

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

Asiyeh Jebelli¹,
Mohammad Khalaj-Kondori²,
Mortaza Bonyadi²,
Mohammad Ali Hosseinpour Feizi³,
Mohammad Rahmati-Yamchi⁴

¹PhD Student in Molecular Genetics, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Associate 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. *CaMKII α* 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 *CaMKII α* 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 *CaMKII α* was quantified by qPCR.

Results: The qPCR data revealed that olibanum alternately changed the expression of *CaMKII α* 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 *CaMKII α* 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, *CaMKII α* 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)

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

آسیه جلیلی^۱
محمد خلیج کندری^۲
مرتضی بنیادی^۲
محمدعلی حسین پور فیضی^۳
محمد رحمتی یامچی^۴

چکیده

سابقه و هدف: از کندر به عنوان عطر و بخور و در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. امروزه، مشخص شده است کندر بر بهبود حافظه و درمان/پیشگیری بیماری آلزایمر نیز تاثیر می‌گذارد. ژن *CaMKIIa* به علت دخالت داشتن در فرآیندهای سلولی مرتبط با حافظه، تحت عنوان حافظه مولکولی نامیده می‌شود. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره اتانولی کندر بر بیان ژن *CaMKIIa* 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 *CaMKIIa* توسط qPCR بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج واکنش qPCR نشان داد که کندر بیان *CaMKIIa* 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 *CaMKIIa* به عنوان حافظه مولکولی و تاثیر مثبت کندر در تقویت حافظه، نتایج این مطالعه می‌تواند گامی در جهت شناخت بیش تر مکانیسم‌های مولکولی تاثیر کندر در تقویت حافظه باشد.

واژه‌های کلیدی: کندر، حافظه، ژن *CaMKIIa*

مقدمه

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

صمغ کندر بانام علمی *Olibanum* از گونه‌های مختلف گیاه بوسولیا به دست می‌آید. در زمان‌های قدیم از کندر به عنوان 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).

E-mail: khalaj@tabrizu.ac.ir

مؤلف مسئول: محمد خلیج کندری - تبریز: دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

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 دارویی، 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

هدف از این مطالعه بررسی نقش عصاره اتانولی کندر بر بیان ژن *CaMKIIa* در دو رده سلولی B65 و PC12 مدل‌های سلولی نورونی - می‌باشد.

مواد و روش‌ها

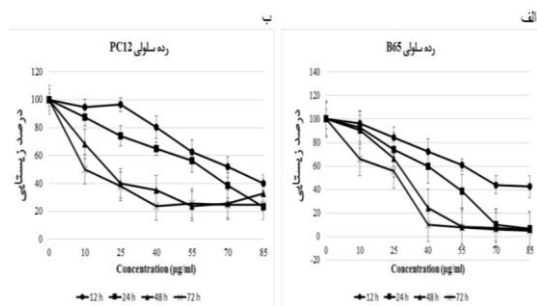
عصاره‌گیری: در این مطالعه تجربی، ۵۰ گرم پودر کندر در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و پس از دو روز نگه‌داری در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول رویی در دستگاه روتاری تبخیر شد. ترکیب چسبنده حاصل در حلال دی‌متیل سولفو کساید حل شد و در دمای 4°C انکوبه شد.

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 37°C نگه‌داری شدند. محیط رویی دور انداخته شده و ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید 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

تیمار موش‌های صحرایی مدل آلزایمر با کندر به طور 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 در مکانیسم‌های 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 مشتق شده از مغز (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 کالمدولین/کلسیم α (*CaMKIIa*) 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 *CaMKIIa* عملکردهای نورونی مهمی از جمله سنتز و آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی، جابه‌جایی وزیکول سیناپسی، شکل‌پذیری سیناپسی، بیان ژن و در نهایت حافظه و یادگیری را تنظیم می‌کند به طوری که از آن به عنوان "حافظه مولکولی" یاد می‌شود (۱۱). گرچه چندین مطالعه فیزیولوژیکی تاثیر مثبت کندر را در تقویت مسیرهای مربوط به حافظه نشان داده‌اند، اما بررسی‌های مولکولی انجام شده در این زمینه بسیار محدود بوده و اطلاعات بسیار کمی در مورد تاثیر کندر بر بیان ژن‌های حافظه وجود دارد. با توجه به این که ژن *CaMKIIa* نقش مهمی در شکل‌گیری حافظه ایفا می‌کند و از آنجایی که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی تاثیر کندر در بیان این ژن ارائه نشده است،

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



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 *CaMKIIa* را در سلول‌های B65 به طور 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 *CaMKIIa* در غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر شد. در صورتی که 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 *CaMKIIa* را به طور معنی‌داری افزایش داد. آنزیم *CaMKIIa* پس از فعال شدن با تأثیر محرک‌های خارجی، با داشتن توانایی خود کاتالیتیکی می‌تواند منجر به فعال شدن تعداد بیش‌تری از آنزیم‌های *CaMKIIa* شود (۱۲، ۱۳). هر چند 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 به طور قابل توجهی افزایش دهد. با توجه به این که آنزیم *CaMKIIa* با

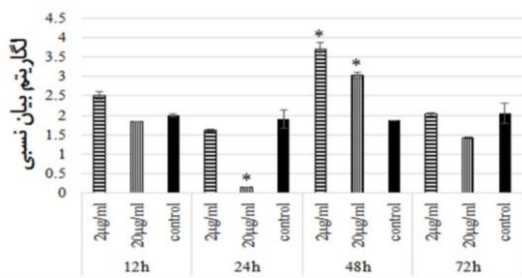
سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید انتقال یافت و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. رسوب حاصل با اتانول شستشو داده شد و در نهایت در آب عاری از ریبونوکلاز حل شد. RNA استخراج شده توسط واکنش رونوشت‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. واکنش qPCR: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *CaMKIIa* و *GAPDH* (کنترل داخلی) در دمای اتصال 60°C در دستگاه Rotor-Gene انجام شد. توالی پرایمرها برای *CaMKIIa* شامل 5'-GGAAACAAGAAGAATGATGG-3' و 5'-TAGGATTCAAAGTCTCCATTG-3' برای *GAPDH* شامل 5'-CATAGACAAGATGGTGAAGGTCG-3' و 5'-CCGTGGGTAGAGTCACTACTGG-3' می‌باشد. نتایج حاصل از qPCR با روش $2^{-\Delta\text{CT}}$ 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 مهارتی 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.

نیز نمی تواند بیان این ژن را در این رده سلولی القا کند. در مجموع، عصاره اتانولی کندر قادر به افزایش چشمگیر بیان *CaMKIIa* می باشد. اما این تاثیر وابسته به سلول است. با توجه به اهمیت *CaMKIIa* به عنوان حافظه مولکولی، این نتایج می تواند گامی در جهت شناخت بهتر مکانیسم های مولکولی تاثیر کندر در تقویت حافظه باشد.



تصویر شماره ۲: نتیجه تاثیر عصاره اتانولی کندر بر بیان *CaMKIIa* در سلول های B65. نتایج qPCR، یک الگوی تناوبی کاهش و افزایش برای بیان این ژن نشان داد. $p\text{-value} < 0.05$ در نمونه های تیمار شده نسبت به کنترل

فسفریلاسیون برخی از فاکتورهای رونویسی منجر به فعال شدن آنها شده و این فاکتورهای رونویسی بیان ژن های مربوط به حافظه را تنظیم می کنند (۱۴)، احتمالاً ژن این آنزیم هدف تنظیم برخی از این فاکتورهای رونویسی قرار گرفته باشد. در نهایت، تغییرات بیان ژن *CaMKIIa* در تیمار ۷۲ ساعته برای هر دو غلظت نسبت به تیمار ۴۸ ساعته به صورت کاهشی بود و میزان بیان نمونه های تیمار شده به مقدار مشابه نمونه های کنترل رسید (تصویر شماره ۲). برخلاف B65، هیچ بیانی برای ژن *CaMKIIa* در نمونه های کنترل و تیمار شده مشاهده نشد. جهت اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها، یک واکنش واحد PCR چندین بار با شرایط یکسان برای cDNA های حاصل از سلول های PC12 و B65 تکرار شد که نتیجه آن تکثیر cDNA های حاصل از B65 و عدم تکثیر cDNA های مربوط به PC12 بود. نتایج حاصل حاکی از آن است که احتمالاً ژن *CaMKIIa* در سلول های PC12 بیان نمی شود و عصاره اتانولی کندر

References

- Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M. Frankincense (Rū 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.
- 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.
- Ammon H. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine* 2010; 17(11): 862-867.
- Hosseini Sharifabad M, Esfandiary E. A morphometric study on CA3 hippocampal field in young rats following maternal administration of *Boswellia serrata* resin during gestation. *IJBMS* 2007; 10(3): 176-182 (Persian)
- Hosseini-Sharifabad M, Esfandiary E, Alaei I, Moatar F. Effect of maternal consumption of aqueous extract of the resin of *Boswellia serrata* during lactation on increasing power of learning and memory in adult offspring. *IJBMS* 2003; 6(3): 207-211 (Persian).
- 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.
- Estelami N, Khalaj-Kondori M, Sheikhzadeh-Hesari F, Hosseini-Feizi M. Aqueous Extract of Frankincense Impedes Aluminum

- 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, Nakhband A, Rahmati-Yamchi M. *Boswellia serrata* gum resin aqueous extract upregulates BDNF 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 Herten LS, Plattner F, Giese KP. α CaMKII 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.