Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effect of grapefruit juice on *CYP2E1* gene expression in obese and control rats

Parisa Vahid[1], Noosha Zia-Jahromi[1]*

ABSTRACT

Background and Aims: The *CYP2E1* gene encodes cytochrome P450 enzymes that play an essential role in liver fat metabolism. Additionally, grapefruit reduces plasma lipids in the body. Therefore, herbal medicines can be considered as an important treatment strategy. The present study aimed to evaluate the effect of grapefruit juice on *CYP2E1* gene expression in obese and control rats.

Materials and Methods: This experimental study was performed on 24 male Wistar rats weighing 180±20 g. Rats were divided into four groups: control (no treatment), high-fat diet group, treatment group 1 (high cholesterol diet with grapefruit juice 4 ml/kg), and treatment group 2 (high-fat diet with grapefruit juice) (8 ml/kg). They also gavaged for 6 weeks and *CYP2E1* gene expression was finally determined. Statistical analyzes were performed using SPSS software (version 22).

Results: The results of *CYP2E1* gene expression indicated that grapefruit juice at a dose of 8 ml/kg can further reduce the expression of *CYP2E1* gene in rats with fatty liver (1.09 ±0.038) than the dose of 4 ml/kg (1.27 ±0.24). This reduction in expression was statistically significant compared to that of the high-fat diet group (3.61 ±0.25) (P=0.003).

Conclusion: The results of this study demonstrated that grapefruit juice reduces the expression of the CYP2E1 gene in obese rats due to naringin and recovers the disease by reducing the accumulation of triglycerides in the liver. Therefore, grapefruit juice can be considered as a therapeutic target in fatty liver disease and obesity.

Keywords: *CYP2E1* gene, Fatty liver, Grapefruit

Citation: Vahid P, Zia-Jahromi N. [Effect of grapefruit juice on CYP2E1 gene expression in obese and control rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(3): 260-269. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.104

Received: March 2, 2021 **Accepted:** September 13, 2021

[1] Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author:** Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Tel: +989133146504 Fax: +98383361000 E-mail: Nooshazia.59@gmail.com

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی آب‌میوه گریپ‌فروت بر بیان ژن *CYP2E1* در موش صحرایی چاق و کنترل

پریسا وحید[1]، نوشا ضیاء جهرمی[1]*

چکیده

زمینه و هدف: ژن *CYP2E1* آنزیم‌های سیتوکروم P450 را رمزگذاری می‌کند که نقش مهمی در متابولیسم چربی‌های کبدی دارد. از طرفی گریپ‌فروت باعث کاهش لیپیدهای پلاسما در بدن می‌شود و داروهای گیاهی می تواند به عنوان یک استراتژی مهم درمان مطرح باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر آب گریپ‌فروت بر بیان ژن *CYP2E1* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب می‌باشد.

روش تحقیق: این مطالعه تجربی بر روی ۲۴ سر رت نر ویستار با وزن ۲۰±۱۸۰ گرم انجام شد. رت‌ها به چهار گروه کنترل (فاقد تیمار)، گروه دریافت کننده رژیم غذایی پرچرب ، گروه تیمار۱ (رژیم پر کلسترول به همراه آب گریپ‌فروت ۴ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و گروه تیمار ۲ (رژیم پر کلسترول به همراه آب گریپ‌فروت ۸ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) تقسیم و به مدت ۶ هفته مورد گاواژ قرار گرفتند و در نهایت بیان ژن *CYP2E1* مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که گریپ‌فروت با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد چرب (۰/۳۸ ± ۱/۰۹) نسبت به دوز ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم (۰/۲۴ ± ۱/۲۷) شود که این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه رژیم غذایی پر چرب (۰/۲۵ ± ۳/۶۱) معنادار است (P=۰/۰۰۳).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که آب‌میوه گریپ‌فروت به دلیل داشتن نارینجنین سبب کاهش بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبدچرب و بهبود این بیماری از طریق کاهش تجمع تری‌گلیسرید در بافت کبد شود. آب میوه گریپ‌فروت می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب و چاقی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن *CYP2E1*، کبد چرب، گریپ‌فروت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۳): ۲۶۰-۲۶۹.

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، ایران

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

آدرس: شهرکرد- رحمتیه- دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۶۵۰۴ نمابر: ۰۳۸۳۳۶۱۰۰۰ پست الکترونیکی: Nooshazia.59@gmail.com

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی یک علت شایع بیماری‌های مزمن کبدی در سراسر جهان است که می‌تواند به فیبروز کبدی، سیروز و سرطان کبد ختم شود. شیوع این بیماری در جوامع مختلف از ۲/۵ درصد تا ۲۴ درصد متفاوت است (۲, ۱).

در اکثر موارد، بیماری بدون علامت است و با مشاهده بالا بودن آنزیم‌های کبدی در آزمایش خون و یا در سونوگرافی شکم که به علل دیگر انجام می‌شود، به‌صورت اتفاقی کشف می‌گردد. اگرچه بعضی بیماران به‌ندرت از درد مبهم قسمت بالا و راست شکم ویا احساس خستگی زودرس وخواب آلودگی شکایت دارند. پاتوژنز این بیماری پیچیده وچند عاملی بوده و در آن برهمکنش عوامل محیطی و ژنتیکی بسیارتاثیرگذار می‌باشد.کبدچرب غیرالکلی به‌شدت با چاقی، مقاومت به انسولین و دیگر اجزای سندرم متابولیک مرتبط می‌باشد. چاقی از مهم‌ترین بیماری‌های همراه با کبد چرب است (۳). افزایش چربی خون از دیگر اجزاء سندرم متابولیک است که با بیماری کبد چرب ارتباط دارد و درمان مناسب افزایش چربی خون منجر به کاهش روند تخریب سلول‌های کبدی در بیماری کبد چرب می‌گردد. مقاومت به انسولین که نقش اصلی در ایجاد بیماری قند (دیابت) دارد، اساس ایجاد سندرم متابولیک بوده و حتی قبل از بروز دیابت آشکار می‌تواند بر سلول‌های کبدی آثار سوء بگذارد. سندروم متابولیک مجموعه‌ای از بیماری‌های پرفشاری خون، افزایش چربی خون، چاقی و دیابت است و مطالعات اخیر حاکی از آن هستند که با افزایش تعداد بیماری‌های تشکیل‌دهنده‌ی این سندرم، شدت بیماری کبد چرب نیز افزایش می‌یابد (۴). آنزیم‌های کبدی (آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز) در سلول‌های کبدی موجود بوده و با تخریب سلول کبدی درسرم بیماران وارد می‌شوند. افزایش آن‌ها نشانه تخریب سلول کبدی است. در بیماری کبدچرب برخلاف اختلال کبد ناشی از مصرف الکل، افزایش میزان ALT (Alanine Aminotransferase) از AST (Aspartate Aminotransferase) بیشتراست و فقط در مراحل پیشرفته بیماری کبد چرب (سیروز) است که غلبه افزایش میزان AST به ALT دیده می‌شود. افزایش آنزیم‌های کبدی فوق در اکثر موارد بین ۱/۵ تا ۲ برابر حد طبیعی می‌باشد. افزایش بسیار بالای آنزیم‌های کبدی (بیش از ۱۰ برابر حد طبیعی سرم) در بیماری کبد چرب بسیار نادر بوده و احتمال بیماری‌های کبدی دیگر را مطرح می‌سازد. افزایش میزان «گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز» سرم که از آنزیم‌های مترشحه از کبد است، در بیماری کبد چرب غیرالکلی مانند کبد چرب الکلی دیده می‌شود و نشانه مقاومت به انسولین است. میزان بیلی‌روبین، آلبومین، زمان پروترومبین و پلاکت‌های خون که نشانه عملکرد سلول کبدی می‌باشند، در مراحل ابتدایی بیماری طبیعی بوده و اختلال در آن‌ها احتمال سیروز را مطرح می‌کند. افزایش فریتین که نشانه ذخایر آهن بدن است، در نیمی از موارد کبد چرب دیده می‌شود و درواقع نشانه ای از مقاومت به انسولین می باشد (۵).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که علاوه بر عوامل خطر زیست‌محیطی، عوامل ژنتیکی نیز در ابتلا و پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی دخیل است. ژن موردمطالعه *CYP2E1* می‌باشد که موقعیت کروموزومی آن در انسان بر روی کروموزوم ۱۰ است. این ژن خانواده آنزیم‌های سیتوکروم P450 را رمزگذاری می‌کند. پروتئین‌های سیتوکروم P450 مونواکسیژناز هستند که بسیاری از واکنش‌های متابولیسم دارو و سنتز کلسترول، استروئیدها و سایر لیپیدها را کاتالیز می‌کنند. این پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در اثر اتانول، حالت دیابتی و گرسنگی القا می‌کند. *CYP2E1* هیدروکسیلاسیون امگا اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کند (۶). تری گلیسیرید و کلسترول، لیپیدهای بیولوژیک مهمی هستند که مصرف بیش‌ازحد آن‌ها از طریق غذا منجر به هیپرلیپیدمی می‌گردد. هیپرلیپیدمی زمینه‌ساز کبد چرب غیرالکلی است که با تجمع تری‌گلیسریدها در سلول‌های کبدی که در اثر استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول شکل می‌گیرند، همراه است و می‌تواند به استئاتوز، فیبروز و درنهایت سیروز کبدی منجر گردد (۷). از زمان‌های بسیار دور برای درمان چربی خون و بیماری‌های متابولیک از فرآورده‌های گیاهی بهره می‌بردند. امروزه نیز استفاده از درمان‌های طبیعی و گیاهی به علت ایجاد سمیت کمتر، قیمت ارزان‌تر و دسترسی آسان‌تر بیش‌ازپیش موردتوجّه قرارگرفته است.

ازجمله مواد مؤثر گیاهی که دارای خاصیت کاهندگی چربی خون می‌باشند می‌توان به آلکالوئیدها، پپتیدوگلیکان‌ها، ترپنوئیدها، آمینواسیدها و یون‌های غیرآلی موجود در گیاهان دارویی اشاره کرد (۸).

گریپ‌فروت که از خانواده مرکبات می‌باشد درختی است بومی ایران که در شمال وجنوب این کشور پهناور یافت می‌شود. آب‌میوه گریپ‌فروت به‌عنوان یک مکمل غذایی در درمان کمبود پتاسیم کاربرد دارد. پکتین موجود در آن عامل مؤثری در کاهش کلسترول خون و بهبود تدریجی عارضه سفت و سخت شدن عروق خونی است. سایر اثرات آن شامل القای تجمع گلبول‌های قرمز، کاهش هماتوکریت‌ها و اثرات احتمالی ضد سرطان است (۹). نارینجنین (Naringenin)، فلاونوئید اصلی در گریپ‌فروت است که، باعث کاهش لیپیدهای پلاسما در داخل بدن می‌شود. با توجه به آمار فزاینده مبتلابه کبد چرب در جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی، در این مطالعه به بررسی اثر عصاره گریپ‌فروت بربیان ژن CYP2E1 در موش‌های چاق مبتلابه کبد چرب می‌پردازیم.

روش تحقیق

نوع مطالعه، جامعه مورد مطالعه و گروه‌بندی

مطالعه حاضر از نوع تجربی می باشد که در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.046 به تصویب رسیده است. روش گردآوری اطلاعات به صورت آزمایشگاهی – مشاهده‌ای بود. در این تحقیق ۲۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۱۸۰ گرم از لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد خریداری شد. این حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با آب و غذای کافی و استاندارد درون قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. جهت القاء مدل کبد چرب، رت‌ها به مدت ۶ هفته از رژیم غذایی با چربی بالا که شامل ۴۵ درصد چربی برابر با ۷/۴ کیلوکالری در هر گرم (۴۱ درصد چربی، ۲۴ درصد پروتئین و ۲۱ درصد کربوهیدرات) در طی این دوره مبتلا به کبد چرب شدند (۱۰). رت‌ها پس از سازگاری با محیط به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. تعداد ۲۴ سر موش صحرایی به‌صورت تصادفی به ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند. گروه A: شامل شش سر رت سالم که فقط روزانه آب و غذای استاندارد دریافت می‌کردند که گروه کنترل را تشکیل می‌دهند. گروه B: شامل شش سر رت مبتلا به کبد چرب است که به عنوان گروه کنترل منفی می‌باشند. گروه C: گروه تیمار اول که شامل شش سر رت مبتلا به کبد چرب می‌باشد که دریافت کننده دوز ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم آب گریپ فروت می‌باشند. گروه D: گروه تیمار دوم شامل شش سر رت دریافت کننده دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم آب گریپ فروت می‌باشند که به مدت ۶ هفته گاواژ شدند. پس از گروه‌بندی و پس از طی شدن دوره‌ی تطبیق حیوانات با حرارت و رطوبت محل نگهداری، آزمایشات شروع شد. در ضمن اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمام مراحل لحاظ گردید.

تهیه آب گریپ‌فروت

میوه گریپ‌فروت از بازار داخلی و از استان گرگان در آذر ماه سال ۱۳۹۸ خریداری شد. توسط دستگاه آب میوه‌گیری دستی آب گریپ فروت از گریپ فروت گرفته شده و از فیلتر پارچه‌ای عبور داده شد تا پالپ و کلیه مواد خارجی جدا شد (۱۲, ۱۱). سپس براساس غلظت‌های مورد نظر گریپ فروت توسط آب مقطر رقیق سازی صورت گرفت.

نمونه‌گیری

پس از طی ۶ هفته از فرایند گاواژ و تیمار، رت‌ها در شرایط کاملاً بهداشتی با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند و با استفاده از ست جراحی شکم آن ها باز و کبد آن ها برداشته شد. سپس مقداری از کبد برای انجام مراحل real time RT-PCR درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی بیست درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از

خلوص RNA استخراج شده با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما cDNA ساخته شد و به فریزر منفی بیست انتقال داده شد. در ادامه برای بررسی ژن مورد مطالعه، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط شرکت سیناژن بر اساس توالی ژن که توسط نرم افزار Primer 3D طراحی شد، سنتز گردید. در جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

ژن	توالی	دما	سایز باند
CYP2E1 - F	5'- AACTCTGAGAT ATGGGCTCCTG -3'	۵۹°C	bp ۱۳۰
CYP2E1- R	5'- GTAGGGCATATC CAGTCTGTCTC -3'		
GAPDH-F	5'- TGATTCTACCCA CGGCAAGTTC-3'	۵۶°C	bp ۲۰۰
GAPDH-R	5' -CGCTCCTGGAAG ATGGTGATG-3'		

بیان ژن با استفاده از PCR

بیان ژن *CYP2E1* در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر Master Mix در ویال ریخته شد و سپس ۱ میکرولیتر پرایمر که شامل ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیشرو و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیرو بود به ویال اضافه شد. در ادامه ۱میکرو لیتر از cDNA ساخته شده به ویال اضافه گردید و در نهایت به آن آب دوبار تقطیر اضافه شد تا حجم مواد به ۲۰ میکرولیتر برسد. سپس نمونه ها در دستگاه PCR طبق برنامه مورد نظر که شامل Initial denaturation step به مدت ۵ دقیقه و دما ۹۴ درجه سانتی گراد، Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، Extension به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و Extensionfinal به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود، تنظیم شد. تعداد سیکل ها ۳۵ دور در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد.

تکنیک RT-Real Time PCR

برای انجام تکنیک real time RT-PCR بر اساس پروتکل کیت یکتاتجهیزآزما ۱۰ میکرو لیتر SYBERPremix به ۱ میکرو لیتر cDNA اضافه شد و سپس پرایمر های پیشرو و پیرو از هرکدام به مقدار ۰/۵ میکرو لیتر اضافه شد و در نهایت با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه RT-PCR قرار داده شد و نتیجه حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت.

تست های بیوشیمیایی برای ارزیابی کبد

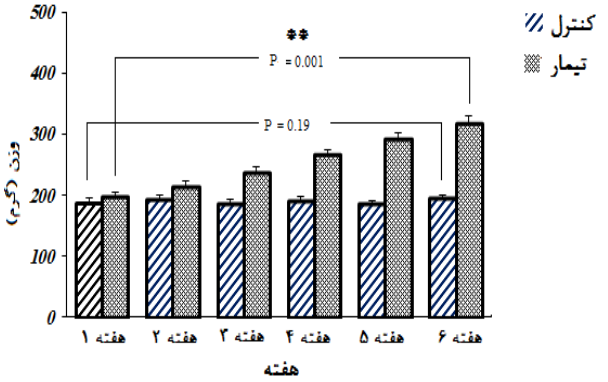
تست‌های بیوشیمیایی شامل سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، قند، SGOT، HDL، LDL، SGPT و آلکالن فسفاتاز بود و این آزمایشات با روش اتوآنالیزر و توسط دستگاه اتوآنالیزر (Auto Analyser BT 3000plus، ساخت کشور ایتالیا) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این بررسی برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از آن‌جا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون تعقیبی LSD ارزیابی شدند و نتایج بصورت Mean ± SEM ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P<۰/۰۵$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

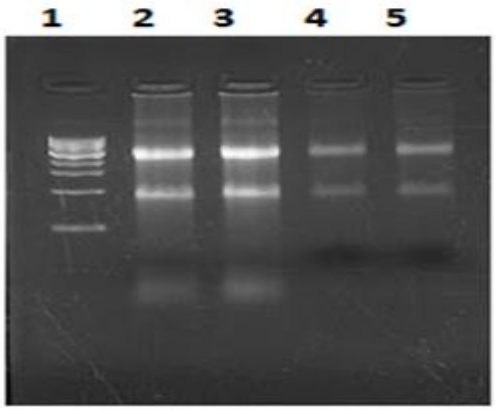
وزن موش‌ها در طول ۶ هفته در نمودار ۱ آورده شده است که نشان دهنده افزایش وزن آن‌ها می باشد. در گروه کنترل به دلیل عدم استفاده از رژیم پرچرب تغییرات وزنی در طول دوره مورد بررسی ناچیز بوده ($P=۰/۱۹$) درحالی که در موش‌های دارای رژیم غذایی پرچرب افزایش قابل توجهی در میانگین وزنی موش‌ها پس از ۶ هفته ایجاد شده است ($P=۰/۰۰۱$).



نمودار ۱- بررسی تغییرات وزن موش‌های مورد مطالعه در یک دوره ۶ هفته‌ای. با توجه به نتایج حاصل از بررسی وزن موش ها در طول یک دوره ۶ هفته ای پیش از انجام آزمایشات می توان از افزایش وزن موش ها و ابتلای آن‌ها به چاقی اطمینان حاصل نمود. ** نشانه معنادار بودن افزایش وزن موش‌ها می‌باشد.

بررسی کیفی RNA

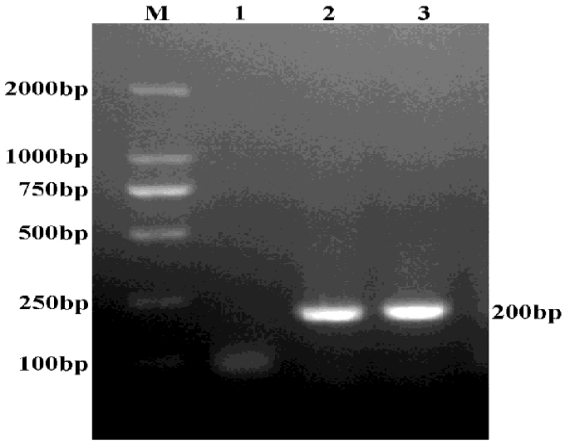
در این تحقیق برای کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده از نمونه‌هایی که در شرایط *RNase* free تهیه شده بودند، روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. از آن‌جایی که بیش‌ترین میزان RNA موجود در RNA استخراج شده، RNAهای ریبوزومی است بنابراین حضور سه باند ۲۸ s، ۱۸ s و ۵/۸ s ریبوزومی نشان‌دهنده‌ی کیفیت استخراج RNAهای مورد نظر خواهد بود. در تصویر ۱ بررسی کیفی RNA استخراج شده و کیفیت آن با تشکیل سه باند ذکر شده نشان داده شده است.



تصویر ۱- بررسی کیفی RNA استخراج شده. چاهک شماره ۱ نشانگر، چاهک شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه RNA

تأیید صحت سنتز cDNA

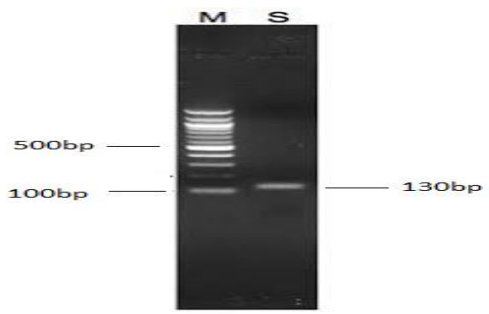
در تحقیق حاضر پس از سنتز برای تأیید صحت سنتز cDNA با پرایمرهای اختصاصی ژن *GAPDH*، واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۲۰۰ جفت بازی مربوط به *GAPDH* دیده شد که تأیید سنتز مناسب cDNA بود که در تصویر ۲ نتایج آن نشان داده شده است.



تصویر ۲- تأیید صحت سنتز cDNA. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ نمونه سالم، چاهک شماره ۳ نمونه رت مبتلا به کبد چرب می‌باشد.

تأیید سنتز ژن *CYP2E1*

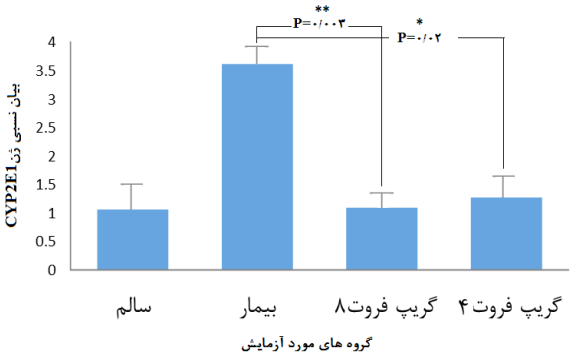
در تحقیق حاضر تأیید سنتز ژن *CYP2E1* نیز با استفاده از ژل آگارز یک درصد بررسی شد و باند ۱۳۰ جفت بازی مشاهده شد. در تصویر ۳ نتایج ژل الکتروفورز برای ژن *CYP2E1* نشان داده شده است.



تصویر ۳- تأیید صحت ژن *CYP2E1*. چاهک M نشانگر و چاهک S باند ۱۳۰ جفت بازی

نتایج آنالیز بیان ژنی

در پژوهش حاضر داده‌های حاصل از بیان ژن به روش real time RT-PCR با استفاده از آزمون آماری ANOVA و سطح معنی داری P<۰/۰۵ انجام شد و بررسی داده‌های حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که آب گریپ فروت باعث کاهش بیان ژن *CYP2E1* می‌شود و این کاهش بیان از نظر آماری معنادار بود (P<۰/۰۵). در نمودار ۲ بررسی بیان ژن *CYP2E1* نشان داده شده است.



نمودار ۲- نتایج آنالیز آماری بیان ژن *CYP2E1*. مقایسه بیان ژن در گروه‌های دریافت کننده گریپ فروت نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب. * و ** نشانه معنادار بودن بیان ژن است که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۲) و (P=۰/۰۰۳) است.

جدول ۳- مقایسه میزان تغییرات بیان ژن CYP2E1 در گروه‌های مختلف

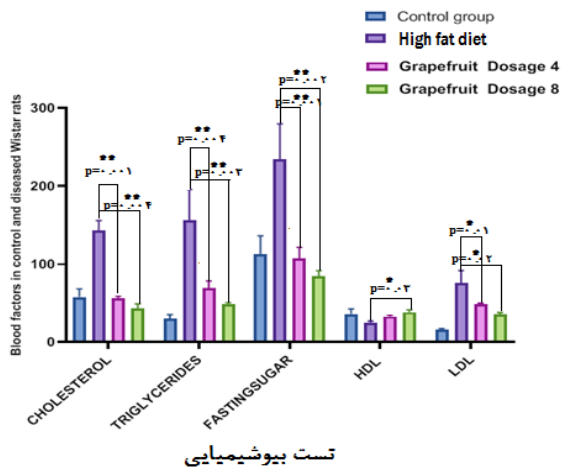
گروه	سالم	دریافت کننده رژیم پرچرب	گریپ فروت ۴	گریپ فروت ۸
بیان ژن	۱/۰۶ ± ۰/۳۹[b]	۳/۶۱ ± ۰/۲۵[a]	۱/۲۷ ± ۰/۲۴[b]	۱/۰۹ ± ۰/۳۸[b]

a,b: میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت اختلاف آماری معنی‌دار دارند a: (P=۰/۰۲) وb: (P=۰/۰۰۳).

طبق جدول ۳ و نمودار ۲ بیشترین میزان بیان مربوط به گروه رت‌های مبتلا به کبد چرب می‌باشد. کمترین میزان بیان مربوط به گروه سالم می‌باشد. داده‌های حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که عصاره گریپ‌فروت با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد چرب (۱/۰۹ ± ۰/۳۸) نسبت به دوز ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم (۱/۲۷ ± ۰/۲۴) شود که این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه بیمار (۳/۶۱ ± ۰/۲۵) معنادار است (P=۰/۰۲).

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود نتایج تست‌های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت‌های تیمار شده با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم گریپ فروت را نشان می‌دهد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که سطح کلسترول در دو گروه دریافت کننده گریپ فروت ۴ و ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب کاهش داشت که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۰۱) و (P=۰/۰۰۴)بود. همچنین تری‌گلیسرید در دو گروه دریافت کننده گریپ فروت ۴ و ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب نیز کاهش معنادار داشت که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۰۴) و (P=۰/۰۰۳) بود. قند در دو گروه دریافت کننده گریپ فروت ۴ و ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب نیز کاهش معنادار داشت که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۰۲) و (P=۰/۰۰۱) بود. از سوی دیگر HDL در گروه دریافت کننده گریپ فروت ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب نیز افزایش معنادار داشت که برابر با (P=۰/۰۳) بود. در نهایت LDL در دو گروه دریافت کننده گریپ فروت ۴ و ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب نیز کاهش معنادار داشت که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۱) و (P=۰/۰۲) بود.



نمودار ۳- نمودار حاصل از نتایج تست بیوشیمیایی. مقایسه بیان ژن در گروه‌های دریافت کننده گریپ فروت نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب. * و ** نشانه معنادار بودن بیان ژن بین گروه‌ها می‌باشد که به ترتیب برابر با (P=۰/۰۱) و (P=۰/۰۰۱) است.

بحث

نارینجنین، فلاونوئید اصلی در گریپ فروت است که، باعث کاهش لیپیدهای پلاسما در داخل بدن می شود. با توجه به آمار فزاینده مبتلا به کبد چرب در جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی، در این مطالعه به بررسی اثرعصاره گریپ فروت بربیان ژن *CYP2E1* در موش های چاق مبتلا به کبد چرب پرداخته شد و نتایج نشان داد که آب میوه گریپ فروت باعث کاهش بیان ژن *CYP2E1* می‌شود و این کاهش بیان از نظر آماری معنادار بود. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آب میوه گریپ فروت به دلیل داشتن نارینجنین سبب کاهش بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد چرب و چاقی می‌شود و می‌توان گفت در صورت تأیید در مطالعات بیشتر، می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب و چاقی مطرح باشد. در راستای پژوهش حاضر بررسی‌هایی صورت گرفته که در ادامه به بررسی آن‌ها پرداخته شده است. به عنوان مثال Butura و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر ژن *CYP2E1* در پیشرفت بیماری کبد چرب درون موش های تراریخته را مورد مطالعه قرار دادند و یافتند که بیان بیش از حد *CYP2E1* آسیب‌های کبدی را تشدید می‌کند (۱۳). خرمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تأثیر درمانی داروی Hesa-A بر روی کبد چرب غیرالکلی در موش های صحرایی دریافتند که ترکیب گیاه دریایی حصا-آ به عنوان یک داروی داخلی در مقایسه با آتورواستاتین می‌تواند اثرات درمانی موثر وبدون عوارض نسبت به داروهای شیمیایی درکبدچرب غیرالکلی ایجادکند و مورداستفاده قرار گیرد (۱۴). Wuو همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی نقش سیتوکروم P4502E1 و اتوفاژی در استئاتوز الکلی موش ها دریافتند که *CYP2E1* نقش مهمی در کبد چرب ناشی از اتانول دارد. گونه‌های اکسیژن فعالِ مشتق از *CYP2E1* مانع از اتوفاژی می‌شود، که متعاقباً باعث انباشته شدن ذرات لیپیدی می‌گردد. مهار اتوفاژی از طریق *CYP2E1* باعث سمیت کبدی ناشی از اتانول، استئاتوز و استرس اکسیدان می‌شود (۱۵). De La Garza و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای با هدف بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عصاره helichrysum و گریپ فروت در موش‌های مقاوم به انسولین و دارای اضافه وزن انجام دادند. این نتایج با کاهش بیان ژن TNFα در بافت چربی اپیدیمال و مخاط روده و کاهش بیان TLR2 در مخاط روده همراه بود. عصاره Helichrysum و گریپ فروت ممکن است به عنوان مکمل رژیم های غذایی برای کاهش وزن استفاده شود. هر دو عصاره به کاهش وزن و مقاومت به انسولین کمک کردند، نشانگرهای التهابی را بهبود بخشیدند و استرس اکسیداتیو ناشی از رژیم غذایی HF–HS diet[1] را در موش‌های مقاوم به انسولین کاهش دادند (۱۶). در پژوهش حاضر نتایج نشان داد که عصاره آب میوه گریپ فروت باعث کاهش بیان ژن *CYP2E1* می‌شود.

در سال ۲۰۲۰ Chen و همکاران به بررسی بیان ژن *CYP2E1* در آسیب‌های کبدی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد علاوه بر این‌که این ژن در بیماری‌های کبدی افزایش می‌یابد جهش در این ژن نیز باعث عدم اتصال داروهای درمانی در این ژن می‌شود (۱۷). در سال ۲۰۲۰ Katary و همکاران به بررسی بیان ژن *CYP2E1* در بیماری‌های قلبی پرداختند و اظهار داشتند که این ژن در بیماری‌های قلبی و عروقی بیان بیشتری دارد و می‌تواند به عنوان یک فاکتور برای شناسایی بیماری‌های قلبی و عروقی باشد. همچنین این دانشمندان اظهار داشتند که مصرف مواد مخدر و مشروبات الکلی نیز باعث افزایش بیان این ژن خواهد شد (۱۸). همچنین در سال ۲۰۲۰ Angireddy و همکاران به بررسی اثرات الکل بر روی ژن *CYP2E1* پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که الکل توسط *CYP2E1* در بافت کبدی به متابولیت سمی، استالدئید متابولیزه می‌شود و همچنین گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS[2]) را القا می‌کند که در کنار هم نقشی اساسی در آسیب سلول و بافت دارند. این نتایج برای اولین بار یک ارتباط مکانیکی بین عملکرد *CYP2E1* و اختلال عملکرد میتوکندری با الکل و فعال شدن استئاتوز کبدی را نشان داد (۱۹). در سال ۲۰۱۴ Airlia و همکاران به بررسی مصرف آب گریپ فروت بر بهبود مقاومت به انسولین ناشی از رژیم غذایی پرچرب و افزایش وزن در موش‌ها

[1] High Fat/High Sucrose Diet
[2] Reactive Oxygen Species

پرداختند. نتایج نشان داد که مصرف گریپ فروت قند خون را کاهش داده و تحمل انسولین را بهبود می‌بخشد؛ اما در افزایش وزن تأثیری ندارد، همچنین گریپ فروت مفید برای سلامتی است (۲۰).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که نتایج حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که عصاره گریپ‌فروت با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد چرب نسبت به دوز ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم شود و می‌توان گفت عصاره آب میوه گریپ‌فروت به دلیل داشتن نارینجنین سبب کاهش بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد می‌شود که در صورت تأیید در مطالعات بیشتر، می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب مطرح باشد.

تقدیر و تشکّر

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۹۷۰۱۵۲۶۹۹ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بوده است و بدین‌وسیله از تمام افرادی که در انجام این پژوهش یاری رساندند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Kamran SM, Ahmad M, Ayaz SB, Ahmad I. Frequency of non-alcoholic fatty liver disease in newly diagnosed cases of hepatitis c virus infection and its correlation with genotypes in normal weight patients. Pakistan Armed Forces Medical Journal. 2018; 68(5): 1444-48. Link

2- De Assunção SNF, Sorte NCB, Alves CD, Mendes PSA, Alves CRB, Silva LR. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathophysiology in obese children and adolescents: update. Nutr Hosp. 2017; 34(3): 727-30. DOI: 10.20960/nh.723

3- Golabi P, Otgonsuren M, de Avila L, Sayiner M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome increase the risk of mortality in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Medicine (Baltimore). 2018; 97(13): 1-12. DOI: 10.1097/MD.0000000000010214

4- Alsaif FA, Alqahtani SH, Alsadoon AM, Alswat KA, Abdo AA, Hassanain MM, et al. Prevalence of biopsy-proven nonalcoholic fatty liver among patients with gallstone disease. Saudi J Gastroenterol. 2020; 26(4): 204-9. DOI: 10.4103/sjg.SJG_29_20

5- Seo Y, Aonuma K. Gamma-Glutamyl Transferase as a Risk Biomarker of Cardiovascular Disease—Does It Have Another Face? Circulation. 2017: 81(6): 783-5. CJ-17-0409. DOI: 10.1253/circj.CJ-17-0409

6- Chen J, Jiang S, Wang J, Renukuntla J, Sirimulla S, Chen J. A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism. Drug Metab Rev.. 2019; 51(2): 178-95. DOI: 10.1080/03602532.2019.1632889

7- Shahraki Mojahed L, Davari S, Hajinezhad M. The Effect of Salvia shariffi and Salvia virgata Hydroalcoholic Extracts on Some Serum Biochemical Parameters in Male Hyperlipidemic Rats. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2017; 16(5): 437-48. [Persian] Link

8- Vyas M. Physicochemical analysis of leaves of Eriobotrya japonica and antioxidant and antidiabetic evaluation of its methanolic extract. Int J Green Pharm. 2019; 13(3): 1-10. DOI: 10.22377/ijgp.v13i3.2612

9- Ko JH, Arfuso F, Sethi G, Ahn KS. Pharmacological utilization of bergamottin, derived from grapefruits, in cancer prevention and therapy. Int J Mol Sci. 2018; 19(12): 4048. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms19124048.

10- Holmes A, Coppey LJ, Davidson EP, Yorek MA. Rat models of diet-induced obesity and high fat/low dose streptozotocin type 2 diabetes: effect of reversal of high fat diet compared to treatment with enalapril or menhaden

oil on glucose utilization and neuropathic endpoints. J Diabetes Res. 2015; 2015 307285. DOI: 10.1155/2015/307285

11- Igual M, Contreras C, Camacho M, Martínez-Navarrete N. Effect of thermal treatment and storage conditions on the physical and sensory properties of grapefruit juice. Food Bioprocess Technol. 2014; 7(1): 191-203. DOI: 10.1007/s11947-013-1088-6

12- Sani AM, Hedayati G, Arianfar A. Effect of temperature and concentration on density and rheological properties of melon (Cucumis melo L. var. Inodorus) juice. Nutr Food Sci. 2014; 44(2): 168-78. DOI: 10.1108/NFS-06-2013-0065

13- Butura A, Nilsson K, Morgan K, Morgan TR, French SW, Johansson I, et al. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. J Hepatol. 2009; 50(3): 572-83. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.10.020

14- Khorrami M, Efati M, Zaree Mahmoudabadi A, Raouf Sarshoori J. Therapeutic Effect OF HESA-A (Herbal-Marine) on Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Rats. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016; 26(142): 14-22. [Persian] Link

15- Wu D, Wang X, Zhou R, Yang L, Cederbaum AI. Alcohol steatosis and cytotoxicity: the role of cytochrome P4502E1 and autophagy. Free Radic Biol Med. 2012; 53(6): 1346-57. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.005

16- de la Garza AL, Etxeberria U, Haslberger A, Aumueller E, Martínez JA, Milagro FI. Helichrysum and grapefruit extracts boost weight loss in overweight rats reducing inflammation. J Med Food. 2015; 18(8): 890-8. DOI: 10.1089/jmf.2014.0088

17- Chen K, Guo R, Wei C. Synonymous mutation rs2515641 affects CYP2E1 mRNA and protein expression and susceptibility to drug-induced liver injury. Pharmacogenomics. 2020; 21(7): 459-70. DOI: 10.2217/pgs-2019-0151

18- Katary M, Abdel-Rahman AA. Alcohol suppresses cardiovascular diurnal variations in male normotensive rats: Role of reduced PER2 expression and CYP2E1 hyperactivity in the heart. Alcohol. 2020; 89: 27-36. DOI: 10.1016/j.alcohol.2020.08.001

19- Angireddy R, Chowdhury AR, Zielonka J, Ruthel G, Kalyanaraman B, Avadhani NG. Alcohol-induced CYP2E1, mitochondrial dynamics and retrograde signaling in human hepatic 3D organoids. Free Radic Biol Med. 2020; 159: 1-14. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.030

20- Chudnovskiy R, Thompson A, Tharp K, Hellerstein M, Napoli JL, Stahl A. Consumption of clarified grapefruit juice ameliorates high-fat diet induced insulin resistance and weight gain in mice. PLoS One. 2014; 9(10): e108408. DOI: 10.1371/journal.pone.0108408