

Research Article**Therapeutic Effect of Sitagliptin and Berberine Interaction on Fatty Liver and Hepatic GLUT4 Gene Expression in Diabetic Male Rats****Soraya Mehrdoost¹, Parichehreh Yaghmaei^{1*}, Hanieh Jafari¹, Azadeh Ebrahim-Habibi²**

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: yaghmaei_p@srbiau.ac.ir

Received: 15 April 2023

Accepted: 18 June 2023

DOI: 10.22034/ascij.2023.1983993.1483

Abstract

Fatty liver disease causes accumulation of excess fat in liver cells. Berberine has antioxidant and anti-inflammatory activities, and Sitagliptin is a DPP-4 inhibitor that increases the function of incretin hormones. In this study biological activities of Berberine and Sitagliptin for the treatment of fatty liver in diabetic Sprague-Dawley rats were investigated. The therapeutic effects of Sitagliptin and Berberine on fatty liver in diabetic rats by Alloxan injection with a single dose of 100 mg/kg were done with the following groups. Groups include 1: control (physiology serum as Alloxan solvent); 2: model (fatty liver + Alloxan); 3: Sitagliptin (fatty liver + Alloxan and Sitagliptin 10 mg/kg); 4: Berberine (fatty liver + Alloxan and Berberine 150mg/kg); 5: Berberine/Sitagliptin (fatty liver + Alloxan and Sitagliptin 5 mg/kg and Berberine 75 mg/kg). After the treatment, the liver tissue separated and weighed. Levels of Liver triglyceride, cholesterol and GLUT4 gene expression in liver tissue measured by real-time PCR method. The level of GLUT4 gene expression levels increased in the treatment groups compared to the model group, but a significant difference was seen only in the co-administration group with the model group ($p < 0.05$). There was a significant decrease in the amount of liver cholesterol in the treatment groups compared to the model group ($p < 0.01$). Hepatic triglyceride decreased in the treatment groups, but only in the co-administration group, a significant difference was seen with the model group ($p < 0.05$). Berberine and Sitagliptin, especially when prescribed together with the increased expression of GLUT4 and the reduction of liver cholesterol and triglycerides, have a favorable effect on lipid metabolism and can be considered as an effective treatment for hyperlipidemia and fatty liver.

Keywords: Sitagliptin, DDP-4, GLUT4Glucose transporter type 4, Berberine, Non-alcoholic fatty liver, disease

مقاله پژوهشی

اثر درمانی تعامل سینت‌گلیپتین و بربرین بر کبد چرب و بیان ژن GLUT4 کبدی در موش‌های
صحرائی نر دیابتیثریا مهردوست^۱، پریچهره یغمایی^{۱*}، هانیه جعفری^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: yaghmaei_p@srbiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

DOI: 10.22034/ascij.2023.1983993.1483

چکیده

کبد چرب سبب تجمع چربی اضافی در سلول‌های کبدی می‌شود. بربرین دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است و سینت‌گلیپتین مهارکننده DPP-4 است که عملکرد هورمون‌های اینکرتین را افزایش می‌دهد. در این تحقیق، فعالیت‌های بیولوژیکی بربرین و سینت‌گلیپتین برای درمان کبد چرب در موش‌های اسپراگ-داولی مدل دیابتی بررسی شد. اثرات درمانی سینت‌گلیپتین و بربرین بر کبد چرب در موش‌های دیابتی شده توسط تزریق آلوکسان با تک دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با گروه‌بندی زیر صورت گرفت. ۱: کنترل (سرم فیزیولوژی به عنوان حلال آلوکسان)؛ ۲: مدل (کبد چرب + آلوکسان)؛ ۳: سینت‌گلیپتین (کبد چرب + آلوکسان و سینت‌گلیپتین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)؛ ۴: بربرین (کبد چرب + آلوکسان و ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بربرین)؛ ۵: بربرین/سینت‌گلیپتین (کبد چرب + آلوکسان و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم سینت‌گلیپتین و ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بربرین). پس از اتمام دوره تیمار و بافت کبد جداسازی و توزین شد. میزان تری‌گلیسرید و کلسترول کبدی سنجش شد. بیان ژن GLUT4 در بافت کبد با روش ریل تایم PCR اندازه‌گیری شد. سطح بیان ژن GLUT4 در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه مدل افزایش یافت که فقط در گروه تجویز توام با گروه مدل تفاوت معنی‌دار دیده شد ($p < 0/05$). میزان کلسترول کبدی در گروه‌های تیمار نسبت به گروه مدل کاهش معنی‌دار داشته است ($p < 0/01$). تری‌گلیسرید کبدی در گروه‌های تیمار کاهش یافت ولی فقط در گروه تجویز توام تفاوت معنی‌داری با گروه مدل دیده شد ($p < 0/05$). بربرین و سینت‌گلیپتین به ویژه در تجویز توام با بیان افزایشی GLUT4 و کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید کبدی اثر مطلوبی در متابولیسم لیپیدها دارند و می‌توانند به عنوان یک رژیم درمانی مؤثر برای هایپرلیپیدمی و کبد چرب در نظر گرفته شوند.

کلمات کلیدی: سینت‌گلیپتین، DPP4، بربرین، GLUT4، کبد چرب غیرالکلی.

مقدمه

تجمع چربی به صورت تری‌گلیسرید در کبد می‌گردد. گیرنده انسولین (InsR) یک گلیکوپروتئین غشایی سلول است و برای اتصال انسولین به سلول‌های هدف ضروری است. با اتصال انسولین با

مقاومت به انسولین یک فاکتور پاتولوژیک کلیدی در بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD) و سندرم متابولیک است. انسولین در متابولیسم چربی‌ها نقش مهمی دارد و عدم تعادل در هومئوستاز چربی منجر به

از طرف دیگر پروتئین‌های IRS فعال شده باعث انجام اعمالی دیگر در سلول می‌گردند که به نقش و عملکرد هورمون انسولین مربوط است، مثل: بیان برخی ژن‌ها، کنترل رشد و تمایز سلول‌ها و جایگیری GLUT در غشای پلاسمایی که سبب تسهیل برداشت گلوکز توسط سلول می‌گردد (۱۷، ۲۵).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر درمانی تعامل سیتاگلیپتین و بربرین بر کبد چرب و بیان ژن GLUT4 کبدی در موش‌های صحرایی نر دیابتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کبد چرب غیر الکلی توسط یک رژیم غذایی امولسیون پرچرب (HFD) القاء شد. ۷۷ درصد از انرژی این رژیم از چربی، ۱۴ درصد از پودر شیر کامل و ۹ درصد از کربوهیدرات تهیه شده بود (۳۱). در این امولسیون، چربی توسط روغن ذرت تهیه شده است (جدول ۱). در مطالعه حاضر، پس از پایان ۶ هفته دوره تیمار، القاء NAFLD در حیوانات توسط آزمایشات بیوشیمیایی و بررسی‌های هیستولوژیکی کبد تایید شد. برای القای دیابت در گروه‌های آزمایش، بعد از ۶ هفته تغذیه با رژیم غذایی پر چرب، تزریق داخل‌صفاقی تک‌دز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم آلوکسان (سیگما) حل شده در سرم فیزیولوژی در حالت ناشتا انجام شد (۱). در گروه کنترل که آب و غذای معمولی دریافت کردند، به همان اندازه سرم فیزیولوژی به جای آلوکسان به صورت تک‌دز تزریق شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق، برای تأیید دیابتی شدن میزان قند خون موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد و قند خون بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر، نشانه دیابتی شدن در نظر گرفته شد. گروه اول: حیواناتی که آب و غذای معمولی به همراه حلال آلوکسان (سرم فیزیولوژی) دریافت کردند. گروه دوم: حیواناتی که به مدت شش هفته رژیم غذایی پر چرب دریافت

InsR روی سطح سلول InsR فعال شده و باعث فسفوریلاسیون بسترهای گیرنده انسولین (IRS) و همچنین وقایع پایین دست شامل فسفواینوزیتول ۳-کیناز (PI3K)، پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز فعال شده میتوزن (MAP K) می‌شود. تعامل بین InsR و انسولین باعث می‌شود طیف وسیعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی برای حفظ هموستاز گلوکز ایجاد شود. ناهنجاری در InsR برای ایجاد مقاومت به انسولین از اهمیت اساسی برخوردار است، که علت اصلی و مهم در ایجاد دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک است. در افراد با مقاومت به انسولین، بیان InsR در بافت‌های محیطی به ویژه کبد، عضله و سلول‌های چربی وجود ندارد یا کاهش می‌یابد (۱۶).

یکی از اثرات تجمع چربی و لیپیدها در داخل سلول‌های کبدی ایجاد مقاومت به انسولین است. تجمع چربی‌ها بخصوص دی اسیل گلیسرول باعث ایجاد یک ایزوفرم از پروتئین کیناز C می‌شود که این نوع ایزوفرم باعث مهار فعالیت کینازی دومین‌های گیرنده انسولین در داخل سلول و در نهایت اختلال در پیام‌رسانی انسولین می‌گردد. در شرایط طبیعی انسولین به گیرنده خود در غشاء سلولی متصل شده، سپس فعال شدن آنزیم تیروزین کیناز گیرنده انسولین رخ می‌دهد که باعث فسفوریلاسیون سوبسترهای مختلف مثل: IRS می‌گردد. به طور مشخص IRS2 در کبد فسریله شده و بایندینگ سایت PI3K را ایجاد می‌کند. اتصال PI3K به IRS2 باعث به کارگیری Akt می‌شود و Akt تولید گلوکز کبدی را از دو مسیر مهار می‌کند: ۱. کاهش بیان آنزیم‌های گلوکونئوزنیک با فسفوریلاسیون و مهار FOXO1 و اهداف پیش گلوکونئوزن آن ۲. فعال کردن گلیکوژن سنتتاز از طریق فسفوریلاسیون آن و غیر فعال کردن گلیکوژن سنتتاز کیناز 3B (۲۰).

میلی‌گرم/کیلوگرم را به مدت دو هفته به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه پنجم: حیواناتی که به مدت شش هفته رژیم غذایی پر چرب دریافت کردند و سپس آلوکسان را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تک دوز به روش تزریق درون صفاقی دریافت می‌کنند و بعد ترکیب بربرین را با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و سیتاگلیپتین را با دوز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت دو هفته به صورت خوراکی دریافت کردند.

تحلیل آماری داده‌ها: تمامی داده‌ها از نظر آماری توسط نرم افزار پریم نسخه ۸ و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی بررسی گردید.

کردند و سپس آلوکسان را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تک دوز به روش تزریق درون صفاقی دریافت کرده و بعد حلال سیتاگلیپتین و بربرین (آب مقطر) دریافت کردند. گروه سوم: حیواناتی که به مدت شش هفته رژیم غذایی پر چرب دریافت کردند و سپس آلوکسان را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تک دوز به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند و بعد بربرین را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت دو هفته به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم: حیواناتی که به مدت شش هفته رژیم غذایی پر چرب دریافت کردند و سپس آلوکسان را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تک دوز به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند و بعد ترکیب سیتاگلیپتین با دوز ۱۰

جدول ۱- ترکیبات و کالری رژیم امولسیون پرچرب (۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم در روز) از طریق گواژ

Table 1. Compositions and calories of high-fat emulsion diet (10 ml/kg per day) through gavage

Compounds	Calories
Corn oil (g)	400
Sacarose (g)	150
Whole milk powder (g)	80
Cholesterol (g)	100
Sodium deoxycholate (g)	10
Tween 80 (g)	36.4
Propylene Glycol (g)	31.1
Vitamin mix (g)	2.5
Salt (g)	10
Mineral compounds (grams)	1.5
Distilled water (ml)	300

نتایج

حدودی بهبود بخشید ولی در هیچ یک از گروه‌ها معنی‌دار نبود (نمودار ۱). طبق نتایج بدست آمده از وزن کبد در حیوانات دیابتی افزایش معنی‌داری در گروه HF نسبت به گروه کنترل در وزن کبد دیده شد ($p < 0.01$). در گروه‌های تیمار وزن کبد نسبت به گروه مدل دیابتی HF کاهش یافت که این کاهش فقط

اثرات بربرین و سیتاگلیپتین بر روی تغییرات وزن بدن و وزن کبد در حیوانات دارای کبد چرب: وزن حیوانات در هفته نهایی درمان با ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین مورد بررسی قرار گرفت. درمان با ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین به تنهایی و توأم با هم در مدت دو هفته نتوانست کاهش وزن ناشی از دیابتی شدن حیوانات با آلوکسان رو جبران کند، هر چند تا

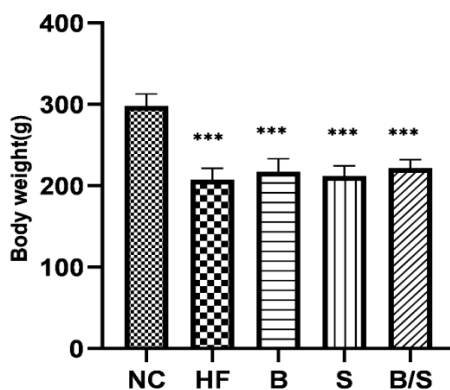
نسبت به گروه مدل دیابتی شد و این کاهش در گروه سیتاگلیپتین و گروه بربرین/سیتاگلیپتین بصورت معنی‌دار به ترتیب ($p < 0/05$ و $p < 0/01$) (نمودار ۴). بود.

تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر روی میزان بیان ژن GLUT4 کبدی در حیوانات دارای کبد چرب: بر اساس تحقیقات به عمل آمده مشخص شد تیمار موش‌های اسپراگ-داولی با رژیم پر کالری مخصوص کبد چرب، باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان GLUT4 کبدی در گروه HF نسبت به گروه کنترل می‌شود در بررسی ما نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه مدل دیابتی و گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/01$) (نمودار ۵). درمان با ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین به صورت تنها و توأم باعث افزایش GLUT4 کبدی نسبت به گروه مدل دیابتی شد و این افزایش در گروه بربرین/سیتاگلیپتین به صورت معنی‌دار بود ($p < 0/05$). <

در گروه بربرین/سیتاگلیپتین معنی‌دار بود ($p < 0/05$) <(نمودار ۲).

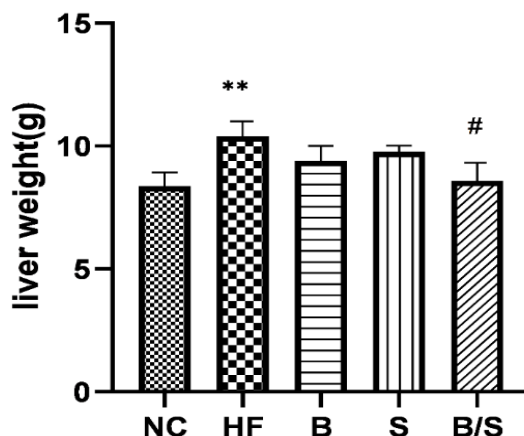
تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر روی تغییرات سطح تری‌گلیسرید کبدی: در این بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروه مدل دیابتی و گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). درمان با ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین به صورت تنها و توأم باعث کاهش تری‌گلیسرید کبدی نسبت به گروه مدل دیابتی شد و این کاهش فقط در گروه بربرین/سیتاگلیپتین بصورت معنی‌دار بود ($p < 0/05$) (نمودار ۳).

تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر روی تغییرات سطح کلسترول کبدی: تیمار موش‌های اسپراگ-داولی با رژیم پر کالری مخصوص کبد چرب، باعث افزایش معنی‌داری در کلسترول کبدی در گروه HF نسبت به گروه کنترل می‌شود. در این بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروه مدل دیابتی و گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). درمان با ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین به صورت تنها و توأم باعث کاهش کلسترول کبدی



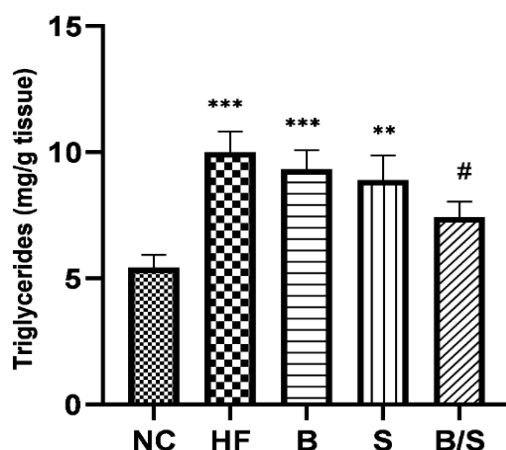
نمودار ۱- تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر روی تغییرات وزن بدن در موش‌های دیابتی تحت تیمار با رژیم HFD. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0/001$). NC، گروه کنترل نرمال؛ HF، گروه مدل دیابتی؛ B، دیابتی دریافت کننده ترکیب بربرین (۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۲ هفته؛ S، دیابتی دریافت کننده ترکیب سیتاگلیپتین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۲ هفته؛ S/B، دیابتی دریافت کننده توأم ترکیبات سیتاگلیپتین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و بربرین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۲ هفته

Fig 1. The effect of Berberine and Sitagliptin on body weight changes in diabetic rats treated with HFD diet ***: significant difference with the control group ($p < 0.001$). NC, normal control group; HF, diabetic model group; B, diabetic receiving Berberine compound (150 mg/kg) for 2 weeks; S, diabetic receiving Sitagliptin compound (10 mg/kg) for 2 weeks; S/B, a diabetic receiving the combination of Sitagliptin (5 mg/kg) and Berberine (75 mg/kg) for 2 weeks.



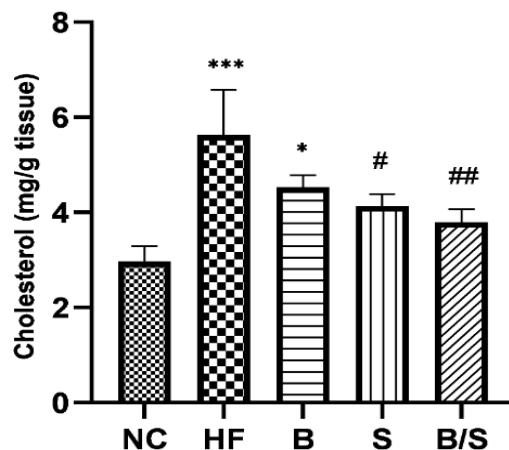
نمودار ۲- تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر روی تغییرات وزن کبد در موش‌های دیابتی تحت تیمار با رژیم HFD. $p^{**} < 0.001$. اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل $p < 0.05$ #.

Fig 2. The effect of Berberine and Sitagliptin on changes in liver weight in diabetic rats treated with HFD diet. **: significant difference with the control group ($p < 0.01$), #: significant difference compared with the HF group ($p < 0.05$).



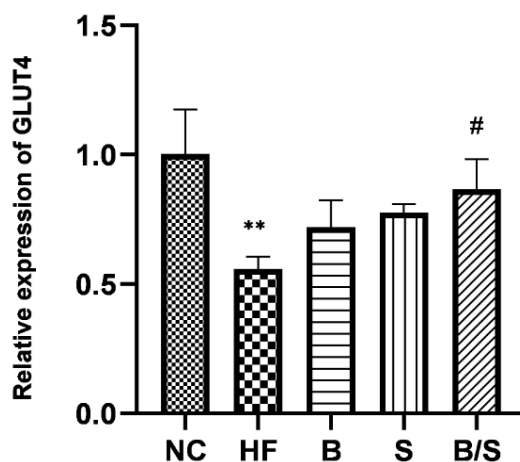
نمودار ۳- تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر تغییرات سطح تری‌گلیسرید کبدی در موش‌های دیابتی تحت تیمار با رژیم HFD. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.01$), ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.001$), #: اختلاف معنی‌دار با گروه HF ($p < 0.05$).

Fig 3. The effect of Berberine and Sitagliptin on the changes of liver triglyceride level in diabetic rats treated with HFD diet ** significant difference with control group ($p < 0.01$), *** significant difference with control group ($p < 0.001$), #: significant difference with HF group ($p < 0.05$)



نمودار ۴- تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر تغییرات سطح کلسترول کبد در موش‌های دیابتی تحت تیمار با رژیم HFD. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$), ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.001$), #: اختلاف معنی‌دار با گروه HF ($p < 0.05$), ##: اختلاف معنی‌دار با گروه HF ($p < 0.01$)

Fig 4. The effect of Berberine and Sitagliptin on changes in liver cholesterol level in diabetic rats treated with HFD diet * significant difference with the control group ($p < 0.05$), *** significant difference with the control group ($p < 0.001$), # significant difference with the HF group ($p < 0.05$), ##: significant difference with HF group ($p < 0.01$)



نمودار ۵- تاثیر بربرین و سیتاگلیپتین بر تغییرات سطح بیان GLUT4 کبدی در موش‌های دیابتی تحت تیمار با رژیم HFD. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.01$), #: اختلاف معنی‌دار با گروه HF ($p < 0.05$).

Fig 5. The effect of Berberine and Sitagliptin on the changes in liver GLUT4 expression level in diabetic rats treated with HFD diet. **: significant difference with control group ($p < 0.01$), #: significant difference with HF group ($p < 0.05$)

بحث

حدودی افزایش وزن نسبت به گروه مدل بیمار دیده می‌شود اما مانع کاملی جهت جلوگیری از کاهش وزن و حفظ آن تا حد گروه‌های سالم عامل نبوده است. احتمالاً این ترکیبات به دلایل اثرات آنتی‌دیابتی ثابت شده تا حدودی کاهش وزن موش‌ها را در اثر دیابتی

القاء دیابت توسط آلوکسان موجب کاهش وزن بدن حیوانات شد، که این یافته با توجه به آن که یکی از علائم دیابت کاهش وزن می‌باشد قابل انتظار بود (۲۳). در گروه‌های بیمار دریافت‌کننده ترکیبات بربرین و سیتاگلیپتین به تنهایی و توأم با هم تا

بدن که برای تجمع چربی طراحی نشده‌اند، مثل کبد رخ می‌دهد. افزایش جریان اسیدهای چرب آزاد از بافت چربی باعث افزایش تجمع آن در بافت کبدی مخصوصا در افراد بی تحرک می‌شود (۸). افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد تولید تری‌گلیسرید و VLDL را افزایش داده و همچنین استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید را هدف قرار می‌دهد که همه این موارد ارتباط نزدیکی با توسعه NAFLD دارند. در نهایت، دیس لیپیدمیا باعث استئاتوز و اختلال در عملکرد متابولیسم چربی در نهایت منجر به تجمع چربی در کبد می‌شود (۳۰). افزایش تجمع چربی در کبد منجر به پراکسیداسیون لیپید و التهاب شده که آسیب کبدی را تشدید می‌کند (۱۴). بربرین به طور قابل توجهی استئاتوز کبدی و سطح چربی کبدی را کاهش می‌دهد (۱۲). کبد نقش مهمی در متابولیسم لیپیدها دارد و بربرین از طریق تنظیم فاکتورهای رونویسی درون هسته‌ای اثرات اصلی را برای تنظیم متابولیسم لیپید اعمال می‌کند. چندین فاکتور رونویسی در سنتز لیپید نقش دارد از جمله FoxO1, SREBP1، بربرین بیان این فاکتورها و همچنین بیان اسید چرب سنتز (FAS) را کاهش می‌دهد از طرف دیگر بربرین فعالیت‌های متابولیکی را از طریق تعدیل بیان گیرنده‌های PPAR در کبد بهبود می‌بخشد (۱۹). PPARs عملکردهای مختلف سلولی از جمله تمایز آدیپوسیت‌ها، متابولیسم گلوکز، مهار بیان ژن‌های التهابی، افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای آنتی‌اکسیدانتی و اکسیداسیون اسیدها ی چرب را تنظیم می‌کنند. از میان ۳ ایزوفرم آن PPAR- α بیان بالایی در کبد دارد. این ژن یک نقش حیاتی را در کنترل اکسیداسیون اسید چرب به وسیله تعدیل بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های درگیر در اکسیداسیون اسید چرب میتوکندریایی و پروکسیمالی و میکروزومالی بازی می‌کند. همچنین بیان پروتئین‌های درگیر در اتصال

شدن، تعدیل می‌کنند. همچنین موش‌های تغذیه شده با HFD به طور قابل توجهی افزایش در وزن کبد را نشان دادند (۱۱، ۲۲).

یافته‌های این تحقیق نیز نشان داد که رژیم غذایی پر چرب باعث افزایش وزن کبد در گروه HF شد در صورتی که درمان با ترکیب توام سیتاگلیپتین و بربرین تفاوت معنی‌دار را در وزن کبد با گروه کنترل نشان نداد. بربرین تأثیر قابل توجهی بر متابولیسم کربوهیدرات و چربی دارد. AMPK سنسور اصلی انرژی سلول و یک تنظیم کننده کلیدی متابولیسم لیپیدها و گلوکز محسوب می‌شود و یافته‌ها نشان می‌دهد که بربرین قادر به فعال کردن مسیر سیگنالینگ AMPK است (۲۸). Deng و همکارانش در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که بربرین در موش‌هایی که با HFD تغذیه شده اند به طور قابل توجهی وزن کبد را کاهش می‌دهد (۱۲). Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۴ عنوان کردند که بربرین سبب مهار جذب روده-ای کلسترول با تداخل در میسلاریزاسیون کلسترول داخل روده‌ای شده و جذب کلسترول توسط انتروسیت‌ها را کاهش می‌دهد (۲۶).

Mu و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که مهارکننده‌های DPP-4 باعث کاهش میزان تری گلیسرید کبدی در جوندگانی که رژیم غذایی پرچرب داشتند، می‌شود (۱۸). احتمالا این ترکیبات به دلایل اثرات آنتی‌دیابتی ثابت شده تا حدودی کاهش وزن موش‌ها را در اثر دیابتی شدن، تعدیل می‌کنند و نهایتا سیتاگلیپتین با بربرین اثر سینرژیک برقرار کرده و تجویز توام این دو ترکیب با یکدیگر باعث کاهش وزن کبد در رت می‌شود. وقتی عدم تعادل بین دریافت انرژی و مصرف انرژی اتفاق می‌افتد، یا هنگامی که در ذخیره انرژی اضافی به عنوان لیپید (تری اسیل گلیسرول) در انبارهای بافت چربی یک مشکل ذاتی وجود دارد، لیپید در اندام‌های دیگر

می‌شود. بربرین باعث افزایش فعالیت AMPK می‌شود (۱۶). بیان بالای AMPK در کبد محتوای تری‌گلیسرید، لیپوژنز و استاتوز کبدی را در رت‌های دیابتی نوع ۲ کاهش و ترموژنز را افزایش می‌دهد. AMPK، استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز را فسفریله می‌کند و نتیجه آن کاهش تبدیل استیل کوآنزیم A به مالونیل کوآنزیم A (اولین مرحله‌ی لیپوژنز) می‌شود. مالونیل کوآنزیم A یک مهار کننده کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ است و باعث جذب آسید چرب- کوآنزیم A به میتوکندری می‌شود. بنابراین کاهش مالونیل کوآنزیم A، FAO را تحریک و لیپوژنز را مهار می‌کند. علاوه بر این، AMPK همچنین می‌تواند متابولیسم اسیدهای چرب را از طریق تنظیم بیوژنز میتوکندری انجام دهد، بنابراین با افزایش فعالیت AMPK کبدی NAFLD از طریق مکانیسم‌های چندگانه کاهش می‌یابد و می‌تواند اثرات مفید در بهبود هموستاز لیپید و گلوکز داشته باشد در نتیجه باعث کاهش خطر دیابت نوع ۲ و بهبود NAFLD می‌شود (۱۰). سیتاگلیپتین، به عنوان یک مهار کننده DPP-4، از تجزیه هورمون‌های اینکرتین جلوگیری می‌کند و نتایج مطلوب کبدی حاصل از سیتاگلیپتین ممکن است از طریق افزایش سطح GLP-1 باشد. داده‌های تجربی نشان می‌دهد که آگونیست‌های GLP1 بر روی مسیرهای اصلی که در تولید کبد چرب تأثیر دارند اثر می‌گذارند (۲). سیتاگلیپتین می‌تواند عملکردهای پیش انسولینی GLP-1 را افزایش دهد. با بهبود مقاومت به انسولین، هیدرولیز اسید چرب کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که سیتاگلیپتین می‌تواند از طریق کاهش لیپوژنز داخل کبدی و افزایش اکسیداسیون لیپید بر کبد چرب ناشی از رژیم غذایی پرچرب تأثیر می‌گذارد (۲۷). Ding و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که Exenatide که آگونیست GLP-1 می‌باشد، به طور

اسید چرب، استریفیکاسیون و خروج اسید چرب در فرم VLDL را تنظیم می‌کند (۷، ۲۱). پروتئین‌های متعددی توسط PPAR- α القا می‌شوند، از جمله اسیل کوآنزیم A سنتتاز اسیل کوآنزیم A اکسیداز و سیستم CPT که در بتا اکسیداسیون اسید چرب نقش کلیدی ایفا می‌کند. اسیدهای چرب اشباع نشده با زنجیره بلند LCPUFA n-3 که به عنوان لیگاندی برای PPAR- α هستند، اختلالات متابولیکی اسیدهای چرب و گلوکز را در کبد کنترل می‌کنند. کاهش LCPUFA n-3 باعث کاهش معنی‌داری در سطح mRNA ژن PPAR- α به همراه کاهش در بیان CPT-1 در بیماران دچار NAFLD می‌شود. افزایش میزان اسید چرب آزاد در NAFLD باعث افزایش تولید ROS شده که کاهش در میزان LCPUFA n-3 را به دنبال دارد. این شرایط می‌تواند باعث تنظیم کاهشی در سیگنال ترنس داکشن مرتبط با PPAR-a و کاهش در تعداد رسپتورهای GLUT4 در بافت‌های وابسته به انسولین شود که یک فاکتور کلیدی در مقاومت انسولینی محسوب می‌شود (۲۱). بیان PPAR- α تحت شرایط رژیم پرچرب و در استاتوهایپاتیت کبدی کاهش می‌یابد (۳۱). Yu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در آزمایشی که روی سلول‌های HepG2 و سلول‌های کبدی موش دارای چربی خون انجام دادند گزارش کردند که بربرین یک آگونیست PPAR- α می‌باشد و اثرات مطلوبی در کاهش چربی دارد (۲۹). به احتمال زیاد این اثر بر فعالیت PPAR- α توسط بربرین می‌تواند مسیر مهمی در متابولیسم چربی‌ها و کاهش تجمع چربی در کبد باشد. HFD به طور قابل توجهی سطح mRNA AMPK α 1 و ACC1 را سرکوب می‌کند و میزان mRNA FAS را به طور افزایشی تنظیم می‌کند (۲۲). کاهش فعالیت AMPK کبدی فسفریلاسیون استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز را کاهش می‌دهد در نتیجه باعث کاهش اکسیداسیون اسید چرب و افزایش لیپوژنز

بیان FAS افزایش می‌یابد اما درمان با سیتاگلیپتین سطح چربی خون را کاهش، بیان PPAR- α ، CREBH و CPT1 را افزایش داده و بیان FAS را سرکوب کرد. سیتاگلیپتین می‌تواند از طریق تنظیم افزایشی PPAR-a و CREBH کبدی و واسطه‌گری در سطح بیان آنزیم‌های کلیدی برای متابولیسم لیپید، از بافت کبدی محافظت کرده و متابولیسم لیپید را در موش‌های NAFLD تعدیل کند (۲۷). مقاومت انسولینی نقش مهمی را در تجمع لیپید، بویژه تری‌گلیسرید در هپاتوسیت‌ها ایفا کرده و یک فاکتور کلیدی و ضروری در پیشرفت NAFLD می‌باشد (۲۴). یک فعل و انفعال پیچیده بین ژن‌ها و شرایط محیطی باعث تقویت مقاومت به انسولین و NAFLD می‌شود. توانایی عوامل دارویی حساس‌کننده به انسولین در درمان NAFLD با کاهش مقاومت به انسولین در کبد مورد پذیرش واقع شده است. در شرایط نرمال، اتصال انسولین به رسپتور آن باعث اتوفسفوریلاسیون رسپتور و متعاقب آن فسفوریلاسیون تیروزین پروتئین‌های IRS می‌شود که آبشاری از وقایع را به راه می‌اندازد که نهایتاً به جایجایی GLUT4 از بخش داخل سلولی به غشای سلول منجر می‌شود. GLUT4 انتقال گلوکز را از فضای خارج سلولی به داخل سیتوپلاسم تسهیل می‌کند. در این بخش از اتفاقات، مکانیسم‌های مسئول برای مقاومت انسولینی ممکن است یا در اتصال انسولین یا در پروتئین‌های IRS و یا در GLUT4 درگیر باشند. افزایش شار اسیدهای چرب آزاد از بافت چربی به اندام‌های غیرچربی مثل کبد در نتیجه متابولیسم غیر طبیعی چربی، منجر به تجمع تری‌گلیسرید کبدی شده و به اختلال در متابولیسم گلوکز و کاهش حساسیت به انسولین در عضلات و کبد می‌شود (۵). مقاومت انسولینی به همراه هایپرانسولینمیا باعث افزایش در توده چربی، افزایش لیپولیز، افزایش در سطوح

موثری ترشح انسولین را تحریک می‌کند و مقاومت به انسولین و استئاتوز کبدی را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد. در این مطالعه نشان دادند که اگر سلول‌های کبدی در معرض GLP-1 قرار بگیرند، افزایش قابل توجهی در تولید cAMP نشان داده و بیان mRNA ژن‌های PPARa که مرتبط با اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌باشد افزایش یافته و بیان ژن‌های SREBP-1c و SCD1 مرتبط با سنتز اسیدهای چرب است کاهش می‌یابد. اطلاعات آنها نشان می‌دهد که پروتئین‌های GLP-1 در کبد تأثیر مستقیمی بر متابولیسم چربی در سلول‌های کبدی دارند (۱۳). Shen و همکارانش در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که سیتاگلیپتین با فعال کردن AMPK از تجمع چربی در کبد جلوگیری می‌کند آنها عنوان کردند که AMPK از طریق تعدیل فسفوریلاسیون استیل‌کوآنزیم A کربوکسیلاز و تنظیم فعالیت CPT1، یک عملکرد مرکزی در کنترل متابولیسم لیپیدها دارد. در این بررسی گزارش شده که وجود مقادیر زیادی از اسیدهای چرب فعالیت AMPK و SIRT1 را سرکوب کرده و در نتیجه باعث کاهش استفاده از اسیدهای چرب و رسوب غیر طبیعی لیپید در کبد می‌شود. در این گزارش توضیح داده شده که AMPK می‌تواند به طور مستقیم وضعیت فسفوریلاسیون H2B هیستون را کنترل کند که فاکتورهای رونویسی را برای اتصال به DNA بکار می‌گیرد. همچنین مسیر SIRT1 / AMPK فعال شده میزان رونویسی ژن‌های هدف پایین‌دست مثل ACC1 و CPT1 را بطور افزایشی تنظیم کرده، در حالی که سطح mRNA FAS را بطور کاهشی تنظیم می‌کند. این یافته‌ها با عملکرد سیتاگلیپتین در سرکوب سنتز اسیدهای چرب و افزایش β -اکسیداسیون اسید چرب سازگار است (۲۲). Xu و همکارانش در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که در موش‌های مدل NAFLD، بیان PPAR- α ، CREBH و CPT1 کاهش یافته و

کبد و کاهش لیپیدهای کبدی توانسته‌اند به خوبی منجر به بهبود NAFLD شوند. با توجه به اهمیت بیماری‌های کبدی و فقدان نسبی داروهای مناسب جهت درمان NAFLD، اثرات سیتاگلیپتین و بربرین جالب توجه بوده و می‌توانند در آینده کاندید مناسبی جهت داروهای موثر در این بیماری در نظر گرفته شوند.

منابع

1. Abud M.A., Nardello A.L., Torti J.F. 2017. Hypoglycemic effect due to insulin stimulation with *Plantago major* in wistar rats. *Medicinal and Aromatic Plants*, 6(3): 292-303.
2. Akaslan S.B., Degertekin C.K., Yilmaz G., Cakir N., Arslan M., Toruner F.B. 2013. Effects of Sitagliptin on nonalcoholic fatty liver disease in diet-induced obese rats. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 11(4):243-250
3. Balakrishnan B.B., Banu B., Krishnasamy K., Choi C. 2018. 'Moringa concanensis Nimmo ameliorates hyperglycemia in 3T3-L1 adipocytes by upregulating PPAR- γ , C/EBP- α via Akt signaling pathway and STZ-induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103:719-728.
4. Bogan J.S., Hendon N., McKee A.E., Tsao T.S., Lodish H.F. 2003. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking, *Nature*, 425:727-33.
5. Bugianesi E., McCullough A.J., Marchesini G. 2005. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42:987-1000.
6. Bugianesi E., Moscatiello S., Ciaravella M.F., Marchesini G. 2010. 'Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16:1941-1951.

اسیدهای چرب آزاد، کاهش در سیگنالینگ انسولین به صورت وابسته به دوز و افزایش گلوکز و تولید لیپید کبدی (سمیت لیپیدی) می‌شود (۵). مقاومت انسولینی کبدی با اختلال در گلیکوژنز و با افزایش در گلوکوژنوژنز و گلیکوژنولیز مرتبط است (۶). طبق مطالعات قبلی، GLUT4 که در درجه اول در سلول‌های چربی و ماهیچه مخطط دیده می‌شود، یک انتقال‌دهنده گلوکز، تنظیم شده توسط انسولین است و به عنوان مرحله محدود کننده سرعت متابولیسم گلوکز عمل می‌کند (۴). بنابراین ارزیابی سطح بیان آن در مطالعه حاضر بسیار مهم بود. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که بیان بالای GLUT4 در کبد باعث کاهش قند خون و مقاومت به انسولین می‌شود (۳، ۹). Jiao و همکارانش در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که متفورمین سبب افزایش بیان InsR، IRS-2 و GLUT4 در کبد موش‌های دیابتی می‌شود. در این گزارش همچنین درمان با پلی‌ساکاریدهای *Morus alba* نیز سبب تنظیم افزایش بیان Akt و GLUT4 شد اما درمان با متفورمین تاثیر بهتری نسبت به *Morus alba* داشت (۱۵).

مطالعه حاضر نشان داد که تجویز سیتاگلیپتین و بربرین به تنهایی و توأم باعث افزایش بیان GLUT4 در کبد موش‌های دیابتی مبتلا به کبد چرب می‌شود و بیان GLUT4 در کبد باعث بهبود NAFLD در موش‌های دیابتی شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، تیمار حیوانات دیابتی دچار کبد چرب با ترکیبات سیتاگلیپتین و بربرین منجر به بهبود کاهش چربی کبدی می‌گردد. اثرات اعمال شده توسط هر دو ترکیب در فاکتورهای مورد بررسی، مفید ارزیابی شد. به نظر می‌رسد که هر دو ترکیب از طریق تنظیم افزایشی ژن GLUT4 در

16. Kong W.J., Zhang H., Song D.Q., Xue R., Zhao W., Wei J., Wang Y.M., Shan N., Zhou Z.X., Yang P., You X.F., Li Z.R., Si S.Y., Zhao L.X., Pan H.N., Jiang J.D. 2009. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism*, 58(1):109-119.
17. McCullough A.J. 2006. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(1):S17-29.
18. Mu J., Woods J., Zhou Y.P., Roy R.S., Li Z., Zycband E., Feng Y., Zhu L., Li C., Howard A.D., Moller D.E., Thornberry N.A., Zhang B.B. 2006. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a Sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 55(6):1695-1704.
19. Pang B., Zhao L.H., Zhou Q., Zhao T..., Wang H., Gu C.J., Tong X.L. 2015. Application of Berberine on treating type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Endocrinology*, 2015:905749.
20. Perry R.J., Rachel J., Varman T. S., Petersen K.F., Gerald I.S. 2014. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 510: 84-91.
21. Pettinelli, P., Obregón A.M., Videla L. A. 2011. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutricion Hospitalaria*, 26:441-450.
22. Shen T., Xu B., Lei T., Chen L., Zhang C., Ni Z. 2018. Sitagliptin reduces insulin resistance and improves rat liver steatosis via the SIRT1/AMPK α pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(4):3121-3128
23. Suji G., Sivakami S. 2003. Approaches to the treatment of diabetes mellitus. *Cellular and Molecular Biology*, 49:635-639.
24. Takaki A., Daisuke K., Kazuhide Y. 2014. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic
7. Burri L., Thoresen G.H., Berge R. K. 2010. The role of PPAR α activation in liver and muscle. *PPAR Research*, 2010:542351-11.
8. Byrne C.D., Targher G. 2015. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62:S47-S64.
9. Chen L.N., Lyu J., Yang X.F., Ji W.J., Yuan B.X., Chen M.X., Ma X., Wang B. 2013. Liraglutide ameliorates glycometabolism and insulin resistance through the upregulation of GLUT4 in diabetic KKAy mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 32:892-900.
10. Day E.A., Ford R. J., Steinberg G.R. 2017. AMPK as a Therapeutic Target for treating metabolic diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28:545-60.
11. DeAngelis R.A., Markiewski M.M., Taub R., Lambris J. D. 2005. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology*, 42:1148-1157.
12. Deng Y., Tang K., Chen R., Nie H., Liang S. J., Zhang Y., Yang Q. 2019. Berberine attenuates hepatic oxidative stress in rats with non-alcoholic fatty liver disease via the Nrf2/ARE signalling pathway, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17:2091-2098.
13. Ding X., Saxena N.K., Lin S., Gupta N.A., Anania F.A. 2006. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology*, 43:173-181.
14. Fon T.K., Rozman D. 2011. Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids*, 2011:783976.
15. Jiao Y., Wang X., Jiang X., Kong F., Wang S., Yan C. 2017. Antidiabetic effects of morus alba fruit polysaccharides on high-fat diet- and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 199:119-127.

28. Xu G., Huang K., Zhou J. 2018. Hepatic AMP Kinase as a Potential Target for Treating Nonalcoholic Fatty Liver Disease.: Evidence from Studies of Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*, 25:889-907.
29. Yu H., Li C., Yang J., Zhang T., Zhou Q. 2016. Berberine is a potent agonist of peroxisome proliferator activated receptor alpha. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 21:1052-1060.
30. Zhang Q., Lu L.G. 2015. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Dyslipidemia, Risk for Cardiovascular Complications, and Treatment Strategy. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3:78-84.
31. Zou Y., Li J., Lu C., Wang J., Ge J., Huang Y., Zhang L., Wang Y. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Science*, 79(11):1100-1107.
- steatohepatitis (NASH). *International Journal of Molecular Sciences*, 15:7352-7379.
25. Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn C.R.. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2):85-96.
26. Wang Y., Yi X., Ghanam K., Zhang S., Zhao T., Zhu X. 2014. Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption. *Metabolism*, 63:1167-77.
27. Xu B., Shen T., Chen L., Xia J., Zhang C., Wang H., Yu M., Lei T. 2017. The Effect of Sitagliptin on Lipid Metabolism of Fatty Liver Mice and Related Mechanisms. *Medical science Monitor :International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23:1363-1370.

