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

رضا یارانی[۱]، کامران منصوری[۲]
علی بیدمشکی‌پور[۳]، مریم مهرابی[۴]
علی ابراهیمی[۵]، کیکاووس غلامی[۶]
خیراله یاری[۶]، 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 ایمونولوژی، 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 لیژه، کدپستی: ۶۷۱۴۸۶۹۹۱۴
تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۴۷۳
E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

چکیده

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

زمینه و هدف: کشت اولیه به‌دنبال 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، قرنیه و مو بسیار بااهمیت است. این مطالعه به‌منظور 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 ایمونوسیتوشیمی و واکنش زنجیره پلیمراز 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 به‌مراتب مناسب‌تر است. به‌علاوه، در این بررسی مشخص شد که ملانوسیت‌های جداشده از پلک افراد بزرگ‌سال به‌مراتب دندریتیک‌تر از ملانوسیت‌های جداشده از پیش‌پوست است و تعداد پاساژهای ملانوسیت‌های حاصل از پیش‌پوست بیش‌تر از ملانوسیت جداشده از پلک می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به‌صورت 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. به‌علاوه 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.

مقدمه

پوست (Skin) وسیع‌ترین عضو بدن است و حدود ۱۶٪ کل وزن بدن را در بالغین تشکیل می‌دهد و سطح خارجی آن ۱/۲-۲/۳m^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 دارای چهار لایه است که از خارج به‌داخل 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 مننژ قرار دارند.[۴]

ملانوسیت‌ها از نورواکتودرم منشا می‌گیرند،[۵] به‌جز سلول‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

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 ملانوژنیک باعث ایجاد ملانوبلاست‌ها می‌شود که قادرند به بسیاری‌از مقصدهای مختلف مهاجرت کنند و در نهایت به ملانوگونیا (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 این‌کار به‌واسطه‌ی استطاله‌های 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 ماورای‌بنفش 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، ملانوژنز و دندریسیتی ملانوسیت‌ها نقش اصلی و به‌سزایی دارند،[۹] در انسان و سگ یک سلول ملانوسیت به‌طور متوسط به‌ترتیب با ۴۰-۳۰ و ۲۰-۱۰ کراتینوسیت در ارتباط است.[۱۰]

طی فرآیندی که به‌نام ملانوژنز معروف است رنگ‌دانه‌ی ملانین ساخته می‌شود که عامل اصلی در شکل دادن رنگ پوست و مقابله با اثرات آسیب‌زای تابش ماورای‌بنفش 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 ۳۰-۲۰ ساله اخیر، پیشرفت قابل‌توجهی در کشت انواع سلول‌های ویژه صورت گرفته است. همان‌طور که گفته شد ملانوسیت‌ها سلول‌های دندریتیک 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 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 یادشده، تکثیر و پراکنش ملانوسیت‌ها متفاوت است.[۱۳]

تولید ملانین در ملانوسیت‌ها در یک ارگانل بسیار پیشرفته متصل به غشا به‌نام ملانوزوم صورت می‌گیرد.[۱۴] این سلول‌ها به‌علاوه در بسیاری از مشکلات و آسیب‌های پاتولوژیک و ناهنجاری‌ها مثل ملانوما، ویتیلیگو (Vitiligo)، آلبینیسم چشمی- پوستی (Oculocutoneous albinism)، ابلقی یا دورنگی (Piebaldism)، سندرم واردنبورگ (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 تترادکانویل‌فربول‌استات -12-0) (Tetradecanoyl Phorbol Acetate, TPA به‌عنوان میتوژن برای ملانوسیت‌ها استفاده کرد وارد مرحله‌ی جدیدی شد.[۱۰]

Eisenger از فربول‌میرستات‌استات (Phorbol Myristate Acetate, PMA) که از خانواده‌ی فربول‌استرهاست و میتوژنی 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 فربول‌استر به‌تنهایی آن‌چنان قدرت تکثیرشان بالا می‌رود که به‌مراحل آخر تکثیر خود می‌رسند و از طرف دیگر بسیاری از آن‌ها نمی‌توانند به کف 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 فربول‌استر (در این مطالعه PMA) برای به‌دست‌آوردن جمعیت خالصی از ملانوسیت‌ها استفاده شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

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 به‌ترتیب 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 به‌خود 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 به‌آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های پوست دوبار و هربار به‌مدت پنج دقیقه در 5ml محلول HBSS شسته شدند. سپس به‌مدت دو دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و سپس دوباره در 5ml محلول HBSS شسته شدند. با استفاده از ست جراحی استریل قسمت‌های چربی و لکه‌های خون و بافت‌های مرده پوست در هر نمونه‌های موردنظر به‌دقت برداشته شد. پوست به‌قطعات به‌طور تقریبی 5×5mm بریده شد. قطعات پوست آماده‌شده سپس در درون فالکون‌های حاوی 5ml آنزیم ترمولایزین در HBSS قرار گرفتند.

در این مرحله فالکون‌های حاوی نمونه یک شب در دمای ۴ °C درون یخچال قرار گرفت. در روز بعد، فالکون‌های حاوی نمونه پنج دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه 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 5ml آنزیم تریپسین- EDTA در حالت هم‌زدن انکوبه شدند. سلول‌های جداشده و بافت‌های باقی‌مانده‌ی موردنظر از صافی‌های سلولی ۸۰ میکرومتری عبور داده شد تا زایده‌های سلولی موجود جدا شوند. مخلوط در ۸۰۰g به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی با 3ml محیط کشت مخصوص ملانوسیت‌ها به‌تعلیق درآمد و بقای سلول‌ها با استفاده از تست تریپان‌بلو سنجیده شد.

محیط کشت ملانوسیت Melanocye Growth Meduim, (MGM): محیط کشت ملانوسیتی فاقد فربول‌استر محیط ویژه‌ای است که دارای ترکیبات متعددی می‌باشد که برای 100ml آن عبارتند از: ۸۷٪ محیط پایه‌ی MCDB-153 (Sigma, Cat. No. M7403, USA)، ۲٪ FBS، ۱۰٪ Chelated FBS، دو میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۲۰ پیکومولار کلراتوکسین (Sigma, Cat. No. C3021, USA)، ۱/۱۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه) (rhbFGF, Reliatech, Cat. No. 300-003, USA)، ۱۰۰ نانومولار ET-3 (rhET-3, Sigma, Cat. No. E9173, USA)، 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 فربول‌استری 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٪ Co_2 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 به‌حدود ۷۰٪ رسید.

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

ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های موردنظر جهت ICC برای مارکرهای اختصاصی ملانوسیتی به‌ترتیب با سه آنتی‌بادی ضد MITF, Tyrosinase, HMB-45 که اختصاصی ملانوسیت‌ها می‌باشند، رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا سلول‌ها با پارافرمالدیید ۴٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای مارکرهای داخل سلولی نفوذپذیری

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ژن‌های بررسی‌شده

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

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

واکنش زنجیره پلیمراز 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 به‌ترتیب در جدول ۱ دیده می‌شوند. سه‌جفت پرایمر ویژه برای همان مارکرهای اختصاصی قبلی بررسی گردید.

یافته‌ها

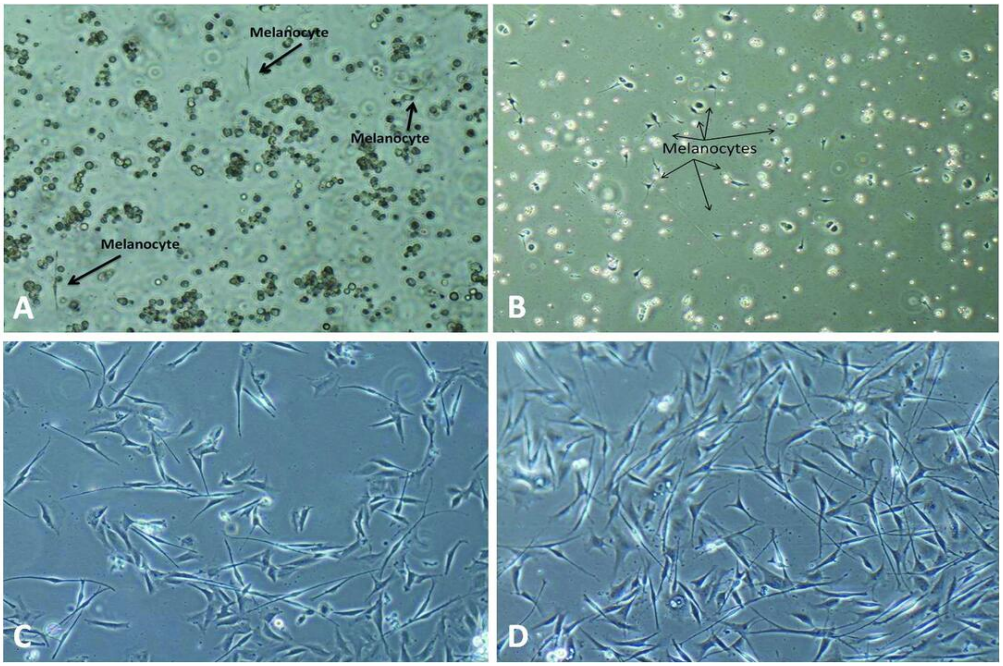
کشت سلول‌های جداشده حاصل‌از اپیدرم در حضور محیط اختصاصی ملانوسیت‌ها: محیط کشت MGM یک محیط کشت انتخابی است که اجازه‌ی رشد و تکثیر را به ملانوسیت‌ها می‌دهد و از چسبیدن دیگر سلول‌ها جلوگیری می‌کند، این سلول‌ها شناور و گرد باقی‌مانده و به کف فلاسک نچسبیدند. ۷۲ ساعت پس از جداسازی، با تعویض محیط، این سلول‌ها حذف شدند و سلول‌های چسبیده (ملانوسیت‌ها) تکثیر یافتند (شکل A–۱). بعد از تعویض محیط، تکثیر سلول‌های چسبیده افزایش یافته و تعداد ملانوسیت‌های کشت‌داده‌شده باتوجه 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 ۴ml 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.[۱۰و۱۷] استفاده از ترکیبات فربول‌استری نه‌تنها کراتینوسیت‌ها را از بین می‌برد بلکه باعث افزایش تکثیر ملانوسیت‌ها هم می‌شود،[۱۰] 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 TPAها می‌باشد و سال‌های طولانی است برای کشت ملانوسیت به‌کار می‌رود و نتیجه‌ی حاصل از آن و مورفولوژی سلول‌ها در شکل ۲ دیده می‌شود.

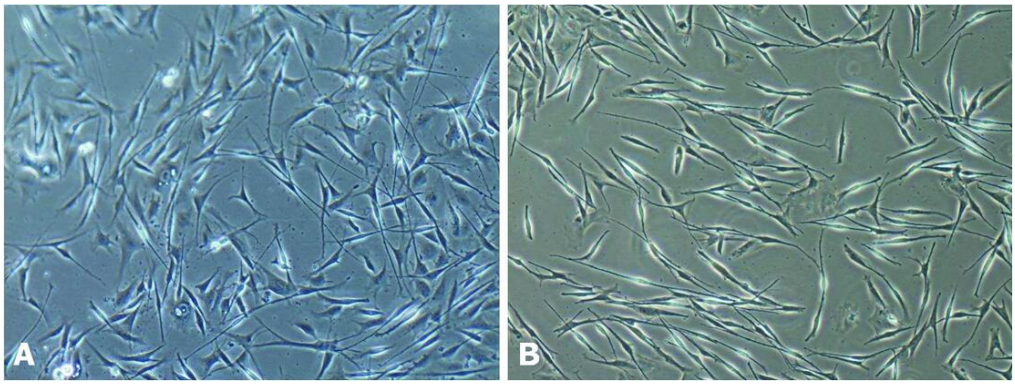
در این کشت یکی از مهم‌ترین تفاوت‌هایی که نسبت به کشت در عدم حضور PMA داشت، مورفولوژی دوکی‌شکل ملانوسیت‌ها به‌صورت دوقطبی و در مواردی نیز سه‌قطبی در حضور فربول‌استرها

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

است که این مورفولوژی در عدم حضور فربول‌استرها دیده نشد (به‌عنوان مثال ملانوسیت‌های پوست پلک حاصل از افراد بزرگ‌سال در عدم حضور PMA سلول‌ها به‌طور کامل حالت پلی‌دندریتیک دیده می‌شدند) و سلول‌های ملانوسیت به‌شکل طبیعی خود یعنی پلی‌دندریتیک دیده شدند که این یکی از مشکلات استفاده از فربول‌استرها است. مقایسه‌ی کشت حاصل از پیش‌پوست نوزاد و

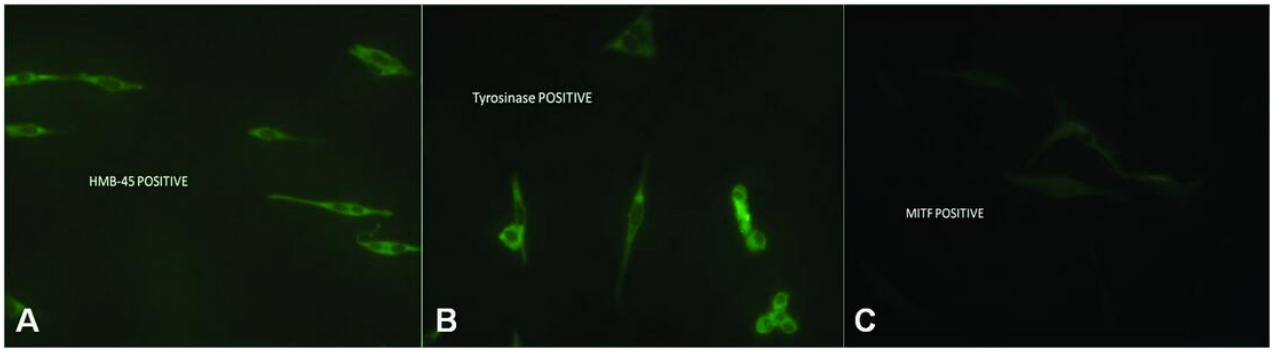


شکل ۱: A) روز سوم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). B) روز چهارم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). C) روز نهم کشت ملانوسیت (ملانوسیت‌های چسبیده دیده می‌شوند). D) روز چهاردهم کشت ملانوسیت. (دوربین Nikon EL WD، Eclipse TS 100 Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰×)

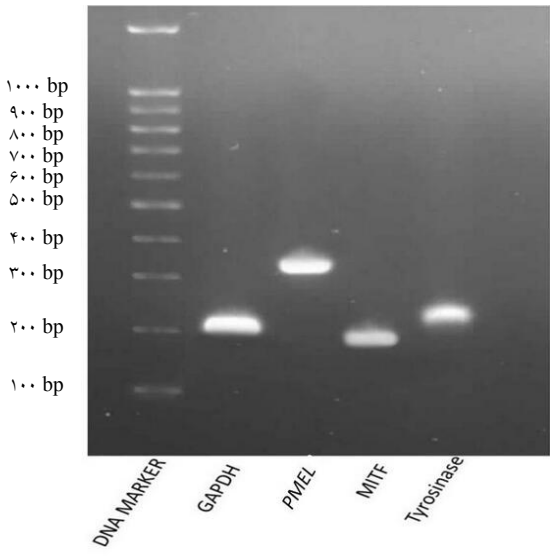


شکل ۲: کشت ملانوسیت‌ها در عدم حضور PMA، A) کشت در حضور PMA، B) (تصاویر با Eclipse TS 100 Inverted Microscope، با بزرگ‌نمایی ۲۰×)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]



شکل ۳: بررسی مارکرهای ملانوسیتی با ICC: بیان مارکر HMB-45، A)، مارکر Tyrosinase، B) مارکر MITF، C) در ملانوسیت‌های جداشده از اپیدرم انسان (دوربین Nikon EL WD، Eclipse TS 100 Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰×)



شکل ۴: بررسی بیان سه ژن HMB-45، MITF، Tyrosinase، در سلول‌های ملانوسیت با روش RT-PCR

پوست پلک بزرگ‌سال نشان داد که ملانوسیت‌های جداشده از پلک افراد بزرگ‌سال به‌مراتب دندریتیک‌تر (پلی‌دندریتیک) از ملانوسیت‌های جداشده از پیش‌پوست نوزادان است و نیز ملانوسیت‌های افراد بزرگ‌سال پس از سه پاساژ دچار پیری سلولی، توقف تکثیر و در نهایت مرگ سلولی شدند، در حالی‌که ملانوسیت‌های جداشده از پیش‌پوست نوزادان بعد از پاساژ شش دچار پیری سلولی، توقف تکثیر و در نهایت مرگ سلولی شدند.

بررسی مارکرهای اختصاصی ملانوسیتی: نتایج حاصل از بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR ملانوسیت بودن سلول‌ها را تایید کرد. ایمونوسیتوشیمی: جهت تعیین ماهیت ملانوسیت‌های به‌دست‌آمده از پیش‌پوست و پوست پلک انسانی، سه آنتی‌بادی اختصاصی ضد HMB-45، Tyrosinase و MITF استفاده شدند. ملانوسیت‌های حاصل از پاساژهای سه و چهار که به‌خوبی خالص شده و اثری از کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها در آن‌ها نبود جهت بررسی ایمونو‌سیتوشیمی انتخاب شدند و بعد از تریپسینه‌شدن در پلیت‌های ۹۶ خانه با تراکم بسیار پایین ریخته شدند، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک در شکل ۳ تاییدکننده‌ی مارکرهای ملانوسیتی می‌باشد. واکنش زنجیره پلیمراز معکوس (RT-PCR): در این مطالعه سلول‌های حاصل از پاساژ سه و چهار که تراکم ۸۰-۷۰٪ داشتند و از نظر بیان ژن‌های PMEL، Tyrosinase و MITF بررسی شدند. نتایج RT-PCR در الکتروفورز بر روی ژل آگاروز نشان داد که در هر سه تکرار این ژن‌ها در ملانوسیت‌ها به‌طور مطلوب بیان شده‌اند این نتایج در شکل ۴ دیده می‌شود.

بحث

در چند دهه‌ی گذشته جداسازی و کشت انتخابی ملانوسیت‌های انسانی از پوست نوزادان و افراد بزرگ‌سال صورت گرفته است.[۱۶]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

کشت ملانوسیت‌ها که از سال‌ها قبل دنبال می‌شد با کارهای Eisenger که از یکی از مشتقات TPA به‌عنوان میتوژنی برای ملانوسیت‌ها استفاده کرد وارد مرحله‌ی جدیدی شد.[۱۰] Eisenger از PMA (از خانواده‌ی فربول‌استرهاست و میتوژنی 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 فربول‌استر 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 نگه داشت. در حالی در روش فاقد فربول‌استر 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 دوقطبی‌شدن 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 ملانوژنز در ملانوسیت‌ها را متوقف کرد.[۱۹]

این اثر در سلول‌های جداشده از ستیغ عصبی بلدرچین هموژن هم دیده شد که PMA در غلظت‌های بالا باعث قطع ملانوژنز و در غلظت‌های پایین باعث کاهش و تأخیر آن می‌شود.[۲۰] پس از آن کارهای متعدد دیگری برای جداسازی ملانوسیت‌ها از اپیدرم انجام شد، گروهی به‌مقایسه‌ی کشت ملانوسیتی حاصل از پوست افراد بزرگ‌سال و خردسالان پرداختند.[۲۱]

این گروه از ایزوبوتیل‌متیل‌گزانتین Isobutylmethylxanthine (IBMX) و ۵–فلوئوروویوراسیل 5-Fluorouracil (5-FU) استفاده کردند، اولی فربول‌استر است درحالی‌که دومی یک آنتی‌متابولیت با سیتوتو–کسیسیتی 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 به‌نام Bovine Pituitary Exteract (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 میتوژن‌های 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– افزاینده‌های داخل سلولی cAMP: هورمون تحریک‌کننده‌ی ملانوسیتی–آلفا (α-Melanocyte Stimulating Hormone, α-MSH)، فورسکولین (Forskolin)، هورمون تحریک‌کننده‌ی فولیلولی (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

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها استفاده شد، از محیط خارج کردن سلول‌های دیگر که برای ما آلودگی و مزاحم محسوب می‌شوند نیز یکی از چالش‌ها می‌باشد مثلا 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 مثلا 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.[۲۴و۲۵]

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 کاملا 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 دوکی‌شکل بودند، از لحاظ مرفولوژی همیشه سلول‌های کشت‌داده‌شده در محیط اول در حضور فاکتورهای رشد سالم‌تر به‌نظر می‌رسید درحالی‌که سلول‌های کشت‌داده‌شده در حضور فربول‌استر به‌طور عمده باریک‌تر و ضعیف‌تر بودند، شاید این به‌دلیل تکثیر بیش‌تر و سریع‌تر سلول‌ها در حضور فربول‌استر باشد که اجازه‌ی رشد زیاد و مناسب و توسعه به سلول‌ها را نمی‌دهد.

با این‌حال 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 تریپسینه‌کردن 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 پخش‌شده به فلاسک چسبیده با زمان‌بندی مناسب طوری عمل کردیم که بعد از جداشدن ملانوسیت‌ها، آن‌ها را به‌سرعت و با دقت از محیط خارج کردیم. این‌کار تا زمانی ادامه می‌یافت که دیگر اثری از سلول دیگری به‌جز ملانوسیت‌ها در محیط باقی نماند.

یکی دیگر از نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر پاساژ موفق ملانوسیت‌ها تا حداقل پنج مرتبه بود. این امر به‌واسطه‌ی ایجاد شرایط مناسب و خارج‌کردن 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 ماورای‌بنفش بر روی ملانوسیت‌ها و تولید ملانین، مطالعه‌ی مهاجرت ملانوسیت‌ها در پوست مصنوعی و نیز مسیرهای آنزیمی و غیرآنزیمی درگیر در تولید ملانین و دخیل در هموستاز سلولی.

پس از جداسازی و کشت اولیه‌ی ملانوسیت‌ها در مطالعه‌ی ما با توجه به خالص‌بودن این کشت می‌توان از آن در مطالعاتی برای درمان بیماران ویتیلیگو و دیگر ناهنجاری‌های وابسته به ملانوسیت‌ها استفاده کرد. به‌علاوه می‌توان از سلول‌های کشت‌داده‌شده در غنی‌کردن 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 Pulripotent Stem Cells, (IPSc از دیگر کاربردهایی است که پس از خالص‌سازی می‌توانند به‌عنوان 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

References

1. Murakami S, Miki Y. Human skin histology using high-resolution echography. *J Clin Ultrasound* 1989;17(2):77-82.
2. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and Atlas. 10th ed. 2002. p. 254-9, 309-22.
4. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. unqueira's Basic Histology: Text and Atlas. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2006. p. 347-60.
5. Alekseev AG, Banin VV, Nozdrin VI. Skin melanocytes. *Morfologiia* 2009;136(5):81-9.
6. Tosney KW. Long-distance cue from emerging dermis stimulates neural crest melanoblast migration. *Dev Dyn* 2004;229(1):99-108.
7. 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.
8. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 2002;50(2): 125-33.
9. Gordon PR, Mansur CP, Gilchrest BA. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol* 1989;92(4):565-72.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2005;23(2):105-61.
15. 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.
16. Gilchrest 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Nielsen HI, Don P. Culture of normal adult human melanocytes. *Br J Dermatol* 1984;110(5):569-80.
23. Halaban R, Alfano FD. Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes. *In Vitro* 1984;20(5):447-50.
24. 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.
25. Wilkins L, Gilchrest 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2013; Vol. 71, No. 3: 139-148 Original Article

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

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]
Kaikaoos 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

Abstract

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

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. Immunocytochemistary 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-17]