عصاره آبی کندر بیان ژن Camk4 را در رده‌های سلولی PC12 و B65 افزایش می‌دهد

آسیه جبلی [۱](Ph.D)، محمد خلج کندری [۱*](Ph.D)، مرتضی بنیادی [۱](Ph.D)، محمدعلی حسینپور فیضی [۱](Ph.D)، محمد رحمتی یامچی [۲](Ph.D)

۱- گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

هدف: مهم‌ترین تأثیرات کندر در ارتباط با حافظه عبارت است از پیشگیری یا بهبود بیماری آلزایمر و نیز تقویت حافظه زاده‌های رت‌هایی که در دوران بارداری و شیردهی کندر دریافت کرده‌اند. ژن *Camk4* یکی از ژن‌های مهم حافظه می‌باشد که با فسفریلاسیون و فعال‌کردن فاکتورهای رونویسی بیان ژن‌های پایین‌دست حافظه را القا می‌کند. بر این اساس، هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در بیان ژن *Camk4* در دو رده سلولی PC12 و B65 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تأثیر عصاره بر زیستایی سلول‌ها با تیمار سلول‌ها در دو بازه زمانی و ۶ غلظت مختلف عصاره بررسی شد و غلظت مهاری ۵۰ درصد به دست آمد. برای مطالعات بیان ژن، سلول‌ها با دو غلظت عصاره در دو بازه زمانی تیمار شدند. سپس RNA سلولی استخراج شده و به cDNA تبدیل شد. در نهایت، واکنش qPCR جهت بررسی بیان ژن *Camk4* در سلول‌ها انجام شد.

یافته‌ها: عصاره آبی کندر زیستایی سلول‌ها را در یک الگوی وابسته به زمان و غلظت کاهش داد. با این وجود، سمیت عصاره برای رده سلولی B65 بیش‌تر از PC12 بود. هم‌چنین، عصاره کندر توانست بیان ژن *Camk4* را به‌طور قابل‌توجهی در سلول‌ها افزایش دهد. با این وجود، این افزایش وابسته به غلظت و نوع سلول بود و بیان ژن *Camk4* در غلظت کم عصاره و در رده سلولی PC12 بیش‌تر و سریع‌تر از B65 افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کندر در یک الگوی وابسته به غلظت می‌تواند بیان ژن *Camk4* را تنظیم کند. با این وجود، به مطالعات تکمیلی بیش‌تری جهت شناسایی مکانیسم‌های عمل کندر در سلول‌های مختلف نیاز است.

واژه‌های کلیدی: کندر، حافظه، ژن *Camk4*، رده سلولی PC12

مقدمه

طب مدرن مبتنی بر شواهد و استفاده از ترکیبات شیمیایی با ساختارهای کاملاً مشخص می‌باشد. با این‌وجود، این طب علم جدیدی بوده و قدمت آن تنها به یک قرن می‌رسد. در مقابل، طب سنتی که در آن از گیاهان متنوع در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود، از هزاران سال پیش کاربرد داشته است. به همین دلیل، امروزه باوجود پیشرفت در طب مدرن و کشف داروهای شیمیایی جدید هم‌چنان از طب سنتی حتی در کشورهای پیشرفته در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود [۱]. کندر با نام علمی Frankincense از جمله

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۳۵۱۱۲۴

Email: khalaj@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۲

گیاهانی است که از دیرباز در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد داشته است. صمغ کندر از تراشیدن تنه گیاهان جنس *بوسولیا (Boswellia)* حاصل می‌شود. این جنس در حدود ۲۰ گونه دارد که هر کدام گستره جغرافیایی متفاوتی دارند [۲]. صمغ کندر از سالیان دور جهت درمان درد، تب، بیماری‌های تنفسی و گوارشی و به‌عنوان ضدالتهاب، ضدتومور و ضدرماتیسم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳-۸]. در کنار تأثیرات درمانی کندر در بیماری‌های مختلف، اهمیت آن در حافظه نیز از دیرباز مورد بررسی قرار گرفته است. کندر در قرن دوم برای درمان جنون و در قرن یازدهم برای درمان هذیان و فراموشی استفاده می‌شد [۹،۱۰]. علاوه بر این، کندر در طب سنتی هند به‌عنوان تقویت‌کننده سیستم عصبی کاربرد دارد [۱۱]. مطالعات سال‌های اخیر نیز تأثیر مثبت کندر را در تقویت حافظه تائید می‌کنند. توانایی یادگیری در جانوران مبتلا به صرع و بهبود حافظه فضایی در رت‌ها با مصرف کندر افزایش می‌یابد [۱۲،۱۳]. عصاره آبی کندر منجر به تقویت حافظه بلندمدت زاده‌های رت‌های دریافت‌کننده کندر در دوران بارداری و شیردهی می‌شود [۱۴،۱۵]. محافظت در برابر آسیب‌های عصبی-مغزی و پیشگیری یا بهبودی شرایط حاد بیماری آلزایمر از دیگر تأثیرات مؤثر کندر می‌باشد [۱۶-۱۸]. در کنار مطالعات فیزیولوژیکی، مطالعات مولکولی نیز نشان می‌دهند که کندر می‌تواند بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای مولکولی حافظه، ژن پیش‌ساز آمیلوئید و BDNF، را تنظیم کند [۱۹-۲۱].

ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین ۴ (*Camk4*) آنزیمی کد می‌کند که با حضور در هسته نورون‌ها منجر به فسفریلاسیون و فعال کردن فاکتورهای رونویسی مهم مانند CREB شده و از این طریق به شکل‌گیری حافظه، بقا نورون‌ها، القا فرآیند تقویت طولانی‌مدت (Long term potentiation) (LTP) کمک می‌کند [۲۲]. اختلال در مسیر سیگنالینگ CaMK4-CREB باعث نقص در رشد دندریت‌ها و LTP می‌شود [۲۳،۲۴]. علاوه بر این، تنظیم بیان پروتئین CaMK4 توسط مسیر سیگنالینگ Wnt در عمل‌کرد حفاظتی این مسیر علیه پپتیدهای آمیلوئیدی آلزایمر نقش دارد [۲۵]. با توجه به اهمیت کندر و ژن *Camk4* در تقویت و شکل‌گیری حافظه و نظربه این‌که شواهدی در مورد تأثیر کندر در بیان ژن *Camk4* وجود ندارد، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان این ژن در دو رده سلولی PC12 و B65 می‌باشد. رده سلولی فئوکروموسیتومای (Phaeochromocytoma) غده فوق کلیه PC12 از تومور بخش مدولای غده فوق کلیه حاصل شده است. این رده سلولی انتقال‌دهنده عصبی دوپامین و نورآدرنالین را سنتز و ذخیره می‌کند. با توجه به اهمیت دوپامین در آمیگدال و هیپوکامپ (مراکز مربوط به یادگیری و حافظه)، نقص در سیستم دوپامین منجر به بیماری‌های پارکینسون و اسکیزوفرنی می‌شود. نورآدرنالین نیز تشکیل و بازیابی حافظه بلندمدت و حافظه کاری را تقویت می‌کند [۲۶]. رده سلولی نوروبلاستومای B65 رت یک نوع رده سلولی تومووری القاشده با جهش‌زای اتیل نیتروسورا می‌باشد و برخی از ویژگی‌های نورون‌های سروتونورژیک را دارد. وظیفه نورون‌های سروتونورژیک تولید انتقال‌دهنده عصبی سروتونین می‌باشد. سروتونین در عمل‌کردهای شناختی مثل حافظه و یادگیری دخالت دارد [۲۷]. از این‌رو، این دو رده سلولی به‌عنوان مدل سلولی مناسب برای مطالعات نورونی و حافظه استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت RPMI 1640و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین از شرکت جیبکو (آمریکا) و کندر از شرکت Mother Herbs (هند) تهیه شد. ایزوپروپانول، اتانول و کلروفرم از شرکت مرک (آمریکا) خریداری شد. آنزیم رونوشت بردار معکوس، پرایمر رندوم هگزامر، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) و آنزیم مهارکننده ریبونوکلئاز از شرکت ترموفیشر (آمریکا) تهیه شد. رنگ فلورسنت SYBR® Green از شرکت امپلیکون (انگلستان) و سایر مواد از شرکت سیگما (آمریکا) فراهم شدند.

کشت رده‌های سلولی. رده‌های سلولی PC12 و B65 از بانک سلولی پاستور (موسسه پاستور تهران، ایران) تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین–استرپتومایسین کشت یافته و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO_2 نگه‌داری شدند. برای جدا کردن سلول‌های B65 از فلاسک یا پلیت از تریپسین ۰/۱ درصد و با توجه به حساسیت سلول‌های PC12 به تریپسین برای جدا کردن این سلول‌ها از روش مکانیکی و اسکراپر استفاده شد.

آماده‌سازی عصاره آبی کندر. قطعات کندر با هاون کوبیده شده و به شکل پودر درآمدند. ۵۰ گرم از پودر کندر در ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. محلول حاصل ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی دو بار از صافی عبور داده شد و سپس با کمک دستگاه خشک‌کن انجمادی به شکل پودر سفیدرنگ آماده شد. پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

بررسی زیستایی سلول‌ها: برای تعیین اثر عصاره آبی کندر بر زیستایی سلول‌های PC12 و B65 و هم‌چنین انتخاب غلظت مناسب برای تیمار سلول‌ها جهت بررسی بیان ژن، سلول‌های PC12 و B65 به ترتیب با دانسیته $۱۰^{۴}$ و ۷×۱۰^{۳} سلول به ازای هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت یافتند. با گذشت ۲۴ ساعت و پس از اطمینان از اتصال سلول‌ها به پلیت، سلول‌ها به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره آبی کندر مورد تیمار قرار گرفتند. سلول‌هایی که با عصاره آبی کندر تیمار نشدند، به‌عنوان سلول‌های کنترل برای آزمون زیستایی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از گذشت بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر خانه پلیت اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، محلول رویی هر خانه پلیت دور ریخته شد و به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید به هر خانه پلیت افزوده شد. سپس، پلیت با استفاده از دستگاه شیکر به مدت ۱۵ دقیقه به آهستگی تکان داده شد و میزان جذب هر خانه پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، درصد زیستایی نهایی با اندازه‌گیری زیستایی سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی کندر نسبت به زیستایی سلول‌های کنترل محاسبه گردید.

تیمار سلول‌ها برای مطالعات بیان ژن. جهت تیمار سلول‌های PC12 و B65 با عصاره، سلول‌ها به ترتیب با دانسیته ۴×۱۰^{۵} و ۲×۱۰^{۵} در پلیت ۶ خانه‌ای کشت یافتند. ۲۴ ساعت پس از کشت، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت جدید دارای غلظت‌های ۲ یا ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره آبی کندر و در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت تعویض شد. سلول‌های تیمار شده در بازه‌های زمانی مربوطه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. از سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان سلول‌های کنترل استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: محیط کشت سلول‌ها با محلول RNX-PLUS تعویض شد. سلول‌ها با پیپتاژ آهسته از پلیت جداشده و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافتند. محلول سلولی با کلروفرم ترکیب‌شده و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل به میکروتیوب جدیدی انتقال‌یافته و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از سانتریفیوژ با شرایط فوق، رسوب RNA به‌دست‌آمده با اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شد. رسوب نهایی در آب عاری از ریبونوکلئاز انحلال یافت. بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده توسط ژل آگارز انجام شد و غلظت آن توسط نانودراپ سنجیده شد. جهت سنتز cDNA، یک واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس، بافر x5 آنزیم رونوشت بردار معکوس، یک واحد آنزیم مهارکننده ریبونوکلئاز، ۸ میکرومولار پرایمر رندوم هگزامر و ۱ میلی‌مولار dNTP استفاده شد. RNA به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس با این مواد انکوبه شد تا در نهایت به cDNA تبدیل شود.

واکنش Quantitative Real-timePCR (qPCR): پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه پرایمرهای اختصاصی ژن Camk4 و ژن Gapdh (کنترل داخلی) رت می‌باشد که با نرم‌افزار Oligo7 (آمریکا) و سایت Primer3 (آمریکا) طراحی شدند. جهت تائید و بهینه‌سازی پرایمرها از PCR معمولی و PCR شیب غلظت استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qPCR عبارت‌اند از: پرایمر پیشرو ´5-AAGCAGCCAACTTTGTCCAC-3´ و پرایمر برگشتی ´5-TGTCTTGTCCTTGCCGTCTTG-3´ برای ژن CaMK4، و پرایمر پیشرو ´5-CATAGACAAGATGGTGAAGGTCG-3´ و پرایمر برگشتی ´5-CCGTGGGTAGAGTCATACTGG-3´ برای ژن Gapdh. واکنش qPCR با استفاده از پرایمرها، رنگ فلورسنت SYBR® Green، cDNA رقیق‌شده انجام شد. برنامه qPCR استفاده‌شده در تکثیر cDNA برای دو ژن در جدول ۱ مشخص می‌باشد. نتایج حاصل از qPCR با روش 2-ΔCT بررسی شد.

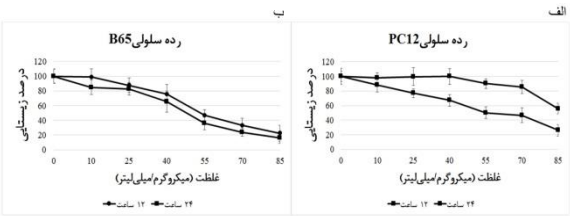
جدول ۱. برنامه qPCR استفاده‌شده در تکثیر cDNA ژن CaMK4 و Gapdh.

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵	۳۰ ثانیه	۴۰
اتصال	۶۰	۳۰ ثانیه	
گسترش	۷۲	۳۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

تجزیه و تحلیل آماری. نتایج آزمون زیستایی از سه آزمایش مستقل به‌دست‌آمده و با نسخه ۶ نرم‌افزار GraphPad Prism (آمریکا) بررسی شد. جهت تجزیه و تحلیل نتایج qPCR از نسخه ۱۹ نرم‌افزار SPSS (آمریکا) و آزمون T.test student و برای رسم نمودار از برنامه Excel استفاده شد. p-value زیر ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. نتایج آزمون زیستایی و qPCR به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد نمایش یافتند.

نتایج

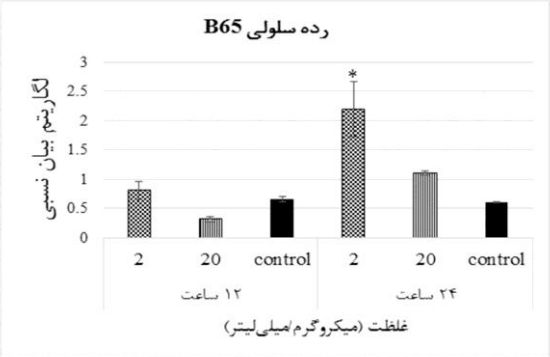
عصاره آبی کندر زیستایی سلول‌های PC12 و B65 را در یک الگوی وابسته به زمان و غلظت کاهش می‌دهد. جهت بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در زیستایی سلول‌ها، سلول‌های PC12 و B65 در پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره آبی کندر مورد تیمار قرار گرفتند. شکل ۱ نتایج حاصل از این آزمون زیستایی را نشان می‌دهد. طبق این نتایج، عصاره آبی کندر زیستایی سلول‌ها را در یک الگوی وابسته به زمان و غلظت کاهش داد. با استفاده از نتایج این آزمون غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC50) عصاره آبی کندر به دست آمد که این مقدار برای سلول‌های PC12 برابر با ۸۹/۰۱ و ۵۵/۴۴ و برای سلول‌های B65 برابر با ۵۴/۵۸ و ۴۶/۳۱ به ترتیب در بازه‌های زمانی ۱۲و ۲۴ ساعت تعیین شد. مقایسه مقادیر IC50 به دست آمده نشان می‌دهد عصاره آبی کندر برای سلول‌های B65 سمی‌تر از سلول‌های PC12 می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر، در سلول‌های PC12 نیاز به غلظت‌های بالایی از عصاره آبی کندر می‌باشد تا زیستایی سلول‌ها کاهش یابد. طبق نتایج به‌دست‌آمده از آزمون زیستایی، برای بررسی تأثیر عصاره در بیان ژن Camk4 و هم‌چنین برای اجتناب از اثرات توکسیک غلظت‌های بالا در بیان ژن‌ها، از دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره آبی کندر استفاده شد.



شکل ۱. بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در زیستایی سلول‌های PC12 و B65. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت یافتند و سپس به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره آبی کندر مورد تیمار قرار گرفتند. نمودارهای الف و ب، الگوی تأثیر عصاره آبی کندر را به ترتیب در رده سلولی PC12 و رده سلولی B65 نشان می‌دهد.

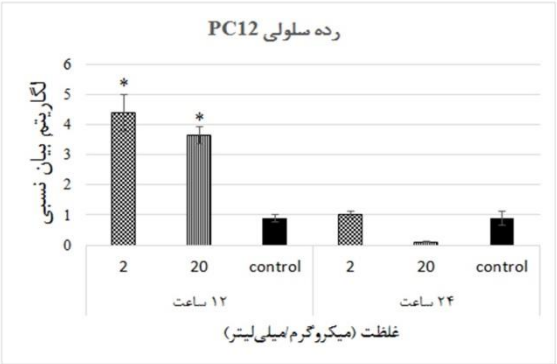
عصاره آبی کندر بیان ژن Camk4 را در رده سلولی B65 افزایش داد. جهت بررسی تأثیر کندر در بیان ژن Camk4،

سلول‌های B65 با دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره آبی کندر در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس RNA سلول‌ها استخراج‌شده، به cDNA تبدیل‌شده و میزان بیان ژن Camk4 با روش qPCR بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشخص می‌باشد،۱۲ ساعت پس از تیمار با عصاره افزایش بیان ناچیزی برای ژن Camk4 در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد. با این وجود، میزان بیان این ژن در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره کم‌تر از نمونه کنترل بود. با گذشت زمان و در تیمار ۲۴ ساعته، افزایش بیان قابل ملاحظه‌ای در بیان ژن Camk4 در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. در این بازه زمانی، غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره نیز توانست بیان این ژن را افزایش دهد.



شکل ۲. بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در بیان ژن Camk4 در رده سلولی B65 با روش qPCR. 12 ساعت پس از تیمار سلول ها با عصاره، افزایش بیان ناچیزی برای ژن Camk4 در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره مشاهده شد. درصورتی‌که میزان بیان این ژن در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره کمتر از نمونه کنترل بود. در تیمار ۲۴ ساعته، افزایش بیان قابل‌ملاحظه‌ای در بیان ژن Camk4 در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. در این بازه زمانی غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره نیز توانست بیان این ژن را افزایش دهد. *p-value زیر ۰،۰۵ نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های کنترل.

عصاره آبی کندر بیان ژن Camk4 را در رده سلولی PC12 سریع‌تر و بیش‌تر از B65 افزایش داد. مشابه با سلول‌های B65، سلول‌های PC12 نیز با دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره و به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش qPCR برای بررسی بیان ژن Camk4 در سلول‌های PC12 انجام شد. برخلاف B65، ۱۲ ساعت پس از تیمار هر دو غلظت عصاره آبی کندر بیان ژن Camk4 را در سلول‌های PC12 به‌طور قابل توجهی افزایش داد. این افزایش بیان، مشابه با آن‌چه در تیمار ۲۴ ساعته B65 مشاهده شد، در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر بیش‌تر از غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. ۲۴ ساعت پس از تیمار با عصاره، بیان ژن Camk4 در سلول‌های PC12 کاهش یافت، به‌طوری که میزان بیان در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر تقریباً برابر با نمونه کنترل و در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کم‌تر از نمونه کنترل بود (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در بیان ژن Camk4 در رده سلولی PC12 با روش qPCR. برخلاف B65، بیان ژن Camk4 در سلول‌های PC12 پس از ۱۲ ساعت تیمار با عصاره و در هر دو غلظت به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. بااین‌وجود، باگذشت زمان میزان بیان این ژن در هر دو غلظت کاهش نشان داد و در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به کمتر از نمونه کنترل رسید. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی کندر بیان ژن Camk4 را در سلول‌های PC12 سریع‌تر از سلول‌های B65 افزایش می‌دهد.*p-value زیر ۰،۰۵ نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های کنترل.

به‌طور کلی، الگوی بیان مشاهده‌شده برای ژن Camk4 در تیمار ۱۲ ساعته PC12 مشابه تیمار ۲۴ ساعته B65 و تیمار ۲۴ ساعته PC12 مشابه با ۱۲ ساعته B65 بود. این نتایج نشان داد که عصاره آبی کندر توانست بیان ژن Camk4 را در سلول‌های PC12 سریع‌تر از سلول‌های B65 افزایش دهد. به‌عبارت دیگر، افزایش بیان مشاهده‌شده برای سلول‌های PC12، ۱۲ ساعت پس از تیمار و برای سلول‌های B65، ۲۴

ساعت پس از تیمار با عصاره به دست آمد. علاوه بر این، میزان کلی بیان ژن Camk4 در نمونه‌های تیمار شده و کنترل در هر دو تیمار ۱۲ و ۲۴ ساعته، در سلول‌های PC12 بیش‌تر از B65 بود (شکل ۲ و ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم/کالمودولین (CaMK) خانواده بزرگی از پروتئین کینازها می‌باشند که در فرآیندهای سلولی بسیاری مثل آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی، انقباض ماهیچه، بیان ژن، و متابولیسم و تکثیر سلولی نقش دارند. این عمل‌کردها با ایجاد کمپلکس پایدار بین کلسیم و کالمودولین تنظیم می‌شود [۲۸]. CaMK4 یکی از اعضا مهم خانواده CaMK می‌باشد که به‌وفور در مغز و تیموس انسان یافت می‌شود. این آنزیم فرآیندهای سلولی متنوعی را از طریق فسفریلاسیون فاکتور رونویسی مهم CREB تنظیم می‌کند. این فاکتور رونویسی نقش مهمی در پاسخ ایمنی، التهاب و تثبیت حافظه ایفا می‌کند [۲۸-۳۰]. فعال شدن خود آنزیم CaMK4 با فسفریلاسیون تره‌اُنین شماره ۲۰۰ آن توسط کلسیم/کالمودولین کیناز کیناز (CaMKK) صورت می‌گیرد. غیرفعال شدن CaMKK منجر به افزایش احتمال سکته مغزی می‌شود. این امر نشان می‌دهد که CaMKK و CaMK4 نقش مهمی در بقا نورون‌ها دارند [۳۲،۳۱]. مطالعات نشان داده‌اند که نقص در عمل‌کرد مسیر سیگنالینگ وساطت شده با CREB منجر به نقایص مربوط به شکل‌گیری و تثبیت حافظه می‌شود [۳۳]. BDNF یکی از ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ CREB می‌باشد که بیان آن توسط این فاکتور رونویسی تنظیم می‌شود. در مطالعات مولکولی پیشین جهت بررسی تأثیر کندر در بیان ژن Bdnf موش، عصاره آبی کندر و اینسنسول استات، از ترکیبات کندر، توانستند بیان این ژن را افزایش دهند [۲۰،۱۹]. بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره آبی کندر در بیان ژن Camk4 در دو مدل سلولی نورونی رت انجام گرفت. طبق نتایج حاصل از این مطالعه، کندر می‌تواند بیان این ژن را به‌طور قابل‌توجهی افزایش دهد.

نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با داده‌های حاصل از دو مطالعه مولکولی قبلی سازگار می‌باشد. با توجه به این‌که CaMK4 کنترل‌کننده بالادست مسیر سیگنالینگ CREB-BDNF می‌باشد، افزایش بیان مشاهده‌شده در ژن Bdnf پس از تیمار با کندر و اینسنسول استات احتمالاً به دلیل افزایش بیان ژن Camk4 و به دنبال آن افزایش بیان ژن Creb می‌باشد تا در نهایت این تغییرات منجر به افزایش بیان ژن پایین‌دست Bdnf شده باشند. با این وجود، افزایش بیان مشاهده‌شده برای ژن Camk4 در این مطالعه وابسته به غلظت عصاره و نوع سلول می‌باشد. غلظت کم کندر نسبت به غلظت بالای آن در افزایش بیان ژن تأثیرگذارتر می‌باشد که این امر می‌تواند احتمالاً به دلیل اثر مهاری غلظت بالای کندر باشد. هم‌چنین به نظر می‌رسد سلول‌های مختلف با مکانیسم‌های متفاوتی به کندر پاسخ می‌دهند، همان‌طور که در این مطالعه مشخص شد تأثیر کندر در تغییرات بیان ژن Camk4 در PC12 سریع‌تر و بیش‌تر از B65 می‌باشد. با این‌که هر دو رده سلولی به عنوان مدل‌های سلولی عصبی در پژوهش‌های اعصاب و حافظه مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما منشاء آن‌ها بافت‌های متفاوت است. به طوری‌که رده سلولی PC12 از بافت توموری غده فوق کلیه حاصل شده است و بیش‌تر دوپامین و نورآدرنالین سنتز و ذخیره می‌کند اما رده سلولی B65 منشاء نوروبلاستومایی داشته، ویژگی نورون‌های سروتونوژیک را دارد [۲۷،۲۶] و اختلاف مشاهده شده در تاثیر عصاره کندر بر آن‌ها احتمالاً به علت منشا بافتی و ویژگی‌های ذاتی متفاوت آن‌ها از قبیل مسیرهای انتقال پیام می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کندر می‌تواند در یک الگوی وابسته به غلظت بیان ژن Camk4 را تنظیم کند. علاوه بر این، سلول‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی به کندر پاسخ می‌دهند. با این وجود، به مطالعات تکمیلی جهت بررسی غلظت‌ها و بازه‌های زمانی بیش‌تر برای شناسایی مکانیسم‌های عمل کندر در رده‌های سلولی PC12 و B65 و نیز در سلول‌های دیگر نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله صمیمانه از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز و مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت تأمین هزینه اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Garodia P, Ichikawa H, Malani N, Sethi G, Aggarwal BB. From ancient medicine to modern medicine: ayurvedic concepts of health and their role in inflammation and cancer. J Soc Integr Oncol 2007; 5: 25-37.

[2] Coppi A, Cecchi L, Selvi F, Raffaelli M. The frankincense tree (Boswellia sacra, Burseraceae) from Oman: ITS and ISSR analyses of genetic diversity and implications for conservation. Genet Resour Crop Evol 2010; 57: 1041-1052.

[3] Poeckel D, Tausch L, Kather N, Jauch J, Werz O. Boswellic acids stimulate arachidonic acid release and 12-lipoxygenase activity in human platelets independent of Ca2+ and differentially interact with platelet-type 12-lipoxygenase. Mol Pharmacol 2006; 70: 1071-1078.

[4] Safayhi H, Rall B, Sailer E-R, Ammon HPT. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. J Pharm Exp Ther 1997; 281: 460-463.

[5] Moussaieff A, Shohami E, Kashman Y, Fride E, Schmitz ML, Renner F, et al. Incensole acetate, a novel anti-inflammatory compound isolated from Boswellia resin, inhibits nuclear factor-κB activation. Mol Pharmacol 2007; 72: 1657-1664.

[6] Jing Y, Nakajo S, Xia L, Nakaya K, Fang Q, Waxman S, et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. Leuk Res 1999; 23: 43-50.

[7] Shehata AM, Quintanilla-Fend L, Bettio S, Singh C, Ammon H. Prevention of multiple low-dose streptozotocin (MLD-STZ) diabetes in mice by an extract from gum resin of Boswellia serrata (BE). Phytomedicine 2011; 18: 1037-1044.

[8] Emami A, khazaei MR, khazaei M. Abortive effect of Boswellia hydroalcoholic extract in mice. Koomesh 2016; 17: 329-335. (Persian).

[9] Michie CA, Cooper E. Frankincense and myrrh as remedies in children. J R Soc Med 1991; 84: 602-605.

[10] Hameed A. Avicenna's Tract on cardiac drugs and essays on Arab cardiotherapy: Hamdard Foundation Press; 1983.

[11] Frawley D, Lad V. The yoga of herbs: an Ayurvedic guide to herbal medicine. India: Motilal Banarsidass; 1994.

[12] Jalili C, Pourmotabbed A, Salahshoor MR, Moradi S, Motaghy M. The therapeutic effect of the aqueous extract of boswellia serrata on the learning deficit in kindled rats. Int J Prev Med 2014; 5.

[13] Sadeghi F, Khalaj-Kondori M, Hosseinpour Feizi M, Shaikhzadeh Hesari F. The effect of aqueous extract of boswellia on spatial learning and memory in adult male rats. ZUMS J 2014; 22: 122-131.

[14] Hosseini SM, Esfandiari E, Alaei H. Effects of frankincense aqueous extract during gestational period on increasing power of learning and memory in adult offsprings. IUMS 2004; 21: 16-20. (Persian).

[15] Sharifabad MH, Esfandiary E. The effects of maternal administration of boswellia gum resin (Frankincense) during lactation on stereological parameters of rat hippocampus. IUMS 2012; 29. (Persian).

[16] Moussaieff A, Yu J, Zhu H, Gattoni-Celli S, Shohami E, Kindy MS. Protective effects of incensole acetate on cerebral ischemic injury. Brain Res 2012; 1443: 89-97.

[17] Yassin N, El-Shenawy S, Mahdy KA, Gouda N, Marrie A, Farrag A, et al. Effect of boswellia serrata on Alzheimer's disease induced in rats. J Arab Soc Med Res 2013; 8: 1-11.

[18] Estelami N, Khalaj-Kondori M, Sheikhzadeh-Hesari F, Hosseinpour-Feizi M. Aqueous extract of frankincense impedes aluminum chloride-induced memory impairment in adult male rats. JPPA 2016; 6: 839-845. (Persian).

[19] Khalaj-Kondori M, Sadeghi F, Hosseinpourfeizi MA, Shaikhzadeh-Hesari F, Nakhlband A, Rahmati-Yamchi M. Boswellia serrata gum resin aqueous extract upregulatesBDNF but not CREB expression in adult male rat hippocampus. Turk J Med Sci 2016; 46: 1573-1578.

[20] Moussaieff A, Gross M, Nesher E, Tikhonov T, Yadid G, Pinhasov A. Incensole acetate reduces depressive-like behavior and modulates hippocampal BDNF and CRF expression of submissive animals. J Psychopharmacol 2012; 26: 1584-1593.

[21] Khalaj-kondori M, Amiri S, Hosseinpour feizi Ma, Shaikhzadeh-Hesari F. Comparing the effects of rivastigmin and aqueous extract of olibanum on gene expression of amyloid precursor protein in rats treated with aluminum chloride. J Pol Med 2016; 4: 279-286.

[22] Sun P, Lou L, Maurer RA. Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca/Calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. J Biol Chem 1996; 271: 3066-3073.

[23] Marie H, Morishita W, Yu X, Calakos N, Malenka RC. Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. Neuron 2005; 45: 741-752.

[24] Yin Y, Gao D, Wang Y, Wang Z-H, Wang X, Ye J, et al. Tau accumulation induces synaptic impairment and memory deficit by calcineurin-mediated inactivation of nuclear CaMKIV/CREB signaling. Proc Natl Acad Sci 2016; 113: 3773-3781.

[25] Arrázola MS, Varela-Nallar L, Colombres M, Toledo EM, Cruzat F, Pavez L, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/β-catenin signaling pathway. J Cell Physio 2009; 221: 658-667.

[26] Westerink RHS, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. Acta Physiol (Oxf) 2008; 192: 273-285.

[27] Nakatani Y, Amano T, Yamamoto H, Sakai N, Tsuji M, Takeda H. Yokukansan enhances the proliferation of B65 neuroblastoma. J Tradit Complement Med 2017; 7: 34-44.

[28] Naz H, Islam A, Ahmad F, Hassan MI. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: A multifunctional enzyme and potential therapeutic target. Prog Biophys Mol Biol 2016; 121: 54-65.

[29] Fukushima H, Maeda R, Suzuki R, Suzuki A, Nomoto M, Toyoda H, et al. Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. J Neurosci 2008; 28: 9910-9919.

[30] Nairn AC, Picciotto MR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. Semin Cancer Biol 1994;5:295-303..

[31] McCullough LD, Tarabishy S, Liu L, Benashski S, Xu Y, Ribar T, et al. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is detrimental in cerebral ischemia. Stroke 2013; 44: 2559-2566.

[32] Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. Science 1998; 281: 1505-1509.

[33] Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca 2+-and stimulus duration–dependent switch for hippocampal gene expression. Cell 1996; 87: 1203-1214.

Aqueous extract of *Frankincense* increases the expression of *Camk4* gene in PC12 and B65 cell lines

Asiyeh Jebelli (Ph.D)[1], Mohammad Khalaj-Kondori (Ph.D)[*1], Mortaza Bonyadi (Ph.D)[1], Mohammad Ali Hosseinpour Feizi (Ph.D)[1], Mohammad Rahmati-Yamchi (Ph.D)[2]

1. *Dept. of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran*
2. *Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

(Received: 13 May 2017; Accepted: 14 Oct 2017)

Introduction*:* The most important effects of *Frankincense* on memory are included prevention and relative treatment of Alzheimer disease, as well as memory enhancement of off springs of the rats that had received Frankincense during their pregnancy and lactation period. Considerably, Camk4, one of the important memory genes, induces downstream memory genes expression through phosphorylation and activation of transcription factors. Here, we aimed to study the effects of aqueous extract of *Frankincense* on the Camk4 gene expression in PC12 and B65 cell lines.

Materials and Methods*:* The effect of extract on the cell viability was evaluated by cell treatment in two time intervals with six concentrations of extract and 50% inhibition concentration was obtained. In this way, for gene expression studies, cells were treated by two concentrations of extract in two time points. RNA was extracted and converted to cDNA and qPCR was performed to investigate the expression of Camk4 gene**.**

Results*:* The aqueous extract of *Frankincense* decreased the cell viability in a time and concentration dependent pattern. However, the extract was more toxic for B65 cell line than PC12. Also, it significantly increased the expression of Camk4 gene in the cells. Nevertheless, the increase was dependent to the extract concentration and the cell type. The low concentration of the extract was more effective to the expression of Camk4 gene than the high concentration as well as to its expression in the PC12 cell line than B65.

Conclusion*:* This study showed that *Frankincense* could regulate the expression of Camk4 gene in a concentration dependent pattern. However, further studies are needed to identify the mechanisms of *Frankincense* action in different cells.

Keywords*:* Frankincense, Memory, PC12 cell line, Camk4 gene

* Corresponding author. Tel: +98 9123351124
khalaj@tabrizu.ac.ir