



The Role of Hydroalcoholic Extract of *Onopordon leptolepis* in Inhibiting Key Diabetes-Related Enzymes and Improving Pancreatic Beta-Cell Function

Mitra Bakhtiari ¹ , Mona Pazhouhi ², Mohammad Hossein Estehghari ³, Cyrus Jalili ^{4*}

¹ Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

² Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Medical Biology Research Center, Health Technology Research Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract

Background: Inhibition of enzymes involved in carbohydrate digestion, coupled with improvement of β -cell function, represents a primary objective in the development of antidiabetic medications. The plant *Onopordon leptolepis* (cotton thistle) exhibits high therapeutic potential due to its phenolic and flavonoid compounds. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of the hydroalcoholic extract of cotton thistle on the enzymes α -amylase, α -glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), as well as its effect on cell viability, insulin secretion and expression of genes related to β -cell function.

Materials and Methods: A hydroalcoholic extract of the plant was prepared, and its antioxidant activity was measured. The inhibitory effects of the extract on the activities of α -amylase, α -glucosidase and PTP1B enzymes were evaluated. RIN-5F cell line was cultured under standard conditions to assess the effect of the extract on cell viability, insulin secretion and expression of INS I, INS II, IRS-I, IRS-II and IRS-III genes.

Results: Cotton thistle extract reduced the activity of free radicals in a concentration-dependent manner ($p \leq 0.05$). Significant inhibition of α -amylase, α -glucosidase and PTP1B enzyme activities was observed ($p \leq 0.05$). Furthermore, treatment with the extract at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ increased insulin secretion ($p \leq 0.05$). Also, the expression of INS I, INS II, IRS-I, IRS-II and IRS-III genes significantly increased after treatment with the extract ($p \leq 0.05$).

Conclusion: Cotton thistle hydroalcoholic extract shows significant antidiabetic effects by inhibiting key glucose-regulating enzymes, reducing free radicals and enhancing the function and expression of genes related to β cells.

Keywords:

Diabetes
Medicinal Plants
Insulin
Antioxidant
Cotton Thistle

*Corresponding author

Cyrus Jalili
cjalili@kums.ac.ir

Ethical code

IR.KUMS.MED.REC.1402.237

Received: 2025/11/29
Accepted: 2026/09/05



Extended Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is one of the most important metabolic disorders worldwide, characterized by chronic hyperglycemia and disruptions in carbohydrate, lipid, and protein metabolism. Persistent hyperglycemia can lead to the development of numerous long-term complications in various organs, including the cardiovascular, renal, ophthalmic and nervous system. One of the major drivers of type 2 diabetes pathogenesis and progression is impaired tissue sensitivity to insulin and the gradual decline in pancreatic β -cell function. Therefore, identifying natural compounds that can simultaneously reduce carbohydrate digestion and absorption, improve insulin sensitivity, and enhance β -cell function is of considerable importance.

During carbohydrate digestion, the enzymes α -amylase and α -glucosidase play essential roles. α -Amylase facilitates the initial stage of carbohydrate digestion by breaking down polysaccharides and starch into oligosaccharides and smaller compounds. Subsequently, α -glucosidase converts complex carbohydrates and disaccharides into simple sugars, particularly glucose. Inhibition of these two enzymes can attenuate the rate of glucose release and absorption following food consumption, thereby preventing glycaemic spikes. Therefore, inhibitors of these enzymes represent compelling therapeutic targets for diabetes management.

Moreover, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is an important regulator of the insulin signaling pathway. Increased activity of this enzyme can reduce insulin sensitivity by decreasing the phosphorylation of proteins involved in insulin signal transduction. Therefore, inhibition of PTP1B may represent a potential strategy for improving insulin signaling and controlling metabolic disorders associated with diabetes.

In recent years, medicinal plants and natural compounds have attracted considerable attention from researchers due to their diverse array of bioactive constituents, including polyphenols and flavonoids. In addition to their antioxidant activity, these compounds may modulate enzymes involved in carbohydrate metabolism and signaling pathways associated with insulin. *Onopordum leptolepis*, known in Persian as Khārpanbeh, belongs to the Asteraceae family and, owing to the presence of phenolic and flavonoid compounds, may possess considerable biological and medicinal potential. Given the importance of identifying new natural resources for diabetes management, simultaneous investigation of the effects of this plant on carbohydrate-digesting enzymes, PTP1B, and β -cell function may provide valuable information.

Objective: The aim of the present study was to investigate the antidiabetic effects of the hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* by evaluating its antioxidant activity; its inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, and PTP1B, and its effects on cell viability, insulin secretion, and the expression of genes associated with β -cell function, including INS I, INS II, IRS-I, IRS-II, and IRS-III.

Materials and Methods: A hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* was prepared, and its antioxidant activity was evaluated using an appropriate free-radical scavenging assay. To investigate the potential capacity of the extract to modulate carbohydrate digestion, the effects of different extract concentrations on the activities of α -amylase and α -glucosidase were examined. Enzyme activity in the presence of the extract was compared against a control group to determine the percentage of enzyme inhibition.

In addition, PTP1B activity was assessed to investigate the effect of different concentrations of the extract on a key regulator of the insulin signaling pathway. A reduction in enzyme activity compared with the control group was used as a measure of inhibitory potency of the extract.

In the cellular part of the study, the pancreatic RIN-5F cell line was used under standard cell culture conditions. Following treatment with different concentrations of the extract, cell viability was evaluated to determine whether the concentrations used exerted any significant adverse effects on cell survival. Subsequently, the effect of the extract on insulin secretion by RIN-5F cells was evaluated to directly investigate its ability to enhance the secretory function of β -cells.

Finally, to investigate molecular changes induced by treatment with the extract, the expression of the INS I, INS II, IRS-I, IRS-II, and IRS-III genes was evaluated. Changes in gene expression following treatment with the extract were compared with those in the control group. All experiments were performed under standard laboratory protocols, and data were analyzed using appropriate statistical methods. A $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The antioxidant activity assessment showed that the hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* exhibited a considerable capacity to reduce free-radical activity. This effect was concentration-dependent, meaning that the ability of the extract to scavenge free radicals increased with increasing extract concentration. This finding may be attributed to the presence of phenolic and flavonoid compounds in the extract, which are established contributors to antioxidant activity. By mitigating oxidative stress—a primary driver of β -cell dysfunction and insulin resistance—these antioxidant properties may contribute to the beneficial metabolic effects of the extract.

Assessment of digestive enzyme activity also revealed that the hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* significantly inhibited α -amylase and α -glucosidase activity ($P \leq 0.05$). Inhibition of these enzymes is expected to reduce the rate of carbohydrate breakdown and consequently decrease the rate of glucose release during digestion. Therefore, the inhibitory effect of the extract on these enzymes may represent one of the possible mechanisms underlying its antidiabetic activity. Furthermore, the results of the PTP1B activity assay demonstrated significant inhibition of this enzyme ($P \leq 0.05$). Given the role of PTP1B in regulating the insulin signaling pathway, PTP1B inhibition may be biologically significant and may potentially contribute to improved insulin signal transduction. The concurrent inhibition of α -amylase, α -glucosidase, and PTP1B suggests that the potential effects of the extract are not limited to a single metabolic pathway.

In the cellular experiments, treatment of RIN-5F cells with the extract demonstrated that the concentrations tested had beneficial effects on β -cell secretory function. Specifically, treatment with concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ resulted in a significant increase in insulin secretion compared with the control group ($P \leq 0.05$). This finding suggests that the *Onopordum leptolepis* extract, in addition to affecting extracellular enzymes and pathways associated with glucose metabolism, may directly influence the secretory function of β -cells.

Gene expression analysis also showed that treatment with the extract significantly upregulated the expression levels of INS I, INS II, IRS-I, IRS-II, and IRS-III compared with the control group ($P \leq 0.05$). Increased expression of insulin-related genes may be associated with an enhanced capacity of β -cells to produce and secrete insulin. On the other hand, changes in the expression of IRS family genes may indicate a potential effect of the extract on molecular components involved in insulin signaling pathway. Collectively, these findings suggest that the effects of the extract may result from the interaction of multiple cellular and molecular mechanisms.

Conclusion: The findings of the present study demonstrate that the hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* possesses a range of biological activities associated with glycemic control. First, the antioxidant activity of the extract and its ability to reduce free-radical activity may be of particular importance. Oxidative stress is associated with cellular damage and impaired β -cell function, and its reduction may contribute to the preservation of normal β -cell function.

Furthermore, inhibition of α -amylase and α -glucosidase indicates that the extract may modulate carbohydrate digestion at the gastrointestinal level. Reducing the activity of these enzymes may decrease the rate at which complex carbohydrates are converted into absorbable

sugars and thereby prevent postprandial glycemic spikes. Such a mechanism is relevant to the management of postprandial hyperglycemia.

Inhibition of PTP1B represents another critical finding. As a negative regulator of the insulin signaling pathway, its inhibition may be instrumental in enhancing cellular responses to insulin. Therefore, the concurrent effects of the extract on digestive enzymes and PTP1B may indicate that the extract may act via multiple pathways to regulate glucose homeostasis.

The data obtained from RIN-5F cells further highlight the extract's impact on β -cell function. The increase in insulin secretion at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$, together with increased expression of the INS I and INS II genes, indicates that the extract may influence β -cell function. Furthermore, increased expression of IRS genes suggests a potential effect on molecular pathways associated with insulin responsiveness.

However, further studies at the protein level, involving cellular signaling pathways and animal models, are necessary to determine the precise mechanisms underlying these effects. Overall, the findings suggest that the potential antidiabetic activity of *Onopordum leptolepis* may result from a combination of antioxidant activity, inhibition of enzymes involved in carbohydrate digestion, inhibition of PTP1B, and enhancement of β -cell function. Given the nature of the experiments performed, the present findings may be considered preliminary evidence of the antidiabetic potential of this plant, and further studies are required to confirm its efficacy and safety.

Based on the findings of the present study, the hydroalcoholic extract of *Onopordum leptolepis* possesses multiple biological activities that may be effective in managing diabetes-related disorders. By reducing free-radical activity and inhibiting α -amylase, α -glucosidase, and PTP1B, the extract affected several important targets involved in glucose regulation. In addition, increased insulin secretion in RIN-5F cells and increased expression of the INS I, INS II, IRS-I, IRS-II, and IRS-III genes indicate a potential effect of the extract on β -cell function and its molecular regulation.

In conclusion, *Onopordum leptolepis* represents a promising natural source for the identification of bioactive compounds with applications in diabetes-related research. Nevertheless, further investigations are warranted to identify the compounds responsible for these activities, elucidate the underlying molecular mechanisms, and evaluate their efficacy and safety in animal models and, ultimately, in human clinical trials.

نقش عصاره هیدروالکلی خارپنبه (*Onopordon leptolepis*) در مهار آنزیم‌های کلیدی دیابت و بهبود عملکرد سلول‌های بتای پانکراس

میترا بختیاری^۱ ID، مونا پژوهی^۲، محمد حسین استحقاری^۳، سیروس جلیلی^{۴*} ID

^۱ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۲ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۳ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۴ مرکز تحقیقات زیست‌شناسی پزشکی، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

زمینه: مهار آنزیم‌های گوارشی مرتبط با هضم کربوهیدرات‌ها و بهبود عملکرد سلول‌های β از اهداف مهم در توسعه داروهای ضد دیابتی است. گیاه *Onopordon leptolepis* (خارپنبه) به دلیل داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، از پتانسیل بالای درمانی برخوردار است. هدف این مطالعه بررسی اثرات مهار عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز و پروتئین تیروزین فسفاتاز B1 (PTP1B) و نیز اثر آن بر زنده‌مانی، ترشح انسولین و بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد سلول‌های β بود.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی گیاه تهیه و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی آن سنجیده شد. اثر عصاره بر فعالیت آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز و PTP1B ارزیابی گردید. رده سلولی RIN-5F در شرایط استاندارد کشت داده شد و اثر عصاره بر زنده‌مانی سلول‌ها، ترشح انسولین و بیان ژن‌های IRS-I، INS II، INS I، IRS-II و IRS-III بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره خارپنبه فعالیت رادیکال‌های آزاد را به‌صورت وابسته به غلظت کاهش داد ($P \leq 0/05$). مهار قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز و PTP1B مشاهده شد ($P \leq 0/05$). عصاره در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر موجب افزایش ترشح انسولین شد ($P \leq 0/05$). همچنین بیان ژن‌های IRS-I، INS II، INS I، IRS-II و IRS-III در پاسخ به عصاره به‌طور معنی‌داری بعد از تیمار افزایش یافت ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی خارپنبه از طریق مهار آنزیم‌های کلیدی تنظیم‌کننده گلوکز، کاهش رادیکال‌های آزاد و تقویت عملکرد و بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های β ، اثرات ضد دیابتی معنی‌داری نشان می‌دهد.

پیام کلیدی: عصاره هیدروالکلی خارپنبه با مهار آنزیم‌های کلیدی، کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت ترشح انسولین، پتانسیل ضد دیابتی نشان داد.

واژگان کلیدی

دیابت
گیاهان دارویی
انسولین
آن‌تی‌اکسیدان
خارپنبه

*نویسنده مسئول

سیروس جلیلی

cjalili@kums.ac.com

کد اخلاق

IR.KUMS.MED.REC.1402.2337



دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۰۸
پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۴

مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از مهم‌ترین اختلالات متابولیک شایع در جهان است که شیوع آن با افزایش سن، تغییر الگوی تغذیه و افزایش چاقی روندی صعودی یافته است (۱). این بیماری با هیپرگلیسمی مزمن ناشی از اختلال در ترشح انسولین، عملکرد آن یا هر دو مشخص می‌شود و می‌تواند منجر به عوارض میکروواسکولار و ماکروواسکولار از جمله نوروپاتی، رتینوپاتی، نفروپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی گردد (۲). مطالعات نشان داده‌اند که افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز دیابت و بروز عوارض آن دارد (۳). از سوی دیگر، مهار آنزیم‌های گوارشی از جمله α -آمیلاز و α -گلوکوزیداز که در هضم کربوهیدرات‌ها دخالت دارند، یکی از راهکارهای مؤثر برای کنترل قند خون پس از غذا است (۴). افزون بر این، آنزیم پروتئین تیروزین فسفاتاز B1 (PTP1B) به‌عنوان یک مهارکننده مسیر سیگنالینگ انسولین شناخته می‌شود و مهار آن می‌تواند به بهبود حساسیت سلول‌ها به انسولین کمک کند (۵).

تمرکز بر داروهای گیاهی دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به‌عنوان گزینه‌هایی با سمیت کمتر و کارایی بالا طی سال‌های اخیر افزایش یافته است (۶). یکی از گیاهان بومی ایران که به‌طور سنتی در طب عامیانه استفاده می‌شود، خارپنبه (*Onopordon leptolepis*) است که گونه‌ای از جنس *Onopordon* از خانواده کاسنیان (Asteraceae) است که به گروه گیاهان موسوم به خارپنبه تعلق دارد. خارپنبه گیاهی است یک تا دو ساله که در کشورهای ایران و آذربایجان گسترش دارد. برگ‌های آن سبز تیره و به شکل پیر با حاشیه‌های پوشیده از خار است. گرچه برگ‌های آن مصرف دارویی دارد، اما قسمتی از گیاه که در طب سنتی بر دیابت تأثیر می‌گذارد، میوه آن است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این گیاه دارای

خواص آنتی‌اکسیدانی (۷)، ضدباکتریایی (۸) و ضدتوموری (۹) بوده و ترکیبات فعال متعددی در آن شناسایی شده‌اند. با وجود این، شواهد علمی در مورد اثرات ضد دیابتی آن محدود است (۹) و نیاز به بررسی دقیق‌تری وجود دارد.

از آنجا که مهار آنزیم‌های گوارشی، کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت عملکرد سلول‌های β پانکراس از اهداف اصلی درمان دیابت محسوب می‌شوند، بررسی اثرات این گیاه می‌تواند افق‌های جدیدی در توسعه درمان‌های گیاهی و ایمن‌تر برای کنترل دیابت فراهم کند. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر فعالیت آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز و PTP1B و نیز ارزیابی اثر آن بر زنده‌مانی، ترشح انسولین و بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد سلول‌های β در مدل سلولی RIN-5F انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه

این پژوهش یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی (In vitro) است که با هدف بررسی اثرات ضد دیابتی عصاره هیدروالکلی گیاه خارپنبه (*Onopordon leptolepis*) انجام شد. پژوهش فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد ۴۰۴۰۴۳۸ است که در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. کد اخلاق طرح ۲۳۷. ۱۴۰۲. IR.KUMS.MED.REC می‌باشد.

تهیه گیاه و استخراج عصاره

بخش‌های هوایی گیاه در اردیبهشت ۱۴۰۳ از مناطق بومی استان کرمانشاه جمع‌آوری و توسط گیاه‌شناس تأیید و شناسایی شد. قسمت‌های هوایی گیاه در سایه خشک و پودر شدند. برای تهیه عصاره، ۱۰ گرم از پودر گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد

(Merck) حل شده و مخلوط به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار گرفت. سپس، محلول از طریق کاغذ فیلتر (واتمن، درجه ۴۲) فیلتر و خشک شد تا امکان تبخیر الکل در دمای اتاق فراهم شود. سرانجام، پودر بدست آمده در محیط کشت بدون سرم حل شد و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور کرد (۱۰).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی

در آزمون DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) و ۲ غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر از عصاره با محلول DPPH (sigma aldrich) (۱۰۰ میکرومولار) مخلوط و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۱). در آزمون 2,2'-azino-bis (ABTS) یک میلی‌لیتر از عصاره (غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) با ۳ میلی‌لیتر محلول کاری ABTS (sigma aldrich) مخلوط و ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. جذب در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد (۱۲).

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

برای سنجش فعالیت آنزیم- α آمیلاز، ۱۲۵ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های مختلف با ۱۲۵ میکرولیتر آنزیم- α آمیلاز (۳ واحد/ میلی‌لیتر) مخلوط و ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس ۱۲۵ میکرولیتر نشاسته ۲ درصد افزوده شد و ۳۰ دقیقه واکنش ادامه یافت. واکنش با dinitrosalicylic acid (sigma aldrich) متوقف و جذب در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۳). برای سنجش فعالیت آنزیم- α گلوکوزیداز، ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم با ۶۰ میکرولیتر عصاره مخلوط و ۱۸ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر 4-Nitrophenyl β -D-glucuronide (sigma aldrich) acid افزوده و پس از ۲۵ دقیقه واکنش با Na_2CO_3 متوقف شد. جذب در ۴۰۵ نانومتر ثبت گردید (۱۳). همچنین سنجش مهار (PTP1B) نمونه‌ها تعیین شد (۱۴).

کشت سلول‌های RIN-5F و سنجش زنده مانی

سلول‌های بتای پانکراس (RIN-5F) در محیط RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول‌ها با تراکم ۱۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شدند. پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر)، محلول MTT (sigma aldrich) افزوده و ۴ ساعت انکوبه شد. بلورهای فورمازان با dimethyl sulfoxide (sigma aldrich) حل و جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵). سلول‌های گروه کنترل محیط کشت فاقد عصاره دریافت کردند. درصد زنده‌مانی نسبت به کنترل محاسبه شد.

اندازه‌گیری ترشح انسولین

سلول‌ها پس از شستشو با بافر Krebs-Ringer Bicarbonate (Merck)، به مدت ۱ ساعت در محیط حاوی ۲۰ میلی‌مولار گلوکز همراه با عصاره (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سوپرناتانت جمع‌آوری و غلظت انسولین با کیت (Abcam, Cambridge, UK)، insulin ELISA kit (Ab100578) سنجیده شد (۱۶). میزان انسولین ترشح شده از مقادیر جذب اندازه‌گیری شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از منحنی کالیبراسیون ارائه شده توسط کیت تعیین شد.

استخراج RNA و بررسی بیان ژن

RNA از سلول‌ها بعد از تیمار با استفاده از کیت جداسازی RNA کل (DENAzist, Tehran, Iran) استخراج شد. سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت (Vivantis, Selangor DE, Malaysia)، Technologies انجام شد. گلیسرآلدئید ۳- فسفات

دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی (ژن) رفرنس) در نظر گرفته شد و تغییر برابر در بیان نسبی هر mRNA هدف بر اساس روش مقایسه‌ای $Ct (2^{-\Delta\Delta Ct})$ محاسبه شد. شرایط چرخه حرارتی به شرح زیر بود: ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای سنتز cDNA، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، و به دنبال آن ۴۰ سیکل ۱۵ ثانیه‌ای در

دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره کردن DNA، و ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و گسترش الگو Real-time PCR با استفاده از SYBR Premix Ex Taq Technology (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) انجام شد. توالی پرایمر به شرح زیر بود:

5'- TGGACATCACAGCAGAATGAAGA -3' and 5'- GACGTGAGGTCCTGGTTGTG -3' for IRS-1;
5'- CACAGTCGTGAAAGAGTGAAGC -3' and 5'- CGTTGGTCGAAACATGCC -3' for IRS-2;
5'-GGCCCCACAGTCTCTCCGG-3' and 5'-GCCTCTTGGGGACTGAAAC-3' for IRS-3;
5'-CGTGGCTTCTTCTACACACCCA-3' and 5'-TGCAGCACTGATCCACAATGCC-3' for INS 1;
5'-CGTGGCTTCTTCTACACACCCA-3' and 5'-TCCAGTGCCAAGGTCTGAAGGT-3' for INS 2;
5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' and 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG-3' for GAPDH.

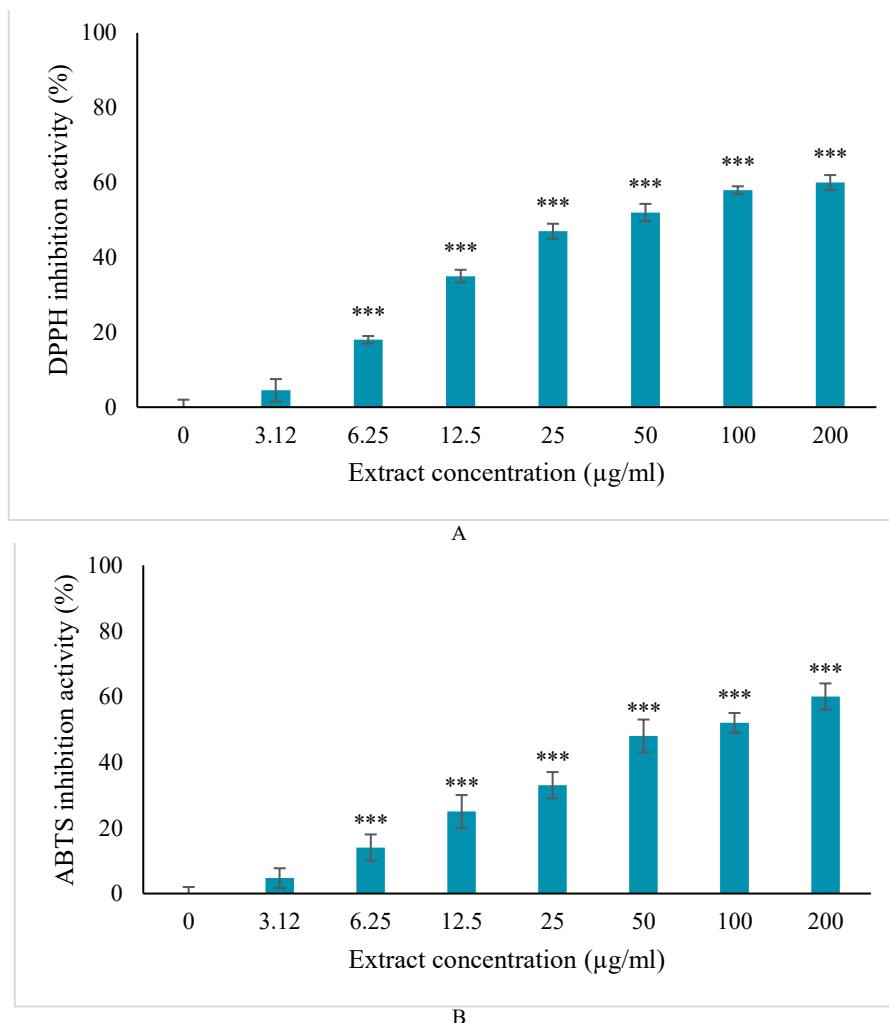
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه سنجش‌ها در سه تکرار در زمان‌های مستقل و در هر بار سه تکرار همزمان انجام شد. به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد. سطح معنی‌داری تست‌های آماری در مورد همه‌ی تست‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شدند. از آزمون t-test و One-way Anova و تست تعقیبی (Tukey) استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از تست کولموگروف- اسمیرنوف سنجیده شد.

یافته‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خارپنبه

نتایج آزمون‌های DPPH و ABTS نشان داد که عصاره هیدروالکلی خارپنبه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است. هر دو آزمون کاهش معنی‌دار فعالیت رادیکال‌های آزاد را به صورت وابسته به غلظت نشان دادند ($P \leq 0/05$) (شکل A و B). میزان IC50 عصاره ۶/۵۰ $\pm$ ۷۳/۸۲ و ۴۹/۱۲ $\pm$ ۴/۴۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر به ترتیب برای آزمون‌های DPPH و ABTS بود.



شکل ۱. اثر عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمون‌های (A) ABTS و (B) DPPH در غلظت‌های مختلف. مهار رادیکال‌های آزاد به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) از سه آزمایش مستقل ارائه شده‌اند. *** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.001$) می‌باشد.

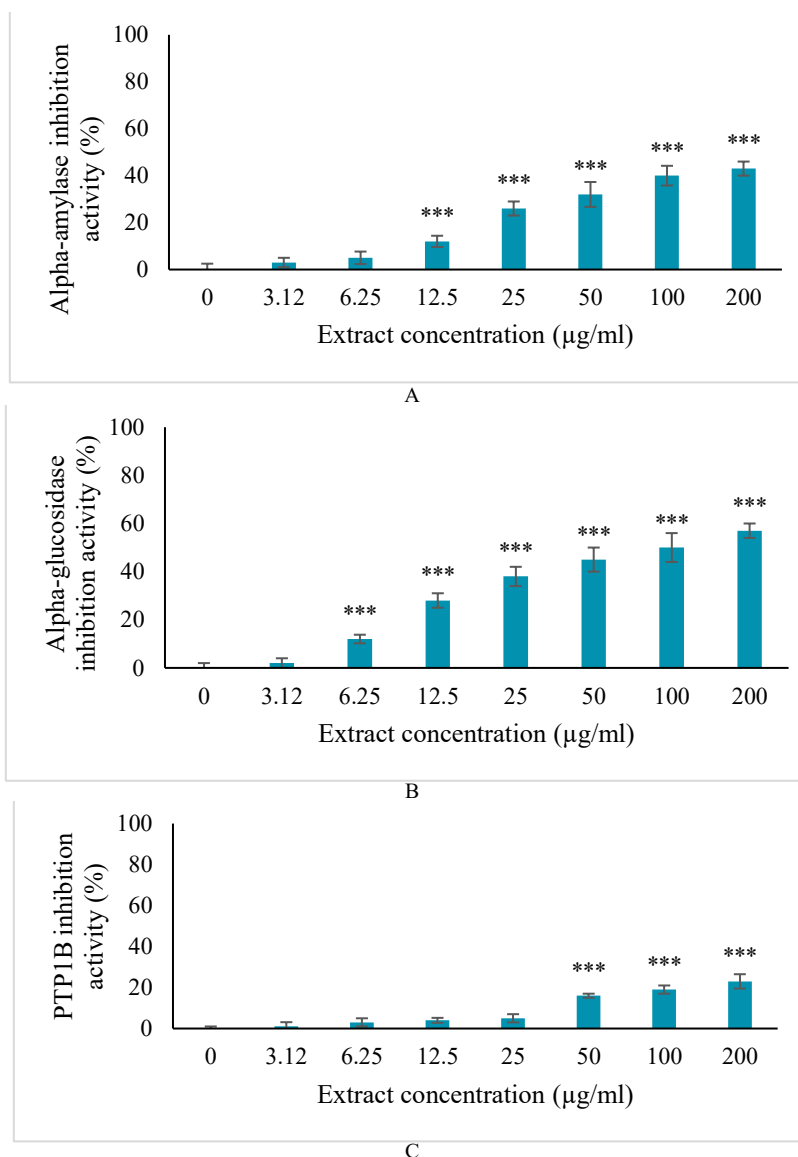
Fig 1. Effect of the hydroalcoholic extract of *Onopordon leptolepis* on antioxidant activity as assessed by (A) ABTS and (B) DPPH assays at different concentrations. Free-radical scavenging activity increased in a concentration-dependent manner. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD) from three independent experiments. *** indicates a statistically significant difference compared with the control group ($P < 0.001$).

اثر عصاره بر فعالیت آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم α -آمیلاز در حضور عصاره خارپنبه مهار شد، این مهار ماهیت وابسته به غلظت داشت و در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$) (شکل ۲).

عصاره گیاه توانست فعالیت آنزیم α -گلوکوزیداز را نیز به شکل معنی‌داری در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش دهد ($P \leq 0.05$) (شکل ۲) همچنین بررسی‌ها نشان داد

عصاره خارپنبه در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قادر است فعالیت آنزیم PTP1B را نیز به طور معنی‌داری مهار کند ($P \leq 0.05$) (شکل ۲). میزان IC₅₀ عصاره 278.25 ± 3.39 ، 271.29 ± 11.29 و 157.62 ± 15.33 میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب برای آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز و PTP1B بود. (شکل ۲ A-C).



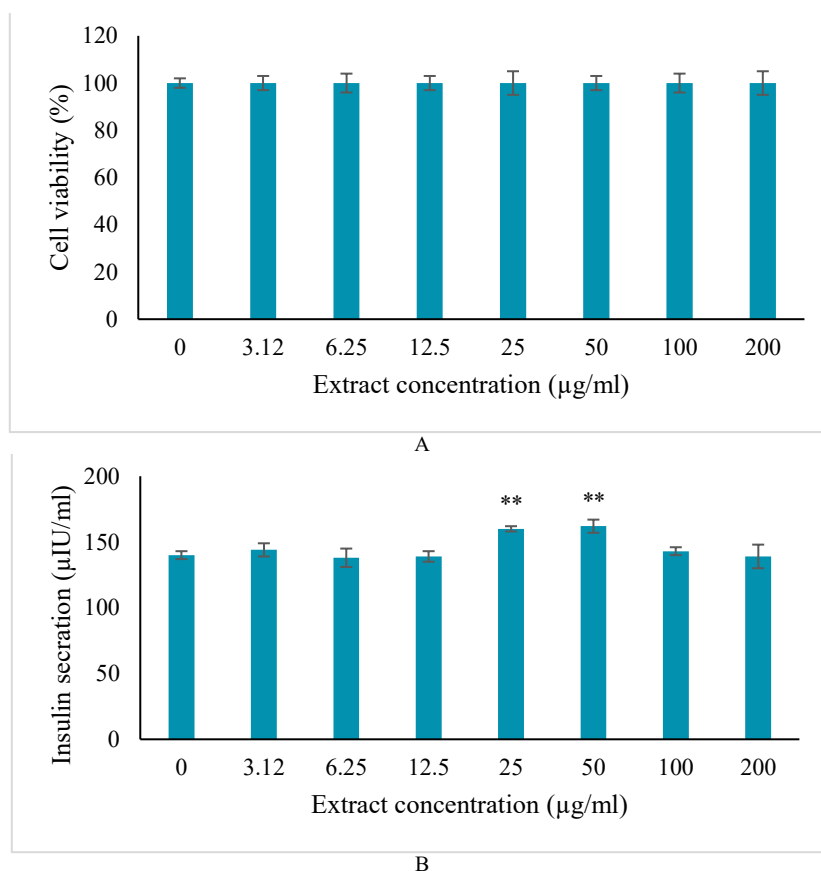
شکل ۲. اثر عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر فعالیت آنزیم های (A) α -آمیلاز، (B) α -گلوکوزیداز، و (C) PTP1B در غلظت های مختلف. مهار فعالیت به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) از سه آزمایش مستقل ارائه شده اند. *** نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($P<0.001$) می باشد.

Fig 2. Effect of the hydroalcoholic extract of *Onopordon leptolepis* on the activity of (A) α -amylase, (B) α -glucosidase, and (C) PTP1B at different concentrations. Enzyme inhibition increased in a concentration-dependent manner. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD) from three independent experiments. *** indicates a statistically significant difference compared with the control group ($P<0.001$).

سمیت قابل توجهی بر سلول های β پانکراس در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمی کند ($P\geq 0.05$) (شکل ۳ A).

اثر عصاره بر زندهمانی سلول های RIN-5F

ارزیابی زندهمانی سلول ها با آزمون MTT نشان داد که عصاره در غلظت های زیر ۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر



شکل ۳. اثر عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر (A) زنده مانی و (B) ترشح انسولین سلول های RIN-5F در غلظت های مختلف. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) از سه آزمایش مستقل ارائه شده اند. *** نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل می باشد. ($P < 0.001$)

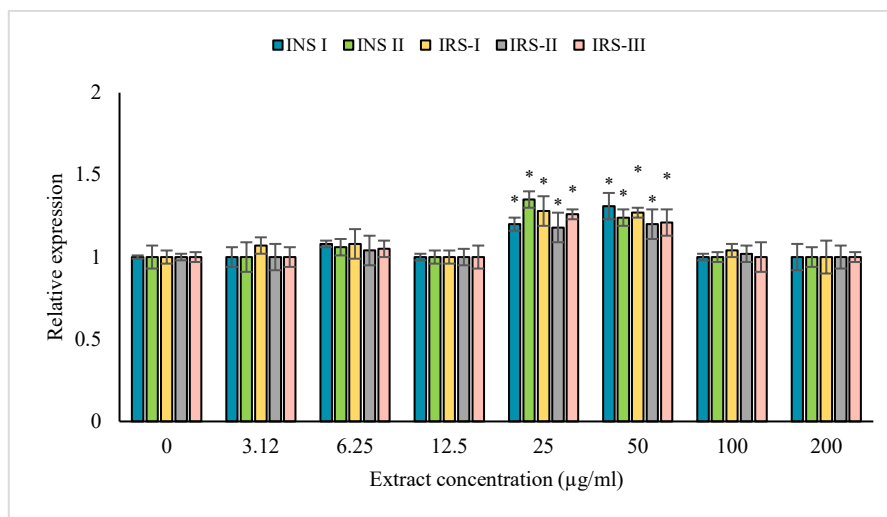
Fig 3. Effect of the hydroalcoholic extract of *Onopordon leptolepis* on (A) cell viability and (B) insulin secretion in RIN-5F cells at different concentrations. Data are presented as mean ± standard deviation (Mean ± SD) from three independent experiments. *** indicates a statistically significant difference compared with the control group ($P < 0.001$).

اثر عصاره بر بیان ژن های INS و IRS

بررسی بیان ژن با Real-time PCR نشان داد که تیمار سلول ها با غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر عصاره باعث افزایش معنی دار بیان ژن های INS I و INS II (مرتبط با سنتز انسولین) و IRS-I، IRS-II و IRS-III (مرتبط با مسیر سیگنالینگ انسولین) شد. افزایش بیان ژن ها در مقایسه با گروه کنترل با معنی داری آماری همراه بود ($P \leq 0.05$) (شکل ۴).

اثر عصاره بر ترشح انسولین

نتایج آزمون ELISA نشان داد عصاره خارپنبه در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر موجب افزایش معنی دار ترشح انسولین از سلول های RIN-5F در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P \leq 0.05$) (شکل ۳ B).



شکل ۴. اثر عصاره هیدروالکلی خارپنبه بر بیان ژن‌های INS I، INS II، IRS-I، IRS-II، IRS-III و RIN-5F در سلول‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) از سه آزمایش مستقل ارائه شده‌اند. ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.05$) می‌باشد.

Fig 4. Effect of the hydroalcoholic extract of *Onopordon leptolepis* on the expression of the INS I, INS II, IRS-I, IRS-II, and IRS-III genes in RIN-5F cells at different concentrations. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD) from three independent experiments. ** indicates a statistically significant difference compared with the control group ($P < 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی خارپنبه دارای اثرات چندجانبه ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی است، که این اثرات به احتمال زیاد ناشی از حضور ترکیبات زیست‌فعال با مکانیسم‌های مکمل می‌باشد. مهار وابسته به غلظت رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بیانگر ظرفیت بالای عصاره در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش استرس اکسیداتیو است. از آنجا که استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در تخریب سلول‌های β پانکراس و پیشرفت دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند، این خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی اثرات محافظتی عصاره خارپنبه باشد. این یافته‌ها با گزارش‌های پیشین درباره نقش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در مهار رادیکال‌های آزاد در گیاهان دارویی همخوانی دارد (۱۷). از سوی دیگر، مهار معنی‌دار آنزیم‌های α -آمیلاز و α -گلوکوزیداز توسط عصاره نشان می‌دهد که خارپنبه

قادر است جذب گلوکز پس از غذا را از طریق کاهش هضم کربوهیدرات‌ها تعدیل کند. این مکانیسم مشابه عملکرد داروهای مهارکننده این آنزیم‌ها مانند آکاربوز است، با این تفاوت که عصاره گیاهی می‌تواند با عوارض جانبی کمتر همراه باشد. برهم‌کنش ترکیبات فعال عصاره با جایگاه فعال آنزیم‌ها و ایجاد مانع فضایی برای اتصال سوبسترا، به عنوان مکانیسم احتمالی این اثر مطرح است. یافته‌های حاضر با مطالعات انجام‌شده روی گیاهانی نظیر چای سبز و سالویا که اثرات مهاری مشابهی بر آنزیم‌های گوارشی نشان داده‌اند، هم‌راستا می‌باشد (۱۸ و ۱۹).

یکی از یافته‌های قابل توجه این مطالعه، مهار فعالیت آنزیم PTP1B توسط عصاره خارپنبه بود. این آنزیم به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی مسیر سیگنالینگ انسولین شناخته می‌شود و افزایش فعالیت آن با بروز مقاومت به انسولین مرتبط است. بنابراین، مهار PTP1B می‌تواند منجر به بهبود پاسخ سلولی به

انسولین و افزایش برداشت گلوکز شود. همخوانی این نتایج با مطالعات پیشین که مهار PTP1B توسط ترکیبات طبیعی را به عنوان یک استراتژی نوین در درمان دیابت نوع ۲ معرفی کرده‌اند، اهمیت این یافته را تقویت می‌کند (۲۰ و ۲۱).

در بررسی‌های سلولی، عصاره خارپنبه تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر سمیت قابل توجهی بر سلول‌های β پانکراسی RIN-5F نشان نداد که بیانگر ایمنی نسبی آن در شرایط آزمایشگاهی است. علاوه بر این، افزایش معنی‌دار ترشح انسولین در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نشان می‌دهد که عصاره می‌تواند عملکرد ترشحی سلول‌های β را بهبود بخشد. این اثر ممکن است از طریق کاهش آسیب اکسیداتیو به سلول‌ها یا تحریک مستقیم مسیرهای سیگنالینگ دخیل در ترشح انسولین اعمال شود. افزایش بیان ژن‌های INS I، INS II، IRS-I، IRS-II و IRS-III نیز مؤید آن است که عصاره خارپنبه علاوه بر اثرات آنزیمی، در سطح مولکولی و تنظیم بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با عملکرد انسولین نقش دارد.

افزایش بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد و سیگنالینگ انسولین، شامل INS I و INS II به عنوان ژن‌های اصلی کدکننده انسولین، نشان می‌دهد که عصاره خارپنبه می‌تواند مستقیماً بر ظرفیت سنتز و ترشح انسولین در سلول‌های β پانکراسی اثرگذار باشد. از سوی دیگر، افزایش بیان ژن‌های IRS-I، IRS-II و IRS-III که نقش کلیدی در انتقال پیام انسولین از گیرنده به مسیرهای پایین‌دستی مانند PI3K/Akt دارند (۲۲)، حاکی از بهبود کارایی مسیر سیگنالینگ انسولین در سطح سلولی است. اختلال در بیان یا عملکرد این ژن‌ها با بروز مقاومت به انسولین و کاهش برداشت گلوکز در بافت‌های هدف مرتبط است؛ بنابراین، تنظیم افزایشی این ژن‌ها توسط عصاره خارپنبه می‌تواند به بهبود حساسیت به انسولین و حفظ هم‌ایستایی گلوکز کمک کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثرات

ضد دیابتی عصاره محدود به مهار آنزیم‌های گوارشی یا کاهش استرس اکسیداتیو نبوده، بلکه در سطح مولکولی نیز قادر به تقویت عملکرد سلول‌های β و مسیرهای سیگنالینگ انسولین است، که این امر پتانسیل درمانی عصاره را به عنوان یک عامل چندهدفه ضد دیابت برجسته می‌سازد.

در راستای مقایسه نتایج این مطالعه با پژوهش‌های پیشین، گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهان دارویی غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی قابل توجهی هستند. برای مثال، چای سبز (*Camellia sinensis*) (۲۳) و سالویا (*Salvia officinalis*) (۲۴) نشان داده‌اند که از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو می‌توانند سلول‌های β پانکراس را محافظت کنند؛ یافته‌ای که با مهار DPPH و ABTS مشاهده شده در عصاره خارپنبه (*Onopordon leptolepis*) همخوانی دارد. همچنین، عصاره‌های گیاهی مانند زنجبیل (*Zingiber officinale*) قادر به مهار آنزیم‌های α -آمیلاز و α -گلوکوزیداز بوده و افزایش قند خون پس از غذا را کاهش می‌دهند (۲۵)، که این مکانیسم با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در زمینه مهار PTP1B، ترکیبات طبیعی موجود در چای سبز و سالویا نیز اثرات مشابهی نشان داده‌اند، و یافته‌های این پژوهش شواهد قبلی را تقویت می‌کند. در مجموع، همسویی نتایج عصاره خارپنبه با یافته‌های گیاهان دارویی دیگر، نشان‌دهنده پتانسیل چندهدفه این گیاه در کنترل دیابت و بهبود عملکرد سلول‌های β است.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره خارپنبه از طریق مکانیسم‌های چندگانه شامل کاهش استرس اکسیداتیو، مهار آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات، مهار PTP1B و تقویت بیان ژن‌های مرتبط با سیگنالینگ انسولین، می‌تواند به بهبود عملکرد سلول‌های β پانکراس و کنترل قند

خون کمک کند. چنین رویکرد چندهدفه‌ای، خارپنبه را به گزینه‌ای امیدوارکننده در توسعه درمان‌های گیاهی ضد دیابت تبدیل می‌کند.

با این حال، از آنجا که این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و مدل سلولی انجام شده است، تعمیم نتایج به شرایط بالینی با محدودیت‌هایی همراه است. انجام مطالعات حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی برای تأیید اثربخشی، تعیین دوز ایمن و بررسی سمیت طولانی‌مدت عصاره ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، شناسایی و جداسازی ترکیبات فعال مسئول این اثرات می‌تواند زمینه‌ساز توسعه فرآورده‌های دارویی یا مکمل‌های گیاهی استاندارد بر پایه خارپنبه باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی خارپنبه دارای پتانسیل قابل توجهی برای بهبود شاخص‌های مرتبط با دیابت نوع ۲ است. این عصاره توانست رادیکال‌های آزاد را به‌طور مؤثری مهار کند، فعالیت آنزیم‌های α -آمیلاز، α -گلوکوزیداز

و PTP1B را کاهش دهد و بدون ایجاد سمیت سلولی قابل توجه، موجب افزایش ترشح انسولین و تقویت بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد سلول‌های β گردد. چنین تأثیرات چندگانه‌ای احتمالاً نشان می‌دهد که خارپنبه می‌تواند از طریق مسیرهای مختلف، از جمله کنترل هضم کربوهیدرات‌ها، بهبود سیگنالینگ انسولین و کاهش استرس اکسیداتیو، در مدیریت دیابت مفید واقع شود. به‌طور کلی، یافته‌ها حاکی از آن است که عصاره خارپنبه می‌تواند به‌عنوان یک گزینه امیدوارکننده در توسعه فرآورده‌های گیاهی ضد دیابتی مطرح شود. با این حال، جهت تأیید این اثرات و تعیین دوز ایمن و مؤثر، انجام مطالعات حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی ضروری است.

دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه حامی مالی این مطالعه می‌باشد (کد ۴۰۴۰۴۳۸). کد اخلاق IR.KUMS.MED.REC. ۱۴۰۲.۲۳۷ می‌باشد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Ruze R, Liu T, Zou X, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023; 14: 1161521. [10.3389/fendo.2023.1161521](https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521)
2. Iwasaki H, Yagyu H, Shimano H. A Comprehensive Analysis of Diabetic Complications and Advances in Management Strategies. *J Atheroscler Thromb* 2025; 32(5): 550-559. [10.5551/jat.65551](https://doi.org/10.5551/jat.65551)
3. Caturano A, D'Angelo M, Mormone A, et al. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Curr Issues Mol Biol* 2023; 45(8): 6651-6666. [10.3390/cimb45080420](https://doi.org/10.3390/cimb45080420)
4. Gong L, Feng D, Wang T, et al. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. *Food Sci Nutr* 2020; 8(12): 6320-6337. [10.1002/fsn3.1987](https://doi.org/10.1002/fsn3.1987)
5. Zhang X, Tian J, Li J, et al. A novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor with therapeutic potential for insulin resistance. *Br J Pharmacol* 2016; 173(12): 1939-1949. [10.1111/bph.13483](https://doi.org/10.1111/bph.13483)
6. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants-Natural Health Products for Human Health. *Molecules* 2023; 28(4): 1845. [10.3390/molecules28041845](https://doi.org/10.3390/molecules28041845)
7. Valizadeh E, Zonouz NF, Zand A, et al. Evaluation of antioxidant potentials of extracts of cotton thistle ('Onopordum leptolepis' DC.) obtained by various solvents. *Australian Journal of Crop Scienc.* 2011; 5(10): 1163-1166. https://www.cropj.com/shahbazi_5_10_2011_1163_1166.pdf
8. Zare K, Nazemyeh H, Lotfipour F, et al. Antibacterial Activity and Total Phenolic Content of the Onopordum acanthium L. Seeds. *Pharm Sci* 2014; 20(1): 6-11.

- https://ps.tbzmed.ac.ir/Article/PHARM_1706_20140421134508
9. Mirzaei N, Mokhtari B, Kolahi M. Evaluation of phytochemical and anticancer properties of cotton thistle (*Onopordon leptolepis* DC.) extract on the survival of CACO2 cancer cells. *SJKU* 2018; 23(2): 57-69. [10.29252/sjku.23.2.57](https://doi.org/10.29252/sjku.23.2.57)
 10. Taghadosi M, Pazhouhi M, Shahveisi K, et al. Effect of Hydroalcoholic Extract of Prosopis Farcta Fruit on the Toxicity Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cell Line In Vitro. *J North Khorasan Univ Med Sci* 2024; 16(1): 44-53. (Persian) [10.32592/nkums.16.1.44](https://doi.org/10.32592/nkums.16.1.44)
 11. Rajabian A, Hassanzadeh Khayyat M, Emami SA, et al. Phytochemical Evaluation and Antioxidant Activity of Essential Oil, and Aqueous and Organic Extracts of *Artemisia dracuncululus*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2016; 12(1): e32325. [10.5812/jjnpp.32325](https://doi.org/10.5812/jjnpp.32325)
 12. Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, et al. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* 2020; 9(8): 709. [10.3390/antiox9080709](https://doi.org/10.3390/antiox9080709)
 13. Frumuzachi O, Nicolescu A, Babota M, et al. D-Optimal Design-Based Ultrasound-Assisted Extraction Optimization and Extensive Bio-Structural Analysis of Phenolic Compounds from Romanian Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Genotypes. *Food Bioprocess Technol* 2025; 18(9): 7915-7932. [10.1007/s11947-025-03914-6](https://doi.org/10.1007/s11947-025-03914-6)
 14. Paudel P, Yu T, Seong SH, et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition and Glucose Uptake Potentials of Mulberrofuran G, Albanol B, and Kuwanon G from Root Bark of *Morus alba* L. in Insulin-Resistant HepG2 Cells: An In Vitro and In Silico Study. *Int J Mol Sci* 2018; 19(5): 1542. [10.3390/ijms19051542](https://doi.org/10.3390/ijms19051542)
 15. Keshavarz G, Jalili C, Pazhouhi M, et al. Resveratrol Effect on Adipose-Derived Stem Cells Differentiation to Chondrocyte in Three-Dimensional Culture. *Adv Pharm Bull* 2020; 10(1): 88-96. [10.15171/apb.2020.011](https://doi.org/10.15171/apb.2020.011)
 16. Khazaei M, Pazhouhi M. Protective effect of hydroalcoholic extracts of *Trifolium pratense* L. on pancreatic β cell line (RIN-5F) against cytotoxicity of streptozotocin. *Res Pharm Sci* 2018; 13(4): 324-331. [10.4103/1735-5362.235159](https://doi.org/10.4103/1735-5362.235159)
 17. Tungmunthum D, Thongboonyou A, Pholboon A, et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines (Basel)* 2018; 5(3): 93. [10.3390/medicines5030093](https://doi.org/10.3390/medicines5030093)
 18. Yilmazer-Musa M, Griffith AM, Michels AJ, et al. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. *J Agric Food Chem* 2012; 60(36): 8924-8929. [10.1021/jf301147n](https://doi.org/10.1021/jf301147n)
 19. Mahdi S, Azzi R, Lahfa FB. Evaluation of in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential and hemolytic effect of phenolic enriched fractions of the aerial part of *Salvia officinalis* L. *Diabetes Metab Syndr* 2020; 14(4): 689-694. [10.1016/j.dsx.2020.05.002](https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.05.002)
 20. Datta R, Mukherjee D, Podolsky MJ, et al. PTP1B mediates the inhibitory effect of MFGE8 on insulin signaling through the β 5 integrin. *J Biol Chem*. 2024; 300(2): 105631. [10.1016/j.jbc.2024.105631](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105631)
 21. Jiang CS, Liang LF, Guo YW. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(10): 1217-1245. [10.1038/aps.2012.90](https://doi.org/10.1038/aps.2012.90)
 22. Guo S. Molecular Basis of Insulin Resistance: The Role of IRS and Foxo1 in the Control of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Drug Discov Today Dis Mech* 2013; 10(1-2): e27-e33. [10.1016/j.ddmec.2013.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2013.06.003)
 23. Koonyosying P, Uthapibull C, Fucharoen S, et al. Decrement in Cellular Iron and Reactive Oxygen Species, and Improvement of Insulin Secretion in a Pancreatic Cell Line Using Green Tea Extract. *Pancreas* 2019; 48(5): 636-643. [10.1097/MPA.0000000000001320](https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001320)
 24. Ashkani-Esfahani S, Noorafshan A, Ebrahimi A, et al. *Salvia officinalis* Protects Pancreatic Beta-cells Against Streptozotocin-Induced Damage; A Stereological Study. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2021; 17(1): e109906. [10.5812/jjnpp.109906](https://doi.org/10.5812/jjnpp.109906)
 25. Rani MP, Padmakumari KP, Sankarikutty B, et al. Inhibitory potential of ginger extracts against enzymes linked to type 2 diabetes, inflammation and induced oxidative stress. *Int J Food Sci Nutr* 2011; 62(2): 106-110. [10.3109/09637486.2010.515565](https://doi.org/10.3109/09637486.2010.515565)