Original Paper

Isolation and culture of interfollicular epidermal stem cells from newborn mouse skin without feeder layer

Sheikhani N (BSc)[1], Haji Ghasem Kashani M (PhD)*[2], Ghorbanian MT (PhD)[2]

[1]MSc Student in Developmental Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Epidermis is the outer layer of skin, regenerating continuously. Epidermal stem cells play important roles in tissue regeneration, scar regeneration and neoplasm formation.This study was displayed for the isolation and culture of interfollicular epidermal stem cells from newborn mouse skin without feeder layer.

Materials and Methods: This experimental study was displayed on 0-3 old-day newborn NMRI mouse skin 60-70 gr weight. The epidermal keratinocytes were separated mechanically and enzymatically from 0-3 old day newborn mice skin (NMRI strain) and seeded on fibronectin-collagen culture substrates. Putative epidermal stem cells were selected by rapid adherence for 10 minutes on this composite matrix of type 1 collagen and fibronectin and the unattached cells were discarded and attached cells were cultured in essential minimal eagle medium (EMEM) (ca+2-free culture medium containing 0.05 mM Ca+2, 9% FBS, 50% conditioned medium, EGF (epidermal growth factor) and Cholera Toxin. The immunocytochemistry of β1-integrin analysis used to indicate their stemness nature.

Results: The results indicated that rapid adherence yields 50% purity. By using this method, the stem cells have been subcultured continuously without any change in the cell properties. The isolated interfollicular epidermal stem cells, expressed epidermal stem cells special marker (β1-integrin) in high levels, which indicates stem cell nature.

Conclusion: This new method yields pure viable epidermal stem cells that can be used in regenerative medicine and cell therapy.

Keywords: Interfollicular epidermal stem cells, Feeder layer, β1-integrin, Keratinocyte

*** Corresponding Author: Haji Ghasem Kashani (PhD), E-mail: kashani_tmu@yahoo.com**

Received 26 Oct 2011 **Revised** 28 Jan 2012 **Accepted** 3 Mar 2012

This paper should be cited as: Sheikhani N, Haji Ghasem Kashani M, Ghorbanian MT. [Isolation and culture of interfollicular epidermal stem cells from newborn mouse skin without feeder layer]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 14(4):31-38. [Article in Persian]

تحقیقی

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد تازه متولد شده موش بدون استفاده از لایه مغذی

ناهید شیخانی[۱]، دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی*[۲]، دکتر محمدتقی قربانیان[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی - تکوینی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان.

۲- استادیار گروه سلولی و مولکولی ، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی ، دانشگاه دامغان.

چکیده

زمینه و هدف : *اپی‌درم لایه خارجی پوست بدن است که به‌طور مداوم تجدید می‌شود. سلول‌های بنیادی اپی‌درمی نقش مهمی در ترمیم بافتی، ترمیم زخم و شکل‌گیری نئوپلاسم به‌عهده دارند. این مطالعه به منظور جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد موش بدون استفاده از لایه مغذی انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ٤ سر موش نژاد NMRI تازه متولد شده صفر تا سه روزه و وزن تقریبی ۷۰-٦۰ گرم انجام شد. کراتینوسیت‌های اپی‌درم به‌صورت مکانیکی و آنزیمی از پوست موش‌ها جدا و روی سوبسترای کشت فیبرونکتین- کلاژن ۱ گسترده شدند. سلول‌های بنیادی اپی‌درمی مفروض به‌وسیله اتصال سریع در بازه زمانی ۱۰ دقیقه روی این ماتریکس مرکب از فیبرونکتین- کلاژن انتخاب گشتند. سلول‌های نچسبیده دور ریخته شدند و سلول‌های چسبیده در محیط کشت EMEM (فاقد کلسیم) شامل ۰/۰۵ میلی‌مولار کلسیم، سرم جنین گاوی ۹ درصد، محیط کشت ثانویه ۵۰ درصد، فاکتور رشد اپی‌درمی و کلراتوکسین کشت داده شدند. از آنالیز ایمونوسیتوشیمی بتا۱- اینتگرین برای تشخیص بنیادی بودن سلول‌ها استفاده شد.*

یافته‌ها : *نتایج نشان داد که اتصال سریع سلول‌ها باعث خلوص ۵۰ درصد می‌شود. با استفاده از این روش، سلول‌های بنیادی بدون تغییر در ویژگی‌های سلولی رشد می‌کنند. سلول‌های بنیادی اپی‌درمی جدا شده، مارکر ویژه این سلول‌ها، بتا۱- اینتگرین را بیان کردند که هویت بنیادی بودن آنها را نشان داد.*

نتیجه‌گیری : *نتایج این مطالعه نشان داد که حاصل جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد موش بدون استفاده از لایه مغذی، سلول‌های بنیادی اپی‌درمی زنده‌ای است که می‌تواند در سلول درمانی و پزشکی ترمیمی به‌کار رود.*

کلید واژه‌ها : *سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی ، لایه مغذی ، بتا۱- اینتگرین ، کراتینوسیت*

* نویسنده مسؤول : دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی ، پست الکترونیکی kashani_tmu@yahoo.com

نشانی : دامغان، جاده چشمه علی، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی ، کد پستی ۳۶۷۱۶۴۱۱۶۷

تلفن ۵۲۴۷۱۴۶-۰۲۳۲ ، نمابر ۵۲۴۷۱۴۶

وصول مقاله : ۹۰/۸/۴ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۱۱/۸ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۱۲/۱۳

مقدمه

اپی‌درم خارجی‌ترین لایه پوست در بدن است که در تماس مستقیم با محیط خارج است. این بافت به‌طور مداوم در حال تجدید است و شامل کراتینوسیت‌هایی است که درجات متفاوتی از تمایز را نشان می‌دهند (۱و۲). درون اپی درم، تکثیر در کراتینوسیت‌های لایه قاعده‌ای اتفاق می‌افتد که در تماس با غشای پایه می‌باشند. سلول‌ها به‌دنبال تمایز نهایی به سطح پوست مهاجرت می‌کنند و در نهایت به عنوان سلول‌هایی مرده از سطح پوست، ریزش می‌یابند (۳). سه زیرجمعیت از کراتینوسیت‌های قاعده‌ای، توسط آنالیز کینتیک سلولی تعریف می‌شوند (۴). سلول‌های بنیادی، سلول‌های تقسیم شونده گذرا و سلول‌های متعهد سلول‌های بنیادی اپی‌درمی، زیرجمعیت نسبتاً کوچکی از سلول‌های خاموش با سیکل سلولی آهسته هستند (۵) که توسط ویژگی خودتجدیدی، بیان بالای بتا ۱- اینتگرین و اتصال سریع به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی تشخیص داده می‌شوند (۶).

همچنین سلول‌های بنیادی اپی‌درمی نقش مهمی در ترمیم بافتی، ترمیم زخم و شکل‌گیری نئوپلاسم برعهده دارند (۷). این سلول‌ها بین ۱۰-۱ درصد از سلول‌های لایه قاعده‌ای را تشکیل می‌دهند که به روش مورد استفاده بستگی دارد (۸). اعتقاد بر این است که سلول‌های بنیادی اپی‌درمی به‌طور نامتقارن تقسیم می‌شوند تا یک

سلول بنیادی جدید و یک سلول تقسیم شونده گذرا به‌وجود آید (۹). سلول‌های تقسیم شونده گذرا، پس از تعداد محدودی تقسیمات سلولی متحمل تمایز نهایی می‌شوند. آنها سطوح پایین‌تری از بتا ۱- اینتگرین را بیان می‌کنند و آهسته‌تر به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شوند (۱۰). کراتینوسیت‌های انسانی کشت شده و سلول‌های بنیادی اپی‌درمی را می‌توان به‌عنوان یک پوشش بیولوژیکی در جراحات ناشی از سوختگی‌ها، زخم‌های شدید، تومورها، سایر بیماری‌های پوستی و سلول درمانی مورد استفاده قرار داد. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی اپی‌درمی به عنوان یک هدف در ژن درمانی و تست دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱). با این وجود، جداسازی و تشخیص این سلول‌ها همچنان چالشی در بیولوژی سلولی و پزشکی است و علت آن عدم وجود مارکرهای ویژه این سلول‌هاست (۱۲و۱۳). یکی از بهترین مارکرهای مطالعه شده برای این سلول‌ها، خانواده اینتگرین‌ها هستند که مسؤول اتصال سلول‌های قاعده‌ای به غشای پایه می‌باشند. بیان بتا ۱-اینتگرین برای تمایز بین سلول‌های بنیادی و سایر کراتینوسیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱و۱۴).

با این وجود، عمده سلول‌های لایه قاعده‌ای در اپی‌درم، بتا ۱-اینتگرین را بیان می‌کنند. لذا روش جدیدی برای جداسازی آنها لازم است. تلاش‌ها با استفاده از رنگ‌های متابولیک مانند رودامین ۱۲۳ برای تفکیک سلول‌های بنیادی از سایر سلول‌ها می‌تواند مفید باشد (۱۵). سلول‌های بنیادی اپی‌درمی همچنین با استفاده از اندازه کوچک و گرانولیتی پایین با استفاده از متغیرهای نوری فلوسیتومتر قابل تشخیص هستند (۱۲). سلول‌های بنیادی اپی‌درمی موش می‌توانند دودمان‌های سلولی متعددی را طی تکوین تولید کنند (۱۶).

این مطالعه به منظور جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد موش بدون استفاده از لایه مغذی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴ سر موش نژاد NMRI تازه متولد شده صفر تا سه روزه و وزن تقریبی ۷۰-۶۰ گرم خریداری شده از مؤسسه رازی کرج، در آزمایشگاه کشت بافت و سلول پژوهشکده علوم زیستی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

پروتکل اصول کار روی حیوانات رعایت گردید. موش‌ها برای سازگاری با شرایط محیط، به مدت ده‌روز در شرایط استاندارد از نظر دما، رطوبت، تغذیه و نور (۱۲ ساعت روشنائی- ۱۲ ساعت تاریکی) در حیوانخانه نگهداری شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی کراتینوسیتی

موش‌ها با استفاده از دی‌اکسیدکربن قربانی شدند. برای شروع کار، به پوست سه موش نیاز بود. ابتدا پوست شکم را به صورت یک تکه جدا کردیم و به زیر هود لامینار منتقل نمودیم. سپس بافت چربی زیرپوستی را به دقت و آرامی تراش دادیم. کراتینوسیت‌های قاعده‌ای پس از هضم با تریپسین ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۰۲ درصد به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شده و روی کلاژن ۱ (sigma, cat.no:c7661, 30µg/ml) و فیبرونکتین (Sigma, F4759, 10µg/ml) گسترده شدند. سلول‌هایی که نچسبیدند؛ دور ریخته شدند و سلول‌های چسبیده کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها از EMEM ۵۰ درصد (ca+2-free culture medium Biowittaker Inc, walkersville, MD, cat no:06-1746)، ۵۰درصد محیط کشت ثانویه، ۰/۰۵ میلی‌مولار کلسیم (از استوک ۱ مولار)، chelex-FBS ۹ درصد (sigma cat.no: c7901-fetal bovine serum from perchased Gibco cat.no: 10270-106)، 1×10^{-10} M کلسترا توکسین (Sigma cat.no: c8052) و EGF ۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر (Sigma, cat.no: e4127) تشکیل شد.

سلول‌ها در شرایط دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محیط کشت هر سه روز یک‌بار تعویض شد. پس از رسیدن به تراکم ۸۰درصد با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد و 1Mm EDTA به مدت ۵ دقیقه، سلول‌ها پاساژ داده شدند (۱۷و۱۸).

جداسازی و کشت فیبروبلاست‌ها برای تهیه محیط کشت ثانویه با استفاده از روش کشت بافت

پس از برداشتن بافت چربی از قطعات پوستی، آن‌ها را روی پلیت‌های mm ۶۰ قرار دادیم که شامل ۴میلی‌لیتر محیط رشد فیبروبلاست DMEM (Gibco cat.no: 31600-083)، FBS ۱۰درصد و 4-(2-Hydroxyethyl)-1- (HEPES) 25mM piperazineethanesulfonic acid (Gibco cat.no: 15630-050) بود. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار داده شدند. به فیبروبلاست‌ها اجازه داده شد تا در شرایط کشت طبیعی به تراکم ۶۰ درصد برسند. محیط کشت ثانویه پس از دو روز جمع‌آوری گردید و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فیبروبلاست‌ها در محیط رشد طبیعی خود به مدت دو روز کشت داده شدند تا قبل از جمع‌آوری مجدد محیط کشت ثانویه، سلول‌ها خود را بازیابی کنند. قبل از استفاده، محیط کشت ثانویه به مدت یک شبانه روز در دمای ۴درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در ۵۰۰۰g به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و در دمای ۴درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر گردید (۱۷و۱۸).

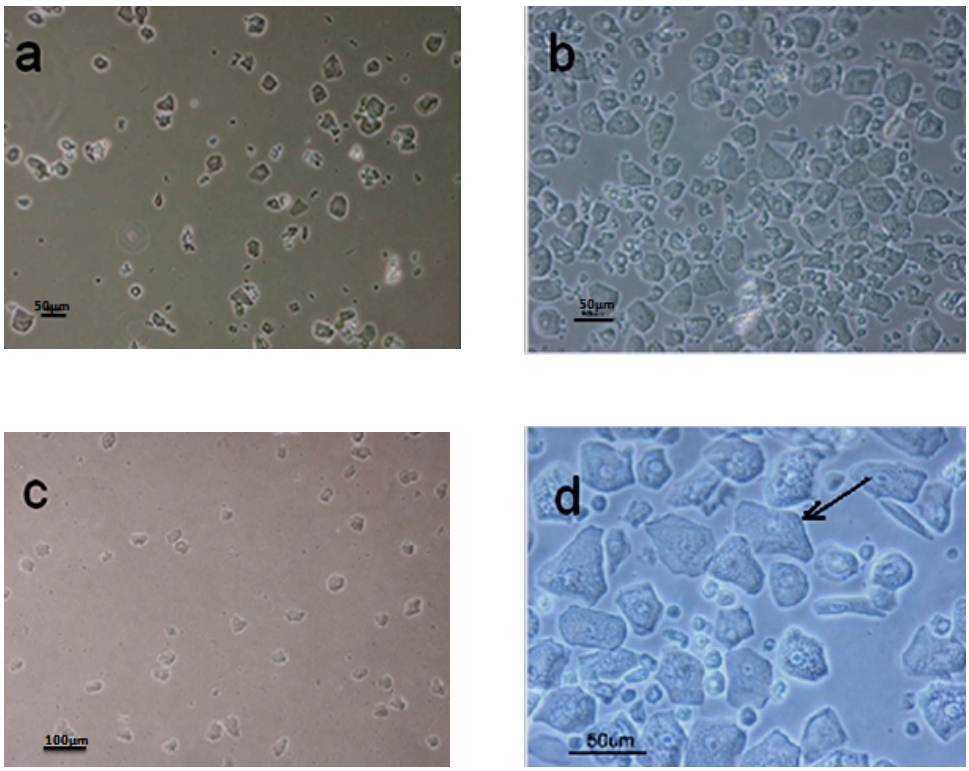
مطالعات بافت‌شناختی و ایمونوهیستوشیمی

کراتینوسیت‌های کشت داده شده روی coverslip با PBS شستشو داده شده و در پارافرمالدهید۴ درصد در PBS به مدت ۵ دقیقه فیکس شدند. سپس به منظور نفوذپذیرکردن سلول‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در معرض محلول Triton X-100 ۰/۳ درصد قرار داده شدند. به‌دنبال سه بار شستشو با PBS، سلول‌ها با سرم طبیعی ۱۰ درصد بز (Sigma, cat no. G9023) در PBS به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند تا پیوندهای غیراختصاصی بلوکه گردید. سپس سلول‌ها به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی اولیه بتا ۱- اینتگرین (P5D2, Abcam,cat.no: ab24693, cambridge, England) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رقت ۱/۱۰۰۰ در PBS انکوبه شدند. Coverslipها سه بار با PBS شسته شند و با آنتی‌بادی ثانویه FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, cat.no: f9137) به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند (۱۸). برای تهیه بخش‌های کنترل مثبت، قطعات پوستی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و DAPI مورد پردازش قرار گرفتند. برای تشخیص سلول‌های بنیادی اپی‌درمی مفروض بیان بتا ۱- اینتگرین با استفاده از آنالیز ایمونوسیتوشیمی با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (Nikon) مدل E600 ساخت کشور ژاپن مورد بررسی قرار گرفت.

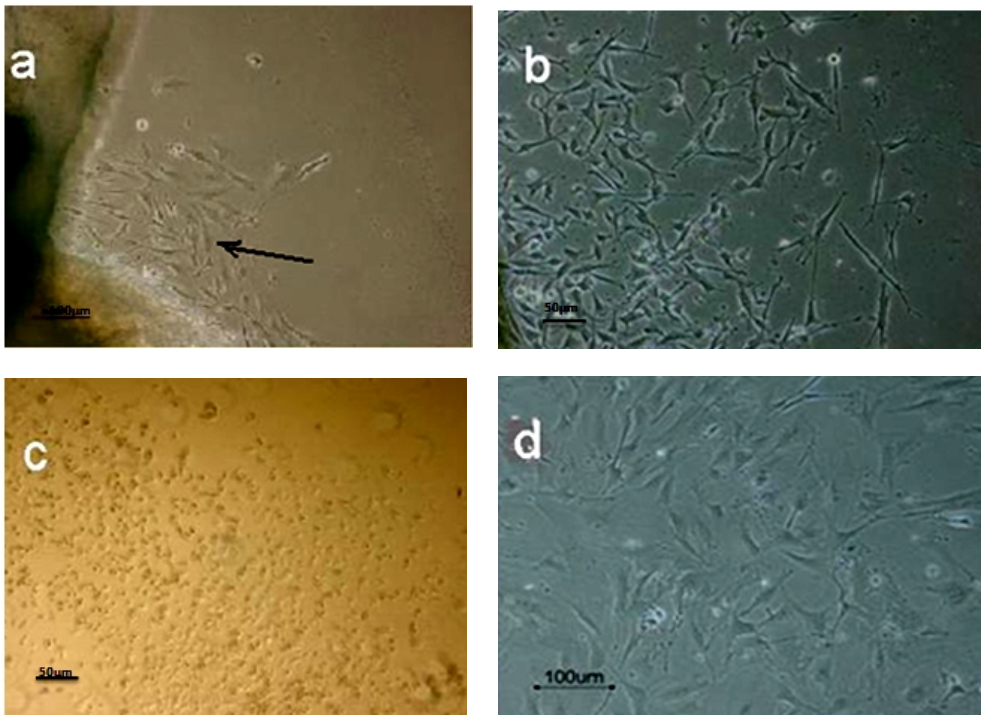
یافته‌ها

کراتینوسیت‌های اپی‌درم به صورت آنزیمی از پوست نوزاد موش‌ها جدا گردید. سلول‌های بنیادی مفروض به وسیله اتصال سریع به ماتریکس مرکب ازکلاژن ۱ و فیبرونکتین انتخاب شدند و در شرایط دی اکسیدکربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سلول‌های سریع چسبنده با تمایز کمتر از سایر سلول‌ها تفکیک شدند و سلول‌های سریع چسبنده در محیط طبیعی رشد نمودند (شکل یک a). سلول‌ها در روزهای اول رشد آهسته‌ای داشتند. سلول‌ها در تراکم ۸۰-۷۰ درصد پاساژ داده شدند (شکل یک b). با پاساژهای متوالی، سلول‌ها با شدت بیشتری رشد نمودند (شکل یکc). مورفولوژی سلول‌های بنیادی اپی‌درم مکعبی تا شش وجهی بود (شکل یک d). میزان اتصال سلول‌ها با گذشت زمان افزایش یافت.

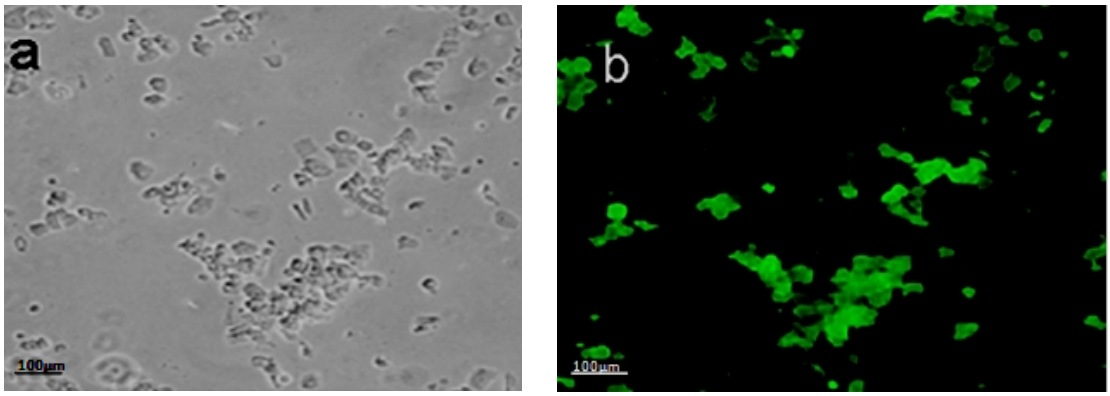
۲ الی ۳ روز پس از آغاز کشت فیبروبلاست‌ها، یک تک لایه از فیبروبلاست‌ها با مورفولوژی دوکی شکل در اطراف بافت ظاهر شد (شکل ۲ a,b). پس از کشت به مدت یک هفته، فیبروبلاست‌ها به تراکم ۸۰ درصد رسیدند (شکل ۲ c). فیبروبلاست‌ها از پلیت به فلاسک منتقل شدند (شکل ۲ d). از فیبروبلاست‌ها در پاساژ ۵-۳ برای جمع‌آوری محیط کشت ثانویه استفاده شد؛ سپس فلاسک‌ها دور انداخته شدند.



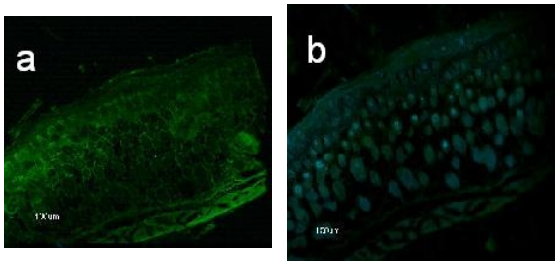
شکل ۱ : جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم
(a) سلول‌های بنیادی اپی‌درمی چسبیده روی پلیت‌های پوشیده با کلاژن ۱- فیبرونکتینپس از بازه زمانی ۱۰ دقیقه (۱۰×)
(b) سلول‌های بنیادی اپی‌درمی پس از ۷ روز از کشت (۲۰×). (c) سلول‌های بنیادی اپی‌درمی در پاساژ اول (۱۰×). (d) مورفولوژی مکعبی شکل سلول‌های بنیادی اپی‌درمی (فلش) (۴۰×)



شکل ۲ : کشت بافت اولیه فیبروبلاست‌های پوست موش تازه متولد
(a) فیبروبلاست‌های کشت داده شده در اطراف بافت (فلش) (۱۰×). (b) مورفولوژی دوکی شکل فیبروبلاست‌ها (۱۰×). (c) انتقال فیبروبلاست‌ها از پلیت به فلاسک (۱۰×). (d) فیبروبلاست‌ها در پاساژ سوم (۱۰×)



شکل ۳ : تشخیص سلول‌های بنیادی اپی‌درمی
(a) مورفولوژی سلول‌های بنیادی اپی‌درمی مفروض از پوست موش تازه متولد (۱۰×)
(b) بیان مارکر بتا ۱ اینتگرین در تصویر ایمونوفلوروسنت از سلول‌های بنیادی (۱۰×)



شکل ۴ : قطعات پوستی به عنوان کنترل مثبت از اپی‌درم
(a) رنگ‌آمیزی بتا ۱ اینتگرین (۱۰×)
(b) رنگ‌آمیزی بتا ۱ اینتگرین با DAPI (۱۰×)

سلول‌های بنیادی بتا ۱- اینتگرین مثبت، با میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شدند (شکل ۳).

بیان بتا ۱ اینتگرین در قطعات پوستی با ضخامت ۵ میکرون به عنوان کنترل مثبت با استفاده از DAPI انجام شد (شکل ۴).

بحث

در این مطالعه جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد موش بدون استفاده از لایه مغذی انجام شد ومیزان عوامل رشد به حداقل رسید.

تلاش‌های متعددی برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی درم از پوست انسان و موش صورت گرفته است (۱۹) که منجر به درک بهتری از عوامل مولکولی، مسیرهای سیگنال و وقایع سلولی می‌شود که جداسازی و تشخیص سلول‌های بنیادی را ممکن می‌سازد (۲۰). در سال ۱۹۷۴ برای جداسازی سریع و ممتد این سلول‌ها، از پوست موش بالغ از نوع ویژه‌ای از دستگاه تریپسینه کننده استفاده شد و تعداد سلول‌های به‌دست آمده با استفاده از این روش $۳-۶\times۱۰^{۶}$ سلول اپی‌درم در هر ۳۰ سانتی‌متر مکعب از پوست جدا شده بود. بیش از ۸۰درصد سلول‌ها زنده بودند؛ اما تنها تا ۲ ماه قابلیت زنده بودن خود را حفظ کردند (۲۱). تلاش‌های اخیر در راستای جداسازی این سلول‌ها به روش کشت بافت انجام شده است که در این روش احتمال آلودگی به سلول‌های غیرکراتینوسیتی وجود دارد (۲۴-۲۲). پس از آن سلول‌ها به صورت تک‌لایه کشت داده شدند (۲۹-۲۱). این مطالعات نشان دادند که کشت‌ها دارای رشد محدودی هستند و پاساژ آنها با مشکل روبروست. پهن‌کردن سلول‌ها روی پلیت‌های پوشیده شده از کلاژن (۳۰) و یا کاهش pH محیط رشد (۳۱)، رشد محدود سلول‌ها را بهبود بخشیده است. کشفیات Rheinwald و Green (۳۲) منجر به موفقیت مطالعات روی کراتینوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی شد. آنها نشان دادند که لایه مغذی از سلول‌های مزانشیمی ۳T۳ باعث رشد کلونال کراتینوسیت‌ها می شود و نه سلولی دیگر. این نتیجه منجر به تکوین محیط کشت‌های فاقد سرم شد که در آن کراتینوسیت‌ها می‌توانند بدون لایه مغذی رشد کنند (۳۵-۳۳) و باعث خلوص جزیی یک عامل رشد کراتینوسیتی از هیپوتالاموس (۳۶)، خلوص (۳۷) و کلونینگ (۳۸) دیگر دودمان‌های سلولی فیبروبلاستی می‌شود (۱۹). اما Hakkinen و همکارانش (۱۷)، Ikuta و همکاران (۳۹) و Reiisi و همکاران (۱۸) توانستند این سلول‌ها را بدون استفاده از لایه مغذی و با استفاده از عوامل رشد محدود جداسازی کرده و کشت دهند. امروزه کشت سلول، برگرفته از استوک‌های فریز شده حداقل تا ۱۰ پاساژ با استفاده از لایه مغذی و عوامل رشد متعدد امکان‌پذیر است. بیشترین تعداد پاساژها ۲۶ مرتبه در دودمان کراتینوسیتی و از موش wild type است (۴۰). Hager و همکاران پاساژ سلول‌های بنیادی کراتینوسیتی را تا ۱۹ پاساژ گزارش کردند (۴۰).

یکی از مزایای پروتکل شرح داده شده در مقایسه با روش‌های قبلی (۴۱) آن است که در این روش کشت کراتینوسیت‌ها نیاز به لایه مغذی و عوامل رشد متعدد ندارد (۴۲) و ساده‌تر و تکامل‌یافته‌تر از سایر روش‌هاست (۱۴و۴۰). در مطالعه Jones و همکاران (۴۳) برای پیشبرد رشد کراتینوسیت‌ها از یک محیط کشت اختصاصی که شامل EGF، کلراتوکسین، محیط کشت ثانویه و غلظت اندک کلسیم بود؛ استفاده شد. برای اتصال و کشت کراتینوسیت‌ها، از یک ماتریکس مرکب از کلاژن ۱ و فیبرونکتین استفاده شد. سلول‌های بنیادی اپی‌درم سطوح بالاتری از گیرنده بتا ۱- اینتگرین را نسبت به سایر سلول‌ها بیان کردند که این امر می‌تواند هم برای تعیین جایگاه سلول‌های بنیادی درون اپی درم و هم برای جداسازی مستقیم آنها از بافت مورد استفاده قرار گیرد (۴۳). ماتریکس کلاژنی اتصال سریع سلول‌ها را حمایت کرد و باعث اتصال اولیه سلول‌های بنیادی نسبت به سایر سلول‌ها به پلیت گردید (۴۳). مشابه با پروسه بهبود زخم، بیان گیرنده‌های فیبرونکتینی (α5β1[45] and αlβ6 [42,10] integrins) وقتی کراتینوسیت‌ها در کشت قرار می‌گیرند؛ القا می‌شود (۶و۴۴). لذا در حالی که ماتریکس کلاژنی اتصال اولیه سلول‌ها را سبب می‌شود؛ فیبرونکتین، پس از اتصال اولیه تکثیر سلول‌ها را به پیش می‌برد (۴۰و۴۱). در مطالعه حاضر نیز از کلاژن ۱ و فیبرونکتین استفاده گردید. در این مطالعه، سلول‌ها مورفولوژی ویژه کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها را نشان دادند که این مورفولوژی طی پاساژها تغییر نکرد. برای تایید هویت سلول‌های بنیادی اپی‌درمی از آنالیز ایمونوسیتوشیمی بتا ۱- اینتگرین استفاده شد. به‌طوری که سلول‌های بنیادی اپی‌درمی سطوح بالایی از این رسپتور را بیان کردند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که حاصل جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اپی‌درم بین فولیکولی پوست نوزاد موش بدون استفاده از لایه مغذی، سلول‌های بنیادی اپی‌درمی زنده‌ای است که می‌تواند در سلول درمانی و پزشکی ترمیمی به‌کار رود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه خانم ناهید شیخانی برای اخذ کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی – تکوینی از دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان بود و با حمایت مالی دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان انجام شد. بدین‌وسیله از آقای دکتر تقی لشکر بلوکی به خاطر حمایت علمی در انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References

1. Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar;95(7):3902-7.

2. Watt FM. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. J Dermatol Sci. 2002 Apr;28(3):173-80.

3. Watt FM. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. Curr Opin Cell Biol. 1989 Dec;1(6):1107-15.

4. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. J Cell Sci Suppl. 1988;10:45-62.

5. Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2005 Jul;19(4):405-13.

6. Huang X, Wu J, Spong S, Sheppard D. The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. J Cell Sci. 1998 Aug; 111 (Pt 15):2189-95.

7. Rebecca J. Morris. Keratinocyte stem cells: targets for cutaneous carcinogens. J Clin Invest. 2000 Jul; 106(1): 3-8.

8. Morris RJ, Potten CS. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. Cell Prolif. 1994 May;27(5):279-89.

9. Koster MI, Roop DR. Asymmetric cell division in skin development: a new look at an old observation. Dev Cell. 2005 Oct; 9(4):444-6.

10. Häkkinen L, Hildebrand HC, Berndt A, Kosmehl H, Larjava H. Immunolocalization of tenascin-C, alpha9 integrin subunit, and alphavbeta6 integrin during wound healing in human oral mucosa. J Histochem Cytochem. 2000 Jul;48(7):985-98.

11. Bannasch H, Föhn M, Unterberg T, Bach AD, Weyand B, Stark GB. Skin tissue engineering. Clin Plast Surg. 2003 Oct; 30(4):573-9.

12. Zhou JX, Chen ShY, Liu WM, Cao YJ, Duan EK. Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells. Hum. Reprod. 2004;19(4):968-74.

13. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. Stem Cells. 2003; 21(4):481-94.

14. Henning H. Mouse epidermal keratinocytes. Primary culture of keratinocytes from newborn mouse epidermis in medium with lowered levels of ca+2. In: Leigh IM, Watt FM (eds). Keratinocyte methods. Cambridge: University Press. 1994; pp: 21-3.

15. Yeheskely-Hayon D, Regev R, Katzir H, Eytan GD. Competition between innate multidrug resistance and intracellular binding of rhodamine dyes. FEBS J. 2009 Feb;276(3):637-48.

16. Liang L, Bickenbach JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. Stem Cells. 2002; 20(1):21-31.

17. Häkkinen L, Koivisto L, Larjava H. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. Methods Cell Sci. 2001;23(4):189-96.

18. Reiisi S, Esmaeili F, Shirazi A. Isolation, culture and identification of epidermal stem cells from newborn mouse skin. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2010 Jan;46(1):54-9.

19. Parkinson EK, Yeudall WA. The Epidermis. In: Freshney RI, Freshney MG. Culture of Epithelial Cells. Chap 3. 2nd. New York: Wiley-Liss. 2002; pp: 65-94.

20. Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. Biol Cell. 2005 Mar;97(3):173-83.

21. Fusenig NE, Worst PKM. Mouse epidermal cell cultures: Isolation and cultivation of epidermal cells from adult mouse skin. J Invest Dermatol. 1974; 63:187-93.

22. Fell HB. The experimental study of keratinization in organ culture. In: Montagna W, Lobitz WC Jr (eds). The Epidermis. New York: Academic Press. 1964; pp: 61-81.

23. Prose PH, Friedman-Kien AE, Neistein S. Ultrastructural studies of organ cultures of adult human skin. In vitro growth and keratinization of epidermal cells. Lab Invest. 1967 Dec; 17(6): 693-716.

24. Flaxman BA, Lutzner MA, Van Scott EJ. Cell maturation and tissue organization in epithelial outgrowths from skin and buccal mucosa In Vitro. The Journal of Investigative Dermatology. 1967; 49:322-32.

25. Cruickshank CN, Cooper JR, Hooper C. The cultivation of cells from adult epidermis. J Invest Dermatol. 1960 May; 34:339-42.

26. Briggaman RA, Abele DC, Harris SR, Wheeler CE Jr. Preparation and characterization of a viable suspension of postembryonic human epidermal cells. J Invest Dermatol. 1967 Feb;48(2):159-68.

27. Yuspa SH, Morgan DL, Walker RJ, Bates RR. The growth of fetal mouse skin in cell culture and transplantation to F1 mice. J Invest Dermatol. 1970 Dec;55(6):379-89.

28. Karasek MA, Charlton ME. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. Invest Dermatol. 1971 Mar; 56(3):205-10.

29. Fusenig NE. Isolation and cultivation of epidermal cells from embryonic mouse skin. Naturwissenschaften. 1971 Aug;58(8):421.

30. Liu SC, Karasek M. Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. J Invest Dermatol. 1978 Aug; 71(2):157-62.

31. Eisinger M, Lee JS, Hefton JM, Darzynkiewicz Z, Chiao JW, DeHarven E. Human epidermal cell cultures: growth and differentiation in the absence of differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. PNAS. 1979 Oct; 76(10): 5340-4.

32. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 1975 Nov;6(3):331-43.

33. Maciag T, Nemore RE, Weinstein R, Gilchrest BA. An endocrine approach to the control of epidermal growth: serum-free cultivation of human keratinocytes. Science. 1981 Mar; 211(4489):1452-4.

34. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol. 1983 Jul; 81(1 Suppl):33s-40s.

35. Wille JJ Jr, Pittelkow MR, Shipley GD, Scott RE. Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. J Cell Physiol. 1984 Oct; 121(1):31-44.

36. Gilchrest BA, Marshall WL, Karassik RL, Weinstein R, Maciag T. Characterization and partial purification of keratinocyte

growth factor from the hypothalamus. J Cell Physiol. 1984 Sep; 120(3):377-83.

37. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Feb; 86(3):802-6.

38. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. Science. 1989 Aug;245(4919):752-5.

39. Ikuta S, Sekino N, Hara T, Saito Y, Chida K. Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. Biosci Biotechnol Biochem. 2006 Nov;70(11):2669-75.

40. Hager B, Bickenbach JR, Fleckman P. Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol. 1999 Jun; 112(6):971-6.

41. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. J Cell Sci. 1995 Jun;108 (Pt 6):2241-51.

42. Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. Exp Cell Res. 1998 Oct; 244(1):184-95.

43. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell. 1995 Jan;80(1):83-93.

44. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. Cell. 1993 May;73(4):713-24.