



Scan online to view this article

The Effect of Silymarin on Neuro D1 Gene Expression and Blood Glucagon Level in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Rahman Jafari hafshejani, Hosein Sazgar*, Noosha Zia Jahromi

Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Aim and Background: Due to the high rates of diabetes in Iran and the world, as well as due to the lower side effects of medicinal plants in comparison with chemical and industrial drugs, this study investigated the effect of the active ingredient of Mary Magenta (*Silybum marianum*) on the expression of the Neuro D1 gene, one of the genes of the genes And the restoration of beta and alpha pancreatic cells is also a study of blood glucagon levels in rats.

Material and methods: 42 male Wistar rats were randomly selected and divided into seven groups of six. Diabetic rats received different doses of silymarin and metformin every other day for 1-3 days and after 40 days anesthetized with chloroform. After blood sampling, the serum glucagon level was measured by glucagon assay kit ELISA Then, the stages of the description and operation of pancreatic tissue extraction and extraction of RNA and cDNA were performed and expression analysis was performed using Real Time RT-PCR technique.

Results: The results of this study showed that STZ causes the destruction of pancreatic tissue and type 1 diabetes. Application of Silymarin improved diabetes and decreased glucose levels and increased serum glucagon levels in rats receiving different doses of silymarin compared to the control group (diabetic). Also, the expression level of NeuroD1 gene increased significantly compared to the GAPDH gene (reference gene).

Conclusion: The expression of NeuroD1 gene in STZ-induced diabetic rats showed a significant increase (P-Value = 0.000), which resulted in improved pancreatic tissue and decreased blood glucose and increased rats and muscle mass by regenerating cells The pancreatic alpha, as well as the binding to the promoter of the glucagon gene, enhance the expression of this gene.

Keywords: Type 1 diabetes, Streptozotocin, Glucagon, Silymarin, NeuroD1 gene.

Corresponding author:

Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: hoseinsazgar@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تأثیر سیلی مارین بر بیان ژن Neuro D1 و بررسی سطح گلوکاگون خون در رت‌های دیابتی شده با استروپتوزوتوسین

رحمان جعفری هفشجانی، حسین سازگار*، نوشا ضیاء جهرمی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باتوجه به آمار بالای دیابت در ایران و جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کم‌تر گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی و صنعتی در این مطالعه به بررسی اثر ماده مؤثره گیاه خار مریم (سیلی مارین) بر بیان ژن Neuro D1 که یکی از ژن‌های تکوین و بازسازی سلول‌های بتا و آلفا پانکراس هست هم‌چنین بررسی سطح گلوکاگون خون در رت‌ها، پرداختیم.

مواد و روش‌ها: ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار به صورت تصادفی انتخاب شدند و به هفت گروه شش تایی تقسیم شدند. رت‌های دیابتی شده دوزهای مختلف سیلی مارین و متفورمین را هر سه روز یک‌بار دریافت کردند و بعد از ۴۰ روز با کلروفوم بی‌هوش کرده بعد از خون‌گیری از قلب رت‌ها سطح سرمی گلوکاگون توسط کیت سنجش گلوکاگون به روش الیزا اندازه‌گیری شد و سپس مراحل تشریح و عمل برداشت بافت پانکراس و مراحل استخراج RNA و cDNA سازی و بررسی بیان ژن با تکنیک Real-Time PCR انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد STZ باعث تخریب بافت پانکراس و ایجاد دیابت نوع یک می‌شود. کاربرد سیلی مارین باعث بهبود دیابت و کاهش قند خون و افزایش سطح سرمی گلوکاگون در رت‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف سیلی مارین نسبت به گروه کنترل منفی (دیابتی) شد. هم‌چنین میزان بیان ژن NeuroD1 نسبت به ژن GAPDH (ژن رفرنس) افزایش معنی‌داری پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: بیان ژن NeuroD1 در رت‌های دیابتی شده با STZ به واسطه سیلی مارین، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (P-Value= ۰/۰۰۰) که نتیجه آن بهبود بافت پانکراس و کاهش قند خون و افزایش وزن رت‌ها و سیلی مارین با بازسازی سلول‌های آلفای پانکراس و هم‌چنین با اتصال به پروموتور ژن گلوکاگون باعث افزایش بیان این ژن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیابت نوع یک، استروپتوزوتوسین، گلوکاگون، سیلی مارین، ژن NeuroD1.

مقدمه

دیابت قندی سندرمی است که در آن متابولیسم کربوهیدرات، چربی، و پروتئین‌ها مختل می‌شود (۱). این بیماری به دلیل فقدان ترشح انسولین یا کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین ایجاد می‌شود شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشم‌گیری داشته است و تخمین زده‌اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۴۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۲). دیابت دارای دو نوع عمده

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۱

خوزستان و آذربایجان رویش دارد عصاره دانه خار مریم حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلاونوئیدی است که در مجموع به نام سیلی‌مارین می‌گویند (۱۳). فلاونوئیدها از ترکیب‌های بسیار مهم اکثر گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه‌ها هستند، فلاونوئیدها از قبیل کوئرستین موجب ترشح انسولین و مهارکننده قوی تجمع سوربیتول در بافت‌های بدن است (۱۴). سیلی‌مارین خواص مختلفی از جمله: محافظت از کبد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطان و همچنین ضد دیابت دارد سیلی‌مارین به‌خاطر اثرهای آنتی‌اکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده انسولین جلوگیری و سبب بهبود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود (۱۵، ۱۶).

باتوجه به آمار بالای دیابت در ایران و جهان و همچنین به‌علت عوارض جانبی کم‌تر گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی و صنعتی در این مطالعه به بررسی اثر ماده مؤثره گیاه خار مریم (سیلی‌مارین) بر بیان ژن Neuro D1 که یکی از ژن‌های تکوین و بازسازی سلول‌های بتا و آلفا پانکراس هست هم‌چنین بررسی سطح گلوکاگون خون در رت‌ها، پرداختیم.

روش بررسی

تعداد ۴۲ سر رت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۲۰ که از شرکت دانته شهرکرد خریداری و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی کامل به آب و غذای استاندارد در لانه حیوانات دانشگاه آزاد شهرکرد نگهداری شدند.

گروه‌بندی حیوانات

رت‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه ۶ تایی دسته‌بندی و در قفس‌های مجزا نگهداری شدند و آب و غذا برای همه یکسان بود و هم‌چنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه ۲۲-۲۵ و رطوبت نسبی ۵۰ درصد حفظ شد.

۷ گروه آزمایشی شامل:

است. دیابت نوع I، که دیابت قندی وابسته به انسولین نیز نامیده شده، به دلیل فقدان ترشح انسولین ایجاد می‌شود (۳). دیابت نوع II، که دیابت قندی غیر وابسته به انسولین نامیده می‌شود (۴).

پانکراس از نظر آناتومیک غده طولی است که در زیر و موازی با معده قرار گرفته و بیش‌تر ساختار درونی آن، شبیه غده بزاقی است و از غدد ضمیمه دستگاه گوارشی است (۵، ۶). پانکراس به میزان زیادی در تنظیم متابولیسم مواد مغذی درگیر است. اهمیت پانکراس در موازنه مواد مغذی در کل بدن به‌وسیله این حقیقت مشخص شده است که در شرایط پاتولوژیک مختلف مثل دیابت نوع یک و دو، که درگیر در متابولیسم مواد مغذی‌اند، به‌عدم تنظیم سلول‌های پانکراس مربوط هستند (۷، ۸). فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول‌ها به سلول‌های بتا در پانکراس اثر می‌گذارند. از جمله این فاکتورها می‌توان به Pax4، Pax6، MafA و Neuro D1 اشاره کرد (۹). ژن Neuro D1 که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۲ واقع شده است (۳۹۲۴)، دارای وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون است. این ژن در ترشح گلوکاگون، انسولین و سوماتواستاتین نقش دارد بیان ژن Neuro D1 در سلول‌های اندوکراین پانکراس و دیگر بافت‌های غیر پانکراتیک مثل روده و مغز یافت می‌شود عملکرد ژن Neuro D1، رونویسی ژن انسولین و پیش‌بردن بیش‌تر تمایز به سمت سلول‌های islet عملکردی است. وجود ژن Neuro D1 در سلول‌های بیان‌کننده گلوکاگون نشان می‌دهد که سرکوب فعالیت گلوکاگون با این ژن ارتباطی دارد. در حقیقت طبق گزارش‌های اخیر، ژن Neuro D1 سبب فعال شدن پروموتور گلوکاگون می‌شود (۱۰-۱۲) داورهای گیاهی نسبت به داورهای شیمیایی دارای سمیت کم‌تر و اثرهای جانبی کم‌تر هستند تاکنون بیش از ۲۱۰۰ گیاه دارویی در کاهش میزان قند خون و یا کاهش عوارض ناشی از آن شناخته شده است. از جمله این گیاهان: خار مریم، خیار تلخ، شنبلیله، هستند (۱) گیاه خار مریم از خانواده کاسنیان است. این گیاه بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران به‌خصوص البرز مرکزی،

۱- گروه A: شاهد سالم

۲- گروه B: کنترل منفی

۳- گروه C: دیابتی دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین

۴- گروه D: دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین

۵- گروه E: دیابتی دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین

۶- گروه F: دیابتی دریافت کننده متفورمین

۷- گروه G: شاهد سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین

قبل از انجام آزمایش تمامی رت‌ها با استفاده از دستگاه گلوکومتر BIONAM ساخت کشور تایوان با اخذ یک قطره خون از طریق دم، گلوکز خون آن‌ها اندازه‌گیری شد.

برای دیابتی کردن رت‌ها از استرپتوزوتوسین (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ براساس وزن شان، غاظت ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (۵۰ mg/kg) STZ به صورت تک دوز درون صفاقی تزریق گردید. حیواناتی که پس از سه روز از تزریق STZ قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند دیابتی تلقی شدند. سنجش قند خون همه گروه‌ها هر ده روز یک مرتبه با رعایت ۱۴ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت گردید.

پس از گذشت سه روز از تزریق استرپتوزوتوسین، گروه‌های دریافت کننده سیلی‌مارین و هم‌چنین گروه دیابتی دریافت کننده متفورمین هر سه روز یک بار (۱۰ مرتبه) در طول یک ماه، ماده مؤثره و متفورمین را از طریق گاواژ کردن دریافتند.

پس از گذشت ۳۰ روز، حیوانات با کلروفوم بی‌هوش و بعد از خون‌گیری از قلب برای بررسی میزان گلوکاگون به روش الایزا که از کیت گلوکاگون با مارک EASTBIOPHARM ساخت کشور آمریکا استفاده شد طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت، تشریح مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع RNA later جهت اندازه‌گیری بیان ژن Neuro D1 ذخیره شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن مورد بررسی در پژوهش حاضر از روش Real Time RT PCR استفاده شد.

مراحل انجام تکنیک Real-Time PCR

استخراج RNA با استفاده از روش تریزول ساخت شرکت کیان انجام گردید. لازم‌به‌ذکر است که RNA پس از استخراج دستخوش تغییرهایی خواهد شد و برای رفع این مشکل بلافاصله پس از برداشت باید در مجاورت محلول تثبیت کننده تمام لوازم مورد نیاز با محلول DEPC ۱ درصد تیمار شدند (۱۷). در سلول‌ها برای لیز و هم‌وزنیزه کردن بافت پانکراس مقداری ازت مایع بروی بافت ریخته شد و سپس یک سی‌سی تریزول اضافه گردید و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، به سه فاز مجزا تقسیم می‌شود که فاز رویی را به اپندروف‌های جدید منتقل شده، و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و مواد داخل به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و سپس فاز رویی به آرامی خارج شده و رسوب RNA حاصل با اتانول ۷۵ درصد سرد شستشو داده شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ رسوب باقی‌مانده در ۲۰ میکرولیتر آب حل شده و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۷۰- نگهداری شد. برای این بردن آلودگی ژنومی از کیت آنزیم DNase (شرکت Thermo) مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد.

پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن آن و هم‌چنین میزان خلوص و عدم آلودگی ژنومی آن از نظر کیفی بالود کردن روی ژل آگاروز ۲ درصد و هم از نظر کمی به وسیله دستگاه نانو درآپ میزان خلوص (OD) آن اندازه‌گیری شد همه غلظت‌های RNA ها بیش‌تر از ۹۰۰۰ ng/μl بود.

سپس مقداری از RNA برای ساخت cDNA استفاده شد به این منظور از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا-ژاپن مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد.

پرایمرهای انتخابی این ژن‌ها ساخت شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی بودند. الگوی پرایمرها مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آمده است.

برای تعیین میزان بیان ژن Neuro D1 از ژن GAPDH به- عنوان ژن کنترل (رفرنس) استفاده شد.

جدول ۱- توالی ژن Neuro D1

GAPDH R	5'-TCCATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'
GAPDH F	5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAACGGAT-3'
Neuro D1 R	5'-TTTGGTCATGTTTCCAATTCC-3'
Neuro D1 F	5'-CGCAGAAGGCAAGGTGTC-3'

آنالیز آماری داده‌های این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ انجام شد. از آنجا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با آزمون پشتیبان post test LSD ارزیابی شدند و نتایج به- صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

سپس به‌وسیله سیستم Rotor-Gene6000 و با استفاده از کیت سابرمستر ریل تایم ساخت شرکت تاکارا ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورد استفاده در دستگاه Rotor-Gene6000 در روش Real-Time PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است. CT‌های مربوط به واکنش توسط نرم‌افزار سیستم Real-Time PCR استخراج و ثبت گردید. بعد از اتمام واکنش Real-Time PCR سیکل آستانه هر نمونه به‌صورت جداگانه به‌دست آمده شد که با مقایسه سیکل آستانه ژن مورد نظر با ژن مرجع (GAPDH)، می‌توان میزان بیان ژن مورد نظر را به‌صورت کمی از فرمول $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ و میزان بیان ژن NeuroD1 را در هفت گروه مختلف اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

بررسی کیفی RNA استخراج شده

در شکل ۱ RNA استخراج شده بر روی ژل دو درصد نشان داده شده است.



شکل ۱- RNA تام سلولی الکتروفورز شده در ژل آگارز ۲ درصد

جدول ۲- پروتکل دمایی برای ژن

۱ سیکل	۹۴°C	۵ دقیقه	Initial denaturation step
۴۰ سیکل	۹۴°C	۱۵ ثانیه	Denaturation
	۶۱°C	۲۰ ثانیه	Annealing
	۷۲°C	۲۰ ثانیه	Extension

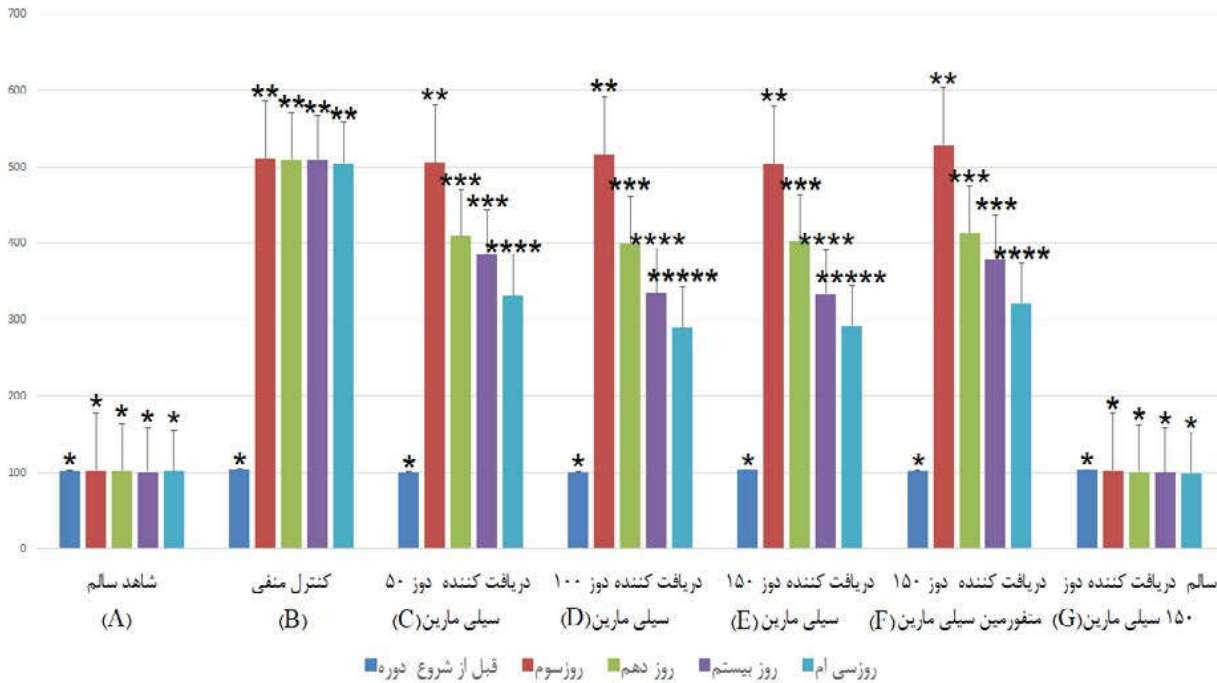
تجزیه و تحلیل آماری

تغییرهای قند خون رت‌ها

در ابتدا تغییرهای قند خون در گروه‌های مورد مطالعه را مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری قند خون هر ۱۰ روز یک

بار قند خون ناشتای رت‌ها (۱۴ ساعت گرسنگی) با خون‌گیری از ناحیه دم و با استفاده از دستگاه گلکومتر اندازه‌گیری شد و نتایج گروه‌های تیمار و شاهد در نمودار ۱ آمده است.

میانگین قند خون



نمودار ۱- تغییرهای قند خون رت‌ها

*تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. (P-Value < ۰/۰۵)

دریافت کننده سیلی مارین (G) تغییر معناداری مشاهده نشد (P-Value > ۰/۰۵).

نتایج Real-Time PCR

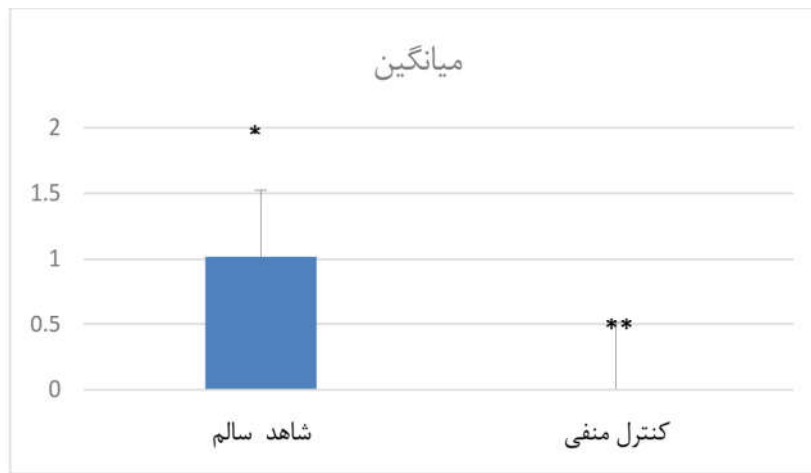
نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن Neuro D1 در

گروه‌ها A و B

بررسی میزان بیان ژن Neuro D1 در گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی به‌عنوان کنترل منفی (B) نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن Neuro D1 در رت‌های دیابتی و سالم دارای اختلاف معناداری است.

(P-Value = ۰/۰۰۰)

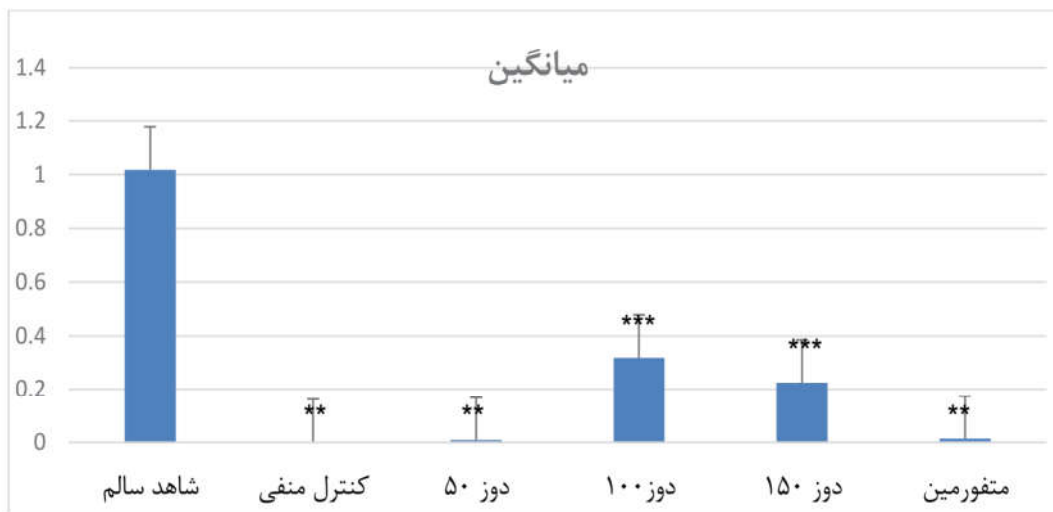
میزان قند خون با تزریق استریتوزوتوسین به‌شدت افزایش یافت؛ اما پس از آن با دریافت سیلی مارین در طول مدت درمان همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان قند خون در هر گروه با توجه به میزان دوز دریافتی سیلی مارین تغییر یافت. تغییرهای قند خون در گروه‌های تحت درمان (سیلی مارین و متفورمین)، گروه شاهد دیابتی (B) و گروه شاهد سالم (A) در طول دوره تیمار نسبت به هم تغییرهای معنی‌دار داشته و بیش‌ترین تغییرها در گروه‌های دریافت کننده دوز mg/kg ۱۰۰ (D) و ۱۵۰ mg/kg (E) نسبت به سایر گروه‌های تیمار است و تمامی گروه‌ها در انتهای دوره درمان تغییرهای معناداری نسبت به شروع دوره دیابتی شدن داشتند (P-Value < ۰/۰۵). ولی بین گروه شاهد سالم (A) و گروه سالم



نمودار ۲- بررسی میزان بیان ژن Neuro D1 در گروه شاهد سالم و کنترل منفی

بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های (A-F) در نمودار ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های A-F



نمودار ۳- بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های (A-F)

*وجود تعداد ستاره‌های متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است.

دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه شاهد (A) نتایج معنی‌دار است.

میزان بیان این ژن به ترتیب گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg ۵۰ سیلی مارین (C)، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰

با توجه به نتایج به دست آمده بیان ژن NeuroD1 قبل از ایجاد دیابت در همه گروه‌ها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروه‌های بیمار به شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلی مارین و متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است. هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد

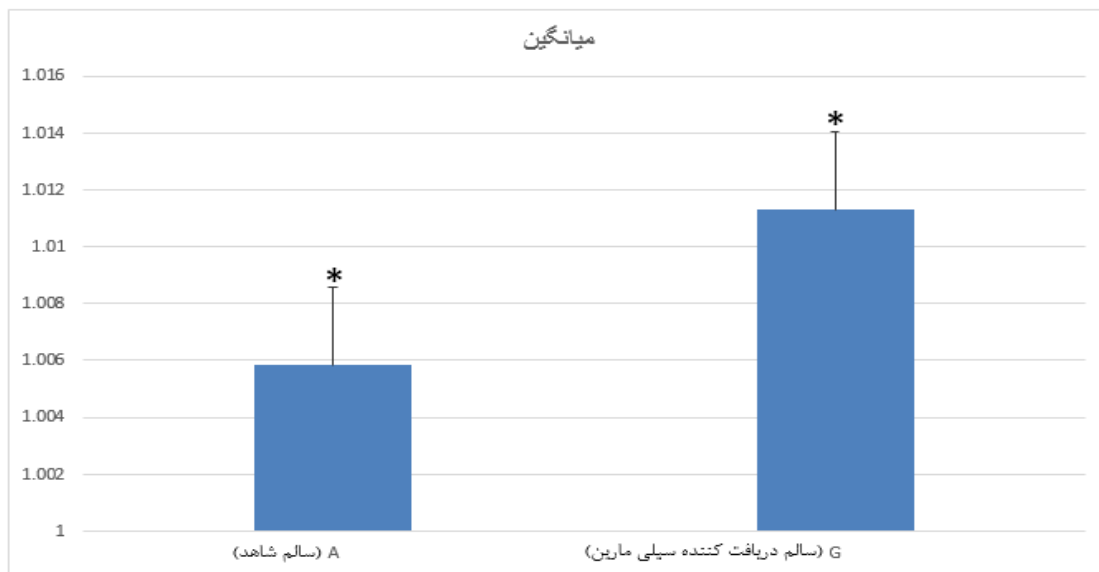
شاهد سالم معنی دار نبود. ($P\text{-Value} > 0/05$). هم‌چنین گروه دریافت کننده دوزهای 100 mg/kg سیلی‌مارین (D) اثردهی بهتری نسبت به دوز 150 mg/kg (E) داشته است که نشان دهنده عدم وابسته به دوز بودن اثردهی سیلی‌مارین است. به احتمال دوز 150 mg/kg به دلیل غلظت بالای آن توسط موش بیش تر دفع شده است علی‌رغم این یافته‌ها، نیاز به انجام تحقیقات بیش تری است.

نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه های A و G

بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های شاهد سالم (A) و سالم دریافت کننده سیلی‌مارین (G) در نمودار ۴ نشان داده شده است.

متفورمین (F)، گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلی‌مارین (E)، دریافت کننده دوز 100 mg/kg (D)، بیش‌ترین بیان را داشته‌اند؛ اما میزان بیان گروه‌های D و E نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلی‌مارین (C) و گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg متفورمین (F) معنی دار بود. ($P\text{-Value} < 0/05$)؛ اما میزان بیان در گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلی‌مارین (C) و گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg متفورمین (F) معنی دار نبود. ($P\text{-Value} > 0/05$).

دوز 100 mg/kg داروی سیلی‌مارین تأثیر بسزایی نسبت به همه دوزهای تیمار سیلی‌مارین و هم‌چنین داروی متفورمین در بیان ژن NeuroD1 داشته است و اختلاف آن با گروه

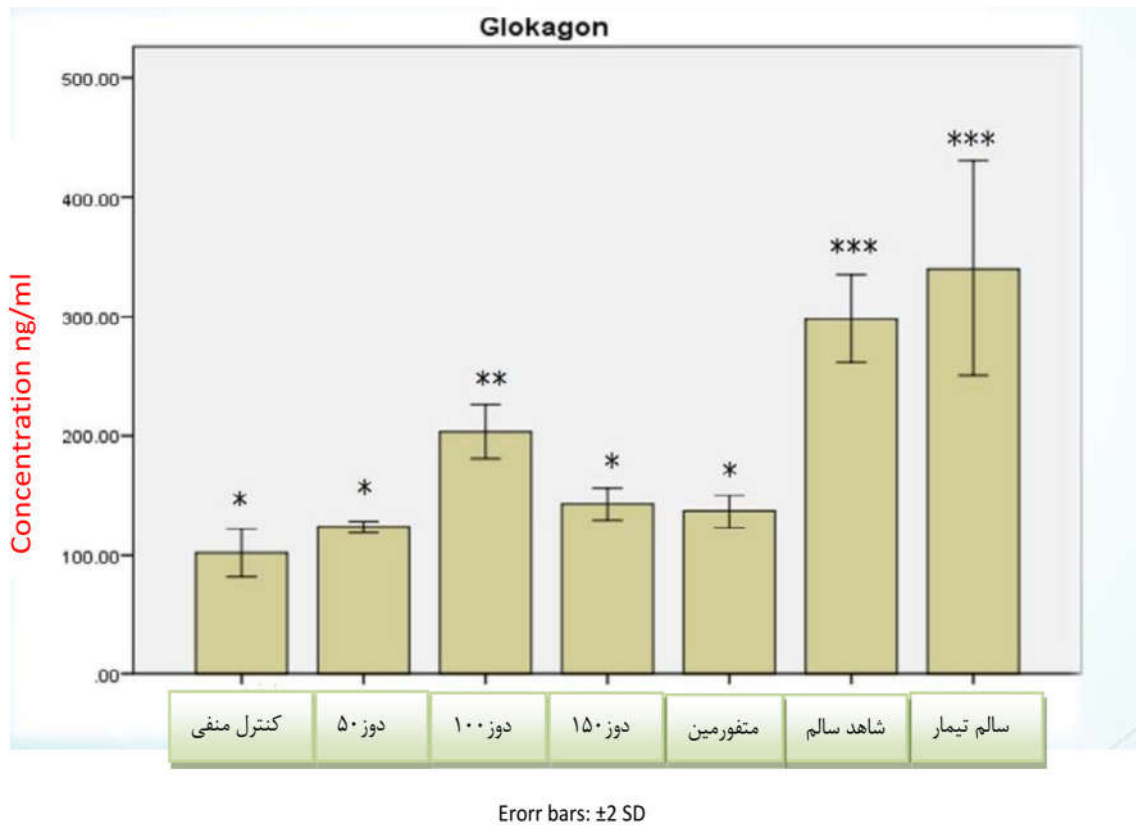


نمودار ۴ - بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های A و G

میانگین مقادیر پلاسمایی گلوکاگون برحسب نانوگرم/میلی‌لیتر بود و با سطح معنی‌داری ($p < 0/01$) گزارش شد. آنالیز آماری داده‌ها در گلوکاگون نشان داد که دوز 100 ، رت‌های سالم و تیمار با کنترل منفی ارتباط معنی‌داری دارد، رت‌های دریافت کننده دوز 50 و متفورمین، 150 ارتباط معنی‌داری با کنترل منفی ندارد (نمودار ۵).

این نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه سالم دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلی‌مارین (G) نسبت به گروه سالم شاهد (A) کمی افزایش یافته ولی این افزایش بیان معنی‌دار نبود ($P\text{-Value} = 0/946$).

نتایج کلی سنجش مقادیر گلوکاگون



نمودار ۵- تغییرها در سطوح پلاسمایی گلوکاگون در رت‌ها

* وجود تعداد ستاره‌های متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است ($P\text{-Value} < 0.05$).

انسولین جلوگیری و سبب بهبود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود. در تأیید این نظریه، مطالعات تجربی و کلینیکی متعدد نشان داده‌اند ترکیب‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان دارای اثرهای مطلوبی بر روی اختلال‌های متابولیکی ناشی از افزایش قند خون دارند. گیاه خار مریم باعث افزایش عملکرد آنزیم‌های دفع‌کننده رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود. این آنزیم‌ها شامل سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالازها است (۱۹،۱۸).

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۰). پیش‌تر نشان داده شده است که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوکز پلازما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۲۱-۲۳). علاوه بر این مکانیسم‌های محافظت‌کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از

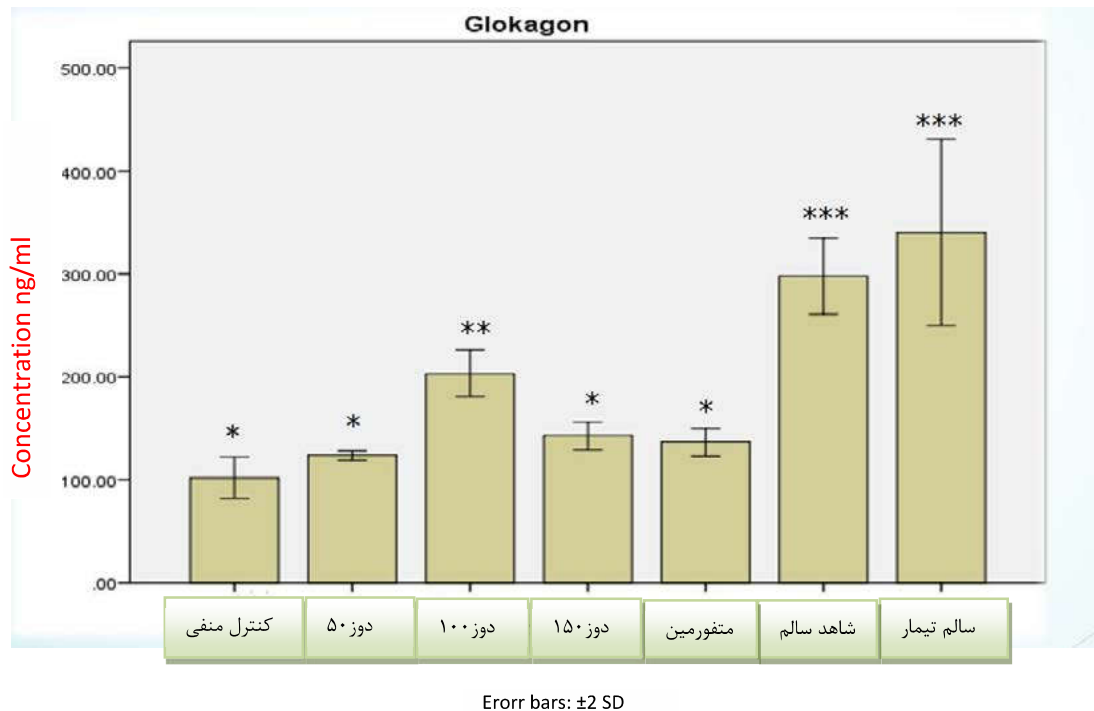
بحث

علت اصلی دیابت آن است که در بدن یا انسولین ساخته نمی‌شود و یا این که مقدار آن به قدری ناچیز است که نیازهای بدن را برآورده نمی‌سازد. در دیابت نوع I سلول‌های بتا پانکراس که انسولین ترشح می‌کنند تخریب شده. در نتیجه انسولین ساخته نمی‌شود و در جریان خون وجود ندارد یا مقدار آن بسیار کم است در حال حاضر بیماران مبتلا به دیابت نوع یک با تزریق روزانه انسولین، قند خود را کنترل می‌کنند (۱۶).

که در این مطالعه از عصاره دانه خار مریم که حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلاونوئیدی است که در مجموع به آن سیلی‌مارین می‌گویند که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است، استفاده شد. سیلی‌مارین به-خاطر اثرهای آنتی‌اکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده

وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که سیلی مارین از طریق تحریک پلی مرز I و رونویسی rRNA سنتز RNA ریپوزومی (rRNA) را افزایش می دهد (۲۴-۲۶). saito و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی سلول‌ها بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز به این نتیجه رسیدند که بیان هم‌زمان PDX-1 و Neurod-1 منجر به تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز می شود (۲۷). valenzuela و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی مارین که یک آنتی-اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد هم‌چنین گلوکاتایون را کاهش می دهد (۲۸). saito و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادن سیلی مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می شود؛ و افزایش گلوکاتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استرپتوزوتوسین می شود (۱۶). سلول‌های انسولین ساز با بیان مداوم این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی توسط Blyszczuk و همکاران تولید شدند. آن‌ها تلاش کردند تا نشان دهند با استفاده از روش ساده ترانسفکشن ژن Pax4 می توان سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز داد. در این روش آن‌ها ابتدا اجسام جنینی را از سلول‌های بنیادی جنین به وجود آوردند و سپس از اجسام جنینی به وجود آمده سلول‌های منفرد را برای ترانسفکشن ژن Pax4 جداسازی کردند. سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکشن شده بعد از چهار روز به سلول‌های ترشح کننده انسولین تمایز یافتند. در طی این مدتی که اجسام شبه جنینی به صورت قطره‌های آویزان هستند ژن‌های مخصوص آندودرم در آن‌ها بیان می شوند (۲۹). در تحقیق ما هم بیان ژن Pax4 به وسیله داروی سیلی مارین افزایش یافته که این نتایج بیانگر است که سیلی مارین باعث ترمیم و افزایش سلول‌های جزایر به واسطه پیش‌سازهای آن‌ها می شود. collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مقاله‌ای تحت عنوان بیان بیش از حد ژن Pax4 در

پانکراس موش و تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های آلفا و پس از آن به سلول‌های بتا به این نتیجه رسیدند که بیان نابجا و بیش از حد ژن Pax4 بر پانکراس در حال تکوین موش‌های تراریخته منجر به پیدایش جزایر لانگرهانس بزرگ می شود که این جزایر به‌طور عمده از سلول‌های بتا تشکیل شده‌اند (۳۰). این نتایج نشان دهنده این است که بیان این ژن باعث افزایش سلول‌های بتا و آلفا می شود که نتایج به‌دست آمده از الیزا ما هم گویای این نتیجه است. soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی مارین در بیان ژن Pdx-1 و گسترش سلول‌های بتای پانکراس در یک مدل پانکراتومی که توسط soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ممکن است سیلی-مارین تکثیر سلول‌های تولیدکننده انسولین را افزایش دهد (۳۱). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق گویایی تأثیر سیلی مارین بر بهبود سلول‌های تخریب شده بافت پانکراس و هم‌چنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رت‌ها و کاهش قند خون افزایش گلوکاگون خون در رت‌های تیمار با دوزهای مختلف سیلی-مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. از سوی دیگر collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی نقش Mafa در سلول‌های بتا پانکراس دریافتند که بیان ژن Mafa همراه با ژن PDX-1 و Neuro D1 به‌طور قابل توجهی باعث بیوستنز انسولین می شود. این نتایج نشان می دهد که این ژن‌ها نقش بسیار مهمی در سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس دارند و می توانند یک هدف درمانی جدید برای دیابت باشد (۳۰). با توجه به نتایج به‌دست آمده بیان ژن NeuroD1 قبل از ایجاد دیابت در همه گروه‌ها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروه‌های بیمار به شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلی مارین و متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است. هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه سالم شاهد (A) نتایج معنی‌دار است. در نهایت zhaو و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی تأثیر



Error bars: ± 2 SD

نمودار ۵- تغییرها در سطوح پلاسمایی گلوکاگون در رت‌ها

*وجود تعداد ستاره‌های متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است ($P\text{-Value} < 0/05$).

انسولین جلوگیری و سبب بهبود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود. در تأیید این نظریه، مطالعات تجربی و کلینیکی متعدد نشان داده‌اند ترکیب‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان دارای اثرهای مطلوبی بر روی اختلال‌های متابولیکی ناشی از افزایش قند خون دارند. گیاه خار مریم باعث افزایش عملکرد آنزیم‌های دفع کننده رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود. این آنزیم‌ها شامل سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالازها است (۱۹،۱۸).

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۰). پیش‌تر نشان داده شده است که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرائی است (۲۱-۲۳). علاوه بر این مکانیسم‌های محافظت کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از

بحث

علت اصلی دیابت آن است که در بدن یا انسولین ساخته نمی‌شود و یا این که مقدار آن به قدری ناچیز است که نیازهای بدن را برآورده نمی‌سازد. در دیابت نوع I سلول‌های بتا پانکراس که انسولین ترشح می‌کنند تخریب شده. در نتیجه انسولین ساخته نمی‌شود و در جریان خون وجود ندارد یا مقدار آن بسیار کم است در حال حاضر بیماران مبتلا به دیابت نوع یک با تزریق روزانه انسولین، قند خود را کنترل می‌کند (۱۶).

که در این مطالعه از عصاره دانه خار مریم که حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلاونوئیدی است که در مجموع به آن سیلی‌مارین می‌گویند که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است، استفاده شد. سیلی‌مارین به خاطر اثرهای آنتی‌اکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده

وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که سیلی مارین از طریق تحریک پلی مرز I و رونویسی rRNA سنتز RNA ریبوزومی (rRNA) را افزایش می دهد (۲۴-۲۶). saito و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی سلول‌ها بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز به این نتیجه رسیدند که بیان هم‌زمان PDX-1 و Neurod-1 منجر به تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز می شود (۲۷). valenzuela و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی مارین که یک آنتی-اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد هم‌چنین گلوکوتایون را کاهش می دهد (۲۸). soto و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادند سیلی مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می شود: و افزایش گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استریتوزوتوسین می شود (۱۶). سلول‌های انسولین ساز با بیان مداوم این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی توسط Blyszczuk و همکاران تولید شدند. آن‌ها تلاش کردند تا نشان دهند با استفاده از روش ساده ترانسفکشن ژن Pax4 می توان سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز داد. در این روش آن‌ها ابتدا اجسام جنینی را از سلول‌های بنیادی جنین به وجود آوردند و سپس از اجسام جنینی به وجود آمده سلول‌های منفرد را برای ترانسفکشن ژن Pax4 جداسازی کردند. سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکشن شده بعد از چهار روز به سلول‌های ترشح کننده انسولین تمایز یافتند. در طی این مدتی که اجسام شبه جنینی به صورت قطره‌های آویزان هستند ژن‌های مخصوص آندودرم در آن‌ها بیان می شوند (۲۹). در تحقیق ما هم بیان ژن Pax4 به وسیله داروی سیلی مارین افزایش یافته که این نتایج بیانگر است که سیلی مارین باعث ترمیم و افزایش سلول‌های جزایر به واسطه پیش‌سازهای آن‌ها می شود. collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مقاله‌ای تحت عنوان بیان بیش از حد ژن Pax4 در

پانکراس موش و تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های آلفا و پس از آن به سلول‌های بتا به این نتیجه رسیدند که بیان نابجا و بیش از حد ژن Pax4 بر پانکراس در حال تکوین موش‌های تراریخته منجر به پیدایش جزایر لانگرهانس بزرگ می شود که این جزایر به‌طور عمده از سلول‌های بتا تشکیل شده‌اند (۳۰). این نتایج نشان دهنده این است که بیان این ژن باعث افزایش سلول‌های بتا و آلفا می شود که نتایج به‌دست آمده از ای‌زا ما هم گویای این نتیجه است. soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی مارین در بیان ژن Pdx-1 و گسترش سلول‌های بتای پانکراس در یک مدل پانکراتومی که توسط soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ممکن است سیلی مارین تکثیر سلول‌های تولیدکننده انسولین را افزایش دهد (۳۱). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق گویایی تأثیر سیلی مارین بر بهبود سلول‌های تخریب شده بافت پانکراس و هم‌چنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رت‌ها و کاهش قند خون افزایش گلوکاگون خون در رت‌های تیمار با دوزهای مختلف سیلی مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. از سوی دیگر collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی نقش Mafa در سلول‌های بتا پانکراس دریافتند که بیان ژن Mafa همراه با ژن PDX-1 و Neuro D1 به‌طور قابل توجهی باعث بیوسنتز انسولین می شود. این نتایج نشان می دهد که این ژن‌ها نقش بسیار مهمی در سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس دارند و می توانند یک هدف درمانی جدید برای دیابت باشد (۳۰). با توجه به نتایج به‌دست آمده بیان ژن NeuroD1 قبل از ایجاد دیابت در همه گروه‌ها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروه‌های بیمار به‌شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلی مارین و متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است. هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه سالم شاهد (A) نتایج معنی‌دار است. در نهایت zhao و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی تأثیر

اکستانید-۴ بر بیان Neurod-1 و Glut-2 در سلول‌های تولیدکننده انسولین مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در موش به این نتیجه رسیدند که اکستانید-۴ به‌طور قابل‌توجهی رونویسی ژن Neurod1 و Glut2 را تسهیل کرد و قادر به ایجاد تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های تولیدکننده اندوکراین و انسولین شد (۳۲). نتایج پژوهش حاضر نیز حاکی از آن بود که سیلی مارین باعث بهبود بافت پانکراس و بیان ژن Neuro D1 و در نتیجه باعث افزایش سطح گلوکاگون می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری در این تحقیق نشان داده شد که سیلی‌مارین باعث بهبود بافت پانکراس و بیان ژن Neuro D1 و در نتیجه باعث افزایش سطح گلوکاگون می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق گویایی تأثیر سیلی‌مارین بر بهبود سلول‌های تخریب شده بافت پانکراس و همچنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رت‌ها و کاهش قند خون افزایش گلوکاگون خون در رت‌های تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. در نتیجه شواهد ارائه شده در این تحقیق حاکی از آن است که سیلی‌مارین نه تنها باعث کاهش دیابت ایجاد شده با استرپتوزتوزسین می‌شود بلکه باعث بهبودی پانکراس و بازگرداندن آن به عملکرد طبیعی اش نیز می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است و مؤلفین این تحقیق مراتب سپاس خود را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که امکان اجرای این طرح را فراهم کردند، ابراز می‌دارند.

1. Sobolová L, Škottová N, Večeřa R, Urbánek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharma research*. 2006;53(2):104-12.
2. Das-Munshi J, Stewart R, Ismail K, Bebbington PE, Jenkins R, Prince MJ. Diabetes, common mental disorders, and disability: findings from the UK National Psychiatric Morbidity Survey. *Psychosom med*. 2007;69(6):543-50.
3. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007;450(7170):712.
4. Sharifirad G, Kamran A, Entezari M. The effect of diabetic diet education on FBS and BMI of patients with type II diabetes mellitus. *J Ardabil University Med Sciences*. 2007;7(4):375-80.
5. Schlachterman A, Forsmark CE. Pancreatic function testing for the early diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endo*. 2017;86(6):1056-8.
6. Hao L, Wang L-S, Liu Y, Wang T, Guo H-L, Pan J, et al. The different course of alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis: A long-term study of 2,037 patients. *PloS one*. 2018;13(6):e0198365.
7. Pinet M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardévol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008;7(4):299-308.
8. Turrell G, Hewitt B, Patterson C, Oldenburg B, Gould T. Socioeconomic differences in food purchasing behaviour and suggested implications for diet-related health promotion. *J Human Nutrition Dietetics*. 2002;15(5):355-64.
9. Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Molecular cellular Endo*. 2001;185(1-2):99-108.
10. Zhu Y, Li Y, Dai C, Sun L, You L, De W, et al. Inhibition of Lincpint expression affects insulin secretion and apoptosis in mouse pancreatic β cells. *internati j biochem cell biology*. 2018;104171-9.
11. Meusel L-AC, Kansal N, Tchistiakova E, Yuen W, MacIntosh BJ, Greenwood CE, et al. A systematic review of type 2 diabetes mellitus and hypertension in imaging studies of cognitive aging: time to establish new norms. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6148.
12. Sandovici I, Hammerle CM, Ozanne SE, Constância M. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. *Cell Molecular Life Sciences*. 2013;70(9):1575-95.
13. Voroneanu L, Nistor I, Dumea R, Apetrii M, Covic A. Silymarin in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J diabetes research*. 2016;2016.
14. Sakai I, Izumi S-i, Murano T, Okuwaki S, Makino T, Suzuki T. Presence of aldose reductase inhibitors in tea leaves. *Japanese J Pharmacology*. 2001;85(3):322-6.
15. Velussi M, Cernigoi AM, Dapas F, Caffau C, Zilli M. Long-term (23 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J hepatology*. 1997;26(4):871-9.

16. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003;136(3):205-12.
17. Hosseinpour Feizi M, Saed S, Babaei E, Montazeri V, Halimi M. Evaluation of Nucleostemin Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors. *J Kerman Uni Med Sciences*. 2012;19(2).
18. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*. 2010;24(10):1423-32.
19. Soto C, Raya L, Pérez J, González I, Pérez S. Silymarin induces expression of pancreatic Nkx6. 1 transcription factor and β -cells neogenesis in a pancreatectomy model. *Molecules*. 2014;19(4):4654-68.
20. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2015;28(1):36-43.
21. Stolf AM, Cardoso CC, Acco A. Effects of silymarin on diabetes mellitus complications: a review. *Phytotherapy research*. 2017;31(3):366-74.
22. Rahimi R, Karimi J, Khodadadi I, Tayebinia H, Kheiripour N, Hashemnia M, et al. Silymarin ameliorates expression of urotensin II (U-II) and its receptor (UTR) and attenuates toxic oxidative stress in the heart of rats with type 2 diabetes. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2018;101244-50.
23. Pradhan S, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Research*. 2006;124(5):491-504.
24. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integrative cancer therapies*. 2007;6(2):120-9.
25. Katiyar SK, Mantena SK, Meeran SM. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PloS one*. 2011;6(6):e21410.
26. Lettéron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, et al. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice: evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem pharmacol*. 1990;39(12):2027-34.
27. Saitoh K, Yamato E, Miyazaki S, Miyazaki J-I. Both Pdx-1 and NeuroD1 genes are requisite for the maintenance of insulin gene expression in ES-derived differentiated cells. *Diabetes research clinical practice*. 2007;77(3):S138-S42.
28. Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta medica*. 1989;55(05):420-2.
29. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(3):998-1003.

10. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells. *Cell*. 2009;138(3):449-62.

11. Soto C, Raya L, Juárez J, Pérez J, González I. Effect of Silymarin in Pdx-1 expression and the proliferation of pancreatic β -cells in a pancreatectomy model. *Phytomedicine*. 2014;21(3):233-9.

12. Zhao Q, Yang Y, Hu J, Shan Z, Wu Y, Lei L. Exendin-4 enhances expression of Neurod1 and Glut2 in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *Archives medical science: AMS*. 2016;12(1):199.