



Scan online to view this article

## Effect of Silymarin on Blood Glucose and *Hnf4a* Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats

Farshid gheibi hajivar, Sajad nikkhah, Rahman jafari hafshejani \*.

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

### Abstract

**Aim and Background:** Diabetes mitigates beta cells and impairs their function. Silymarin improves this disorder and decreases and also significantly increases the expression of insulin. The purpose of this study was to evaluate the effect of Silymarin on blood glucose and expression *Hnf4a* gene is in streptozotocin-diabetic male rats.

**Material and methods:** In this research, 42 male rats were randomly selected and divided into 7 groups of heparin, diabetic rats with diabetes mellitus and streptozotocin, and their fasting blood glucose was measured. Then, doses of 50, 100, and 150 were given to the Marin's slider recipients. The rats were then anesthetized with medication. A portion of the pancreatic tissue was isolated and used to evaluate the expression of *Hnf4a* gene using Real Time RT PCR.

**Results:** Investigating the expression of *Hnf4a* expression at 150 mg/kg doses in rats receiving silymarin showed that in this dose significant reduction of *Hnf4a* gene was introduced as an effective dose (P-value <0.05). In the future, silymarin can be considered as a Herbal medicine used to treat diabetes.

**Conclusion:** By studying the results of this study, it can be said that the silymarin plant has anti-inflammatory effects and can be effective in reducing diabetes mellitus.

**Keywords:** *Hnf4a*, Silymarin, Rat, Streptozotocin.

Corresponding author:

Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran  
Email: rahman.j9599@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## تأثیر سیلی مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf4a* در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین فرشید غیبی حاجیور، سجاد نیکخواه، رحمان جعفری هفشجانی\*

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

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیابت باعث کاهش سلول‌های بتا و اختلال در عملکرد آنها می‌شود سیلی مارین این اختلال و کاهش را بهبود می‌بخشد و هم‌چنین به‌طور قابل توجهی باعث افزایش بیان انسولین می‌شود و هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سیلی مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf4a* در رت‌های نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۴۲ سر رت نر به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و به ۷ گروه شش‌تایی تقسیم شدند، رت‌های دیابتی با ماده استرپتوزوتوسین دیابتی شدند و قند خون ناشتای آنها سنجیده شد. سپس به گروه‌های دریافت‌کننده سیلی مارین دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ داده شد. سپس رت‌ها با دارو بی هوش و تشریح شدند. مقداری از بافت پانکراس جداسازی و برای بررسی بیان ژن *Hnf4a* به‌روش Real-time PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** بررسی بیان *Hnf4a* در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رت‌های دریافت‌کننده سیلی مارین نشان داد که در این دوز کاهش چشم‌گیری در ژن *Hnf4a* و به‌عنوان دوز مؤثر معرفی می‌گردد ( $P\text{-Value} < 0.05$ ) و می‌توان در آینده از سیلی مارین به‌عنوان یک داروی گیاهی برای درمان دیابت استفاده نمود.

**نتیجه‌گیری:** با بررسی نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت گیاه سیلی مارین دارای اثرهای ضد التهابی است و می‌تواند در کاهش قند خون در بیماری دیابت مؤثر واقع شود.

**واژه‌های کلیدی:** *Hnf4a* سیلی مارین، رت، استرپتوزوتوسین.

### مقدمه

پانکراس نقش ضروری در گوارش، هضم غذا و همئوستازی گلوکز دارد. پانکراس بالغ از دو بخش تشکیل شده است: بخش برون‌ریز شامل سلول‌های آسینار و مجرا است که تولید و انتقال آنزیم‌های گوارشی را به روده انجام می‌دهند. بخش درون‌ریز شامل جزایر لانگرهانس است. این جزایر دارای چهار نوع سلول هستند به نام آلفا، بتا، دلتا و سلول‌های تولیدکننده پلی‌پپتید که به‌ترتیب گلوکاگون، انسولین، سوماتو استاتین و

پلی‌پپتیدهای پانکراس را ترشح می‌کنند (۲۶، ۵). سلول‌های آلفا و بتا در هماهنگی برای حفظ قند خون عمل می‌کنند، سلول‌های آلفا گلوکاگون را در پاسخ به گلوکز پایین برای تحریک گلیکوژنولیز در کبد آزاد می‌کنند در مقابل سلول‌های بتا انسولین را در پاسخ به گلوکز بالا برای تحریک دفع گلوکز محیطی آزاد می‌کنند و نقش مخالف در همئوستازی گلوکز ایفا می‌کنند (۲۴). همه اشکال دیابت (دیابت شیرین) به‌صورت مشترک ناشی از فقدان عملکرد مناسب توده سلول‌های بتا هستند (۶، ۵). دیابت ملیتوس یک بیماری شایع است که با هایپرگلیسمی ناشی از تولید ناکافی انسولین و یا مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود. دیابت ملیتوس به دو گروه اصلی تقسیم می‌شود. دیابت نوع یک، نوعی بیماری خودایمنی است که در آن سلول‌های بتا ترشح‌کننده انسولین در جزایر پانکراس به‌طور دائم توسط حملات خودایمنی آسیب می‌بینند

### نویسنده مسئول:

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

اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیکی: rahman.j9599@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

اگزون بوده و در انسان در موقعیت 20q13.12 قرار دارد. طی تحقیقی با استفاده از روش‌های آماری دانشمندان بیان کردند که خانواده *let-7* از میکرو RNAها به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی برای عامل هسته‌ای کبدی (*Hnf4a*) عمل می‌کند. هم‌چنین با استفاده از Real-time PCR سطح بیان خانواده *let-7* را در سلول‌های HepG2 و MSC (یک رده سلولی کبد که سطح بالایی از *Hnf4a* را بیان می‌کند) مقایسه کردند که نتایج نشان داد که سطح بیان خانواده *let-7* در سلول‌های HepG2 بسیار پایین بوده و این نتیجه بیان‌کننده نقش خانواده *let-7* در تنظیم بیان *Hnf4a* است (۱۴).

استفاده از گیاهان دارویی از اولین درمان‌های دیابت بوده است. داورهای گیاهی نسبت به داورهای شیمیایی دارای سمیت کم‌تر و اثرهای جانبی کم‌تر هستند و اقبال عمومی برای مصرف آن‌ها بیش‌تر است (۴). از جمله گیاهان مؤثر در کاهش قند خون می‌توان به خار مریم، خیار تلخ، شنبلیله، سیاه‌گیله و هندوانه ابوجهل اشاره کرد. گیاه خار مریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) یک گیاه یک یا دو ساله از خانواده کاسنیان است که در درمان اختلال‌ها و بیماری‌های کبد استفاده می‌شود. این گیاه بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران به‌خصوص البرز مرکزی، خوزستان و آذربایجان رویش دارد. عصاره بذر گیاه خار مریم حاوی یک ترکیب‌های فلاونوئیدی به‌نام سیلی‌مارین است. 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. سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان گلوکوتایون سلولی و ثبات غشای سلولی در طب سنتی جهت بهبود اختلال‌های کبد تجویز می‌شود. تجویز این دارو برای افراد مبتلا به بیماری‌های کبدی موجب افزایش حساسیت سلولی به انسولین و در نتیجه کاهش میزان قند خون شده است. سیلی‌مارین خواص مختلفی از جمله: محافظت از کبد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطان و هم‌چنین ضد دیابت دارد (۷، ۱۸).

دیابت باعث کاهش سلول‌های بتا و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شود که سیلی‌مارین آن را بهبود می‌بخشد و هم‌چنین به‌طور قابل توجهی باعث افزایش بیان انسولین می‌شود. سیلی‌مارین شامل مخلوطی از چند ترکیب فنولی است که ایزومراز هم هستند که این ترکیب‌های سلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین نامیده می‌شوند. با توجه به عوارض

و در نتیجه انسولین تولید نمی‌شود یا به‌طور ناقص تولید می‌گردد. در دیابت نوع یک میزان تخریب سلول‌های بتا به‌طور کامل متغییر است. در برخی افراد سریع (به‌طور عمده نوزادان و کودکان) و در دیگران آهسته (به‌طور عمده بزرگسالان) است و تنها ۵ درصد افراد دیابتی مبتلا به دیابت نوع یک هستند. دیابت نوع دو هنگامی رخ می‌دهد که پانکراس به‌مقدار کافی انسولین تولید نمی‌کند و یا بافت‌های بدن به سطح نرمال یا حتی بالا انسولین مقاوم می‌شوند، این افراد ۹۵ درصد افراد دیابتی را شامل می‌شوند (۳، ۱). عواملی مانند محیط زیست و استعداد ژنتیکی از عوامل اصلی هستند که بر پیشرفت این بیماری تأثیر می‌گذارند (۱۱). بروز جهانی دیابت ملیتوس به‌طور نگران‌کننده در ده سال گذشته افزایش یافته است، تخمین زده می‌شود این اختلال ۵۵۲ میلیون نفر را تا سال ۲۰۳۰ تحت تأثیر قرار دهد. تغییر شیوه زندگی که منجر به کاهش فعالیت بدنی می‌شود و افزایش چاقی به‌عنوان عوامل اصلی برای افزایش احتمال بروز دیابت هستند. درمان‌های موجود برای دیابت نوع یک و بیماران طولانی مدت دیابت نوع دو بر روی منابع خارجی انسولین متمرکز شده است. با این حال با وجود اثرهای مفید درمان با انسولین بر روی همئوستازی گلوکز، مدیریت ضعیف بیمار اغلب منجر به عوارض دیابت مانند بیماری‌های رتینوپاتی، نفروپاتی، قلبی عروقی و هم‌چنین بیماری‌های عروق مغز می‌شود (۳، ۱۶). عوارض جانبی ناشی از این مدیریت ضعیف که زندگی را تهدید می‌کند نشان دهنده یک نیاز استراتژی درمانی جدید برای حفظ و افزایش سلول‌های بتا عملکردی و در نتیجه همئوستازی گلوکز بدون عوارض جانبی مشتق شده از درمان است (۱۳).

ژن عامل هسته‌ای کبد *Hnf4a*<sup>۱</sup> یک عامل رونویسی است که عملکرد بسیار مهمی در تمایز ریخت‌شناسی و عملکرد کبد ایفا می‌کند و هم‌چنین به‌عنوان عامل برجسته در تمایز هیپاتوبلاست‌ها به‌حالت بالغ عمل می‌کند. این ژن بیان چندین ژن کبدی را بر عهده دارد. این ژن در توسعه کبد، کلیه و روده نقش دارد و جهش در این ژن با دیابت نوع اول در ارتباط است. هم‌چنین به‌تازگی مشخص شده است که *Hnf4a* یک تنظیم‌کننده بیان میکرو RAN (۱۲۲) است و افزایش بیان این عامل طی تکامل کبدی جنین موش هم‌جهت با افزایش بیان miR-122 است و این مطالعه‌ها نشان دهنده نقش *Hnf4a* در تکامل کبد است (۱۲، ۲۵). ژن *Hnf4a* دارای ۱۳

<sup>۱</sup> hepatocyte nuclear factor 4 alpha

جانبی کم‌تر گیاهان دارویی در این مطالعه به بررسی تأثیر سیلی‌مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf4a* در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شد.

## روش کار

### جامعه مورد مطالعه و گروه بندی

در این تحقیق تعداد ۴۲ سر رت نر ویستار به وزن ۲۲۰-۱۸۰ از شرکت دانته شهرکرد خریداری گردید و به اتاق حیوانات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. حیوانات در قفس‌های مخصوص خود نگهداری شدند و آب و غذا به اندازه کافی در اختیارشان قرار داده شد. برای تغذیه حیوانات از غذای مخصوص موش از شرکت خوراک دام کابيله اصفهان تهیه شده بود استفاده گردید و آب لوله‌کشی توسط شیشه‌های آبخوری در اختیارشان قرار می‌گرفت. سپس رت‌ها در ۷ گروه ۶ تایی دسته‌بندی و در قفس‌های مجزا نگهداری شدند آب و غذا برای همه یکسان بود و همچنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه در دمای ۲۲-۲۵ و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت در شبانه روز حفظ شد. لازم‌به ذکر است که گروه A شامل سالم شاهد بودند که هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه B شامل بیمار دیابتی (شاهد دیابتی) بودند که این گروه نیز هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه C بیمار دیابتی که سیلی مارین را با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و تعداد دفعات دریافت دارو ۱۰ بار بود. گروه D بیمار دیابتی که سیلی مارین را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و تعداد دفعات دریافت دارو ۱۰ بار بود. گروه E بیمار دیابتی که سیلی مارین را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و تعداد دفعات دریافت دارو ۱۰ بار بود. گروه F بیمار دیابتی که متفورمین را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و تعداد دفعات دریافت دارو ۱۰ بار بود. گروه G شامل گروه سالم که سیلی مارین را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و تعداد دفعات دریافت دارو ۱۰ بار بود.

گروه‌های مورد آزمایش شامل شش سر رت نژاد ویستار بود که همه گروه‌ها به‌جز گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی (B)، هر سه روز یک‌بار طی یک ماه (۱۰ نوبت در ماه) دوزهای مختلف داروهای سیلی مارین و متفورمین حل شده در آب مقطر را به‌صورت خوراکی (گاوژ) دریافت کردند.

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

برای ایجاد دیابت از داوری استرپتوزوتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت (۵۰ mg/kg) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ با یک‌بار تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. اثبات دیابتی بودن قند خون رت‌ها ۷۲ ساعت از زمان تزریق (STZ) در محدوده بالاتر از ۲۴۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود (۲۹،۳۰). سنجش قند خون همه گروه‌ها هر ده روز یک‌مرتبه با رعایت ۸ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت گردید. پس از پایان دوره آزمایش در روز سی‌ام حیوانات به‌مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شدند و سپس با استفاده از کلروفورم بی‌هوش شده پس از تشریح، مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع حاوی RNAlater جهت اندازه‌گیری بیان ژن *Hnf4a* ذخیره شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن مورد بررسی در پژوهش حاضر از روش Real-time PCR (RT-qPCR) استفاده شد. قابل توجه 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 (RNA later) قرار گیرد و هم-چنین به‌دلیل حساسیت بالا تمام لوازم مورد نیاز با محلول DEPC ۱ درصد تیمار شدند (۱۰).

### انجام تکنیک Real-time PCR

استخراج RNA از بافت پانکراس به‌وسیله هاون و ازت مایع و تریزول ساخت شرکت کیان مطابق پروتکل استاندارد شرکت-های سازنده انجام گردید و Total RNA استخراج شد و سپس برای حذف آلودگی ژنومی از کیت آنزیم DNase (شرکت Thermo) مطابق دستورالعمل این شرکت استفاده شد. لازم‌به ذکر است که پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن آن و هم‌چنین میزان خلوص و عدم آلودگی ژنومی آن، از نظر کیفی به‌واسطه لود کردن روی ژل آگارز ۲ درصد و هم از نظر کمی به‌وسیله دستگاه نانودراپ میزان خلوص (OD) آن اندازه‌گیری شد که غلظت همه غلظت RNAها بیشتر از ۹۰۰۰ ng/μl بود.

سپس مقداری از RNA برای ساخت cDNA استفاده شد. به این منظور از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا طبق

جداگانه به دست آمد؛ که با مقایسه سیکل آستانه ژن *Hnf4a* با ژن مرجع (GAPDH)، می توان میزان بیان ژن مورد نظر را به صورت کمی از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  = fold change به دست آورد و میزان بیان ژن *Hnf4a* در هفت گروه مختلف اندازه گیری شد.

### یافته ها

#### تغییرهای قند خون رت ها

در این پژوهش ابتدا تغییرهای قند خون در گروه های مورد مطالعه بررسی شد. برای اندازه گیری قند خون هر ۱۰ روز یک بار قند خون ناشتای رت ها (۱۴ ساعت گرسنگی) با خون گیری از ناحیه دم و با استفاده از دستگاه گلوکومتر اندازه گیری شد و نتایج گروه های تیمار و شاهد در نمودار (۱) آمده است.

جدول ۲. پروتکل دمایی مورد استفاده برای ژن *Hnf4a* در دستگاه روتورژن

مرحله	مدت زمان	دما	تعداد سیکل
دنا توره اولیه	۴ دقیقه	۹۴°C	۱ سیکل
دنا توره شدن	۲۰ ثانیه	۹۴°C	۴۰ سیکل
اتصال	۲۰ ثانیه	۶۰°C	
گسترش	۲۰ ثانیه	۷۲°C	

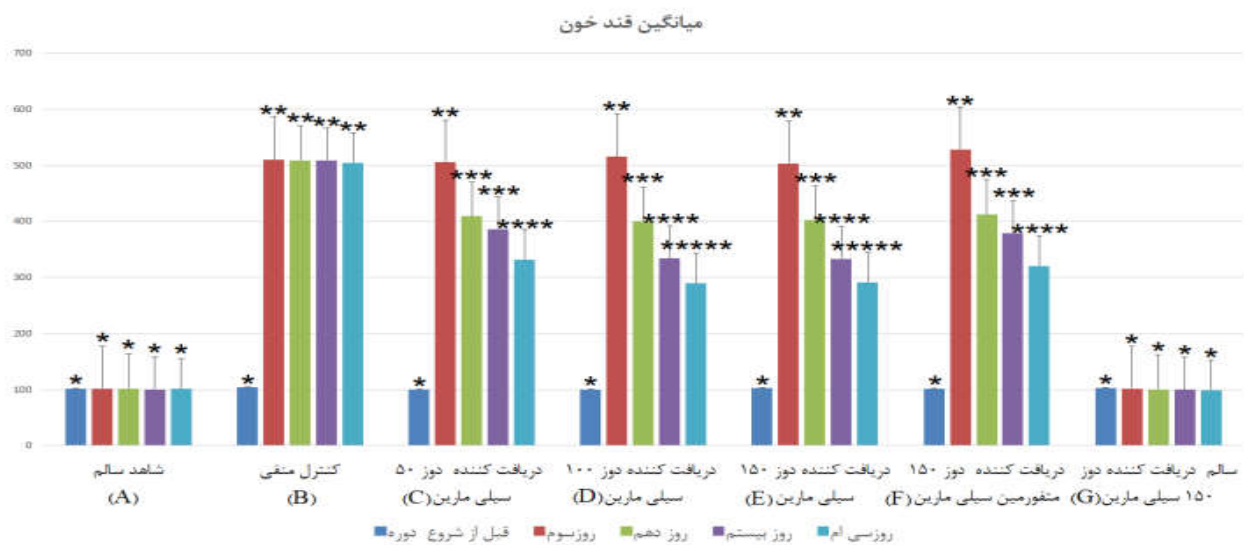
دستورالعمل شرکت سازنده این کیت استفاده شد. برای تعیین میزان بیان ژن *Hnf4a* از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی (رفرنس) استفاده شد. پرایمرهای انتخابی این ژن ها ساخت شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی بودند. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول شماره (۱) آمده است. همچنین اندازه باند پرایمرهای استفاده شده برای ژن *Hnf4a* bp۲۸۲ بود.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای ژن *Hnf4a* و GAPDH

پرایمر	توالی
Forward <i>Hnf4a</i>	5'-ACAGACATAC GTGCAAGCAA-3'
Reverse <i>Hnf4a</i>	5'-CATCATTTTG TTCTGCGGTGT-3'
GAPDH Forward	5'-TGGTGAAGGTCG GTGTGAACGGAT-3'
GAPDH Reverse	5'-TCCATGGTGGTG AAGACGCCAGTA-3'

در مرحله بعد به وسیله سیستم روتورژن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت سایبر مستر ریل تایم ساخت شرکت تاکارا کشور ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورد استفاده در دستگاه روتورژن در روش Real-time PCR در جدول شماره (۲) آورده شده است.

در انتها CT های مربوط به واکنش ها توسط نرم افزار سیستم Real-time PCR استخراج و ثبت گردید. بعد از اتمام واکنش Real-time PCR سیکل آستانه هر نمونه به صورت

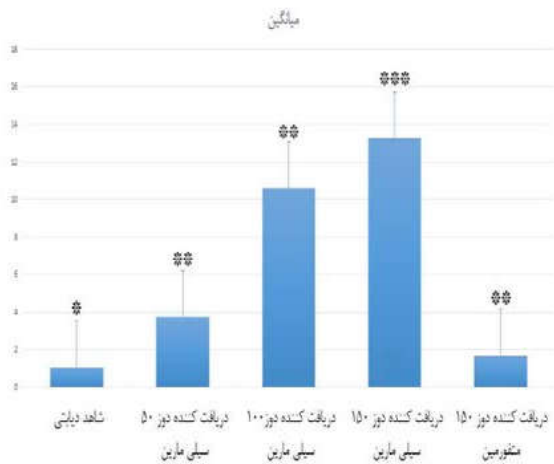


نمودار ۱. تغییرهای قند خون رت ها در تیمارهای مختلف درمانی با سبیلی مارین و متفورمین تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار به ترتیب ۰/۰۵ برای یک ستاره ۰/۰۱ برای دو ستاره و ۰/۰۰۱ برای سه ستاره.

در جدول (۴) میانگین و انحراف معیار بیان ژن مورد نظر گروه‌های تیمار نشان داده شده است. هم‌چنین بررسی گروه‌های تیمار حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف بین این گروه‌ها بود ( $P\text{-Value} < 0/05$ ) که در نمودار (۳) نشان داده شده است.

جدول ۴. نتایج بررسی میانگین و انحراف معیار بیان ژن در گروه‌های تیمار و شاهد

گروه	میانگین $\pm$ انحراف معیار
شاهد دیابتی	$1/0717 \pm 0/3997^a$
دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین	$3/7454 \pm 0/4332^b$
دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین	$10/5990 \pm 1/2704^c$
دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین	$13/2539 \pm 4/4959^b$
دریافت کننده دوز ۱۵۰ متفورمین	$1/6995 \pm 1/0916^b$



نمودار ۳. بررسی بیان ژن در گروه‌های تیمار که تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. ( $P\text{-Value} < 0/05$ )

### نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین

میانگین و انحراف معیار نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین در جدول (۵) آورده شده است. هم‌چنین نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که اختلاف بین این دو معنادار نیست ( $P\text{-Value} = 0/821$ ) که در نمودار (۴) نشان داده شده است.

لازمه ذکر است که تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد ( $P\text{-Value} < 0/05$ ).

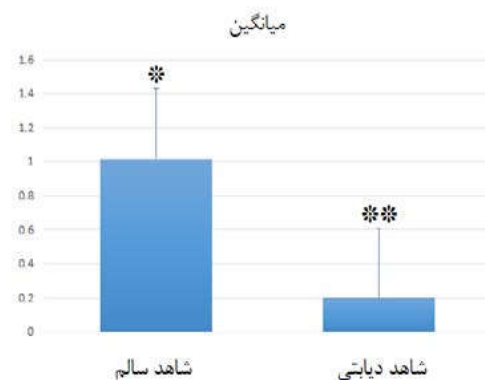
از سو دیگر نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن رفرنس ( $GAPDH2$ ) در همه نمونه‌ها یکسان بوده است و بیش‌ترین بیان ژن  $Hnf4a$  مربوط به گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین (G) و بعد از آن به گروه‌های سالم شاهد (A)، دریافت کننده دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین (D)، دریافت کننده دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین (E)، دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین (F)، دریافت کننده دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین (C) و شاهد دیابتی (B) بوده است.

نتایج گروه سالم شاهد و کنترل منفی (شاهد دیابتی) در جدول (۳) میانگین و انحراف معیار دو گروه سالم و شاهد دیابتی آورده شده است.

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار بیان ژن دو گروه سالم و شاهد دیابتی

گروه ها	میانگین $\pm$ انحراف معیار
شاهد سالم	$1/0175 \pm 0/1882^a$
شاهد دیابتی	$0/1977 \pm 0/096^b$

لازمه ذکر است که حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است ( $P\text{-Value} < 0/05$ ). بررسی دو گروه شاهد دیابتی و سالم از نظر بیان ژن نشان داد که اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار است. ( $P\text{-Value} = 0/049$ ) که در نمودار (۲) نشان داده شده است.



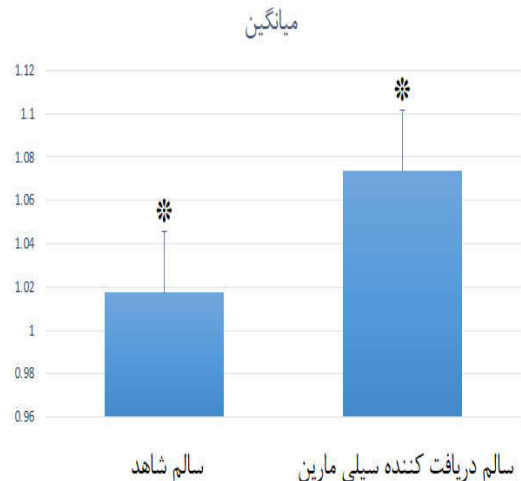
نمودار ۲. بررسی اختلاف دو گروه شاهد دیابتی و سالم که تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد.

### نتایج بررسی گروه‌های تیمار

جدول ۶. بررسی میانگین و انحراف معیار بین دو گروه مورد نظر از نظر

بیان ژن	
گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین
سالم شاهد	$1/0.176 \pm 0.2663^a$
سالم دریافت کننده سیلی- مارین	$1/0.235 \pm 0.1521^a$

حروف نامشابه نشان دهنده وجود گروه‌های معنی دار است.



نمودار ۴. بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین. اختلاف بین این دو معنادار نیست (P-Value=0/821)

## بحث

امروزه دیابت ملیتوس به عنوان یکی از شایع ترین بیماری‌های غیر واگیر در جهان در نظر گرفته می‌شود و علت اصلی ۵ درصد از تمام مرگ و میرها در جهان است. در سال‌های اخیر مطالعه‌های زیادی بر روی این گیاهان انجام شده است. به عنوان مثال Saravanan و همکاران در سال ۲۰۱۶ در طی پژوهشی اثر حفاظتی تیمول روی نفروپاتی دیابتی ناشی از رژیم غذایی پرچرب در موش را بررسی کردند. مطالعه‌های آن‌ها نشان داد که تیمول باعث کاهش محصول‌های پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین بهبود همئوستازی گلوکز می‌شود (۲۰). از سوی دیگر Al-Khalaf و همکاران در سال ۲۰۱۳ در طی پژوهشی اثر آویشن و تیمول بر آسم القا شده در موش سوری را بررسی کردند. هدف اصلی مطالعه آن‌ها بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و نیز اثر آنتی‌اکسیدانی آویشن و تیمول بود. آن‌ها دو آنزیم آنتی‌اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز و پارامترهای دیگر را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد موش‌های درمان شده با

آویشن و تیمول بهبود قابل توجهی در سطح تمام پارامترهای مورد مطالعه داشتند، در واقع آویشن و تیمول باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن و افزایش توانایی آن‌ها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد که در داخل بدن ایجاد می‌شود، می‌گردند (۲). تحقیقات نشان داده است که بیماری که دیابت نوع ۲ جهش در ژن *Hnf4a* هستند در ابتدا قند نرمال دارند ولی سپس به تدریج هیپرگلیسمی شروع می‌شود که علت آن نارسایی سلول‌های بتای پانکراس است، که در طول بیماری رو به افزایش می‌گذارد. Valenzuela و همکاران اظهار داشتند که سیلی مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۳). Soto و همکاران نیز اظهار داشتند که سیلی مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۲۲). به علاوه طی بررسی دیگری Soto و همکاران اظهار داشتند که سیلی مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود و افزایش گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استرپتوزوتوسین می‌شود (۲۱). نتایج این تحقیق نیز حاکی از آن بود که سیلی مارین دارای اثر ضد التهابی و همچنین در کاهش قند خون مؤثر است. بررسی *Hnf4a* در دوز ۱۵۰ در رت‌های دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که در این دوز باعث کاهش چشم‌گیری در بیان ژن *Hnf4a* می‌شود و به عنوان دوز مؤثر معرفی شد. در مطالعه‌ای Hirota اظهار داشتند که فعالیت *Hnf4a* به انتقال سیگنال انسولین از طریق مسیر انسولین foxo1 بستگی دارد (۹). در غیاب انسولین *Hnf4a* به همراه foxo1 به احتمال ژن گلوکز ۶ فسفاتاز و فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز را از طریق PGC-1 $\alpha$  فعال می‌کند که این وضعیت با فعال شدن گلوکونئوزنز همراه است اما در حضور انسولین foxo1 فسفریله شده و از هسته خارج می‌شود که در نتیجه آن از *Hnf4a* نیز جدا می‌شود که با جدا شدن آن، *Hnf4a* فعال می‌شود و ژن گلوکوکیناز را فعال و ژن‌های درگیر گلوکونئوزنز را مهار می‌کند (۱۹). نتایج ما نیز نشان داد که سیلی مارین در کاهش قند خون مؤثر است و بررسی *Hnf4a* در دوز ۱۵۰ در رت‌های دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که در این دوز باعث کاهش چشم‌گیری در بیان ژن *Hnf4a* می‌شود. به علاوه pioker و همکاران به بررسی جهش‌های واقع در ژن *Hnf4a* در بیماران کودک مبتلا به دیابت و در آمریکا پرداختند. آن‌ها

همچنین سن شروع دیابت ممکن است تحت تأثیر موقعیت جهش‌های وابسته به ایزوفرم‌های *Hnf-1α* باشد. و مشخص شده است افرادی که جهش‌های Missense آن‌ها در اگزون ۷ یا در اگزون‌های ۸ تا ۱۰ قرار گرفته است نسبت به افرادی که دارای جهش در اگزون‌های ۱ تا ۶ است ۱۰ سال دیرتر تشخیص داده می‌شود (۸).

## نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سیلی‌مارین دارای اثر ضد التهابی و همچنین در کاهش قند خون مؤثر است. بررسی *Hnf4a* در دوز ۱۵۰ در رت‌های دریافت کننده سیلی‌مارین نشان داد که در این دوز باعث کاهش چشم‌گیری در بیان ژن *Hnf4a* می‌شود و به-عنوان دوز مؤثر معرفی شد و می‌توان در تحقیقات آینده اهمیت بیش‌تری به اثرهای سیلی‌مارین داده شود.

## سپاسگزاری

این مقاله تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد 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. Abdelalim, E.M. & Emara, M.M. (2015). Advances and challenges in the differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic  $\beta$  cells. *World journal of stem cells*. 2015; 7 (1): 174181-.
2. Al-Khalaf, M.I. (2013). Thyme and thymol effects on induced bronchial asthma in mice. *Life Science Journal*. 2013; 10: 693-9.
3. American Diabetes, A. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012; 35 Suppl 1: S64-71.
4. Bahmani, M., Sarrafchi, A., Shirzad, H. & Rafieian-Kopaei, M. (2016). Autism: Pathophysiology and promising herbal remedies. *Current pharmaceutical design*. 2016; 22 (3): 277-85.
5. Bozovic, G., Pullerits, R., Ståhl, A., Ydström, K., Wenger, D., Marsal, J., et al. (2019). Exocrine pancreatic function is preserved in systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*. 2019; 21 (1): 52.
6. Donath, M. & Halban, P.A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*. 2004; 47 (3): 581-9.
7. García-Ramírez, M., Turch, M., Simó-Servat, O., Hernández, C. & Simó, R. (2018). Silymarin prevents diabetes-induced hyperpermeability in human retinal endothelial cells. *Endocrinologia, diabetes y nutricion*. 2018; 65 (4): 200-5.
8. Haliyur, R., Tong, X., Sanyoura, M., Shrestha, S., Lindner, J., Saunders, D.C., et al. (2018). Human islets expressing HNF1A variant have defective  $\beta$  cell transcriptional regulatory networks. *The J. clinical investigation*. 2018; 129 (1).
9. Hirota, K., Sakamaki, J.-i., Ishida, J., Shimamoto, Y., Nishihara, S., Kodama, N., et al. (2008). A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (47): 32432-41.
10. Hosseinpour Feizi, M., Saed, S., Babaei, E., Montazeri, V. & Halimi, M. (2012). Evaluation of Nucleostemin Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors. *J. Kerman University of Medical Sciences*. 2012; 19 (2).
11. Hu He, K.H., Lorenzo, P., Brun, T., Jimenez Moreno, C., Aeberhard, D., Vallejo Ortega, J., et al. (2011). In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet beta-cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. *Diabetes*. 2011; 60 (6): 1705-15.
12. Huerta-Saenz, L., Saunders, C. & Yan, Y. (2018). Challenging diagnosis of congenital hyperinsulinism in two infants of diabetic mothers with rare pathogenic *KCNJ11* and *HNF4A* gene variants. *International J. pediatric endocrinology*. 2018; 2018 (1): 5.
13. Keymeulen, B., Walter, M., Mathieu, C., Kaufman, L., Gorus, F., Hilbrands, R., et al. (2010). Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia*. 2010; 53 (4): 614-23.
14. Koh, W., Sheng, C.T., Tan, B., Lee, Q.Y., Kuznetsov, V., Kiang, L.S., et al. (2010). Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. *BMC genomics*. 2010; 11 (1): S6.
15. Locke, J.M., Saint-Martin, C., Laver, T.W., Patel, K.A., Wood, A.R., Sharp, S.A., et al. (2018). The Common HNF1A Variant I27L is a Modifier of Age at Diabetes Diagnosis in HNF1A-MODY Individuals. *Diabetes*. 2018: db180133.
16. Mellado-Gil, J.M., Cobo-Vuilleumier, N. & Gauthier, B.R. (2012). Islet J.transplantation. 2012; 2012.

17. Pihoker, C., Gilliam, L.K., Ellard, S., Dabelea, D., Davis, C., Dolan, L.M., et al. (2013). Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *The J. Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013; 98 (10): 4055-62.
18. Rahimi, R., Karimi, J., Khodadadi, I., Tayebinia, H., Kheiripour, N., Hashemnia, M., et al. (2018). 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; 101: 244-50.
19. Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J.C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F.J., et al. (2003). Regulation of hepatic fasting response by PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100 (7): 4012-7.
20. Saravanan, S. & Pari, L. (2016). Protective effect of thymol on high fat diet induced diabetic nephropathy in C57BL/6J mice. *Chemico-biological interactions*. 2016; 245: 1-11.
21. Soto, C., Recoba, R., Barron, H., Alvarez, C. & Favari, L. (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003; 136 (3): 205-12.
22. Soto, C.P., Perez, B.L., Favari, L.P. & Reyes, J.L. (1998). Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1998; 119 (2): 125-9.
23. Valenzuela, A. & Garrido, A. (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*. 1994; 27: 105-.
24. van der Meulen, T. & Huising, M.O. (2015). Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol*. 2015; 54 (2): R103-17.
25. Wang, X., Wang, T., Yu, M., Zhang, H., Ping, F., Zhang, Q., et al. (2019). Screening of HNF1A and HNF4A mutation and clinical phenotype analysis in a large cohort of Chinese patients with maturity-onset diabetes of the young. *Acta diabetologica*. 2019; 56 (3): 281-8.