



Original Article

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

Parisa Vahid^{ID1}, Noosha Zia-Jahromi^{ID1*}

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

بررسی آب میوه گریپ فروت بر بیان ژن *CYP2E1* در موش صحرایی چاق و کنترل

پریسا وحید^۱، نوشاد ضیاء جهومی^{۱*}

چکیده

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

روش تحقیق: این مطالعه تجربی بر روی ۲۴ سررت نر ویستار با وزن ۱۸۰ ± ۲۰ گرم انجام شد. رتها به چهار گروه کنترل (فاقد تبیمار)، گروه دریافت کننده رژیم غذایی پر چرب، گروه تبیمار ۱ (رژیم پر کلسترول به همراه آب گریپ فروت ۴ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و گروه تبیمار ۲ (رژیم پر کلسترول به همراه آب گریپ فروت ۸ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) تقسیم و به مدت ۶ هفته مورد گاواز قرار گرفتند و در نهایت بیان ژن *CYP2E1* موردن بررسی قرار گرفت. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که گریپ فروت با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *CYP2E1* در رتها مبتلا به کبد چرب ($۰/۳۸ \pm ۰/۰۹$) نسبت به دوز ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم ($۰/۲۴ \pm ۰/۲۷$) شود که این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه رژیم غذایی پر چرب ($۰/۲۵ \pm ۰/۰۳$) معنادار است ($P=0/003$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که آب میوه گریپ فروت به دلیل داشتن نارینجنین سبب کاهش تجمع تری‌گلیسیرید در بافت کبد شود. آب میوه گریپ فروت می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری کبد چرب و چاقی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن *CYP2E1*، کبد چرب، گریپ فروت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیر جند. ۱۴۰۰: ۲۶۰-۲۶۹.

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲

^۱ 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 نامبر: ۰۳۸۳۳۶۱۰۰۰ پست الکترونیکی: Nooshazia.59@gmail.com

مقدمه

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 بیلی‌روین، آلبومین، زمان پرتوترومیین 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 فربین که نشانه ذخایر آهن بدن است، در نیمی از موارد کبد چرب دیده می‌شود و درواقع نشانه‌ای از مقاومت به انسولین می‌باشد.^(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 مونوکسیژناز هستند که بسیاری از واکنش‌های متابولیسم دارو و سنتر کلسترول، استروئیدها و سایر لیپیدها را کاتالیز می‌کنند. این پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در اثر *CYP2E1* هیدروکسیلاسیون امگا اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کند.^(۶) تری گلیسرید و کلسترول، لیپیدهای بیولوژیک مهمی هستند که مصرف بیش از حد آن‌ها از طریق غذا منجر به هیپرلیپیدمی می‌گردد. هیپرلیپیدمی زمینه‌ساز کبد چرب غیرالکلی است که با تجمع تری گلیسریدها در سلول‌های کبدی که در اثر استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول شکل می‌گیرند، همراه است و می‌تواند به استثاتوز، فیبرоз 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 بیش از بیش مورد توجه قرار گرفته است.

بیماری کبد چرب غیرالکلی یک علت شایع بیماری‌های مزمن کبدی در سراسر جهان است که می‌تواند به فیبروز کبدی، سیروز و سلطان کبد ختم شود. شیوع این بیماری در جوامع مختلف از ۲/۵ درصد تا ۲۴ درصد متفاوت است^(۸,۹).

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، به صورت اتفاقی کشف می‌گردد. اگرچه بعضی بیماران به ندرت از درد مبهم قسمت بالا و راست شکم و یا احساس خستگی زودرس و خواب آلودگی شکایت دارند. پاتوژن این بیماری پیچیده و چند عاملی بوده و در آن برهمنکش عوامل محیطی و ژنتیکی بسیار تاثیرگذار می‌باشد. کبد چرب غیرالکلی به شدت 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 در سرم بیماران وارد می‌شوند. افزایش آن‌ها نشانه تخریب سلول کبدی است. در بیماری کبد چرب بخلاف Alanine (ALT) از Aspartate (AST) (Aminotransferase Aminotransferase) بیشتر است و فقط در مراحل پیشرفتی بیماری کبد چرب (سیروز) است که غلبه افزایش میزان AST به ALT دیده می‌شود. افزایش آنزیم‌های کبدی فوق در اکثر موارد

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 به صورت 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 گاواز 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 (۱۱، ۱۲). سپس براساس غلظت‌های مورد نظر گریپ فروت توسط آب مقطر رقیق سازی صورت گرفت.

نمونه‌گیری

پس از طی ۶ هفته از فرایند گاواز و تیمار، رت‌ها در شرایط کاملاً بهداشتی با استفاده از کلروفورم بیهودش شدند و با استفاده از ست جراحی شکم آن‌ها باز و کبد آن‌ها برداشته شد. سپس مقداری RNA از کبد برای انجام مراحل real time RT-PCR 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 آرما 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

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

گریپ‌فروت که از خانواده مرکبات می‌باشد درختی است بومی ایران که در شمال و جنوب این کشور پهناور یافت می‌شود. آب میوه گریپ‌فروت به عنوان 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 سلطان است (۹). نارینجنین (Naringenin)، فلاونوئید اصلی در گریپ‌فروت است که، باعث کاهش لیپیدهای پلاسمای دارای چرب 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 بر بیان ژن CYP2E1 در موش‌های چاق مبتلابه کبد چرب می‌پردازیم.

روش تحقیق

نوع مطالعه، جامعه مورد مطالعه و گروه‌بندی

مطالعه حاضر از نوع تجربی می‌باشد 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 ویستان با میانگین وزنی ۱۸۰ ± ۲۰ 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 قفسه‌های 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 $7/4$ کیلوکالری در هر گرم (۴۱ درصد چربی، ۲۴ درصد پروتئین و ۲۱ درصد کربوهیدرات) در طی این دوره مبتلا به

بررسی شد.

تکنیک RT-Real Time PCR

برای انجام تکنیک real time RT-PCR بر اساس پروتکل کیت یکتاچه‌بیزآزمایشی ۱۰ میکرو لیتر SYBERPremix به ۱ میکرو لیتر cDNA اضافه شد و سپس پرایمرهای پیشرو و پیرو از هر کدام به مقدار ۵/۰ 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.

تست‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی کبد

تست‌های بیوشیمیایی شامل سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، قند، SGPT، LDL، HDL، HDL و آکالان فسفاتاز بود و این آزمایشات با روش اتوانالیزر و توسط دستگاه اتوانالیزر (Auto Analyser BT 3000plus، 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 تعمیی LSD ارزیابی شدند و نتایج بصورت Mean \pm SEM ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

وزن موش‌ها در طول ۶ هفته در نمودار ۱ آورده شده است که نشان دهنده افزایش وزن آن‌ها می‌باشد. در گروه کنترل به دلیل عدم استفاده از رژیم پرچرب تغییرات وزنی در طول دوره مورد بررسی ناچیز بوده ($P = 0.19$). در حالی که در موش‌های دارای رژیم غذایی پرچرب افزایش قابل توجهی در میانگین وزنی موش‌ها پس از ۶ هفته ایجاد شده است ($P = 0.001$).

خلوص RNA استخراج شده با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزمایشی 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

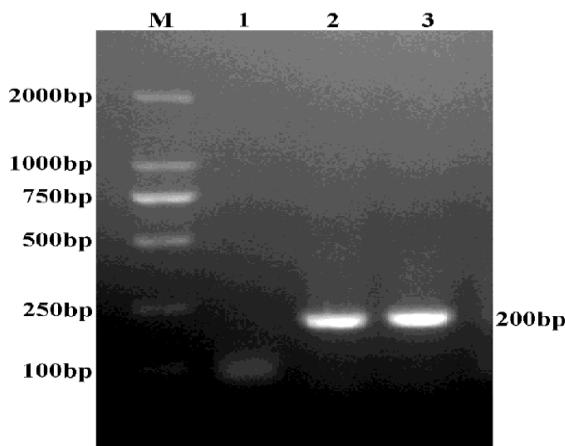
	سایز باند	دما	توالی	ژن
CYP2E1 - F	bp	۵۹°C	5'- AACTCTGAGAT ATGGGCTCCTG -3'	
CYP2E1 - R	۱۳۰		5'- GTAGGGCATATC CAGTCTGTCTC -3'	
GAPDH-F	bp	۶۵°C	5'- TGATTCTACCCA CGGCAAGTTC-3'	
GAPDH-R	۲۰۰		5' -CGCTCCTGGAAG ATGGTGATG-3'	

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 ۵/۰ میکرولیتر پرایمر پیشرو و ۰/۰ میکرولیتر پرایمر پیرو بود به ویال اضافه شد. در ادامه ۱ میکرو 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 نمونه‌ها 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، Extensionfinal به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود، تنظیم شد. تعداد سیکل‌ها ۳۵ دور در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد

تأیید صحت سنتز cDNA

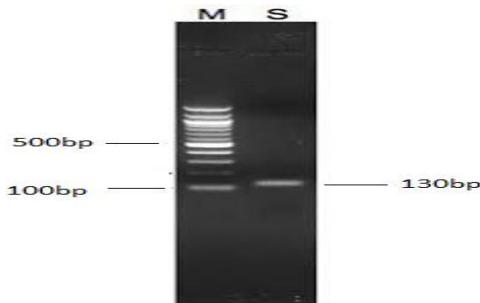
در تحقیق حاضر پس از سنتز برای تأیید صحت سنتز cDNA با پرایمرهای اختصاصی ژن *GAPDH*, واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفوروز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۲۰۰ جفت cDNA بازی مربوط به *GAPDH* دیده شد که تأیید سنتز مناسب بود که در تصویر ۲ نتایج آن نشان داده شده است.



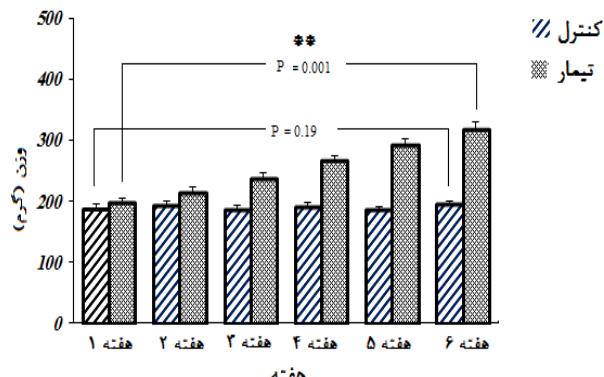
تصویر ۲- تأیید صحت سنتز cDNA. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ نمونه سالم، چاهک شماره ۳ نمونه رت مبتلا به کبد چرب می‌باشد.

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 الکتروفوروز برای ژن *CYP2E1* نشان داده شده است.



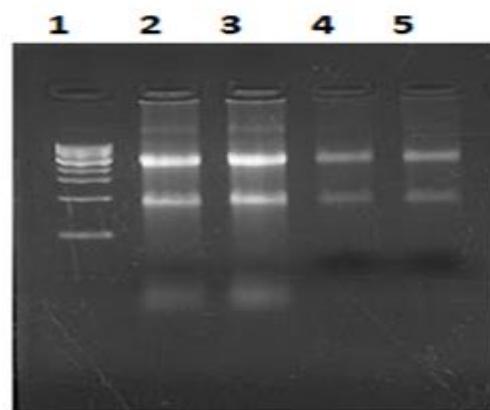
تصویر ۳- تأیید صحت سنتز ژن *CYP2E1*. چاهک M نشانگر و چاهک S باند ۱۳۰ جفت بازی



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

بررسی کیفی RNA

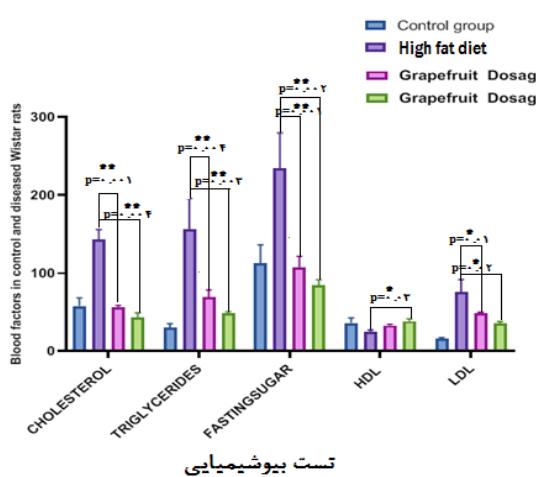
در این تحقیق برای کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده از نمونه‌هایی که در شرایط *RNase free* تهییه شده بودند، روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. از آنجایی که بیشترین میزان RNA موجود در RNA استخراج شده، RNAهای ریبوزومی است بنابراین حضور سه باند ۱۸S، ۲۸S و ۵S/۸Ribosomal RNA نشان‌دهنده‌ی کیفیت استخراج 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

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

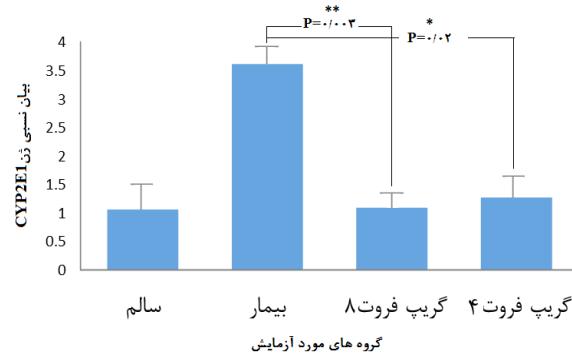
همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود نتایج تست‌های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت‌های تیمار شده با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم گریپ فروت را نشان می‌دهد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که سطح کلسترول در دو گروه دریافت کننده گریپ فروت ۴ و ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرچرب کاهش داشت که به ترتیب برابر با ($P=0.001$) و ($P=0.004$) 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 ($P=0.003$) و ($P=0.004$) 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 ($P=0.002$) و ($P=0.001$) 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 ($P=0.03$) 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 ($P=0.02$) و ($P=0.01$) 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 ($P=0.01$) و ($P=0.001$) است.

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 $P<0.05$ 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 ($P<0.05$). 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 ($P=0.02$) و ($P=0.03$) است.

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

گروه	سالم	بیمار	گریپ فروت ۴	رژیم پرچرب
بیان ژن	1.09 ± 0.38^b	1.27 ± 0.24^b	2.61 ± 0.25^a	1.06 ± 0.39^b

a: میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت اختلاف آماری معنی دار دارند: a ($P=0.02$) و b ($P=0.03$).

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 گریپ فروت با دوز ۸ میلی‌لیتر/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن *CYP2E1* در رت‌های مبتلا به کبد چرب شود که این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه بیمار ($P=0.02$) معنادار است ($P=0.02$).

بحث

در موش‌های مقاوم به انسولین و دارای اضافه وزن انجام دادند. این نتایج با کاهش بیان ژن TNF α در بافت چربی اپیدیدیمال 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 HF-HS diet^۱ با خشیدن و استرس اکسیداتیو ناشی از رژیم غذایی^۲ 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 این که 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 الكل بر روی ژن CYP2E1 پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که الكل توسط CYP2E1 در بافت کبدی به متابولیت سمی، استالدید متابولیزه می‌شود و همچنین گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS^۳) 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 الكل و فعل 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

نارینجنین، فلاونوئید اصلی در گریپ فروت است که، باعث کاهش لیپیدهای پلاسمای دارای کبد چرب در بدن می‌شود. 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 اثر عصاره گریپ فروت بر بیان ژن CYP2E1 در موش‌های 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 موش‌های ترازیخته را مورد مطالعه قرار دادند و یافته‌ند که بیان بیش از حد CYP2E1 آسیب‌های کبدی را تشدید می‌کند (۱۳). خرمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تاثیر درمانی داروی Hesa-A بر روی کبد چرب غیرالکلی در موش‌های صحرایی دریافتند که ترکیب گیاه دریابی حصار-آ به عنوان یک داروی داخلی در مقایسه با آتونرواستاتین می‌تواند اثرات درمانی موثر و بدون عوارض نسبت به داروهای شیمیایی در کبد چرب غیرالکلی ایجاد کند و مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). Wu و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی نقش سیتوکروم P4502E1 و اتوفاژی در استئاتوز الكلی موش‌ها دریافتند که CYP2E1 نقش مهمی در کبد چرب CYP2E1 ناشی از اتانول دارد. گونه‌های اکسیژن فعال مشتق از CYP2E1 مانع از اتوفاژی می‌شود، که متعاقباً باعث انبیاشته شدن ذرات لیپیدی می‌گردد. مهار اتوفاژی از طریق CYP2E1 باعث سمیت کبدی De La Garza و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای با هدف بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عصاره helichrysum و گریپ فروت

¹ High Fat/High Sucrose Diet

² Reactive Oxygen Species

کبد چرب مطرح باشد.

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).

تقدیر و تشکر

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

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

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که نتایج حاصل از بیان ژن *CYP2E1* نشان داد که عصاره گریپ فروت 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 گریپ فروت 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

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](https://doi.org/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.00000000000010214](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010214)
- 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108408)