مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ۱۹-۹

بررسی ویژگی‌های چسبندگی و تکثیری جمعیت‌های مختلف سلول‌های اپیدرمی فولیکول مو در محیط کشت

احمد قارزی Ph.D.[1*]، کالین جاهودا Ph.D.[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه دورهام، انگلستان
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahgharzi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۲۴

چکیده

هدف: "فرضیه‌ی فعال شدن بالژ" در زمینه‌ی چرخه‌ی فولیکول مو اخیرا توجه زیادی را به خود جلب کرده است. یکی از جنبه‌های این فرضیه این است که سلول‌های پیش‌ساز اپیدرمی موجود در قاعده‌ی فولیکول سلول‌های تقسیم شونده‌ی موقتی هستند که طول فاز رشد فولیکول را محدود می‌کنند. در این مطالعه، الگوی تکثیر این سلول‌ها بررسی و با سلول‌های اپیدرمی مستقر در بخش بالای فولیکول مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: برای این کار سلول‌های اپیدرمی ناحیه‌ی پایینی و ناحیه‌ی بالایی فولیکول ویبریسا جدا شده و در محیط کشت رشد داده شدند و طی کشت ویژگی‌های رشد این دو نوع سلول برای چندین هفته اندازه‌گیری گردید.

نتایج: یافته‌های این تحقیق نشان داد که سلول‌های اپیدرمی پایینی نسبت به همتایان خود که از ناحیه‌ی بالای فولیکول مشتق شده بودند خیلی دیر به بسترچسبیده و بطور آهسته‌تر رشد می‌کنند. به علاوه، هر چند که اکثریت سلول‌های پائینی فولیکول قادر نیستند که برای مدت طولانی به رشد خود ادامه دهند اما برخی از آنها کلنی‌های سلولی بزرگی را تشکیل داده و توانستند برای بیش از ۱۰ هفته رشد کنند و تا چندین بار نیز بازکشت شدند.

نتیجه‌گیری: بر خلاف تصور رایج، در اینجا نشان داده شد که در محیط کشت، حداقل تعدادی از سلول‌های قاعده‌ی فولیکول، دارای توانایی تکثیری هستند که این توانایی از طول فاز رشد فولیکول بسیار بیشتر است و بنابراین خاتمه‌ی فاز رشد فولیکول نمی‌تواند ارتباطی به قابلیت تکثیر این سلول‌ها داشته باشد.

واژگان کلیدی: فولیکول مو، سلول‌های بنیادی، سلول‌های اپی‌تلیال، کشت سلول، تکثیر

مقدمه

فولیکول مو در پستانداران یک سیستم ترمیم شونده‌ی دینامیک و بی‌نظیری است که در سرتاسر حیاتش چرخه‌های تکراری متشکل از فاز رشد (anagen)، فاز پسرفت (catagen) و فاز استراحت (telogen) را پشت سر می گذراند (۱). این فعالیت چرخه‌ای جز ویژگی ذاتی فولیکول بوده و ناشی از برهم‌کنش های بین بخش های درمی و اپیدرمی فولیکول می‌باشد. در فولیکول موهای پوششی، بعد از اینکه ماتریکس اولیه (جمعیت سلول های اپیدرمی قاعده ی فولیکول) در طی رشد و نمو جنینی از پلاکود اپیدرمی تشکیل شد (۲)، نسل بعدی سلول های ماتریکس پیاز یا بولب (bulb) از ناحیه‌ی برآمدگی یا "بالژ" (bulge) مستقر در غلاف خارجی ریشه (outer root sheath) یا ORS منشا می‌گیرند (۳). سلول های موجود در بالژ از زمانی که کاتسرالیس و همکارانش (۴) نشان دادند که آن ها می‌توانند مواد رادیواکتیو را برای مدت طولانی در خود نگه دارند موضوع تحقیقات زیادی قرار گرفته‌اند. برعکس، مطالعات نشانه گذاری با مواد رادیواکتیو نشان داده که سلول‌های ناحیه‌ی ماتریکس بولب فاقد چنین قابلیتی هستند (۵). محققین براین باورند که توانایی یک سلول برای نگهداشت و حفظ طولانی مدت ماده‌ی نشاندار مبین این است که این سلول دارای چرخه‌ی سلولی آهسته است، و این یکی از ویژگی های سلول های بنیادی است. بعدها مطالعات دیگری نیز انجام و نشان داده شد که سلول های مستقر در بالژ دارای تمام ویژگی ها و مارکرهای مربوط به سلول های بنیادی هستند (۱۰-۶). بر طبق عقیده‌ی حاضر و تحت شرایط هومئوستازی طبیعی سلول های ناحیه ی بالژ در پاسخ به برهم‌کنش های مزانشیمی-اپیدرمی در شروع فاز رشد به سمت پایین مهاجرت کرده و بخش اپی‌تلیالی قاعده‌ی فولیکول مو را بوجود می‌آورند (۱۱). اما، آنها همچنین می‌توانند در پاسخ به جراحت وارده به اپیدرم پوست به طرق بالا نیز مهاجرت کنند (۱۲و ۱۳). در طی این مهاجرت سلول های بالژ نه تنها به انواع مختلف سلول های اپی‌تلیال تبدیل می‌شوند بلکه می‌توانند به انواعی از سلول های غیراپی‌تلیالی نیز تمایز یابند که این نیز ویژگی چندتوانه بودن آنها را آشکار می‌کند (۱۴).

در طول فاز رشد چرخه‌ی مو، اپی‌تلیال زاینده (germinative epithelial) یا GE و سلول‌های ماتریکس بولب از سلول‌های واقع در بالژ منشاء می‌گیرند ولی زمان و نحوه‌ی بکارگیری این سلول‌ها در ناحیه‌ی بولب هنوز مورد بحث است (۱۵). سلول‌های GE در انتهایی‌ترین بخش قاعده‌ی بولب فولیکول قرار داشته و در تماس مستقیم با پاپیلای درمی (dermal papilla) هستند (۱۶). این سلول‌های زاینده از نظر ویژگی‌های تمایزی بعنوان حدواسط بین سلول‌های بالژ و ماتریکس در نظر گرفته شده و آن‌ها هستند که به ماتریکس تکثیر شونده تبدیل می‌شوند (۱۷). سلول‌های ماتریکس متعاقبا بطور سریع تقسیم و تکثیر پیدا کرده و از زاده‌های آن‌ها لایه‌های متعدد و متحدالمرکز رشته‌ی مو ایجاد می‌گردد. سلول‌های ماتریکس در انتهای فاز رشد، از تقسیم و تکثیر باز ایستاده و متعاقبا فولیکول از طریق یک مرحله‌ی موقتی پسرفت وارد فاز استراحت می‌شود. گمان می‌رود که این قابلیت تکثیر سلول های ماتریکس بولب است که طول فاز رشد فولیکول مو را دیکته می‌کند و دلیل اینکه فولیکول‌های مناطق مختلف بدن دارای طول فاز رشد متفاوتی هستند این است که قابلیت تکثیر این سلول‌ها در آنها با هم فرق می‌کند. یکی از چالش‌هایی که در زیست‌شناسی مو وجود دارد این است که بفهمیم چه عاملی باعث می‌شود که سلول‌های اپی‌تلیال ماتریکس بولب به یکباره از تکثیر باز ایستاده و در آغاز فاز پسرفت شروع به پشت سرگذاشتن روند مرگ سلولی برنامه ریزی شده (apoptosis) می‌کنند (۱۸).

یکی از جنبه‌های "فرضیه‌ی فعال‌شدن بالژ" که در ابتدای دهه‌ی ۱۹۹۰ مطرح شد این است که دلیل توقف رشد مو در انتهای فاز رشد پایان یافتن قدرت تکثیر سلول‌های ماتریکس است و آن‌ها دیگر قادر به ادامه‌ی تقسیم سلولی نیستند. بر طبق این فرضیه سلول‌های اپیدرمی ماتریکس فولیکول مو در حقیقت سلول‌های "تقسیم شونده‌ی موقتی" (transientamplifying) یا TA هستند و با توجه به تعریف از پتانسیل تکثیری محدودی برخوردارند. این عقیده وجود دارد که تفاوت‌هایی که در طول فاز رشد در بین انواع فولیکول‌های مختلف دیده می شود ناشی از تفاوت در پتانسیل تکثیر این سلول‌های TA موجود در ماتریکس فولیکول ها است (۱۹). در فولیکول‌هایی مثل فولیکول‌های پوششی موش که دارای طول فاز رشد کوتاهی هستند، عقیده بر این است که در شروع فاز رشد جمعیتی از سلول‌ها از ناحیه ی بالژ به قاعده‌ی فولیکول مهاجرت کرده و این سلول‌ها هستند که منبع لازم برای تکثیر و ایجاد رشته‌ی مو را فراهم کرده و با پایان یافتن قدرت تکثیر این سلول‌ها، فاز رشد نیز خاتمه می‌یابد (۲۰). اما، فولیکول‌هایی همچون فولیکول‌های موی سر انسان و ویبریسا (موهای زیر و غیر پوششی پشت لب فوقانی بعضی پستانداران) دارای فاز رشد

طولانی‌تری هستند و از این رو به تامین و مهاجرت مداوم سلول از ناحیه‌ی بالژ نیاز دارند (۲۱). چیزی که سبب توقف مهاجرت سلول‌ها از بالژ بسمت بولب می‌شود هنوز ناشناخته مانده است چراکه در شروع فاز پسرفت زاده‌های بالژ که قبلا از طریق ORS بطرف بولب مهاجرت کرده بودند قادرند که دوباره به بالژ برگردند (۲۲).

در عمل فراهم آوردن اطلاعات در زمینه ی اینکه آیا سلول‌های ماتریکس واقعاً از نوع TA بوده و دارای پتانسیل تکثیر محدودی هستند یک هدف چالش انگیز است زیرا تعیین کمی قدرت تکثیر این سلول‌ها بطور مستقیم در *in vivo* مشکل است. با توسعه‌ی تکنیک ها برای کشت سلول‌های اپی‌تلیال فولیکول، محققین این توانایی را بدست می‌آورند تا ظرفیت تزاید این سلول‌ها را در محیط کشت (*in vitro*) مورد ارزیابی و سنجش قرار دهند. در این مطالعات، توانایی‌های سلول بنیادی اپیدرمی معمولا از روی پتانسیل کلنی‌زایی و یا قابلیت اتصال آنها به بستر مورد سنجش قرار می‌گیرد (۱۰ و ۲۳). اتصال سریع سلول های اپی‌تلیال به بستر به بیان بالای گیرنده‌های مخصوص ترکیبات خارج سلولی همچون کلاژن IV و لامینین در سطح سلول بستگی دارد (۲۴). برای مثال، نشان داده شده که در سطح سلول های بنیادی اینتگرین α6β1، یک گیرنده‌ی لامینین، وجود دارد (۲۵). با این وجود، اخیرا نشان داده شده که چسبندگی سریع سلول‌های اپی‌تلیال ضرورتا قابلیت زنده مانی بیشتر به سلول‌ها اعطا نمی‌کند (۲۶).

همانگونه که در این تحقیق نشان داده خواهد شد و قبلا نیز دیگران گزارش کرده‌اند، سلول‌های اپیدرمی ماتریکس واقع در ناحیه‌ی بولب فولیکول دارای پتانسیل کلنی‌زایی کمتری در مقایسه با سلول‌های اپیدرمی موجود در بخش بالایی فولیکول هستند (۲۷، ۲۸و۲۹). با وجود پیشرفت هایی که در کشت سلول‌های اپیدرمی فولیکول مو، از جمله ماتریکس، صورت گرفته (۳۰ و ۳۱) پتانسیل رشد و تکثیرسلول‌های اجدادی موجود در انتهای ماتریکس بولب به روشنی مشخص نشده است. بنابراین، ما در این مطالعه تلاش نمودیم تا ویژگیهای رشد و پتانسیل تکثیر این سلول‌ها را با سلول‌های بالژ واقع در ORS فولیکول ویبریسای موش صحرایی (rat) مقایسه نماییم.

مواد و روش‌ها

فولیکول‌های ویبریسا در میانه‌ی فاز رشد از لب بالای موش صحرایی نژاد PVC (inbred Piebald Virol Glaxo rat) با روش مرسوم جدا شدند (۳۲). بعد از زدودن بافت‌های همبند اطراف، فولیکول‌ها با دو برش عرضی به سه قطعه تقسیم شدند، بدین ترتیب که یک برش درست بالای پیاز یا بولب فولیکول و برش دیگر درست زیر نقطه‌ی ورود عصب به داخل کپسول کلاژنی فولیکول انجام شد. سپس قطعه‌ی میانی دور انداخته شد ولی قطعه‌های پایینی (حاوی سلول‌های اپیدرمی پائین فولیکول یا قاعده ی بولب) (End Bulb) یا EB، و قطعه‌ی بالایی (حاوی سلول‌های اپیدرمی بخش بالای فولیکول) (Upper Follicle) یا UF جداگانه به داخل ظرف های پلاستیکی ۳۵ میلی‌متری حاوی محیط کشت یکسان منتقل شدند (شکل ۱). برای پرهیز از تکرار و ساده نمودن توصیحات از این به بعد از علامت اختصاری EB به جای سلول‌های اپیدرمی پایینی قاعده‌ی بولب و از UF برای سلول‌های بالایی استفاده می‌گردد.

برای خارج کردن بافت اپیدرمی از UF، ابتدا با استفاده از سوزن سرنگ کپسول کلاژنی اطراف فولیکول به نرمی و آرامی پاره و جدا شد تا اینکه اجزا داخلی فولیکول که شامل یک مغز اپیدرمی و یک غلاف درمی (dermal sheath) ضخیم است آشکار گردند. این اجزا داخلی بعد از جدا شدن از کپسول کلاژنی به داخل پتری ۵ میلی‌متری حاوی ۲ میلی لیتر محلول کلاژناز/دیسپیس (گیبکو، انگلستان) (۵۰/۵۰) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منتقل شده و پتری مذکور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت این مدت غلاف درمی با کمک پنس‌های بسیار ریز از مغز اپیدرمی جدا گردید. مغز اپیدرمی باقیمانده بعد از آن به یک لوله‌ی مخروطی ۳۰ میلی‌لیتری برای تریپسینه شدن منتقل گردید.

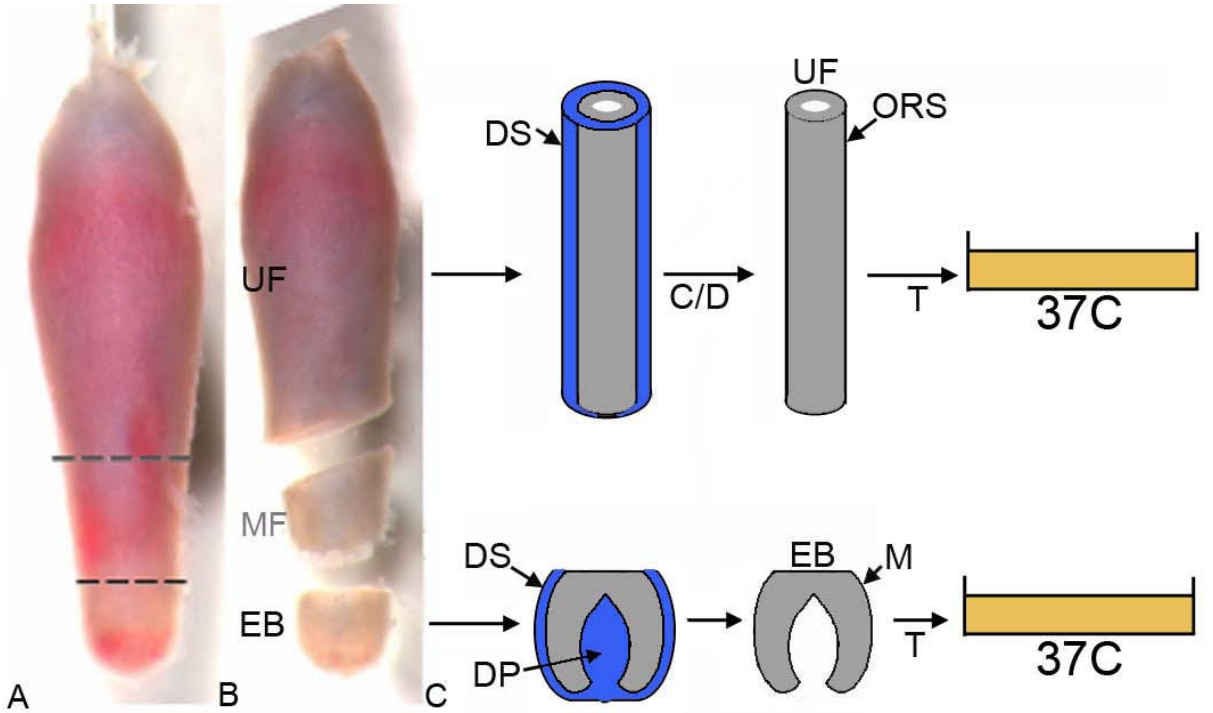
به منظور جدا نمودن جزء اپیدرمی از EB، ابتدا با کمک یک پنس ظریف لبه‌ی کپسول کلاژنی اطراف بولب گرفته شده و با استفاده از پنس دیگر قاعده ی بولب بطرف بالا فشار داده شده تا به این کار محتویات داخل کپسول که در اینجا شامل پاپیلای درمی مرکزی و غلاف سلول های اپیدرمی ماتریکس هستند از کپسول خارج گردد. سپس با احتیاط و دقت زیاد سلول‌های اپیدرمی از پاپیلای درمی جدا و برای تریپسینه شدن به لوله‌ی مخروطی ۳۰ میلی‌لیتری منتقل شدند.

عمل تریپسینه کردن سلول‌های اپیدرمی با محلول ۰/۰۵ درصد تریپسین (گیبکو انگلستان) خام برای مدت ۱ ساعت انجام گرفت. بعد از آن سوسپانسیون سلولی حاصله در دور ۱۸۰۰rpm و به مدت ۳تا ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. توده ی سلولی موجود در انتهای لوله (پلت) سپس در محیط کشت مخصوص سلول های

اپیدرمی مجددا به حالت سوسپانسیون درآمد. بعد از آن سلول ها شمارش شدند و به تعداد ($۲/۴\times۱۰^{۴}$) در هر ظرف کشت و بدون استفاده از لایه ی تغذیه کننده (3T3 feeder layer)، قرار داده شدند. ظروف کشت سپس در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار داده شدند.

محیط کشت مورد استفاده برای رشد سلول های اپیدرمی بر اساس روش رینولدز (۳۳) تهیه شد. این محیط شامل محیط کشت عاری از کلسیم (گیبکو انگلستان) حاوی آنتی بیوتیک ها به همراه ۲۰ درصد سرم گاوی جنینی (fetal calf serum) یا FCS، ۵ میکرو گرم/میلی‌لیتر ترنسفرین، ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیدروکورتیزون، ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاست (EGF)، محلول $۱۰^{-۹}$مولار سم وبا (تماما فراهم شده از سیگما، انگلستان) و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره‌ی هیپوفیزی جنین موش صحرایی بود (۳۳).

در این تحقیق تعداد ۱۲ ظرف کشت از هر کدام از سلول‌های اپیدرمی EB و UF به روش فوق تهیه و در انکوباتور به مدت ۴تا ۸ روز بدون هیچ گونه تماسی گذاشته شد. بعد از این زمان ظروف مذکور از انکوباتور خارج و در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست اینورت مورد مشاهده قرار گرفتند و در هر ظرف تعداد ۵تا ۷ کلنی انتخاب و با کمک قلم مخصوص نشانه گذاری شدند. بعد از آن ظروف کشت بطور مرتب در فواصل ۲تا ۳روز در زیر میکروسکوپ با عدسی × ۱۰ مشاهده و با استفاده از یک گراتیکول مدرج نصب شده بر روی عدسی چشمی قطر کلنی‌های علامت گذاری شده اندازه گیری گردید. کار اندازه‌گیری تا زمانیکه محیط کلنی‌ها بهم می‌رسیدند ادامه می‌یافت (این زمان بین ۳۰ تا ۸۰ روز در تغییر بود). بعد از این مرحله سلول‌ها بازکشت شده (پاساژ داده شده) و به فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربع منتقل شدند.



شکل ۱: نمایی شماتیک از چگونگی ایجاد برش در فولیکول های ویبریسا برای استفاده در کشت. (A) برش عرضی فولیکول ویبریسا و تبدیل آن به سه قطعه. یکی از برش ها درست در بالای بولب و دیگری درست زیر محل ورود عصب اصلی به فولیکول. (B) قطعه ی پائینی فولیکول یا قاعده ی بولب و بخش بالایی فولیکول برای کشت نگهداری شده و قطعه ی میانی دور انداخته شد. (C) بعد از برداشت مکانیکی کپسول کلاژن، غلاف درمی بخش بالایی فولیکول از غلاف خارجی ریشه بوسیله ی محلول کلاژناز/دیسپیس جدا گردید. در مورد قطعه یا بخش پایینی، بخش اپیدرمی از غلاف درمی و پاپیلای درمی با کمک پنسهای ظریفی جدا شد. اپی‌تلیوم غلاف خارجی ریشه‌ی بخش بالایی فولیکول و بخش اپیدرمی قاعده‌ی بولب سپس هر دو تریپسینه شدند تا سلول های منفرد ایجاد گردد و این سلول های منفرد سپس بطور مجزا در محیط کشت مخصوص سلول های اپیدرمی رشد داده شدند. [EB= قطعه‌ی پایینی فولیکول یا قاعده ی بولب، UF= بخش بالایی فولیکول، MF= قطعه‌ی میانی فولیکول، DS= غلاف درمی، DP= پاپیلای درمی، ORS= غلاف خارجی ریشه، C/D= محلول کلاژناز/دیسپیس، T=تریپسینه کردن، M= بخش اپیدرمی پایین فولیکول].

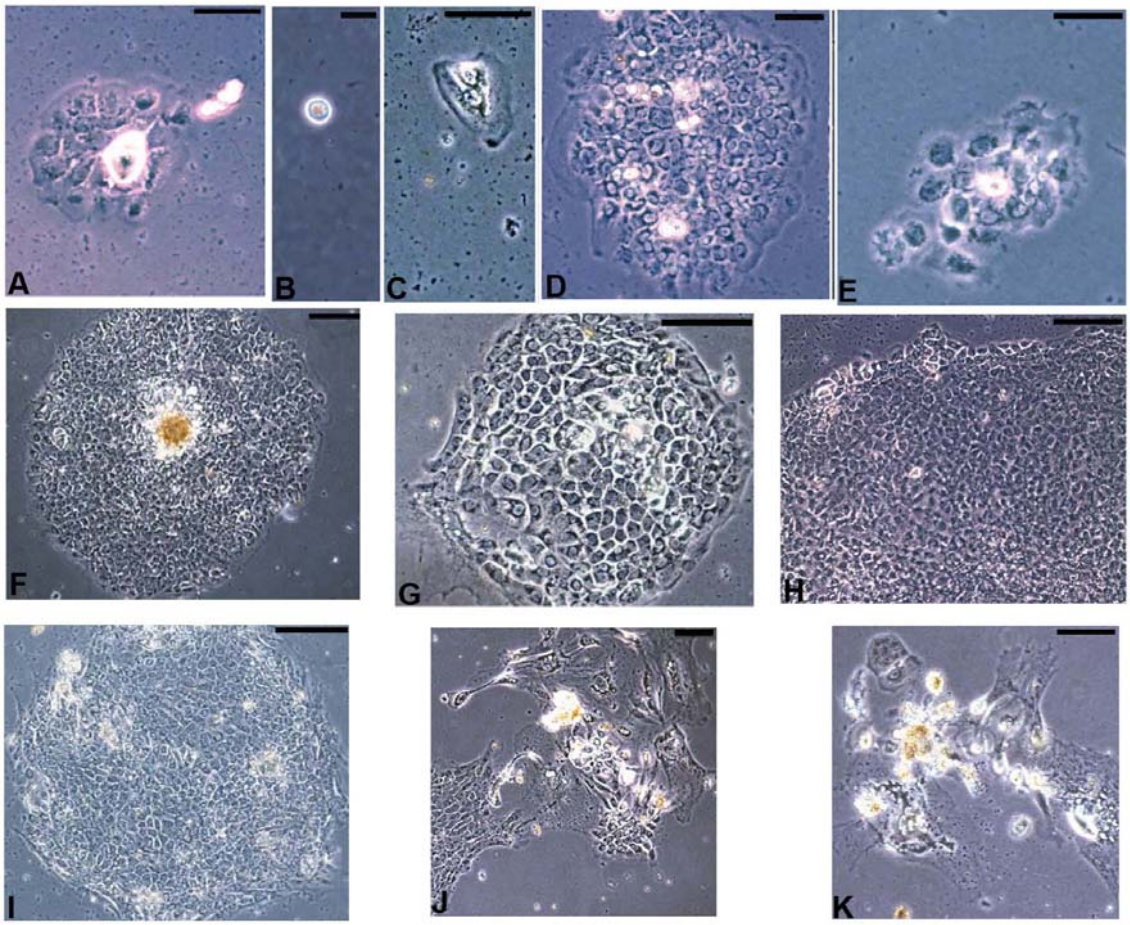
برای مشاهده‌ی بهتر کلنی‌ها، از هر یک از دو نمونه در مراحل مختلف چند ظرف کشت خارج و با محلول گیمسا (محلول ۲۰ بار رقیق شده از محلول ۸ در هزار ذخیره) رنگ‌آمیزی شدند. همچنین برای اینکه مشخص گردد عمل تقسیم سلولی در کدام ناحیه از کلنی انجام می‌گیرد در چند مورد کلنی‌ها با برمودزکسی‌یوریدین نشاندار (BrdU) نشانه‌گذاری شدند. برای این کار بعد از دور ریختن محیط کشت از روی کلنی‌ها، ۲ میلی‌لیتر MEM حاوی ۱۰میکرومول بر لیتر BrdU (سیگما انگلستان) به ظروف کشت حاوی کلنی اضافه گردید و ظروف فوق برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوابانده شدند. بعد از این مدت محیط کشت حداقل (Minimum Essential Medium) یا MEM حاوی BrdU را از روی سلول‌ها دور ریخته و ۲ میلی‌لیتر محیط MEM تازه به سلول‌ها اضافه شد. ظروف مذکور سپس به مدت ۱۰تا ۱۵ دقیقه مجددا در همان دما قرار گرفتند. بعد از آن محیط روی سلول ها خارج شده و سلول‌ها برای مدت ۳۰تا ۴۵ دقیقه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در اتانول ۷۰ درصد (حاوی ۵۰ میلی مول بر لیتر گلیسین، pH=۲) تثبیت شدند. سلول‌های نشاندار شده سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس (Zeiss Axiovert 135) مورد مشاهده قرارگرفتند.

در مواردی تعدادی از ظروف کشت برای رنگ‌آمیزی با قرمز روغنی O (oil red O) (سیگما، انگلستان) آماده شدند. برای این کار پس از اینکه سلول‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه با فرمالین نمکی ۴درصد در دمای۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند، آنها برای۳۰ دقیقه در محلول اشباع شده‌ی قرمز روغنی O که با ایزوپروپانول/آب (سه/ دو) تهیه شده بود قرار گرفتند. سلول‌ها سپس با ایزوپروپانول۶۰ درصد شسته شده تا اینکه زمینه‌ی قرمز زدوده شود. متعاقبا سلولها با هماتوکسیلین مایر برای مدت زمان ۵ دقیقه رنگ شدند. سپس سلولها با آب مقطر شسته و با کمک اتانول در چند مرحله آب‌گیری گردیدند. در نهایت سلول ها با چسب پوشاننده، پوشیده شدند. تمام مراحل این تحقیق با توجه به پروتکول‌های تعریف شده و با رعایت موازین اخلاقی تایید شده برای کار روی حیوانات انجام گرفته است.

نتایج

در این تحقیق ۱۲ جفت (UF و EB) ظرف کشت از سلول‌های اپیدرمی تهیه و رفتار آنها در طول آزمایش مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. در هر دو سری از کشت‌ها سلول‌ها به بستر ظرف چسبیده و کلنی‌هایی تولید نمودند.

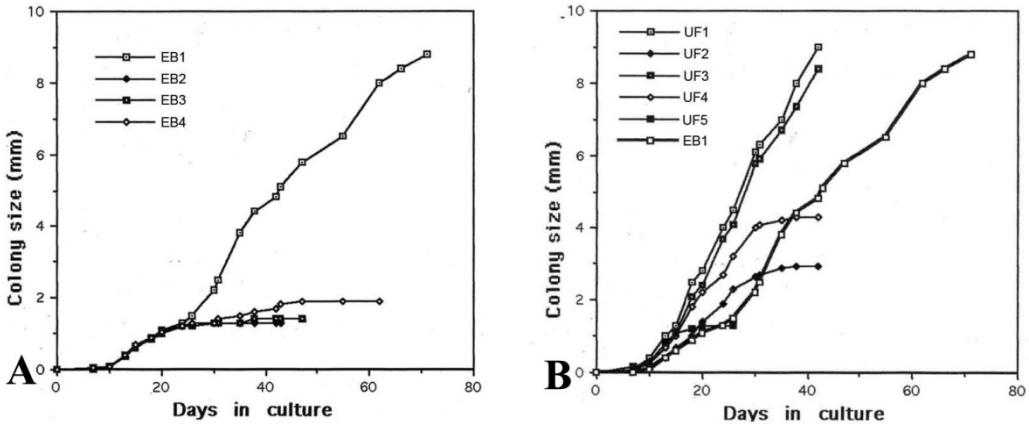
مشاهده‌ی ظروف کشت بین ۱ تا ۳ روز بعد از شروع کشت نشان داد که فقط در حدود ۱ درصد از سلول‌های UF به کف ظرف کشت چسبیده و در حال پهن شدن بودند. در روز چهارم، این سلول ها شروع به تکثیر کرده و کلنی‌های کوچکی با حدود ۲۰ سلول ایجاد نمودند (شکل ۲A). مشاهدات مشابهی که بر روی سلول های مشتق شده از EB انجام گرفت مشخص کرد که در همین زمان (۱ تا ۳روز) تعداد بسیار کمتری (تقریباً ۰/۰۱درصد) به بستر خود چسبیدند، اما برخلاف سلول های UF بسیاری از این سلولها هنوز بر روی کف ظرف پهن نشده و ظاهر گردی را به نمایش می‌گذاشتند (شکل ۲B). این پیشنهاد می‌کند که سرعت چسبندگی این سلول ها کمتر از همتایان خود در UF بودند. بررسی ظروف کشت EB چهار روز بعد از شروع کشت نمایان ساخت که بیشتر سلول های چسبیده دارای ظاهری پهن و کشیده بودند. تعداد کمی از این سلول ها پیشاپیش تقسیم سلولی نیز انجام داده در حالی که بسیاری از آنها هنوز بصورت سلول های واحد باقی مانده بودند (شکل ۲C). بعد از ۷ روز، کشت های حاصله از UF دارای کلنی‌های مشخصی بودند (شکل ۲D) در حالیکه در همین زمان سلول های EB حداکثر فقط چند تقسیم سلولی را پشت سرگذرانده بودند (شکل ۲E). بعد از ۱۲تا ۱۵روز در ظروف UF کلنی‌هایی با ظاهر گرد و با سلول های متراکم، هم در مرکز و هم در پیرامون کلنی، دیده می‌شدند (شکل ۲F). در همین زمان، در ظروف مشتق شده از ناحیه‌ی EB کلنی‌های بسیار کوچکتر ولی با سلول های بسیار متراکم در مرکز و پیرامون وجود داشت (شکل ۲G). اختلاف سرعت رشد بین کلنی‌های UF و UB با گذشت زمان نیز ادامه پیدا کرد، بطوری که در روز بیستم (شکل ۲H) کلنی‌های ظروف UF بسیار بزرگ تر از همتایان خود در ظروف حاصل از EB بودند (شکل ۲I). با گذشت زمان، در هر دو نوع کشت نشانه‌های تمایز نهایی مشاهده می‌شد به‌طوری که که جمعی از کلنی‌ها همچنان که سلول هایشان تمایز پیدا می کرد رشد خود را متوقف نمودند (شکل ۲J و ۲K). با این وجود، کلنی‌های باقی ماتده در ظروف UF بازهم سریعتر از کلنی‌های باقی مانده در کشت EB رشد می‌نمودند بطوریکه ۳۵ تا ۴۵ روز پس از شروع کشت مرز خارجی کلنی‌ها با یکدیگر تماس برقرار کرده و به هم ملحق می‌شدند. در مقایسه، عمل به هم رسیدن و الحاق کلنی‌ها در ظروف مشتق شده از EB ۷۰ تا ۸۰ روز طول می‌کشید.



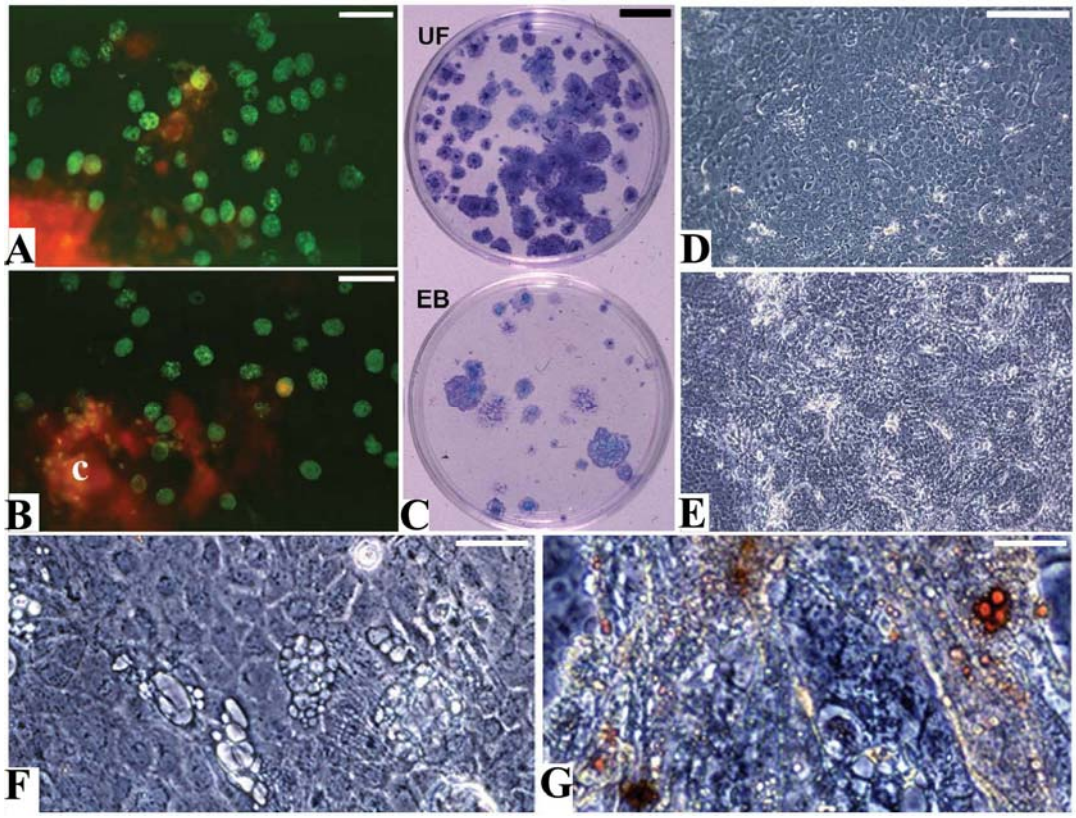
شکل ۲: مشاهدات میکروسکوپی تشکیل کلنی بوسیله‌ی سلول‌های اپیدرمی بخش بالایی فولیکول یا UF و بخش پائینی فولیکول یا قاعده ی بولب یا EB. تصاویر A, D, F, H, J مربوط به کشت سلول های حاصل از بخش بالایی می‌باشد که در مراحل زمانی مختلف تهیه شده است در حالی که تصاویر B, C, E, G, I, K مربوط به کشت سلول های حاصل از بخش پایینی می‌باشد. طی چهار روز از گذشت بذرپاشی سلولهای بالایی تقسیم شده و کلنی-های کوچکی را تشکیل داده‌اند، در حالی که سلول های پایینی سه روز (B) یا چهار روز (C) وقت نیاز داشتند تا پهن شده و شروع به تقسیم سلولی نمایند. متعاقبا، در روز هفتم کلنی‌های سلول های بالایی بزرگتر از کلنی‌های سلولهای پائینی بودند (D را با E مقایسه کنید). این وضعیت در روزهای ۱۵-۱۲ نیز دیده می‌شد (شکل F حاصل از سلولهای پایینی را با شکل G حاصل از سلولهای بالایی مقایسه کنید). مقایسه ی کلنی‌ها در روز بیستم نیز نشان داد که کلنی های حاصل از سلول های بالایی بزرگتر از سلول های پایینی بودند (شکل H و I). این مشاهدات نشان‌دهنده ی رشد سریعتر سلول های بالایی نسبت به همتایان پایینی می‌باشد. هر دو گروه از سلول ها کلنی‌هایی نیز تولید کردند که در آنها سلولها بعد از چندی از رشد باز ایستاده و روند تمایزیافتگی را شروع کردند (شکل J حاصل از سلول های پایینی و شکل K حاصل از سلول های بالایی است). خطوط نشانه: A/D/E/J/K برابر با ۱۰۰ میکرومتر، B/C برابر با ۵۰ میکرومتر، F/C برابر با ۱۵۰ میکرومتر و H/I برابر با ۲۰۰ میکرومتر.

اندازه‌گیری قطر تک تک کلنی‌ها در ۸ جفت از ظروف کشت در طی یک زمان طولانی تفاوت بین کشت های UF و EB را تصدیق کرد. در حدود ۹۰ درصد کلنی‌های ظروف EB دارای طول عمر کوتاهی بوده و فقط برای ۱۰ تا ۱۵روز رشد می‌کردند ولی درصد کمی از آنها قادر بودند تا ۷۰ روز و حتی بیشتر نیز رشد کنند (شکل ۳A). از نظر رشد، کلنی‌های UF در سه گروه قرار می‌گرفتند؛ کلنی‌های با طول عمر کوتاه، کلنی‌های با طول عمر متوسط، و کلنی‌های با طول عمر دراز (شکل ۳B). حدود ۲۵تا ۳۰ درصد کلنی‌های UF عمر کوتاهی (۱۰ تا ۱۵روز) داشتند، کلنی‌های با عمر متوسط که برای ۲۵ تا ۳۰ روز رشد می کردند حدود ۳۰ تا ۳۵ درصد از کلنی‌ها را تشکیل می دادند ولی تقریبا ۳۵ تا ۴۰ درصد از کلنی‌ها را کلنی‌های با عمر دراز تشکیل می‌دادند که به‌طور پیوسته رشد می‌کردند. مرز خارجی یا پیرامون این کلنی‌ها همیشه صاف بود و عمدتا از سلول های کوچک، گرد و متراکم تتشکیل می‌شدند.

همانطور که در بالا ذکر شد، کلنی‌های EB نسبت به همتایان UF خود، رشدشان را دیرتر شروع کرده و آهسته‌تر رشد می‌نمودند، اما آنها قادر بودند برای مدت درازی به این رشد آهسته‌ی خود ادامه دهند (شکل ۳B).



شکل ۳: ویژگی های رشد سلول های اپی‌تلیال فولیکول. (A) نمودار روند رشد چهار کلنی مشتق شده از کلنی‌های سلول های اپیدرمی پایینی را در یکی از ظروف کشت به عنوان نماینده نشان می‌دهد. سه کلنی رشد خود را حدود روز بیستم متوقف کردند، در حالی که یکی از کلنی‌ها برای بیش از ۷۰ روز به رشد خود ادامه داد. (B) نمودار روند رشد کلنی‌های سلول های اپیدرمی بالایی را در یکی از ظروف کشت بعنوان نماینده نشان می‌دهد. با نگاهی به نمودار A و B می توان چگونگی روند رشد کلنی‌های با عمر دراز دو ظرف را با هم مقایسه کرد. کلنی‌های حاصل از سلول های اپیدرمی بالای فولیکول با سرعت بیشتری نسبت به همتایان پایینی خود در محیط کشت رشد می‌نمودند.



شکل ۴: ویژگی‌های تکثیری سلول های اپیدرمی بالایی و پایینی فولیکول در محیط کشت. نشانه‌گذاری BrdU سلول های کلنی‌ها برای تشخیص تقسیمات میتوزی در آنها. اکثر BrdU در سلول های پیرامون کلنی دیده شده و به‌طور نسبی درصد سلول های نشاندار شده با BrdU در کلنی‌های حاصل از سلول های بالایی (A) بیشتر از درصد نشاندار شدن کلنی‌های حاصل از سلول های پایینی (B) بود. (C) ظروف رنگ‌آمیزی شده با گیمسا که تعداد و اندازه ی کلنی‌های اپیدرمی موجود در ظروف حاصل از بخش بالایی و بخش پایینی را نشان می دهد. (D) ظرف حاوی سلول های اپیدرمی متراکم وکانفلوئنت از بخش بالایی فولیکول. (E) ظرف حاوی سلول های متراکم و کانفلوئنت از بخش پایینی فولیکول. هر چند که در این دو ظرف (D و E) مورفولوژی سلول ها با هم مشابه است ولی سلول‌های پایینی برای رسیدن به حالت تراکم به زمان بسیار بیشتری نسبت به سلول های بالایی نیاز دارند. (F) سلول های واکوئوله‌ای که در ظروف کشت حاصل از بخش بالایی در حالت رنگ نشده با قرمز روغنی O دیده می شوند. (G) تصویر سلول های واکوئوله حاصل از بخش بالایی فولیکول بعد از رنگ آمیزی با رنگ قرمز روغنی O. خطوط نشانه: A/B برابر با ۵۰ میکرومتر، C برابر با ۶ میلی‌متر، D برابر با ۱۴۰ میکرومتر، E برابر ۷۰ میکرومتر، و F/G برابر با ۶۰ میکرومتر. [UF= سلول های بخش بالایی فولیکول و EB= سلول های بخش پایینی فولیکول].

آزمایشات BrdU که بعد از گذشت ۲۵ تا ۳۰روز از شروع کشت بر روی سلول‌ها صورت گرفت مشخص کرد که BrdU فقط در کلنی‌های با سلول‌های متراکم یافت می‌شود و در کلنی‌های با عمر کوتاه دیده نمی‌شود. کلنی‌های UF (شکل ۴A) نسبت به کلنی‌های EB (شکل۴B) واجد تعداد بیشتری سلول‌های BrdU- مثبت بودند و این منعکس کننده‌ی تفاوت‌های مشاهده شده در سرعت رشد کلنی است. در هر دو مورد، کراتینوسیت‌های نشاندار شده با BrdU عمدتا به نواحی پیرامونی کلنی‌ها محدود می‌شدند و این ماده‌ی نشاندار بندرت در سلول‌های واقع در مرکز کلنی دیده می‌شد.

ظروف کشت حاصل از UF و EB این قابلیت را داشتند که بازکشت شوند و در ظروف جدید به تراکم نهایی یا کانفلوئنت برسند. اما زمان بازکشت برای کشت های UF، ۳۰ تا ۴۰ روز بعد از بذرپاشی بود در حالی که این کار برای کشت های EB حدود ۷۰ روز طول می‌کشید (شکل۴C). در هر دو مورد، سلول ها حتی بعد از بازکشت شدن نیز از نظر سرعت تشکیل کلنی و سرعت رشد ویژگیهای منشا خود را منعکس می‌کردند. سلولهای UF بازکشت شده قادر بودند در ظروف جدید طی ۱۰تا ۱۵دوباره به حد تراکم نهایی برسند (شکل ۴D)، در مقابل سلولهای بازکشت شده ی EB، ۵۰ روز زمان نیاز داشتند تا بار دیگر به تراکم نهایی دست پیدا کنند (شکل ۴E). هر دو سری از کشت‌ها این قابلیت را داشتند که طی چند ماه برای چندین بار متوالی بازکشت شوند و هر بار در ظروف جدید به حد تراکم نهایی برسند. یکی از ویژگی های کشت های UF وجود سلول های واکوئوله بود (شکل ۴F) که با قرمز روغنی O (oil red O) رنگ می‌گرفتند (شکل ۴G). چنین سلول هایی هرگز در کشت های EB مشاهده نشد (شکل نشان داده نشده است).

بحث

این تحقیق نشان داد که در فولیکول مو جمعیت کوچکی از سلول‌های اپیدرمی واقع در ماتریکس بولب دارای قابلیت تولید کلنی در محیط کشت بودند. اما علاوه بر این، تحقیق حاضر نشان داد که سلول های EB زمان بیشتری برای چسبیدن به بستر نیاز دارند و دیرتر تقسیمات خود را شروع کرده و سرعت رشد کلنی‌های آنها نسبت به همتایانشان از UF آهسته‌تر بود. تعدادی از کلنی‌هایی EB دارای طول عمر درازی بودند و سلول‌های آنها این توانایی را داشتند که برای چندین بار بازکشت شوند، اما حتی بعد از باز کشت شدن نیز آنها همچون کشت اولیه سرعت تقسیمات پایین‌تری نسبت به سلول‌های حاصله از UF از خود به نمایش گذاشتند. این نتایج چند سوال را در ذهن متبادر می‌نماید: ۱) ارتباط بین توانایی سلول‌های اپی‌تلیال برای چسبیدن سریع به بستر و قابلیت کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی چیست؟ ۲) آیا سلول های بنیادی در بولب وجود دارند؟ و ۳) آیا طول فاز رشد چرخه ی فولیکول مو بوسیله‌ی ظرفیت تکثیر سلول‌های EB تعیین می‌شود؟

قابلیت کلنی‌زایی سلول‌های اپیدرمی نواحی مختلف فولیکول در شرایط *in vitro* بوسیله‌ی تعدادی از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۷، ۲۹، ۳۴، ۳۵ و۳۶). اما در اینجا ما نشان دادیم که تمام انواع سلولی با قابلیت تزاید و تمایز متفاوت در داخل بولب وجود دارند، چنان‌که کلنی‌های متفاوتی در کشت های حاصل از این ناحیه ایجاد شد. ما همچنین نمایان ساختیم که در میان این انواع سلولی، جمعیت کوچکی از سلول‌ها وجود داشتند که ظرفیت بالایی برای ایجاد کلنی از خود نشان می‌دادند و به نسبت از رشد آهسته‌ای برخوردار بودند. یک احتمال این است که سلول‌هایی با قابلیت تکثیر محدود متعلق به قسمت های بالایی ماتریکس بوده باشند در حالی که سلول های با قابلیت کلنی‌زایی بالا از ناحیه‌ی تحتانی بولب یا به‌عبارتی از ناحیه‌ی زاینده‌ی اپی‌تلیومی یا GE که به پاپیلای درمی متصل است مشتق شده بودند. این فرضیه به‌وسیله ی این حقیقت تایید می‌شود که در مطالعات سایرین (۲۷، ۲۹، ۳۱و ۳۷) این ناحیه‌ی از بولب از آزمایشات حذف می‌شده چرا که این محققین از موی کنده شده از فولیکول برای کشت استفاده کرده‌اند و این ناحیه (GE) در هنگام کندن مو به همراه آن بیرون نمی‌آید. اما محققینی که در آزمایشات آنها سلول‌های تحتانی بولب یا GE وجود داشته تصدیق کرده‌اند که سلول‌های بولب می توانند تحت شرایط مناسب در محیط کشت کلنی تشکیل دهند (۱۶، ۲۸، ۳۵ و ۳۸). یک گروه از محققین که روی کلنی‌زایی سلول‌های اپیدرمی نواحی مختلف فولیکول ویبریسا کار می‌کردند برای اولین بار گزارش داده‌اند که ۹۵ درصد از کل کلنی‌های تشکیل شده از نواحی مختلف فولیکول مو از ناحیه‌ی "بالژ" مشتق شده و فقط کمتر از ۵ درصد از کلنی‌ها از سلول‌های ناحیه ی بولب بوجود می‌آیند، ولی با این وجود کلنی‌های مشتق شده از ناحیه‌ی بولب می‌توانند به دفعات متعدد بازکشت شوند (۲۸). بعدها همین گروه نشان دادند که تعداد سلول های کلنی‌زا در ناحیه ی بولب در مراحل مختلف چرخه‌ی فولیکولی متفاوت بودند (۲۱). یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، چند توانه

بودن آنها است و در همین سال های اخیر محققین مشخص کرده‌اند که سلول های بولب در صورت پیوند شدن به پشت موش های بدون تیموس می توانستند به تمام انواع سلول های پوستی و فولیکولی تمایز پیدا کنند (۳۹).

یکی از جنبه‌های سلول های بنیادی ظرفیت نامحدود آنها برای خود-نوسازی (self-renewal) و داشتن چرخه‌ی سلولی آهسته در *in vivo* است. به‌طور کلی چنین تصور می‌شود که سلول‌های کراتینوسیت بنیادی ویژگی‌های متفاوتی را در محیط کشت به نمایش می‌گذارند، به این ترتیب که به سرعت به بستر خود چسبیده، از قدرت کلنی‌زایی بالایی برخوردارند و به سرعت تکثیر می‌شوند (۲۳ و ۴۰). اما نظر فوق که برای مدت مدیدی مورد قبول محققین بود اکنون بتدریج به چالش کشیده می‌شود (۴۱) و عملا پیشنهاد شده که اتصال سریع به کلاژن و کلنی‌زایی بالا ضرورتا ویژگی تکثیر بالا در *in vitro* یا قدرت نوسازی بیشتر در *in vivo* را به سلول ها اعطا نمی‌کند (۲۶). در حقیقت، نشان داده شده که کراتینوسیت‌هایی که ویژگی چسبندگی و قدرت کلنی‌زایی کمتری دارند، در شرایط *in vitro* عمر طولانی داشته و از قابلیت نوسازی بهتری برخوردار می باشند (۲۶). شاید جالب‌ترین یافته‌ی این مطالعه این باشد که سلول های اپی‌تلیال بولب که کلنی تشکیل می‌دهند، از جمله آن‌هایی که دارای طول عمر بلند و با رشد آرام بودند، خیلی آهسته به بستر می‌چسبیدند و میل زیادی برای شروع تقسیم از خود نشان نمی‌دادند. در حقیقت، آهسته بودن این فرآیند چسبیدن و شروع تقسیم چنان بود که گاهی این احساس ایجاد می‌شد که این سلول‌ها قرار نیست که رشد کنند چراکه تا دیر زمانی بصورت سلول‌های گرد و بی تغییر در کف ظرف دیده می‌شوند. ولی هنگامی که ظروف کشت برای چند روز بعد مورد مشاهده واقع می‌شدند مشخص می‌شد که این سلول ها رشد را خود را آغاز کرده‌اند. این موضوع جالب است چراکه به نظر می‌رسد تاییدی بر این ادعا است که سلول های بنیادی می‌توانند در خارج از بدن رفتار متفاوتی از خود نشان دهند (۲۶).

یکی از مشاهداتی که در این تحقیق صورت گرفت ولی در مطالعات قبلی (۲۸) مورد توجه قرار نگرفته است سرعت رشد کلنی‌ها است. برخلاف مطالعات قبلی، ما در این تحقیق از لایه‌ی تغذیه استفاده کننده نکردیم و دریافتیم که کلنی‌های ناحیه‌ی بولب آهسته تر از کلنی‌های UF رشد می‌کنند و این سرعت رشد آهسته در سرتاسر دوره‌ی کشت سلول‌ها در محیط کشت تداوم داشت. اگرچه ما نسبت سلول های تکثیر شونده را در کلنی‌های مختلف مورد سنجش قرار ندادیم اما با روش ایمنوهیستوشیمی و با استفاده از BrdU نشان دادیم که در کلنی‌های بولب در هر لحظه تعداد کمتری سلول در حال تکثیر نسبت به کلنی‌های UF وجود دارد و این خود دوباره آهسته بودن فرآیند رشد در کلنی‌های بولب را تایید می کرد. البته یک مطالعه‌ی جامع کمی از تکثیر سلولی لازم است در آینده مد نظر قرار گیرد اما یافته‌های ما پیشنهاد می کند که کلنی‌های با رشد آهسته واجد سلول‌های شبه بنیادی بودند. این پیشنهاد با طبیعت سلول‌های بنیادی در شرایط *in vivo* نیز مطابقت دارد چراکه طبق تعریف سلول‌های بنیادی سلولهایی هستند که در *in vivo* از چرخه‌ی تقسیم آهسته و طول عمر زیادی برخوردار هستند. این‌که در این تحقیق نشان داده شد حتی بعد از بازکشت نیز سلول‌های حاصل از UF نسبت به سلول های EB رشد بیشتری دارند منعکس کننده‌ی تفاوت های ذاتی است که بین این دو جمعیت از سلول‌ها وجود دارد. مشاهده‌ی سلول‌های لیپیددار در کشت‌های UF و عدم وجود آنها در نمونه های EB تاییدی بر نتیجه‌گیری فوق می‌باشد. ناحیه‌ی UF واجد غدد چربی است و لذا این سلول ها، سلول‌های اجدادی هستند که در حال پشت سرگذراندن روند تمایز به سلول‌های چربی (sebocyte) می‌باشند.

در این مطالعه پس از مدتی ادامه‌ی اندازه‌گیری قطر کلنی‌های با رشد آهسته‌ی بولب غیرممکن می‌شد چراکه کلنی‌ها بهم متصل و در هم ادغام می‌شدند. ولی از آنجا که ما بعضی از ظروف کشت را ۸۰ روز پس از بذرپاشی بازکشت کردیم این به‌طور قطعی نشان می دهد که این سلول ها حداقل قادرند برای مدت ۸۰ روز در محیط کشت رشد و تکثیر یابند. حتی اگر بپذیریم که قدرت تکثیر این سلول ها فقط ۸۰ روز است این مدت باز هم از طول فاز رشد فولیکول های ویبریسا که در حدود ۶۰ روز است (۴۲) بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه ما معتقدیم که جمعیت کوچکی از کلنی‌های با عمر دراز حاصل از بولب دارای ظرفیت تکثیر بیشتر از آن چیزی هستند که برای سلول‌های "تقسیم شونده‌ی موقتی" (TA) تعریف شده است. نتایج حاصل از این مطالعه به همراه اطلاعات ارائه شده توسط اوشیما و همکاران

(۲۱) پیشنهاد می‌کند که حداقل در مورد فولیکول‌های ویبریسا، طول فاز رشد فولیکول به‌وسیله ی قابلیت تکثیر سلول‌های موجود در ماتریکس بولب محدود و تعیین نمی‌شود و این‌که از دست رفتن ظرفیت تکثیری دلیل توقف فاز رشد در فولیکول‌های ویبریسا نیست. به عبارتی سلول‌های اپیدرمی موجود در انتهای قاعده‌ای فولیکول (EB) سلول‌های TA نیستند بلکه ویژگی های را نشان می‌دهند که بیشتر شبیه سلول‌های بنیادی است.

منابع

1. Chase HB. Growth of the hair. Physiol Rev, 1954; 34(1): 113-126.

2. Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. Cell Stem Cell. 2008; 3(1): 33-43.

3. Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM. Hair follicular stem cells: the bulge activation hypothesis. J Invest Dermatol. 1991; 96(5): 77S-78S.

4. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell. 1990; 61(7):1329-1337.

5. Lavker RM, Cotsarelis G, Wei ZG, Sun TT. Stem cells of pelage, vibrissae, and eyelash follicles: the hair cycle and tumor formation. Ann N Y Acad Sci. 1991; 642: 214-224.

6. Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. J Invest Dermatol. 2003; 121(5): 963-968.

7. Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, Hengge U, et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. Exp Dermatol. 1999; 8(1): 80-88.

8. 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; 95(7): 3902-3907.

9. Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. J Cell Sci. 1998; 111 (21): 3179-3188.

10. Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, et al. Characterization and isolation of stem cellenriched human hair follicle bulge cells. J Clin Invest. 2006; 116(1): 249-260.

11. Morris RJ, Liu YL, Marles Z, Yang C, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nat Biotechnol. 2004; 22(4): 411-417.

12. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, et al. Self renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. Cell. 2004; 118(5): 635-648.

13. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. Cell, 2000; 102(4): 451-461.

14. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(15): 5530-5534.

15. Panteleyev AA, Jahoda CA, Christiano AM. Hair follicle predetermination. J Cell Sci. 2001; 114(19): 3419-3431.

16. Reynolds AJ, Jahoda CA. Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is activated in vitro by the presence of hair dermal papilla cells. J Cell Sci. 1991; 99 (2): 373-385.

17. Legue E, Nicolas JF. Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. Development. 2005; 132(18): 4143-4154.

18. Paus R, Muller-Rover S, Botchkarev VA. Chronobiology of the hair follicle: hunting the "hair cycle clock". J Investig Dermatol Symp Proc. 1999; 4(3): 338-45.

19. Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, et al. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. J Invest Dermatol. 1993; 101(1): 16S-26S.

20. Hanakawa Y, Li H, Lin C. Stanley JR, Cotsarelis G. Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle. J Invest Dermatol. 2004; 123(5): 817-822.

21. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell. 2001; 104(2): 233-45.

22. Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. Cell. 2011; 144(1): 92-105.

23. Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, Fishbaugh J, et al. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. Exp Dermatol. 2001; 10(1): 45-54.

24. Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. Exp Cell Res. 1998; 244(1): 184-195.

25. Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. J Invest Dermatol. 2000; 114(3): 413-420.

26. Strachan LR, Scalapino KJ, Lawrence HJ, Ghadially R. Rapid adhesion to collagen isolates murine keratinocytes with limited long-term repopulating ability in vivo despite high clonogenicity in vitro. Stem Cells. 2008; 26(1): 235-243.

27. Moll I. Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicles. J Invest Dermatol. 1995; 105(1): 14-21.

28. Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(15): 7391-7395.

29. Moll I. Differential epithelial outgrowth of plucked and microdissected human hair follicles in explant culture. Arch Dermatol Res. 1996; 288(10): 604-610.

30. Limat A, Noser FK. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. J Invest Dermatol. 1986; 87(4): 485-488.

31. Jones LN, Fowler KJ, Marshall RC, Ackland ML. Studies of developing human hair shaft cells in vitro. J Invest Dermatol. 1988; 90(1): 58-64.

32. Gharzi A, Abbasi M, Jahoda CAB. [Study of expression of α-SMA in dermal cells of skin appendages by immunohistochemistry]. Journal of Cell &Tissue. 2011; 1(2): 65-74. (persian).

33. Reynolds AJ. In vivo and in vitro studies of isolated and interacting dermal and epidermal components of the integument, in Department of Biological Sciences. 1989; University of Dundee.

34. Yang JS, Lavker RM, Sun TT. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. J Invest Dermatol. 1993; 101(5): 652-629.

35. Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. Cell. 1994; 76(6): 1063-1073.

36. Roh C, Tao Q, Photopoulos C, Lyle S. In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. J Invest Dermatol. 2005; 125(6): 1099-1105.

37. Wells J, Sieber VK. Morphological characteristics of cells derived from plucked human hair in vitro. Br J Dermatol. 1985; 113(6): 669-675.

38. Detmar M, Schaart FM, Blume U, Orfanos CE. Culture of hair matrix and follicular keratinocytes. J Invest Dermatol. 1993; 101(1): 130S-134S.

39. Claudinot S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, et al. Longterm renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(41): 14677-14682.

40. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(8): 2302-2306.

41. Kaur P, Li A, Redvers R, Bertoncello I. Keratinocyte stem cell assays: an evolving science. J Investig Dermatol Symp Proc. 2004; 9(3): 238-247.

42. Ibrahim L, Wright EA. The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions. J Embryol Exp Morphol. 1975; 33(4): 831-844.

Journal of Cell & Tissue (JCT)

Research Article

Spring 2012; 3(1): 9-19

A Survey of Attachment and Proliferative Characteristics of Different Population of Hair Follicle Epithelial Cells in Culture

Gharzi A, Ph.D.[1*], Jahoda C, Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad

2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Durham, UK

* Email corresponding author: ahgharzi@yahoo.com

Received: 19 Dec. 2011 Accepted: 13 Jun. 2012

Abstract

Aim: "The bulge activation hypothesis" has recently provided significant interest in the hair follicle cycle. One facet of this hypothesis suggests that the epithelial cells located at the base of the follicle are 'transient amplifying, that limit the duration of the follicle's growth phase. In this study, we investigate the pattern of cell division and proliferation of these cells and compared with those from upper part of follicle.

Material and methods: To fulfill this task, epidermal cells from lower and upper vibrissa follicles were cultured after isolation and growth characteristics of these two cell types were measured and recorded over a period of weeks.

Results: Data provided here demonstrated that epidermal cells from lower region of follicle normally attached to the substrate and started dividing more slowly than their counterparts from the upper part of the follicle. In addition, although the majority of the basal cells failed to grow for extended periods and underwent terminal differentiation, a small subset of these cells grew as large single colonies for more than 10 weeks and they were able to be passaged several times.

Conclusion: Contrary to the current dogma, we here showed that, at least in culture medium, some of basal hair follicle cells have a proliferative capacity which is much further than duration of the growth phase of follicle. Therefore, the termination of growth phase can not be related to the replicative potential of these cells.

Keywords: Hair follicle, Cell culture, Epithelial cells, Stem cells, Proliferation