مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۷۶ الی ۱۸۵

جداسازی سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی و بررسی فاکتورهای سلول بنیادی آن در شرایط آزمایشگاهی برای اولین بار در ایران

دکتر ملیحه نوبخت[۱]، دکتر نوروز نجف زاده[۲]، دکتر باقر پورحیدر[۳]، دکتر محمد قاسم گلمحمدی[٤]

[۱] دانشیار گروه بافت شناسی، محقق مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات مقاومت میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۲] نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

E-mail: n.najafzade@arums.ac.ir

[۳] استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران [٤] استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف: در طی دوران زندگی، فولیکول موهای بدن وارد سه فاز رشد آناژن، کاتاژن، تلوژن می‌شوند. سلول‌های بنیادی فولیکول مو در ناحیه Bulge که بخشی از غلاف ریشه خارجی است قرار دارند و سلولهای ناحیه Bulge، در فاز آناژن تکثیر می کنند و سلول‌های جدیدی ایجاد می کنند. چندین سال است که ناحیه Bulge منبع سلول‌های بنیادی محسوب می‌شود، با اینحال مطالعات کمی در مورد خصوصیات سلول‌های بنیادی مشتق از ناحیه Bulge فولیکول مو در موش صحرایی بصورت In Vitro انجام شده است. در این مطالعه، بیان فاکتورهای سلول‌های بنیادی را در ناحیه Bulge فولیکول موی موش‌های صحرایی را بررسی نمودیم.

روش کار: در این مطالعه از فولیکول های موی موش صحرایی، ناحیه Bulge جدا شدند و در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد کشت داده شدند. در سلولهای ناحیه Bulge فولیکول موی موش صحرایی یک هفته و سه هفته بعد از کشت، بیان Nestin، CD34 و K15 بررسی شدند. در این مطالعه از روشهای ایمونوسیتوشیمی و فلوسیتومتری استفاده شد.

یافته ها: نتیجه این مطالعه نشان داد که سلول‌ها پتانسیل تکثیری بالایی دارند و قبل از تمایز مارکرهای Nestin، CD34 را بیان کردند ولی مارکر K15 در سلول‌های بنیادی که متمایز نشده بودند، بیان نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان دادند که سلول‌های کشت یافته ناحیه Bulge فولیکول‌های موش صحرایی، می‌توانند فاکتورهای سلول‌های بنیادی را بیان کنند پس بنابراین این سلول‌ها می‌توانند سلول‌های بنیادی چند توان باشند.

کلمات کلیدی: Nestin، CD34، K15 ، ناحیه Bulge، فولیکول مو، موش صحرایی

دریافت: ۸۹/۸/۱۹ **پذیرش:** ۹۰/۱/۸

مقدمه

در طی دوران زندگی، بسیاری از ارگان‌ها در بدن، بعد از اینکه سلول‌های آنها بطور فیزیولوژیکی و یا در اثر آسیب از بین می‌روند توانایی ایجاد سلول جدید را دارند، اساسا توانایی ترمیم سلولی به سلول‌های بنیادی بالغ وابسته است [۱].

پوست بزرگترین ارگان بدن است که اعمال مهمی در بدن انجام می‌دهد که شامل تنظیم درجه حرارت، حفظ تعادل مایعات بدن می‌باشد. پوست دارای ضمایم بافتی همچون اپیدرم، فولیکول مو و غدد سباسه می‌باشد [۲].

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Nobakht M, Najafzadeh N, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Isolation of Rat Hair Follicle Stem Cells and in Vitro Study of Stem Cell Factors. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(2): 176-185. (Full text in persain)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

در سالهای گذشته، محققان وجود سلول‌های بنیادی را در فولیکول مو گزارش کردند. این سلول‌های بنیادی در یک ناحیه خاصی از فولیکول مو بنام Bulge قرار گرفته است. این ناحیه نزدیک اتصال عضله راست کننده مو و در زیر غده سباسه قرار گرفته است. سلول‌های Bulge خاصیت سلول‌های بنیادی اپیتلیال را دارند و سیکل تقسیم کندی دارند و می‌توانند بمدت طولانی در فولیکول مو باقی بمانند [۴،۳].

تحقیقات کوبایاشی[1] و همکارانش نشان داد که سلول‌های Bulge فولیکول موی موش صحرایی بعد از کشت قادرند ۹۵٪ از کل کلونی‌های سلولی را تشکیل دهند [۵،۴]. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بیان کننده nestin وCD34 در ناحیه Bulge فولیکول موی موش سوری و انسان قرار دارند و این پروتئین‌ها بعنوان نشانگر سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش و انسان مطرح هستند[۷،۶]. تاکنون مطالعه روی بیان این مارکرها در ناحیه Bulge فولیکول موی موش صحرایی انجام نشده است.

هدف از این مطالعه بررسی بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی همچون Nestin، CD34 و مارکر سلول‌های متمایز شده کراتینوسیتی K15 در ناحیه Bulge فولیکول موی موش صحرایی است.

روش کار

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نژاد ویستار نر به وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری می‌شدند. اتاق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود. شرایط نوری حیوانات به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. درجه حرارت اتاق در محدوده ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ می‌شد. آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد وجود داشت.

در این مطالعه ۲ گروه مورد بررسی قرار می‌گیرند:
گروه اول: سلول‌های بنیادی Bulge فولیکول‌های موش صحرایی پس از جداسازی و با روش ایمونوسیتوشیمی رنگ آمیزی شدند.
گروه دوم: فیبروبلاست‌های از نوع 3T3 feeder از انستیتو پاستور تهیه شد و بعنوان گروه کنترل منفی در رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی در نظر گرفته شد.

جدا کردن ناحیه Bulge فولیکول مو

موش ها در ظرف استوانه‌ای قرار گرفته و با انداختن پنبه آغشته به اتر[2] به داخل ظرف بیهوش می شدند. سپس صورت و سر حیوان توسط محلول ۱:۱ بتادین و پراکسید هیدروژن به مدت سه دقیقه شستشو داده شد و بدنبال آن موهای ناحیه صورت حیوان با ریش تراش، برداشته شده و با الکل ۷۰٪ تمیز و ضد عفونی می‌شد و در نهایت بافت لب بالای موش که حاوی سبیل بود بریده می‌شد.

بعد از برداشتن بافت لب بالا در زیر هود و محیط استریل، نمونه‌ها در DMEM/F12 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، آمفوتریسین B (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) بمدت نیم ساعت قرار داده می‌شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها در فسفات بافر، بافت‌های همبند اطراف فولیکول برداشته می‌شد. سپس نمونه‌ها به تکه‌های کوچک تقسیم و در محلول کلاژناز II/دیسپاز II (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت نیم ساعت انکوبه شدند.

بعد از نیم ساعت فولیکول‌های مو به وسیله پنس ظریف از بافت لب بیرون کشیده شدند و به پلیت‌های 35mm منتقل شدند و با استفاده از تیغ بیستوری کوچک برش عرضی از بالا و پایین ناحیه Bulge داده شد و ناحیه Bulge جدا شد بعد از برداشتن کپسول کلاژن اطراف ناحیه Bulge، این

[1] Kobayashi

[2] Ether

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

بخش با بافر فسفات شستشو داده شد و آماده کشت گردید.

کشت سلولی

سلولهای فیبروبلاست 3T3 feeder از انستیتو پاستور تهیه شد و در محیط DMEM (gibco)[1] حاوی ۱۰٪ FBS[2] کشت داده شدند.

کشت سلول‌های ناحیه Bulge طی مراحلی انجام گرفت[۸،۹].

ناحیه Bulge جداشده در محلول ۰/۰۱٪ اتیل دی آمین ترا اسیتیک اسید (EDTA) و ۰/۱۲۵٪ ترپیسین (gibco) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سلول‌های جدا شده با سرعت ۱۲۰۰rpm بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از جداسازی، سلول‌ها در پلیت‌هایی که قبلا با کلاژن نوع یک پوشیده شده بودند ریخته شدند.

سلول‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی ال-گلوتامین (٤، ۳ میلی‌مول)، آدنین (۰/۱۳۵ میلی‌مول)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلراتوکسین (سیگما 10^{-9})، هیدروکورتیزون (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، فاکتور رشد اپیدرمال (EGF)[3] (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، سیگما) و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند.

ایمونوسیتوشیمی

سلول‌ها با ٤٪ پارافرماآلدئید بمدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد فیکس شدند سپس بمدت ۱۵ دقیقه و سه بار با فسفات بافر شستشو داده شدند. نمونه‌ها بمدت نیم ساعت در محلول حاوی ۱۰٪ سرم بز(invitrogen)، 0,3 تریتون X-100 (Fluka) قرار داده شدند.

آنتی بادی‌های اولیه در غلظت‌های زیر بمدت یک شبانه روز در دمای ٤°C نگهداری شدند:

آنتی‌بادی پلی‌کلونال CD34 (Sigma,1:50)، آنتی بادی مونوکلونال نستین[4] (Sigma,1:200) و آنتی بادی مونوکلونال K15 (Sigma,1:100) استفاده شد و سپس سلول‌ها سه بار بمدت ۱۵ دقیقه با PBS[5] شستشو داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه با رقت‌های زیر بمدت دو ساعت در دمای اتاق استفاده شد:

از آنتی‌بادی های ثانویه کونژوکه با FITC با رقت 1:200 و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با Alexa flour 546 با رقت ۱:٤۰۰ بمدت دو ساعت در دمای اتاق استفاده شد. بعد از سه بار شستشو با PBS نمونه‌ها با میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus AX70) مورد بررسی قرار گرفتند.

فلوسایتومتری

سوسپانسیون سلول‌های ناحیه Bulge فولیکول مو، پس از فیکس شدن در فرمالدئید ۲٪ و PBS در بافر حاوی ساپونین ۰/۱٪ و سدیم آزاید ۰/۰۵٪ قرار داده شدند. سپس سلولها با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اولیه CD34 (Sigma,1:50)،آنتی بادی مونوکلونال نستین و آنتی بادی مونوکلونال K15 رنگ شدند و پس از شستشو با بافر فسفات، با آنتی‌بادی ثانویه کونژوکه و FITC[6] Alexa flour 546 بمدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ شدند. سپس با بافر شستشو شده و جهت پروسه فلوسایتومتری بررسی گردیدند. نمونه‌هایی که فقط با آنتی بادی ثانویه رنگ شدند به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

یافته ها

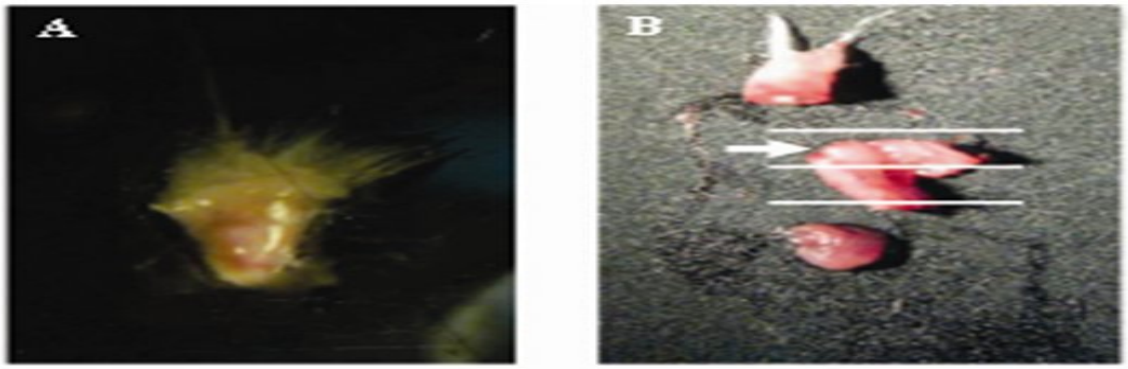
از روش تعدیل شده ای برای جداسازی راحت ناحیه Bulge استفاده شد که فولیکول موی سبیل موش و ناحیه Bulge در شکل۱ مشاهده می‌شود.

[1] Dulbecco's Modified Eagle Mediun
[2] Fetal Bovine Serum
[3] Epidermal Growth Factor
[4] Nestin
[5] Phosphate Buffer Solution
[6] Fluorescein Isothioyanate

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

تکثیر سلولی

مقایسه تصاویر شکل ۲ نشان می‌دهد که سلول‌های ناحیه Bulge از میزان رشد بالایی برخوردار بودند.

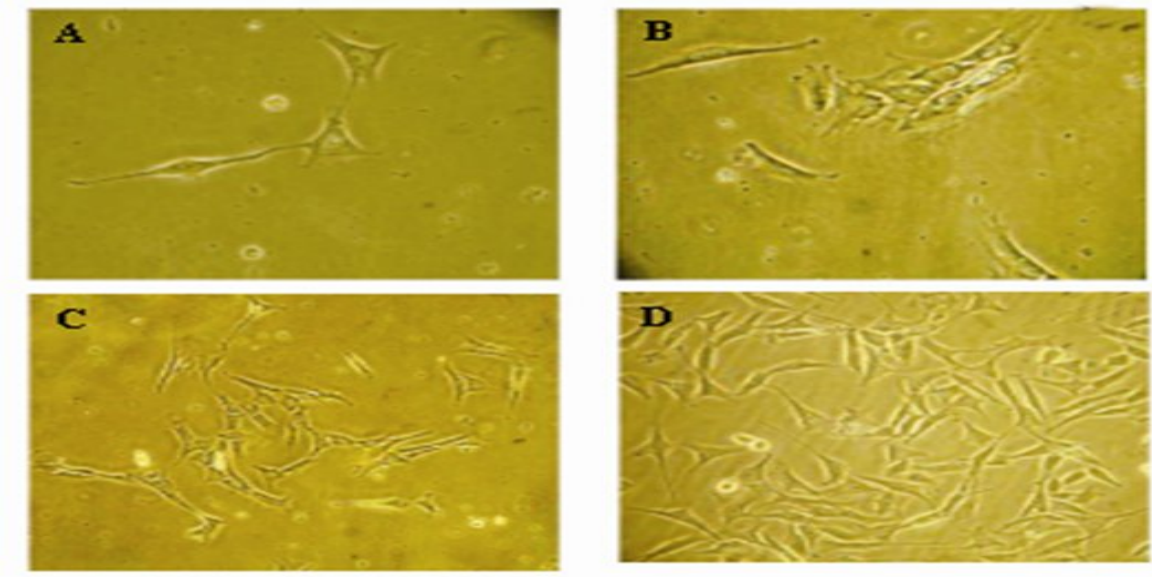


شکل۱.جداسازی ناحیهBulge از فولیکول موی سبیل موش صحرایی. فولیکول موی جداشده همراه با بافت همبند اطراف (A)و ناحیه Bulge با فلش نشان داده شده است(B)

همانطوریکه مشاهده می‌شود سلول‌ها در محیط کشت حاوی EGF, Cholera toxin تکثیر زیادی دارند. در پلیت‌هایی که میزان کمی سلول وجود دارد، بعد از یک هفته کشت سلولی، پلیت‌ها از سلول‌های بنیادی پر شده بود.

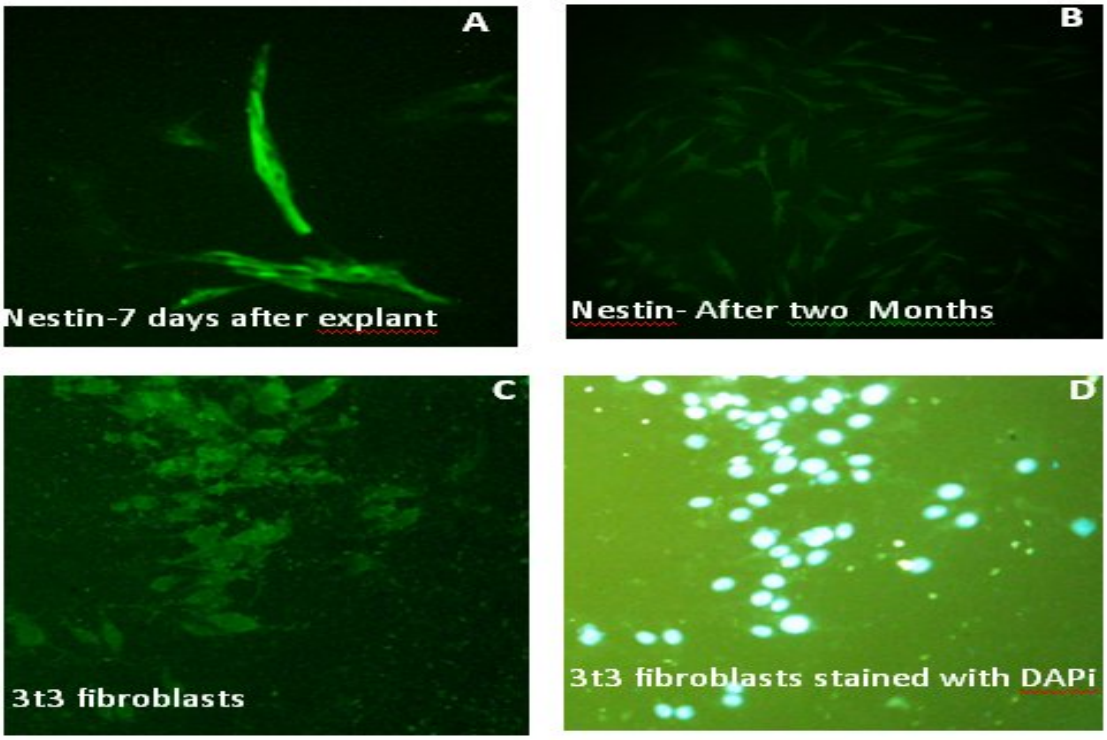
بیان nestin در سلول‌های Bulge

رنگ آمیزی‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد که سلول‌های Bulge که از کشت فولیکول موی موش صحرایی بوجود می‌آیند قبل از متمایز شدن، nestin را بیان می‌کنند (شکل۳.A) در حالیکه همین سلول‌ها بعد از دو ماه کشت دادن و پاساژ دادن (شکل۳.B) مشابه نمونه فیبروبلاست‌ها (شکل۳.Cو D) قادر به بیان nestin نیستند. سلول‌های bulge، در روش فلوسیتومتری هم، مارکر nestin را قبل از تمایز بیان می‌کردند (شکل٤).

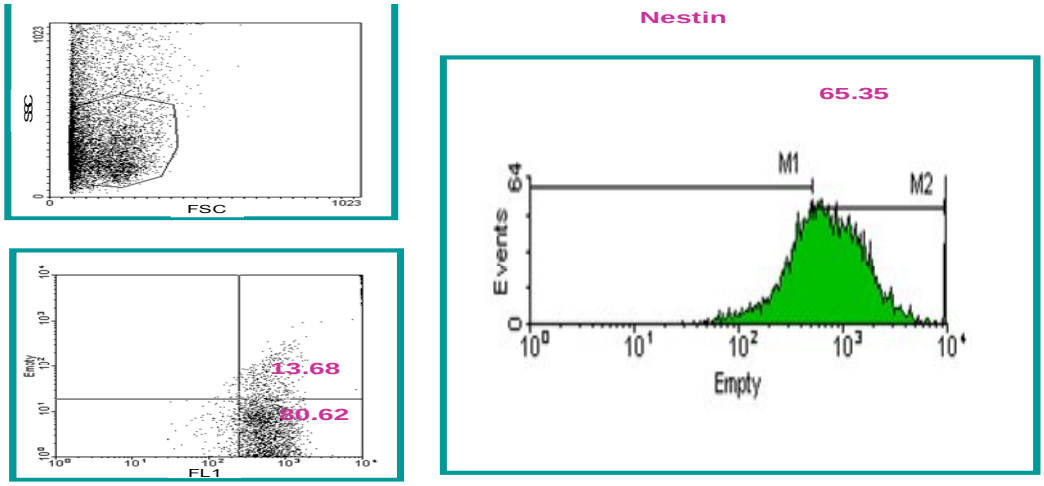


شکل۲.کشت سلولهای بنیادی Bulge. سلولهای بنیادی ناحیه Bulge بعد از تریپسینه شدن با تراکم سلولی کم کشت داده شدند (A). همان سلولها بعد از ٢٤ ساعت (B) و ٤٨ ساعت (C)و یک ماه(D) بعد ازکشت دیده می شوند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]



شکل۳. سلولهای Bulge، هفت روز بعد از کشت اولیه، nestin positive شده اند(A). بعد از دو ماه سلولهای متمایز شده Bulge (B)و فیبروبلاست های 3t3 (C) با مارکر nestin، رنگ نگرفته اند و شکل (D) سلولهای فیبروبلاست رنگ آمیزی شده باDAPi را نشان می دهد.

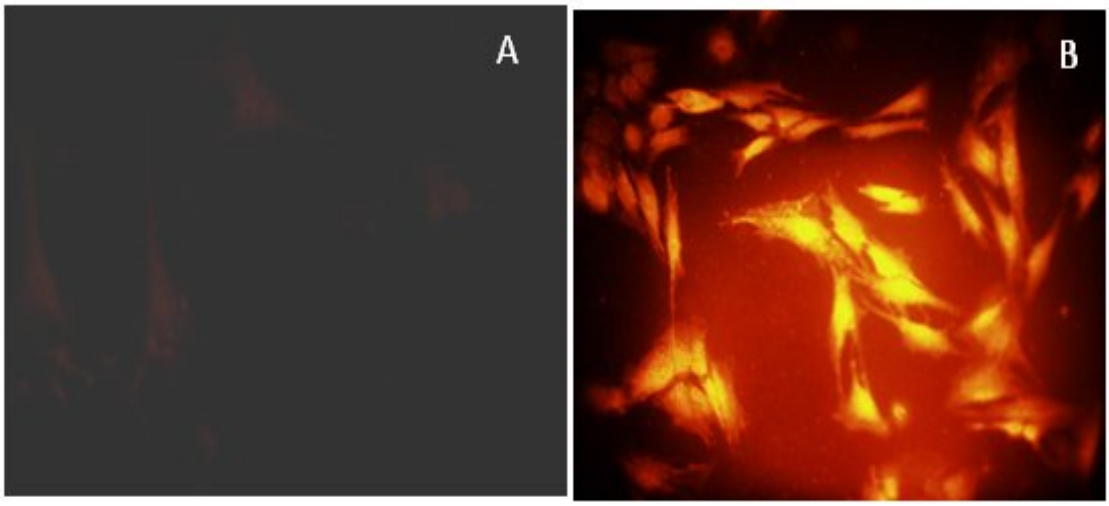


شکل٤. بیان نستین در روش فلوسیتومتری. جمعیت سلولی بر روی محورهای FSC وSSC دیده می شود، پس از گیت بندی و اعمال آن بر روی FL1 وهر یک از چهار قسمت، میزان nestin مثبت معادل 94,32 می باشد میزانM2 هم بر روی هیستوگرام 65,35 می باشد.

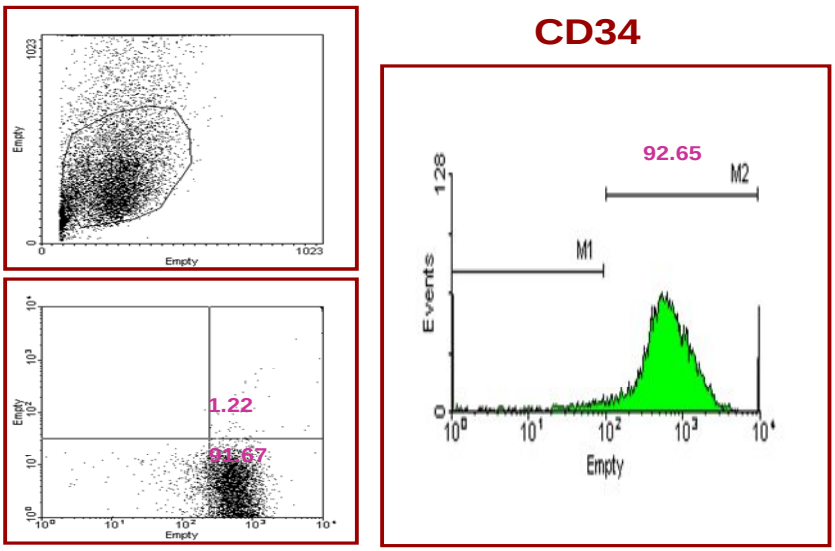
بیان مارکر CD34 در سلولهای Bulge

شکل‌های ۵ و ۶ بیان مارکر سلول‌های بنیادی CD34 را در سلول‌های ناحیه Bulge در دو روش ایمونوسیتوشیمی و فلوسیتومتری یک هفته بعد از کشت را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]



شکل۵. بیان آنتی ژن CD34 با روش ایمونوسیتوشیمی. (A)، عدم بیان CD34 را در گروه کنترل منفی فیبروبلاست 3T3 feeder را نشان می دهد درحالیکه در سلول های bulgeیک هفته بعد از کشت این پروتئین بیان می شود(B) (x 200) .



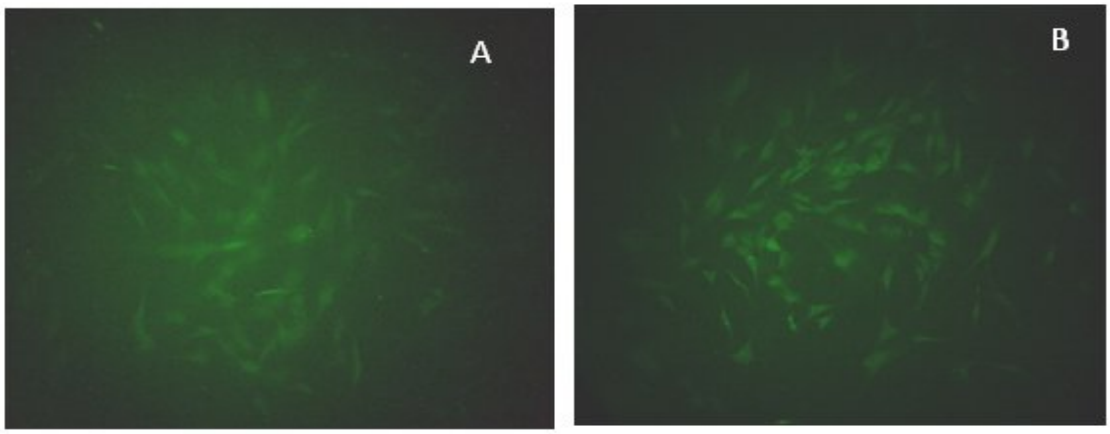
شکل۶. بیان CD34 در روش فلوسیتومتری. جمعیت سلولی بر روی محورهای FSC و SSC دیده می شود، پس از گیت بندی و اعمال آن بر روی FL1 و هر یک از چهار قسمت، میزان CD34 مثبت معادل ۹۲,۸۹ می باشد. میزان M2 هم بر روی هیستوگرام ۹۲,۶۵ می باشد.

بیان نشدن مارکر کراتینوسیت K15 در ناحیه bulge شکل‌های ۷ و ۸ عدم بیان مارکر K15 را یک هفته بعد از کشت در سلول‌های ناحیه bulge نشان می‌دهد.

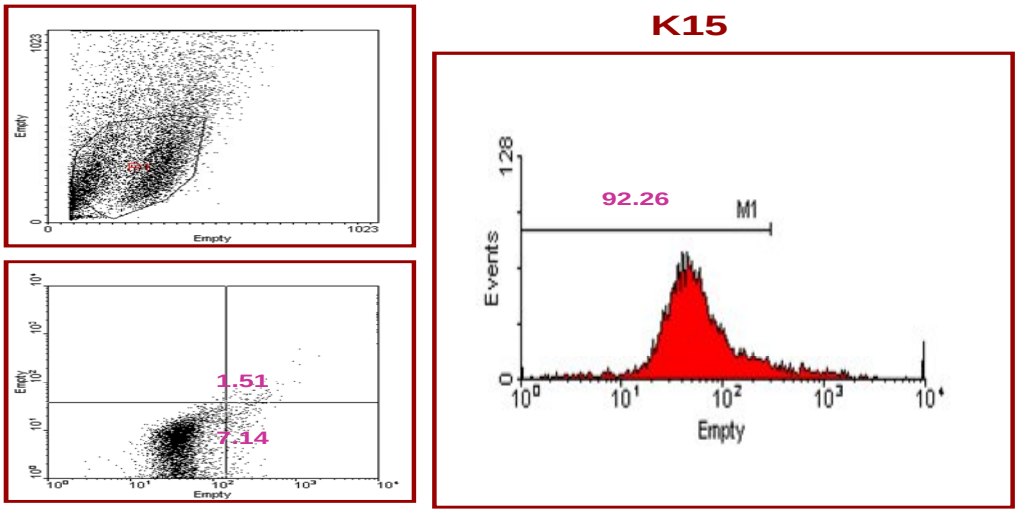
بحث

برای مطالعه سلول‌های بنیادی فولیکول مو، از فولیکول‌های سبیل موش صحرایی بیشتر استفاده می شود به لحاظ اینکه به راحتی قابل دسترسی و به اندازه کافی بزرگ است. مطالعات محققان روی ناحیه Bulge فولیکول موی انسان و موش نشان داده

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]



شکل۷. عدم بیان مارکر کراتینوسیت با رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی. K15 در سلولهای فیبروبلاست 3T3 feeder (A)و سلولهای bulge یک هفته بعد از کشت بیان نمی *شود (100x)(B).*



شکل۸. عدم بیان K15 در روش فلوسیتومتری. جمعیت سلولی بر روی محورهای FSC وSSC دیده می شود، پس از گیت بندی و اعمال آن بر روی FL1 و هر یک از چهار قسمت، میزان K15 مثبت معادل ۳,۷۳ می باشد میزانM1 هم بر روی هیستوگرام ۹۲,۲۶ می باشد، که منفی در نظر گرفته می شود.

است که سلول‌های بنیادی در داخل ناحیه Bulge قرار دارد [٤]. ناحیه Bulge نزدیک محل اتصال عضله راست کننده و زیر غده چربی قرار دارد [٤،٣].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های Bulge موش صحرایی را می‌توان جدا کرد و در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد کشت داد. آنالیز کلونی‌های تشکیل شده و تعداد سلول‌ها در این مطالعه نشان داد که پتانسیل تکثیری سلول‌های Bulge زیاد است. مطالعات قبلی روی سبیل موش صحرایی نشان داده است که در محیط کشت، سلول‌های این ناحیه، ۹۵٪ کلونی‌ها را تشکیل می‌دهد [۱۰،۵].

همچنین یکی از نتایج این مطالعه، بیان nestin در سلول‌هایی بود که یک هفته کشت داده بودند اما بعد از متمایز شدن بیان نمی‌شدند، این نتیجه نشان می‌دهد که سلول‌های بیان‌کننده nestin نه تنها در ناحیه Bulge فولیکول موی انسان و موش‌های ترنسژنیک قرار دارد [۱۲،۱۱] بلکه این سلول‌ها در ناحیه Bulge فولیکول موی موش صحرایی نیز قرار دارد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

یکی از نتایج مطالعه حاضر، بیان CD34 در سلول‌های ناحیه Bulge بود که موید نتیجه، تحقیقات پابلت و همکارانش روی فولیکول موی انسان است که نشان دادند که در غلاف ریشه‌ای خارجی و در ناحیه Bulge، CD34 بیان می‌شود و همچنین بیان این آنتی‌ژن سلول پروژنیتور نشان‌دهنده وجود سلول‌های بنیادی در ناحیه Bulge است [۱۴،۱۳]. سلول‌های ناحیه Bulge در موش‌های ترنسژنیک nestin و CD34 را بیان می‌کنند [۱۶،۱۵،۷،۶].

بررسی ما با روش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که، سلول‌های Bulge فولیکول موی موش صحرایی قبل از تمایز، مارکر K15 را بیان نمی‌کنند که موید نتیجه مطالعات آموح و همکارانش روی موش‌های ترنسژنیک است که نشان دادند، سلول‌های بنیادی فولیکول مو جدا شده از ناحیه Bulge، در حالت متمایز نشده، کراتین ۱۵ را بیان نمی‌کردند اما CD34 را بیان می‌کردند و سلول‌های ناحیه Bulge در محیط کشت حاوی RPMI1640 و ۱۰٪ FBS متمایز می‌شوند و به سلول عصبی، سلول گلیال، کراتینوسیت، عضله صاف و ملانوسیت تبدیل می‌شوند. بطوریکه ٤٨٪ این سلول‌های بنیادی سبیل و ۶۸٪ سلول‌های بنیادی فولیکول‌های موی خزه‌ای پوست به نورون تبدیل می‌شود [۱۷]. مطالعات محققان دیگر روی فولیکول موی گوسفند نشان داده‌اند که اغلب نقاط غلاف ریشه‌ای خارجی فولیکول توان بیان K15 را دارند اما ناحیه کوچکی در غلاف ریشه‌ای خارجی که حاوی سلول‌های بنیادی است قدرت بیان K15 را ندارند [۱۸].

بررسی روی نمونه‌های حیوانی نشان داده است که مارکرهای مختلفی در فولیکول موی موش سوری، موش صحرایی و انسان بیان می‌شود [۱۹]. ما در مطالعات قبلی هم نشان داده بودیم که سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی توان تبدیل به سلول‌های نورونی و گلیال را دارد [۲۱،۲۰].

نتیجه گیری

نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های Bulge فولیکول موی موش صحرایی می‌توانند مارکرهای سلول‌های بنیادی همچون nestin و CD34 را بیان کنند و پروتئین تمایزی سلول‌های کراتینوسیت در سلول‌های این ناحیه وجود ندارد، پس سلول‌های این ناحیه قدرت تکثیری زیادی دارند و می‌توانند بعنوان منبع سلول‌های بنیادی بالغین در فولیکول مو مطرح شوند و در آینده می‌توانند اهمیت درمانی داشته باشند.

References

1- Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. Mol Pathol. 2003 Apr;56(2):86-96.
2- Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2005 Jul;19(4):405-13.
3- Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. N Engl J Med. 1999 Aug;341(7):491-7.
4- Cotsarelis G, Sun T, Lavker R. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell. 1990 Jun;61(7):1329-37.
5- Claudinot S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, Barrandon Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 oct;102(41):14677.
6- Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Aug;100(17):9958.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

7- Amoh, Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Dec; 102(49):17734-38.
8- Yang J, Lavker R, Sun T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. J Invest Dermatol. 1993 Nov;101(5):652-9.
9- Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. Birth Defects Res C Embryo Today. 2004 Jun;72(2):162-72.
10- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Aug; 90(15):7391.
11- Hu Y, Zhang Z, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. Stem Cells. 2006 Dec;24(12):2692-702.
12- Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. Birth Defects Res C: Embryo Today. 2004 Jun;72(2):162-72.
13- Poblet E, Jimenez-Acosta F, Rocamora A. QBEND/10 (anti-CD34 antibody) in external root sheath cells and follicular tumors. J Cutan Pathol. 1994 Jun;21(3):224-28.
14- Pascucci L, Mercati F, Gargiulo AM, Pedini V, Sorbolini S, Ceccarelli P. CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmic region of canine hair follicles. Vet Dermatol. 2006 Aug;17(4):244-51.
15- Hoang M, Keady M, Mahalingam M. Stem cell markers (cytokeratin 15, CD34 and nestin) in primary scarring and nonscarring alopecia. Br J Dermatol. 2009 Mar;160(3):609-15.
16- Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. J Invest Dermatol. 2003 Apr;120(4):501-11.
17- Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Apr; 102(15): 5530-4.
18- Whitbread LA, Powell BC. Expression of the intermediate filament keratin gene, K15, in the basal cell layers of epithelia and the hair follicle. Exp Cell Res. 1998 Nov; 244(2):448-59.
19- Inoue K, Aoi N, Sato T, Yamauchi Y, Suga H, Eto H, et al. Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. Lab Invest. 2009 Aug;89(8):844-56.
20- Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M ,Roshandel N, Delaviz H, Joghataie M, et al. Bulge cells of rat hair follicles: Isolation, cultivation, morphological and biological features. The Cell. 2010 Spring; 12(1): 51-8.
21- Asalgoo S, Noubakht M, Rahbar Roushandel N, Mousavizadeh K, Najafzadeh N, Kordestani S. Neurotrophic effects of silibinin on differentiation of hair follicle stem cells to neurons. Qom Med Sci J. 2010 Winter; 3(4): 12-19.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]

Isolation of Rat Hair Follicle Stem Cells and in Vitro Study of Stem Cell Factors in Iran

Nobakht M, PhD [1]; Najafzadeh N, PhD[2]; Pourheydar B, PhD[3]; Golmohammadi MG, PhD[4]

[1]Associate Prof. of Dept. of Histology & Neurosciences, Researcher in cellular & Molecular Research Center, Antimicrobial Resistance Research center, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Corresponding Author: Assistant Prof. of Dept. of Anatomy, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. E-mail: n.najafzade@arums.ac.ir
[3] Assistant Prof. of Dept. of Anatomy, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
[4] Assistant Prof. of Dept. of Anatomy, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

ABSTRACT

Background & objectives: During lifetime, hair follicles undergo three cyclic changes: anagen, catagen, telogen. In hair follicles, stem cells located in Bulge area, which is part of the outer root sheath. Bulge cells proliferate new cells in anagen phase. Bulge region of hair follicle indicated as a source of stem cell for many years, but little studies done in vitro to characterize rat bulge region hair follicle stem cells.

Methods: In this study Bulge cells of rat hair follicle were isolated and cultured, then morphological features of these cells surveyed. Nestin and CD34 as hair follicle stem cell markers, and K15 as a keratinocyte marker assessed by immunocytochemistry after one to three weeks**.**

Results: In this study, we found that, 2 days after attachment of cells to floor of plates, the cells were initiated to proliferation and migration. These cells had good nestin and CD34 immunostaining, but after three week differentiation,were nestin and CD34 negative. Also these cells couldn't express K15.

Conclusion*:* Results showed that cultivated rat bulge cells, have high proliferative potential, and also could express nestin and CD34 as stem cell factors.

Key words: Nestin, CD34; K15; Bulge Region; Hair Follicle; Rat

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-14]