مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ۳۱۶-۳۰۹

اثر عصاره آبی الکلی چای سبز بر بیان آکواپورین۴ در کورتکس مغز: روشی بالقوه جهت کاهش علائم ادم مغزی

هما محسنی کوچصفهانی .Ph.D[1*]، محمد نبیونی .Ph.D [2]، سیده سمیرا مرتضوی اصل MSc [1]، زهرا نظری .Ph.D.student [1]، فاطمه امیری .MSc [1]

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 دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

چکیده

هدف: آکواپورین۴ اصلی‌ترین 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 آکواپورین۴ 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 آکواپورین۴ را در کورتکس مغز کاهش دهد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش از نوع مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد. تعداد ۴۰ سر رت نژاد ویستار (۴ تا ۶ هفته‌ای) به‌طور تصادفی انتخاب شده و به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه شاهد بدون تیمار، گروه شاهد آزمایشگاهی۲۰۰ میکرولیتر سالین (حلال GTE) و گروه تجربی ۱و ۲ به‌ترتیب 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 آکواپورین۴ در هر چهار گروه به روش‌های وسترن‌بلات و ایمیونوهیستوشیمی بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از ایمیونوهیستوشیمی و وسترن بلات نشان داد که عصاره چای سبز می‌تواند به شیوه‌ی وابسته به دوز بیان آکواپورین۴ را در کورتکس مغز کاهش دهد.

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

واژگان کلیدی: چای سبز، آکواپورین۴، کورتکس مغز

مقدمه

آکواپورین‌ها کانال‌های آبی با نفوذپذیری بالا هستند که به‌طور وسیعی در بافت‌های مختلف بدن شناسایی شده‌اند (۱). آکواپورین‌ها 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 آکواپورین‌های ۱، ۴، ۹ و ۱۱ در سیستم عصبی مرکزی اثبات شده است (۳و۴). 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 آکواپورین 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 پری‌سیناپتیک نورون‌ها، گره‌های رانویه و همچنین در غشای سلولی پایانه‌های آستروسیتی مجاورنرم 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 آکواپورین ۴ در سیستم عصبی مرکزی همراه هستند (۶ و۷). Skjolding و همکارانش (۸) بیان آکواپورین۴ 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 آکواپورین ۴ در آستروسیت‌ها همراه بوده که به نقش آکواپورین‌ها در پاتوفیزیولوژی مغز اشاره دارد. Yang و همکارانش (۹) نشان دادند که در موش های دچار ادم سیتوتوکسیک حذف آکواپورین۴ منجر به کاهش میزان آب ورودی به مغز و در نتیجه کاهش اثرات مخرب ادم مغزی می‌شود. بیان بالای آکواپورین ۴ ویژگی astrocytomas می‌باشد، توموری که از آستروسیت‌ها در سیستم عصبی تشکیل شده و نفوذپذیری بالایی دارند. Saadoun و همکارانش (۱۰) و Nico و همکاران (۱۱) نشان دادند که در موش‌های فاقد آکواپورین۴ رشد تومور آهسته‌تر است. این محققین اظهار داشتند که آکواپورین۴ با تسریع روند رگ‌زایی در بافت سرطانی به مهاجرت سلول‌های توموری کمک می‌کند. این مطالعات نشان می‌دهند که بیماری‌های مختلفی با افزایش میزان آکواپورین۴ و فشار داخل جمجمه‌ای همراه هستند. به‌نظر می‌رسد با کاهش بیان آکواپورین۴ بتوان روند بهبودی این بیماری‌ها را تسریع بخشید.

چای سبز یک فراورده ساخته شده از برگ و جوانه گیاه Camellia sinensis از خانواده Theaceaeمی‌باشد که تقریبا بعد از آب پرمصرف‌ترین نوشیدنی است (۱۲). چای سبز یک چای غیر تخمیری است که آنزیم های پلی فنل اکسیداز موجود در برگ‌های تازه چای به‌وسیله 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 (۱۶-۱۴).

EGCG (Epigallocatechin gallate) فراوان‌ترین کاتچین چای سبز است و تقریبا ۵۹ درصد از کل کاتچین‌ها را شامل می‌شود و به‌نظر می‌رسد که بخش عمده فعالیت‌های بیولوژیک چای سبز مربوط به همین ترکیب باشد (۱۲و۱۷). در سال‌های اخیر چای سبز به‌دلیل خواص درمانی خود به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است. این خواص درمانی شامل تاثیرات آنتی اکسیدانتی، 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 آکواپورین۵ در رده سلولی سرطان تخمدانSKOV3 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

که احتمالا از این طریق بر فعالیت‌های عصبی اثر گذاشته و موجب حفاظت سیستم عصبی می‌شود (۲۲). به‌علاوه نشان داده شده است که چای سبز و ترکیبات جدا شده از آن به‌خصوص EGCG دارای اثرات حفاظتی در مقابل آسیب‌های ایسکمی مغزی و ضایعات نخاعی و نیز بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی می‌باشد (۲۳و ۲۴). از آنجایی‌که چای سبز دارای خاصیت ضد التهابی بوده و در بهبودی ایسکمی وادم مغزی و سایر بیماری‌هایی که مربوط به افزایش فشار داخل جمجمه‌ای سیستم عصبی مرکزی می‌باشد 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 به‌کارگیری عصاره چای سبز بیان ژن‌های آکواپورین۴ را در کورتکس مغز کاهش داد.

مواد و روش‌ها

نحوه عصاره گیری چای سبز: به‌منظور به‌دست آوردن عصاره چای سبز، ابتدا میزان یک کیلوگرم برگ‌های چای سبز در ۵ لیتراتانول ۷۰ درصد حل شده و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شد (۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد). سپس محلول حاصله توسط کاغذ صافی فیلتر شده و جهت تبخیر از دستگاه rotary evaporator استفاده شد. ماده حاصله که عصاره چای سبز می‌باشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

تیمار گروه ها با عصاره چای سبز: در تحقیق حاضر که از نوع مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد از رت های ۴ تا ۶ هفته‌ای نژاد ویستار (هر دو جنس) استفاده شد. رت‌ها به‌طور 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 به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه تجربی اول: رت‌هایی که میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز حل شده در ۲۰۰ میکرولیتر، PBS را دریافت کردند. گروه تجربی دوم: رت‌هایی که میزان ۲۰۰ میلی‌گرم 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 رت‌های گروه شاهد با غلظت‌های بالای کلروفرم کشته شده و مغز حیوانات جدا شده و به دو دسته جداگانه جهت انجام ایمیونوهیستوشیمی و وسترن بلات تقسیم شدند.

ایمیونوهیستو شیمی: به‌منظور انجام بررسی کیفی ایمیونوهیستوشیمی در هر چهار گروه تحت آزمایش (شاهد، شاهد آزمایشگاهی، تجربی۱ و تجربی۲) مغزها جدا شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. در مرحله بعد به‌ترتیب آبگیری با محلول‌های الکل با درجات صعودی، شفاف سازی با تولوئن، نفوذ پارافین، قالب‌گیری، برش گیری توسط میکروتوم و قرار دادن برش‌ها بر روی لام‌های پوشش شده با پلی‌ال-لایزین ۱ درصد انجام شد. جهت انجام ایمیونوهسیتوشیمی به‌ترتیب پارافین زدایی با زایلن، آبگیری با الکل مطلق، بلوکه کردن با محلول پراکسید هیدروژن و شستشو با آب دیونیزه انجام شد. بازیابی آنتی‌ژنی با بافر سیترات انجام شده و پس از بلوکه کردن با BSA، ۱ درصد (آلبومین سرم گاوی) آنتی بادی اولیه آکواپورین۴ (Abcam) با غلظت ۱:۲۰۰ به‌مدت ۶ ساعت در دمای اتاق روی نمونه‌های بافتی ریخته شد. پس از شستشو با PBST (Phosphate buffer –Tween saline)، یک قطره آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه (Bethyl Laboratories) حل شده در میلی‌لیتر۲ PBS به نمونه‌ها اضافه شده و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس به‌ترتیب شستشو با سوبسترای DAB (دی آمینو بنزیدین)، PBST و رنگ هماتوکسیلین انجام شد. در نهایت آبگیری نمونه‌ها با درجات صعودی الکل (۷۰ تا ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد)، لامل گذاری با چسب انتالن انجام شد. تغییرات بیان آکواپورین۴ در هر چهار گروه توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج پروتئین و تعیین غلظت: علاوه بر تکنیک ایمیونوهیستوشیمی، بیان آکواپورین۴ در بافت کورتکس مغز به‌روش وسترن‌بلات 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 بافت‌ها بافر لیزکننده سرد (Invitrogen, UK) اضافه گردید. پس از هموژنیزه کردن، نمونه‌ها با دور ۱۱۰۰۰rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و محلول رویی که حاوی کل محتوای پروتئینی بافت کورتکس می‌باشد به‌درون میکروتیوب‌های جدید

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

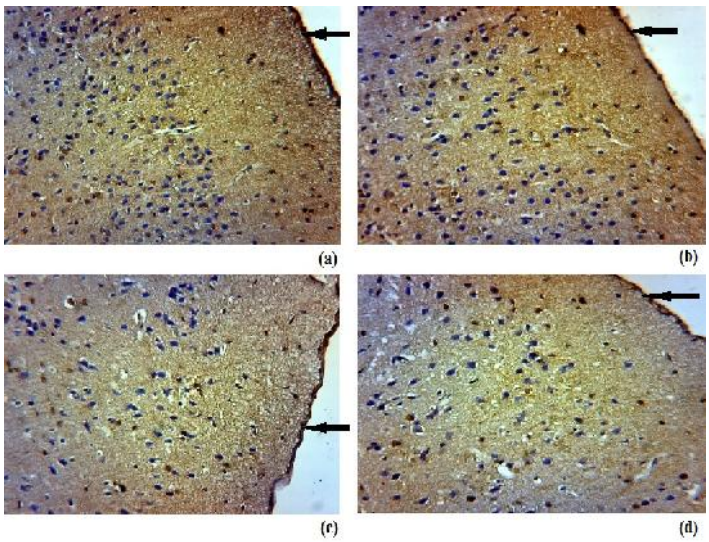
الکتروفورز به روش SDS-PAGE و وسترن بلات: الکتروفورز به‌روش SDS-Page انجام شد. پس از انجام تست بردفورد ۳۴ میکروگرم از هر نمونه پروتئینی به‌نسبت ۱:۱ با بافر نمونه مخلوط شده و مورد استفاده قرار گرفت. جهت مشخص شدن جایگاه پروتئین آکواپورین۴ از نشانگر وزن مولکولی استفاده شد. همچنین جهت Loading control از آنتی بادی β-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 محلول بلوکه‌کننده BSA، ۳ درصد و شستشو با محلول بافر تریس نمکی حاوی Tween غشا به‌مدت ۱ ساعت با ۲ میلی‌لیتر آنتی‌بادی اولیه آکواپورین۴ (Abcam,Rabbit anti-Aquaporin 4) رقیق شده در BSA، ۳ درصد به نسبت ۱ به ۱۰۰۰و پس از آن به‌مدت ۳۰ دقیقه در آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه (*ABC* Staining Kits) با غلظت ۱/۱۰۰۰ در PBS/BSA انکوبه گردید. سپس فیلتر به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض ABC-AP reagent (Vector Laboratories) قرار داده شد. در نهایت محلول سوبسترای Vector Blue- Alkaline Phosphatase Substrate بر روی فیلتر ریخته شد. پس از ظهور باندهای پروتئینی آبی رنگ محلول سوبسترا خارج شده و فیلتر شستشو شد. در نهایت پس از خشک شدن از غشا توسط دوربین canon g 11 (japan) عکس‌برداری 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 به‌صورت کمی برآورد شده و به‌وسیله نرم افزار INSTAT3 و تست پارامتریک one-way ANOVA آنالیز شدند. سپس نمودار توسط نرم افزار EXCEL رسم شده و $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب گردید.

نتایج

نتایج حاصل از ایمنوهیستوشیمی

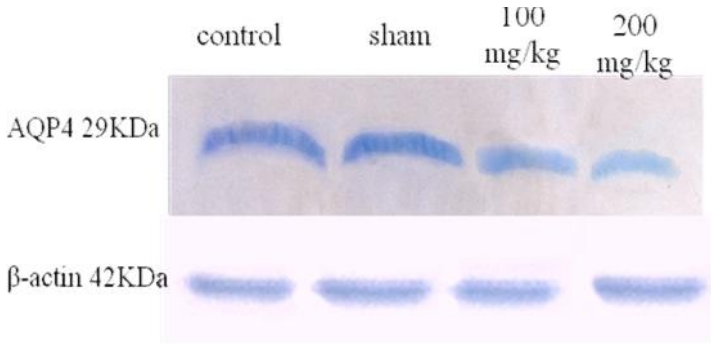
یافته‌های حاصل از بررسی‌های ایمنوهیستوشیمیایی بیان آکواپورین۴ در برش‌های کرونال از قشر مغز گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تحت تیمار با دوز های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره چای سبز حاکی از آن دارد که میزان بیان این پروتئین در قشر مغز حیوانات گروه شاهد آزمایشگاهی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد ولی در گروه‌های تحت تیمار با عصاره چای سبز تفاوت بیان چشمگیری را در مقایسه با گروه شاهد مشاهده می‌کنیم (شکل ۱).



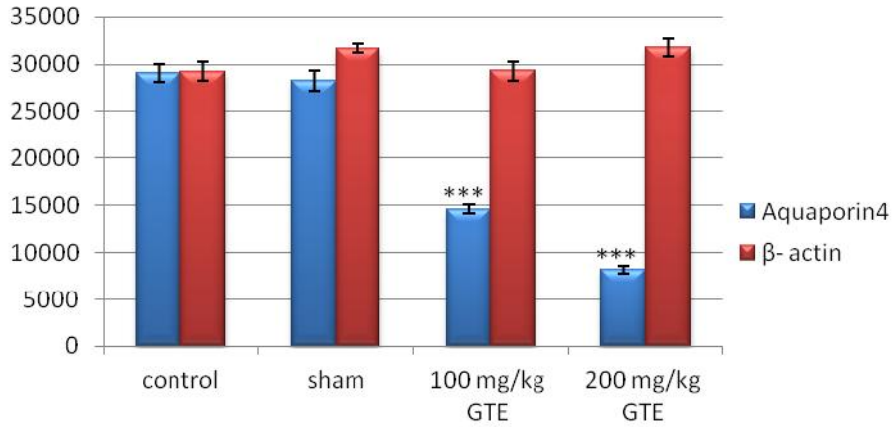
شکل ۱: رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی با آنتی‌بادی آکواپورین۴، رنگ هماتوکسیلین و دی آمینو بنزیدین. به‌منظور بررسی بیان آکواپورین۴ در بافت قشر مغز رت‌های گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و تحت تیمار با عصاره چای سبز.(a) نمونه شاهد .(b) نمونه شاهد آزمایشگاهی. (c) نمونه تیمار شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز. (d) نمونه تیمار شده با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز. پیکان‌ها محدوده سلول‌های گلیال را در مجاور نرم شامه نشان می‌دهد که بیان آکواپورین ۴ در این ناحیه بسیار زیاد می باشد. بیان آکواپورین۴ (به‌رنگ قهوه‌ای) در قشر مغز نمونه های تیمار شده با عصاره چای سبز در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. همچنین دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز موجب کاهش بیشتر بیان آکواپورین۴ نسبت به دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شده است. بزرگنمایی ×۱۰۰.

نتایج حاصل از وسترن بلات

نتایج حاصل از وسترن بلات آکواپورین۴ در نمونه‌های کورتکس مغز رت در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم 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 معنی‌داری در میزان بیان پروئین آکواپورین۴ نسبت به گروه شاهد وجود ندارد. این درحالی بود که در گروه‌های تحت 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث ۴۶ درصد کاهش بیان و دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث ۷۲ درصد کاهش در بیان آکواپورین۴ نسبت به گروه شاهد می‌گردد.



شکل۲: تصویر غشا نیتروسلولز حاصل از بررسی بیان آکواپورین۴ در سلول‌های کورتکس مغز رت‌های گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز. نتایج کاهش بیان آکواپورین۴ را در گروه‌های تیمار شده با عصاره چای سبز نشان می‌دهد. آنتی بادی β-actin با وزن مولکولی۴۲KDa به‌عنوان loading control مورد استفاده قرار گرفته است.



*نمودار۱: نمودار حاصل از نتایج کمی تست وسترن بلات که به‌وسیله نرم افزار Image J برآورد شده است. این نتایج نشان می‌دهد که دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز موجب بیشترین میزان کاهش در بیان آکواپورین۴ در کورتکس می‌گردد. ***P<۰/۰۰۱. Mean± SEM.*

بحث

در بررسی حاضر اثر عصاره چای سبز بر بیان کانال آبی آکواپورین۴ موجود در کورتکس مغز رت به‌وسیله تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمی و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره چای سبز می‌تواند به‌طور چشمگیری بیان این پروتئین را در کورتکس مغز کاهش دهد

(شکل ۱ و۲). به‌طوری‌که نتایج حاصل از کمی سازی تست وسترن بلات کاهش ۴۶ درصدی را در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کاهش۷۲ 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 آکواپورین۴ می‌باشد (۶،۷، ۲۹-۲۶). نتایج تحقیقاتی که با استفاده از موش‌های فاقد اکواپورین ۴ صورت گرفته است نشان داده که کاهش آکواپورین ۴ با کاهش ادم سیتوتوکسیک مغزی در موش‌های دچار مسمویت آبی، ایسکمی مغزی و یا مننژیت باکتریایی همراه می‌باشد. برای مثال موش‌های فاقد اکواپورین ۴ تورم نیمکره ای 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 آکواپورین ۴ در بسیاری از تومورهای مغزی با منشا آستروسیتی نیز افزایش می‌یابد و شواهد اخیر نشان داده که آکواپورین ۴ در مهاجرت، آنژیوژنز و رشد تومورهای مغزی و تشکیل ادم دخالت دارند و بازدارنده‌های بیان و یا عمل‌کرد آکواپورین ۴ می‌توانند از رشد این تومورها جلوگیری کنند (۱۱). از سوی دیگر بررسی‌ها نشان داده که موش‌هایی که در ژن آکواپورین ۴ دارای جهش می‌باشند آستانه تحریک‌پذیری بالاتری نسبت به موش‌های سالم دارند و همچنین موش‌های فاقد آکواپورین ۴ قابلیت کاهش حمله القا شده توسط تشنج شیمیایی Pentylenetetrazole را نشان می‌دهند و این امکان را می‌دهد که بازدارنده‌های آکواپورین 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 آکواپورین ۴ در مغز موش‌های هیپوناترمیا، سبب کاهش خیز مغزی در این موش‌ها می‌شود. بنابراین هر عامل مهار کننده‌ی بیان آکواپورین۴ 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 بر بیان کانال‌های آکواپورین۴ 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). به‌علاوه در ارتباط با اثر چای سبز بر مهار کانال‌های آبی، Chunxiao و همکاران (۲۱) نشان دادند که EGCG با کاهش بیان آکواپورین۵ 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 آکواپورین۴ را دارا می‌باشد؛ می‌توان نتیجه گرفت که عصاره چای سبز می‌تواند به‌عنوان آنتاگونیست این کانال آبی به‌کار رود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی با بر هم خوردن هومئوستازی مایعات مغزی و افزایش بیان آکواپورین ۴ در سیستم عصبی مرکزی همراه هستند، نتایج تحقیقات اخیر نشان داده که هر عامل مهار کننده‌ی بیان آکواپورین۴ 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 آکواپورین۴ 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 آکواپورین 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،

لذا از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی کـه امکانـات اجرایـی 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. Immunolocalizationof 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 encephalomyeritis. J Neurol Sci. 2009; 276(1-2): 103-7.

7. Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amirymoghaddam M, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K+ 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 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, Klockenka ¨mper 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.

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 andintracranial hypertension. Am J Physiol. 1994; 266(2): 393-8.

27. August H, van Alphen MM. A result ofincreased 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, Saadoum 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 og green tea polyphenols in Alzhimer’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.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2014; 5(3): 309-316 *Original Article*

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.[1*], Nabiuni M.Ph.D[2], Mortazavi asl SS, MSc[1], Nazari Z, Ph.D.student[1], Amiri F, MSc[1]

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