ORIGINAL ARTICLE

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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۸۷ فروردین سال ۱۳۹۱ (۷۳-۶۵)

اثر فاکتور مهار کننده لوکمیا بر بیان پروتئین اصلی میلین، Olig1 و Olig2 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 Olig1 و Olig2 در تنظیم تکوین سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت نقش مهمی دارند. مهمترین پروتئین سازنده میلین، پروتئین اصلی میلین (Myelin Basic Protein=MBP) است. فاکتور مهارکننده 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 ($p<۰/۰۰۱$).

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.

واژه های کلیدی: فاکتور مهارکننده لوکمیا، Olig1 ، Olig2، اولیگودندروسیت، مالتیپل اسکلروزیس

مقدمه

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

مولف مسئول: فرهاد مشایخی- رشت: خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی E-mail: mashayekhi@guilan.ac.ir
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان
تاریخ دریافت : ۹۰/۱۰/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۱۲/۱ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۲/۲۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی، بیماری MS یک بیماری اتوایمیون نیز می‌باشد که در آن سیستم ایمنی مختل می‌شود. آکسون‌ها نیز ممکن است در اثر فقدان عایق‌بندی و تأمین تغذیه توسط سلول‌های اطراف آسیب ببینند. حدود ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به MS مبتلا هستند(۲،۱). 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 صدهزار 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 می شود. 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 می کنند(۱).

جهت ایجاد MS تجربی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که مهمترین آن‌ها استفاده از Cuprizone و اتیدیوم بروماید است. با توجه به این‌که Cuprizone از طریق خوراکی و از طریق غذا به موش‌ها داده می‌شود لذا روش مناسبی است. اما القائ 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، 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 میلین‌سازی است. این خانواده از فاکتورهای رشد شامل فاکتور رشد عصبی (NGF)، نوروتروفین 3 و نوروتروفین 4/5 (NT-4/5 و NT-3)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain Derived Neurotrophic Factor: BDNF)، فاکتور مهارکننده لوکیا (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 می کند. 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 میلین‌سازی نقش دارد LIF می باشد. 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 میلین‌سازی بازی می کند(۱۵،۱۴). 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

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 می شود 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 منتژیت 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. فاکتور های کپی برداری 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 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 روش ها

ایجاد MS تجربی در موش و تهیه نمونه ها

به منظور بررسی اثر LIF بر فرآیند میلین سازی 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 سانتی گراد 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 موش های نر بالغ ۸ هفته ای 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 هفته ای نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد در اتاق حیوانات نگهداری شدند. موش‌ها به مدت ۵ هفته Cuprizone 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

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

برای تشخیص القائ 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 ودر مجموع ۳۶ موش استفاده شد. شش هفته بعد از تزریق‌ها، موش‌ها با دی اتیل اتر یا پنتوباربیتال 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 میلی‌لیتر بافر لیز کننده پروتئین (150 mMNacl, 1.0% Np40,20 mM) Tris (pH.7.5), 5mM EDTA به همراه مهارکننده پروتئاز (Roche Diagnostic Ltd, West Sussex,Uk) قرار داده شده و به طور مکانیکی و سونیکاسیون به صورت هموژن در آورده شد(۲۱). بعد از سانتریفوژ کردن، عصاره‌های پروتئین جدا و در فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- 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 می‌شود که ماکزیمم جذب از ۴۶۵ نانومتر (رنگ قرمز) به ۵۹۵ نانومتر (رنگ آبی) تغییر یابد. ابتدا برای رسم نمودار استاندارد بردفورد، محلول‌هایی پروتئینی با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه، که از سرم آلبومین گاوی استفاده شد و این مقادیر در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. سپس در لوله‌های آزمایش ۲/۵ میلی‌لیتر 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 محلول‌های BSA تهیه شده اضافه گردید. لوله‌ها را به خوبی مخلوط کرده و بعد از ۲۰ دقیقه، جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از جذب‌های به‌دست آمده در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سرم آلبومین گاوی، منحنی استاندارد رسم شد. با توجه به جذب محلول به‌دست آمده در ۵۹۵ نانومتر و منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در عصاره‌ها 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، عصاره‌ها با بافر حاوی SDS ۳/۲ درصد (3.2 Sodium dodecyl sulfate)، گلیسرول ۱۵ درصد، β- مرکاپتواتانل ۲/۸ مولار و برومونفول آبی مخلوط شد. سپس نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Milan, Italy) ۱۵ درصد قرار داد شدند. سپس پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل به صفحات نیتروسلولز 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}C$۴ قرار داده شد. سپس نمونه‌ها برای ۲ ساعت در کمپلکس آویدین- بیوتین (Vector Lab., Peterborough, UK) قرار داده شدند. سپس نمونه ها با دی آمینوبنزیدین (Vector Lab., UK) رنگ‌آمیزی شده و برای بررسی غلظت پروتئین‌ها در باندها از نرم‌افزار Metaview استفاده شد. از β-توبولین نیز به عنوان کنترل استفاده شد. روش وسترن بلات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

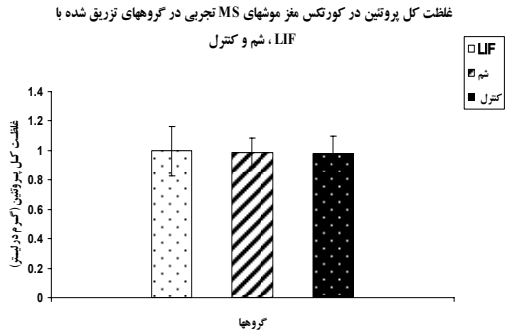
مطابق پروتکل شرکت Abcam که به همراه آنتی‌بادی ارسال شده بود انجام گردید.

تمام نتایج به‌صورت Mean±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 $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

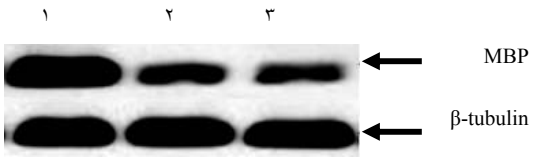
یافته ها

غلظت کل پروتئین: غلظت کل پروتئین های عصاره مغز در نمونه‌های گروه‌های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب ۰/۱۱ ± ۰/۹۷، ۰/۱۶ ± ۰/۹۹ و ۰/۰۹ ± ۰/۹۸ محاسبه شد. غلظت کل پروتئین‌های عصاره مغز در نمونه‌های 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 معنی‌دار نبوده است (نمودار شماره ۱).

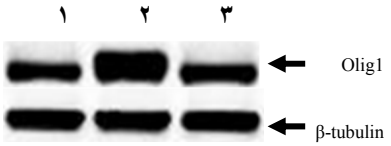
اثر LIF بر بیان Olig1, MBP و Olig2: بررسی اثر LIF بر تولید کورتکس مغز در موش‌های با MS تجربی و مقایسه آن با دو گروه دیگر (گروه‌های شم و کنترل) نشان داد که میزان بیانMBP ، Olig1 و Olig2 در گروه تزریق شده با LIF بیشتر از دو گروه شم و کنترل می‌باشد. بیان MBP در عصاره مغز در نمونه‌های گروه‌های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب ۰/۶۷ ± ۵/۸۲، ۲/۰۴ ± ۱۱/۸۹ و ۱/۰۲ ± ۶/۱۶ محاسبه شد. بیان Olig1 در عصاره مغز در نمونه‌های گروه‌های کنترل، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب ۰/۱ ± ۴/۵۳، ۱/۳۱ ± ۱۱/۱۵ و ۰/۶۹ ± ۴/۸۶ محاسبه شد. بیان Olig2 در عصاره مغز در نمونه‌های گروه‌های کنترل ، تزریق شده با LIF و شم و به ترتیب ۰/۶ ± ۴/۵، ۱/۸۲ ± ۹/۴۶ و ۰/۷ ± ۴/۸ محاسبه شد (تصاویر شماره ۱، ۲ و۳). بررسی بیشتر به کمک نرم افزار Metaview و Image Analyzer نشان داد که میزان بیان نسبی Olig1,MBP و Olig2 در گروه تزریق شده با LIF بیشتر از آن در گروه کنترل و شم بود، که این افزایش معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار شماره ۲). اختلاف در بیان هر سه پروتئین مورد مطالعه در گروه کنترل و شم معنی دار نبوده است.



نمودار شماره ۱: غلظت کل پروتئین‌های(mean± SE) عصاره مغز در نمونه‌های تزریق شده با LIF و گروه‌های شم و کنترل. غلظت کل پروتئین‌های عصاره مغز در نمونه‌های تزریق شده با LIF نسبت به گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل افزایش یافته ولی این افزایش معنی‌دار نبود

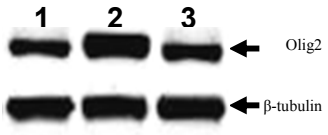


تصویر شماره ۱: بیان پروتئین MBP در عصاره مغز موش‌های تزریق شده با LIF (شماره ۱)، گروه شم (شماره ۲) و گروه کنترل (شماره ۳). میزان بیان پروتئین MBP در گروه اول بیشتر از گروه دوم و سوم است. از بتا توبولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (Loading control)استفاده شد.

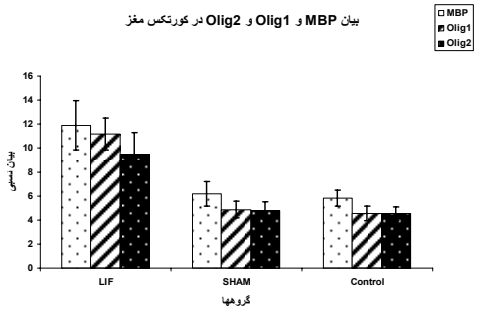


تصویر شماره ۲: بیان پروتئین Olig1 در عصاره مغز موش‌های تزریق شده با LIF (شماره ۲)، گروه شم (شماره ۳) و گروه کنترل (شماره ۱). میزان بیان پروتئین Olig1 در گروه اول بیشتر از گروه دوم و سوم است. از بتا توبولین (۵۰ کیلو دالتون) به عنوان کنترل (Loading control) استفاده شد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]



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 بتا توبولین (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 به‌طور 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 به‌طور تجربی MS شده اند (در مقایسه با گروه کنترل). چون MBP توسط اولیگودندروسیت‌های در حال میلین‌سازی بیان و به آکسون‌ها اضافه می‌شود و در میلین‌سازی 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 نورون‌های سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارد. ایجاد اولیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین از سلول‌های پیش‌ساز آن‌ها نیازمند به فعال‌شدن و هماهنگی تنظیم‌کننده‌های کپی برداری است که برای بیوسنتز میلین مهم می‌باشد(۲۵). مکانیسم‌های مولکولی ایجاد اولیگودندروسیت های 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 به‌طور 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

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 پروتئولیپید، 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 درساختمان 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 MBP در موش‌هایی که به طور تجربی به MS مبتلا شده اند گردیده است. با توجه به این‌که 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 می‌نماییم. 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.

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. Lowis GW. The social epidemiology of multiple sclerosis. Sci Total Environ 1990; 90: 163-190.
3. Swingler 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-Maciel DR, Morimoto HK, Watanabe MA, Georgeto SM, Reiche

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-10]