لیزر در پزشکی؛ ۱۴۰۳، دورهٔ ۲۱، شماره ۳، صفحات: ۲۱-۱۷.

مقاله پژوهشی

تولید پروتئین اینترلوکین ۲ نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی با استفاده از سیستم بیانی میکروبی

فرشته سرافرازی اسفندآبادی[۱]
آرمین ناظمی‌زاده[۱]
مهدی حصارکی[۱]
مسعود حبیبی[۱]
محسن فاتح[۲]
حسن رسولی[۱]

۱. *گروه پژوهشی پزشکی بازساختی و زیست‌فناوری در ترمیم زخم مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی پژوهشکده فناوری‌های زخم و ترمیم بافت یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران*

۲. *گروه پژوهشی پزشکی مبتنی بر سبک زندگی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران*

نویسنده مسئول: حسن رسولی تلفن: ۰۲۱۶۶۴۶۲۹۱۵
پست الکترونیکی: Rassouli۵۹@gmail.com

خلاصه

مقدمه: اینترلوکین-۲، سیتوکینی که گسترش سلول‌های T و توسعه فنوتیپی را هدایت می‌کند، نقش مهمی در بهبود زخم ایفا می‌کند. بهترین نقش مطالعه‌شده برای اینترلوکین-۲ در تأثیرگذاری بر رشد سلول‌های T است. با این‌حال، انواع سلول‌های دیگر، از جمله فیبروبلاست ها، سلول‌های پوستی که وظیفه ترمیم زخم را به‌عهده دارند، گیرنده اینترلوکین-۲ را بیان می‌کنند و بنابراین ممکن است به اینترلوکین-۲ پاسخ دهند. مطالعات نشان داده‌اند که درمان با اینترلوکین-۲ می‌تواند استحکام پوست ترمیم یافته را بهبود بخشد، که که بیانگر نقش اینترلوکین-۲ را در روند بهبود زخم می‌باشد.

روش مطالعه: در این مطالعه، یک وکتور بیان میکروبی حاوی توالی کدکننده برای IL-2 بهینه ساخته و سازه‌ی مذکور به سویه‌های باکتریایی انتقال یافت. بیان پروتئین نوترکیب پس از القا با استفاده از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ و آنتی‌بادی اختصاصی موردبررسی قرار گرفت. سپس جهت تخلیص از کروماتوگرافی تمایلی استفاده شد. فعالیت زیستی پروتئین تولیدشده به‌وسیله‌ی رسم منحنی رشد سلول‌های NIH-3T3 موردبررسی قرار گرفت.

نتایج: پس از تنظیم مسیر بیانی مناسب، میزان ۸/۰۱ میلی‌گرم IL-2 به‌ازای هر لیتر کشت باکتریایی در ارلن تخلیص گردید. IL-2 تخلیص‌شده دارای ساختار مناسب و فعالیت زیستی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: سویه باکتریایی مورد استفاده می‌تواند IL-2 نوترکیب تولید و فولدینگ مناسب را ایجاد نماید. IL-2 نوترکیب تولیدی دارای فعالیت بیولوژیکی است و مسیر تولیدی مقیاس‌پذیر بوده و از نظر اقتصادی به‌صرفه است.

واژگان کلیدی: IL-2 نوترکیب، فناوری DNA نوترکیب، سیستم بیان میکروبی

مقدمه

پوست اغلب آسیب‌دیده و باعث آسیب به اپیتلیوم یا آسیب به ساختار آناتومیک طبیعی بافت می‌شود. زخم‌ها را می‌توان براساس ماهیت، ساختار لایه‌های پوست، فرآیند بهبود و براساس طول مدت بهبود زخم طبقه‌بندی کرد (Susanto et al., 2022). چهار فرآیند همپوشانی اصلی در فرآیند بهبود زخم وجود دارد: فازهای هموستاتیک، التهابی، تکثیر و بازسازی (وانگ و همکاران، ۲۰۱۸). فرآیند بهبود زخم شامل پاسخ‌های سلولی و بیوشیمیایی، از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها و سیتوکین‌ها است (ولنار و همکاران، ۲۰۰۹). سیتوکین‌هایی که در فاز التهابی نقش دارند شامل سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)، اینترلوکین -۱ (IL-1)،IL-6 و IL-8 سلول‌های ایمنی را به محل زخم هدایت می‌کند. اینترلوکین گاما و همچنین سیتوکین‌های ضدالتهابی مانند IL-4، IL-10 و IL-13 باعث تحریک آزادسازی ماگروفاژها و تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شوند.

(Sarsenova, M., et al. 2022). سلول‌های فیبروبلاست که برای بستن زخم‌ها عمل می‌کنند، IL-2 را نیز در روند بهبود زخم بیان می‌کنند. IL-2 یک سایتوکین مرتبط با سیستم ایمنی است که تولید سلول‌های T را تحریک می‌کند که نقش مهمی در بهبود زخم دارند (Doersch et al., 2017).

فرآیند بهبود زخم نیازمند هماهنگی سلول‌های ایمنی با سلول‌های پوست است. IL-2 یک سیتوکین است که در مسیرهای سیگنال‌دهی مربوط به سیستم ایمنی نقش دارد، نقش مهمی در چندین عملکرد کلیدی سیستم ایمنی ایفا می‌کند و با چندین سیتوکین برای تعدیل تشکیل و فعال‌شدن سلول‌های ایمنی تعامل دارد که می‌تواند بر بهبود زخم نیز تأثیر بگذارد. IL-2 بیشتر توسط سلول‌های +CD8 T و +CD4 در حالت فعال تولید می‌شود. (Arenas-Ramirez et al., 2013)

علاوه‌براین، مهاجرت سلول‌های لکوسیت و پلاکت نیز با فعال‌سازی MAPK انجام می‌شود که نفوذپذیری غشای سلولی را به یون‌های +Ca2 افزایش می‌دهد و کلاژناز و الاستاز را فعال می‌کند، که همچنین مهاجرت سلولی را به سمت موقت تحریک می‌کند ماتریسی که تشکیل شده است سلول‌های پلاکتی پس از رسیدن به ماتریکس، دگرانولاسیون را تجربه می‌کنند، سیتوکین‌ها ترشح می‌کنند و مسیرهای درونی و بیرونی را فعال می‌کنند که سلول‌های نوتروفیل را تحریک می‌کنند تا به ماتریکس موقت مهاجرت کنند و فاز التهابی را آغاز کنند. ERK برای تنظیم فعال‌شدن سیگنال‌های MAPK عمل می‌کند و تنظیم‌کننده اصلی مهاجرت انواع مختلف سلول است (He et al., ۲۰۱۲). سیگنال مرگ سلولی ناشی از فعال‌سازی (AICD) را القا می‌کند و با تشویق به تمایز سلول‌های T نابالغ به سلول‌های T تنظیمی از بیماری‌های خودایمنی جلوگیری می‌کند. Kao) (et al., ۲۰۱۸ سلول‌های T تنظیمی نقش مهمی در تمایز سلول‌های CD8+ T ساده به سلول‌های T موثر و سلول‌های T حافظه دارند، در نتیجه ایمنی را تقویت می‌کنند. تولید IL-2 توسط سلول‌های T توسط فاکتورهای رشد فیبروبلاست ۱- (FGFs) یا ۲- هدایت می‌شود که برای بهبود زخم و فرآیندهای رگ‌زایی مهم هستند .(Kang et al., 2013) IL-2 یک عامل مهم در رشد فیبروبلاست از طریق اتوفاژی یا از طریق اجزای زخم ناشی ازاندامک‌های آسیب‌دیده زخم است که هضم و تخصیص مجدد می‌یابد ((Zhu and Paul, 2008 در مرحله التهابی فرآیند بهبود زخم، سلول‌های ایمنی و ماکروفاژها و لنفوسیت‌های مختلف خارج می‌شوند. ماکروفاژها بقایای بدن را فاگوسیت کرده و از زخم در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند که سپس ماتریکس خارج سلولی (ECM) تولید می‌کنند. لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها همچنین به تولید سیتوکین‌ها کمک می‌کنند که سیستم ایمنی را در روند بهبود زخم تحریک می‌کنند. IL-2 می‌تواند توسط ماکروفاژها، سلول‌های کمکی T، لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کراتینوسیت که در روند بهبود زخم نقش دارند بیان شود (نلسون، ۱۹۹۸). بنابراین، بسیاری از سلول‌های پوست که در سیستم ایمنی نقش دارند، در ترمیم زخم به IL-2 نیاز دارند (Doersch et al, 2017).

مطالعات نشان داده‌اند که درمان با IL-2 می‌تواند قدرت پوست را در روند بهبود زخم افزایش دهد؛ (باربول و همکاران، ۱۹۸۶). مطالعه دیگری از IL-2 به شکل کرم به‌عنوان یک درمان موضعی برای زخم‌ها در بیماران دیابت نوع ۱ (DM) و بیماران دیابت نوع ۱ کاهش سطح IL-2 را تجربه کردند و باعث ایجاد فاز التهابی طولانی در روند بهبود زخم شد (چان، ۲۰۱۵). علاوه‌براین، مشخص شده است که در چندین بیماری که باعث اختلال در ترمیم زخم می‌شوند، مانند بیماری‌های مرتبط با خودایمنی مانند لوپوس اریتماتوز سیستماتیک (SLE)، کمبود IL-2 یا آسیب به سیگنالینگ گیرنده IL-2 وجود دارد (Doersch et al., ۲۰۱۷).

ترمیم زخم یک فرآیند بیولوژیکی طبیعی در بدن انسان است که هدف آن بازگرداندن عملکرد و یکپارچگی بافت آسیب‌دیده است. در این فرآیند، بهبود زخم شامل پاسخ‌های سلولی و بیوشیمیایی (شامل آنتی‌اکسیدان‌ها و سیتوکین‌ها) است که به‌صورت موضعی و سیستمیک رخ می‌دهند. IL-2 یک سیتوکین است که تولید سلول‌های T را تحریک می‌کند که نقش مهمی در بهبود زخم دارند. چندین مطالعه نشان داده‌اند که درمان با IL-2 می‌تواند قدرت پوست را در روند بهبود زخم افزایش دهد. علاوه بر التیام زخم ها، IL-2 در التیام بیماری‌های خودایمنی نیز استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

کلونینگ قطعه IL-2 از cDNA

تکثیر قطعه C-terminal cDNA پروتئین Interleukin-2

در این مطالعه تجربی، RNA کل از سلول‌های خونی انسانی با استفاده از

کیت (MNCo; Germany) NucleoSpin RNA II استخراج شد. پس از استخراج، RNA کل با DNase بدون esaNR (negortivnI, dabslraC, AC, ASU) تیمار شد تا از حذف کامل DNA ژنومی اطمینان حاصل شود. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از آنزیم معکوس ترنسکریپتاز Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)، پرایمر اولیگو dT و ۲ میکروگرم RNA کل خالص‌شده انجام شد. پرایمرهایی که برای تکثیر Interleukin-2 طراحی شدند از بانک ژن (شماره دسترسی CAA01199.1) نوکلئوتیدهای ۴۵۹-۶۱ انتخاب شدند تا بخش N-terminal حذف شود. قطعه C-terminal IL-2 با استفاده از پرایمرهای

pET- IL-2-f (5' AAT TAA GAA TTC GCA CCT ACT TCA AGT TCT AC 3')

و

-r (5' TAC CAT GAG CTC TCA AGT CAG TGT TGA GA 3') pET- IL-2

تکثیر شد.

این پرایمرها یک سایت محدودکننده EcoRI را در انتهای ۵' و یک سایت محدودکننده SacI را در انتهای ۳' آمپلی‌کون اضافه می‌کنند. برای تکثیر قطعه، از پلی‌مراز (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) زا pfx ، DNA و دستگاه PCR Mastercycler® Gradient Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany استفاده شد. مراحل تکثیر شامل مراحل زیر بود: پیش‌انکوباسیون در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه؛ ۳۰ چرخه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه؛ سپس یک مرحله انکوباسیون در ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه. پس از آن، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱.۵٪ تجزیه‌وتحلیل شده و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید تحت نور فرابنفش (UV) مشاهده شدند.

همسانه سازی قطعه C-terminal cDNA پروتئین Interleukin-2 در وکتور بیانی pET32a

محصول PCR و وکتور pET32a با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و SacI (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) هضم شدند، سپس عمل لیگاسیون انجام شد تا همسانه سازی تکمیل گردد. بیان پروتئین هیستیدین-تگ‌شده IL-2 که در pET32a کلون شده است، تحت کنترل مستقیم پروموتر T۷ و ترمیناتور ترنسکریپشن قرار دارد. ساختار وکتور بیان نوترکیب که ژن IL-2 را حمل می‌کرد (pET32a/IL-2) ، با استفاده از روش شوک حرارتی طبق دستورالعمل سازنده (User Protocol TB 009 Rev.

F 0104) به سلول‌های شایسته E. coli سویه (DE 3) BL 21 (Novagen, Madison, WI, USA) منتقل شد. توالی نوکلئوتیدی ترانس‌ژن در pET 28/bFGF با استفاده از توالی‌یابی DNA تائید شد.

انتقال وکتور حاوی ژن به باکتری و غربالگری جهت اطمینان از ورود وکتور به میزبان

با استفاده از روش کلونیگ شوک حرارتی حامل ژنی به میزبان منتقل گردید. وکتور حاوی ژن پلازمید دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد. پس از مسیر انتقال حامل ژنی، باکتری‌ها به‌منظور غربالگری و حذف باکتری‌هایی که فاقد حامل ژنی بودند به محیط کشت باکتری LB مایع و LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه شده و باکتری‌هایی که رشد نموده بودند، به‌منظور ادامه مسیر ذخیره گردید.

بیان و تخلیص IL-2 نوترکیب

pET32a/IL-2 که پروتئین His6-IL-2 را کد می‌کرد به سویه E. coli منتقل شد. غلظت‌های مختلف IPTG (۰.۱، ۰.۵ یا ۱ میلی‌مولار) و دماهای القایی (۳۰ درجه سانتی‌گراد تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد) مورد استفاده قرار گرفت. پس از القا و ۶ ساعت بیان پروتئین His6-IL-2، پروتئین‌های بیشتری را در دمای القایی ۳۰ درجه سانتیگراد در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. بهترین غلظت IPTG، ۰.۱ میلی‌مولار از نظر سطح بیان و تشکیل اینکلوژن بادی تعیین شد. IL-2 نوترکیب بیان‌شده توسط کروماتوگرافی تمایلی با ستون Ni-NTA آگارز (اسپانیا، ABT) تخلیص شد. شست‌وشوی ناخالصی‌ها توسط محلول ۲۵ میلی‌مولار ایمیدازول و جداسازی پروتئین هدف بوسیله ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول انجام گردید.

اکثر پروتئین‌های باکتریایی آلاینده در طی مسیر و مراحل شست‌وشو حذف شدند. میزان جداسازی پروتئین‌های متصل‌شده با شستن بیشتر رزین یا با افزایش غلظت ایمیدازول افزایش پیدا نکرد. پروتئین نوترکیب IL-2 (تقریباً ۳۷ کیلو دالتون) در فراکسیون‌های ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول به‌دست آمد.

شناسایی پروتین IL-2 تخلیص‌شده

پروتئین‌های IL-2 خالص‌شده با ژل SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ تایید شد. نتایج نشان داد که پروتئین‌های ما با IL-2 مطابقت دارند.

ژل SDS-PAGE

SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید الکتروفورز ژل) برای بررسی تولید و شناسایی ساختار پروتئین استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی پس از مخلوط‌شدن با بافر نمونه (در هر دو شرایط احیاشده و احیانشده)، دناتوره‌شدن در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و بارگذاری روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد آماده شدند. الکتروفورز در ولتاژ ۱۲۰ ولت انجام

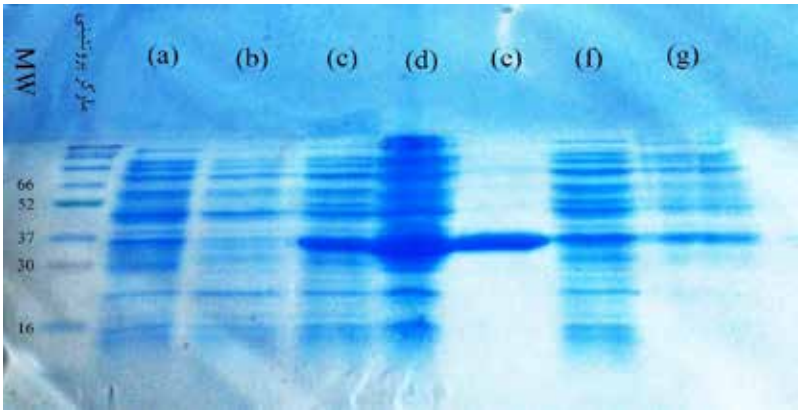
شد تا زمانی که قسمت جلویی رنگ به انتهای ژل برسد و سپس رنگ‌آمیزی Coomassie Brilliant Blue G250 انجـــام گردید. نتایج نشـــان دهنده تولید IL-2 (شکل ۱) و تشکیل یک ساختار مونومر (شکل ۲) است.

وسترن‌بلاتینگ

به‌عنوان آنتی بادی اولیه ضد His Tag (Cat#: 652501 Biolegend Inc، ایالات متحده آمریکا) برای انجام آنالیز وســـترن‌بلات استفاده شد. آنتی‌بادی ثانویه (HRP) از نوع IgG ضدموش از بز (cat#:DB9571, DNABiotech Inc., IR IRAN) مورد اســـتفاده قرار گرفت. آنتی بـــادی Anti-His Tag با رقـــت ۱:۱۰۰۰ و آنتی‌بـــادی ثانویه با رقت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد. (CMG, IRI) غشای انتقال فلوراید پلی‌وینیلیدین (PVDF) از شرکت Roche (Life Science, USA) خریداری شد.

تعیین غلظت IL-2 نوترکیب تخلیص‌شده

غلظت IL-2 نوترکیب تخلیص‌شـــده توسط آزمون سنجش برادفورد با BSA به‌عنوان اســـتاندارد بررسی و برابر با ۸/۰۱ میلی‌گرم IL-2 به‌ازای



شـــکل ۱. ژل SDS-PAGE از IL-۲ نوترکیب تولیدشده: (a) پروتئوم باکتریایی فاقد وکتور و القاشده با IPTG (b) پروتئوم باکتریایی قبل از القا توسط IPTG (c) پروتئین‌های محلول پس‌از القاء و IPTG (d) پروتئین‌های رسوب‌شـــده در پلیت پس از حل‌شدن مجدد توسط اوره (e) پروتئین‌های خالص شده با کروماتگرافی تمایلی توسط ستون Ni-NTA آگاروز (f) پروتئین‌های اضافی عبوریافته از ستون Ni-NTA آگاروز Ni-NTA (g) پروتئین‌های محیط کشت باکتری

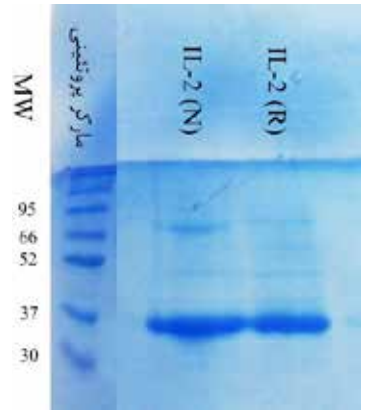
هر لیتر کشت باکتریایی محاسبه گردید.

بررسی فعالیت زیستی IL-2 نوترکیب تولیدشده بر سلول‌های فیبروبلاستی NIH-3T3

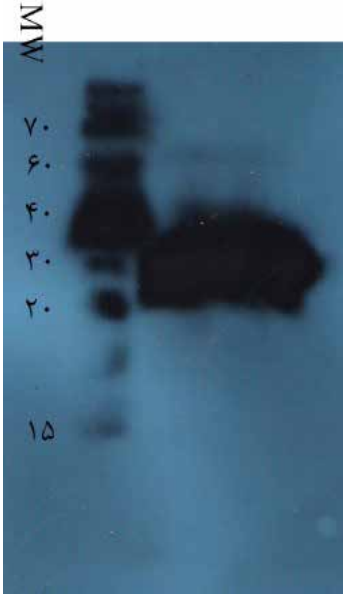
برای بررسی عملکرد محصول IL-2 خود، آن را روی کشت NIH-3T3 که رده‌های سلولی فیبروبلاست مانند مشتق‌شده از موش NIH Swiss هستند، اعمال کردیم و منحنی رشد آن با استفاده از بررسی تعداد سلول‌ها به کمک تســـت MTT در زمان ۲۴ ساعت ترسیم شد. در این آزمایش رشد سلول‌ها درحضور غلظت‌هـــای ۴.۰۶، ۸.۱۲، ۱۶.۲۵، ۳۲/۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در چاه غلظت IL-2 نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج منحنی رشد روبه‌افزایش، متناسب با افزایش غلظت فاکتور رشد را نشان داد (شکل ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

اینترلوکین۲-، سیتوکینی که گسترش سلول‌های T و توسعه فنوتیپی را هدایـــت می‌کند، نقش مهمی در بهبود زخم ایفا می‌کند. بهترین نقش مطالعه‌شـــده برای اینترلوکین-۲ در تأثیرگذاری بر رشـــد سلول‌های T است. با این‌حال، انواع سلول‌های دیگر، از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های پوســـتی که وظیفه ترمیم زخم را به‌عهده دارنـــد، گیرنده اینترلوکین-۲ را بیان می‌کنند و بنابراین ممکن اســـت به اینترلوکین-۲ پاســـخ دهند. مطالعات نشـــان داده‌اند کـــه درمان با اینترلوکین-۲ می‌تواند اســـتحکام پوست بهبود یافته را بهبود بخشـــد، که که بیانگر نقش اینترلوکین-۲ را در روند بهبود زخم می‌باشد. علاوه بر این، بیماری‌هایی که شامل اختلال در ترمیم زخم می‌شـــوند، مانند دیابت و لوپوس اریتماتوز سیستمیک، با کمبود اینترلوکین-۲ یا نقص در ســـیگنال دهـــی گیرنده اینترلوکین-۲ مرتبط می‌باشـــند. اینترلوکین-۲ همچنین یـــک ابزار مهم با رویکردهای



شـــکل ۲. تجزیه‌وتحلیل ســـاختار پروتئین با استفاده از SDS-PAGE: (N)IL-۲ پروتئیـــن به‌شـــکل احیانشـــده آن (R)IL-۲ پروتئین پس از احیا در شـــکل کاهش‌نیافته، یک بانـــد پروتئین درحـــدود ۶۶ کیلودالتون تشـــخیص داده شـــد، درحالی‌که در شکل کاهش‌یافته، نوار تقریباً ۳۷ کیلودالتون یافت شد.



شـــکل ۳. آنالیـــز IL-۲ نوترکیب با اســـتفاده از وســـترن بلات (به‌ترتیب از چپ بـــه راســـت مارکـــر، نمونه اینترلوکیـــن ۲ درحالـــت احیـــا)



شکل ۴. نمودار استاندارد تست براد فورت



شکل ۵. منحنی رشد سلول های NIH ۳T۳ در حضور IL-۲

تعدیل‌کننـــده و به‌عنوان درمان‌هـــای بالقوه مورد اســـتفاده در مطالعات پروتئومیک و بیودارویی است. این پژوهش به‌منظور تولید اینترلوکین-۲ نوترکیب در یک سیستم بیان میکروبی طراحی گردید. در این پژوهش پس از طراحی حامل ژنی مناسب برای ژن IL-2، این حامل به باکتری میزبان منتقل شـــد و پس از تنظیم مسیر بیانی مناسب (باتوجه به میزبان مورد استفاده و حامل ژنی)، میزان ۸/۱۰ میلی‌گرم IL-2 به‌ازای هر لیتر کشت باکتریایی در ارلن تخلیص گردید. سپس فعالیت زیستی IL-2 تخلیص‌شده به‌روش رسم منحنی رشـــد سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی زیست‌سنجی نشـــان‌دهنده فعالیت برای این پروتئین می‌باشد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده فناوری‌های زخم و ترمیم بافت یارا، ســـازمان جهاد دانشگاه علوم پزشـــکی تهران انجام شد. در این مقاله تضاد منافع وجود ندارد.

References:

1. Susanto, W. and S. J. Suprapto (2022). "Perawatan luka pada kulit kronis." PT Global Eksekutif Teknologi: 38-39.
2. Sarsenova, M., et al. (2022). "Recent advances to enhance the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells." Frontiers in Immunology 13: 1010399.
3. Velnar, T., et al. (2009). "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms." Journal of international medical research 37(5): 1528-1542.
4. Doersch, K. M., et al. (2017). "The contribution of interleukin-2 to effective wound healing." Experimental biology and medicine 242(4): 384-396.
5. Arenas-Ramirez, N., et al. (2015). "Interleukin-2: biology, design and application." Trends in immunology 36(12): 763-777.
6. Kao, A. M., et al. (2018). "Prevention and treatment strategies for mesh infection in abdominal wall reconstruction." Plastic and reconstructive surgery 142(3S): 149S-155S.
7. Kang, R., et al. (2013). "Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth." Experimental cell research 319(4): 556-565.
8. Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood, The Journal of the American Society of Hematology 112(5): 1557-1569.
9. Barbul, A., et al. (1986). "Interleukin 2 enhances wound healing in rats." Journal of Surgical Research 40(4): 315-319.
10. He, M., et al. (2012). "Breviscapine inhibits high glucose-induced proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells of rats via suppressing the ERK1/2 MAPK signaling pathway." Acta Pharmacologica Sinica 33(5): 606-614.