پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات ۵۵ تا ۶۱

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی کیفی و کمی بیان پروتئین آکواپورین۱ در شبکه کوروئید رت نژاد ویستار

زهرا نظری[۱]، محمد نبیونی*[۲]، زهرا صفایی نژاد[۱]، بهرام دلفان[۳]، خدیجه بهره بر[۴]

[۱] دانشجوی دکتری سلولی- تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی
[۲] دانشیار، دکتری سلولی- تکوینی، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی
[۳] دانشیار، دکتری فارماکولوژی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
[۴] کارشناس ارشد سلولی- تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی

چکیده

سابقه و هدف: *شبکه کوروئید ساختاری منشعب متشکل از سلول‌های اپیتلیالی تک لایه و عروق خونی است که تشکیل دهنده‌ی سد خون- مایع مغزی- نخاعی می‌باشد. قسمت اعظم مایع مغزی- نخاعی (CSF) توسط این ساختار ترشح می‌شود. کانال‌های آبی آکواپورین۱ (AQP1) موجود در این سلول‌ها در طی فرآیند تولید CSF مهمترین نقش را در انتقال آب ایفا می‌کنند. بیان AQP1 در بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی به شدت تغییر می‌کند، لذا مطالعه‌ی دقیق جایگاه بیان و همچنین میزان بیان این پروتئین در سلول‌های شبکه کوروئید ضروری به نظر می‌رسد.*

روش بررسی: *تحقیق حاضر به روش توصیفی انجام گرفت. بافت شبکه کوروئید از بطن‌های جانبی رت نژاد ویستار استخراج شده و پس از هضم آنزیمی و مکانیکی در محیط کشت DMEM کشت داده شد. در ادامه میزان بیان AQP1 در این سلول‌ها به روش‌های وسترن‌بلات و فلوسیتومتری بررسی شد. همچنین جایگاه بیان این پروتئین به روش ایمونوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از وسترن‌بلات دو باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۷ و ۳۲ کیلودالتون را برای AQP1 شناسایی نمود. همچنین با استفاده از تست ایمونوسیتوشیمی اثبات شد که این پروتئین تنها در غشای پلاسمایی سلول‌های کوروئیدی بیان می‌شود. بعلاوه نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های کوروئیدی AQP1 را به میزان تقریبی ۹۷/۶۳ درصد بیان می‌کنند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد جایگاه بیان AQP1 صرفاً غشاء سلول های کوروئیدی باشد. همچنین بیان بالای این پروتئین در سلول‌های کوروئیدی نشان داده شد. با توجه به مهم بودن این پروتئین در تولید CSF و تغییرات سطح آن در بیماری‌هایی نظیر هیدروسفالی امید است در آینده مطالعات بیشتری بر روی این پروتئین صورت گیرد.*

واژگان کلیدی: *آکواپورین۱، شبکه کوروئید، مایع مغزی- نخاعی.*

مقدمه

آکواپورین‌ها (Aquaporins) کانال‌های آبی با نفوذپذیری بالا هستند که به طور وسیعی در بافت‌های مختلف بدن شناسایی شده‌اند (۱). وجود آکواپورین‌های ۱، ۴، ۹ و ۱۱ در سیستم عصبی مرکزی (CNS) اثبات شده است (۲،۳). جایگاه پروتئین AQP1 در CNS به سلول‌های اپیتلیالی شبکه کوروئید محدود می‌شود (۴). سد خون- مایع مغزی نخاعی که به نام شبکه کوروئید نیز شناخته می‌شود، به تعداد چهار عدد درون هر یک از بطن‌های مغزی قرار دارند. شبکه کوروئید از عروق خونی و یک لایه اپیتلیوم

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه خوارزمی، گروه زیست شناسی، محمد نبیونی
(**e-mail:** nabiuni@khu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۳/۱۹

پوششی تشکیل شده است که این ساختار تولید ۸۰-۷۰٪ از کل CSF را به عهده دارد (۵). در ساختار شبکه کوروئید یک سری کانال‌ها و ناقلین یونی توسط مکانیسم‌های انتشار و یا انتقال فعال موجب ترشح مایع مغزی- نخاعی می‌شوند که از این میان مهم‌ترین نقش بر عهده‌ی AQP1 می‌باشد که انتقال آب را از سلول‌های کوروئیدی به فضای بطنی بر عهده دارد (۶،۷). در سال ۲۰۰۳، Oshio و همکارانش نشان دادند که میزان تولید CSF در موش‌های فاقد AQP1 به میزان ۵۰٪ نسبت به موش‌های طبیعی کاهش می‌یابد (۸). همچنین در سال ۲۰۰۶، Moon و همکارانش برای پی بردن به نقشAQP1 در پاتوفیزیولوژی هایپوناترمی، بیان این پروتئین را در شبکه کوروئید رت مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که در موش‌های فاقد AQP1 نفوذپذیری اسمزی شبکه کوروئید و همچنین ترشح CSF کاهش می‌یابد (۹). در سال ۲۰۰۵، Oshio و همکارانش نقش AQP1 را در بروز ادم ناشی از ضربه مغزی بررسی نمودند. آنها نشان دادند که موش‌های فاقد AQP1 میزان فشار داخل جمجمه‌ای کمتری را دارا می‌باشند (۱۰). مطالعات فوق نشان دهنده نقش محوری AQP1 در تولید CSF است. این پروتئین به عنوان اصلی‌ترین کانال دخیل در ترشح CSF، می‌تواند نقش مهمی در ناهنجاری‌های CNS داشته باشند. لذا در سال‌های اخیر بررسی میزان بیان این پروتئین در برخی از بیماری‌های مغزی نظیر هیدروسفالی مادرزادی، تومورهای مغزی نظر محققین را به خود جلب نموده است (۱۳-۱۱). با توجه به این مطالعات، بررسی جایگاه AQP1 و همچنین میزان بیان این پروتئین در سلول‌های شبکه کوروئید ضروری به نظر می‌رسد. در این بررسی سعی شد توسط تکنیک‌های مختلف شامل ایمونوسیتوشیمی، وسترن بلات و فلوسیتومتری بیان این پروتئین و همچنین جایگاه آن در سلول‌های اپیتلیالی شبکه کوروئید بطن‌های جانبی رت نژاد ویستار مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

تحقیق حاضر به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد ۱۰-۵ عدد رت بالغ نژاد ویستار از هر دو جنس توسط دوز بالای کلروفرم کشته شدند و سپس توسط وسایل جراحی استریل مغز آنها خارج شد. پس از شستشوی مغزها توسط PBS سرد (Gibco-invitrogen انگلستان)، با استفاده از پنس‌های ظریف، شبکه کوروئید بطن‌های جانبی زیر میکروسکوپ استریو خارج شده و به درون ظروف پتری شیشه‌ای حاوی سرم HBSS (Gibco-invitrogen انگلستان) منتقل گردیدند. به منظور پاک‌سازی و زدودن خون‌های اضافی، بافت‌ها دو بار توسط سرم HBSS شستشو داده شدند.

کشت سلول

پس از خارج سازی بافت‌های کوروئیدی، آنها را به قطعات کوچک ۲mm تقسیم نموده و سپس به منظور هضم آنزیمی به HBSS حاوی قطعات بافتی ۱ml تریپسین ۰/۲۵٪ (Gibco-invitrogen انگلستان) اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون جهت خنثی‌سازی آنزیم تریپسین، به فالکون حاوی بافت، ۲ml محیط کشت DMEM (Gibco- invitrogen انگلستان) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با ۱۵۰۰rpmسانتریفوژ شد. سپس محیط رویی را دور ریخته و به پلت تشکیل شده حاوی سلول ۴ml محیط کشت DMEM دارای ۱۰ng/ml EGF (Gibco-invitrogen) برای رشد سلول‌های اپیتلیالی و ۲۰µM سیتوزین آرابینوزید (Sigma آمریکا) جهت جلوگیری از رشد سلول‌های خونی و فیبروبلاستی اضافه شد. در نهایت سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه کوت شده با poly-L-Lysine (Sigma آمریکا) کشت داده شدند. پس از گذشت دو روز و حذف شدن سلول‌های خونی محیط کشت با محیط DMEM بدون بدون سیتوزین آرابینوزید تعویض شد (۱۴).

ایمونوسیتوشیمی

پس از کشت سلول‌های کوروئیدی جهت بررسی میزان بیان و جایگاه بیان پروتئین AQP1 در این سلول‌ها از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها که در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شده بودند، از سطح سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها سه مرتبه با PBS و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور فیکس نمودن سلول‌ها فرمالین۴٪ (Merck آلمان) به مقدار ۳۰۰µl به چاهک‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C و در نهایت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شستشو، به منظور نفوذپذیر نمودن غشاء به هر یک از چاهک‌ها ۳۰۰µl Triton X-100 (۰/۴٪) (Merck آلمان) اضافه گردید و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس عمل بلوکه کردن توسط ۱٪BSA حل شده در ۰/۱٪Tween-PBS (TPBS) (Merck آلمان)، به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. محلول بلوکه کننده خارج شده و بدون شستشو، ابتدا سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در آنتی‌بادی اولیه AQP1 (Abcam انگلستان) و پس از شستشو با ۰/۱٪TPBS، به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با رنگ فلورسنت FITC (Abcam انگلستان) انکوبه شدند.

سپس به منظور رنگ‌آمیزی هسته به هر چاهک رنگ DAPI (Gibco انگلستان) با غلظت ۰/۱µgr/ml اضافه گردید. پس از ۳۰ ثانیه الی ۱ دقیقه چاهک‌ها با PBS شستشو شدند. در نهایت به هر خانه ۵۰۰µl PBS اضافه شده و با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکسبرداری شدند (تمامی مراحل ۱۳-۱۰ در تاریکی انجام شد).

استخراج پروتئین و تست بردفورد

علاوه بر بررسی ایمونوسیتوشیمیایی، میزان بیان AQP1 در سلول‌های کوروئیدی به روش وسترن‌بلات نیز بررسی شد. در ابتدا به منظور استخراج پروتئین پس از خارج سازی بافت کوروئیدی و هضم مکانیکی، آنها را درون میکروتیوپ‌های سرد ریخته و پس از سانتریفیوژ به هر میکروتیوپ ۱۰۰µl بافر لیزکننده سرد (invitrogen انگلستان) اضافه گردید. پس از هموژنیزه کردن، میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به درون یخ منتقل شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۱۱۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و محلول رویی که حاوی کل محتوای پروتئینی سلول‌های کوروئیدی می‌باشد به درون میکروتیوب‌های جدید منتقل شد. برای بررسی کمی محتوای پروتئینی عصاره‌ها از روش بردفورد استفاده شد. جهت رسم نمودار استاندارد بردفورد از BSA (Sigma آمریکا) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. در نهایت با استفاده معادله خط به دست آمده از نمودار استاندارد و همچنین جذب‌های به دست آمده از عصاره‌های سلولی مختلف، غلظت پروتئین بر حسب mg/ml محاسبه گردید.

الکتروفورز به روش SDS-PAGE

الکتروفورز به روش SDS-Page انجام شد که مواد تشکیل دهنده‌ی ژل شامل محلول آکریل آمید- بیس آکریل آمید (Serva فرانسه)، SDS (Merck آلمان)، تریس باز (Serva فرانسه)، TEMED (Merck آلمان)، آمونیوم پرسولفات (Serva فرانسه) می‌باشند. پس از انجام تست بردفورد ۳۴µg از نمونه پروتئینی به نسبت ۱:۱ با بافر نمونه مخلوط شده و پس از ۴ دقیقه حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه در هر چاهک ژل ریخته شد. جهت مشخص شدن جایگاه پروتئین AQP1، ۵µl از نشانگر وزن مولکولی پروتئین‌ها که قبلا رنگ شده‌اند (Prestained proteinladder) (Fermentas آلمان) در چاهک اول ریخته شد. دستگاه الکتروفورز با بافر تانک پر شده و سپس به جریان برق با ولتاژ ۱۲۰ ولت وصل شد. پس از رسیدن رنگ برموفنل‌بلو به انتهای ژل جریان برق قطع گردید.

در مراحل بعدی ژل برای وسترن‌بلات مورد استفاده قرار گرفت.

وسترن بلات

پس از انجام الکتروفورز جهت انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء مدل ساندویچ توسط برگه های واتمن، غشاء نیترو سلولزی و ژل تهیه شده و در تانک انتقال حاوی بافر انتقال قرار داده شد. پس از گذشت ۳ ساعت فیلتر خارج شده و در داخل لوله فالکون ۵۰ml قرار داده شد. در ابتدا عمل بلوکه کردن توسط ۵ml محلول بلوکه‌کننده شامل BSA ۳٪ در PBS انجام گرفت. بافر بلوکه‌کننده خارج شده و غشاء ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه با محلول بافر تریس نمکی حاوی Tween (Merck آلمان) شستشو شد. در این مرحله غشاء به مدت ۱ ساعت با ۲ml آنتی‌بادی اولیه و پس از آن ۳۰ دقیقه با آنتی بادی ثانویه بیوتینه شده (Vector Laboratoriesآمریکا) انکوبه گردید.

سپس فیلتر به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ABC-AP reagent (Vector Laboratoriesآمریکا) قرار داده شد. در نهایت محلول سوبسترای Vector Blue- Alkaline Phosphatase Substrate (Vector Laboratoriesآمریکا) بر روی فیلتر ریخته شد. پس از ظهور باندهای پروتئینی آبی رنگ محلول سوبسترا خارج شده و فیلتر دو بار شستشو شد. در نهایت پس از خشک شدن از غشاء عکس برداری شد.

آنالیز فلوسیتومتری جهت بررسی کمی بیان AQP1

در این تحقیق بیانAQP1 به روش فلوسیتومتری نیز مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که ابتدا سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و پس از شستشو و سانتریفیوژ به منظور نفوذپذیر نمودن غشاء سلول، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول Triton-۱x100٪ در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس حجم سلول‌ها را با PBS به ۱۰۰۰µl رسانده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد. سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۴ درجه با ۵۰µl ازآنتی بادی اولیه (رقیق شده با محلول بلوکه‌کننده ۳BSA-PBS٪ به نسبت۱:۱۰۰) و پس از شستشو با آنتی بادی ثانویه Anti-rabbitIgG کونژوگه با رنگ FITC انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS به آنها ۳۰۰µl فرمالین ۱٪ اضافه شده و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیزگردیدند (۱۵).

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیکی سلول‌های اپیتلیالی شبکه کوروئید پس از کشت اولیه

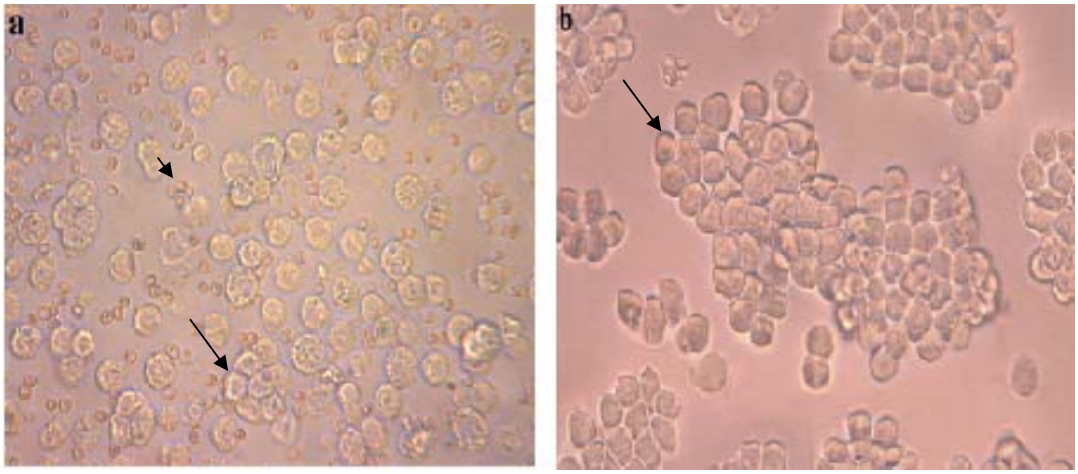
جهت بررسی تغییرات مورفولوژیکی طی کشت اولیه، سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفتند. کشت اولیه این سلول‌ها طی روزهای اول محتوی سلول‌های اپیتلیالی کوروئیدی تقریباً مدور و تعداد زیادی سلول‌های خونی می‌باشد (شکل۱ قسمت a). در حالی که پس از گذشت۲ الی ۳ روز از کشت اولیه، سلول‌های خونی به کمک سیتوزین آرابینوزید حذف می‌شوند. سلول‌های شبکه کوروئید که از نوع چسبنده‌ی سست می‌باشند، پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت به کمک بستر پلی- ال- لایزین به کف پلیت چسبیده و به شکل چند وجهی در می‌آیند (شکل ۱ قسمت b).

نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی

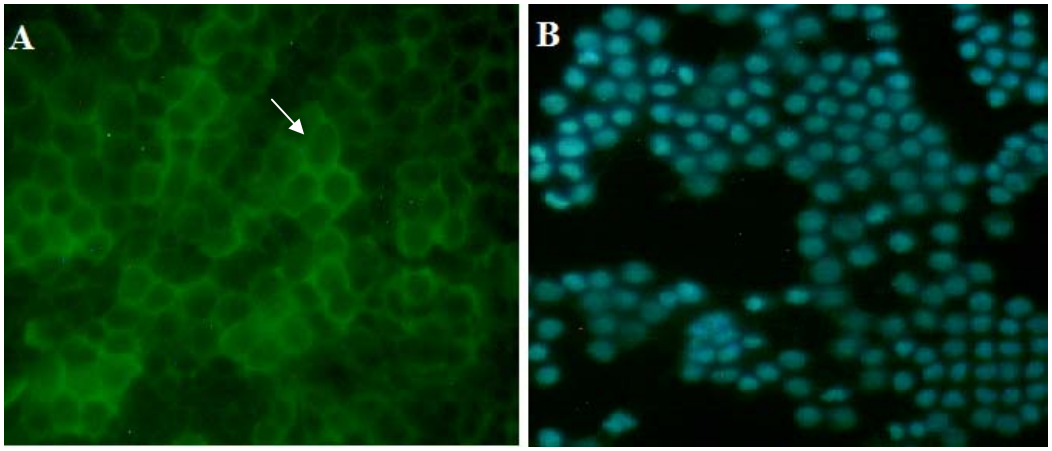
نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی AQP1 در سلول‌های کوروئیدی نشان داد که این پروتئین به صورت غشائی در این سلول‌ها بیان می‌شود. این در حالی بود که هیچ اثری از بیان این پروتئین در سیتوپلاسم سلول‌های کوروئیدی مشاهده نشد. جهت رنگ آمیزی هسته و مشخص شدن جایگاه بیان AQP1 از رنگ هسته DAPI استفاده شد (شکل ۲).

نتایج حاصل از وسترن بلات AQP1

ایمونوبلات AQP1 دو باند با وزن مولکولی تقریبی ۲۷ و ۳۲

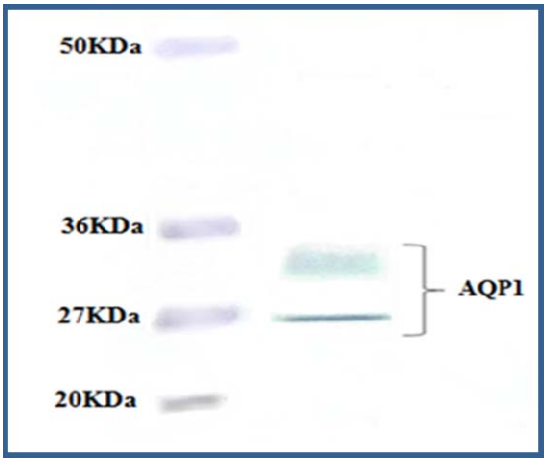


شکل ۱- فتومیکروگراف میکروسکوپ معکوس از تغییر مورفولوژیکی سلول‌های اپیتلیالی شبکه کوروئید در کشت اولیه. a) کشت سلول‌ها در روز اول که محتوی سلول‌های کوروئیدی تقریباً گرد و سلول‌های خونی می‌باشد. b) پس از گذشت ۳ روز سلول‌های اپیتلیالی به کف پلیت چسبیده و به شکل چندوجهی در آمده‌اند و تعداد سلول‌های خونی کاهش یافته است. پیکان‌های بلند سلول‌های کوروئیدی و پیکان‌های کوتاه گلبول‌های قرمز را نشان می‌دهند (بزرگنمایی ۴۰۰x).



شکل ۲- فتومیکروگراف میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های پیتلیالی شبکه کوروئید. (A) سلول‌های کوروئیدی که با آنتی‌بادی اختصاصی AQP1 رنگ‌آمیزی شده‌اند. پیکان‌ها جایگاه بیان AQP1 را در غشاء سلولی نشان می‌دهند. (B) رنگ آمیزی هسته با رنگ DAPI (بزرگنمایی ۴۰۰x).

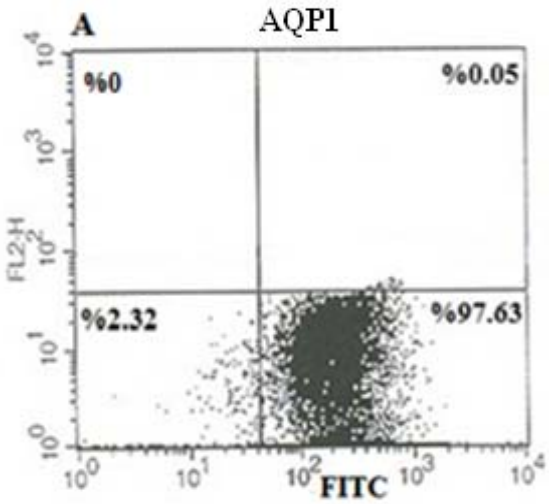
کیلودالتون را نشان داد. در شکل ۳ نتایج حاصل از ایمونوبلات پروتئین AQP1 نشان داده شده است.



شکل ۳- تصاویر غشاء نیتروسلولزی حاصل از ایمونوبلات AQP1 موجود درسلول‌های کوروئیدی. رنگ‌آمیزی ایمونو دو باند را با وزن‌های مولکولی ۲۷ و ۳۲ کیلودالتون برایAQP1 نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری

علاوه بر بررسی‌های کیفی ایمونوسیتوشیمی و وسترن‌بلات، بیان AQP1 در سلول‌های کوروئیدی بصورت کمی و به روش فلوسیتومتری نیز برآورد گردید. نتیجه حاصل از فلوسیتومتری بیان ۹۷/۶۳ درصدی را برای پروتئین AQP1 نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- جمعیت سلول‌های فاقد بیان AQP1 در سمت چپ پایین منحنی و جمعیت سلول‌های دارای بیان AQP1 در سمت راست و پایین قرار دارند.

بحث

شبکه کوروئید یا همان سد خون- مایع مغزی نخاعی یک ساختار اپیتلیالی غنی از عروق می‌باشد که در نتیجه بیرون زدگی سلول‌های اپاندیمی پوشاننده‌ی سطح بطن‌ها به وجود می‌آید. شبکه‌های کوروئید به تعداد چهار عدد در کف بطن‌های جانبی، سقف بطن سوم و سقف بطن چهارم قرار دارند (۱۶). شبکه کوروئید در بطن‌های جانبی برگی شکل بوده و به وسیله ساقه نازکی که در انتهای آن وجود دارد، در امتداد پوشش بطنی قرار می‌گیرد (۶). این ساختار وظیفه تولید ۸۰-۷۰٪ از کل CSF را به عهده داشته و سایر منابع مانند سلول‌های اپاندیمی پوشاننده بطن ها و غشاء عنکبوتیه تنها باعث ایجاد بالانس در این مایع می‌شوند. شبکه کوروئید نه تنها ورود مواد را به داخل مغز کنترل می‌کند، بلکه جایگاه تأمین مولکول‌های خاص نظیر فاکتورهای رشد و هورمون‌ها در مغز می‌باشد. این ساختار همچنین در دفع مواد زائد از CSF نقش دارد (۵). بنابراین مطالعه دقیق پروتئین‌های انتقال دهنده در ساختار این سلول‌ها ضروری می‌باشد. حضور پروتئین های انتقال دهنده مختلف نظیر پمپ Na^+-K^+ ATPase، AQP1، کوترنسپورتر Na^+-K^+-$2Cl^+$ و کانال‌های K^+ در غشاء رأسی این سلول‌ها اثبات شده است. در تحقیق حاضر علاوه بر بررسی کیفی سطح AQP1 به کمک تکنیک‌های وسترن بلات و ایمونوسیتوشیمی و تأیید مطالعات گذشته، بیان این پروتئین بصورت کمی نیز در اپیتلیای کوروئیدی مورد بررسی قرار گرفت. به گونه‌ای که نتایج حاصل از فلوسیتومتری بیان ۹۷/۶۳ درصدی را برای این پروتئین نشان داد. این امر می‌تواند نشان دهنده‌ی اهمیت بالای این پروتئین در سلول‌های کوروئیدی باشد. همچنین تست وسترن‌بلات، دو باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۷ و ۳۲ کیلو دالتون را برای AQP1 شناسایی نمود که این تفاوت در وزن مولکولی به خاطر داشتن فرم‌های گلیکوزیله و غیرگلیکوزیله این پروتئین است. علاوه بر این با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی اثبات شد که پروتئین AQP1 صرفاً در غشاء پلاسمایی سلول‌های اپیتلیالی شبکه کوروئید بیان می‌شود. در سال ۲۰۰۲، Speake و همکارانش با روش وسترن‌بلات بیان این پروتئین را در سلول‌های شبکه کوروئید بطن‌های جانبی و بطن چهارم مغز رت بررسی نمودند. در بررسی آنها آنتی‌بادی AQP1 دو باند را با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۷ و ۳۲ کیلو دالتون نشان داد (۱۷). در سال ۱۹۹۳، Nielsen و همکارانش، با روش ایمونوسیتوشیمی بیان این پروتئین را در غشاء رأسی

سلول‌های شبکه کوروئید نشان دادند (۷). علاوه بر این در سال ۲۰۰۴، Mobasheri و Marple نشان دادند که در انسان، میزان بیان این پروتئین در شبکه کوروئید نسبت به سایر بافت‌های بدن که AQP1 را بیان می‌کنند بسیار بیشتر است. این امر نشان می‌دهد که AQP1 در فرآیند ترشح CSF نقش مهمی را ایفا می‌کند (۱۸). در تأیید مطالعات گذشته (۶، ۱۶،۷)، بررسی حاضر اثبات نمود که پروتئین AQP1 به میزان بالا و صرفاً در غشای پلاسمایی سلول‌های شبکه کوروئید رت بیان می‌شود. علاوه بر این در این تحقیق بیان کمی این پروتئین نیز در سلول‌های کوروئیدی بررسی شد. با توجه به نقش محوری AQP1 در تولید CSF و همچنین با توجه به اینکه بیماری‌های متعددی با کاهش و یا افزایش میزان CSF همراه هستند، مطالعه دقیق این پروتئین در شبکه کوروئید انسان نیز ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی دانشگاه خوارزمی انجام گرفته است، لذا از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند و همچنین از مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی لرستان جهت تأمین هزینه های این طرح صمیمانه سپاسگزاریم.

REFERENCES

1. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. J Cell Sci 2005; 118: 3225–32.
2. Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, et al. Immunolocalizationof AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. Biochem Biophys ResCommun 2000; 276: 1118–28.
3. Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. BMC Biochem 2006; 7: 14.
4. Speake T, Freeman LJ, Brown PD. Expression of aquaporin-1 and aquaporin-4 water channels in rat choroid plexus. Biochim Biophys Acta 2003; 1609: 80–86.
5. Johanson CE. Arachnoid membrane, subarachnoid CSF and pia-glia. Methodology and Biology 1998; 23: 259-69.
6. Zheng W, Chodobski A, Editors. The blood-cerebrospinal fluid barrier. New York: Taylor and Francis group; 2005. P.227-350.
7. Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP insecretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 7275–79.
8. Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. Acta Neurchir 2003; 86: S525–28.
9. Moon Y, Hong SJ, Shin D, Jung Y. Increased aquaporin-1 expression in choroid plexus epithelium after systemic hyponatremia. Neurosci Lett 2006; 395: 1–6.
10. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluidproduction and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. FASEB J 2005; 19: 76–78.
11. Papadopoulos M, Saadoun S, Krishna S, Bell B, Davies D. The aquaporin-1 water channel protein is abnormally expressed in oedematous human brain tumours. J Anat 2002; 200: 531–32.
12. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. Nature 2005; 434: 786–92.
13. Nabiuni M, Rasouli J, Sheikholeslami A. Comparative study of aquaporin-1 protein expression in developing brain of Wistar and H-Tx rats. Pejouhande 2011; 16: 125-29. [In Persian]
14. Wegener J, Hakvoort A, Galla HJ. Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. Brain Res 2000; 853: 115–24.
15. Rahman M. Introduction to flow cytometry. Serotec. Ltd 2006; 1: 10-22.
16. Keep RF, Jones HC. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. Develop Brain Res 1990; 56: 47–53.
17. Speake T, Kajita H, Smith CP, Brown PD. Inward-rectifying anion channels areexpressed in the epithelial cells of choroid plexus isolated from ClC-2 ‘knock-out’mice. J Physiol 2002; 539: 385–90.

18. Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal humantissues: a semi-quantitative study using tissue mircroarray technology. Am J Physiol 2004; 286: 529–37.