بررسی اثر زهر زنبورعسل بر بیان پروتئین آکواپورین یک در سلول‌های اپی تلیالی شبکه کوروئید استخراج شده از بطن‌های جانبی مغز موش صحرائی بزرگ در محیط کشت

یاسمین حقیر شریف زمینی[۱]، محمد نبیونی[۲*]، سعید آیریان[۲]، لطیفه کریم زاده[۳]

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

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

۳-دانشجوی دکترای تخصصی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۴ / زمستان ۹۷ / مسلسل ۷۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۲

مقدمه: آکواپورین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های تراغشایی هستند که انتقال آب در دو طرف غشای پلاسمایی را به عهده‌دارند. آکواپورین یک به دلیل بیان در غشای آپیکال سلول‌های شبکه کوروئید نقش مهمی را در تولید مایع مغزی نخاعی دارد. در هیدروسفالی و آسیب‌های مغزی بیان این پروتئین در سیستم عصبی مرکزی افزایش می‌یابد. زهر زنبورعسل با دارا بودن طیفی از ترکیبات فعال بیولوژیک با اثرات ضدالتهابی، قادر به مهار کانال‌های آبی، پمپ یونی سدیم پتاسیم ATPase و فعالیت پروتئین کیناز C است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات مهاری زهر زنبورعسل بر بیان اکواپورین یک در سلول‌های اپیتلیالی جداشده از شبکه کوروئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرایی است.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج بافت شبکه کوروئید و انجام روش‌های هضم آنزیمی و مکانیکی، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ٪۱۰ سرم جنینی گاوی و ۱٪ استرپتومایسین- پنی سیلین کشت داده شدند. پس از یک هفته، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های µg/ml ۰/۵، ۲، ۴ زهر زنبورعسل تیمار شدند. تأثیر زهر زنبورعسل بر بقای سلول‌ها و بیان آکواپورین یک به ترتیب با استفاده از سنجش MTT و تست فلوسیتومتری انجام شد. تمامی تجربیات سه بار تکرار و داده‌ها از طریق برنامه SPSS 16.0 و در سطح معنی‌داری $P< ۰/۰۵$ تحلیل شدند.

یافته‌ها: داده‌های حاصل از سنجش MTT نشان داد میزان IC50 برابربا ۵/۷ µg/ml است. بیان آکواپورین یک به صورت وابسته به دوز طی مدت ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل کاهش داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: زهر زنبور عسل ممکن است بتواند در بهبود علائم بیماری‌هایی همراه با افزایش تولید مایع مغزی نخاعی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آکواپورین یک، زهر زنبورعسل، شبکه کوروئید، پمپ سدیم- پتاسیم-ATPase

*آدرس مکاتبه: کرج، میدان دانشگاه، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی.

پست الکترونیک: devbiokharazmi@gmail.com

مقدمه

آکواپورین ها خانواده‌ای از پروتئین‌های کوچک و اینتگرالِ ناقل هستند و نقش ابتدایی آن‌ها تسهیل نقل‌وانتقال آب در عرض غشای پلاسمایی در پاسخ به گرادیان اسمُتیک است. آکواپورین ها مونومرهای ۳۰ کیلو دالتونی‌اند و عموماً حاوی شش قطعه‌ی حلقوی گذرنده از غشا و دو قطعه‌ی کوتاه‌تر حلقوی هستند که به دور کل غشا نمی‌پیچد (۱).

آکواپورین یک، در مغز به‌صورت عمده در غشا رأسی سلول‌های اپی تلیالی شبکه کوروئید یعنی در سطحی از غشای پلاسمایی که به سمت بطن و مایع مغزی نخاعی است بیان می‌شود. مکان بیان این پروتئین نشان می‌دهد که در تولید مایع مغزی نخاعی نقش مهمی ایفا می‌کند (۲). شبکه کوروئید بافتی بسیار رگ‌دار با پوشش اپیتلیالی-اندوتلیالی، شاخه‌شاخه، متشکل از تعداد زیادی پرز بوده که به درون بطن‌های مغزی برجسته شده است. این ساختار از سلول‌های اپاندیمال مفروش کننده بطن‌های مغزی ایجاد می‌شود (۳).

طبق یافته‌های سنتی در رابطه با فیزیولوژی مایع مغزی نخاعی بخش اعظم مایع مغزی نخاعی به‌وسیله‌ی شبکه کوروئید تولیدشده، در بطن‌ها و سیسترناها گردش نموده و نهایتاً در فضای زیر عنکبوتیه از طریق پرزهای عنکبوتیه به داخل خون جذب می‌شود (۴). نحوه‌ی ترشح مایع مغزی نخاعی در شبکه‌ی کوروئید تقریباً مشابه چیزی است که در ترشح مایعات در اپیتلیوم‌های مختلف رخ می‌دهد. این پروسه معمولاً وابسته به نقل‌وانتقال یک‌طرفه یون‌ها است که موجب ایجاد گرادیان اسمتیک و نهایتاً حرکت آب می‌شود. نقل‌وانتقال یک‌طرفه یون‌ها (چه جذب و چه ترشح)، ممکن است نتیجه‌ای از بیان قطبی پروتئین‌های ناقل غشاهای رأسی و بازولترال سلول‌های اپیتلیالی باشد (۵).

غشای رأسی (غشای رو به بطنی یا رو به مایع مغزی نخاعی) این سلول‌ها بیان‌کننده پمپ سدیم پتاسیم ATP آز، کانال‌های پتاسیم و کو ترانسپورترهای سدیم، کلر و پتاسیم هستند. در مقابل غشای بازولترال (غشایی که رو به مویرگ‌های خونی است) معاوضه گرهای کلر بیکربنات، انواعی از ترانسپورترهای سدیم جفت شونده با بیکربنات و کوترانسپورترهای پتاسیم کلر را بیان می‌کنند. برآیند نهایی نقل‌وانتقال یون‌ها از خلال ناقلین ذکرشده، انتقال یون‌ها بیکربنات، کلر و سدیم از خون به داخل مایع مغزی نخاعی است که موجب ایجاد نوعی گرادیان اسمزی به سمت بطن‌های مغز می‌شود (شکل ۱). همان‌طور که گفته شد، کانال آبی آکواپورین یک در غشای رأسی این سلول‌ها بیان می‌شود، بنابراین آب نیز درنهایت طبق گرادیان اسمزی حاصل از نقل‌وانتقال یون‌ها از طریق کانال آبی مذکور وارد بطن‌های مغزی می‌شود (۶،۷). در شبکه کوروئید فعالیت پمپ سدیم پتاسیم ATP آز بسیار حائز اهمیت بوده و ارتباط نزدیکی با تولید مایع مغزی نخاعی دارد. مهارکنندگان این پمپ به‌عنوان‌مثال کاردیاک گلیکوزید قدرت کاهش ترشح مایع مغزی نخاعی را دارند (۸).

بر اساس بررسی‌های انجام‌شده در برخی از حالات پاتولوژیک مانند انواع سردردها مانند میگرن و هیدروسفالی و هایپوناتریمیای سیستمیک فشار درون جمجمه‌ای و میزان تولید مایع مغزی نخاعی افزایش می‌یابد. کانال آبی آکواپورین یک در تولید مایع مغزی – نخاعی نقش مهمی ایفا می‌کند به قسمی که تولید مایع مغزی- نخاعی در موش‌های ترانس ژنیک AQP1 null تا حدود ۲۵ درصد کاهش می‌یابد. نتیجتاً در این موش‌ها فشار درون جمجمه‌ای به میزان قابل ملاحظه‌ای پایین است (۹-۱۱).

زهر زنبورعسل محتوی حداقل ۱۸ ماده‌ی فعال ازنظر داروئی است که این مواد شامل ملیتین، فسفولیپاز A_2،

آپامین است. ملیتین ۴۰ تا ۶۰ درصد از کل وزن خشک زهر زنبورعسل را تشکیل می‌دهد و قادر است پمپ سدیم- پتاسیم- ATPase را مهار کند. (۱۳،۱۲).

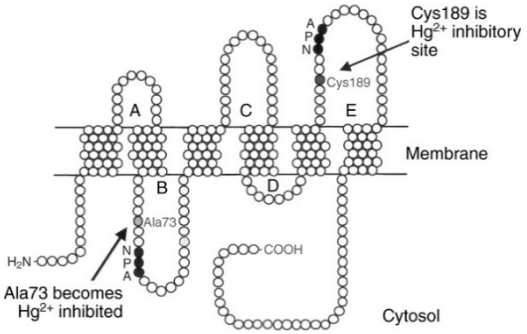
ملیتین پلی پپتیدی با ۲۶ اسیدآمینه و فرمول شیمیایی $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$، وزن مولکولی ۲۸۴۶/۵۱۵ گرم بر مول از اصلی‌ترین مواد تشکیل‌دهنده‌ی زهر زنبورعسل (*Apis mellifera*) است. توالی اسیدهای آمینه‌ی تشکیل‌دهنده‌ی این پلی پپتید بدین شرح است:

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-GlnNH2

ملیتین دارای خواص بیولوژیکی، داروئی و سمی متنوعی است که از این میان می‌توان به فعالیت سطحی قوی آن در سطح غشاهای لیپیدی سلولی، فعالیت لیز کردن گلبول‌های خونی، خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی و خصوصیات بالقوه‌ی ضد توموری آن اشاره کرد. ملیتین همچنین به‌عنوان یک ترکیب طبیعی پپتیدی ایجادکننده‌ی سوراخ در غشاست که به این روش می‌تواند خود را از میان دولایه‌ی لیپیدی به درون سلول وارد کند (۱۴).

ملیتین شناخته شده‌ترین پپتید زهر زنبورعسل، تحریک‌کننده‌ی قوی فسفولیپاز A2 است. این ترکیب همچنین قادر به مهار پروتئین کیناز C، پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/ کالمودولین ۲ است. تحقیقات گسترده بر روی ملیتین نشان‌دهنده‌ی اثرات چندگانه‌ی ملیتین است و ممکن است این اثرات به دلیل فعل وانفعالاتی باشد که این پپتید با فسفولیپیدهایی با بار منفی در غشا باشند (۱۵).

با توجه به ارتباط نزدیک بین بیان آکواپورین یک در شبکه‌ی کوروئید و پمپ سدیم پتاسیم ATPase در این بافت و مطالعات اخیری که نشان داده‌اند برخی از ترکیبات مانند کاردیاک گلیکوزید و پپتید ناتریورتیک دهلیزی با مهار این پمپ قادر به کاهش تولید مایع مغزی نخاعی هستند در این مطالعه اثر زهر زنبورعسل که دارای ترکیبی قوی به نام ملیتین است و ملیتین، اثر مهارکنندگی بر فعالیت این پمپ دارد، بر آن شدیم که اثر زهر زنبورعسل را بر بیان کانال‌های آبی آکواپورین یک که نقش اصلی تولید مایع مغزی نخاعی در سیستم عصبی مرکزی را ایفا می‌کنند را موردبررسی قرار دهیم.



شکل ۱. ساختار ابتدایی آکواپورین یک در انسان. دمین های شش بار گذرنده از غشا نشان داده‌شده‌اند. این دمین ها در حالی از غشا عبور می‌کنند که با پنج لوپ ارتباطی A تا E با غشا در ارتباط هستند. NPA یا موتیف‌های آسپارژین- پرولین- آلانین در لوپ‌های B و E مشخص‌شده‌اند. همچنین سیستئین ۱۸۹ و آلانین ۷۳ که سایت‌های اولیه و ثانویه مهار توسط جیوه هستند در شکل مشخص‌شده است (۱۶).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی در هر بار کشت اولیه از ۱۲ رت نژاد ویستار نر و ماده چهارهفته‌ای که در قفس‌های مخصوص‌های از جنس پلی کربنات با فضای استاندارد تحت شرایط محیطی مناسب (دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی به مقادیر دلخواه غذا (شرکت دام، بهپرور تهران) و آب که در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی نگهداری شدند، استفاده شد. حیوانات به‌وسیله تنفس کلروفرم کشته و به کمک یک قیچی جراحی بسیار تیز پوست سر حیوان جداشده و با کمک اسکالپل قسمت پشتی جمجمه در عقب مخچه شکافته شد. با استفاده از یک قیچی ظریف و تیز دورتادور

استخوان جمجمه بریده شده و کنار گذاشته شد. مغز جداشده به درون پلیت استریلی که محلول فسفات بافر سالین (PBS) خنک محتوی یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین –پنی سیلین انتقال داده شد.

بافت به‌دست‌آمده در زیر هود لامینار کشت سلول با استفاده از قیچی نوک تیز و ظریف به قطعات بسیار ریز در حد یک میلی‌متر بریده شده تا در مرحله هضم آنزیمی، آنزیم به‌صورت مؤثرتری بتواند بر روی بافت اثر کند. سپس محلول بافت، PBS و آنتی‌بیوتیک جهت سانتریفیوژ به لوله مخصوص سانتریفیوژ منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت ۱۵۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. پس‌ازاین مدت مایع رویی خارج‌شده و میزان دو میلی‌لیتر آنزیم تریپسین ۰/۲۵٪ به رسوب بافتی اضافه‌شده و لوله مذکور درون شیکر انکوباتور به مدت ۲۵-۳۰ دقیقه، با دور ۱۰۰ RPM و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از مدت ذکرشده، بافت مورد نظر پیپتاژ شد. پس‌ازاینکه قطعات بافتی کمتری در لوله مشاهده شد، با افزودن یک میلی‌لیتر سرم جنین گاوی (FBS)(Gibco) آنزیم تریپسین خنثی‌شده و محلول به‌دست‌آمده یک یا دو بار به‌آرامی پیپتاژ شده تا محلولی یک‌دست حاصل شود. سپس لوله موردنظر به سانتریفیوژ منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰RPM سانتریفیوژ شد.

پس از زمان یادشده، محلول بالایی که شامل تریپسین و سرم جنین گاوی است سرریز گشته و میزان یک میلی‌لیتر محیط کشت پایهDMEM (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰mL/U پنی‌سیلین و ۱۰۰µg استرپتومایسین) (Gibco)، ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد اپی تلیال جهت رشد سلول‌های اپی تلیالی (EGF)(Gibco) و ۲۰ مایکرومولار سیتوزین آرابینوزید (Sigma) به رسوب سلولی اضافه شد. این ترکیب جهت حذف سلول‌های فیبروبلاستی به محیط کشت اضافه می‌شود. سپس از محیط کشت با ترکیبات بالا جهت رقیق کردن محلول سلولی اولیه استفاده شد. محلول سلولی به‌دست‌آمده در فلاسک هایی که با ژلاتین ۰/۱٪ پوشش داده‌شده یا به‌اصطلاح coat شده‌اند کشت داده شدند. تعویض محیط پس از ۴۸ ساعت و با محیط فاقد سیتوزین آرابینوزید انجام می‌شود.

بررسی مورفولوژی سلول‌های اپی تلیالی شبکه کوروئید

همانند سایر سلول‌های اپیتلیالی در محیط کشت، سلول‌های اپیتلیالی بافت شبکه کوروئید نیز در محیط کشت در روزهای ابتدایی کشت شروع به چسبیدن به کف ظرف کرده و کلونی‌های کوچکی را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها، همانند سلول‌های اپیتلیالی دیگر در محیط کشت، به‌صورت چندوجهی ظاهر می‌شوند. حواشی کلونی‌های سلولی با پیکان مشخص‌شده است. در روزهای بعد با رشد بیشتر اجزای تشکیل‌دهنده این کلونی‌ها، کلونی‌های مجاور به هم پیوسته و نهایتاً کف ظرف کشت از یک تک لایه از سلول‌های اپی تلیالی پوشیده خواهد شد. معمولاً پس از هفت روز در پلیت‌های شش‌خانه، سلول‌های اپیتلیالی مذکور کل مساحت چاهک‌ها را اشغال می‌کنند.

تیمار سلول‌ها با زهر زنبورعسل

پودر زهر زنبورعسل از دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران گروه حشره‌شناسی تهیه و سپس ۱۰۰ میکروگرم از پودر در یک میلی‌لیتر از PBS حل و سپس به روش serial dilution غلظت‌های مختلفی از آن به دست آمد. سلول‌های کشت‌شده با غلظت‌های ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر (µg/ml) برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول MTT با غلظت ۵mg/ml در فسفات بافر سالین، در تاریکی به هر یک از چاهک‌ها افزوده شده و برای مدت سه ساعت در تاریکی در انکوباتور قرار گرفت.

پس از گذشت سه ساعت، محلول MTT و محیط کشت به آرامی از کنار چاهک‌ها خارج شد و مقدار مناسبی DMSO به هر یک از آنها اضافه شد. بعد از حدود ۲۰ الی ۳۰ دقیقه میزان جذب نور محلول‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از نسبت میزان جذب در نمونه تیمار به میزان جذب در نمونه کنترل، درصد حیات یا Viability سلول‌ها در غلظت‌های مختلف زهر زنبورعسل یادشده مورد محاسبه قرار گرفت.

ارزیابی تأثیر زهر زنبور عسل بر بیان ژن آکواپورین یک از طریق آزمون فلوسیتومتری

غلظت‌های انتخابی برای تیمار با زهر زنبورعسل در این مرحله به ترتیب ۰/۵، ۲ و ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. همان‌طور که قبلاً نیز گفته شد، پس از رسیدن سلول‌ها به حد مناسب رشد تیمار انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها جهت انجام تست فلوسیتومتری آماده شدند. سلول‌ها پس از جداسازی از کف فلاسک سلولی از طریق هضم آنزیمی به میکروتیوپ‌ها منتقل شد. سپس میکروتیوپ‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰RPM قرار گرفتند و بعد از زمان گفته‌شده، محلول بالایی سرریز شده و پلت سلولی با PBS شستشو داده شد. سپس مجدداً سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰RPM به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و مایع رویی سرریز شد. حال نمونه سلولی در میکرو تیوپ‌ها آماده‌ی اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه است در مرحله از آنتی‌بادی AQP1Abcam(ab7799) استفاده شد که به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محلول ۳ درصد BSA/PBS رقیق‌شده است. میکروتیوپ‌های حاوی رسوب سلولی و آنتی‌بادی اولیه در طول شب (Over-night) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد یخچال قرار گرفتند. در روز بعد، ابتدا حجم محلول درون میکروتیوپ‌ها به‌وسیله‌ی PBS به یک میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه با سرعت ۲۰۰۰RPM برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی در مرحله بعد سرریز شده و آنتی‌بادی کانژوگه بارنگ فلورسانت (FITC) به رسوب سلولی اضافه گردید. پس از افزودن آنتی‌بادی ثانویه، نمونه به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، حجم محلول داخل میکروتیوپ‌ها به یک میلی‌لیتر رسانده شد. مجدداً برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰RPM میکروتیوپ‌ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی سرریز شد. سپس میزان یک میلی‌لیتر محلول فرمالین سه درصد به نمونه‌ها اضافه شد و تا زمان بررسی در محیط تاریک و دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیز آماری

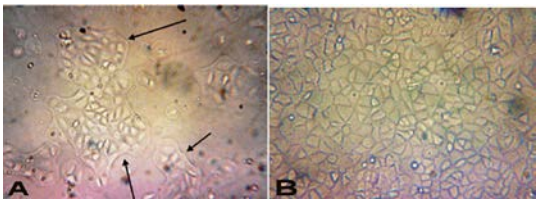
جهت انجام محاسبات آماری از برنامه آماری SPSS و نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد. اطلاعات پس از ورود به رایانه با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شد. سنجش‌ها سه بار تکرار شدند و از میانگین نتایج در محاسبات آماری استفاده شد. اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس

در ابتدا سلول‌ها حالت مدور دارند و تعدادی سلول‌های خونی در بین آن‌ها وجود دارد. با گذشت دو روز سلول‌های اپیتلیالی ته‌نشین شده و به کف پلیت چسبیده و مورفولوژی چند وجهی پیدا می‌کنند. سلول‌های فیبروبلاستی نیز با وجود سیتوزین آرابینوزید در طی دو روز اول از بین رفته و با تعویض محیط سلول‌های خونی نیز خارج می‌شوند. این سلول‌ها ابتدا کلنی‌های کوچکی را ساخته و حواشی این کلنی‌ها در روزهای ابتدائی کشت کاملاً واضح است. نهایتاً و پس از

حدود هفت روز تنها سلول‌های چندوجهی اپیتلیالی کل کف فلاسک سلولی را خواهند پوشاند.

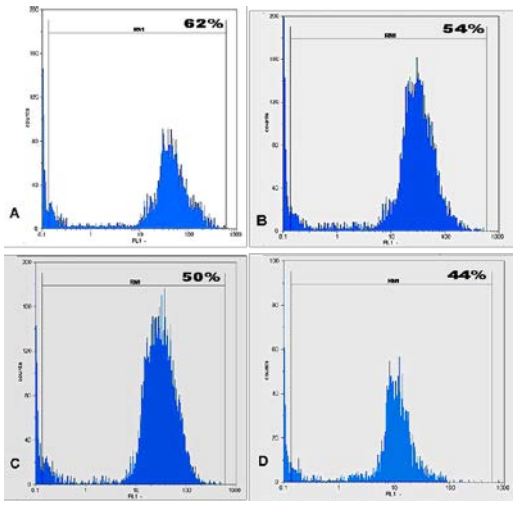


شکل ۲) فتومیکروگراف سلول‌های اپیتلیالی کشت داده‌ی شبکه کوروئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرایی در A) روز سوم: این سلول‌ها مانند سایر سلول‌های اپی تلیالی با ایجاد کلنی‌ها و نهایتاً اتصال این کلنی‌ها به هم تمامی فضای کف فلاسک را می‌پوشانند. پیکان‌ها حواشی کلنی‌ها را نشان می‌دهند (X400)؛ در B) روز هفت بعد از کشت که سلول‌ها تقریباً کل کف فلاسک را پوشانده اند (X200).

سنجش MTT: نتایج حاصل از تأثیر زهر زنبور عسل با غلظت‌های متفاوت بر سلول‌های اپی تلیالی شبکه کورئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرایی نشان داد که این ماده با الگویی وابسته به دوز و زمان میزان بقا را کاهش می‌دهد. درصد بقای سلول‌های تیمار شده با زهر زنبورعسل در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت تیمار با زهر زنبورعسل به ترتیب ۵۶، ۶۹ و ۷۲ درصد بوده است. به‌این‌ترتیب غلظتی از زهر زنبورعسل که منجر به مرگ پنجاه درصدی سلول‌های کشت داده‌شده پس از ۲۴ ساعت می‌شود (IC50) میزان ۵٫۷ میکروگرم/میلی‌لیتر است.

ارزیابی تغییرات بیان آکواپورین یک با استفاده از فلوسیتومتری

تغییر بیان آکواپورین یک در سلول‌های اپی تلیالی شبکه کورئید با استفاده از آنتی‌بادی AQP1 و در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر از زهر زنبور عسل و پس از ۲۴ ساعت سنجیده شد. چنانچه در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود، A هیستوگرام نمونه‌ی کنترل مثبت است که میزان بیان آکواپورین یک را در سلول‌های اپی تلیال شبکه کورئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرائی بدون هیچ‌گونه تیماری نشان می‌دهند که میزان Gating در این حالت ۶۲٪ است. B هیستوگرام مربوط به نمونه‌ی تیمار شده با میزان ۰/۵ میکروگرم / میلی‌لیتر از زهر زنبورعسل بعد از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد که میزان بیان پروتئین آکواپورین یک در این نمونه نسبت به حالت کنترل مثبت ۸٪ کاهش‌یافته و میزان Gating در این نمونه ۵۴٪ اندازه‌گیری است. C هیستوگرام نمونه‌ای است که با غلظت ۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان بیان پروتئین آکواپورین یک در آن به میزان ۵۰٪ رسیده است. تصویر D هیستوگرام نمونه‌ای است که با غلظت ۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان بیان پروتئین آکواپورین یک در آن با کاهش ۱۸٪ نسبت به نمونه‌ی کنترل به میزان ۴۴٪ درصد رسیده است (تصویر ۳).



شکل ۳: میزان بیان آکواپورین یک را در سلول‌های اپیتلیالی شبکه کورئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرائی ۲۴ ساعت پس از تیمار. A: سلول‌های کنترل مثبت، B: سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، C: سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر و D: سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر.

بحث و نتیجه‌گیری

زنبور درمانی به روشی گفته می‌شود که در آن از محصولات به‌دست آمده از زنبور مانند عسل، بره موم، ژله‌ی رویال و زهر زنبورعسل در پیشگیری یا درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. تاریخچه زنبور درمانی به زمان مصریان باستان بازمی‌گردد. در آن زمان، آن‌ها جهت درمان آرتریت از این روش استفاده می‌کرده‌اند. بر اساس گفته‌های Broadman اشاره به زهر زنبور به ۴۰۰ سال قبل از میلاد مسیح و به زمان پزشک معروف آن زمان بقراط و سایر نویسندگان عهد عتیق بازمی‌گردد؛ اما ترکیبات زهر زنبور تا اواخر سده ۱۹۰۰ میلادی شناسایی نشده بودند (۱۷،۱۸).

زهر زنبورعسل، ترکیبی پیچیده از موادی است که زنبورعسل برای دفاع از کلونی خود در برابر خطرات گسترده محیط به کار می‌برد. زهر زنبورعسل، از غدد زهری که در محوطه‌ی شکمی حشره قرار دارند ترشح می‌شود و شامل انواع مختلفی از پپتیدهای فعال ازنظر بیولوژیک، آنزیم‌های متعدد و همچنین ترکیبات غیر پپتیدی می‌باشند (۱۹).

بر اساس تحقیقاتی که تاکنون انجام‌شده است زهر زنبورعسل در بهبود بسیاری از بیماری‌ها ثمربخش بوده است. در انواع آرتریت اعم از استئوآرتریت و روماتئوارتریت، مالتیپل اسکلروزیس، جنون، فلج بعد از سکته، پلی نوریت، التهاب عصب گانگلیونی، آتاکسی مغزی، سردرد، التهاب عصب صورتی، میوپاتی، نورالجیای عصب سه‌قلو، التهاب پس از آسیب شبکه عصبی، التهاب عنکبوتیه، پارکینسون مورداستفاده قرارگرفته است (۱۸).

ملیتین ترکیب اصلی زهر زنبورعسل قدرت مهار پمپ سدیم پتاسیم ATP آز و مهار فعالیت پروتئین کیناز C را دارد (۲۰).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ توسط نبیونی و همکاران انجام شد نشان داده شد که کورکامین ماده‌ی مؤثره‌ی زردچوبه قادر است باعث کاهش میزان بیان آکواپورین یک در سلول‌های اپی تلیال شبکه کورئید بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرایی در محیط کشت گردد. کورکامین قدرت مهار کانال‌های یونی پتاسیم و پمپ سدیم پتاسیم ATP آز را دارد (۲۱).

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی علوم زیستی دانشگاه خوارزمی کرج به انجام رسیده است. لذا از ریاست دانشکده‌ی علوم زیستی که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند و همچنین جناب آقای دکتر ایمانی از دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران که پودر زهر زنبورعسل را در اختیار ما نهادند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Papadopoulos M, Verkman A. Aquapori water channels in the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2013; 14(4): 265-77.
2. Benga O, J.Huber V. Brain water chnnels proteins in health and disease. Mol Aspects Med. 2012;33(2012): 562-578.
3. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J.Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. physiol. 2010; 25(4): 239-249.
4. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. FBCNS. 2014; 11(10):1-16.
5. Damkie HH, Brown PD, Preatorius Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. physiol Rev.2013; 93(4):1847-1892.
6. Supuran T.C. Acetazolamide for the treatment of idiopathic intracranial hypertension. Expert Rev Neurother. 2015; 15(8): 851-856.
7. Wulberg H, Paulus W. Choroid plexus:biology and pathology. Acta Neuropathol.2010; 119(1): 75-88.
8. Brown PD, Davies SL, Speak T.Molecular Mechanisms of Cerebrospinal Fluid Production. Neuroscience.2004:129(4): 957-970.
9. Zelenia M. Regulation of Brain Aquaporins. Neurochem Int.2010; 57(4):468-488.
10. Irani, David N. Cerebrospinal fluid in clinical practice. 1st. USA: Saunders; 2008: 1-336.
11. Owler BK, Pitham T, Wang D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. Cerebrospinal Fluid Res. 2010; 7(15):1-12.
12. Uddin MB, Lee BH, Nikapitiya C, Kim JH, Kim TH, Lee HC, Kim CG, Lee JS, Kim CJ. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo, 2016; 54(12):853-866.
13. Alvarez-Fischer D, Noelker C, Vulinović F, Grünewald A, Chevarin C, Klein C, et al. Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in a Parkinson disease mouse model.2013; 8(4):1-8.
14. Chen J, Guan S-M, Sun W, Fu H. Melittin, the major pain - producing substance of bee venom. Neurosci Bull. 2016; 32(3): 265-272.
15. Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increase the blood- clotting time. J Pharmacopuncture. 2015; 18(4): 7-11.
16. H. Spring J, Robichuax S.R, A. H,lin J. The Role of Aquaporins in Excretion in Insects. Journal of Exprimental Biology 2009: 212: 358-362.
17. Ahuja, Annpoorna, and Vipin Ahuja. "Apitherapy–A sweet approach to dental diseases-Part I: Honey." Journal of Advanced Dental Research I 2010: 81-86.
18. Bogdanov S. Bee Venom: Composition, health, Medicine, A review. Bee Product Science, 2011;1-20.
19. Premratanachai P, Chanchao C. Review of the anticancer nactivities of bee products. Apjtb. 2014; 4(5): 337-44.
20. O'Brian CA,Ward NE. ATP-sensitive binding of melittin to the catalytic domain of protein kinase C. Mol Pharmacol, 1989; 36 (3) 355-359.
21. Nabiuni M, Nazari Z, Safaenejad Z, Delfan B, et al. Curcumin Downregulates Aquaporin-1 Expression in cultured Rat choroid plexus. J Med Food. 2013; 16(6): 504-510.
22. Francesca B, Rezzani R. Aquaporin and Blood Brain Barrier.Curr Neuropharmacol. 2010; 92-96.
23. Paul L, Madan M, Rammling M, Behnam B, et al. The altered expression of aquaporin 1 and 4 in choroid plexus of congenital

hydrocephalus. Cerebrospinal Fluid Res. 2009; 6(1): 7-8.

24. L. Rekate H, A. Aygok G, Kouzelis K, M.Klinge P, et al. Hydrocephalus: Selected Papers from the International Workshop in Crete. 1. USA: Springer-Verlag Wien; 2012: 15-20.
25. Ameli PA, Madan M, Chigurupati S, Yu A, Chan SL, Pattisapu JV. Effect of acetazolamide on aquaporin-1 and fluid flow in cultured choroid plexus. InHydrocephalus 2012:59-64.

The Effect of Honey Bee Venom on the Expression of Aquaporin 1 in Epithelial Cells of Choroid Plexus in Lateral Ventricles of Rat

Haghirsharif Zamini Y[1], Nabiuni M[2*], Irian S[2], Karimzadeh L[3]

1. MSc, Department of Biology, Faculty of Science, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. Associated Professor, Faculty of Biological, Department of Cell and Molecular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran. devbiokharazmi@gmail.com.
3. Ph.D. Candidate, Department of animal Biology, school of biology, college of science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: *23 Oct 2018* Accepted: *3 Dec 2018*

Abstract

***Background*:** Aquaporins are the trans-membrane water channels which transport water on both sides of the plasma membrane. Aquaporin1, express in the apical membrane of epithelial cells of choroid plexus and has got the important role in cerebrospinal fluid secretion. In hydrocephalus and brain injuries, Aquaporin1 overexpress in central nervous system. Honey Bee Venom (HBV) contains a wide range of biologically active components with anti-inflammatory and inhibitory effects on Na^+/K^+ ATPase pump and protein kinase-C function. This study aims to investigate the inhibitory effect of HBV on Aquaporin1 expression in epithelial cells of choroid plexus in lateral ventricles of rat brain in culture**.**

Materials and Methods: After harvesting the choroid plexus tissue and performing the enzymatic and mechanical digestion, cells were seeded in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin penicillin. After one week, cells were treated for 24 hours with 0.5, 2 and 4 µg/ml of HBV. The effect of HBV on cells viability and Aquaporin1expression evaluated with MTT assay and flow-cytometry method (respectively). All experiments were done three times and data were analyzed using SPSS 16.0 statistical software and $P< 0.05$ was chosen as the level of significance.

Results: the results of the MTT The result showed that 5.7 µg/ml HBV can induce an approximately 50% choroid plexus epithelial cells death. Due to the results of the flow- cytometry Aquaporin1 decreased as dose dependent manner after 24 hours from treating.

Conclusion: Due to decreasing of the Aquaporin1 expression in HBV-treated cultured choroid plexus epithelial cells, HBV can be used in improving disease condition with increasing intracranial pressure.

Keywords: Aquaporin1, Honey Bee Venom, choroid plexus, Na^+/K^+ ATPase pump

****Citation:*** Haghirsharif Zamini Y, Nabiuni M, Irian S, Karimzadeh L. The Effect of Honey Bee Venom on the Expression of Aquaporin 1 in Epithelial Cells of Choroid Plexus in Lateral Ventricles of Rat. Yafte. 2019; 20(4):97-106.