مقاله پژوهشی

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست پوستی از نوزاد موش سوری به روشی ساده و ارزان

نویسندگان:

مصطفی چشم پوش[۱]،اسما محمدی[۱]، ندا عبدویسی[۱]، حمیده قاسم‌پور[۱]، علیرضا خیراله*[۱و۲]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

چکیده:

مقدمه: فیبروبلاست جزء اصلی بافت پیوندی محسوب میشود که تقریبا در همه جای بدن یافت می شود و بستگی به محل قرار گرفتن آنها در بدن شکل و اعمال متفاوتی دارند. هدف این طرح، علاوه بر ساده‌سازی روش از طریق نوآوری و بومی‌سازی، تهیه سلول‌های فیبروبلاست پوستی نوزاد موش به‌منظور استفاده در مطالعات بعدی بود.

روش کار: ابتدا نوزادهای موش سوری یک تا دو روزه زیر هود بیولوژی و با ابزار استریل در الکل ۷۰٪ کشته و استریل شدند. سپس سلول‌های فیبروبلاست پوستی و با استفاده از تریپسین ۰/۱ درصد جداسازی و کشت داده شد. برای رشد بیشتر، سلول‌ها از محیط اولیه به یک محیط تازه منتقل شدند و اولین پاساژ سلولی بر روی آن‌ها انجام شد.

یافته ها: سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده در روزهای مختلف از لحاظ میزان رشد و مورفولوژی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت مورد بررسی قرار گرفتند، سلول‌هایی با هسته روشن و بیضی مایل به دوکی شکل لکه‌دار دارای ۱-۲ هستک با سیتوپلاسمی منشعب مشاهده شد که با مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست تطابق دارند. محیط کشت شفاف و هیچ‌گونه کدورت و یا آلودگی میکروبی یا قارچی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سادگی، هزینه اندک و استریل بودن شرایط بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ روش انتخابی، استفاده از آن را برای جداسازی و کشت سلول‌ها در مطالعات مختلف منطقی می‌سازد.

واژگان کلیدی: کشت سلولی، فیبروبلاست، موش

Pars J Med Sci 2016;14 (3):35-42

مقدمه:

سلول فیبروبلاست یکی از اجزای مهم بافت همبند است که تقریباً در همه جای بدن یافت می‌شود. سلول‌های فیبروبلاست بر اساس مکانشان، نقش‌های عملکردی و مورفولوژی گوناگونی دارند [۱]. پوست یک عضو همیشه در حال تغییر است که شامل سلول‌های بسیار تخصص‌یافته و با ساختار متفاوت است. پوست به‌عنوان یک سد حفاظتی، اندام‌های درونی بدن را از محیط خارجی حفاظت کرده و در ایجاد و ثابت نگاه‌داشتن درجه حرارت مناسب بدن نقش مهمی دارد. پوست اطلاعات حسی را از محیط جمع‌آوری و نقش فعال و مهمی در سیستم ایمنی بدن انسان در مقابل بیماری‌ها بازی می‌کند [۲]. به‌طورکلی پوست از سه لایه تشکیل‌شده است، اپیدرم که به آن روپوست یا بشره هم میگویند و لایه بیرونی پوست است. دِرم که به آن جِلد نیز گفته می‌شود و ضخیم‌ترین لایه پوست است. بافت زیر جلدی که هیپودرم نیز خوانده می‌شود و داخلی‌ترین لایه پوست است که از چربی و بافت همبند تشکیل‌شده و محل عبور رگ‌های خونی بزرگ‌تر و اعصاب است. یکی از وظایف مهم این لایه، تنظیم دمای خود پوست و بدن است. ضخامت این لایه در نواحی مختلف بدن و از فردی به فرد دیگر متغیر است [۲]. فیبروبلاست های پوستی بافت همبند پوست را ساخته و آن را سازمان می‌دهند [۳]. این سلول‌ها با تولید کلاژن، فیبرونکتین، سیتوکاین ها و فاکتورهای رشد نقش مهمی در بهبود زخم‌های بدن و همچنین تغذیه کردن سلول‌های توموری ایفا می‌کنند

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران .

تلفن تماس: ۰۹۱۶۷۵۰۵۰۷۵ - ۰۶۱۳۳۷۳۸۶۳۲ پست الکترونیک:akheirollah@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۰ اصلاح: ۱۳۹۵/۵/۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۶

[۴-۸]. سلول‌های فیبروبلاست پوستی در تحقیقات بیولوژی نقش‌های متنوعی بازی می‌کنند. به‌عنوان‌مثال در مطالعه‌ای منیره گلپور و همکاران از سلول‌های فیبروبلاست پوستی برای بررسی گلیکولیز بی‌هوازی استفاده کردند [۹]. در مطالعه دیگری مانیشا و همکاران سلول‌های فیبروبلاست پوستی را برای بررسی پیشرفت سلول‌های توموری به کار گرفتند [۱۰]. علاوه بر این، محققان از این سلول‌ها برای بررسی فرایندهای مربوط به ترمیم زخم استفاده می‌کنند [۱۱]. به‌علاوه، از سلول‌های فیبروبلاست جنین موش به‌عنوان تغذیه‌کننده برای کشت سلول‌های بنیادی جنین و همچنین به‌عنوان سلول تغذیه‌کننده برای کشت و نگهداری لایه‌های سلول‌های بنیادی جنینی به‌دست‌آمده از انسان و موش مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سلول‌ها یک مخلوط پیچیده اما ناشناخته از مواد غذایی و سوبسترا برای تکثیر و رشد طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی جنینی چند استعدادی تمایز نیافته فراهم می‌کنند [۱۲]. در حال حاضر سلول‌های فیبرو بلاست جنین موش و سلول‌های فیبروبلاست پوست ختنه‌گاه انسان به‌طورمعمول به‌عنوان سلول‌های تغذیه‌کننده برای نگهداری حالت چند استعدادی سلول‌های بنیادی استفاده می‌شوند [۱۳]، اما کارایی سلول‌های فیبروبلاست جنین موش در حفظ سلول‌های بنیادی جنینی انسانی تمایز نیافته به دلیل ترشح مقدار کمتر اکتین A، بیشتر از سلول‌های فیبروبلاست پوست ختنه‌گاه انسانی است[۱۴]. کشت بافت یک اصطلاح کلی است و زمانی به کار می‌رود که سلول‌ها، بافت‌ها و یا اندام‌هایی را از یک حیوان یا گیاه برداشته و آن‌ها را به یک محیط مصنوعی مساعد برای رشد بهتر منتقل می‌کنند. این محیط معمولاً از یک ظرف کشت شیشه‌ای یا پلاستیکی مناسب تشکیل‌شده است و شامل یک محیط مایع یا نیمه جامد است که مواد مغذی ضروری برای زنده ماندن و رشد را فراهم می‌کند [۱۵]. هنگامی‌که کل یک اندام یا قطعاتی از اندام سالم موردمطالعه قرار می‌گیرد، به آن کشت اندام و زمانی که سلول‌ها از تکه‌هایی از یک اندام برداشته می‌شود و ارتباطشان با سلول‌های مجاور قطع و آماده کشت و مطالعه می‌شوند، به آن کشت سلولی می‌گویند[۱۵]. کشت سلولی یکی از ابزار اصلی مورد استفاده در زندگی علمی امروز بوده و نقش‌های متنوعی را در تحقیقات بیولوژی ایفا می‌کند. کشت سلولی محیطی مناسب برای مطالعه فرایندهای مختلفی از قبیل بررسی اثر داروها و مواد آرایشی و شیمیایی روی سلول‌های مختلف، بررسی فرایندهای مربوط به پیری و همچنین فرایندهای مربوط به تغذیه است [۱۵]. با استفاده از کشت سلولی می‌توان سازوکارهای تبدیل سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی را مطالعه کرد و بدین ترتیب روش و داروهای مناسب برای مقابله با انواع مختلف سرطان را پیدا کرد. همچنین با استفاده از کشت سلولی می‌توان سلول‌های جنینی را از زنان باردار جدا کرده، کشت داد و بدین ترتیب سلامت جنین درون بدن مادر را مورد بررسی قرار داد. علاوه بر این، کشت سلولی در مهندسی ژنتیک، ژن‌درمانی و تولید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۵]. کشت سلولی به سه شکل، کشت اولیه، کشت دوم یا پاساژ سلولی و خریدن سلول انجام می‌شود. هنگامی‌که سلول‌ها از ارگان جدا شدند و در محیط کشت مناسب قرار گرفتند، سلول‌ها به بستر محیط متصل شده، تقسیم و رشد می‌کنند که به این نوع کشت، کشت اولیه می‌گویند. این فرایند به دو صورت انجام می‌شود: ۱-کشت ریز نمونه ۲-تجزیه آنزیماتیک. هنگامی‌که سلول‌ها در ظرف کشت اولیه رشد کردند و همه جای بستر کشت قابل‌دسترس را پر کردند، در این هنگام باید آن‌ها را برای ادامه رشد برای دومین بار کشت داد. این روش معمولاً با برداشتن سلول‌ها به‌آرامی از بستر به کمک آنزیم انجام می‌شود که به این فرایند کشت دادن فرعی می‌گویند. یک‌راه برای به دست آوردن کشت‌های سلولی خریدن یا قرض گرفتن کشت‌های سلولی آماده‌شده از سازمان‌هایی از جمله ATCC و یا the Coriell Institute for Medical Research است [۱۵]. به دلیل این‌که کشت سلولی اولیه به شرائط In vivo (در داخل بدن) نزدیک‌تر است، نسبت به روش‌های دیگر با ارزش‌تر بوده و می‌تواند کمک بزرگی به محققان کند[۱۶] با توجه به اهمیت کشت سلولی در زندگی علمی امروز، مطالعه حاضر با هدف ساده‌سازی روش کشت سلولی از طریق نوآوری و یا بومی‌سازی آن و همچنین کشت سلول‌های فیبروبلاست پوستی نوزاد موش قابل‌استفاده برای مطالعات بعدی می‌باشد.

روش کار:

مواد موردنیاز

مواد مورد استفاده در این طرح شامل: فلاسکT-25، فلاسک T-75، پتری دیش ۱۰cm، ۶-Well dishes، FBS منجمد، تریپسین، محیط کشت DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)، اتانول ۱۰۰٪، لام و لامل، بافر PBS (Phosphate-buffered saline) ، لوله فالکون در دو حجم ۱۵ و ۵۰ میلی‌متری بودند.

تهیه موش ها:

در اجرای این پروژه از نوزاد موش یک تا دو روزه نژاد سوری استفاده شد. این موش‌ها از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات

آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز که تحت شرایط مناسب نور و تاریکی نگهداری می‌شدند، تهیه شدند.

جداسازی و کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست پوستی:

قبل از شروع کار، ابتدا تمام وسایل از جمله ست جراحی و ظروف کشت و بافر فسفات و غیره توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار شدید استریل شدند. همچنین محیط کار توسط الکل ۷۰٪ و اشعه ماورابنفش استریل شد. مراحل جداسازی و کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست پوستی به ترتیب عبارت‌اند از:

ابتدا نوزادهای موش زیر هود بیولوژی و به‌وسیله ابزار استریل با جدا نمودن سر کشته شدند و سپس با کمک پنس قطعات کوچکی از پوست آن‌ها جدا و به پتری دیش حاوی dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) روی یخ منتقل شد. قطعات پوست موش‌ها با استفاده از اسکالپل به ذرات ریزتر خردشده و همراه با dPBS به لوله فالکون ۱۵ میلی‌متری منتقل شد. از بالا و پایین کردن برای شستشو و بیشتر خرد شدن این قطعات استفاده شد و پس از ته‌نشین شدن قطعات با کمک سانتریفوژ در دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه، dPBS از لوله‌های فالکون تخلیه‌شده و تریپسین ۰/۱ درصد به سلول‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آن در دور ۱۱۰۰rpm و به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و تریپسین از لوله‌ها تخلیه شد. از محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد برای خنثی کردن تریپسین استفاده شد. به این صورت که حجمی معادل تریپسین از محیط کشت به لوله‌های فالکون اضافه‌شده و پس از بالا و پایین کردن سلول‌ها سانتریفوژ در دور rpm ۱۱۰۰ و به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سپس محیط کشت حاوی تریپسین از لوله‌ها تخلیه و بار دیگر به سلول‌های محیط کشت اضافه‌شده و سلول‌ها به فلاسک های کشت حاوی محیط کشت منتقل شدند. فلاسک های کشت در محیط ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند.۷۲ ساعت بعد از کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست، محیط کشت آن‌ها تعویض شد. مورفولوژی سلول‌ها در تمامی مراحل کشت با میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus) بررسی شد.

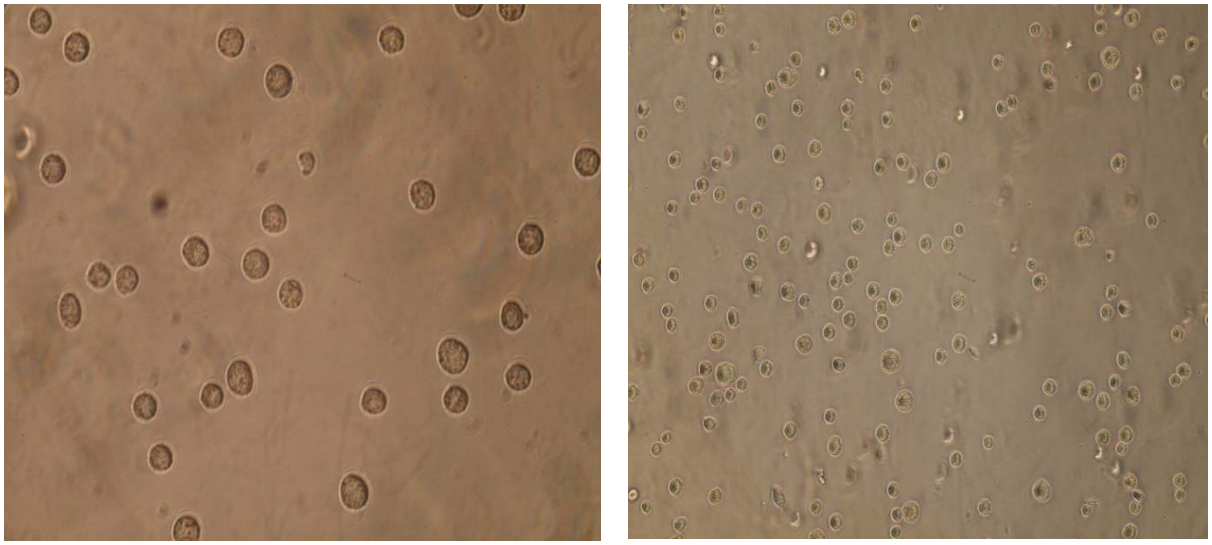
انجام این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز مورد تایید و با شناسه اخلاقی IR.AJUMS.REC.1395.127 تصویب گردید.

کشت ثانویه سلول‌های فیبروبلاست پوستی:

سلول‌های فیبروبلاست پوستی کشت داده‌شده برای رشد بیشتر از محیط اولیه به یک محیط تازه منتقل شدند و اولین پاساژ سلولی یک هفته پس از کشت اولیه و رسیدن تراکم سلولی ۹۸ درصد به شرح زیر بر روی این سلول‌ها انجام شد. قبل از شروع کار، تمام وسایل ازجمله ظروف کشت و بافرها و غیره توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار شدید استریل شدند. همچنین محیط کار توسط الکل ۷۰٪ استریل شد. سپس محیط کشت فلاسک ها تخلیه و سلول‌ها با استفاده از بافر dPBS شستشو داده شدند. بعد از این مرحله، به فلاسک ها تریپسین ۰/۱ درصد اضافه و فلاسک ها به‌آرامی تکان داده شدند. پس از اضافه کردن محیط کشت برای خنثی کردن تریپسین، محتویات به لوله‌های فالکون منتقل و در دور ۱۱۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی از لوله‌ها خارج و جهت اطمینان کامل از حذف تریپسین بار دیگر با DMEM + FBS 10% شستشو داده شدند. برای شمارش تعداد سلول‌ها پس از پیپت کردن، یک قطره (۱۰ میکرو لیتر) از سوسپانسیون سلولی به لام نئوبار اضافه شد و لامل بر روی آن قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در ناحیه RBC شمارش شد. برای تعیین تعداد کل سلول‌ها، عدد حاصل از شمارش در ضریب رقت سوسپانسیون سلولی و عدد ۱۰۴ ضرب شد. با توجه به تعداد سلول‌ها و ظرفیت فلاسک های کشت سلول‌ها در تعداد متناسبی از فلاسک ها کشت و در محیط ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند.

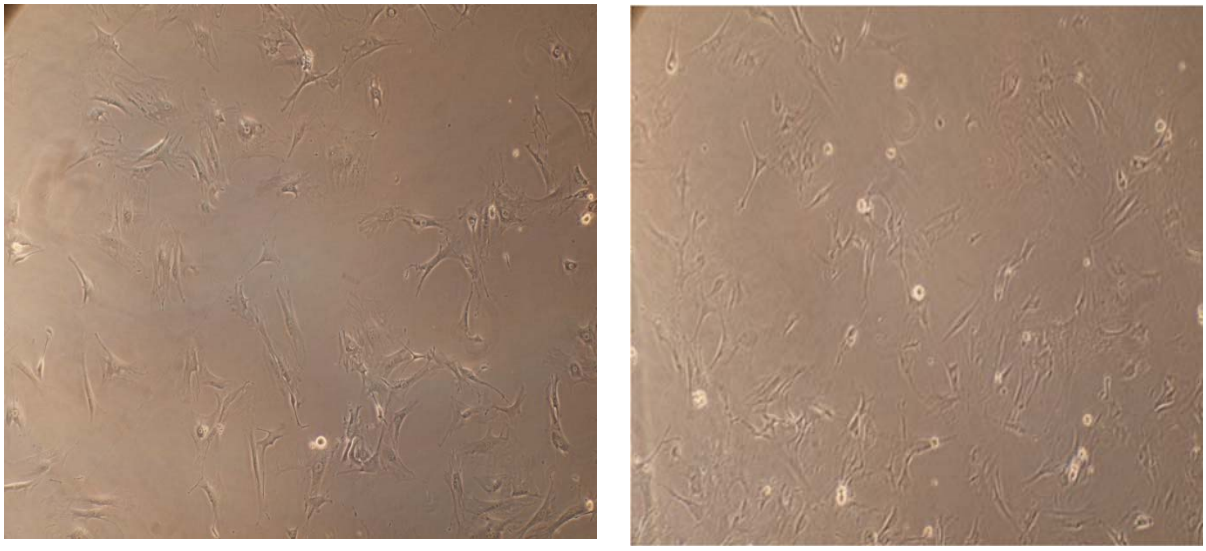
یافته ها:

سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده در روزهای مختلف از لحاظ میزان رشد و مورفولوژی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus) با بزرگنمایی ۱۰ و۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند. در شکل ۱، ۲ و ۳ مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست حاصل از اولین پاساژ سلولی در زمان‌های مختلف نشان داده‌شده است. در نهایت سلول‌هایی با هسته روشن و بیضی مایل به دوکی شکل لکه‌دار دارای ۱–۲ هستک با سیتوپلاسمی منشعب مشاهده شد که با مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست تطابق دارند. ظاهر محیط کشت شفاف بوده و در آن هیچ‌گونه کدورت، آلودگی میکروبی یا قارچی مشاهده نشد.



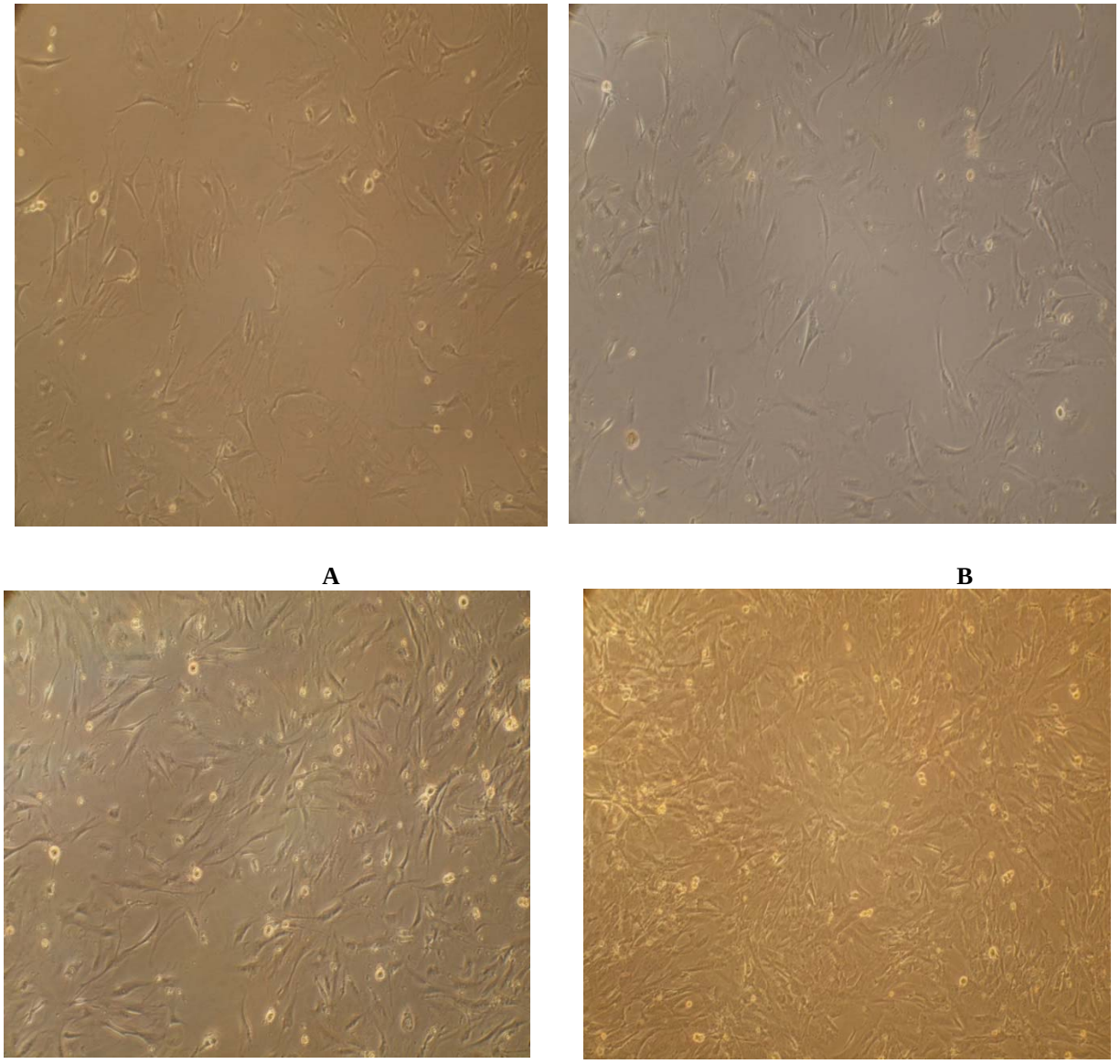
A **B**

شکل ۱: سلول‌های فیبروبلاست نیم ساعت پس از اولین پاساژ سلولی
(A): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم کمتر (B): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم بیشتر



A **B**

شکل ۲: سلول‌های فیبروبلاست یک روز پس از اولین پاساژ سلولی
(A): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم بیشتر (B): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم کمتر



شکل ۳: سلول‌های فیبروبلاست دو روز پس از اولین پاساژ سلولی
(A,B): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم کمتر (C): سلول‌های فیبروبلاست با تراکم بیشتر
(D): محیط فرش شده توسط سلول‌های فیبروبلاست با تراکم بیشتر

بحث:

بسیاری از سلول‌های جانداران در محیط خارج از بدن قابل‌کشت و نگه‌داری هستند. کشت سلولی یکی از روش‌های متداول و اصلی مورد استفاده در زندگی علمی امروزی به‌خصوص در تحقیقات علوم پزشکی است. از آنجا که فیبروبلاست پوستی اولین لایه دفاعی جلدی را تشکیل می‌دهد، بنابراین تلاش‌های متعددی برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست پوست موش و جوندگان صورت گرفته است که هر کدام مزایا و معایبی دارند. در این مطالعه با روشی ساده، کم‌هزینه و قابل انجام با حداقل امکانات آزمایشگاهی فیبروبلاست‌های پوستی جنین موش جداسازی و در محیط کشت فاقد هر نوع آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. اگر روشی پایه‌گذاری شود که بدون دخالت آنتی‌بیوتیک‌ها که خود از عوامل مداخله‌گر در فرایندهای سلولی هستند، مدل سلولی از فیبروبلاست فراهم شود، می‌تواند سیستم مناسبی برای تحقیقات بیولوژی مختلف همچون تنظیم چرخه سلولی، بازسازی DNA و آپوپتوزیس بوده و منجر به مطالعه بهتر ساز وکارهای مولکولی مربوط به تنظیم تولید بافت همبند پوست و نیز پاتولوژی بیماری‌های پوستی شود [۳]. در سال ۲۰۱۲ جی جوسفسیزوک و همکاران یک روش بهینه برای جدا

کردن و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین موش فراهم کردند. آن‌ها در این پروتکل برای کشت سلول‌های فیبروبلاست یک محیط کشت جدید به نام Conditioned Medium ارائه دادند و برای ارزیابی آن از روش الیزا و برای رشد مناسب سلول‌های فیبروبلاست از عوامل رشد متعددی از جمله گلوتامین استفاده کردند [۱۷]. همچنین در سال ۲۰۱۰ سلونوو و همکاران یک پروتکل برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست پوست و شش جوندگان بالغ فراهم کردند. آن‌ها در این بررسی قادر به جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست از موش و رت های آزمایشگاهی تا جوندگان وحشی از قبیل سگ آبی، جوجه‌تیغی و سنجاب شدند [۱۶]. یکی از مزایای روش یادشده این است که سلول‌های به‌دست‌آمده بیشتر به شرایط داخل بدن نزدیک هستند. جی‌خو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ جهت کشت سلول‌های فیبروبلاست پروتکل جدیدی ارائه دادند. در این پروتکل برخلاف پروتکل ارائه‌شده در مطالعه حاضر، تعداد و مدت‌زمان انکوباسیون در مرحله کشت اولیه سلولی بیش‌تر بود [۱۸]. در مطالعه دیگری که توسط مارک و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نیز تعداد مراحل کشت اولیه سلولی بیش‌تر بوده و برای به دست آوردن سلول‌های سالم و مناسب، از پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای جلوگیری از آلودگی استفاده شده است [۱۹]. از آنجایی که استفاده از آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ می‌تواند باعث اختلال در نتایج تحقیقات شود، در مطالعه حاضر برخلاف مطالعات قبلی، سلول‌های فیبروبلاست از پوست نوزاد یک تا دو روزه در شرایط استریل و بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ جداسازی شد. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست پوستی کشت داده شده فاقد هرگونه آلودگی بوده و در پایان کار اثری از آلودگی باکتریایی و قارچی دیده نشد. به دلیل عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ در این روش، اختلالی در کشت سلول‌های فیبروبلاست ها مشاهده نشد. از دیگر مزایای این روش علاوه بر کاهش مراحل کشت و به صرفه بودن، عدم استفاده از عوامل رشد همچون گلوتامین است.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، استفاده از روش پیشنهادی برای جداسازی و کشت سلول‌ها به دلیل سادگی، عدم نیاز به صرف هزینه زیاد و استریل بودن شرایط بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ در مطالعات آتی منطقی به نظر می‌رسد.

تعارض منافع:

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تشکر و قدردانی:

این مقاله از طرح تحقیقاتی (CMRC-82) استخراج و با حمایت مالی معاونت توسعه پژوهش و فناوری تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شده است.

References:

1. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(20):12877-82.
2. Borna Company. Layers of skin [Internet]. [Available date25/1/2016]; [one page]. Available from: http://www.borna-ray.com/JA933101.html.
3. Rittié L, Fisher GJ. Isolation and culture of skin fibroblasts. Methods Mol Med 2005; 117:83-98.
4. Xi X, McMillan DH, Lehmann GM, et al. Ocular fibroblast diversity: implications for inflammation and ocular wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(7):4859-65.
5. Kuro-o M. Klotho in health and disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 2012; 21(4): 362-8.
6. Stenmark KR, Frid MG, Yeager M, et al. Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. Pulm Circ 2012; 2(1):3.
7. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 6(1): 67-80.
8. Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. Circ Res 2010; 107(11):1304-12.
9. Golpour M, Niaki HA, Khorasani HR, et al. Human Fibroblast Switches to Anaerobic Metabolic Pathway in Response to Serum Starvation: A Mimic of Warburg Effect. Int J Mol Cell Med 2014;3(2):74.
10. Tripathi M, Billet S, Bhowmick NA. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. Cell Adh Migr 2012;6(3):231-5.
11. Philp A, Macdonald AL, Watt PW. Lactate–a signal coordinating cell and systemic function. J Exp Biol 2005;208(24):4561-75.
12. Wesselschmidt, R. L. Mouse Embryonic Feeder Cell Protocol: Mitotic Inactivation of MEFs by Mitomycin C. 2009, Available at: http://www.thermo.com/

13. Pekkanen-Mattila M, Ojala M, Kerkelä E, et al. The Effect of Human and Mouse Fibroblast Feeder Cells on Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cells International. Stem Cells Int 2012, Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2012/875059
14. Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, et al. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. Int J Dev Biol 2008;52(4):353.
15. Ryan JA. Introduction to Animal Cell Culture. Corning Incorporated, Life Sciences, Chelmsford St. 2008. 3-8
16. Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. J Vis Exp 2010; 5(44): 1-4.
17. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. J Vis Exp 2012;(64):1-5.
18. Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. Curr Protoc Mol Biol 2005 May; Chapter 28:Unit 28.1.
19. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell 2002; 13 (3): 978-88.

Original Article

Isolation and culture of mouse newborn skin fibroblast cells in a simple and inexpensive method

Mostafa Chashmpoosh [1], Asma Mohammadi [1], Neda Abdovis [1], Hamideh Ghasempoor[1] Alireza Kheirollah[1,2*]

Received: 2016/29/03 Revised:201/6/25/07 Accepted: 2016/6/09

1. Dept of Biochemistry, Medical School, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2. Cellular & Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(3):35-42

Abstract

Introduction:
Fibroblasts are an important component of connective tissue found almost everywhere in the body. Fibroblasts have different functions and morphologies based on their location. This project aimed to simplify isolating newborn mouse skin fibroblasts for use in future studies.

Methods & Materials:
First, Balb/c neonate mice of one to two days old were slaughtered under laminar hood using sterilized tools. Then, skin fibroblasts were isolated using trypsin 1% and cultured. Finally, the cells were transferred to a new growth medium for the first passage.

Results:
Fibroblasts were evaluated in different days in terms of growth and morphology by a fluorescent microscope. Cells with clear oval or spindle-shaped nucleus with one or two nuclei were observed, which correspond with fibroblast morphology. The culture media were clear and showed no opacity or microbial or fungal contamination.

Conclusion:
Based on the results, it is logical to use this method because it is simple, inexpensive and sterile, so it does not require antibiotics and antifungal treatment.

Keywords: Cell culture, Fibroblast, Mouse

* Corresponding author, Email: akheirollah@gmail.com