

Original Article

## Effects of simultaneous intervention of aerobic training and berberine supplementation on AMPK and GLUT4 gene expression in the quadriceps muscle of diabetic male rats

Mahboobe Zaefarani Arani<sup>1</sup>, Javad Ramezani<sup>1\*</sup>, Saeed Naghibi<sup>1</sup>

Department of Sports Sciences, Faculty of Humanities, Payame Noor University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and Purpose:** Diabetes is a metabolic disease associated with increased blood glucose. Based on the results of previous research, physical activity, and herbal supplements containing antioxidants and anti-inflammatory agents play an important role in controlling blood glucose in diabetics. GLUT4 as a glucose transporter and AMPK as an insulin-independent biological pathway play an important role in energy homeostasis in the body. This study aimed to investigate the simultaneous intervention of aerobic training and berberine supplementation on GLUT4 and AMPK gene expression in the quadriceps muscle of diabetic male rats.

**Materials and Methods:** In this experimental research, 35 male Wistar rats (age 8 weeks, weight  $242.15 \pm 10.32$  gr) were randomly divided into five groups ( $n=7$ ) including healthy control, diabetic control, diabetes + berberine, diabetes + aerobic training, and diabetes + aerobic training + berberine. Diabetes was induced by one-step intraperitoneal injection of STZ (60 mg/kg). Blood glucose above 300 mg/dL meant successful induction of diabetes. The training groups performed a treadmill protocol for six weeks, five days a week, with a gradual increase in speed and time. Berberine supplementation with a dose of 50 mg per kilogram of body weight was done by gavage on all days of week and in training days one hour before training. Forty-eight hours after the last training session, rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight) and quadriceps muscle tissue samples were collected. RT-PCR technique was used to measure the relative expression of GLUT4 and AMPK genes. The data were analyzed using SPSS software. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were employed for between-group comparisons of the data.

**Results:** AMPK and GLUT4 gene expression in the quadriceps muscle of the diabetic control group was significantly decreased compared to the healthy control group ( $P=0.0001$ ). Moreover, the results showed that the content of AMPK and GLUT4 gene expression in diabetes + aerobic training and diabetes + aerobic training + berberine groups increased significantly compared to the diabetic control group ( $P=0.0001$ ). This increase in gene expression was higher in the diabetes + aerobic training + berberine group than in the diabetes + aerobic training group. In addition, the level of AMPK and GLUT4 gene expression in the group of diabetes + aerobic training + berberine increased significantly compared to the diabetes + berberine group ( $P<0.05$ ). However, despite the increase in gene expression of these two variables in diabetes + berberine group, these changes were not statistically significant ( $P>0.05$ ) when compared to the diabetic control group.

**Conclusion:** The simultaneous intervention of aerobic training and berberine supplementation has positive synergistic effects on AMPK and GLUT4 gene expressions in the quadriceps muscle of type 1 diabetic rats and may improve energy homeostasis in the body.

**Keywords:** AMPK, GLUT4, Berberine, Aerobic Training, Diabetes, Quadriceps Muscle

**How to cite this article:** Zaefarani arani M, Ramezani J, Naghibi S. Effects of simultaneous intervention of aerobic training and berberine supplementation on AMPK and GLUT4 gene expression in the quadriceps muscle of diabetic male rats. *J Sport Exerc Physiol.* 2023;16(4):55-66.

\*Corresponding Author's E-mail: j\_ramezani@pnu.ac.ir

<https://doi.org/10.48308/joeppa.2024.233187.1194>

Received: 22/09/2023

Revised: 10/12/2023

Accepted: 29/12/2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## تأثیر مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل دهی بربرین بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی نر دیابتی

محبوبه زعفرانی آرانی<sup>۱</sup>، جواد رضضانی<sup>۲\*</sup>، سعید نقیبی<sup>۱</sup>

گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت یک بیماری سوخت‌وسازی متابولیکی است که با افزایش قند خون و اختلال در هموستاز انرژی در بدن همراه است. روی هم‌رفته به‌طور کلی، فعالیت بدنی و مکمل‌های گیاهی دارای حاوی آنتی‌اکسیدان، ضد اکساینده‌ها و عوامل ضد التهابی، از راه میانجی‌گرهای زیست‌شیمیایی از طریق واسطه‌های بیوشیمیایی نقش بارزی در کنترل و تنظیم انرژی در بدن از راه میانجی‌گرهای سوخت‌وسازی از طریق واسطه‌های متابولیکی بازی ایفا می‌کنند. GLUT4 به‌عنوان ناقل گلوکز و AMPK به‌عنوان یک مسیر زیستی بیولوژیک غیروابسته به انسولین، از جمله این میانجی‌گرها واسطه‌هاست. هدف این تحقیق، بررسی مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل دهی بربرین بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی نر دیابتی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تحقیق تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار (سن هشت هفته، وزن ۳۲/۱۰±۲۴۲ گرم) به‌صورت تصادفی در پنج گروه هفت‌تایی شامل ۱. کنترل سالم، ۲. کنترل دیابتی، ۳. دیابت + بربرین، ۴. دیابت + تمرین هوازی و ۵. دیابت + تمرین هوازی + بربرین قرار گرفتند. القای دیابت با تزریق تک‌مرحله‌ای و داخل صفاقی STZ (۶۰ mg/kg) صورت پذیرفت. قند خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به معنای القای موفقیت‌آمیز دیابت بود. گروه‌های تمرین، به مدت شش هفته و با تواتر پنج روز در هفته، با افزایش تدریجی سرعت و زمان روی نوارگردان بر پایه برنامه ورزشی طبق پروتکل فعالیت کردند. مکمل دهی بربرین با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت گاوآز در تمامی روزها و یک ساعت پیش از تمرین انجام گرفت. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی توسط تزریق داخل صفاقی داروی کنامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت عمیق بی‌هوش شدند و سپس نمونه‌برداری از بافت عضله چهارسر ران انجام گرفت. برای بررسی تغییرات بیان نسبی ژن AMPK و GLUT4 از تکنیک RT-PCR استفاده شد. داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه و تست تعقیبی توکی بررسی شدند.

**نتایج:** بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری داشت ( $P=0/0001$ ). همچنین نتایج نشان داد محتوای بیان ژن AMPK و GLUT4 در گروه‌های (دیابت + تمرین هوازی) و (دیابت + تمرین هوازی + بربرین) نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معناداری داشت ( $P=0/0001$ ). این افزایش بیان ژن، در گروه (دیابت + تمرین هوازی + بربرین) نسبت به گروه (دیابت + تمرین هوازی) بیشتر بود. همچنین میزان بیان ژن AMPK و GLUT4 در گروه (دیابت + تمرین هوازی + بربرین) نسبت به گروه (دیابت + بربرین)، افزایش معناداری داشت ( $P>0/05$ ). در گروه (دیابت + بربرین) نسبت به گروه کنترل دیابتی، با وجود افزایش بیان ژن این دو متغیر، به لحاظ آماری معنادار نبود ( $P<0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل دهی بربرین دارای تأثیرات هم‌افزایی مثبت بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک است و شاید سبب بهبود انرژی در بدن شود.

**واژه‌های کلیدی:** AMPK، GLUT4، تمرین هوازی، دیابت، عضله چهارسر ران

**نحوه استناد به این مقاله:** زعفرانی آرانی م، رضضانی ج، نقیبی س. تأثیر مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل دهی بربرین بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی نر دیابتی. نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی. ۱۴۰۲؛ ۱۶(۴): ۵۵-۶۶.

\* رایانامه نویسنده مسئول: j-ramezani@pnu.ac.ir

## مقدمه

دیابت یک بیماری سوخت‌وسازی متابولیک است که با افزایش گلوکز خون ناشی از ترشح ناقص انسولین یا اختلال در کار عملکرد انسولین مشخص می‌شود (۱). تنظیم جذب گلوکز توسط سلول‌های چربی و عضلانی که روی هم‌رفته برای حفظ گلوکز در همه بدن ضروری است، توسط سطوح ناقل گلوکز ۴ (GLUT۴) در غشای پلاسمایی این سلول‌ها تعیین می‌شود (۲). اثر اصلی انسولین تحریک اگزوسیتوز GLUT۴ برای افزایش میزان آن در غشای پلاسمایی است و در نتیجه سبب افزایش جذب گلوکز خون می‌شود (۲). در حالت معمولی (سلول‌های تحریک نشده)، بیشتر GLUT۴ به صورت درون سلولی در محفظه‌های دور هسته‌ای قرار دارند که تا حدی ماهیت شبکه ترانس گلژی (TGN) دارند (۳) و در وزیکول‌های تخصصی (که به وزیکول‌های پاسخ‌دهنده به انسولین، IRV گفته می‌شود) در سراسر سیتوزول پراکنده‌اند (۶) که تحویل آن به غشای پلاسمایی توسط انسولین تنظیم می‌شود (۹). مسیر دیگری که در آن عضلات اسکلتی به‌عنوان مهم‌ترین بخش سوخت‌وسازی متابولیکی بدن به برداشت گلوکز از جریان خون کمک می‌کنند (عضلات اسکلتی ۷۵ درصد گلوکز بدن را مصرف می‌کنند)، مسیر پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) است که به انسولین وابستگی ندارد (۱۰). AMPK یک مسیر زیستی بیولوژیک غیروابسته به انسولین است که در حفظ انرژی بدن اثرگذار بوده و آنزیمی کلیدی در تنظیم سوخت‌وساز است. این آنزیم در هنگام پایین‌تر بودن سطوح ATP سلول به AMP فعال می‌شود و پیام‌هایی برای تولید مجدد ATP، از راه تجزیه FFA و همچنین کاهش مصرف ATP، از راه تجزیه پروتئین‌ها و تری‌گلیسیریدها فرستاده شده و سبب ایجاد آثار متفاوتی در بافت‌های مختلف بدن می‌شود (۱۱). افزایش غلظت AMPK، موجب افزایش GLUT۴ در سطح سلول و همچنین افزایش حساسیت انسولینی و در نهایت بهبود کنترل سطح گلوکز خون در بیماران دیابتی می‌شود (۱۰). در بیماران دیابتی نوع یک که توانایی ترشح انسولین در بدن به شدت کاهش می‌یابد، افزایش AMPK ممکن است از راه مسیرهای غیروابسته به انسولین سبب کنترل بهتر سطح گلوکز خون شود.

فعالیت بدنی منظم، یکی از روش‌های مؤثر در

کنترل قند خون از راه مسیرهای غیروابسته به انسولین به‌شمار می‌رود. برخی پژوهش‌ها، افزایش سطوح AMPK و GLUT۴ را پس از انجام فعالیت‌های ورزشی مختلف نظیر فعالیت هوازی و مقاومتی و برخی دیگر عدم تغییر بیان این دو ژن را پس از انجام ورزش گزارش کرده‌اند (۱۲-۱۷). برای نمونه چن و همکاران (۲۰۰۳) و تا که کوشی و همکاران (۲۰۰۶)، در پژوهش‌های خود دریافتند که در سطوح بالای فعالیت، میزان AMPK می‌تواند افزایش یابد (۱۲، ۱۳). همچنین کائو و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهش خود بیان کردند که هر دو نوع ورزش حاد و مزمن می‌توانند سبب افزایش سطوح AMPK در بدن موش‌ها شوند (۱۴). هال و همکاران (۲۰۱۳) و چانها و همکاران (۲۰۱۵)، به این نتیجه رسیدند که فعالیت هوازی با شدت بالا سبب افزایش سطح GLUT۴ می‌شود (۱۵، ۱۶)، در حالی که گارلی و همکاران (۲۰۱۶) عدم تغییر GLUT۴ را در عضلات اسکلتی پس از انجام تمرین‌های تمرینات هوازی بیان کردند (۱۷). در دهه‌های اخیر، گیاهان و اجزای فعال آنها به‌طور گسترده در درمان دیابت، به‌ویژه در دیابت نوع دو استفاده شده است (۱۸). بربرین یک ترکیب ایزوکینولین مشتق از بسیاری از گیاهان مختلف از جمله انگور ارگون، زرشک و زردچوبه است که سال‌ها در طب سنتی چینی به‌عنوان وسیله‌ای برای درمان مجموعه‌ای از بیماری‌ها از جمله اختلالات سوخت‌وساز متابولیک استفاده شده است (۱۹-۲۲). همچنین در تحقیقی گزارش شد که مصرف بربرین در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو سبب افزایش بیان پروتئین GLUT۴ می‌شود (۲۳). با این حال، تأثیرات دقیق بربرین بر AMPK و GLUT۴ در بیماران دیابتی نوع یک (T1D) ناشناخته باقی مانده است. استفاده از عوامل کاهش‌دهنده گلوکز خون برای مدیریت T1D هنوز در مراحل اولیه است. نشان داده شده است که بربرین افزون علاوه بر تأثیرات کاهش‌دهنده گلوکز خون، میزان حساسیت به انسولین در موش‌های دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوسین را بالا می‌برد (۲۴). یکی از اقدامات اصلی بربرین در فضای سلولی، فعال کردن آنزیمی به نام AMPK است که گاهی اوقات از آن به‌عنوان «کلید اصلی سوخت‌وساز متابولیک» یاد می‌شود. آنزیم مذکور در سلول‌های اندام‌های گوناگون ارگان‌های مختلف از جمله مغز، کلیه، عضلات، قلب و کبد وجود دارد و نقش مهمی

از سازگاری موش‌های صحرایی با شرایط آزمایشگاه به صورت تصادفی ساده، به پنج گروه هفت‌تایی جایگزین تقسیم شدند: ۱. کنترل سالم، ۲. کنترل دیابتی، ۳. دیابت + مکمل بربرین، ۴. دیابت + تمرین هوازی و ۵. دیابت + تمرین هوازی + مکمل بربرین. القای دیابت از راه تزریق داخل صفاقی و تک‌مرحله‌ای استرپتوزوسین (STZ) با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، حل شده در بافر سیترات سدیم (۱۰۰ mM) با ۴PH/۵ = صورت گرفت. برای جلوگیری از مرگ و میر موش‌های تحت تزریق STZ به دلیل شوک گلوکز خون، به مدت ۴۸ ساعت پس از تزریق به جای آب از محلول گلوکز پنج درصد استفاده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق STZ و ۱۲ ساعت ناشتایی، غلظت گلوکز خون موش‌ها با استفاده از دستگاه گلوکارد ۱۰ ساخت ژاپن اندازه‌گیری شد و موش‌هایی که سطح قند خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند، به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شدند. روز پس از تأیید دیابت، مداخله تمرین هوازی و مکمل‌دهی بربرین آغاز شد.

**روش اجرای پژوهش:** برنامه تمرین هوازی و مکمل‌دهی بربرین: برنامه پروتکل تمرین هوازی شامل دویدن روی نوارگردان ویژه مخصوص موش‌ها (ساخت شرکت برج صنعت آزما مدل T.S8۰۰۰) با تکرار پنج روز در هفته و به مدت شش هفته انجام شد. در آغاز و پایان هر جلسه تمرین، به ترتیب سه دقیقه گرم کردن و سرد کردن با سرعت (۴-۵ متر بر دقیقه) انجام گرفت. بدنه اصلی تمرین بر اساس جدول ۱ انجام شد (جدول ۱) (۲۷). برای وادار کردن موش‌ها به دویدن روی نوارگردان، بدون استفاده از شوک الکتریکی و تنها با کمک دست زدن اقدام شد. همچنین مکمل‌دهی بربرین در گروه‌های تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از راه سوزن گاوژ در تمام ایام هفته و یک ساعت پیش از تمرین خوراندند. پودر بربرین استفاده شده در این تحقیق از شرکت سیگما آلدردیج به شناسه (۵-۶۰-cas-۱۴۱۴۳۳) خریداری شد. پودر بربرین هر روز به صورت تازه در محلول نرمال سالین حل و آماده می‌شد.

در تنظیم سوخت‌وساز ایفا می‌کند (۲۵). همچنین در مدل‌های حیوانی دیابتی شده با استرپتوزوسین (STZ)، بربرین نقش مهمی در بازسازی سلول‌های بتای پانکراس، افزایش ترشح انسولین، افزایش حساسیت گیرنده‌ها به انسولین و کاهش مقاومت انسولینی ایفا می‌کند (۲۶).

با توجه به ناهمسویی نتایج تحقیقات و همچنین تأثیرات سوخت‌وسازی متابولیکی فعالیت بدنی و بربرین، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل بربرین بر بیان ژن AMPK و GLUT4 عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع یک انجام گرفت. در این پژوهش به بررسی تأثیر مداخله همزمان تمرین هوازی و مکمل بربرین بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع یک پرداختیم. در واقع این پرسش در تحقیق حاضر مطرح است که افزون تأثیر سوخت‌وسازی متابولیکی تمرین هوازی و بربرین، آیا مداخله همزمان این دو می‌تواند جنبه هم‌افزایی در بیان ژن AMPK و GLUT4 در نمونه‌های دیابتی نوع یک داشته باشد یا خیر؟

## روش پژوهش

**نمونه‌های پژوهش:** این تحقیق از نوع تجربی بود. برای انجام این تحقیق از ۲۵ سر موش صحرایی رت نر بالغ نژاد ویستار (سن هشت هفته) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، با میانگین وزنی ۲۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی پس از خریداری به اتاق ویژه مخصوص حیوانات واقع در پردیس بین‌الملل دانشگاه شهید صدوقی یزد انتقال داده شدند و در قفس‌هایی از جنس پلی‌بی‌کربنات به ابعاد ۴۰×۶۰×۹۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. تمام شرایط استاندارد از جمله درجه حرارت (۲۴±۱°C)، رطوبت نسبی (% ۳±۴)، دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد (خریداری شده از شرکت یه‌پور، ایران) و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲/۱۲ برای موش‌های صحرایی در نظر گرفته شد. ملاحظات اخلاقی در این تحقیق توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه پیام نور با شناسه IR.PNU.REC.۱۴۰۰۲۶۸ تأیید شد. پس

جدول ۱. پروتکل برنامه تمرین هوازی

متغیرهای تمرین	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵-۱۴	۱۵-۱۴	۱۸-۱۷	۱۸-۱۷
مدت (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۴۰

## روش‌های آزمایشگاهی:

محتویات لوله‌های کوچک درهم آمیخته شود. سپس به مدت ده دقیقه در دمای ۲۰- نگهداری آنکوبه شدند. به منظور رسوب RNA، نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتی‌فریوژ شدند. محلول رویی تخلیه شده و رسوب‌ها با اتانول ۷۵ درصد شست‌وشو داده شدند، به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به هر میکروتیوب افزوده شد و چند ثانیه ورتکس انجام گرفت تا رسوب کاملاً در اتانول شسته شده و ناخالص‌ها جدا شوند. سپس سانتی‌فریوژ در RPM ۷۵۰۰ به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه انجام شد. محیط رویی تخلیه و لوله‌های کوچک به مدت ۱۵ دقیقه روی دستمال کاغذی استریل برعکس قرار داده شدند تا رسوب نیمه‌خشک شده و الکل تبخیر شود. پس از نیمه‌خشک شدن رسوب، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب DEPC یا عاری از RNase (ساخت شرکت Thermo، آمریکا) به هر لوله کوچک افزوده شد تا رسوب RNA در آن حل شود. برای حل شدن رسوب، لوله‌های کوچک به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه قرار گرفتند. سپس نمونه‌های RNA استخراج‌شده در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند. مرحله بعد ساخت سنتز cDNA بود. برای این منظور ابتدا همه مواد کیت از دمای ۲۰- و نمونه‌ها از ۷۰- درجه خارج شده و پس از آب شدن به روی یخ جابه‌جا شدند. مواد پیش از استفاده، ورتکس کوتاه و اسپین شدند. برای تهیه میکس RT، ۵ میکرولیتر بافر RT به همراه آنزیم RT، ۱ میکرولیتر آغازگر پرایمر طراحی شده (جدول ۲) و ۳ میکرولیتر آب DEPC مخلوط شد و سپس در حجم‌های ۹ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شد. لوله‌های کوچک آماده‌شده حاوی ترکیبی از RT و نمونه RNA در دستگاه Dry block heater ساخت شرکت کیاژن، ایران گذاشته شد و برنامه دمایی زیر (جدول ۳) انجام گرفت. نمونه‌های cDNA آماده‌شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه نگهداری شدند. از کیت Easy cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت پارس‌توس، ایران برای سنتز cDNA استفاده شد.

**روش نمونه‌برداری و آماده‌سازی بافت‌ها:** ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی داروی کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) به صورت عمیق بی‌هوش شدند. سپس عضله چهارسر ران از بدن حیوان جدا شده و در داخل میکروتیوب پنج میلی‌لیتر سی‌سی گذاشته شد و بلافاصله در تانک ازت قرار داده شد.

در روز آزمایش، قطعه‌ای از بافت عضله چهارسر ران حیوانات به وزن حدود ۱۰۰ میلی‌گرم جدا شده و در یک میلی‌لیتر بافر (PH=۷، ۴/۷=PBS) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از هموژنایزر (مدل IKA ۱۰ T Basic، آلمان) روی یخ به مدت پنج دقیقه کاملاً حل شدند. محلول به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فریوژ شد. مایع شفاف رویی به یک میکروتیوب ۱ سی‌سی منتقل شد. بیان نسبی ژن AMPK و GLUT۴ در بافت عضله چهارسر ران با روش RT-PCR سنجش شد و پس از کمی‌سازی آن با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، تغییرات آن محاسبه و تجزیه و تحلیل شد.

برای استخراج RNA نخست ۷۰ میلی‌گرم از بافت عضله چهارسر ران حیوان پس از هموژن کردن کامل در ۱ میلی‌لیتر تراپیزول (ساخت شرکت کیازیست، ایران) ریخته شد تا لیزات سلول به دست آید. سپس در مرحله اول مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (ساخت مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) به نمونه‌ها اضافه شد و ۱۵ ثانیه تکان داده شد تا مخلوط شوند (بدون ورتکس). میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط آنکوبه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فریوژ شدند. بخش فاز شفاف رویی حاوی RNA جدا شده و به لوله کوچک میکروتیوب دیگری منتقل شد. به لوله‌های کوچک دارای مایع شفاف رویی، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (ساخت مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) اضافه شد و دو مرتبه میکروتیوب‌ها سر و ته (inverting) شدند تا

جدول ۲. توالی پرایمر آغازگرهای GLUT4 و AMPK به همراه ژن کنترل GAPDH

ژن	توالی آغازگر پرایمر
f-r-Glut4	GAAGTGGGAAGCTGGAGGGAG
R-r-Glut4	TAGGGGTAAGAGGAAGGCAGGA
r-AMPK F	TGTGTTCAAAGTCTGCTGCC
r-AMPK R	ACGCTGTAAGGTCTGGTCAA
r-GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTG
r-GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

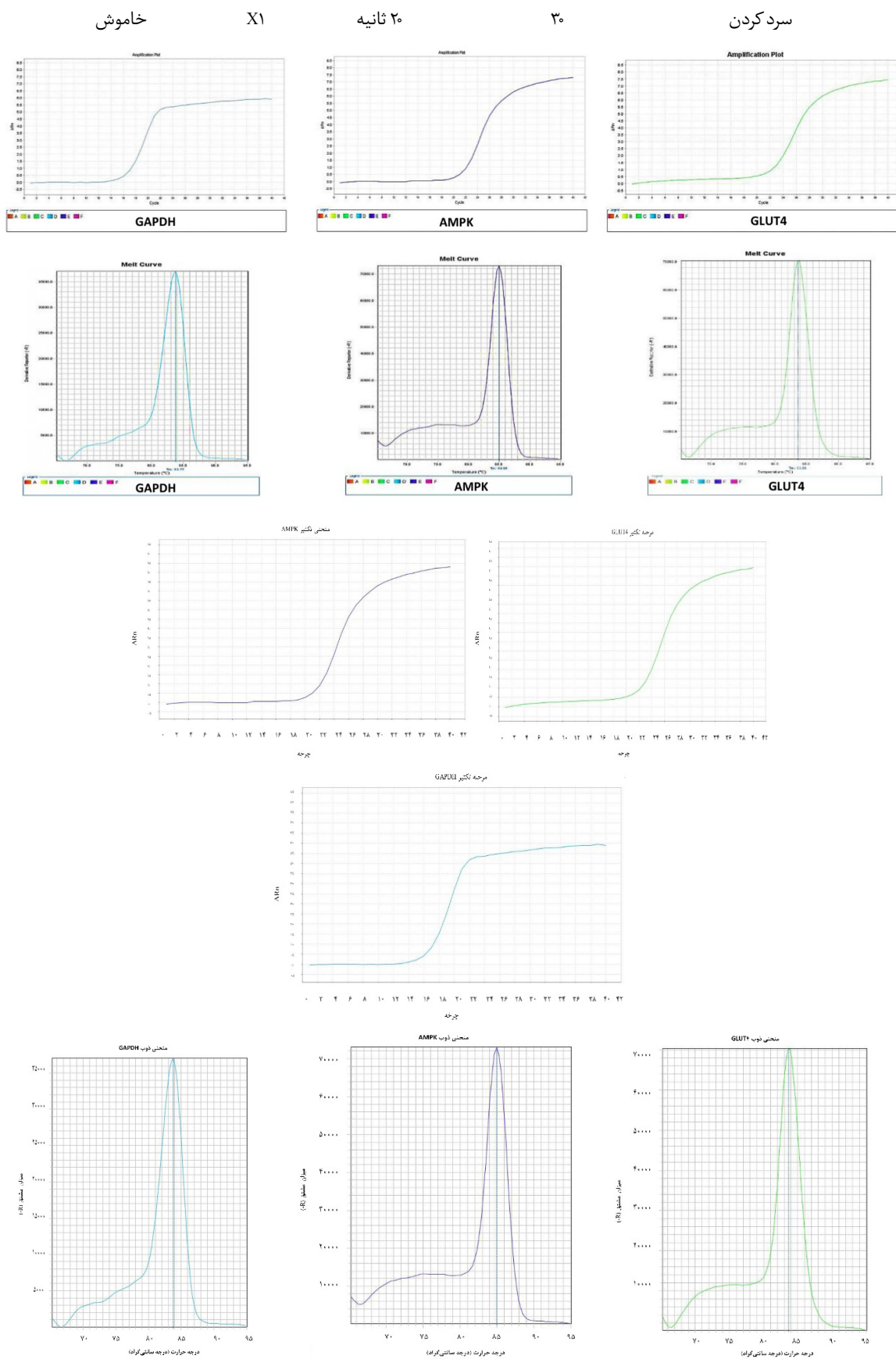
جدول ۳. پروتکل برنامه دما در ساخت cDNA

برنامه Real-Time			
	درجه سانتیگراد	دقیقه	
	۲۵	۱۰	
	۴۷	۶۰	X1
RT-PCR	۸۵	۵	
Cooling	۴	۲	X1

برای بررسی کمی تغییرات بیان ژن، مواد لازم برای PCR از فریزر درآورده شده و کمی ورتکس و اسپین روی یخ انجام گرفت. سپس در هر محلول مقدار یک میکرولیتر از نمونه cDNA مورد نظر افزوده شد و حجم نهایی هر واکنش PCR به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس برنامه دمایی زیر (جدول ۴) اجرا شد.

جدول ۴. پروتکل برنامه دمایی در RT-PCR

برنامه Real-Time PCR				
Acquisition mode	چرخه	زمان	درجه حرارت (سانتیگراد)	مراحل
خاموش	X1	۵ دقیقه	۹۵	دنا توره کردن
خاموش	X40	۱۵ ثانیه	۹۵	تکثیر
خاموش		۱۵-۲۰ ثانیه	۶۰	
روشن		۱۵-۳۰ ثانیه	۷۲	
خاموش	X1	۱۵ ثانیه	۹۵	(Amplification) منحنی ذوب
خاموش		۱ دقیقه	۶۵	(Melt curve)
روشن			۶۵---۹۵، Slope ۰/۳	



شکل ۱. مرحله تکثیر و منحنی ذوب AMPK، GLUT4 و GAPDH

## نتایج

بر پایه نتایج، القای دیابت سبب کاهش معناداری در میزان بیان ژن GLUT4 و AMPK در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی شد ( $P=0.001$ ) (جدول ۶). میزان بیان ژن این دو متغیر در گروه‌های (دیابت+ تمرین هوازی) و (دیابت+ تمرین هوازی+ بربرین) نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معناداری پیدا کرد ( $P=0.001$ )، اما این افزایش در گروه (دیابت+ بربرین) معناداری نبود ( $P>0.05$ ) (شکل ۲). همچنین در گروه (دیابت+ تمرین هوازی+ بربرین) نسبت به گروه (دیابت+ بربرین)، میزان بیان ژن GLUT4 و AMPK افزایش معناداری نشان داد ( $P>0.005$ ) (شکل ۲).

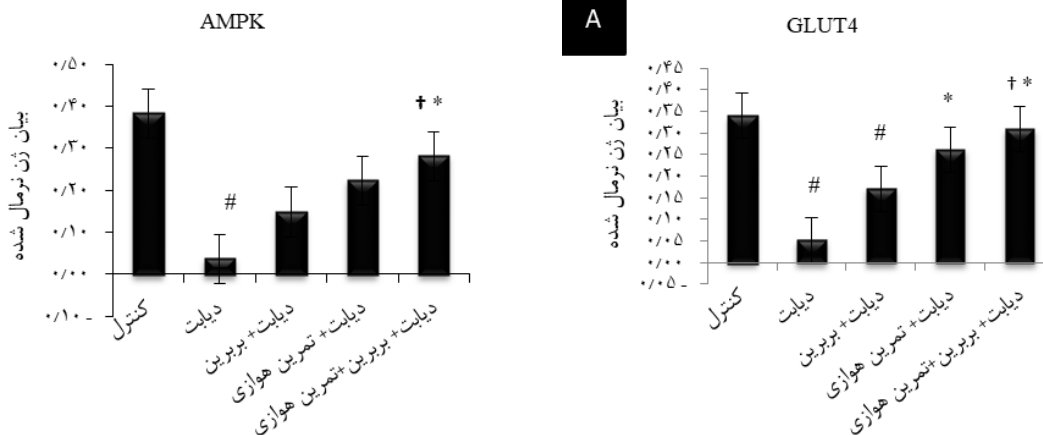
**تحلیل آماری:** از آزمون شاپیروویلیک برای اطمینان از توزیع هنجار داده‌ها و همچنین از آزمون لون برای بررسی همگنی واریانس داده‌ها استفاده شد. پس از تأیید پراکنش هنجار نرمالیتی و همگنی واریانس توزیع داده‌ها، به منظور بررسی تغییرات میانگین بیان ژن GLUT4 و AMPK درون گروهی و بین گروه‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یکراهه (ANOVA) در سطح معناداری  $P<0.05$  و آزمون تست تعقیبی توکی استفاده شد. تمامی مراحل آماری با بهره‌گیری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت.

جدول ۵. میانگین و انحراف استاندارد وزن بدن و گلوکز خون در گروه‌های مورد بررسی

متغیر	کنترل سالم	کنترل دیابتی	تمرین هوازی	بربرین	تمرین هوازی+ بربرین
وزن بدن (گرم)	۲۴۴/۱۲±۲۱/۳	۲۴۳/۱۳±۳/۱۳	۲۴۴/۱۱±۴/۲۱	۲۴۳/۱۳±۸/۳۴	۲۴۵/۱۸±۱/۵۱
پس از مداخله	۳۱۴/۲۱±۸/۱۱	۱۷۸/۱۰±۹/۹۸	۲۴۷/۸±۴/۶۳	۱۹۴/۱۵±۸/۱۱	۳۰۰/۱۶±۴/۱۵
گلوکز خون (mg/dl)	۹۹/۰۷±۱۳/۱۵	۴۱۷/۳۸±۴۵/۲۹	۴۲۰/±۱۲۲۹/۶۵	۴۲۰/۵۴±۳۶/۵۴	۴۱۹/۲۴±۴۱/۲۶
پس از مداخله	۹۷/۰۸±۸/۵۴	۵۰۱/۲۵±۲۱/۳۶	۳۲۴/۴۵±۳۳/۲۱	۳۷۹/۲۵±۲۱/۳۴	۲۶۷/۲۸±۱۷/۲۱

جدول ۶. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه متغیرهای مورد بررسی (علامت \* نشان دهنده وجود اختلاف معناداری بین گروه‌هاست)

متغیر	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F	P
GLUT4	بین گروهی	۰/۲۳۲۶	۴	۰/۰۵۸۱۵		
	درون گروهی	۰/۰۵۷۴۶	۱۵	۰/۰۰۳۸۳۱	۱۵/۱۸	* ۰/۰۰۰۱
	کل	۰/۲۹۰۱	۱۹	۰/۰۶۶۳۴		
AMPK	بین گروهی	۰/۰۳۵۱۷	۱۵	۰/۰۰۲۳۴۵	۲۸/۳	* ۰/۰۰۰۱
	درون گروهی	۰/۳۰۰۵	۱۹			
	کل					



شکل ۲. مقایسه میانگین تغییرات بیان نسبی ژن AMPK و GLUT4 در گروه‌های پژوهش. (علامت \*) نشان دهنده اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل دیابت، علامت (#) نشان دهنده اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل سالم، علامت (†) نشان دهنده اختلاف معنادار نسبت به گروه دیابت+ بربرین است)



## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، مصرف بربرین با دوز ۵۰ mg/kg به مدت شش هفته اثر معناداری بر بیان ژن AMPK و GLUT۴ در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی ندارد، اما تمرین هوازی به تنهایی و همچنین توأم با مصرف بربرین دارای تأثیرات هم‌افزایی مثبت بوده و سبب افزایش معناداری بر بیان ژن این دو متغیر شده است (شکل ۲). این نتیجه با نتایج بیشتر مطالعات همسوست (۱۴، ۱۲-۲۸). اگوجی و همکاران (۲۰۱۳) نیز در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که مصرف فلاونوئیدها و انجام تمرین هوازی به صورت جداگانه، تأثیر معناداری بر بیان ژن GLUT۴ ایجاد نمی‌کند، ولی ترکیب این دو با یکدیگر بیان ژن AMPK و GLUT۴ را افزایش می‌دهد (۲۹). پروتئین کیناز وابسته به AMP (AMPK) نقش حیاتی در روند تنظیم انرژی بدن دارد. بربرین ممکن است حساسیت به انسولین را افزایش دهد و چاقی سراسری سیستمیک را برای حفظ گلوکز از راه از طریق فعال‌سازی AMPK در بافت‌های متعدد از جمله عضلات و بافت چربی کاهش دهد (۱). برای مثال، بربرین انتقال ناقل گلوکز-۴ (GLUT۴) را به غشای پلاسمایی ارتقا داده و با فعال کردن AMPK، حساسیت به انسولین کاردیومیوسیت‌های H۹c۲ مقاوم به انسولین را افزایش می‌دهد (۳۰). دو سازوکار اصلی بربرین برای فعال کردن مسیر AMPK ذکر شده است، یکی مهار کمپلکس I تنفسی میتوکندری و در نتیجه تحریک فعالیت AMPK است (۳۱، ۳۲) و دیگری تنظیم بیان سیرتوئین ۱ (SIRT1) در بافت چربی به طوری که مسیر AMPK می‌تواند فعال شود (۳۳). در زمان فعالیت بدنی ATP به ADP و AMP و فسفات شکسته می‌شود و تولید انرژی می‌کند. AMP با تحریک AMPK سبب ساخته شدن ATP می‌شود. همچنین بر اساس شواهد، ADP که یک ماده حاصل از تجزیه ATP در اثر فعالیت بدنی است نیز با تحریک AMPK در ساخت ATP نقش دارد (۱۱).

از سوی دیگر، AMPK سبب انتقال GLUT۴ توسط دو پروتئین AS1۶۰ و aPKC می‌شود. AMPK در این مسیر طی کاهش سطح انرژی، آندوسیتوز GLUT۴ را کم می‌کند تا انرژی مورد نیاز سلول هنگام ورزش با جذب بیشتر گلوکز تأمین شود (۳۴). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، میزان بیان ژن GLUT۴ نیز هنگام با افزایش

AMPK در عضله چهارسر ران موش‌های صحرایی در گروه تمرین هوازی و همچنین گروه (تمرین هوازی + بربرین) نسبت به گروه کنترل دیابتی، افزایش معنادار داشته است (شکل ۲A). در هنگام ورزش با انقباض عضله، کلسیم از شبکه آندوپلاسمیک به سیتوپلاسم رها می‌شود و به این صورت پیام‌بر ثانویه کلسیم کالمودولین را فعال می‌کند و کلسیم کالمودولین، با فعال‌سازی aPKC که مسیری جدا از AMPK است، سبب جذب گلوکز می‌شود. همچنین AMPK پس از فعال شدن، هنگام انقباض عضله، مولکول HDAC۵ را فسفوریله کرده و MEF۲ را آزاد می‌کند. MEF۲ عاملی است که نسخه برداری مولکول SLC۲A۴ را فعال کرده و بدین صورت ذخایر GLUT۴ افزایش پیدا می‌کند. از راه از طریق این سازوکار، ورزش سبب افزایش بیان GLUT۴ در عضله اسکلتی شده و همین مسئله موجب افزایش محتوای پروتئین‌های گیرنده انسولین و در نتیجه افزایش حساسیت به انسولین در سلول‌های عضلانی می‌شود (۳۴). هرچند گزارشی مبنی بر عدم تأثیرپذیری شش هفته تمرین هوازی با شدت متوسط بر میزان GLUT۴ عضله دوقلوی موش‌های دیابتی دیده شد (۳۵) که به گمان فراوان به احتمال زیاد، این ناهم‌سویی ممکن است به تفاوت در عضله مورد بررسی یا برنامه پروتکل تمرینی ارتباط داشته باشد.

از طرفی بربرین نیز از راه مهار پروتئین‌های فعال شده با میتوزن (MAPK) و با فعال کردن AMPK، سبب افزایش حساسیت به انسولین می‌شود و در جذب بیشتر گلوکز و تحریک GLUT۴ اثرگذار است (۳۶). در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که بربرین بیان GLUT۴ را افزایش می‌دهد، فعالیتی که به طور بالقوه با توانایی آن در کنترل سوخت‌وساز گلوکز وابسته مرتبط است (۳۷). مشخص شده است که بربرین بیان IRS را افزایش می‌دهد و در نتیجه پیام‌رسانی سیگنالینگ PI۳K/AKT را فعال می‌کند (۳۸). شواهدی وجود دارد که یافته‌های پیشین نشان می‌دهد پیام‌رسانی سیگنالینگ PI۳K/AKT بر فعال‌سازی MAPK (۳۹) و کاهش بیان GLUT۴ تأثیر دارد و سبب اختلال در تحمل گلوکز می‌شود (۴۰). همچنین بربرین از راه سرکوب P۳۸، ERK و JNK سبب کاهش بیان پروتئین MAPK و افزایش بیان GLUT۴ می‌شود (۴۱). تحقیقات نشان داده است که در بیماران دیابتی مقاوم به انسولین، فعالیت محور

**حامی/ حامیان مالی**

این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور مرکز کرج و با هزینه شخصی دانشجوی انجام گرفته است.

**مشارکت نویسندگان**

همه نویسندگان در آماده سازی مقاله مشارکت یکسان داشته اند.

**تعارض منافع**

هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

**منابع**

- Han Y, Xiang Y, Shi Y, Tang X, Pan L, Gao J, et al. Pharmacokinetics and Pharmacological Activities of Berberine in Diabetes Mellitus Treatment. Evidence-based Complement Altern Med. 2021;2021.
- Klip A, McGraw TE, James DE. Thirty sweet years of GLUT4. J Biol Chem. 2019;294(30):11369–81.
- Foley KP, Klip A. Dynamic GLUT4 sorting through a syntaxin-6 compartment in muscle cells is derailed by insulin resistance-causing ceramide. Biol Open. 2014;3(5):314–25.
- Li L V, Bakirtzi K, Watson RT, Pessin JE, Kandrор K V. The C-terminus of GLUT4 targets the transporter to the perinuclear compartment but not to the insulin-responsive vesicles. Biochem J. 2009;419(1):105–13.
- Shewan AM, van Dam EM, Martin S, Luen TB, Hong W, Bryant NJ, et al. GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. Mol Biol Cell. 2003;14(3):973–86.
- Xu Z, Kandrор K V. Translocation of small preformed vesicles is responsible for the insulin activation of glucose transport in adipose cells: evidence from the in vitro reconstitution assay. J Biol Chem. 2002;277(50):47972–5.
- Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, Zhou L, Herz J, Kandrор K V, et al. Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. J Biol Chem. 2010;285(1):104–14.
- Larance M, Ramm G, Stockli J, van Dam EM, Winata S, Wasinger V, et al. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. J Biol Chem. 2005;280(45):37803–13.

هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) افزایش می یابد و پس از آن میزان ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از غده آدرنال و خطر بروز هایپرگلیسمی را افزایش می دهد (۴۲، ۴۳). گلوکوکورتیکوئیدها می توانند جذب و استفاده از گلوکز محیطی را با مهار انتقال GLUT4 و اثر آن بر روی عضلات اسکلتی کاهش دهند (۴۴، ۴۵). بربرین از راه مهار مسیر محور HPA، می تواند بیان mRNA و پروتئین GLUT4 را در عضله اسکلتی موش های صحرایی دیابتی افزایش دهد (۴۶). علی رغم تأثیرات مثبت گزارش شده بربرین بر AMPK و GLUT4 (۳۶، ۳۹–۴۱)، افزایش این دو عامل در عضله چهارسر ران موش های صحرایی در گروه بربرین با دوز ۵۰ mg/kg معنادار نبود. گویا این ناهمسویی به دلیل دوز پایین تر بربرین، نحوه مصرف آن یا مدت زمان کوتاه مصرف آن باشد.

بر پایه نتایج این تحقیق، مصرف بربرین به مقدار ۵۰ mg/kg اثر معناداری بر بیان ژن AMPK و GLUT4 در عضله چهارسر ران موش های صحرایی دیابتی شده با STZ ندارد، اما انجام تمرین هوازی به تنهایی دارای اثر معناداری است. همچنین مصرف بربرین با دوز ۵۰ mg/kg توأم با تمرین هوازی، دارای تأثیرات هم افزایی است و میزان بیان ژن AMPK و GLUT4 را در عضله چهارسر ران دوچندان می کند. بنابراین توصیه می شود در کنار تمرین هوازی، مصرف بربرین با دوز مناسب در نمونه های دیابتی تجویز شود. نتایج این تحقیق با احتیاط زیاد، ممکن است به نمونه های انسانی قابل تعمیم باشد، هرچند به پژوهش های تحقیقات بالینی نیاز است. از محدودیت های این تحقیق می توان به عدم کنترل میزان غذا و آب مصرفی و همچنین میزان استرس وارده به موش ها اشاره کرد. از این رو برای تحقیقات آینده توصیه می شود مقدار غذا و آب مصرفی حیوانات اندازه گیری و به طور دقیق ثبت شود تا همگام با سایر نتایج به خصوص تغییرات میزان گلوکز خون، تغییرات مصرف غذا و آب در گروه های مختلف بررسی شود، چراکه در توجیه بهتر نتایج می تواند بسیار کمک کننده باشد.

**تشکر و قدردانی**

از مدیریت و کادر محترم آزمایشگاه هیستوژنوتک بابت انجام آزمایش های این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

9. Karylowski O, Zeigerer A, Cohen A, McGraw TE. GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol Biol Cell*. 2004;15(2):870–82.
10. Schunke M, Myers MG, Zierath JR, Björnholm M. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase  $\gamma$ 1H151R overexpression enhances whole body energy homeostasis and insulin sensitivity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2015;309(7):E679–90.
11. Bird SR, Hawley JA. Exercise and type 2 diabetes: new prescription for an old problem. *Maturitas*. 2012;72(4):311–6.
12. Chen Z-P, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*. 2003;52(9):2205–12.
13. Takekoshi K, Fukuhara M, Quin Z, Nissato S, Isobe K, Kawakami Y, et al. Long-term exercise stimulates adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and subunit expression in rat visceral adipose tissue and liver. *Metabolism*. 2006;55(8):1122–8.
14. Cao S, Li B, Yi X, Chang B, Zhu B, Lian Z, et al. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51709.
15. Hall KE, McDonald MW, Grisø KN, Campos OA, Noble EG, Melling CWJ. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. *Metabolism*. 2013;62(10):1485–94.
16. Cunha VN, de Paula Lima M, Motta-Santos D, Pesquero JL, de Andrade RV, de Almeida JA, et al. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. *Cell Biochem Funct*. 2015;33(7):435–42.
17. Gurley JM, Griesel BA, Olson AL. Increased skeletal muscle GLUT4 expression in obese mice after voluntary wheel running exercise is posttranscriptional. *Diabetes*. 2016;65(10):2911–9.
18. NING G, HONG J, BI Y, GU W, ZHANG Y, ZHANG Z, et al. Progress in diabetes research in China. *J Diabetes [Internet]*. 2009 Sep;1(3):163–72.
19. Wu J, Li J, Li W, Sun B, Xie J, Cheng W, et al. *Achyranthis bidentatae* radix enhanced articular distribution and anti-inflammatory effect of berberine in Sanmiao Wan using an acute gouty arthritis rat model. *J Ethno-pharmacol*. 2018;221:100–8.
20. Jin F, Xie T, Huang X, Zhao X. Berberine inhibits angiogenesis in glioblastoma xenografts by targeting the VEGFR2/ERK pathway. *Pharm Biol*. 2018;56(1):665–71.
21. Ikram M. A review on the chemical and pharmacological aspects of genus *Berberis*. *Planta Med*. 1975;28(08):353–8.
22. Vuddanda PR, Chakraborty S, Singh S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(10):1297–307.
23. Zhang W, XU Y, Guo F, Meng Y, Li M. Anti-diabetic effects of cinnamaldehyde and berberine and their impacts on retinol-binding protein 4 expression in rats with type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(21):2124–8.
24. Wang Y, Campbell T, Perry B, Beaurepaire C, Qin L. Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 2011 Feb;60(2):298–305.
25. Yeung AWK, Orhan IE, Aggarwal BB, Battino M, Belwal T, Bishayee A, et al. Berberine, a popular dietary supplement for human and animal health: Quantitative research literature analysis a review. 2020;
26. Zhou J, Zhou S, Tang J, Zhang K, Guang L, Huang Y, et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol [Internet]*. 2009;606(1–3):262–8.
27. Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, et al. RETRACTED: Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. Elsevier; 2009.
28. Arshadi S, Hasan Ghomi M, Banaeifar A.A, Kazemzadeh Y. The Effect of Eight Weeks Aerobic and Resistance Training on AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Gene Expression in Soleus Muscle and Insulin Resistance of STZ-Induced Diabetic Rat. *jmciri* 2019; 37 (2) :81-87. [In persian]
29. Eguchi T, Kumagai C, Fujihara T, Takemasa T, Ozawa T, Numata O. Black tea high-molecular-weight polyphenol stimulates exercise training-induced improvement of endurance capacity in mouse via the link between AMPK and GLUT4. *PLoS One*. 2013;8(7):e69480.

30. Chang W, Zhang M, Li J, Meng Z, Wei S, Du H, et al. Berberine improves insulin resistance in cardiomyocytes via activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Metabolism*. 2013;62(8):1159–67.
31. Turner N, Li J-Y, Gosby A, To SWC, Cheng Z, Miyoshi H, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes*. 2008;57(5):1414–8.
32. Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, et al. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS One*. 2011;6(2):1–10.
33. Shan Y, Zhang S, Gao B, Liang S, Zhang H, Yu X, et al. Adipose tissue SIRT1 regulates insulin sensitizing and anti-inflammatory effects of berberine. *Front Pharmacol*. 2020;11:591227.
34. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*. 2007;5(4):237–52.
35. Astorino T, Baker J, Brock S, Dalleck L, Goulet E, Gotshall R, et al. Effect of exercise on GLUT4 expression of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Exerc Physiol*. 2011;14(4).
36. Yin J, Ye J, Jia W. Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharm Sin B [Internet]*. 2012 Aug;2(4):327–34.
37. Zhang Q, Xiao X, Feng K, Wang T, Li W, Yuan T, et al. Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2010;2011.
38. Wang Y-Y, Tang L-Q, Wei W. Berberine attenuates podocytes injury caused by exosomes derived from high glucose-induced mesangial cells through TGFβ1-PI3K/AKT pathway. *Eur J Pharmacol*. 2018;824:185–92.
39. Zhou T, Meng X, Che H, Shen N, Xiao D, Song X, et al. Regulation of insulin resistance by multiple MiRNAs via targeting the GLUT4 signalling pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(5):2063–78.
40. Zhou D, Li S, Ding J, Yin T, Yang J, Ye H. MIF may participate in pathogenesis of polycystic ovary syndrome in rats through MAPK signalling pathway. *Curr Med Sci*. 2018;38(5):853–60.
41. Zhang N, Liu X, Zhuang L, Liu X, Zhao H, Shan Y, et al. Berberine decreases insulin resistance in a PCOS rats by improving GLUT4: Dual regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;110:104544.
42. Daimon M, Kamba A, Murakami H, Takahashi K, Otaka H, Makita K, et al. Association between pituitary-adrenal axis dominance over the renin-angiotensin-aldosterone system and hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):889–97.
43. Perry RJ, Zhang X-M, Zhang D, Kumashiro N, Camporez J-PG, Cline GW, et al. Mechanism for the anti-diabetic effect of leptin. *Nat Med*. 2014;20(7):759.
44. DIMITRIADIS G, LEIGHTON B, PARRY-BILLINGS M, SASSON S, YOUNG M, KRAUSE U, et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J*. 1997;321(3):707–12.
45. Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Adams S, McEwen BS, Charron MJ, et al. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology*. 2007;85(2):71–80.
46. Mi J, He W, Lv J, Zhuang K, Huang H, Quan S. Effect of berberine on the HPA-axis pathway and skeletal muscle GLUT4 in type 2 diabetes mellitus rats. *Diabetes, Metab Syndr Obes*. 2019;12:1717–25.