Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.45; No.4

The influence of trans-palmitoleic acid on gene expression of fatty acid synthase and lipid accumulation in liver cells

Ramesh Farokh Nezhad[1], Mitra Nourbakhsh*[2], Maryam Razzaghy Azar[3], Roya Sharifi[4], Parichehreh Yaghmaei[5]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: 2020/12/02 Accepted: 2021/06/02)

Abstract

Background and aim*: Prevalence of obesity has been elevated during the recent years and therefore its consequences, including liver and cardiovascular disorders, have increased. The previous studies have shown that trans-palmitoleic acid (tPA) has beneficial effects in metabolic disorders. Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of tPA on lipid accumulation in liver cells and the gene expression of fatty acid synthase (FAS) enzyme and the activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα).*

Materials and Methods: *In the present experimental in vitro study, HepG2 liver cells were cultured and treated with different concentrations of tPA and palimitic acid. Intracellular triglyceride (TG) levels were measured with an enzymatic method, and the expression of FAS gene was assessed using real-time PCR. The activity of PPARα was also evaluated via luciferase reporter assay, using the vector comprising the PPARα response element.*

Results: *Both fatty acids caused TG deposition in liver cells; however, the TG levels were significantly lower in cells treated with tPA compared to the cells that were treated with palmitic acid ($P<0.001$). The gene expression of FAS was enhanced by both fatty acids, but in cells treated with tPA, it was significantly lower than palmitic acid ($P<0.001$). Also, tPA was observed to activate PPARα, especially at lower concentrations ($P<0.001$), while palmitic acid did not have any effect on this nuclear receptor.*

Conclusion: *The results showed that less TG is accumulated in liver cells treated with tPA as compared with palmitic acid and thus this fatty acid has better influence on liver cells compared with its saturated counterpart.*

Keywords: *Trans fatty acids; Trans palmitoleic acid; Fatty acid synthase; Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARα); Fatty liver*

* *Corosponding author: Mitra Nourbakhsh*

Email: nourbakhsh.m@iums.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٥، شماره ٤، ١٤٠٠، صفحات ٢٠ تا ٢٩

تأثیر ترانس پالمیتولئیک اسید بر بیان ژن آنزیم اسید چرب سنتاز و تجمع چربی در سلول‌های کبد

رامش فرخ نژاد[1]، میترا نوربخش[2*]، مریم رزاقی آذر[3]، رویا شریفی[4]، پریچهره یغمایی[5]

۱. دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی
۲. دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
۳. فوق تخصص غدد کودکان، استاد، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی غدد، مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک
۴. دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، استادیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی
۵. دکترای تخصصی زیست‌شناسی جانوری، استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی

دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۲

چکیده:

سابقه و هدف: شیوع چاقی به میزان قابل توجهی در سال‌های اخیر بیشتر شده و در نتیجه عوارض ناشی از آن مانند کبد چرب و بیماری‌های قلبی- عروقی افزایش یافته است. مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند اسید چرب ترانس پالمیتولئیک اسید (tPA) آثار سودمندی در وضعیت بیماری‌های متابولیک دارد. از این‌رو هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر tPA در تجمع چربی در سلول‌های کبدی و بیان ژن آنزیم اسید چرب سنتاز (FAS) و فعالیت رونویسی‌گیرنده هسته‌ای اسیدهای چرب یعنی PPARα (peroxisome proliferator activated receptor alpha) است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی (experimental) که به صورت in vitro انجام شد، سلول‌های کبدی HepG۲ کشت داده شده و با غلظت‌های متفاوتی از ترانس پالمیتولئیک اسید (tPA) و همچنین پالمیتیک اسید تیمار شدند. سطح داخل سلولی تری‌گلیسرید با روش آنزیمی اندازه‌گیری و بیان ژن FAS با روش real-time PCR سنجش شد. فعالیت PPARα با آزمایش گزارشگر لوسیفراز و با استفاده از وکتور حاوی عامل پاسخگو به PPARα ارزیابی شد.

یافته‌ها: همه اسیدهای چرب سبب تجمع تری‌گلیسرید در سلول‌های کبدی شدند، ولی میزان تری‌گلیسرید در سلول‌های تیمار شده با tPA به طور معناداری کمتر از پالمیتیک اسید بود (P<0.001). بیان ژن آنزیم FAS نیز تحت تأثیر این اسیدهای چرب افزایش معناداری نشان داد (P<0.05) ولی در مقایسه میان دو اسید چرب، القای آنزیم FAS در سلول‌های تیمار شده با tPA به طور معناداری کمتر از پالمیتیک اسید بود (P<0.001). tPA در غلظت‌های پایین تأثیر افزاینده بر فعالیت PPARα ایجاد کرد (P<0.001)، در حالی که پالمیتیک اسید بر فعالیت این گیرنده تأثیری نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که تجمع TG در سلول‌های کبدی تیمار شده با tPA به مراتب کمتر از پالمیتیک اسید است که نشان می‌دهد این اسید چرب در مقایسه با مولکول متناظر اشباع خود تأثیر بهتری بر سلول‌های کبدی دارد.

واژگان کلیدی: اسیدهای چرب ترانس، ترانس پالمیتولئیک اسید، اسید چرب سنتاز، کبد چرب

مقدمه

چاقی علاوه بر تجمع چربی، یک بیماری التهابی است که با افزایش قند، چربی و فشار خون همراه است. چاقی به بروز علایمی متشکل از پرفشاری، دیس لیپیدمی و مقاومت به انسولین می‌انجامد که در مجموع سندرم متابولیک نامیده می‌شود(۱, ۲). چاقی و سندرم متابولیک با تجمع تری‌گلیسرید در کبد همراه هستند که این عارضه به نام کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) شناخته می‌شود(۳).

اسیدهای چرب ترانس، اسیدهای چرب غیر اشباعی هستند که حاوی حداقل یک پیوند دوگانه در کنفورماسیون ترانس هستند. اسیدهای چرب ترانس در صنعت از پروسه هیدروژناسیون، از اسیدهای چرب غیراشباع روغن‌های گیاهی و به صورت طبیعی در روده نشخوارکنندگان ساخته می‌شوند(۴). اسید ترانس پالمیتولئیک (tPA) (16;1:9) که به آن Palmitelaidic acid هم گفته می‌شود، یکی از اسیدهای چرب ترانس است که به صورت طبیعی در محصولات لبنی و چربی گوشت یافت می‌شود(۵). این اسید چرب در بدن ساخته نشده و فقط در

نویسنده مسئول: دکتر میترا نوربخش
پست الکترونیک: nourbakhsh.m@iums.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

محصولات لبنی پر چرب و چربی گوشت دیده می‌شود. ترانس پالمیتولئیک اسید (tPA) توسط میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان ساخته شده و سپس وارد چربی‌های بدن و شیر می‌شود(۵). گزارش‌های اخیر نشان داده اند که پالمیتولئیک اسید می‌تواند با مهار واکنش‌های التهابی ناشی از مسیر NF- κ B از پرفشاری خون جلوگیری کرده و مکمل یاری با این اسید چرب فشار خون سیستولی، بازآرایی آئورتی و همچنین تولید و ترشح سایتوکاین‌ها را در آئورت بهبود بخشد و به این شکل نقشی محافظتی در بیماری‌های قلبی- عروقی ایفا کند(۶). غلظت اسیدهای چرب خون متأثر از تجویز آن‌هاست و بنابراین می‌توان غلظت آن‌ها را در خون به این ترتیب تنظیم کرد(۷). هر چند اسیدهای چرب سیس دارای تأثیرهای سودمند شناخته شده برای سلامتی انسان هستند، اثرهای مثبت و منفی اسیدهای چرب ترانس روی بیماری‌های قلبی-عروقی و متابولیکی مورد مناقشه است(۸, ۹).

در تمامی موجودات، زنجیرهای بلند کربنی اسیدهای چرب در یک توالی چهار مرحله‌ای تکرار شونده و توسط یک سیستم آنزیمی تحت عنوان اسید چرب سنتاز یا Fatty acid synthase (FAS) ساخته می‌شوند (۱۰). FAS در بیشتر موارد اسید چرب اشباع ۱۶ کربنه پالمیتیک اسید را تولید می‌کند(۱۱).

(PPARs)Peroxisome proliferator-activated receptors گیرنده‌های درون سلولی هستند که سه ایزومر آلفا، دلتا و گاما دارند و تنظیم‌کننده‌های مهم متابولیسم لیپید به شمار می‌روند(۱۲). در میان ایزومرهای این گیرنده PPAR α تنظیم رونویسی ژن را در ارتباط با هومئوستاز لیپید، کاهش تری‌گلیسرید و افزایش میزان لیپوپروتئین‌ها برعهده دارد. PPAR α در کبد بیان می‌شود و بسیاری از اسیدهای چرب می‌توانند این گیرنده هسته‌ای را فعال کنند(۱۳). نحوه توزیع PPAR α و PPAR γ در بافت‌ها نشان می‌دهد که آن‌ها به ترتیب در کاتابولیسم اسید چرب (۱۴, ۱۵) و سنتز لیپید یا به عبارتی adipogenesis نقش دارند(۱۶). اگر چه تمام ایزوفرم‌های PPAR در متابولیسم لیپید در بسیاری از بافت‌ها و سلول‌ها نقش دارند(۱۷)، ولی PPAR α مهم‌ترین نقش را در متابولیسم کبدی اسیدهای چرب بر عهده دارد که دلیل آن، بیان زیاد PPAR α در کبد است(۱۸). PPAR α تنظیم‌کننده بیان ژن‌هایی است که به خصوص در بتا- اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری و انتقال لیپید نقش دارند. فعال شدن PPAR α لیپولیز را افزایش و لیپوژنز را کاهش می‌دهد و از این طریق سبب بهبود تجمع چربی در کبد، سرکوب التهاب و کاهش فیبروز کبدی می‌شود. PPAR α بیان ژن و فعالیت آنزیم لیپوپروتئین لیپاز را افزایش می‌دهد(۱۹).

بعضی مطالعه‌ها حاکی از آثار مفید tPA در بیماری‌های متابولیک نظیر دیابت و NAFLD هستند(۲۰)، ولی اثر مستقیم این اسید چرب و مکانیسم عمل آن در کبد تا کنون مطالعه نشده است. به همین دلیل هدف از این مطالعه، پاسخ به این سوال بود که آیا tPA بر تجمع لیپید در سلول‌های کبدی تأثیری متفاوت از پالمیتیک اسید دارد و اینکه تأثیر این اسیدهای چرب بر بیان و فعالیت رونویسی گیرنده هسته‌ای PPAR α چگونه است.

مواد و روش ها

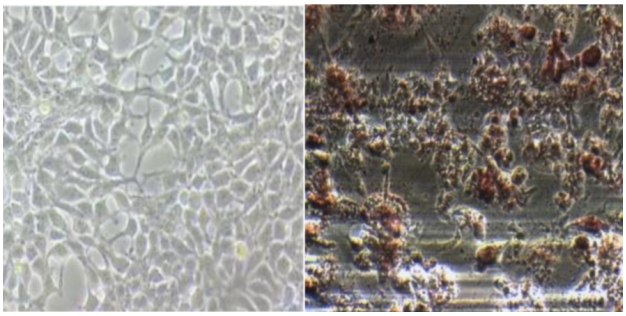
نوع مطالعه:

این تحقیق به صورت یک مطالعه تجربی و با استفاده از رده سلولی سلول‌های کبد انسانی Human hepatocellular carcinoma- HepG2 و سلول‌های رویانی کلیه HEK293T انجام شد. طرح از نظر عنوان و اخلاق از سوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تصویب شد.

کشت و تیمار سلول‌ها با اسیدهای چرب:

سلول‌های کبد انسانی Human hepatocellular carcinoma- HepG2 و سلول‌های HEK293T از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران (IBRC) (تهران، ایران) تهیه شد و سلول‌ها در محیط DMEM حاوی مکمل‌های ۱۰درصد fetal bovine serum (FBS) وگلوتامین همراه با استرپتومایسین/ پنی‌سیلین (100 µg/ml , 100 units / ml) در اتمسفر مرطوب با ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. برای تیمار سلول‌ها با اسیدهای چرب، محلول اصلی با غلظت mM ۳ از اسیدهای چرب در اتانل ۵۰ درصد تهیه و به هنگام تیمار، با محیط حاوی ۱درصد BSA فاقد اسید چرب، رقت‌های mM ۲/۵ – ۰/۱ از اسید چرب که براساس مطالعه‌های پایلوت تعیین شدند، تهیه شد.

برای تأیید تجمع چربی در سلول‌ها از روش رنگ‌آمیزی Oil red O استفاده شد. به این صورت که ابتدا سلول با فرمالین ۱۰ درصد به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست‌وشو با ایزوپروپانول ۶۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و خشک شدن چاهک‌ها محلول Oil red O به سلول‌های فیکس شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از خارج کردن محلول رویی و خشک شدن سلول‌ها تصویر میکروسکوپی سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت مشاهده‌شد(شکل۱).



شکل ۱. تجمع لیپید در سلول‌های HepG۲ از طریق رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Oil red O. رنگ قرمز مؤید تجمع لیپید در سلول است.

ارزیابی بقای سلولی:

سلول‌های HepG2 به تعداد اولیه 8×10^3 سلول در هر چاهک در یک پلیت ۹۶ تایی کاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به کف چاهک‌های پلیت چسبیدند، محیط رویی سلول‌ها برداشته شد و پس از شست‌وشوی سلول ها محیط حاوی tPA با رقت‌های مورد نظر (از ۰/۱ تا ۱/۵ میلی مولار) اضافه شد. انکوباسیون با اسید چرب در دو گروه ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته انجام شد. برای بررسی اثر توأم tPA و پالمیتیک اسید، از رقت‌های mM ۲/۵ – ۰/۲۵ tPA همراه بااسید پالمیتیک با غلظت mM ۱ برای تیمار استفاده شد. گروهی از سلول‌ها بدون تیمار و گروه دیگر با غلظت مشابه اتانول (حلال) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. بعد از پایان مدت انکوباسیون محلول حاوی نمک تترازولیوم MTT به هر چاهک با غلظت mg/ml ۰,۵ در حجم نهایی μl ۱۰۰ اضافه شد. بعد از چهار ساعت نگه‌داری با MTT در 37° سانتی‌گراد، محیط رویی سلول‌ها برداشته شد و بلورهای تشکیل شده فورمازان در DMSO (۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر چاهک) حل شد. سپس جذب محلول رنگی حاصل با استفاده دستگاه خوانش پلیت بر اساس اسپکتروفوتومتری در طول موج nm ۵۷۰ اندازه‌گیری شد. بقای سلول نسبت به کنترل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

OD حاصل از گروه کنترل / OD حاصل از گروه تیمار = بقای سلول

بررسی بیان ژن با روش Real-time PCR:

برای بررسی تأثیر tPA بر بیان ژن، سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، تیمار با غلظت ۰/۱ تا ۱/۵ میلی‌مولار tPA و غلظت یک‌میلی مولار پالمیتیک اسید انجام شد. تیمار توأم tPA و پالمیتیک اسید نیز برای بررسی اثر توأم این دو اسید چرب انجام شد. به عنوان کنترل منفی هم سلول‌های تیمار نشده و همچنین تیمار شده با اتانول (به عنوان حلال اسیدهای چرب) در نظر گرفته شد. پس از تیمار، سلول ها به کمک بافر لیز منهدم شده و برای استخراج RNA استفاده شدند.

محتوایRNA تام سلولی از سلول‌های HepG2 با استفاده از کیت تلخیص RibospinTM ساخت شرکت Gene All کشور کره جدا سازی شد. برای این منظور سلول‌ها با استفاده از بافر لیز (RiboEX, GeneAll, Korea) لیز شده

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

و سپس محتوای لیز شده سلول از ستون تعبیه شده در کیت عبور داده شد و با شستوشوی ستون RNA از ستون ها تخلیص شد. غلظت و کیفیت کلی RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ سنجش شد به این صورت که جذب مخلوط حاصل در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و جذب در ۲۶۰ نانومتر برای اندازه‌گیری غلظت RNA و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ برای ارزیابی خلوص RNA استفاده شد و نسبت ۲ برای این منظور مناسب در نظر گرفته شد. سپس cDNA با به کارگیری کیت Revert Aid First Strand cDNA برند Thermo Fisher ساخت آمریکا ساخته شد به این شرح که با استفاده از ۱µg از RNA و ۱ µl آنزیم رونویسی معکوس و همچنین مخلوط dNTP به میزان ۲ µl (با غلظت ۱۰ mM) به همراه بافر تعبیه شده در کیت مخلوط واکنش تهیه شد. در این کیت از پرایمرهای اولیگو dT و رندم هگزامر به عنوان پرایمر و آنزیم رونویسی معکوس (RT) به عنوان آنزیم سنتزکننده cDNA بهره برده شد. برای انجام فرایند رونویسی معکوس، مخلوط واکنش ابتدا پنج دقیقه در دمای اتاق و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا واکنش متوقف شود.

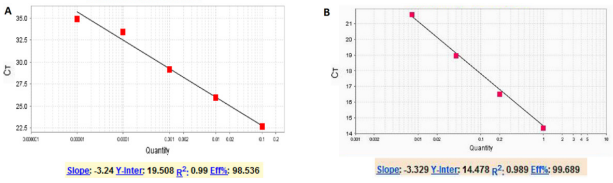
آنالیز بیان ژن توسط quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) با استفاده از SYBER Green Real Q Plus 2x Master Mix Green ساخت شرکت Ampliqon دانمارک و دستگاه Rotor Gene ۶۰۰۰ Corbett Light Cycler آلمان انجام شد. در این واکنش از ژن کدکننده آنزیم گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) برای نرمال کردن نتایج استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده که توسط نرم‌افزار Oligo ۷ طراحی شده و سپس در پایگاه اطلاعاتی NCBI واکاوی و blast شده‌اند، در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

جدول ۲. توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش real-time PCR

نام ژن	جهت پرایمر	توالی
FAS	مستقیم	5′-CGGTACGCGACGGCTGCCTG-3′
	معکوس	5′-GCTGCTCCACGAACTCAAACAC-CG-3′
GAPDH	مستقیم	5’-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3’
	معکوس	5’-TCCACTTTACCAGAGTTAAAAG-CAGG-3’

FAS: fatty acid synthase; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

برای بررسی کارآیی پرایمرهای استفاده شده، منحنی استاندارد رسم شد. برای رسم این منحنی، مخلوطی از نمونه‌های cDNA تهیه شد. سپس رقت‌های ۱ به ۱۰ از مخزن اولیه ساخته شد و با استفاده از Real-time PCR کارآیی آن‌ها بررسی و منحنی استاندارد FAS و GAPDH رسم شد(شکل ۲). پس از اطمینان از کارآیی مناسب واکنش PCR بر اساس منحنی استاندارد، داده‌های حاصل از ژن FAS در مقابل سطح رونویسی GAPDH نرمالیزه شده و روش تغییرCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) برای محاسبه بیان ژن استفاده شد.



شکل ۲. منحنی استاندارد (A) ژن FAS و (B) GAPDH حاصل از واکنش PCR

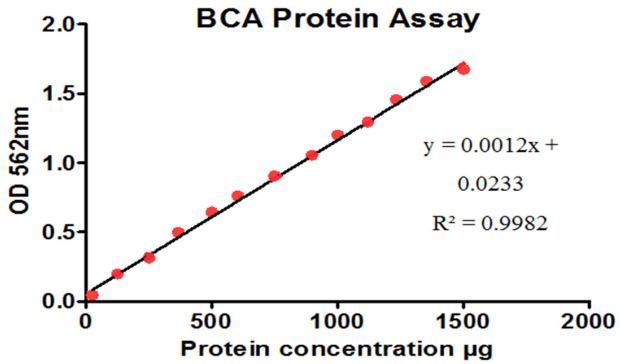
اندازه‌گیری پروتئین و لیپید داخل سلولی:

سلول‌های HepG2 با تعداد اولیه ۳×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک در یک پلیت شش‌تایی کشت داده و با رقت‌های ۰/۱ تا ۱/۵ میلی‌مولار از اسیدهای چرب به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. برای استخراج تری‌گلیسیرید (TG) از سلول‌ها، پس از جداسازی سلول‌ها از پلیت به کمک تریپسین و شستوشو با بافر فسفات، ۱۰ میلیون سلول با یک میلی‌لیتر محلول دترجنت NP-۴۰ با غلظت ۵ درصد مخلوط و به آرامی تا دمای ۸۰ درجه حرارت داده شد. پس از ایجاد کدورت در محلول دوباره زمان داده شد تا محلول به دمای اتاق برسد. این مراحل یک بار دیگر تکرار شد تا کل TG داخل سلولی به صورت محلول در بیاید. مقدار لیپید توسط کیت ساخت شرکت پارس آزمون (ایران) و طبق دستورالعمل کیت و به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد. برای این منظور پس از جداسازی محلول رویی حاوی لیپید استخراج شده از سلول به روش فوق، از هر نمونه ۱۰ µl در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و استاندارد و کنترل تعبیه شده در کیت نیز برای کالیبراسیون و کنترل در چاهک‌های جداگانه ریخته شد. سپس به هر چاهک مقدار ۲۵۰ µl معرف اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ C° جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۶ nm اندازه‌گیری و با فرمول زیر محاسبه شد.

غلظت استاندارد × (جذب نوری استاندارد / جذب نوری تست) = غلظت TG در نمونه

اندازه‌گیری میزان پروتئین تام به روش بیسینکونینیک اسید (BCA) با استفاده از کیت BCA شرکت Thermo Fisher scientific انجام شد. اساس این روش احیا کردن یون Cu^{++} به Cu^{+} توسط پروتئین در محیط قلیایی در حضور BCA است. در این روش، از شلاته کردن دو مولکول BCA توسط هر یون Cu+، رنگ بنفش شفافی با جذب در ۲۵۶ نانومتر ایجاد می‌شود.

شدت این رنگ به صورت خطی، با غلظت پروتئین متناسب است. ابتدا محلول استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت‌های ۲۵ ، ۱۲۵ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ ، ۷۵۰ ، ۱۰۰۰ ، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ µg/ml از استوک ۲ mg/ml تهیه شد. سپس نمونه‌ها و استانداردها به صورت سه‌تایی و به مقدار ۲۵ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر ازمعرف BCA اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون درتاریکی، جذب در ۵۶۲ nm قرائت شد. پس ازرسم نموداراستاندارد (شکل ۳)، غلظت نمونه‌ها محاسبه شد. در نهایت نسبت مقدار TG به پروتئین تام برای هر نمونه محاسبه و برای مقایسه در گروه‌های مختلف تیمار استفاده شد.

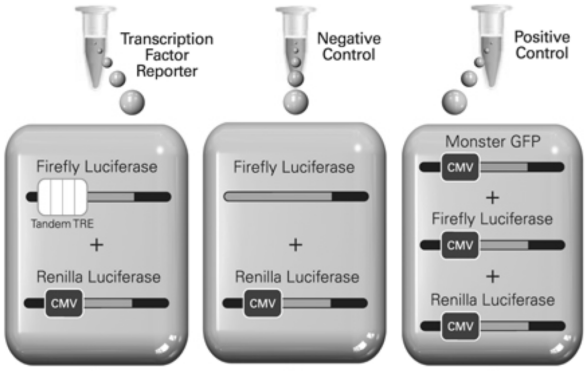


شکل ۳. منحنی استاندارد BSA (Bovine serum albumin) اندازه‌گیری شده با روش بیسینکونینیک اسید (BCA) که نشان‌دهنده میزان جذب نوری (OD) در رابطه با غلظت پروتئین

ارزیابی فعالیت رونویسی PPARα:

سلول‌های کلیه جنین انسانی Human Kidney (embryonic) –HEK-293 خریداری و با پروتکلی مشابه سلول‌های HepG2 کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت با تعداد اولیه ۵×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک در پلیت ۲۴ تایی کاشته شدند. برای اطمینان از بیان PPAR α در سلول‌ها، ابتدا بیان ژن آن به روش Real-time PCR ارزیابی و مشخص شد که این پروتئین به طور قابل توجه در سلول‌های HEK-293T بیان می‌شود.

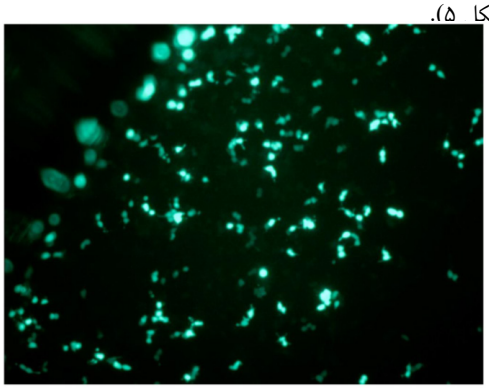
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]



شکل ۴.الگوی قرارگیری عناصر مختلف در وکتور گزارشگر ساخت شرکت Qiagen آلمان. همان‌طور که مشاهده می شود، لوسیفراز فایرفلای در کنار عنصر پاسخگو به فاکتور رونویسی قرار گرفته و به همین دلیل در صورت اتصال فاکتور رونویسی (در اینجا PPAR) و فعال شدن آن، لومینسانس حاصل از لوسیفراز ایجاد شده که اندازه‌گیری می‌شود. لوسیفراز رنیلا به عنوان کنترل داخلی اندازه‌گیری می‌شود.

برای ارزیابی فعالیت رونویسی PPAR α، از وکتور گزارشگر PPAR α - luciferase استفاده شد. در این وکتور که از شرکت Qiagen آلمان تهیه شد، توالی اتصالی PPAR α در مجاورت ژن لوسیفراز فایرفلای قرار داده شده است. در صورت اتصال و فعالیت PPAR α، ژن لوسیفراز فایرفلای بیان شده و لوسیفراز حاصل قادر است با تولید لومینسانس سیگنال ایجاد کند که با دستگاه لومینومتر قابل اندازه‌گیری است. وکتور مذکور علاوه بر این حاوی لوسیفراز رنیلا نیز است که به طور دائمی بیان می‌شود و بنابراین به عنوان نرمالایزر استفاده می‌شود. به عنوان کنترل منفی از وکتور بدون توالی پاسخگو به PPAR α استفاده شد (شکل ۴).

برای وارد کردن وکتور به داخل سلول (ترنسفکشن) سلول‌ها، ابتدا سلول‌ها ۵۰ به میزان هزار سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شده و اجازه داده شد که به کف پلیت بچسبند. کمپلکسی متشکل از وکتور و پلی‌اتیلن ایمین به عنوان عامل ترنسفکشن تهیه شد. محیط روی سلول‌ها با محیط بدون سرم تعویض شد و سپس کمپلکس حاوی وکتور به سلول‌ها اضافه شد. میزان یک میکروگرم وکتور به همراه PEI به مقدار ۱/۴۴ میکرولیتر اضافه شد. حجم نهایی محیط در چاهک همراه با کمپلکس چاهک ۳۰۰ میکرولیتر شد. پس از گذشت چهار ساعت، محیط سلول با محیط کامل حاوی سرم تعویض شد. برای تأیید ترنسفکشن سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند که با توجه به وجود پروتئین فلورسانس سبز (GFP) وجود رنگ سبز نشان‌دهنده ورود وکتور به داخل سلول است (شکل ۵).



شکل ۵. تأیید ترانسفکشن وکتور به داخل سلول از طریق ارزیابی رنگ فلورسانس حاصل از وکتور در زیر میکروسکوپ فلورسانس.

اندازه‌گیری فعالیت لوسیفراز بعد از ترانسفکشن و تیمار با استفاده از کیت Dual-Luciferase (luc) Reporter Assay system (شرکت ThermoFisher) و با اضافه کردن سوبسترا لوسیفراز فایر فلای و رنیلا به طور جداگانه انجام شد و مقدار لومینسانس حاصل با دستگاه لومینومتر سنجش شد. در این تست، میزان لومینسانس حاصل متناسب با مقدار فعالیت گیرنده PPAR α است.

آنالیز آماری:

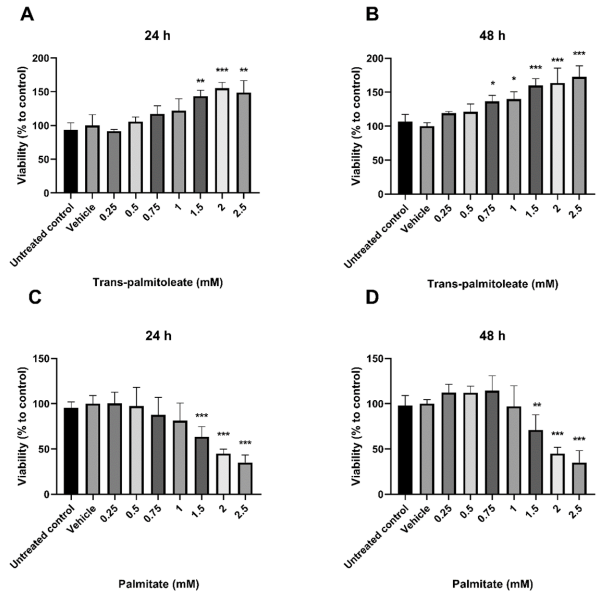
تمامی آزمایش‌ها حداقل سه بار و به صورت دوتایی (duplicate) انجام و نتایج حاصل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در نظر گرفته شدند. آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزار Graph Pad Prism و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. معیار $P < ۰/۰۵$ به عنوان نتایج معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بقای سلولی در سلول‌های HepG2 تیمار شده در مقایسه با کنترل:

آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که اثر پالمیتات و ترانس پالمیتات بر بقای سلول از الگوی متفاوتی تبعیت می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱ (A, B) دیده می‌شود، tPA بقای سلول‌های HepG2 کبدی را افزایش می‌دهد. ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول با ترانس پالمیتولئیک اسید، غلظت ۱/۵ میلی‌مولار این اسید چرب قادر بود بقای سلول را به طور معناداری نسبت به کنترل افزایش دهد (۸/۶ $\pm$ ۱۴۳/۶ درصد در نمونه تیمار شده در مقایسه با کنترل ۱۰/۷ $\pm$ ۹۳/۳ درصد) که نشان‌دهنده افزایش ۱/۵ برابری بقای سلول نسبت به گروه کنترل تیمار نشده بود ($P<۰/۰۱$). همان طور که در شکل A-۱ مشاهده می‌شود، غلظت‌های ۲ و ۲/۵ میلی‌مولار نیز افزایش مشابهی به ترتیب ۱/۶۷ و ۱/۰۶ برابری نسبت به کنترل ایجاد کردند (به ترتیب، $P<۰/۰۰۱$ و $P<۰/۰۱$). تیمار با tPA بعد از ۴۸ ساعت سبب شد غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار اسید چرب تغییر معناداری در بقای سلول ایجاد کند (۸/۸ $\pm$ ۱۳۶/۶ درصد در گروه تیمار شده در مقایسه با ۱۰/۵ $\pm$ ۱۰۶/۸ درصد در گروه کنترل تیمار نشده، $P<۰/۰۵$) که این روند افزایشی تا غلظت ۱/۵ میلی‌مولار همچنان تداوم داشت به طوری که در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار توانست افزایش ۱/۶ برابر در بقای سلول نسبت به کنترل ایجاد کند (۱۶/۰۴ $\pm$ ۱۷۲/۸، $P< ۰/۰۰۱$).

در مقابل، اسید پالمیتیک در غلظت‌های ۱/۵ و بالاتر به طور معناداری بقای سلول را کاهش داد (شکل ۱ C,D)، به طوری که غلظت ۲/۵ میلی‌مولار اسید پالمیتیک بعد از ۴۸ ساعت (بیشترین دوز در بیشترین زمان) بقای سلول را به حدود ۳۵ درصد (۱۳/۲ $\pm$ ۳۵/۰۱، $P< ۰/۰۰۱$) کاهش داد و می‌توان گفت که سبب از بین بردن حدود ۶۵ درصد از سلول‌ها شد. این درحالی است که tPA نه تنها بقای سلول را کاهش نداد، بلکه سبب افزایش بقای سلول هم شد.

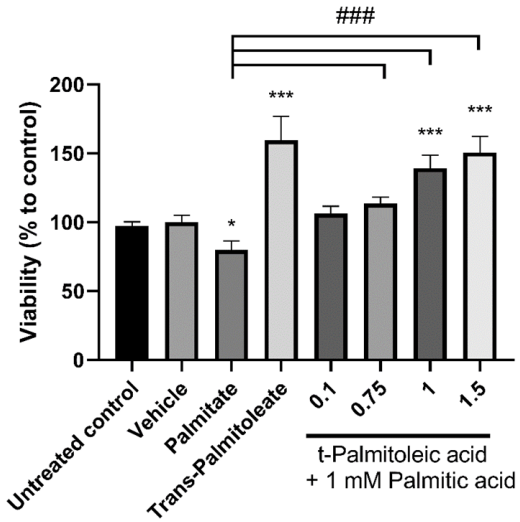


شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف ترانس پالمیتولئیک اسید (tPA) در زمان‌های ۲۴ (A) و ۴۸ (B) ساعت و پالمیتیک اسید در زمان‌های ۲۴ (A) و ۴۸ (B) ساعت بر بقای سلول‌های HepG۲. نتایج به صورت میانگین ارائه شده و نوار خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است. علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنادار نسبت به کنترل است. *P<0.05، **P<0.01، ***P<0.001

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

با توجه به تأثیر متفاوت tPA با پالمیتیک اسید، بررسی اثر توأم این اسیدهای چرب آزمایش شد. غلظت یک میلی‌مولار اسید پالمیتیک با غلظت‌های ۰/۱ میلی‌مولار تا ۱/۵ میلی‌مولار ترانس- پالمیتولئیک اسید به صورت هم تیمار به سلول‌های HepG2 تأثیر داده شد. ترانس پالمیتولئیک اسید و پالمیتیک نیز هر یک به تنهایی برای تیمار سلول استفاده شدند. کنترل تیمار نشده و کنترل حاوی مقدار حلال (Vehicle) نیز در آزمایش گنجانده شد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، وقتی tPA همزمان با پالمیتیک اسید تیمار می‌شود، بقای سلول نسبت به زمانی که سلول‌ها به تنهایی با پالمیتیک اسید تیمار می‌شوند، بهتر می‌شود. به طوری که تیمار همزمان سلول‌ها با پالمیتیک اسید با دوز یک میلی‌مولار و tPA با دوز یک میلی‌مولار بقای سلول را به میزان ۱/۷ برابر نسبت به سلول‌هایی که فقط با پالمیتات تیمار شده بودند و ۱/۴ برابر نسبت به سلول‌های کنترل تیمار نشده افزایش داد (۹/۳ ± ۱۳۹/۳ درصد در تیمار همزمان در مقایسه با ۶/۴ ± ۷۹/۷۶ در تیمار با پالمیتات به تنهایی و ۳/۱ ± ۹۷/۲۳ درصد در گروه کنترل، P< ۰/۰۰۱). این امر نشان می‌دهد که tPA تا حدودی قادر بوده از کاهش بقای سلول توسط پالمیتیک اسید جلوگیری کند. افزایش غلظت tPA توانست اثر منفی پالمیتیک اسید را بر بقای سلولی کاهش دهد؛ به نحوی که غلظت ۱/۵ میلی‌مولار از tPA در تیمار همزمان با پالمیتیک اسید توانست دوباره بقای سلول را به میزان ۱/۹ برابر بیشتر از گروه تیمار شده با پالمیتات به تنهایی و ۱/۵ برابر نسبت به کنترل تیمار نشده ارتقا دهد (۱۱/۸ ± ۱۵۰/۶ درصد در تیمار همزمان در مقایسه با ۶/۴ ± ۷۹/۷۶ در تیمار با پالمیتات به تنهایی و ۳/۱ ± ۹۷/۲۳ درصد در گروه کنترل، P< ۰/۰۰۱).

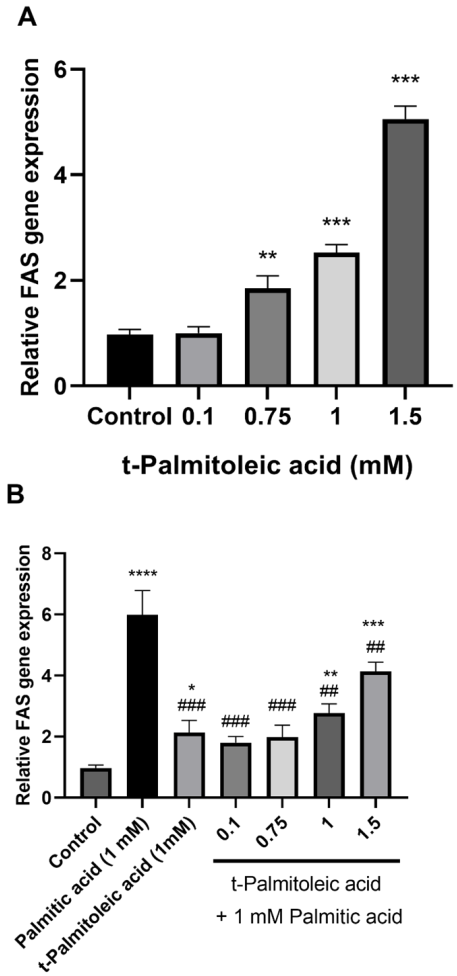


شکل۲. تأثیر تیمار توأم با ترانس پالمیتولئیک اسید و پالمیتیک اسید در مقایسه با تیمار با هریک به تنهایی بر بقای سلول‌های HepG۲. غلظت‌های ۰/۱ تا ۱/۵ میلی‌مولار ترانس پالمیتولئیک اسید همراه با غلظت یک میلی‌مولار پالمیتیک اسید برای تیمار توأم در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ارائه شده و نوار خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است. علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار نسبت به کنترل تیمار نشده (***P<0.001, *P<0.05) و علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنادار نسبت به گروهی که فقط با پالمیتیک اسید تیمار شده (###P<0.001) است.

تأثیر ترانس پالمیتولئیک اسید بر بیان ژن FAS:

تأثیر غلظت‌های مختلف ترانس پالمیتولئیک اسید به تنهایی و توأم با پالمیتات بر کمپلکس اسید چرب سنتاز بررسی شد. یافته‌های حاصل نشان داد که بیان ژن FAS تحت تأثیر پالمیتات با غلظت یک میلی‌مولار به طور معناداری و به میزان نزدیک به شش برابر نسبت به کنترل (۰/۸ ± ۵/۹، P < ۰/۰۰۰۱) افزایش یافت. در مقابل، tPA به خصوص در غلظت‌های پایین تأثیر معناداری بر بیان ژن FAS نداشت. هرچند غلظت‌های بالاتر tPA توانست بیان ژن FAS را افزایش دهد، ولی همچنان این افزایش به طور معناداری کمتر از پالمیتیک اسید بود به طوری که tPA در غلظت یک میلی‌مولار بیان ژن FAS را به میزان ۲/۵ برابر (۰/۱۵ ± ۲/۵، P < ۰/۰۰۱) و در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار بیان ژن را به میزان پنج برابر (۰/۲ ± ۵/۰، P <۰/۰۰۱) افزایش داد (شکل۳ A).

همان‌طور که در شکل ۳B مشاهده می شود، در تیمار همزمان پالمیتات و tPA اگرچه افزایش در بیان ژن FAS قابل رؤیت است، ولی این افزایش همچنان در مقایسه با تیمار با پالمیتات به تنهایی از سطح کمتری برخوردار است، به طوری که در تیمار همزمان غلظت ۱/۵ میلی‌مولار از tPA و یک میلی‌مولار از پالمیتات بیان ژن FAS به میزان ۰/۳ ± ۴/۱۴ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته است، در حالی که پالمیتات به تنهایی توانسته ۰/۸ ± ۵/۹ برابر نسبت به کنترل بیان ژن را القا کند که این دو حالت تفاوت معناداری را نسبت به هم نشان می‌دهند (P < ۰/۰۱).



شکل۳. تأثیر ترانس پالمیتولئیک اسید و پالمیتیک اسید بر بیان ژن اسید چرب سنتاز (Fatty acid synthase: FAS) در سلول‌های HepG۲ به طور جداگانه (A) و در تیمار همزمان (B). داده‌ها به صورت میانگین ارائه شده و نوار خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است. اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل تیمار نشده با علامت * (*P<0.05 ،**P<0.01 ،***P<0.001) و نسبت به گروه تیمار شده با پالمیتیک اسید با علامت # (#P<0.05 ،##P<0.01 ،###P<0.001) نشان داده شده است.

بررسی تأثیر ترانس پالمیتولئیک اسید بر فعالیت گیرنده هسته‌ای PPARα:

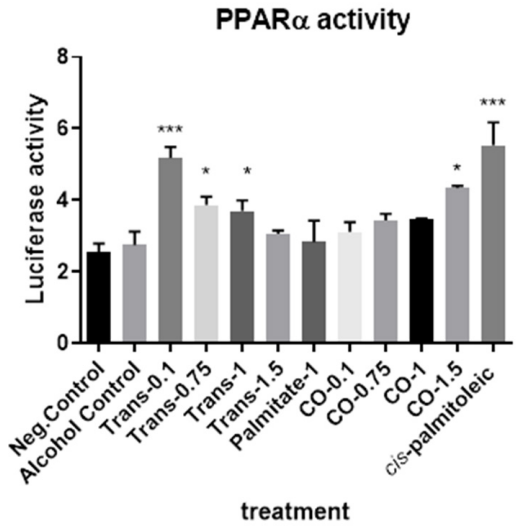
گیرنده هسته ای PPAR α یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیان ژن آنزیم‌های دخیل در متابولیسم لیپید است که توسط اسیدهای چرب به طور متفاوت تنظیم می‌شود. برای بررسی تأثیرtPA بر PPAR α، ابتدا بیان ژن این گیرنده در سلول‌های HepG2 به کمک Real-time PCR ارزیابی شد. با توجه به بیان پایین این ژن در سلول‌های HepG2 و بیان قابل توجه آن در سلول‌های HEK293T ، تأثیر اسیدهای چرب بر این گیرنده در این سلول‌ها سنجش شد. برخلاف پالمیتیک اسید که تأثیر معناداری بر فعالیت PPAR α نداشت، ترانس پالمیتولئیک اسید توانست فعالیت این گیرنده را به طور قابل توجهی افزایش

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

دهد، به طوری که این اسید چرب با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار که معادل غلظت فیزیولوژیک آن است، فعالیت لوسیفراز را که بیانگر میزان فعالیت گیرنده هسته‌ای PPAR γ است، به میزان ۰/۳ $\pm$ ۵/۱۸ برابر نسبت به کنترل افزایش دهد ($P < ۰/۰۰۱$). جالب اینجاست که بیشترین فعالیت با غلظت فیزیولوژیک این اسید چرب (۰/۱ میلی‌مولار) حاصل شد. با افزایش غلظت ترانس پالمیتولئیک اسید، فعالیت PPAR α کاهش یافت، ولی همچنان معنادار بود (۰/۰۹ $\pm$ ۳/۰۶ برابر نسبت به کنترل، $P< ۰/۰۵$).

در تیمار همزمان با پالمیتیک اسید، اثر افزاینده ترانس پالمیتولئیک اسید بر PPAR α مهار شد و پالمیتیک اسید توانست از اثر فعال کنندگی tPA بر فعالیت گیرنده بکاهد(شکل ۴). در تیمار همزمان با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار tPA و یک میلی‌مولار پالمیتیک اسید، فعالیت لوسیفراز ۰/۰۵ $\pm$ ۴/۳ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$).

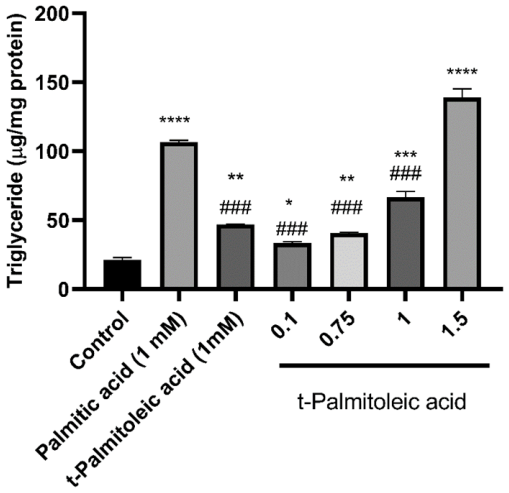
در کنارمطالعه اصلی یعنی بررسی تاثیر ترانس پالمیتولئیک اسید بر فعالیت PPAR α، تأثیر غلظت ۱ mM از سیس پالمیتولئیک هم بررسی شد. سیس پالمیتولئیک اسید از نظر طول زنجیره کربنی و تعداد پیوند دوگانه مشابه tPA است و تنها تفاوت این اسید چرب با نوع ترانس در وضعیت قرارگیری پیوند دوگانه از نظر سیس یا ترانس بودن است. نتایج نشان داد که سیس پالمیتولئیک اسید تاثیری مشابه tPA داشت و گیرنده PPAR α را به میزان قابل توجهی (۰/۶ $\pm$ ۵/۵ برابر نسبت به کنترل، $P < ۰/۰۰۱$) فعال کرد(شکل ۴).



شکل۴. تأثیر غلظت‌های مختلف ترانس پالمیتولئیک (Trans: Trans-Palmitoleic acid) به تنهایی و یا توأم با پالمیتیک اسید (Co-treatement: CO) بر فعالیت گیرنده هسته‌ای PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor)) در سلول‌ها. در تیمارهای همزمان غلظت پالمیتیک اسید ثابت (یک میلی‌مولار)است و اعداد نشان‌دهنده غلظت‌های متفاوت ترانس پالمیتولئیک هستند. گروه تیمار نشده به عنوان کنترل منفی (Neg. control: negative control) در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین ارائه شده و نوار خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است. نتیجه معنادار با علامت ستاره ($P<0.05$ * و $P<0.001$ ***) نشان داده شده است.

تأثیر اسید ترانس پالمیتولئیک روی میزان تری‌گلیسیرید در سلول‌های HepG2:

همان‌گونه که اشاره شد، با لیز سلولی و آزاد کردن پروتئین و لیپید سلول، به روش BCA، پروتئین و با روش آنزیمی‌میزان TG اندازه‌گیری شد. مقادیر تری‌گلیسیرید داخل سلول‌های HepG2 تیمار شده با اسید پالمیتیک و tPA به صورت جداگانه و توأم پس از ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد و همان‌طور که انتظار می‌رفت هر دو نوع اسید چرب به صورت معناداری تجمع TG را در سلول‌های HepG2 افزایش دادند. نکته جالب توجه این بود که تجمع TG ناشی از tPA به صورت معناداری کمتر از اسید پالمیتیک با غلظت مشابه یک میلی‌مولار بود (۰/۲ $\pm$ ۴۶/۸۷ μ g/mg protein) برای غلظت یک میلی‌مولار tPA در مقابل ۱/۳ $\pm$ ۱۰۶/۶ μ g/mg protein برای غلظت یک میلی‌مولار پالمیتیک اسید، $P < ۰/۰۰۱$). وقتی تیمار توام با اسید پالمیتیک انجام شد، tPA به طور موثری تأثیر چربی‌زایی اسید پالمیتیک را، به خصوص در غلظت‌های کم کاهش داد، به طوری که در تیمار توأم با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار tPA همزمان با غلظت یک میلی‌مولار پالمیتیک اسید میزان TG داخل سلولی μ g/mg protein ۰/۹ $\pm$ ۳۳/۴۶ که در مقایسه با تیمار با پالمیتات به تنهایی با $P <$ ۰/۰۰۱ اختلاف معناداری را نشان داد(شکل ۵).



شکل۴. تأثیر ترانس پالمیتولئیک اسید و پالمیتیک اسید بر تجمع تری‌گلیسیرید در سلول‌های کبدی HepG۲. مقدار تری‌گلیسیرید نسبت به پروتئین تام در سلول نرمال شده است. نتایج به صورت میانگین ارائه شده و نوار خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است. اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل تیمار نشده با علامت * (*P<0.05، **P<0.01، ***P<0.001) و نسبت به گروه تیمار شده با پالمیتیک اسید با علامت # (#P<0.05، ##P<0.01، ###P<0.001) نشان داده شده است.

بحث

این مطالعه نخستین تحقیق در زمینه بررسی تأثیر اسید چرب غیر اشباع ترانس پالمیتولئیک اسید و مقایسه تأثیر آن با اسید چرب اشباع پالمیتیک اسید بر سلول‌های کبدی است. در این مطالعه ابتدا تأثیر tPA در مقایسه با اسید پالمیتیک روی بقای سلول‌های HepG2 بررسی شد و نتایج نشان داد که tPA برخلاف اسید پالمیتیک، نه تنها سبب کاهش بقای سلول‌های HepG2 نمی‌شود، بلکه به صورت قابل توجهی سبب افزایش آن می‌شود. Dave و همکارانش در سال ۲۰۱۷ تاثیر اسید چرب اشباع پالمیتیک اسید و غیراشباع اسید اولئیک را بر سلول‌های HepG2 بررسی کردند و علاوه بر آنکه کاهش بقای سلولی را با افزایش غلظت اسید چرب آزاد متناسب دانستند، بلکه عوامل دیگری مانند نحوه تیمار، مدت زمان تیمار و حتی روش اندازه‌گیری بقای سلولی را در نتایج به دست آمده دخیل دانسته‌اند(۲۱). مروری بر مطالعه‌های انجام شده در خصوص ارتباط اسیدهای چرب با بقای سلولی نشان می‌دهد که اسیدهای چرب گوناگون آثار متنوعی بر بقای سلول اعمال می‌کنند. اثر tPA بر بقای سلولی تا کنون در مطالعه‌های پیشین بررسی نشده، ولی مطالعه‌هات نشان‌دهنده این هستند که برخی اسیدهای چرب قادرند بقای سلول را افزایش دهند. به عنوان مثال Zeng و همکارانش در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که اولئیک اسید که یک اسید چرب ۱۸ کربنه با یک پیوند دوگانه است در مقایسه با اسید چرب پالمیتیک اسید اثر مخرب بر بقای سلولی نداشته و اولئیک اسید در تیمار همزمان با اسید پالمیتیک توانست از آثار سوء این اسید چرب جلوگیری کند که این یافته همراستا با نتایج مطالعه ماست(۲۲). اثر محافظتی اولئیک اسید بر سلول‌های پانکراس هم پیشتر گزارش شده است(۲۳). مطالعه دیگری که در خصوص اولئیک اسید در سلول‌های اپی‌تلیال پستان انجام شده، نشان داده که تحت تأثیر این اسید چرب بقای این سلول‌ها افزایش می‌یابد(۲۴). اسید چرب دیگری موسوم

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

به لینولئیک اسید که اسید چرب ۱۸ کربنه با دو پیوند دوگانه یکی در موقعیت سیس و دیگری در موقعیت ترانس است هم طبق گزارش‌ها اثر محافظتی بر سلول‌های کبد دارد. به طوری که این اسید چرب فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲۱ (FGF۲۱) را القا می‌کند که این فاکتور رشد به نوبه خود افزایش‌دهنده بقای سلول‌های کبدی است(۲۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثر اسید چرب بر بقای سلول متأثر از ساختار آن متفاوت است و به ویژه در خصوص اسیدهای چرب غیر اشباع اثر محافظتی دارد.

مطالعه‌ها در خصوص پالمیتیک اسید همگی حاکی از آن است که این اسید چرب به ویژه در غلظت‌های بالا سبب کاهش بقای سلول و القای آپوپتوز در سلول می‌شود. در راستای نتایج مطالعه حاضر، سال ۲۰۰۳ نیز Listenberger و همکارانش غلظت ۱mM را به عنوان غلظتی از اسید پالمیتیک نشان داد که می‌تواند سمیت ناشی از چربی ایجاد کند(۲۶). البته در بعضی مطالعه‌ها دیگر غلظت‌های پایین‌تر یا بالاتری از پالمیتات برای ایجاد آپوپتوز و کاهش قابل توجه بقای سلول گزارش شده‌اند(۲۷-۲۹) که ممکن است ناشی از نحوه تیمار با اسید چرب و یا شرایط سلول باشد، ولی آنچه که در همه این مطالعه‌ها مشترک است، تأثیر سوء پالمیتیک اسید بر بقای سلولی و کاهش زنده مانی سلول به دنبال مواجهه آن با پالمیتیک اسید است.

در باره نحوه تیمار، در توافق با روش ما، Dave و همکارانش اسید چرب را قبل از تیمار، با BSA (Bovine serum albumin) کمپلکس کرده و بعد به محیط اضافه کردند تا از تجمع اسید چرب جلوگیری کرده و به صورت قابل توجهی حل شدن اسید چرب آزاد در محیط را افزایش داده تا سلول‌های HepG2 اسیدهای چرب آزاد را بهتر برداشت کنند. در حالی که Ricchi و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر خلاف روش ما، در مطالعه بر تأثیراسید اولئیک و پالمیتیک روی آپوپتوز سلول‌های HepG2، سلول‌ها را مستقیم با این ترکیب‌ها تیمار کردند(۳۰). به نظر می‌رسد روش ما، یعنی ایجاد کمپلکس اسید چرب آزاد با BSA برای نزدیک‌تر کردن شرایط آزمایش با شرایط بدن (حمل اسید چرب توسط آلبومین) بهتر باشد.

یافته دیگر این تحقیق، افزایش بیان ژن FAS تحت تأثیر اسیدهای چرب مطالعه شده بود. هر چند انتظار می‌رود که با توجه به اینکه اسیدهای چرب محصول این آنزیم هستند، اثر مهاری بر بیان ژن آن داشته باشند، ولی در مطالعه ما افزایش بیان ژن FAS پس از تیمار با اسیدهای چرب دیده شد که البته این القا در باره tPA به مراتب کمتر از پالمیتیک اسید بود.

این یافته با توجه به نقش گیرنده SREBP۱ که یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی آنزیم‌های متابولیسم لیپید است، قابل توجیه است. مطالعات نشان می‌دهند که SREBP۱ توسط اسیدهای چرب منجمله پالمیتات فعال می‌شود(۳۱). از سویی دیگر SREBP۱ می‌تواند به ناحیه بالادست ژن FAS متصل شده و بیان آن را القا کند(۳۲, ۳۳). به نظر می‌رسد مسیرهای مختلفی در بیان ژن FAS وجود دارد که امکان بیان متفاوتی از FAS را تحت تأثیر اسیدهای چرب فراهم می‌کند.

فعالیت PPAR α. اکسیداسیون لیپید را افزایش و تجمع لیپید راکاهش می‌دهد.(۳۴, ۳۵) یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که غلظت فیزیولوژیک ترانس پالمیتولئیک اسید و غلظت ۱mM سیس پالمیتولئیک اسید به صورت معناداری فعالیت PPAR α را که توسط انجام آزمایش لوسیفراز مشخص شد، تحریک می‌کنند. در تیمار همزمان با پالمیتیک اسید، اثر افزاینده ترانس پالمیتولئیک اسید بر PPAR α مهار شد که به نظر می‌رسد به دلیل اثر رقابتی میان این دو اسید چرب در اتصال به گیرنده PPAR α باشد. چرا که پالمیتیک اسید توانست اثر فعال‌کنندگی tPA بر فعالیت گیرنده را کاهش دهد. اسیدهای چرب جزو لیگاندهای PPAR α هستند، اما مطالعه‌های پیشین نشان داده است که اسیدهای چرب متفاوت در مقابل PPAR αبه شکل‌های مختلفی عمل می‌کنند. اسید استئاریک و اسید پالمیتیک ممانعت‌کننده هستند، در حالی‌که همتاهای غیر اشباع آن‌ها، یعنی به ترتیب اولئیک اسید و پالمیتولئیک اسید فعالیت ترانس اکتیواسیونی PPAR α را افزایش می‌دهند. حتی در بین اسیدهای چرب غیراشباع، اسید لینولئیک و گاما لینولنیک در فعالیت PPAR α تأثیر ندارند، در حالی‌که آلفا لینولنیک اسید، به شدت فعالیت این گیرنده را تقویت می‌کند. غلظت‌های کم از آراشیدونیک اسید، آیکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزاانوئیک اسید، فعالیت PPAR α را تحریک کرده، در حالی که غلظت‌های بالای آن‌ها ممانعت‌کننده فعالیت آن هستند(۳۶). Kratz و همکارانش گزارش کردند که ترانس پالمیتولئیک اسید قادر است با تحریک بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، حساسیت به انسولین را به سلول‌های کبدی باز گرداند(۲۴). بر اساس یافته‌های ما، گزارش‌های پیشین از تحریک بتا اکسیداسیون توسط ترانس پالمیتولئیک اسید ممکن است ناشی از تحریک فعالیت رونویسی PPAR α باشد.

دیگر یافته‌های این مطالعه، تفاوت تجمع تری‌گلیسرید در هپاتوسیت‌ها در پاسخ به ترانس پالمیتولئیک و پالمیتیک اسید بود. گر چه هر دو اسید چرب سبب تجمع چربی در سلول‌های HepG2 شدند، ولی تاثیر اسید پالمیتیک در مقایسه با ترانس پالمیتولئیک اسید کمتر بود. به خصوص در غلظت طبیعی آن در بدن که به مقدار بسیار کمی سطح تری گلیسرید داخل سلولی را در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش می‌دهد. این یافته با نتایج مربوط به فعال‌سازی PPAR α همخوانی داشت چرا که PPAR α سبب کاهش تجمع لیپید در سلول می‌شود و از طرف دیگر tPA توانست PPAR α را فعال کند که این امر در مورد پالمیتیک اسید اتفاق نیفتاد. سازگار با این نتیجه، مظفریان و همکارانش نشان دادند که در مطالعه‌های انسانی افزایش ترانس پالمیتولئیک اسید در گردش خون، با کاهش تری‌گلیسرید، انسولین ناشتا، فشار خون و بروز دیابت همراه است(۳۷).

نقطه قوت این مطالعه، استفاده از اسید چربی است که به طور طبیعی در تغذیه وجود دارد و بنابراین به راحتی می‌تواند جایگزین اسیدهای چرب دیگر موجود در رژیم غذایی شود. محدودیت این طرح کار روی نمونه سلولی بوده که تعمیم آن را به کاربرد بالینی اسید چرب محدود می‌کند. مطالعه این اسید چرب در نمونه‌های حیوانی می‌تواند راهگشای مطالعه‌های بعدی برای ارزیابی پتانسیل و کارآمدی این اسید چرب در سلامت کبد باشد.

نتیجه‌گیری کلی:

از یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که tPA بر خلاف اسید پالمیتیک، بر سلول‌های کبدی اثر مخرب نداشته و بقای این سلول‌ها را افزایش می‌دهند. علاوه بر این گیرنده PPAR α که از عوامل مؤثر در کاهش تجمع چربی است را فعال کرده و از سویی دیگر استئاتوز کمتری نسبت به پالمیتیک اسید ایجاد کرده و القای آنزیم FAS نیز به میزان کمتری انجام می‌شود.

به طور کلی می‌توان گفت که tPA اثر مخرب بر سلول‌های کبد نداشته و اثر محافظتی روی این سلول‌ها دارد. مطالعه‌ی بیشتر روی مدل‌های حیوانی می‌تواند شواهد بیشتری را برای امکان و فواید مصرف طولانی‌مدت این اسید چرب در سلامتی و بیماری فراهم کند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

منـابع:

1. Sanches-Silva A, Testai L, Nabavi SF, Battino M, Devi KP, Tejada S, et al. Therapeutic potential of polyphenols in cardiovascular diseases: regulation of mTOR signaling pathway. Pharmacological research. 2020:104626.
2. De Lorenzo A, Romano L, Di Renzo L, Di Lorenzo N, Cenname G, Gualtieri P. Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2019;71:110615.
3. Petrović G, Bjelaković G, Benedeto-Stojanov D, Nagorni A, Brzački V, Marković-Živković B. Obesity and metabolic syndrome as risk factors for the development of non-alcoholic fatty liver disease as diagnosed by ultrasound. Vojnosanitetski pregled. 2016;73(10):910-20.
4. Hunter JE. Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. Lipids. 2006;41(11):967-92.
5. Destaillats F, Wolff RL, Precht D, Molkentin J. Study of individual trans-and cis-16:1 isomers in cow, goat, and ewe cheese fats by gas-liquid chromatography with emphasis on the trans-Δ3 isomer. Lipids. 2000;35(9):1027-32.
6. Tang J, Yang B, Yan Y, Tong W, Zhou R, Zhang J, et al. Palmitoleic Acid Protects against Hypertension by Inhibiting NF-κB-Mediated Inflammation. Mol Nutr Food Res. 2021:e2001025.
7. Mitri J, Tomah S, Furtado J, Tasabehji MW, Hamdy O. Plasma Free Fatty Acids and Metabolic Effect in Type 2 Diabetes, an Ancillary Study from a Randomized Clinical Trial. Nutrients. 2021;13(4).
8. Brouwer I, Wanders A, Katan M. Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed? European journal of clinical nutrition. 2013;67(5):541.
9. Gulecoglu Onem MG, Coker C, Baysal K, Altunyurt S, Keskinoglu P. The effects of pre-pregnancy obesity and gestational weight gain on maternal lipid profiles, fatty acids and insulin resistance. J Perinat Med. 2021.
10. Clarke SD. Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. Journal of animal science. 1993;71(7):1957-65.
11. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nature reviews Cancer. 2007;7(10):763-77.
12. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR-Ralpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Journal of hepatology. 2015;62(3):720-33.
13. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. Circulation Research. 2005;96(9):939-49.
14. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPARα to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. Cardiovascular research. 2011;90(2):276-84.
15. Montague CT. Adipose depot-specific effects of PPAR gamma agonists: a consequence of differential expression of PPAR gamma in adipose tissue depots? Diabetes Obes Metab. 2002;4.
16. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ. Annu Rev Biochem. 2008;77:289-312.
17. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. Trends in pharmacological sciences. 2005;26(5):244-51.
18. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Journal of hepatology. 2015;62(3):720-33.
19. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland). 2006;25(3):454-65.
20. Mozaffarian D. Trans fatty acids–effects on systemic inflammation and endothelial function. Atherosclerosis Supplements. 2006;7(2):29-32.
21. Dave T, Tilles AW, Vemula M. A Cell-Based Assay to Investigate Hypolipidemic Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Therapeutics. SLAS Discov. 2018;23(3):274-82.
22. Zeng X, Liu X, Luo R, Chen Y. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced pyroptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells. The FASEB Journal. 2019;33(1_supplement):487.27-.27.
23. Nemecz M, Constantin A, Dumitrescu M, Alexandru N, Filippi A, Tanko G, et al. The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules. Frontiers in pharmacology. 2019;9:1554-.
24. Meng Y, Zhang J, Yuan C, Zhang F, Fu Q, Su H, et al. Oleic acid stimulates HC11 mammary epithelial cells proliferation and mammary gland development in peripubertal mice through activation of CD36-Ca2+ and PI3K/Akt signaling pathway. Oncotarget. 2018;9(16).
25. Yu J, Yu B, Jiang H, Chen D. Conjugated linoleic acid induces hepatic expression of fibroblast growth factor 21 through PPAR-α. The British journal of nutrition. 2012;107(4):461-5.
26. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(6):3077-82.
27. Yao H-R, Liu J, Plumeri D, Cao Y-B, He T, Lin L, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. Am J Transl Res. 2011;3(3):284-91.
28. Dhami-Shah H, Vaidya R, Udipi S, Raghavan S, Abhijit S, Mohan V, et al. Picroside II attenuates fatty acid accumulation in HepG2 cells via modulation of fatty acid uptake and synthesis. Clin Mol Hepatol. 2018;24(1):77-87.
29. Zang Y, Fan L, Chen J, Huang R, Qin H. Improvement of Lipid and Glucose Metabolism by Capsiate in Palmitic Acid-Treated HepG2 Cells via Activation of the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway. J Agric Food Chem. 2018;66(26):6772-81.
30. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2009;24(5):830-40.
31. Marwarha G, Claycombe-Larson K, Lund J, Ghribi O. Palmitate-Induced SREBP1 Expression and Activation Underlies the Increased BACE 1 Activity and Amyloid Beta Genesis. Molecular Neurobiology. 2019;56(7):5256-69.
32. Griffin MJ, Sul HS. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. IUBMB Life. 2004;56(10):595-600.
33. Li JN, Mahmoud MA, Han WF, Ripple M, Pizer ES. Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Participates in the Regulation of Fatty Acid Synthase Expression in Colorectal Neoplasia. Experimental Cell Research. 2000;261(1):159-65.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

34. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. The Lancet. 2005;365(9468):1415-28.
35. Dowman J, Armstrong M, Tomlinson J, Newsome P. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2011;13(8):692-702.
36. Popeijus H, van Otterdijk S, Krieken S, Konings M, Serbonij K, Plat J, et al. Fatty acid chain length and saturation influences PPAR transcriptional activation and repression in HepG2 cells. Molecular Nutrition & Food Research. 2014;58.
37. Mozaffarian D, de Oliveira Otto MC, Lemaitre RN, Fretts AM, Hotamisligil G, Tsai MY, et al. trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). The American journal of clinical nutrition. 2013;97(4):854-61.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]