ORIGINAL ARTICLE

# *Effects of Vitamin B12 on Olig2 Expression and Total Protein Concentration in the Cerebral Cortex*

Mojtaba Eslami,
Farhad Mashayekhi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received September 26, 2012 ; Accepted February 9, 2013)

## *Abstract*

**Background and purpose:** Myelin-producing oligodendrocytes play a key role in supporting normal neuronal function of the mammalian central nervous system (CNS). Formation of myelinating oligodendrocytes from their precursors requires activation and coordination of a set of stage-specific transcriptional regulators that are important for the biosynthesis of myelin components. *Olig2* plays an important role in oligodendrocyte differentiation, myelination and remyelination. Some studies indicated the importance of Vitamin B12 in the immunotherapies for MS patients. This study investigated the effects of Vitamin B12 on total protein concentration (TPC) and Olig2 expression in the cerebral cortex.

**Materials and methods:** Thirty mice were divided into three groups (n=10 in each group). The first group received Vitamin B12 injections (50 µg dissolved in normal saline) once a week for three weeks. Normal saline injection was done for the second group and the third group was left without injection as the control group. In this study we investigated the role of vitamin B12 on TPC and *Olig2* expression in the cerebral cortex using Bio-Rad protein assay based on the Bradford dye procedure and Western Blot, respectively.

**Results:** The results showed that TPC and *Olig2* expression in the cerebral cortex increased in the group injected with vitamin B12 compared with those of the control group.

**Conclusion:** It is believed that vitamin B12 may play a key role in myelination in the CNS by increasing *Olig2* expression and thus oligodendrocytes differentiation.

***Keywords:*** Vitamin B12, oligodendrocyte, myelin, olig2

**J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(Supple 1): 2-7 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۱ (۷-۲)

# اثر ویتامین B12 بر بیان Olig2 و غلظت کل پروتئین در کورتکس مغز موش

**مجتبی اسلامی**

**فرهاد مشایخی**

## چکیده

**سابقه و هدف:** اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین، نقش مهمی در حمایت از عملکرد نورون در سیستم عصبی پستانداران ایفا می‌کنند. ایجاد الیگودندروسیت‌های میلین ساز از سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت، نیازمند فعالیت گروهی از تنظیم‌کننده‌های رونویسی است که برای ساخت اجزائ میلین ضروری هستند. فاکتور رونویسی Olig2 نیز نقش مهمی را در تمایز الیگودندروسیت، میلین سازی و ایجاد دوباره میلین بر عهده دارد. نشان داده شده است که ویتامین B12 در ایمنی درمانی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مهم می‌باشد. در این مطالعه، اثر ویتامین B12 بر غلظت کل پروتئین و بیان Olig2 در کورتکس مغز مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه کیفی- کمی بوده که بر روی ۳۰ موش آزمایشگاهی انجام شد. موش‌ها به سه گروه ده تایی تقسیم و تزریق‌ها بدون سه هفته و هفته‌ای یک نوبت انجام شد. به گروه اول مقدار ۵۰ میکروگرم ویتامین B12 و به گروه دوم سرم فیزیولوژی تزریق شد. گروه سوم عنوان گروه کنترل بوده و هیچ گونه تزریقی در آن ها صورت نگرفت. در این تحقیق، نقش ویتامین B12 بر غلظت کل پروتئین و بیان Olig2 در کورتکس مغز موش ها با استفاده از روش‌های برادفورد (بر اساس سنجش Bio-Rad) و وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصله از برادفورد و وسترن بلات نشان داد که بیان Olig2 و غلظت کلی پروتئین، در عصاره کورتکس مغز نمونه‌های تزریق شده با ویتامین B12 نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری یافته است.

**استنتاج:** بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ویتامین B12 احتمالاً از طریق افزایش بیان Olig2 و در نهایت تمایز الیگودندروسیتی، نقش مهمی را در میلین سازی دستگاه عصبی مرکزی ایفا می‌کند.

**واژه های کلیدی:** ویتامین B12، Olig2، کورتکس مغز

## مقدمه

ویتامین B12 یا کوبالامین، یک ترکیب ارگانومتالیک است که در بدن ساخته نمی‌شود. تنها منبع غذایی کوبالامین، محصولات حیوانی نظیر گوشت و لبنیات است. کاهش ویتامین B12 در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس دیده می‌شود(۱). میزان ویتامین B12 در سرم خون بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نیز کم می‌شود(۲). کاهش ویتامین B12 منجر به تشکیل ناقص پوشش میلین می‌شود که به دلیل نقص در متیله

**مؤلف مسئول: فرهاد مشایخی**- رشت: خیابان نامجو، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی E-mail: mashayekhi@guilan.ac.ir
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۷/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۹/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۱/۲۱

شدن پروتئین اصلی میلین بر سیستم عصبی مرکزی Myelin basic protein (MBP) می‌باشد(۳). همچنین ممکن است با ضشروع وقایع اتوایمیون، این ویتامین باعث نقص در تشکیل میلین شود. به علاوه، مطالعات دیگری نشان می‌دهد که ویتامین B12 ، اثرات مهمی بر سیستم ایمنی گذاشته و باعث تنظیم فعالیت سایتوکاین هایی نظیر TNF-α می شود(۴، ۵). بنابراین کاهش ویتامین B12 باعث بدتر شدن فرآیندهای التهابی و از دست رفتن میلین و همچنین کاهش روند تشکیل دوباره میلین و ترمیم آن می‌شود. اگرچه ویتامین B12 نقش مهمی در بیماری مالتیپل اسکلروزیس ایفا می کند ولی مکانسیم مولکولی آن مشخص نشده است(۶). با این حال مطالعات جدید نشان می‌دهد که احتمالاً نقص در ویتامین B12 باعث برهم زدن تعادل میان فاکتورهایی رشد و سیتوکاین ها می گردد و این منجر به آسیب صفحات میلین می‌شود. این مطالعات پیشنهاد می کند که نقص در ویتامین B12، سبب افزایش سنتز و بالا رفتن میزان فاکتورهای (Myelinotoxic) مانند TNF-α شده که برای میلین سمی بوده و از طرف دیگر منجر به کاهش سنتز و پایین رفتن میزان فاکتورهای تروفیک میلین (Myelinotrophic) مانند اینترلوکین-۶ و فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor (EGF)) می گردد. مجموعه این وقایع سبب آسیب در میلین سیستم عصبی مرکزی می‌شود(۷). مطالعات نشان می دهد کاهش ویتامین B12 باعث ایجاد بیماری‌هایی می‌شود که با تخریب میلین همراه (Demyelination) است. ویتامین B12 برای متیله شدن DNA، چربی ها و پروتئین‌ها ضروری است(۳). پروتئین اصلی میلین در انسان، دارای یک متیل- آرژنین است که در موقعیت ۱۰۷ قرار دارد. متیله شدن این پروتئین، مسئول تمامیت و پایداری میلین می باشد. کمبود ویتامین B12 و نقص در متیله شدن، می‌تواند منجر به ایجاد فرم ناقص یا ناپایدار پروتئین اصلی میلین شود(۱۲). اولیگودندروسیت‌ها در بیان MBP نقش دارند(۱۳). ایجاد اولیگودندروسیت‌های تولید کننده میلین از سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت ها، Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) نیازمند فعال شدن و هماهنگی دسته‌ای از تنظیم کننده‌های کپی برداری است که برای بیوسنتز اجزا میلین مهم است(۱۴). فاکتور های کپی برداری Olig1 و Olig2، نقش مهمی در تمایز اولیگودندروسیت‌ها، تولید میلین (Myelination) و همچنین تولید دوباره میلین (Reyelination) ایفا می کند. دنبال بیماری‌های ناشی از تخریب میلین در سیستم عصبی مرکزی، Olig1 توسط اولیگودندروسیت‌ها، نقش مهمی در تولید میلین و همچنین در ایجاد دوباره میلین بازی می کند(۱۶). $Olig_2$ در تکوین لولی و تمایز نقش دارد.

مطالعات اخیر نشان داد که olig2 برای تمایز سلول های گلیا در طی تکوین و بعد از آسیب، ضروری می‌باشد. در طی رشد و نمو و پس از آن، Olig2 به طور وسیعی در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شود که حاکی از آن است که این فاکتور نقش‌های متعددی در تمام مناطق سیستم عصبی مرکزی بر عهده دارد(۱۷). به طور کلی با در نظر گرفتن نقش ویتامین B12 در تولید میلین توسط الیگودندروسیت‌ها و با توجه به اعمال Olig2 در تمایز سلول های نوروگلیا نظیر اولیگودندروسیت، در این تحقیق به بررسی اثرات ویتامین B12، در بیان فاکتور کپی برداری Olig2 در سیستم عصبی مرکزی پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه کمی- کیفی بوده و به منظور بررسی اثر ویتامین B12 بر بیان Olig2 ، از موش های آزمایشگاهی نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها در اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه گیلان نگهداری شدند. دمای اتاق ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲:۱۲ ساعت تنظیم شد. غذا و آب نیز در اختیار موش‌ها قرار داده شد. در تمام آزمایشات ملاحظات

اخلاقی در نظر گرفته شد. برای انجام آزمایشات از موش‌های نر بالغ ۶ هفته‌ای استفاده گردید ودر سه گروه مجزا نگهداری شدند. برای هر گروه ده موش استفاده شد (n =۳۰). تزریق‌ها برای سه هفته و هفته‌ای یک نوبت انجام شد. به گروه اول مقدار ۵۰ میکروگرم ویتامین B12 محلول در سرم فیزیولوژی و به گروه دوم سرم فیزیولوژی به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. به گروه سوم هیچ‌گونه تزریق انجام نشد (گروه کنترل). سه هفته بعد از اولین تزریق، موش‌ها با سدیم نپتوباریتال توسط ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد بیهوش شدند سپس کورتکس کغز آن ها جدا و در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی شست و شو داده شدند سپس به قطعات ریز تقسیم شدند. جهت تهیه عصاره، کورتکس مغز در بافر لیز کننده لیز گردید. نمونه ها و در ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز کننده پروتئین (150mMNacl, 1.0% Np40,20 mM Tris(pH.7.5),5mM EDTA) به همراه مهارکننده پروتئاز (Roche Diagnostic Ltd, West Sussex,Uk) قرار داده شدند و به‌طور مکانیکی و سونیکاسیون، به‌صورت هموژن در آورده شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن، عصاره های پروتئین جدا و در °C ۷۰ نگهداری شدند.

غلظت کل پروتئین در عصاره، با روش برادفورد (Bradford) انجام شد. برای آنالیز میزان بیان Olig2، از وسترن بلات استفاده شد. برای وسترن بلات، عصاره ها با بافر حاوی SDS ۳/۲ درصد (3.2 Sodium dodecyl sulfate)، گلیسرول ۱۵ درصد، β- مرکاپتواتانل ۲/۸ مولار و برومونول آبی ۰/۰۰۱۵ درصد مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) ۱۵ درصد قرار داده شدند (Bio-Rad, Milan, Italy) و بر اساس روش لاملی جدا شدند. سپس پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل، به صفحات نیتروسلولز که دارای اندازه منفذ ۰/۴۵ میکرومتر بودند و از شرکت Bio-Rad تهیه شدند، منتقل گردیدند. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در محلول بلوکه کننده (سالین بافر فسفات به همراه ۵ درصد شیر خشک)، صفحه نیترو سلولز به مدت ۲۴ ساعت در محلول حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه Olig2 (شرکت Abcam) با غلظت ۱:۱۰۰۰ و در دمای ۴°C قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در کمپلکس اویدین- بیوتین (Vector Lab., Peterborough, UK) قرار گرفتند. بعد از آن نمونه‌ها با دی آمینوبنزیدین (DAB) (Vector Lab., UK) رنگ‌آمیزی شده و برای بررسی غلظت پروتئین‌ها در باندها از نرم افزار Metaview استفاده شد. از β-توبولین نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

آنالیز آماری: تمام نتایج ارائه شده به‌صورت Mean±SEM محاسبه شد. در تمام آزمایشات حداقل تعداد ۲۰ نمونه، مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری با استفاده از student's t-test انجام گردید و فقط P≤ ۰/۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

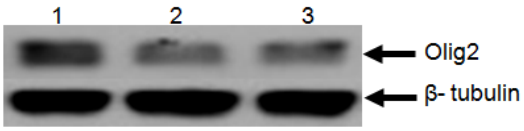
*غلظت کل پروتئین*

میانگین غلظت کل پروتئین در عصاره کورتکس مغز گروه تزریق شده با ویتامین B12 (گروه اول) ۲۷/۸۸±۴/۱۲ گرم در لیتر و در گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه دوم) ۱۴/۳۶±۱/۸۸ گرم در لیتر و در گروه بدون تزریق (گروه سوم) ۱۵/۲۵±۱/۵۱ گرم در لیتر محاسبه شد. آنالیز آماری نشان داد که افزایش غلظت کل پروتئین گروه اول در مقایسه با گروه دوم و گروه سوم، معنی دار بوده (p<۰/۰۱) ولی مقایسه گروه دوم و گروه سوم نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p >۰/۰۵).

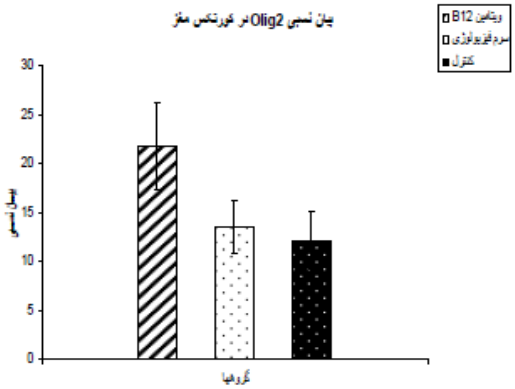
*بررسی بیان نسبی Olig2 در کورتکس مغز با استفاده از روش وسترن بلات*

عصاره‌های کورتکس مغز موش‌ها با استفاده از ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره ها بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد قرار گرفت و الکتروفورز انجام شد و به منظور بررسی بیان Olig2 در عصاره کورتکس مغز موش، از وسترن بلات استفاده شد. بیان نسبی Olig2 در سه گروه با استفاده از نرم افزار Metaview محاسبه و محاسبات آماری انجام شد (تصاویر شماره ۱ و ۲). میانگین بیان نسبی Olig2 در گروه تزریق شده با ویتامین B12، گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی و گروه کنترل به ترتیب ۴/۴۴± ۲۱/۸۳، ۲/۷۳±۱۳/۵۰، و ۲/۹۲±۱۲/۱۶ می‌باشد. نتایج نشان داد که بیان نسبی این پروتئین در گروه تزریق شده با ویتامین B12 نسبت به گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی و گروه بدون تزریق، افزایش معنی‌دار می‌باشد (p>۰/۰۰۲). در حالی‌که تفاوت بین دو گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی و کنترل معنی‌دار نمی‌باشد (p= ۰/۴۳).




**تصویر شماره ۱:** بیان پروتئین Olig2 در عصاره مغز موش های بالغ نر تزریق شده با ویتامین B12 (چاهک ۱) و نمونه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (چاهک ۲) و نمونه کنترل (چاهک ۳). بیان بتا توبولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (loading control) در نظر گرفته شده است.




**تصویر شماره ۲:** بیان نسبی Olig2 در عصاره مغز در نمونه‌های تزریق شده با ویتامین B12 و تزریق شده با سرم فیزیولوژی و کنترل. افزایش بیان نسبی Olig2 در نمونه‌های تزریق شده با ویتامین B12 در مقایسه با گروه‌های دیگر مشخص است. شدت سیگنال‌های آزمایشات ایمونوبلاتینگ نمونه ها توسط آنالیز های دانسیتومتری تعیین شد.

## بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که ویتامین B12 در کورتکس مغز موش، باعث افزایش معنی‌داری در بیان Olig2 و غلظت کل پروتئین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. به دنبال بیماری‌های ناشی از تخریب میلین در سیستم عصبی مرکزی Olig2 توسط اولیگو وندوسیت‌ها نقش مهمی در تولید میلین و تشکیل مجدد میلین ایفا می‌کند(۱۶). اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین نقش مهمی در حمایت اعمال طبیعی نورون‌های سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارند. ایجاد اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین از سلول‌های پیش ساز آن‌ها، نیازمند فعال شدن و هماهنگی تنظیم کننده‌های کپی برداری است که برای بیوسنتز میلین مهم می باشد(۱۴). مکانیسم های مولکولی ایجاد اولیگودندروسیت های فعال و تولید کننده میلین در سیستم عصبی مرکزی بعد از تولد، به طور کامل مشخص نشده است. در میان این فاکتور های کپی‌برداری، Olig2 در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی بیان شده و نقش‌های مهمی را در مغز انجام می‌دهد(۱۸). نشان داده شده که سلول‌های پیش‌ساز $Olig2^+$ قادر هستند به الیگودندروسیت ها و آستروسیت ها تمایز یابند(۱۹). موش‌هایی که ژن Olig2 در آن‌ها حذف شده است، فاقد اولیگودندروسیت یا سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت، در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی بوده لذا این موضوع نشان دهنده آن است که در تمام مناطق سیستم عصبی مرکزی، Olig2 به طور مثبت باعث تنظیم اولیگودندروسیت‌ها می‌شود(۲۰). فقدان Olig2 فعال، باعث کاهش آستروسیت ها در دوران جنینی می‌شود(۱۷). همچنین مطالعات متعدد دیگر نشان می‌دهد که olig2 نقش مهمی را در ایجاد اولیگودندروسیت‌های فعال بعد از آسیب‌های مغزی، برعهده دارد(۲۰، ۲۱).

مطالعات نشان می‌دهد که بیماران با کمبود ویتامین B12 و بیماری مالتیپل اسکلروزیس، دارای خصوصیات پاتوفیزیولوژیکی مشترکی هستند. این ویتامین به عنوان

کوفاکتور در تولید میلین نقش داشته و دارای اثرات تنظیم کنندگی بر سیستم ایمنی می‌باشد(۲۲)، اما مطالعات دیگر نشان می‌دهد که ارتباطی بین میزان ویتامین B12 و بیماری مالتیپل اسکلروزیس وجود ندارد(۲۳). در این تحقیق به بررسی اثر ویتامین B12 بر بیان olig2 در کورتکس مغز پرداخته شده است. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که بین کمبود این ویتامین و تخریب میلین رابطه ای وجود دارد. ویتامین B12 نقش مهمی در رابطه با بیماری مالتیپل اسکلروزیس دارد. نشان داده شده است که این ویتامین، با تأثیر بر سیستم ایمنی و تنظیم فعالیت سایتوکاین‌ها، در بیماری مالتیپل اسکلروزیس نقش دارد. مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین B12، باعث افزایش غلظت کل پروتئین و بیان Olig2 در کورتکس می‌شود. با توجه به افزایش غلظت کل پروتئین در گروه تزریق شده با ویتامین B12، به نظر می‌رسد که احتمالاً این ویتامین، بر روی دستگاه سنتز پروتئین اثر دارد(۲۴). از طرف دیگر با توجه به نقش مهم Olig2 به عنوان یک فاکتور کپی برداری در تمایز و بلوغ اولیگودندروسیت‌های سنتز کننده میلین، به‌نظر می‌رسد که ویتامین B12 با افزایش بیان Olig2، باعث تمایز سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت‌ها به الیگودندروسیت‌های بالغ شده و از این طریق به تولید میلین کمک می‌کند. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که ویتامین B12 باعث بیان پروتئین اصلی میلین و در نتیجه تولید بیشتر میلین می‌شود(۲۵).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بنابر نتایج حاصل از این تحقیق مبنی بر افزایش بیان Olig2 در اثر تزریق ویتامین B12 و همچنین اثر ویتامین B12 بر تولید میلین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً این ویتامین با تمایز بیشتر سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و تبدیل آن‌ها به الیگودندروسیت‌ها، بر فرآیند میلین سازی تأثیر دارد.

## سپاسگزاری

از دانشگاه گیلان به جهت پشتیبانی مالی قدردانی می‌نماییم.

## References

1. Miller A, Korem M, Almog R, Galboiz Y. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2005; 233(1-2): 93-7.
2. Crellin RF, Bottiglieri T, Reynolds EH. Multiple sclerosis and macrocytosis. Acta Neurol Scand. 1990; 81(5): 388-91.
3. Najafi MR, Shaygannajad V, Mirpourian M, Gholamrezaei A. Vitamin B(12) Deficiency and Multiple Sclerosis; Is there Any Association? Int J Prev Med. 2012; 3(4):286-9.
4. Schroecksnadel K, Leblhuber F, Frick B, Wirleitner B, Fuchs D. Association of hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease with elevated neopterin levels. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2004; 18 (3): 129-33.
5. Peracchi M, Bamonti Catena F, Pomati M, De Franceschi M, Scalabrino G. Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor-alpha and epidermal growth factor. Eur J Haematol. 2001; 67 (2): 123-7.
6. van Rensburg SJ, Kotze MJ, Hon D, Haug P, Kuyler J, Hendricks M, et al., Iron and the folate-vitamin B12-methylation pathway in multiple sclerosis. Metab Brain Dis. 2006; 21 (2-3): 121-37.
7. Scalabrino G. The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons

learned from its deficiency. Prog Neurobiol. 2009; 88 (3): 203-20.

8. Regland B, Abrahamsson L, Blennow K, Gottfries CG, Wallin A. Vitamin B12 in CSF: reduced CSF/serum B12 ratio in demented men. Acta Neurol Scand. 1992; 85 (4): 276-81.
9. Coppedè F, Tannorella P, Pezzini I, Migheli F, Ricci G, Caldarazzo lenco E, et al., Folate, homocysteine, vitamin B12, and polymorphisms of genes participating in one-carbon metabolism in late-onset Alzheimer's disease patients and healthy controls. Antioxid Redox Signal. 2012; 17(2): 195-204.
10. Chatterjee A, Yapundich R, Palmer CA, Marson DC, Mitchell GW. Leukoencephalopathy associated with cobalamin deficiency.Neurology. 1996; 46 (3): 832-4.
11. Baldwin GS, Carnegie PR. Specific enzymic methylation of an arginine in the experimental allergic encephalomyelitis protein from human myelin. Science. 1971; 171 (971): 579-81.
12. Sponne IE, Gaire D, Stabler SP, Droesch S, Barbé FM, Allen RH, et al., Inhibition of vitamin B12 metabolism by OH-cobalamin c-lactam in rat oligodendrocytes in culture: a model for studying neuropathy due to vitamin B12 deficiency. Neurosci Lett. 2000; 288 (3): 191-4.
13. Gokhan S, Marin-Husstege M, Yung SY, Fontanez D, Casaccia-Bonnefil P, Mehler MF. Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. J Neurosci. 2005; 25 (36): 8311-21.
14. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. Nat Rev Neurosci. 2004; 5 (5): 409-19.
15. Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. Science. 2004; 306 (5704): 2111-5.
16. Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K. Olig2 transcription factor in the developing and injured forebrain; cell lineage and glial development. Mol Cells. 2009; 27 (4): 397-401.
17. Cai J, Chen Y, Cai WH, Hurlock EC, Wu H, Kernie SG, A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development.Development. 2007; 134 (10): 1887-99.
18. Ono M, Kikusui T, Sasaki N, Ichikawa M, Mori Y, Murakami-Murofushi K. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. Neuroscience. 2008; 156 (4): 1103-10.
19. Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. Curr Biol. 2002; 12 (13): 1157-63.
20. Islam MS, Tatsumi K, Okuda H, Shiosaka S, Wanaka A. Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions. Neurochem Int. 2009; 54 (3-4): 192-8.
21. Mashayekhi F, Faraji M, Mousavi S. Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Myelin Basic Protein, Olig1 and Olig2 Expression in the Cerebral Cortex of Cuprizone Induced

Multiple Sclerosis Mice. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 22 (87): 65-73.

22. Miller A, Korem M, Almog R, Galboiz Y. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. Neurol Sci. 2005; 233 (1-2): 93-7.
23. Bowling AC, Stewart TM. Current Complementary and Alternative Therapies for Multiple Sclerosis. Curr Treat Options Neurol. 2003; 5 (1): 55-68.
24. Hassing L, Wahlin A, Winblad B, Bäckman L. Further evidence on the effects of vitamin B12 and folate levels on episodic memory functioning: a population-based study of healthy very old adults. Biol Psychiatry. 1999; 45 (11): 1472-80.
25. Lee JH, Lee YA, Oh KH, Chang N. Effects of dietary folic acid on the expression of myelin basic protein in the brain and spinal cord of pregnant and lactating rats. Ann Nutr Metab. 2010; 56 (2): 83-90.