-CoA-directed gene transcription in cancer cells. Genes & Dev 2018; 32(7-8): 463-465.
19. Wang Q, Li S, Jiang L, Zhou Y, Li Z, Shao M, et al. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. J Lipid Res 2010; 51(9): 2516-2526.
20. Wang Q, Jiang L, Wang J, Li S, Yu Y, You J, et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. Hepatology (Baltimore, Md) 2009; 49(4): 1166-1175.
21. Ma Z, Chu CH, Cheng D. A novel direct homogeneous assay for ATP citrate lyase. J Lipid Res 2009; 50(10): 2131-2135.
22. Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. I. Lipogenesis. Lipids 1974; 9(2): 121-128.
23. Sullivan AC, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Inhibition of lipogenesis in rat liver by (-)-hydroxycitrate. Arch Biochem Biophys 1972; 150(1): 183-190.
24. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. Science (New York, NY). 2009; 324(5930): 1076-1080.
25. Fernandez S, Viola JM, Torres A, Wallace M, Trefely S, Zhao S, et al. Adipocyte ACLY Facilitates Dietary Carbohydrate Handling to Maintain Metabolic Homeostasis in Females. Cell Rep 2019; 27(9): 2772-2784.e6.
26. Chen C, Li C, Wang Y, Renaud J, Tian G, Kambhampati S, et al. Cytosolic acetyl-CoA promotes histone acetylation predominantly at H3K27 in Arabidopsis. Nat Plants 2017; 3(10): 814-824.
27. Carrer A, Parris JLD, Trefely S, Henry RA, Montgomery DC, Torres A ,et al. Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels. J Biol Chem 2017; 292(8): 3312-3322.
28. Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. Am J Clin Nutr 1982; 36(5): 950-962.
29. Guimarães J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2019; 140: 64-71.
30. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, et al. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. Cell Rep 2016; 17(6): 1463-1472.
31. Chamma CM, Bargut TC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. Food & function 2017; 8(2): 778-787.
32. Sung MH, Liao FH, Chien YW. Medium-Chain Triglycerides Lower Blood Lipids and Body Weight in Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes Rats. Nutrients 2018; 10(8): 963.
33. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats fed

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]

fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. J Nutr 2009; 139(11): 2067-2071.

34. Goudarzi A, Hosseinmardi N, Salami S, Mehdikhani F, Derakhshan S, Aminishakib P. Starvation promotes histone lysine butyrylation in the liver of male but not female mice. Gene 2020; 745: 144647.
35. Ebrahimi R, Toolabi K, Jannat Ali Pour N, Mohassel Azadi S, Bahiraee A, Zamani-Garmsiri F, et al. Adipose tissue gene expression of long non-coding RNAs; MALAT1, TUG1 in obesity: is it associated with metabolic profile and lipid homeostasis-related genes expression? Diabetology & metabolic syndrome 2020; 12(36): 1-13.
36. Roeb E, Weiskirchen R. Fructose and Non-Alcoholic Steatohepatitis. Front. Pharmacol 2021; 12: 634344.
37. Softic S, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O'Neill BT, Rao TN, et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. J Clin Invest 2017; 127(11): 4059-4074.
38. Huang Z, Zhang M, Plec AA, Estill SJ, Cai L, Repa JJ, et al. ACSS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115(40): E9499-e9506.
39. Zhao S, Jang C, Liu J, Uehara K, Gilbert M, Izzo L, et al. Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. Nature 2020; 579(7800): 586-591.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-10]