

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

\*دکتر فرهاد مشایخی (Ph.D)<sup>۱</sup> - مهدیه فرجی (M.Sc)<sup>۱</sup> - سیده زهرا موسوی بنه حور (M.Sc)<sup>۱</sup>

\*نویسنده مسئول: رشت، خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: mashayekhi@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۴

## 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 و Olig2 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 Olig1، Olig2 و Opalin در کورتکس مغز موش‌های دچار اسکروز مولتیپل (Multiple sclerosis=MS) القاء شده با Cuprizone **مواد و روش‌ها:** برای القای اسکروز مولتیپل به مدت پنج هفته به ۳۶ 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 به صورت 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 تزریق شده CNTF به طور 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 بیست و یکم شماره ۴، صفحات: ۱۵-۲۱

## مقدمه

به میزان کمی میلین‌سازی می‌کنند (۳). البته به‌رغم وجود سلول‌های اجدادی الیگودندروسیت، ترمیم در ناحیه آسیب‌دیده در بیماران MS ادامه پیدا نمی‌کند (۴). 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

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 و سپس به الیگودندروسیت‌های نابالغ و در نهایت به الیگودندروسیت‌های بالغ تبدیل می‌شوند (۲). با توجه به این‌که پوشش میلین و الیگودندروسیت‌ها در اسکروز 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

نشانگر الیگوندروسیت 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 اولیگوندروسیت‌ها و در نتیجه میلین‌سازی در کورتکس مغز از موش‌های نر بالغ ۶ تا ۸ هفته‌ای آزمایشگاهی نژاد Balb/c استفاده شد. موش‌ها در اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه گیلان در دمای اتاق ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲:۱۲ 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 ۵ هفته Cuprizone، ۰/۲٪ (از شرکت Sigma-Aldrich) به همراه غذا داده شد. Cuprizone با تخریب اولیگوندروسیت‌ها 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، ۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن CNTF به صورت زیرپوستی تزریق شد. به گروه دوم (شم)، سرم فیزیولوژی تجویز شد و به گروه سوم نیز هیچگونه تزرقمی نشد (گروه کنترل). حجم سرم فیزیولوژی و محلول حاوی CNTF برای تزریق ۵۰ میکرولیتر بود.

شش هفته بعد از تزریق‌ها، موش‌ها را با دی‌اتیل 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. بدین صورت که کورتکس مغز به قطعه‌های ریز تقسیم و در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده پروتئین (Tris 150mMNaCl, 1.0% Np40,20 mM (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. بعد از سانتریفوژ، عصاره‌های پروتئینی جدا و در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$

(factor = CNTF) سیتوکینی است که باعث تحریک تولید میلین می‌شود (۶). CNTF که باعث بقا و تمایز سلول‌های اجدادی الیگوندروسیت در نخاع می‌شود (۷)، متعلق به خانواده انترلوکین ۶ (IL-6) است (۸). این سیتوکین ابتدا به گیرنده خود یعنی CNTFR $\alpha$  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 (۹). CNTF در دستگاه عصبی محیطی توسط سلول‌های شوان و در دستگاه عصبی مرکزی توسط سلول‌های آستروسیت بیان می‌شود (۱۰). مطالعات نشان می‌دهد که CNTF با مهار تولید TNF $\alpha$  دارای اثر ضدالتهابی نیز هست (۱۱). بنابراین، CNTF نقش مهمی در بیماری‌های التهابی دستگاه عصبی مرکزی نظیر MS و فرایند میلین‌سازی ایفا می‌کند.

در MS، تعدادی از سلول‌های اجدادی الیگوندروسیت به الیگوندروسیت‌ها تبدیل شده و شروع به تولید میلین می‌کنند ولی قادر به ادامه این روند نیستند. از عوامل مهمی که در تمایز و ایجاد الیگوندروسیت‌ها و میلین‌سازی نقش دارند عوامل کپی برداری Olig1 و Olig2 است (۱۲). Olig2 در تنظیم تعداد الیگوندروسیت‌ها در تمام بخش‌های دستگاه عصبی مرکزی نقش دارد (۱۳). بنابراین، افزایش بیان Olig1 و Olig2 می‌تواند نشان دهنده افزایش تولید الیگوندروسیت‌ها باشد.

یکی دیگر از پروتئین‌هایی که میزان بیان آن نشان‌دهنده میزان فعالیت الیگوندروسیت‌هاست اوپالین (Opalin) می‌باشد. این ژن فقط در پستانداران و در الیگوندروسیت‌های در حال میلین‌سازی و فعال بیان می‌شود (۱۴) که این موضوع نشان می‌دهد Opalin نقش منحصر به فردی در میلین‌سازی در پستانداران بازی می‌کند. Opalin پروتئینی داخل‌غشایی و نشانگر مولکولی برای الیگوندروسیت‌های بالغ و فعال است (۱۵).

با توجه به نقش CNTF در فرایند تولید دوباره میلین توسط الیگوندروسیت‌ها و همچنین نقش Olig1,2 در تکوین و تمایز الیگوندروسیت‌های تولیدکننده میلین، در این تحقیق به بررسی اثر CNTF بر بیان Olig1,2 و Opalin، به عنوان

نگهداری شد.

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

بررسی کمی 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 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 از سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin= BSA) تهیه و این مقادیر در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

سپس، در لوله‌های آزمایش، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد (۰/۰۱٪ Coomassie Brilliant Blue G-250، ۰/۵٪ اتانول ۹۵٪، ۱۰٪ اسید فسفریک ۸۵٪) ریخته و در هر یک از آنها ۱۰۰ میکرولیتر محلول BSA تهیه شده اضافه شد. لوله‌ها را بخوبی مخلوط کرده و بعد از ۲۰ دقیقه جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده و در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم BSA در میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم و غلظت پروتئین در عصاره‌ها محاسبه شد.

### ب) بررسی بیان نسبی Olig1 و Olig2، Opalin در عصاره کورتکس مغز به روش وسترن بلات

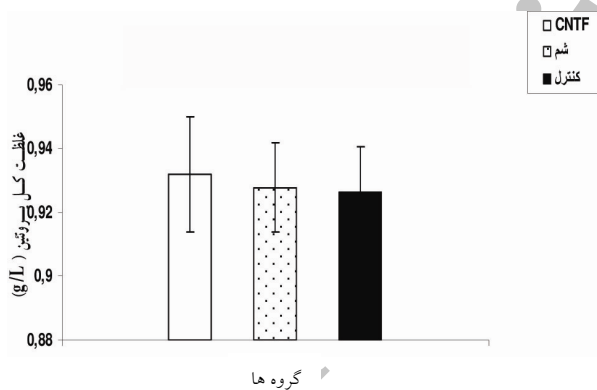
برای آنالیز میزان بیان Olig1 و Olig2 و Opalin از روش وسترن بلات استفاده شد. برای وسترن بلات، عصاره‌ها با بافر حاوی SDS ۳/۲٪ (Sodium dodecyl sulfate)، گلیسرول ۱۵٪،  $\beta$ -مرکاپتواتانل ۲/۸ مولار و بروموفنول آبی مخلوط شدند. سپس، نمونه‌ها بر ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌امید (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Milan, Italy) ۱۵ درصد قرار گرفته و بر اساس روش لاملی جدا شدند. سپس، پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل به صفحه‌های نیتروسولوز با منفذ ۰/۴۵ میکرومتر منتقل شدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در محلول بلوکه‌کننده (سالین بافر فسفات به همراه ۵ درصد شیر خشک)، صفحه نیتروسولوز به مدت ۲۴ ساعت در محلول حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه Olig1، Olig2 و Opalin (شرکت Abcam) با غلظت ۱:۱۰۰۰ در دمای ۴°C و پس از آن به مدت ۲ 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  $\beta$ -توبولین نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

**آنالیز آماری:** تمام نتایج ارائه شده به صورت Mean $\pm$ SEM محاسبه شد. در تمام آزمایش‌ها تعداد ۱۲ نمونه بکار رفت. آنالیز آماری با Student's t-test انجام و فقط  $P \leq 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

۱- **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 کنترل به ترتیب  $P=0/58$  و  $P=0/49$  بود (شکل ۱) و اختلاف غلظت پروتئین بین دو گروه شم و کنترل معنی‌دار نبود ( $P=0/86$ ).

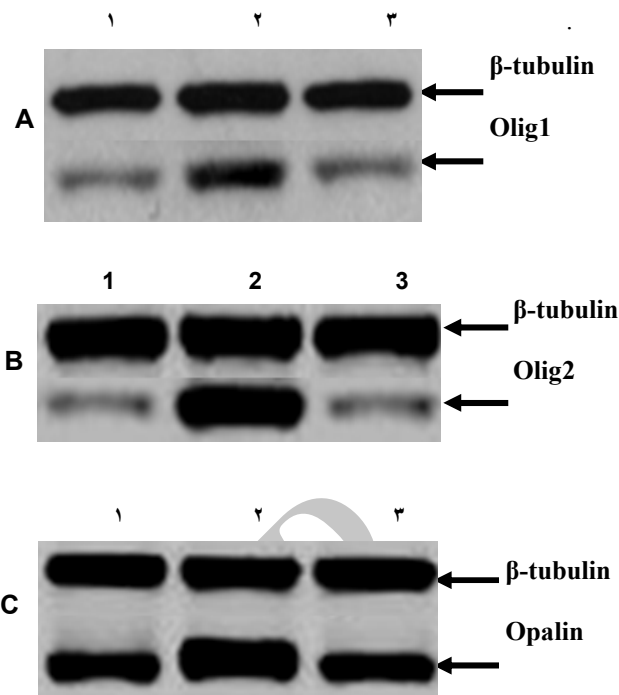


شکل ۱: غلظت کل پروتئین‌های عصاره کورتکس مغز در موش‌های تزریق شده با CNTF و گروه‌های شم و کنترل. غلظت کل پروتئین‌های عصاره کورتکس مغز در نمونه‌های تزریق شده با CNTF در مقایسه با گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی (گروه شم) و گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. این افزایش معنی‌دار نبوده و سطح احتمال نسبت به گروه شم و کنترل به ترتیب  $P=0/58$  و  $P=0/49$  می‌باشد. تفاوت بین دو گروه کنترل و شم نیز معنی‌دار نیست ( $P=0/86$ ).

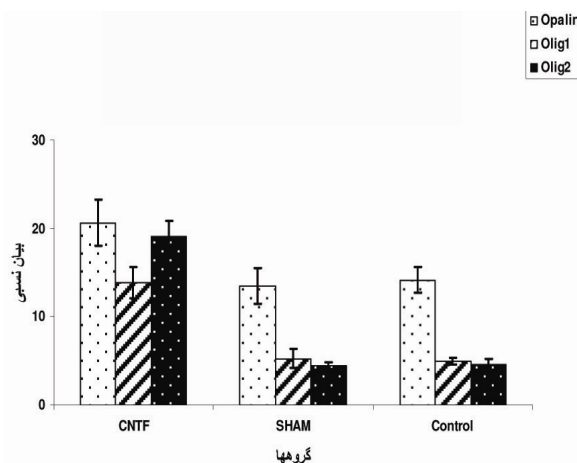
### بحث و نتیجه‌گیری

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 بین رفتن حاد میلین در MS، ابتدا مقدار کمی میلین توسط الیگودندروسیت‌های موجود یا الیگودندروسیت‌هایی که از سلول‌های اجدادی 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 عامل‌های 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



شکل ۲: بیان پروتئین Olig1، Olig2، و Opalin (به ترتیب A، B و C) در عصاره کورتکس مغز موش‌های تزریق شده با CNTF (شماره ۲)، گروه شام (شماره ۳) و گروه کنترل (شماره ۱). میزان بیان هر سه پروتئین در گروه تزریق شده با CNTF بیشتر از گروه‌های شام و کنترل است. از بتاتوبولین (۵۰ کیلو 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، شام 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 شام به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ( $P < 0.0001$ ). اختلاف در بیان هر سه پروتئین مورد مطالعه در گروه کنترل و شام معنی‌دار نبوده است ( $P > 0.05$ ).

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 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 احتمالاً 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.

**تشکر و قدردانی:** از دانشگاه گیلان - معاونت محترم پژوهشی - برای تصویب این طرح پژوهشی و تخصیص بودجه و پشتیبانی مالی قدردانی می‌شود.

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 دستگاه عصبی 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 توجه 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 در حال میلین‌سازی بیان شده و نقش مهمی در ایجاد میلین در دستگاه عصبی مرکزی بازی می‌کند. افزایش Opalin در پاسخ به تزریق CNTF نشان‌دهنده

## منابع

1. Kessar 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 En Esclerosis Múltiple. Quality Of Life in Multiple Sclerosis Patients in Spain. *Mult Scler* 2002; 8: 527-31.
5. Barres BA, Schmid R, Sendtner 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. Talbot 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, Brockschneider 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.

Archive

# 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)<sup>1</sup>- Faraji M.(M.Sc)<sup>1</sup>- Mousavi Bane Hour S.Z.(M.Sc)<sup>1</sup>

\*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