مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره۳، پاییز ۱۳۹۱، ۲۲۰-۲۱۱

انتقال و بیان ژن NGF در سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش با استفاده از دو وکتور لنتی ویروسی HIV و FIV

سمیه اکبری .M.Sc[۱و۲]، آزیتا پروانه تفرشی .Ph.D[۱*]، شاه صنم عباسی .M.Sc[۱]،
حسن مومن .M.Sc [۱]، محمد معصومی .Ph.D [۱و۳]

۱- پژوهشکده علوم پایه زیست فناوری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران کد پستی ۱۴۹۶۵-۱۶۱
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران
۳- دپارتمان زیستی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات تکنولوژی سلول‌های بنیادی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: tafreshi@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

چکیده

هدف: در این مطالعه میزان انتقال بیان ژن توسط لنتی ویروس‌های مشتق از ویروس نقصان ایمنی انسانی (HIV)"Human immunodeficiency virus" با میزان انتقال بیان ژن توسط لنتی ویروس مشتق از ویروس نقصان ایمنی گربه Feline Immunodeficiency virus (FIV) به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: حامل های ویروسی با استفاده از وکتورهای آماده، سلول‌های HEK-293T، شاتل‌های لنتی ویروسی با پایه‌های HIV و FIV حامل ژن GFP به عنوان کنترل، و FIV و HIV حامل ژن NGF (Nerve growth factor) تولید شدند. سپس سوپرناتانت سلول‌های HEK-293T حاوی ویروس‌های ساخته شده در معرض سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که سلول‌های مغز استخوان تیمار شده با وکتور HIV -NGF، NGF را بیان کردند. اما پس از تیمار با وکتور FIV-NGF، فاقد این توانایی و قادر به بیان NGF نبودند. نتایج بیان NGF توسط نتایج انتخاب سلول‌ها، به وسیله آنتی بیوتیک، مورد تایید قرار گرفتند.

نتیجه گیری: لنتی ویروس‌های مشتق از FIV در مقایسه با لنتی ویروس‌های مشتق از HIV جهت آلوده سازی و بیان ژن خارجی در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان مناسب نیستند.

واژگان کلیدی: لنتی ویروس‌های HIV based و FIV based، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش، NGF.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

انتقال ژن در زمره مهم‌ترین تکنیک های مورد استفاده درمطالعات تکاملی و فیزیولوژیکی، تشخیص بیماری‌ها، درمان و پیشگیری از آن‌ها می‌باشد. به علت توانایی طبیعی ویروس‌ها در انتقال ژن و الحاق به ژنوم میزبان که بخشی ضروری از سیکل زندگی آن‌ها است، از آن‌ها بعنوان ابزاری قوی برای انتقال ژن‌های بیگانه به درون سلول‌های میزبان استفاده می شود (۱). لنتی ویروس‌ها ناقلین ویروسی می‌باشند که به دلیل ویژگی‌های برجسته‌ای مانند اینتگراسیون، تولید آسان و ترانسداکشن فراوان، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته اند. لنتی ویروس‌ها از خانواده رتروویریده می‌باشند و همانند رترو ویروس‌ها قادرند پس از ورود به سلول میزبان، ژن‌های خود را به داخل ژنوم میزبان وارد کنند. البته رتروویروس‌ها تنها قادر به آلوده سازی سلول‌های در حال تقسیم می‌باشند در حالیکه لنتی ویروس‌ها قادر به آلوده سازی سلول‌های تکثیرشونده و غیرقابل تکثیر هستند (۲). وکتورهای رتروویروسی مشابه وکتورهای با پایه ویروس سرطان خون موشی (murine leukemiavirus) (MLV) می باشند ولی نسبت به آدنوویروس‌ها دارای مزایایی مانند بیان طولانی مدت ژن نوترکیب، عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و توانایی بیان نسبتا بالای یک ژن در انواع سلول‌های پستانداران هستند(۳). لنتی ویروس ایدز (HIV) توانایی آلوده سازی سلول‌های درحال تقسیم و سلول‌های تکثیر ناپذیر را دارا بوده که این توانایی به علت عدم نیاز این ویروس‌ها به فاکتورهای مهم هسته ای برای انتقال به هسته می باشد. این وکتورها قابلیت انتقال ژن به سلول‌های اولیه در حال رشد و ماکروفاژهای تمایز یافته در شرایط آزمایشگاهی را دارا بوده و در *in vivo* نیز قابلیت انتقال ژن به نورون‌های تمایز یافته، سلول‌های شبکیه، کبد، ماهیچه و سلول‌های دیگری را دارند (۴ و ۵). توانایی لنتی ویروس‌ها به‌عنوان حاملین مناسب انتقال ژن به سلول‌های مختلف انسان و پستانداران مخصوصا به بافت هایی مثل سیستم عصبی یا بافت کبد که دارای سلول‌های تقسیم ناپذیر می باشند، منجر به اهمیت روز افزون استفاده از آن‌ها شده است. از مهم‌ترین حامل‌های لنتی‌ویروسی می‌توان حامل‌های لنتی‌ویروسی FIV مشتق از Feline Immunodeficiency virus"، حامل‌های لنتی‌ویروسی HIV مشتق از "Human immunodeficiency virus" و حامل های لنتی ویروسی SIV مشتق از Simian Immunodeficiency virus را نام برد که عموما برای انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶، ۷ و ۸).

اگر چه لنتی ویروس‌های پریمات‌ها مانند SIV وHIV دارای ساختاری توسعه یافته می باشند، اما لنتی ویروس‌های غیرپریماتها نیز دارای توانایی‌های مشابهی می‌باشند که کمتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. ویروس نقص ایمنی FIV دارای ساختاری نسبتا مشابه با ویروس HIV است و می‌تواند مدل بسیار مناسبی برای گسترش تولید واکسن‌های نوترکیب و درمان بیماری‌های ویروسی باشد. از سوی دیگر این لنتی‌ویروس را می‌توان به منظور ایجاد وکتورهای مناسب‌تر جهت سازگاری با میزبان های مختلف بکار برد (۹). آنالیز فیلوژنیک وکتور FIV نشان می‌دهد که این ویروس دارای فاصله نسبتا زیادی با لنتی‌ویروس‌های پریمات می باشد و شواهد اپیدمیولوژیک وقوع sero conversion (تولید آنتی بادی های اختصاصی قابل تشخیص برای میکروارگانیسم‌ها در سرم خونی که در نتیجه آلوده سازی یا ایمنی زایی تولید می شوند) در جوامع انسانی را نشان نمی‌دهد (۱۰). بعضی از ویژگی های چرخه زندگی لنتی‌ویروس FIV شامل ورود و خروج از هسته، ادغام (integration) و سازماندهی پروموتر متفاوت از ویروس‌های پریماتها است. به همین دلیل این وکتورها می توانند به عنوان حامل‌های لنتی ویروسی دارای ایمنی بالاتر، برای انتقال ژن به انواع سلول‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرند. ویروس FIV که از طریق قرار گرفتن در معرض مخاط منتقل می شود دارای ساختار کلی مشابه با ویروس‌های HIV می باشد، ولی تفاوت‌هایی از جمله تفاوت در اندازه ژنوم (۹۴۰۰ نوکلئوتید در ژنوم FIV)، نوع گیرنده موجود در سطح سلول هدف (CXCR4 گیرنده ورود FIV به سلول هدف گیرنده) و در بعضی از پروتئین‌های کمکی به‌چشم می‌خورد (۹، ۱۰ و ۱۱). یکی از ژن‌های کاندید جهت درمان بسیاری از بیماری‌های نورولوژیک، ژن نوروتروفین‌ها است که با بکارگیری از وکتورهای لنتی ویروسی به سلول‌های بنیادی قابل انتقال می‌باشد. نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از فاکتورهای رشد می‌باشند که در تنظیم رشد، تعیین سرنوشت سلول، تمایز، عملکرد، و بقای سلول‌های عصبی نقش های مهمی دارند. سالهاست که بر نقش نوروتروفین ها در تمایز و بقای سلول های عصبی تاکید می‌شود. نوروترفین‌ها پروتئین‌های اندوژن حل شونده ای هستند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷) که باعث تنظیم بقا رشد، تغییرات مورفولوژیک و همچنین سنتز پروتئین‌های دخیل در تمایز نورون ها می‌گردند. از میان سلول‌های بنیادی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با قابلیت تبدیل به انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های عصبی و عدم

Archive of SID

www.SID.ir

تحریک سیستم ایمنی گزینه ای جذاب به‌حساب می آیند. بررسی بیان نوروتروفین NGF در این سلول‌ها حاکی از آن است که آنها بطور ذاتی این نوروتروفین را بیان می کنند (۱۸). لذا در این مطالعه جهت افزایش بیان ژن NGF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی از وکتورهای ویروسی FIV وHIV حامل NGF استفاده گردید و میزان توانایی این وکتورها در انتقال و بیان ژن NGF به این سلول‌ها مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر وکتورهای لنتی ویروسی: در این تحقیق از باکتری E.coli سویه *Top 10* استفاده شد و طبق دستورالعمل زیر باکتری‌ها برای پذیرش پلاسمید مستعد شدند و سپس پلاسمیدها به آن‌ها انتقال داده شد.

تهیه سلول مستعد با استفاده از کلرید کلسیم ($CaCl_2$): برای تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد از محلول ۱۰۰ میلی مولار $CaCl_2$ و آنتی‌بیوتیک های آمپی‌سیلین با غلظت‌های نهایی (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت. پس از تهیه پلیت آگار حاوی آمپی‌سیلین، از استوک باکتری E.coli سویه *Top10* بر روی پلیت کشت داده و سپس یک تک کلون از پلیت باکتری *Top10* را تحت شرایط استریل برداشته و در محیط کشت مایع کشت داده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر به ۴۵۰ برسد. سپس محیط کشت داده شده حاوی گونه باکتری *Top10* را سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه 5000 rpm) و پس از تخلیه محلول رویی به رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱۰۰ میلی مولار $CaCl_2$ اضافه شد. پس از انکوبه شدن (۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد)، سانتریفوژ، مراحل بالا تکرار و در ویال های استریل به دمای ۷۰ - درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

ترانسفورماسیون: برای ازدیاد پلاسمید هریک از پلاسمیدها به باکتری اشرشیاکلی *Top10* وارد شدند. برای ترانسفورماسیون پلاسمیدها، ابتدا به ۵۰۰ میکرو لیتر از باکتری مستعد شده *اشرشیاکلی Top10*، یک نوع پلاسمید (۵ میکرولیتر) اضافه شد و پس ازمخلوط شدن آرام ۳۰ دقیقه‌ای در دمای اتاق (۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. پس از افزودن LB مایع به هریک از لوله‌ها (۱ساعت، ۱۰۰۰rpm، ۳۷ درجه سانتی گراد) هریک از سوسپانسیون‌های سلولی، روی پلیت LB- آگار دارای آمپی سیلین کشت شد و به این ترتیب اجازه رشد به تک کلنی های حاوی پلاسمید مقاوم به آمپی سیلین over night، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) داده شد.

استخراج پلاسمیدها به مقدار زیاد (Maxi prep): ابتدا یک تک کلنی از پلیت کشت داده شده از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت مایع استریل حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد و سپس به روش ارائه شده در بروشور شرکت (Qiagen) و از فیلتر مخصوص کیت برای جدا سازی DNA استفاده شد. بعد از عبور محلول از فیلتر بافر شستشو از ستون فیلتردار عبور داده شد. پس از خشک شدن، رسوب DNA های نوترکیب با آب مقطر شستشو داده شد. پلاسمیدهای استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره شدند.

انتقال وکتورهای لنتی ویروسی به رده سلولی HEK 293T (Transfection): سلول‌های HEK-293T به دلیل توانایی بالا در تکثیر و پروتئین سازی به عنوان سلول بسته بندی کننده وکتورهای لنتی ویروسی به صورت گسترده‌ای برای تولید انواع ویروس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب فعال، سلول‌های مولد ویروس همزمان با سه ناقل لنتی ویروس شامل package envelope با روش رسوب DNA–کلسیم ترانسفکت شدند. تولید لنتی ویروس با کمک وکتورهای pMD2G ، pPSPAX2 و وکتور ترانسفر (ژن مورد نظر ما توسط شرکت GeneCoepia کلون و خریداری شد). این وکتورهای لنتی ویروسی از نسل دوم بوده که ذیلا راجع به خصوصیات آن‌ها اشاره شده است. مخلوط DNA ویروسی شامل ۱۰/۲میکروگرم از وکتور pMD2G (بیان کننده پوشش گلیکوپروتئینی ویروس تورم تاولی دهان)، ۱۰/۲ میکروگرم از وکتور pSPAX2 (بیان کننده پروتئین‌های gag, pol, tat و rev) و ۱۳/۲ میکروگرم از وکتور pEZLV 156 و یا pEZLV2 (شاتل‌های لنتی‌ویروسی حامل NGF و GFP خریداری شده از شرکت GeneCoepia) بود. پلاسمیدهای ترانسفر برای HIV based- NGF (Lv156) و برای FIV based-NGF (Lv23)(شرکت GeneCoepia) بودند. جهت Transfection از یک‌سو به ناقلین لنتی ویروسی و از سوی دیگر به سلول‌های مولد ویروس نیاز بود. تولید لنتی ویروسی با انتقال ژن به داخل سلول مولد ویروس صورت پذیرفت که اصطلاحا ترانسفکشن خوانده می‌شود. برای این کار ۲۴ ساعت قبل سلول‌ها به تعداد تقریبی ۲/۵ تا ۳ میلیون برای هر پلیت ۱۰ سانتی در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

DMEM + ۱۰درصد سرم کشت داده شدند. سپس سه پلاسمید لنتی ویروسی شامل ناقل وکتور transfer (۱۱/۵ میکروگرم) در دو وکتور HIV based و FIV based، ناقل بسته بندی ویروس (Packaging Vector) (۷ میکروگرم) و ناقل مربوط به غشاء ویروسی (۴/۵ میکروگرم)، بودند استفاده شدند. پلاسمید لنتی‌ویروسی وکتور GFP نیز به عنوان کنترل مورد آزمون قرار گرفت. ترانسفکشن به روش رسوب DNA – کلسیم فسفات انجام شد. مخلوط DNA - کلرید کلسیم قطره قطره به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۶ تا ۸ ساعت انکوبه گردید تا DNA وارد سلول‌ها گردد. برای ممانعت از آسیب فسفات کلسیم به سلول‌ها، محیط سلول‌ها تعویض و یک‌بار با PBS شستشو شده و با افزودن محیط جدید به آن‌ها (۲۴ تا ۴۸ ساعت و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کشت داده شدند. در این فاصله زمانی ذرات ویریونی پس از تشکیل در درون سلول‌ها به فضای خارج سیتوپلاسمی رها شدند.

تغلیظ ویروسی و آلوده سازی سلولهای هدف (Infection): محیط‌های ویروسی جمع آوری شده در مرحله تولید ترانسفکشن با رعایت تمام شرایط ایمنی و استریل به ستون‌های تغلیظ پروتئین (Amicon) منتقل (۱۵ تا ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵۰۰rpm) سانتریفوژ گردیدند. در موارد کافی نبودن مقدار محیط حاوی ویروس نوترکیب این مرحله برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه دیگر تکرار شد. محیط حاوی ویروس پس از گذشت ۲۴ ساعت از تعویض محیط ترانسفکشن، جمع آوری و پس از سانتریفوژ به محیط سلول‌های هدف افزوده گردید. سلول‌های هدف شامل HEK 293T و یا سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موشی BMSC بودند. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موشی پس از استخراج از استخوان فمور رت در پتری‌دیش کشت داده شدند. برای آزمون آلودگی (infection) به وسیله ویروس، رقت‌های سریالی از هر یک از ویروس‌های نوترکیب به سلولهای هدف کشت شده در پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. مشاهده GFP پس از ۴۸ ساعت، بیانگر آلوده شدن به ویروس بود. حداکثر بیان GFP در این مطالعه پس از ۱۴۴ ساعت بود.

روش وسترن بلات: استخراج پروتئین: پس از اتمام زمان آلودگی، محیط سلول‌ها خارج و فلاسک ۲ بار با PBS سرد شست‌وشو داده شد. سپس به هر فلاسک T25 ، تریپسین اضافه و فلاسک برای ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. بعد از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، PBS دارای ۱۰ درصد FBS به سلول‌ها اضافه شد و سوسپانسیون سلولی منتقل گردید. پس از (۵ دقیقه، ۱۵۰۰ rpm) محلول رویی دور ریخته و رسوب سلولی در PBS تعلیق و به یک ویال انتقال یافت. پس از سانتریفوژ (۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰rpm) محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی یا برای نگه‌داری طولانی مدت در ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و یا مستقیما برای استخراج پروتئین، مورد استفاده قرار گرفت. به رسوب سلولی حاوی ۵۰۰ تا ۸۰۰ هزار سلول، بافر لیز کامل اضافه گردید. سپس به کمک یک سرنگ انسولین، رسوب سلولی حدود ۱۰ بار پیپتاژ شد تا هیچ توده‌ی سلولی باقی نماند و ویال‌ها (۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه روی شیکر) و سپس (۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰ rpm) انجام شد. محلول رویی شامل پروتئین به یک ویال جدید منتقل شد تا غلظت آن اندازه‌گیری گردد.

پس از الکتروفورز پروتئین‌ها، آن‌ها بر روی PVDF ترانسفر و مراحل ایمونوبلاتینگ انجام شد:

۱- قرار دادن بلات در محلول بلوک کننده (۴ درجه سانتی‌گراد، overnight، شیکر) موجب می‌شود تا پروتئین‌های موجود در شیر خشک مانع از اتصال آنتی بادی‌ها به نواحی فاقد پروتئین گردد.

۲- آبکشی سریع توسط TBST و اضافه نمودن آنتی بادی اولیه شامل:

آنتی بادی β-Actin (Sigma): رقیق شده با نسبت ۱:۲۵۰۰۰ در TBST ، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

آنتی بادی NGF (Millipore): رقیق شده با نسبت ۱:۲۵۰۰ در TBST ، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۳- جمع آوری آنتی بادی اولیه و ۳ شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۴- اضافه نمودن Anti-rabbit IgG HRP-Conjugated (SantaCruz): رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر (برعلیه آنتی بادی NGF) و یا آنتی بادی ثانویه موشی-Anti-mouse IgG HRP Conjugated (SantaCruz): رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر (برعلیه آنتی بادی β-Actin)

Archive of SID
www.SID.ir

۵- جمع آوری آنتی بادی ثانویه و ۳ شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۶- اضافه کردن ECL (شرکت زیست فناوران نجم) بر روی بلات به حدی که سطح را بپوشاند. پس از ۵ دقیقه بلات درون یک نایلون و سپس در کاست عکاسی قرار گرفت. در اتاق تاریک فیلم X-ray ، بسته به شدت نور، برای مدت زمان ۱ ثانیه تا چند دقیقه روی بلات قرار گرفت. سپس فیلم درون داروی ظهور انداخته شد. پس از شست‌وشو با آب مقطر، فیلم را در داروی ثبوت قرار داده و پس از آن با آب شسته شد.

استخراج RNA: سلول‌ها پس از رسیدن به ۸۰ درصد فراوانی سلولی (پس از ۲ هفته) با PBS شستشو و سپس تریپسینه گردیدند و تریپسین با محیط کشت حاوی سرم خنثی شد. سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ (۵' , ۴°C ,۱۵۰۰rpm) شد. رسوب سلولی در PBS سوسپانس و دوباره سانتریفوژ (۵دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰۰rpm) گردید. رسوب سلولی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. رسوب سلولی به همان روش که در بخش قبل تشریح شد، آماده گردید. از محلول easy BLUE® (INtron, نانومهر) به این رسوب اضافه گردید. سپس به کمک سرنگ انسولین و سرسرنگ‌های ۲۱G، رسوب سلولی حدود ۷ تا ۸ بار پیپتاژ شد تا سلول‌های لیز شده RNA سلولی خارج شود. پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، کلروفرم به محلول اضافه شد (۳۰ ثانیه تکان شدید در جهت بالا و پایین) و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ (۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm ۱۲۰۰۰) شد که منجر به تشکیل سه فاز تشکیل گردید. فاز آبی رنگ حاوی پروتئین و ضایعات سلولی در پایین، فاز کدر شیری رنگ شامل DNA در وسط و فاز بی‌رنگ رویی حاوی RNA تمام سلول‌ها است. فاز رویی به یک ویال جدید منتقل و ایزوپروپانول به آن اضافه شد. ویال چند بار به آرامی واژگون گشت. ایزوپروپانول، RNA را رسوب می‌دهد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، سانتریفوژ (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانی‌گراد و ۱۲۰۰۰rpm) انجام شد. ایزوپروپانول دور ریخته شد و اتانول ۷۵٪ به رسوب RNA اضافه و دوباره سانتریفوژ (۷ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۷۵۰۰rpm) گردید. اتانول خارج و رسوب RNA در ویال با در باز قرار گرفت تا اتانول آن به طور کامل ولی نه در حد خیلی خشک تبخیر گردد. پس از آن رسوب درآب-DEPC حل شد. سپس ۱ میکرولیتر از آن برداشته و با رقت ۱:۱۰۰ جذب آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. غلظت RNA استخراج شده به کمک فرمول زیر محاسبه گشت.

غلظت RNA (µg/ml) = عکس رقت × OD_{260} × 40

سنتز cDNA: پیش از سنتز cDNA ، جهت حذف آلودگی احتمالی به RNA،DNA با DNase I (Roche ($10_{u/µl}$) انکوبه شد. به این ترتیب که ۲ میکروگرم از RNA با ۱ میکرولیتر از DNase I مخلوط و حجم نهایی با آب-DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط ابتدا (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) و سپس (۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفت تا پس از حذف DNA ، آنزیم DNase I نیز غیرفعال گردد.در این مرحله ۱ میکرولیتر از (Rando Hexamer ($40_{u/µl}$ به مخلوط اضافه گشت و ویال (۵ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی گراد) تا loop احتمالی موجود در mRNAها وجود دارد، از بین رفته و هگزامر به خوبی به آن متصل گردند. سپس ویال به سرعت روی یخ قرار داده شد و سایر مواد به آن اضافه گردیدند:

۴µl 5X Buffer

۲µl dNTPs Mix (10mM)

۱µl RNase Inhibitor ($40_{u/µl}$)

۱M-MuLV Reverse Transcriptase ($20_{u/µl}$) µl

۲۰µl Total

ویال‌ها درون دستگاه Thermal Cycler قرار داده شدند و ابتدا (۱۰ دقیقه، ۲۵ درجه سانتی گراد) سپس (۱ساعت، ۴۲ درجه سانتی گراد) و در نهایت (۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد) انکوبه شدند. پس از اتمام مراحل، cDNA سنتز شده برای نگهداری طولانی مدت در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

RT-PCR ژنهای β-ACTIN و NGF

توالی پرایمرهای β-ACTIN (طول قطعه= ۱۰۲ bp)

F: 5`AAGGCCAACCGTGAAAAGAT 3`

R: 5'ACCAGAGGCATACAGGGACA 3`

توالی پرایمرهای NGF (طول قطعه= ۱۱۷ bp)

F: 5`AAT TAG GCT CCC TGG AGG TG3`

R: 5`TGA GCT TGG GTC CAG CAT 3`

Archive of SID
www.SID.ir

جهت انجام PCR:

۱ µl Template (cDNA)

۲ µl PCR buffer (10X)

۱/۶ µl dNTPs (10mM)

۱ µl $MgCl_2$ (50mM)

۲ µl Primers (5µM)

۱۲µl ddH_2O

۰/۴µl *Taq* DNA Polymerase

۲۰µl Total

طبق جدول زیر برنامه به دستگاه داده شد.

ایمونوسیتوشیمی پروتئین NGF: برای اثبات تولید پروتئین NGF تست ICC انجام شد. ابتدا ۵×۱۰^{۴} سلول BMSCs آلوده شده با لنتی‌ویروس نو ترکیب دارای NGF و به همان میزان سلول BMSC آلوده نشده به عنوان کنترل در چاهک‌های جداگانه در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند (البته در چاهک‌ها لامل قرار داده شده بود و سلول‌ها روی لامل در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند). پس از دو روز، محیط کشت لامل‌های حاوی سلول خارج و با PBS شستشو گردیدند. پس از آن، سلول‌ها با پارافرمالدهید سرد فیکس و با PBS شستشو شدند. در مرحله بعد، محلول بلاکینگ حاوی ۱ درصد BSA (۲۰ دقیقه) اضافه و بعد از شستشوی مجدد با PBST ۱درصد (PBS دارای ۱ درصد Tween 20)، در آنتی بادی اولیه علیه NGF (۶۰ دقیقه) انکوبه گردید. پس از شستشو، سلول‌ها با آنتی بادی ثانویه (۴۵ دقیقه) انکوبه شدند. بعد از خارج کردن آنتی بادی ثانویه و شستشوی سلول‌ها، DAPI برای رنگ کردن هسته سلول‌ها استفاده شد. با استفاده از گلیسرول ۹۰ درصد Cover slip های حاوی سلول بر گلیسرول ۹۰ درصد بر روی لام قرار گرفته و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

قسمت	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۴°C	۵'	۱
Denaturation	۹۴°C	۳۰"	۳۵ (ژن β-ACTIN)
Annealing	۵۶°C (β-ACTIN)	۳۰"	
	۶۰°C (NGF)		
Extension	۷۲°C	۳۰"	۴۵ (ژن NGF)
Final Extension	۷۲°C	۵'	۱

آنالیز آماری

باندهای RT-PCR و Western blotting توسط نرم افزار Labimage اسکن و دانسیته باندهای NGF نسبت به باند بتا اکتین نیمه کمی گردیدند و با آزمون Student t-Test مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. سطح معنی داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

لنتی ویروس‌های FIV و HIV حاوی GFP قادر به ترانسفکت کردن سلول های HEK-293T می‌باشند.

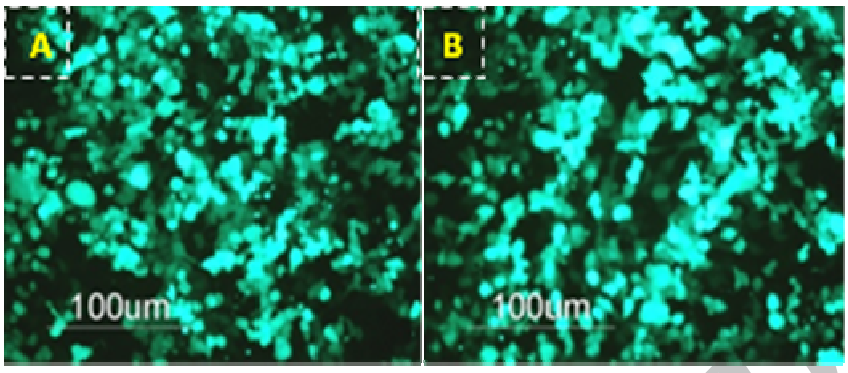
سلول‌های HEK-293T بعد از ترانسفکشن با هر دو نوع وکتور حاوی GFP درصد بالایی از بیان GFP را نشان دادند و تفاوت محسوسی مشاهده نگردید (شکل ۱).

لنتی ویروس‌های FIV و HIV حاوی NGF هر دو قادر به آلوده سازی سلول‌های HEK-293T می‌باشند.

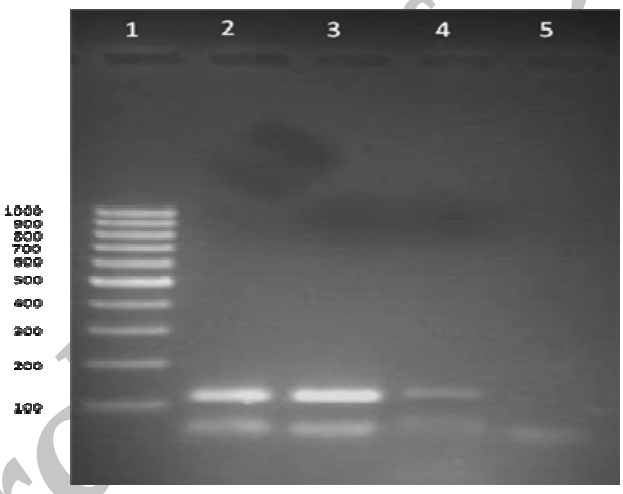
بطور طبیعی ژن NGF در سلول‌های HEK-293T بیان می‌شود که پس از آلوده سازی HEK-293T با ویروس FIV-NGF ، این افزایش بیان مشاهده شد. نتایج آزمون بیان NGF^{mRNA} توسط RT-PCR در سلولهای HEK-293T آلوده شده با ویروس FIV-NGF نسبت به سلول‌های آلوده نشده نشان داد که این میزان ۲ برابر شده است (شکل ۲). البته همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد، این بیان هنوز کمتر از سلول‌های BMSC دست نخورده است که بطور طبیعی NGF را به میزان بالاتری از سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF (۱/۷) برابر بیان می‌کنند. نتایج بدست آمده از تکنیک وسترن بلات (شکل۳) نیز نشان داد که بیان نسبی

Archive of SID
www.SID.ir

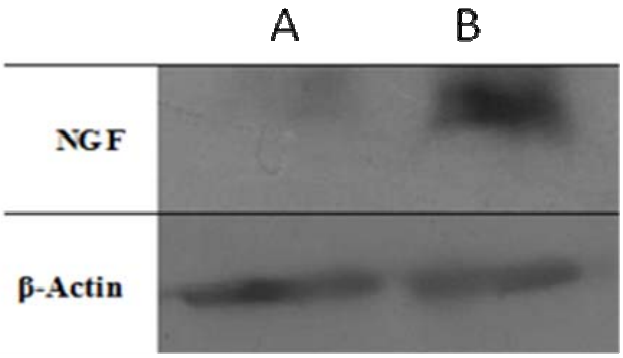
پروتئین NGF (۱۳ کیلو دالتون) به پروتئین بتا اکتین (۹۸ کیلو دالتون) در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF ۱/۹ برابر افزایش داشته است، در حالی‌که در سلول‌های آلوده نشده، نسبت بیان NGF به بتا اکتین به میزان ۰/۷ برابر کمتر است.



شکل ۱: مقایسه بیان GFP در سلول‌های آلوده شده HEK-293T توسط سازه های A) FIV-GFP و B) HIV-GFP. بررسی بیان GFP در سلول‌های HEK-293T بعد از ترانسفکشن با هر دو نوع وکتور حاوی GFP (FIV based- GFP و HIV based GFP) درصد بالایی از بیان GFP را نشان دادند و تفاوت محسوسی میان دو وکتور مشاهده نگردید.



شکل ۲: مقایسه بیان ژن NGF در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس NGF–FIV و سلول‌های BMSC آلوده نشده. ۱- DNA marker 100 bp ۲- سلول‌های HEK-293T آلوده شده به ویروس FIV-NGF ۳- سلول BMSC دست نخورده ۴- سلول HEK-293T آلوده نشده ۵- کنترل منفی (واکنش بدون cDNA). لنتی ویروس FIV قادر آلوده سازی سلول های HEK-293T میباشد.

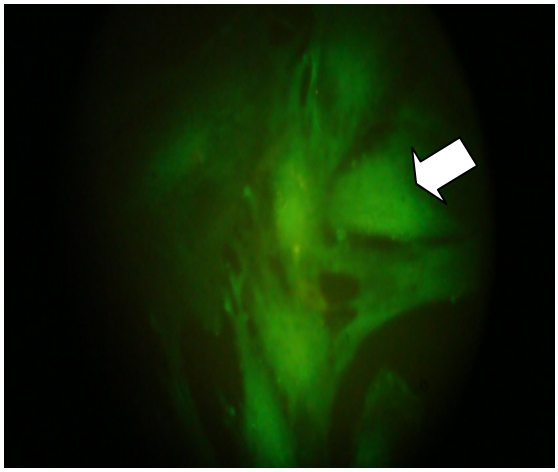


شکل ۳: وسترن بلاتینگ بیان پروتئین NGF در سلول‌های HEK-293T (A) آلوده نشده و (B). آلوده شده به ویروس NGF– FIV. در این سلول‌ها باند NGF، ۱۳ کیلودالتونی می باشد. بیان NGF در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF نسبت به ژن بتا اکتین حدود ۲ برابر بیشتر و درسلول‌های آلوده نشده ۰/۷ برابر کمتر می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

فقط لنتی ویروس HIV و نه FIV قادر بـه آلـوده سـازی سلول‌های BMSC می‌باشد.

آلوده سازی سلول‌های BMSC توسط سوپرناتانت بدست آمده از سلول‌های HEK-293T و سپس تیمار سـلول‌هـای آلـوده شـده توسط آنتی بیوتیک G418، هیچ گونه مقاومتی نسـبت بـه ایـن آنتی بیوتیک در این سلول‌ها ایجاد نکرد. همچنـین اگـر چـه در سلول‌های BMSC آلوده شده با HIV-GFP پس از گذشت ۴۸ ساعت بیان پروتئین GFP مشاهده گردید و بیان آن بـا اسـتفاده از ایمونوسیتوشیمی تایید شد (شکل ۴)، اما بیان مارکر (GFP) در سلول‌های BMSC آلـوده شـده بـا ژن FIV-GFP حتـی بـا گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت پـس از آلـوده سـازی هـم دیـده نشـد. به‌علاوه به دلیل آنکـه ایـن سـلول‌هـا ژن مقاومـت بـه G418 را دریافت نکرده بودند، پس از ۴ روز تیمار با G418 مـرگ سـلولی رخ داد. با تغییر زمان تیمار با G418 بـه مـدتهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز تغییری در نتایج ایجاد نشد. همچنـین بـا تغییـر میـزان دفعات آلودگی (۲ الی ۳ بار در روزهای متوالی) تغییری در نتایج ایجاد نشد و کماکان مـرگ سـلولی رخ داد. بـه عـلاوه در یـک‌سـری از آزمایشات دیگر (نشـان داده نشـده اسـت) ترنسفکشـن مسـتقیم وکتور FIV-GFP بدون مداخله‌ی سـلول‌هـای HEK-293T بـا استفاده از الکتروپوریشن (electroporation) سلول‌هـای هـدف (BMSC) صورت گرفت، باز هم بیان قابـل ملاحظـه‌ای از GFP در BMSC دیده نشد. با تغییر در تعـداد سـلول‌هـای BMSC، بـه نسبت محیط ویروسی نیز تفاوتی در نتیجه اینفکشن ژن FIV-NGF مشاهده نگردیـد و سـه روز پـس از تیمـار بـا G418 سـلول زنـده‌ای مشاهده نشد.



شـکل ۴: بیـان ژن HIV-NGF در سـلول‌هـای BMSC. سیتوپلاسـم سلول‌های BMSC آلوده شده با ویروس نوترکیب HIV- NGF (فلـش) دارای ژن NGF بوده و با آنتی بادی NGF قابل شناسایی هستند.

بحث

لنتی‌ویروس‌ها گزینه ای مناسب جهت انتقال ژن به سلول‌هـای بنیـادی به‌حساب مـی‌آینـد. روش‌هـای لنتـی‌ویروسـی بـر روش‌هـای غیـر ویروسـی و بـر روش‌هـای متکـی بـر سـایر ویـروس‌هـا نظیـر رتروویروس‌ها ارجـح اسـت. علـل اسـتفاده از لنتـی‌ویـروس‌هـای نوترکیب ۱- تولید این ویروس‌ها در تیتر بالا در عرض ۴۸ ساعت ۲- کارایی و تولید بالا ۳ -عدم نیـاز بـه عوامـل ترنسـفکت شـده گـران در سـلول‌هـای مولـد ویـروس ۴- سـهولت آلـوده سـازی سلول‌های تقسیم ناپذیر می‌باشند. لذا استفاده از لنتی‌ویـروس‌هـا علاوه بر بکارگیری سازه‌های تولید شده به منظـور آلـوده سـازی سلول‌های بنیادی، مزایای دیگری نیـز دارا هسـتند کـه از آن‌هـا مـی‌تـوان ۱- افـزایش مقاومـت نسـبت بـه خاموشـی ژنـی (Gene Silencing) ۲- مسـئله امنیـت و سـلامت اسـتفاده از لنتی‌ویـروس در مقایسـه بـا سـایر ویـروس‌هـا و وجـود امکانـات تشخیصی حساس به HIV در صورت تولید لنتـی ویـروس‌هـای بیماریزا را نام برد (۱۹). وکتورهای لنتی FIV- based بـه‌دلیـل ایمن بودن برای انسان از لحاظ انتقـال ژن در مقایسـه بـا لنتـی ویروس‌های HIV -based مورد توجه خاصی قـرار گرفتـه انـد. Poeschla و همکـاران (۸)، وکتورهـای FIV را بـا عملکـردی مناسب در مغز، چشم، گـوش، ریـه، کبـد، ماهیچـه، پـانکراس و سیستم هماتوپویتیک معرفی کردند، اگر چه تـا کنـون مطالعـات اندکی در مورد میزان موفقیت و کارآیی وکتورهـای FIV جهـت انتقال ژن به سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۸). یافته‌های زیـادی دال بـر ژن درمـانی بـا فاکتورهـای رشـد عصـبی یـا نوروتروفین‌ها درجهـت تعـدیل و یـا پیشـگیری از بیمـاری‌هـای نورولوژیک است. Bonner و همکاران با استفاده از لنتـی‌ویـروس حاوی ژن نوروتورفین BDNF در سلول‌های پیش ساز نورونی در موش‌های مدل جراحت نخاعی باعث رشد اعصاب قطع شـده بـه سمت بافتهای هدف شدند (۲۰). Park و همکاران با اسـتفاده از لنتـی ویـروس حـاوی ژن‌هـای نوروتـورفین VEGF, IGF-I, BDNF ،NT3،GDNF در موش‌های مـدل ALS باعـث بهبـود عملکرد آن‌ها شدند (۲۱). Zhang و همکاران (۲۲) با استفاده از لنتی‌ویروس حاوی ژن‌های نوروتورفین NT3 در موش‌های مـدل ایسکمی باعـث بهبـود عملکـرد آن‌هـا شـدند (۲۳). سـلول‌هـای بنیادی غیرخونی در مغزاستخوان از گزینه‌های سلول درمـانی در بیماری‌های نورولوژیک محسوب می‌شـوند. ایـن سـلول‌هـا دارای قابلیت تبدیل شدن بـه سـلول‌هـای پـیش سازعصـبی هسـتند و به‌علاوه بطور ذاتی دارای توانایی تولید فاکتورهـای رشـد عصـبی

Archive of SID
www.SID.ir

نوروتروفین‌ها هستند. از آن‌جا که میزان نوروتروفین‌های پایه این سلول‌ها اندک است، بایستی اقدام به افزایش بیان نوروتروفین‌ها در آن‌ها با استفاده از ژن درمانی کرد. لذا در این تحقیق سلول‌های بنیادی مغز استخوان دست ورزی شده با بکار گیری سیستم‌های لنتی‌ویروسی ژن نوروتروفین NGF به منظور استفاده از آن در مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس مورد هدف قرار گرفتند. الحاق ژنی با بکارگیری سیستم‌های لنتی‌ویروسی صورت پذیرفت و تفاوت‌های کارآمدی دو وکتور ویروسیHIV based، FIV based که هر دو حامل ژن NGF بودند مقایسه گردید. وکتورهای FIV-based بدلیل ایمن بودن برای انسان از لحاظ انتقال ژن در مقایسه با لنتی ویروس‌های-HIV based مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. وکتور FIV با وجود مزایایی در مقابل HIV ازجمله عدم القا پاسخ ایمنی در انسان و کارآمدی بالای انتقال ژن و آلوده سازی سلول‌های تقسیم ناپذیر پس از ایجاد تغییرات در پروموتر و ژنوم آن، هنوز کاملا مورد ارزیابی کامل واقع نشده است. در مطالعه حاضر، بررسی آلوده سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان با وکتورهای لنتی ویروسی FIV و HIV و آنالیز بیان ژن NGF صورت گرفت. نتایج بخش سلولی و آنالیز ایمونوراکتیویته NGF پس از استفاده از وکتور HIV-NGF در مقایسه با NGF-FIV، تجمع سیتوپلاسمی پروتئین NGF در سلول‌های مغز استخوان را پس از استفاده از وکتور HIV-NGF و نه NGF-FIV نشان می‌دهد. همچنین آزمایشات RT-PCR نیز بیان NGF mRNA در این سلول‌ها را پس از HIV-NGF و نه FIV-NGF تائید کرد. به منظور تایید هر چه بیشتر این نتایج، آلودگی با استفاده از سلول‌های ۲۹۳T نیز انجام شد. بر خلاف انتظار ما، بررسی سطح ترشحی میزان NGF در سلولهای ۲۹۳T ترنسفکت شده با لنتی ویروسHIV based-NGF نسبت به سلول‌های ۲۹۳T ترنسفکت شده با لنتی ویروس based-NGF FIV نشان داد که در این فاز هر دو وکتور قادر به آلوده سازی سلول‌های ۲۹۳T هستند. این افزایش در میزان بیان پروتئین NGF تا حدی بالا بود که قابل سنجش و نمایش با تکنیک‌های وسترن بلاتینگ بود. این درحالی است که به ندرت می‌توان رفرانسی در مورد القای بیان این ژن و سنجش میزان بیان پروتئین NGF یافت. در مطالعات مختلف به بررسی بیان پروتئین گیرنده TrkA توسط وسترن بلات بسنده شده است و نتایج حاصل از بیان پروتئین NGF ارائه نشده است (۲۳). در هر صورت علی‌رغم آن‌که وکتورهای ویروسی FIV-NGF و HIV-NGF هر دو دارای توانایی آلودگی سلول‌های ۲۹۳T بودند، عدم توانایی FIV-NGF در آلوده سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان مشاهده شد که دلیل آن برای ما مشخص نیست و نیاز به بررسی‌های بیشتر ملکولی و ساختاری در وکتور FIV-NGF را دارد. در مجموع پیشنهاد می‌شود تا در استفاده از وکتور FIV جهت ژن درمانی سلول‌های بنیادی پستانداران با تامل بیشتری گام برداشته شود.

نتیجه گیری

علی‌رغم آنکه در وکتورهای ویروسی با پایه FIV تغییراتی جهت پایدار سازی، تسهیل ورود ویروس و الحاق ژنی گزارش شده است، ولی در این مطالعه این امر اثبات نشد. سلول‌های مغز استخوان موش دریافت کننده وکتور FIV الحاق شده با ژن NGF قادر به زنده ماندن در محیط حاوی آنتی بیوتیک ایجاد کننده مقاومت در وکتور نبودند. در مجموع بر اساس یافته های این تحقیق، استفاده از وکتورهای با پایه FIV جهت الحاق ژنی در سلول‌های پستانداران پیشنهاد نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است. در ضمن از سرکار خانم فاطمه وحید دستجردی و آقای مصطفی جمشیدی بابت خرید و در اختیار قرار دادن وکتور های کلون شده HIV-NGF و FIV-NGF صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003; 43: 413-439.

2.Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA Cell Biol. 2002; 21(12): 937-951.

3. Saenz DT, Teo W, Olsen JC, Poeschla EM. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins. J Virol 2005; 79(24): 15175-15188.

4. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. Nat Genet 1997; 17(3): 314-317.

5. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 1996; 272(5259): 263-267.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Poeschla EM. Non-primate lentiviral vectors. Curr Opin Mol Ther. 2003; 5 (5): 529-540.

7. Poeschla EM. Primate and feline lentiviruses in current intrinsic immunity research: the cat is back. Vet Immunol Immunopathol. 2011; 143(3-4): 215-220.

8. Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. Nat Med. 1998; 4(3):354-357.

9. Elder JH, Sundstrom M, de Rozieres S, de Parseval A, et al. Molecular mechanisms of FIV infection. Vet Immunol Immunopathol. 2008; 123 (1-2): 3-13.

10. Johnston JC, Gasmi M, Lim LE, Elder JH, et al. Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. J Virol. 1999; 73 (6): 4991-5000.

11. Poeschla EM, Looney DJ. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. J Virol. 1998; 72(8): 6858-6866.

12. Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. Neurobiol Dis. 2007; 26(1): 47-55.

13. Heese K, Low JW, Inoue N. Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. Neurosignals. 2006; 15(1): 1-12.

14. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. Neurobiol Dis. 2005; 18 (1): 184-192.

15. Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1996; 351(1338): 365-373.

16. Memberg SP, Hall AK. Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. Mol Cell Neurosci. 1995; 6(4): 323-335.

17.Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. J Neurobiol. 1994; 25 (11): 1334-1348.

18. Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. Neurosci Res. 2010; 66(1): 46-52.

19. Federico M. Ed. Lentivirus gene engineering protocols. Humana Press. 2003.

20. Bonner JF, Blesch A, Neuhuber B, Fischer I. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord. J Neurosci Res. 2009; 88(6): 1182-1192.

21. Park S, Kim HT, Yun S, Kim IS, et al. Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. Exp Mol Med. 2009; 41(7): 487-500.

22. Zhang ZH, Wang RZ, Li GL, Wei JJ, et al. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. Neurosci Lett. 2008; 444(3): 227-230.

23. Triaca V, Tirassa P. Circulating NGF antibody alters the distribution of NG2 and CD56 positive cells in the brain of an animal model of inflammatory disorder. Arch Ital Biol. 2003; 141(2-3): 127-139.

Archive of SID

www.SID.ir