Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر گیاه کرفس کوهی بر بیان ژن *SREBP-1C* در رت‌های مبتلا به کبد چرب و رت‌های سالم

نویسندگان:

زهرا حق‌شناس[1]، دکتر نوشا ضیاء جهرمی[2]*

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.2, Summer 2021

چکیده:

مقدمه: پژوهش‌ها نشان داده است که گیاه کرفس باعث کاهش میزان لیپوپروتئین با چگالی کم می‌شود. با توجه به آمار فزاینده ابتلا به کبد چرب، این مطالعه به بررسی اثر عصاره این گیاه بر بیان ژن *SREBP-1C* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب می‌پردازد.

روش کار: در پژوهش حاضر ۲۴ سر رت به چهار گروه کنترل، کنترل منفی، تیمار اول و تیمار دوم تقسیم شدند. دو گروه تیمار به ترتیب ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم عصاره کرفس به صورت گاواژ دریافت کردند. رت‌ها با کلروفرم بیهوش شدند و پس از تشریح، بافت کبد آن‌ها جمع‌آوری شد. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. در نهایت، بیان ژن *SREBP-1C* با استفاده از تکنیک Real time PCR انجام و داده‌ها تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که عصاره کرفس کوهی با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *SREBP-1C* نسبت به دوز۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در رت‌های مبتلا به کبد چرب شود. این کاهش از نظر آماری نسبت به گروه بیمار معنادار بود (p=۰/۰۰۱). نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت‌های تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره کرفس کوهی به دلیل داشتن فلانوئید نارینجین سبب کاهش بیان ژن *SREBP-1C* که نقش مهمی در بیوژنز کلسترول، اسیدهای چرب و تری‌گلیسیریدها دارد می شود. عصاره مذکور در صورت تایید با انجام مطالعات وسیع‌تر می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب مطرح باشد.

واژگان کلیدی: کرفس کوهی، ژن *SREBP-1C* ، کبد چرب

Pars J Med Sci 2021;19(2):23-32

مقدمه:

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یک بیماری در حال رشد است که یک سوم از بزرگسالان و تعداد زیادی از جوانان در کشورهای توسعه یافته را مبتلا می‌کند. این بیماری با تجمع نامتناسب تری‌گلیسیرید در کبد آغاز می‌شود که در بعضی از افراد منجر به پاسخ التهابی می‌شود [۱]. از نظر اتیولوژی، بیماری کبد چرب غیر الکلی یک بیماری چند بعدی است که مجموعه‌ای از عوامل از جمله ژنتیک، سبک زندگی، نوع تغذیه و فعالیت بدنی در ایجاد آن دخالت دارند [۲]. این بیماری در دیابت نوع ۲ نیز بسیار شایع است که احتمالاً منعکس کننده بروز مکرر چاقی و مقاومت به انسولین در T2DM است [۳]. بر اساس نتایج به دست آمده شیوع کبد چرب غیر الکلی در منطقه مدیترانه ۳۶/۸ درصد، چین ۲۴-۵ درصد، اروپا ۴۰-۲۰ درصد، ژاپن ۳۰-۹ درصد، هند ۳۲-۱۶ درصد است. کم‌ترین میزان شیوع در کشورهای آسیایی متعلق به سنگاپور به میزان ۵ درصد است [۴]. شیوع کبد چرب غیر الکلی در ایران به نسبت زیاد است و در افراد مذکر بیماری دیابت، سندروم متابولیک، فشار خون سیستولیک و دیاستولیک و پرفشاری خون از عوامل تعیین کننده آن هستند [۵]. شیوع کبد چرب در ایران از ۲/۹ درصد تا ۱/۷ درصد در جمعیت عمومی و

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۱۴۶۵۰۴ پست الکترونیک: Nooshazia.59@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰ اصلاح:۱۴۰۰/۰۴/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

۸/۵۵ درصد در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ متغیر است. این بیماری اغلب در افراد مذکر با شاخص توده بدنی بالا، فشار خون بالا، کلسترول بالا، تری گلیسیرید بالا و همچنین دور کمر بالا مشاهده می‌شود [۶]. اگر کبد چرب غیرالکلی به سیروز مبتلا شود علائم ممکن است شامل مواردی همچون سردرگمی ذهنی، خون ریزی داخلی، نگهداری مایعات و از دست دادن عملکرد کبد سالم نیز باشد [۷]. افراد مبتلا به کبد چرب غیرالکلی طیف وسیعی از علائم غیراختصاصی از جمله خستگی و خواب آلودگی در روز دارند که می‌تواند بر کیفیت زندگی شان تاثیر چشم گیری داشته باشد [۸-۱۰].

از جمله عوامل ژنتیکی، پروتئین‌های متصل شونده به عناصر تنظیم کننده استرول (SREBPS) (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) خانواده‌ای از عوامل رونویسی است که در بیوژنز کلسترول، اسیدهای چرب و تری‌گلیسیریدها نقش دارند. آن‌ها هم چنین عملکردهای فیزیولوژیکی بسیاری از اندام‌ها از جمله تیروئید مغز، قلب، لوزالمعده و سنتز هورمون را تنظیم می‌کنند. همچنین در کبد در پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی استئاته هپاتیت غیر الکلی و سرطان کبد نقش دارد. خانواده SREBP از سه عضو تشکیل شده‌اند و عمدتاً در کبد، بافت چربی سفید، غده فوق کلیوی، عضله اسکلتی و مغز موش‌ها و انسان‌ها بیان می‌شود. مطالعات نشان داده است که فعال سازی LXRA که یک فاکتور رونویسی اتصال‌دهنده DNA است بیان *SREBP-1C* را افزایش می‌دهد. این عمل منجر به لیکوژنز کبدی و هیپرتری گلیسیریدمی می‌شود. همچنین انسولین بیان *SREBP-1C* را از طریق گیرنده هسته‌ای LXR تحریک می‌کند [۱۱-۱۳]. *SREBP-1C* و *SREBF1* عناصر تنظیم کننده استرول و فاکتور رونویسی هستند که در انسان روی کروموزم ۱۷ باند 17P11.2 و در موش روی کروموزم ۱۱ باند B211.11 قرار دارد. عملکرد مولکولی ژن شامل اتصال DNA، فعالیت دفع پروتئین، اتصال کروماتین و اتصال پروتئین کیناز است. بررسی عملکرد ژن *SREBP-1C* نشان می‌دهد که این ژن کد کننده آنزیمی است که موجب کاتالیز تبدیل اسیدهای چرب اشباع به حالت غیر اشباع خود شده و افزایش بیان آن می‌تواند میزان اسید چرب اشباع در کبد را کاهش دهد. *SREBP-1C* با تاثیر بر عملکرد لیپوژنیک همچون اسید چرب سنتتاز، استیل کوآکربوکسیلاز و استروئیل کوآدسچوراز ۱ در تنظیم متابولیسم اسیدهای چرب و کلسترول دخالت دارد [۱۳].

طی دهه‌های گذشته استفاده از گیاهان دارویی برای درمان کبد چرب غیر الکلی به دلیل در دسترس بودن گسترده، عوارض جانبی کم و مزایای درمانی اثبات شده توجه بیشتری شده است. سیر، چای سبز، رسوراترول و خارشیر چند مورد از گیاهان دارویی هستند که در بیماری‌های کبدی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۴]. از فرمول گیاهی سنتی چینی، عصاره خام گیاهان دارویی و محصولات طبیعی خالص برای درمان کبد چرب غیرالکلی استفاده شده است. داروهای گیاهی منابع طبیعی هستند که می‌توانند در پژوهش‌های نوین دارویی، توسعه و درمان کبد چرب غیرالکلی در آینده بسیار کاربرد داشته باشند [۱۵].

کرفس از خانواده Apiaceae است که داشتن ساقه‌های ترد این گیاه را به یک میان وعده کم کالری خوب تبدیل می‌کند. کرفس باعث کاهش میزان لیپوپروتئین با چگالی کم یا کلسترول بد می‌شود. عصاره این گیاه نیز از بیماری کبدی و زردی جلوگیری می‌کند. کرفس حاوی ترکیبات گیاهی همچون سلینن، لیمونن، Kaempferol و P-Coumaric Acid است که خاصیت آنتی-اکسیدانی قدرتمندی به آن می دهد. آنتی‌اکسیدان‌ها به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد کمک می‌کنند. چوب کرفس نیز مقادیر اندکی ویتامین K، فولات، ویتامین A، پتاسیم و ویتامین C دارد [۱۶]. همچنین کرفس می‌تواند میزان TL، TG و LDL را کاهش دهد [۱۷]. با توجه به آمار فزاینده ابتلا به کبد چرب و همچنین عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی، این مطالعه به بررسی اثر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن *SREBP-1C* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب پرداخته است.

روش کار:

نوع مطالعه، جامعه مورد مطالعه و گروه‌بندی

مطالعه حاضر از نوع مطالع حیوانی و روش گردآوری داده‌ها به صورت آزمایشگاهی – مشاهده‌ای بوده است. در این پژوهش ۲۴ سر رت نر بالغ ویستار با میانگین وزنی ۱۳۰ تا ۲۰۰ گرم (سن ۹ هفته) از لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد خریداری شد. این حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با آب و غذای کافی و استاندارد درون قفس‌های مخصوص دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد نگهداری شدند. رت‌ها پس از سازگاری با محیط به طور تصادفی به چهار گروه شش تایی تقسیم شدند گروه کنترل شامل شش سر رت سالم فقط روزانه آب و غذای استاندارد دریافت می‌کردند. گروه کنترل منفی نیز شامل شش سر رت مبتلا به کبد چرب که به عنوان گروه کنترل منفی بودند. گروه تیمار اول دریافت‌کننده دوز ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره کرفس و گروه تیمار دوم دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره کرفس بودند. پس از اتمام دوره تطبیق حیوانات با حرارت و رطوبت محل نگهداری، آزمایشات شروع شد. همچنین اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمام

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

مراحل لحاظ شد. لازم به ذکر است که جهت ابتلا به کبد چرب، رت‌ها به مدت شش هفته با رژیم غذایی با چربی بالا شامل ٪۴۵ چربی برابر با ۴/۷ کیلوکالری در هر گرم (٪۲۴ چربی، ٪۲۴ پروتئین و ٪۴۱ کربوهیدرات) چاق شدند [۱۸].

تهیه عصاره کرفس

گیاه کرفس از مناطق کوهستانی استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. این گیاه با تأیید متخصصین گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد تأیید و سپس در محلی دور از نور و آفتاب و در دمای رطوبت مناسب به‌طوری‌که هوا در آن محل جریان داشته باشد نگهداری و خشک شد. پس از خشک‌کردن گیاه قسمت‌های خشک‌شده توسط آسیاب برقی به قطعات ۰/۵ تا ۳ سانتی پودر شده و سپس ۵۰ گرم از این پودر با الکل اتانول ۷۰ درصد صنعتی مخلوط شد به طوری که پودر کاملاً با الکل پوشیده شود. بعد از ۵ ساعت مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره‌ای که پس از عبور از کاغذ صافی به دست آمد با دستگاه روتاری تنظیم شده روی دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. در نهایت، مقدار انتخابی عصاره‌ها با حل کردن در یک حلال مناسب به دست آمد و به صورت گاواژ به رت‌ها داده شد.

نمونه‌گیری

پس از گذشت یک ماه از فرایند گاواژ و تیمار، رت‌ها در شرایط کاملاً بهداشتی با استفاده از کلروفورم بی هوش شدند و با استفاده از ست جراحی شکم آن ها باز و کبد آن‌ها برداشته شد. سپس مقداری از کبد برای انجام مراحل ریل تایم درون RNA later و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد، RNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما استخراج و بررسی کمی و کیفی آن با کمک دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از خلوص RNA استخراج شده با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما cDNA ساخته و به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شد. در ادامه به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن، پس از طراحی با نرم افزار الیگو نسخه ۷ و BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، توسط شرکت پیشگام سنتز شد که در جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

بیان ژن با استفاده از PCR

بیان ژن *SREBP-1C* در یک واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر Master Mix در ویال ریخته شد و سپس یک میکرولیتر پرایمر که شامل ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیشرو و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیرو بود به آن اضافه شد. در ادامه نیز یک میکرو لیتر از cDNA ساخته شده همچنین آب دیونیزه اضافه شد تا حجم مواد به ۲۰ میکرولیتر برسد. سپس نمونه ها در دستگاه PCR طبق برنامه مورد نظر شامل Initial denaturation به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، Extension به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و Extensionfinal به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. تعداد سیکل ها ۳۵ دور در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد.

تکنیک Real Time PCR

برای انجام این تکنیک بر اساس پروتکل کیت یکتا تجهیز آزما ۱۰ میکرو لیتر SYBER Premix به ۱ میکرو لیتر cDNA اضافه شد و سپس پرایمرهای پیشرو و پیرو هرکدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر اضافه شد و در نهایت با آب دیونیزه به حجم ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. نمونه ها در دستگاه RT-PCR قرار داده شد و دستگاه طبق جدول ۲ تنظیم شد. سپس نتایج حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از محاسبه $\Delta\Delta CT$ نسبت بیان ژن هدف در نمونه مورد نظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

آزمایش‌های بیوشیمیایی ارزیابی کبد

آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل آزمایش کلسترول، تری‌گلیسرید، قند، GOT، HDL، LDL، GPT و آلکان فسفاتاز توسط دستگاه اتوآنالیزر (Auto Analyser BT 3000plus، ساخت کشور ایتالیا) با استفاده از لام پاتولوژی انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل آماری داده‌ها برای بررسی اثر گیاه کرفس کوهی بر بیان ژن *SREBP-1C* در رت‌های مبتلا به کبد چرب و رت‌های سالم با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. با توجه کم بودن حجم نمونه‌ها برای بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو- ویلک مناسب برای نمونه های کوچک (۳ تا ۵۰ نمونه) استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در تمامی گروه‌های مورد بررسی نمونه ها از توزیع نرمال برخوردار هستند و می‌توان از آزمون‌های پارامتریک برای بررسی آماری نتایج به دست آمده استفاده کرد. از این رو داده ها با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD ارزیابی شدند. نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با P=۰/۰۰۱ معنادار تلقی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

ژن	توالی	دما	اندازه باند
SREBP-1C- F	5'- TGCTTCTCTGGGCTCCTCTCTG -3'	۶۴C	۱۵۵ bp
SREBP-1C- R	5'- GCACTGGCTCCTCTTTGATTCC -3'		
GAPDH-F	5'- TGATTCTACCCACGGCAAGTTC-3'	۵۶C	۲۰۰ bp
GAPDH-R	5' -CGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'		

جدول ۲: مراحل دمایی Real Time PCR

مراحل	دما سانتیگراد	زمان	تعداد سیکل‌ها
PCRInitial denaturation step	۹۵	۵ دقیقه	۱ سیکل
Denaturation	۹۵	۲۵ ثانیه	۴۰سیکل
Annealing *SREBP-1C*	۵۹	۳۰ ثانیه	
Annealing GAPDH	۶۲	۳۰ ثانیه	
Extension	۷۲	۲۵ثانیه	۱سیکل

یافته‌ها:

بررسی RNA استخراج شده

برای کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده از نمونه‌هایی که در شرایط RNase free تهیه شده بودند، روی ژل آگارز یک درصد برده و بررسی شدند. از آن‌جایی که بیش‌ترین میزان RNA موجود در RNA تام استخراج شده، RNAهای ریبوزومی است و بنابراین حضور سه باند ۲۸ s، ۱۸ s و ۵/۸ s ریبوزومی نشان‌دهنده کیفیت استخراج RNAهای مورد نظر بود که در شکل A– ۱ به تصویر کشیده شده است.

بررسی صحت سنتز cDNA

به منظور تایید صحت سنتز cDNA با پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH، واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۲۰۰ جفت بازی مربوط به GAPDH دیده شد که موید سنتز مناسب cDNA است که در شکل B –۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که از ژن GAPDH در تمام شرایط و در تمام سلول‌ها رونویسی می‌شود و RNA آن در دسترس است.

تایید تکثیر قطعه

تایید صحت ژن *SREBP-1C* نیز با استفاده با پرایمرهای اختصاصی ژن *SREBP-1C* و واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۱۵۵ جفت بازی مشاهده شد که در شکل C –۱ نشان داده شده است.

نتایج آزمایش های بیوشیمیایی

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت‌های تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم را تایید می کند.

نتایج RT-PCR

نمودارهای منحنی ذوب

در پژوهش حاضر منحنی ذوب برای بررسی آلودگی نمونه مورد استفاده قرار گرفت. در صورت وجود آلودگی بیش از یک پیک برای هر نمونه در منحنی ذوب ثبت شد. بررسی نمودار منحنی ذوب برای نمونه‌های مختلف نشان داد که نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای آلودگی بسیار کمی بوده و در بیشتر نمونه‌ها تنها یک پیک جذب قوی مشاهده می شود. بررسی منحنی ذوب برای ژن *SREBP-1C* نشان داد که نمونه‌های حاوی این ژن عاری از هر گونه آلودگی بوده و تنها در نقطه ذوب ژنی پیک دارند. در شکل‌های A– ۳ و B منحنی‌های ذوب برای ژن‌های *SREBP-1C* و GAPDH نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

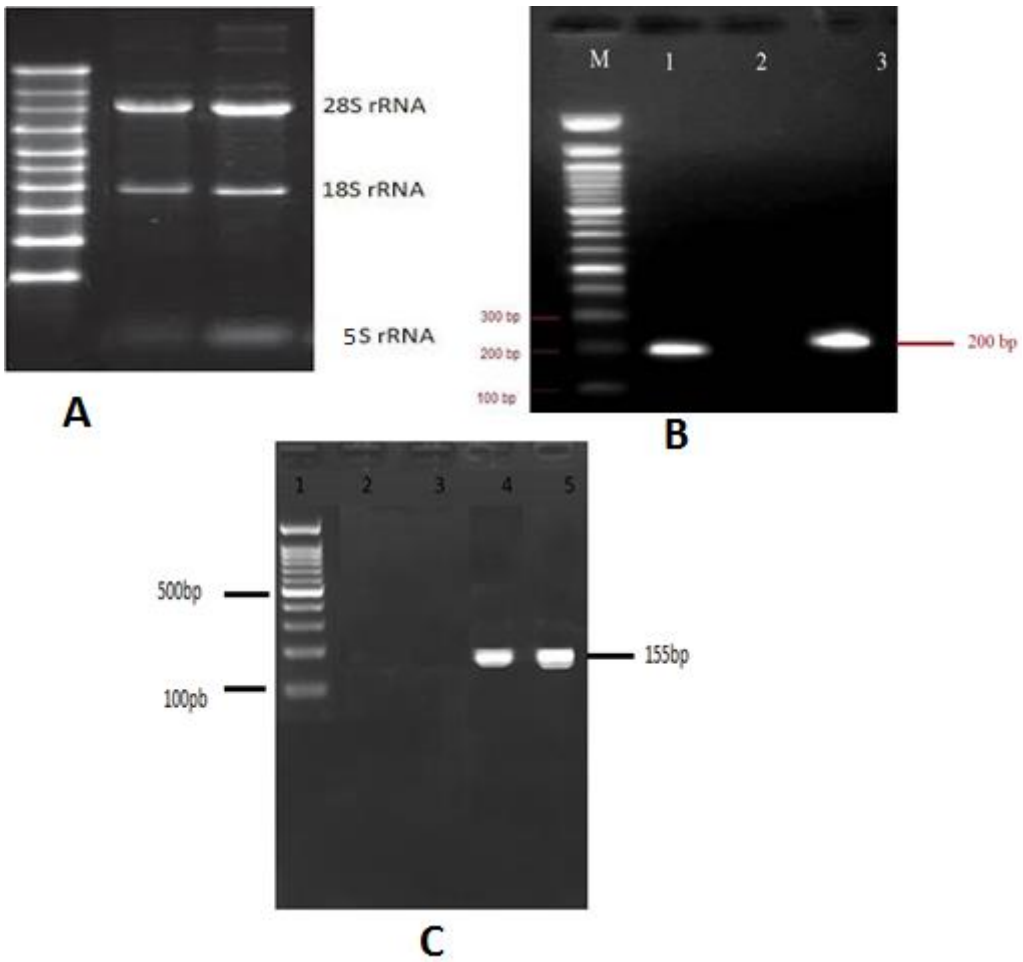
منحنی تکثیر

در پژوهش حاضر برای بررسی میزان نسبی بیان ژن *SREBP-1C* از روش ΔΔCT استفاده شد. بدین ترتیب که با مقایسه شروع سیکل آستانه میزان بیان ژن *SREBP-1C* و همچنین ژن GAPDH به روش یاد شده محاسبه شد. در شکل‌های A– ۴ و B– ۴ منحنی‌های تکثیر برای ژن‌های *SREBP-1C* و GAPDH نشان داده شده است.

نتایج تحلیل بیان ژنی

بررسی داده‌های حاصل از بیان ژن *SREBP-1C* نشان داد که عصاره کرفس کوهی با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم باعث کاهش بیان این ژن می‌شود و این کاهش از نظر آماری نسبت به گروه بیمار معنادار است (p=۰/۰۰۱) که در جدول ۴ و شکل ۸ نشان داده شده است.

طبق جدول ۳ و شکل ۹ بیشترین میزان بیان مربوط به گروه رت‌های مبتلا به کبد چرب بود و کمترین میزان بیان مربوط به گروه سالم بود. در رت‌های دریافت کننده دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره کرفس کوهی کاهش بیان دیده می‌شود که این کاهش نسبت به گروه بیمار معنادار بود (p=۰/۰۰۱). در رت‌های دوز ۸۰۰ این کاهش بیان چشم‌گیر و معنادار بود (p=۰/۰۰۱).

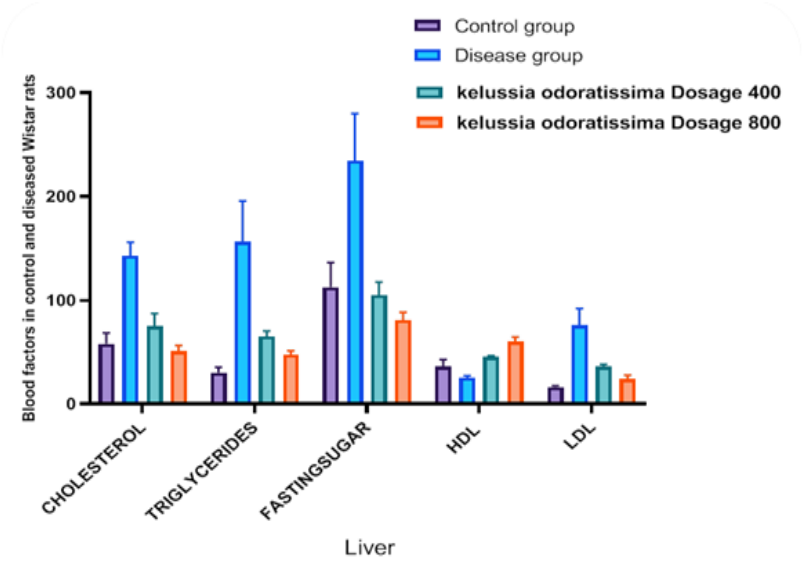


شکل ۱ –A: بررسی کیفی RNA استخراج شده و حضور سه باند ۲۸ S، ۱۸ S و ۵ S ریبوزومی، B: تایید صحت سنتز cDNA. چاهک شماره ۱ نمونه سالم، چاهک شماره ۲ کنترل منفی، چاهک شماره ۳ نمونه بیمار است، C: تایید صحت ژن *SREBP-1C* . چاهک ۱ DNA Ladder، چاهک ۲ و ۳ کنترل منفی، چاهک ۴ و ۵ باند bp ۱۵۵ مربوط به ژن *SREBP-1C*

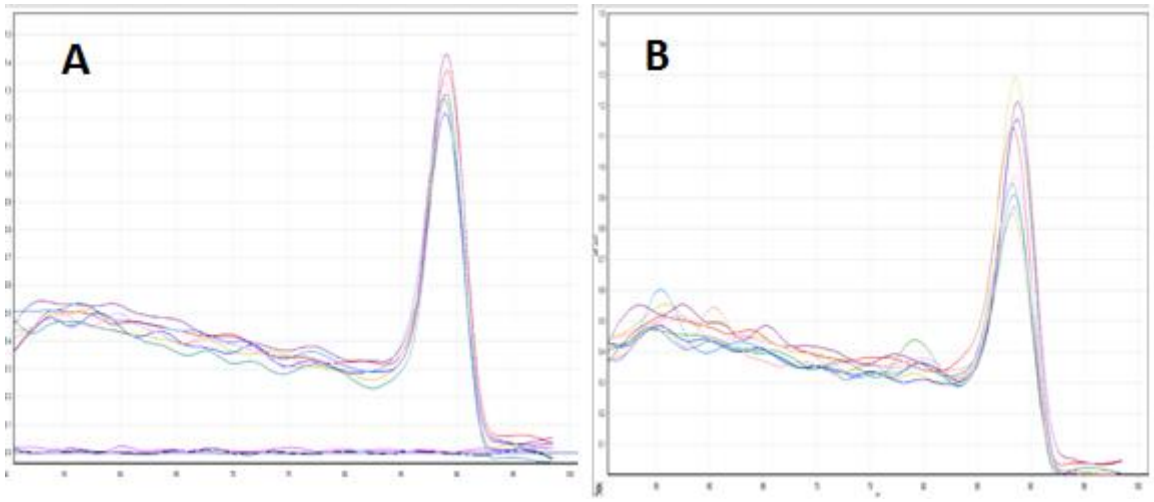
www.SID.ir

Archive of SID

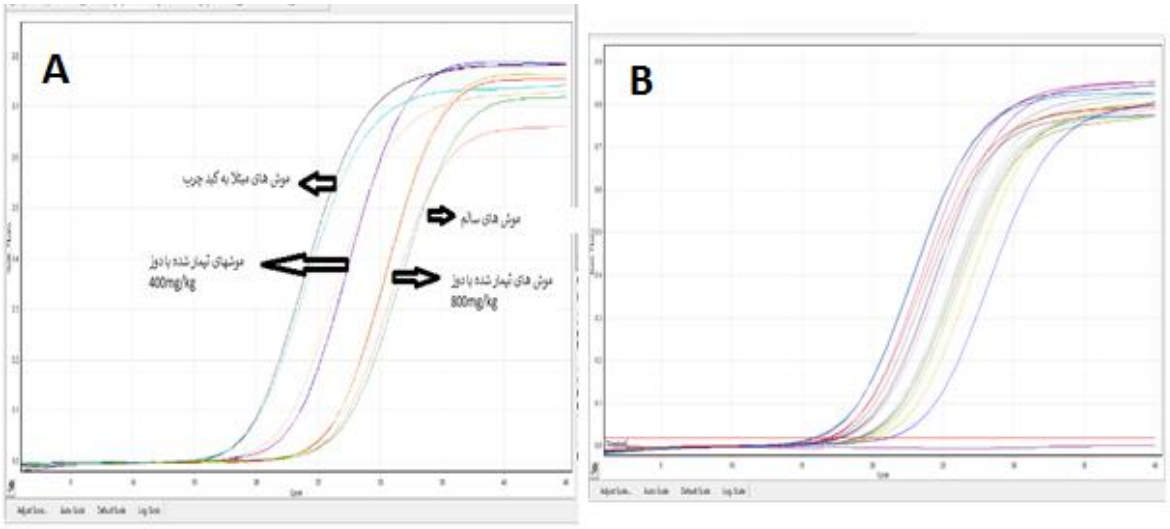
Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021



شکل ۲: نمودار حاصل از نتایج آزمایش بیوشیمیایی



شکل A- ۳: منحنی ذوب برای ژن *SREBP-1C* و شکل B: منحنی ذوب برای ژن GAPDH



شکل A -۴: منحنی تکثیر برای ژن *SREBP-1C* و شکل B: منحنی تکثیر برای ژن GAPDH

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *SREBP-1C* در گروه های مختلف

گروه	سالم	بیمار	عصاره کرفس ۴۰۰	عصاره کرفس ۸۰۰
بیان ژن *SREBP-1C*	۱/۱۴ ± ۰/۶۵b	۳/۵۶ ± ۰/۱۱a	۱/۴۳ ± ۰/۷۱b	۱/۲۸ ± ۰/۴۶b

a,b: میانگین ها با حروف لاتین متفاوت اختلاف آماری معنادار دارند (p=۰/۰۰۱).

بحث:

کرفس از خانواده Apiaceae است و ساقه‌های ترد آن باعث می‌شود که به میان وعده‌های کم کالری تبدیل شود.کرفس باعث کاهش میزان LDL می‌شود. عصاره این گیاه از بیمارهای کبدی و زردی جلوگیری می‌کند. کرفس حاوی ترکیبات گیاهی همچون سلینن، لیمونن، Kaempferol و P-Coumaric Acid است که خاصیت آنتی اکسیدانی قدرتمندی دارند. چوب کرفس مقادیر کمی ویتامین K، فولات، ویتامین A، پتاسیم و ویتامین C را در بردارد [۱۶]. در پژوهش حاضر به بررسی اثر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن *SREBP-1C* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب پرداخته شد. نتایج نشان داد که عصاره کرفس کوهی با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن مذکور نسبت به دوز۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رت‌های مبتلا به کبد چرب شود. این کاهش از نظر آماری نسبت به گروه بیمار معنادار بود (p=۰/۰۰۱). نتایج آزمایش های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت‌های تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تایید می‌کند. در این راستا پژوهش های زیر انجام گرفته است. فریی و همکاران در سال ۲۰۱۰ خاصیت هیپو لیپیدمی عصاره آبی کرفس را در موش های صحرایی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی دو گروه موش صحرایی به مدت هشت هفته رژیم غذایی پرچرب دریافت کردند. یک گروه با عصاره آبی کرفس در رژیم غذایی تکمیل شدند و گروه دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. در پایان آزمایش کاهش قابل توجهی در میزان کلسترول، کلسترول LDL-C و تری گلیسیرید در موش‌های تحت درمان با کرفس مشاهده شد [۲۰]. طاهر و همکاران به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی کرفس و شوید بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در رت‌ها پرداختند. نتیجه بررسی نشان داد که مواد موثره گیاهان شوید و کرفس احتمالاً با آثار آنتی‌اکسیدانت یا کاهش تولید رادیکال‌های آزاد سبب تثبیت غشا سلول‌های کبدی و کاهش آزادسازی آنزیم به خون می‌شود [۲۱]. سینق و همکاران برای درمان بیماری‌های کبدی از اثر متانولی دانه‌های کرفس و هیگروفیلیا استفاده کردند و با نظارت بر چندین آزمون اثر کاهشی آنزیم‌های کبدی در موش صحرایی را مشاهده کردند که حاصل فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای موجود در این دو گیاه است [۲۲]. در سال ۲۰۱۵ مشکانی و همکاران به بررسی ژن SHIP2 در لیپوژنز القایی با اولئات پرداختند. نتایج نشان داد که افزایش بیان ژن مذکور از طریق افزایش ژن *SREBP-1C* سبب تحریک لیپوژنز (افزایش تری گلیسرید داخل و خارج سلول) در حضور اولئات می‌شود [۲۳]. در سال ۲۰۱۷ ابراهیمی و همکاران به بررسی بیان نسبی ژن‌های کلیدی متابولیسم لیپید به دنبال مصرف رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی در کبد موش صحرایی پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که رژیم غذایی پرچرب باعث اختلال لیپید و احتمالاً آسیب کبدی شده و تنها بیان ژن *SREBP-1C* را افزایش داده است. همچنین، باوجود این که تمرین اثری بر بیان ژن FXR نداشته است، اما بیان PPAR-α مستقل از شدت تمرین در گروه های با رژیم غذای پرچرب افزایش داشته است. آن‌ها اظهار داشتند که بیان *SREBP-1C* در گروه با تغذیه طبیعی با تمرین شدید کاهش پیدا کرده است. به طور کلی، اختلال لیپید و تجمع چربی در بافت کبد می‌تواند از عواقب مصرف رژیم‌های پرچرب باشد که احتمالاً از طریق افزایش بیان *SREBP-1C* که منجر به فعال شدن مسیرهای لیپوژنیک می‌شود، صورت می‌گیرد. اگرچه مداخلات تمرینی این پژوهش بیان ژن‌ها را تغییر داد، اما اثر مشهودی بر پروفایل لیپید و آمینوترنسفرازها نداشت [۲۴]. در پژوهش حاضر نیز نتایج نشان داد که عصاره کرفس کوهی می‌تواند بیان ژن *SREBP-1C* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب را کاهش دهد. هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ کرفس کوهی بر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن BMP7 در بافت چربی سفید رت‌ها را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره مذکور در مرحله پیش‌گیری از چاقی نقش مؤثری در جلوگیری از افزایش وزن و همچنین افزایش فعالیت کاتالاز کبد دارد [۲۵]. در سال ۲۰۱۹ آذربایجانی و همکاران به بررسی تمرینات هوازی بر بیان ژن *SREBP-1C* و گیرنده A1 کبدی در موش‌های صحرایی تغذیه شده با غذای پر چرب پرداختند. نتایج حاکی از ان بود که ژن مذکور و گیرنده A1 به ترتیب در گروه‌های غذای پر چرب افزایش معناداری داشته و تمرین اینتروال شدید و استقامتی اثر معناداری بر کاهش بیان این دو ژن دارند. تعامل تمرین استقامتی آدنوزین کاهش معنادارتری از تمرین اینتروال شدید آدنوزین بر بیان A1 داشته است. آن‌ها بیان کردند که صرف نظر از شدت تمرین به عنوان یک عامل

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

مؤثر بر بیان ژن‌های لیپوژنز، دوز مصرفی آدنوزین همراه با کاهش گیرنده آن به دنبال غذای پرچرب احتمالاً نقش مؤثری بر بیان ژن‌های لیپوژنتیک دارند [۲۶]. نتایج این مطالعه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم سو است. در سال ۲۰۲۰ جمایی و همکاران بیان ژن‌های PPARγ، SREBP و C/EBPα با استفاده از بذر گیاه کولیوسنت را بررسی کردند. نتایج پژوهش حاکی از آن بود که بیان این ژن‌ها کاهش معناداری داشته است [۲۷]. داده‌های حاصل در پژوهش حاضر نشان داد دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *SREBP-1C* در رت‌های مبتلا به کبد چرب نسبت به دوز ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم شود که این کاهش از نظر آماری نسبت به گروه بیمار معنادار است (p=۰/۰۰۱).

نتیجه گیری:

از جمله عوامل ژنتیکی موثر در بیماری کبد چرب، پروتئین‌های اتصال دهنده تنظیم کننده استرول خانواده‌ای از عامل‌های رونویسی است که در بیوژنز کلسترول، اسیدهای چرب و تری‌گلیسیریدها نقش دارند. همچنین در کبد در پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی استئاته هپاتیت غیر الکلی و سرطان کبد نقش دارد. مطالعات نشان داده بیان ژن *SREBP-1C* منجربه لیپوژنز کبدی و هیپرتری گلیسیریدمی می‌شوند. از سوی دیگر پژوهش ها نشان داده است که کرفس کوهی نقش مؤثری بر بیان ژن‌های لیپوژنتیک دارد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر که بیان ژن *SREBP-1C* در گروه های تیمار شده با غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم به صورت معناداری کاهش پیدا کرده است می‌توان گفت کرفس کوهی به دلیل داشتن فلاونوئیدهایی همچون نارینجنین بیان ژن *SREBP-1C* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب را کاهش می‌دهد. بنابر این، ژن یاد شده می‌تواند در آینده به عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب مطرح باشد.

پیشنهادهایی برای پژوهش‌های بعدی:

پیشنهاد می‌شود موارد زیر در بررسی های آینده در نظر گرفته شود :

بیان ژن *SREBP-1C* در نمونه‌های انسانی

اثر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن‌های مورد هدف *SREBP-1C*

اثر عصاره کرفس کوهی بر بیماری‌های دیگری همچون چاقی و سرطان کبد

ملاحظات اخلاقی:

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.044 به تصویب رسیده است.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بدین وسیله از همکاری تمام افراد شرکت کننده در این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع:

بنابر اظهار نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

References:

1. Arrese M, Cortés V, Barrera F, Nervi F. Nonalcoholic fatty liver disease, cholesterol gallstones, and cholecystectomy: new insights on a complex relationship. Current opinion in gastroenterology. 2018;34(2):90-6.
2. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. Global epidemiology of non- alcoholic fatty liver disease/non- alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. Liver International. 2018;38:47-51.
3. Zhao N, Guo F-F, Xie K-Q, Zeng T. Targeting Nrf-2 is a promising intervention approach for the prevention of ethanol-induced liver disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2018;75(17):3143-57.
4. Amirkalali B, Poustchi H, Keyvani H, Khansari MR, Ajdarkosh H, Maadi M, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its predictors in north of Iran. Iranian journal of public health. 2014;43(9):1275.
5. Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2019;16(6):377-86.
6. Adam RAA. A Study of Non Alcoholic Fatty Liver Disease and its Associated Risk Factors in Sudanese using Computed Tomography. Sudan University of Science and Technology. 2019;3(45):34-55.
7. Smith GI, Shankaran M, Yoshino M, Schweitzer GG, Chondronikola M, Beals JW, et al. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. The Journal of clinical investigation. 2020;130(3).
8. Yamamura S, Nakano D, Hashida R, Tsutsumi T, Kawaguchi T, Okada M, et al. Patient- reported outcomes in patients with non- alcoholic fatty liver disease: A narrative review of Chronic Liver Disease Questionnaire- non- alcoholic fatty liver disease/non- alcoholic steatohepatitis. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2020;2(3):65-70.
9. Soto-Angona Ó, Anmella G, Valdés-Florido MJ, De Uribe-Viloria N, Carvalho AF, Penninx BW, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) as a neglected metabolic companion of psychiatric disorders: common pathways and future approaches. BMC medicine. 2020;18(1):1-14.
10. De Almeida Jr HL, Sartori DS, Jorge VM, Rocha NM, de Castro LAS. Phytophotodermatitis: A Review of Its Clinical and Pathogenic Aspects. Journal of Dermatological Research. 2016;1(3):51-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

11.Moslehi A, Hamidi-zad Z. Role of SREBPs in liver diseases: a mini-review. Journal of clinical and translational hepatology. 2018;6(3):332. (Persian)
12.Tian J, Goldstein JL, Brown MS. Insulin induction of *SREBP-1C* in rodent liver requires LXRα-C/EBPβ complex. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(29):8182-7.
13.Tarling E, Salter A, Bennett A. Transcriptional regulation of human *SREBP-1C* (sterol-regulatory-element-binding protein-1c): a key regulator of lipogenesis. Portland Press Ltd.. 2004;3(1):24-34.
14.Xiao J, So KF, Liong EC, Tipoe GL. Recent advances in the herbal treatment of non-alcoholic Fatty liver disease. Journal of traditional and complementary medicine. 2013;3(2):88-94.
15.Yao H, Qiao Y-J, Zhao Y-L, Tao X-F, Xu L-N, Yin L-H, et al. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. World Journal of Gastroenterology. 2016;22(30):6890.
16.Tsi D, Das N, Tan B. Effects of aqueous celery (Apium graveolens) extract on lipid parameters of rats fed a high fat diet. Planta medica. 1995;61(01):18-21.
17.Scott Luper N. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. Alternative Medicine Review. 1998;3(6):410-21.
18.Holmes A, Coppey LJ, Davidson EP, Yorek MA. Rat models of diet-induced obesity and high fat/low dose streptozotocin type 2 diabetes: effect of reversal of high fat diet compared to treatment with enalapril or menhaden oil on glucose utilization and neuropathic endpoints. Journal of diabetes research. 2015;2015(9):67-77.
19.Ahad NA, Yin TS, Othman AR, Yaacob CR. Sensitivity of normality tests to non-normal data. Sains Malaysiana. 2011;40(6):637-41.
20.Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP- 1c. Diabetes, obesity and metabolism. 2010;12:83-92.
21.Taher M, Ghannadi A, Karmiyan R. Effects of volatile oil extracts of Anethum graveolens L. and Apium graveolens L. seeds on activity of liver enzymes in rat. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2007;11(2):8-12. (Persian)
22.Singh A, Handa S. Hepatoprotective activity of Apium graveolens and Hygrophila auriculata against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. Journal of ethnopharmacology. 1995;49(3):119-26.
23.Meshkani R, Gorgani-Firuzjaee S. Role of SHIP2 in Oleate Induced De-Novo Lipogenesis. Paramedical Sciences and Military Health. 2015;10(2):26-34. (Persian)
24.Ebrahimi M, Fathi R, ANSARI PZ, TALEBI GE. Relative Gene Expression of Key Genes Involved in Lipid Metabolism, Following High Fat Diet and Moderate and High Intensity Aerobic Training in Rat's Liver. 2017;5(9)56-60. (Persian)
25.Hashemi Shahraki F, Ghatreh Samani K, Zia Jahromi N, Yaghobi A. Effects of hydroethanolic extract of kelussia odoratissima mozaff. Leaf on total antioxidant capacity and BMP7 gene expression in rat white adipose tissue. Journal of Medicinal Plants. 2018;2(66):113-21. (Persian)
26.Azarbayjani M, Banaeifar A, Arshadi S. The Effect of Aerobic Training and Adenosine on the Expression of *SREBP-1C* and A1 Receptor in Hepatic Fat-fed Rats. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019;14(1):1-9. (Persian)
27.Jemai R, Drira R, Makni M, Fetoui H, Sakamoto K. Colocynth (Citrullus colocynthis) seed extracts attenuate adipogenesis by down-regulating PPARγ/*SREBP-1C* and C/EBPα in 3T3-L1 cells. Food Bioscience. 2020;33:100491.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 10:02 +0330 on Saturday December 4th 2021

Original Article

The Effect of *Kelussia odoratissima Mozaff* Extract on *SREBP-1C* Gene Expression in Fatty Liver Rats and Healthy Rats

Zahra Haghshenas[1], Noosha Zia-Jahromi[2*]

Received:2021.04.09 Revised:2021.07.07 Accepted: 2021.07.10

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

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.2, Summer 2021

Pars J Med Sci 2021;19(2):23-32

Abstract:

Introduction:
Studies have shown that Kelussia lowers low-density lipoprotein levels. Due to the increasing number of patients with fatty liver in this study, we aimed to investigate the effect of Kelussia extract on the expression of *SREBP-1C* gene in obese mice with fatty liver.

Materials & Methods:
In the present study, 24 rats were divided into four groups: control, negative control, treatment and the second treatment. The two treatment groups received 400 and 800 ml/kg Kelussia extract by gavage, respectively. Rats were anesthetized with chloroform and after dissection, rat liver tissue was collected. Then RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Finally, *SREBP-1C* gene expression was performed using RT-PCR Real time technique and relevant analyzes were performed.

Results:
In the present study, the results showed that Kelussia extract at a dose of 800 mg/kg could further reduce the expression of *SREBP-1C* gene than a dose of 400 mg/kg in rats with fatty liver. It is statistically significant compared to the patient group (p=0.001). The results of biochemical tests confirm liver improvement in treated rats at a dose of 800 mg/kg.

Conclusion:
It seems that Kelussia extract reduces the expression of *SREBP-1C* gene due to its orange flavonoid, which plays an important role in the biogenesis of cholesterol, fatty acids and triglycerides. If approved in larger studies, it can be considered as a therapeutic target in fatty liver disease.

Keywords: Kelussia odoratissima Mozaff, *SREBP-1C* gene, Fatty liver

* Corresponding author Email: Nooshazia.59@gmail.com

www.SID.ir