

## Protective Effect of Berberine Chloride and Aerobic Training on Liver Nrf2/HO-1 Pathway and PPAR $\gamma$ in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Sahraei M, Abdi A\*, Jalal H

Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

\* *Corresponding author.* Tel: +981144267687, Fax: +981143217009, E-mail: a.abdi58@gmail.com

Received: Jan 28, 2021 Accepted: Mar 10, 2021

### ABSTRACT

**Background & objectives:** The increased incidence of metabolic diseases (e.g., diabetes and obesity) has seriously affected human health and life safety worldwide. It is of great significance to find effective drugs from natural compounds and exercise to treat metabolic diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of berberine chloride with aerobic training on Liver Gene Expression Nrf2, HO-1 and PPAR $\gamma$  in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

**Methods:** In this experimental study, 32 male Wistar rats were randomly divided into four groups (n=8): Diabetes (DM), Diabetes-Berberine (BDM), Diabetes-Aerobic Training (TDM), Diabetes-Aerobic Training -Berberine (TBDM). Diabetes was induced by injection of STZ in male rats. Berberine chloride (30 mg/kg/day) were administered orally, by gavage, once a day. Training groups have performed a progressive aerobic running program (at 10-18 m/min, 10-40 min/day, and 5 days/week) on a motor-driven treadmill for six weeks.

**Results:** There was a significant increase in Nrf2 and HO-1 expression in BDM in BDM ( $p=0.027$  and  $p=0.038$ , respectively), TDM ( $p=0.022$  and  $p=0.028$ , respectively) and TBDM ( $p=0.000$  and  $p=0.000$ , respectively). This increase was also observed in TBDM groups compared to BDM ( $p=0.034$  and  $p=0.034$ , respectively) and TDM ( $p=0.043$  and  $p=0.046$ , respectively). PPAR $\gamma$  was significantly increased in TDM ( $p=0.046$ ) and TBDM ( $p=0.001$ ) groups.

**Conclusions:** Berberine chloride combination with exercise may possibly inhibit STZ-induced liver damage through up-regulating the Nrf2/HO-1 pathway and PPAR $\gamma$ .

**Keywords:** Exercise; Berberine Chloride; Nrf2; PPAR $\gamma$ ; Diabetes

## اثر محافظتی بربرین کلراید و تمرین هوازی بر مسیر Nrf2/HO-1 و PPAR $\gamma$ کبدی موش‌های صحرایی دیابتی با استرپتوزوتوسین

مژگان صحرایی، احمد عبدی\*، حامد جلال

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۱۱۴۳۲۱۷۱۲۶ فاکس: ۰۱۱۴۳۲۱۷۰۰۹ پست الکترونیکی: a.abdi58@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** افزایش شیوع بیماری‌های متابولیک (مثل: دیابت و چاقی) به طور جدی سلامت انسان و ایمنی زندگی را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار داده است. یافتن داروهای موثر با ترکیبات طبیعی و فعالیت ورزشی برای درمان بیماری‌های متابولیک از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر مصرف بربرین کلراید با تمرین هوازی بر بیان ژن Nrf2، HO-1 و PPAR $\gamma$  کبدی موش‌های صحرایی دیابتی با استرپتوزوتوسین (STZ) می‌باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، ۳۲ موش صحرایی نر ویستار به طور تصادفی به چهار گروه (n=8): دیابت (DM)، دیابت-بربرین (BDM)، دیابت-تمرین هوازی (TDM)، دیابت-تمرین هوازی-بربرین (TBDM) تقسیم شدند. دیابت با تزریق STZ در موش‌های نر القا شد. بربرین کلراید (۳۰ mg/kg/day) یک بار در روز به صورت خوراکی با گاوآذ خورانده شد. گروه‌های تمرین به مدت شش هفته برنامه تمرین هوازی فزاینده (۱۸-۱۰ متر در دقیقه، ۶۰-۱۰ دقیقه در روز، پنج روز در هفته) را روی تردمیل انجام دادند.

**یافته‌ها:** بیان Nrf2 و HO-1 در گروه‌های BDM (به ترتیب  $p=0/027$  و  $p=0/038$ )، TDM (به ترتیب  $p=0/022$  و  $p=0/028$ )، TBDM (به ترتیب  $p=0/000$  و  $p=0/000$ ) افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش در گروه‌های TBDM نسبت به BDM (به ترتیب  $p=0/034$  و  $p=0/034$ ) و TDM (به ترتیب  $p=0/043$  و  $p=0/046$ ) نیز مشاهده شد. PPAR $\gamma$  در گروه‌های TDM ( $p=0/046$ ) و TBDM ( $p=0/001$ ) افزایش معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** بربرین کلراید همراه با فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق تنظیم افزایشی مسیر Nrf2/HO-1 و PPAR $\gamma$  می‌تواند آسیب کبدی ناشی از STZ را مهار کند.

**واژه‌های کلیدی:** فعالیت ورزشی، بربرین کلراید، Nrf2، PPAR $\gamma$ ، دیابت

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۰

### مقدمه

در حال حاضر بسیاری از افراد در سراسر دنیا به بیماری دیابت مبتلا هستند که بیش از ۹۰ درصد از این مبتلایان را دیابت نوع ۲ (T2DM)<sup>۱</sup> تشکیل می‌دهد. دیابت باعث اختلال در متابولیسم

کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها شده و همچنین باعث افزایش میزان قند خون می‌شود. این اختلالات باعث آسیب اندام‌هایی از قبیل کلیه، قلب، چشم، اعصاب و کبد شده و منجر به بیماری‌هایی از جمله آترواسکلروز<sup>۲</sup>، رتینوپاتی<sup>۱</sup>، نفروپاتی<sup>۲</sup> و اختلالات کبدی

<sup>2</sup> Atherosclerosis

<sup>1</sup> Type 2 Diabetes Mellitus

رادیکال‌های پراکسید و صدمات بافتی می‌شود. از این رو بهبود مسیر Nrf2/HO-1 روش درمانی مناسب برای کنترل و درمان دیابت می‌باشد. گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پروکسی‌زومها (PPAR $\gamma$ )<sup>۱۰</sup> نیز یک عامل رونویسی ناشی از لیگاند است که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و همچنین پاسخ‌های التهابی دارد [۹]. گزارش شده که فعال‌سازی PPAR $\gamma$  باعث تعدیل بیان چندین آنتی‌اکسیدان شده و پاسخ‌های ضد التهابی را القاء می‌کند [۱۰]. مطالعات قبلی نشان داده که فعال‌سازی Nrf2 و یا PPAR $\gamma$  باعث محافظت کبد در برابر آسیب‌های ناشی از مصرف دارو می‌شود [۱۱، ۱۲]. پژوهش‌ها نشان داده که چندین پلی‌فنول طبیعی فعال‌کننده Nrf2 [۱۳] و PPAR $\gamma$  [۱۴] باعث بهبود دیابت می‌شود. بربرین، آلکالوئیدی ایزو کوئینولین<sup>۱۱</sup> می‌باشد که دارای اثرات دارویی متعدد از جمله کاهش قند خون، آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب می‌باشد [۱۵، ۱۶]. مطالعات نشان داده که بربرین از طریق کاهش التهاب و فشار اکسایشی باعث محافظت کبد در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید<sup>۱۲</sup> می‌شود [۱۶]. همچنین، بربرین باعث تنظیم PPAR $\gamma$  در بافت چربی موش‌های T2DM شد [۱۵]. علاوه بر این، در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که بربرین باعث تنظیم بیان Nrf2، HO-1 و PPAR $\gamma$  کبدی موش‌های صحرایی مسموم شده با متوترکسات (MTX)<sup>۱۳</sup> می‌شود [۱۴]. علاوه بر بربرین، فعالیت ورزشی نیز می‌تواند بر این مسیر تاثیر داشته باشد. مطالعات نشان داده که فعالیت ورزشی با تنظیم افزایش Nrf2، HO-1 و SOD باعث کاهش فشار اکسایشی می‌شود [۱۷]. به نظر می‌رسد، مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با Nrf2 دارای اثرات

می‌شود [۱]. بنابراین مدیریت افزایش قند خون از اهداف اصلی درمانی برای دیابت می‌باشد. داروهای کاهش‌دهنده قند خون مورد استفاده در درمان دیابت باعث افزایش ترشح انسولین و یا بهبود حساسیت به انسولین شده و همچنین از طریق تنظیم کاهشی گلیکوئتوزنز<sup>۳</sup>، تولید گلوکز کبدی را مهار می‌کند [۲]. دیابت را می‌توان با استفاده از داروهای کاهش‌دهنده قند خون مدیریت کرد، با این حال در بسیاری از بیماران این روش قادر نیست قند خون را به سطح طبیعی برگرداند [۳]. سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۴</sup> استفاده از محصولات گیاهی طبیعی و فعالیت ورزشی را برای مدیریت درمان دیابت توصیه می‌کند. محصولات گیاهی و فعالیت ورزشی رقیب خوبی برای درمان‌های دارویی می‌باشد. افزایش قند خون در طولانی مدت باعث افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>۵</sup> شده و تولید بیش از حد ROS باعث آسیب بافتی می‌شود [۴]. دیابت با افزایش فشار اکسایشی همراه بوده و استرس اکسایشی نقش مهمی در پیشرفت دیابت دارد. فاکتور رونویسی Nrf2<sup>۶</sup> تنظیم‌کننده اصلی اثرات دفاعی آنتی‌اکسیدان بوده که بیش از ۲۰۰ ژن محافظ سلول را در برابر فشار اکسایشی تنظیم می‌کند [۵]. Nrf2 یک فاکتور رونویسی متعلق به خانواده زیپ لوسینی بازی (ZIP)<sup>۷</sup> می‌باشد [۶]. Nrf2 با اتصال به keap1<sup>۸</sup> در سیتوزول مهار می‌شود [۷]. استرس اکسیداتیو باعث انتقال Nrf2 به هسته شده، جایی که در آن آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و هم-اکسیژناز-۱ (HO-1)<sup>۹</sup> تنظیم افزایشی دارد [۸]. مطالعات نشان می‌دهد، اختلال Nrf2 در دیابت باعث تجمع

<sup>1</sup> Retinopathy<sup>2</sup> Nephropathy<sup>3</sup> Glyconeogenesis<sup>4</sup> World Health Organization<sup>5</sup> Reactive Oxygen Species<sup>6</sup> Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2<sup>7</sup> Basic-Leucine Zipper Protein<sup>8</sup> Kelch Like ECH-Associated Protein1<sup>9</sup> Heme Oxygenase-1<sup>10</sup> Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma<sup>11</sup> Isoquinoline Alkaloids<sup>12</sup> Cyclophosphamide<sup>13</sup> Methotrexate

آزمایش در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری شدند. دمای محیط  $22 \pm 1/4$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت  $55/6 \pm 4$  درصد بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. پس از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه، القای دیابت و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل: دیابت (DM)، دیابت- بربرین (BDM)، دیابت- تمرین هوازی (TDM)، دیابت- تمرین هوازی- بربرین (TBDM) بودند. موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین، یک برنامه شش هفته‌ای (۵ روز هفته) تمرین هوازی را اجرا کردند. در حالی که دیگر گروه‌ها در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند.

#### روش القای دیابت

در این مطالعه موش‌های صحرایی با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین<sup>۴</sup> (ساخت شرکت سیگما با کد: S0130)، دیابتی شدند. القای دیابت با تزریق تک دوز ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات به صورت داخل صفاقی صورت گرفت. برای تشخیص دیابتی بودن موش‌های صحرایی، ۷۲ ساعت پس از تزریق با ایجاد جراحت کوچک توسط لانس در دم حیوان یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و مقدار قند خون اندازه‌گیری شد، که قند خون ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، حاکی از دیابتی شدن موش‌ها بوده است [۲۰].

#### نحوه تهیه و مصرف بربرین کلراید

مکمل مورد استفاده، پودر بربرین کلراید هیدرات (شرکت سیگما با کد: 14050)، از گیاه زرشک با درجه خلوص ۹۰٪ بود. این پودر در هر جلسه به اندازه مورد نیاز در محلول سالین حل می‌شد. سپس محلول آماده شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در تمام روزهای هفته و به مدت شش

آنتی‌اکسیدانی هستند. واف<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که تمرین ورزشی باعث تنظیم بیان Nrf2 و سطح آنتی‌اکسیدان موش‌ها می‌شود [۱۸]. با این وجود گومز<sup>۲</sup> و همکاران بیان کردند که تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی جوان باعث تغییری در بیان Nrf2 نشد، در حالی که در موش‌های پیر Nrf2 کاهش یافت [۱۹]. با توجه به اهمیت این مسیر در حفظ ردوکس سلولی<sup>۳</sup> و نتایج متناقضی که در پژوهش‌ها در خصوص اثر تمرین ورزشی مشاهده شده، در پژوهش حاضر به بررسی اثر بربرین کلراید همراه با فعالیت ورزشی هوازی بر مسیر Nrf2/HO-1 در موش‌های دیابتی ناشی از STZ پرداخته شد. همچنین با توجه به پتانسیل بالایی که بربرین کلراید و تمرین هوازی بر موش‌های مدل دیابتی دارد، فرض ما این بود که بربرین و تمرین هوازی با تنظیم Nrf2، باعث تنظیم مجدد بیان HO-1 شده و می‌تواند باعث بهبود عملکرد کبد در موش‌های مبتلا به دیابت شود.

#### روش کار

این پژوهش از نوع تجربی بوده و همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. معیار ورود به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش‌ها، سلامت کامل موش‌ها و عدم استفاده از هرگونه دارو بود. معیار خروج از مطالعه عدم اجرای پروتکل تمرینی، مونث بودن و آسیب حین اجرای تمرین بود. تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر ۱۰ هفته‌ای با نژاد ویستار و میانگین وزن  $276/0.9 \pm 17/0.3$  گرم از انستیتو پاستور تهیه شد و به آزمایشگاه حیوانی منتقل شدند. حیوانات مورد

<sup>1</sup> Wafi

<sup>2</sup> Gomes

<sup>3</sup> Cellular Redox

<sup>4</sup> Streptozotocin

### روش نمونه‌گیری از بافت کبد

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین<sup>۲</sup> (۶۰ mg/kg) و زایلازین<sup>۳</sup> (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالیین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه روزی، بافت برداری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید.

### روش اندازه‌گیری بیان ژن‌ها

اثر تمرین هوازی همراه و بربرین کلراید بر بیان ژن HO-1، Nrf2 و PPAR $\gamma$  کبدی موش‌های صحرائی دیابتی با STZ با استفاده از روش کمی RT-PCR با  $\beta$ -actin به عنوان ژن کنترل اندازه‌گیری شد. به‌همین منظور ابتدا با استفاده از محلول تیزاول، RNA کل سلول‌ها استخراج و با استفاده از کیت RNeasy (کیاژن، آلمان) خالص‌سازی شد. cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Thermo Scientific, USA) سنتز شده و جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده با استفاده از SYBR Green master mix (Thermo Scientific, USA) و آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ تکثیر شد. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

هفته به صورت خوراکی (گاواژ)، قبل از تمرین به گروه‌های مورد نظر خورانده می‌شد [۲۱].

### پروتکل تمرینی

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، تمامی حیوانات به مدت یک هفته با نحوه انجام فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند، برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر درصد و به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه بود. شدت تمرین از طریق سرعت تردمیل کنترل گردید. گروه‌ها به لحاظ آمادگی اولیه (حداکثر اکسیژن مصرفی:  $VO_{2max}^1$ ) همگن شدند. یعنی میانگین  $VO_{2max}$  اولیه گروه‌ها تقریباً یکسان بود. برنامه فعالیت‌بدنی استقامتی با افزایش تدریجی سرعت و زمان آغاز شد. به طوری که در هفته اول با سرعت ۱۰ m/min به مدت ۱۰ دقیقه، در هفته دوم با سرعت ۱۰ m/min و به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۵-۱۴ m/min به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته چهارم با سرعت ۱۵-۱۴ m/min به مدت ۳۰ دقیقه، در هفته پنجم با سرعت ۱۸-۱۷ m/min به مدت ۳۰ دقیقه و در هفته ششم با سرعت ۱۸-۱۷ m/min و به مدت ۴۰ دقیقه بود. فعالیت‌بدنی به مدت ۵ روز در هفته بوده و در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین، ۳ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با سرعت ۵-۸ m/min انجام گرفت. به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره نوارگردان) استفاده شد؛ بدین صورت که در جلسات اول، از محرک الکتریکی با ولتاژ کم، همراه با محرک صوتی استفاده شد و پس از شرطی نمودن موش‌ها به همراه بودن دو محرک، در سایر جلسات به منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد [۲۲].

<sup>2</sup> Ketamine

<sup>3</sup> Xylazine

<sup>1</sup> Maximum Oxygen Consumption

جدول ۱. الگوی پرایمر PPAR $\gamma$  و Nrf2

Genes	GenBank Accession number	Sequence (5' → 3')
Forward Nrf2	NM_031789.2	TTGTAGATGACCATGAGTCGC
Reverse Nrf2		TGTCCTGCTGTATGCTGCTT
Forward HO-1	NM_012580.2	GTAATGCAGTGTGGCCCC
Reverse HO-1		ATGTGCCAGGCATCTCCTTC
Forward PPAR $\gamma$	NM_001145367	GGACGCTGAAGAAGAGACCTG
Reverse PPAR $\gamma$		CCGGGTCCTGTCTGAGTATG
Forward $\beta$ -Actin	NM_031144	AGGAGTACGATGAGTCCGGC
Reverse $\beta$ -Actin		CGCAGCTCAGTAACAGTCCG

## تجزیه و تحلیل یافته‌ها

پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون t همبسته (برای مقایسه پیش آزمون و پس آزمون متغیرهای وزن، شاخص توده بدنی (BMI)<sup>۱</sup> و گلوکز)، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-21

انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در جدول ۲ میانگین و نتایج آزمون درون‌گروهی و بین‌گروهی مربوط به وزن، BMI و گلوکز در گروه‌های مختلف ارائه شده است.

جدول ۲. نتایج آماری مربوط به متغیرهای وزن، BMI و گلوکز

متغیر	(n=۸) DM	(n=۸) BDM	(n=۸) TDM	(n=۸) TBDM	p بین گروهی
پیش آزمون	۲۷۷/۶۵ ± ۱۸/۵۹	۲۸۱/۵۷ ± ۱۴/۰۴	۲۶۲/۳۸ ± ۱۲/۱۴	۲۸۲/۷۸ ± ۷/۱۰۵	
وزن (گرم)	۲۲۶/۳۶ ± ۲۷/۷۰	۲۸۳/۸۸ ± ۳۳/۰۵	۲۱۸/۵۸ ± ۳۳/۰۵	۲۲۱/۷۴ ± ۲۱/۰۶	
p درون گروهی	۰/۰۰۱ *	۰/۰۳۱ *	۰/۰۴۷ *	۰/۰۰۲ *	۰/۴۴۳
پیش آزمون	۰/۶۱۸ ± ۰/۰۲۲	۰/۶۲۰ ± ۰/۰۳۳	۰/۵۷۶ ± ۰/۰۴۸	۰/۶۱۶ ± ۰/۰۴۷	
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر متر مربع)	۰/۴۶۶ ± ۰/۰۳۳	۰/۵۰۷ ± ۰/۰۳۶	۰/۴۸۳ ± ۰/۰۸۱	۰/۴۶۰ ± ۰/۰۳۵	
p درون گروهی	۰/۰۰۱ *	۰/۰۰۲ *	۰/۱۳۷	۰/۰۰۱ *	۰/۱۴۰
پیش آزمون	۵۲۴/۶۲ ± ۸۱/۶۳	۵۴۰/۱۲ ± ۱۱۱/۰	۵۲۱/۶۲ ± ۱۱۰	۵۱۷ ± ۹۵/۵۶	
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۵۷۲/۰۰ ± ۵۲/۷۳	۳۸۵/۵۰ ± ۲۰/۰۳	۴۰۲/۶۲ ± ۵۶/۲۸	۳۸۴/۵۰ ± ۸۳/۶۷	
p درون گروهی	۰/۰۶۱	۰/۰۱۱ *	۰/۰۲۵ *	۰/۰۰۸ *	۰/۰۰۲

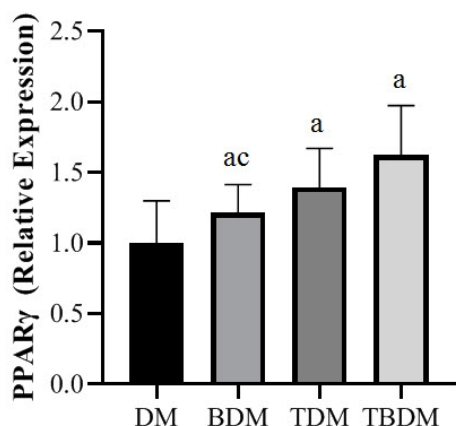
\* تفاوت درون گروهی،  $\beta$  تفاوت بین گروهی

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان Nrf2 بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد ( $F=11/606$ ,  $p=0/000$ ) (نمودار ۱). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های DM با BDM ( $p=0/022$ )، TDM ( $p=0/022$ ) و TBDM ( $p=0/000$ ) و همچنین بین گروه TBDM با BDM ( $p=0/034$ )، TDM ( $p=0/043$ ) تفاوت معنی‌داری

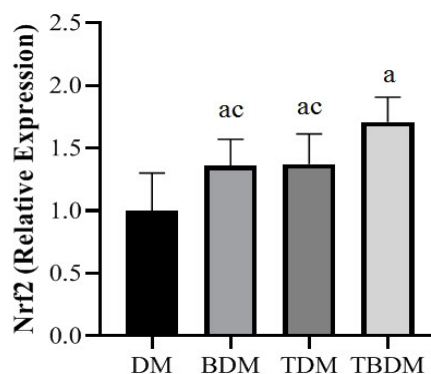
وجود دارد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان HO-1 بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد ( $F=11/042$ ,  $p=0/000$ ) (نمودار ۲). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های DM با BDM ( $p=0/038$ )، TDM ( $p=0/028$ ) و TBDM ( $p=0/000$ ) و همچنین بین گروه TBDM با BDM ( $p=0/034$ )، TDM ( $p=0/046$ ) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد

<sup>۱</sup> Body Mass Index

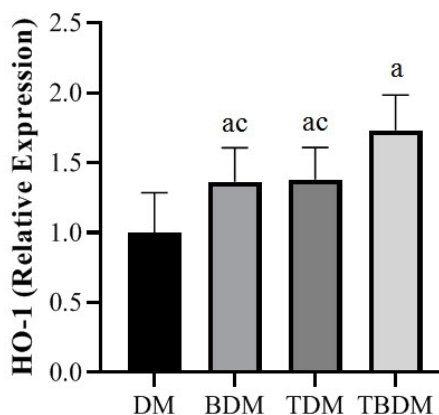
که تفاوت معنی داری در میزان تغییرات بیان PPAR $\gamma$  بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد (نتایج آزمون  $F=6/868, p=0/001$ ) (نمودار ۳). تعقیبی نشان داد بین گروه‌های DM با TBDM ( $p=0/001$ ) و همچنین بین گروه TBDM با BDM ( $p=0/039$ ) تفاوت معنی داری وجود دارد.



نمودار ۳. تغییرات بیان PPAR $\gamma$  بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $p<0/05$ )  
a تفاوت با DM، c تفاوت با گروه TBDM



نمودار ۱. تغییرات بیان Nrf2 بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $p<0/05$ )  
a تفاوت با DM، c تفاوت با گروه TBDM



نمودار ۲. تغییرات بیان HO-1 بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $p<0/05$ )  
a تفاوت با DM، c تفاوت با گروه TBDM

### بحث

پژوهش حاضر اثر محافظتی بربرین کلراید و فعالیت ورزشی را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت بر بیان PPAR $\gamma$  و Nrf2/HO-1 مورد بررسی قرار داد. نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که بربرین کلراید باعث افزایش معنی دار بیان Nrf2 و HO-1 بافت کبد موش‌های صحرایی دیابتی شده است. Nrf2 یک عامل رونویسی است که رونویسی ژن‌های مختلفی را برای حفظ همئوستاز و فشارهای مضر سلولی تنظیم می‌کند. در شرایط فشار اکسایشی Nrf2 از Keap-1 جدا شده و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را از طریق اتصال به عناصر آنتی‌اکسیدانی (ARE<sup>1</sup>) پس از جابجایی در هسته القا می‌کند [۲۳]. به نظر می‌رسد افزایش فشار اکسایشی در شرایطی نظیر دیابت، می‌تواند باعث تنظیم کاهش Nrf2 شده و استفاده از بربرین کلراید می‌تواند با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی که دارد، باعث افزایش بیان Nrf2 شود [۱۴]. در پژوهشی نشان داده شد که بربرین، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و باعث افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در کبد موش‌های دیابتی نوع ۲ می‌شود [۲۱]. در مطالعه حاضر موش‌هایی که تحت

<sup>1</sup> Antioxidant Response Element

درمان با ۳۰ میلی گرم بربرین کلراید قرار گرفتند، افزایش معنی داری را در بیان Nrf2 کبدی نشان دادند. در همین راستا گزارش شده که استفاده از ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بربرین می تواند باعث افزایش پروتئین و بیان Nrf2 در موش های صحرایی شود [۱۴]. افزایش Nrf2 ناشی از مصرف بربرین با افزایش در بیان HO-1 موش های صحرایی دیابتی همراه بود. محمود و همکاران نیز نشان دادند که مصرف بربرین باعث فعال کردن مسیر Nrf2/HO-1 و PPAR $\gamma$  و سرکوب فشار اکسایشی در موش هایی با آسیب کبدی ناشی از MTX می شود [۱۴]. در پژوهش حاضر افزایش بیان Nrf2 با افزایش PPAR $\gamma$  نیز همراه بود. به نظر می رسد بربرین می تواند باعث سرکوب بیان NF- $\kappa$ B<sup>۱</sup> و واسطه های التهابی از طریق PPAR $\gamma$  شود [۱۴]. مطالعات متعددی نشان داده که فعال شدن PPAR $\gamma$  باعث محافظت کبد در برابر آسیب های کبدی از طریق کاهش فشار اکسایشی، التهاب و آپوپتوز شود [۱۵، ۲۴]. همچنین نشان داده شده که بربرین باعث تنظیم PPAR $\gamma$  کبدی [۱۵] موش های دیابتی می شود. شواهد تجربی نشان می دهد که فعال شدن PPAR $\gamma$  می تواند بیان ژن های آنتی اکسیدانی را افزایش داده [۲۵] و بهبود HO-1 ناشی از مصرف بربرین کلراید را توضیح دهد.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر تحت تاثیر قرار گرفتن مسیر Nrf2/HO-1 به دنبال فعالیت ورزشی هوازی بود. مسیر Nrf2/HO-1 بخش مهمی از سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی است که وضعیت ردوکس را در سلول ها تنظیم می کند [۲۶]. Nrf2 به عنوان یک فعال کننده ژن، بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد. HO-1 آنتی اکسیدانی است که در حضور NADPH<sup>۲</sup>، هم را به منوکسید کربن (CO)، آهن فرو (Fe<sup>۲</sup>) و بیلی وردین<sup>۳</sup> تبدیل می کند. اثر

آنتی اکسیدانی HO-1 با افزایش سنتز فریتین و بیلی روبین اعمال می شود. CO همچنین می تواند به عنوان یک عامل آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد آپوپتوز و اتساع عروق عمل کند [۲۷]. مطالعات قبلی نشان می دهد که دیابت با کاهش آنزیم های اکسایشی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی همراه است. با این وجود فعالیت ورزشی می تواند باعث بهبود وضعیت اکسیدانی بافت کبد در موش های دیابتی شود [۱۷]. به نظر می رسد افزایش بیان Nrf2 و HO-1 کبدی در نتیجه تمرین هوازی، پاسخ جبرانی به افزایش فشار اکسایشی ناشی از STZ می باشد. همراستا با پژوهش حاضر، فتحی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که تمرین هوازی باعث بهبود بیان Nrf2، Keap-1 و HO-1 در برابر آسیب ناشی از اتانول در کبد و قلب موش ها می شود [۲۸]. به نظر می رسد فعالیت ورزشی هوازی با کنترل فشار اکسایشی و بهبود وضعیت التهابی [۲۶] از طریق افزایش بیان Nrf2 و NF- $\kappa$ B آسیب ناشی از دیابت را کاهش می دهد. نشان داده شده که تمرین منظم هوازی با افزایش فعالیت مسیر Nrf2/Keap-1/HO-1 در کبد، کلیه و قلب نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسایشی سلولی دارد [۲۷]. همچنین گزارش شده که Nrf2 در کنترل بیان ژن هایی که متابولیسم کلسترول و هومئوستاز اسیدهای صفراوی در کبد و روده را تنظیم می کند، نقش مهمی دارد [۲۹]. از دیگر نتایج مطالعه حاضر افزایش بیان PPAR $\gamma$  کبدی به دنبال فعالیت ورزشی بود. PPAR $\gamma$  به عنوان یک هدف درمانی برای چاقی، چربی بالا و دیابت می باشد. فعالیت ورزشی باعث افزایش سطوح PPAR $\gamma$  کبدی و عضلانی شده و به دنبال آن باعث کاهش مقاومت به انسولین و میزان چربی کبد و همچنین افزایش جذب گلوکز و اکسیداسیون اسیدهای چرب در عضلات اسکلتی در موش ها T2DM می شود [۳۰]. ژانگ<sup>۴</sup> و همکاران نیز نشان دادند که فعالیت ورزشی

<sup>۱</sup> Nuclear Factor- $\kappa$ B

<sup>۲</sup> Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate

<sup>۳</sup> Biliverdin

<sup>۴</sup> Zheng



همراه با مصرف بربرین کلراید اثر مضاعفی بر بهبود نشانگرهای استرس اکسیداتیو بافت قلب موش‌های دیابتی با STZ دارد [۳۴]. به نظر می‌رسد بربرین کلراید و تمرین هوازی با اثرات هم‌افزایی که داشتند، باعث بهبود بیان Nrf2/HO-1 و PPAR $\gamma$  در بافت کبد شده است.

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بربرین کلراید و فعالیت ورزشی هوازی یک روش درمانی مناسب برای محافظت از بافت کبد در برابر آسیب‌های ناشی از دیابت می‌باشد. با این وجود ترکیب بربرین کلراید و فعالیت ورزشی هوازی نسبت به هر کدام به تنهایی، اثر بهتری بر مسیر Nrf2/HO-1 و بیان PPAR $\gamma$  داشت.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با تایید کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه پیام نور با کد IR.PNU.REC.1397.033 و در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیتا... آملی انجام شد. بدین وسیله نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

باعث تنظیم افزایشی ژن PPAR $\gamma$  کبدی در موش‌های چاق می‌شود [۳۱]. نشان داده شده که افزایش PPAR $\gamma$  ناشی از ورزش هوازی طولانی مدت باعث تنظیم بیان CPT-1<sup>۱</sup> و ژن هدف آن MCAD<sup>۲</sup> شده و به دنبال آن باعث کاهش مقاومت به انسولین از طریق افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود [۳۱]. مکانیزم‌هایی که باعث افزایش PPAR $\gamma$  ناشی از فعالیت ورزشی می‌شود ناشناخته است. کاوانیشی<sup>۳</sup> و همکاران در پژوهشی نشان دادند که تمرین ورزشی با کاهش بیان CD36 ماکروفاژهای کبدی باعث تنظیم افزایشی PPAR $\gamma$  کبدی می‌شود [۳۲]. همچنین بیان شد که تمرینات ورزشی با شدت کم باعث افزایش سطوح سرمی oxLDL<sup>۴</sup> شده و به دنبال آن باعث افزایش بیان PPAR $\gamma$  و LXR $\alpha$ <sup>۵</sup> می‌شود [۳۳]. در پژوهش حاضر اثر همزمان بربرین کلراید و تمرین ورزشی بر بیان Nrf2/HO-1 و PPAR $\gamma$  بیشتر از اثر هر کدام به تنهایی بود. مطالعاتی که به بررسی اثر همزمان بربرین کلراید و تمرین هوازی بر این متغیرها پرداخته باشند، مشاهده نشد. با این وجود صدیقی و همکاران نشان دادند که تمرین هوازی

<sup>1</sup> Carnitine Palmitoyltransferase I

<sup>2</sup> Medium-chain acyl-CoA Dehydrogenase

<sup>3</sup> Kawanishi

<sup>4</sup> Oxidized Low-density Lipoprotein

<sup>5</sup> Liver X Receptor  $\alpha$

### References

- 1- Dehghan F, Hajiaghaalipour F, Yusof A, Muniandy S, Hosseini SA, Heydari S, et al. Saffron with resistance exercise improves diabetic parameters through the GLUT4/AMPK pathway in-vitro and in-vivo. *Sci Rep*. 2016 Apr 28; 6:1-12.
- 2- Nithya R, Devi VR, Selvam R, Subramanian SP. Sinapic acid regulates glucose homeostasis by modulating the activities of carbohydrate metabolizing enzymes in high fat diet fed-low dose STZ induced experimental type 2 diabetes in rats. *Glob J Obes, Diabetes Metab Syndr*. 2017 Aug 22; 4(2):54-61.
- 3- Scheen AJ. Drug treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the 1990s. *Drugs*. 1997 Sep; 54(3):355-68.
- 4- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29; 107(9):1058-70.
- 5- Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy

- status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med*. 2015 Nov; 88(Pt B):108-146
- 6- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1; 47(9):1304-9.
- 7- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999 Jan 1; 13(1):76-86.
- 8- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May; 24(5):981-90.
- 9- Peyrou M, Ramadori P, Bourgoin L, Foti M. PPARs in liver diseases and cancer: epigenetic regulation by microRNAs. *PPAR Res*. 2012 Sep 13; 22:1-17.
- 10- Yu Y, Correll P, Heuvel JV. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Apr 15; 1581(3):89-99.
- 11- Mahmoud AM, Germoush MO, Alotaibi MF, Hussein OE. Possible involvement of Nrf2 and PPAR $\gamma$  up-regulation in the protective effect of umbelliferone against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2017 Feb; 86:297-306.
- 12- Abdella EM, Mahmoud AM, El-Derby AM. Brown seaweeds protect against azoxymethane-induced hepatic repercussions through up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and attenuation of oxidative stress. *Pharm Biol*. 2016 Nov; 54(11):2496-2504.
- 13- Zhang L, Chen Z, Gong W, Zou Y, Xu F, Chen L, et al. Paeonol ameliorates diabetic renal fibrosis through promoting the activation of the Nrf2/ARE pathway via up-regulating Sirt1. *Front Pharmacol*. 2018 May 18; 9:1-15.
- 14- Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM. Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPAR $\gamma$ , and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017 Oct; 94:280-291.
- 15- Mahmoud AM, Germoush MO, Soliman AS. Berberine attenuates isoniazid-induced hepatotoxicity by modulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma, oxidative stress and inflammation. *Int J Pharmacol*. 2014 Nov 10; 10(8):451-460.
- 16- Germoush MO, Mahmoud AM. Berberine mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Jul; 140(7):1103-1109.
- 17- Ryu J-S, Kang H-Y, Lee JK. Effect of treadmill exercise and trans-cinnamaldehyde against d-galactose-and aluminum chloride-induced cognitive dysfunction in mice. *Brain Sci*. 2020 Oct 29; 10(11):1-13.
- 18- Wafi AM, Yu L, Gao L, Zucker IH. Exercise training upregulates Nrf2 protein in the rostral ventrolateral medulla of mice with heart failure. *J Appl Physiol (1985)*. 2019 Nov 1; 127(5):1349-1359.
- 19- Gomes F, Chuffa L, Scarano W, Pinheiro P, Fávoro W, Domeniconi RF. Nandrolone decanoate and resistance exercise training favor the occurrence of lesions and activate the inflammatory response in the ventral prostate. *Andrology*. 2016 May; 4(3):473-480.
- 20- Hosseini SE, Karimzadeh K. Anti-diabetic effects of hydroalcoholic *Juglans regia* male flower extract on blood glucose level and on liver enzymes activity in intact and diabetogenized adult male rat. *J Birjand Univ Med Sci*. 2012 Mar 10; 19(2): 165-172. [ Full text in Persian]
- 21- Mahmoud AM, Abdel-Rahman MM, Bastawy NA, Eissa HM. Modulatory effect of berberine on adipose tissue PPAR $\gamma$ , adipocytokines and oxidative stress in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *J App Pharm Sci*. 2017 Apr 30; 7(04):1-10.
- 22- Seo H, Park C-H, Choi S, Kim W, Jeon B-D, Ryu S. Effects of voluntary exercise on apoptosis and cortisol after chronic restraint stress in mice. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2016 Sep; 20(3):16-23.
- 23- Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 15; 36(10):1199-1207.

- 24- Mahmoud AM, Al Dera HS. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid exerts protective effects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: potential role of PPAR $\gamma$  and Nrf2 upregulation. *Genes Nutr.* 2015 Nov 32; 10(6):11-13.
- 25- Chung SS, Kim M, Youn B-S, Lee NS, Park JW, Lee IK, et al. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2009 Jan; 29(1):20–30.
- 26- Satta S, Mahmoud AM, Wilkinson FL, Yvonne Alexander M, White SJ. The role of Nrf2 in cardiovascular function and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2017 Sep 14; 2017:1-18.
- 27- Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res.* 2012 Oct; 2012: 1-16.
- 28- Fathi R, Nasiri K, Akbari A, Ahmadi-KaniGolzar F, Farajtabar Z. Exercise protects against ethanol-induced damage in rat heart and liver through the inhibition of apoptosis and activation of Nrf2/Keap-1/HO-1 pathway. *Life Sci.* 2020 Sep 1; 256:117958.
- 29- Weerachayaphorn J, Mennone A, Soroka CJ, Harry K, Hagey LR, Kensler TW, et al. Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 May 1; 302(9):925–936.
- 30- Kim JC. The effect of exercise training combined with PPAR $\gamma$  agonist on skeletal muscle glucose uptake and insulin sensitivity in induced diabetic obese Zucker rats. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2016 Jun; 20(2):42–50.
- 31- Zheng F, Cai Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- $\gamma$  and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 2019 Jan 5; 18(1):1-8.
- 32- Kawanishi N, Mizokami T, Yada K, Suzuki K. Exercise training suppresses scavenger receptor CD36 expression in kupffer cells of nonalcoholic steatohepatitis model mice. *Physiol Rep.* 2018 Dec; 6(23):1-8.
- 33- Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR $\gamma$ . *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Jul; 40(7):1263-1270.
- 34- Sadighi A, Abdi A, Azarbayjani MA, Barari A. Effect of aerobic training and berberine chloride supplementation on oxidative stress indices in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ilam Uni Med Sci.* 2020 Oct 31; 28(4):54-65. [ Full text in Persian ]