مقاله پژوهشی

بررسی کمی بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین IV با تاثیر عصاره الکلی کندر در رده سلولی PC12

آسیه جبلی[1]، محمد خلج کندری[1*]، مرتضی بنیادی[1]، محمدعلی حسینپور فیضی[1]، محمد رحمتی یامچی[2و3]

۱- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳- مرکزتحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: حافظه بلندمدت وابسته به سنتز پروتئین می‌باشد. محصول ژن *Camkiv* با فعال کردن پروتئین‌های حافظه، آن را تقویت می‌کند. تیمار حیوانات آزمایشگاهی نیز با کندر منجر به تقویت حافظه و بهبود آلزایمر می‌شود. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره الکلی کندر در بیان *Camkiv* در سلول‌های PC12 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سمیت کندر بر زیستایی سلول‌ها با آزمون MTT بررسی شد. سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰ ، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، سلول‌ها با غلظت‌های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در زمان‌های فوق تیمار شدند. RNA استخراج شده به cDNA تبدیل شد و واکنش real-time PCR انجام یافت.

نتایج: مرگ سلولی با افزایش زمان و غلظت تیمار با عصاره افزایش یافت. مقادیر IC50 به‌دست‌آمده برای تیمارهای ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۷۱.۰۱، ۵۲.۹۵، ۲۱.۰۵ و ۱۳.۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. علاوه‌براین، غلظت‌های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره، ۲۴ ساعت پس از تیمار منجر به افزایش معنی‌دار بیان *Camkiv* شد. در تیمار ۴۸ ساعت، حداکثر بیان *Camkiv* مشاهده شد. تأثیر کندر در افزایش بیان ژن تا ۷۲ ساعت پایدار بود.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی کندر می‌تواند بیان *Camkiv* را به‌طور قابل‌توجه و طولانی‌مدت افزایش دهد. این نتایج در راستای مطالعات قبلی می‌باشد که نشان دادند کندر بیان *Bdnf*، ژن پایین‌دست *Camkiv*، را افزایش می‌دهد. بااین‌وجود، با توجه به وجود مسیر دوطرفه در تنظیم بیان *Bdnf* و *Camkiv* نیاز به مطالعات جامع‌تری برای شناخت مکانیسم دقیق عملکرد کندر در مغز می‌باشد.

کلمات کلیدی: عصاره الکلی کندر، ژن *Camkiv*، سلول‌های PC1

مقدمه

حافظه و یادگیری نتیجه میان کنش بین ژن ها و محیط می باشد. منظور از حافظه، کسب دانش، ذخیره سازی و بازیابی آن می باشد و یادگیری کسب اطلاعات از محیط اطراف را شامل می شود. حافظه انواع مختلفی دارد که از نظر مدت زمان بقا و پایداری متفاوت بوده و از چند ثانیه/دقیقه تا پایان عمر متغیر می باشند. حافظه کوتاه مدت (STM) از چند دقیقه تا چند ساعت پایدار بوده و با تغییرات کوالانسی مولکول های سیناپسی از پیش موجود مانند فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون آنزیم ها، گیرنده ها و کانال های یونی همراه می باشد. در مقابل، حافظه بلند مدت (LTM) چندین روز دوام داشته و با رشد سیناپس های جدید و بازسازی سیناپس های قبلی ارتباط دارد. بنابراین

***نویسنده مسئول: محمد خلج کندری**، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
Email: khalaj@tabrizu.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-9231-889X

LTM، برخلاف STM، نیازمند رونویسی و ترجمه پروتئین های جدید می باشد (۱, ۲). انتقال اطلاعات از STM به LTM تثبیت گفته می شود. مختل شدن فرایند تثبیت که در بیماری های نوروژنیک رخ می دهد، مانع از به یاد آوردن اتفاقات گذشته خواهد شد (۳). مرکز اصلی حافظه و یادگیری بویژه LTM هیپوکامپ می باشد. نورون های هیپوکامپ مدت زمان کوتاهی پس از فعال شدن می توانند قدرت اتصالات خود را تغییر دهند. این پدیده که نیرومند سازی طولانی مدت (LTP) نامیده می شود و می تواند برای چندین ساعت و یا حتی چندین روز ادامه داشته باشد، مکانیسم مهمی در یادگیری و LTM است (۴, ۵).

ژن های متعددی شناسایی شده اند که بیان آن ها در مغز به تقویت LTP و در نتیجه تشکیل LTM کمک می کند. ژن کدکننده پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین IV (*Camkiv*) بطور عمده در هیپوکامپ بیان شده و پروتئین سرین/ترئونین کینازی کد می کند که بطور غالب در هسته نورون های هیپوکامپ یافت می شود. CaMKIV با اتصال کلسیم/کالمودولین و فسفریلاسیون توسط آنزیم CaMKK فعال می شود. نتیجه فسفریلاسیون با آنزیم CaMKK فعال سازی طولانی مدت CaMKIV، حتی در غیاب کلسیم، است. هم چنین مشخص شده است که خودفسفریلاسیون دمین مهاری در CaMKIV باعث می شود اثر مهاری این دمین حذف شده و پروتیئن CaMKIV بعنوان سوبسترای CaMKK در دسترس قرار گیرد (۶, ۷). در هسته، CaMKIV پروتئین های متعددی ازجمله فاکتور رونویسی اصلی حافظه، CREB، را فسفریله کرده و از این طریق بیان ژن‌های پایین‌دست آن را فعال می‌کند. CaMKIV از طریق رونویسی وابسته به CREB منجر به رشد دندریت‌های نورونی، پاسخ های سیناپسی و در نهایت تقویت LTP می‌شود (۸, ۹). علاوه براین، CaMKIV با تنظیم رونویسی پروتئین Bcl-2 تاثیر ضد آپوپتوزی در سلول های نورونی دارد (۱۰).

با وجود پیشرفت های چشمگیر در طب مدرن، طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی در جهت تقویت و درمان شرایط مختلف از جمله حافظه و یادگیری همچنان از توجه بالایی برخوردار می باشد (۱۱). کندر صمغ حاصل از درخت و بوته های خانواده بورسراسه (*Burseraceae*) می باشد که از گذشته تاکنون در زمینه تجاری و پزشکی مورد استفاده قرار می گیرد. اهمیت کندر از نظر تجاری، در تهیه عطر و بخور و از نظر پزشکی در مهار خونریزی های داخلی، درمان کبودی های سطحی و بیماری های التهابی از جمله آرتریت و آسم می باشد (۱۲, ۱۳). علاوه بر این، مطالعات فیزیولوژیکی اخیر نشان دادند کندر در تقویت حافظه نیز نقش مهمی ایفا می کند. تجویز عصاره های آبی و هیدروالکلی کندر موجب بهبود حافظه فضایی موش های بالغ می شود (۱۴). هم چنین، مصرف عصاره کندر در دوران بحرانی رشد و نمو دستگاه عصبی جنین و نوزادان موش های صحرایی تاثیر قابل توجهی در تقویت حافظه آن ها نشان می دهد (۱۵). در سطح مولکولی نیز، عصاره کندر در تنظیم بیان ژن فاکتور نوروتروفیک حاصل از مغز (*Bdnf*) دخالت دارد. محصول این ژن با مشارکت در انتقال سیناپسی نقش مهمی در تشکیل حافظه و یادگیری ایفا می‌کند (۱۶). رونویسی پروتئین BDNF توسط فاکتور رونویسی CREB صورت می گیرد و همانطور که قبلا ذکر شد CaMKIV باعث فعال شدن CREB می شود. بنابراین *Bdnf* یکی از ژن های پایین دست مسیر CaMKIV-CREB می باشد که بیان آن در موش های صحرایی دریافت کننده کندر افزایش قابل ملاحظه ای نشان می دهد (۱۷).

با توجه به اطلاعات حاصل از مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی انجام شده در جهت شناخت اهمیت کندر در تقویت حافظه، هدف این پژوهش بررسی تاثیر عصاره الکلی کندر در بیان ژن *Camkiv* در رده سلولی PC12 می باشد. رده سلولی PC12 مشتق شده از فئوکروموسیتوم موش صحرایی است که بعلت داشتن انتقال دهنده های عصبی دوپامین و نورآدرنالین مشابه نورون ها بوده و به این جهت در مطالعات عصبی بعنوان سلول مدل استفاده می شود (۱۸).

مواد و روش‌ها

تهیه مواد: رده سلولی PC12 از بانک سلولی پاستور ایران، کندر از شرکت Mother Herbs (هند)، محیط کشت RPMI، سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین ۱۰۰X از شرکت گیبکو (آمریکا)، ایزوپروپانول، اتانول و کلروفرم از شرکت مرک (آمریکا)، آنزیم رونوشت بردار معکوس، آنزیم مهارکننده ریبونوکلئاز، پرایمر رندوم هگزامر و دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) از شرکت ترموفیشر (آمریکا)، کیت real-time PCR حاوی رنگ فلورسنت SYBR® Green از شرکت امپلیکون (انگلستان) و سایر مواد از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردید.

نگه داری و کشت سلول های PC12: سلول‌های PC12 در فلاسک T25 و در محیط کشت RPMI غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین کشت یافتند و در انکوباتور ۳۷ °C حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت نگه‌داری شدند. در مواردی که نیاز به جدا کردن سلول ها از فلاسک بود، به دلیل حساسیت سلول‌های PC12 به تریپسین، از روش مکانیکی و اسکراپر استفاده شد. جهت بررسی کلی زیستایی سلول ها و احتمال آلودگی آن ها، فلاسک های کشت سلولی بطور روزانه با میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفتند و در موارد موردنیاز برای اطمینان از رشد مناسب سلول ها، با استفاده از تریپان بلو و لام نئوبار تعداد دقیق سلول های مرده و زنده مشخص شد.

تهیه عصاره الکلی کندر: پودر کندر از طریق کوبیدن قطعات کندر با هاون به دست آمد. ۵۰ گرم از پودر آماده شده در ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. محلول حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگه داری شد و سپس در دور ۱۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با استفاده از دستگاه سوکسله تبخیر شد و در نهایت ترکیب چسبنده ای به دست آمد. این ترکیب چسبنده در حلال آلی دی متیل سولفوکساید ۰.۱ درصد حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ °C نگه‌داری شد.

بررسی میزان سمیت عصاره الکلی کندر بر زیستایی سلول‌ها: به منظور بررسی تاثیر عصاره الکلی کندر بر زیستایی سلول های PC12 از نمک تترازولیوم (آزمون MTT) استفاده شد. نمک تترازولیوم پودری زرد رنگ است که توسط آنزیم های میتوکندریایی سلول های زنده احیا شده و تشکیل رسوب بنفش رنگ نامحلول فورمازان می دهد (۱۹). برای انجام این آزمون، سلول های PC12 توسط لام نئوبار شمارش شده و با دانسیته 10^4 سلول به ازای هر چاهک در پلیت ۹۶ چاهکی کشت یافتند. باگذشت ۲۴ ساعت و پس از اطمینان از اتصال سلول‌ها به پلیت، سلول ها با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره الکلی کندر و به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C تیمار شدند. از سلول‌هایی که با عصاره الکلی کندر تیمار نشده بودند، به‌عنوان سلول‌های کنترل استفاده شد. برای هر غلظت عصاره و نیز برای سلول های کنترل ۳ چاهک در نظر گرفته شد. طی زمان انکوباسیون، سلول ها مورد بررسی قرار گرفتند تا از چگونگی رشد سلول ها و عدم آلودگی آنها اطمینان حاصل شود. پس از گذشت بازه های زمانی مربوطه، ۲۰ میکرولیتر از محلول آماده شده MTT به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C نگه داری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، محیط رویی هر چاهک تخلیه شد و به جای آن ۱۵۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید اضافه شد. پلیت به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه شیکر به آهستگی تکان داده شد تا کریستال های تشکیل شده حل شوند و پس از آن، میزان جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Elisa reader (شرکت BioTek، آمریکا) اندازه گیری شد. میزان سمیت ایجاد شده در هر غلظت عصاره از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد سمیت} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب سلول های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب سلول های کنترل}} \times 100$$

$$\text{درصد زیستایی} = 100 - \text{درصد سمیت}$$

تیمار سلول‌ها با عصاره الکلی کندر جهت مطالعات بیان ژن *Camkiv*: سلول های PC12 پس از شمارش توسط لام نئوبار با دانسیته 4×10^5 سلول/ به ازای هر چاهک در پلیت ۶ چاهکی کشت یافتند. ۲۴ ساعت پس از کشت و اطمینان از چسبیدن سلول ها به پلیت، سلول ها با غلظت های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره الکلی در چهار بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. در این بازه های زمانی، سلول ها در انکوباتور دمای ۳۷ °C نگه داری شدند. از سلول‌های تیمار نشده با عصاره الکلی به‌عنوان سلول‌های کنترل استفاده شد. طی زمان انکوباسیون، سلول ها از نظر رشد و عدم آلودگی بطور مرتب مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA تام: با گذشت بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، محلول رویی هر چاهک با محلول RNX-PLUS تعویض شد. با پیپتاژ آهسته، سلول‌ها از پلیت جدا شده و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اتوکلاو شده انتقال یافتند. محلول سلولی حاصل با کلروفرم ترکیب شده و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در این مرحله، محلول رویی به میکروتیوب جدیدی انتقال یافته و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. رسوب RNA با اتانول ۷۵ درصد سرد شستشو داده شد و در نهایت در آب عاری از ریبونوکلئاز حل شد. کیفیت RNA استخراج‌شده توسط ژل آگارز بررسی شد و غلظت آن با نانودراپ

اندازه گیری شد. RNA استخراج شده سپس توسط آنزیم DNaseI تیمار شد تا آلودگی احتمالی DNA از بین رفته و RNA خالص برای سنتز cDNA استفاده شود.

واکنش رونوشت برداری معکوس: در این مرحله، ابتدا RNA تام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه شد تا ساختارهای ثانویه آن حذف شود، سپس ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA با استفاده از پرایمرهای رندوم هگزامر به cDNA تبدیل شد. به این منظور یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس (۲۰۰ یونیت/میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر بافر آنزیم رونوشت بردار معکوس (5X)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم مهارکننده ریبونوکلئاز (۴۰ یونیت/میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر رندوم هگزامر (۱۰۰ میکرومولار) و ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) استفاده شد و محلول حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C انکوبه شد.

بررسی بیان ژن *Camkiv*: میزان بیان ژن *Camkiv* در سلول های تیمار شده و کنترل با استفاده از تکنیک real-time PCR بررسی شد. طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس مورد استفاده جهت تکثیر ژن *Camkiv* (NM_012727.3) و *Gapdh* (NM_017008.4) (کنترل داخلی) با نرم‌افزار Oligo7 و وب سایت Primer3 (آمریکا) صورت گرفت. جهت اطمینان از عدم تکثیر آلودگی احتمالی DNA، آغازگرها در هر دو ژن برای اگزون های متفاوت ژن طراحی شدند. سپس، با استفاده از آزمایش سریال غلظت، میزان غلظت بهینه cDNA و آغازگرهای مربوط به هر ژن به طور مجزا مشخص شد. آغازگرهای مورداستفاده در واکنش real-time PCR برای ژن *Camkiv* شامل آغازگر مستقیم با توالی 5´-AAGCAGCCAACTTTGTCCAC-3´ و آغازگر معکوس با توالی 5´-TGTCTTGTCCTTGCCGTCTTG-3´ و برای ژن *Gapdh* شامل آغازگر مستقیم با توالی 5´-CATAGACAAGATGGTGAAGGTCG-3´ و آغازگر معکوس با توالی 5´-CCGTGGGTAGAGTCATACTGG-3´ می باشد. واکنش های real-time PCR با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در دستگاه Rotor-Gene™ 6000 (شرکت Corbett Life Science، استرالیا) و با استفاده از کیت real-time PCR (۲x)، cDNA رقیق شده (رقت $^1/_{10}$) و آغازگرهای اختصاصی ژن *Camkiv* و *Gapdh* (۱۰ پیکومول) انجام گرفت. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه با سه مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه بود. اختصاصی بودن واکنش ها با آنالیز دمای ذوب محصولات PCRصورت گرفت. در نهایت، نتایج حاصل از این واکنش ها با روش $^{-\Delta CT}$۲ مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان نسبی به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تعیین غلظت موثر کشنده (IC50) عصاره در زمان های مختلف، از پارامتر رگرسیون غیرخطی با شیب متغیر از نسخه ۶ نرم‌افزار GraphPad Prism (آمریکا) استفاده شد. تحلیل نتایج Real-time PCR با آزمون T.test student در نسخه ۱۹ نرم‌افزار SPSS (آمریکا) با p-value زیر ۰.۰۵ بعنوان سطح معناداری صورت گرفت. جهت رسم نمودارهای مربوط به نتایج آزمون زیستایی و real-time PCR از برنامه Excel استفاده شد. نتایج آزمون زیستایی و real-time PCR به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد نمایش داده شد.

نتایج

درصد سلول های مرده به دنبال افزایش غلظت و زمان تیمار با عصاره الکلی کندر افزایش یافت:

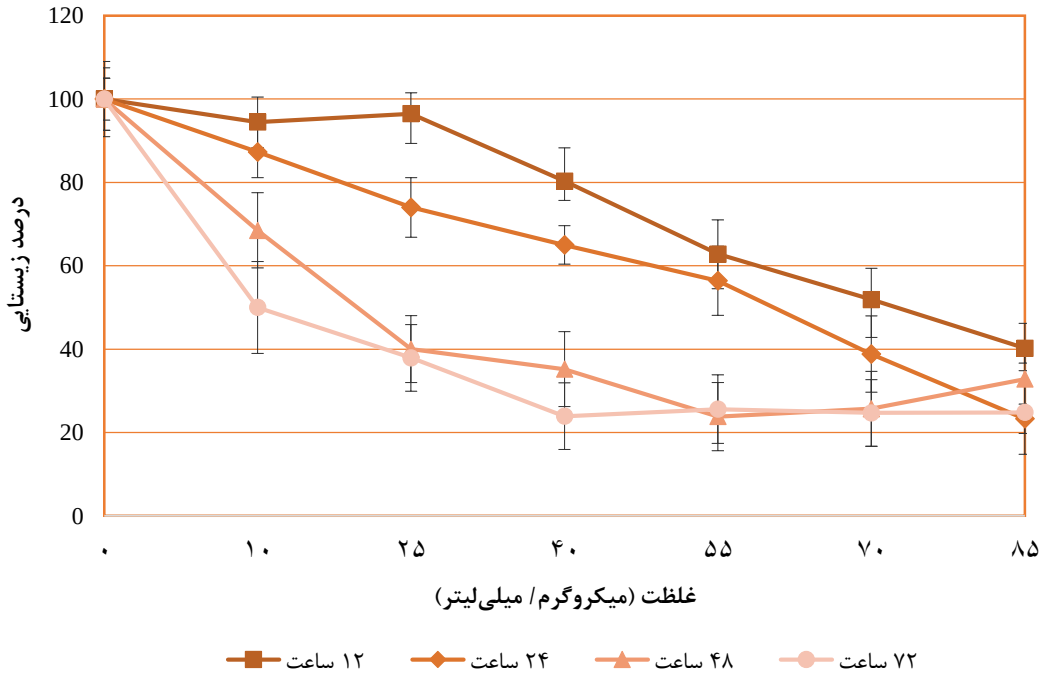
جهت بررسی تاثیر عصاره الکلی کندر بر بقا و زیستایی سلول های PC12 از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام این آزمون، سلول ها در چهار بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با پنج غلظت مختلف ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره الکلی کندر تیمار شدند. سلول های تیمار نشده با عصاره الکلی به عنوان نمونه کنترل در هر بازه زمانی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه فقط سلول های زنده و دارای فعالیت متابولیک قادر به تشکیل رسوب رنگی می باشند، بنابراین می توان با آزمون MTT به سادگی سلول های مرده و زنده را از هم تشخیص داد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد میزان زیستایی سلول ها بصورت تابعی از غلظت و زمان تیمار با عصاره الکلی کندر کاهش یافت. بیشترین تاثیر کشندگی عصاره در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. در این دو بازه زمانی چهار غلظت ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره منجر به مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول ها شد. در صورتی که در بازه زمانی ۲۴ ساعت، فقط دو غلظت ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره باعث مرگ قابل توجه سلول ها شد. علاوه بر این، کمترین اثر کشندگی عصاره الکلی در بازه زمانی ۱۲ ساعت مشاهده شد که فقط در تیمار با غلظت ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره ۶۰

درصد سلول های PC12 مرده و فاقد فعالیت متابولیکی بودند (نمودار ۱). غلظت های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در همه بازه های زمانی مرگ کمتر از ۵۰ درصد سلول های PC12 را باعث شدند. این امر نشان می دهد عصاره در غلظت های پایین برای سلول ها قابل تحمل می باشد.

مقادیر IC50 عصاره الکلی کندر که از نتایج آزمون MTT برای هر بازه زمانی به دست آمد، در جدول ۱ قابل مشاهده می باشد. طبق نتایج حاصل از آزمون MTT، جهت اجتناب از تاثیرات سمی عصاره و مقایسه تاثیر غلظت های مختلف آن، از غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر که IC50 کمتر از ۵۰ درصد داشت و غلظت ده برابر رقیق تر آن، ۲ میکروگرم/میلی لیتر، در مطالعات بیان ژن استفاده شد.

عصاره الکلی کندر منجر به افزایش قابل توجه بیان ژن *Camkiv* در سلول های PC12 شد:

جهت بررسی تاثیر عصاره الکلی کندر بر بیان ژن *Camkiv*، سلول های PC12 با غلظت های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره الکلی در چهار بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و میزان بیان ژن با تکنیک real-time PCR



نمودار۱. بررسی افزایش میزان مرگ سلول های PC12 با افزایش غلظت و زمان تیمار با عصاره الکلی کندر. به منظور بررسی تاثیر عصاره بر بقا و مرگ سلول ها، از آزمون MTT استفاده شد. سلول های PC12 در پلیت ۹۶ چاهکی کشت یافتند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول ها با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره الکلی به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد عصاره الکلی کندر بصورت تابعی از غلظت و زمان، بقای سلول ها را کاهش می دهد. کمترین اثر کشندگی عصاره الکلی کندر در بازه زمانی ۱۲ ساعت و فقط برای غلظت ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و بیشترین اثر کشندگی در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت برای ۴ غلظت ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره گزارش شد.

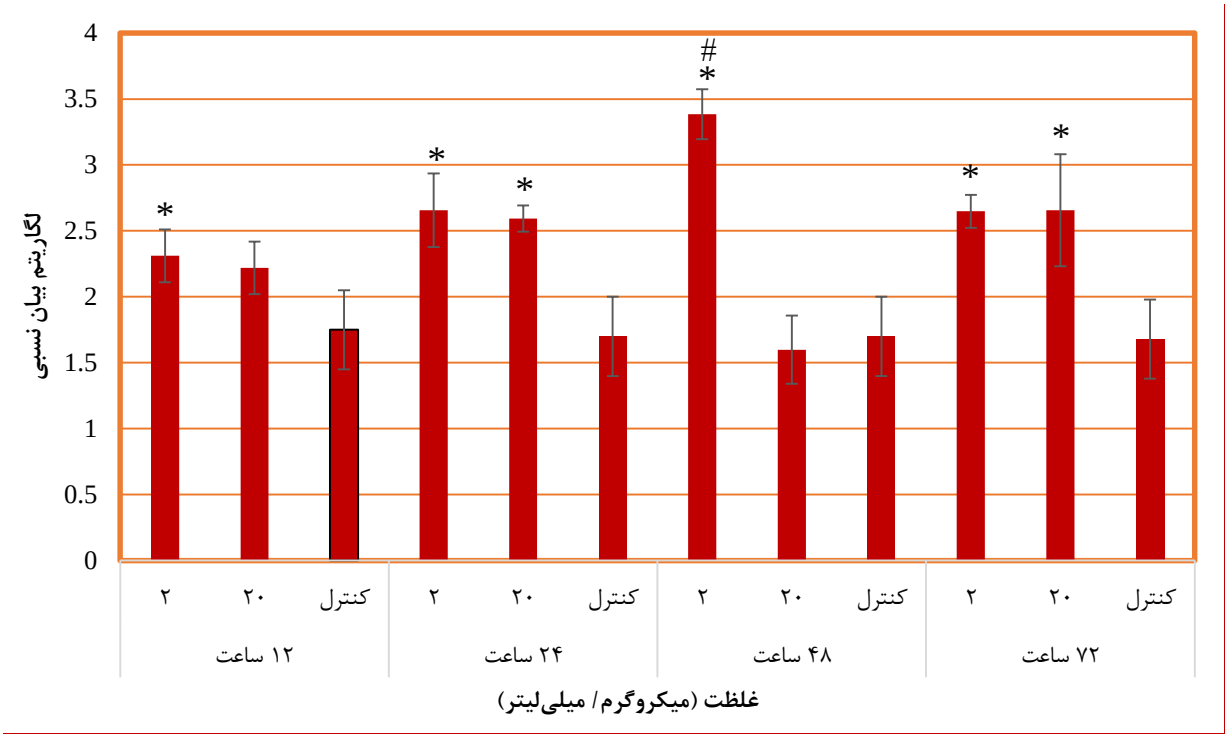
جدول ۱. مقادیر IC50 به دست آمده از آزمون MTT برای عصاره الکلی کندر

زمان تیمار	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
غلظت عصاره (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۷۱/۰۱	۵۲/۹۵	۲۱/۰۵	۱۳/۸۵

ارزیابی شد. از سلول‌های تیمار نشده با عصاره الکلی نیز به‌عنوان سلول‌های کنترل استفاده شد. میزان بیان ژن *Camkiv* نسبت به بیان *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی نرمال سازی شد.

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود، هر دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره، در مقایسه با نمونه کنترل، منجر به افزایش بیان ژن *Camkiv* در بازه زمانی ۱۲ ساعت شد که این افزایش برای غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر معنادار بود (p-value<۰/۰۵). افزایش بیان مشاهده شده در بازه زمانی ۱۲ ساعت تا ۲۴ ساعت پس از تیمار ادامه یافت. علاوه بر این، شدت بیان در این بازه زمانی بیشتر از محدوده زمانی ۱۲ ساعت بود، بطوریکه در این بازه زمانی تفاوت معناداری بین هر دو نمونه تیمار شده با نمونه کنترل مشاهده شد (p-value< ۰/۰۵). افزایش بیان ژن *Camkiv* در ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر به بیشترین مقدار خود رسید و تفاوت قابل توجهی با میزان بیان نمونه کنترل و غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نشان داد (p-value<۰/۰۵). با این وجود با عبور از بازه زمانی ۴۸ به ۷۲ ساعت تغییرات در بیان ژن برای غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر سیر نزولی نشان داد. این نتایج نشان می دهد که غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در یک الگوی وابسته به زمان میزان بیان ژن *Camkiv* را از بازه زمانی ۱۲ ساعت تا ۴۸ ساعت افزایش می دهد. با این وجود، با گذر از محدوده زمانی ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت، بیان *Camkiv* پس از رسیدن به حداکثر مقدار خود در ۴۸ ساعت سیر کاهشی پس از تیمار ۷۲ ساعته نشان می دهد.

اگرچه الگوی بیانی مشاهده شده برای غلظت های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در هر دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت مشابه می باشد، در بازه های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت تغییرات حاصل در بیان ژن برای دو غلظت مذکور عکس هم است. به عبارت دیگر، ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره مقدار بیان ژن *Camkiv* در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش قابل توجهی



نمودار ۲. بررسی تغییرات بیان ژن *Camkiv* در سلول های PC12 پس از تیمار با عصاره الکلی کندر. تغییرات بیان ژن پس از تیمار با دو غلظت ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در هر چهار بازه زمانی با استفاده از تکنیک real-time PCR بررسی شد. طبق نتایج حاصل از این آزمایش، در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت میزان بیان ژن *Camkiv* در هر دو غلظت عصاره بیشتر از نمونه کنترل بود. این افزایش بیان برای غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در ۴۸ ساعت پس از تیمار نیز ادامه یافت و به حداکثر رسید. در صورتی که در همین محدوده زمانی میزان بیان ژن *Camkiv* در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تقریبا مشابه با نمونه کنترل بود. ۷۲ ساعت پس از تیمار تغییرات بیان ژن در دو غلظت در جهت عکس هم صورت گرفته و در نهایت در سطح یکسانی قرار گرفتند. * p-value< ۰/۰۵ در مقایسه با نمونه کنترل. # p-value< ۰/۰۵ بین دو گروه تیمار شده در یک بازه زمانی

نسبت به غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر نشان داد (p-value<۰/۰۵) و میزان بیان در این غلظت تقریبا مشابه با نمونه کنترل بود. ۷۲ ساعت پس از تیمار مقدار بیان در غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، برخلاف غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر، افزایش یافت، بطوری که میزان بیان برای هر دو غلظت در این بازه زمانی تقریبا مشابه با هم بود. بطور خلاصه، می توان نتیجه گرفت میزان بیان مشاهده شده در همه بازه های زمانی، به جز ۴۸ ساعت، برای غلظت های ۲ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره تقریبا مشابه بود و تفاوت معناداری بین آن ها گزارش نشد (p-value>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

عمده مطالعات مربوط به نقش کندر در تقویت حافظه در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است. براساس این مطالعات، تاثیرات مثبت کندر بر حافظه هم در مغز طبیعی و هم در مغز دارای اختلال حافظه گزارش شده است (۲۰, ۲۱). کندر تاثیر لیپوساکارید باکتری های گرم منفی را در مهار بازیابی حافظه خنثی می کند. این نوع لیپوساکارید منجر به التهاب نورون ها شده و با افزایش دادن مقدار TNF-α هیپوکامپ، بازیابی حافظه را مختل می کند. عصاره هیدروالکلی کندر در موش های صحرایی تیمار شده با لیپوساکارید، مقدار TNF-α هیپوکامپ را کاهش داده و بازیابی حافظه را بهبود می بخشد. عصاره الکلی کندر قادر است التهاب نورونی مشاهده شده در موش های صحرایی مبتلا به بیماری آلزایمر را نیز سرکوب کند. این تاثیرات به علت ویژگی ضد التهاب نورونی کندر می باشد (۲۲, ۲۳). مطالعات فیزیولوژیکی نشان داده اند که تاثیر کندر در حافظه بعلت تغییرات ساختاری در مدارهای عصبی مغز می باشد. تیمار موش های صحرایی باردار با عصاره کندر منجر به افزایش قابل توجه شاخه ای شدن دندریت ها و اندازه اجسام نورونی در هیپوکامپ و تقویت حافظه و یادگیری زاده های آن ها می شود (۲۴). مصرف عصاره کندر در دوران شیردهی توسط موش صحرایی مادر باعث افزایش حجم لایه های سلولی شکنج دندانه ای و هرمی هیپوکامپ و بزرگ شدن حجم جسم سلولی نورون های این بخش در موش های صحرایی جوان می شود. علاوه براین، مصرف طولانی مدت کندر تعداد شاخه های دندریتی و طول دندریت های نورون های ناحیه هیپوکامپ موش های صحرایی پیر را نیز افزایش می دهد (۲۵, ۲۶).

در بعد مولکولی، کندر می تواند پروتئین کینازهای مختلف را فعال کند. پروتئین کینازها نقش مهمی در حفظ تغییرات سیناپسی ایجاد شده بر عهده دارند. پروتئین کیناز A با تاثیر مستقیم بر وزیکول ها و پایانه های عصبی و همچنین وارد شدن به هسته سلولی و فعال کردن مسیر پیام‌رسان فاکتور رونویسی CREB، باعث آغاز آبشاری بیان ژن های درگیر در تشکیل LTM می شود. این پروتئین های تولید شده منجر به افزایش طولانی مدت در میزان انتقال دهنده های عصبی آزاد شده در سیناپس ها شده و با افزایش شکل گیری ارتباطات سیناپسی به تشکیل حافظه کمک می کنند (۲۷). هم چنین، کندر با مهار افزایش بیان ژن پروتئین پیش ساز بتا آمیلوئید که شاخصه بیماری آلزایمر می باشد، تاثیر درمانی خود را در این بیماری نشان می دهد (۲۸).

با توجه به این اطلاعات، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عصاره الکلی کندر در بیان ژن *Camkiv* در رده سلولی PC12، رده سلولی مدل برای مطالعات عصبی و نورونی، می باشد. مطالعه حاضر نشان می دهد عصاره الکلی کندر می تواند بیان ژن *Camkiv* را بطور قابل توجهی افزایش دهد. افزایش بیان مشاهده شده در ژن *Camkiv* به دنبال تیمار با کندر در مقایسه با نمونه کنترل مدت زمان طولانی، ۷۲ ساعت پس از تیمار، دوام داشت که نشان دهنده تاثیر طولانی مدت کندر در بیان این ژن می باشد. با این وجود، برخلاف غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره که بیشترین میزان بیان را ۴۸ ساعت پس از تیمار ایجاد کرد، بیان حاصل از غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در این بازه زمانی دچار کاهش ناگهانی شد که احتمالا به علت تاثیر مهاری غلظت بالای عصاره است. ظاهرا تاثیر مهاری غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۷۲ ساعت پس از تیمار تعدیل شده است. به جز بازه زمانی ۴۸ ساعت، در سایر بازه های زمانی میزان بیان مشاهده شده برای ژن *Camkiv* در هر دو غلظت عصاره تقریبا مشابه بوده و تفاوت معناداری نداشت.

نتایج حاصل از این پژوهش در راستای نتایج حاصل از مطالعات قبلی می باشد که نشان دادند کندر بر تقویت حافظه و بهبود/پیشگیری بیماری های مربوط به حافظه مثل آلزایمر، ام اس و نقایص حافظه‌ی حاصل از کم کاری تیروئید تاثیر مثبتی دارد (۲۹, ۳۰). علاوه بر این، خلج و همکاران (۱۷) نشان دادند عصاره آبی کندر بیان ژن *Bdnf* را بطور قابل ملاحظه ای در موش های صحرایی افزایش می دهد. موسیف و همکاران (۳۱) نیز تاثیر

ایسنسول استات، یکی از ترکیبات فعال کندر، را در تنظیم بیان ژن *Bdnf* ارزیابی کردند. طبق نتایج حاصل از مطالعه آن ها، اینسنسول استات قادر است بیان رونوشت های خاصی از ژن *Bdnf* را در هیپوکامپ موش افزایش دهد. *Bdnf* یکی از ژن های پایین دست مسیر CREB بوده و بیان آن توسط این فاکتور رونویسی تنظیم می شود. از سوی دیگر پروتئین CaMKIV با فسفریلایون CREB به فعال شدن این پروتئین کمک می کند (۳۲). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر مشخص شد کندر می تواند بیان ژن *Camkiv* را افزایش دهد، بنابراین می توان نتیجه گیری کرد افزایش بیان گزارش شده در ژن *Bdnf* در دو مطالعه اشاره شده (۱۷, ۳۱) می تواند به علت افزایش بیان ژن *Camkiv* و در نتیجه فعال شدن مسیر پیام‌رسان CaMKIV→CREB→BDNF باشد.

علاوه بر این، گزارشات دیگری وجود دارد که نشان می دهد در کنار تنظیم بیان ژن *Bdnf* توسط CREB، BDNF نیز می تواند فسفریلاسیون و فعالسازی CREB را حداقل از طریق دو مسیر پیام‌رسان تحریک کند: اول، مسیر تنظیم شده با CaMKIV و دوم، مسیر وابسته به Ras. با توجه به اینکه CaMKIV جهت فعال شدن به جریان کلسیم و القا کمپلکس کلسیم/کالمودولین نیاز دارد، بنابراین، BDNF برای فعال کردن این آنزیم بایستی جریان کلسیم را القا کند. به نظر می رسد BDNF از طریق فعال کردن کانال یونی جریان کلسیم را تنظیم می کند (۳۳, ۳۴). افزایش مقدار کلسیم داخل سلولی در پاسخ به تیمار نورون ها با BDNF، وابسته به جریان کلسیم از منابع ذخیره ای سلول بوده و این مسیر برای فسفریلاسیون CREB و رشد بهبود یافته آکسونی ضروری است. بنابراین، با این مکانیسم BDNF قادر به فعال کردن CREB نیز می باشد (۳۳). BDNF هم چنین با فعال سازی مسیر Ras/ERK/RSK فسفریلاسیون CREB را تحریک می‌کند. بنابراین، فعال شدن CaMKIV همزمان و به موازات سایر پروتئین کینازهای مسیر CREB-BDNF مثل PKA و ERK می باشد که مجموع آن ها باعث فسفریلاسیون و فعال شدن CREB می شود. این امر نشان می دهد چندین مسیر برای تنظیم تاثیر نوروتروپین هایی مثل BDNF در مغز وجود دارد (۳۴, ۳۵). بنابراین، به نظر می رسد نیاز به مطالعه جامعی باشد تا بیان دو ژن *Bdnf* و *Camkiv* بطور همزمان مورد بررسی قرار گیرد تا مسیر اصلی در تنظیم بیان *Bdnf* و *Camkiv* در نمونه های کنترل و تیمار شده با کندر مشخص شود.

در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد عصاره الکلی کندر می تواند بیان ژن *Camkiv* را به طور قابل توجهی افزایش دهد که با نتایج حاصل از مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی قبلی انجام شده در این زمینه سازگار است. علاوه بر این، مطالعه حاضر بیانگر طولانی مدت بودن تاثیر کندر در تنظیم بیان ژن می باشد. با توجه به اینکه ژن *Camkiv* یکی از ژن های مهم حافظه بوده و در شکل گیری LTM نقش دارد، نتایج این مطالعه می تواند گامی در جهت شناخت بیشتر مکانیسم های مولکولی تاثیر کندر در تقویت حافظه باشد. با این وجود، به بررسی های بیشتری جهت مطالعه تفاوت غلظت های مختلف کندر در تنظیم مسیرهای مولکولی حافظه نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز و هم چنین مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه اجرای رساله با شماره ثبت ۲۴۲۷۳۶۰ را تامین کردند، کمال تشکر و سپاس را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Josselyn SA, Nguyen PV. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2005;4(5):481-497.

2. Stork O, Welzl H. Memory formation and the regulation of gene expression. CMLS. 1999;55(4):575-592.

3. Isokawa M. Cellular signal mechanisms of reward-related plasticity in the hippocampus. Neural Plast. 2012;2012(1):1-18.
4. Zhang Y, Lin R, Tao J, Wu Y, Chen B, Yu K, et al. Electroacupuncture improves cognitive ability following cerebral ischemia reperfusion injury via CaM-CaMKIV-CREB signaling in the rat hippocampus. Exp Ther Med. 2016;12(2):777-782.
5. Evans DC. Bottlenecks: Aligning UX Design with User Psychology. 1st ed. Berkeley, CA: Apress; 2017. P. 95-102.
6. Soderling TR, Stull JT. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. Chem Rev. 2001;101(8):2341-2352.
7. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. J Neurochem. 2017;141(6):808-818
8. Nagendran T, Hardy LR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV mediates distinct features of basal and activity-dependent dendrite complexity. Neurosci. 2011;199(1):548-562.
9. 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.
10. Kokubo M, Nishio M, Ribar TJ, Anderson KA, West AE, Means AR. BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. J Neurosci. 2009;29(28):8901-8913.
11. 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(1):25-37.
12. Michie CA, Cooper E. Frankincense and myrrh as remedies in children. JRSM. 1991;84(10):602-605.
13. Lad V, Frawley D. The yoga of herbs: an Ayurvedic guide to herbal medicine. 2 nd ed. Colorado: Lotus Press; 1986. P. 50-55.
14. Farshchi A, Ghiasi G, Farshchi S, Malek Khatabi P. Effects of boswellia papyrifera gum extract on learning and memory in mice and rats. IJBMS. 2010;13(2):9-15.
15. Hosseini-Sharifabad M, E E. Effect of Boswellia serrata gum resin on the morphology of hippocampal CA1 pyramidal cells in aged rat. Anat Sci Int. 2015;90(1):47-53.
16. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Reviews: BDNF and memory formation and storage. Neuroscientist. 2008;14(2):147-156.
17. 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.
18. Westerink R, Ewing A. The PC12 cell as model for neurosecretion. Acta Physiol. 2008;192(2):273-285.
19. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119(2):203-210.
20. 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):1-11.
21. Mahmoudi A, Hosseini-Sharifabad A, Monsef-Esfahani HR, Yazdinejad AR, Khanavi M, Roghani A, et al. Evaluation of systemic administration of Boswellia papyrifera extracts on spatial memory retention in male rats. J Nat Med. 2011;65(3):519-525.
22. Beheshti S, Karimi B. Frankincense improves memory retrieval in rats treated with Lipopolysaccharide. J HerbMed Pharmacol. 2016;5(1):12-16.
23. Ahmed H, Mohamed E, El-Dsoki S. Evidences for the promising therapeutic potential of Boswellia serrata against Alzheimer's disease: pre-clinical study. Int J Pharm Pharmaceutic Sci. 2014;6(11):384-392.
24. Alaei H, Moatar F, Toori LAH, Moatar F, Toori L. Effects of the abstract of oliban on learning and memory. J Qazvin Univ Med Sci. 1999;11(3):21-28.
25. Hosseini-Sharifabad M, Esfandiari E. Effect of Boswellia serrata Triana & Planch. gum resin administration during lactation on morphology of pyramidal neurons in hippocampus of rat. J Herbal Drugs. 2011;2(1):45-52.
26. Hosseini-Sharifabad M, Esfandiari E. Effect of Boswellia serrata gum resin on the morphology of hippocampal CA1 pyramidal cells in aged rat. Anat Sci Int. 2015;90(1):47-53.
27. Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J. Targeting the CREB pathway for memory enhancers. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(4):267-277.
28. 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(4):279-286.
29. Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M, Hamidpour R. Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Frankincense (Boswellia Species): From the Selection of Traditional Applications to the Novel Phytotherapy for the Prevention and Treatment of Serious Diseases. Glob J Med Res. 2015;15(3):16-22.
30. Sedighi B, Pardakhty A, Kamali H, Shafiee K, Hasani BN. Effect of Boswellia papyrifera on cognitive impairment in multiple sclerosis. J Neurol. 2014;13(3):149-153.
31. 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(12):1584-1593.
32. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. Neuron. 2008;60(4):610-624.
33. Spencer TK, Mellado W, Filbin MT. BDNF Activates CaMKIV and PKA in Parallel to Block MAGmediated Inhibition of Neurite Outgrowth. Mol Cell Neurosci. 2008;38(1):110-116.
34. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. Neuron. 1997;19(5):1031-1047.
35. Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT. Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. Neuron. 2002;35(4):711-719.

Oiginal Article

Investigating Quantitative Analysis of the Gene Expression of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV by the Effect of Olibanum Alcoholic Extract in PC12 Cell Line

Jebelli A[1], Khalaj-Kondori M[1*], Bonyadi M[1], Hosseinpour Feizi MA[1], Rahmati-Yamchi M[2,3]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 20 Jan 2018 Accepted: 03 May 2018

Abstract

Background & Objective: Long-term memory depends on protein synthesis. The product of *Camkiv* gene promotes memory via activating its proteins. The treatment of laboratory animals by Olibanum leads to memory improvement and the recovery of Alzheimer. Therefore, the aim of this study is the evaluation of Olibanum ethanolic extract on the *Camkiv* expression in PC12 cells.

Materials & Methods: Olibanum toxicity on the cell viability was investigated by MTT test. Cells were treated with concentrations 10,25,40,55,70 and 85 µg/ml of extract in time intervals 12,24,48 and 72 hours and their absorption rate was measured. Then, cells were treated by concentrations 2 and 20 µg/ml of extract in mentioned times. Extracted RNA was converted into cDNA and real-time PCR performed.

Results: Cell death was raised by increasing time and concentration of extract treatment. IC50 values were obtained as 71.01, 52.95, 21.05 and 13.85 µg/ml in 12, 24, 48 and 72 hours of treatment, respectively. Besides, concentrations 2 and 20 µg/ml significantly increased *Camkiv* expression following 24 hour treatment. The maximum expression of *Camkiv* was observed in 48 hour treatment. The effect of Olibanum on gene upregulation was stable until 72 hours.

Conclusion: The Olibanum ethanolic extract can remarkably upregulate *Camkiv* expression for a long time. These results are consistent with the previous studies indicating the effect of Olibanum on upregulation of *Bdnf*, *Camkiv*-downstream gene. However, regarding the existence of the two-direction pathway in the expression regulation of *Bdnf* and *Camkiv*, comprehensive studies are required to determine exact mechanism of Olibanum function in the brain.

Keywords: Olibanum ethanolic extract, *Camkiv* gene, PC12 cells

***Corresponding Author: : Mohammad Khalag-Kondori,** Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Email: khalaj@tabrizu.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-9231-889X