اثر عامل نوروتروفی مژکی بر تمایز سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و القای بیان Opalin، Olig1 و Olig2 در کورتکس مغز موش‌های دچار اسکلروز مولتیپل القا شده با Cuprizone

*دکتر فرهاد مشایخی(Ph.D)[1]- مهدیه فرجی(M.Sc)[1]- سیده زهرا موسوی بنه حور(M.Sc)[1]

*نویسنده مسئول: رشت، خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

پست الکترونیک:mashayekhi@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/٤

چکیده

مقدمه: اولیگودندروسیت‌ها سلول‌های تولیدکننده میلین در دستگاه عصبی مرکزی هستند که از سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت ایجاد می‌شوند. Opalin نشانگر مولکولی اختصاصی برای اولیگودندروسیت بالغ و تولیدکننده میلین است. Olig1 وOlig2 در تنظیم تمایز سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت به اولیگودندروسیت‌ها نقش دارند. عامل نوروتروفی مژکی (Ciliary neurotrophic factor=CNTF) نقش مهمی در تکثیر و بلوغ اولیگودندروسیت‌ها بازی می‌کند.

هدف: بررسی تاثیر CNTF بر بیان Opalin، Olig1 وOlig2 در کورتکس مغز موش‌های دچار اسکلروز مولتیپل (Multiple sclerosis=MS) القاء شده با Cuprizoe

مواد و روش‌ها: برای القای اسکلروز مولتیپل به مدت پنج هفته به ۳٦ موش از نژاد cuprizone Balb/c داده و سپس موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند (n=12 برای هر گروه). به گروه اول ۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن CNTF به‌صورت زیرپوستی و به گروه دوم (شم)، سرم فیزیولوژی تزریق شد ولی به گروه سوم هیچ‌گونه تزریقی نشد (کنترل). بعد از چهار هفته، از کورتکس مغز موش‌ها عصاره تهیه و بیان Opalin، Olig1/2 به روش وسترن بلات مطالعه شد.

نتایج: بیان Opalin، Olig1/2 در گروه تزریق‌شده CNTF به‌طور معنی‌دار نسبت به دو گروه شم و کنترل افزایش یافت($P<0.0001$).

نتیجه‌گیری: CNTF باعث افزایش بیان Opalin و Olig1/2 شده و ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی MS داشته باشد. همچنین، با توجه به نقش این سه عامل در تمایز اولیگودندروسیت‌ها و تولید میلین، نتیجه‌گیری می‌شود که ممکن است CNTF عامل تنظیم‌کننده تمایز اولیگودندروسیت‌ها از سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و تولید میلین باشد.

کلید واژه‌ها: ام اس/ اوپالین/ اولیگودندروسیت/ فاکتور نوروتروفیک مژکی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست‌ویکم شماره ۸٤، صفحات: ۲۱-۱۵

مقدمه

الیگودندروسیت‌ها در دستگاه عصبی مرکزی، در تولید میلین نقش داشته که خود از سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت در ناحیه بطنی ایجاد می‌شوند(۱). در طی تکوین، این سلول‌ها ضمن فرایند تمایزی خاصی بوجود می‌آیند. ابتدا سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت به پیش الیگودندروسیت‌ها وسپس به الیگودندروسیت‌های نابالغ و در نهایت‌به الیگودندروسیت‌های بالغ تبدیل می‌شوند(۲). با توجه به این‌که پوشش میلین و الیگودندروسیت‌ها در اسکلروز مولتیپل (Multiple sclerosis=MS) از بین می‌رود لذا ایجاد الیگودندروسیت‌ها می‌تواند به فرایند ترمیم و ایجاد دوباره میلین کمک کند. در مراحل اولیه بعد از ایجاد MS تعداد کمی از سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت به الیگودندروسیت‌ها تمایز یافته و به میزان کمی میلین‌سازی می‌کنند(۳). البته به‌رغم وجود سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت، ترمیم در ناحیه آسیب‌دیده در بیماران MS ادامه پیدا نمی‌کند(٤). این موضوع نشان‌دهنده آن است که ایجاد دوباره میلین توسط عوامل محیطی در محل ضایعه مهار می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که میزان برخی از عوامل رشد در محل ضایعه در بیماران MS افزایش می‌یابد. این عوامل نقش مهمی در تنظیم تعداد الیگودندروسیت‌ها و تکوین آنها بازی کرده(۵) و احتمالاً میزان تخریب و ایجاد دوباره میلین را کنترل می‌کنند. بنابراین بررسی نقش این عوامل رشد بر الیگودندروسیت‌ها و سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت بسیار مهم است. در میان عوامل رشد، عامل نوروتروفی مژکی (Ciliary neurotrophic

۱. رشت، خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

factor = CNTF) سیتوکینی است که باعث تحریک تولید میلین می‌شود(٦). CNTF که باعث بقا و تمایز سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت در نخاع می‌شود(٧)، متعلق به خانواده انترلوکین ٦ (IL-6) است(٨). این سیتوکین ابتدا به گیرنده خود یعنی CNTFRα و سپس به گیرنده عامل مهارکننده لوسمی (Leukemia inhibitory factor=LIF) و gp130 متصل می‌شود و از این طریق است که سیگنال خود را منتقل می‌کند(٩). CNTF در دستگاه عصبی محیطی توسط سلول‌های شوان و در دستگاه عصبی مرکزی توسط سلول‌های آستروسیت بیان می‌شود(١٠). مطالعات نشان می‌دهد که CNTF با مهار تولید TNFα دارای اثر ضدالتهابی نیز هست(١١). بنابراین، CNTF نقش مهمی در بیماری‌های التهابی دستگاه عصبی مرکزی نظیر MS و فرایند میلین سازی ایفا می‌کند.

در MS، تعدادی از سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت به الیگودندروسیت‌ها تبدیل شده و شروع به تولید میلین می‌کنند ولی قادر به ادامه این روند نیستند. از عوامل مهمی که در تمایز و ایجاد الیگودندروسیت‌ها و میلین‌سازی نقش دارند عوامل کپی برداری Olig1 و Olig2 است(١٢). Olig2 در تنظیم تعداد الیگودندروسیت‌ها در تمام بخش‌های دستگاه عصبی مرکزی نقش دارد(١٣). بنابراین، افزایش بیان Olig1 و Olig2 می‌تواند نشان دهنده افزایش تولید الیگودندروسیت‌ها باشد.

یکی دیگر از پروتئین‌هایی که میزان بیان آن نشان‌دهنده میزان فعالیت الیگودندروسیت‌هاست اوپالین (Opalin) می‌باشد. این ژن فقط در پستانداران و در الیگودندروسیت‌های در حال میلین‌سازی و فعال بیان می‌شود(١٤) که این موضوع نشان می‌دهد Opalin نقش منحصر به فردی در میلین‌سازی در پستانداران بازی می‌کند. Opalin پروتئینی داخل غشایی و نشانگر مولکولی برای الیگودندروسیت‌های بالغ و فعال است(١٥).

با توجه به نقش CNTF در فرایند تولید دوباره میلین توسط الیگودندروسیت‌ها و همچنین نقش Olig1,2 در تکوین و تمایز الیگودندروسیت‌های تولید کننده میلین، در این تحقیق به بررسی اثر CNTF بر بیان Olig1,2 و Opalin، به عنوان نشانگر الیگودندروسیت فعال، در کورتکس مغز موش‌های دچار MS تجربی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

ایجاد MS تجربی در موش‌ها و تهیه نمونه: برای بررسی تاثیر CNTF بر بیان ژن‌هایی نظیر Olig1,2 و Opalin در فرایند تمایز اولیگودندروسیت‌ها و در نتیجه میلین‌سازی در کورتکس مغز از موش‌های نر بالغ ٦ تا ٨ هفته‌ای آزمایشگاهی نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها در اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه گیلان در دمای اتاق ٢٢ درجه سانتی گراد و تناوب نوری ١٢:١٢ ساعت نگهداری شدند. غذا و آب به مقدار کافی در اختیار موش‌ها گذاشته و در تمام آزمایش‌ها ملاحظه اخلاقی رعایت شد. در سه گروه مجزای دوازده نفره نگهداری شدند (n=12).

برای ایجاد MS تجربی به موش‌ها به مدت ٥ هفته Cuprizone، ٠/٢٪ (از شرکت Sigma-Aldrich) به همراه غذا داده شد. Cuprizone با تخریب اولیگودندروسیت‌ها باعث تخریب میلین در جانوران می‌شود. پس از پنج هفته و ایجاد علائم MS نظیر از بین رفتن تعادل حرکتی، Cuprizone از غذای آنها حذف و از همان هنگام به سه گروه تقسیم شدند: به گروه اول، ٢ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن CNTF به‌صورت زیرپوستی تزریق شد. به گروه دوم (شم)، سرم فیزیولوژی تجویز شد و به گروه سوم نیز هیچگونه تزریقی نشد (گروه کنترل). حجم سرم فیزیولوژی و محلول حاوی CNTF برای تزریق ٥٠ میکرولیتر بود.

شش هفته بعد از تزریق‌ها، موش‌ها را با دی اتیل اتر بیهوش کرده و کورتکس مغز آن‌ها پس از جداسازی در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. کورتکس مغز برای تهیه عصاره در بافر لیزکننده لیز شد. بدین‌صورت که کورتکس مغز به قطعه‌های ریز تقسیم و در ٠/٥ میلی‌لیتر بافر لیزکننده 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 شده و به‌طور مکانیکی و سونیکاسیون به‌صورت هموژن در آورده شد. بعد از سانتـــریفوژ، عصاره‌های پروتئینی جدا و در فریزر $-٧٠^{\circ}C$

نگهداری شد.

الف) اندازه‌گیری غلظت کل پروتئین با روش بردفورد (Bradford)

بررسی کمّی محتوای پروتئینی عصاره کورتکس مغز به روش بردفورد انجام شد. در این روش از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250 استفاده می‌شود. اتصال رنگ به پروتئین موجب می‌شود که حداکثر جذب از ٤٦٥ نانومتر (رنگ قرمز) به ٥٩٥ نانومتر (رنگ آبی) تغییر یابد. ابتدا برای رسم نمودار استاندارد بردفورد، محلول‌هایی پروتئینی با غلظت‌های ١٠٠، ٢٠٠، ٤٠٠، ٦٠٠، ٨٠٠ و ١٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر از سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin= BSA) تهیه و این مقادیر در ١ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

سپس، در لوله‌های آزمایش، ٢/٥ میلی‌لیتر معرف بردفورد (٠/٠١٪ Coomassie Brilliant Blue G-250، ٥٪ اتانول ٩٥٪ ١٠٪ اسید فسفریک ٨٥٪) ریخته و در هر یک از آنها ١٠٠ میکرولیتر محلول BSA تهیه شده اضافه شد. لوله‌ها را بخوبی مخلوط کرده و بعداز ٢٠ دقیقه جذب در ٥٩٥ نانومتر خوانده و در غلظت‌های١٠٠تا١٠٠٠میکروگرمBSA در میلی‌لیترمنحنی استاندارد رسم و غلظت پروتئین در عصاره‌ها محاسبه شد.

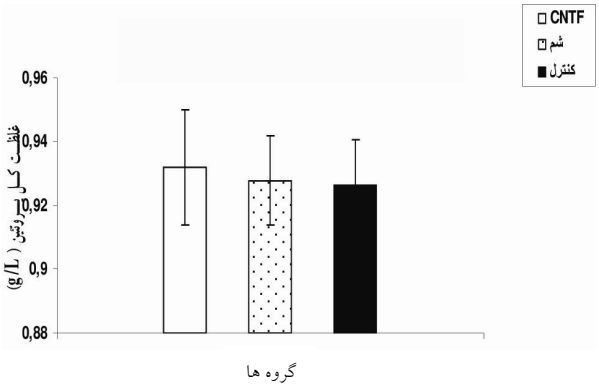
ب) بررسی بیان نسبی Opalin، Olig2وOlig1 در عصاره کورتکس مغز به روش وسترن بلات

برای آنالیز میزان بیان Opalin وOlig1 و Olig2 از روش وسترن بلات استفاده شد. برای وسترن بلات، عصاره‌ها با بافر حاوی SDS ٣/٢٪ (Sodium dodecyl sulfate)، گلیسرول ١٥٪، β-مرکاپتواتانل ٢/٨ مولار و بروموفنول آبی مخلوط شدند. سپس، نمونه‌ها بر ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Milan, Italy) ١٥ درصد قرار گرفته و بر اساس روش لاملی جدا شدند. سپس، پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل به صفحه‌های نیتروسلولز با منفذ ٠/٤٥ میکرومتر منتقل شدند. پس از ٢ ساعت انکوباسیون در محلول بلوکه‌کننده(سالین بافر فسفات به همراه ٥درصد شیر خشک)، صفحه نیترو سلولز به مدت ٢٤ ساعت در محلول حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه Opalin، Olig1 و Olig2 (شرکت Abcam) با غلظت ١:١٠٠٠ در دمای ٤°C و پس از آن به مدت ٢ ساعت در کمپلکس آویدین- بیوتین(Vector Lab., Peterborough, UK) قرار داده شدند. سپس، نمونه‌ها با دی‌آمینوبنزیدین (DAB)(Vector Lab., UK) رنگ‌آمیزی شده و برای بررسی غلظت پروتئینی در نوارها نرم‌افزار Metaview بکار رفت. از β-توبولین نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

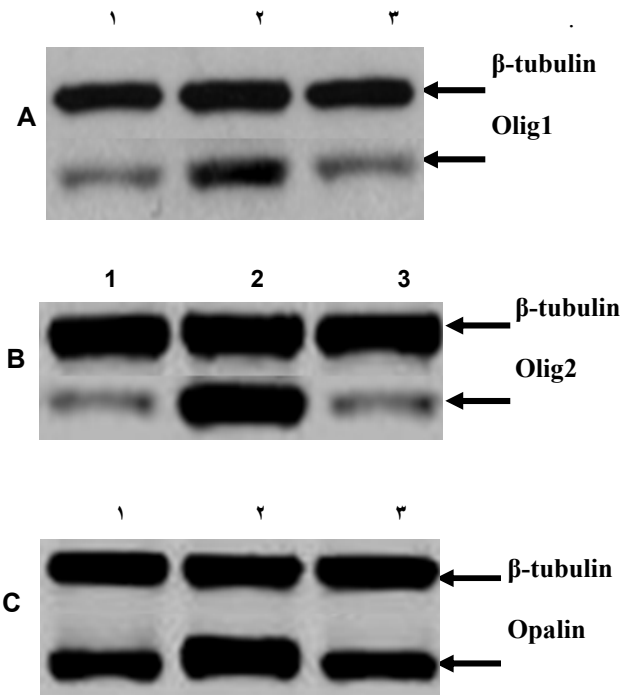
آنالیز آماری: تمام نتایج ارائه شده به‌صورت Mean±SEM محاسبه شد. در تمام آزمایش‌ها تعداد ١٢ نمونه بکار رفت. آنالیز آماری با Student's t-test انجام و فقط P≤٠/٠٥ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

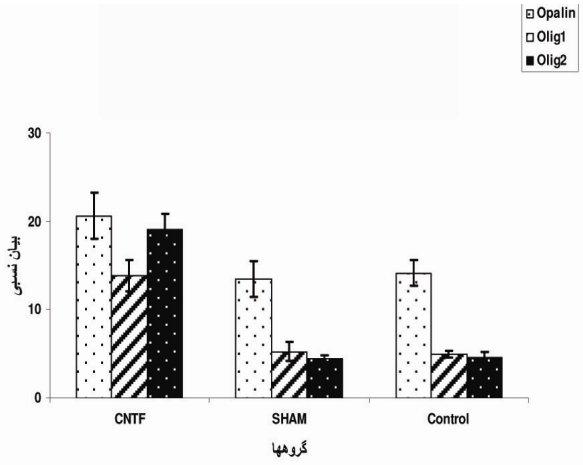
١- غلظت کل پروتئین: غلظت کل پروتئین‌های عصاره مغز در نمونه‌های تزریق شده با CNTF، گروه‌های شم و کنترل اندازه‌گیری شد. نمونه‌های CNTF نسبت به گروه سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل به میزان کمی افزایش نشان داد. این افزایش معنی‌دار نبود و سطح احتمال نسبت به گروه شم و گروه کنترل به ترتیب P=٠/٥٨ و P=٠/٤٩ بود(شکل ١) و اختلاف غلظت پروتئین بین دو گروه شم و کنترل معنی‌دار نبود(P= ٠/٨٦).



شکل١: غلظت کل پروتئین‌های عصاره کورتکس مغز در موش‌های تزریق شده با CNTF و گروه‌های شم و کنترل. غلظت کل پروتئین‌های عصاره کورتکس مغز در نمونه‌های تزریق شده با CNTF در مقایسه با گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. این افزایش معنی دار نبوده و سطح احتمال نسبت به گروه شم و گروه کنترل به ترتیب P=٠/٥٨ و P=٠/٤٩ می‌باشد. تفاوت بین دو گروه کنترل و شم نیز معنی‌دار نیست (P=٠/٨٦).



شکل ۲: بیان پروتئین Olig1،Olig2 و Opalin (به‌ترتیب A، B و C) در عصاره کورتکس مغزموش‌های تزریق‌شده باCNTF (شماره۲)، گروه شم (شماره۳) و گروه‌کنترل(شماره۱). میزان بیان هر سه پروتئین درگروه تزریق‌شده باCNTF بیشتر از گروه‌های شم و کنترل است. از بتاتوبولین (۵۰کیلو دالتون) به عنوان کنترل(loading control) استفاده شد.



شکل ۳: بیان نسبی MBP، Olig1 و Olig2 در کورتکس مغز موش‌های MS تجربی در گروه‌های کنترل، شم و تزریق شده با CNTF در ژل‌های وسترن بلات که با نرم‌افزار Metaview بررسی و سطح احتمال(P) با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه و نمودارها رسم گردید. بیان هر سه پروتئین در گروه تزریق شده با CNTF در مقایسه با گروه کنترل و شم به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد(P<۰/۰۰۰۱). اختلاف در بیان هر سه پروتئین مورد مطالعه در گروه کنترل و شم معنی‌دار نبوده‌است(P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در MS، میلین به‌طور موضعی آسیب‌دیده، الیگودندروسیت‌ها از بین می‌روند و ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T از سد خونی- مغزی عبور کرده و وارد بافت عصبی می‌شوند(۱۶). هنگام از بین‌رفتن حاد میلین در MS، ابتدا مقدار کمی میلین توسط الیگودندروسیت‌های موجود یا الیگودندروسیت‌هایی که از سلول‌های‌اجدادی الیگودندروسیت ایجاد شده‌اند بوجود می‌آید(۱۷). سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت در دستگاه عصبی افراد سالم و بیماران دچار MS وجود دارد. در جانورانی که به‌طور تجربی به MS مبتلا شدند، سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت تکثیر شده و به مناطقی که میلین در آنجا تخریب شده وارد شدند. این فرایند دائمی نبوده، لذا پس از مدت کوتاهی ایجاد دوباره میلین در بیماران MS متوقف می‌شود. بنابراین، درک مکانیسم‌هایی که باعث تمایز و ایجاد الیگودندروسیت‌ها از سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت می‌شود می‌تواند ایده‌های جدیدی در درمان MS به محققان بدهد. به همین دلیل در این تحقیق به بررسی تاثیر یکی از عوامل رشد یعنی CNTF بر بیان عوامل کپی‌برداری Olig1/2 و Opalin پرداخته شد. مطالعات نشان داد که Olig 1,2 نقش مهمی در ایجاد الیگودندروسیت‌های بالغ و فعال بازی می‌کند و Opalin نیز نشانگری برای تشخیص الیگودندروسیت فعال از نظر میلین‌سازی است (۱۸).

مطالعات نشان می‌دهد که بیان عوامل رشد قادر است در ترمیم MS نقش داشته‌باشد و این عمل را با القای بیان بقیه عامل های رشد موثر در میلین‌سازی انجام داده و یا این کار را به‌طور مستقیم بر تکثیر یا تولید دوباره الیگودندروسیت‌ها در مناطق آسیب دیده انجام می‌دهد. از مهم‌ترین عوامل رشد می‌توان به CNTF اشاره کرد که باعث پیشبرد بقای الیگودندروسیت‌ها می‌شود(۶). تزریق CNTF به موش‌های MS باعث بقا و حفظ عصب بینایی می‌شود(۲۰). افزودن CNTF به سلول‌های عصبی کورتکس مغز در محیط کشت باعث تحریک میلین‌سازی می‌شود(۶). مکانیسم‌های مولکولی که طی آن CNTF آثار فوق را اعمال می‌کند هنوز روشن نشده اما ممکن این کار با بیان ژن‌هایی که در تمایز

الیگودندروسیت‌ها نقش دارند انجام دهد. دو عامل کپی‌برداری Olig1 و Olig2 نقش مهمی در تمایز الیگودندروسیت‌ها و ایجاد میلین ایفا می‌کنند(۲۱). این دو عامل در دستگاه‌عصبی مرکزی بیان شده و در تنظیم تعداد الیگودندروسیت‌ها نقش دارند(۲۲). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که CNTF باعث افزایش بیان Olig1 و Olig2 در موش‌های MS می‌شود.

با توجـه به نقش Olig1 و Olig2 در تمایز الیگودندروسیت‌ها و در نتیجه میلین‌سازی، احتمال دارد که CNTF با افزایش بیان این دو عامل کپی‌برداری نقش مهمی در تولید دوباره میلین داشته باشد.

در این تحقیق همچنین نشان داده شد که CNTF باعث افزایش بیان Opalin در عصاره کورتکس مغز موش‌های MS شده‌است. Opalin پروتئین داخل غشایی است که به طور اختصاصی در الیگودندروسیت‌های درحال‌میلین‌سازی‌بیان‌شده و نقش مهمی در ایجاد میلین در دستگاه عصبی مرکزی بازی می‌کند. افزایش Opalin در پاسخ به تزریق CNTF نشان‌دهنده افزایش تعداد الیگودندروسیت‌های فعال در مغز موش‌های MS است و این موضوع نشان می‌دهد که CNTF با افزایش تعداد سلول‌های تولیدکننده میلین در فرایند تولید دوباره میلین نقش دارد.

به‌طور کلی نتیجه می‌گیریم که CNTF باعث افزایش بیان Opalin ، Olig1 و Olig2 در الیگودندروسیت‌ها و افزایش فعالیت آنها شده و در نتیجه سبب افزایش تولید دوباره میلین در موش‌های MS می‌شود. در ضمن CNTF احتمالا در پاتوفیزیولوژی MS نیز نقش داشته باشد. همچنین، با توجه به نقش این سه عامل در تمایز اولیگودندروسیت‌ها و تولید میلین، نتیجه می‌گیریم که CNTF ممکن است عامل تنظیم‌کننده تمایز اولیگودندروسیت‌ها از سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و تولید میلین باشد.

تشکرو قدردانی: از دانشگاه گیلان- معاونت محترم‌پژوهشی- برای تصویب این طرح پژوهشی و تخصیص بودجه و پشتیبانی مالی قدردانی می‌شود.

منابع

1. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing Waves Of Oligodendrocytes In The Forebrain And Postnatal Elimination Of An Embryonic Lineage. Nat Neurosci 2006; 9: 173-9.

2. Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. Induction Of Myelination In The Central Nervous System By Electrical Activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 9887-92.

3. Reynolds R, Dawson M, Papadopoulos D, Polito A, Di Bello IC, Pham-Dinh D, Levine J. The Response Of NG2-Expressing Oligodendrocyte Progenitors To Demyelination In MOG-EAE And MS. J Neurocytol 2002; 31 :523-36.

4. Chang CH, Cella D, Fernández O, Luque G, De Castro P, De Andrés C, Casanova B, Hernández MA, Prieto JM, Fernández VE, De Ramón E, Grupo Español De Calidad De Vida EnEsclerosis Múltiple . Quality Of Life in Multiple Sclerosis Patients in Spain. Mult Scler 2002; 8: 527-31.

5. Barres BA, Schmid R, Sendnter M, Raff MC. Multiple Extracellular Signals Are Required For Long-Term Oligodendrocyte Survival. Development 1993; 118: 283-95.

6. Stankoff B Aigrot MS, Noël F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Enhances Myelin Formation: A Novel Role For CNTF And CNTF-Related Molecules. J Neurosci 2002; 22: 9221-7.

7.Talbott JF , Cao Q, Bertram J, Nkansah M, Benton RL, Lavik E, Whittemore SR.CNTF Promotes The Survival and Differentiation of adult Spinal Cord-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells In Vitro But Fails to Promote Remyelination in Vivo. Exp Neurol 2007; 204:485-9.

8. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, Mcninch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS.Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3: A Cytokine of The IL-6 Family. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 11458-63.

9. Elson GC, Lelièvre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, De Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF Associates with CLC to form A Functional Heteromeric Ligand for The CNTF Receptor Complex. Nat Neurosci 2000; 3: 867-72.

10. Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M. Regional Distribution, Developmental Changes, and

Cellular Localization of CNTF-Mrna and Protein In The Rat Brain. J Cell Biol 1991; 115: 447-59.

11. Meazza C, Di Marco A, Fruscella P, Gloaguen I, Laufer R, Sironi M, Sipe JD, Villa P, Romano M, Ghezzi P. Centrally Mediated Inhibition of Local Inflammation by Ciliary Neurotrophic Factor. Neuroimmunomodulation 1997; 4: 271-6.

12. Franco PG, Silvestroff L, Soto EF, Pasquini JM. Thyroid Hormones Promote Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells and Improve Remyelination after Cuprizone-Induced Demyelination. Exp Neurol 2008; 212: 458-67.

13. Jakovcevski I, Zecevic N. Olig Transcription Factors are Expressed in Oligodendrocyte and Neuronal Cells in Human Fetal CNS. J Neurosci 2005; 25: 10064-73.

14. Haines JD, Fang J, Mushynski WE, Almazan G. Mitogen-Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2 (MK2) Participates In P38 MAPK Regulated Control Of Oligodendrocyte Differentiation. Glia 2010; 58: 1384-93.

15. Yoshikawa F, Sato Y, Tohyama K, Akagi T, Hashikawa T, Nagakura-Takagi Y, Sekine Y, Morita N, Baba H, Suzuki Y, Sugano S, Sato A, Furuichi T. Opalin, A Transmembrane Sialylglycoprotein Located In The Central Nervous System Myelin Paranodal Loop Membrane. J Biol Chem 2008; 283: 20830-40.

16. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing And Remitting Multiple Sclerosis: Pathology Of The Newly Forming Lesion. Ann Neurol 2004; 55: 458-68.

17. Prineas JW, Kwon EE, Sternberger NH, Lennon VA. The Distribution of Myelin-Associated Glycoprotein and Myelin Basic Protein in Actively Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. J Neuroimmunol 1984; 6: 251-64.

18. Ligon KL, Fancy SP, Franklin RJ, Rowitch DH. Olig Gene Function in CNS Development and Disease. Glia 2006; 54: 1-10.

19. Golan N, Adamsky K, Kartvelishvily E, Brockschnieder D, Möbius W, Spiegel I, Roth AD, Thomson CE, Rechavi G, Peles E. Identification Of Tmem10/Opalin As An Oligodendrocyte Enriched Gene Using Expression Profiling Combined with Genetic Cell Ablation. Glia 2008; 56: 1176-86.

20. Maier K, Rau CR, Storch MK, Sättler MB, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert AV, Bähr M, Diem R. Ciliary Neurotrophic Factor Protects Retinal Ganglion Cells from Secondary Cell Death During Acute Autoimmune Optic Neuritis in Rats. Brain Pathol 2004; 14: 378-87.

21. Schebesta M, Serluca FC. Olig1 Expression Identifies Developing Oligodendrocytes in Zebrafish and Requires Hedgehog and Notch Signaling. Dev Dyn 2009; 238: 887-98.

22. 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: 192-8.

Effects of Ciliary Neurotrophic Factor on Oligodendrocyte Progenitor Cells Differentiation and Induction of Opalin, Olig Expression in the Cuprizone Induced Multiple Sclerosis Mice

*Mashayekhi F.(Ph.D)[1]- Faraji M.(M.Sc)[1]- Mousavi Bane Hour S.Z.(M.Sc)[1]

***Corresponding Address:** Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Namjoo Street, Rasht, IRAN

Email: mashayekhi@guilan.ac.ir

Received: 27/Jan/2012 Accepted: 22/Jun/2012

Abstract

Introduction: Oligodendrocytes are myelinating cells in the central nervous system (CNS) which develop from oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). Opalin is a unique molecular marker for mature and myelinating oligodendrocyte. Olig1/2 plays a regulatory function in the differentiation of OPCs to oligodendrocyte. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) has been shown to play an important role in the proliferation and maturation of oligodendrocytes.

Objective: In this study the effects of CNTF on Opalin, Olig1/2 expression in the cerebral cortical extracts of Cuprizone induced multiple sclerosis (MS) has been investigated.

Materials and Methods: The mice were treated by Cuprizone for five weeks in order to induce MS. The mice were then divided into 3 groups. The first group was injected subcutaneously (SC) by CNTF in the amount of 2 µg/kg BW. The second group (SHAM) was injected SC by phosphate buffered saline (PBS) and the third group was left without injection as the control group. After five weeks the mice were killed and the cerebral cortex was harvested and the expression of Opalin and Olig1/2 was studied by Western blotting.

Results: The results from this study show that the expression of Opalin, Olig1/2 was significantly increased in the CNTF injected group as compared to the other groups.

Conclusion: It is concluded that CNTF enhances Opalin, Olig1/2 expression and may play important role in the pathophysiology of MS. It is also concluded that CNTF may be a regulator in the differentiation of oligodendrocyte from OPCs.

Key words: Ciliary Neurotrophic Factor/ Oligodendrocyte/ Opalin/ Multiple Sclerosis

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 84, Pages: 15-21

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Namjoo Street, Rasht, IRAN