Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 30, No. 4, Winter 2020 **ORIGINAL ARTICLE**

Effects of alcoholic extract of *Alhagi maurorum* on the expression level of hepatic Caspase-3 gene in male Wistar rats following the induction of diabetes mellitus

Tahmoores Shahrivar[1], Mokhtar Mokhtari[2], Vally Alipour[3]
[1] Ph.D Student , Department of biology, Faculty of Science, Islamic Azad University- Kazeroon branch, Kazeroon, Iran
[2]Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon, Iran
[3] Assistant Professor, Department of environmental health, school of public health, Hormozgan university of medical sciences and health services, Hormozgan, Iran

Abstract

Background: Many diseases, including diabetes, are involve in the development of liver disorders through changes in the expression of genes such as Caspase-3. In the present study, the impact of alcoholic extract of *Alhagi maurorum* on the expression level of liver Caspase-3 gene was investigated in male Wistar rats following the induction of diabetes mellitus by streptozotocin.
Materials and methods: In this experimental study, 42 male Wistar rats were divided into 6 groups. The control group was left untreated, the diabetic control group received one dose of 70 mg/kg streptozotocin, the experimental groups 1 and 2 received 250 and 500 mg/kg *Alhagi maurorum* alcoholic extract peritoneally respectively, and the experimental groups 3 and 4 first received streptozotocin followed by 250 and 500 mg/kg extracts respectively. To investigate the expression level of the Caspase-3 gene, liver samples were obtained from all the groups, and were evaluated using real time PCR.
Results: The expression of Caspase-3 gene, against β actine, increased significantly in experimental groups compared to the control group, while diabetic groups received extract showed reduced gene expression compared to the streptozotocin group.
Conclusion: It appears that *Alhagi maurorum* extract is effective in reducing hepatic gene expression of Caspase-3, which increases after using streptozotocin. This effect is possibly due to the anti-oxidants contents, such as flavonoids and anthocyanins.
Keywords: *Alhagi maurorum, Streptozotocin, Caspase-3, β actine, Rat.*

Cited as: Shahrivar T, Mokhtari M, Alipour V. Effects of alcoholic extract of Alhagi maurorum on the expression level of hepatic Caspase-3 gene in Male Wistar rats following the induction of diabetes mellitus. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): **408-417.**

Correspondence to: Mokhtar Mokhtari
Tel: *+98 9171811963*
E-mail: M. Mokhtari246@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-7364-0119
Received: 12 Feb 2020; **Accepted:** 11 May 2020

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۰، شماره ۴، زمستان ۹۹، صفحات ۴۰۸ تا ۴۱۷

Original Article

تاثیر عصاره الکلی خارشتر(*Alhagi maurorum*) بر میزان بیان ژن کاسپاز ۳ (Caspase-3) کبدی در موش صحرایی نر نژاد ویستار بدنبال القای دیابت شیرین

طهمورث شهریور[۱]، مختار مختاری[۲]، ولی علیپور[۳]

[۱] دانشجوی دکتری ، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
[۳] استادیار ، گروه بهداشت محیط ، دانشکده بهداشت محیط ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان ، هرمزگان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *در روند اختلالات کبدی بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت نقش دارند که از طریق تغییر در بیان ژن‌هایی از جمله کاسپاز ۳ عمل می‌کنند. در این تحقیق، تاثیر عصاره الکلی خارشتر بر میزان بیان ژن کاسپاز۳ کبدی در موش صحرایی نر به دنبال القای استرپتوزوتوسین بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، از ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. گروه کنترل هیچ تیمار دارویی دریافت نکرد، حیوانات گروه شاهد دیابتی ۷۰mg/kg استرپتوزوتوسین به صورت درون صفاقی دریافت کردند، حیوانات گروه تجربی ۱ و ۲به ترتیب ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg عصاره الکلی خارشتر دریافت کردند، و حیوانات گروه تجربی ۳و۴ ابتدا استرپتوزوتوسین و سپس ۵۰۰ mg/kg و ۲۵۰ عصاره دریافت کردند. برای بررسی ژن کاسپاز۳ نمونه برداری از کبد انجام و با استفاده از دستگاه Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین در گروه‌های دریافت کننده عصاره خارشتر افزایش بیان را نشان می‌دهد، در حالی که در گروه‌های دیابتی ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین با گروه استرپتوزوتوسین کاهش بیان ژن را نشان می‌دهد.*

نتیجه‌گیری: *احتمالا خارشتر به دلیل داشتن ترکیبات آنتی اکسیدانت مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در کاهش بیان ژن کاسپاز-۳کبدی که در روند استفاده از استرپتوزوتوسین افزایش یافته است، موثر است.*

واژگان کلیدی: *خار شتر، استرپتوزوتوسین، کاسپاز-۳، بتااکتین، رت.*

مقدمه

کبد در اعمال حیاتی متنوعی ازجمله متابولیسم، ترشح، ذخیره و سم زدایی انواع داروها نقش دارد (۱). در بیماری دیابت ، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش قند خون، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش عملکرد آنتی اکسیدانت‌ها رخ می‌دهد (۳،۲). استرپتوزوتوسین نوعی ماده آنتی بیوتیک و ضد سرطان برای القای دیابت نوع I است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) تولید می‌کند و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را کاهش می‌دهد (۴). استرپتوزوتوسین به عنوان یک آنالوگ N-acetylglocosamine برای ایجاد دیابت در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رهایی نیتریک اکساید، افزایش گلیکوزیله شدن پروتئین‌های پانکراس و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از دلایل تخریب سلول‌های بتای پانکراس در اثر STZ است (۵).

در دیابت القاء شده توسط STZ، روند آپوپتوزیز سیستمیک در کبد رخ می‌دهد. این عملکرد از طریق مسیرهای P53/ERK یا

آدرس نویسنده مسئول: هرمزگان، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت محیط ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان، مختار مختاری (**email**: M. Mokhtari246@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-8928-3649
تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۲/۲۲

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

سیگنال‌های ملکولی وساطت کننده P53 عمل می‌کند (۶). یکی از عوامل موثر در درمان بیماری‌ها ، گیاهان دارویی هستند و مواد طبیعی با منشاء گیاهی برای درمان و محافظت از کبد از گذشته مورد توجه بوده است. گیاهان دارویی در درمان سرطان، دیابت، آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی – عروقی نقش دارند. ترکیبات فعال مانند فلاونوئیدها، مواد فنولیک و آنتی اکسیدان‌ها به فراوانی در گیاهان دارویی یافت می‌شوند (۷). فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی دارای فعالیت های بیولوژیکی متعدد ازجمله توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی اکسیدانتی هستند. این ترکیبات در درمان و حفاظت سلول‌های کبدی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو نیز مورد توجه هستند (۸).

گیاه خارشتر (*Alhagi maurorum*) از جنس Alhagi از زیر تیره Papilionoidoea، بوته‌ای چند ساله، علفی مهاجم با ارتفاع ۵۰ تا ۸۰ سانتی متر، بدون کرک، سبز رنگ با منشاء ناحیه ایرانی – تورانی، متعلق به تیره پروانه آسا، دارای خارهای فراوان است (۹).

ترکیبات فتوشیمیایی خارشتر شامل، روغن‌های اساسی، ترکیب فنلی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و همچنین منبع غنی از مواد فعال مانند آنتی اکسیدان‌ها، فلاونوئیدها و مواد فنولیک هستند (۷،۱۰،۱۱). خارشتر حاوی اسیدهای چرب و استرول‌ها، فلاونوئیدها، کومارین-ها،آلکالوئیدها و ویتامین‌های مختلف است. استرول‌های غیر اشباع، تری ترپن‌ها، تانن‌ها، گلیکوزیدهای فلاوانون از قبیل الهاجیدین و الهاجیتین، پرآنتوسیانین‌ها و رزین‌ها است. روغن برگ‌های خارشتر برای درمان روماتیسم و یبوست استفاده می‌شود. عصاره آبی ریشه این گیاه برای بزرگ شدن لوله حالب و خروج سنگ کلیه تاثیر دارد. در حالی که عصاره متانولی خار شتر به عامل ضد اسهال و شربت سرفه گیاهی است (۱۲). خارشتر دارای ترکیبات فلاونوئید از جمله کوئرستین و کاتچین است که خصوصیات آنتی اکسیدانتی را بر عهده دارند (۱). فلاونوئیدها به ویژه کوئرستین، در درمان روماتیسم، تب، دمانس، پرفشاری خون، استفراغ، یبوست، درد، عفونت، آسم، دیابت، بیماری عصبی، درد قفسه سینه، تنظیم ایمنی، ضد التهاب، ضد آپوپتوز، آنتی اکسیدان قوی، درد معده، اسهال، تهوع، اختلالات قلبی و بیماری های تنفسی است. همچنین خارشتر دارای خصوصیات ضد اسپاسم، محرک اشتها، ادرار آور، خلط آور، ضد درد، آرامش بخش، آنتی باکتریال، شل کننده عروق، شل کننده برونش‌ها، محرک موضعی، مسهل و تقویت کننده قوای جنسی نیز است (۱۴، ۱۳). خارشتر حاوی اسیدهای چرب و استرول‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، آلکالوئیدها و ویتامین‌های مختلف است. استرول‌های غیر اشباع، تری ترپن‌ها، تانن‌ها، گلیکوزیدهای فلاوانون از قبیل الهاجیدین و الهاجیتین، پر آنتوسیانین‌ها و رزین‌ها است. علاوه بر این، ۶ گلیکوزید فلاونوئیدی اصلی در عصاره اتانولی آن وجود دارد. علاوه براین خارشتر دارای ترکیب Lupeol است که برای جلوگیری از رگ‌زایی، ضداکسیداتیو و ضد التهابی به کار می‌رود (۱۲).

کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌کنند. این آنزیم‌ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ازجمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدنDNA، ایجاد می‌کنند؛ بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است (۱۵).

کاسپاز ۳ یکی از افکتورهای کاسپاز است که به عنوان پروتئاز کلیدی شامل چندین سوبسترای سلولی از جمله اجزای نشانگر اصلی در آپوپتوز است. در واقع نقش دیابت در سلول‌های مختلف با استفاده از کاسپاز ۳ با استفاده از ایمونوهیستوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهند بیان کاسپاز ۳ در کبد در موش‌های دیابتی شده افزایش می‌یابد (۱۷،۱۶). مطالعات قبلی نشان می‌دهند در رت‌های دیابتی شده، هیپر گلیسمی از طریق افزایش فعالیت کاسپاز- ۳، باعث افزایش آپوپتوز در کبد می‌شود و ممکن است در روند بیماری در کبد دیابتیک سهیم باشد (۱۸). فعال شدن کاسپاز به میزان زیادی، مختص آپوپتوز است و تعیین فعالیت کاسپازها برای تمایز بین نکروز و آپوپتوز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۹).

علاوه بر نقش و اهمیت کاسپازها در فرایند آپوپتوز، کاسپازها در فرایند تکامل، تمایز و التهاب نیز دخالت دارند (۲۰). مطالعات مختلف نشان می‌دهند کاسپازهای اختصاصی نه تنها در آپوپتوز بلکه در سایر روندهای اساسی سلول نقش دارند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، در رت‌های دیابتی شده با STZ، هیپر گلیسمی از طریق افزایش فعالیت کاسپاز- ۳ باعث افزایش آپوپتوز در کبد شد، که نشان می‌دهد ممکن است در روند بیماری در کبد دیابتیک سهیم باشد (۱۸). در تحقیقات Haligur و همکارانش در سال ۲۰۱۲، تکنیک ایمونوهیستوشیمی افزایش بیان caspase-3 در کبد و کلیه رت‌های دیابتی شده با STZ را نشان داد. پیشنهاد شده است

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

یکی از مکانیزم های احتمالی بروز مشکل کبدی ممکن است افزایش فعالیت آپوپتوتیک باشد (۲۱،۱۶).

در میان فلاونوئیدها، کوئرستین توانایی بالایی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد. خاصیت ضد التهابی آن تقریبا ۶ برابر بیشتر از آسکوربیک اسید است. کوئرستین تولید سیتوکین‌ها را در ماکروفاژها مهار کرده و بنابراین التهاب را کاهش می‌دهد. کوئرستین آپوپتوز را در سلول‌های چند شکلی T98G توسط فعال کردن مسیرهای مرگ میتوکندریایی القاء می‌کند. قرار گرفتن سلول‌های T98G در معرض کوئرستین منجر به فعالیت کاسپاز ۳ و رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش ظرفیت غشایی میتوکندری می‌شود (۲۲). مطالعات نشان می‌دهند توانایی آنتی اکسیداتیو کوئرستین توسط گروه هیدروکسیل یا گروه کتکول موجود در آن ایجاد میشود. کوئرستین آپوپتوز را در انواع متنوعی از سلول‌های سرطانی توسط تنظیم فاکتورهای درونی و بیرونی القاء می‌کند (۲۳). کوئرستین و دیگر فلاونوئیدها اثرات ضد التهابی را از طریق کاهش مسیر NF-kB(NF-kappaB) انجام می‌دهند. اثر جلوگیری کننده فلاونوئیدها بر بیماری‌های کبدی، از طریق ممانعت از فعالیت NF-kB و بیان واسطه-گرهای پیش التهابی است (۲۴) . Apigenin (APG) فلاونوئیدی است که به طور فراوانی اثرات ضد التهابی را نشان می‌دهد. Apigenin منع کننده ویژه‌ای از PTK (Protein tyrosine kinase) است و فعالیت کاسپاز ۳ را القاء می‌کند (۲۵). کوئرستین دارای فعالیت آنتی اکسیداتیو، به دلیل توانایی حذف گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن است. کوئرستین دارای فعالیت‌های آپوپتوزی بر علیه سرطان‌های مختلف است. کوئرستین آپوپتوز را در انواع متنوعی از سلول‌های سرطانی توسط تنظیم فاکتورهای درونی و خارجی القاء می‌کند. دانشمندی به نام Robaszkiewicz و همکارانش نشان دادند کوئرستین با مقادیر ۵۰ میکرومول در محیط کشت و میتوکندری‌های جدا شده، رادیکال‌های سوپراکسید تولید می‌کند. فعالیت‌های کوئرستین با مقادیر کمتر از ۲۰ میکرومول فعالیت آنتی اکسیداتیو را نشان می‌دهد. مطالعات Watijen و همکارانش نشان دادند فلاونوئیدها با غلظت‌های کم سلول‌ها را از آپوپتوز القاء شده توسط پراکسید هیدروژن محافظت می‌کنند. غلظت بالای فلاونوئیدها با مقادیر ۲۵۰mg/kg باعث آسیب به DNA و آپوپتوز می‌شود (۲۶). با توجه به موارد فوق در این تحقیق میزان بیان ژن کاسپاز۳ در موش‌های دیابتی دریافت کننده استرپتوزوتوسین و دریافت کننده عصاره الکلی خارشتر و اثرات آن بر بیان ژن کاسپاز۳ و کاهش اثرات التهابی کبدی ناشی از دیابت بررسی شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با وزن تقریبی ۱۰ ±۲۰۰گرم در محدوده سنی ۲/۵ تا ۳ ماه استفاده شد.. کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی با رعایت اخلاق پزشکی درمطالعات تجربی و بر اساس معاهده هلسینکی انجام شد. حیوانات به ۶ گروه تقسیم شدند:

- گروه کنترل: حیوانات این گروه تحت تاثیر هیچ گونه استرسی از جمله تزریق دهانی قرار نگرفتند.
- گروه شاهد دیابتی: حیوانات این گروه ۷۰mg/kg استرپتوزوتوسین یک بار به صورت درون صفاقی در ابتدای دوره ۲ ماهه آزمایش دریافت کردند.
- گروه تجربی ۱: حیوانات این گروه ۲۵۰mg/kg عصاره الکلی خارشتر روزانه به طور دهانی طی ۲ ماه دریافت کردند.
- گروه تجربی ۲: حیوانات این گروه ۵۰۰mg/kg عصاره الکلی خارشتر روزانه به طور دهانی طی ۲ ماه دریافت کردند.
- گروه تجربی ۳: حیوانات این گروه ابتدا ۷۰mg/kg استرپتوزوتوسین دریافت کردند و سپس طی یک دوره دو ماهه روزانه ۲۵۰mg/kg عصاره الکلی خارشتر به طور دهانی دریافت کردند.
- گروه تجربی ۴: حیوانات این گروه ابتدا ۷۰mg/kg استرپتوزوتوسین دریافت کردند و سپس طی یک دوره دو ماهه روزانه mg/kg ۵۰۰ عصاره الکلی خارشتر به طور دهانی دریافت کردند (۲۸-۲۶).

کلیه حیوانات تحت دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۲ -۲۰درجه سانتی گراد و رطوبت کافی نگهداری شدند. تغذیه حیوانات مورد مطالعه توسط غذاهای آماده استاندارد و بدون محدودیت در آب و خوراک صورت گرفت (۲۹).

تهیه عصاره الکلی خارشتر

قسمت‌های هوایی خارشتر جمع آوری و چندین بار با آب مقطر شسته شد و سپس در سایه خشک شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

جدول ۱. توالی پرایمرها برای تکثیر قطعه مورد نظر دارای ژن های کاسپاز۳ و بتا اکتین

ژن	سکانس پرایمر		Amplicon length
Caspase3	Forward	F:5-CGGTATTGAGACAGACAGTGG-3	284 bp
	Reverse	R:5-TACACGGGATCTGTTTCTTTGC-3	
β-action	Forward	F:5-CATCCTCTTCCTCCCTGGAGA-3	198 bp
	Reverse	R:5-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3	

جدول ۲. شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

نام ژن	فعال سازی ابتدایی آنزیم	واسرشت شدن	اتصال آغازگرها	بسط ترکیبی	چرخه ها
Caspase-3	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه	۵۵درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه	۳۰
β- Action	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه	۴۹,۴درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه	۳۵

سپس توسط (Wiley mill) (Model 4-GMI, Germany) پودر شده و ۱۰۰ گرم از گیاه با ۱ لیتر اتانول ۷۰ درصد یا با ۱ لیتر آب مقطر برای یک ساعت قرار داده شد. پس از فیلتر، تحت کاهش فشار ۴۰ درجه با استفاده از rotary evaporator(Buchi, Model 462, Germany) استخراج انجام شد. با استفاده از دستگاه Lyophilizer فریز و خشک شده و دسترسی به عصاره‌های خشک انجام شد. در نهایت سوسپانسیون آبی از عصاره‌های آبی یا اتانولی تهیه و برای تجویز دهانی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

نحوه تجویز دارو و روش خونگیری

ابتدا مقادیر مختلف دارو استرپتوزوتوسین با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد. پس از ۱۲ ساعت بی‌غذایی شبانه با تزریق داخل صفاقی ۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین حل شده در سرم فیزیولوژی دیابت القاء شد (۳۰). ۵ روز پس از تزریق STZ، از نمونه‌های خونی تهیه شده برای تعیین میزان گلوکز و تایید دیابتی شده توسط گلوکومتر استفاده شد و سطح گلوکز خون ثبت شد. موش‌هایی با سطوح گلوکز بیش از ۲۵۰Mg/dl دیابتی محسوب شدند. برای اطمینان از دیابتیک ماندن حیوانات در گروه‌های ۱۴روزه OGTT یا تست تحمل گلوکز انجام شد. به این طریق که درپایان ۱۴روز، پس از خون گیری از موش‌ها به هر حیوان gr/kg ۱ گلوکز به ازای وزن بدن به طور دهانی با گاواژ داده شد. ۱۰ دقیقه و ۶۰ دقیقه پس از دادن گلوکز، خون با استفاده از ورید دمی بررسی شد و سطح گلوکز خون ثبت شد (۳۱).

برای استخراج RNA مقدار ۵۰ گرم بافت منجمد کبد به روش هموژنیزه کردن سرد پودر شد و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور جداسازی RNA، از کیت RNA-plus طبق دستورالعمل شرکت پیشگام استفاده شد و سپس محلول RNA استخراج شد. با استفاده از کیت Dnase1 Nase، از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم تخریب کننده RNA پاکسازی شد. از هر نمونه، ۲ میلی گرم mRNA برای سنتز اولین رشته DNA استفاده شد. سپس برای سنتز cDNA از کیت cDNA synthesis استفاده شد. به این صورت که برای ساخت cDNA از آغازگر (primer) اولیگو (oligo dt) که به دم پلی A متصل می‌شود، استفاده شد. کلیه مراحل استخراج زیر هود لامینار انجام و قبل از شروع کار زیر هود با وایتکس و الکل ۷۰ ٪ تمیز شد و RNA استخراج شده در فریزر ۸۰- نگهداری شد. میزان بیان ژن‌های کاسپاز- ۳ و بتا- اکتین در این بافت‌ها با استفاده از تکنیک Real Time PCR اندازه گیری شد (۳۴-۳۲). توالی پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن کاسپاز- ۳ و همچنین ژن بتا- اکتین به عنوان استاندارد داخلی نشان داده شده است (جدول ۱). بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر در تیمارهای مختلف با استفاده از روش کمیت سنجی Real time (PCR) با استفاده از دستگاه 96 lightcycler Roche انجام گرفت. محلول واکنش Real time PCR شامل ۴ میکرولیتر Master mix Hot Taq evagreen (Gene All, Korea)، ۲ میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر پرایمر و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود . همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن تنظیم و برای کمیت سنجی روش Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲) (۳۵،۳۶،۳۷). برای بررسی اختصاصی بودن محصول تکثیر شده ، منحنی دوب مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روشqReal Time PCR داده های خام به صورت (Threshold cycle (Ct از دستگاه استخراج شد. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از روش مقایسه میزان تغییرات سطح آستانه هر ژن (Ct) با میزان

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

آن در نمونه شاهد (ΔΔCt) استفاده شد. برای هـر نمونـه ۳ تکـرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی خارشتر بر بیان mRNA β-actin و caspase-3 در بافت کبد به دنبال القاء دیابت توسط STZ نشان داد به طور کلی نمونه-های شاهد نسبت به هم هیچ گونه اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما مقایسه ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین در گروه‌های تجربی دریافت کننده ۵۰۰ mg/kg و ۲۵۰ عصاره الکلی خارشتر با گروه کنترل افزایش بیان را نشان داد. در حالی که در گروه‌های دیابتی دریافت کننده ۵۰۰mg/kg و ۲۵۰ عصاره خارشتر، ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین با گروه استرپتوزوتوسین کاهش بیان ژن را نشان داد (جدول۳، نمودار۱، شکل۱).

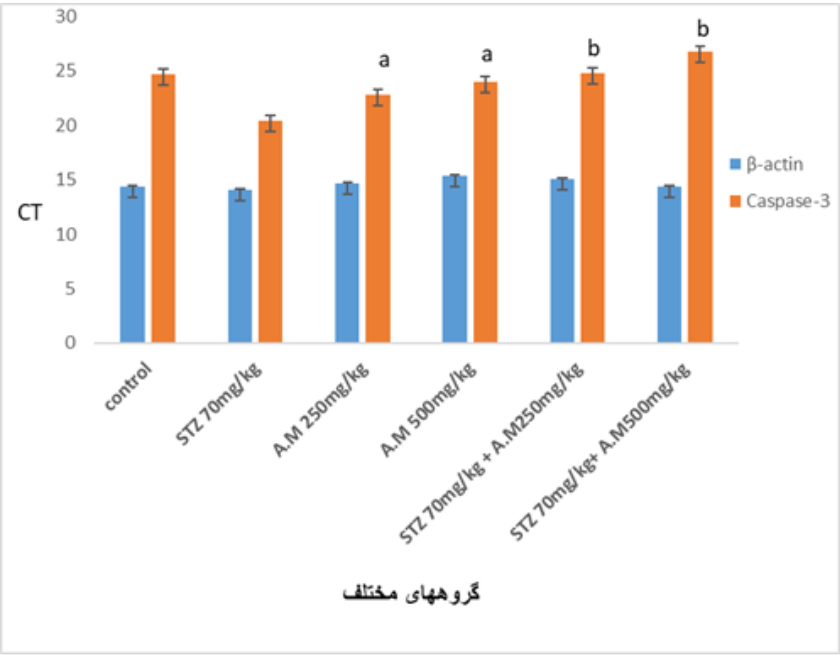
بحث

آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمیت بیان ژن، اطلاعات بدست آمده از بیان ژن caspase-3 و نتایج حاصل از بتااکتین به عنـوان ژن مرجـع نـرمـال سازی شد. مطالعات مربوط به تکثیر میزان CT(Threshold Cycle) نمونه‌ها نشان داد مقایسه میانگین ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین در گروه-های تجربی دریافت کننده ۵۰۰ mg/kg و ۲۵۰ عصاره الکلی خارشتر با گروه کنترل افزایش بیان را نشان می‌دهد.

جدول۳. مقایسه اختلاف CT ژن کاسپاز۳ و بتا اکتین به دنبال تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی خارشتر به دنبال القای دیابت توسط STZ

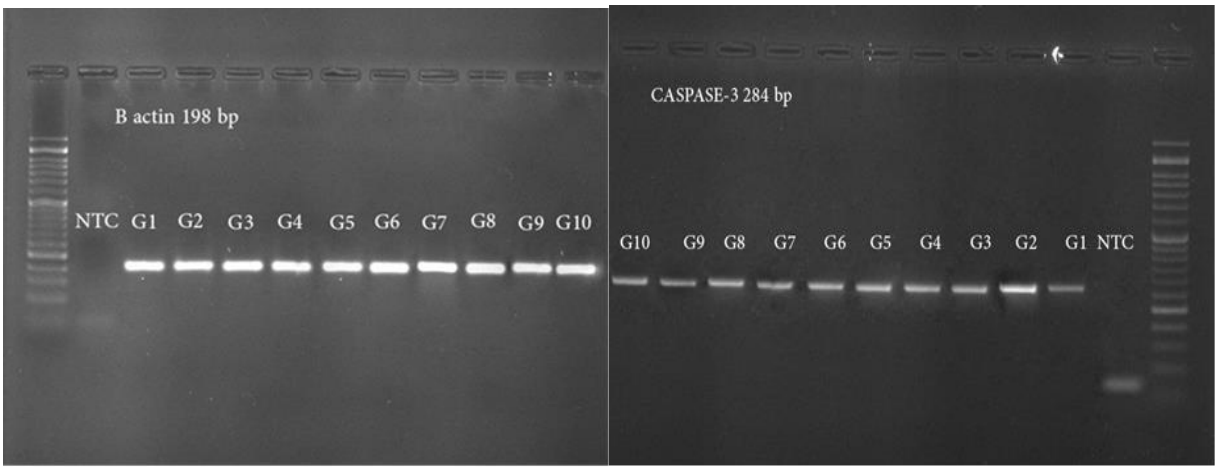
group	β actin(Cq)	Error	Caspase-3(Cq)	Error	$2^{(-\Delta\Delta Ct)CASPASE3}$
control	14.4	0.03	24.66	0.08	1
۷۰mg/kg STZ	14.1	0.06	20.38	0.04	15.77
۲۵۰mg/kg A.M	14.7	0.05	22.78	0.27	3.86 [a]
۵۰۰mg/kg A.M	15.4	0.04	23.95	0.72	3.27 [a]
۷۰mg/kg STZ + 250 mg/kg A.M	15.1	0.02	24.80	0.07	1.47 [b]
۷۰mg/kg STZ + 500 mg/kg A.M	14.4	0.07	26.75	0.52	0.23 [b]

حرف a نشان دهنده اختلاف معنی دار $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ژن کاسپاز۳ با ژن بتا اکتین بین گروه کنترل با گروههای تجربی دریافت کننده عصاره الکلی خارشتر . حرف b نشان دهنده اختلاف معنی دار $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ژن کاسپاز ۳ با ژن بتا اکتین بین گروه شاهد دیابتی با گروههای تجربی دریافت کننده STZ +عصاره الکلی خارشتر



نمودار ۱. تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی خارشتر بر بیان ژن β-actin و caspase-3 در بافت کبد به دنبال القاء دیابت توسط STZ . حرف a نشانه تفاوت گروه کنترل با گروههای تجربی دریافت کننده عصاره الکلی خارشتر می باشد ، حرف b نشانه تفاوت گروه شاهد دیابتی با گروههای تجربی دریافت کننده عصاره می باشد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]



شکل ۱. تاثیر غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی خارشتر بعد از ۲ ماه بر بیان ژن کاسپاز۳ .میزان بیان نسبی mRNA ژن کاسپاز۳ پس از نرمال سازی با ژن بتااکتین محاسبه شد. .(G:گروههای مختلف)

در حالی که مقایسه میانگین ژن کاسپاز۳ در برابر ژن بتااکتین در گروههای دیابتی دریافت کننده mg/kg ۵۰۰ و ۲۵۰ عصاره خارشتر با گروه استرپتوزوتوسین کاهش بیان ژن را نشان می‌دهد.

کاسپازها پروتئازهای ویژه آسپارتیل – سیستئین هستند و در آپوپتوز نقش اصلی را بر عهده دارند. کاسپاز ۳ جریان پایین رونده مسیرهای آپوپتوز را نشان می‌دهد. مطالعات ژن‌های کاسپاز نشان می‌دهد نه فقط در آپوپتوز، بلکه در دیگر فرایندهای عملکردی نقش دارد. مطالعات Invitro پیشنهاد می‌دهند مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپاز برای آپوپتوز سلول‌های β ضروری است (۱۶).

فلاونوئیدها قادر به مهار فعالیت کاسپاز در رفتارهای وابسته به دوز در محیط invivo و invitro هستند. دانشمندی به نام quati نشان داد myricetin که گروهی از فلاونوئیدها هستند، قادر به منع فعالیت کاسپاز۳ در سلول‌های عصبی موش در محیط کشت است و myricetin پیوندهایی با جایگاه فعال کاسپاز۳ ایجاد می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند تنوعی از فلاوئونیدها، کاسپاز ۱، ۳ و ۷ را منع می‌کنند (۳۹، ۳۸).

آنتوسیانین‌ها به طور گسترده‌ای در گیاهان وجود دارند و فراوان‌ترین فلاوئوئیدها هستند. دانشمندی به نام Dowen-Forbes در سال ۲۰۱۰ گزارش داد آنتوسیانین‌ها در بافت‌های فراوانی از جمله کبد، اثرات آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی را نشان می‌دهند. آنتوسیانین‌ها رادیکال‌های آزاد را بررسی، اشغال کرده و آسیب به ژنوم سلول‌های طبیعی که توسط استرس اکسیداتیو ایجاد شده است را کاهش می‌دهند و از جهش‌های ژنی جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها بر روی پروتئین‌های خانواده Bc1 اثر می‌کنند، منع کننده خانواده پروتئین آپوپتوز هستند و پاسخ آپوپتوز از طریق مسیرهای وابسته به کاسپاز را فعال می‌کنند. Reddivari در سال ۲۰۰۷ گزارش داد آنتوسیانین‌های القاء کننده میتوکندری از طریق رها سازی اندونوکلئاز G و فاکتور القاء کننده از طریق مسیر JNK از طریق گیر انداختن آپوپتوز مستقل از کاسپاز عمل می‌کنند (۳۹). Wang در سال ۲۰۱۳ گزارش داد آنتوسیانین‌ها به طور قابل توجهی با غلظت کمتر CRP (C- reactive protein) که یک مارکر چاقی و و دیابت است همراه هستند. عصاره آنتوسیانین افزایش وزن بدن را مهار می‌کند و زمینه لیپیدی کبد و سرم را کاهش می‌دهد (۴۰).

عصاره‌های غنی از آنتوسیانین، اثرات پیش آپوپتوز در چندین نوع سلول در invitro را نشان می‌دهند. در مسیرهای طبیعی، رفتار آنتوسیانین در سلول‌های سرطانی در نتیجه افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری، رهاسازی سیتوکروم C تعدیل پروتئین‌های پیش و ضد آپوپتوز وابسته به کاسپاز را نشان می‌دهد (۴۱). Martin – sanz و همکارانش در سال ۲۰۰۲ گزارش دادند هپاتوسیت‌ها قادر به پاسخ سیتوکین‌های پیش التهابی هستند و بیان ژن‌هایی که پاسخ های وساطت کننده التهابی هستند را هدایت می‌کنند. یکی از سیتوکین‌های اصلی رها شده TNF-α است که با TNF-R1(Tumor necrosis factor receptor 1) در ارتباط است و بنابراین فعالیت (NF-kB(kappaB یا مسیر فعالیت کاسپاز را شروع می‌کند و نقش اصلی را در آپوپتوز انجام می‌دهد (۴۲). توانایی آنتی اکسیداتیو کوئرستین توسط گروه هیدروکسیل یا گروه کتکول موجود در آن ایجاد می‌شود. کوئرستین آپوپتوز را در انواع متنوعی از سلول‌های سرطانی توسط تنظیم فاکتورهای درونی و بیرونی القاء می‌کند (۲۳).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

در سطح بیان ژن، عصاره الکلی خارشتر با مقادیر mg/kg ۵۰۰ و ۲۵۰ باعث کاهش بیان ژن کاسپاز۳ در موش‌های دیابتی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین شد که احتمالا به علت خاصیت آنتی اکسیدانتی ترکیبات موثر خارشتر در کاهش بیان ژن های موثر در التهابات کبدی است. عصاره الکلی خارشتر می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلف موجب اثرات حفاظتی بر تغییرات بیان ژن مرتبط با کبد القاء شده توسط استرپتوزوتوسین شود.

نتایج این مطالعه نشان داد، استرپتوزوتوسین باعث تخریب بافت کبدی و افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و التهابات کبدی ناشی از آن می‌شود. عصاره الکلی خارشتر به واسطه خواص آنتی اکسیدانتی به خصوص فلاونوئیدها (کاتچین و کوئرستین) و آنتوسیانین‌ها، باعث کاهش بیان ژن کاسپاز۳ به دنبال سمیت کبدی استرپتوزوتوسین می‌شود.

REFERENCES

1. Raju SBG, Battu RG, Manju latha YB, Srinivas K. Anti-hepatotoxic activity of smilax china roots on CCL4 induced hepatic damage in rats. Int J Pharm Pharm Sci 2012 ; 4:494-496.

2. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radical, transition metods and oxidative stress in the etiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull 1993;49:642-652.

3. Desco MC, Asensi M, Marquenz R, Martine z-valls J, Vent M, Pollard FV, et al. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type-1 diabetes:protection by allopurinol. Diabetes 2002;51:118-124.

4. Mamdouh M, Abdel-Raheim MA, Meki. Oxidative Stress in Streptozotocin – induced Diabetic Rats: Effecs of Garlic Oil and Melatonin. Comp Biochem Physiol B 2003;135:539-547.

5. Harald R, Walfish P G, Thorsten S, Braun J, Reinhard F, Jurgen He, et a. CTLA4 Alanin-17 confers Genetic suscebtibility to Graves Disease and type 1 Diasbetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:143–146.

6. Francés DE, Ronco MT, Monti JA, Ingaramo PI. Hyperglycemia induces apoptosis in rat liver through the increase of hydroxyl radical: new insights into the insulin effect. J of Endocri 2010;205:187–200.

7. Bahmani M, Saki K, Shahsavari S. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5: 858–64.

8. Anbarasu C, Rajkapoor B, Bhat KS, Giridharan J, Amuthan A A, Satish K. Protective effects of pisonia aculeata on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats. Asian Pac J Trop Biomed 2012;2:511-15.

9. Hashemi Z, Rezanejad F. Morphological and developmental study of Alhagi pseudoalhagi (M. B.) Desv. flower and anatomical features. J Plant Biology 2013;5:31-43. [in Persian]

10. Shakiba Y, Rezatofighi SE, Seyyed-Nejad SM, Ardakani MR. Antiviral Activity of *Alhagi maurorum* Medik's Methanolic Extract on Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) in Cell Cultures. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2016;17:2-5.

11. Yaghoubian F, Cheraghi J, Mahmudi M. Evaluating the Protective Effect of Hydroalcohlic Extract of Arial Parts of *Alhagi Maurorum* on Gentamicin induced-acute Nephrotoxicity in Rat. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2013;14:73-81. [In Persian]

12. Sheweita M. Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activities in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rats: Role of *Alhagi maurorum* Extracts. Oxid Med Cell Longev 2016:8.

13. Jaimand K, Asli AH, Monfared A. Extraction and Determination of Quercetin in Achilleamillefolium L., *Achilleabieberstinuii Afan.* and *Achilleatenuifolia Lam*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2011;27: 529-539. [In Persian]

14. Derakhshanian H, Marjanmehr SH, Ghadbeigi S. Evaluation of the protective effects of quercetin in biliary cirrhotic rats. Tehran University Medical Journal 2013;71:1-6. [In Persian]

15. Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immun Methods 2002; 265:97-110.

16. Haligur M, Topsakal S, Ozmen O. Early degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver, and kidney in rats: an immunohistochemical study. Exp Diabetes Res 2012;2012:120645.

17. Park N. Evaluation of Effects of Chinese Prescription Kangen-karyu on Diabetes-Induced Alterations such as Oxidative Stress and Apoptosis in the Liver of Type 2 Diabetic db/db Mice. Evid Based Complementary Altern Med 2012;12.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]

[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

18. Minna W, Razqallah H. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. Genes Dev 1998;12:806–19.

19. Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, et al. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. J Neurosci 1997;17:553-62.

20. Sadowski-Debbing K, Coy J, Mier W, Hug H, Loss M. Caspases – Their Role in Apoptosis and Other Physiological Processes as Revealed by Knockout Studies. Arch Immunol Ther Exp 2002;50:19-34.

21. Marie-Luise B, Fang L. Attenuation of Interstitial Fibrosis and Tubular Apoptos in db/db Transgenic Mice Overexpressing Catalase in Renal Proximal Tubular Cells. Diabetes 2008;57:451-9.

22. Vidak M, Rozman D, Komel R. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. Molecules 2015;20:19406-19432.

23. Ju-Suk N, Sharma A, Nguyen RT. Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. Molecules 2016;21:108.

24. Mediavilla -García V, Crespo AI, Pilar S, Collado A, Estelle A. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. Eur J Pharmacol 2007;557:221-229.

25. Das A, Banik N L, Ray S K. Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes. Cancer 2010;116:164–176.

26. Namjoo AR, MirVakili M, Rafieian-Kopaei M, Faghani M. Histopatological and biochemical effects of subcute toxicity of lemon balm hydroalcoholic extract on liver and kidney tissues in the surri mice. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;15:62-72. [In Persian]

27. Gulzar A, Alhagi M. A Plant Genus Rich in Bioactives for Pharmaceuticals. Phytother Res 2015;29:1-13.

28. Arbid S. Protective effect of Al-hagi graecorum in alloxan- induced diabetic rats. Der Pharma Chemica 2016;8:8-15.

29. Suthar P, Mathur K. Traditional uses, phytochemistry, pharmacological properties of plant alhagi maurorum (medik.): a review. World J Pharm Pharm Sci 2016;5:4.

30. Ashraf H, Zare S, Farnad N. The effect of aqueous extract of barberry fruit on liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2014;15:1-9. [In Persian]

31. Norina A, Nurzakiah MS. Protective Effect of the Ethanol Extract of Zingiber officinale Roscoe on Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Rats. J Sains Kes Mala 2004;2:85-95.

32. Pouraboli I, Nazari S, Ranjbar B, Shariati M, KargarJahromi H. Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effects of Daucuscarota ssp. sativum Seeds Extract in Diabetic Rats. J Babol Univ Med Sci 2014;16: 33-40. [In Persian]

33. Kazeminasab F, Marandi M, Ghaedi K, et al. Endurance training enhances LXRα gene expression in Wistar male rats. Eur J Appl Physiol 2013;113:2285–90.

34. Ahmadi S, Mohammadian Farsani A, Karami Z, Khosrobakhsh F, Rostamzadeh J. Increase in Nociception Threshold and Decrease in Mu-Opioid Receptor Gene Expression in Liver of a Rat Model of Hepatic Encephalopathy. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam 2015;3:1-10. [In Persian]

35. Gharavi M J, attorney L, Sharif M. Review of Quantitative Diagnostic Methods by Real Time PCR. Diagnostic Laboratory 2013;97:1-7. [In Persian]

36. Pourhamzeh M, Mahmoudian Z G, Saidijam M. The Effect of Silver Nanoparticles on the Biochemical Parameters of Liver Function in Serum, and the Expression of Caspase-3 in the Liver Tissues of Male Rats. Avicenna J Med Biochem 2016;4:35557.

37. Malekinejada H, Rezabakhsha A, Rahmani F.Paraquat Exposure Up-regulates Cyclooxygenase-2 in the Lungs, Liver and Kidneys in Rats. Iran J Pharmaceutical Research 2013;12:887-96.

38. Wenfang L, Wang G, Yakovlev AG. Identification and Functional Analysis of the Rat Caspase-3 Gene Promoter J Biol Chem 2002; 277:8273–78.

39. White JB, Beckfordb J, Yadegarynia S. Some natural flavonoids are competitive inhibitors of Caspase-1, −3 and −7 despite their cellular toxicity. Food Chem 2012;131:1453-59.

40. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. Br J Pharmacol 2017;174:1226–43.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]

[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]

41. Li D, Wang P, Luo Y, Zhao M, Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57:1729–41.

42. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett 2008;269:281–90.

43. Frances DI, Ingaramo PI, Ronco MT, Carnovale CE. Diabetes, an inflammatory process: Oxidative Stress and TNF-alpha involved in hepatic complication. J Biomed Sci Eng 2013;6:645-53.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.7.4]

[DOI: 10.29252/iau.30.4.408]