

تأثیر بیان بالای فاکتور مهار کننده لوسمی در سلول‌های بنیادی مغز

بر ساختار بافتی هیپوکامپ در موش‌های ترانس ژن تولید شده به روش TMGT

شیمیا حسینی فر^۱ PhD، صادق جوزایی^۲ PhD، محمدرضا تابنده^{۳*} PhD، محمود راهدار^۴ PhD

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش بافت شناسی، اهواز، ایران

۲- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، اهواز، ایران

۳- مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.tabandeh@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۹

چکیده

هدف: فاکتور مهار کننده لوسمی (LIF) اثرات مفیدی بر عملکرد سلول‌های بنیادی عصبی و درمان بیماری‌های نورودژنراتیو دارد. اما اطلاعات محدودی در خصوص تأثیر بیان بالای LIF در سلول‌های بنیادی عصبی بر تغییرات بافت مغز وجود دارد. در این پژوهش موش‌های ترانسژن با بیان بالای هدف‌دار LIF تحت پروموتور نستین تولید و ساختار بافتی هیپوکامپ در آن‌ها مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: به منظور تولید موش‌های ترانسژن، نواحی پروموتوری پلاسمید pIRES2-EGFP با پروموتور دوم اینترون نستین و توالی تشدید کننده Hsp68 جایگزین و به صورت درون بیضه‌ای (۲۵ میکروگرم) به ۱۰ موش صحرایی نر تزریق شد. پس از جفت‌گیری با موش‌های ماده، تأیید ترانسژنی با استفاده از PCR معمولی، Real time PCR و میکروسکوپ فلوروسنت انجام شد. از مغز موش‌های صحرایی ترانسژن بالغ (۴ ماهه) نمونه‌گیری و پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی H&E ساختار بافتی هیپوکامپ در آن‌ها بررسی شد. **نتایج:** ژن LIF در سلول‌های بنیادی هیپوکامپ نسبت به گروه‌های کنترل بیان بیشتری داشت ($P < 0.05$). این یافته به همراه مشاهده حضور پروتئین EGFP در نواحی تجمع سلول‌های بنیادی نشان‌دهنده بروز ترانسژنی در زاده‌ها بود. تعداد سلول‌های الیگودندروسیت در هیپوکامپ موش‌های ترانسژن نسبت به گروه‌های کنترل به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بیان بالای LIF در سلول‌های بنیادی مغز موش‌های صحرایی ترانسژن منجر به افزایش جمعیت سلول‌های الیگودندروسیت در هیپوکامپ شد. از آنجا که تخریب سلول‌های الیگودندروسیت در پیشرفت ضایعات نورودژنراتیو دارای نقش مهمی است ممکن است بتوان در صورت انتقال موفقیت آمیز LIF به مغز از این روش به منظور احیای توده سلول‌های الیگودندروسیت استفاده نمود.

واژگان کلیدی: فاکتور مهار کننده لوسمی، موش‌های صحرایی ترانسژن، هیپوکامپ، تغییرات بافتی

مقدمه

کاربرد روش‌های درمانی بر پایه سلول‌های بنیادی پیشرفت روز افزونی داشته است. با این حال درمان بسیاری از بیماری‌های عصبی نورودژنراتیو بر پایه کاربرد سلول‌های بنیادی به دلیل محدودیت‌هایی چون ناکارآمد بودن عبور سلول‌های بنیادی از سد خونی مغزی، توزیع نامتجانس سلول‌های بنیادی عصبی در بخش‌های غیرهدف به دنبال تزریق درون بطن‌ها و احتمال بروز تومورهای مغزی در زمان کاربرد سلول‌های بنیادی تغییر یافته ژنتیکی با ویروس‌ها، با تردیدهایی روبه‌رو می‌باشد. وجود محدودیت‌های فوق، توجه به روش‌های حفاظت عصبی و ژن‌درمانی، به جای پیوند مستقیم سلول‌های بنیادی به منظور ترمیم ضایعات عصبی را افزایش داده است. بازآرایی جمعیت سلول‌های بنیادی درون‌زاد مستقر در نواحی مختلف مغز مانند هیپوکامپ و ناحیه تحت بطنی (SVZ) به کمک القای فاکتورهای نوروتروفیک یکی از روش‌های مورد توجه می‌باشد. به نظر می‌رسد ادغام این روش توأم با انتقال ژن به کمک سلول‌های بنیادی روش کارآمدی در درمان اختلالات عصبی انسان در آینده باشد (۱). با این حال در بسیاری موارد اثرات بیان بالای فاکتورهای نوروتروفیک بر خصوصیات ساختاری و عملکردی مغز ناشناخته می‌باشد و نگرانی‌هایی در خصوص تأثیر این فاکتورها بر سایر جمعیت‌های سلول‌های عصبی غیر از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز وجود دارد.

فاکتور مهارکننده لوسمی (Leukemia inhibitory factor (LIF)) پروتئینی با ۱۸۰ اسید آمینه، وزن مولکولی ۳۷ تا ۶۲ کیلو دالتون می‌باشد (۲). این پروتئین در بسیاری از انواع سلول‌ها مانند فیبروبلاست، سلول‌های T فعال شده، طحال و یا سلول‌های ماکروفاژ، کندروسیت‌ها، سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های اندوتلیال، آستروسیت‌ها و سلول‌های توموری بیان می‌شود (۳). در سال‌های اخیر دو عملکرد این پروتئین به دلیل کاربرد درمانی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. نخست تسهیل فرآیند لانه‌گزینی در رحم گونه‌های مختلف حیوانات و دوم نقش ویژه پروتئین LIF در حفظ خاصیت چند قوه‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش (۴). تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تمایز یافته سبب کاهش بیان LIF می‌شود که نشان‌دهنده نقش این پروتئین در حفظ خاصیت چند قوه‌زایی سلول‌های بنیادی است

(۵). با این حال مکانیسم دقیق تأثیر LIF بر حفظ چند قوه‌زایی سلول‌های بنیادی در سطح مولکولی به‌طور کامل شناخته نشده است. مطالعات اخیر در موش‌های فاقد LIF یا موش‌های دارای ضایعات مغزی تحت درمان با LIF اگزوزن نشان‌دهنده اهمیت LIF در مراحل مختلف نوروزن و ترمیم ضایعات نخاعی و مغزی می‌باشد (۶ و ۷). اخیراً تأثیر تزریق LIF خارجی بر تکثیر و تولید سلول‌های پیش‌ساز رده اولیگودندروسیت و افزایش سنتز میلین به اثبات رسیده است (۷). آسیب سلول‌های اولیگودندروسیت در شرایط هیپوکسی در محیط کشت، پس از مواجهه با LIF کاهش می‌یابد (۸).

تجمع سلول‌های بنیادی عصبی در بخش‌های متعدد هیپوکامپ شامل شاخ آمون، شکنج دنداندار و ناحیه سابیکولوم و نیز در لایه‌های چهارگانه ناحیه تحت بطنی تأیید شده است. هم‌چنین نقش آسیب و باز آرای سلول‌های بنیادی عصبی در این نواحی در آسیب‌های حسی و حرکتی به اثبات رسیده است. در بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو به‌ویژه آلزایمر، مولتیپل اسکلروز و پیری کاهش سلول‌های بنیادی مستقر در هیپوکامپ سبب بروز اختلالات حافظه‌ای، حرکتی فضایی و حواسی متعدد می‌شود (۹). استفاده از روش‌های تزریقی درون بطن‌ها و مشکلات مربوط به عبور پپتیدهای درمانی از سد خونی مغز، شناسایی تأثیرات ساختاری و مولکولی آن‌ها را با محدودیت‌هایی روبه‌رو می‌سازد. استفاده از سایر روش‌ها که منجر به بیان مستقیم پروتئین‌های درمانی در بافت عصبی شود، امکان بررسی مکانیسم تأثیرات این ترکیبات را فراهم خواهد آورد. تولید حیوانات ترانسژن به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های مختلف و درک مکانیسم تأثیرات آن‌ها در بافت در سال‌های اخیر توسعه یافته است. تولید این حیوانات با استفاده از دو روش اصلی شامل ریز تزریق پیش‌هسته یا الحاق سلول‌های بنیادی ترانسژن در بلاستوسیت می‌باشد که هر دو این روش‌ها پرهزینه و نیازمند دسترسی به دستگاه‌های ویژه دارد. توسعه روش‌های ارزان قیمت مانند انتقال ژن به‌واسطه اسپرم (Sperm mediated gene transfer (SMGT) یا بیضه (TMGT (Testes mediated gene transfer) با کارایی بالا امکان تولید حیوانات ترانسژن با هزینه کمتر و کارایی بهتر را فراهم نموده است (۱۰).

با توجه به نقش پروتئین نوروتروفیک LIF در عملکرد

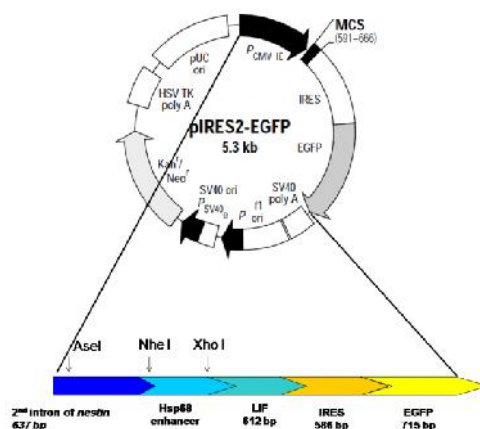
استفاده از پرایمرهای GGCAATGGGTTGTGTGCAGCTCCACA و CCCATACTCTGGAGTGATATCCTC تکثیر شد و با استفاده از آنزیم‌های برشی AseI و NheI در محل پروموتور ECMV در پلاسمید pIRES2-EGFP (توالی بین ۵۹۱-۷) جایگزین شد. پروموتور اینترون دوم نستین به‌تنهایی فاقد عملکرد پروموتوری می‌باشد مگر اینکه یک توالی تقویت‌کننده در مجاورت آن قرار گیرد (۱۲ و ۱۳). به‌همین دلیل توالی تقویت‌کننده hsp68 موشی پس از برش از پلاسمید hsp68-NheI LacZ-pA (تاکارا، ژاپن) با استفاده از آنزیم‌های برشی NheI و XhoI در پلاسمید pIRES2-EGFP پس از پروموتور نستین قرار داده شد. بدین ترتیب که ابتدا پلاسمید hsp68-NheI LacZ-pA در باکتری E.coli سویه DH5 در محیط کشت TSB حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تکثیر و سپس با استفاده از کیت تجاری AccuPrep (بیونیر، کره جنوبی) خالص سازی شد. سپس برش نواحی دوطرف قطعه hsp68 با طول ۳۴۰ bp با استفاده از آنزیم‌های برشی XhoI و NheI انجام و قطعه برش داده شده با استفاده از کیت استخراج از ژل AccuPrep Gel Purification Kit (بیونیر، کره) خالص سازی شد. قطعه مورد نظر پس از برش وکتور pIRES2-EGFP با آنزیم‌های در محدوده ۶۱۳-۵۹۱ وکتور با استفاده از آنزیم T4 لیگاز جایگزین شد. نقشه ژنتیکی پلاسمید اصلاح شده pIRES2-EGFP در شکل ۱ نشان داده شده است.

سلول‌های بنیادی عصبی و فقدان مطالعه‌ای که به بررسی اثرات بیان بالا و اختصاصی LIF در سلول‌های بنیادی عصبی و تغییرات ساختاری مغز بپردازد مطالعه حاضر طراحی گردید. هدف از این مطالعه القا بیان بالای LIF تحت پروموتور نستین در سلول‌های بنیادی عصبی مغز و تاثیر آن بر بافت شناسی هیپوکامپ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

اصلاح ناحیه پروموتوری پلاسمید pIRES2-EGFP

در این مطالعه از وکتور بیانی یوکاریوتی pIRES2-EGFP محصول شرکت Invitrogen (آمریکا) که ناحیه پروموتوری سایتومگالو ویروس (CMV) آن اصلاح شده بود، استفاده شد. با توجه به این‌که ژن نستین در سیستم عصبی مرکزی تنها در سلول‌های عصبی بنیادی مغز بیان می‌شود، لذا استفاده از پروموتور آن در ناحیه پایین دست پروموتوری پلاسمیدهای بیانی سبب القا بیان اختصاصی ژن هدف در سلول‌های بنیادی مغز می‌شود. از این‌رو در توالی ناحیه پروموتوری پلاسمید pIRES2-EGFP توالی اینترون دوم ژن نستین جایگزین شد. بدین ترتیب که ابتدا پلاسمید pIRES2-EGFP در باکتری E.coli سویه DH5 در محیط کشت TSB حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تکثیر و سپس با استفاده از کیت تجاری AccuPrep (بیونیر، کره جنوبی) خالص سازی شد. پروموتور اینترون دوم از ژن نستین موش صحرایی با ۶۳۷ جفت باز (قطعه ۱۷۹۸-۱۱۶۲ پروموتور)، (۱۱) توسط RT-PCR با



شکل ۱: نقشه ژنتیکی پلاسمید اصلاح شده pIRES2-EGFP که ناحیه پروموتوری CMV در آن با توالی پروموتوری اینترون دوم نستین (آبی رنگ) و توالی تقویت‌کننده (Hsp68) جایگزین شد. ناحیه IRES بین ژن هدف (LIF) و پروتئین فلئورسنت EGFP امکان بیان مجزای دو ژن را فراهم می‌نماید. محل برش آنزیم‌های برشی در وکتور pIRES2-EGFP به‌منظور جایگزین نمودن قطعات پروموتوری نشان داده شده است.

جنوبی) تعیین توالی شد.

تکثیر ژن LIF

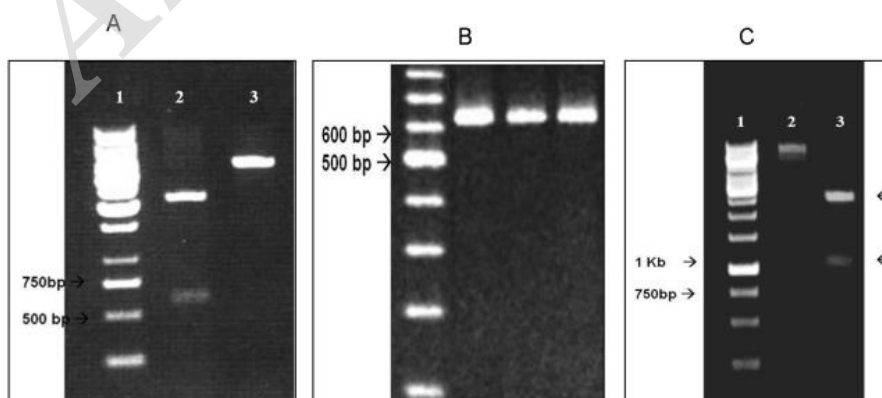
کلون سازی ژن LIF در پلاسمید اصلاح شده به‌منظور کلونینگ ژن LIF، پلاسمید اصلاح شده pIRES2-EGFP پس از کشت و تخلیص با استفاده از کیت AccuPrep (بیونیر، کره جنوبی) با آنزیم‌های BamHI و EcoRI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. محصول PCR ژن LIF نیز به‌منظور ایجاد انتهای چسبان با استفاده از آنزیم‌های BamHI و EcoRI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. سپس پلاسمید پس از الحاق ژن LIF به‌کمک آنزیم لیگاز T4 به سلول‌های مستعد E. coli سویه DH5 که با استفاده از روش کلرید کلسیم سرد و شوک حرارتی تهیه شده بودند، انتقال یافتند. سلول‌های ترانسفورم شده به‌منظور غربال‌گری کلون‌های مثبت بر روی پلیت حاوی کانامایسین (۵۰ میکرو گرم/ میلی‌لیتر) کشت داده شدند و کلون‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای عقبی و جلویی CMV شناسایی شدند.

تولید موش‌های ترانس ژن به‌روش TMGT

به‌منظور تولید موش‌های ترانس ژن از روش TMGT استفاده شد (۱۰). ۵۰ میکروگرم پلاسمید اصلاح شده pIRES2-EGFP پس از تکثیر و خالص سازی با استفاده از کیت AccuPrep (بیونیر، کره جنوبی) به نسبت ۱:۱ با معرف ترانسفکشن DOTAP (Life Science، آمریکا) آماده سازی و در محلول HBS استریل (۲۰ میلی‌مولار هیپس و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) مخلوط و با استفاده از سرنگ همیلتون شماره ۳۰ به‌صورت درون بیضه‌ای تزریق شد.

به‌منظور کلون سازی ژن LIF موش صحرائی به‌طول ۶۱۲bp (عدد دسترسی بانک ژن: NM_022196.2) از روش RT-PCR و سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی صحرائی REF (rat embryonic fibroblast) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از تهیه سلول‌های REF از مرکز ذخایر ژنتیک و زیستی ایران، استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری RNxplus (سیناژن، ایران) انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Accupower Rocketscript (بیونیر کره) و PCR با استفاده از کیت تجاری AccuPower PreMix حاوی آنزیم DNA پلیمرز pfu انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن LIF به‌ترتیب شامل شامل 5'-AGTAAGGATCCATGAAGGTCTTGGCGGCAGG-3' و 5'-CTAGAAGGCCTGGACCACCAGGATCTTCG-3' بودند. طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) انجام شد. پرایمرهای جلویی و عقبی بترتیب دارای محل‌های برش‌های آنزیم‌های EcoRI و BamHI بودند.

چرخه دمایی مورد استفاده در PCR شامل ۳۵ چرخه واسرشتگی (۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه)، اتصال پرایمر (۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه) و تکثیر (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه) بود. واسرشتگی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه) و تکثیر نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه) هرکدام یک مرحله انجام شد. محصول PCR پس از خالص سازی از ژل با استفاده از کیت AccuPrep Gel Purification (بیونیر، کره



شکل ۲: A: برش قطعه پرموتوری ECMV از وکتور pIRES2-EGFP با استفاده از آنزیم‌های *NheI* و *AseI* به‌منظور جایگزینی با نواحی پرموتوری جدید، بانندی با طول تقریبی ۶۰۰ bp ایجاد نمود. (۱- مارکر *HMW*، ۲- پلاسمید برش داده شده، ۳- پلاسمید کامل) B: الکتروفورز محصول PCR قطعه پرموتوری اینترون ۲ نستین با طول ۶۳۷ bp. C: الکتروفورز ناحیه پرموتوری جایگزین شده پرموتور ECMV پس از برش از وکتور pIRES2-

EGFP با استفاده از آنزیم‌های *XhoI* و *AseI* محصولی با طول 1/1 Kb تولید نمود. (1- مارکر *HMW*، 2- وکتور کامل، 3- وکتور برش داده شده). موش‌های صحرایی ماده (6 حیوان)، 24 ساعت پس از تزریق (گروه کنترل پلاسمید).

گروه 3: تزریق 250 میکرولیتر بافر HBS استریل به همراه DOTAP به موش‌های نر (3 حیوان) و جفت‌گیری با موش‌های صحرایی ماده (6 حیوان)، 24 ساعت پس از تزریق (گروه کنترل منفی).

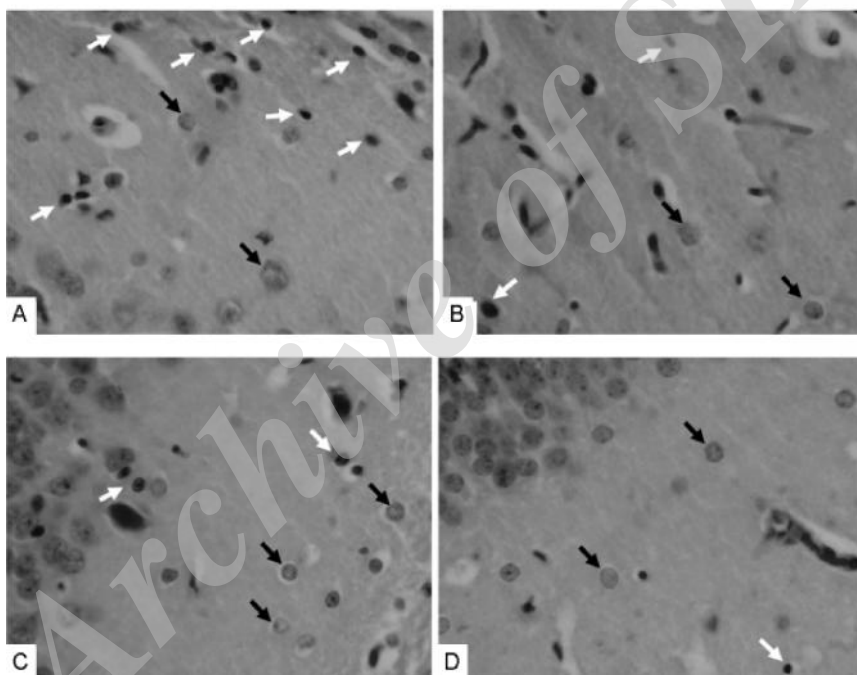
قبل از انجام تزریقات، بی‌هوشی با استفاده از ترکیب کتامین/زایلازین انجام شد. سطح خارجی بیضه‌ها با استفاده از اسکراپ جراحی و الکل استریل شد. 20 روز پس از زایمان، نوزادان از مادرها جدا و تا روز 60 نگهداری شدند.

گروه بندی حیوانات

در این مطالعه از 9 سر موش صحرایی نر بالغ و 18 سر موش صحرایی ماده بالغ با وزن تقریبی 200 گرم استفاده شد. حیوانات به 3 گروه تقسیم شدند:

گروه 1: تزریق 250 میکرولیتر پلاسمید حاوی LIF (25 میکروگرم در هر بیضه) به موش‌های صحرایی نر (3 حیوان) و جفت‌گیری با موش‌های صحرایی ماده (6 حیوان) 24 ساعت پس از تزریق (گروه ترانسژن).

گروه 2: تزریق 250 میکرولیتر پلاسمید فاقد (25 میکروگرم در هر بیضه) LIF به موش‌های نر (3 حیوان) و جفت‌گیری با



شکل 3: تصویر میکروسکوپ نوری رنگ آمیزی H&E (A) و فلورسنت (B) هیپوکامپ موش‌های ترانس ژن شده با استفاده از پلاسمید *pIRES2-EGFP* تحت القا پروموتور نستین که نشان‌دهنده بیان پروتئین *EGFP* در نواحی شکنج دنداندار (DG) و برخی نواحی شاخ آمون (CA1-CA4) هیپوکامپ می‌باشد (40×).

جلویی 5'-CATCCAACTGAGCAGCCGG-3' و عقبی 5'-CCAACAGCAGGGGCACAACT-3' انجام شد. در صورت ترانس ژن بودن حیوانات و وجود وکتور محصول PCR با طول 110 جفت بازی تولید می‌شود.

زاده‌های ترانسژن و گروه‌های کنترل در سن 60 روزگی با استفاده از کلروفرم آسان‌کشی شده و پس از برداشت جمجمه اقدام به خارج کردن کل بافت مغز گردید. نیمی از هر نیم کره

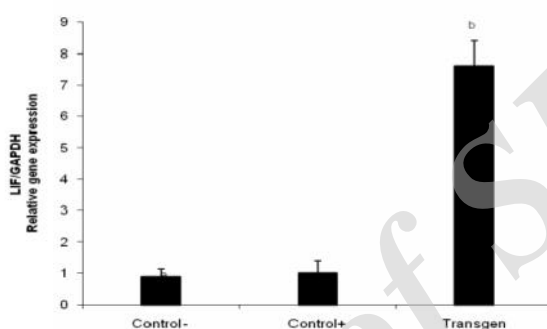
نمونه‌گیری از حیوانات و تایید زاده‌های ترانسژن

به منظور تایید مقدماتی زاده‌های ترانسژن، پس از خون‌گیری از دم و استخراج DNA با استفاده از کیت AccuPrep GenomicDNA Extraction (بیونیر، کره)، واکنش PCR به منظور تایید حضور قطعه 110 جفت بازی از بخشی از ناحیه پروموتوری وکتور و ژن LIF با استفاده از پرایمرهای

به منظور ارزیابی عملکرد سیستم پروموتور نستین، بیان پروتئین مارکر فلئورسنت EGFP در بخش‌های مختلف مغز بررسی شد. حداقل ۱۰ زاده ترانس ژن و غیر ترانس ژن در انتخاب و پس از آسان کشتی مطابق روش توصیف شده توسط Mothe و همکاران (۱۴)، اقدام به تهیه مقاطع بافتی از دو نیمکره مغز شد و مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس Olympus مدل IBX57 (ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت تهیه مقاطع بافتی و نیمی دیگر به منظور ارزیابی سطح بیان LIF با استفاده از Real time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه اقدامات انجام شده در ارتباط با حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه بر اساس دستورالعمل نگهداری و تحقیق با حیوانات آزمایشگاهی مصوب NIH به شماره دسترسی ۲۳-۸۶ انجام شد.

ارزیابی بیان EGFP در مقاطع بافتی با روش میکروسکوپ فلورسانس

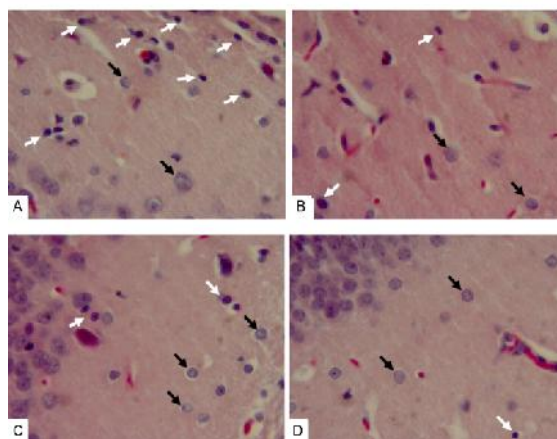


شکل ۴: مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن LIF در مقایسه با ژن GAPDH در سه گروه کنترل منفی، کنترل مثبت بدون پلاسمید و گروه ترانس ژن. حروف نامتشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ می‌باشد.

قرائت جذب نمونه‌های RNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Ependorf, آلمان) نمونه‌هایی که میزان جذب ۲۶۰/۲۸۰ آن‌ها بالای ۱/۸ بود به منظور ساخت cDNA استفاده شدند. ساخت cDNA با یک میکروگرم RNA و با استفاده از کیت Accupower Rocketscript (Bioneer, کره) و پرایمر اولیگو dT انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه‌های بافت هیپوکامپ از ۵ موش در هر گروه ترانسژن، کنترل وکتور فاقد LIF و کنترل منفی فاقد پلاسمید دریافت شد. استخراج RNA با استفاده از کیت TriPure (Invitrogen, آمریکا) و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. تمام نمونه‌های RNA به منظور حذف آلودگی با DNA با استفاده از آنزیم DNase (سیناکلون، ایران) تیمار و پس از



شکل ۵: مقطع بافتی هیپوکامپ موش صحرایی ($H&E, 100\times$). A: ناحیه چندشکلی شاخ آمون گروه ترانسژن. B: ناحیه مولکولار شکنج دنداندار گروه

ترانسژن. C. ناحیه چندشکلی شاخ آمون گروه کنترل منفی فاقد LIF.D ناحیه مولکولار شکنج دنداندار گروه کنترل پلاسمید فاقد LIF. تعداد سلول‌های اولیگوندروسیت (پیکان‌های سفید) در هیپوکامپ موش‌های ترانسژن نسبت به گروه کنترل پلاسمید به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. پیکان‌های مشکلی نشان‌دهنده سلول‌های آستروسیت می‌باشد (H&E, 100x).

ارزیابی بیان ژن LIF با آزمون PCR زمان حقیقی

پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Beacon desigsner TM (PREMIER Biosoft international, USA) انجام شد. واکنش‌ها در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش ۲X، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت نهایی ۲۰۰ نانومول، ۳ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم) و ۲/۷۵ میکرولیتر آب تهیه شدند. چرخه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. نمونه‌های کنترل منفی فاقد cDNA و نمونه RNA در هر واکنش در نظر گرفته شد. واکنش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Lightcycler ارزیابی و بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش شد (۱۵).

به‌منظور ارزیابی بیان ژن LIF در هیپوکامپ از آزمون PCR در زمان حقیقی، روش مقایسه‌ای Ct و دستگاه Lightcycler Detection System (Roche، امریکا) استفاده شد. روش آزمون بر پایه‌ی کاربرد رنگ سایبرگرین کیت qPCRTM Green Master (Jena Bioscience، آلمان) استوار بود. در این مطالعه از ژن GAPDH به‌عنوان کالیبراتور استفاده شد. پرایمرهای جلویی و عقبی جهت تکثیر ژن LIF شامل 5'- CATCCAAACTGAGCAGCCGG -3' و 5'- CCAACAGCAGGGGCACAACT -3' جهت تکثیر ژن GAPDH شامل جلویی 5'- AGTTCAACGGCAGTCAAG -3' و عقبی 5'- TACTCAGCACCAGCATCACC -3' بودند. طراحی

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های اولیگوندروسیت در لایه‌های مختلف هیپوکامپ در موش‌های ترانس ژن، کنترل منفی LIF و گروه کنترل منفی فاقد پلاسمید. حروف نامتشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح (p < ۰/۰۵) می‌باشد.

| گروه کنترل منفی | گروه منفی | گروه ترانسژن شده | لایه‌ها | |
|------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|------------------|
| ^b ۶/۶ ± ۲/۳ | ^b ۶/۸ ± ۲/۵ | ^a ۱۴/۳ ± ۳/۶ | چندشکلی - هرمی | شاخ آمون ۱ (CA1) |
| ^b ۴/۷ ± ۱/۵ | ^b ۴/۸ ± ۱/۸ | ^a ۹/۱ ± ۲/۴ | مولکولار | |
| ^b ۷/۵ ± ۳/۱ | ^b ۷/۶ ± ۳/۷ | ^a ۱۵/۸ ± ۳/۷ | چندشکلی - هرمی | شاخ آمون ۲ (CA2) |
| ^b ۵/۱ ± ۲/۰ | ^b ۵/۰ ± ۱/۸ | ^a ۸/۳ ± ۲/۲ | مولکولار | |
| ^b ۶/۱ ± ۲/۶ | ^b ۶/۳ ± ۳/۲ | ^b ۸/۶ ± ۱/۸ | چندشکلی - هرمی | شاخ آمون ۳ (CA3) |
| ^b ۴/۴ ± ۱/۱ | ^b ۵/۱ ± ۱/۲ | ^b ۶/۳ ± ۱/۹ | مولکولار | |
| ^b ۶/۳ ± ۱/۹ | ^b ۵/۳ ± ۱/۴ | ^a ۹/۶ ± ۲/۶ | میانگین کل تعداد سلول‌های لایه‌های شاخ آمون | |
| ^b ۳/۷ ± ۱/۰ | ^b ۳/۴ ± ۱/۸ | ^a ۷/۱ ± ۱/۳ | هیپوس | |
| ^b ۴/۵ ± ۱/۵ | ^b ۴/۶ ± ۱/۹ | ^a ۹/۰ ± ۱/۵ | چندشکلی - هرمی | شکنج دنداندار |
| ^b ۴/۶ ± ۲/۱ | ^b ۴/۵ ± ۲/۱ | ^a ۷/۳ ± ۱/۴ | مولکولار | |
| ^b ۴/۴ ± ۱/۶ | ^b ۴/۳ ± ۱/۷ | ^a ۸/۱ ± ۱/۳ | میانگین کل تعداد سلول‌های لایه‌های شکنج دنداندار | |
| ^b ۴/۶ ± ۱/۶ | ^b ۴/۵ ± ۱/۳ | ^a ۷/۶ ± ۱/۸ | میانگین تعداد سلول مجموع لایه‌ها | |

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار ضخامت لایه‌های هیپوکامپ در بین گروه ترانس ژن، گروه کنترل پلاسمید و گروه کنترل منفی.

| گروه کنترل منفی | گروه کنترل پلاسمید | گروه ترانسژن شده | لایه‌ها | ضخامت لایه‌ها (میکرومتر) |
|-----------------|--------------------|------------------|----------|--------------------------|
| ۹۱/۹ ± ۱۴/۷ | ۹۲/۵ ± ۱۴/۶ | ۱۰۸/۰ ± ۲۵/۹ | چندشکلی | شاخ آمون ۱ (CA1) |
| ۳۵/۷ ± ۶/۰ | ۳۴/۷ ± ۶/۰ | ۳۵/۲ ± ۱۱/۴ | هرمی | |
| ۲۴۸/۷ ± ۶۲/۷ | ۲۴۹/۲ ± ۶۱/۷ | ۲۴۲/۹ ± ۴۰/۳ | مولکولار | |
| ۱۷۹/۲ ± ۴۷/۳ | ۱۷۸/۷ ± ۴۹/۰ | ۱۹۵/۷ ± ۲۸/۳ | چندشکلی | شاخ آمون ۳ (CA3) |
| ۵۴/۸ ± ۷/۴ | ۵۵/۰ ± ۶/۷ | ۵۵/۸ ± ۱۰/۲ | هرمی | |
| ۵۳۳/۶ ± ۳۸/۳ | ۵۳۳/۶ ± ۳۸/۳ | ۶۰۱/۶ ± ۴۰/۸ | مولکولار | |

| | | | |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| چندشکلی | ۱۵۳/۷ ± ۳۳/۹ | ۱۳۹/۹ ± ۲۱/۱ | ۱۴۰/۵ ± ۲۱/۰ |
| هرمی | ۴۱/۷ ± ۱۰/۰ | ۴۰/۶ ± ۲/۸ | ۴۰/۳ ± ۲/۸ |
| مولکولار | ۱۶۳/۸ ± ۲۳/۰ | ۱۴۱/۷ ± ۳/۰ | ۱۴۰/۴ ± ۲/۴ |

با آنزیم‌های XhoI و NheI در ناحیه پایین دست قطعه پروموتوری نستین ۲ از وکتور pIRES2-EGFP که با همین آنزیم‌ها برش داده شده بود الحاق شد. طول قطعه پروموتوری جایگزین شده در وکتور ۹۷۷bp بود که به‌منظور تایید جایگزینی این قطعه نواحی دو طرف پروموتور با آنزیم‌های AseI و XhoI برش داده شد. در الکتروفورز باند تقریبی ۱kb مشاهده شد (شکل C-۲) که نشان‌دهنده صحت طول پروموتور الحاقی بود.

نتایج کلونینگ LIF در وکتور اصلاح شده

به‌منظور کلونینگ ژن LIF در پلاسمید اصلاح شده، اقدام به تکثیر ژن LIF با استفاده از PCR و آنزیم Pfu پلیمرز از سلول‌های MEF شد. سپس قطعه تکثیر شده با PCR به‌طول ۶۱۲bp در پلاسمید اصلاح شده الحاق و به سلول‌های پذیرایی E.coli سویه BL21(DE3) منتقل شد. از مجموع کلون‌های رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی کانامیسین دارای پلاسمید pIRES2-EGFP حاوی ژن LIF، در مجموع ۳ کلون انتخاب شد. انتخاب کلون‌های مذکور بر اساس انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی LIF بر روی کلون‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی کانامیسین بود. بر این اساس از آنجا که طول ژن LIF ۶۱۲ bp بود به‌دلیل قطعات حاوی محل برش آنزیم‌ها در زمان PCR یک قطعه با طول تقریبی ۶۵۰ bp تولید شد. صحت توالی‌های به‌دست‌آمده پس از تعیین توالی به‌صورت خوانش از دو طرف، با استفاده از نرم افزار nBLAST و مقایسه با توالی LIF موجود در بانک ژن با عدد دسترسی NM_022196.2 تأیید شد.

تایید زاده‌های ترانس ژن

به‌منظور تایید زاده‌های ترانس ژن، نمونه‌های جدا شده از هیپوکامپ موش‌های صحرایی ۴۰ روزه با استفاده از PCR و میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی شدند. نتایج حاصل نشان‌دهنده ۶۰ درصد ترانس ژنی در زاده‌های نسل اول بود. PCR بر نمونه‌های بافتی گروه مثبت حاوی پلاسمید و ژن LIF، محصولی با طول ۱۸۰ bp مربوط به قطعه‌ای از ژن LIF به

بررسی بافت‌شناسی هیپوکامپ با روش میکروسکوپ نوری در این مرحله از هر گروه تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر ۶۰ روزه انتخاب شده و نمونه‌گیری از مغز آن‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها به فرمالین ۱۰ درصد انتقال داده شدند. سپس به‌روش معمول تهیه مقاطع بافتی قالب‌گیری انجام و برش‌های تهیه شده با ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر با روش هماتوکسیلین-انوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (۱۶). در مطالعه‌ی میکروسکوپی ضخامت طبقات چندشکلی، هرمی و مولکولار در بزرگنمایی ۱۰۰× و تعداد الیگوندروسیته‌ها در بزرگنمایی ۱۰۰× (برای هر نمونه ۵ اسلاید میکروسکوپی و در هر اسلاید ۱۰ میدان میکروسکوپی) در بخش‌های شاخ آمون، شکنج دنداندار و هیلوس اندازه‌گیری و شمارش شدند. در این مرحله از نرم‌افزار Dino-Eye Microscope AM- و عدسی Dinocapture 423X (ANMO، تایوان) استفاده شد.

آنالیز آماری

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها از نسخه‌ی شانزدهم نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری student t استفاده شد. نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. سطح معنی‌داری تست‌ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی جایگزینی قطعات پروموتوری نستین و Hsp68 در پلاسمید pIRES2-EGFP

در این مطالعه به‌منظور جایگزینی قطعه پروموتوری ECMV وکتور pIRES2-EGFP ابتدا قطعه ۶۰۰ bp مربوط به پروموتور ECMV با استفاده از آنزیم‌های AseI و NheI از پلاسمید برش داده شد (شکل A-۲). سپس قطعه پروموتوری اینترون ۲ نستین با طول ۶۳۷ bp با استفاده از PCR و پرایمرهای دارای ناحیه برش AseI و NheI تکثیر (شکل B-۲) و در پلاسمید برش یافته با آنزیم‌های AseI و NheI الحاق شد. به‌منظور الحاق ناحیه تشدیدکننده hsp68، این ناحیه به طول ۳۴۰ bp پس از برش وکتور hsp68-LacZ-pA

نتایج ارزیابی ضخامت لایه‌های مختلف هیپوکامپ در بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری ضخامت هر کدام از لایه‌ها اختلاف معنی‌داری بین ضخامت لایه‌های هیپوکامپ در بین گروه‌های مثبت ترانسژن شده، گروه منفی و گروه کنترل منفی مشاهده نشد (جدول ۲).

بحث

در مطالعه حاضر بمنظور ارزیابی تأثیر بیان بالای فاکتور مهارکننده لوسمی بر جمعیت سلول‌های اولیگوندروسیت در هیپوکامپ از مدل موش صحرایی ترانس ژن تولیدشده با روش TMGT استفاده شد. در این مدل بیان بالای فاکتور مهارکننده لوسمی تحت عملکرد پروموتور نستین و عامل تشدیدکننده hsp68 القا شد. در مطالعه حاضر بیان ژن LIF در بافت هیپوکامپ موش‌های ترانس ژن نسبت به گروه‌های کنترل فاقد وکتور و کنترل فاقد LIF افزایش یافت. در مطالعات محدود انجام‌شده بمنظور ارزیابی بیان بالای LIF در مغز و تأثیر آن بر جمعیت و شاخص‌های مولکولی سلول‌های بنیادی، محدودیت‌هایی وجود داشته است که در مدل طراحی‌شده در مطالعه حاضر رفع شده است. نخست اینکه در مطالعه Deverman و Patterson (۷)، از تزریق مستقیم LIF در بطن‌ها استفاده شده است که به دلیل پاک‌سازی سریع پروتئین‌های خارجی، توزیع نامتناسب آن‌ها در مغز پس از ورود به بطن‌ها و نیز عدم تعیین میزان جذب، ارزیابی اثرات تزریق درون مغزی LIF به‌منظور توسعه کاربرد بالینی آن را امکان‌پذیر نمی‌سازد. همچنین روش تزریق درون بطنی و امکان برداشت LIF اگزوزن توسط سلول‌های غیر هدف محدودیت مهمی در کاربرد این روش در شرایط بالینی می‌باشد. در مطالعه Bauer و Patterson (۶) از وکتور آدنوویریوسی تحت کنترل پروموتور آنسفالومیوکاردیت استفاده شده است. مهم‌ترین محدودیت‌های این روش القا بیان ژن LIF در تمام سلول‌های آلوده با وکتور آدنوویریوسی است چرا که پروموتور ECMV در تمام سلول‌های پستانداران قابلیت القا را دارد. دیگر این‌که در این روش عموماً سلول‌های اپاندیمال در حاشیه خارجی بطن‌ها آلوده می‌شوند که همه آن‌ها خاصیت بنیادی ندارند لذا بروز اثرات بیان بالای LIF در سلول‌های بنیادی به‌صورت متغیر ظاهر شده است (۶). در مطالعه حاضر با الحاق پروموتور اینترون نستین و ناحیه تشدیدگر hsp68 محدودیت‌های فوق در

همراه بخشی از پروموتور Hsp68 در ۶۰ درصد زاده‌ها را نشان داد. در نمونه‌های غیر ترانس ژن و نمونه‌های گروه منفی و نمونه گروه کنترل منفی محصولی تولید نشد. ارزیابی مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که پروتئین EGFP در نواحی تحت بطنی و شکنج دنداندار هیپوکامپ که محل تجمع سلول‌های بنیادی می‌باشد بیان می‌شود (شکل ۳). با توجه به عدم بیان EGFP در سایر بخش‌ها و نیز با توجه به ساختار وکتور که حاوی پروموتور نستین می‌باشد، القا بیان ژن EGFP در این نواحی و فعال بودن پروموتور نستین در سلول‌های بنیادی تأیید شد.

تغییرات بیان ژن LIF

شکل ۴ تغییرات بیان نسبی ژن LIF در مقایسه با بیان ژن GAPDH در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. میزان بیان ژن LIF در گروه ترانسژنیک ۸ برابر گروه‌های کنترل منفی بود.

نتایج هیستومتری نمونه‌ها

در ارزیابی هیستومتری نواحی CA1، CA2، CA3 و CA4 شاخ آمون و شکنج دنداندار از نظر تعداد سلول‌های اولیگوندروسیتی و نیز ضخامت لایه‌های چندشکلی، هرمی و مولکولار مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی آماری نتایج حاصل از شمارش الیگوندروسیت در نواحی مختلف هیپوکامپ افزایش معنی‌دار تعداد این سلول‌ها در نواحی CA1 و CA2 شاخ آمون در گروه ترانس‌ژن شده را نسبت به گروه کنترل منفی فاقد LIF و گروه کنترل منفی فاقد پلاسمید نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۱). در ناحیه CA3 شاخ آمون اختلاف معنی‌داری در تعداد سلول‌های اولیگوندروسیت بین سه گروه مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۲). صرف‌نظر از نوع لایه‌های هیپوکامپ، مجموع سلول‌های شمارش شده در شاخ آمون هیپوکامپ در گروه ترانسژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه کنترل منفی بود (شکل ۵). تعداد سلول‌های اولیگوندروسیتی در لایه‌های چندشکلی-هرمی و مولکولار شکنج دنداندار هیپوکامپ در گروه ترانس ژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کنترل بود ($p < 0.05$) (جدول ۱). در مجموع تعداد سلول‌های اولیگوندروسیتی در لایه‌های مختلف هیپوکامپ موش‌های ترانس ژن بطور معنی‌داری بالاتر از تعداد سلول‌های هیپوکامپ در موش‌های گروه‌های کنترل بود ($p < 0.05$) (جدول ۲).

خصوص کنترل بیان وکتور در سلول‌های بنیادی عصبی رفع شد.

القا تکثیر سلول‌های عصبی یا سلول‌های نیایی و یا پیوند آن‌ها برای جایگزینی سلول‌هایی که در صدمات یا بیماری‌ها از دست رفته‌اند، امید تازه‌ای به منظور درمان اختلالات عصبی ایجاد کرده است (۱۷). تزریق مستقیم یا بیان بالای فاکتورهای رشد عصبی (نوروتروف) یکی از بهترین این راه‌کارها می‌باشد. تزریق مستقیم فاکتورهای رشد مانند فاکتور پایه رشد فیبروبلاستی و عامل رشد اپیدرمی به درون بدن‌ها در حیوانات آزمایشگاهی منجر به گسترش جمعیت سلول‌های پیش ساز ناحیه زیر بطنی تولید نورون‌ها و آستروسیت‌ها شده است. همچنین تزریق فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده آلفا در حیواناتی که سیستم دوپامین آن‌ها آسیب‌دیده بود منجر به تکثیر سلول‌های بنیادی در بخش جلویی حفره قدامی مغز و به دنبال آن مهاجرت سلول‌های پیش ساز عصبی و گلیال شده است. با این حال در تمام این روش‌ها ترمیم موقت و غیر تجدید شونده مانع از باز یافت عملکرد کامل سیستم عصبی آسیب‌دیده شده است. همچنین نیاز به انجام تزیقات پیاپی انجام بالینی چنین روش درمانی را با محدودیت روبه‌رو می‌سازد (۱۷ و ۱۸).

در مطالعه حاضر بیان پروتئین EGFP در ناحیه شیار دندانه‌دار با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس تأیید شد درحالی‌که در گروه‌های کنترل، پروتئین EGFP بیان نشد. مطالعات موجود نشان داده است که سلول‌های بنیادی نیایی عصبی در سه ناحیه شامل ناحیه تحت بطنی بدن‌های جانبی، شکج دندانه‌دار هیپوکامپ، باقی‌مانده بخش نوروایپ‌تلیوم دوره جنینی متمرکز هستند (۱۹). تمایز این سلول‌ها به سلول‌های پیش ساز سبب کاهش خاصیت چند قوه‌زایی آن‌ها توام با خاموش شدن ژن‌های شاخص چند قوه‌زایی و تعهد آن‌ها به تمایز به یک نوع رده سلولی شامل نورون و سلول‌های گلیال (آستروسیت‌ها و اولیگودندروسیت‌ها) می‌شوند (۲۰). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های موجود در نواحی تحت بطنی دارای توان تکثیر سریع بوده (نوع C) و عموماً پس از تکثیر به نورون‌ها تمایز یافته و به ناحیه لوب بویایی مهاجرت می‌کنند درحالی‌که سلول‌های بنیادی موجود در هیپوکامپ عموماً دارای توان تکثیر آهسته بوده (نوع B) و پس از تمایز به سلول‌های گلیال به‌ویژه اولیگودندروسیت‌ها تبدیل و به نواحی مجاور مغز به‌ویژه جسم

پینه‌ای که حاوی بیشترین فعالیت میلین‌زایی در مغز می‌باشد مهاجرت می‌کنند. افزایش بیان ژن LIF توام با بیان پروتئین EGFP در شیار دندانه‌دار هیپوکامپ در این مطالعه با نتایج Kawaguchi و همکاران (۱۲)، مبنی بر تمرکز سلول‌های بنیادی نیایی در این ناحیه همخوانی دارد. بیان پروتئین EGFP در بخش‌هایی از هیپوکامپ و نیز بیان بالای LIF در هیپوکامپ موش‌های ترانس ژن، می‌تواند نشان‌دهنده بیان نستین و القا پروموتور آن در سلول‌های بنیادی پیش ساز باشد که در برخی بخش‌های هیپوکامپ توزیع شده‌اند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تعداد سلول‌های اولیگودندروسیت در نورون‌های هرمی، مولکولار و چندشکلی بخش‌های CA1 و CA2 شاخ آمون و شیار دندانه‌دار هیپوکامپ در موش‌های ترانس ژن با بیان بالای LIF نسبت به موش‌های کنترل افزایش یافت. درحالی‌که ضخامت لایه‌های نورونی در بخش‌های مختلف هیپوکامپ موش‌های ترانس ژن و غیر ترانس ژن تفاوت نداشتند. این یافته افزایش تمایز سلول‌های نیایی بنیادی به سلول‌های پیش ساز در مدل طراحی‌شده در این مطالعه را تأیید می‌نماید. نتایج مطالعات موجود در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی تجربی اطلاعات متناقضی در خصوص تأثیر LIF بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی نشان می‌دهد که احتمالاً مربوط به متغیرهایی چون نحوه تجویز و دوز LIF، نوع سلول‌های هدف که LIF در آن‌ها بیان می‌شود و یا فعال شدن مسیرهای انتقال سیگنال متفاوت می‌باشد (۶، ۷ و ۵).

Zhao و همکاران (۵) نشان داده‌اند که علی‌رغم تشدید تکثیر متقارن سلول‌های بنیادی عصبی و نیز تمایز آن‌ها به سلول‌های بنیادی پیش ساز گلیال در حضور LIF، میزان تمایز این سلول‌ها به بافت‌های مزودرمی و اندودرمی خارج رویانی مهار می‌شود. در مطالعه حاضر افزایش تکثیر سلول‌های اولیگودندروسیت در هیپوکامپ نشان‌دهنده کارکرد مسیرهایی است که ضمن افزایش توان خودنوزایی سلول‌های بنیادی نیایی، تمایز آن‌ها به رده‌های گلیال را تشدید نموده است. این یافته با نتایج Zhao و همکاران (۵) مطابقت دارد. مطابق با نتایج این مطالعه، Mayer و همکاران (۲۰) نشان داده‌اند که کاربرد LIF نوترکیب در محیط کشت عصاره بافتی هیپوکامپ سبب افزایش تعداد اولیگودندروسیت‌های بالغ می‌شود که این تغییرات توام با

القایی تحت پروموتور نستین به‌طور موفقیت آمیزی در تولید حیوانات ترانسژن با بیان اختصاصی فاکتورهای نوروتروف در سلول‌های بنیادی استفاده نمود. بیان بالای LIF در موش‌های ترانسژن در نواحی از هیپوکامپ که محل تجمع سلول‌های بنیادی نیایی و سلول‌های پیش ساز رده‌های مختلف سلولی می‌باشد سبب افزایش تعداد سلول‌های میلین ساز اولیگودندروسیت در هیپوکامپ می‌شود. نتایج این تحقیق تاییدی بر امکان کاربرد پروتئین LIF در درمان ضایعات حاصل از کاهش یا آسیب سلول‌های اولیگودندروسیت می‌باشد. با این حال مطالعات بیشتری در این زمینه ضروری می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌دلیل تامین هزینه‌های طرح تقدیر و تشکر می‌نمایند.

افزایش میزان تولید میلین در محیط کشت بوده است (۲۱). Deverman و همکاران (۷) نشان داده‌اند که ۳ تا ۵ هفته پس از تزریق پلاسمید آدنووایروس حاوی LIF تعداد سلول‌های پیش ساز اولیگودندروسیتی در نواحی اطراف بطن افزایش یافته است. با توجه به این که در مطالعه Deverman و همکاران (۷) عموماً سلول‌های اپاندیمال جدار بطن پس از تزریق پلاسمید آلوده شده‌اند تغییرات جمعیت سلول‌های پیش ساز تنها در نواحی مجاور بطن‌ها مشاهده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که القای بیان بالای LIF به‌صورت اختصاصی در سلول‌های نستین مثبت سبب گسترش جمعیت سلول‌های اولیگودندروسیت در بخش‌های مختلف هیپوکامپ می‌شود (۷).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از وکتورهای

منابع

1. Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, et al. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 24(3): 623–631.
2. Trouillas V, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, et al. The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur Cytokine Netw J*. 1993; 20(2): 51–62.
3. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S. Leukemia inhibitory factor: role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *J Cell Immunol*. 2008; 253(1-2): 16-22.
4. Xavier G, Nadine T, Vincent P, Pierre T, et al. LIF-dependent signaling: New pieces in the lego. *Stem Cell Rev Rep*. 2012; 8(1):1–15.
5. Zhao HE, Jing-Jing LI, Zhen CC, Feng LY, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(1): 80–90.
6. Bauer S, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *J Neurosci*. 2006; 26(46): 12089 – 12099.
7. Deverman BE, Patterson PH. Exogenous leukemia inhibitory factor stimulates oligodendrocyte progenitor cell proliferation and enhances hippocampal remyelination. *J Neurosci*. 2012; 32(6): 2100–2109.
8. Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118:2393-2403.
9. Miller RH. The promise of stem cells for neural repair. *Brain Res*. 2006; 1091(1): 258-64.
10. Chang KT, Ikeda A, Katsuhiko H, Yasufumi F, et al. Production of transgenic rats and mice by the testis-mediated gene transfer. *J Reprod Dev*. 1999; 45(1): 29-36.
11. Lothian Cl, Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci*. 1997; 9(3):452-62.
12. Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita K, et al. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2001; 17(2): 259–273.
13. Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, et al. In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature*. 2006; 444(7118): 499-502.
14. Mothe AJ, Kulbatski I, Bendegem RLV, Lee L, et al. Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking

558–65.

19. Alenzi F, Bahkali A. Stem cells: Biology and clinical potential. *Afr J Biotech.* 2011; 10(86): 19929–40.

20. Mayer M, Bhakoo K, Noble M. Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development.* 1994; 20(1): 143–153.

21. Marriott MP, Emery B, Cate HS, Binder MD, et al. Leukemia inhibitory factor signaling modulates both central nervous system demyelination and myelin repair. *Glia J.* 2008; 56(6): 686–698.

transplanted neural stem/progenitor cells. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53(10): 1215.

15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.

16. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* 5rd ed, Edinburgh, Churchill Livingstone. 2002: 85-107.

17. Muller FJ, Snyder EY, Loring JF. Opinion: Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nature Rev.* 2006; 7(1):75-84.

18. Paspala S, Murthy T, Mahaboob V, Habeeb M. Pluripotent stem cells A review of the current status in neural regeneration. *J Neuro India.* 2011; 59(4):

Archive of SID

Effect of enhanced expression of leukemia inhibitory factor in brain stem cells on histological structure of the hippocampus in produced transgenic rats by TMGT technique

Hosseinfar Sh, Ph.D.¹, Jozaie S, DVM.², Tabandeh MR, Ph.D.^{2*}, Rahdar M, Ph.D.³

1- Division of histology, Department of basic sciences, Faculty of veterinary medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Division of biochemistry and molecular biology, Department of basic sciences, Faculty of veterinary medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Cellular and Molecular Research Center (CMRC), Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

* Email corresponding author: m.tabandeh@scu.ac.ir

Received: 30 Dec. 2015

Accepted: 27 Sep. 2016

Abstract

Aim: Leukemia inhibitory factor (LIF) has beneficial effects on neural stem cell function and neurodegenerative disease treatment. However limited data is available about the effects of LIF over-expression in neural stem cells on brain tissue changes. In this study transgenic rats (TR) with over expression of LIF under the control of nestin gene promoter were produced and histological changes of their hippocampus were studied.

Material and methods: To produce transgenic rats, promoter regions of pIRES2-EGFP vector were replaced with 2nd intron nestin promoter and Hsp68 enhancer sequence, and injected into testes (10 µg) of 10 male rats. After mating with female rats, transgenesis confirmation was done using conventional PCR, real time PCR and fluorescent microscopy. Brain of mature transgenic and control rats (4 months of age) were obtained, sectioned and stained with H & E and then their hippocampus structure were studied.

Results: LIF gene was significantly expressed in higher levels in hippocampus stem cells of TR comparing to control ($P < 0.05$). This finding in concomitant with presence of EGFP signal in neural stem cells of hippocampus confirmed the transgenesis in offspring. Oligodendrocytes number was significantly higher in hippocampus of transgenic rats in comparison with control groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Over expression of LIF in neural stem cells resulted in elevation of oligodendrocytes in hippocampus of rat brain. Because oligodendrocytes destruction are importance in neurodegenerative diseases progression, it is possible that successful LIF transmission into the brain can be used in the future to restore the oligodendrocyte mass.

Key words: Luekemia inhibitory factor, transgenic rats, hippocampus, histological changes