

Detection of CXCL5 Gene Polymorphism with Diabetes in Ardabil Province

Yaghoubi H^{1*}; Haghi M²; Solhi S¹

¹Department of Biology, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran

²Department of Genetic, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran

* Corresponding Author. Tel: +989383942499 Fax: +984517716199 E-mail: Yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Received: 14 Jan 2013 Accepted: 1 Jun 2013

ABSTRACT

Background & objectives: CXCL5, also known as epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA-78), is a chemokine that has a role in some diseases. CXCL5 blocks insulin signaling by activating the Jak2/STAT5/SOCS2 pathway. It is reported the association between -156G>C (rs352046) polymorphism in the promoter region and diabetes. The aim of this study was to examine whether there is an association between this polymorphism and diabetes mellitus in Ardabil province population.

Methods: A total of 100 patients affected diabetes were recruited from Ardabil province population; 100 healthy control subjects also were recruited from the same area. The region containing the CXCL5 - 156G>C polymorphism was genotyped by PCR amplification and restriction fragment length polymorphism analysis, and allele frequency data were analyzed using Fisher test.

Results: The results show a higher frequency of carrying both the G/G and G/C genotype in patients with diabetes compared with healthy controls (p -value=0.01 and 0.006, respectively). In addition, the frequency of allele C was significantly increased (p -value = 0.028) in patients with diabetes (25.5%) compared with controls (12%).

Conclusions: Our findings suggest a role of CXCL5 in the pathogenesis of diabetes. Also, replications in other populations with larger sample sizes are required to confirm these findings.

Key words: Diabetes; CXCL5; Polymorphism

بررسی ارتباط چند ریختی ژن CXCL5 با بیماری دیابت در استان اردبیل

هاشم یعقوبی^{۱*}، مهدی حق^۲، سمیرا صلحی^۱

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، ایران ^۲ گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۳۸۳۹۴۲۴۹۹ فاکس: ۰۴۵۱۷۷۱۶۱۹۹ پست الکترونیک: Yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پپتید فعال کننده نوتروفیل ازمنشا سلولهای اپیتلیال (Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide, ENA-78) کموکینی است که در برخی بیماری ها نقش دارد. نقش ژن CXCL5 در بروز مقاومت سلول ها به انسولین نشان داده شده است که با فعال کردن مسیر Jak2/STAT5/SOCS2، سیگنال دهی انسولین را مهار می کند. اخیرا چند ریختی (rs352046) -156G/C از این ژن در ناحیه پروموتور گزارش شده است که می تواند مستعد کننده بیماری دیابت باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط این چند ریختی با بیماری دیابت در جمعیت استان اردبیل می باشد.

روش کار: در این مطالعه ۱۰۰ نفر از افراد دیابتی ساکن استان اردبیل و ۱۰۰ نفر از افراد سالم ساکن همان منطقه انتخاب شدند. و ارتباط بین این چند ریختی با دیابت با روش های مولکولی PCR-RFLP و الکتروفورز بررسی شد و نتایج حاصل با استفاده از تست آماری فیشر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان دهنده فراوانی بالای ژنوتیپ GC در افراد مبتلا (۳۹٪) نسبت به افراد سالم (۱۴٪) بود ($p=0/006$). در این مطالعه افراد مبتلا (۲۵/۵٪) به دیابت بطور معنی داری ($p=0/028$) دارای ال C بیشتری نسبت به افراد کنترل سالم (۱۲٪) بود.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان دهنده نقش CXCL5 در پاتوژنز دیابت هستند. تکرار این مطالعه در جمعیت با حجم نمونه بالا جهت تایید این یافته ها پیشنهاد می گردد.

کلمات کلیدی: دیابت؛ CXCL5؛ چند ریختی

پذیرش: ۹۲/۳/۱۱

دریافت: ۹۱/۱۰/۲۵

مقدمه

بیماری دیابت قندی شایعترین بیماری اندوکراین است و تعیین شیوع واقعی آن به علت تنوع معیارهای تشخیصی، مشکل می باشد. افزایش گلوکز خون و وجود آن در ادرار به نام دیابت شیرین یکی از رایج ترین اختلالات متابولیسم کربوهیدراتها می باشد. در پاتوژنز این بیماری عوامل مختلفی از قبیل ژنتیک و محیطی دخالت دارند. بررسی ها نشان دهنده نقش کموکین ها در بروز دیابت می باشد [۱].

کموکین ها گروهی از ملکول های کوچک با وزن ملکولی ۸-۱۴ کیلو دالتون هستند که در تنظیم جابجایی و مهاجرت لکوسیت ها نقش ایفا می کنند [۲]. کموکاین ها سایتوکاین های پیش التهابی هستند

که در پاسخ به محرک های عفونی و التهابی دیگر توسط تعدادی از انواع سلول های مختلف تولید می شوند. تا به امروز بیش از ۵۰ سایتوکاین پیش التهابی و یا کموکاین شناسایی شده اند و با توجه به سیستمین حفاظت شده به چهار گروه CXCL، CCL، CL و CX3CL طبقه بندی شده اند [۳].

پپتید فعال کننده نوتروفیل ازمنشا سلولهای اپیتلیال^۱، کموکینی است که توسط ژن CXCL5 کد می شود. این کموکین پس از تحریک توسط سیتوکین های پیش التهابی مانند IL-1 β و TNF- α در سلول های اپیتلیال بیان شده و سبب تجمع نوتروفیل های پلی

¹ Epithelial Cell-Derived Neutrophil-Activating Peptide, ENA-78

مورفونوکلوتر (PMN) می شود [۴]. همچنین به عنوان یک کموکلین مهم در بازسازی بافت همبند و بروز بیماری های التهابی نقش ایفا می کند [۵]. به دنبال تحریک سلول ها با سایتوکاین های التهابی، اینترلوکین-۱ یا فاکتور نکروز تومور آلفا، تولید می شود. بیان CXCL5 نیز در ائوزینوفیل مشاهده شده و بوسیله نوع II اینترفرون γ مهار می شود. نتایج نشان دهنده میزان بالای CXCL5 در سرم افراد چاق است. در مقابل، غلظت CXCL5 پس از یک برنامه کاهش وزن در افراد چاق کاهش می یابد. CXCL5 به میزان زیادی توسط سلول های ماکروفاژ بافت چربی سفید تولید می شود که علاوه بر چاقی در مقاومت سلول ها نسبت به انسولین نقش دارد [۱، ۸-۶].

ژن CXCL5 بر روی کروموزوم ۴ انسان قرار گرفته است و دارای چهار اگزون می باشد [۶]. در ناحیه بالادست این ژن، چند ریختی $C>156G$ - وجود دارد که در میزان بیان این ژن تاثیر می گذارد. افراد حامل آلل C، مقادیر بالاتری از کموکلین CXCL5 را در خون خود نشان می دهند [۸].

در مطالعه ای بر روی جمعیت رفسنجان، ارتباط این چند ریختی با بیماری دیابت نشان داده شده است [۹، ۱۰].

هدف کلی بررسی ارتباط پلی مورفیسم با بیماری دیابت بر روی جمعیت استان اردبیل است. این مطالعه وجود و یا عدم وجود ارتباط بین پلی مورفیسم $G/C156$ در ژن CXCL5 و بیماری دیابت در مقایسه با جمعیت کنترل سالم در جمعیت استان اردبیل را بررسی خواهد کرد.

روش کار

در این مطالعه ۱۰۰ نفر از افراد مبتلا به دیابت اولیه ساکن استان اردبیل و ۱۰۰ افراد سالم ساکن همان منطقه در سال های ۹۰-۹۱ پس از کسب رضایت کتبی نمونه برداری خون به عمل آمد. نسبت مرد و

زن در گروه بیماران دیابتی ۴۳ و ۵۷ در ۱۰۰ نفر و در گروه کنترل سالم ۴۵ و ۵۵ از ۱۰۰ نفر بود. میانگین سنی در گروه بیمار ۵۴ و در گروه کنترل سالم ۵۶ سال بود. از هر فرد حداکثر ۵ سی سی از خون وریدی در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع اوری شد و پس از استخراج DNA از خون، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه ای از ژن CXCL5 که حاوی محل چند ریختی $C>156G$ - بود با استفاده از روش PCR تکثیر شد. این پلی مورفیسم با روش های مولکولی RFLP و الکتروفورز بررسی شد و نتایج حاصل با استفاده از تست آماری مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

استخراج DNA

روش پروتئیناز K-SDS: ۵ ml خون را به دو قسمت تقسیم کرده و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسمای خون دور ریخته شد و سپس روی سلولهای ته نشین شده ۵ml آب سرد اضافه شد و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد و عمل فوق تا شفاف شدن محلول رویی تکرار گردید. بر روی سلولهای ته نشین شده ۴ ml بافر لیزات افزوده و به خوبی تکان داده شد. سپس بر روی محلول بدست آمده $250 \mu l$ SDS (۱۰٪) و $7/1 \text{ ml}$ ($200 \mu g/ml$) پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت ۳ الی ۲۴ ساعت در دمای ۴۷ درجه انکوبه شد. سپس $7/1 \text{ ml}$ نمک طعام اشباع شده ریخته و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفوژ شد. محلول رویی به لوله تمیز منتقل شده، ۴ ml ایزوپروپانول اضافه کردیم تا DNA منعقد شود. DNA منعقد شده از داخل محلول استخراج و با اتانول ۷۰٪ شسته و به آن آب مقطر اضافه شد.

روش آماری: این مطالعه یک مطالعه‌ی مورد-شاهدی بود که در آن نتایج حاصل با آنالیز فیشر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و بین افراد بیمار و کنترل به روش کای مربع مقایسه انجام گرفت. در این مطالعه سطح معنی دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ نفر از افراد دیابتی ساکن استان اردبیل و ۱۰۰ نفر از افراد سالم ساکن همان منطقه انتخاب شدند. میانگین سنی افراد دیابتی و سالم به ترتیب ۵۴ و ۵۶ بود. فراوانی آلل G در گروه بیمار ۷۴/۵٪ و در گروه سالم ۸۸٪، همچنین فراوانی آلل C در گروه بیمار ۲۵/۵٪ و در گروه سالم ۱۲٪ بدست آمد. که اختلاف فراوانی آلل‌ها بین گروه بیمار و گروه سالم معنی دار بود ($p=0/01$). نتایج حاصل از آزمایشات در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپی پلی مورفسم $G>C$ CXCL5 156- در بیماران مبتلا به دیابت و افراد کنترل سالم در جمعیت استان اردبیل

P	گروه بیمار		گروه کنترل	P
	۱۰۰ نفر		۱۰۰ نفر	
ژنوتیپ GG	۵۵٪	۸۱٪	۰/۰۱	
ژنوتیپ GC	۳۹٪	۱۴٪	۰/۰۰۶	
ژنوتیپ CC	۶٪	۵٪	۱/۰۰	
آلل G	۷۴/۵٪	۸۸٪	۰/۰۲۸	
آلل C	۲۵/۵٪	۱۲٪	۰/۰۲۸	

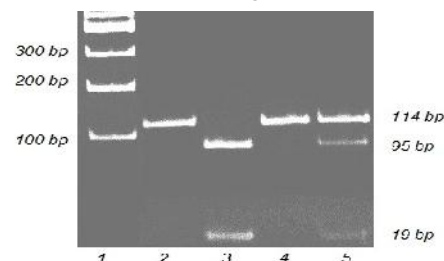
بحث

بیماری دیابت نوع ۲ یکی از بیماریهای غیر عفونی است که در سنین میانسالی افراد را درگیر میکند که هزینه و مشکلات متعددی را برای فرد، خانواده و در نهایت جامعه ایجاد میکند. با توجه به اینکه بیماری دیابت یک بیماری نسبتا شایع در سنین بالا است و فرد مبتلا هزینه های اقتصادی و اجتماعی زیادی را متحمل میشود لذا شناخت بیماری و نحوه پیشگیری و غربالگری آن یکی از ضروریات سلامت افراد جامعه

PCR: ۵ μl DNA استخراج شده به داخل مسترمیکس که حاوی ۵/۲ μl 10X-PCR Buffer، ۵/۰ μl $MgCl_2$ (50 mM)، ۲۵/۰ μl dNTPs، ۲/۵ U Taq پلیمرز، ۲۵/۰ μM پرایمر رفت، ۲۵/۰ μM پرایمر برگشت بود افزوده و سپس با استفاده از آب دیونیزه حجم نهایی محلول به ۲۵ μl رسانده شد. توالی پرایمر رفت و برگشت به قرار زیر است [۱۰].

Forward-5'-CTCCTCCTGGCCACCCTCGC-3'
Reverse-5'-TCAAGCTTTGGGATGCTGGGGGA-3'

سپس با استفاده از ترمال سایکلر، برنامه ذیل، دناتوراسیون $94^{\circ}C$ بمدت یک دقیقه، اتصال $60^{\circ}C$ بمدت سی ثانیه و $72^{\circ}C$ بمدت سی ثانیه مورد استفاده قرار گرفت. تعداد سیکل‌ها ۳۵ سیکل بوده و در سیکل اول مرحله دناتوراسیون بمدت ۳ دقیقه و مرحله توسعه سیکل آخر ۵ دقیقه عمل شد. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفرز شد. RFLP: محصول PCR به اندازه ۱۱۴ جفت باز با آنزیم محدودالانر NURI تحت برش قرار داده شد. در حضور آلل G آنزیم، محصول PCR را برش داده و قطعات ۹۵ و ۱۹ جفت بازی را ایجاد می کند که با الکتروفرز بر روی ژل آگارز ۴٪ قابل مشاهده است. در صورتیکه حضور آلل C موجب عدم برش در محصول PCR شود باند ۱۱۴ جفت بازی قابل مشاهده است (شکل ۱).



شکل ۱. ژل الکتروفرز

لاین ۱. مارکر
لاین ۲. محصول PCR
لاین ۳. نمونه هموزیگوت GG
لاین ۴. نمونه هتروزیگوت GC
لاین ۵. نمونه هموزیگوت CC

می باشد و با توجه به اینکه این بیماری علاوه بر عوامل محیطی دارای ابعاد ژنتیکی نیز می باشد که فرد را مستعد به این بیماری میکند لذا پیدا کردن این عوامل ژنتیکی ضروری به نظر می رسد. بنابراین شناسایی چند ریختی هایی که افراد را نسبت به این بیماری حساس تر و مستعدتر می کند، می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. تا با مراقبت های که در سنین جوان تر به عمل آورده می شود از بروز بیماری جلوگیری یا از شدت بروز بیماری جلوگیری به عمل آید [۱۱-۱۳].

با استفاده از مطالعات وسیع ژنومی و غربالگری ژنتیکی (Gene screening) می توان به منظور یافتن ژنهایی که با فرکانس بیشتری در میان افراد مبتلا به این بیماری یافت می شود، استفاده کرد که بیش از ۴۰ ناحیه از ژنوم کشف شده که فرد را مستعد ابتلا به بیماری دیابت می کند. با توجه به اینکه نقش ژن CXCL5 در بروز مقاومت سلول ها به انسولین نشان داده شده است که با فعال کردن مسیر Jak2/STAT5/SOCS2، سیگنال دهی انسولین را مهار می کند. بنابراین می تواند به عنوان ژن کاندید و موثر در بروز بیماری دیابت مورد بررسی قرار گیرد. نقش عملکردی برای چند ریختی 156G/C- توضیح داده شده نشان می دهد که حامل های آلل C دارای مقادیر بالایی از غلظت CXCL5 در گردش خون و همچنین بر روی لکوسیت ها هستند [۱۴،۱].

بنابراین وجود آلل C در جایگاه ۱۵۶- که ناحیه تنظیمی برای ژن مربوطه است موجب افزایش نسبی

بیان ژن می شود و با بالا رفتن میزان این کموکی در خون، استعداد و حساسیت فرد در برابر ابتلا به دیابت افزایش پیدا می کند [۱۴]. البته برای اثبات تاثیر این ژن بر بیماری دیابت بررسی های بر روی نمونه های بیشتر در جمعیت های مختلف ضروری می باشد. همچنین بررسی های مولکولی عملکردی در مسیر های احتمالی در بروز بیماری دیابت که احتمالاً به مسیر های جدید منجر شود اجتناب ناپذیر است. چه بسا مسیرهای جدید در ارائه روش های درمانی موثر تر و ارائه داروهای جدید راه گشا باشد. نتایج این مطالعه، ارتباط بین آلل CXCL5-156C با دیابت در جمعیت استان اردبیل نشان داد که تاییدی برنتایج بدست آمده از مطالعه آملی و همکاران [۱۰،۹] بر روی جمعیت رفسنجان می باشد.

نتیجه گیری

چند ریختی CXCL5-156 را می توان به عنوان یکی از عوامل موثر در ابتلا به دیابت در جمعیت استان اردبیل در نظر گرفت اما در یک اختلال چند عاملی مانند دیابت که عوامل زیادی تاثیر گذار می باشند پیدا کردن یک چند ریختی خاص و تکیه بر آن به عنوان عامل ابتلا در دیابت صحیح نیست. تکرار مطالعات در سایر جمعیت ها و نیز مطالعات ملکولی بر روی نحوه عملکرد این ژن لازم به نظر می رسد که می تواند نشان دهنده نقش جدید این ژن در دیابت باشد.

References

- 1- Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clape C, Iankova I, Teyssier J. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2009 Apr; 9(4): 339-349.
- 2- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb; 12(2): 121-127.
- 3- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006 Dec; 7(12): 243.

- 4- Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL, Strieter RM. Nucleotide structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J Exp Med*. 1991 Dec; 174 (6): 1355-62.
- 5- Persson T, Monsef N, Andersson P, Bjartell A, Malm J, Calafat J, et al. Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA 78/CXCL5 by human eosinophils. *Clin Exp Allergy*. 2003 Apr; 33 (4): 531-37.
- 6- Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *J Biol Chem*. 1994 Oct; 269 (41): 25277-82.
- 7- O'Donovan N, Galvin M, Morgan J. Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet*. 1999 Jan; 84(1): 39-42.
- 8- Zineh I, Aquilante CL, Langaee TY, Beitelshes AL, Arrant CB, Wessel TR, et al. CXCL5 gene polymorphisms are related to systemic concentrations and leukocyte production of epithelial neutrophil-activating peptide (ENA-78). *Cytokine*. 2006 Mar; 33(5): 258-63.
- 9- Amoli MM, Larijani B, Thomson W, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Two polymorphisms in the epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *Dis Markers*. 2005 May; 21(2):75-7.
- 10- Ranjbar S, Amiri P, Zineh I, Langaee T, Namakchian M, Heshmet R. CXCL5 gene polymorphism association with diabetes mellitus. *Mol Diagn The*: 2008 Nov; 12 (6): 391-394.
- 11- Barroso I, Luan J, Middelberg S. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in B-Cell function as well as insulin action. *PLoS Biol*. 2003 Oct; 1(1): 41-55.
- 12- Haghdoost A, Rezazadeh-Kermani M, Sadghirad B, Baradaran HR. Prevalence of type 2 diabetes in the Islamic Republic of Iran: systematic review and meta-analysis. *East Mediterr Health J*. 2009 May-Jun; 15(3): 591-599.
- 13- Gloyn AL. The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Res Rev*. 2003 Apr; 2(2): 111-127.
- 14- Carine C, Fajas L. CXCL5 drives obesity to diabetes, and further. *Aging*. 2009 Jul; 1(7): 674-677.