



## اثر تمرین هوازی بر بیان lncRNA های مرتبط با گلوکز ۶ فسفاتاز (G6P) و گلوکوکیناز (GCK) در کبد موش‌های چاق دیابتی نوع ۲

فاطمه کاظمی نسب<sup>۱\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

### چکیده

**هدف:** هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی بر بیان lncRNA های مرتبط با گلوکز ۶ فسفاتاز (G6P) و گلوکوکیناز (GCK) در موش‌های دیابتی بود.

**روش کار:** هجده سر موش C57BL/6 با وزن ۱۸-۱۲ گرم و سن ۴-۶ هفته به دو گروه تقسیم شدند: (۱) موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (HFD) (n=12) و (۲) موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد (n=6). حیوانات به مدت ۱۶ هفته تحت تیمار رژیم غذایی قرار گرفتند. پس از تایید القای دیابت توسط تست‌های تحمل گلوکز و تحمل انسولین، گروه تغذیه شده با HFD به دو گروه تقسیم شدند: (A) رژیم غذایی پرچرب-تمرین، (B) رژیم غذایی پرچرب-بی تحرک. موش‌های گروه تمرینی به مدت ۸ هفته، ۵ جلسه در هفته با سرعت متوسط ۲۲ متر بر دقیقه و به مدت ۵۰ دقیقه، تحت تمرین بر روی تردمیل قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌ها قربانی و بافت کبد جداسازی شد. براساس نتایج بیوانفورماتیک، lncRNA MEG3 مرتبط با G6P و lncRNA lncLGR مرتبط با GCK انتخاب شدند. از آزمون ANOVA استفاده شد.

**یافته‌ها:** سطوح G6P و MEG3 در موش‌های HFD بالا و در موش‌های تمرین کرده نسبت به موش‌های تمرین نکرده به طور معناداری کمتر بود. همچنین بیان GCK و lncLGR در موش‌های دیابتی تمرین نکرده کمتر بود، اما به دنبال تمرین بدنی افزایش یافت.

**نتیجه گیری:** احتمالاً تمرین هوازی با کاهش بیان MEG3، بیان G6P در کبد را تنظیم می‌کند و در نتیجه گلوکونئوز و تولید گلوکز کبدی کاهش پیدا می‌کند و مقاومت به انسولین در موش‌های دیابتی بهبود می‌یابد. همچنین به دنبال تمرین بدنی و افزایش بیان lncLGR، بیان GCK کبدی نیز بالا می‌رود. در این وضعیت گلوکز خون به گلیکوژن در کبد ذخیره می‌شود و در نتیجه هایپرگلیسمی کاهش می‌یابد.

**واژگان کلیدی:** تمرین هوازی، گلوکز ۶ فسفاتاز، گلوکوکیناز، دیابت، چاقی

۱. گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

\*نشانی الکترونیک نویسنده مسئول: fkazeminasab@kashanu.ac.ir

## مقدمه

موش‌های مدل دیابتی با کمبود انسولین، فعالیت G6P افزایش می‌یابد (۲۳).

مطالعات مختلف تأثیر مثبت فعالیت بدنی بر چاقی و دیابت در مدل حیوانی را بررسی کرده اند. مطالعات نشان داده اند که ورزش اجباری بر روی تردمیل می‌تواند باعث کاهش التهاب در چربی و رسوبات چربی داخل کبدی در بافت کبد موش‌ها شود (۲). نکته جالب توجه این است، تمرین بدنی منجر به کاهش مقاومت به انسولین در مدل موش‌های چاق دیابتی ناشی از رژیم غذایی پرچرب (HFD) شد (۱۸). اثرات مفید تمرین هوایی بر دیابت از طریق دو مکانیزم اصلی می‌باشد: ۱. افزایش ظرفیت اکسیداتیو میتوکندری در بافت‌های محیطی و کبد، ۲. مهار تولید گلوکز کبدی. مهار تولید گلوکز کبدی از طریق کاهش بیان PGC1 $\alpha$  - فاکتور رونویسی و تنظیم کننده مهم در متابولیسم گلوکز- و ژن‌های کلیدی در واکنش گلوکونئوز از جمله فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز (PEPCK $\alpha$ )، فروکتوز ۱،۶- بیسفاتاز (FDPase $\alpha$ ) و گلوکز ۶ فسفاتاز (G6P) صورت می‌گیرد و به طور موثری دیابت را بهبود می‌بخشد و میزان گلوکز خون را کاهش می‌دهد (۱۶، ۳۰، ۳۶). به طور کلی می‌توان گفت شناخت تنظیم کننده های سلولی مولکولی در مسیر گلوکونئوز می‌تواند به درمان دیابت کمک بسیاری نماید.

LncRNA ها رونوشت مشابه mRNA ها هستند که اندازه آن‌ها تقریباً ۲۰۰ نوکلئوتید

بیماری دیابت نوع ۲ (T2DM $^1$ ) به دلیل یک سری اختلالات متابولیسمی در متابولیسم کربوهیدرات از جمله کاهش عملکرد انسولین، اختلال در ترشح انسولین، افزایش تولید گلوکز کبدی و افزایش مقاومت به انسولین (IR $^2$ ) رخ می‌دهد (۲۲). مقاومت به انسولین عمدتاً به دلیل چاقی، یک عامل تعیین کننده اصلی مرتبط با سندرم متابولیک است که منجر به T2DM می‌شود. تقریباً در همه بافت‌ها در شرایط IR، سلول‌ها به میزان کافی به انسولین پاسخ نمی‌دهند (۱۱). چاقی به عنوان یک عامل اصلی برای ارتباط با مکانیسم‌های مقاومت به انسولین در نظر گرفته می‌شود (۳۹). شرایط مقاومت به انسولین، با تغییرات چشمگیری در فعالیت دو آنزیم گلوکوکیناز (GCK $^3$ ) و گلوکز ۶ فسفاتاز (G6P $^4$ ) همراه است. آنزیم گلوکوکیناز از آنزیم‌های محدودکننده سرعت $^5$  فسفوریلاسیون گلوکز کبدی محسوب می‌شود که نقش مهمی در هومئوستاز گلوکز و سنتز گلیکوژن دارد. محققان در پژوهشی گزارش کرده اند که فعالیت آنزیم و بیان GCK در سطح mRNA در کبد موش‌های دیابتی کاهش می‌یابد (۴۲). آنزیم گلوکز ۶ فسفاتاز از آنزیم‌های محدودکننده سرعت گلوکونئوز است که به طور عمده در کبد بیان می‌شود و در تولید گلوکز به دیگر اندام‌ها نقش مهمی دارد. فعالیت آنزیم G6P توسط مسیر سیگنالینگ cAMP تحریک و توسط انسولین مهار می‌شود. در

6. High fat diet
7. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
8. Phosphoenolpyruvate carboxykinase
9. Fructose 1,6-bisphosphatase

1. Type 2 diabetes
2. Insulin resistance
3. Glucokinase
4. Glucose 6 phosphatase
5. Rate-limiting enzyme

که ناک داون<sup>۵</sup> IncRNA MEG3 منجر به مهار بیان پروتئین گلوکز ۶ فسفاتاز در کبد موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب می‌شود (۴۵). در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۶، روان<sup>۶</sup> و همکارانش گزارش کردند که IncLGR با ژن گلوکوکیناز ارتباط دارد و بیان ژن گلوکوکیناز کبدی را در موش‌ها تنظیم می‌کند. در این پژوهش ارتباط IncLGR و گلوکوکیناز به تایید آزمایشگاهی رسید (۲۸). اگرچه در سال‌های گذشته در پژوهش‌های بسیاری به بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیماری دیابت پرداخته شده است و نتایج حاکی از آن است که تمرین هوازی در پیشگیری و درمان دیابت نقش مهمی دارد، اما در مطالعات اندکی به بررسی مکانیسم‌های سلولی مولکولی اثرات تمرین بدنی پرداخته شده است. در نتیجه تلاش برای شناخت مکانیسم‌های مولکولی فعالیت بدنی بر کاهش مقاومت به انسولین و مسیرهای سلولی مولکولی در متابولیسم کربوهیدرات، احتمالاً می‌تواند برای پیشگیری و درمان دیابت سودمند باشد. چنین مطالعه‌ای به توسعه اهداف جدید درمانی برای T2DM، پیدا کردن نقطه عطفی در کمک به شناسایی و ساخت دارو و یا سایر موارد برای درمان یا کاهش دیابت و همچنین درک مکانیسم‌های بالقوه در پیشرفت چاقی به T2DM و راه‌های جلوگیری از پیشرفت بیماری دیابت کمک می‌کند.

همچنین نقش فعالیت بدنی بر شبکه mRNAs-IncRNAs مرتبط با ژن‌های کلیدی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها از جمله گلوکز ۶ فسفاتاز و گلوکوکیناز در کبد موش‌های چاق

است که همه آن‌ها به استثناء موارد کمی، فاقد توانایی رمز کردن پروتئین هستند. LncRNA ها با اثرات تنظیمی بالقوه بر بیان ژن‌های هدف، در سطح رونویسی و پس از رونویسی فعالیت دارند (۳۱). مطالعات مختلف نشان داده است که IncRNA ها به عنوان تعدیل کننده فرایندهای کلیدی سلولی، نه تنها در فیزیولوژی طبیعی (۶، ۱۰، ۱۹، ۳۴، ۳۸)، دیابت نوع ۱ (۲۰) و دیابت نوع ۲ (۷، ۴۶) اهمیت دارند. از طرفی در مطالعات معدودی اثر فعالیت بدنی در بهبود شرایط متابولیک که به واسطه IncRNAs ایجاد می‌شود بررسی شده است و محققان گزارش کرده اند که تمرین بدنی با کاهش بیان IncRNA MALAT1 مقاومت به انسولین را کاهش می‌دهد (۱۸). همچنین در پژوهشی دیگر نتایج نشان داد که IncRNA MALAT1 با بهبود اختلال عملکرد اندوتلیال که به واسطه تمرین بدنی در کودکان چاق اتفاق می‌افتد، ارتباط دارد (۴۳). از طرف دیگر، در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه ارتباط بین IncRNA MEG3 با ژن گلوکز ۶ فسفاتاز و همچنین ارتباط بین IncLGR با ژن گلوکوکیناز انجام شده است. در سال ۲۰۱۹، ژو<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که بیان بیش از حد<sup>۲</sup> IncRNA MEG3 با افزایش بیان پروتئین گلوکز ۶ فسفاتاز در هپاتوسیت‌ها ارتباط دارد و ارتباط IncRNA MEG3 و گلوکز ۶ فسفاتاز به تایید آزمایشگاهی<sup>۴</sup> رسید (۴۴). در سال ۲۰۱۹، همان تیم پژوهشی گزارش کردند

1. Zhu
2. Overexpression
3. LncRNA maternally expressed gene
- 3
4. Experimental validation

پایتون<sup>۶</sup> (۳۵)، مجموعه ای از IncRNA ها و mRNA هایی که در مجاورت ۵۰ کیلوبایت (kb) بود، بدست آمد. در نهایت ژن گلوکوکیناز و گلوکز ۶ فسفاتاز که در مسیرهای مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات از جمله گلیکوژن و گلوکونئوزن نقش کلیدی دارند، انتخاب شدند. براساس نتایج بیوانفورماتیک و نتایج مطالعات اخیر در رابطه با ارتباط (همبستگی) بالای بیان IncRNA MEG3 و ژن گلوکز ۶ فسفاتاز و ارتباط بالای IncRNA IncLGR و ژن گلوکوکیناز، این دو IncRNA به عنوان دو تنظیم کننده مهم برای بیان ژن گلوکز ۶ فسفاتاز و گلوکوکیناز انتخاب شدند.

#### القای چاقی و دیابت در مدل حیوانی

تعداد ۱۸ موش نر C57BL/6 با وزن تقریبی (۱۲-۱۸ گرم) و سن (۴-۶ هفته) تحت شرایط کنترل شده ی نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما ( $23 \pm 1$  درجه سانتیگراد) و رطوبت ( $50 \pm 5$  درصد) در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. وزن بدن موش‌ها به صورت هفتگی اندازه گیری شد. پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه، موش‌ها به دو گروه تقسیم شدند: ۱. موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (HFD). این گروه به مدت ۱۶ هفته جهت القای چاقی از رژیم غذایی پرچرب (۶۰٪ کیلوکالری از چربی، ۲۰٪ کیلوکالری از کربوهیدرات، ۲۰٪ کیلوکالری از پروتئین) تغذیه شدند. ۲. موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد (Control). این

دیابتی نوع ۲ بررسی نشده است. در نتیجه این پژوهش طراحی شد تا نشان دهد آیا تمرین هوازی منظم می‌تواند از طریق تنظیم کننده‌های رونویسی ژن از جمله IncRNAs، متابولیسم کربوهیدرات را تعدیل و کنترل کند؟

#### روش پژوهش

##### مراحل بیوانفورماتیک طرح

در ابتدا، مجموعه ای از IncRNA ها و ژن‌های حساس متابولیسی کبدی از GEO<sup>۱</sup>، بانک اطلاعات ژنوم موشی (MGD<sup>۲</sup>) به آدرس (<http://www.informatics.jax.org>) (۳) و بررسی ادبیات پیشین جمع آوری شد. IncRNA ها و mRNA ها از مجموعه داده‌های GEO (GSE94790)، که به طور متفاوت در کبد موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب بیان شدند و بر اساس  $\log_{2}FC > 2$  در مقایسه با گروه رژیم غذایی استاندارد متفاوت بودند، غربال شدند. تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر<sup>۴</sup> mRNA های استخراج شده با استفاده از بانک اطلاعاتی DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) براساس داده-های KEGG<sup>۵</sup> انجام شد تا مسیرهای احتمالی موجود در کبد موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب غربالگری شود.

مکان کروموزومی مجموعه ای از IncRNA ها و mRNA های انتخاب شده از مرورگر Ensembl استخراج شد و با استفاده از زبان برنامه نویسی

1. Gene Expression Omnibus
2. Mouse Genome Database
3. Log fold change
4. Pathway enrichment
5. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

6. Paython

7. High-fat diet

8. Standard diet

متعددی از جمله ترشح ادیپوکاین از بافت چربی، آزاد شدن اسیدهای چرب آزاد (FFA<sup>۴</sup>) به خون و ایجاد مقاومت به انسولین، به واسطه رژیم‌های غذایی پرچرب و چاقی منجر به القای دیابت نوع ۲ می‌شود (۵، ۱۲).

**انجام تمرین هوازی موش‌ها بر روی تردمیل**  
بعد از ۱۶ هفته (در شروع هفته هفدهم)، حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (موش‌های چاق دیابتی<sup>۵</sup>) به دو گروه تقسیم شدند: ۱. موش‌های تمرین کرده - تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب. (n=6) (HFD-Exe)، ۲. موش‌های بی تحرک - تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب. (n=6) (HFD-Sed). در شروع پژوهش برای آشناسازی موش‌ها با تمرین کردن بر روی تردمیل، موش‌های گروه تمرینی (HFD-Exe) با شدت ۱۰ متر بر دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در روز بر روی تردمیل مخصوص موش‌ها، تمرین بدنی را آغاز کردند و به مدت یک هفته، به تدریج زمان فعالیت از ۱۵ دقیقه به ۵۰ دقیقه در روز و شدت فعالیت به ۱۹ متر بر دقیقه افزایش یافت. هفته اول تمرین در شروع پژوهش به این منظور طراحی شد که موش‌های گروه تمرین، بتوانند هر هفته ۵ روز متوالی، هر روز یک جلسه و هر جلسه ۵۰ دقیقه با شدت ۱۹ متر بر دقیقه روی نوارگردان بدون پروتکل اصلی تمرین به شرح ذیل است: موش‌های گروه تمرین کرده در هفته اول و دوم با شدت ۱۹ متر بر دقیقه، هفته سوم و چهارم با شدت ۲۱ متر بر دقیقه، هفته پنجم و ششم با شدت ۲۳ متر بر دقیقه، هفته هفتم و هشتم با شدت ۲۵ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه

گروه به مدت ۱۶ هفته از رژیم غذایی استاندارد (۱۰٪ کیلوکالری از چربی، ۷۰٪ کیلوکالری از کربوهیدرات، ۲۰٪ کیلوکالری از پروتئین) تغذیه شدند. در هر گرم خوراک پرچرب، ۵/۸ کیلوکالری انرژی (5.8 kcal/g) و در هر گرم خوراک استاندارد، ۴/۶ کیلوکالری انرژی (4.6 kcal/g) وجود داشت. خوراک پرچرب توسط محقق این پژوهش به شماره ۹۷۰۳۵ به ثبت اختراع رسیده است. در این مطالعه جهت تایید القای چاقی، مقایسه تغییرات وزن بدن موش‌های تغذیه شده با HFD پس از ۱۶ هفته مداخله رژیم غذایی در مقایسه با گروه تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد انجام شد. همچنین جهت تایید القای دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین در مدل حیوانی، پس از پایان ۱۶ هفته مداخله رژیم غذایی، تست تحمل گلوکز (GTT)، تست تحمل انسولین (ITT) در گروه‌های مختلف اندازه گیری و ارزیابی مدل همئوستاز-مقاومت به انسولین (HOMA-IR<sup>۲</sup>) انجام شد. مدل چاقی القا شده توسط رژیم غذایی پرچرب عمدتاً برای القای تجمع بافت چربی بدن، چاقی و بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴، ۲۴). لازم به ذکر است که مدل دیابت ایجاد شده به واسطه رژیم غذایی پرچرب و پرکالری که منجر به القای چاقی در مدل حیوانی می‌شود، شباهت زیادی با مدل دیابت نوع ۲ ایجاد شده در انسان دارد که معمولاً حاصل چاقی و اضافه وزن است و با افزایش گلوکز خون همراه است (۳۲). عوامل

1. Glucose tolerance test
2. Insulin tolerance test
3. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

4. Free fatty acid
5. Obese mice

قرار گرفت. سپس بافت منجمد کبد جهت استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### استخراج RNA و بررسی بیان ژن mRNA و IncRNA توسط تکنیک Real time PCR

به منظور استخراج RNA از بافت کبد از ماده ترایزول<sup>۳</sup> (شرکت Thermo Scientific)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و سپس RNA استخراج شده از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA، با استفاده از کیت DNaseI (شرکت Thermo Scientific)، پاک سازی شد. برای سنتز اولین رشته cDNA، در هر نمونه دو میکروگرم mRNA به کار گرفته شد. در این پژوهش، سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthesis (شرکت TaKaRa) انجام شد. در این پروتکل، برای ساخت cDNA از آغازگر (پرایمر<sup>۴</sup>) رندوم هگزامره<sup>۵</sup> استفاده شد. سطح نسبی بیان mRNA G6P, GCK, MEG3 و IncLGR کبدهی با استفاده از روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. توالی پرایمر اختصاصی G6P, GCK, MEG3 و IncLGR در جدول ۱ ارائه شده است. برای کنترل تکثیر ژن‌ها از پرایمر اختصاصی ژن خانه گردان<sup>۶</sup> 18SrRNA استفاده شد. این ژن در همه بافت‌ها بیان می‌شود و می‌تواند شاهد خوبی برای بررسی بیان ژن باشد (جدول ۱).

تمرین کردند. لازم به ذکر است پروتکل تمرینی استفاده شده در این طرح پژوهشی از نوع پروتکل فزاینده<sup>۱</sup> است که شدت آن متوسط و به میزان ۶۵٪ حداکثر اکسیژن مصرفی است (۱۴، ۱۵). همچنین موش‌های رژیم غذایی پرچرب - بی‌تحرك (HFD-Sed) در حین اجرای پروتکل تحقیق، هیچگونه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های گروه HFD-Sed و گروه HFD-Exe تا پایان ۲۴ هفته (پایان طرح)، از رژیم غذایی پرچرب تغذیه شدند. موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد (Control) تا پایان طرح (پایان ۲۴ هفته) هیچ گونه تمرین بدنی نداشتند.

### جداسازی بافت کبد

پس از پایان هفته بیست و چهارم، موش‌های گروه تمرین ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و موش‌های هر سه گروه پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از طریق تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی کتامین و زایلازین بیهوش شدند. سپس خونگیری انجام شد و بلافاصله خون درون لوله‌های آزمایش ریخته شد. جهت استخراج سرم خون، نمونه‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه (RPM) و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم هر نمونه جدا شد. نمونه‌ها برای اندازه‌گیری نیمرخ لیپیدی<sup>۲</sup> (تری گلیسیرید، کلسترول تام، لیپوپروتئین با چگالی پایین، لیپوپروتئین با چگالی بالا) در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از خونگیری، بافت کبد سریعاً جدا و لوب رویی بافت کبد با استفاده از سرم فیزیولوژیک شستشو داده و به داخل میکروتیوب منتقل شد و در نیتروژن مایع

3. TRIzol Reagent
4. Primer
5. Random hexamer
6. Housekeeping
7. 18S ribosomal RNA

1. Progressive
2. Lipid profile

## جدول ۱. توالی پرایمرها

Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	ژن
CCTGATGGTGGTGGCTCTA	TCTCTGTGCTGTGGCTCTATT	<b>G6P</b>
ATGGCTGT GGATACTACAAG	TCACTGGCCCAGCATGCAAC	<b>GCK</b>
GGGAGCAGCTATGGATCACC	ATAGCGCCCCCTATTTCATGC	<b>MEG3</b>
TCTAAAAGCAAAGGAAGAAATGA	CACTGTCAAAAACACTTTTAATGA	<b>IncLGR</b>
TCGCTCCACCAACTAAGAAC	CGGACACGGACAGGATTG	<b>18SrRNA</b>

حساسیت (mmol/L) ۰/۱ استفاده شد. همچنین برای تعیین غلظت لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL<sup>c</sup>) موجود در سرم از کیت (Mouse LDL-Cholesterol Assay Kit, Crystal Chem) با محدوده سنجش (۴/۵-۲۴۵mg/dL HDL<sup>c</sup> - Mouse) از کیت (Cholesterol Assay Kit, Crystal Chem) با محدوده سنجش (۱/۵-۱۸۰ mg/dL) استفاده شد.

#### ارزیابی مدل هومئوستاز-مقاومت به انسولین (HOMA-IR)

پس از ۱۶ هفته مداخله رژیم غذایی، درحالیکه موش‌ها به مدت ۱۲ ساعت ناشتا بودند، با استفاده از کیت‌های مخصوص سنجش گلوکز (Sigma, St. Louis) به شماره کاتالوگ MAK013، قند خون ناشتا (FBS<sup>۵</sup>) اندازه گیری شد. جهت بررسی میزان انسولین پلاسما، خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد و پلاسما استخراج

برای انجام تکنیک Real time PCR، باید بهترین غلظت cDNA برآورد شود، برای این منظور غلظت‌های مختلف cDNA بررسی و نهایتاً غلظت مناسب ۲ میکرولیتر (201) در نظر گرفته شد. واکنش Real time PCR با استفاده از کیت SYBR Green PCR Master Mix (شرکت TaKaRa) و دستگاه ABI Applied Biosystems ساخت کشور آمریکا، سه بار تکرار شد. پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، سیکل آستانه (Ct) هر نمونه به دست آمد و با استفاده از روش ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) سطح بیان GCK، MEG3 و IncLGR نسبت به بیان ژن 18SrRNA محاسبه شد.

#### آنالیز نیمرخ لیپیدی

برای تعیین غلظت تری‌گلیسیرید (TG<sup>۱</sup>) موجود در سرم از کیت (Mouse Triglycerides kit, MyBioSource) با محدوده سنجش (۰/۰۵-۱۵mmol/L) و برای غلظت کلسترول تام (TC<sup>۲</sup>) موجود در سرم از کیت (Cholesterol kit, MyBioSource) با میزان

3. Low density lipoprotein
4. High density lipoprotein
5. Fasting blood sugar

1. Triglyceride
2. Total cholesterol

پرچرب به طور معناداری بیشتر از موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد است (مدل هومئوستاز-مقاومت به انسولین (HOMA-IR)، شکل ۱C،  $p < 0.001$ ). همچنین در تست تحمل گلوکز (GTT) پس از تزریق گلوکز، سطوح قند خون افزایش پیدا کرد. پس از آن، سطح قند خون به تدریج کاهش یافت و در نهایت در زمان ۱۲۰ دقیقه به سطح اولیه خود بازگشت. داده‌ها نشان می‌دهد اختلاف معناداری در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب در زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در مقایسه با گروه کنترل (موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد) وجود دارد (شکل ۲A،  $p < 0.05$ ). این نتایج با افزایش مقادیر سطح زیر منحنی (AUC) گلوکز در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (موش‌های دیابتی) در مقایسه با گروه کنترل تایید شد (شکل ۲B،  $p < 0.001$ ).

در تست تحمل انسولین پلاسما (ITT) پس از تزریق انسولین، سطوح انسولین پلاسما افزایش پیدا کرد. پس از آن، سطح انسولین پلاسما به تدریج کاهش یافت و در انتها در زمان ۱۲۰ دقیقه به پایین‌ترین سطح خود رسید. اختلاف معناداری در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در مقایسه با گروه کنترل (موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد) مشاهده شد (شکل ۳A،  $p < 0.05$ ). این نتایج با افزایش قابل توجه مقادیر سطح زیر منحنی (AUC) انسولین در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب در مقایسه با گروه کنترل تایید شد (شکل ۳B،  $p < 0.05$ ). با توجه به نتایج تست-های GTT، ITT، اختلاف تحمل گلوکز و ارزیابی مدل هومئوستاز-مقاومت به

شد. میزان انسولین پلاسما از طریق کیت الایزا (mouse insulin Elisa, Alpco) به شماره کاتالوگ 80-INSMS-E01 مورد سنجش قرار گرفت. با استفاده از گلوکز و انسولین ناشتا، مقیاس HOMA-IR به عنوان مقیاس مقاومت به انسولین تعیین شد. معادله زیر برای محاسبه مقدار HOMA-IR استفاده شد. (حاصلضرب میزان انسولین ناشتا ( $\mu\text{U/mL}$ ) در میزان گلوکز ناشتا ( $\text{mg/dL}$ ) پلاسما، تقسیم بر ۴۰۵) (۱۷).

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها براساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین<sup>۱</sup> گزارش شد. برای تعیین میزان تفاوت بین سه گروه، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) در سطح معنی-داری ۰/۰۵ استفاده شد. از آزمون همبستگی پیرسون<sup>۲</sup> برای بررسی ارتباط بین بیان ژن و IncRNA در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ تجزیه و تحلیل شدند و برای رسم نمودار از نرم افزار GraphPad Prism 6 نسخه ۲۰۱۹ استفاده شد.

### یافته‌ها

**اثرات رژیم غذایی پرچرب و القای دیابت بر وزن بدن، میزان گلوکز، انسولین پلاسما و**

### HOMA-IR

در شکل ۱B داده‌ها نشان می‌دهد تغییرات وزن بدن موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب نسبت به موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی استاندارد به طور معناداری افزایش یافته است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی

1. Standard error of the mean
2. Pearson correlation



است که بیان این ژن در موش‌های تمرین کرده به طور معناداری نسبت به موش‌های تمرین نکرده کمتر بود (شکل ۴A،  $p < 0.01$ ).

همچنین بیان *IncRNA MEG3* در بافت کبد در موش‌های دیابتی بی تحرک (HFD-Sed) به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود (شکل ۴C،  $p = 0.001$ ). اما بیان این *IncRNA* در موش‌های تمرین کرده به طور معناداری نسبت به موش‌های تمرین نکرده کمتر بود (شکل ۴C،  $p < 0.01$ ).

همچنین ارتباط مثبت معناداری بین بیان *G6P* کبدی و بیان *IncRNA MEG3* در موش‌های چاق دیابتی وجود داشت (شکل ۴E،  $r = 0.188$ ،  $p < 0.001$ ).

#### اثرات تمرین هوازی بر بیان نسبی *GCK* و *IncLGR*

نتایج نشان داد بیان *GCK mRNA* در کبد موش‌های دیابتی به طور معناداری کمتر از موش‌های گروه کنترل بود (شکل ۴B،  $p < 0.01$ ). نکته قابل توجه این است که بیان این ژن در موش‌های HFD-Exe به طور معناداری نسبت به موش‌های HFD-Sed افزایش پیدا کرد (شکل ۴B،  $p < 0.001$ ).

انسولین (HOMA-IR) در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب نسبت به گروه کنترل، القای بیماری دیابت و مقاومت به انسولین در مدل حیوانی تایید شد.

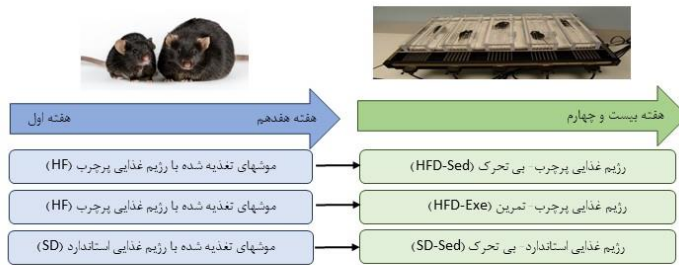
#### اثرات تمرین هوازی بر وزن بدن موش‌ها و مقیاس HOMA-IR

وزن بدن موش‌ها پس از انجام تمرین هوازی در نمودار ۱D نشان داده شده است. تغییرات وزن بدن موش‌های چاق دیابتی در مداخله دوم در گروه تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب - بی تحرک (HFD-Sed) به طور معناداری بیشتر از گروه تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب - تمرین کرده (HFD-Exe) بود (شکل ۱D،  $p < 0.01$ ). همچنین داده‌های HOMA-IR نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین در موش‌های HFD-Exe به طور معناداری نسبت به موش‌های HFD-Sed کاهش پیدا کرد (شکل ۱E،  $p < 0.01$ ). نتایج نشان می‌دهد هشت هفته تمرین هوازی منجر به کاهش وزن بدن و شاخص مقاومت به انسولین در مدل حیوانی دیابت شد.

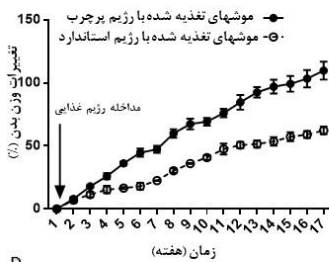
#### اثرات تمرین هوازی بر بیان نسبی *G6P* و *IncRNA MEG3*

نتایج نشان داد بیان *G6P mRNA* کبدی در موش‌های دیابتی (HFD-Sed) نسبت به گروه کنترل (Control) افزایش معناداری داشته است (شکل ۴A،  $p = 0.001$ ). نکته قابل توجه این

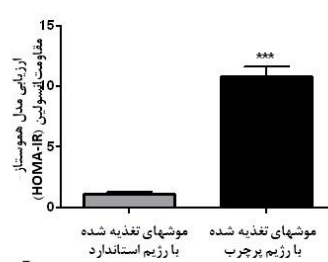
A



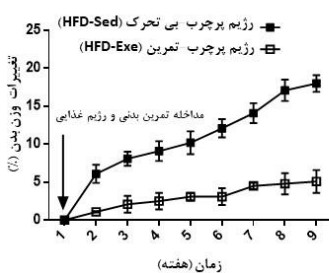
B



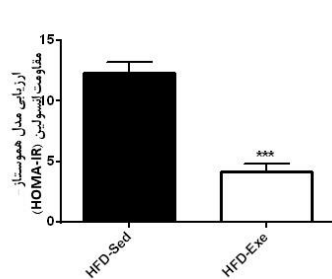
C



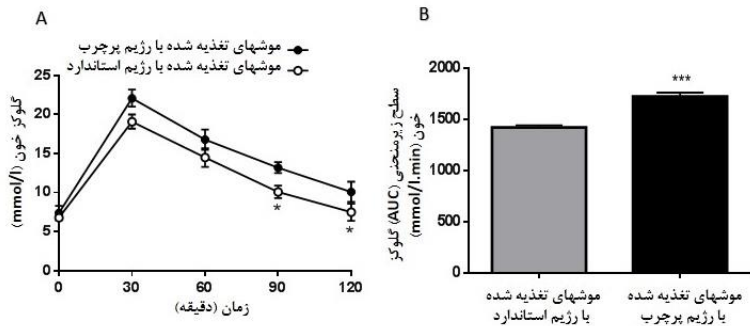
D



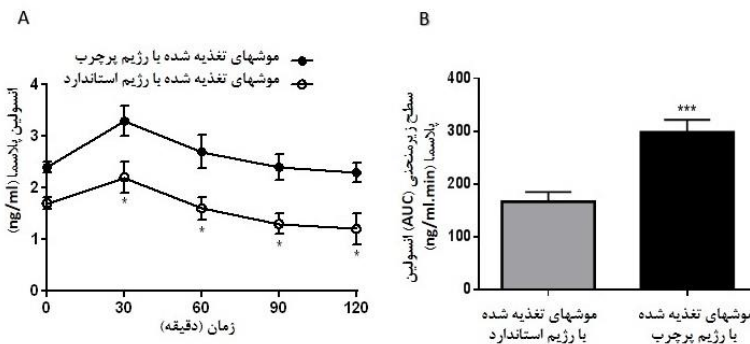
E



شکل ۱. پروتکل پژوهش و تغییرات وزن بدن. (A) نمایش کلی از پروتکل پژوهش با اعمال دو نوع مداخله (رژیم غذایی و تمرین بدنی). (B) تغییرات وزن بدن پس از اعمال مداخله رژیم غذایی (لقای دیابت). (C) ارزیابی مدل همئوستاز - مقاومت به انسولین (HOMA-IR) در موش‌های تغذیه شده با رژیم استاندارد و رژیم پرچرب. (D) تغییرات وزن بدن پس از اعمال مداخله تمرین بدنی و رژیم غذایی. (E) ارزیابی مدل همئوستاز - مقاومت به انسولین (HOMA-IR) در موش‌های HFD-Exe و HFD-Sed. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین گزارش شده است. در هر گروه تعداد موش‌ها برابر ۶ سر است. علامت (\*\*\*) به معنای  $p < 0.001$  است.



شکل ۲. تست تحمل گلوکز (GTT) پس از اعمال مداخله رژیم غذایی جهت بررسی القای دیابت. (A) میزان گلوکز خون پس از تزریق گلوکز در موش‌های تغذیه شده با رژیم استاندارد و پرچرب. (B) سطح زیر منحنی (AUC) گلوکز. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین گزارش شده است. در هر گروه تعداد موش‌ها برابر ۶ سر است. علامت (\*\*\*) به معنای  $p < 0.001$  است.



شکل ۳. تست تحمل انسولین پلاسما (ITT) پس از اعمال مداخله رژیم غذایی جهت بررسی القای دیابت. (A) میزان انسولین پلاسما پس از تزریق انسولین در موش‌های تغذیه شده با رژیم استاندارد و پرچرب. (B) سطح زیر منحنی (AUC) انسولین. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین گزارش شده است. در هر گروه تعداد موش‌ها برابر ۶ سر است. علامت (\*\*\*) به معنای  $p < 0.001$  است.

تایید آزمایشگاهی<sup>۱</sup> رسیده است (۴۴، ۴۵). همچنین در پژوهشی دیگر بیان IncLGR با IncRNA G6P ارتباط دارد و ارتباط بین IncLGR و G6P تایید آزمایشگاهی شده است (۲۸). در پژوهش حاضر بیان دو جفت ژن و IncRNA و ارتباط آن‌ها در موش‌های چاق دیابت نوع ۲ ناشی از یک رژیم غذایی طولانی مدت بررسی شدند. نتایج حاکی از همبستگی بالای بیان G6P مرتبط با IncRNA MEG3 و همبستگی بالای بیان G6P مرتبط با IncLGR بود. کبد در تنظیم سطح گلوکز خون نقش اساسی دارد و با تعدیل سطح گلوکز بر هومئوستاز انرژی سایر بافت‌ها از جمله عضلات تأثیر می‌گذارد (۹، ۲۶).

اما مکانیسم‌های مولکولی آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. از طرف دیگر، انسولین باعث تحریک سنتز کلاسترول و تری‌گلیسیرید در کبد و همچنین جذب گلوکز به بافت‌های محیطی مانند عضلات و چربی می‌شود. قابل ذکر است، سلول‌های چربی مقاوم به انسولین در تولید بیشتر تری‌گلیسیرید کبدی نقش دارند. بنابراین در شرایط چاقی، مقاومت به انسولین کبدی ایجاد می‌شود. در این شرایط انسولین نمی‌تواند تولید گلوکز کبدی و مسیر گلوکونئوژنز کبدی را سرکوب کند، با این وجود همچنان به تحریک لیپوژنز ادامه می‌دهد و باعث افزایش قند خون، چربی خون و بیماری دیابت نوع ۲ می‌شود (۳۹، ۴۱). احتمالاً در کبد موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب، IncRNA MEG3 بیان ژن G6P را تنظیم می‌کند که افزایش بیان G6P (ژن کلیدی گلوکونئوژنز) در موش‌های چاق دیابتی نشان می‌دهد، مسیر گلوکونئوژنز

همچنین بیان IncLGR در بافت کبد موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کمتر بود (شکل ۴D،  $p < 0.01$ ). همچنین بیان این IncRNA در موش‌های تمرین کرده (HFD-Exe) نسبت به موش‌های تمرین نکرده (HFD-Sed) به طور معناداری افزایش پیدا کرده است (شکل ۴D،  $p < 0.001$ ). همچنین ارتباط مثبت معناداری بین بیان G6P کبدی و بیان IncLGR در موش‌های چاق دیابتی وجود داشت (شکل ۴F،  $r = 0.84$ ،  $p < 0.001$ ).

### اثرات تمرین هوازی بر نیمرخ لیپیدی

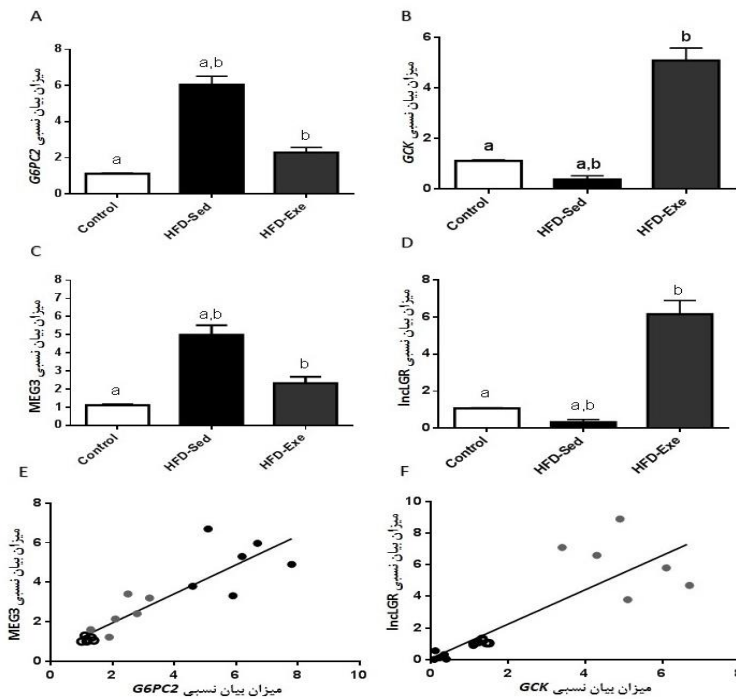
به دنبال رژیم غذایی پرچرب و القای دیابت، میزان تری‌گلیسیرید (TG)، کلاسترول تام (TC) و لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش و میزان لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) به طور معناداری کاهش یافت (جدول ۲،  $p < 0.05$ ). همچنین به دنبال تمرین استقامتی، میزان تری‌گلیسیرید (TG)، کلاسترول تام (TC) و لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) در گروه HFD-Exe نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش و میزان لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) به طور معناداری افزایش یافت (جدول ۲،  $p < 0.05$ ).

### بحث

در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، IncRNA های مرتبط با ژن‌های کلیدی در متابولیسم کربوهیدرات (ژن گلوکوکیناز و گلوکز ۶ فسفاتاز) انتخاب شدند. در مطالعات پیشین، داده‌ها نشان می‌دهد که بیان IncRNA MEG3 با ژن G6P ارتباط دارد و ارتباط بین IncRNA MEG3 و ژن G6P به

هایپرگلیسمی در بدن ایجاد می‌شود (۳۹). همچنین در این پژوهش مشاهده شد که بیان *IncRNA IncLGR* مرتبط با *GCK* در کبد موش‌های چاق دیابتی کاهش یافته است که نشان می‌دهد احتمالاً *IncRNA IncLGR* بیان *GCK* در کبد را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با تنظیم بیان *GCK*، گلیکوژن کبدی را کاهش می‌دهد. در این شرایط گلوکز اضافی خون نمی‌تواند به فرم گلیکوژن ذخیره شود.

افزایش یافته است، که به طور بالقوه منجر به افزایش سطح گلوکز در خون می‌شود. پس به طور کلی می‌توان گفت *IncRNA MEG3* منجر به افزایش گلوکونئوژن کبدی می‌شود. در این شرایط، بافت‌های مصرف کننده گلوکز مانند عضله اسکلتی، که تحت تأثیر مقاومت به انسولین ناشی از چاقی قرار دارند، نمی‌توانند قند خون را جذب کنند. در این شرایط قند خون همچنان بالا باقی می‌ماند و شرایط



شکل ۴. بیان ژن‌های *G6P*، *GCK*، *MEG3* و *IncLGR* در بافت کبد تمام گروه‌ها و همبستگی بین ژن‌ها و *IncRNA* (A. بیان ژن *G6P* کبدی. B. بیان ژن *GCK* کبدی. C. بیان ژن *MEG3* کبدی. D. بیان ژن *IncLGR* کبدی. E. همبستگی بین *G6P* و *MEG3* در تمام گروه‌ها. F. همبستگی بین *GCK* و *IncLGR* در تمام گروه‌ها. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین گزارش شده است. همبستگی با استفاده از روش همبستگی پیرسون بررسی شد. در هر گروه تعداد موش‌ها برابر ۶ سر است. حرف (a) تفاوت بین گروه کنترل و گروه *HFD-Sed*، حرف (b) تفاوت بین گروه *HFD-Sed* و *HFD-Exe* را نشان می‌دهد. در شکل E و F، داده‌های گروه کنترل با دایره توخالی سفید، گروه *HFD-Sed* با دایره مشکی، گروه *HFD-Exe* با دایره خاکستری نمایش داده شده است.

## جدول ۲. اثر تمرین هوازی بر نیمرخ لیپیدی و آنزیم‌های کبدی در موش‌های پیش‌دیابتی

متغیرها	گروه کنترل (Control)	گروه رژیم پرچرب- بی تحرک (HFD-Sed)	گروه رژیم پرچرب- تمرین (HFD-Exe)
تری گلیسرید TG (mmol/L)	(a) ۱/۱۲±۰/۱۳	(a,b) ۳/۹۸±۰/۲۸	(b) ۱/۸۲±۰/۷۲
کلسترول تام TC (mmol/L)	(a) ۳/۱۴±۰/۳۱	(a,b) ۶/۱۹±۰/۱۵	(b) ۴/۰۱±۰/۰۶
لیپوپروتئین با چگالی بالا HDL (mmol/L)	(a) ۳/۷±۰/۴۲	(a,b) ۱/۷۸±۰/۲۸	(b) ۲/۲±۰/۰۷
لیپوپروتئین با چگالی پایین LDL (mmol/L)	(a) -/۳۲±۰/۰۳	(a,b) ۱/۴۴±۰/۱۹	(b) -/۷۶±۰/۲۳

متابولیسم گلوکز در کبد ایفا می‌کند (۳۷). PGC1a به عنوان یک فعال کننده رونویسی، در تعدادی از فرایندهای بیولوژیکی نقش دارد و همچنین با تنظیم بیان ژن‌های کلیدی گلوکونئوز از جمله فسفوانول پیروات کیناز، فروکتوز ۱-۶-بیسفاتاز و گلوکز ۶ فسفاتاز باعث تحریک گلوکونئوز کبدی می‌شود (۱۳). با دریافت رژیم غذایی پرچرب در مدل حیوانی و القای دیابت، بیان PGC1a افزایش پیدا می‌کند و منجر به افزایش آنزیم‌های گلوکونئوز و افزایش سطح گلوکز خون می‌شود (۴۰). اما در پاسخ به تمرین هوازی، بیان PGC1a و ژن‌های کلیدی گلوکونئوز و به دنبال آن میزان گلوکز خون در افراد دیابتی کاهش می‌یابد (۴، ۳۳). همچنین مطالعات متعددی کاهش گلوکز خون و مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را با مداخله تمرین بدنی تایید نموده اند (۸، ۲۵، ۲۹).

نکته قابل توجه این است، هنگامی که موش‌های دیابتی تحت تمرین هوازی قرار گرفتند و میزان چربی بدن آن‌ها کاهش پیدا کرد، الگوهای بیان دو جفت IncRNAs-mRNAs معکوس شدند و این نشان دهنده‌ی پتانسیل این شبکه تنظیمی است که در رویکردهای درمانی آینده می‌تواند مورد هدف قرار گیرد. در پاسخ به فعالیت بدنی، گردش ATP افزایش می‌یابد و در نتیجه باعث افزایش مصرف ATP و افزایش سطح AMP درون سلولی می‌شود. این تغییرات منجر به فعال شدن AMPK در جوندگان و در عضله انسان می‌شود. AMPK مسیرهای سیگنالینگ متعددی از جمله اکسیداسیون اسیدهای چرب و جذب گلوکز را تنظیم می‌کند که اثرات کلی آن-ها افزایش تولید ATP است (۲۱). ما در این پژوهش پیشنهاد می‌کنیم که فعال شدن مسیر AMPK و نیاز سلول به انرژی ممکن است منجر به تغییر در شبکه mRNA-IncRNAs کبدی شود.

از طرف دیگر، تحقیقات نشان داده است که PGC1a نقش مهمی در شبکه نظارتی

نتایج تاییدی بر این مطلب است که پروتکل تمرینی مورد استفاده در این پژوهش، بر میزان مقاومت به انسولین و نیمرخ لیپیدی تاثیرگذار بوده است و تمرین بدنی شرایط دیابت را تا حدودی بازگردانده است و تاثیر مثبت تمرین هوازی بر نیمرخ لیپیدی را نشان می‌دهد.

پیشنهاد می‌شود احتمالاً تحت تاثیر تمرین بدنی بیان *IncRNA MEG3* کاهش پیدا کرده که منجر به کاهش بیان *گلوکز ۶ فسفاتاز* در بافت کبد می‌شود. در این شرایط فرایند *گلوکونوژنز* و به دنبال آن تولید *گلوکز کبدی* کاهش پیدا کرده و شرایط مقاومت به انسولین و دیابت بهبود می‌یابد. یکی از شاخص‌های بهبود دیابت، کاهش مقاومت به انسولین (*HOMA-IR*) در موش‌های چاق دیابتی تمرین کرده نسبت به موش‌های تمرین نکرده است. همچنین به دنبال تمرین بدنی بیان *IncRNA IncLGR* افزایش پیدا کرده که احتمالاً منجر به افزایش بیان *گلوکوکیناز کبدی* می‌شود و قند خون به *گلیکوژن* در کبد ذخیره می‌شود. در این شرایط تمرین هوازی منجر به کاهش *هایپرگلیسمی* ایجاد شده در دیابت نوع ۲ می‌شود.

#### تشکر:

در پایان، از کلیه کسانی که در انجام این طرح حمایت کردند، به ویژه همکاران گروه علوم ورزشی دانشگاه کاشان تشکر و قدردانی می‌گردد. لازم به ذکر است این طرح با حمایت مالی دانشگاه کاشان به انجام رسیده است.

نتایج مطالعه راپل<sup>۱</sup> و همکارانش نشان می‌دهد که دو دوره شنا با مدت زمان سه ساعت تمرین و یک دوره استراحت ۴۵ دقیقه، منجر به کاهش بیان *PGC1a* و *گلوکز ۶ فسفاتاز* در کبد موش-های چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب می‌شود و در این شرایط *هیپرگلیسمی* ناشنا موش‌های دیابتی بهبود پیدا کرد (۲۷). همچنین *PGC1a* می‌تواند باعث افزایش اثر انسولین از طریق اثرات کوتاه مدت و عمدتاً از طریق انتقال *گلوکز* مستقل از انسولین، شود (۳۶). نکته قابل توجه این است که در تمرینات هوازی با شدت متوسط، برداشت *گلوکز* محیطی بیشتر از *گلوکز* تولید شده توسط کبد است و منجر به کاهش *گلوکز* خون می‌شود (۱).

همچنین در مطالعه حاضر، اثر تمرین هوازی بر میزان وزن بدن، شاخص مقاومت به انسولین و نیمرخ لیپیدی موش‌های چاق دیابتی بررسی شد. نتایج نشان داد رژیم غذایی پرچرب موجب افزایش وزن بدن، مقیاس مقاومت به انسولین (*HOMA-IR*)، میزان تری گلیسیرید، کلسترول تام و *LDL* سرمی در موش‌های چاق دیابتی شد. همچنین تحت تاثیر رژیم غذایی پرچرب میزان *HDL* سرمی در موش‌های دیابتی به طور معناداری کاهش پیدا کرد. اما تمرین استقامتی شرایط فیزیولوژیکی ایجاد شده توسط رژیم غذایی پرچرب را بازگرداند. به طوریکه، به دنبال تمرین هوازی، وزن بدن، مقاومت به انسولین، میزان تری گلیسیرید، کلسترول تام و *LDL* سرمی در موش‌های دیابتی کاهش پیدا کرد. همچنین میزان *HDL* سرمی در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با موش‌های تمرین نکرده به طور معناداری افزایش پیدا کرد. این

## منابع

1. Alam S, Stolinski M, Pentecost C, Boroujerdi MA, Jones RH, Sonksen PH, et al. (2004). The effect of a six-month exercise program on very low-density lipoprotein apolipoprotein b secretion in type 2 diabetes.89(2):688-94.
2. Bagheri M, Azamian-Jazi A, Banitalebi E, Kazeminasab F, Nasr-Esfahani MHJS, Sports. (2020). Both high-intensity interval training and low-intensity endurance training decrease intrahepatic lipid deposits via alterations of the expression of hif-1 $\alpha$ , hlg2 in a murine model of nafld.
3. Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JEJNar. (2019). Mouse genome database (mgd) 2019.47(D1):D801-D6.
4. Church TS, Cheng YJ, Earnest CP, Barlow CE, Gibbons LW, Priest EL, et al. (2004). Exercise capacity and body composition as predictors of mortality among men with diabetes.27(1):83-8.
5. Felber J, Golay AJIjoo. (2002). Pathways from obesity to diabetes.26(2):S39-S45.
6. Feng S, Yao J, Chen Y, Geng P, Zhang H, Ma X, et al. (2015). Expression and functional role of reprogramming-related long noncoding rna (lincrna-ror) in glioma.56(3):623-30.
7. Goyal N, Sivadas A, Shamsudheen K, Jayarajan R, Verma A, Sivasubbu S, et al. (2017). Rna sequencing of db/db mice liver identifies lincrna h19 as a key regulator of gluconeogenesis and hepatic glucose output.7(1):1-12.
8. Gundala NK, Naidu VG, Das UNJB, communications br. (2018). Amelioration of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in wistar rats by arachidonic acid.496(1):105-13.
9. Han H-S, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo S-HJE, medicine m .(۲۰۱۶). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective.48(3):e218-e.
10. Hu L, Wu Y, Tan D, Meng H, Wang K, Bai Y, et al. (2015). Up-regulation of long noncoding rna malat1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.34(1):1-13.
11. Johnson AM, Olefsky JMJC. (2013). The origins and drivers of insulin resistance.152(4):673-84.
12. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KMJN. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.444(7.۸۴۰-۶:(۱۲۱)
13. Kalhan SC, Ghosh AJD. (2015). Dietary iron, circadian clock, and hepatic gluconeogenesis.64(4):1091-3.
14. Kazeminasab F, Marandi SM, Ghaedi K, Safaiejad Z, Esfarjani F, Nasr-Esfahani MHJAp, nutrition,, et al. (2018). A comparative study on the effects of high-fat diet and endurance training on the pgc-1 $\alpha$ -fndc5/irisin pathway in obese and nonobese male c57bl/6 mice.43(7):651-62.
15. Kim M-K, Chae YN, Son MH, Kim SH, Kim JK, Moon HS, et al. (2008). Par-5359, a well-balanced ppara/ $\gamma$  dual agonist, exhibits equivalent antidiabetic and hypolipidemic activities in vitro and in vivo.595(1-3):119-25.
16. Kirwan JP, Solomon TP, Wojta DM, Staten MA, Holloszy JOJAJOp-E, Metabolism. (2009). Effects of 7 days of exercise training on insulin sensitivity and responsiveness in type 2 diabetes mellitus.



17. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *41(6):1313-21*.
18. Liu S-X, Zheng F, Xie K-L, Xie M-R, Jiang L-J, Cai YJMT-NA. (2019). Exercise reduces insulin resistance in type 2 diabetes mellitus via mediating the lncrna malat1/microrna-382-3p/resistin axis. *18:34-44*.
19. Liu W, Ma C, Yang B, Yin C, Zhang B, Xiao YJB, et al. (2017). Lncrna gm15290 sponges mir-27b to promote ppar $\gamma$ -induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice. *493(3):1168-75*.
20. Motterle A, Gattesco S, Caille D, Meda P, Regazzi RJD. (2015). Involvement of long non-coding rnas in beta cell failure at the onset of type 1 diabetes in nod mice. *58(8):1827-35*.
21. O'neill HMJD, journal m. (2013). Ampk and exercise: Glucose uptake and insulin sensitivity. *37(1):1*.
22. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LBJOmj. (2012). Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *27(4):269*.
23. Palsamy P, Subramanian SJC-bi. (2009). Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *179(2-3):356-62*.
24. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu F-K, Ji LL, et al. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *265(6):H2094-H8*.
25. Rashidi M, Soori R, CHOOBINEH S, Ravasi AA, Baesi K. (2016). The effect of an aerobic exercise on mtnr1b gene expression, insulin and glucose levels in pancreas of induced diabetic rat with streptozotocin-nicotinamide.
26. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han WJE, medicine m. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *48:(3)e219-e*.
27. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, De Pinho RA, Velloso LA, et al. (2009). Acute exercise modulates the foxo1/pgc-1 $\alpha$  pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *587(9):2069-76*.
28. Ruan X, Li P, Cangelosi A, Yang L, Cao HJCr. (2016). A long non-coding rna, lnc1gr, regulates hepatic glucokinase expression and glycogen storage during fasting. *14(8):1867-75*.
29. Sabag A, Way KL, Keating SE, Sultana RN, O'Connor HT, Baker MK, et al. (2017). Exercise and ectopic fat in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *43(3):195-210*.
30. Sharabi K, Lin H, Tavares CD, Dominy JE, Camporez JP, Perry RJ, et al. (2017). Selective chemical inhibition of pgc-1 $\alpha$  gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes. *169(1):148-60. e15*.
31. Spizzo R, Almeida MIE, Colombatti A, Calin GAJO. (2012). Long non-coding rnas and cancer: A new frontier of translational research? ; *31(43):4577-87*.
32. Srinivasan K, Ramarao PJIJoMR. (2007). Animal model in type 2 diabetes research: An overview. *125.451:(3)*
33. Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SNJAoim. (2000). Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *132(8):605-11*.

34. Wei S, Du M, Jiang Z, Hausman GJ, Zhang L, Dodson MVJC, et al. (2016). Long noncoding rnas in regulating adipogenesis: New rnas shed lights on obesity.73(10):2079-87.
35. Werner MS, Sullivan MA, Shah RN, Nadadur RD, Grzybowski AT, Galat V, et al. (2017). Chromatin-enriched lncrnas can act as cell-type specific activators of proximal gene transcription.24(7):596.
36. Winnick JJ, Sherman WM, Habash DL, Stout MB, Failla ML, Belury MA, et al. (2008). Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity.93(3):771-8.
37. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan HJJE. (2016). Pgc-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus.229(3):R99-R115.
38. Yao Z, Liu C, Yu X, Meng J, Teng B, Sun Y, et al. (2019). Microarray profiling and coexpression network analysis of long noncoding rnas in adipose tissue of obesity-t2dm mouse.27(10):1644-51.
39. Ye JFom. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity.7(1):14-24.
40. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator pgc-1.413(6852):131-8.
41. Zeyda M, Stulnig TMJG. (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review.55.۳۷۹-۸۶:(۴)
42. Zhang X, Liang W, Mao Y, Li H, Yang Y, Tan HJB, et al. (2009). Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice.63(3):180-6.
43. Zhao W, Yin Y, Cao H, Wang YJMR. (2021). Lncrna malat1/mir-320a axis is associated with exercise-induced improvement of endothelial dysfunction in obese children.104194.
44. Zhu X, Li H, Wu Y, Zhou J, Yang G, Wang W, et al. (2019). Creb-upregulated lncrna meg3 promotes hepatic gluconeogenesis by regulating mir-302a-3p-crtc2 axis.120(3):4192-202.
45. Zhu X, Li H, Wu Y, Zhou J, Yang G, Wang WJlomm. (2019). Lncrna meg3 promotes hepatic insulin resistance by serving as a competing endogenous rna of mir-214 to regulate atf4 expression.43(1):345-57.
46. Zhu X, Wu Y-B, Zhou J, Kang D-MJB, communications br. (2016). Upregulation of lncrna meg3 promotes hepatic insulin resistance via increasing foxo1 expression.469(2):319-25.



**Title: The effect of aerobic exercise on the expression of lncRNAs associated with Glucose 6 phosphatase (G6P) and Glucokinase (GCK) in the liver of obese type 2 diabetic mice**

**Kazeminasab F<sup>1\*</sup>**

Received: 8/2/2021

Accepted: 10/8/2021

**Abstract**

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise on the expression of lncRNAs associated with Glucose 6 phosphatase (G6P) and Glucokinase (GCK) in obese diabetic mice.

**Method:** Eighteen C57BL/6 mice with weight (12-18 g) and age (4-6 weeks) were divided into two groups: mice fed a high-fat diet (HFD) (n=12) and mice fed a standard diet (n=6). The animals for 16 weeks were treated with diet. After confirmation of induction of diabetes by glucose tolerance and insulin tolerance tests, the HFD-fed group was divided into two groups: A) high-fat diet-exercise, B) high-fat diet-sedentary. The exercised mice were trained on a treadmill for 8 weeks, 5 sessions per week at an average speed of 22 m/min for 50 minutes. Twenty-four hours after the last training session and after 12 hours of fasting, the mice were sacrificed and the liver tissue was isolated. Based on bioinformatics results, MEG3 lncRNA associated with G6P and lncRNA lncLGR associated with GCK were selected. ANOVA test was used.

**Results:** The levels of G6P and MEG3 were significantly higher in the HFD-fed mice and significantly lower in trained mice compared to untrained mice. The expression of GCK and lncLGR were also lower in untrained diabetic rats, but increased after exercise.

**Conclusion:** Aerobic exercise may regulate G6P expression in the liver by reducing MEG3 expression, resulting in decreased gluconeogenesis and hepatic glucose production and improved insulin resistance in the diabetic mice. The expression of hepatic GCK also increases following exercise and increased lncLGR expression. In this condition, blood glucose is stored in glycogen in the liver, resulting in reduced hyperglycemia.

**Keywords:** Aerobic exercise, Glucose 6-phosphatase, Glucokinase, Diabetes, Obesity

---

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Human Sciences, University of Kashan, Kashan, Iran.

\*Email: fkazeminasab@kashanu.ac.ir