

تأثیر سیلی مارین بر بیان ژن Mafa و ارتباط آن با میزان انسولین خون در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

سیده زهرا بنی‌هاشمی^۱، نوشا ضیاء جهرمی^{۱*}، حسین سازگار^۱

(۱) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۱

چکیده

مقدمه: در درمان انواع بیماری های قلبی و عروقی، دیابت، چربی خون، بیماری های کبدی، هپاتیت حاد و ویروسی و بیماری های کیسه صفرا موثر است و هم چنین دارای خواص احیاکننده در چند اختلال کبدی، اثرات ضد دیابتی، ضد التهابی و آنتی اکسیدان می باشد. با توجه به این موضوع این مطالعه با هدف تأثیر سیلی مارین بر بیان ژن Mafa و ارتباط آن با میزان انسولین خون در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۴۲ رت به صورت تصادفی انتخاب شدند، سپس به ۷ گروه ۶ تایی تقسیم شدند و برای دیابتی کردن رت ها از ماده دیابت زا استرپتوزوتوسین استفاده شد. سپس بعد از ۱ ماه هر گروه از رت ها بعد از خونگیری از قلب برای اندازه گیری میزان انسولین، کشته شدند و بافت پانکراس آن ها جهت اندازه گیری بیان ژن Mafa با استفاده از Realtime PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: ماده موثره سیلی مارین باعث افزایش بیان ژن Mafa می شود که در دوزهای مختلف میزان بیان ژن متفاوت است. که این افزایش بیان ژن وابسته به دوز نبود و در گروه های دریافت کننده دوز پایین میزان بیان کمتر ($P=0.018$) و در گروه های دریافت کننده دوز بالا میزان بیان بیشتر است ($P=0.003$). هم چنین میزان انسولین را افزایش داده است.

بحث و نتیجه گیری: ماده موثره سیلی مارین باعث افزایش بیان ژن Mafa و در نتیجه افزایش سطح ترشح انسولین توسط سلول های بتا پانکراس می شود.

واژه های کلیدی: سیلی مارین، ژن Mafa، دیابت، پانکراس، استرپتوزوتوسین

* نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email: n.zia@iaushk.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

دیابت نوع اول یک بیماری اتوایمیون است که شیوع برابر ۳ درصد را در جمعیت آمریکا داشته و در سایر کشورها نیز رو به افزایش می باشد (۱). اتوانتی بادی های متعددی در پاتوژنز این بیماری نقش دارند (۲). برخی مطالعات نشان داده اند که با مداخلات ایمنی شاید بتوان مانع پیشرفت دیابت نوع یک شد (۳). اگر چه علت دقیق بیماری مشخص نیست، شواهدی دال بر تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی در القای خود ایمنی وجود دارد (۴). از علائم دیابت، بیماری های میکروواسکولار (رتینوپاتی، نوروپاتی، نفروپاتی) و بیماری های ماکروواسکولار (حمله قلبی، سکته قلبی، بیماری های عروق محیطی) است که باعث تعداد مرگ و میر قابل توجهی شده است (۵). بنا بر گزارش سازمان جهانی بهداشت شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشم گیری داشته است و تخمین زده اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۴۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۵۶). تاکنون ژن های متعددی اهمیت آن ها در پاتوژنز بیماری دیابت مورد بررسی قرار گرفته است. بسیاری از ژن های مرتبط با دیابت درگیر عملکرد سلول های بتا هستند (۷). فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول های بتا در پانکراس اثر می گذارند، از جمله این فاکتورها عبارتند از: Pax-4, Pdx-1, Fgf10, Mafa که در این میان به اهمیت فاکتور Mafa در پانکراس تاکید شده و در تحقیقات بسیار زیاد در بین جوامع مختلف نقش آن به اثبات رسیده است (۸). Mafa یک عضو از پروتئین های خانواده MAF می باشد. اعضای خانواده MAF به دو گروه بسته به اندازه مولکولی آن ها یعنی پروتئین بزرگ Maf و پروتئین کوچک (Maf) تقسیم شده است (۹). Mafa یک فاکتور رونویسی است که متصل به پروموتور ژن انسولین می باشد و برای تنظیم رونویسی انسولین در پاسخ به سطوح گلوکز سرم ضروری است. Mafa کلید تنظیم ترشح انسولین از تحریک گلوکز در بدن است (۱۰، ۱۱). ژن Mafa بر روی کروموزوم شماره ۱۵ قرار دارد (۱۲). Mafa از طریق سیگنالینگ پرولاکتین باعث تنظیم تکثیر سلول های بتا بعد از تولد می شود (۱۳). القای بیان ژن Mafa در سلول های بتا نابالغ و یا ناکارآمد و

هم چنین سلول های بنیادی تولید کننده انسولین باعث تولید سلول های بتا بالغ و هم چنین بهبود دیابت می شود (۱۴، ۱۰). قبل از کشف انسولین و هم چنین داروهای ضد دیابت رایج، بیماران دیابتی با گیاهان دارویی و درمان های سنتی معالجه می شدند. تاکنون تاثیر مثبت بیش از ۱۲۰۰ گیاه دارویی در کاهش میزان قندخون و یا کاهش عوارض ناشی از آن شناخته شده است (۱۵). فلاونوئیدها، گروهی از ترکیبات فعال زیستی با منشاء گیاهی هستند که خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد سرطانی و ضد دیابتی آن ها به اثبات رسیده است. از دسته گیاهان دارویی گیاه خارمریم است. ترکیبات موثر این گیاه گروهی از فلاونولیکتان ها هستند. سیلی بین یک جزء با بیشترین درجه فعالیت بیولوژیکی است و ۷۰-۵۰ درصد از سیلی مارین را می سازد. سیلی مارین در کل گیاه یافت می شود اما در میوه ها و دانه ها متمرکز شده است. این گیاه در درمان انواع بیماری های قلبی و عروقی، دیابت، چربی خون، بیماری های کبدی، هیپاتیت حاد و ویروسی و بیماری های کیسه صفرا موثر است و هم چنین دارای خواص احیاکننده در چند اختلال کبدی، اثرات ضد دیابتی، ضد التهابی و آنتی اکسیدان می باشد (۱۶). نتایج نشان می دهد که ممکن است سیلی مارین کاهش سلول های بتا پانکراس مشاهده شده در دیابت را بهبود بخشد و هم چنین درمان با سیلی مارین به طور قابل توجهی باعث افزایش تولید بیان انسولین می شود (۱۷). استرپتوزوتوسین به وسیله ناقل گلوکز یا همان ترانسپورتر گلوکز وارد سلول بتا پانکراسی می شود. این ماده در داخل سلول باعث آلکیلاسیون DNA می گردد. آسیب DNA به واسطه متیلاسیون القایی توسط استرپتوزوتوسین، باعث فعال سازی فرآیند ترمیمی پلی ADP ریبوزیلاسیون می شود که در عمل دیابت زایی استرپتوزوتوسین نقش مهمی را ایفا می کند (۱۸).

با توجه به شیوع دیابت و تخریب سلول های بتا پانکراس (سلول های ترشح کننده انسولین) در دیابت نوع یک و استقبال بیماران دیابتی از درمان های سنتی دیابت با استفاده از گیاهان یا عصاره های گیاهی لازم دانسته ایم که به بررسی اثر سیلی مارین بر بیان ژن

رت ها با کلروفرم بیهوش شدند و خونگیری از قلب انجام شد.

دیابتی کردن رت ها و بررسی میزان قندخون: برای دیابتی کردن رت ها از ماده دیابت زا استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد که با استفاده از تحقیقات صورت گرفته در پژوهش های گذشته است (۱۹). برای دیابتی کردن رت ها بعد از ۱۲ تا ۲۴ ساعت پرهیز از غذا به ۳۰ سر رت به صورت درون صفاقی STZ تزریق شد و به ۱۲ سر رت باقی مانده استرپتوزوتوسین تزریق نکردیم چون گروه های کنترل را شامل می شدند و برای اثبات شدن دیابتی بودن رت ها، بعد از ۷۲ ساعت از زمان تزریق در صورت القای دیابت در حیوان بایست قندخون در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر باشد که در این مرحله ضمن خونگیری از ناحیه دم رت ها با استفاده از نوار گلوکویاب و دستگاه اندازه گیری قندخون، میزان قندخون بیش از ۲۰۰ mg/dl، دیابتی در نظر گرفته شدند.

مرحله گاوژ ماده موثره و متفورمین: پس از القای دیابت در گروه های مورد آزمایش، در این مطالعه مقدره ماده موثره نیز به ازای میانگین وزن هر گروه از رت ها با ترازوی دیجیتال حساس وزن شد و در دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) هر سه روز یک بار در پروسه زمانی ۳۵ روز با استفاده از سرنگ گاوژ به سه گروه از رت های دیابتی گاوژ داده شد و هم چنین گروه سالم غیر دیابتی، دریافت کننده سیلی مارین به صورت گاوژ بودند که این گروه به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. جهت اندازه گیری تغییرات قندی در رت ها قبل و بعد از تزریق استرپتوزوتوسین و هم چنین در طول مطالعه هر هفته یک بار در شرایط ناشتا (۱۲ ساعت، آب، غذا، دارو و ماده سیلی مارین استفاده نشد) و با استفاده از لانست، پس از ضد عفونی کردن از ناحیه دم رت ها یک قطره خون بر روی استریپ گلوکومتر منتقل و مقدار قندخون قرائت و ثبت شد هم چنین وزن آن ها نیز هر هفته اندازه گیری شد.

Mafa و ارتباط آن با میزان انسولین خون در رت های مبتلا به دیابت نوع یک ناشی از استرپتوزوتوسین پیردازیم.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه و گروه بندی: در تحقیق تجربی حاضر جمعیت مورد مطالعه ۴۲ سر از موش های ویستار نر بالغ ۶ هفته ای با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم بودند که از مرکز تکثیر و نگهداری خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران به صورت تصادفی انتخاب شدند. سپس این حیوانات مورد مطالعه به گروه های ۶ تایی تقسیم و درون قفس های مخصوص، نگهداری شدند و در دمای استاندارد ۲۲ درجه سانتی گراد و دسترسی کافی به آب و غذا در حیوان خانه دانشگاه آزاد شهرکرد قرار داشتند.

گروه های مورد آزمایش: گروه A: گروه شاهد سالم را تشکیل می دادند. گروه B: هر سه روز یک بار طی یک ماه (ده بار تزریق) و هر نوبت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می کردند که گروه شاهد دریافت کننده سیلی مارین را شامل می شدند. گروه C: کنترل منفی (شاهد دیابتی) را تشکیل می دادند. گروه D: داروی کاهنده قندخون (متفورمین) هر سه روز یک بار طی یک ماه (ده بار تزریق) و هر نوبت به مقدار ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می کردند. گروه E: هر سه روز یک بار طی یک ماه (ده بار تزریق) و هر نوبت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می کردند. گروه F: رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که هر سه روز یک بار طی یک ماه (ده بار تزریق) و هر نوبت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می کردند. گروه G: رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بودند که هر سه روز یک بار طی یک ماه (ده بار تزریق) و هر نوبت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می کردند. لازم به ذکر است که این گروه بندی ها بر اساس تحقیقات گذشته انجام گرفته است. در پایان مطالعه پس از ۳۰ روز نگهداری

طراحی پرایمرهای مورد استفاده: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه توسط شرکت کیاژن بر اساس توالی ژن Mafa و ژن GAPDH طراحی شدند که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از بافت پانکراس مطابق پروتکل استاندارد شرکت های سازنده انجام شد و در نهایت مقدار و خلوص RNA بررسی شد. سپس برای ساخت cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا استفاده شد.

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

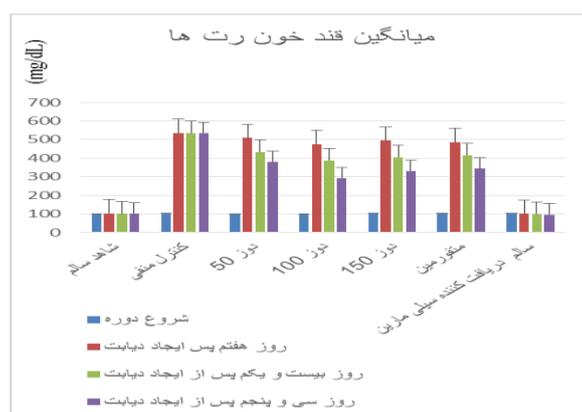
نام ژن	توالی پرایمر (۵'-۳')	طول محصول (bp)
GAPDH	Forward-TGGTGAAGGT CGGTGTGAACGGAT	۳۱۰
	Reverse-TCCATGGTGG TGAAGACGCCAGTA	
Mafa	Forward-CTTCAGCAAG GAGGAGGTCATC	۷۲
	Reverse-GCGTAG CCGCGGTTCTT	

استفاده از کیت انسولین بررسی گردید. تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده در این مطالعه برای مقایسه میزان بیان ژن و محاسبه تغییرات بیان میانگین بین گروه های سالم، تیمار، دیابتی و کنترل از طریق نرم افزار SPSS vol.22 و آزمون های آنالیز واریانس استفاده شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهشی

تغییرات قندخون در گروه های تحت درمان (سیلی مارین و متفورمین)، گروه کنترل منفی (دیابتی) و گروه شاهد (سالم) در طول دوره تیمار به صورت کامل در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تغییرات قندخون مربوط به هفت گروه ذکر شده به صورت میانگین به دست آورده شد. میزان قندخون با تزریق استرپتوزوتوسین به شدت افزایش یافت. اما پس از آن با دریافت سیلی مارین در طول مدت درمان همان طور که مشاهده می شود میزان قندخون در هر گروه با توجه به میزان دوز دریافتی سیلی مارین تغییر یافت (نمودار شماره ۱).

بررسی بیان ژن: برای بررسی بیان ژن Mafa به صورت کمی با استفاده از SYBR Green و تکنیک Real Time RT PCR توسط دستگاه Rotor-Gene انجام گردید و برنامه Real Time RT PCR جهت بررسی بیان ژن mafa شامل ۴۰ سیکل بود که مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۴ دقیقه بود و دمای واسرشت در دمای ۹۴ و ۲۰ ثانیه بود. لازم به ذکر است که دمای اتصال و گسترش به ترتیب برابر با ۵۸ و ۷۲ درجه سانتی گراد بود که مدت زمان آن ها ۲۰ ثانیه بود. در این واکنش از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. بعد از اتمام واکنش Real Time RT PCR سیکل آستانه هر نمونه به صورت جداگانه به دست آمده شد. که با مقایسه سیکل آستانه ژن مورد نظر با ژن مرجع (Housekeeping)، می توان میزان بیان ژن مورد نظر را به صورت کمی از فرمول $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta act}$ به دست آورد و میزان بیان ژن Mafa را در هفت گروه مختلف به دست آوردیم. لازم به ذکر است بررسی میزان انسولین تحت تاثیر ماده موثره سیلی مارین از طریق دستگاه الایزا و با

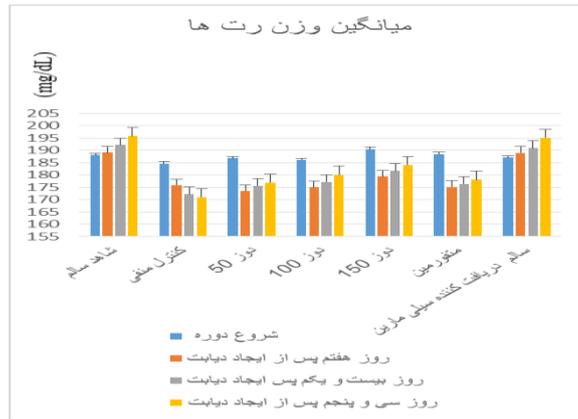


نمودار شماره ۱. نمودار تغییرات قندخون در گروه های تحت درمان و کنترل که واحد محور Y بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر می باشد.

مقدار زیادی از گلوکز، وزن بیمار پیوسته کاهش می یابد. به علت کمبود انسولین مقدار زیادی از چربی های بدن و پروتئین ها تخریب می شود تا در کبد صرف ساخته شدن قند شود. این قندهای اضافی در ادرار دفع خواهد شد. در ابتدا اشتها افزایش می یابد و فرد با پرخوری جبران از دست دادن مایعات و گلوکز را می کند. ولی با پیشرفت بیماری میزان از دست دادن بسیار بیشتر از میزان خوردن می شود و در نتیجه وزن پیوسته کاهش می یابد. در موارد دیابت پیشرفته و درمان نشده انباشت مواد کتونی و افزایش اسمولالیتی خون باعث بی اشتها و حتی تهوع و استفراغ می شود که به کاهش وزن بیشتری می انجامد. وزن رت ها طی چند مرحله یعنی قبل از ایجاد دیابت و پس از ایجاد دیابت و در روزهای ۳، ۱۴، ۲۸ و ۳۵ روز پس از تحت تیمار قرار گرفتن رت ها با دارو اندازه گیری شد. نتایج نشان دهنده این بود که وزن در تمامی گروه ها پس از تزریق استرپتوزوتوسین نسبت به قبل از دیابتی شدن افت بسیاری داشت. اما با شروع دوره تیمار و دریافت داروی سیلی مارین و متفورمین وزن در هر یک از گروه ها با توجه به داروی دریافتی و میزان دوز دریافتی تغییر و افزایش پیدا کرد. تغییرات وزن رت در گروه های تحت درمان (سیلی مارین و متفورمین)، گروه کنترل منفی (دیابتی) و گروه شاهد (سالم) در طول دوره تیمار به صورت ستونی در نمودار شماره ۲ نشان داده شد.

در نمودار شماره ۱ میانگین میزان قندخون رت ها در هفت گروه ذکر شده در پنج نوبت اندازه گیری شد، در گروه دیابتی (کنترل منفی) قندخون به میزان زیادی افزایش یافت، که اختلاف معنی دار و چشم گیری با گروه های سالم و بیمار تحت تیمار با سیلی مارین دارد. بین گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین با گروه شاهد (سالم) اختلاف معنی دار و چشم گیری مشاهده نمی شود. در گروه های دیابتی دریافت کننده دوزهای مختلف سیلی مارین (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰) میلی گرم بر کیلوگرم موثرترین دوز، دوز دریافت کننده ۱۰۰ می باشد. بین گروه های دریافت کننده دوز ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده متفورمین اختلاف معنادار و چشم گیری دیده می شود از این رو می توان از سیلی مارین به عنوان دارو برای درمان دیابت نوع یک استفاده کرد چون حتی در گروه سالم هم قندخون را کمی کاهش داده و باعث افزایش متابولیسم بدن رت ها شده است.

تغییرات وزن در گروه های سالم، تحت درمان و دیابتی: زمانی که قندخون به ۱۸۰ میلی گرم و یا بیشتر برسد به صورت پر ادراری تظاهر می کند. دفع قند (گلوکز) در ادرار باعث از دست دادن مقدار زیادی آب و املاح می شود. و در نتیجه حس تشنگی در فرد تحریک می شود و بیمار از دست دادن آب بدن را با خوردن مقدار زیادی آب جبران می کند. به علت از دست رفتن مقدار زیادی از آب بدن و هم چنین دفع

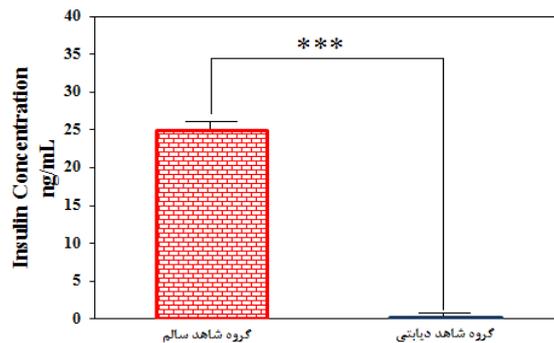


نمودار شماره ۲. تغییرات وزن در گروه های تحت درمان و کنترل که واحد محور Y بر حسب گرم می باشد.

گروه کنترل منفی دارای اختلاف معنادار و چشم گیری می باشد، و بین گروه سالم و گروه دریافت کننده سیلی مارین تغییر معناداری مشاهده نشد.

غلظت انسولین خون در رت های سالم و دیابتی: در دیابت نوع یک، بدن به هیچ وجه انسولین تولید نمی کند. به همین دلیل، نوع یک بیماری دیابت؛ یک بیماری خود ایمنی است، به نحوی که به سیستم ایمنی بدن حمله می کند و سلول های سازنده انسولین در پانکراس را از بین می برد. که در این جا ما به بررسی میزان غلظت انسولین در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی به عنوان کنترل منفی پرداخته ایم.

در نمودار شماره ۲ تغییرات وزن مربوط به رت ها در پنج مرحله اندازه گیری شد. نتایج نشان دهنده آن بود که وزن تمامی گروه ها پس از القای دیابت به شدت افت پیدا کرد. اما در گروه های تحت درمان با دریافت داروی سیلی مارین و هم چنین متفورمین وزن به صورت تدریجی و با نزدیک شدن به پایان دوره تیمار کم کم افزایش پیدا کرد، به خصوص در گروه های دریافت کننده داروی سیلی مارین در دوزهای (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰) افزایش وزن بیشتر بود. اما وزن رت در گروه کنترل منفی (دیابتی) پس از ایجاد دیابت نه تنها ثابت نمانده بلکه همواره کاهش یافته است، که میزان وزن رت بین گروه های تحت درمان و



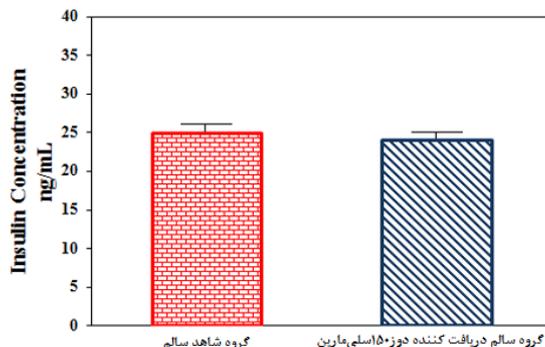
نمودار شماره ۳. مقایسه غلظت انسولین در موش های سالم و دیابتی

انسولین در گروه شاهد دیابتی و گروه شاهد سالم دارای اختلاف معنادار چشم گیری بوده است. غلظت انسولین خون در رت های سالم و رت های سالم دریافت کننده سیلی مارین: در گروه های که

همان طور که در نمودار شماره ۳ دیده می شود نتایج گویای آن است که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان غلظت انسولین در رت های دیابتی به صورت معناداری کاهش یافته است ($P > 0.001$). یعنی غلظت

نمودار شماره ۴ غلظت انسولین خون در دو گروه رت های شاهد سالم و سالم دریافت کننده سیلی مارین نشان داده شده است.

مبتلا به دیابت نیستند، فعالیت و عملکرد سلول های بتای پانکراس باعث تولید هورمون انسولین می شود و هم چنین قند در محدوده نرمال قرار می گیرد. در

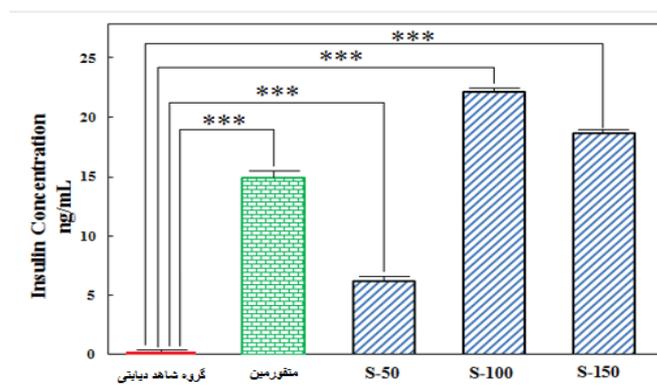


نمودار شماره ۴. مقایسه غلظت انسولین در رت های شاهد سالم و سالم دریافت کننده سیلی مارین

متفورمین، از طریق اثر بر روی سلول های بتای پانکراس و ترمیم و بازسازی آن ها میزان انسولین در آن ها افزایش یافت. میزان انسولین در همه گروه های دیابتی دریافت کننده داروی سیلی مارین و متفورمین با توجه به دوز دریافتی، در هر کدام به نحوی تغییر یافته و دارای اثر مثبت بوده اند. اما در گروه دیابتی که هیچ گونه دارویی دریافت نمی کردند تولید انسولین اصلاً وجود نداشته است. بررسی میزان انسولین در رت های شاهد دیابتی و دریافت کننده سیلی مارین و متفورمین به صورت ستونی در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است.

بررسی میزان غلظت انسولین در گروه شاهد سالم و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که در سطح آماری میزان غلظت انسولین در رت های گروه شاهد سالم و گروه دریافت کننده سیلی مارین دارای اختلاف معناداری نمی باشد ($P=0.102$).

بررسی میزان انسولین در رت های شاهد دیابتی و دریافت کننده سیلی مارین و متفورمین: در گروه شاهد دیابتی که هیچ گونه دارویی دریافت نمی کردند به هیچ وجه تولید انسولین وجود نداشت، چون سلول های بتای پانکراس که مسئول ساخت انسولین بودند کاملاً تخریب شدند و توانایی تولید انسولین را نداشتند، اما در گروه های دیابتی تحت درمان داروی سیلی مارین و



نمودار شماره ۵. مقایسه میزان انسولین در موش های شاهد دیابتی و دریافت کننده سیلی مارین و متفورمین

انسولین افزایش یافته است که دارای اختلاف معنادار و چشم گیری با گروه شاهد دیابتی می باشد. بررسی کیفی *cDNA* سنتز شده: برای بررسی کیفی *cDNA* سنتز شده از پرایمرهای پیشرو و پسرو ژن رفرنس به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید و بعد از اتمام PCR محصولات روی ژل مخصوص الکتروفورز برده شدند (شکل شماره ۱).

در سه گروه دیابتی دریافت کننده دوزهای مختلف سیلی مارین (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰) میزان انسولین افزایش یافته است و نسبت به گروه شاهد دیابتی دارای اختلاف معنادار و چشم گیری می باشند. اما بین سه دوز دریافتی سیلی مارین، دوز ۱۰۰ سیلی مارین دارای بیشترین اثر و دوز موثر در افزایش انسولین بوده است پس افزایش انسولین در این سه گروه وابسته به دوز نبوده است. در گروه های دیابتی دریافت کننده داروی متفورمین نیز



شکل شماره ۱. بررسی کیفی میزان *cDNA* سنتز شده با ژن *GAPDH* (چاهک شمار ۱: کنترل منفی PCR، چاهک شماره ۲: گروه شاهد) سالم). چاهک شماره ۳: شاهد دیابتی. چاهک شماره ۴: گروه دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین. چاهک شماره ۵: گروه بیمار دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین، چاهک شماره ۶: *DNA Ladder bp50-1500*. چاهک شماره ۷: گروه بیمار دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین. چاهک شماره ۸: گروه بیمار دریافت کننده دوز ۱۵۰ متفورمین. چاهک شماره ۹: گروه رت های سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین.



شکل شماره ۲. بررسی کیفی بیان ژن *Mafa* روی ژل. چاهک ۱: *DNA Ladder bp50-1500*. چاهک ۲: گروه سالم دریافتی سیلی مارین. چاهک ۳: گروه دیابتی. چاهک ۴: گروه دوز دریافتی ۱۰۰ سیلی مارین. چاهک ۵: گروه دوز دریافتی ۱۵۰ سیلی مارین. چاهک ۶: گروه دوز دریافتی ۵۰ سیلی مارین. چاهک ۷: گروه دریافتی دوز ۱۵۰ داروی متفورمین. چاهک ۸: گروه شاهد سالم. چاهک ۹: کنترل منفی PCR

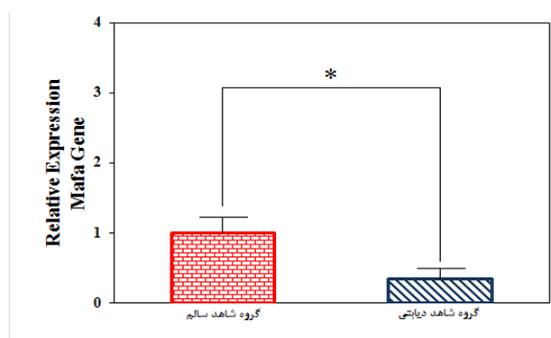
بیان ژن در گروه های تحت درمان و سالم و دیابتی می باشد، که از سمت چپ به ترتیب بیشترین بیان ژن مربوط به گروه سالم بوده است، بعد از آن گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین قرار دارد که میزان بیان ژن این دو گروه با هم اختلاف معناداری ندارد. سومین منحنی مربوط به گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین است، چهارمین منحنی مربوط به گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین،

میزان بیان ژن *Mafa* نیز به صورت کیفی روی ژل با دستگاه الکتروفورز بررسی گردید (شکل شماره ۲). مقایسه میزان بیان ژن *Mafa* به منظور تعیین کارایی در واکنش Real Time RT PCR پنج سری رقت با دو تکرار از مخلوط *cDNA* تهیه شد و بهترین رقت با توجه به منحنی ها و سیکل آستانه انتخاب شد و به صورت نمودار درآورده شد. در شکل شماره ۲ هفت منحنی دوبار تکرار وجود دارد که نشان دهنده میزان

تخریب شدند. لازم به ذکر است از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

میزان بیان ژن *Mafa* در رت های سالم و دیابتی: بررسی بیان ژن *Mafa* در گروه های تحت درمان، گروه سالم و گروه کنترل با استفاده از نرم افزار SPSS vol.22 انجام شد و از جایی که داده ها نرمال شده، از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. در نمودار شماره ۶ میزان بیان ژن *Mafa* در دو گروه رت های سالم و شاهد دیابتی نشان داده شده است.

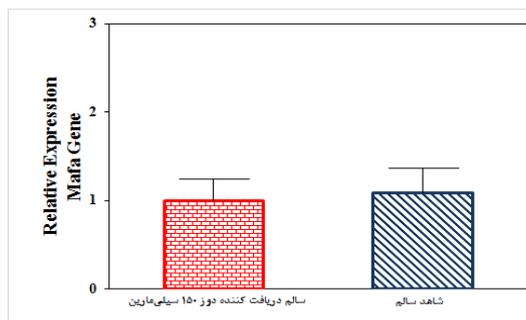
منحنی پنجم برای گروه دیابتی تحت درمان با داروی متفورمین و ششمین منحنی برای گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین می باشد. بین سه دوز دریافت کننده سیلی مارین دوز موثر دوز ۱۰۰ سیلی مارین بوده است چون بیشترین بیان را نسبت به دو دوز دیگر دارد. بیان ژن گروه دریافت کننده داروی متفورمین از کمترین دوز سیلی مارین کمی بیشتر بوده ولی اختلاف معنادار و چشم گیری نداشتند، و آخرین نمودار مربوط به گروه دیابتی (کنترل منفی) می باشد که کمترین بیان را داشته چون سلول های بتای پانکراس



نمودار شماره ۶. بیان نسبی ژن *Mafa* در رت های سالم و دیابتی

شاهد سالم دریافت کننده سیلی مارین: گروه سالم تیمار دوز ۱۵۰ سیلی مارین را دریافت می کردند و دیابتی نشده بودند که با گروه سالم از لحاظ میزان بیان مورد مقایسه قرار دادیم. هر دو گروه در شرایط یکسان نگهداری شدند و آب و غذا به میزان کافی دریافت می کردند. در نمودار شماره ۷ بیان ژن *Mafa* در دو گروه رت های شاهد سالم و شاهد دریافت کننده سیلی مارین نشان داده شده است.

بررسی میزان بیان ژن *Mafa* در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی به عنوان کنترل منفی نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن *Mafa* در رت های دیابتی نسبت به رت های سالم به صورت معنا داری کاهش یافته است ($P=0.031$). در گروه شاهد دیابتی به دلیل تخریب کامل سلول های بتای پانکراس بیان ژن *Mafa* به شدت کاهش یافته است. بررسی بیان ژن *Mafa* در رت های سالم و گروه



نمودار شماره ۷. بیان نسبی ژن *Mafa* در رت های سالم و شاهد دریافت کننده سیلی مارین

بیان ژن Mafa در رت های تحت درمان و دیابتی: بررسی میزان بیان ژن Mafa در گروه شاهد دیابتی (کنترل منفی) و رت های دیابتی دریافت کننده دوزهای مختلف سیلی مارین (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰) و رت های دیابتی دریافت کننده داروی متفورمین در جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۸ نشان داده شده است.

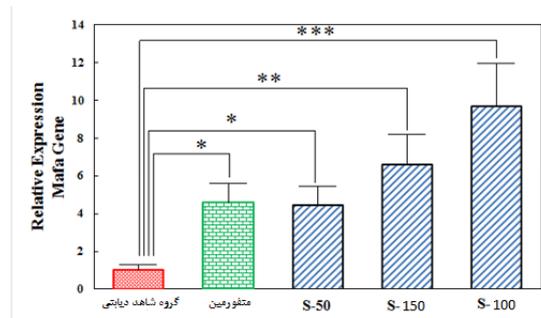
بررسی میزان بیان ژن Mafa در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که میزان بیان ژن Mafa در رت های شاهد سالم و شاهد دریافت کننده سیلی مارین دارای اختلاف چشم گیر و معناداری نمی باشد (P=0.917). در هر دو گروه میزان بیان ژن Mafa بالا قرار داشت.

جدول شماره ۲. بررسی میزان بیان ژن Mafa

نمونه	بیان ژنی Mafa	انحراف استاندارد	P
شاهد دیابتی	۱/۰۰	۰/۳۴۲	رفرنس
متفورمین	۴/۵۷۹	۱/۰۰۳	۰/۰۱۲
سیلی مارین ۵۰ میلی گرم	۴/۴۵۲	۰/۹۸۵	۰/۰۱۸
سیلی مارین ۱۰۰ گرم	۹/۶۷۸	۲/۲۷۲	<۰/۰۰۱
سیلی مارین ۱۵۰ میلی گرم	۶/۵۸۱	۱/۶۲۰	۰/۰۰۳

کمتر از ۰/۵ باشد یعنی بین گروه ها اختلاف معناداری وجود دارد اما اگر P بیشتر از ۰/۵ باشد یعنی اختلاف معناداری بین آن ها وجود ندارد. میزان بیان ژن به صورت ستونی نیز در نمودار زیر آورده شده است.

در گروه شاهد دیابتی میزان بیان ژن به شدت پایین بوده است. در این جا گروه دیابتی به عنوان رفرنس سایر گروه ها می باشد و برحسب این گروه P سایر گروه ها به دست آورده شد. طبق تعریف اگر P



نمودار شماره ۸. ستونی بیان نسبی ژن Mafa

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه بیان ژن Mafa تحت تاثیر سیلی مارین در ۷ گروه مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که بیان ژن در گروه دیابتی (کنترل منفی) که هیچ دارویی دریافت نمی کردند کاهش چشم گیری داشت، در گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین (کنترل مثبت) افزایش چشم گیری داشت. در گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیان ژن Mafa نسبت به گروه کنترل منفی

طبق جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۸ کمترین میزان بیان مربوط به گروه دیابتی می باشد. بیشترین میزان بیان بین گروه های دریافت کننده دوزهای مختلف سیلی مارین مربوط به دوز ۱۰۰ می باشد، و کمترین مربوط به دوز دریافتی ۵۰ می باشد و می توان نتیجه گرفت افزایش بیان ژن وابسته به دوز نبوده است. بین گروه دیابتی دریافتی سیلی مارین و داروی متفورمین با گروه دیابتی شاهد اختلاف معنادار و چشم گیری وجود دارد.

بیشتر بود. بعد از آن در گروه دیابتی دریافت کننده متفورمین میزان بیان ژن از گروه دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین بیشتر بود و سپس در گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به میزان ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیان ژن بالاتر از گروه های قبلی بود و در گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش چشم گیری در بیان ژن Mafa مشاهده شد و از سه دوز قبلی بیشترین بیان را داشت، سپس گروه سالم شاهد را داشتیم و در راس همه گروه های قبلی گروه سالم شاهد بود که میزان بیان با گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین اختلاف معناداری نداشت. هم چنین ارتباط سیلی مارین بر میزان انسولین خون در رت های دیابتی به این گونه بود که گروه کنترل منفی هیچ گونه تولید انسولینی نداشت به خاطر تخریب کامل سلول های بتای تولیدکننده انسولین، و بیشترین انسولین را در بین گروه ها، گروه سالم شاهد داشت که میزان انسولین گروه سالم شاهد تیمار خیلی نزدیک به آن بود و اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد. اما در سایر گروه ها در گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم انسولین به میزان خیلی کمی افزایش داشت، بعد از آن گروه دریافت کننده متفورمین قرار دارد که با گروه دریافت کننده دوز ۵۰ اختلاف معناداری ندارند. سپس گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به میزان ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم که میزان انسولین با گروه دیابتی یا همان کنترل منفی اختلاف معناداری دارد. در آخر گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش چشم گیری در میزان انسولین نسبت به سایر گروه ها دارد. حسینی و همکاران دریافتند که تجویز سیلی مارین برای بیماران دیابتی موجب کاهش قندخون و در بهبود عملکرد هورمون انسولین مفید است (۲۰). در مطالعه ای تحت عنوان بررسی اثر سیلی مارین در بیان فاکتور رونویسی NKX6.1 و سلول های بتا نئوجنسیس که توسط سوتو و همکاران در یک مدل پانکراتومی بر روی ۶۰ موش ویستار دریافتند که سیلی مارین کاهش سلول های بتا پانکراس مشاهده شده در دیابت را بهبود

می بخشد (۱۸). پس طبق مطالعه انجام شده و مطالعات گذشته بر روی سیلی مارین می توان گفت که نتایج با هم مطابقت دارد و سیلی مارین باعث بهبود عملکرد پانکراس، بیان هورمون انسولین و هم چنین بیان ژن های مربوطه می شود. در مطالعه ای تحت عنوان نقش Mafa در ترمیم سلول های بتا پانکراس که توسط (Kaneto) و همکاران انجام شد، دریافتند که فاکتور رونویسی Mafa به عنوان ترانس قوی برای ژن انسولین می باشد و بیان Mafa به طور قابل توجهی باعث بیوستنژ انسولین در غیر سلول های بتا مختلف و در نتیجه یک ابزار مفید برای القاء تولیدکننده انسولین جایگزین سلول های بتا است (۲۱). در مقاله ای منتشر شده توسط ژوآ و همکاران تحت عنوان میکرو-RNA و میکرو-سی دی باعث تحریک فاکتور رونویسی Mafa و تولید انسولین، در سلول های بتا پانکراس دریافتند که القای تولید انسولین به وسیله بیان بالای میکرو-سی دی با افزایش بیان فاکتور رونویسی Mafa همراه است (۲۲). این مطالعات نیز با نتایج ما مطابقت دارد زیرا افزایش بیان Mafa تحت تاثیر سیلی مارین در سلول های بتای پانکراس تخریب شده توسط STZ باعث ترمیم و عملکرد سلول های بتای پانکراس شده است، در نتیجه میزان انسولین نیز افزایش یافته و باعث درمان دیابت شده است. با توجه به مطالعه حاضر و مقایسه یافته های گروه های دیابتی تحت درمان، گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی (کنترل منفی) به نظر می رسد که دوزهای مختلف سیلی مارین هرکدام به یک میزانی باعث افزایش بیان ژن Mafa در سلول های بتای پانکراس تخریب شده توسط STZ می شود. ژن Mafa وظیفه ترمیم و بازسازی سلول های تخریب شده بتای پانکراس را دارد پس باعث ترمیم و نوسازی سلول های بتای پانکراس شده در نتیجه با ساخت مجدد سلول های بتا، این سلول ها در پانکراس شروع به ترشح انسولین می کنند و با افزایش انسولین میزان قند کاهش پیدا می کند، که همه این ها باعث درمان دیابت می شود. به طور کلی اثرات ماده موثره سیلی مارین در دوزهای بالاتر در بیان ژن Mafa و افزایش میزان انسولین بهتر و موثرتر دیده

تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می باشد و از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می نمایند.
 کد اخلاق مقاله: IR.IAU.SHK.REC.1397.035

می شود اما در دوزهای پایین تاثیر آن چنانی مشاهده نشد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و

References

- 1.Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes care2000; 23(10):1516-26. doi: 10.2337/diacare.23.10.1516
- 2.Rungby J. Zinc, zinc transporters and diabetes, Diabetologia.2010; 53(8):1549-51. doi: 10.1007/s00125-010-1793-x
- 3.Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, et al. Human type 1 diabetes is associated with T cell autoimmunity to zinc transporter 8. The Journal of Immunology2011; 3(1):1790-81. doi: 10.4049/jimmunol.1003815
- 4.Maclaren N, Atkinson M. Is insulin-dependent diabetes mellitus environmentally induced? Mass Medical Soc1992; 4(3):45-48. doi: 10.1056/NEJM199207303270509
- 5.Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology2011; 24(9):1542-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000133606.69732.4c
- 6.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. Psychosomatic medicine2007; 69(6):543-50. doi: 10.1097/PSY.0b013e3180cc3062
- 7.Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. Molecular and cellular Endocrinology2001; 185(1-2):99-108. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00628-1
- 8.Chakrabarti SK, Mirmira RG. Transcription factors direct the development and function of pancreatic β cells. Trends in Endocrinology & Metabolism2003; 14(2):78-84. doi : 10.1016/S1043-2760(02)00039-5
- 9.Kataoka K, Han S-i, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -cell-specific transcriptional activator for the insulin

- gene, Journal of Biological Chemistry2002; 277(51): 49903-10. doi: 10.1074/jbc.M206796200
- 10.Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. Molecular and cellular biology2005; 25(12); 4969-76. doi: 10.1128/MCB.25.12.4969-4976. 2 005
- 11.Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, Bonner-Weir S, et al, A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β -cells, Developmental biology2006; 293(2):526-39. doi: org/10.1016/j.ydbio.2006.02.028
- 12.Matsuoka T-a, Kaneto H, Kawashima S, Miyatsuka T, Tochino Y, Yoshikawa A, et al, Preserving Mafa expression in diabetic islet β -cells improves glycemic control in vivo, Journal of Biological Chemistry2015; 2(595579):32-34. doi: 10.1074/jbc.M114.595579
- 13.Eto K, Nishimura W, Oishi H, Udagawa H, Kawaguchi M, Hiramoto M, et al. MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic β -cells. PloS one 2014; 9(8):104184. doi: org/10.1371/journal.pone.0104184
- 14.Bliss CR, Sharp G. Glucose-induced insulin release in islets of young rats: time-dependent potentiation and effects of 2-bromostearate, American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism1992; 263(5): E890-E6. doi: org/10.1152/ajpendo.1992.263.5.E890
- 15.Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine1995; 2(2);137-89. doi: org/10.1016/S0944-7113(11)80059-0
- 16.Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future, Phytotherapy Research2010; 24(10):1423-32. doi: org/10.1002/ptr.3207
- 17.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. doi: org/10.3390/ molecules19044654
18. Axler D. Stability of the diabetogenic activity of streptozotocin. *IRCS Med Sci*1982; 10;157-8. doi: 10008621920
19. Zangeneh M. Hematoprotective and Nephroprotective Properties of Ethanolic Extract of *Anthemis odontostephana* Boiss in Streptozotocin-induced Diabetic Mice2018;2(3):43-45. (Persian)
20. Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, et al. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*2006; 20(12):1036-9. doi: org/10.1002/ptr.1988
21. Kaneto H, Matsuoka T-a, Kawashima S, Yamamoto K, Kato K, Miyatsuka T, et al, Role of MafA in pancreatic beta-cells. *Advanced drug delivery reviews*2009; 61(7-8):489-96. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.015
22. Zhao X, Mohan R, Özcan S, Tang X. MicroRNA-30d induces insulin transcription factor MafA and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) in pancreatic β -cells, *Journal of Biological Chemistry*2012; 287(37):31155-64. doi: 10.1074/jbc.M112.362632

Effect of Silymarin on the Expression of Mafa gene and its Relationship with Insulin Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Banihashemi Z¹, Zia-Jahromi N^{*1}, Sazgar H¹

(Received: January 30, 2019

Accepted: May 21, 2019)

Abstract

Introduction: Silymarin is effective in the treatment of various cardiovascular diseases, diabetes, blood lipids, liver disease, acute viral hepatitis, and gallbladder disease. It also has regenerative properties in several liver disorders, anti-diabetic effects, as well as anti-inflammatory, and anti-oxidant agents. Therefore, this study was aimed to investigate the effect of silymarin on Mafa gene expression and its association with insulin levels in streptozotocin-induced diabetic rats.

Materials & Methods: This study included 42 rats which were selected randomly and divided into 7 groups (n=6 per group). Streptozotocin was induced to develop diabetes among rats. Subsequently, after 1 month, the blood samples were taken from the heart of each group of rats to measure insulin levels. Following that, the rats were sacrificed and their pancreatic tissues were

examined to measure the expression of the Mafa gene using Realtime PCR. *Ethics code:* IR.IAU.SHK.REC.1397.035

Findings: According to the results, active ingredients found in silymarin enhance the expression of the Mafa gene, and the levels of Mafa gene expression differ in different doses. This increase in the expression of the gene was not dose-dependent; however, in the low- and high -dose groups, the expression levels were lower (P=0.018) and higher (P=0.003), respectively. Moreover, it led to an increase in insulin levels.

Discussion & Conclusions: Active ingredients found in silymarin enhance the expression of the Mafa gene, and therefore, increases the level of insulin secretion by the pancreatic beta cells.

Keywords: Diabetes, Mafa gene, Pancreas, Silymarin, Streptozotocin

1. Department of Basic Science, Faculty of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, *Corresponding autor Email: Email: n.zia@iaushk.ac.ir