

Culture and Expansion of Rat Mesenchymal Stem Cells Using the Serum Prepared from Rat's Peripheral Blood

Eslaminejad M.B., Ph.D.*, Rouhi L., M.Sc., Arabnajafi M., Ph.D., Baharvand H., Ph.D.

** P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effects of prepared serum from rat peripheral blood on growth and viability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro.

Materials and Methods: Bone marrow cells prepared from rat's tibia and femur central canal were cultured either in medium containing fetal bovine serum (FBS) or rat peripheral blood-derived serum (PBDS) for three successive passages during which viability, growth and proliferation of the cells were evaluated by MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide], colony forming assay, calculation of population doubling number and daily examination of the cell growth for drawing growth curve. Each experiment was performed ten times and the mean values were statistically compared. In this study, third passaged cells were evaluated in terms of their bone and adipocyte differentiation potentials.

Results: Morphologically, the cells cultured with PBDS appeared to be somewhat more spindle than of FBS cells. Comparatively, these cells seemed to have clear cut border than of FBS-cultured cells. According to MTT assay, the cells from PBDS group significantly showed more absorption value than of FBS group indicating that they would be more viable than FBS cells. Furthermore, in this group, more colonies were formed and more population doubling number (about twice of FBS cells) occurred ($p < 0.004$). Growth curve of two cells revealed further differences; in contrast to FBS, the cell from PBDS group showed no lag phase and their log phase was much more longer than of FBS cells (2 versus 6 days). Third passaged cells were readily differentiated to bone and adipocyte lineages confirming their mesenchymal stem cell nature.

Conclusion: Taken together, the serum prepared from rat peripheral blood could significantly improve the viability and proliferation potential of the rat MSCs and in this term they could be considered as appropriate substitute for FBS.

Key words: Mesenchymal stem cells, Bone and cartilage differentiation, Peripheral blood-derived serum, FBS, Cell expansion

کشت و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی موش صحرایی با استفاده از

سرم تهیه شده از خون محیطی

✍ محمد رضا باغبان اسلامی نژاد Ph.D.*، لیلا روحی M.Sc.**، سید محمود عرب نجفی Ph.D.**، حسین بهاروند Ph.D.*

* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** بخش زیست‌شناسی دانشگاه تهران

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی توان سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی در پیشبرد رشد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی همان‌گونه در مقایسه با سرم گاوی

مواد و روشها: مغز استخوان از کانال مرکزی استخوانهای درشت نی و ران موش صحرایی خارج شد و در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (FBS: fetal bovin serum) و سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی (PBDS: peripheral blood-derived serum) برای سه پاساژ متوالی کشت شد و در طول این مدت توان زیستی، رشد و تکثیر سلولها، با روش $MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide]$ ، شمارش کلون، محاسبه تعداد دوبله شدن جمعیت سلولی و بررسی رشد روزانه سلول (به منظور ترسیم منحنی رشد) مطالعه شد. هر مطالعه ۱۰ بار تکرار شد و میانگین نتایج، مقایسه آماری شد. در مطالعه حاضر برای اطمینان از ماهیت بنیادی- مزانشیمی سلول، از روش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد.

یافته‌ها: از لحاظ مورفولوژی سلولهای گروه PBDS در مقایسه با FBS اندکی دوکی تر و با حد و مرز مشخص‌تری ظاهر شدند. بر اساس آزمون MTT، سلولهای گروه PBDS از لحاظ آماری میزان جذب بالایی داشتند. این شاخص نشان می‌دهد که سلولهای این گروه از توان زیستی بالایی برخوردار بودند. به علاوه در این گروه، تعداد کلون بیشتری تشکیل شد و تعداد دوبله شدن جمعیت سلولی در حدود دو برابر ($p < 0.004$) بیشتر از گروه FBS بود (۱۷/۱۸ در مقابل ۱۰/۵۴). منحنی رشد ترسیم شده برای دو گروه نیز تفاوتی داشت. در گروه PBDS برخلاف FBS فاز lag مشاهده نشد و مرحله رشد لگاریتمی آن شیب بیشتری داشت. براساس منحنی رشد، زمان دوبله شدن جمعیت سلولی در گروه PBDS، ۴۸ ساعت و برای گروه FBS ۶ روز بود. سلولهای پاساژ سوم دو گروه مورد مطالعه به راحتی به استخوان و چربی تمایز یافتند که نمایانگر ماهیت بنیادی- مزانشیمی آنها بود.

نتیجه‌گیری: روی هم رفته می‌توان گفت که استفاده از سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی می‌تواند به طور مشخص قابلیت حیات و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی همان‌گونه را افزایش دهد و از این نظر جایگزین مناسبی برای سرم گاوی است.

کلیدواژه‌ها: سلول بنیادی مزانشیمی، تمایز به استخوان و چربی، سرم تهیه شده از خون محیطی، سرم گاوی، تکثیر سلولی

✍ آدرس مکاتبه: تهران، میدان بنی‌هاشم، کوچه حافظ، پژوهشکده رویان،

صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

Email: bagesla@yahoo.com