

جداسازی و کشت اولیه ملانوسیت‌های پوست انسان و مقایسه‌ی کشت با و بدون فربول‌استر

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۲

زمینه و هدف: کشت اولیه به دنبال جداسازی سلول‌ها از بافت انجام می‌گیرد. جداسازی و کشت اولیه‌ی ملانوسیت‌ها با توجه به نقش این سلول‌ها در محافظت از بدن در برابر اشعه‌های مضر خورشید، ایجاد رنگ پوست، قرینه و مو بسیار با اهمیت است. این مطالعه به منظور راه‌اندازی نحوه‌ی جداسازی، کشت و تکثیر ملانوسیت‌ها از پیش‌پوست نوزاد و پوست پلک افراد بزرگسال و مقایسه‌ی دو نوع محیط کشت ملانوسیتی انجام شده است.

روش بررسی: برای کشت ملانوسیت‌ها از نمونه‌های پیش‌پوست و پلک استفاده شد. اپیدرم از درم، جدا و مخلوط سلولی حاصل از هضم اپیدرم در محیط‌های انتخابی ملانوسیتی کشت داده شد. برای تایید ملانوسیت‌ها پس از جداسازی و کشت از تکنیک‌های ایمنوسیتوشیمی و واکنش زنجیره پلیمرز معکوس استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کشت در عدم حضور فربول‌استر از لحاظ مورفولوژی و از لحاظ چسبندگی سلولی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی ملانوسیت‌ها به مراتب مناسب‌تر است. به علاوه، در این بررسی مشخص شد که ملانوسیت‌های جدا شده از پلک افراد بزرگسال به مراتب دندریتیک‌تر از ملانوسیت‌های جدا شده از پیش‌پوست است و تعداد پاساژهای ملانوسیت‌های حاصل از پیش‌پوست بیش‌تر از ملانوسیت جدا شده از پلک می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به صورت مرسوم برای کشت ملانوسیت‌ها از فربول‌استرها استفاده می‌شود که در این مطالعه کشت در عدم حضور فربول‌استر و با استفاده از فاکتورهای رشد، بهتر و مناسب‌تر بود. به علاوه ملانوسیت‌های حاصل از بافت‌های جوان‌تر هم‌چون پیش‌پوست برای تحقیقات با توجه میزان بیش‌تر قدرت تکثیر توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پوست، اپیدرم، ملانوسیت، فربول‌استر، فاکتور رشد.

رضا یارانی^۱، کامران منصوری^۲
علی بیدمشکی‌پور^۳، مریم مهرابی^۴
علی ابراهیمی^۵، کیکاووس غلامی^۶
خیراله یاری^۷، علی مصطفایی^{۷*}

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، ۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، ۵- گروه آموزشی پوست، ۶- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، ۷- گروه ایمنونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
۱، ۲، ۴، ۵، ۶ و ۷- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

* نویسنده مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، سرخه لیزه، کدپستی: ۶۷۱۴۸۶۹۹۱۴
تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۴۷۳
E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

مقدمه

دارای چهار لایه است که از خارج به داخل عبارتند از: لایه‌ی شاخی (Stratum corneum)، لایه شفاف (Stratum lucidum)، لایه دانه‌دار (Stratum granulosum) و لایه زایا (Stratum germinativum). اپیدرم دارای چهار گروه سلول اصلی است که در این میان ملانوسیت‌ها از بقیه اهمیت بیش‌تری دارند. ملانوسیت‌ها سلول‌های تولیدکننده‌ی رنگدانه (ملانین) هستند که در لایه پایینی اپیدرم پوست، مو، چشم‌ها و لایه‌ی داخلی گوش و منتر قرار دارند.^۱ ملانوسیت‌ها از نورواکتودرم منشا می‌گیرند،^۵ به‌جز سلول‌های

پوست (Skin) وسیع‌ترین عضو بدن است و حدود ۱۶٪ کل وزن بدن را در بالغین تشکیل می‌دهد و سطح خارجی آن $1/2-2/3m^2$ است. از لحاظ بافت‌شناسی پوست از اپیدرم (Epidermis)، یک لایه اپیتلیال با منشای اکتودرمی و درم (Dermis)، یک لایه هم‌بند از منشای مزودرم تشکیل می‌شود که بر پایه مقایسه ضخامت اپیدرم در نواحی مختلف، به‌انواع ضخیم و نازک تقسیم می‌گردد.^{۱-۴} اپیدرم

Uveal tract)، ماتریکس مو، گوش (Stria vascularis)، غشای موکوسی و سیستم عصبی مرکزی (Leptomeninges) می‌باشند^{۱۲} که با توجه به سن و موقعیت آناتومیکی قرارگیری پادشده، تکثیر و پراکنش ملانوسیت‌ها متفاوت است.^{۱۳}

تولید ملانین در ملانوسیت‌ها در یک ارگانل بسیار پیشرفته متصل به غشا به نام ملانوزوم صورت می‌گیرد.^{۱۴} این سلول‌ها به‌علاوه در بسیاری از مشکلات و آسیب‌های پاتولوژیک و ناهنجاری‌ها مثل ملانوما، ویتیلیگو (Vitiligo)، آلبینسم چشمی - پوستی (Oculocutaneous albinism)، ابلقی یا دورنگی (Piebaldism)، سندرم واردنبرگ (Waardenburg) و سندرم Vogt-Koyanagi-Harada دخیل می‌باشند که اهمیت جداسازی و کشت آن‌ها را برای بررسی دوچندان می‌کند. عامل اصلی در بیماران ویتیلیگو (لک و پیس) که یکی از بیماری‌های پوستی شایع است، به‌دلیل نقص و آسیب ملانوسیت‌ها می‌باشد و این خود لزوم جداسازی و کار بر روی ملانوسیت‌ها را آشکارتر می‌سازد.^{۱۵} در چند دهه‌ی گذشته کشت انتخابی ملانوسیت‌های انسانی از نوزادان و افراد بزرگسال به‌دست آمده است.^{۱۶} کشت اولیه‌ی ملانوسیت‌ها که از سال‌ها قبل دنبال می‌شد با کارهای Eisenger که از تتراکانویل فربول استات (0-12) می‌شد با کارهای Tetradeconoyl Phorbol Acetate, TPA به‌عنوان میتوزن برای ملانوسیت‌ها استفاده کرد وارد مرحله‌ی جدیدی شد.^{۱۷}

Eisenger از فربول میرستات استات (Phorbol Myristate Acetate, PMA) که از خانواده‌ی فربول استرهاست و میتوزنی قدرت‌مند برای تکثیر و رشد بسیاری از سلول‌ها است و کلراتوکسین استفاده کرد. این دو ترکیب باعث تکثیر تمام رده‌های سلولی جداشده می‌شوند به‌گونه‌ای که کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها در حضور فربول استر به‌تنهایی آن‌چنان قدرت تکثیرشان بالا می‌رود که به‌مراحل آخر تکثیر خود می‌رسند و از طرف دیگر بسیاری از آن‌ها نمی‌توانند به‌کف فلاسک بچسبند و نیز فیبروبلاست‌ها در حضور کلراتوکسین رشدشان متوقف می‌شود.

در مطالعه‌ی حاضر بعد از جدا کردن درم از اپیدرم، سلول‌های اپیدرمی از نمونه‌های پیش‌پوست و پلک انسانی جداسازی شد و سپس از کشت ویژه‌ی ملانوسیتی در حضور و عدم حضور فربول استر (در این مطالعه PMA) برای به‌دست آوردن جمعیت خالصی از ملانوسیت‌ها استفاده شد.

رنگ‌دانه‌ای شبکیه که از جام بینایی (Optic cup) از پیش‌مغز (Forebrain) مشتق می‌شوند، در انسان گسترش ملانوسیت‌ها با مهاجرت ملانوبلاست‌ها از ستیغ عصبی در طول جنین‌زایی صورت می‌گیرد.^۶

متعهدشدن سلول‌های ستیغ عصبی به دودمان ملانوزنیک باعث ایجاد ملانوبلاست‌ها می‌شود که قادرند به بسیاری از مقصدهای مختلف مهاجرت کنند و در نهایت به ملانوگونا (Melanogonia) و سپس به ملانوسیت بالغ تمایز یابند.^۷ در پوست ملانوسیت‌ها اغلب در درم حضور دارند که پس از مهاجرت به اپیدرم در لایه‌ی بازال اپیدرم قرار می‌گیرند.

به‌علاوه در لایه‌ی بازال اپیدرم در مهره‌داران، ملانوسیت‌ها در تماس بسیار نزدیک با کراتینوسیت‌های اطراف هستند و این کار به‌واسطه‌ی استتاله‌های دندریتیکی آن‌ها صورت می‌گیرد. این ارتباط نزدیک به ملانوسیت‌ها اجازه می‌دهد که وظیفه‌ی اولیه‌ی خودشان یعنی تولید ملانین و انتقال آن به کراتینوسیت‌ها را انجام دهند، بنابراین باعث ایجاد یک سپر دفاعی در مقابل اشعه‌ی ماورای بنفش و نیز ایجاد رنگ پوست و مو می‌شوند.^۸ به‌علاوه کراتینوسیت‌ها با تولید فاکتورهای رشدی مانند فاکتور رشد فیبروبلاستی، اندوتلین و دیگر فاکتورها، در رشد، تکثیر، ملانوزن و دندریستی ملانوسیت‌ها نقش اصلی و به‌سزایی دارند،^۹ در انسان و سگ یک سلول ملانوسیت به‌طور متوسط به‌ترتیب با ۳۰-۴۰ و ۱۰-۲۰ کراتینوسیت در ارتباط است.^{۱۰}

طی فرآیندی که به‌نام ملانوزن معروف است رنگ‌دانه‌ی ملانین ساخته می‌شود که عامل اصلی در شکل دادن رنگ پوست و مقابله با اثرات آسیب‌زای تابش ماورای بنفش می‌باشد.^{۱۱} کشت اولیه ملانوسیت‌ها، که بلافاصله به‌دنبال جداسازی سلول‌ها از بافت صورت می‌گیرد، یکی از مشکل‌ترین کشت‌ها به‌دلیل تعداد اندک این سلول‌ها و نیز حساسیت بالای آن‌ها در محیط کشت از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. کشت سلول‌های حیوانی در سرم از اوایل دهه ۱۹۰۰ انجام شده است، اما در ۲۰-۳۰ ساله اخیر، پیشرفت قابل توجهی در کشت انواع سلول‌های ویژه صورت گرفته است. همان‌طور که گفته شد ملانوسیت‌ها سلول‌های دندریتیکی با منشای ستیغ عصبی هستند. به‌صورت آناتومیک ملانوسیت‌ها یک گروه سلولی بسیار کوچک در پوست (در لایه‌ی بازال اپیدرم)، چشم (در اپیتلیوم رنگی شبکیه و

روش بررسی

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی و در آزمایشگاه کشت سلول، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ انجام گردید.

آماده‌سازی بافت اپیدرم: نمونه‌های پوست مورد استفاده در این تحقیق، قطعه‌های پیش‌پوستی (Foreskin) و پوست پلک انسان بودند که به ترتیب حاصل از عمل جراحی داوطلبانه ختنه (Circumcision) و دورریزهای حاصل از پوست پلک بیمارانی بود که افتادگی پلک داشتند که از اتاق عمل سرپایی بیمارستان حضرت معصومه (س) کرمانشاه تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. به والدین بیماران در موارد ختنه‌ی کودکان و به خود بیماران در موارد پوست پلک اطلاعات کافی داده و رضایت‌نامه گرفته شد. مطالعه تحت شرایط رعایت کامل نکات اخلاقی و با تایید کمیته‌ی اخلاقی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد.

نمونه‌ها بلافاصله در بافر Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) فاقد کلسیم و منیزیم و دارای پنی‌سیلین، استرپتومایسین، جنتامایسین و آمفوتریسین B قرار گرفتند و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های پوست دوبار و هر بار به مدت پنج دقیقه در ۵ml محلول HBSS شسته شدند. سپس به مدت دو دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و سپس دوباره در ۵ml محلول HBSS شسته شدند. با استفاده از ست جراحی استریل قسمت‌های چربی و لکه‌های خون و بافت‌های مرده پوست در هر نمونه‌های مورد نظر به دقت برداشته شد. پوست به قطعات به‌طور تقریبی ۵×۵mm بریده شد. قطعات پوست آماده‌شده سپس در درون فالكون‌های حاوی ۵ml آنزیم ترمولایزین در HBSS قرار گرفتند.

در این مرحله فالكون‌های حاوی نمونه یک شب در دمای ۴°C درون یخچال قرار گرفت. در روز بعد، فالكون‌های حاوی نمونه پنج دقیقه در دمای ۳۷°C آنکوبه شدند و پس از تخلیه‌ی محلول آنزیمی، با استفاده از پنس و پنست مناسب و استریل درم را از اپیدرم جدا گردید. بعد از جداشدن درم از اپیدرم، از ورقه‌های اپیدرمی حاصل برای جداسازی سلول با استفاده از آنزیم تریپسین- EDTA استفاده شد. ورقه‌های اپیدرمی ۱۵ دقیقه در ۵ml آنزیم تریپسین- EDTA در حالت هم‌زدن آنکوبه شدند. سلول‌های جداشده و بافت‌های

باقی‌مانده‌ی مورد نظر از صافی‌های سلولی ۸۰ میکرومتری عبور داده شد تا زایده‌های سلولی موجود جدا شوند. مخلوط در ۸۰۰g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی با ۳ml محیط کشت مخصوص ملانوسیت‌ها به تعلیق درآمد و بقای سلول‌ها با استفاده از تست تریپان‌بلو سنجیده شد.

محیط کشت ملانوسیت (MGM) (Melanocyte Growth Medium): محیط کشت ملانوسیتی فاقد فریول‌استر محیط ویژه‌ای است که دارای ترکیبات متعددی می‌باشد که برای ۱۰۰ml آن عبارتند از: ۸۷٪ محیط پایه‌ی MCDB-153 (Sigma, Cat. No. M7403, USA)، ۲٪ FBS، ۱۰٪ Chelated FBS، دو میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۲۰ میکرومولار کراتوکسین (Sigma, Cat. No. C3021, USA)، ۱/۱۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه) (rhbFGF, Reliatech)، ۱۰۰ نانومولار ET-3 (Sigma, Cat. No. ET-3)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF (فاکتور سلول‌های بنیادی) (rhSCF, R&D Systems, Cat. No. 255-SC-050, USA) و یک نانوگرم بر میلی‌لیتر هپارین. این محیط در ۴°C تا هشت روز قابل استفاده و پایدار است. برای تهیه‌ی محیط دیگر که محیط فریول‌استری است از Phorbol Myristate Acetate (PMA) طبق روش معمول با اندکی تغییرات استفاده شد.^{۱۷}

مخلوط سلولی حاصل در فلاسک‌های کشت سلول T25 در شرایط ۳۷°C و ۵٪ CO₂ برای ۷۲ ساعت کشت داده شد. سلول‌ها در روز چهارم با MGM شسته شد تا سلول‌هایی که به کف فلاسک اتصال نیافته‌اند از محیط خارج شوند. از این پس تعویض محیط دوبار در هفته انجام شد. تراکم سلول‌ها پس از گذشت ۱۲ تا ۱۴ روز در شرایط مذکور به حدود ۷۰٪ رسید.

تایید هویت ملانوسیت‌ها: برای تایید ملانوسیت‌های کشت‌داده شده از تکنیک‌های ایمونوسیتوشیمیایی (Immunocytochemistry, ICC) و واکنش زنجیره پلیمرز معکوس (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) استفاده شد.

ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های مورد نظر جهت ICC برای مارکرهای اختصاصی ملانوسیتی به ترتیب با سه آنتی‌بادی ضد MITF, Tyrosinase, HMB-45 که اختصاصی ملانوسیت‌ها می‌باشند، رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا سلول‌ها با پارافرمالیدید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای مارکرهای داخل سلولی نفوذپذیری

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ژنهای بررسی شده

ژن‌ها	توالی پرایمرها	تعداد جفت باز	وزن مولکولی
PMEL	F: CTGTGCCAGCCTGTGCTAC	۱۹	۵۷۵۶
	R: CACCAATGGGACAAGAGCAG	۲۰	۶۱۶۹
Tyrosinase	F: GTCTTTATGCAATGGAACGC	۲۰	۶۱۳۲
	R: GCTATCCCAGTAAGTGGACT	۲۰	۶۱۱۷
MITF	F: TTATGTACCTTCTCTTTGCC	۲۱	۶۳۱۳
	R: GCTTGCTGTATGTGGTACTTG	۲۱	۶۴۷۴

باقی مانده و به کف فلاسک نچسبیدند. ۷۲ ساعت پس از جداسازی، با تعویض محیط، این سلول‌ها حذف شدند و سلول‌های چسبیده (ملانوسیت‌ها) تکثیر یافتند (شکل A-۱). بعد از تعویض محیط، تکثیر سلول‌های چسبیده افزایش یافته و تعداد ملانوسیت‌های کشت داده شده با توجه به تکثیر سلولی افزایش یافت (شکل B-۱) و شکل C-۱). در واقع در این مرحله هر سه روز کل محیط کشت را خالی کردیم و ۴ ml از محیط کشت به آن اضافه نمودیم. بعد از ۱۲ تا ۱۴ روز کشت سلول‌ها به ۷۰٪ تراکم رسید (شکل D-۱). با پاساژ سلول‌ها و انتقال سلول‌ها از یک فلاسک به دو یا چند فلاسک دیگر این امکان فراهم شد که سلول‌ها بار دیگر تقسیم شوند و تعدادشان افزایش یابد.

کشت ملانوسیت در حضور Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA): یکی از روش‌های کشت ملانوسیت‌ها، کشت در حضور فربول‌استرها از جمله PMA است.^{۱۰،۱۷} استفاده از ترکیبات فربول‌استری نه تنها کراتینوسیت‌ها را از بین می‌برد بلکه باعث افزایش تکثیر ملانوسیت‌ها هم می‌شود،^{۱۱} PMA از چسبیدن کراتینوسیت‌ها جلوگیری می‌کند اما از چسبیدن ملانوسیت‌ها جلوگیری نمی‌کند و به‌علاوه باعث افزایش تکثیر آن‌ها می‌شود. در بررسی کشت ملانوسیتی، سلول‌ها در حضور PMA کشت داده شدند که یکی از مشتقات TPA می‌باشد و سال‌های طولانی است برای کشت ملانوسیت به‌کار می‌رود و نتیجه‌ی حاصل از آن و مورفولوژی سلول‌ها در شکل ۲ دیده می‌شود.

در این کشت یکی از مهم‌ترین تفاوت‌هایی که نسبت به کشت در عدم حضور PMA داشت، مورفولوژی دوکی شکل ملانوسیت‌ها به‌صورت دوقطبی و در مواردی نیز سه‌قطبی در حضور فربول‌استرها

با استفاده از تریتون X-100 ۱٪/۰ در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با سرم بز ۶٪ و آلبومین گاوی (BSA) ۱٪/۰ بلوکه شدند. سپس نمونه‌ها با افزودن آنتی‌بادی اولیه در ۴ °C شبانه انکوبه شدند. پس از شستشوی چاهک‌ها (پنج‌بار هر بار دو دقیقه) آنتی‌بادی ثانویه مناسب کونژوگه با فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) به مدت یک ساعت در دمای اتاق به چاهک‌ها اضافه شد، سپس چاهک‌ها شسته شد (دو بار، هر بار دو دقیقه) و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید.

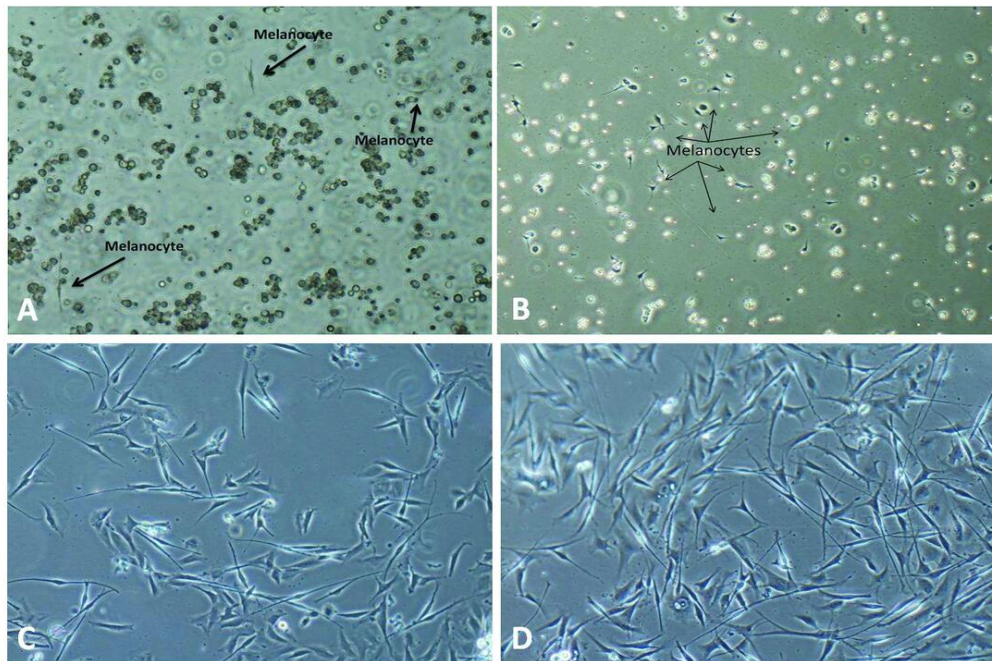
واکنش زنجیره پلیمرز معکوس (RT-PCR): RNA سلولی با استفاده از RNaxPlus و انجام مراحل معمول از نمونه‌ها تهیه گردید و cDNA با روش نسخه‌برداری معکوس و طبق دستورالعمل کیت شرکت (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL USA) تولید شد. PCR برای تمام نمونه‌ها بهینه‌سازی و انجام شد و سپس نتایج آن با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهایی که جهت PCR انتخاب گردید به ترتیب در جدول ۱ دیده می‌شوند. سه جفت پرایمر ویژه برای همان مارکرهای اختصاصی قبلی بررسی گردید.

یافته‌ها

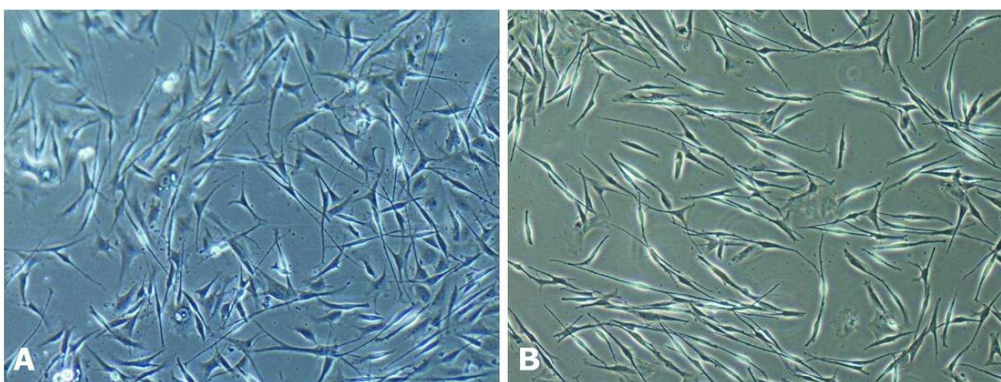
کشت سلول‌های جدا شده حاصل از اپیدرم در حضور محیط اختصاصی ملانوسیت‌ها: محیط کشت MGM یک محیط کشت انتخابی است که اجازه‌ی رشد و تکثیر را به ملانوسیت‌ها می‌دهد و از چسبیدن دیگر سلول‌ها جلوگیری می‌کند، این سلول‌ها شناور و گرد

می‌شدند) و سلول‌های ملانوسیت به شکل طبیعی خود یعنی پلی‌دندریتیک دیده شدند که این یکی از مشکلات استفاده از فریبول‌استرها است. مقایسه‌ی کشت حاصل از پیش‌پوست نوزاد و

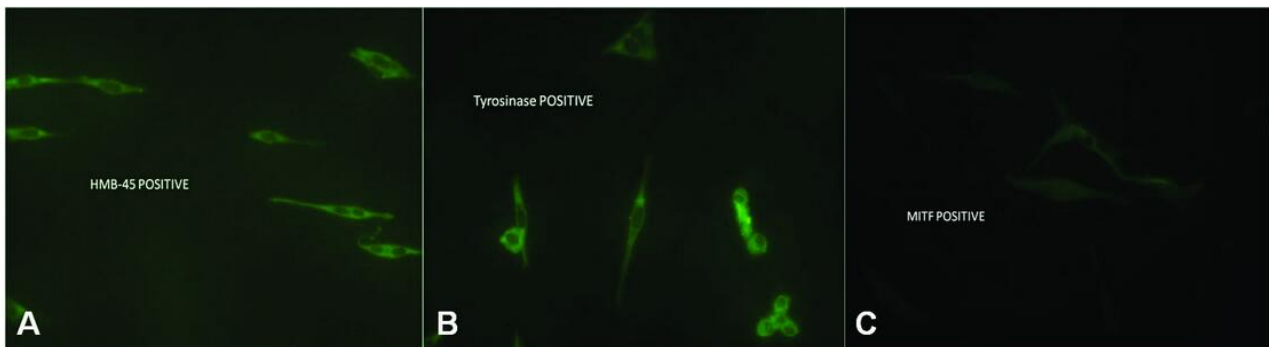
است که این مورفولوژی در عدم حضور فریبول‌استرها دیده نشد (به‌عنوان مثال ملانوسیت‌های پوست پلک حاصل از افراد بزرگ‌سال در عدم حضور PMA سلول‌ها به‌طور کامل حالت پلی‌دندریتیک دیده



شکل ۱: (A) روز سوم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). (B) روز چهارم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). (C) روز نهم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). (D) روز چهاردهم کشت ملانوسیت. (دوربین Eclipse TS 100 Inverted Microscope، Nikon EL WD، با بزرگ‌نمایی $\times 40$) (Nikon, Tokyo, Japan)



شکل ۲: کشت ملانوسیت‌ها در عدم حضور PMA، (A) کشت در حضور PMA، (B) تصاویر با Eclipse TS 100 Inverted Microscope، با بزرگ‌نمایی $\times 20$



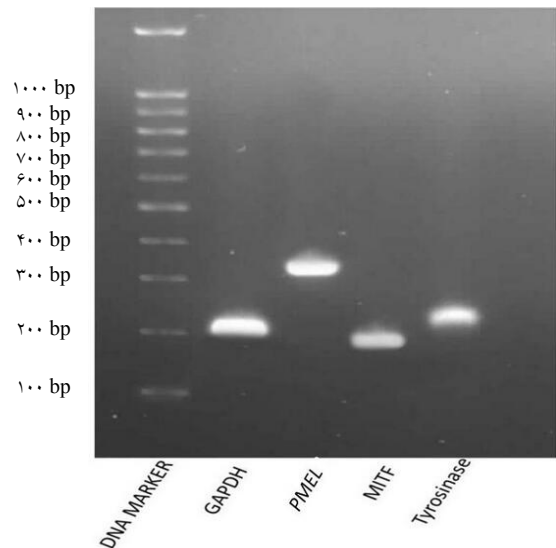
شکل ۳: بررسی مارکرهاي ملانوسيتي با ICC: بيان مارکر HMB-45 (A)، مارکر Tyrosinase (B)، مارکر MITF (C) در ملانوسيت‌هاي جداشده از ايدرم انسان (دوربين Nikon EL WD، Eclipse TS 100 Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمايي $\times 40$)

تکثیر و در نهایت مرگ سلولي شدند.

بررسی مارکرهاي اختصاصي ملانوسيتي: نتايج حاصل از بررسی-هاي ايمونوسيتوشيمي و RT-PCR ملانوسيت بودن سلول‌ها را تايد کرد. ايمونوسيتوشيمي: جهت تعيين ماهيت ملانوسيت‌هاي به‌دست-آمده از پيش‌پوست و پوست پلک انساني، سه آنتي‌بادي اختصاصي ضد HMB-45، Tyrosinase و MITF استفاده شدند. ملانوسيت‌هاي حاصل از پاساژهاي سه و چهار که به‌خوبي خالص شده و اثری از کراتينوسيت‌ها و فيروبلاست‌ها در آنها نبود جهت بررسی ايمونوسيتوشيمي انتخاب شدند و بعد از تريسپينه‌شدن در پليت‌هاي ۹۶ خانه با تراکم بسيار پايين ريخته شدند، نتايج حاصل از رنگ‌آمیزی ايمونولوژيک در شکل ۳ تايدکننده‌ي مارکرهاي ملانوسيتي مي‌باشد. واکنش زنجيره پليمرز معکوس (RT-PCR): در اين مطالعه سلول‌هاي حاصل از پاساژ سه و چهار که تراکم ۸۰-۷۰٪ داشتند و از نظر بيان ژن‌هاي PMEL، Tyrosinase و MITF بررسی شدند. نتايج RT-PCR الکتروفورز بر روی ژل آگاروز نشان داد که در هر سه تکرار اين ژن‌ها در ملانوسيت‌ها به‌طور مطلوب بيان شده‌اند اين نتايج در شکل ۴ ديده مي‌شود.

بحث

در چند دهه‌ي گذشته جداسازی و کشت انتخابي ملانوسيت‌هاي انساني از پوست نوزادان و افراد بزرگ‌سال صورت گرفته است.^{۱۶}



شکل ۴: بررسی بيان سه ژن HMB-45، MITF، Tyrosinase. در سلول‌هاي ملانوسيت با روش RT-PCR

پوست پلک بزرگ‌سال نشان داد که ملانوسيت‌هاي جداشده از پلک افراد بزرگ‌سال به‌مراتب دندريتيک‌تر (پلي‌دندريتيک) از ملانوسيت-هاي جداشده از پيش‌پوست نوزادان است و نيز ملانوسيت‌هاي افراد بزرگ‌سال پس از سه پاساژ دچار پيري سلولي، توقف تکثير و در نهایت مرگ سلولي شدند، در حالی‌که ملانوسيت‌هاي جداشده از پيش‌پوست نوزادان بعد از پاساژ شش دچار پيري سلولي، توقف

شد، گروهی به مقایسه‌ی کشت ملانوسیتی حاصل از پوست افراد بزرگسال و خردسالان پرداختند.^{۲۱}

این گروه از ایزوبوتیل‌متیل‌گزانتین Isobutylmethylxanthine (IBMX) و ۵-فلوئورویوراسیل (5-Fluorouracil (5-FU) استفاده کردند، اولی فریبول‌استر است درحالی‌که دومی یک آنتی‌متابولیت با سیتوتوکسیسیته بالا برای کراتینوسیت‌ها است. در واقع این دو به‌عنوان داروهای درمان سرطان به‌کار می‌روند که یکی به پیش‌برنده‌ی تومور معروف است و دیگری یک داروی شیمی‌درمانی می‌باشد. بسیاری از گروه‌ها از پوست حاصل از جراحی زیبایی استفاده می‌کردند حال این‌که بسیاری از آن‌ها نیز از پیش‌پوست استفاده کردند.^{۲۲} در مطالعه‌ی ما این نوع پوست در مقایسه با پوست پلک به‌کار رفت.

گروه دیگری در ۱۹۸۴ برای کشت ملانوسیت از هیچ‌یک از ترکیبات نام‌برده استفاده نکرده بلکه از یک عصاره‌ی طبیعی مغزی که دارای فعالیت ضعیفی در تحریک رشد سلول‌هاست به نام Bovine Pituitary Extract (BPE) استفاده کردند.^{۱۶} مطالعات گسترده‌ای در طی سال‌های بعد صورت گرفت و ترکیبات و روش‌های گوناگونی برای جداسازی و کشت ملانوسیت‌ها به‌کار رفت. درنهایت چهار گروه عمده‌ی میتوزن‌های رشد ملانوسیتی یافت شد که به‌صورت یک دسته‌بندی منسجم عبارتند از:

- ۱- فاکتورهای رشد پپتیدی: فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)، فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ (Insulin/insulin-like Growth Factor-1, IGF-1)، فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor, EGF)، فاکتور رشد ترانسفورماسیون-آلفا (Transforming Growth Factor- α , TGF- α)، اندوتلین (Endothelins, ET)، فاکتور رشد هپاتوسیتی (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, HGF/SF)، فاکتور سلول بنیادی (Stem Cell Factor, SCF)، ۲- کلسیم، ۳- افزایشنده‌های داخل سلولی cAMP: هورمون تحریک‌کننده‌ی ملانوسیتی-آلفا (α -Melanocyte Stimulating Hormone, α -MSH)، فورسکولین (Forskolin)، هورمون تحریک‌کننده‌ی فولیکولی (Follicle Stimulating Hormone, FSH)، کلراتوکسین (Cholera toxin)، ۴- فعال‌کننده‌های Protein Kinase C (PKC) مانند ۱۲-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)، 20-oxo-phorbol-12,13-dibutyrate

از ترکیبات مختلفی هم در محیط کشت ملانوسیتی برای حذف

کشت ملانوسیت‌ها که از سال‌ها قبل دنبال می‌شد با کارهای Eisenger که از یکی از مشتقات TPA به‌عنوان میتوزنی برای ملانوسیت‌ها استفاده کرد وارد مرحله‌ی جدیدی شد.^{۱۰} Eisenger از PMA (از خانواده‌ی فریبول‌استرهاست و میتوزنی قدرت‌مند برای تکثیر و رشد بسیاری از سلول‌ها) و کلراتوکسین استفاده کرد. این دو ترکیب باعث تکثیر تمام رده‌های سلولی جداشده می‌شوند به‌گونه‌ای که کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها در حضور فریبول‌استر به‌تنهایی آن‌چنان قدرت تکثیرشان بالا می‌رود که به‌مراحل آخر تکثیر خود می‌رسند و از طرف دیگر نمی‌توانند بچسبند و نیز فیبروبلاست‌ها در حضور کلراتوکسین رشدشان متوقف می‌شود.

یکی از ویژگی‌های کلراتوکسین به‌تنهایی و عدم حضور PMA افزایش تکثیر و رشد ملانوسیت‌ها ولی با سرعت کم است درحالی‌که همراه با PMA بسیار سریع عمل می‌کند. در این شرایط، ملانوسیت‌ها قدرت تکثیر و تعداد پاساژهای بیش‌تری نسبت به‌روش فاقد PMA دارند و زمان طولانی‌تر می‌شود این سلول‌ها را نگه‌داشت. در حالی در روش فاقد فریبول‌استر طول مدت نگه‌داری ملانوسیت‌ها محدود است، اما این روش معایبی نیز دارد که بسته به‌نوع کار می‌تواند نامناسب باشد به‌عنوان نمونه، ملانوسیت‌هایی که در این روش کشت داده می‌شوند به‌طور عمده دوکی‌شکل هستند، درحالی‌که بایستی پلی‌دندریتیک باشند. یکی از دلایل دیگر برای استفاده نکردن از PMA تأثیر آن بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیک ملانوسیت‌ها است که باعث دوقطبی شدن آن‌ها و کاهش تدریجی یا سریع ملانین‌های آن‌ها می‌شود.^{۱۸}

یکی دیگر از مشکلات PMA تغییراتی است که بر روی سلول‌ها و غشای آن‌ها ایجاد می‌کند،^{۱۸} مثل تغییر در چسبندگی سلول که گفته می‌شود باعث افزایش چسبندگی سلول‌هایی می‌شود که بایستی به‌طور طبیعی معلق باشند و همچنین کاهش چسبندگی سلول‌هایی که تا حالا به‌صورت چسبنده رشد کرده‌اند و نیز افزایش تکثیر تمام رده‌های سلولی که ممکن است برای ما مناسب باشد. هم‌چنین دیده شده که PMA ملانوزن در ملانوسیت‌ها را متوقف کرد.^{۱۹}

این اثر در سلول‌های جداشده از ستیغ عصبی بلدرچین هموزن هم دیده شد که PMA در غلظت‌های بالا باعث قطع ملانوزن و در غلظت‌های پایین باعث کاهش و تأخیر آن می‌شود.^{۲۰} پس از آن کارهای متعدد دیگری برای جداسازی ملانوسیت‌ها از اپیدرم انجام

یکی دیگر از نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر پاساژ موفق ملانوسیت‌ها تا حداقل پنج مرتبه بود. این امر به واسطه‌ی ایجاد شرایط مناسب و خارج کردن سلول‌های رقیب از محیط امکان‌پذیر شد. در برخی از مقالات کشت زیاد ملانوسیتی اشاره شده اما کشت بیش‌تر از سه پاساژ نشان‌دهنده‌ی مناسب و مساعد بودن شرایط رشد و بقای ملانوسیت‌هاست که استحکام و پایداری ملانوسیت‌ها را نشان می‌دهد. کشت اولیه‌ی ملانوسیت‌ها اولین قدم برای مطالعات بعدی در این زمینه است، مطالعاتی هم‌چون: شناسایی مکانیسم‌های درگیر در ایجاد و بروز ملانوما، شناسایی مکانیسم‌هایی که در بروز و ایجاد ناهنجاری‌های ملانوسیتی مثل ویتیلیگو، آلبینیسم چشمی- پوستی، ابلقی یا دورنگی، سندرم واردنبورگ، سندرم Vogt- koyanagi Harada دخیل هستند، بررسی مکانیسم‌های درگیر در ایجاد رنگ پوست، بررسی اثر داروها و مواد مختلف بر روی تولید ملانین و نیز اثر آن‌ها بر خود ملانوسیت‌ها، بررسی اثر اشعه‌ی ماورای بنفش بر روی ملانوسیت‌ها و تولید ملانین، مطالعه‌ی مهاجرت ملانوسیت‌ها در پوست مصنوعی و نیز مسیرهای آنزیمی و غیر آنزیمی درگیر در تولید ملانین و دخیل در هموستاز سلولی.

پس از جداسازی و کشت اولیه‌ی ملانوسیت‌ها در مطالعه‌ی ما با توجه به خالص بودن این کشت می‌توان از آن در مطالعاتی برای درمان بیماران ویتیلیگو و دیگر ناهنجاری‌های وابسته به ملانوسیت‌ها استفاده کرد. به علاوه می‌توان از سلول‌های کشت داده شده در غنی کردن مخلوط سلولی، برای درمان بیماران ویتیلیگو در تکنیک ایجاد تاول استفاده کرد. استفاده‌ی از این سلول‌ها هم‌چنین در مهندسی بافت برای تولید پوست مصنوعی و استفاده‌ی آن‌ها در تولید سلول‌های بنیادی القایی (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSc) از دیگر کاربردهایی است که پس از خالص‌سازی می‌توانند به عنوان هدف‌های بعدی مدنظر باشد.

سپاسگزاری: نویسندگان وظیفه خود می‌دانند از کلیه بیمارانی که با دادن نمونه پوست امکان این مطالعه را فراهم کردند، قدردانی نمایند. از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی که با کمک فکری و تکنیکی انجام این مطالعه را تسهیل نمودند، تشکر می‌شود. از ستاد توسعه سلول‌های بنیادی و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که با حمایت مالی امکان انجام این مطالعه را فراهم ساختند، تشکر می‌شود.

کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها استفاده شد، از محیط خارج کردن سلول‌های دیگر که برای ما آلودگی و مزاحم محسوب می‌شوند نیز یکی از چالش‌ها می‌باشد مثلاً برای حذف فیبروبلاست‌ها که اصلی‌ترین و عمده‌ترین موانع بر سر راه کشت ملانوسیت‌ها هستند از جنتیسین (Genticin (G418 استفاده شد و برای حذف کراتینوسیت‌ها به‌طور عمده از فربول‌استرها استفاده کردند.^{۲۳} جداسازی ملانوسیت‌ها فقط مربوط به پوست نیست از تمام قسمت‌های که ملانوسیت دارند می‌شود برای جداسازی استفاده کرد مثلاً در مطالعات دیگر علاوه بر اپیدرم ملانوسیت‌ها را از فولیکول‌های مو جداسازی کردند، استفاده از فاکتورهای رشد مختلف برای بهبود شرایط کشت ملانوسیتی هم به‌صورت گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفت.^{۲۴ و ۲۵}

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در محیط TPA Free MGM ملانوسیت‌ها به‌طور کامل شکل دندریتیک خود را حفظ کرد و روابط بین سلولی آن‌ها به‌صورت شبکه‌ای کاملاً مشخص بود، درحالی‌که در محیط حاوی فربول‌استر با این‌که رشد سلولی و تکثیر ملانوسیت‌ها بالاتر بود ولی ملانوسیت‌ها حالت دندریتیک نداشته و به‌طور عمده به‌صورت دوکی شکل بودند، از لحاظ مرفولوژی همیشه سلول‌های کشت داده شده در محیط اول در حضور فاکتورهای رشد سالم‌تر به‌نظر می‌رسید درحالی‌که سلول‌های کشت داده شده در حضور فربول‌استر به‌طور عمده باریک‌تر و ضعیف‌تر بودند، شاید این به دلیل تکثیر بیش‌تر و سریع‌تر سلول‌ها در حضور فربول‌استر باشد که اجازه‌ی رشد زیاد و مناسب و توسعه به سلول‌ها را نمی‌دهد.

با این حال در هر دو محیط ما شاهد حضور سلول‌های مزاحم کراتینوسیت و فیبروبلاست بودیم که البته در محیط اول به‌مراتب کم‌تر بود، فیبروبلاست‌ها را با افزودن مقدار مشخص و به‌صورت محدود جنتیسین از محیط خارج کردیم درحالی‌که کراتینوسیت‌ها در صورت وجود بایستی با تریپسین کردن انتخابی از محیط حذف می‌شدند، یعنی با توجه به این‌که ملانوسیت‌ها در چسبیدن به محیط و اتصالات به کف فلاسک ضعیف‌تر از کراتینوسیت‌ها می‌باشند که بسیار محکم و به‌صورت پخش شده به فلاسک چسبیده با زمان‌بندی مناسب طوری عمل کردیم که بعد از جداشدن ملانوسیت‌ها، آن‌ها را به‌سرعت و با دقت از محیط خارج کردیم. این کار تا زمانی ادامه می‌یافت که دیگر اثری از سلول دیگری به‌جز ملانوسیت‌ها در محیط باقی نماند.

References

- Murakami S, Miki Y. Human skin histology using high-resolution echography. *J Clin Ultrasound* 1989;17(2):77-82.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
- Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and Atlas. 10th ed. 2002. p. 254-9, 309-22.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. unqueira's Basic Histology: Text and Atlas. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2006. p. 347-60.
- Alekseev AG, Banin VV, Nozdrin VI. Skin melanocytes. *Morfolog-ia* 2009;136(5):81-9.
- Tosney KW. Long-distance cue from emerging dermis stimulates neural crest melanoblast migration. *Dev Dyn* 2004;229(1):99-108.
- LaBonne C, Bronner-Fraser M. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol* 1998;36(2):175-89.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 2002;50(2):125-33.
- Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol* 1989;92(4):565-72.
- Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(6):2018-22.
- Mosse I, Kostrova L, Subbot S, Maksimenya I, Molophei V. Melanin decreases clastogenic effects of ionizing radiation in human and mouse somatic cells and modifies the radioadaptive response. *Radiat Environ Biophys* 2000;39(1):47-52.
- Jimbow K, Quevedo WC, Prota G, Fitzpatrick TB. Biology of melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, et al, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 192-220.
- Abdel-Malek ZA, Swope VB, Nordlund JJ, Medrano EE. Proliferation and propagation of human melanocytes in vitro are affected by donor age and anatomical site. *Pigment Cell Res* 1994;7(2):116-22.
- Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2005;23(2):105-61.
- Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Dutrieux RP, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol* 1993;100(6):816-22.
- Gilchrist BA, Vrabel MA, Flynn E, Szabo G. Selective cultivation of human melanocytes from newborn and adult epidermis. *J Invest Dermatol* 1984;83(5):370-6.
- Chao-Hsing KA, Hsin-Su YU. A study of the effects of phorbol 12-myristate-13-acetate on cell differentiation of pure human melanocytes in vitro. *Arch Dermatol Res* 1991;283(2):119-24.
- Weinstein IB, Lee LS, Fisher PB, Mufson A, Yamasaki H. Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. *J Supramol Struct* 1979;12(2):195-208.
- Payette R, Biehl J, Toyama Y, Holtzer S, Holtzer H. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the differentiation of avian melanocytes. *Cancer Res* 1980;40(7):2465-74.
- Glimelius B, Weston JA. Analysis of developmentally homogeneous neural crest cell populations in vitro. II. A tumor-promoter (TPA) delays differentiation and promotes cell proliferation. *Dev Biol* 1981;82(1):95-101.
- Tsuji T, Karasek M. A procedure for the isolation of primary cultures of melanocytes from newborn and adult human skin. *J Invest Dermatol* 1983;81(2):179-80.
- Nielsen HI, Don P. Culture of normal adult human melanocytes. *Br J Dermatol* 1984;110(5):569-80.
- Halaban R, Alfano FD. Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes. *In Vitro* 1984;20(5):447-50.
- Na GY, Paek SH, Park BC, Kim DW, Lee WJ, Lee SJ, et al. Isolation and characterization of outer root sheath melanocytes of human hair follicles. *Br J Dermatol* 2006;155(5):902-9.
- Wilkins L, Gilchrist BA, Szabo G, Weinstein R, Maciag T. The stimulation of normal human melanocyte proliferation in vitro by melanocyte growth factor from bovine brain. *J Cell Physiol* 1985;122(3):350-61.

Primary culture of human skin melanocyte and comparison of culture in the presence and absence of phorbol ester

Abstract

Received: September 12, 2012 Accepted: March 02, 2013

Reza Yarani M.Sc.¹
Kamran Mansouri M.Sc.²
Ali Bidmeshkipour Ph.D.³
Maryam Mehrabi M.Sc.⁴
Ali Ebrahimi M.D.⁵
Kaikaos Gholami M.Sc.⁵
Kheirollah Yari M.Sc.⁶
Ali Mostafaie Ph.D.^{7*}

1- M.Sc. of Cellular and Molecular Biology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- M.Sc. of Hematology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran.

4- M.Sc. of Biochemistry, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

5- Department of Dermatology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

6- M.Sc. of Cellular and Molecular Biology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

7- Department of Immunology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

* Corresponding author: Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Sorkheh Lizheh, Kermanshah, Iran, PO. Box: 6714869914
Tel: +98-831-4276473
E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

Background: Primary culture takes place following the cell isolation from tissues. Isolation and culture of melanocytes based on their roll in the protection of body against hazardous sun rays, production of skin, cornea and hair color is really important. This study was done to set isolation, culture and proliferation of melanocytes from children foreskin and adult eyelashes, and also comparison of two types of melanocyte culture medium.

Methods: Human foreskin and eyelash samples were used for melanocyte isolation and culture. After isolation of epidermis from dermis, epidermis cell suspensions were prepared by enzymatic digestion. The isolated cells were cultured in two melanocyte selective culture media. Immunocytochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were used for confirmation of isolated and cultured melanocytes.

Results: Our results indicated that isolated melanocyte cultured in the selective medium without phorbol esters is better than the melanocytes cultured in selective medium containing phorbol esters not only morphologically but also physiologically and from the aspect of cell adhesion. In addition, the results showed that isolated melanocyte from adult eyelashes are more dendritic than melanocytes isolated from children foreskin. Conversely, our results indicated that the number of cell passages in melanocyte isolated from foreskin is more than melanocytes isolated from adult eyelashes.

Conclusion: Melanocytes cultured in selective medium containing convenient growth factors in absence of phorbol esters show more native physiological and adhesive properties. In addition, melanocyte isolated from younger tissues such as foreskin have better proliferative and sub-culturing properties so we suggest isolation and culture of younger tissues.

Keywords: Epidermis, growth factor, melanocytes, phorbol ester, skin.