

بررسی اثر سیلی مارین بر بیان ژن های اوروتنسین ۲ و گیرنده آن در بافت کبد رت های دیابتی تیپ ۲

نجات خیری پور (PhD)^۱، جمشید کریمی (PhD)^{۲*}، حیدر طویلانی (PhD)^۲، ایرج خدادادی (PhD)^۲، محمد تقی گودرزی (PhD)^۲

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۷/۶/۱۵، اصلاح: ۹۷/۹/۳، پذیرش: ۹۷/۹/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: مطالعات نشان می دهند که افزایش U-II با اختلالات دیابت مرتبط می باشد. با توجه به اینکه داروهای گیاهی برای درمان بیماری نسبت به بسیاری از داروهای شیمیایی عوارض کمتری دارند، در این مطالعه اثر سیلی مارین بر سطوح گلوکز، انسولین و بیان ژن های U-II و گیرنده اوروتنسین ۲ (U-II R) در رت های نر دیابتی تیپ ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۶ نر ویستار آلبینو به صورت تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند؛ ۱- گروه کنترل، ۲ و ۳- گروه های کنترل درمان شده با سیلی مارین دوز ۱۲۰ mg/kg/day و ۴- گروه دیابتی تیپ ۲ که از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین ۶۰ mg/kg و نیکوتین آمید ۱۲۰ mg/kg دیابتی شده و گروه های ۵ و ۶- دیابتی درمان شده با سیلی مارین دوز ۱۲۰ mg/kg/day و ۶۰ روز ادامه یافت. در پایان نمونه سرم و بافت کبد جمع آوری شد. گلوکز، انسولین، شاخص HOMA-IR و آنزیم های کبدی در نمونه سرم با روش اسپکتروفتومتری و الایزا، و بیان ژن در بافت کبد با روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: در گروه های دیابتی تحت درمان با سیلی مارین (۱۲۰ و ۶۰ mg/kg) به ترتیب $9/6 \pm 1/11$ و $9/8 \pm 0/96$ در مقایسه با گروه دیابتی کنترل؛ انسولین $11/46 \pm 0/47$ به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0/05$). همچنین سطح گلوکز، HOMA-IR، آنزیم های کبدی، بیان ژن های U-II و U-II R در گروه های دیابتی تیمار شده با سیلی مارین به طور معنی داری نسبت به گروه دیابتی کنترل کاهش نشان داد ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تجویز سیلی مارین باعث بهبود عملکرد کبد در موش های دیابتی می شود.

واژه های کلیدی: دیابت ملیتوس، سیلی مارین، اوروتنسین ۲، گیرنده اوروتنسین ۲، کبد.

مقدمه

بیماری دیابت، یکی از اختلالات مهم متابولیک می باشد. این بیماری، به دلایل مختلفی نظیر کاهش ترشح انسولین و یا مقاومت به عملکرد این هورمون ایجاد می شود (۱). در سال ۲۰۱۷ شیوع جهانی دیابت، ۳۸۲ میلیون نفر بود و این میزان به ۵۹۲ میلیون نفر در سال ۲۰۳۵ افزایش خواهد داشت، متأسفانه این افزایش در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما چشمگیرتر است (۲). دیابت به عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی محسوب می شود (۳). اوروتنسین ۲ (U-II) (Urotensin-II) با ۱۱ اسید آمینه به عنوان قوی ترین عامل انقباض عروق در پستانداران شناسایی شده است. در انسان U-II mRNA در بافت های قلب، کبد، کلیه ها، غدد آدرنال، جفت، طحال و غدد تیموس کشف شده است (۴). مولکول U-II از طریق رسپتورش که G protein-coupled receptor

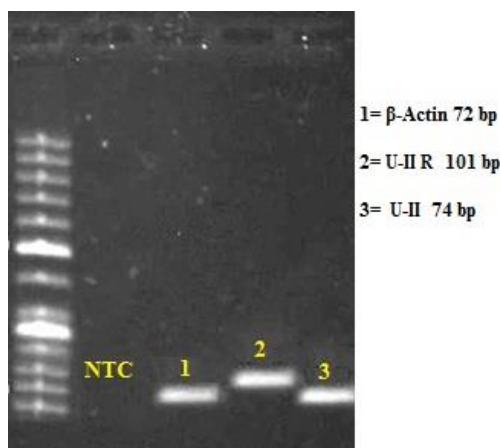
است اعمال خود را انجام می دهد. سیستم U-II و U-II R در ایجاد مقاومت به انسولین، اختلال در تحمل گلوکز، اختلال در انتقال گلوکز از طریق GLUT4 به عضله، اختلال در عملکرد سلول های بتای پانکراس و ایجاد دیابت تیپ ۲ موثر است (۵). بنابراین، سیستم U-II و U-II R یک هدف درمانی بالقوه در درمان اختلالات حاصل از دیابت است. سیلی مارین (Silymarin) مهم ترین ماده موثره گیاه ماریتیغال یا خارمریم با نام علمی *Silybummarianum* می باشد که از گروهی از مواد شیمیایی به نام فلاونولینگان ها تشکیل شده است (۶ و ۷). بذر این گیاه برای قرن ها به عنوان یک داروی مفید کم ضرر در درمان بیماری های کبدی استفاده و از سال ۱۹۷۰ به صورت داروی کارخانه ای تولید و مصرف شده است (۳). با توجه به اهمیت U-II و U-II R و اینکه اخیراً بعنوان یک هدف درمانی جدید

این مقاله حاصل پایان نامه نجات خیری پور دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۰۵۰۵۲۶۱۷ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر جمشید کریمی

$HOMA-IR = \text{Fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Fasting glucose } (\text{mg/dl}) / 405$

اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی: سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین آمینوترانسفراز (ALP) با کیت شرکت پارس‌آزمون با روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتروفوتومتر در حالت ناشتا تعیین شد. بررسی بیان ژن‌های U-II و U-II R: جهت بررسی بیان ژن‌های U-II و U-II R ابتدا استخراج RNA توسط محلول RNX-Plus شرکت سیناکلون انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز و نانودراپ تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول ژن‌های U-II R، U-II و β -Actin در کنار Ladder 100bp بر روی الکتروفورز آگارز ۱٪

سپس سنتز cDNA توسط کیت تاکارا انجام گردید. در ادامه میزان یک میکروگرم از cDNA سنتز شده وارد واکنش Real time PCR گردید که با کمک کیت سایبرگرین شرکت تاکارا انجام گرفت. پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام واکنش توسط نرم افزار Primer 3 طراحی گردید (جدول ۱)، همچنین از β -Actin به عنوان ژن رفرانس (House Keeping) استفاده شد. در انتها نتایج به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفتند (۹).

آنالیز آماری: داده‌ها پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و Post Hoc توکی تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت تأیید برخورداری متغیرهای مطالعه از وضعیت نرمال از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد.

در بیماری‌های متابولیک مورد توجه قرار گرفته است، پیدا کردن ترکیبات مخصوصا با منبع گیاهی که در مسیرهای مربوط به این هورمون دخیل هستند، از اهمیت بسزایی برخوردار است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر سیلی مارین بر میزان گلوکز، انسولین، HOMA-IR، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های U-II و U-II R در بافت کبد رت‌های نر دیابتی تیپ ۲ انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.1395.205 بر روی ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (220 ± 10 گرم) انجام شد. حیوانات در شرایط حیوانخانه با دسترسی آزاد به آب و غذا و برخوردار بودن از ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی نگهداری شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل: تغذیه ساده، گروه‌های کنترل درمان شده با سیلی مارین دوز 120 mg/kg و ۶۰ گروه دیابتی تیپ ۲، گروه‌های دیابتی تیپ ۲ درمان شده با سیلی مارین دوز 120 mg/kg و ۶۰ به مدت ۶۰ روز تقسیم شدند. جهت القای دیابت تیپ ۲ از پودر استرپتوزوتوسین (STZ) و نیکوتین‌آمید (NIC) استفاده گردید. ۱۵ دقیقه بعد از تزریق 60 mg/kg استرپتوزوتوسین، نیکوتین‌آمید با دوز 120 mg/kg بصورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد. برای تأیید دیابت، ۷ روز بعد، نمونه قند خون با گلوکومتر اندازه‌گیری شد.

رت‌های دارای قند خون بالای ۱۵۰ وارد مطالعه شدند. سپس دوره تیمار با سیلی مارین (قرص لیورگل بصورت سوسپانسیون در نرمال سالین و یک بار در روز بمدت ۶۰ روز بصورت گاواژ دهانی) شروع گردید (۸). تمام نکات کار با حیوانات بر اساس راهنمای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. در پایان مطالعه رت‌ها پس از یک شب ناشتایی، با کتامین (50 mg/kg) بیهوش شدند و نمونه سرم جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی و انسولین جداسازی و نگهداری گردید. همچنین بافت کبد در دمای منفی 80°C تا زمان انجام آزمایشات بیان ژن نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان گلوکز، انسولین و HOMA-IR: میزان گلوکز ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر Accu-Chek ساخت کشور آلمان از طریق خون‌گیری از ورید دمی اندازه‌گیری شد. انسولین با استفاده از کیت الایزای شرکت مرکودیا، ساخت کشور سوئد اندازه‌گیری شد. شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) با استفاده از فرمول زیر مورد ارزیابی قرار گرفت (۴).

جدول ۱. اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول پرایمر (bp)	طول محصول (bp)
Urotensin II	Forward	5'GTCGTCATGGACAGGGTG3'	۱۸
	Reverse	5'GAGGGTTTATTTCTCATAGTGG3'	۲۲
Urotensin II receptor	Forward	5'GCACGCCAGCATCTTCAC3'	۱۸
	Reverse	5'TGGTCCCAAAGAGCAACG3'	۱۸
β -Actin	Forward	5'CCCGCGAGTACAACCTTCT3'	۱۹
	Reverse	5'CGTCATCCATGGCGAACT3'	۱۸

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه القای دیابت تیپ ۲ در موش‌های صحرایی، موجب کاهش انسولین، افزایش گلوکز، HOMA-IR و افزایش بیان ژن‌های U-II و U-II R نسبت به گروه کنترل سالم شد. همچنین تیمار حیوانات دیابتی با سیلی مارین، موجب بهبود میزان گلوکز، انسولین و بیان ژن‌های U-II R و U-II ناشی از دیابت در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل شده است.

در دیابت میزان انتقال گلوکز به عضلات کاهش یافته و در نتیجه میزان گلوکز خون افزایش می‌یابد (۱۰). همچنین ترکیب استرپتوزوتوسین از طریق یک انتقال-دهنده گلوکز (GLUT2) به سلول‌های بتای پانکراس وارد شده و باعث آلکیلاسیون DNA می‌گردد. آسیب به DNA باعث القاء Poly ADP-riboseylation می‌گردد. فرایند Poly ADP-riboseylation منجر به کاهش مقادیر ATP و NAD در سلول می‌شود. تشدید دفسفریلاسیون ATP، بعد از اثر کردن استرپتوزوتوسین، سوبسترای برای آنزیم گزانتین‌اکسیداز فراهم می‌کند که منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید و آسیب به DNA می‌شود، که سبب نکروز سلول‌های بتا پانکراس می‌شود، در نتیجه این امر میزان انسولین سرم کاهش یافته و گلوکز سرم افزایش می‌یابد (۱۱). در گروه‌های دیابتی تیمار شده با دوزهای ۱۲۰ و ۶۰ mg/kg سیلی مارین، بهبود در میزان قند خون، ترشح انسولین و HOMA-IR نسبت به گروه دیابتی مشاهده گردید. در مطالعه Soto و همکاران گزارش شد که سیلی مارین از طریق افزایش بیان ژن (Pdx1) Pancreatic duodenal homeobox سبب بهبود سلول‌های بتای پانکراس، افزایش تولید انسولین و در نتیجه کاهش قند خون می‌گردد (۱۲).

هایپرگلیسمی و دیس‌لیپیدمی، که از ویژگی‌های اصلی دیابت تیپ ۲ هستند، با کاهش بیان Pdx1 باعث اختلال در عملکرد سلول‌های بتا می‌شوند. Pdx1 همچنین سبب افزایش بیان ژن انسولین، تکثیر و بقاء سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد (۱۳ و ۱۴). همچنین در مطالعه Pferschy-Wenzig و همکاران گزارش شد که ماده موثره Isosilybin A موجود در سیلی مارین دارای خواص آگونیستی PPAR γ می‌باشد. مولکول PPAR γ یک هدف برای تیاژولیدین دیون‌ها مانند پیوگلیتازون هستند، این داروها حساسیت به انسولین را افزایش می‌دهند تا سطح گلوکز خون را در بیماران دیابتی تیپ ۲ کاهش دهند (۱۵). در مطالعات Alabdan، Tuorkey و Feng نشان داده شد که، درمان رت‌های دیابتی با سیلی مارین سبب بهبود قند خون، محافظت سلول‌های بتای پانکراس، افزایش ترشح انسولین و بهبود HOMA-IR می‌شود (۱۶-۱۸).

ادعا شده است که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره سیلی مارین مانند سیلی‌بین و سیلی‌دیانین و افزایش سطح گلوکوتاتیون سلولی احتمالاً موجب کاهش مقاومت انسولین و بهبود متابولیسم گلوکز در بیماران دیابتی می‌شود (۱۹). کاهش انسولین، ایجاد دیس‌لیپیدمی و افزایش گلوکز خون در شرایط دیابتیک به بسیاری از بافت‌ها از جمله بافت کبد آسیب وارد می‌کند (۲۰). افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، ALP برای سنجش میزان آسیب سلول‌های کبدی

نشانگرهای مناسبی هستند (۲۱). در مراحل اولیه آسیب کبد، آنزیم‌های سیتوپلاسمی به دلیل افزایش نفوذپذیری غشای هیاتوسیت‌ها از این سلول‌ها به داخل جریان خون نشت می‌کنند (۲۲). همچنین، افزایش کاتابولیسم پروتئین‌ها همراه با گلوکونئوز و تشکیل اوره که در بیماری دیابت دیده می‌شود، احتمالاً مسئول افزایش این ترانس-آمینازها در خون است (۲۳).

از طرف دیگر، چون انسولین ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های گلوکونئوزیک را سرکوب می‌کند و ALT نیز یک آنزیم گلوکونئوزیک است، در جریان دیابت که سیگنال انسولین دچار نقص می‌شود، تولید ALT افزایش می‌یابد (۲۴). در مطالعه حاضر نتایج بیانگر افزایش میزان مارکرهای آسیب کبدی در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم بود. همچنین نشان داده شد که تیمار با سیلی مارین سبب کاهش معنی‌دار مارکرهای آسیب کبدی در سرم شد. سیلی مارین یک درمان معمول جهت بیماری‌های کبدی می‌باشد. گزارش شده است که بیش از ۳۳ درصد از افراد مبتلا به عفونت مزمن Hepatitis C virus و سیروز از سیلی مارین جهت درمان استفاده می‌کنند (۲۵ و ۲۶).

سیلی مارین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، افزایش میزان گلوکوتاتیون سلولی و ثبات غشای سلولی در طب سنتی جهت بهبود اختلالات کبدی تجویز می‌شود و با این مکانیسم سبب کاهش میزان مارکرهای آسیب کبدی می‌شود (۲۷). در مطالعه حاضر همچنین نشان داده شد که تیمار با سیلی مارین سبب کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های U-II و U-II R در بافت کبد گروه‌های دیابتی تیمار شده نسبت به گروه کنترل دیابتی شد. در مطالعه Rahimi و همکاران همسو با مطالعه حاضر نتایج نشان‌دهنده تاثیر سیلی مارین بر کاهش بیان ژن‌های U-II و U-II R در بافت قلب رت‌های دیابتی شده بود، در مطالعه نامبرده ذکر شده است که سیلی مارین از طریق تاثیر بر بیان ژن‌های U-II و U-II R سبب بهبود اختلالات قلبی ناشی از دیابت می‌شود (۴). همچنین در مطالعه Cheng و همکاران از ترکیب گیاهی بنام *simsii* Planch. Total flavones from *Rhododendron* Flower (TFR) بر روی موش صحرایی استفاده کردند. این گیاه حاوی فلاونوئیدهای است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد فیبروز دارد. این تحقیق نشان داد که TFR از طریق کاهش بیان ژن‌های U-II R و U-II موجب محافظت قلب رت‌ها در برابر رت‌سکته قلبی شد (۲۸). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سیلی مارین خصوصیات هایپوگلاسمیک بالقوه داشته و سطح انسولین را افزایش داد و در نتیجه موجب بهبود حساسیت به انسولین گردید. سیلی مارین بیان ژن‌های U-II و U-II R را در بافت کبد رت‌های دیابتی تیپ ۲ را کاهش داد که ممکن است از این طریق سبب کاهش مقاومت به انسولین بشود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی از این مطالعه، تقدیر و تشکر می‌گردد.

The Effect of Silymarin on the Expression of Urotensin–II and Urotensin–II Receptor Genes in the Liver Tissue of Type 2 Diabetic Rats

N. Kheiripour (PhD)¹, J. Karimi (PhD)^{*2}, H. Tavalani (PhD)², I. Khodadadi (PhD)², M.T. Goodarzi (PhD)²

1. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran

2. Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 27-33

Received: Sep 6th 2018, Revised: Nov 24th 2018, Accepted: Dec 11th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Studies have shown that the increase in urotensin – II is associated with diabetes disorders. Considering that using herbal medicines for the treatment of diseases leads to fewer complications compared to most chemical drugs, the present study was conducted to investigate the effect of silymarin on glucose, and insulin levels and the expression of urotensin – II (U–II) and urotensin – II receptor (U–II R) genes in the liver tissue of type 2 diabetic male rats.

METHODS: In this experimental study, 36 male albino Wistar rats were randomly divided into 6 groups (n=6): 1. Control group; 2 and 3. Control groups treated with 60 and 120 mg / kg / day silymarin; 4. Type 2 diabetic group which received an intraperitoneal (i.p.) injection of 60 mg / kg streptozotocin and 120 mg / kg nicotinamide; 5 and 6. Diabetic rats treated with 60 and 120 mg/kg/day silymarin. After 60 days of treatment, serum and liver tissue samples were collected. Glucose, insulin, HOMA-IR index and liver enzymes were evaluated by spectrophotometry and ELISA methods, while gene expression in liver tissue was analyzed by Real-time PCR method.

FINDINGS: Insulin levels increased significantly in diabetic groups treated with silymarin (60 and 120 mg/kg) (9.6±1.11 and 9.8±0.96, respectively) in comparison with the diabetic control group (7.10±1.06) (p<0.05). Moreover, glucose level, HOMA-IR, liver enzymes, U–II and U – II R expression in diabetic group treated with silymarin significantly decreased compared to diabetic control group (p<0.05).

CONCLUSION: The results of this study showed that administration of silymarin improves liver function in diabetic rats.

KEY WORDS: *Diabetes Mellitus, Silymarin, Urotensin – II, Urotensin – II Receptor, Liver.*

Please cite this article as follows:

Kheiripour N, Karimi J, Tavalani H, Khodadadi I, Goodarzi MT. The Effect of Silymarin on the Expression of Urotensin–II and Urotensin–II Receptor Genes in the Liver Tissue of Type 2 Diabetic Rats. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:27-33.

*Corresponding Author: J. Karimi (PhD)

Address: Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

Tel: +98 81 38380452

E-mail: jamshidkarimi2013@gmail.com

References

1. Bolbol Haghghi N, Molzemi S, Goli S, Mohammad Sadeghi H, Aminian M. The effect of hydroalcoholic extract of ziziphora clinopodioides lam on testicular damage caused by diabetes mellitus in male rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19(12):43-9. [In Persian]
2. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1: 15019.
3. Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2016;16(2): e132-41.
4. 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. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:244-50.
5. Barrette PO, Schwertani AG. A closer look at the role of urotensin II in the metabolic syndrome. *Front Endocrinol*. 2012;3:165-75.
6. Goli F, Karimi J, Khodadadi I, Tayebinia H, Kheiripour N, Hashemnia M, et al. Silymarin attenuates ELMO-1 and KIM-1 expression and oxidative stress in the kidney of rats with type 2 diabetes. *Ind J Clin Biochem*. 2018;1-8.
7. Mohamadifard M, Nazem H, Mottaghipisheh J. The effects of copper oxide nanoparticles and hydroalcoholic extracts of berberis vulgaris, descurainia sophia and silybum marianum on catalase, glutathione peroxidase, and malondialdehyde concentration in male diabetic rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2016;18(3):54-61. [In Persian]
8. Kheiripour N, Karimi J, Khodadadi I, Tavilani H, Goodarzi MT, Hashemnia M. Silymarin prevents lipid accumulation in the liver of rats with type 2 diabetes via sirtuin1 and SREBP-1c. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;29(3):301-8.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
10. Kheiripour N, Karimi J, Khodadadi I, Tavilani H, Goodarzi MT, Hashemnia M. Hepatoprotective effects of silymarin on liver injury via irisin upregulation and oxidative stress reduction in rats with type 2 diabetes. *Iran J Med Sci*. 2018; 1-10.
11. Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(6):3059-64.
12. Soto C, Mena R, Luna J, Cerbon M, Larrieta E, Vital P, et al. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sci*. 2004;75(18):2167-80.
13. Fujimoto K, Polonsky KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11 (4):30-7.
14. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev*. 2001;15(2):111-27.
15. Pferschy-Wenzig EM, Atanasov AG, Malainer C, Noha SM, Kunert O, Schuster D, et al. Identification of isosilybin a from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Nat Prod*. 2014;77(4):842-7.
16. Alabdan MA. Silymarin ameliorates Metabolic Risk Factors and Protects against Cardiac Apoptosis in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Biomed Biotechnol*. 2015;3(2):20-7.
17. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(1):36-43.
18. Feng B, Meng R, Huang B, Shen S, Bi Y, Zhu D. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. *Free Radic Res*. 2016;50(3):314-27.

19. Altorjay I, Dalmi L, Sari B, Imre S, Balla G. The effect of silibinin (Legalon) on the free radical scavenger mechanisms of human erythrocytes in vitro. *Acta Physiol Hung.* 1992;80(1-4):375-80.
20. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2015;6(3):456-80.
21. Cetinkunar S, Tokgoz S, Bilgin BC, Erdem H, Aktimur R, Can S, et al. The effect of silymarin on hepatic regeneration after partial hepatectomy: is silymarin effective in hepatic regeneration? *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):2578-85.
22. Chin J, Abas H, Sabariah I. Toxicity study of orthosiphon stamineus benth (misai kucing) on Sprague dawley rats. *Trop Biomed.* 2008;25(1):9-16.
23. Prakasam A, Sethupathy S, Pugalendi KV. Influence of Casearia esculenta root extract on protein metabolism and marker enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(5):587-93.
24. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(6):1889-95.
25. Seeff LB, Curto TM, Szabo G, Everson GT, Bonkovsky HL, Dienstag JL, et al. Herbal product use by persons enrolled in the hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis (HALT-C) Trial. *Hepatology.* 2008;47(2):605-12.
26. Fried MW, Navarro VJ, Afdhal N, Belle SH, Wahed AS, Hawke RL, et al. Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2012;308(3):274-82.
27. 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 Med.* 1989;55(05):420-2.
28. Cheng X, Zhang J, Chen Z. Effects of Total Flavone from *Rhododendron simsii* Planch. Flower on Postischemic Cardiac Dysfunction and Cardiac Remodeling in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017:1-9.