

## اثر عصاره آبی الکلی چای سبز بر بیان آکوپورین ۴ در کورتکس مغز: روشی بالقوه جهت کاهش علائم ادم مغزی

هما محسنی کوچصفهانی <sup>۱\*</sup> Ph.D.، محمد نبیونی <sup>۲</sup> Ph.D.، سیده سمیرا مرتضوی اصل <sup>۱</sup> MSc، زهرا نظری <sup>۱</sup> Ph.D.student،  
فاطمه امیری <sup>۱</sup> MSc

۱- دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران

۲- دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی مولکولی، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kouchesfehani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۵

## چکیده

**هدف:** آکوپورین ۴ اصلی ترین کانال آبی موجود در مغز است که در انتقال آب توسط سد خونی- مغزی نقش عمده‌ای را بر عهده دارد. اثبات شده که میزان فشار داخل جمجمه‌ای و همچنین بیان آکوپورین ۴ در برخی بیماری‌ها نظیر هیدروسفالی هیپوناترمی، ادم سیتوتوکسیک و تومورهای مغزی افزایش می‌یابد و داروهایی که بتوانند بیان این پروتئین‌ها را کاهش دهند، می‌توانند به درمان این بیماری‌ها کمک کنند. در این تحقیق فرض بر این بود که عصاره چای سبز بتواند سطح آکوپورین ۴ را در کورتکس مغز کاهش دهد.

**مواد و روش‌ها:** این پژوهش از نوع مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد. تعداد ۴۰ سررت نژاد ویستار (۴ تا ۶ هفته‌ای) به‌طور تصادفی انتخاب شده و به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه شاهد بدون تیمار، گروه شاهد آزمایشگاهی ۲۰۰ میکرولیتر سالین (حلال GTE) و گروه تجربی ۱ و ۲ به ترتیب میزان ۲۰۰ میکرولیتر سالین محتوی عصاره چای سبز را با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. پس از گذشت ۶ ساعت بیان آکوپورین ۴ در هر چهار گروه به روش‌های وسترن‌بلات و ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

**نتایج:** نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات نشان داد که عصاره چای سبز می‌تواند به شیوه‌ی وابسته به دوز بیان آکوپورین ۴ را در کورتکس مغز کاهش دهد.

**نتیجه گیری:** پیشنهاد می‌شود که عصاره چای سبز با کاهش سطح پروتئین آکوپورین ۴ در کورتکس مغز بتواند به‌عنوان یک داروی گیاهی برای کاهش دادن میزان فشار داخل جمجمه‌ای در بیماری‌هایی نظیر هیپوناترمی، ادم سیتوتوکسیک، تومورهای مغزی و غیره مفید باشد.

**واژگان کلیدی:** چای سبز، آکوپورین ۴، کورتکس مغز

## مقدمه

شده و نفوذپذیری بالایی دارند. Saadoun و همکارانش (۱۰) و Nico و همکاران (۱۱) نشان دادند که در موش‌های فاقد آکوپورین ۴ رشد تومور آهسته‌تر است. این محققین اظهار داشتند که آکوپورین ۴ با تسریع روند رگ‌زایی در بافت سرطانی به مهاجرت سلول‌های توموری کمک می‌کند. این مطالعات نشان می‌دهند که بیماری‌های مختلفی با افزایش میزان آکوپورین ۴ و فشار داخل جمجمه‌ای همراه هستند. به نظر می‌رسد با کاهش بیان آکوپورین ۴ بتوان روند بهبودی این بیماری‌ها را تسریع بخشید.

چای سبز یک فراورده ساخته شده از برگ و جوانه گیاه *Camellia sinensis* از خانواده *Theaceae* می‌باشد که تقریباً بعد از آب پرمصرف‌ترین نوشیدنی است (۱۲). چای سبز یک چای غیر تخمیری است که آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز موجود در برگ‌های تازه چای به وسیله خشک کردن و بخار آب دادن غیر فعال شده و بنابراین مانع اکسیداسیون کاتچین‌های چای سبز می‌شود. این امر مانع تبدیل کاتچین‌ها به مشتقات پلیمری از قبیل تیافلاوین و تیاروبیجین می‌شود و بنابراین موجب پایداری مواد موثره آن‌ها می‌شود (۱۳).

چای سبز حاوی کافئین، پلی فنل‌ها، ویتامین‌های B، C و E، فلاونوئیدها، گلیکوپروتئین، فیبر، لیپید و کاروتنوئیدها می‌باشد. کاتچین‌ها ترکیبات پلی فنلی اصلی موجود در چای سبز هستند که در میان ترکیبات چای سبز دارای بیشترین فعالیت بیولوژیکی می‌باشند و ۲۵ تا ۳۵ درصد از وزن خشک چای سبز را شامل می‌شوند (۱۴-۱۶).

EGCG (*Epigallocatechin gallate*) فراوان‌ترین کاتچین چای سبز است و تقریباً ۵۹ درصد از کل کاتچین‌ها را شامل می‌شود و به نظر می‌رسد که بخش عمده فعالیت‌های بیولوژیکی چای سبز مربوط به همین ترکیب باشد (۱۲ و ۱۷). در سال‌های اخیر چای سبز به دلیل خواص درمانی خود به شدت مورد توجه قرار گرفته است. این خواص درمانی شامل تاثیرات آنتی اکسیدانسی، ضد جهشی، القا کننده آپوپتوزیس، ضد دیابتی، ضد التهابی، ضد سرطانی و تاثیرات ضد باکتریایی می‌باشند (۲۰-۱۸). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که EGCG با کاهش بیان آکوپورین ۵ در رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 از متاستاز و آنژیوژنز سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و موجب القا آپوپتوزیس می‌شود (۲۱). تحقیقات نشان می‌دهد که پلی فنل‌های موجود در چای سبز از سد خونی-مغزی عبور می‌کند

آکوپورین‌ها کانال‌های آبی با نفوذپذیری بالا هستند که به‌طور وسیعی در بافت‌های مختلف بدن شناسایی شده‌اند (۱). آکوپورین‌ها در بازجذب آب در کلیه‌ها، ترشح و بازجذب مایع مغزی-نخاعی، تولید ترشحات ریوی، ترشح و بازجذب مایع زلالیه، ایجاد اشک و چندین فرآیند فیزیولوژیکی دیگر نقش دارند (۲) وجود آکوپورین‌های ۱، ۴، ۹ و ۱۱ در سیستم عصبی مرکزی اثبات شده است (۳ و ۴). هومئوستازی آب و مایعات در مغز از اهمیت کلینیکی و فیزیولوژیکی ویژه‌ای برخوردار است و فعالیت‌های نورونی و هومئوستازی یون‌ها و آب به‌صورت جدایی‌ناپذیری با یکدیگر در ارتباط هستند به‌طور عمده آکوپورین ۴ بیشترین تراکم را در سیستم عصبی مرکزی دارا می‌باشد و در حرکت و هومئوستازی آب و فعالیت عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این پروتئین در غشا سلولی پایانه‌های آستروسیتی در مجاورت نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی شامل عروق خونی (جایگاه سد خونی-مغزی)، فضاهای پری سیناپتیک نورون‌ها، گره‌های رانویه و همچنین در غشای سلولی پایانه‌های آستروسیتی مجاورترنم شامه و غشای قاعده‌ای-جانبی سلول‌های اپاندیمی پوشاننده‌ی بطن‌ها (سطوح مغز-مایع مغزی نخاعی) حضور دارند (۵).

بیماری‌های متعددی نظیر هیپوناترمی، افزایش فشار داخل جمجمه‌ای، هیدروسفالی، انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، صرع، ادم سیتوتوکسیک مغزی و تومورهای مغزی با بر هم خوردن هومئوستازی مایعات مغزی و افزایش بیان آکوپورین ۴ در سیستم عصبی مرکزی همراه هستند (۶ و ۷). Skjolding و همکارانش (۸) بیان آکوپورین ۴ را در مغز رت‌های هیدروسفال و سالم مقایسه نمودند. تحقیقات آن‌ها نشان داد که سطح این پروتئین در مغز رت‌های هیدروسفال نسبت به نمونه‌های سالم به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. مشاهده شده که ادم مغزی ایجاد شده توسط آسیب مغزی تروما و ایسکمی مغزی یا مسمومیت آب با افزایش بیان آکوپورین ۴ در آستروسیت‌ها همراه بوده که به نقش آکوپورین‌ها در پاتوفیزیولوژی مغز اشاره دارد. Yang و همکارانش (۹) نشان دادند که در موش‌های دچار ادم سیتوتوکسیک حذف آکوپورین ۴ منجر به کاهش میزان آب ورودی به مغز و در نتیجه کاهش اثرات مخرب ادم مغزی می‌شود. بیان بالای آکوپورین ۴ ویژگی astrocytomas می‌باشد، توموری که از آستروسیت‌ها در سیستم عصبی تشکیل

کلروفورم کشته شده و مغز حیوانات جدا شده و به دو دسته جداگانه جهت انجام ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات تقسیم شدند.

**ایمونوهیستوشیمی:** به منظور انجام بررسی کیفی ایمونوهیستوشیمی در هر چهار گروه تحت آزمایش (شاهد، شاهد آزمایشگاهی، تجربی ۱ و تجربی ۲) مغزها جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. در مرحله بعد به ترتیب آگیری با محلول های الکل با درجات صعودی، شفاف سازی با تولوئن، نفوذ پارافین، قالب گیری، برش گیری توسط میکروتوم و قرار دادن برش ها بر روی لام های پوشش شده با پلی آل-لایزین ۱ درصد انجام شد. جهت انجام ایمونوهیستوشیمی به ترتیب پارافین زدایی با زایلن، آگیری با الکل مطلق، بلوکه کردن با محلول پراکسید هیدروژن و شستشو با آب دیونیزه انجام شد. بازیابی آنتی ژنی با بافر سیترات انجام شده و پس از بلوکه کردن با BSA، ۱ درصد (آلبومین سرم گاوی) آنتی بادی اولیه آکوپورین ۴ (Abcam) با غلظت ۱:۲۰۰ به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق روی نمونه های بافتی ریخته شد. پس از شستشو با PBST (Phosphate buffer – Tween) یک قطره آنتی بادی ثانویه بیوتینه (Bethyl Laboratories) حل شده در میلی لیتر ۲ PBS به نمونه ها اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داری شد. سپس به ترتیب شستشو با سوبسترای DAB (دی آمینو بنزیدین)، PBST و رنگ همتاکسیلین انجام شد. در نهایت آگیری نمونه ها با درجات صعودی الکل (۷۰ تا ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد)، لامل گذاری با چسب انتالن انجام شد. تغییرات بیان آکوپورین ۴ در هر چهار گروه توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

**استخراج پروتئین و تعیین غلظت:** علاوه بر تکنیک ایمونوهیستوشیمی، بیان آکوپورین ۴ در بافت کورتکس مغز به روش وسترن بلات نیز بررسی شد. به این منظور در چهار گروه تحت آزمایش پس از جراحی و خارج سازی مغز بخش کوچکی از بافت کورتکس مغز جدا شده و درون PBS سرد قرار گرفت. پس از هضم مکانیکی به بافت ها بافر لیزکننده سرد (Invitrogen, UK) اضافه گردید. پس از هموژنیزه کردن، نمونه ها با دور ۱۱۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و محلول رویی که حاوی کل محتوای پروتئینی بافت کورتکس می باشد به درون میکروتیوب های جدید

که احتمالاً از این طریق بر فعالیت های عصبی اثر گذاشته و موجب حفاظت سیستم عصبی می شود (۲۲). به علاوه نشان داده شده است که چای سبز و ترکیبات جدا شده از آن به خصوص EGCG دارای اثرات حفاظتی در مقابل آسیب های ایسکمی مغزی و ضایعات نخاعی و نیز بیماری های تحلیل سیستم عصبی می باشد (۲۳ و ۲۴). از آنجایی که چای سبز دارای خاصیت ضد التهابی بوده و در بهبودی ایسکمی وادم مغزی و سایر بیماری هایی که مربوط به افزایش فشار داخل جمجمه ای سیستم عصبی مرکزی می باشد موثر بوده و همچنین یک ترکیب طبیعی است و عوارض جانبی خاصی برای مصرف آن ذکر نشده؛ لذا در این تحقیق فرض بر این بود که بتوان با به کارگیری عصاره چای سبز بیان ژن های آکوپورین ۴ را در کورتکس مغز کاهش داد.

## مواد و روش ها

**نحوه عصاره گیری چای سبز:** به منظور به دست آوردن عصاره چای سبز، ابتدا میزان یک کیلوگرم برگ های چای سبز در ۵ لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شده و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شد (۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد). سپس محلول حاصله توسط کاغذ صافی فیلتر شده و جهت تبخیر از دستگاه rotary evaporator استفاده شد. ماده حاصله که عصاره چای سبز می باشد در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

**تیمار گروه ها با عصاره چای سبز:** در تحقیق حاضر که از نوع مطالعه تجربی آزمایشگاهی می باشد از رت های ۴ تا ۶ هفته ای نژاد ویستار (هر دو جنس) استفاده شد. رت ها به طور تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه شاهد شامل حیواناتی که هیچگونه تیماری دریافت نکردند. گروه شاهد آزمایشگاهی: حیواناتی که حلال عصاره چای سبز یعنی فسفات بافر سالین (PBS) را به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه تجربی اول: رت هایی که میزان ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز حل شده در ۲۰۰ میکرولیتر، PBS را دریافت کردند. گروه تجربی دوم: رت هایی که میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز حل شده در ۲۰۰ میکرولیتر، PBS را دریافت کردند. پس از تیمار حیوانات با دوزهای ذکر شده از عصاره چای سبز، پس از گذشت زمان ۶ ساعت، حیوانات تیمار شده با عصاره چای سبز، گروه شاهد آزمایشگاهی و همچنین رت های گروه شاهد با غلظت های بالای

محللول سوبسترای Vector Blue- Alkaline Phosphatase Substrate بر روی فیلتر ریخته شد. پس از ظهور باندهای پروتئینی آبی رنگ محللول سوبسترا خارج شده و فیلتر شستشو شد. در نهایت پس از خشک شدن از غشا توسط دوربین japan canon g 11 (عکس برداری شد. در نهایت برای دانسیتومتری باندها از نرم افزار Image J استفاده شد.

**آنالیز آماری:** نتایج کیفی حاصل از سه بار تکرار تست وسترن بلات توسط نرم افزار image j به صورت کمی برآورد شده و به وسیله نرم افزار INSTAT3 و تست پارامتریک one-way ANOVA آنالیز شدند. سپس نمودار توسط نرم افزار EXCEL رسم شده و  $P < 0/05$  معنی دار محسوب گردید.

### نتایج

#### نتایج حاصل از ایمنوهیستوشیمی

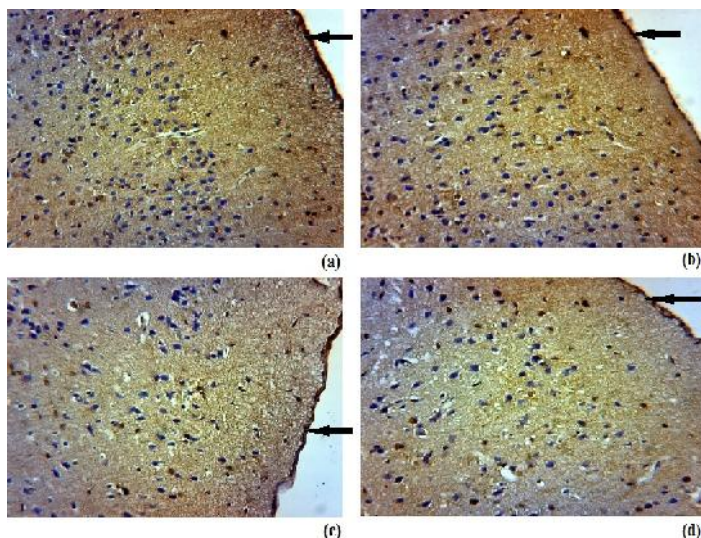
یافته‌های حاصل از بررسی‌های ایمنوهیستوشیمیایی بیان آکواپورین ۴ در برش‌های کروئال از قشر مغز گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تحت تیمار با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره جای سبز حاکی از آن دارد که میزان بیان این پروتئین در قشر مغز حیوانات گروه شاهد آزمایشگاهی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد ولی در گروه‌های تحت تیمار با عصاره جای سبز تفاوت بیان چشمگیری را در مقایسه با گروه شاهد مشاهده می‌کنیم (شکل ۱).

شکل ۱: رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی با آنتی‌بادی آکواپورین ۴، رنگ همتوکسیلین و دی‌آمینو بنزیدین. به منظور بررسی بیان آکواپورین ۴ در بافت قشر مغز رت‌های گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و تحت تیمار با عصاره جای سبز. (a) نمونه شاهد. (b) نمونه شاهد آزمایشگاهی. (c) نمونه تیمار شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره جای سبز. (d) نمونه تیمار شده با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره جای سبز. پیکان‌ها محدوده سلول‌های گلیال را در مجاور نرم شامه نشان می‌دهد که بیان آکواپورین ۴ در این ناحیه بسیار زیاد می‌باشد. بیان آکواپورین ۴ (به رنگ قهوه‌ای) در قشر مغز نمونه‌های تیمار شده با عصاره جای سبز در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. همچنین دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره جای سبز موجب کاهش بیشتر بیان آکواپورین ۴ نسبت به دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شده است. بزرگنمایی  $\times 100$ .

منتقل شد. جهت بررسی کمی محتوای پروتئینی عصاره‌های پروتئینی از روش بردفورد استفاده شد. جهت رسم نمودار استاندارد بردفورد از BSA به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. در نهایت با استفاده معادله خطی به دست آمده از نمودار استاندارد و همچنین جذب‌های به دست آمده از عصاره‌های مختلف، غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید (۲۵).

#### الکتروفورز به روش SDS-PAGE و وسترن بلات:

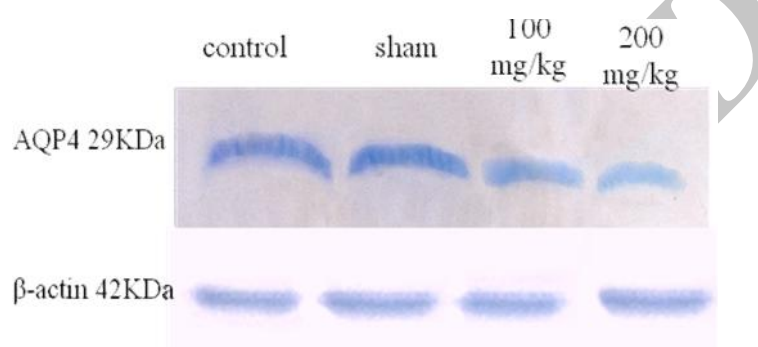
الکتروفورز به روش SDS-Page انجام شد. پس از انجام تست بردفورد ۳۴ میکروگرم از هر نمونه پروتئینی به نسبت ۱:۱ با بافر نمونه مخلوط شده و مورد استفاده قرار گرفت. جهت مشخص شدن جایگاه پروتئین آکواپورین ۴ از نشانگر وزن مولکولی استفاده شد. همچنین جهت Loading control از آنتی بادی  $\alpha$ -actin استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز جهت انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشا مدل ساندویچ توسط برگه‌های واتمن، غشا نیترو سلولزی و ژل تهیه شده و در تانک انتقال حاوی بافر انتقال قرار داده شد. پس از بلوکه کردن توسط ۵ میلی‌لیتر محللول بلوکه‌کننده BSA، ۳ درصد و شستشو با محللول بافر تریس نمکی حاوی Tween غشا به مدت ۱ ساعت با ۲ میلی‌لیتر آنتی‌بادی اولیه آکواپورین ۴ (Abcam, Rabbit anti-Aquaporin 4) رقیق شده در BSA، ۳ درصد به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه (ABC Staining Kits) با غلظت ۱/۱۰۰۰ در PBS/BSA آنکوبه گردید. سپس فیلتر به مدت ۳۰ دقیقه در معرض-ABC AP reagent (Vector Laboratories) قرار داده شد. در نهایت



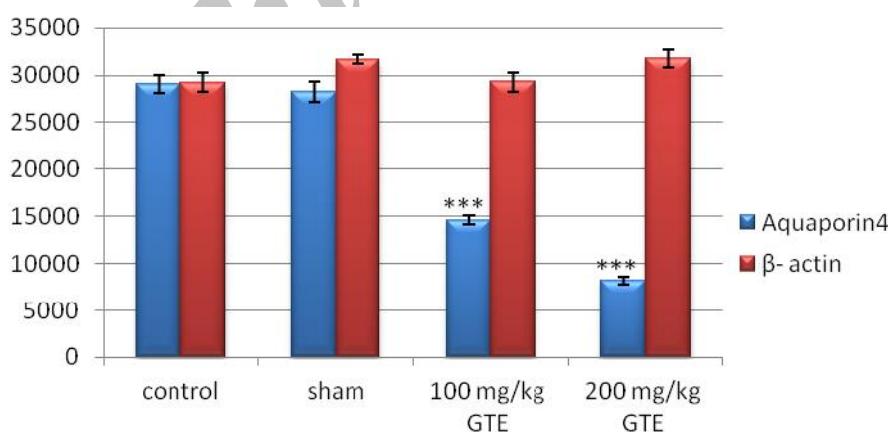
## نتایج حاصل از وسترن بلات

تیمار با عصاره چای سبز تفاوت بیان چشمگیری در سطح بیان این پروتئین نسبت به گروه شاهد وجود دارد. نتایج کمی حاصل از تست وسترن بلات در نمودار ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث ۴۶ درصد کاهش بیان و دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث ۷۲ درصد کاهش در بیان آکواپورین ۴ نسبت به گروه شاهد می گردد.

نتایج حاصل از وسترن بلات آکواپورین ۴ در نمونه های کورتکس مغز رت در گروه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در شکل ۲ نشان داده شده است. این بررسی نشان داد که در حیوانات گروه شاهد آزمایشگاهی که تنها سالین دریافت کرده بودند هیچ تفاوت معنی داری در میزان بیان پروتئین آکواپورین ۴ نسبت به گروه شاهد وجود ندارد. این در حالی بود که در گروه های تحت



شکل ۲: تصویر غشا نیتروسلولوز حاصل از بررسی بیان آکواپورین ۴ در سلول های کورتکس مغز رت های گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز. نتایج کاهش بیان آکواپورین ۴ را در گروه های تیمار شده با عصاره چای سبز نشان می دهد. آنتی بادی  $\beta$ -actin با وزن مولکولی ۴۲KDa به عنوان loading control مورد استفاده قرار گرفته است.



نمودار ۱: نمودار حاصل از نتایج کمی تست وسترن بلات که به وسیله نرم افزار *Image J* برآورد شده است. این نتایج نشان می دهد که دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز موجب بیشترین میزان کاهش در بیان آکواپورین ۴ در کورتکس می گردد.  $P < 0.001$  \*\*\*.  $Mean \pm SEM$

ایمنوهیستوشیمی و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره چای سبز می تواند به طور چشمگیری بیان این پروتئین را در کورتکس مغز کاهش دهد

## بحث

در بررسی حاضر اثر عصاره چای سبز بر بیان کانال آبی آکواپورین ۴ موجود در کورتکس مغز رت به وسیله تکنیک های

بر بیان کانال‌های آکوپورین ۴ موجود در کورتکس مغز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات مختلف خواص حفاظت کننده عصب عصاره چای سبز به اثبات رسیده است. چای سبز دارای آثار حفاظتی در مقابل آلزایمر، پارکینسون (۳۵)، ضایعات نخاعی، ایسکمی مغزی، آسیب مغزی بعد از سکته و نیز بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی است (۲۳ و ۲۴)، بررسی‌ها نشان داده که کاتچین‌های موجود در چای سبز از جمله EGCG آثار حفاظت کننده از عصب خود را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، کاهش پراکسیداسیون چربی و کاهش آپوپتوزیس و آثار التهابی اعمال می‌نمایند (۳۶). به علاوه در ارتباط با اثر چای سبز بر مهار کانال‌های آبی، Chunxiao و همکاران (۲۱) نشان دادند که EGCG با کاهش بیان آکوپورین ۵ در رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 از متاستاز و آنژیوژنز سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و موجب القاء آپوپتوز می‌شود. با استناد به این مطالعات و با توجه به نتایج حاصل از بررسی حاضر که نشان داد عصاره چای سبز توانایی کاهش بیان آکوپورین ۴ را دارا می‌باشد؛ می‌توان نتیجه گرفت که عصاره چای سبز می‌تواند به‌عنوان آنتاگونیست این کانال آبی به کار رود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی با برهم خوردن هومئوستازی مایعات مغزی و افزایش بیان آکوپورین ۴ در سیستم عصبی مرکزی همراه هستند، نتایج تحقیقات اخیر نشان داده که هر عامل مهار کننده‌ی بیان آکوپورین ۴ می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور درمانی جهت درمان بیماری‌های فوق مورد استفاده قرار گیرند. با در نظر گرفتن اینکه عصاره چای سبز به‌عنوان یک ترکیب طبیعی که عوارض جانبی خاصی برای مصرف آن ذکر نشده توانست بیان آکوپورین ۴ را در کورتکس مغز کاهش دهد امید است که با انجام تحقیقات بیشتر بتوان از عصاره چای سبز به‌عنوان یک داروی گیاهی جهت درمان بیماری‌هایی که با افزایش بیان آکوپورین ۴ و فشار داخل جمجمه همراه است استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی دانشگاه خوارزمی انجام گرفته است،

(شکل ۱ و ۲). به‌طوری‌که نتایج حاصل از کمی‌سازی تست وسترن بلات کاهش ۴۶ درصدی را در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کاهش ۷۲ درصدی را در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای این پروتئین نسبت به گروه شاهد نشان داد. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که در بیماری‌هایی نظیر افزایش فشار داخل جمجمه‌ای، میگرن، هیدروسفالی، تومورهای مغزی، بیماری خودایمنی انسفالومیلیت تجربی و ادم مغزی میزان مایع مغزی- نخاعی و فشار داخل جمجمه‌ای افزایش می‌یابد که این افزایش در فشار داخل جمجمه‌ای تا حد زیادی در ارتباط با افزایش بیان پروتئین‌های آکوپورین ۴ می‌باشد (۶، ۷، ۲۹-۲۶). نتایج تحقیقاتی که با استفاده از موش‌های فاقد آکوپورین ۴ صورت گرفته است نشان داده که کاهش آکوپورین ۴ با کاهش ادم سیتوتوکسیک مغزی در موش‌های دچار مسمویت آبی، ایسکمی مغزی و یا مننژیت باکتریایی همراه می‌باشد. برای مثال موش‌های فاقد آکوپورین ۴ تورم نیمکره‌ای مغز کمتر از ۳۵ درصد را ۲۴ ساعت بعد از انسداد شریان میانی مغز در مقایسه با موش‌های وحشی نشان داده‌اند (۳۰ و ۳۱). بیان آکوپورین ۴ در بسیاری از تومورهای مغزی با منشا آستروسیتی نیز افزایش می‌یابد و شواهد اخیر نشان داده که آکوپورین ۴ در مهاجرت، آنژیوژنز و رشد تومورهای مغزی و تشکیل ادم دخالت دارند و بازدارنده‌های بیان و یا عمل کرد آکوپورین ۴ می‌توانند از رشد این تومورها جلوگیری کنند (۱۱). از سوی دیگر بررسی‌ها نشان داده که موش‌هایی که در ژن آکوپورین ۴ دارای جهش می‌باشند آستانه تحریک‌پذیری بالاتری نسبت به موش‌های سالم دارند و همچنین موش‌های فاقد آکوپورین ۴ قابلیت کاهش حمله القا شده توسط تشنج شیمیایی Pentylentetrazole را نشان می‌دهند و این امکان را می‌دهد که بازدارنده‌های آکوپورین ۴ بتوانند در درمان بیماری صرع نیز سودمند باشند (۳۲ و ۳۳). در هیپوناترمیا، یک گرادیان اسمزی بین پلاسما و مغز ایجاد می‌شود و منجر به نفوذ مایع از رگ‌ها و تورم سلولی می‌شود و Frigeri و همکارانش (۳۴) نشان دادند که عدم حضور آکوپورین ۴ در مغز موش‌های هیپوناترمیا، سبب کاهش خیز مغزی در این موش‌ها می‌شود. بنابراین هر عامل مهار کننده‌ی بیان آکوپورین ۴ می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور درمانی جهت درمان بیماری‌های فوق مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به خواص ضدالتهابی عصاره چای سبز و توانایی این ماده در عبور از سد خونی مغزی در این تحقیق اثر عصاره چای سبز

initiated peroxidation of rat liver microsomes. *ChemPhys Lipids*. 2002; 120: 109–117.

13. Pan X, Niu G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*. 2003; 42: 129-133.

14. Shahidi F, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992; 32(1): 67-103.

15. Wiseman SA, Balentine DA, Frei B. Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1997; 37: 705-718.

16. Ho CT, Chen CW, Wanasundara UN, Shahidi F. Natural antioxidants from tea in natural antioxidants. Champaign IL AOCs Press. 1997; 213–223.

17. Nakazoto T, Ito K, Miyakawa Y. Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Haematologica*. 2005; 90: 317–325.

18. Xie M, Von Bohlen A, Klockenkaemper R, Jian X, et al. Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Z LebensmUntersFor*. 1998; 207: 31–38.

19. Feng Q, Kumagai T, Torii Y, Nakamura Y, et al. Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. *Free Radic Res*. 2001; 35: 779-788.

20. Pan TH, Jankovic J, Le WD. Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. *Drugs Aging*. 2003; 20(10): 711–721.

21. Chunxiao Y, Jianhua Y, Lan Sh, Xuejun Ch. Inhibitory effect of Epigallocatechingallate on ovarian cancer cell proliferation associated with aquaporin 5 expression. *Arch GynecolObstet*. 2012; 285: 459–467.

22. Caturla N, VeraSamper E, Villalain J, Mateo CR, et al. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylatedcatechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free RadicBiol Med*. 2003; 34: 648– 62.

23. Ames BN, Shigenaga M, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(17): 7915 – 22.

24. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Sci*. 1992; 257: 1220 – 4.

لذا از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند صمیمانه سپاسگزاریم.

## منابع

1. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*. 2005; 118: 3225-3232.

2. Beitz E. Aquaporins; Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009;190: 320-400.

3. Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res*. 2000; 276: 1118-1128.

4. Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, et al. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem*. 2006; 1: 7-14.

5. Zheng W, Chodobski A. The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. Taylor and Francis group. 2005; 227-350.

6. Miyamoto K, Nagaosa N, Motoyama M, Kataoka K, et al. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci*. 2009; 276(1-2): 103-7.

7. Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiryoghaddam M, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 1193-1198.

8. Skjolding AD, Rowland IJ, Sogaard LV, Praetorius J, et al. Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2010; 7: 20.

9. Yang B, Zador Z, Verkman AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem*. 2008; 283(22): 15280-15286.

10. Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci*. 2005b; 118: 591–598.

11. Nico B, Ribatti D. Role of aquaporins in cell migration and edema formation in human brain tumors. *J Experimental cell research*. 2011; 317: 2391-2396.

12. Cai YJ, Ma LP, Hou LF, Zhou B. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical

25. Copeland RE. Methods for protein analysis. Chapman and Hall. 1994; 243-246.
26. Faraci FM, Kinzenbaw D, Heistad DD. Effect of endogenous vasopressin on blood flow to choroid plexus during hypoxia and intracranial hypertension. *Am J Physiol.* 1994; 266(2): 393-8.
27. August H, van Alphen MM. A result of increased CSF pressure: A new pathophysiological concept (preliminary report). *Neuro Rev.* 1986; 9: 121-124.
28. Parker JN, Parker PM. Hydrocephalus. *ICON Group International.* 2004; 3-67.
29. Zador Z, Bloch O, Yao X, Manley GT. Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog Brain Res.* 2007; 161: 185-194.
30. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos CP. Water movements in the brain: role of aquaporins. *J Trends in Neurosciences.* 2007; 31:37-43.
31. Badaut J, Fukuda AM, Jullienne A, Petry KG. Aquaporins and brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(5):1554-65.
32. Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen O. Aquaporin-4 and Epilepsy. *Glia.* 2012; 60(8): 1203-1214.
33. Castle NA. Aquaporins targets for drug discovery. *J Drug Discovery Today.* 2005; 10: 485-493.
34. Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, et al. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB J.* 2001; 15(1): 90-98.
35. Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MBH. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2004; 15: 506-516.
36. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J NutrBiochem.* 2006; 17(5): 291-306.



## Effect of Green Tea Hydro Alcoholic Extract on Aquaporin4 Expression in Cerebral Cortex, as a Potential Therapeutic Way to Alleviate Edema Symptoms

Mohseni Kouchesfahani H, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Nabiuni M.Ph.D<sup>2</sup>, Mortazavi asl SS, MSc<sup>1</sup>, Nazari Z, Ph.D.student<sup>1</sup>, Amiri F, MSc<sup>1</sup>

1. Department of Animal sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: kouchesfehani@yahoo.com

Received: 6 Nov. 2013

Accepted: 16 Feb. 2014

### Abstract

**Aim:** Aquaporin4 (AQP4) is the main water channel in the brain that has important role in water transport across blood- brain- barrier. It has been proved that intracranial pressure and also expression of AQP4 increase in some disorders such as Hydrocephalus, Hyponatremia, cytotoxic oedema and brain tumours and drugs that can decrease the expression of this AQP can offer some treatment for these disorders. The aim of this study was to determine whether green tea extract (GTE) can down regulate the Aquaporin4 protein level in brain cortex.

**Material and methods:** This research is a laboratory experimental study. 40 Wister rats (4-6 weeks) were randomly divided into 4 groups as follows: untreated control group, sham group treated intra peritoneally (IP) with 200 µl saline (solvent GTE), experimental1&2treated IP with 100& 200 mg/kg GTE dissolved in 200 µl saline. After 6 hours, expression of AQP4 in control, sham, and experimental groups were tested by immunohistochemistry and western blotting.

**Result:** Results from immunohistochemistry and western blotting showed that GTE can down regulate the AQP4 expression level on dose-dependent manner in brain cortex.

**Conclusion:** It is suggested that GTE has potential to reduce the level of AQP4 protein in brain cortex and it can be useful as a herbal medicine to reduce intracranial pressure in diseases such as hyponatremia, cytotoxic oedema, brain tumours and etc.

**Keywords:** Green tea, Aquaporin4, Cerebral cortex