

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی اسفناج بر بیان mRNA رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی

شادی بابایی^۱، دکتر معصومه اصل روستا^۲، دکتر ساناز مهمازی^۲

۱) گروه ژنتیک، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، ۲) گروه فیزیولوژی جانوری، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: گروه فیزیولوژی جانوری، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، دکتر معصومه اصل روستا؛ e-mail: Masoumeh_rousta@yahoo.com

چکیده

مقدمه: رزیستین یک هورمون پپتیدی است که از بافت چربی ترشح می‌شود. افزایش ترشح رزیستین موجب مقاومت به انسولین و پیدایش سندرم متابولیک می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی اسفناج (*Spinacia oleraceae* L.) بر بیان mRNA ی رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۰ سررت به ۶ گروه تقسیم شدند که عبارت بود از: ۱) شاهد، ۲) اسفناج ۲۰۰، ۳) اسفناج ۴۰۰، ۴) استرس، ۵ و ۶) استرس-اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰. گروه‌های ۲ و ۵ عصاره هیدروالکلی اسفناج را با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه‌های ۳ و ۶ عصاره را با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوآژ به مدت ۲۱ روز متوالی دریافت نمودند. گروه‌های ۴، ۵ و ۶ به مدت ۲۱ روز متوالی هر روز ۶ ساعت در مقیدکننده قرار داده شدند. در پایان دوره، بیان mRNA رزیستین در بافت چربی احشایی حیوانات به روش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت و $P < 0/05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. یافته‌ها: بی‌حرکتی مزمن موجب افزایش معنادار بیان رزیستین ($2/78 \pm 0/30$) در بافت چربی در مقایسه با گروه شاهد ($1 \pm 0/36$) شد ($P = 0/002$). بیان رزیستین در چربی احشایی گروه‌های استرس-اسفناج ۲۰۰ و استرس-اسفناج ۴۰۰ (به ترتیب $0/74 \pm 0/23$ و $1/25 \pm 0/15$) کمتر از گروه استرس بود (به ترتیب $P = 0/000$ و $P = 0/020$). نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره اسفناج می‌تواند بیان رزیستین را در موش‌های مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی کاهش دهد.

واژگان کلیدی: عصاره اسفناج (*Spinacia oleraceae* L.)، بیان ژن رزیستین، استرس بی‌حرکتی، رت

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۲۱ - دریافت اصلاحیه: ۹۷/۱۱/۲۹ - پذیرش مقاله: ۹۸/۱/۱۸

مقدمه

رزیستین یک هورمون پپتیدی است که افزایش ترشح آن موجب مقاومت به انسولین، التهاب، دیابت نوع ۲، چاقی و بیماری‌های قلبی-عروقی نظیر فشار خون بالا و آترواسکلروز می‌شود. رزیستین به واسطه التهاب می‌تواند ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی را تحریک نماید.^{۱،۲} سطح رزیستین سرم

رابطه‌ی معکوسی با فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن دارد به طوری که افزایش بیان رزیستین موجب کاهش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود^۳ و به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها سطح سرمی رزیستین را کاهش می‌دهند.^۴ برای مثال؛ تیمار آنتی‌اکسیدان کوئرستین می‌تواند سطح سرمی و بیان ژن رزیستین را در سلول‌های تک هسته‌ای در زنان چاق مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک کاهش دهد.^۵ همچنین زورراترول

درجه سانتی‌گراد و دسترسی آسان به آب و غذا) نگهداری شدند.

رت‌ها به ۶ گروه (هر گروه شامل ۵ سر رت) تقسیم شدند:

- گروه شاهد: حیواناتی که هیچ تیماری دریافت نکردند.

- گروه‌های آزمون دریافت‌کننده عصاره هیدروالکی اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰: به مدت ۲۱ روز متوالی، هر روز، عصاره هیدروالکی اسفناج را به ترتیب با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت نمودند.^{۱۱،۱۷}

- گروه آزمون استرس: به مدت ۲۱ روز متوالی و هر روز ۶ ساعت (از ساعت ۸ تا ۱۴) در مقیدکننده (Restrainer) قرار داده شدند.^{۱۷}

- گروه‌های آزمون استرس-اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰: به مدت ۲۱ روز متوالی، هر روز، علاوه بر دریافت عصاره اسفناج با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، در مقیدکننده قرار گرفتند.

برگ‌های خشک شده اسفناج از گیاهانی که در مزارع خداینده کشت شد، تهیه شده و توسط گروه گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تایید شد. ۱۰۰ گرم پودر برگ خشک شده اسفناج به همراه ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد در یک بشر به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و محلول مورد نظر، پس از گذراندن از کاغذ صافی، جهت حذف حلال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در روتاری قرار گرفت. سپس با افزودن آب مقطر، دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره در حجم ۰/۴ میلی‌لیتر برای هر گاواژ تهیه و به حیوان خوراندند شد.

پس از پایان این دوره، حیوانات بدون درد کشته شده و بافت چربی احشایی آن‌ها بلافاصله پس از جداسازی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردید. جداسازی RNA و سنتز cDNA با استفاده از کیت‌های مربوطه (ساخت شرکت سیناژن، ایران) انجام گرفت. میزان بیان ژن رزیستین و ژن مرجع B2M (ژن بتا-۲-میکروگلوبولین؛ کدکننده پروتئینی از خانواده MHC-I که بر روی غشای همه‌ی سلول‌های هسته‌دار وجود دارد) با استفاده از Real Time PCR توسط کیت Real Q plus 2x Master mix Green ساخت سیناژن تعیین شد. مطالعه به روش کمی-نسبی (Relative quantification) انجام گرفت و ژن هدف

نیز بیان رزیستین را در بافت چربی موش‌های دیابتی نوع ۲ کاهش می‌دهد.^{۱۶} تیمار موش‌های سالم با رتینوئیک اسید موجب کاهش بیان رزیستین در چربی سفید و قهوه‌ای و همچنین کاهش سطح رزیستین سرم در این حیوانات می‌شود.^۷

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) از خانواده‌ی Chenopodiaceae. یک گیاه بومی آسیا می‌باشد که حاوی مقادیر فراوانی فلاونوئید (کوئرستین، میریستین، کامفرول، آپیزنین، لوتئولین و ...)، ترکیبات فنولی (نظیر پاراکوماریک اسید و فرولیک اسید)، کاروتنوئیدها (لوتئین و بتاکاروتن) و ویتامین (A, C, E, K و فولیک اسید) است.^۸ اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضددیابتی و هیپولیپیدمیک این گیاه گزارش شده است.^{۹-۱۲} اسفناج به عنوان یکی از گیاهان کنترل‌کننده سندرم متابولیک پیشنهاد شده است.^{۱۱}

بی‌حرکتی نوعی استرس است که از ویژگی‌های نامطلوب جوامع ماشینی محسوب می‌شود. از سوی دیگر تعداد زیادی از افراد ممکن است به دلایلی نظیر شکستگی، جراحی و غیره، مجبور به تحمل بی‌حرکتی باشند. بی‌حرکتی موجب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال شده و در نهایت سطح گلوکوکورتیکوئیدها را در خون افزایش می‌دهد. بی‌حرکتی در طولانی مدت اثرات مخربی در بدن به جای می‌گذارد. استرس بی‌حرکتی و گلوکوکورتیکوئیدها می‌توانند سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن را تضعیف نموده و استرس اکسیداتیو را در بافت‌های مختلف بدن ایجاد نمایند.^{۱۳} استرس اکسیداتیو موجب پیدایش مقاومت به انسولین و التهاب در بافت چربی شده و مقاومت به انسولین نیز به نوبه خود، التهاب را در بافت چربی افزایش می‌دهد. عوامل فوق در مجموع زمینه‌ساز سندرم متابولیک هستند.^{۱۴-۱۶}

از این رو به نظر می‌رسد اسفناج بر بیان ژن رزیستین اثر بگذارد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره هیدروالکی اسفناج بر بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی رت‌های نر بالغ مواجه شده با استرس بی‌حرکتی مزمن است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش بنیادی از ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار به وزن ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی، دمای ۲۳ تا ۲۵

توالی پرایمرهای استفاده شده^{۱۸،۱۹} در جدول ۱ نمایش داده شده است.

رزیستین) نسبت به بیان ژن مرجع (B2M) مورد سنجش قرار گرفت. همه مراحل به طور دقیق طبق دستورالعمل کیت-ها انجام و میزان بیان رزیستین نسبت به B2M با استفاده از فرمول زیر ارزیابی شد: $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{(\Delta Resistin - \Delta B2M)}$.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

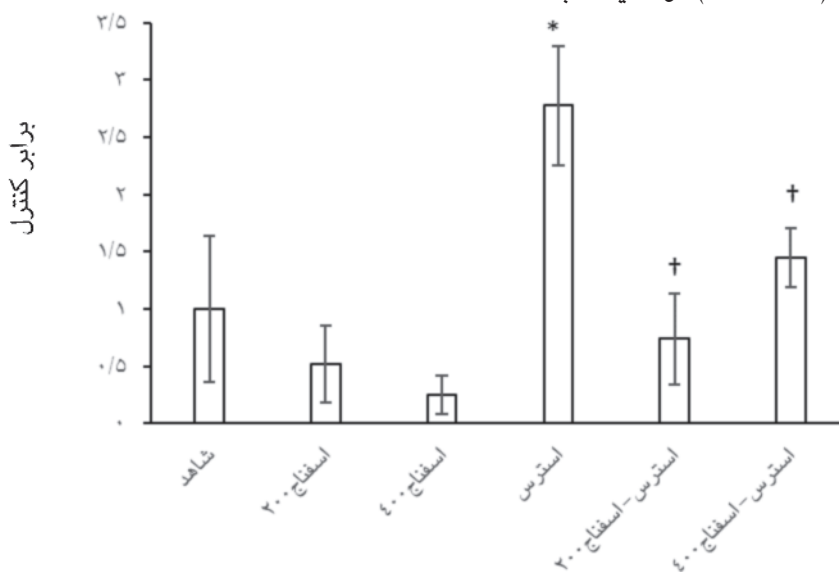
پرایمر	توالی
Resistin – Forward	5'-GGCTCTGTGCTCCTCCATCT-3'
Resistin –Reverse	5'-AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG-3'
B2M – Forward	5'-AAGATTCAGGTTTACTCACGTC-3'
B2M – Reverse	5'-TGATGCTGCTTACATGTCTCG-3'

گروه شاهد (۱±۰/۳۶) شد ($P < 0.002$). بیان ژن رزیستین در گروه‌های آزمون استرس-اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰ (به ترتیب 0.74 ± 0.23 و 1.45 ± 0.15) در مقایسه با گروه استرس به طور معناداری کاهش یافت (به ترتیب $P = 0.000$ و $P = 0.020$) در حالی که اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشت (به ترتیب $P = 0.96$ و $P = 0.77$). عصاره اسفناج در هر دو دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش بیان ژن رزیستین شد (به ترتیب 0.52 ± 0.19 و 0.25 ± 0.09) که در مقایسه با گروه شاهد معنادار نبود (به ترتیب $P = 0.72$ و $P = 0.30$) (نمودار ۱).

این مطالعه با کد IR.IAU.Z.REC.1396.36 به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان رسید و قوانین مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. مطالعات آماری با استفاده از SPSS v.18 انجام شد. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش گردید. مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از One way ANOVA و Tukey HSD انجام گرفت و $P < 0.05$ ملاک معناداری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۲۱ روز بی‌حرکتی موجب افزایش معنادار بیان رزیستین در بافت چربی احشایی رت‌ها (2.78 ± 0.30) در مقایسه با



نمودار ۱- نتایج حاصل از سنجش بیان ژن رزیستین در بافت چربی. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار و به شکل برابر با شاهد نشان داده شده است.

* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه شاهد و † نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه استرس می‌باشد. (در هر گروه ۵ سر رت قرار دارد).

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی در گروه‌های آزمون که عصاره هیدروالکلی اسفناج را با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت که معنادار نبود. گزارشی مبنی بر اثر اسفناج بر بیان ژن یا سطح سرمی رزیستین یافت نشده است اما اخیراً نتایج حاصل از یک تحقیق نشان داده است که تیمار خوراکی عصاره اتانلی برگ *Morus alba* به مدت ۸ هفته موجب کاهش قند خون، کلسترول و شاخص آتروژنیک در رت‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرکلسترول شده و همچنین بیان ژن و سطح سرمی رزیستین و لپتین را در این موش‌ها کاهش می‌دهد. نتیجه‌گیری شد که بیان رزیستین و لپتین در ارتباط با مقاومت به انسولین است. همچنین اختلالات رفتاری ناشی از این نوع رژیم غذایی نیز در حیوانات بهبود یافت به طوری که با بهبود حافظه و کاهش رفتارهای اضطرابی در این موش‌ها همراه بود. نتایج مشاهده شده از عصاره *Morus alba* به کوئرستین و کافتیک اسید نسبت داده شد.^{۲۰} با توجه به این که در مطالعه‌ی حاضر دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره اسفناج، اثر کاهشی ضعیفی بر بیان ژن رزیستین داشته‌اند، به نظر می‌رسد که افزایش مدت زمان تیمار عصاره بتواند اثر معناداری در این زمینه داشته باشد.

برای القای استرس مزمن بی‌حرکتی، حیوانات ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز متوالی در مقیدکننده قرار گرفتند. این مدل یکی از روش‌های متداول برای القای استرس است که در مطالعات فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است و اختلالات فیزیولوژیکی مرکزی و محیطی را در حیوان به دنبال دارد. طی تحقیقی که موازی با مطالعه حاضر انجام گرفت، این مدل از استرس موجب پیدایش اضطراب و اختلال در حافظه فضایی شد^{۱۷} که با نتایج گزارش شده از این مدل^{۲۱،۲۲} همخوانی دارد، بنابراین القای استرس بی‌حرکتی به درستی و منطبق با منابع انجام گرفته است.

افزایش بیان رزیستین در بافت چربی را می‌توان به عنوان یک بیومارکر برای وقوع مقاومت به انسولین و به دنبال آن ابتلا به دیابت، آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی-عروقی، کبد چرب غیرالکلی، التهاب و بیماری‌های کلیوی در نظر گرفت.^{۲۳} نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که

بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی رت‌هایی که با بی-حرکتی تحت استرس قرار گرفتند در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. تاکنون گزارشی مبنی بر تغییر بیان رزیستین در حیوانات تحت استرس وجود ندارد اما نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داده است که تیمار خوراکی دگزامتازون (نوعی گلوکوکورتیکوئید سنتتیک)، موجب افزایش بیان ژن رزیستین و سطح سرمی آن در موش‌ها می‌شود.^{۲۴} با توجه به آن که بی‌حرکتی مزمن موجب افزایش شدید غلظت گلوکوکورتیکوئیدها در خون می‌شود^{۲۵} و از آن‌جا که کورتیزول نقش مهمی در مقاومت به انسولین و پیدایش سندرم متابولیک ایفا می‌کند^{۲۶،۲۷} و همچنین رابطه مستقیمی بین افزایش کورتیزول و رزیستین وجود دارد،^{۲۸} بنابراین افزایش بیان رزیستین در مطالعه حاضر قابل پیش‌بینی و منطقی بود.

همچنین در مطالعه حاضر، تیمار هر دو دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره اسفناج، به کاهش معنادار بیان ژن رزیستین در موش‌های مواجه شده با استرس بی‌حرکتی منجر شد. گزارش شده است که تیمار دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره اسفناج با کاهش مالون‌دی‌آلدهید و هموسیستئین، کاهش مقاومت به انسولین، افزایش گلوکوتایون و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی، موجب کاهش علائم سندرم متابولیک ناشی از رژیم غذایی غنی از فروکتوز در رت‌ها می‌شود^{۱۱} و یکی از دلایل انتخاب دوزهای مذکور برای مطالعه حاضر، بررسی فرضیه سودمندی اسفناج در کاهش عوارض ناشی از سندرم متابولیک به واسطه کاهش بیان ژن رزیستین بود. اسفناج غنی شده با نیترات می‌تواند به بهبود هومئوستازی لیپیدی، کاهش التهاب (با کاهش سطح فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین ۶) و کاهش مقاومت به انسولین در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب و حاوی فروکتوز فراوان منجر گردد.^{۲۹} با توجه به اهمیتی که رزیستین در مقاومت به انسولین و پیدایش سندرم متابولیک دارد، به نظر می‌رسد اسفناج با کاهش بیان رزیستین توانسته است اثرات سودمند خود را بر حیوانات مبتلا به این عارضه به جای بگذارد و ممکن است اثرات ضددیابتی، هیپولیپیدمی و ضدالتهابی اسفناج (که پیشتر به آن‌ها اشاره شد) نیز در ارتباط با اثر کاهشی آن بر بیان رزیستین باشد.

اثر کاهشی عصاره اسفناج بر بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی حیوانات استرسی ممکن است به ترکیبات

فاکتورهای التهابی و رزستین جزو محدودیت‌های مطالعه حاضر است.

در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره هیدروالکلی اسفناج ممکن است به علت دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های فراوان، بیان رزستین را در موش‌های مواجه شده با استرس بی‌حرکتی کاهش دهد و به همین دلیل، کاندیدای مناسبی برای پیشگیری و درمان سندرم متابولیک ناشی از انواع استرس باشد.

سپاسگزاری: از خانم‌ها معصومه تاراسی و افسانه نظری به جهت یاری در مراحل عملی پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود. نویسندگان اعلام می‌نمایند که تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

موجود در این گیاه مربوط باشد. در این راستا، اثر کاهشی ترکیبات مختلف موجود در اسفناج نظیر کوئرستین،^{۲۰} لوتئولین،^{۲۱} کامفرول،^{۲۲} ویتامین A^{۲۳} و ویتامین C^{۲۴} بر بیان رزستین به اثبات رسیده است. همچنین، با توجه به این که فاکتورهای پیش‌التهابی (نظیر اینترلوکین-۱ و ۶ و فاکتور نکروز توموری آلفا) بیان رزستین را افزایش می‌دهند،^{۲۵} بنابراین یکی دیگر از دلایل احتمالی اثر کاهشی اسفناج بر بیان رزستین، اثر ضدالتهابی اسفناج^{۱۰} در موش‌های مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی است که دچار التهاب هستند.^{۳۶}

با توجه به اثر ضدالتهابی و ضد استرس اکسیداتیو اسفناج و ارتباط بین رزستین با این پدیده‌ها، به نظر می‌رسد که بررسی استرس اکسیداتیو و تعیین بیان و سطح سرمی

References

- Park HK, Kwak MK, Kim HJ, Ahima RS. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J Intern Med* 2017; 32: 239-47.
- Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trend Endocrin Metab* 2002; 13: 18-23.
- Ozarda Y, Tuncer GO, Gunes Y, Eroz E. Serum levels of leptin, adiponectin and resistin are interrelated and related to total antioxidant capacity, free fatty acids and phospholipids in early neonatal life. *Clin Biochem* 2012; 45: 298-302.
- Bo S, Ciccone G, Durazzo M, Gambino R, Massarenti P, Baldi I, et al. Efficacy of antioxidant treatment in reducing resistin serum levels: a randomized study. *PLoS Clin Trials* 2007; 2: e17.
- Khorshidi M, Moini A, Alipoor E, Rezvan N, Gorgani-Firuzjaee S, Yaseri M, et al. The effects of quercetin supplementation on metabolic and hormonal parameters as well as plasma concentration and gene expression of resistin in overweight or obese women with polycystic ovary syndrome. *Phytother Res* 2018; 32: 2282-9.
- Zarei S, Saidijam M, Karimi J, Yadegarazari R, Farimani AR, Hosseini-Zijood SO, et al. Effect of resveratrol on resistin and apelin gene expressions in adipose tissue of diabetic rats. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 1561-7.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 2004; 53: 882-9.
- Metha D, Belemkar S. Pharmacological activity of spinacia oleracea linn.-a complete overview. *AJPRD* 2014; 83-93.
- Aehle E, Raynaud-Le Grandic S, Ralainirina R, Baltora-Rosset S, Mesnard F, Prouillet C, Mazière JC, Fliniaux MA. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chem* 2004; 86: 579-85.
- Nagar A, Shukla AK, Bigoniya P. Anti-inflammatory potential of *Spinacia oleracea* leaf extract. *J Nat Pharm* 2011; 2: 80-7.
- Panda V, Mistry K, Sudhamani S, Nandave M, Ojha SK. Amelioration of Abnormalities Associated with the Metabolic Syndrome by *Spinacia oleracea* (Spinach) Consumption and Aerobic Exercise in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 2359389.
- Shaheen SM. Phytochemical Profiling and Evaluation of Antioxidant and Antidiabetic Activity of Methanol Extract of Spinach (*Spinacia Oleracea* L.) leaves. *Int J Pharm Sci Scient Res* 2017; 3: 8-24.
- Zafir A, Banu N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 2009; 12: 167-77.
- Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1553-67.
- Matsuura N, Nagasawa K, Minagawa Y, Ito S, Sano Y, Yamada Y, et al. Restraint stress exacerbates cardiac and adipose tissue pathology via β -adrenergic signaling in rats with metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308: H1275-86.
- Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2018; 128: 1538-50.
- Tarasi M, asle-rousta M. Effect of spinach (*Spinacia oleracea* L.) extract on chronic restraint stress-induced memory deficit and anxiety in male rats. *RJMS* 2018; 25: 48-55. [Farsi]
- Scheres N, Laine ML, De Vries TJ, Everts V, Van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2010; 45: 262-70.
- Ye H, Zhang HJ, Xu A, Hoo RL. Resistin production from adipose tissue is decreased in db/db obese mice, and is reversed by rosiglitazone. *PLoS One* 2013; 8: e65543.
- Metwally FM, Rashad HM, Mahmoud AA. *Morus alba* L. Diminishes visceral adiposity, insulin resistance,

- behavioral alterations via regulation of gene expression of leptin, resistin and adiponectin in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiol Behav* 2018; 201: 1-11.
21. Kim DM, Leem YH. Chronic stress-induced memory deficits are reversed by regular exercise via AMPK-mediated BDNF induction. *Neurosci* 2016; 324: 271-85.
 22. Bhagya VR, Srikumar BN, Veena J, Shankaranarayana Rao BS. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. *J Neurosci Res* 2017; 95: 1602-10.
 23. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J pharmacol* 2012; 165: 622-32.
 24. Sasayama D, Hori H, Nakamura S, Yamamoto N, Hattori K, Teraishi Tet al. Increased protein and mRNA expression of resistin after dexamethasone administration. *Horm Metab Res* 2015; 47: 433-8.
 25. Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol Behav* 2001; 73: 525-32.
 26. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci* 1999; 96: 513-23.
 27. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review the pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2692-701.
 28. Weber-Hamann B, Kratzsch J, Kopf D, Lederbogen F, Gilles M, Heuser I, Deuschle M. Resistin and adiponectin in major depression: the association with free cortisol and effects of antidepressant treatment. *J Psychiatric Res* 2007; 41: 344-50.
 29. Li T, Lu X, Sun Y, Yang X. Effects of spinach nitrate on insulin resistance, endothelial dysfunction markers and inflammation in mice with high-fat and high-fructose consumption. *Food Nutr Res* 2016; 60: 32010.
 30. Zhang MH, Liang ZQ, Qin Q, Li SL, Zhou DS, Tang L. Effects of quercetin on serum levels of resistin and IL-18 and on insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2013; 21: 66-70.
 31. Nepali S, Son JS, Poudel B, Lee JH, Lee YM, Kim DK. Luteolin is a bioflavonoid that attenuates adipocyte-derived inflammatory responses via suppression of nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinases pathway. *Pharmacogn Mag* 2015; 11: 627-35.
 32. Shin SK, Cho YY, Kwon EY, Jung UJ, Park YB, Choi MS. Kaempferol supplementation enhances insulin sensitivity via regulation of plasma cytokine level and hepatic transcriptional response. *The FASEB J* 2012; 26.
 33. Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 2004; 53: 882-9.
 34. Aumailley L, Warren A, Garand C, Dubois MJ, Paquet ER, Le Couteur DG, et al. Vitamin C modulates the metabolic and cytokine profiles, alleviates hepatic endoplasmic reticulum stress, and increases the life span of *Gulo*^{-/-} mice. *Aging (Albany NY)* 2016; 8: 458-83.
 35. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 286-90.
 36. Kim SH, Oh DS, Oh JY, Son TG, Yuk DY, Jung YS. Silymarin prevents restraint stress-induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules* 2016; 21: 443.

Original Article

The Effect of Spinach Hydro-alcoholic Extract on Resistin mRNA Expression in Visceral Adipose Tissue of Rats Exposed to Chronic Restraint Stress

Babaei S¹, Asle-Rousta M², Mahmazi S¹

¹Department of Genetics, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, ²Department of Physiology, Islamic Azad University, Zanjan, I.R. Iran.

e-mail: Masoumeh_rousta@yahoo.com

Received: 12/11/2018 Accepted: 07/04/2019

Abstract

Introduction: Resistin is a peptide hormone, secreted by adipose tissue. Increased secretion of resistin results in insulin resistance and metabolic syndrome. The aim of this study was to determine the effect of hydro-alcoholic spinach (*Spinacia oleraceae* L.) extract on the expression of resistin mRNA in the visceral adipose tissue of rats exposed to chronic immobilization stress. **Materials and Methods:** In this experimental study, 30 adult male Wistar rats were allocated to six groups, including: 1) Control, 2) Spinach 200, 3) Spinach 400, 4) Stress, 5) Stress-Spinach 200 and 6) Stress-Spinach 400. Groups 2 and 5 were gavaged with spinach hydro-alcoholic extract at dose 200 mg/kg body weight and groups 3, 6 were gavaged with dose 400 mg/kg body weight of extract for 21 consecutive days; groups 4, 5 and 6 were placed in restrainers 6 hours a day for 21 consecutive days. At the end of this period, the expression of resistin mRNA in adipose tissue was evaluated by Real Time PCR. Data analysis was performed using one-way ANOVA and $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** Chronic immobility increased the expression of resistin mRNA (2.78 ± 0.30) in adipose tissue, compared to the control group (1 ± 0.36) ($P = 0.002$). Resistin mRNA expression in visceral adipose tissue of Stress-Spinach 200 and Stress-Spinach 400 (0.74 ± 0.23 and 1.45 ± 0.15 respectively) was lower than in the stress group ($P = 0.000$ and $P = 0.020$ respectively). **Conclusion:** Results indicate that spinach extract can reduce resistin mRNA expression in rats exposed to chronic restraint stress.

Keywords: Spinach (*Spinacia oleraceae* L.) extract, Resistin gene expression, Restraint stress, Rat