

بررسی بیان اکتین آلفای ماهیچه صاف (α -SMA) در سلولهای درمی ضمام پوستی به روش ایمونوهیستوشیمی

احمد قارزی Ph.D.^{۱*}، محسن عباسی Ph.D.^۲، کالین جاهودا Ph.D.^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- گروه علوم پایه، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه دورهام، دورهام، انگلستان

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahgharzi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۳۰

چکیده

هدف: اکتین آلفای ماهیچه صاف (α -SMA) یک ایزوفرم اکتین است که در بسیاری از انواع سلولهای یوکاریوت وجود دارد. در این تحقیق نحوه بیان این پروتئین در ضمام پوستی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر بیان پروتئین آکتین آلفای ماهیچه صاف در سلولهای درمی سه نوع از ضمام پوستی در شرایط *in vitro* و در یک مورد در شرایط *in situ* به روش ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که در شرایط *in vitro* این پروتئین تقریباً در تمام سلولهای پاپیلای درمی فولیکول موی ویبریسا بیان شد. سلولهای درمی بستر چنگال نیز با درصد بالایی این پروتئین را بیان نمودند، ولی فقط درصد کمی از سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر دارای این پروتئین مثبت بودند. در شرایط *in situ* این پروتئین بشدت در سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر و سایر بافتهای درمی قاعده فولیکول بیان گردید.

نتیجه گیری: در این تحقیق برای اولین بار بیان α -SMA در سلولهای درمی چنگال و پر، را در محیط کشت گزارش می‌شود. بعلاوه نتایج بدست آمده به همراه شواهد موجود توسط سایر محققین ثابت می‌کند که این پروتئین یک نقش اساسی در فعالیتهای طبیعی و ترمیمی پوست و ضمام پوستی پستانداران و سایر مهره‌داران بازی می‌نماید. همچنین بیان بسیار زیاد این پروتئین در فولیکول پر، موید نقش مهمتر این پروتئین در پرندگان نسبت به نقشی است که آن در فولیکول موی پستانداران برعهده دارد ولی تعیین دقیق این نقش به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: اکتین آلفای ماهیچه صاف، ایمونوهیستوشیمی، فولیکول مو، پر، ناخن، سلولهای درمی

مقدمه

پاتولوژیکی شرکت می‌کنند.

پروتئین α -SMA علاوه بر پوست در ضمام پوستی نیز بیان می‌شود. ضمام پوستی که در مهره داران شامل مو، پشم، ویبرسا (موهای زیر روی سطح پشتی لب فوقانی بعضی پستانداران)، پر، ناخن، چنگال، شاخ و غیره می‌باشند در دوره جنینی تماماً طی برهم‌کنشهای مولکولی و بیوشیمیایی تقریباً مشابهی که بین لایه اپیدرمی و مزانشیمی جنین اتفاق می‌افتد منشاء می‌گیرند و در سرتاسر حیات شباهتهایی را بین خود آشکار می‌کنند (۲۴). بطوریکه بعنوان مثال گفته شده که ناخن یا چنگال مهره‌داران در حقیقت یک فرم باز نشده از فولیکول مو است که بجای مو صفحه کراتینی می‌سازد (۲۵).

مطالعاتی که بر روی بیان α -SMA در فولیکول مو صورت گرفته نشان می‌دهد که در شرایط *in situ* سلولهای غلاف درمی و پایلای درمی این پروتئین را بیان می‌کنند ولی سطح بیان آن در نقاط مختلف فولیکول فرق می‌کند (۵). ضمن اینکه میزان بیان این پروتئین حتی در یک نوع سلول فولیکول مو در شرایط *in vitro* با شرایط *in situ* متفاوت است (۲۶). بنظر می‌رسد که این پروتئین در فولیکول مو یک نقش اساسی در کنترل فعالیت چرخه‌ای آن بازی می‌کند ولی این موضوع هنوز کاملاً تایید نشده است.

علیرغم شباهتهای ذکر شده بین ضمام پوستی، تاکنون مطالعه‌ای بر روی بیان یا عدم بیان این پروتئین در سایر ضمام پوستی صورت نگرفته است و با وجود این شباهتهای جنینی و ساختاری مشخص نیست که آیا این شباهتها در مورد این پروتئین نیز صادق است یا تفاوتی بین آنها دیده می‌شود. این شباهتها یا تفاوتها می‌تواند کلیدی برای تعیین نقش دقیق و واقعی این پروتئین در ضمام پوستی باشد و به ما نشان خواهد داد که آیا این پروتئین بطور کلی نقش یکسانی در تمام ضمام پوستی دارد، یا اینکه با توجه به وظایف و ویژگیهای منحصر به فرد این ضمام در مهره‌داران این پروتئین در هر یک از آنها دارای یک نقش متفاوت و اختصاصی می‌باشد. برای آگاهی از این موضوع ما بر آن شدیم که بیان این پروتئین را علاوه بر سلولهای درمی فولیکول موی ویبرسا در سلولهای درمی موجود در چنگال پستاندار و فولیکول پر پرنده مورد بررسی قرار دهیم تا با توجه به نتایج حاصله بتوانیم نقش احتمالی این پروتئین در این ضمام پوستی بهتر درک نماییم.

اکتین یک پروتئین اسکلت سلولی است که در تمام سلولهای یوکاریوت یافت می‌شود. این پروتئین فراوانترین پروتئین موجود در بسیاری از سلولهای یوکاریوت می‌باشد و اغلب تا ۵ درصد از کل پروتئین سلول را شامل می‌گردد (۱). این پروتئین به همراه سایر پروتئینها ضمن فراهم آوردن حمایت مکانیکی برای سلول در اعمال مختلف سلولی همچون انقباض، چسبندگی و حرکت دخالت دارد (۳ و ۲). در بافتهای یوکاریوتها سه نوع ایزوفرم اکتین وجود دارد (آلفا، بتا و گاما) که آنها را میت وان بر مبنای نقاط ایزوالکتریکی متفاوت که در ژل الکتروفورز دو بعدی آشکار می‌شود از هم متمایز نمود (۵ و ۴). در حالیکه اکتین بتا بطور غیر افتراقی در تمام سلولهای یوکاریوت وجود دارد، اکتین آلفای قلبی، اکتین آلفای اسکلتی و اکتین آلفای ماهیچه صاف (α -smooth muscle actin یا α -SMA) بعنوان اکتین خاص - یافت در نظر گرفته می‌شوند (۶ و ۷).

اکتین آلفای ماهیچه صاف (α -SMA) عمدتاً در ماهیچه صاف طبیعی بالغ و بطور موقت در طی نمو ماهیچه اسکلتی و قلبی بیان می‌شود (۸). این پروتئین مهمترین پروتئین ماهیچه صاف بوده و بعنوان یک نشانگر اختصاصی برای این نوع ماهیچه محسوب می‌شود. اما بیان این پروتئین تنها به سلولهای ماهیچه صاف محدود نمی‌شود و در سایر سلولها همچون سلولهای میوفیبروبلاست (۹ و ۱۰) و میوایپ تلیال (۱۱) و سایر سلولهایی که خاصیت انقباضی دارند یافت می‌گردد. بیش از چند دهه است که مشخص شده سلولهای فیبروبلاست بافت همبند نیز فعالیت انقباضی شبه- ماهیچه‌ای از خود نشان می‌دهند (۱۲). گزارشهایی وجود دارد که نشان می‌دهد انقباض فیبروبلاستها در بعضی از بافتهای همبند (درم) یک نقش کلیدی در بسته شدن زخمها در جریان التیام جراحات پوست بازی می‌کند (۱۳)، ۱۴، ۱۵ و ۱۶) و تایید شده که این رفتار انقباضی فیبروبلاستها ناشی از بیان α -SMA در آنها است (۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰). وجود این پروتئین حتی در سلولها و بافتهای ظاهراً غیر انقباضی نظیر کندروسیتها، استئوبلاستها، سلولهای مزانشیمی مغز استخوان، آلمتوبلاستها، دیسکهای بین مهره‌ای و سلولهای اپی تلیالی عدسی چشم تایید شده است (۲۱، ۲۲ و ۲۳). هر چند که نقش واقعی α -SMA در این سلولها و بافتها هنوز مشخص نشده است ولی یکی از احتمالات این است که سلولهای حاوی α -SMA در فرایندهای ترمیمی و التیامی چه طبیعی و چه

مواد و روش‌ها

جدا نمودن سلولهای درمی از فولیکول موی و بربریسا موش صحرایی: تعداد ۵ موش صحرایی نژاد PVG (inbred Piebald) (Virol Glaxo rat) کشته شدند و پس از خارج نمودن فولیکولهای و بربریسای آنها، پاپیلای درمی این فولیکولها به ترتیبی که توسط سایرین توضیح داده شده (۵، ۲۶ و ۲۷) جدا گردید. کلیه مراحل انجام طرح با توجه به پروتکل‌های تعریف شده در دانشگاه دورهام، انگلستان صورت گرفته است. بطور خلاصه، بعد از شکافتن پوست لب فوقانی موش با کمک قیچی، لبه پوست بریده شد و با انبرهای ریز گرفته و کشیده شد تا اینکه فولیکولهای بزرگ و بربریسا از زیر نمایان شدند. سپس با کمک پنس فولیکولها یکی یکی و آرامی از ناحیه گردن گرفته، جدا و در ظرف حاوی MEM (Eagle's Minimal Essential Medium, Gibco, Life Technologies, UK) قرار داده شدند. در زیر استرئومیکروسکوپ (Nikon SMZ-10, Japan) و با استفاده از یک قیچی ریز ناحیه قاعده فولیکولها از بخشهای فوقانی آن جدا و به ظرف جداگانه انتقال داده شد. در اینجا با کمک پنس ظریف لبه کپسول کلاژنی اطراف قاعده فولیکول را گرفته و با استفاده از یک پنس دیگر سطح پائینی آن بطرف بالا فشار داده شد تا با معکوس کردن آن محتویات داخل کپسول که شامل پاپیلای درمی (dermal papilla)، مرکزی و غلاف سلولهای اپیدرمی ماتریکس هستند، از کپسول خارج گردد. با کمک پنسهای ظریف، پاپیلای درمی از سلولهای غلاف اپیدرمی جدا و به ظروف کشت انتقال یافت.

جدا سازی پاپیلای درمی از فولیکول پر کبوتر: تعداد دو کبوتر معمولی بالغ تهیه شد و پس از کشتن، بالهای آنها از بقیه بدن جدا گردید. سپس تمام پرهای روی بال بجز پرهای کوچک تازه بیرون آمده با دست از بال کنده شدند. سپس با استفاده از قیچی، ساقه پرها از محل خروج از پوست قطع و دور انداخته شد. باقیمانده بالها پس از شستشو در اتانول ۷۰ درصد برای کارهای بعدی به ظروف حاوی MEM و آنتی بیوتیک منتقل شدند. با استفاده از قیچی‌های ظریف، پوست روی بال به همراه فولیکولهای پر آن از بافتهای زیرین جدا شدند. چون قاعده فولیکولهای پر در تماس نزدیک با استخوانهای بال قرار دارد، دقت زیادی بعمل آمد تا حین جدا کردن پوست به قاعده فولیکولها آسیبی نرسد. پوست جدا شده به همراه فولیکولهای موجود در آن به ظرف دیگری حاوی MEM و آنتی بیوتیک تازه

منتقل شدند. متعاقباً در این ظرف فولیکولها از بافتهای اطراف جدا شدند. در اینجا بعضی از این فولیکولها برای بررسی بیان α -SMA در شرایط *in situ* برای برش با فریزمیکروتوم (کرایوستات) آماده شدند. اما بقیه فولیکولها برای خارج کردن پاپیلای درمی و کشت سلولی بطریق زیر آماده شدند. ابتدا با کمک قیچی‌های ریز پوشش شاخی اطراف فولیکول پاره گردید. در زیر این پوشش یک غلاف درمی وجود دارد که آن نیز پاره و خارج شد تا اینکه محتویات داخلی فولیکول که شامل بافت اپی تلیالی خارجی و پاپیلای درمی مرکزی است آشکار گردد. سپس با کمک سر سرنگ و پنسهای بسیار ریز بخش اپیدرمی جدا و دور انداخته شد ولی بخش داخلی که شامل پاپیلای درمی است به ظروف کشت حاوی محیط کشت منتقل گردیدند.

جدا نمودن و کشت سلولهای درمی از چنگال موش صحرایی: برای اینکار موشهای صحرایی ابتدا کشته شدند و اندامهای حرکتی آنها با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شدند. سپس با استفاده از یک تیغه اسکالپل آخرین بند انگشت اندامهای حرکتی آنها که واجد چنگال است قطع گردید. بندهای انگشت قطع شده به پتری حاوی MEM و آنتی بیوتیک منتقل گردیدند. با استفاده از استرئومیکروسکوپ و قیچی‌های ریز و تیز، با یک برش طولی پوست روی انگشتان برداشته شد، تا اینکه اجزاء داخلی آن آشکار گردد. اجزاء داخلی که شامل بافتهای اطراف استخوان آخرین بند انگشت و بافتهای مربوط به چنگال هستند متعاقباً به ظروف حاوی MEM تازه منتقل گردیدند. سپس صفحه کراتینی چنگال به آرامی از بافتهای اطراف استخوان بند انگشت جدا و دور انداخته شد. سپس پاپیلای درمی که در زیر صفحه چنگال بود آشکار گردید. پاپیلا که فقط به بافتهای اطراف استخوان متصل بود با استفاده از پنس به آرامی از این بافتها جدا گردید و به ظروف ۳۵ میلی متری حاوی محیط کشت انتقال داده شد.

نحوه کشت بافتهای درمی: هر سه نوع بافت درمی خارج شده از فولیکول موی و بربریسا و بستر چنگال موش صحرایی فولیکول پر کبوتر بر طبق روشی که با جزئیات توسط دیگران توصیف شده، کشت داده شد (۵ و ۲۷). در اینجا بافتهای جدا شده برای شروع کشت ابتدا با کمک نوک سرنگ به قطعه‌های کوچکی به ابعاد ۱-۲ میلی متر خرد شدند و در نهایت به ظروف کشت ۳۵ میلی متری (Falcon, Becton Dickinson, UK) حاوی ۱-۲ قطره محیط کشت انتقال یافت. محیط کشت مورد استفاده

برای کشت شامل MEM + آنتی-بیوتیکها (استروپتومايسين، پنی‌سیلین و فونگیزون هر یک با غلظت 50 units/ml) (Gibco) و ۲۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom) بود. ظروف کشت سپس در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفت. بعد از ۳-۴ روز از شروع کشت، ظروف در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شد. پس از اینکه بافت‌های درمی به کف ظروف چسبیدند و علائم رشد سلولی را نشان دادند، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به آنها افزوده شد. در طی مدت کشت، محیط قدیمی هر ۴ روز یکبار با محیط جدید تعویض گردید. موقعیکه سلولها به تراکم نهایی رسیدند (حالت کانفلوئنت، confluent) کشتها پاساژ داده شد و به ظرفهای دیگر انتقال یافتند. سلولها پس از پاساژ دوم برای کارهای ایمونوهیستوشیمی به روش زیر آماده شدند.

نشاندن دار کردن سلولهای درمی در شرایط *in vitro* با آنتی α -SMA در شرایط *in situ* فولیکولهای پر بعد از جدا شدن از بال پرنده به ترتیبی که در قسمت مربوطه توضیح داده شد در محلول tissue-tek (Agar aids) قالبگیری گردید و سپس با کمک نیتروژن مایع فریز شدند. سپس از قالبهای مذکور، با کمک دستگاه کرایوآستات (Leitz, model 1720) برشهای ۶ میکرومتری تهیه شد. برشهای تهیه شده سپس بر روی لامهای پوشیده شده با پولی-لیزین قرار داده شدند. برشها سپس در دمای اتاق گذاشته شد تا خشک شوند و بعد در دمای ۴ درجه با استون به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. بعد از این مرحله برای نشاندن کردن برشها به همان ترتیبی که در قسمت قبل برای سلولهای محیط کشت توضیح داده شد، عمل گردید.

نتایج

ویژگی سلولهای درمی در شرایط *in vitro*

طی ۳-۵ روز بعد از خوابانده شدن بافت‌های درمی جدا شده از فولیکول ویبريسا، چنگال و فولیکول پر در محیط کشت، سلولها شروع به رشد کردن در اطراف بافت‌های پیوند شده یا explant نمودند (شکل ۱A) و بتدریج در اثر تقسیمات متوالی تمام کف ظرف کشت را اشغال می‌کردند. سلولهای حاصله از هر سه نوع بافت هر چند در ابتدای رشد و در مجاورت بافت اولیه کم و بیش گرد و کوچک بودند ولی بتدریج پهن شده و ظاهر دوکی یا ستاره‌ای شکل پیدا می‌کردند. سلولها در ظروف کشت اولیه ۳۵ میلی‌متری حدود ۴-۵ هفته طول می‌کشید که به تراکم نهایی برسند و یک تک لایه را در کف ظرف ایجاد کنند و آن زمانی بود که سلولها برای پاساژ دادن آماده می‌شدند.

با بررسی‌ها و مشاهدات بعمل آمده روی نحوه رشد این سه نوع بافت مشخص شد که بطور کلی سلولهای پاپیلای درمی فولیکول ویبريسا در ظروف کشت نسبت به دو نوع سلول دیگر حالت

برای کشت شامل MEM + آنتی-بیوتیکها (استروپتومايسين، پنی‌سیلین و فونگیزون هر یک با غلظت 50 units/ml) (Gibco) و ۲۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom) بود. ظروف کشت سپس در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفت. بعد از ۳-۴ روز از شروع کشت، ظروف در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شد. پس از اینکه بافت‌های درمی به کف ظروف چسبیدند و علائم رشد سلولی را نشان دادند، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به آنها افزوده شد. در طی مدت کشت، محیط قدیمی هر ۴ روز یکبار با محیط جدید تعویض گردید. موقعیکه سلولها به تراکم نهایی رسیدند (حالت کانفلوئنت، confluent) کشتها پاساژ داده شد و به ظرفهای دیگر انتقال یافتند. سلولها پس از پاساژ دوم برای کارهای ایمونوهیستوشیمی به روش زیر آماده شدند.

نشان دار کردن سلولهای درمی در شرایط *in vitro* با آنتی

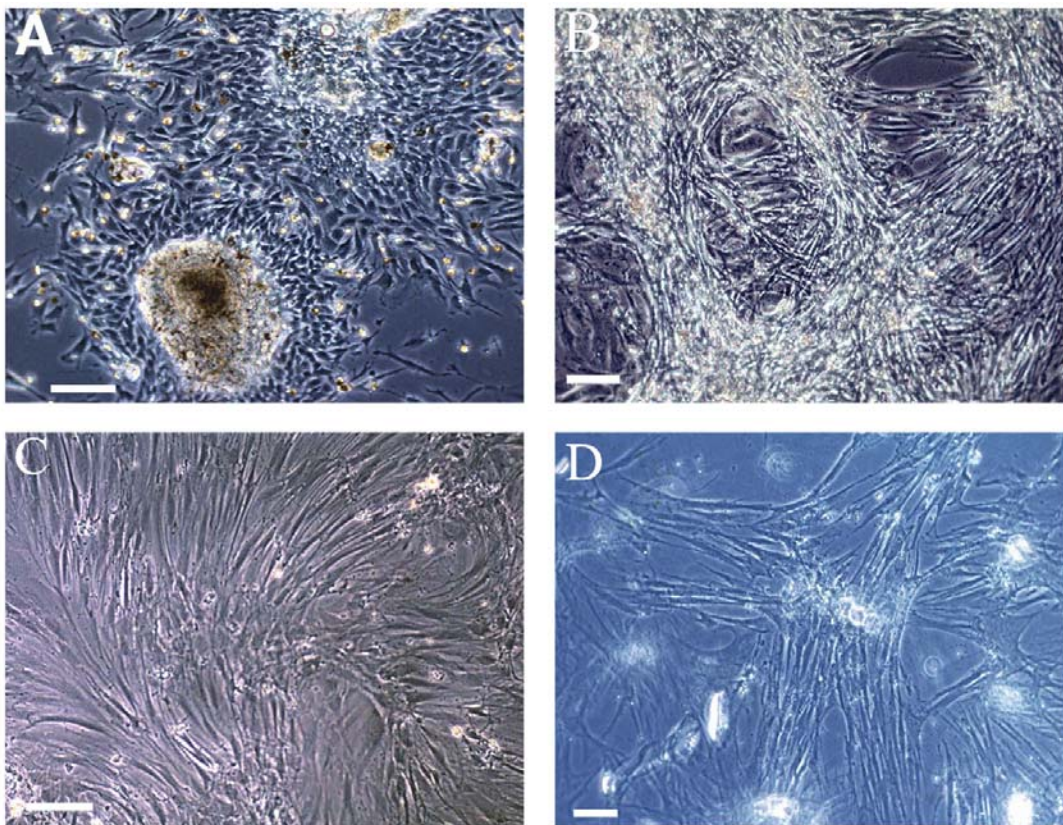
α -SMA — روش ایمونوهیستوشیمی: مراحل ایمونوهیستوشیمی بر مبنای آنچه که توسط دیگران (۵، ۱۰ و ۲۷) بیان شده و با تغییراتی، انجام گرفت. بطور خلاصه، سوسپانسیون سلولهای درمی بعد از دومین پاساژ روی لامی که در کف ظروف کشت ۳۵ میلی‌متری گذاشته شده بود، کشت داده شدند. بعد از ۷-۱۰ روز که سلولها به سطح لامل چسبیده و در اثر رشد و تقسیم بحالت کانفلوئنت رسیدند، ظروف حاوی لامل از انکوباتور خارج و با کمک یک پنس ظریف لامل از ظرف کشت خارج گردید. لامل حاوی سلولها سپس چند بار با بافر PBS شسته شد و بعد از آن برای مدت ۵ دقیقه در استون و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تثبیت گردید و پس از تثبیت دوباره برای مدت چند بار و هر بار به مدت ۳-۵ دقیقه با بافر شستشو داده شد. سپس آنتی بادی منوکلونال α -SMA اولیه (تهیه شده توسط Dr. Gabbiani, Geneva, Switzerland) با PBS ده بار رقیق گردید و روی لامل حاوی سلولهای تثبیت شده، ریخته شد. لامل مذکور سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به حال خود رها شد. بعد از این مدت سلولها مجدداً برای ۳ بار با PBS شستشو داده شدند و سپس به مدت ۱ ساعت در معرض biotinylated goat anti-mouse antibody (Sigma, Aldrich, UK) با رقت ۱ به ۹۰ قرار گرفتند. بعد از شستشوی دوباره با PBS نمونه‌ها برای آخرین بار به مدت ۱ ساعت دیگر در معرض fluorescein-liked streptavidin

بودند و تشکیل توده‌های سلولی (کلمپ) را نمی‌دادند یا اینکه این توده‌ها کمتر دیده می‌شد (شکل ۱C).

سلولهای حاصله از فولیکول پر در محیط کشت دیرتر از دو نوع سلول دیگر شروع به ظاهر شدن در اطراف بافت پیوند شده می‌کردند ولی در هنگام ظاهر شدن همان مورفولوژی سلولهای مزانشیمی را آشکار می‌نمودند. این سلولها در محیط کشت خلاف دو نوع سلول دیگر از رشد آهسته‌ای در محیط کشت برخوردار بودند بطوریکه حداقل دو هفته دیرتر از دو نوع دیگر بحالت تراکم نهایی در ظروف کشت می‌رسیدند. این رشد آهسته بطور مداوم هم در کشت های اولیه و هم بعد از پاساژ دادن قابل تشخیص بود. این سلولها همچنین به هیچ عنوان به تراکمی که در دو نوع سلول دیگر ظاهر می‌شد نمی‌رسیدند و همیشه فاصله اندکی بین سلولهای همسایه مشاهده می‌شد (شکل ۱D).

متراکم‌تری بخود می‌گرفتند که این حالت از همان ابتدای شروع رشد سلولها در اطراف explant نمایان بود. این سلولها هنگامیکه به مرحله تراکم نهایی نیز می‌رسیدند روی همدیگر سوار می‌شدند و توده‌های سلولی (clamp) را بوجود می‌آوردند که این حالت در دو نوع دیگر سلولها مشاهده نمی‌شد یا اینکه بحالت مشخص وجود نداشت (شکل ۱B).

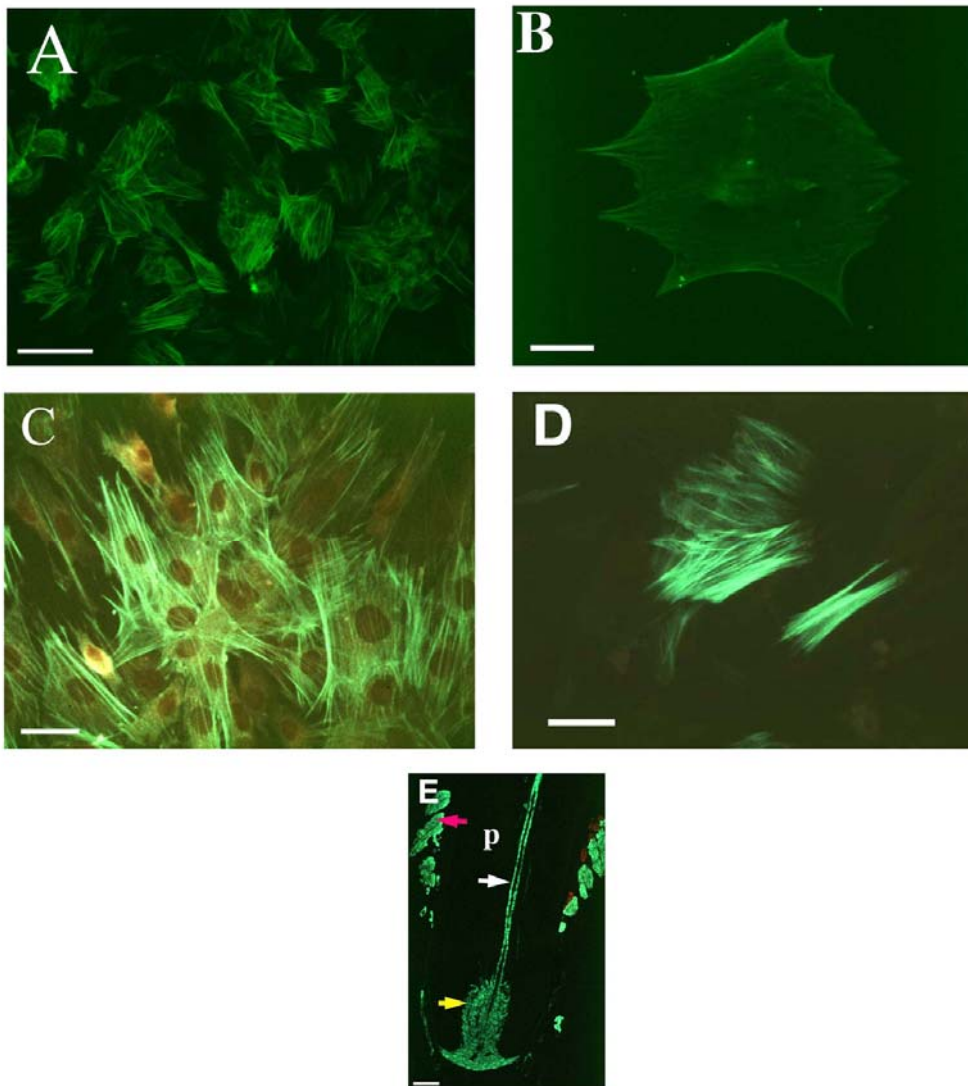
سلولهای جدا شده از بافت درمی زیر یا بستر چنگال موش نیز در حین رشد در محیط کشت ویژگیهای سلولهای درمی را بخود گرفته و از لحاظ مشخصات ظاهری مشابه فیبروبلاستهای حاصله از پوست که توسط دیگران توصیف شده بودند (۲۱) یعنی اکثراً باریک و بلند بوده و ظاهری دوکی شکل داشتند. همانطور که در بالا ذکر شد این سلولها نسبت به سلولهای پاپیلای درمی در هنگام تشکیل تک لایه ای سلولی از تراکم کمتری برخوردار



شکل ۱: میکروگرافهای فاز کنتراست از سلولهای درمی ضمام پوستی. (A) سلولهای پاپیلای درمی که ۶ روز بعد از کشت از کنار بافت پیوند شده (explant) شروع به رشد نموده‌اند. همانطور که دیده می‌شود سلولهای مجاور بافت که به تازگی ایجاد شده‌اند کوچکتر و متراکم‌تر از سلولهای حاشیهای می‌باشند. خط نشانه = ۲۰۰ میکرومتر. (B) سلولهای پاپیلای درمی فولیکول و بیبرسا در حالت تراکم نهایی. علاوه بر تشکیل تک لایه ای، بعضی از سلولها روی هم سوار شده و تشکیل توده‌های سلولی را داده‌اند. خط نشانه = ۱۰۰ میکرومتر. (C) سلولهای درمی حاصل از بستر چنگال موش صحرايي در حالت تراکم نهایی. حالت تشکیل توده سلولی در اینجا به شدت پاپیلای درمی فولیکول و بیبرسا (شکل ۲) نیست. خط نشانه = ۱۵۰ میکرومتر. (D) سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر کبوتر در حالت تراکم نهایی. سلولها در اینجا بزرگتر و پراکنده‌تر از دو نوع دیگر هستند و حالت توده سلولی آشکاری ایجاد نمی‌گردد. خط نشانه = ۱۰۰ میکرومتر.

درصد بالایی از سلولهای درمی مشتق شده از بستر چنگال موش صحرایی نیز همچون سلولهای پاپیلای درمی حاصل از فولیکول ویبریسای پروتئین α -SMA را در سیتوپلاسم خود بیان نمودند. به علاوه در این سلولها این پروتئین در پاهای تیغه‌ای سلولها شدیدتر از سیتوپلاسم مرکزی بیان می‌شد. همچنین هم چون سلولهای پاپیلای درمی ویبریسای سلولهای پهن و با فاصله این پروتئین را بهتر از سلولهای متراکم بیان نمودند (شکل ۲C).

بیان α -SMA در سلولهای درمی در شرایط *in vitro*
 بیان α -SMA در سلولهای پاپیلای درمی فولیکول ویبریسای موش صحرایی قبلاً بوسیله دیگران گزارش شده است (۵ و ۲۶). بطور کلی تقریباً تمام سلولهای پاپیلای درمی موجود در محیط کشت این پروتئین را بیان نمودند (شکل ۲A). به علاوه سلولهای پهن و گسترده شده و آنهایی که با فاصله از سلولهای همسایه قرار داشتند نسبت به سلولهای کوچکتر و متراکم‌تر خیلی شدیدتر این پروتئین را در سیتوپلاسم خود بیان نمودند (شکل ۲B).



شکل ۲: میکروگرافهای فلورسنت از سلولهای درمی ضمام پوستی که با آنتی α -SMA رنگ شده‌اند. (A) پاپیلای درمی ویبریسای تقریباً تمام سلولهای پاپیلای درمی از نظر بیان پروتئین α -SMA مثبت بودند. خط نشانه = ۵۰ میکرومتر. (B) تصویر A با بزرگنمایی بالاتر. خط نشانه = ۲۵ میکرومتر. (C) سلولهای درمی حاصل از بستر چنگال موش صحرایی. اکثریت سلولها ولی نه تماماً پروتئین α -SMA را در سیتوپلاسم خود بیان نمودند. ملاحظه می‌شود که پاهای تیغه‌ای سلولها این پروتئین را شدیدتر بیان می‌کنند. خط نشانه = ۲۵ میکرومتر. (D) سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر در محیط کشت. فقط بخش کمی از سلولها پروتئین α -SMA را در سیتوپلاسم خود بیان می‌کنند. خط نشانه = ۲۵ میکرومتر. (E) بیان α -SMA در مقطع طولی از فولیکول پر کبوتر در شرایط *in situ* نواحی مختلف فولیکول که پروتئین مذکور را بیان نموده‌اند با رنگ سبز قابل تشخیص است. پیکان زرد (پاپیلای درمی)، پیکان سفید (رگ خونی)، پیکان قرمز = ماهیچه راست کننده و p = پولپ. خط نشانه = ۱۰۰ میکرومتر.

در آنها تظاهر پیدا می‌کند. همچنین مشخص گردید که بر عکس سلولهای پاپیلای ویریساً که تقریباً تماماً در محیط کشت این پروتئین را تولید می‌کنند در مورد سلولهای پاپیلای پر فقط کسر کوچکی از سلولها به این کار اقدام می‌ورزند و بقیه به این پروتئین پاسخ منفی نشان می‌دهند. این مشاهدات به همراه نتایج حاصله توسط دیگران که نشان داده‌اند سلولهای غلاف درمی فولیکول مو نیز هم در شرایط *in vitro* و هم *in situ* پروتئین α -SMA را بیان می‌کنند (۲۶)، نقش مهم اکتین را در انقباض فولیکول نشان می‌دهد و انقباض فرآیندی است که فولیکول بدون آن نمی‌تواند وظایفش را انجام دهد. فولیکول مو دارای یک چرخه دوره‌ای است و در طی این چرخه علاوه بر تغییرات فیزیولوژیک دگرگونیهای مورفولوژیک عمیقی را پشت سر می‌گذراند (۲۱ و ۲۸)، به این ترتیب که در طی فاز رشد (anagen) رشته موی (fiber) تازه تشکیل شده بطور پیوسته بطرف بالا و سطح پوست رانده می‌شود و از اینرو به احتمال قوی پروتئین α -SMA موجود در جزء درمی فولیکول در این رانده شدن رشته مو دخالت مستقیم دارد. به علاوه در فاز انتقالی (catagen) در اکثر انواع فولیکولها، بخش پائینی فولیکول منقبض شده و بطرف بالا حرکت می‌کند و این خود دوباره اشاره به این دارد که سلولهای این ناحیه از فولیکول برای انجام این کار بایستی قابلیت انقباض داشته باشند. مضاف بر این وجود اکتین‌های انقباضی در سلولهای درمی فولیکول مو ممکن است در آرایش سلولهای سازنده رشته مو دخالت داشته باشد. در تایید این مطلب مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که دستجات اکتین سلولهای درمی ناحیه تحتانی فولیکول دستجات حلقوی پیوسته‌ای را در اطراف غلاف داخلی ریشه مو تشکیل می‌دهند (۲) و این محل منطقه کراتینوژن است که جایگاه ضروری برای تولید رشته مو می‌باشد. در طول فاز رشد سلولها در ناحیه ماتریکس (سلولهای اپیدرمی قاعده فولیکول) پس از تکثیر بطرف بالا حرکت می‌کنند و در این حین و تا قبل از منطقه کراتینوژن بر حجم آنها افزوده می‌گردد. در بالای ناحیه بولب (bulb) سلولهای حجیم شده همچون کیف بداخل منطقه کراتینوژن باریک رانده می‌شوند و در این منطقه در اثر نیروی اعمال شده از اطراف به سلولهای باریک و بلند کراتینی تبدیل می‌شوند (۲۹). این احتمال وجود دارد که در این فرایند نیروی اعمال شده به سلولها توسط دستجات اکتینی سلولهای درمی اطراف تامین می‌گردد (۲). به علاوه، بدنبال قطع تولید مو در پایان فاز رشد، به نظر می‌رسد که در طی فاز انتقالی و استراحت

بر خلاف سلولهای درمی حاصل از موش صحرایی، پروتئین α -SMA فقط در درصد کمی (حدوداً یک سوم) از سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر کبوتر بیان شد و بقیه سلولها از نظر این پروتئین واکنش منفی نشان دادند. در اینجا سلولهای α -SMA مثبت معمولاً در گروههای مجزا و کنار هم دیده می‌شدند و کاملاً از سلولهای α -SMA منفی جدا می‌شدند. اما در هماهنگی با دو نوع سلول درمی دیگر در اینجا نیز پروتئین α -SMA در سلولهای پهن و کشیده‌تر شدیدتر بیان می‌شد (شکل ۲D).

بیان α -SMA در سلولهای پاپیلای درمی فولیکول پر در

شرایط *in situ*

چون بیان α -SMA در پاپیلای درمی ویریساً در شرایط *in situ* قبلاً مطالعه شده و نظر به عدم امکان برش گیری چنگال موش صحرایی با کرایواستات (با توجه به سخت بودن این بافت) در این تحقیق فقط فولیکول پر از نظر بیان α -SMA در شرایط *in situ* مورد مطالعه قرار گرفت. مشاهدات انجام شده نشان داد که این پروتئین با شدت بالایی در پاپیلای درمی بیان می‌شود. همچنین این پروتئین در دیواره عروق خونی موجود در فولیکول وجود دارد. به علاوه مشخص شد که به غیر از پاپیلای درمی و رگهای خونی بافتهای همبند اطراف قاعده فولیکول نیز این پروتئین را بیان می‌کنند. اما بیان این پروتئین در این بافتهای همبند در سطوح بالاتر به ناگهان قطع می‌شود و از نیمه فولیکول بطرف بالا این پروتئین در آنها بیان نمی‌شود. همچنین مشخص شد که پروتئین α -SMA قویاً در عضله راست کننده پر که به کناره فولیکول متصل می‌شود بیان می‌گردد (شکل ۲E).

بحث

در توافق با مشاهدات قبلی (۵) در این تحقیق نشان دادیم که سلولهای پاپیلای درمی فولیکولهای ویریساً در شرایط *in vitro* پروتئین α -SMA را در سیتوپلاسم خود بیان می‌کردند. بعلاوه در این پژوهش برای اولین بار نشان دادیم که سلولهای درمی بستر چنگال و همچنین پاپیلای درمی فولیکول پر همچون همتای خود در فولیکول ویریساً واجد این پروتئین بودند. در مطالعات قبلی مشخص شده بود که سلولهای پاپیلای درمی ویریساً منحصراً در شرایط *in vitro* این پروتئین را بیان می‌کنند ولی در اینجا نشان داده شد که در مورد پر سلولهای پاپیلای درمی هم در شرایط *in vitro* و هم *in situ* این پروتئین

وجود تفاوت‌هایی که در این تحقیق بین سلول‌های درمی سه نوع ضمامن پوستی از نظر بیان پروتئین α -SMA مشاهده شد می‌تواند منعکس کننده این واقعیت باشد که علاوه بر نقش مشترک، ترمیم و انقباض، این پروتئین به احتمال زیاد در این ضمامن یک نقش اختصاصی نیز بازی می‌کند که بسته به فعالیت‌های آنها فرق می‌کند. از طرفی همانطور که مشاهده شد بیان این پروتئین در سلول‌های درمی بستر چنگال خیلی کمتر و محدود تر از بیان این پروتئین در فولیکول پر و مو می‌باشد و فولیکولها در مقایسه با چنگال ضمامن بسیار فعال‌تری هستند چراکه همانطور که در بالا اشاره شد دارای چرخه‌های متوالی رشد و بازسازی هستند که این چرخه‌ها در چنگال دیده نمی‌شود. بنابراین با توجه به این نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که α -SMA در فعل و انفعالات دینامیک این ضمامن نقش فعال و بارزی ایفا می‌کند ولی اینکه دقیقاً این نقش چیست و از چه طریق و با واسطه چه مولکول‌های دیگری این نقش اعمال می‌گردد نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان چنین استنباط کرد که α -SMA در فعل و انفعالات دینامیک ضمامن پوستی نقش فعال و بارزی ایفا می‌کند ولی اینکه دقیقاً این نقش چیست و از چه طریق و با واسطه چه مولکول‌های دیگری این نقش اعمال می‌گردد نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

منابع

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, et al. Molecular biology of the cells, 3rd edition, Garland Publishing Inc. New York; 1994; 821.
2. Furumura M, Ishikawa H. Actin bundles in human hair follicles as revealed by confocal microscopy. Cell Tissue Res. 1996; 283: 425-434.
3. Ronnov-Jessen L, Petersen OW. A function of filamentous α -smooth muscle actin: Retardation of motility in fibroblasts. J. Cell Biol. 1996; 134: 67-80.
4. Garrels JI, Gibson W. Identification and characterisation of multiple forms of actin. Cell. 1976; 9: 793-805.
5. Reynolds AJ, Chaponnier C, Jahoda CAB, Gabbiani G. A quantitative study of the differential expression of alpha-smooth muscle actin in cell populations of follicular and non-follicular origin, J. Invest. Dermatol. 1993; 101: 577-583.

(telogen) تمام عناصر انقباضی فولیکول بکار گرفته می‌شوند تا رشته موی قدیمی را که در طی فاز رشد قبلی ایجاد شده بطرف بالا برانند تا اینکه در نهایت آن از سطح پوست بیافتد و دوباره این نیروی انقباضی توسط α -SMA سلول‌های اطراف بر رشته موی قدیمی اعمال می‌گردد. بنابراین بطور خلاصه نتایج این تحقیق به همراه سایر مشاهدات انجام شده تایید می‌کند که وجود α -SMA در اجزاء درمی فولیکول مو برای ساختار رشته مو و حفظ پیوستگی و تمامیت فولیکول مو ضروری است.

علیرغم عدم وجود شواهد دیگر، با توجه به شباهت‌های جنینی و ساختاری که بین فولیکول مو و چنگال وجود دارد، نقش α -SMA در سلول‌های درمی بستر چنگال احتمالاً اعمال نیروی انقباضی در جهت آرایش و سازمان‌بندی سلول‌های کراتینی چنگال یا ناخن و همچنین راندن بافت ساخته شده به سمت بیرون می‌باشد، چیزی مشابه وظیفه‌ای که برای این پروتئین در دیگر ساختار پوستی یعنی غده پستانی مشخص شده است. گزارشی وجود دارد که α -SMA موجود در سلول‌های میوپیتیلیال غده پستانی در انقباض این سلول‌ها و آزاد سازی شیر از سلول‌های لومینال دخالت دارد (۳۰) ولی اینکه این پروتئین در چنگال نیز دقیقاً نقش انقباضی دارد یا در اعمال دیگر نیز مشارکت دارد یا خیر احتیاج به شواهد و مدارک بیشتری دارد. به علاوه گزارش شده که سلول‌های بیان کننده α -SMA در حقیقت یکی از مهمترین سلول‌های تولید کننده رشته‌های کلاژن میان بافتی هستند (۳۱). از اینرو شاید یکی از نقش‌های این پروتئین ممکن است دخالت در سنتز و ترشح رشته‌های موجود در لابلا سلول‌های درمی باشد. همچنین بیان قوی و شدید α -SMA در سلول‌های بافت همبند، رگ خونی، ماهیچه و پاپیلا درمی فولیکول پر در شرایط *in situ* به نقش با اهمیت این پروتئین در این ساختار اشاره می‌کند. در پرندگان پروازی همچون کبوتر، پر در مقایسه با مو در پستانداران نقش بسیار با اهمیت‌تری در حیات حیوان بازی می‌کند. این اهمیت را می‌توان در همین تحقیق با توجه به وجود یک رگ خونی مستقل برای پاپیلا درمی فولیکول پر درک نمود، چیزی که تاکنون در مورد پاپیلا درمی فولیکول مو گزارش نشده است. از طرفی بر خلاف پاپیلا درمی فولیکول مو که در شرایط *in situ* این پروتئین در آنها بیان نمی‌شود در اینجا مشاهده شد که این پاپیلا و حتی رگ خونی آن پروتئین α -SMA را بیان می‌کنند. این نتایج دوباره به نقش بارز α -SMA در فولیکول پر اشاره می‌نماید.

6. Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in higher mammals: an analysis based on amino acid sequence of the amino terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 1978; 126: 783-802.
7. Vandekerckhove J, Weber K. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation.* 1979; 14: 123-133.
8. Roy SG, Nozaki Y, Pham S H. Regulation of α -smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *The international Journal of Biochemistry & cell Biology.* 2001; 33: 723-734.
9. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound-healing. *Lab. Invest.* 1990; 63: 21-29.
10. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillissen D, Gabbiani GA monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 1986; 103: 2787-2796.
11. Bello IO, Alanen K, Salo T. Alpha-smooth muscle actin within epithelial islands is predictive of ameloblastic carcinoma. *Oral oncology.* 2009; 45: 760-765.
12. Kinner B, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Spector M. Expression of Smooth Muscle Actin in Connective Tissue Cells Participating in Fracture Healing in a Murine Model. *Bone.* 2002; 30(5): 738-745.
13. Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS. Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J. Pediat. Surg.* 1997; 32: 1017-1021.
14. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh H.D. Expression of alpha-smooth muscle (Alpha-SM) actin during corneal stromal wound-healing. *Invest. Ophthalmol. Visu. Sci.* 1995; 36: 809-819.
15. Martin P. Wound healing- aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276: 75-81.
16. Martinot V, Mitchell V, Fevrier P. Duhamel A, Pellerin P. Comparative study of split-thickness skin grafts taken from the scalp and thigh in children. *Burn.* 1994; 20: 146-150.
17. Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res.* 1998; 38: 545-548.
18. Germain L, Jean A, Auger FA, Garrel DR. Human wound-healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J. Surg. Res.* 1994; 57: 268-273.
19. Muller H. Hair neogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 1971; 56: 1-9.
20. Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. Myofibroblast. *Histology for Pathologists.* Sternberg, S. S. Eds. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997; 129-165.
21. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Gene & Development.* 2007; 17: 1189-1200.
22. Garcia CM, Kwon GP, Beebe DC. α -Smooth muscle actin is constitutively expressed in the lens epithelial cells of several species. *Experimental eye research.* 2006; 83: 999-1001.
23. Hastreiter D, Ozuna RM, Spector M. Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs, including the presence of alpha-smooth muscle actin. *J Orthop Res.* 2001; 19: 597-604.
24. Sengel P. Epidermal-dermal interactions. In *Biology of the Integument. II. Vertebrates.* Edited by J. Bereiter-Hahn, A. G. Maltoltsy & K. S. Richarts, Springer Verlag, Berlin. 1986; 374-408.
25. Dawber RPR, De Berker D, Baran R. Science of the nail apparatus. In *Diseases of the nails and their management,* Edited by R. Baran & R. P. R. Dawber, Blackwell Scientific Publications. 1994; 1-34.
26. Jahoda CAB, Oliver RF. The growth of vibrissa dermal papilla cells in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1981; 105: 623-627.
27. Jahoda CBA, Reynolds AJ, Chaponnier C, Forester JC, Gabbiani G. Smooth muscle α -actin is a marker for hair follicle dermis *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell. Sci.* 1991; 99: 627-636.
28. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews.* 2001; 81(1): 449-494.
29. Kassenbeck P. Morphology and fine structure of hair. In *Hair research, status and future aspects.* Edited by C. E. Orfanos, W. Montagna, G. Stutgen. Springer Verlag, Hidelberg; 1981; 52-64.
30. Widelitz RB, Velmaat JM, Mayer JA, Foley J, Chuong, C-M. Mammary glands and feathers: Comparing two skin appendages which help define novel classes during vertebrate evolution. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2007; 18: 255-266.
31. Yamamoto T, Nishipka K. Animal Model of Sclerotic Skin. V: Increased Expression of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblastic Cells in Bleomycin-Induced Scleroderma. *Clinical Immunology.* 2002; 102(1): 77-83.

Study of expression of α -SMA in dermal cells of skin appendages by immunohistochemistry

Gharzi A, Ph.D.^{1*}, Abbasi M, Ph.D.², Jahoda CAB, Ph.D.³

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorram-Abad, Iran.

2- Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram-Abad, Iran.

3- Department of Biology, University of Durham, Durham, UK

* Email corresponding author: ahgharzi@yahoo.com

Received: 19 Feb. 2011

Accepted: 14 Jun. 2011

Abstract

Aim: Alpha smooth muscle actin (α -SMA) is an actin isoform present in many kinds of eukaryotic cells. In this survey the expression of this protein in skin appendages was examined.

Materials and Methods: In present study we examined the expression of this protein in 3 populations of dermal cells derived from three different skin appendages *in vitro* and in one case *in situ* by means of immunohistochemistry.

Observations: The results obtained here showed that in culture this protein is expressed nearly in all dermal papilla cells derived from vibrissa follicles. In case of dermal cells derived from claw unit a high percentage of cells expressed the protein, but in feather follicles only a small percentage of dermal papilla cells were positive for this protein. The α -SMA was also strongly expressed in dermal components reside at basal region of feather follicles *in situ*.

Discussion: Here we report for the first time that α -SMA is expressed in cultured dermal cells of claw and feather follicle. Moreover, these findings along with the results provided by other workers reinforce the crucial role of this protein in normal activities of skin and cutaneous appendages in mammals and other vertebrates. Given to a high expression of this protein in dermal cells of feather follicle particularly *in situ*, it can be concluded that α -SMA plays a more important role in birds compared to its role in hair follicle of mammals but the exact role of this protein needs to be elucidated.

Key words: α -SMA, Immunohistochemistry, Skin appendages, Dermis