مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز و زمستان ۱۳۸۰؛ دوره ۱ (شماره ۱): ۲۳-۳۰

مقاله پژوهشی

القای ترشح انسولین به‌وسیله فراکسیون استخراج‌شده از عصاره گیاه گزنه در پریفیوژن جزایر لانگرهانس موش صحرایی و بررسی اثر in vivo آن درموشهای سالم و دیابتی

بیژن فرزامی*: استاد بیوشیمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
داوود احمدوند: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
صفورا ورداسبی: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
ژیلا ماژین: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
شهناز خاقانی: عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: در کتابهای پزشکی قدیمی، عصاره برگ گیاه گزنه برای درمان قند خون بالا توصیه شده است.

روشها: در این مطالعه با ایجاد سیستم پریفیوژن، تعداد معینی از جزایر لانگرهانس بدست آمده از موش صحرایی (رت) در معرض یک جزء تلخیص شده از عصاره گزنه که با روش کروموتوگرافی لایه نازک (TLC) جداسازی شده بود، قرار گرفت. سپس برای ارزیابی پاسخ در محیط زنده، جزء فعال جدا شده به‌درون صفاق رت‌های طبیعی و دیابتی تزریق شد.

یافته‌ها: اندازه‌گیری قابلیت ترشح انسولین به روش ELISA افزایش قابل توجهی در نمونه‌های حاوی جزء جدا شده از عصاره گیاه گزنه ایجاد کرد. تزریق درون صفاقی محلول حاوی ماده مؤثر به موش صحرایی باعث افزایش انسولین در سرم خون حیوان گردید. در آزمایش in vivo علاوه‌بر افزایش انسولین سرم بعد از ۶۰ دقیقه از زمان تزریق، کاهش قند نیز در زمان مشابه در سرم خون مشاهده شد. افزایش انسولین ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق، تقریباً به ۵ برابر میزان اولیه خود رسید. همچنین کاهش قند خون همزمان با افزایش انسولین ایجاد گردید و تا حدودی دامنه تغییرات مشابه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تزریق عصاره گیاه برگ گزنه در موشهای دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین مشابه موشهای سالم اما دامنه تغییرات نسبت به آنها تا حدودی کاهش یافته بود.

کلیدواژه‌ها: گزنه، پریفیوژن، انسولین، اثر هیپوگلیسمیک، جزایر لانگرهانس, دیابت قندی

مقدمه

اثر کاهش‌دهنده قند خون گیاه گزنه (*Urtica dioica*) یا *Stinging Nettle* به‌عنوان گیاه مؤثر در کاهش قند خون در متون قدیمی پزشکی و در رساله‌های ابن‌سینا آورده شده است. گزارشهای دیگری وجود دارد که گیاه گزنه را در بیماری دیابت (۲،۱) و عوارض‌دیگر مانند هیپرپلازی پروستات (۳-۶), التهاب آرتریت روماتویید (۷)، پرفشاری خون و رینیت آلرژیک (۸)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

* تهران، صندوق پستی ۵۳۹۹-۱۴۱۵۵

مورد استفاده قرار داده‌اند. در همه گزارشهای فوق, مکانیسم‌اثر انسولین ذکر نشده است. در تجارب حاضر نشان داده شده است که کاهش قند خون به‌علت افزایش ترشح انسولین از منشأ جزایر لانگرهانس می‌باشد.

در این مطالعات با استفاده از روش پریفیوژن جزایر لانگرهانس و به‌کارگیری فراکسیون جداشده به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک در تجربیات in vitro و in vivo, اثر القا کننده ترشح انسولین به‌وسیله عامل مؤثر در گیاه گزنه مشاهده گردید.

روشها

ماده گیاهی: برگ گیاه گزنه از نواحی شمالی ایران به‌دست آمد و به‌وسیله بخش‌گیاه‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفت. برگها در حرارت اتاق خشک و به‌صورت پودر درآورده شد.

تهیه عصاره گیاهی: ۱۰ گرم پودر برگ خشک با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر برای مدت ۱۵دقیقه جوشانده شد. فیلتراسیون از پارچه به‌عمل آمد و سپس مایع از صافی واتمن‌شماره یک عبور داده شد. حجم محلول با عمل تبخیر در خلاء به ۵/۱ برابر مقدار اولیه رسانده شد و عصاره تغلیظ یافته در ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

جداسازی به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

صفحات ژل سیلیکات کلسیم TLC (type G) [1] به ضخامت یک میلی‌متر در روی صفحات شیشه‌ای کشیده شد و فعال‌سازی به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس انجام گردید. سپس عصاره فوق در دفعات متعدد در امتداد خطی در یک سانتی‌متری انتهای صفحات قرار داده شد تا غلظت کافی را به‌دست آورد. محلولهای حامل‌با نسبتهای متفاوتی از حلال ایزوپروپانل و آب به نسبتهای ۲۵٪ تا ۷۵٪ مورد استفاده قرارگرفت.

بهترین جداسازی در مخلوط حلال ایزوپروپانل و آب به نسبت حجمی ۷۰/۳۰ به‌دست آمد. کروماتوگرافی ۱۰-۷ ساعت به‌طول انجامید. صفحات سپس در اتو ۴۵ درجه خشک گردید. با استفاده از اشعه فلورسانس مشخص شد که شش باند حساس به فلورسانس به‌دست آمده است که F1 تا F6 نامیده شدند. باقی باندها و نواحی حد فاصل آنها نیز جداگانه از روی صفحات تراشیده شد و با حلال با نسبت ۳۰/۷۰ ایزوپروپانل وآب به‌مدت چند دقیقه تکان داده شد. بخش جامد با عمل سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دوردر دقیقه جدا گردید و مایع رویی در دستگاه تبخیر حلال آلی تبخیر و باقیمانده جامد آن در یک‌میلی‌لیتر آب حل شد.

آزمایش با حیوان

موشهای نر آلبینو (albino rats) از سویه ویستار (Wistar strain) به‌وزن ۲۲۰ تا ۲۷۰ گرم در مدت یک هفته قبل از انجام آزمایش با غذای معمول و آب در شرایط مناسب تهویه‌ای در درجه حرارت ۲°C ± ۲۲ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی نگهداری شدند.

جداسازی جزایر لانگرهانس

جداسازی جزایر لانگرهانس از پانکراس موش صحرایی براساس روش لیسی (Lacy) و کاستیانوفسکی (Kastianovsky) (۹) انجام گردید. طبق این روش بیهوشی ملایمی با اتر داده شد و بعد از باز کردن حفره شکمی, جهت افزایش بازده در

[1] Thin-layer chromatography

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

برداشت جزایر, برای تخریب بافت برون‌ریز و جداسازی جزایر لانگرهانس, محلولهای نمکی هانکس به‌درون مجرای صفراوی تزریق گردید. قطعات پانکراس به وزن حدود ۱۰۰ میلی‌گرم جدا و به قطعات کوچک بریده شد. سپس در داخل لوله آزمایش حاوی محلولKBR-HEPES که دارای ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز بود, در شرایط سرما اضافه گردید. محتوای لوله آزمایش دو بار در ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای دو دقیقه سانتریفوژ شد و هر بارمحلول رویی دور ریخته شد و به‌جای آن حجم مساوی از محلول KBR-HEPESحاوی‌گلوکز ۱۶/۷ میلی‌مولار که حاوی ۵۰۰ واحد آنزیمی کلاژناز بود, اضافه گردید و به‌مدت۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه تکان داده شد. از بین رفتن قطعات و رشته‌های بافتی، چسبیدن بافت به دیواره لوله سانتریفوژ و تغییر رنگ آن از نشانه‌های نقطه پایانی هضم می‌باشد. نقطه پایانی هضم به‌وسیله استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ فاز کنتراست نیز تأیید گردید. با استفاده از پتری دیش با زمینه سیاه در زیر استریومیکروسکوپ, جزایر به‌رنگ سفید مایل به خاکستری دیده می‌شدند که به‌آسانی از بقیه بافت مشخص گردیدند. جداسازی نهایی و تخلیص جزایر به روش دستچین کردن (Hand picking) انجام گردید بدین معنی که با استفاده از پیپت پاستور جزایر در زیر میکروسکوپ برداشته می‌شد و درون لوله‌های سیلیکونیزه حاوی گلوکز ۲/۸ میلی‌مولار و آلبومین سرم گاوی (BSA) ۳۵٪ قرار داده می‌شد (۱۱، ۱۵).

سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده, در لوله‌های متعدد به‌طور یکسان و با حجم یک میلی‌لیتر در هر لوله تقسیم شد و سپس در حضور گاز کاربوژن و قند گلوکز ۲/۸ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر فراکسیون جداشده از گیاه گزنه, در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس لوله‌ها سانتریفوژ و نیم میلی‌لیتر از محلول رویی آنها برداشته شد و مقدار انسولین هر لوله به روش الایزا اندازه‌گیری گردید. مقادیر اندازه‌گیری شده با لوله‌های شاهد (Control) که حاوی جزایر و گاز کاربوژن و قند ۲/۸ میلی‌مولار بودند مقایسه شد. در نتیجه تغییرات ترشح انسولین از سلولهای جزایر لانگرهانس در حضور فراکسیون جداشده بررسی‌گردید.

آزمایشهای In vivo

آماده‌سازی حیوانات

موشها به دو گروه شش تایی تقسیم شدند. بیهوشی با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید ۵۰ mg/kg و ۰/۲ میلی‌لیتر کلرپرومازین انجام گرفت. به یک دسته از حیوانات به‌عنوان گروه شاهد سرم فیزیولوژی تزریق شد و دسته دوم سرم فیزیولوژی‌حاوی فراکسیون F1 دریافت داشتند.

آزمون GTT[1]

تمامی حیوانات به مدت ۱۶ ساعت به‌حالت ناشتا نگهداری شدند. محلول‌گلوکز با غلظتg/kg ۱/۲۵ به‌صورت درون صفاقی تزریق گردید. نمونه‌های خون از شبکه عروق رترواوربیتال چشم در لوله‌های هماتوکریت جمع‌آوری شد.جمع‌آوری خون در چند مرحله یکی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق و در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از آن انجام گردید.

اندازه گیری قند و انسولین

حدود یک میلی‌لیتر نمونه خون از هر موش در لوله‌های حاوی هپارین تهیه گردید. جداسازی سرم با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. اندازه‌گیری قند خون با روش گلوکز

[1] Glucose tolerance test

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

اکسیداز و اندازه‌گیری انسولین سرم با کیت ایمونواسی Dako صورت گرفت.

دیابتی کردن حیوانات

پس از ۱۶ ساعت ناشتایی, یک نوبت استرپتوزوتوسین به صورت داخل وریدی به مقدار ۴۰mg/kg وزن بدن در دم حیوانات تزریق شد. محلول تزریقی حاوی‌بافر سرد سیترات با غلظت ۱/۰ مولار و PH = ۴/۵ بود. بعد از یک هفته قند خون‌ناشتا اندازه گیری شد. شرایط دیابتی شدن حیوان در صورتی مورد تأیید قرار می‌گرفت که قند خون در محدوده ۲۵۰mg/dl به‌دست می‌آمد. آزمایشهای انجام شده دیگر در هر دو گروه حیوانات دیابتی و سالم به صورت مساوی و یکسان انجام گردید (۱۲).

یافته‌ها

مطالعات In vitro

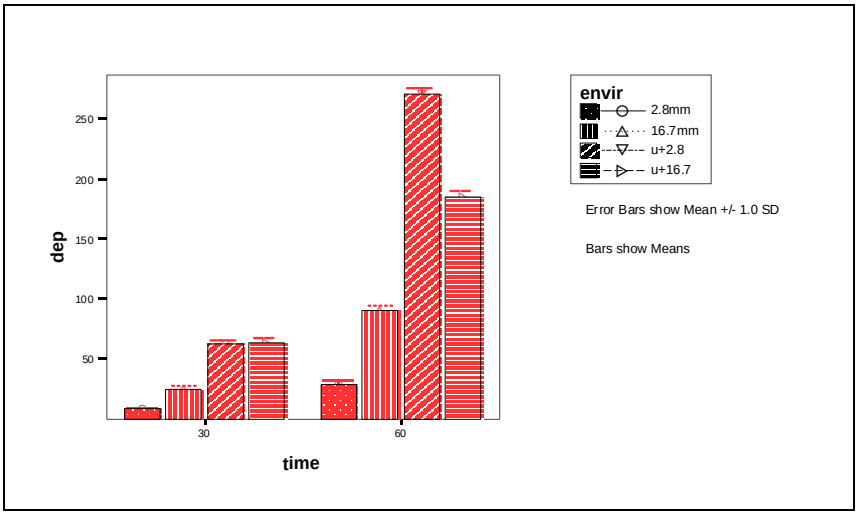
اثر افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس به‌وسیله عصاره آبی گزنه در روش پریفیوژن: نتایج به‌دست آمده از پریفیوژن نشان داد که عصاره آبی گزنه قادر است در دو غلظت قند ۲/۸ و۱۶/۷ میلی‌مولار, باعث افزایش ترشح انسولین گردد.

این بررسی برحسب زمان نیز انجام گردید با این ترتیب زمانی که نمونه مورد آزمایش برای سنجش انسولین, در زمانهای مختلف ۳۰ و ۶۰ دقیقه برداشته شد. افزایش مقدار انسولین در محلول قند ۱۶/۷ میلی‌مولار در ۶۰ دقیقه به حداکثر رسید (شکل ۱).

اثر گاز کاربوژن در نسبت CO_2/O_2 ٪۵/۹۵ با استفاده از دمیدن آرام گاز به‌درون محلول و در تمام طول مدت انکوباسیون, نشان داد که در ۶۰ دقیقه نمونه‌هایی که گاز در آنها وارد نشده بود, فعالیت ترشحی انسولین کمتری داشتند. با این‌حال در زمان ۳۰دقیقه نمونه‌هایی که گاز کاربوژن دریافت نکرده بودند, افزایش فعالیت بیشتری را نشان دادند. این یافته‌ها نشان دهنده اهمیت حضور کاربوژن در دوام حیات سلولی در زمانهای طولانی‌تر انکوباسیون است. با این همه, افزایش نسبی فعالیت در ۳۰ دقیقه اول می‌تواند مربوط به وجود شرایط عادی سلولی جهت فعالیت ترشحی جزایر باشد.

شش فراکسیون (F1-F6) توسط جذب در پرتوهای ماورای بنفش (UV) و فلورسانس شناسایی گردید.

شکل ۱ـ اثر افزایش دهنده فراکسیون F1 جدا شده از عصاره گزنه در دو غلظت ۸/۲ میلی مولار و ۱۶ میلی مولار گلوکز در زمانهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه



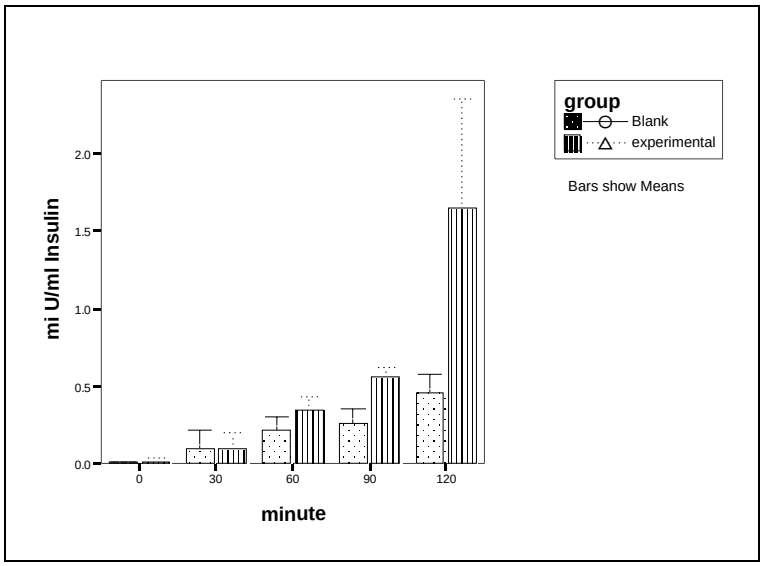
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

فراکسیونی که دارای بیشترین مقدار کمیت Rf بود (F1) بالاترین اثر را در پریفیوژن جزایر نشان داد. بعد از تغلیظ فراکسیون F1 از حاصل کروماتوگرافی‌های مختلف TLC با مخلوط حلال دی‌کلرومتان و سیکلوهگزان به نسبت V/V ۱/۲ انجام گرفت. شش باند جدید حاصل شد که از میان آنها فراکسیون با RF=۰/۹ بیشترین اثر را در افزایش ترشح انسولین نشان داد.

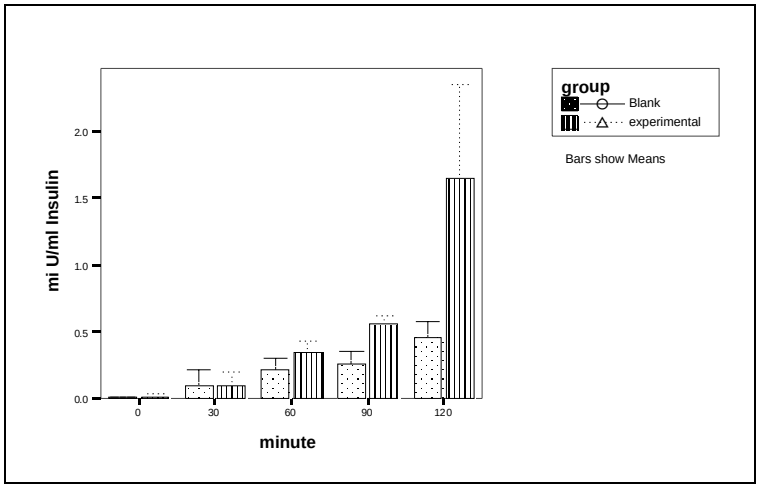
مطالعات In vivo

اندازه گیری انسولین و قند سرم با روش ELISA انجام گرفت. تزریق درون صفاتی فراکسیون فعال عصاره گزنه باعث افزایش غلظت انسولین سرم نمونه‌های سالم و دیابتی گردید (شکلهای۲و۳). این افزایش حدود ۶۰ دقیقه پس از تزریق حاصل گردید ($p < 0.05$).

شکل ۲ـ اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر افزایش انسولین در موشهای سالم‌بر حسب زمان خونگیری: الف – سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب – سرم‌فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1



شکل ۳ـ اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر افزایش انسولین در موشهای‌دیابتی برحسب زمان خونگیری: الف – سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب –سرم فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1



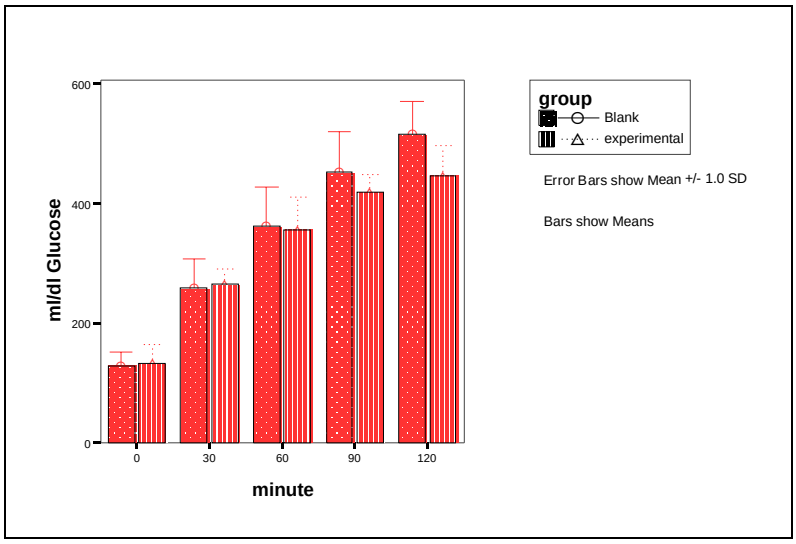
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

در تمامی نمونه‌هایی که مورد سنجش انسولین قرار گرفته بود, قند سرم نیز اندازه گیری شد. بعد از زمان ۶۰ دقیقه (همزمان با افزایش‌انسولین) غلظت قند خون کاهش قابل توجهی پیدا کرد (شکل ۳). نتایج مشابهی در سرم خون نمونه‌های دیابتی نیز به‌دست آمد (شکلهای ۴ و ۵).

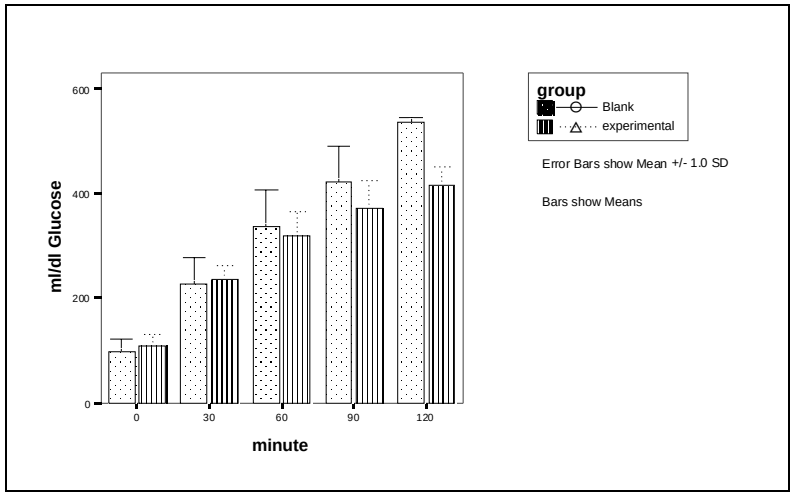
بحث

نتایج این آزمایشها نشان می‌دهد که عصاره آبی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica*) قادر است باعث افزایش ترشح انسولین در پریفیوژن جزایر و نیز در بدن موش صحرایی گردد. بیشترین اثر در ترشح انسولین بعد از ۶۰ دقیقه از آغاز شروع پریفیوژن حاصل شد و فرایند ترشحی وابسته به غلظت ماده مؤثر بود. در مدت زمان آزمایش اهمیت وجود کاربوژن مشخص گردید به‌گونه‌ای که ظاهراً فعالیت جزایر در ۶۰ دقیقه با وجود کاربوژن بیشتر از زمانی بود که کاربوژن در محلول وجود نداشت.

شکل ۴ـ اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر مقدار قند سرم موشهای سالم‌برحسب زمان خونگیری: الف – با سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیونF1 ب – با سرم‌فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیونF1



شکل ۵ ـ اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر مقدار قند سرم موشهای دیابتی‌برحسب زمان خونگیری: الف – با سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیونF1 ب – سرم‌فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیونF1

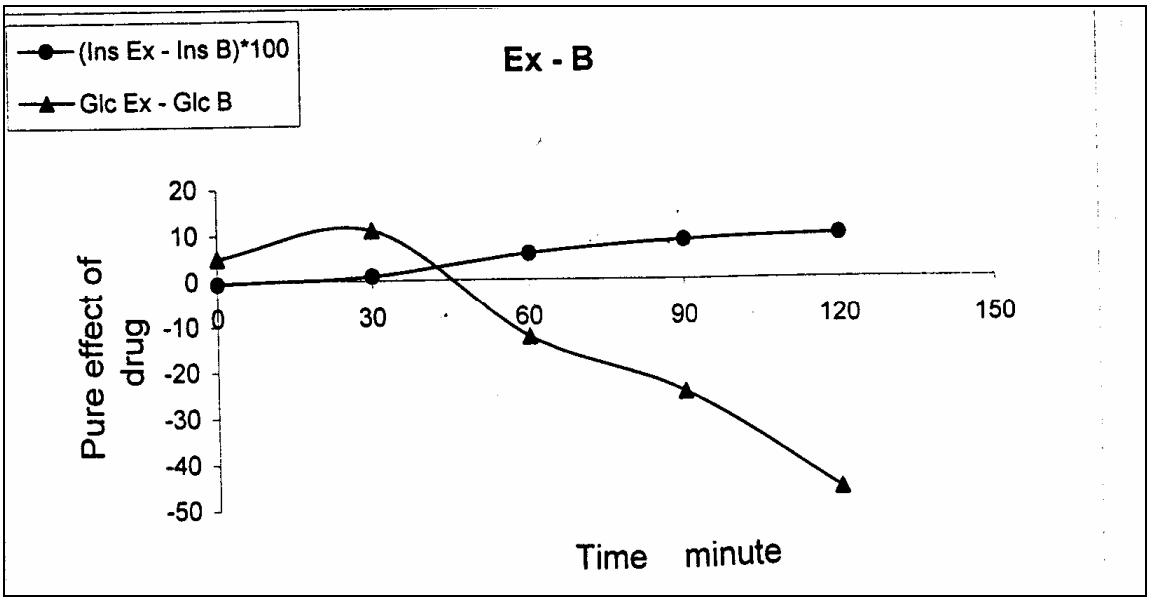


[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

در کروماتوگرافی لایه نازک استفاده از دو نوع سیستم حلال آب/ ایزوپروپانول ۳۰/۷۰ باعث جداسازی خالص‌ترین فراکسیون موثر در ترشح گردید. مطالعات in vivo نشان داد که فراکسیون خالص‌شده قادر است افزایش غلظت انسولین سرمی را به مقدار ۵ برابر نرمال افزایش دهد که این نتایج در آزمایشهای in vitro به شیوه پریفیوژن جزایر لانگرهانس نیز دیده شد. تزریق درون صفاقی عصاره تخلیص‌شده در موشهای سالم و موشهای دیابتی اثر مشابهی داشت با این تفاوت که دامنه اثر آن در موشهای دیابتی اندکی کاهش یافته بود. همچنین افزایش انسولین و کاهش قند خون در حیوانات سالم و دیابتی همزمان و بصورت متقارن صورت گرفت (شکلهای ۶ و ۷).

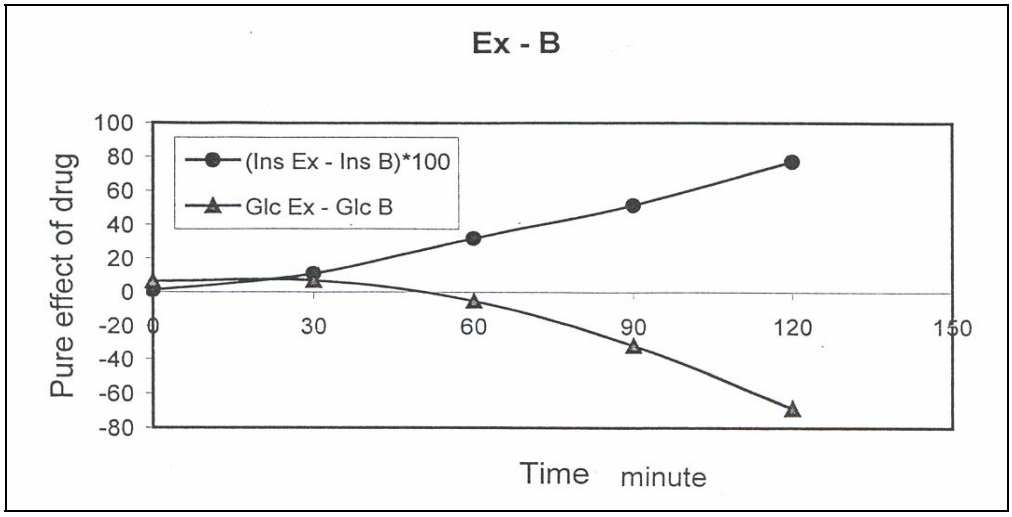
امید است در آینده بتوانیم ساختمان مولکولی ماده مؤثره گیاه گزنه را شناسایی کنیم واحتمالا نحوه اثر و مکانیسم عمل مولکولی آن را در ترشح انسولین شناسایی نماییم.

شکل ۶ـ نمودار تغییرات نسبی الف: انسولین سرم ب : قند خون بعد از تزریق درون صفاقی فراکسیون F1در موشهای سالم



[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

شکل ۷ـ نمودار تغییرات نسبی الف: انسولین سرم ب : قند خون بعد از تزریق درون صفاقی فراکسیونF1 در موشهای دیابتی



مآخذ

1. Roman Ramos R, Alarcon Aguilar F, Lara Lemus A, Flores Saenz JL. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research* 1992; 23: 59-64.
2. Swanston, Flatt SK, Day C, Flatt PR, Gould BJ, Bailey CY. Glycaemiceffects of traditional European plant treatment for diabetes: studies innormal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1989; 10: 69-75.
3. Kayser K, Bubenzer J, Kayser G, Eichhorn S, Zemlyanukhinat Bovin NV, Andres S, etal. Expression of lectin, interleukin-2 and histopathologic blood group binding sites in prostate cancer and itscorrelation with integrated optical density and syntactic structureanalysis. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1995; 17: 135-42.
4. Krzeski T, Kazon M, Bordowski A, Witeska A, Kuczera J. Combined extracts of Urtica dioica and pygeum africanum in treatment of benign prostatic hyperplasia: double-blind comparison of two doses. *Clinical Therapeutics* 1993; 15: 1011-20.
5. Schneider HJ Honold E, Masuhr T. Treatment of benign prostatichyperplasia. Results of a treatment study with the phytogeniccombination of Sabal extract WS 1475 and Urtica extract WS 1031 inurologic specialty practices. *Fortschritte der Medizin* 1995; 113: 37-40.
6. Hirono T, Homma M, Oka K. Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na-K ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Medica* 1994; 60: 30-3.
7. Obertreis B, Giller K, Teucher T, Behnke B, Schmitz H. Anti-inflammatory effect of Urtica dioica folia extract in comparison to Caffeic malic acid. *Arzneimittel-Forschung* 1996; 46: 52-6.
8. Miltman P. Randomized double-blind study of freeze dried Urtica dioicain the treatment of allergic rhinitis. *Planta Medica* 1990; 56: 44-7.
9. Lacy PE, Kostianovsky M, Louis St. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-9.
10. Lacy PE, Finke EH, Conant S. and Naber, S. Long-term perifusion of isolated Rat Islets in Vitro. *Diabetes* 1976; 25: 484-93.
11. Lacy PE, Walker MM, and fink, C.J., Perifusion of isolated rat Islets in vitro. *Diabetes* 1972; 21: 987-98.
12. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation* 1969; 48: 2129-39.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-07-04]