

Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Myelin Basic Protein, Olig1 and Olig2 Expression in the Cerebral Cortex of Cuprizone Induced Multiple Sclerosis Mice

Farhad Mashayekhi,
Mahdiyeh Faraji,
Seyyedeh Zahra Mousavi

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

(Received December 25 , 2011 ; Accepted March 17 , 2012)

Abstract

Background and purpose: Oligodendrocytes are responsible for myelin synthesis in the central nervous system (CNS). Olig1 and Olig2 play an important role in regulating the development of oligodendrocyte precursor cells (OLPs). Myelin basic protein (MBP) is the main component of myelin sheath. Leukemia inhibitory factor (LIF) has an important role in myelination and pathology of multiple sclerosis (MS). This study investigates the effects of LIF on the expression of MBP, Olig1 and Olig2 in the cerebral cortex of cuprizone-induced MS mice.

Materials and methods: In order to induce MS the mice were treated by Cuprizone for 5 weeks. The mice were then divided into three groups. The first group was injected LIF (25 µg/kg BW per day, i.p.) for 6 weeks. The second group (SHAM) received normal saline, i.p. for six weeks and the third group did not receive any injection. The mice were killed after six weeks and the cerebral cortex was harvested and MBP, Olig1 and Olig2 expression was studied by western blotting.

Results: The results indicate that MBP, Olig1 and Olig2 expression in the cerebral cortical extracts was significantly increased in the LIF injected group compared with control and SHAM groups ($P < 0.001$).

Conclusion: This study reveals that LIF not only increases Olig1 and Olig2 expression in the oligodendrocytes and enhances oligodendrocytes activity and MBP expression, but also plays an important role in the pathophysiology of MS.

Key words: Leukemia inhibitory factor, Olig1, Olig2, oligodendrocytes, multiple sclerosis

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(87): 65-73 (Persian).

اثر فاکتور مهار کننده لوکمیا بر بیان پروتئین اصلی میلین، Olig2 و Olig1 در کورتکس مغز موش‌های مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس القا شده با Cuprizone

فرهاد مشایخی

مهدیه فرجی

سیده زهرا موسوی بنه حور

چکیده

سابقه و هدف: اولیگودندروسیت‌ها مسئول تولید میلین در سیستم عصبی مرکزی هستند. فاکتورهای رونویسی نظیر Olig2 و Olig1 در تنظیم تکوین سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت نقش مهمی دارند. مهمترین پروتئین سازنده میلین، پروتئین اصلی میلین (Myelin Basic Protein=MBP) است. فاکتور مهار کننده لوکمیا (Leukemia Inhibitory Factor=LIF) نقش مهمی در تولید میلین و پاتولوژی مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis=MS) دارند. در این مطالعه به بررسی اثر LIF بر بیان MBP، Olig1 و Olig2 در کورتکس مغز موش‌هایی پرداخته شده است که به‌طور تجربی به MS مبتلا شده‌اند.

مواد و روش‌ها: ایجاد MS در موش‌ها با دادن cuprizone برای مدت پنج هفته القاء گردید. سپس این موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند: به گروه اول ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن LIF و به گروه دوم سرم فیزیولوژی (گروه شم) به‌صورت داخل صفاقی به‌طور روزانه و به مدت شش هفته داده شد. به گروه سوم هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد (گروه کنترل). شش هفته بعد از تزریق، از کورتکس مغز آن‌ها عصاره تهیه و به کمک وسترن بلات میزان بیان MBP، Olig1 و Olig2 مطالعه شد.

یافته‌ها: بررسی نمونه‌ها با روش وسترن بلات نشان داد که میزان بیان MBP، Olig1 و Olig2 در کورتکس مغز موش‌های مورد بررسی در گروه تزریق شده با LIF در مقایسه با گروه کنترل و شم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p < 0.001$).
استنتاج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که LIF نه فقط باعث افزایش فاکتورهای کپی‌برداری نظیر Olig1 و Olig2 در اولیگودندروسیت‌ها و در نتیجه فعال شدن این سلول‌ها و افزایش بیان MBP شده و در تولید میلین نقش دارد، بلکه ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری MS بازی کند.

واژه‌های کلیدی: فاکتور مهار کننده لوکمیا، Olig1، Olig2، اولیگودندروسیت، مالتیپل اسکلروزیس

مقدمه

التهاب و تخریب میلین در سیستم عصبی مرکزی و به‌خصوص در بافت ماده سفید رخ داده و باعث ایجاد پلاک‌ها یا آسیب‌هایی در مغز و نخاع می‌شود. علاوه بر

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis: MS) یک بیماری خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی است که مغز، نخاع و اعصاب بینایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

E-mail: mashayekhi@guilan.ac.ir

مؤلف مسئول: فرهاد مشایخی - رشت: خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲۷

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۲/۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۴

فاکتور نکروزه کننده تومور آلفا و بتا در ایجاد MS در افراد مختلف نقش دارند (۷،۶).

سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-2، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α)، اینترفرون گاما نیز نقش کلیدی در فعال شدن و حفظ پاسخ‌های اتوایمون دارند و TNF ممکن است مستقیماً باعث آسیب غشاء میلین یا اولیگودندروسیت‌ها شود (۸). مطالعات اخیر نشان دهنده نقش مهم فاکتورهای نوروتروفین در میلین سازی است. این خانواده از فاکتورهای رشد شامل فاکتور رشد عصبی (NGF)، نوروتروفین 3 و نوروتروفین 4/5 (NT-3 و NT-4/5)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain Derived Neurotrophic Factor: BDNF)، فاکتور مهارکننده لوکیما (Leukemia Inhibitory Factor: LIF) می‌باشد (۹).

نشان داده شده است که NGF نقش مهمی در تنظیم تولید میلین در سلول‌های شوان و اولیگودندروسیت‌ها در محیط کشت بازی می‌کند. BDNF یا NT-3 باعث افزایش رشد آکسون، تکثیر سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و تولید میلین در نخاع موش بالغ بعد از آسیب می‌شود (۱۰). یکی دیگر از سایتوکاین‌ها که در فرآیند میلین سازی نقش دارد LIF می‌باشد. LIF از خانواده IL-6 می‌باشد که در سیستم عصبی نیز بیان شده و اثرات متعددی بر سیستم عصبی دارد (۱۱). LIF قادر است تمایز نورون‌ها و نوروگلیاها را تحریک کند (۱۲). گیرنده LIF در سلول‌های عصبی بیان می‌شود. بیان همزمان LIF و گیرنده آن در مغز بیماران مبتلا به پارکینسون و آلزایمر ممکن است نشان دهد که LIF نقش مهمی در بیماری‌های تحلیل‌رونده عصبی و بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی دارد (۱۳). LIF نقش مهمی به عنوان عامل نوروتروفیک بر روی بقاء اولیگودندروسیت‌ها و میلین سازی بازی می‌کند (۱۴، ۱۵). منبع تولید LIF، آستروسیت‌ها است. بنابراین فعال کردن سیگنال گیرنده LIF ممکن است نقش مهمی در درمان بیماری‌های تحلیل‌رونده عصبی نظیر MS بازی کند (۱۶).

آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی، بیماری MS یک بیماری اتوایمون نیز می‌باشد که در آن سیستم ایمنی مختل می‌شود. آکسون‌ها نیز ممکن است در اثر فقدان عایق‌بندی و تأمین تغذیه توسط سلول‌های اطراف آسیب ببیند. حدود ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به MS مبتلا هستند (۲۰۱). بیماری MS در زنان حدود ۳ برابر شایع‌تر از مردان است. سن شروع آن به‌طور معمول بین ۲۰ تا ۴۰ سال بوده و در مردان نسبت به زنان اندکی دیرتر شروع می‌شود. بیشترین شیوع این بیماری در شمال اسکاتلند بوده که ۲۵۰ مورد در هر صد هزار نفر است. در شمال اروپا و شمال ایالات متحده آمریکا و کانادا نیز میزان ابتلا بالا است. در مقابل، شیوع آن در مناطق استوایی آفریقا و در خاورمیانه پایین است (۴،۳). ضایعات حاد MS با تجمع سلول‌های التهابی تک هسته‌ای نظیر لمفوسیت‌های T و ماکروفاژها در اطراف سیاهرگ‌ها مشخص می‌شود که به ماده سفید اطراف نیز پخش می‌شود. در مناطق التهاب، سد خونی مغزی از هم گسسته می‌شود. در اکثر موارد، در ضایعات آنتی‌بادی‌هایی بر علیه میلین وجود دارد که در پیشبرد تخریب میلین، تحریک ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیال دخالت کرده و این سلول‌ها بقایای میلین را حذف می‌کنند (۱).

جهت ایجاد MS تجربی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که مهمترین آن‌ها استفاده از Cuprizone و اتیدیوم بروماید است. با توجه به این که Cuprizone از طریق خوراکی و از طریق غذا به موش‌ها داده می‌شود لذا روش مناسبی است. اما القای MS با استفاده از اتیدیوم بروماید نیازمند به بیهوش کردن حیوان و جراحی می‌باشد (۵).

شواهد همچنین نشان‌دهنده اثرات ژنتیک بر MS است. سفیدپوستان نسبت به آفریقایی‌ها یا آسیایی‌ها حتی زمانی که در محیط مشابه سکونت داشته باشند به‌طور ذاتی در خطر بیشتری برای ابتلا به MS هستند. به‌طور کلی پلی‌مورفیسم ژن‌های مربوط به اینترلوکین‌ها،

میلین توسط الیگودندروسیت‌ها و همچنین با توجه به اعمال Olig1 و Olig2 در تمایز سلول‌های نوروگلیا نظیر اولیگودندروسیت و در نتیجه میلین‌سازی، در این تحقیق به بررسی اثرات LIF در بیان فاکتور کپی‌برداری Olig1 و Olig2 و MBP در کورتکس مغز موش‌های مبتلا به MS تجربی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

ایجاد MS تجربی در موش و تهیه نمونه‌ها

به منظور بررسی اثر LIF بر فرآیند میلین‌سازی در کورتکس مغز از موش آزمایشگاهی نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها در اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی 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 ۸ هفته‌ای استفاده گردید و در سه گروه مجزا نگهداری شدند. برای هر گروه دوازده موش استفاده شد (n=۱۲). وزن موش‌های مورد استفاده به‌طور میانگین ۲۷ تا ۲۹ گرم بوده است.

برای ایجاد MS تجربی با استفاده از Cuprizone، از موش‌های ۸ هفته‌ای نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد در اتاق حیوانات نگهداری شدند. موش‌ها به مدت ۵ هفته ۰/۲ درصد (از شرکت Sigma-Aldrich) به همراه غذا داده شد. بعد از پنج هفته و ایجاد علائم MS در این موش‌ها، به آن‌ها غذای فاقد Cuprizone داده و از همان زمان به سه گروه تقسیم شدند: به گروه اول مقدار ۳۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن LIF به صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal=IP) به‌طور روزانه و به مدت شش هفته داده شد. به گروه دوم سرم فیزیولوژیک به صورت IP به‌طور روزانه و به مدت شش هفته داده شد (گروه شم). به گروه سوم هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد (گروه

LIF در پاتوژنز بیماری‌های عصبی نقش مهمی بازی می‌کند. بیان آن در پلاک‌های بیماری آلزایمر دیده شده است. تولید LIF احتمالاً باعث حفظ نورون‌ها در برابر خاصیت سمی ایجاد شده توسط B-آمیلوئید می‌شود. نشان داده شده که LIF ممکن است نقش مهمی در بیماری‌های التهابی سیستم عصبی مرکزی نظیر MS داشته باشد. بیان LIF در پاسخ به، از بین رفتن میلین در بیماری‌های التهابی زیاد می‌شود و در نتیجه LIF باعث حفظ اولیگودندروسیت‌های بالغ شده و مانع آسیب و مرگ آن‌ها می‌شود. نشان داده شده که LIF در تکثیر سلول‌های اپی‌تلیوم بویایی در پستانداران نقش مهمی دارد و دادن LIF به موش‌ها باعث افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود. LIF از طریق جفت وارد جنین شده و باعث پیشبرد نوروژنز در مغز جنین موش می‌شود. غلظت LIF در سرم در بیماران مبتلا به متزیت نیز دیده شده است (۱۷).

در بیماری MS، اولیگودندروسیت‌ها از بین می‌روند، تعداد کمی از سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت به اولیگودندروسیت‌ها تبدیل شده و شروع به میلین‌سازی کرده ولی قادر به ادامه تولید میلین نیست. فاکتورهای کپی‌برداری Olig1 و Olig2 نقش مهمی در تمایز اولیگودندروسیت‌ها و تولید میلین و همچنین تولید دوباره میلین بازی می‌کند. Olig2 متعلق به خانواده بزرگ فاکتورهای کپی‌برداری است که در تکوین و تمایز سلول‌های گلیا نظیر اولیگودندروسیت‌ها نقش دارد. Olig1 نقش مهمی در تولید میلین توسط اولیگودندروسیت‌ها و همچنین در ایجاد دوباره میلین به دنبال بیماری‌های ناشی از تخریب میلین در سیستم عصبی مرکزی بازی می‌کند (۱۸). Olig2 به‌طور وسیعی در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی در طی رشد و نمو و بعد از آن بیان می‌شود که حاکی از آن است که Olig2 نقش‌های متعددی در تمام مناطق سیستم عصبی مرکزی بازی می‌کند (۱۹).

به‌طور کلی با در نظر گرفتن نقش LIF در تولید

کنترل). LIF از شرکت Abcam- Cambridge, UK در اندازه ۱۰ میکروگرم خریداری گردید.

برای تشخیص القای MS توسط Cuprizone از تست واکنش عمومی (Social interaction test) استفاده شد (۲۰) که در آن فعالیت های حرکتی حیوان مورد توجه قرار می گیرد.

برای هر گروه، تعداد ۱۲ موش و در مجموع ۳۶ موش استفاده شد. شش هفته بعد از تزریق ها، موش ها با دی اتیل اتر یا پنتوباریتال بیهوش شده و کورتکس مغز آن ها پس از جدا کردن در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی شستشو داده و جهت تهیه عصاره، کورتکس مغز در بافر لیز کننده لیز گردید. کورتکس مغز جدا و به قطعات ریز تقسیم و در ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز کننده پروتئین (150 mM NaCl, 1.0% NP40, 20 mM Tris (pH.7.5), 5mM EDTA (Roche Diagnostic Ltd, West Sussex, UK) پروتئاز قرار داده شده و به طور مکانیکی و سونیکاسیون به صورت هموژن در آورده شد (۲۱). بعد از سانتریفوژ کردن، عصاره های پروتئین جدا و در فریزر $^{\circ}\text{C} -70$ نگهداری شد.

اندازه گیری غلظت کل پروتئین با روش بردفورد (Bradford)

برای بررسی کمی محتوای پروتئینی مایع مغزی - نخاعی از روش بردفورد استفاده شد. این روش از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250 استفاده می شود. اتصال رنگ به پروتئین موجب می شود که ماکزیمم جذب از ۴۶۵ نانومتر (رنگ قرمز) به ۵۹۵ نانومتر (رنگ آبی) تغییر یابد. ابتدا برای رسم نمودار استاندارد بردفورد، محلول هایی پروتئینی با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه، که از سرم آلبومین گاوی استفاده شد و این مقادیر در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس در لوله های آزمایش ۲/۵ میلی لیتر معرف بردفورد (Coomassie Brilliant Blue G-250) یک صدم درصد،

۵ درصد اتانول ۹۵ درصد، ۱۰ درصد اسید فسفریک ۸۵ درصد) ریخته و در هر یک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های BSA تهیه شده اضافه گردید. لوله ها را به خوبی مخلوط کرده و بعد از ۲۰ دقیقه، جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از جذب های به دست آمده در غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از سرم آلبومین گاوی، منحنی استاندارد رسم شد. با توجه به جذب محلول به دست آمده در ۵۹۵ نانومتر و منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در عصاره ها محاسبه گردید (۲۲).

بررسی بیان نسبی *Olig1*، *Olig2* و *MBP* در عصاره کورتکس مغز به روش وسترن بلات

برای آنالیز میزان بیان *MBP*، *Olig1* و *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 بروموفنول آبی مخلوط شد. سپس نمونه ها بر روی ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Milan, Italy) ۱۵ درصد قرار داد شدند. سپس پروتئین های جدا شده بر روی ژل به صفحات نیتروسولول با اندازه منفذ ۰/۴۵ میکرومتر از شرکت Bio-Rad منتقل شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در محلول بلوکه کننده (سالین بافر فسفات به همراه ۵ درصد شیر خشک)، صفحه نیترو سلولز برای ۲۴ ساعت در محلول حاوی آنتی بادی مونوکلونال بر علیه *MBP*، *Olig1* و *Olig2* (شرکت Abcam) با غلظت ۱:۱۰۰۰ در دمای $^{\circ}\text{C} 40$ قرار داده شد. سپس نمونه ها برای ۲ ساعت در کمپلکس آویدین - بیوتین (Vector Lab., Peterborough, UK) قرار داده شدند. سپس نمونه ها با دی آمینوبنزیدین (Vector Lab., UK) رنگ آمیزی شده و برای بررسی غلظت پروتئین ها در باندها از نرم افزار Metaview استفاده شد. از β -توبولین نیز به عنوان کنترل استفاده شد. روش وسترن بلات

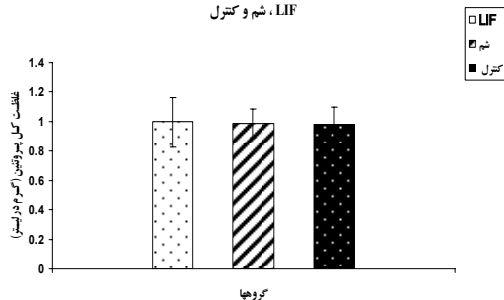
مطابق پروتکل شرکت Abcam که به همراه آنتی‌بادی ارسال شده بود انجام گردید. تمام نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شد. در تمام آزمایشات تعداد ۱۲ نمونه مورد استفاده قرار گرفت. از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA جهت آنالیز آماری استفاده شد و برای بررسی اختلاف داخل سه گروه از Post-hoc استفاده شد و فقط $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

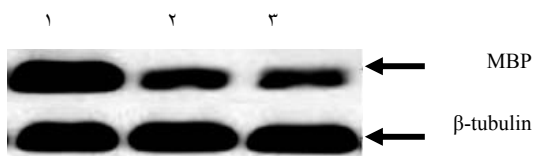
غلظت کل پروتئین: غلظت کل پروتئین های عصاره مغز در نمونه های گروه های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب 0.97 ± 0.11 ، 0.99 ± 0.16 و 0.98 ± 0.09 محاسبه شد. غلظت کل پروتئین های عصاره مغز در نمونه های تزریق شده با LIF نسبت به گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل به میزان کمی افزایش یافته ولی این افزایش معنی دار نبوده است (نمودار شماره ۱).

اثر LIF بر بیان MBP، Olig1 و Olig2: بررسی اثر LIF بر تولید کورتکس مغز در موش های با MS تجربی و مقایسه آن با دو گروه دیگر (گروه های شم و کنترل) نشان داد که میزان بیان MBP، Olig1 و Olig2 در گروه تزریق شده با LIF بیشتر از دو گروه شم و کنترل می باشد. بیان MBP در عصاره مغز در نمونه های گروه های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب 0.67 ± 0.16 ، 0.82 ± 0.04 و 1.18 ± 0.02 محاسبه شد. بیان Olig1 در عصاره مغز در نمونه های گروه های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب 0.53 ± 0.11 ، 0.31 ± 0.11 و 0.69 ± 0.04 محاسبه شد. بیان Olig2 در عصاره مغز در نمونه های گروه های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب 0.5 ± 0.06 ، 0.46 ± 0.07 و 0.82 ± 0.07 محاسبه شد (تصاویر شماره ۱، ۲ و ۳). بررسی بیشتر به کمک نرم افزار Metaview و Image Analyzer نشان داد که میزان بیان نسبی

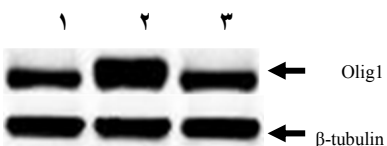
غلظت کل پروتئین در کورتکس مغز موش های MS تجربی در گروه های تزریق شده با LIF، شم و کنترل



نمودار شماره ۱: غلظت کل پروتئین های ($\text{mean} \pm \text{SE}$) عصاره مغز در نمونه های تزریق شده با LIF و گروه های شم و کنترل. غلظت کل پروتئین های عصاره مغز در نمونه های تزریق شده با LIF نسبت به گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل افزایش یافته ولی این افزایش معنی دار نبود



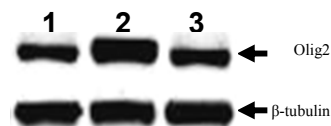
تصویر شماره ۱: بیان پروتئین MBP در عصاره مغز موش های تزریق شده با LIF (شماره ۱)، گروه شم (شماره ۲) و گروه کنترل (شماره ۳). میزان بیان پروتئین MBP در گروه اول بیشتر از گروه دوم و سوم است. از بتا توبولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (Loading control) استفاده شد.



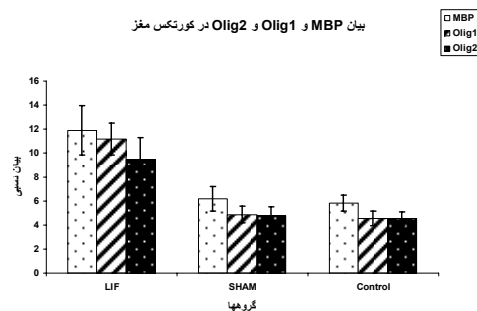
تصویر شماره ۲: بیان پروتئین Olig1 در عصاره مغز موش های تزریق شده با LIF (شماره ۲)، گروه شم (شماره ۳) و گروه کنترل (شماره ۱). میزان بیان پروتئین Olig1 در گروه اول بیشتر از گروه دوم و سوم است. از بتا توبولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (Loading control) استفاده شد

میلین سازی بیان و به آکسون‌ها اضافه می‌شود و در میلین سازی سیستم عصبی مرکزی نقش دارند لذا افزایش در MBP در کورتکس مغز در پاسخ به تزریق LIF ممکن است در ارتباط با تولید میلین باشد. قبلاً نشان دادیم که غلظت LIF در مایع مغزی- نخاعی در بیماران MS افزایش می‌یابد (۲۴). که این امر نشان می‌دهد که این دو فاکتور در تحلیل عصبی نقش دارند. بنابراین می‌توان گفت که LIF ممکن است در پاتوفیزیولوژی MS نقش داشته باشد. همچنین نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که LIF نقش مهمی در ایجاد میلین در سیستم عصبی بازی می‌کند.

اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین نقش مهمی در حمایت اعمال طبیعی نوروهای سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارد. ایجاد اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین از سلول‌های پیش‌ساز آنها نیازمند به فعال شدن و هماهنگی تنظیم‌کننده‌های کپی برداری است که برای بیوسنتز میلین مهم می‌باشد (۲۵). مکانیسم‌های مولکولی ایجاد اولیگودندروسیت‌های فعال و تولیدکننده میلین در سیستم عصبی مرکزی در بعد از تولد هنوز به طور کامل مشخص نمی‌باشد. در میان این فاکتورهای کپی برداری، Olig2 در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی بیان شده و نقش‌های مهمی را در مغز انجام می‌دهد (۱۹). نشان داده شده که سلول‌های پیش‌ساز Olig2 قادر به تمایز به الیگودندروسیت‌ها و آستروسیت‌ها هستند (۲۶). موش‌هایی که ژن Olig2 در آنها حذف شده است فاقد اولیگودندروسیت یا سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی بوده و لذا این موضوع نشان می‌دهد که Olig2 به طور مثبت باعث تنظیم اولیگودندروسیت‌ها در تمام مناطق سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۲۷). فقدان Olig2 فعال باعث کاهش آستروسیت‌ها در دوران جنینی می‌شود (۱۹). همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که olig2 نقش مهمی در ایجاد اولیگودندروسیت‌های فعال بعد از آسیب‌های مغزی بازی می‌کند (۲۸).



تصویر شماره ۳: بیان پروتئین Olig2 در عصاره مغز موش‌های تزریق شده با LIF (شماره ۲)، گروه شم (شماره ۳) و گروه کنترل (شماره ۱). میزان بیان پروتئین Olig2 در گروه اول بیشتر از گروه دوم و سوم است. از بنا توپولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (Loading control) استفاده شد.



نمودار شماره ۲: بیان نسبی MBP، Olig1 و Olig2 (mean ± SE) در کورتکس مغز موش‌های MS تجربی در گروه‌های کنترل، شم و تزریق شده با LIF در ژل‌های وسترن بلات بیان هر سه پروتئین در گروه تزریق شده با LIF در مقایسه با گروه کنترل و شم به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.001$). اختلاف در بیان هر سه پروتئین مورد مطالعه در گروه کنترل و شم معنی‌دار نبوده است.

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق LIF به موش‌های مبتلا به MS تجربی باعث افزایش بیان MBP، Olig1 و Olig2 شده، ولی میزان کل پروتئین افزایش معنی‌داری نداشت. LIF، سایتوکاین با اعمال متعدد بوده که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. همانند بقیه سایتوکاین‌ها، بیان LIF بسیار کنترل شده است. این فاکتور رشد توسط بافت مغزی و شبکه کوروئید نیز بیان می‌شود (۲۳).

نشان داده شد که تزریق LIF باعث افزایش بیان پروتئین اصلی میلین (MBP) در موش‌هایی می‌شود که به طور تجربی MS شده اند (در مقایسه با گروه کنترل). چون MBP توسط اولیگودندروسیت‌های در حال

MBP در موش‌هایی که به طور تجربی به MS مبتلا شده‌اند گردیده است. با توجه به این که MBP توسط اولیگودندروسیت‌های فعال بیان می‌شود و از طرفی Olig1 و Olig2 نقش مهمی در تمایز اولیگودندروسیت‌ها دارد (۱۸). لذا افزایش بیان MBP در اثر LIF ممکن است به دلیل افزایش بیان Olig1 و Olig2 در اولیگودندروسیت‌ها باشد.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که LIF نه فقط باعث افزایش فاکتورهای کپی‌برداری در اولیگودندروسیت‌ها و در نتیجه فعال‌شدن آن‌ها و افزایش بیان MBP می‌شود بلکه ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری MS بازی می‌کند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی، دانشگاه گیلان به جهت پشتیبانی مالی قدردانی می‌نمایم. از آقای مجتبی اسلامی و خانم نائمه نایب زاده دانشجویان کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و تکوینی به جهت کمک در نگهداری کلنی موش‌ها سپاسگزاری می‌کنیم.

فاکتور کپی‌برداری Olig1 و Olig2 نقش مهمی در تمایز اولیگودندروسیت‌ها و تولید میلین و همچنین تولید دوباره میلین بازی می‌کند. علاوه بر Olig1 و Olig2، فاکتور کپی‌برداری دیگری بنام ZFP488 نیز باعث پیشبرد تمایز اولیگودندروسیت‌ها می‌شود. بیان Olig1 و Olig2 در دودمان سلول‌های اولیگودندروسیت در بعد از تولد نیز ادامه می‌یابد (۲۹).

مطالعات نشان می‌دهد که Olig1 نقش مهمی در تولید میلین توسط اولیگودندروسیت‌ها در مغز داشته و برای بیان فاکتور MBP ضروری است. الیگودندروسیت‌های بالغ پروتئین‌های میلین نظیر MBP، پروتئین پروتولپید، گلیکوپروتئین اولیگودندروسیت میلین و گلیکوپروتئین وابسته به میلین را بیان می‌کنند (۳۰). MBP یک پروتئین محیطی غشاء است که در موش ۱۸/۵ کیلودالتون وزن دارد. MBP یکی از اتو آنتی ژن‌های مهم غلاف میلین بوده و لذا در بیماری MS نقش مهمی دارد. MBP همچنین در ساختمان میلین نیز نقش دارد (۳۱).

در این تحقیق به بررسی اثر LIF بر بیان Olig1 و Olig2 و MBP پرداخته شد. نتایج نشان داد که LIF باعث افزایش معنی‌داری در بیان Olig1 و Olig2 و

References

1. Rudick R, Antel J, Confavreux C, Cutter G, Ellison G, Fischer J, et al. Recommendations from the National Multiple Sclerosis Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Ann Neurol* 1997; 42(3): 379-382.
2. Lewis GW. The social epidemiology of multiple sclerosis. *Sci Total Environ* 1990; 90: 163-190.
3. Swingle RJ, Compston D. The distribution of multiple sclerosis in the United Kingdom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986; 49(10): 1115-1124.
4. Handel AE, Jarvis L, McLaughlin R, Fries A, Ebers GC, Ramagopalan SV. The epidemiology of multiple sclerosis in Scotland: inferences from hospital admissions. *PLoS One* 2011; 6(1): e14606.
5. Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand* 2008; 188(Suppl): 72-76.
6. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39(9): 1083-1091.
7. Kallaur AP, Kaimen-Maciell DR, Morimoto HK, Watanabe MA, Georgeto SM, Reiche

- EM. Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis (review). *Int J Mol Med* 2011; 28(4): 467-479.
8. Fernandes Filho JA, Vedeler CA, Myhr KM, Nyland H, Pandey JP. TNF-alpha and -beta gene polymorphisms in multiple sclerosis: a highly significant role for determinants in the first intron of the TNF-beta gene. *Autoimmunity* 2002; 35(6): 377-380.
9. Slaets H, Hendriks JJ, Stinissen P, Kilpatrick TJ, Hellings N. Therapeutic potential of LIF in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2010; 16(11): 493-500.
10. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1998; 18(14): 5354-5365.
11. Soilu-Hänninen M, Broberg E, Röyttä M, Mattila P, Rinne J, Hukkanen V. Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurol Scand* 2010; 121(1): 44-50.
12. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Dutton R, Tan SS, Gearing DP, Bartlett PF, et al. Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur J Neurosci* 1996; 8(2): 291-299.
13. Rensink AA, Gellekink H, Otte-Höller I, ten Donkelaar HJ, de Waal RM, Verbeek MM, et al. Expression of the cytokine leukemia inhibitory factor and pro-apoptotic insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2002; 104(5): 525-533.
14. Marriott MP, Emery B, Cate HS, Binder MD, Kemper D, Wu Q, et al. Leukemia inhibitory factor signaling modulates both central nervous system demyelination and myelin repair. *Glia* 2008; 56(6): 686-698.
15. Linker RA, Kruse N, Israel S, Wei T, Seubert S, Hombach A, et al. Leukemia inhibitory factor deficiency modulates the immune response and limits autoimmune demyelination: a new role for neurotrophic cytokines in neuroinflammation. *J Immunol* 2008; 180(4): 2204-2213.
16. Ishibashi T, Lee PR, Baba H, Fields RD. Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve. *J Neurosci Res* 2009; 87(15): 3343-3355.
17. Waring P, Wycherley K, Cary D, Nicola N, Metcalf D. Leukemia inhibitory factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids. *J Clin Invest* 1992; 90(5): 2031-2037.
18. 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.
19. 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): 1887-1899.
20. Xu H, Yang HJ, Zhang Y, Clough R, Browning R, Li XM. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav Neurosci* 2009; 123(2): 418-429.
21. Shimada Y, Fukuda T, Aoki K, Yukawa T, Iwamuro S, Ohkawa K, et al. A protocol for immunoaffinity separation of the accumulated

- ubiquitin-protein conjugates solubilized with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 2008; 377(1): 77-82.
22. Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
23. Gregg C, Weiss S. CNTF/LIF/gp130 receptor complex signaling maintains a VZ precursor differentiation gradient in the developing ventral forebrain. *Development* 2005; 132(3): 565-578.
24. Mashayekhi F, Salehi Z. Expression of leukemia inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 2011; 18(7): 951-954.
25. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(5): 409-419.
26. 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): 1157-1163.
27. 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): 192-198.
28. 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.
29. Park HC, Mehta A, Richardson JS, Appel B. olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* 2002; 248(2): 356-368.
30. Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG, Stevens DB. Involvement of OSP/ claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res* 2000; 59(6): 706-711.
31. Kaushansky N, Eisenstein M, Zilkha-Falb R, Ben-Nun A. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP) as a relevant primary target autoantigen in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9(4): 233-236.