BRIEF REPORT

Effect of the Ethanolic Extract of Olibanum on the Expression of CaMKIIα Gene in B65 and PC12 Cells

Asiyeh Jebelli[1],
Mohammad Khalaj-Kondori[2],
Mortaza Bonyadi[2],
Mohammad Ali Hosseinpour Feizi[3],
Mohammad Rahmati-Yamchi[4]

[1]PhD Student in Molecular Genetics, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received July 11, 2017 ; Accepted July 10, 2018)

Abstract

Background and purpose: In the past, olibanum was used as an incense and perfume and a remedy for treating various diseases. Now, it is confirmed that olibanum improves memory and has a role in treatment and prevention of Alzheimer disease. *CaMKIIα* gene is known as molecular memory because of its role in cellular processes associated with memory. The aim of this research was to study the effect of ethanolic extract of olibanum on the expression of *CaMKIIα* in B65 and PC12 cells.

Materials and methods: To determine the effect of olibanum on cell viability, MTT assay was done and cells were treated with the extract in different concentrations and times. To study the gene expression, the cells were treated by two concentrations of the extract at four time points. Then, RNA was extracted, cDNA was synthesized, and the expression of *CaMKIIα* was quantified by qPCR.

Results: The qPCR data revealed that olibanum alternately changed the expression of *CaMKIIα* in a reducing and increasing pattern over time in B65 cells. However, the extract could not induce the expression of this gene in PC12 cells.

Conclusion: According to the role of *CaMKIIα* as molecular memory and the positive effect of olibanum in memory improvement, current results could be helpful in understanding the molecular mechanisms by which olibanum affects memory performance.

Keywords: olibanum, memory, *CaMKIIα* gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (169): 169-174 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Khalaj-Kondori -** Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran (E-mail: khalaj@tabrizu.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۹ بهمن سال ۱۳۹۷ (۱۷۴-۱۶۹)

بررسی تاثیر عصاره اتانولی کندر بر بیان ژن *CaMKIIα* در سلول‌های B65 و PC12

آسیه جبلی[۱]
محمد خلج کندری[۲]
مرتضی بنیادی[۲]
محمدعلی حسین‌پور فیضی[۳]
محمد رحمتی یامچی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: در گذشته، از کندر به عنوان عطر و بخور و در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شد. امروزه، مشخص شده است کندر بر بهبود حافظه و درمان/پیشگیری بیماری آلزایمر نیز تاثیر می‌گذارد. ژن *CaMKIIα* به علت دخالت داشتن در فرآیندهای سلولی مرتبط با حافظه، تحت‌عنوان حافظه مولکولی نامیده می‌شود. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره اتانولی کندر بر بیان ژن *CaMKIIα* در سلول‌های B65 و PC12 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای تعیین تاثیر عصاره در زیستایی سلول‌ها، از آزمون MTT استفاده شد و سلول‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت با عصاره تیمار شدند. جهت مطالعه بیان ژن، سلول‌ها با دو غلظت عصاره و در چهار بازه زمانی تیمار شدند. سپس RNA استخراج شده، cDNA سنتز شد و میزان بیان *CaMKIIα* توسط qPCR بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج واکنش qPCR نشان داد که کندر بیان *CaMKIIα* را در سلول‌های B65 با پیشرفت زمان به طور متناوب افزایش و کاهش می‌دهد. با این وجود، عصاره نتوانست بیان این ژن را در سلول‌های PC12 القا کند.

استنتاج: با توجه به اهمیت *CaMKIIα* به عنوان حافظه مولکولی و تاثیر مثبت کندر در تقویت حافظه، نتایج این مطالعه می‌تواند گامی در جهت شناخت بیش‌تر مکانیسم های مولکولی تاثیر کندر در تقویت حافظه باشد.

واژه های کلیدی: کندر، حافظه، ژن *CaMKIIα*

مقدمه

صمغ کندر بانام علمی *Olibanum* از گونه‌های مختلف گیاه بوسولیا به دست می‌آید. در زمان‌های قدیم از کندر به‌عنوان عطر و بخور استفاده می‌شد. در طب سنتی نیز اعتقاد بر این بود که مصرف کندر توسط مادران باردار به تقویت حافظه فرزندانشان کمک شایانی می‌کند(۱).

مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد کندر در درمان دیابت، سرطان و بیماری‌های التهابی نیز قابل‌استفاده می‌باشد(۳،۲). علاه‌براین، تجویز کندر در دوران بارداری موش‌های صحرایی منجر به افزایش اندازه اجسام سلولی نورون‌ها و تقویت حافظه کوتاه و بلندمدت زاده‌های آن‌ها می‌شود(۵،۴).

مولف مسئول: محمد خلج کندری– تبریز: دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز E-mail: khalaj@tabrizu.ac.ir
۱. دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استاد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۴/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۴/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۴/۱۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]

تیمار موش‌های صحرایی مدل آلزایمر با کندر به‌طور قابل توجهی علائم مربوط به بیماری آلزایمر را تعدیل می‌کند(۶). در موش‌های صحرایی سالم که قبل از تزریق ترکیب القاکننده آلزایمر کندر دریافت کردند، علائم مربوط به نقص حافظه فضایی القاشده با این ترکیب کاهش می‌یابد. بنابراین، احتمالاً کندر می‌تواند باعث پیشگیری از ابتلا به بیماری آلزایمر شود(۷). برخلاف مطالعه‌های فیزیولوژیکی متعدد، چند مطالعه محدود به بررسی تاثیر کندر درمکانیسم‌های مولکولی حافظه پرداخته است. بیان ژن پیش‌ساز آمیلوئید که در بیماری آلزایمر افزایش نشان می‌دهد با مصرف کندر کاهش می‌یابد(۸). همچنین، بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق‌شده از مغز[1] (*BDNF*) در حیوانات آزمایشگاهی به دنبال مصرف کندر و استات‌اینسنسول افزایش می‌یابد. این ژن در شکل‌گیری حافظه نقش مهمی ایفا می‌کند(۹). ایزوفرم α ژن پروتئین کیناز وابسته به کالمودولین/کلسیم۲[2] (*CaMKIIα*) یکی از ژن‌های مهم مسیر مربوط به حافظه در نورون‌ها است. حذف این ایزوفرم در موش‌ها منجر به نقص در عملکرد حافظه و القا بیماری آلزایمر می‌شود(۱۰). پروتئین کد شده توسط ژن *CaMKIIα* عملکردهای نورونی مهمی از جمله سنتز و آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی، جابه‌جایی وزیکول سیناپسی، شکل‌پذیری سیناپسی، بیان ژن و درنهایت حافظه و یادگیری را تنظیم می‌کند به‌طوری‌که از آن به‌عنوان "حافظه مولکولی" یاد می‌شود(۱۱). گرچه چندین مطالعه فیزیولوژیکی تأثیر مثبت کندر را در تقویت مسیرهای مربوط به حافظه نشان داده‌اند، اما بررسی‌های مولکولی انجام‌شده در این زمینه بسیار محدود بوده و اطلاعات بسیار کمی در مورد تأثیر کندر بر بیان ژن‌های حافظه وجود دارد. با توجه به این‌که ژن *CaMKIIα* نقش مهمی در شکل‌گیری حافظه ایفا می‌کند و ازآن‌جایی‌که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی تأثیر کندر در بیان این ژن ارائه نشده است، هدف از این مطالعه بررسی نقش عصاره اتانولی کندر بر بیان ژن *CaMKIIα* در دو رده سلولی B65 و PC12 مدل‌های سلولی نورونی- می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری: در این مطالعه تجربی، ۵۰ گرم پودر کندر در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و پس از دو روز نگه‌داری در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول رویی در دستگاه روتاری تبخیر شد. ترکیب چسبنده حاصل در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید حل شد و در دمای ۴°C انکوبه شد.

آزمون زیستایی: به منظور بررسی تاثیر عصاره در زیستایی سلول‌ها از آزمون MTT استفاده شد. سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی کشت یافته و با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره اتانولی به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. در هر بازه زمانی، سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگه‌داری شدند. محیط رویی دور انداخته شده و ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دستگاه شیکر به آهستگی تکان داده شد. در نهایت میزان جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد زیستایی نهایی با اندازه‌گیری زیستایی سلول‌های تیمار شده نسبت به زیستایی نمونه‌های کنترل محاسبه شد.

تیمار سلول‌ها با عصاره، استخراج RNA و سنتز cDNA: سلول‌های B65 و PC12 در پلیت ۶ چاهکی کشت یافته و با غلظت‌های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. محلول رویی هر چاهک دور ریخته شد و محلول RNX-PLUS به هر چاهک اضافه شد. سلول‌ها به میکروتیوب انتقال یافته، با کلروفرم ترکیب شده و سپس

1. Brain-derived neurotrophic factor
2. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]

سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید انتقال یافت و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. رسوب حاصل با اتانول شستشو داده شد و درنهایت در آب عاری از ریبونوکلئاز حل شد. RNA استخراج‌شده توسط واکنش رونوشت‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد.

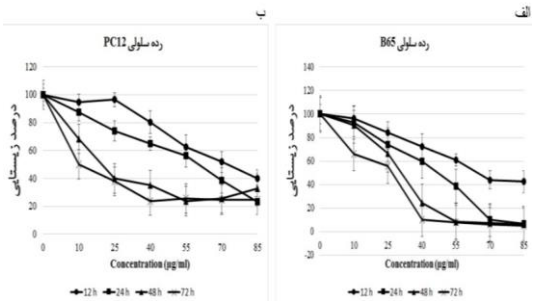
واکنش qPCR: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *CaMKIIα* و *GAPDH* (کنترل داخلی) در دمای اتصال ۶۰°C در دستگاه Rotor-Gene انجام شد. توالی پرایمرها برای *CaMKIIα* شامل 5′-GGAAACAAGAAGAATGATGG-3′ و 5′-TAGGATTCAAAGTCTCCATTG-3′ وبرای *GAPDH* شامل 5′- CATAGACAAGATGGTGAAGGTCG-3′ و 5′-CCGTGGGTAGAGTCATACTGG-3′ می‌باشد. نتایج حاصل از *qPCR* با روش $2^{-\Delta CT}$ مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی‌های آماری: نتایج *qPCR* با آزمون t.test در نرم‌افزار SPSS بررسی شد.

یافته‌ها و بحث

عصاره اتانولی کندر زیستایی سلول‌های B65 و PC12 را در الگوی وابسته به زمان و غلظت کاهش داد.

تاثیر عصاره اتانولی کندر بر زیستایی سلول‌های B65 و PC12 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. طبق نتایج حاصل از این آزمون، عصاره کندر زیستایی سلول‌ها را در یک الگوی وابسته به زمان و غلظت کاهش داد (تصویر شماره ۱). غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC50) عصاره برای سلول‌های PC12 برابر با ۷۱/۰۱، ۵۲/۹۵، ۲۱/۰۵ و ۱۳/۸۵ و برای سلول‌های B65 برابر با ۶۷/۴۶، ۴۲/۰۵، ۲۹/۶۳ و ۱۸/۷۸ به ترتیب در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد. مقایسه مقادیر IC50 نشان می‌دهد تاثیر عصاره اتانولی کندر در کاهش زیستایی سلول‌ها به طور کلی در رده سلولی PC12 کمتر از B65 می‌باشد. طبق این نتایج، برای مطالعات بیان ژن از دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره استفاده شد.



تصویر شماره ۱: نتیجه آزمون زیستایی عصاره اتانولی کندر در سلول‌های B65 و PC12. سلول‌ها پس از کشت در پلیت، با شش غلظت عصاره در چهار بازه زمانی تیمار شده و برای آزمون MTT مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد عصاره اتانولی کندر در یک الگوی وابسته به غلظت و زمان زیستایی هر دو سلول را کاهش می‌دهد.

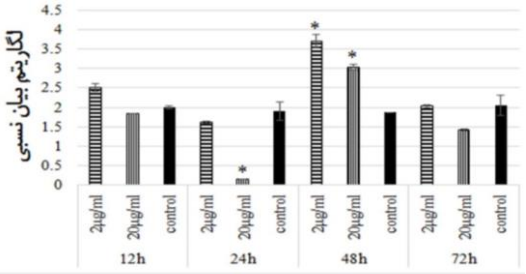
در حالی که عصاره اتانولی کندر که بیان ژن *CaMKIIα* را در سلول‌های B65 به‌طور متناوب کاهش و افزایش داد، نتوانست بیان این ژن را در سلول‌های PC12 القا کند.

تیمار ۱۲ ساعته سلول‌ها با عصاره کندر منجر به افزایش بیان *CaMKIIα* در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر شد. درصورتی‌که غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره باعث کاهش جزئی بیان ژن نسبت به نمونه کنترل شد. در تیمار ۲۴ ساعت، میزان بیان این ژن در هر دو غلظت نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش یافت. این کاهش برای غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر چشمگیر بود. ممکن است علت این امر مکانیسم‌های تنظیمی سلول و یا فیدبک منفی محصول این ژن بر بیان خود باشد. در زمان ۴۸ ساعت، هر دو غلظت عصاره، بیان *CaMKIIα* را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. آنزیم CaMKIIα پس از فعال‌شدن با تأثیر محرک‌های خارجی، با داشتن توانایی خودکاتالتیکی می‌تواند منجر به فعال‌شدن تعداد بیش‌تری از آنزیم‌های CaMKIIα شود(۱۳،۱۲). هرچند این تنظیم در سطح پروتئین می‌باشد، اما به نظر می‌رسد تنظیم مشابهی در سطح ژن نیز وجود داشته باشد تا بتواند با گذشت زمان بیان این ژن را به‌طور قابل‌توجهی افزایش دهد. با توجه به این‌که آنزیم CaMKIIα با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]

فسفریلاسیون برخی از فاکتورهای رونویسی منجر به فعال‌شدن آن‌ها شده و این فاکتورهای رونویسی بیان ژن‌های مربوط به حافظه را تنظیم می‌کنند(۱۴)، احتمالاً ژن این آنزیم هدف تنظیم برخی از این فاکتورهای رونویسی قرارگرفته باشد. درنهایت، تغییرات بیان ژن *CaMKIIα* در تیمار ۷۲ ساعته برای هر دو غلظت نسبت به تیمار ۴۸ ساعته به‌صورت کاهشی بود و میزان بیان نمونه‌های تیمار شده به مقدار مشابه نمونه‌های کنترل رسید (تصویر شماره ۲). برخلاف B65، هیچ بیانی برای ژن *CaMKIIα* در نمونه‌های کنترل و تیمار شده مشاهده نشد. جهت اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها، یک واکنش واحد PCR چندین بار با شرایط یکسان برای cDNAهای حاصل از سلول‌های PC12 و B65 تکرار شد که نتیجه آن تکثیر cDNAهای حاصل از B65 و عدم تکثیر cDNAهای مربوط به PC12 بود. نتایج حاصل حاکی از آن است که احتمالا ژن *CaMKIIα* در سلول‌های PC12 بیان نمی‌شود و عصاره اتانولی کندر نیز نمی‌تواند بیان این ژن را در این رده سلولی القا کند.

در مجموع، عصاره اتانولی کندر قادر به افزایش چشمگیر بیان *CaMKIIα* می‌باشد. اما این تاثیر وابسته به سلول است. با توجه به اهمیت *CaMKIIα* به عنوان حافظه مولکولی، این نتایج می‌تواند گامی در جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های مولکولی تاثیر کندر در تقویت حافظه باشد.



تصویر شماره ۲: نتیجه تاثیر عصاره اتانولی کندر بر بیان *CaMKIIα* در سلول‌های B65. نتایج qPCR، یک الگوی تناوبی کاهش و افزایش برای بیان این ژن نشان داد.*p-value<۰/۰۵ نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل

References

1. Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M. Frankincense (Rŭ Xiāng; Boswellia Species): from the selection of traditional applications to the novel phytotherapy for the prevention and treatment of serious diseases. J Tradit Complement Med 2013; 3(4): 221-226.
2. 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(12): 1037-1044.
3. Ammon H. Modulation of the immune system by Boswellia serrata extracts and boswellic acids. Phytomedicine 2010; 17(11): 862-867.
4. Hosseini Sharifabad M, Esfandiary E. A morphometeric study on CA3 hippocampal field in young rats following maternal administration of Boswellia serrata resin during gestation. IJBMS 2007; 10(3): 176-182 (Persian)
5. Hosseini-Sharifabad M, Esfandiury E, Alaei I, Moatar F. Effect of maternal consumption of aqueous extract of the resin of Boswellia serrate during lactation on increasind power of learning and memny in adult Offspning. IJBMS 2003; 6(3): 207-211 (Persian).
6. 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.
7. Estelami N, Khalaj-Kondori M, Sheikhzadeh-Hesari F, Hosseinpour-Feizi M. Aqueous Extract of Frankincense Impedes Aluminum

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]

Chloride-Induced Memory Impairment in Adult Male Rats. JPPA 2016; 6(2): 839-845.

8. 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 Police Med 2016; 4(4): 279-286 (Persian).
9. 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(5): 1573-1578.
10. Yamauchi T. Neuronal Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II—discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. Biol Pharm Bull 2005; 28(8): 1342-1354.
11. Irvine EE, von Hertzen LS, Plattner F, Giese KP. αCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. Trends Neurosci 2006; 29(8): 459-465.
12. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nature Rev Neurosci 2002; 3(3): 175-190.
13. Strack S, Choi S, Lovinger DM, Colbran RJ. Translocation of autophosphorylated calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. J Biol Chem 1997; 272(21): 13467-13470.
14. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nature Rev Neurosci 2012; 13(3): 169-182.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-18]