

Research Paper

Evaluation of Rosmarinic Acid Attenuation Effect on Endoplasmic Reticulum Stress in Swiss-type Mice Affected With Nonalcoholic Steatohepatitis



Tahereh Komeili-Movahhed¹ , Fatemeh Heidari¹ , Azam Moslehi^{1*} 

1. Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.



Citation Komeili-Movahhed T, Heidari F, Moslehi A. [Evaluation of Rosmarinic Acid Effect on Endoplasmic Reticulum Stress Attenuation in Mice Induced Non- Alcoholic Steatohepatitis (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 17:E65.8. <https://doi.org/10.32598/qums.17.65.8>

 <https://doi.org/10.32598/qums.17.65.8>



Received: 24 Jan 2021

Accepted: 26 Apr 2023

Available Online: 10 Aug 2023

Keywords:

Nonalcoholic fatty liver disease, Endoplasmic reticulum stress, Rosmarinic acid, *GRP78*, IRE-1

ABSTRACT

Background and Objectives Nonalcoholic steatohepatitis is a severe liver disease characterized by excess lipid accumulation (steatosis) and inflammation in the liver. Endoplasmic reticulum stress is considered one of the crucial factors in nonalcoholic steatohepatitis pathophysiology. Rosmarinic acid is a herbal medicine with antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to evaluate the effect of rosmarinic acid on reducing the endoplasmic reticulum stress induced by nonalcoholic steatohepatitis in male Swiss-type mice.

Methods The study animals were grouped into four: Saline, rosmarinic acid, nonalcoholic steatohepatitis, and nonalcoholic steatohepatitis-rosmarinic acid. Nonalcoholic steatohepatitis was induced by a diet without methionine-choline for 8 weeks, and rosmarinic acid was injected intraperitoneally daily for 8 weeks in mice. After 8 weeks, the animals were killed, and their liver samples were obtained. Real-time PCR was used for molecular studies. Data analyses were performed by one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results Findings of this study showed that rosmarinic acid alleviated mRNA levels of *GRP78*, IRE-1, and PERK while increasing the Apo B expression.

Conclusion The results suggest that rosmarinic acid ameliorates endoplasmic reticulum stress parameters, upregulates Apo B expression as a key factor in triglyceride exit from the liver, and thereby improves nonalcoholic steatohepatitis in male Swiss-type mice.

* Corresponding Author:

Azam Moslehi, PhD.

Address: Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 6510485

E-Mail: moslehi2000@gmail.com



Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the most common liver disease, characterized by excess lipid accumulation (steatosis) and inflammation in the liver. It has been shown that almost 20% of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) cases progress to NASH. It is predicted that NASH will become the first indication for liver transplantation in 2020-2025. NASH is characterized by steatosis and inflammation in the hepatocytes, which can progress to cirrhosis, fibrosis, and hepatocellular carcinoma. In NASH pathophysiology, endoplasmic reticulum (ER) stress is a crucial factor; studies have demonstrated that ER stress is one of the principal reasons for developing and promoting this disease through different pathways. Actually, lipid accumulation triggers a cascade of events, such as ER stress, resulting in the destruction and dysfunction of the liver. ER stress creates certain principal markers, including glucose-regulated protein 78 (*GRP78*), activating transcription factor 6 (*AFT6*), PKR-like endoplasmic reticulum kinase (*PERK*), and inositol-requiring enzyme 1 (*IRE1*). ER stress results in the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the endoplasmic reticulum lumen. These proteins can produce and activate inflammatory cytokines and apoptotic enzymes. ER stress also provokes hepatic stellate cells, Kupffer cells, and other inflammatory cells to produce inflammatory cytokines; cross-reaction between ER stress and inflammation has been demonstrated in many pathological conditions.

Rosmarinic acid (RA) is a synthetic compound that is plentiful in plants from the Lamiaceae family, including *Rosmarinus officinalis* (*R. officinalis*) (rosemary), *Coleus aromaticus*, *Origanum vulgare* L. (oregano), and *Thymus vulgaris* L. (thyme). Positive effects of RA on diabetes, sepsis, hepatotoxicity, and brain injuries have previously been demonstrated. Rosmarinic acid decreases blood glucose, inhibits insulin resistance, and increases glucose transporter 4 (*GLUT4*) expression in the skeletal muscles. Studies have shown that RA can reduce oxidative stress in most tissues and alleviate apoptosis and fibrosis in the renal cells, cardiomyocytes, and hepatic cells. Moreover, it has been shown that administering RA could improve liver steatosis and lipid metabolism-related genes in NASH-induced mice.

As mentioned above, this study aimed to evaluate the lessening effect of rosmarinic acid on ER stress induced by NASH in male mice.

Methods

This study was done at Qom University of Medical Sciences on 24 C57/BL6 male mice (Patur Institute, Tehran, Iran). The animals were weighing 25-27 g. Mice were housed in a temperature-controlled room at a 12:12 light/dark cycle with free access to food and tap water. The animal care and experimental procedure were approved in accordance with the guidelines for animal care and use at Qom University of Medical Sciences. All animals were randomly divided into 4 equal groups ($n=6$ for each group): Saline group with access to standard diet for 8 weeks and receiving daily saline (IP) simultaneously; rosmarinic acid (RA) group with access to standard diet for 8 weeks and receiving RA (10 mg/kg, IP) for 8 weeks daily; nonalcoholic steatohepatitis group, who received methionine-choline deficient (MCD) diet for 8 weeks to induce NASH; and nonalcoholic steatohepatitis-RA group, who received MCD diet for 8 weeks to induce NASH and rosmarinic acid (10 mg/kg, IP) for 8 weeks simultaneously. After this period, the animals were anesthetized with ketamine-xylazine and killed. Then, midline incisions were done on their abdomens, and their livers were immediately removed, weighed, and washed in ice-cold physiological saline. A part of the liver was dissected and kept at -80°C for real-time assay.

Total RNA was extracted from frozen tissue samples using TRIzol, and the quantity and purity of the RNA samples were measured by a NanoDrop spectrophotometer. Complementary DNAs (cDNA) were made from mRNA templates for qRT-PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction). cDNAs were then used as templates for real-time analysis. Data normality was checked by the Kolmogorov-Smirnov test. The obtained data were expressed as Mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (to compare the groups) and Tukey's post hoc test using SPSS software. $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

This study showed that *GRP78* gene expression significantly increased in the nonalcoholic steatohepatitis group and markedly decreased in the nonalcoholic steatohepatitis-RA group. The mRNA expression of *PERK* was also significantly upregulated in the nonalcoholic steatohepatitis group, and rosmarinic acid could significantly downregulate *PERK* expression. In the same way, gene expression of *IRE1* showed a marked increase in the nonalcoholic steatohepatitis group; meanwhile, its expression was remarkably lowered in the nonalcoholic ste-

atohepatitis-RA group. However, Apo B gene expression was markedly reduced in the nonalcoholic steatohepatitis group, and its expression was raised in the nonalcoholic steatohepatitis-RA group.

Conclusion

In nonalcoholic steatohepatitis disease, *GRP78* is up-regulated and induces IRE1 and PERK as ER stress transmembrane sensors in the cytosol. Then, they activate intracellular pathways, such as inflammation and lipogenesis. They also decline lipid excretion from the liver through decreased synthesis of Apo B and keep lipids in the hepatic cells. The findings of this study showed that rosmarinic acid can reverse the expression of these genes and improve nonalcoholic steatohepatitis via ER stress attenuation and increased lipid export from the liver.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study approved the Ethics Committee of [Qom University of Medical Sciences](#) (Code: IR.MUQ.REC.1400.003).

Funding

This study was financially supported by [Qom University of Medical Sciences](#).

Authors contributions

All authors contributed equally to this study.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank [Qom University of Medical Sciences](#) for supporting this study.

مقاله پژوهشی

بررسی اثر رزمارینیک اسید بر کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی در موش‌های سوری مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی

طاهره کمیلی موحد^۱، فاطمه حیدری^۱، اعظم مصلحی^۱

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

Use your device to scan
and read the article online

Citation Komeili-Movahhed T, Heidari F, Moslehi A. [Evaluation of Rosmarinic Acid Effect on Endoplasmic Reticulum Stress Attenuation in Mice Induced Non- Alcoholic Steatohepatitis (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 17:E65.8. <https://doi.org/10.32598/qums.17.65.8>

<https://doi.org/10.32598/qums.17.65.8>

چکیده

زمینه و هدف: بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی یک بیماری جدی کبدی است که با تجمع بیش از حد چربی (استئاتوز) و التهاب در کبد مشخص می‌شود. استرس شبکه اندوپلاسمی به‌عنوان یکی از دلایل مهم در پاتوفیزیولوژی استئاتوهپاتیت غیرالکلی در نظر گرفته می‌شود. رزمارینیک اسید یک ترکیب گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر رزمارینیک اسید بر کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی ناشی از استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش‌های سوری نر بود.

روش بررسی: حیوانات به ۴ گروه سالیان، رزمارینیک اسید، استئاتوهپاتیت غیرالکلی و استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید تقسیم شدند. استئاتوهپاتیت غیرالکلی با استفاده از رژیم غذایی فاقد متیونین-کولین به‌مدت ۸ هفته القا شد و رزمارینیک اسید روزانه به‌مدت ۸ هفته به‌صورت داخل صفاقی در موش‌ها تزریق شد. پس از ۸ هفته، حیوانات کشته شدند و نمونه‌های کبدی تهیه شد. برای انجام مطالعات مولکولی از روش ریل تایم PCR استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و سپس آزمون توکی انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌های این مطالعه نشان داد رزمارینیک اسید سطوح IRE-1، GRP78 mRNA و PERK را کاهش داد، درحالی‌که بیان Apo B افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد رزمارینیک اسید شاخص‌های استرس شبکه اندوپلاسمی را بهبود می‌بخشد، بیان Apo B را به‌عنوان یک عامل کلیدی در خروج تری‌گلیسرید از کبد تنظیم می‌کند و در نتیجه استئاتوهپاتیت غیرالکلی را در موش‌های سوری نر بهبود می‌بخشد.

تاریخ دریافت: ۰۴ بهمن ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۲

تاریخ انتشار: ۱۹ مرداد ۱۴۰۲

کلیدواژه‌ها:

بیماری‌های کبد چرب
غیرالکلی، استرس شبکه
اندوپلاسمی، رزمارینیک
اسید، IRE-1، GRP78

* نویسنده مسئول:

دکتر اعظم مصلحی

نشانی: قم، دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.

تلفن: ۶۵۱۰۴۸۵ (۹۱۲) ۹۸+

رایانامه: moslehi2000@gmail.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

بیماری کبد چرب شده است [۸]. استفاده از کافتین به عنوان یک ترکیب اصلی در قهوه با کاهش بیان PERK و IRE-1 موجب کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی و بهبود کبد چرب غیرالکلی شده است [۹]. ثابت شده است که تجمع اسیدهای چرب یا تری گلیسریدها با ایجاد استرس در شبکه اندوپلاسمی موجب تغییر در ساخت و فعالیت آپولیپوپروتئین‌های ترشحی مانند آپولیپوپروتئین B مربوط می‌شود [۱۰].

رزمارینیک اسید یک استر از کافتیک اسید و ۳ و ۴ دی هیدروکسی فنیلکاتیک اسید است و به فراوانی در گیاهانی چون *Rosmarinus officinalis* (R. officinalis) (rosemary), *Coleus aromaticus* *Origanum vulgare* L. (oregano) و *Thymus vulgaris* L. (thyme) یافت می‌شود [۱۱]. مطالعات متعدد اثرات مثبت رزمارینیک اسید را بر بهبود دیابت، شوک سپتیک و آسیب‌های کبدی و کلیوی نشان داده‌اند [۱۲-۱۶]. رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی نیز در کاهش التهاب داشته و به عنوان یک ترکیب ضد التهاب قوی شناخته می‌شود [۱۷-۱۹]. نشان داده شده است که رزمارینیک اسید می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و مهار مسیرهای التهابی، موجب بهبود بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش‌های سوری شود [۲۰].

باتوجه به اهمیت استرس شبکه اندوپلاسمی در ایجاد و پیشرفت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی و نقش مثبت رزمارینیک اسید بر بهبود این بیماری، هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش رزمارینیک اسید بر کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی در موش‌های سوری مبتلا به بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی قم و بر روی ۲۴ سر موش سوری نر نژاد C57/BL6 در محدوده وزنی ۲۳ تا ۲۵ گرم انجام شد. در مدت مطالعه حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲۹±۲ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (۴۵ تا ۴۸ درصد) و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. جهت انجام آزمایش، حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی به ترتیبی که در ادامه خواهد آمد، تقسیم شدند.

گروه اول سالیین

سالیین شامل حیوانات سالمی بود که دسترسی به غذای معمولی داشتند و روزانه نرمال سالیین را به عنوان حلال رزمارینیک اسید به شکل داخل صفاقی دریافت می‌کردند.

گروه دوم رزمارینیک اسید

رزمارینیک اسید شامل حیوانات سالمی بود که دارای رژیم غذایی معمولی بودند که روزانه به مدت ۸ هفته ۱۰ میلی‌گرم

بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی یک اختلال جدی و مهم در کبد است که ناشی از استئاتوز یا تجمع چربی در کبد و التهاب کبدی می‌باشد [۱]. در واقع این عارضه شکل پیشرفته بیماری کبد چرب غیرالکلی است که به دلیل فعال شدن مکانیسم‌های مولکولی ناشی از تجمع چربی در کبد مثل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، ایجاد التهاب و تولید سایتوکین‌های التهابی، عدم تعادل در تولید هورمون‌های ترشح شده از بافت چربی و نیز ایجاد استرس در شبکه اندوپلاسمی می‌باشد [۲]. در واقع یکی از عوامل مهم در تبدیل یک استئاتوز ساده به استئاتوهپاتیت ایجاد استرس در شبکه اندوپلاسمی است.

شبکه اندوپلاسمی یکی از اندامک‌های مهم در تولید و تغییر شکل پروتئین‌های تازه ساخته شده می‌باشد که می‌تواند انواع هورمون‌ها، سایتوکین‌های التهابی و حتی آنزیم‌های دخیل در سنتز و متابولیسم چربی باشند [۳]. بسیاری از محرک‌های محیطی، تغذیه‌ای و پاتولوژیکی مانند اختلال در هموستاز کلسیم، محرومیت از قند و یا افزایش آن، بار بیش از حد کلسترول، التهاب و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌توانند هموستاز شبکه اندوپلاسمی را مختل کنند و موجب اختلال در تاخوردن پروتئین‌های تازه تشکیل شده، تغییر در گلیکوزیلاسیون و سولفیداسیون در آن‌ها شود و وضعیتی به عنوان استرس شبکه اندوپلاسمی^۱ را ایجاد کنند [۴]. ایجاد استرس و اختلال در شبکه اندوپلاسمی موجب فعال شدن انواعی از حسگرها در غشای این شبکه می‌شود که در ادامه موجب تغییر بیان ژن‌های دیگری در پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم و یا میتوکندری در سلول می‌شود و منجر به التهاب، آپوپتوز، اتوفاژی و غیره می‌شوند [۳].

پروتئین وابسته به گلوکز ۷۸ (GRP78) به عنوان یک چاپرون مهم در شبکه اندوپلاسمی شناخته می‌شود. تحت شرایط استرس شبکه اندوپلاسمی، GRP78 فعال می‌شود و موجب افزایش بیان سه حسگر مهم در غشای شبکه اندوپلاسمی یعنی کیناز شبکه اندوپلاسمی مشابه پروتئین کیناز^۲، فاکتور فعال کننده نسخه برداری^۳ و آنزیم مورد نیاز اینوزیتول^۴ می‌شود [۵]. افزایش بیان و تولید این حسگرها، سپس موجب تغییر بیان، ساخت و تولید شکل طبیعی بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌های داخل سلول می‌شود و اختلال جدی در عملکرد سلول ایجاد می‌کند. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داده‌اند که افزایش فعالیت GRP78 در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی با افزایش PERK و IRE 1 همراه بوده و منجر به بدتر شدن این بیماری می‌شود [۶، ۷].

گزارش شده است که استفاده از کنگد در رژیم غذایی موجب کاهش بیان GRP78 و IRE-1 در موش‌های سوری مبتلا به

1. ER stress
2. PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)
3. Activating transcription factor 6 ((ATF-6)
4. Inositol-requiring enzyme 1 (IRE 1)

جدول ۱. توالی پرایمرها

| | | |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|
| GAPDH | (F) TGGCCTCCGTGTTCTAC | (R) GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA |
| GRP78 | (F) TGTGTGTGAGACCAGAACCG | (R) TAGGTGGTCCCAAGTCGAT |
| IRE1 | (F) CACTGCCTGAGACCTTGTGT | (R) TTAAGTCCACTTGATGGAGCC |
| PERK | (F) AGTCCCTGCTCGAATCTTCT | (R) TCCAAGGCAGAACAGATATACC |
| β -lipoprotein | (F) GCTCAACTCAGGTTACCGTGA | (R) AGGGTGTACTGGCAAGTTTGG |



گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز^۶ به عنوان ژن خانگی مقایسه شدند. توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است.

ارزیابی آماری داده‌ها

داده‌های این مطالعه به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. برای ارزیابی آماری و مقایسه بین گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک طرفه^۷ و آزمون تعقیبی توکی^۸ استفاده شد. در تمامی محاسبات $P < 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان ژن GRP78 کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در موش‌های سوری نر

داده‌های به دست آمده از این مطالعه افزایش معناداری در میزان بیان mRNA ژن GRP78 در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه سالین نشان دادند ($1/62 \pm 0/32$ در مقابل ۱ با $0/5$ $P < 0$)، در حالی که استفاده از رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی موجب کاهش بیان GRP78 به عنوان چاپرون اصلی در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی- رزمارینیک اسید نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی شد ($0/26 \pm 0/08$ در مقابل $1/62 \pm 0/32$ با $0/01$ $P < 0$) (تصویر شماره ۱).

بررسی اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان ژن‌های PERK و IRE1 کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در موش‌های سوری نر

همچنین نتایج این مطالعه افزایش معناداری در میزان بیان mRNA ژن PERK در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه سالین نشان داد ($10/07 \pm 0/3$ در مقابل ۱ با $0/01$ $P < 0$). استفاده از رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته در موش‌های گروه استئاتوهپاتیت

به ازای هر کیلوگرم رزمارینیک اسید (شرکت سیگما، کد: ۵۳۶۹۵۴-۵G) را به شکل داخل صفاقی دریافت می‌کردند [۲۰].

گروه سوم استئاتوهپاتیت غیرالکلی

استئاتوهپاتیت غیرالکلی شامل حیواناتی بودند که به مدت ۸ هفته تحت رژیم فاقد متیونین-کولین^۵ قرار گرفتند تا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در آن‌ها ایجاد شود [۲۱].

گروه چهارم استئاتوهپاتیت غیرالکلی- رزمارینیک اسید

استئاتوهپاتیت غیرالکلی - رزمارینیک اسید شامل موش‌های سوری بودند که رژیم فاقد متیونین-کولین را به مدت ۸ هفته دریافت کردند و هم‌زمان تزریق روزانه ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم رزمارینیک اسید به شکل داخل صفاقی به آن‌ها تزریق می‌شد.

پس از ۸ هفته حیوانات با استفاده از تزریق داروی بیهوشی کتامین-گزیلازین به میزان ۵۰ گرم به ازای هر کیلوگرم کتامین و ۰/۱ گرم به ازای هر کیلوگرم گزیلازین بیهوش شدند [۲۰] و ناحیه شکم برش داده شد و کبد در معرض دید قرار گرفت. کبد بلافاصله خارج شد و جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها و انجام ریل تایم PCR در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روش انجام ریل تایم PCR

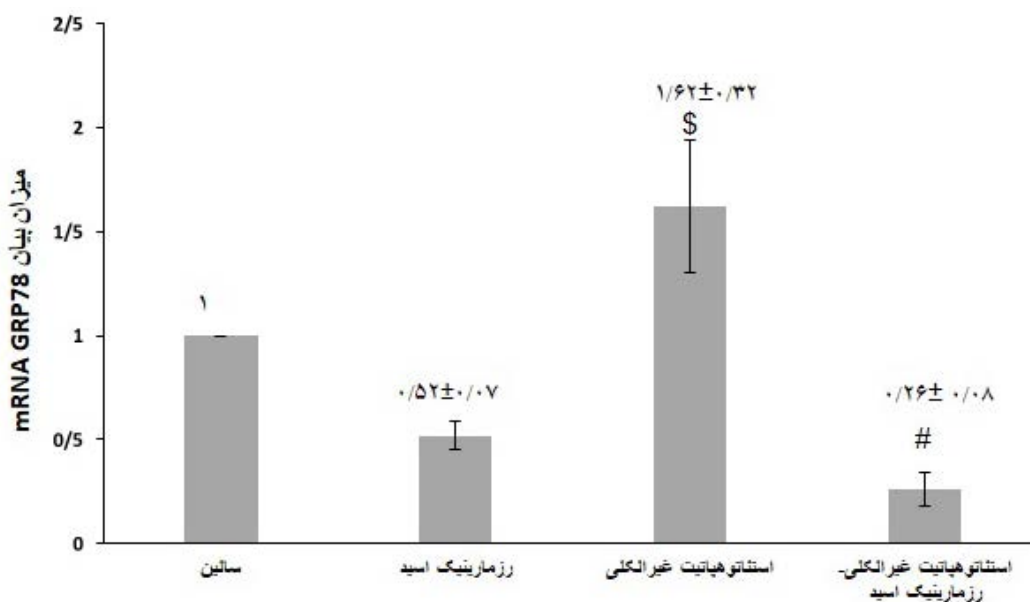
جهت بررسی بیان ژن‌های IRE1, PERK, GRP78 و Apo B از روش ریل تایم RT-PCR استفاده شد. در این روش ابتدا RNA با استفاده از محلول تریزول (یکتا تجهیز، ایران) از بافت کبد استخراج و میزان خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanolytik، آلمان) تعیین شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز، ایران) از روی آن cDNA به‌طور معکوس ساخته شد. سرانجام با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سایبرگرین (امپلیکون، کره جنوبی) به‌عنوان ماده نشاندار رنگی و دستگاه ریل تایم (AB, USA)، میزان بیان هر کدام از ژن‌ها به‌طور کمی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری و با میزان بیان ژن

6. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

7. One-way ANOVA

8. Tukey

5. Methionine-Choline Deficient (MCD)



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

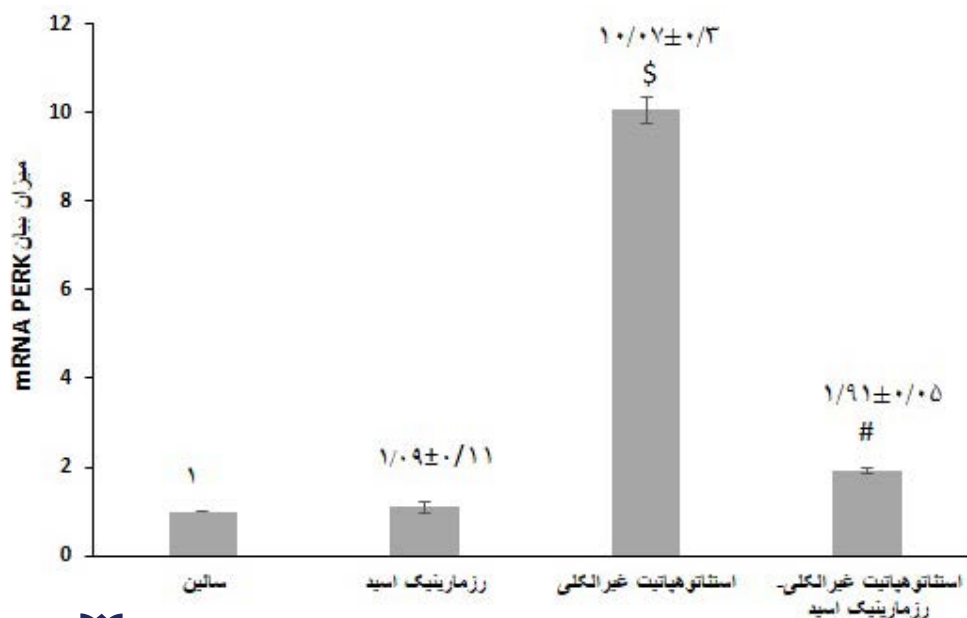
تصویر ۱. میزان بیان mRNA ژن GRP78 در بافت کبدی. نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه سالین، # نشان‌دهنده کاهش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی

در حالی که در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی- رزمارینیک اسید کاهش معناداری در بیان mRNA ژن IRE1 نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی دیده شد (1/11 ± 0/12) در مقابل (8/63 ± 0/37) با (P < 0/001) (تصویر شماره ۳).

بررسی اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان mRNA ژن ApoB کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در موش‌های

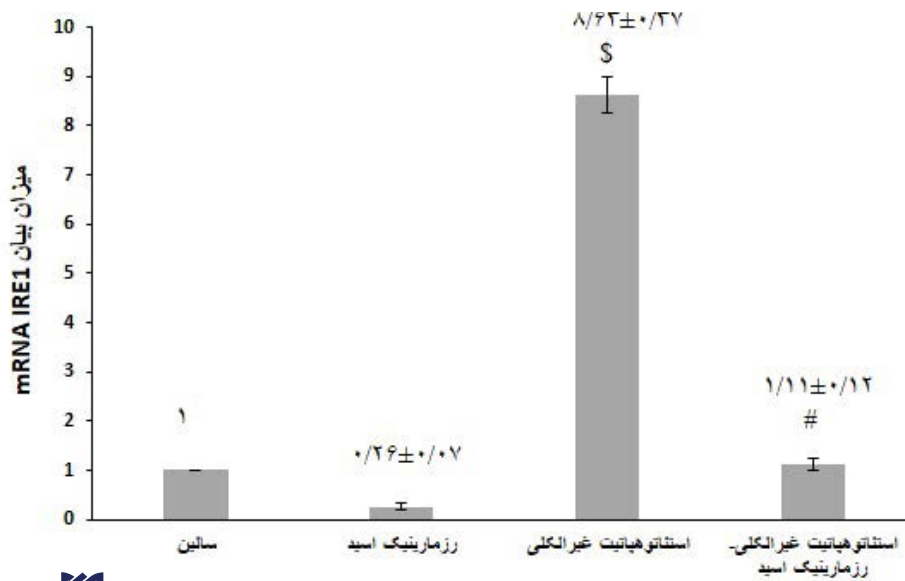
غیرالکلی- رزمارینیک اسید با کاهش معنادار بیان PERK نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی همراه شد (1/91 ± 0/05) در مقابل (10/07 ± 0/3) (P < 0/001) (تصویر شماره ۲).

علاوه بر این داده‌های حاصل از این پژوهش افزایش معناداری در میزان بیان mRNA ژن IRE1 در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه سالین نشان دادند (8/63 ± 0/37) در مقابل ۱



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. میزان بیان mRNA ژن PERK در بافت کبدی. نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه سالین، # نشان‌دهنده کاهش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

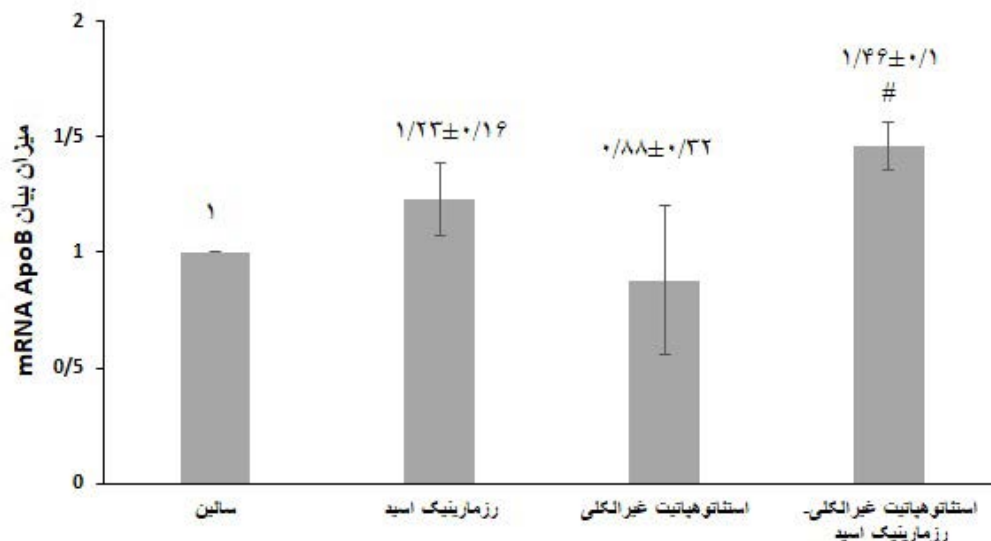
تصویر ۳. میزان بیان mRNA IRE1 در بافت کبدی. # نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه سالین، # نشان‌دهنده کاهش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی

بحث

سوری نر

بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی یک اختلال شایع و جدی در کبد است که استرس شبکه اندوپلاسمی یکی از عوامل اصلی در ایجاد و پیشرفت آن می‌باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد استفاده از رزمارینیک اسید هم‌زمان با ایجاد استئاتوهپاتیت غیرالکلی به شکل قابل ملاحظه‌ای میزان بیان ژن‌های IRE 1 و GRP78، PREK را به‌عنوان

یافته‌های حاصل از PCR تغییر معناداری در میزان بیان mRNA ژن آپو لیپوپروتئین B در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه سالین نشان ندادند، در حالی که تزریق رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی موجب افزایش بیان آپو لیپوپروتئین B در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی- رزمارینیک اسید نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی شد (1/0 ± 1/46 در مقابل 0/32 ± 0/88 با P < 0/05) (تصویر شماره ۴).



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۴. میزان بیان mRNA ژن آپو لیپوپروتئین B در بافت کبدی. # نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی

موجب کاهش استرس در شبکه اندوپلاسمی شده و آسیب ریوی را در موش‌های سوری مبتلا به شوک ناشی از لیپوپولی ساکارید بهبود بخشد [۲۲]. این گزارشات همسو با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر است و نشان می‌دهد رزمارینیک اسید با کاهش بیان GRP78 و به موجب آن کاهش PIREK و IRE 1 توانسته است استرس شبکه اندوپلاسمی را بهبود بخشد.

همان‌طور که در بالا بیان شد افزایش القای PIREK و IRE 1 با اثر بر مسیرهای ساخت و فعالیت پروتئین‌های تازه تشکیل‌شده موجب اختلال در عملکرد سلول‌های کبد می‌شود. یکی از این پروتئین‌های مهم، آپولیپوپروتئین B است که در کبد ساخته می‌شود و با اتصال به تری‌گلیسریدها در لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم^۱، موجب خروج آن‌ها از کبد و استفاده در بافت‌های مختلف می‌شود [۲۸]. در واقع در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی، ایجاد استرس شبکه اندوپلاسمی موجب کاهش ساخت این پروتئین می‌شود و در نتیجه با تجمع تری‌گلیسریدها در کبد استئاتوز افزایش می‌یابد [۶]. داده‌های این پژوهش نشان داد رزمارینیک اسید با کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی، موجب افزایش بیان آپولیپوپروتئین B شده است.

در همین راستا، لی و همکاران بیان کردند که آگزندین به‌عنوان یک آگونیست لیپین ۱ با بهبود استرس در شبکه اندوپلاسمی و کاهش بیان GRP78 موجب افزایش ساخت آپولیپوپروتئین B در سلول‌های کبدی قرار گرفته در معرض تونیکامایسین شده است [۵]. در مطالعه‌ای دیگر کمیلی موحد و همکاران گزارش کردند که استفاده از آلانتوئین در موش‌های سوری مبتلا به استئاتوهپاتیت با کاهش بیان GRP78 و AFT6 و در نتیجه کاهش استرس در شبکه اندوپلاسمی میزان بیان را در بافت کبد افزایش داده است [۲۱]. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات رزمارینیک اسید بر میزان بیان آپولیپوپروتئین B انجام نشده است و این اولین مطالعه در این زمینه می‌باشد، به نظر می‌رسد استفاده از رزمارینیک اسید با کاهش بیان شاخص‌های استرس شبکه اندوپلاسمی و بهبود این اختلال موجب افزایش ساخت و عملکرد آپولیپوپروتئین B در لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم می‌شود و به این ترتیب با کمک به خروج تری‌گلیسریدها از کبد، موجب کاهش استئاتوز در کبد شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد رزمارینیک اسید با کاهش بیان PIREK، GRP78 و IRE 1 به‌عنوان شاخص‌های مهم استرس شبکه اندوپلاسمی موجب بهبود این اختلال سلولی شده و در نتیجه میزان آپولیپوپروتئین B افزایش یافته است. این امر احتمالاً منجر به خروج بیشتر تری‌گلیسریدها از کبد شده و در نتیجه تجمع چربی در کبد را کاهش داده است.

شاخص‌های اصلی شناسایی استرس شبکه اندوپلاسمی کاهش داد. همچنین میزان بیان ژن آپولیپوپروتئین B به‌عنوان یک آپولیپوپروتئین مهم در انتقال تری‌گلیسریدها به خارج از کبد به‌صورت معناداری افزایش یافت.

رزمارینیک اسید ماده مؤثر اصلی در گیاهانی چون رزماری است. مطالعات انجام‌شده در گذشته نشان داده‌اند که رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی در بهبود استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوتوز در بافت‌های مختلف دارد [۱۵-۱۷، ۲۲-۲۴]. برای مثال کیم و همکاران قبلاً نشان داده‌اند که رزمارینیک اسید دارای اثرات حفاظت کبدی در برابر استرس اکسیداتیو و آپوتوز در موش‌های سوری مبتلا به NASH می‌شود [۲۵]. استرس شبکه اندوپلاسمی یکی از علل ایجاد و پیشرفت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی و به‌عنوان ضربه دوم شناخته می‌شود [۷]. در واقع تجمع چربی در کبد یا استئاتوز به‌عنوان محرکی برای ایجاد استرس در شبکه اندوپلاسمی موجب می‌شود که GRP78 افزایش یابد. GRP78 وظیفه تسهیل انتقال، تکمیل و تجمع پروتئین‌های تازه تولیدشده در سلول را بر عهده دارد و از تا خوردگی اشتباه و تجمع پروتئین‌های بد تا خورده در سلول جلوگیری می‌کند. زمانی که تعداد این پروتئین‌های اشتباه و بد تاخوردگی افزایش می‌یابد، میزان بیان GRP78 نیز افزایش می‌یابد که به‌عنوان مهم‌ترین شاخص استرس شبکه اندوپلاسمی در نظر گرفته می‌شود [۶].

افزایش GRP78 حالا موجب القاء و فعال شدن حسگرهای مهم دیگری در غشای شبکه اندوپلاسمی به نام‌های PIREK و IRE 1 می‌شود. افزایش بیان PIREK و IRE 1 هر دو منجر به القای پروتئین‌ها و آنزیم‌های مسیر ساخت تری‌گلیسرید در کبد می‌شود و استئاتوز را بدتر می‌کند و از طرف دیگر موجب بد ساختن شدن و کاهش پروتئین‌های مسیر اکسیداسیون تری‌لیسریدها می‌شود [۲۶].

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد مصرف رزمارینیک اسید به‌مدت ۸ هفته توانست میزان بیان PIREK، GRP78 و IRE1 را کاهش دهد و به این ترتیب استرس شبکه اندوپلاسمی ایجادشده را بهبود بخشد. در همین زمینه بلاچاندر و همکاران گزارش کردند که مصرف رزمارینیک اسید موجب کاهش بیان پروتئین‌های PERK و α -eIF، ATF-6، IRE 1 در سلول‌های HepG2 کبد قرار گرفته در معرض اسید اولئیک به‌عنوان یک اسید چرب می‌شود و استرس شبکه اندوپلاسمی در این سلول‌ها را تخفیف می‌دهد [۲۷].

در مطالعه‌ای دیگر هونگ و تیمش بیان کردند که رزمارینیک اسید موجب کاهش میزان PIREK، GRP78 و IRE 1 شده و به واسطه مهار استرس شبکه اندوپلاسمی، آپوتوز را در سلول‌های کبدی در معرض کادمیم سرکوب کرده است [۲۳]. علاوه بر این رزمارینیک اسید توانسته است مهار مسیر GRP78/IRE1 α ،



ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه کد اخلاق را از دانشگاه علوم پزشکی قم (IR.MUQ. REC.1401.018) است.

حامی مالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قم حامی مالی این مطالعه بوده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

- [1] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet*. 2021; 397(10290):2212-24. [DOI:10.1016/S0140-6736(20)32511-3] [PMID]
- [2] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019; 92:82-97. [DOI:10.1016/j.metabol.2018.11.014] [PMID]
- [3] Zhang J, Guo J, Yang N, Huang Y, Hu T, Rao C. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death Dis*. 2022; 13(12):1051. [DOI:10.1038/s41419-022-05444-x] [PMID]
- [4] Shi P, Zhang Z, Xu J, Zhang L, Cui H. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death as a potential mechanism for targeted therapy in glioblastoma (Review). *Int J Oncol*. 2021; 59(2):60. [DOI:10.3892/ijo.2021.5240] [PMID]
- [5] Lee J, Hong SW, Kwon H, Park SE, Rhee EJ, Park CY, et al. Endon-4 improves ER stress-induced lipid accumulation and regulates lipin-1 signaling in HepG2 cells. *Cell Stress Chaperones*. 2018; 23(4):629-38. [DOI:10.1007/s12192-017-0872-z] [PMID]
- [6] Celik C, Lee SYT, Yap WS, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases. *Prog Lipid Res*. 2023; 89:101198. [DOI:10.1016/j.plipres.2022.101198] [PMID]
- [7] Zheng W, Sun Q, Li L, Cheng Y, Chen Y, Lv M, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in hepatic glucose and lipid metabolism and therapeutic strategies for metabolic liver disease. *Int Immunopharmacol*. 2022; 113(Pt B):109458. [DOI:10.1016/j.intimp.2022.109458] [PMID]
- [8] Yang Y, Yu J, Huo J, Yan Y. Sesamin attenuates obesity-associated nonalcoholic steatohepatitis in high-fat and high-fructose diet-fed mice. *J Med Food*. 2023; 26(3):176-84. [DOI:10.1089/jmf.2022.K.0091] [PMID]
- [9] Hu XW, Li XM, Wang AM, Fu YM, Zhang FJ, Zeng F, et al. Caffeine alleviates acute liver injury by inducing the expression of NEDD4L and decreasing GRP78 level via ubiquitination. *Inflamm Res*. 2022; 71(10-11):1213-27. [DOI:10.1007/s00011-022-01603-0] [PMID]
- [10] Lee HY, Lee GH, Bhattarai KR, Park BH, Koo SH, Kim HR, et al. Bax Inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion. *Sci Rep*. 2016; 6:27799. [DOI:10.1038/srep27799] [PMID] [PMCID]
- [11] Hasanein P, Seifi R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018; 96(1):32-7. [DOI:10.1139/cjpp-2017-0135] [PMID]
- [12] Zhang Y, Chen X, Yang L, Zu Y, Lu Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct*. 2015; 6(3):927-31. [DOI:10.1039/C4FO01051E] [PMID]
- [13] Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Z, Škoda M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014; 66:321-8. [DOI:10.1016/j.fct.2014.02.002] [PMID]
- [14] Heidari F, Komeili-Movahhed T, Hamidzad Z, Moslehi A. The protective effects of rosmarinic acid on ethanol-induced gastritis in male rats: Antioxidant defense enhancement. *Res Pharm Sci*. 2021; 16(3):305-14. [DOI:10.4103/1735-5362.314829] [PMID]
- [15] Hong Z, Minghua W, Bo N, Chaoyue Y, Haiyang Y, Haiqing Y, et al. Rosmarinic acid attenuates acrylamide induced apoptosis of BRL-3A cells by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Food Chem Toxicol*. 2021; 151:112156. [DOI:10.1016/j.fct.2021.112156] [PMID]
- [16] Joardar S, Dewanjee S, Bhowmick S, Dua TK, Das S, Saha A, et al. Rosmarinic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress, apoptosis, inflammation and fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(8):2027. [DOI:10.3390/ijms20082027] [PMID]
- [17] Fan YT, Yin GJ, Xiao WQ, Qiu L, Yu G, Hu YL, et al. Rosmarinic acid attenuates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats by inhibiting nuclear factor-kb activation. *Am J Chin Med*. 2015; 43(6):1117-35. [DOI:10.1142/S0192415X15500640] [PMID]
- [18] Lu C, Zou Y, Liu Y, Niu Y. Rosmarinic acid counteracts activation of hepatic stellate cells via inhibiting the ROS-dependent MMP-2 activity: Involvement of Nrf2 antioxidant system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017; 318:69-78. [DOI:10.1016/j.taap.2017.01.008] [PMID]
- [19] Chen WP, Jin GJ, Xiong Y, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Rosmarinic acid down-regulates NO and PGE2 expression via MAPK pathway in rat chondrocytes. *J Cell Mol Med*. 2018; 22(1):346-53. [DOI:10.1111/jcmm.13322] [PMID]
- [20] Komeili-Movahhed T, Bassirian M, Changizi Z, Moslehi A. SIRT1/NFκB pathway mediates anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of rosmarinic acid on in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Recept Signal Transduct Res*. 2022; 42(3):241-50. [DOI:10.1080/10799893.2021.1905665] [PMID]
- [21] Komeili Movahhed T, Moslehi A, Golchoob M, Ababzadeh S. Allantoin improves methionine-choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice through involvement in endoplasmic reticulum stress and hepatocytes apoptosis-related genes expressions. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; 22(7):736-44. [DOI:10.22038/ijbms.2019.33553.8012] [PMID] [PMCID]
- [22] Zhang ZK, Zhou Y, Cao J, Liu DY, Wan LH. Rosmarinic acid ameliorates septic-associated mortality and lung injury in mice via GRP78/IRE1α/JNK pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2021; 73(7):916-921. [DOI:10.1093/jpp/rgaa033] [PMID]
- [23] Huang N, Hauck C, Yum MY, Rizshsky L, Widrlechner MP, McCoy JA, et al. Rosmarinic acid in prunella vulgaris ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(22):10579-89. [DOI:10.1021/jf9023728] [PMID]
- [24] Eo SH, Kim SJ. Rosmarinic acid induces rabbit articular chondrocyte differentiation by decreases matrix metalloproteinase-13 and inflammation by upregulating cyclooxygenase-2 expression. *J Biomed Sci*. 2017; 24(1):75. [DOI:10.1186/s12929-017-0381-5] [PMID]

- [25] Kim M, Yoo G, Randy A, Son YJ, Hong CR, Kim SM, et al. Lemon balm and its constituent, rosmarinic acid, alleviate liver damage in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients*. 2020; 12(4):1166. [DOI:10.3390/nu12041166] [PMID]
- [26] Manne V, Handa P, Kowdley KV. Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018; 22(1):23-37. [DOI:10.1016/j.cld.2017.08.007] [PMID]
- [27] Balachander GJ, Subramanian S, Ilango K. Rosmarinic acid attenuates hepatic steatosis by modulating ER stress and autophagy in oleic acid-induced HepG2 cells. *RSC Adv*. 2018; 8(47):26656-63. [DOI:10.1039/C8RA02849D] [PMID]
- [28] Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: A stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*. 2006; 66(2 Suppl 1):S102-9. [DOI:10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec] [PMID]