

THỬ NGHIỆM THU NHẬN TẾ BÀO GỐC TỪ MÔ NHUNG HƯƠNG SAO (*CERVUS NIPPON*)

Nguyễn Ngọc Như Băng¹, Nguyễn Tiến Bằng¹, Trần Hoàng Dũng², Lê Thanh Hưng¹

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Công nghệ sinh học - Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sự thay thế hằng năm của sừng hương là trường hợp tái sinh khác thường ở động vật có vú, một loài mà khả năng tái sinh lại các phần bị mất là rất hạn chế. Những nghiên cứu gần đây cho thấy hiện tượng tái sinh này là một quá trình dựa vào sự hoạt động có tính chu kỳ của các tế bào gốc ở cuống sừng. Trên cơ sở đó, chúng tôi thử nghiệm thu nhận tế bào gốc từ mô nhung hương sao (*Cervus nippon*). Các tế bào đơn nhung hương được thu nhận và nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12, 10% FBS. Sau khoảng 10 ngày nuôi cấy, các tế bào nhung hương tăng sinh mạnh và chiếm khoảng 70 - 80% diện tích bề mặt nuôi cấy. Tiếp đó, các tế bào nhung hương được tiến hành cấy chuyển bằng Trypsin - EDTA 0,25% nhằm cung cấp chất dinh dưỡng và không gian cho sự phát triển của chúng. Sau một thời gian nuôi cấy dài hạn, các tế bào nhung hương thu nhận được thể hiện tính đa năng giống tế bào gốc. Trong môi trường có tác nhân biệt hóa thích hợp, các tế bào nhung hương có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, tế bào mỡ...

Từ khóa: hương, nhung hương, tế bào sừng hương, tế bào nhung hương, tái sinh

MỞ ĐẦU

Ở một số loài hương, tốc độ tái tạo nhung có thể đạt 2 cm/ngày. Do đó, hiện tượng tái sinh ở sừng hương thu hút nhiều sự chú ý của các nhà khoa học. Trước đây, sự tái sinh này được cho là một quá trình tái sinh các bộ phận bị mất giống với sự tái sinh các chi ở lưỡng cư - sự phân biệt hóa. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây (Goss, 1983; Price *et al.*, 2005; Cegielski *et al.*, 2006; Rolf *et al.*, 2006; 2008; Berg *et al.*, 2007; Kierdorf *et al.*, 2007) lại cho thấy không giống như sự tái sinh các phần đã mất ở lưỡng cư, sự tái sinh ở sừng hương liên quan đến sự biệt hóa tế bào và là một hiện tượng dựa vào tế bào gốc. Mặc dù vậy, các bằng chứng trực tiếp về sự có mặt của tế bào gốc trong nhung hương nguyên phát hoặc tái sinh vẫn chưa rõ ràng. Vì vậy, việc thu nhận tế bào gốc nhung hương và tìm hiểu vai trò của nó trong quá trình tái sinh của sừng hương sẽ mang lại một ý nghĩa to lớn trong lĩnh vực y học phục hồi.

Năm 2008, Rolf và đồng tác giả tại Trường Đại học Goettingen (Goettingen, Đức) đã đưa ra những bằng chứng rất quan trọng về sự tồn tại của các tế bào gốc nhung hương. Theo đó, họ tìm thấy sự hiện diện của các tế bào dương tính với các marker của tế bào gốc trung mô (như STRO - 1, CD133 và CD271 (Dennis *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Baksh *et al.*, 2004)) trong các vùng khác

nau của nhung hương cũng như trong cuống sừng của hương hoang dã (*Dama dama*) (Rolf *et al.*, 2008). Và các tế bào STRO - 1⁺ phân lập từ các vùng khác nhau có thể biệt hóa trong điều kiện *in vitro* thành các dòng tế bào tạo xương và tạo mỡ. Kết quả của nghiên cứu này hỗ trợ cho quan điểm quá trình tái sinh hằng năm của sừng hương phụ thuộc vào sự hoạt động tuần hoàn của các tế bào gốc trung mô nằm trong màng xương cuống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu mô nhung hương sao (lộc nhung) thu nhận từ Cơ sở chăn nuôi hương nai Trường Thịnh, Xã Phước Tân, Huyện Long Thành, Tỉnh Đồng Nai.

Nhung hương 55 ngày tuổi được thu nhận tại Cơ sở chăn nuôi hương nai Trường Thịnh. Sau khi cắt, nhung được bảo quản lạnh trong đá khô và chuyển về phòng thí nghiệm. Thời gian từ khi cắt nhung tới khi thao tác được giới hạn trong vòng 6 h.

Phương pháp

Thu nhận và nuôi cấy sơ cấp tế bào đơn từ mô nhung hương

Quy trình thu nhận tế bào đơn (Allen *et al.*,

2002) được tiến hành như sau: tại phòng thí nghiệm, phần ngọn của nhung hươu - vùng tăng trưởng tạo sụn - được thu nhận; sau khi loại bỏ lớp biểu bì, phần mô này được cắt thành những mảnh mô nhỏ có kích thước khoảng 2 - 4 mm²; tiếp đó, những mảnh mô nhỏ này được ủ lần lượt với hai loại enzyme trypsin, collagenase type I (*Sigma*) nhằm phân cắt các cầu nối liên bào giữa các tế bào với nhau; sau đó, dịch tế bào thu nhận được sẽ được lọc qua màng lọc tế bào (với kích thước lỗ lọc là 70 µm) để tách riêng biệt từng tế bào đơn; dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 2.500 vòng/phút trong 5 phút; phần cặn tế bào đơn được thu nhận, huyền phù trở lại trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS; chuyển 3 ml dịch huyền phù tế bào vào mỗi flask 25cm² sao cho mật độ tế bào đạt 5.10⁵ tế bào/ml; các flask được ủ trong tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂.

Nuôi cấy thứ cấp - cấy chuyển tăng sinh

Khi số lượng tế bào nhung hươu đạt 70 - 80% diện tích bề mặt flask nuôi cấy, các tế bào này được tiến hành cấy chuyển để cung cấp dinh dưỡng và không gian sống cho sự phát triển của chúng.

Quy trình cấy chuyển được tiến hành như sau: loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ và rửa flask hai lần bằng HBSS (*Gibco*); loại bỏ dịch rửa và bổ sung 2 - 3 ml Trypsin - EDTA 0,25%; sau 2 - 3 phút, khi tế bào đã tách rời hoàn toàn khỏi bề mặt nuôi cấy, bổ sung 2 - 3 ml môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS; ly tâm thu nhận cặn tế bào đơn; tái huyền phù cặn tế bào thu nhận được bằng môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS và chia vào 2 - 3 bình nuôi mới (phụ thuộc vào số lượng tế bào thu nhận được).

Để theo dõi sự tăng sinh của tế bào, các bước sau được tiến hành: chọn flask có lượng tế bào đạt 70 - 80% diện tích bề mặt nuôi cấy, tách lớp đơn tế bào bằng Trypsin EDTA 0,25%, ly tâm thu cặn và huyền phù tế bào với môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS, dịch huyền phù tế bào được cho vào đĩa 24 giếng với mật độ ban đầu là 5.10⁵ tế bào/ml, mỗi giếng 1 ml, sau mỗi 48 h, tách tế bào từ 3 giếng của đĩa và tiến hành xác định lại mật độ bằng buồng đếm hồng cầu, ghi nhận mật độ trung bình. Sự thay đổi mật độ tế bào được theo dõi qua 10 ngày nuôi cấy.

Khả năng biệt hóa của tế bào nhung hươu

Các tế bào nhung hươu thu được sau 5 - 7 lần cấy chuyển được sử dụng cho thí nghiệm biệt hóa *in vitro*.

Biệt hóa tế bào nhung hươu thành tế bào xương

Các tế bào nhung hươu với mật độ thích hợp được nuôi trong môi trường DMEM/F12 10% FBS có bổ sung dexamethasone 0,1 µM, L - ascorbic acid 2 - phosphate 50 mM (AsAP), β - glycerol phosphate 10 mM và EGF 10 µM (*Sigma*). Sau 21 ngày nuôi cấy, sự biệt hóa được đánh giá thông qua khả năng tích tụ của calcium trong tế bào chất hay chất nền ngoại bào nhờ nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red S (*Sigma*).

Biệt hóa tế bào nhung hươu thành tế bào mỡ

Các tế bào nhung hươu với mật độ thích hợp được nuôi trong môi trường DMEM/F12 10% FBS có bổ sung dexamethasone 0,5 µM, indomethacin 60 µM, insuline 10 µM, isobutyl methylxanthine 0,5 µM (IBMX) (*Sigma*). Sau 21 ngày nuôi cấy, sự biệt hóa được ghi nhận khi quan sát dưới kính hiển vi (ở độ phóng đại X20, X40 sẽ thấy có sự xuất hiện của các giọt mỡ nhỏ). Các tế bào mỡ còn được xác định dựa vào phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Oil Red O (*Sigma*). Oil Red O là thuốc nhuộm lipid, nó chỉ hòa tan trong lipid và tạo màu đỏ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu nhận mô nhung hươu

Nhung hươu sau khi cắt khỏi cơ thể con vật ở trạng thái mềm, mọng và vẫn còn huyết nhung. Sau 2 h di chuyển, nhung hươu được đưa về tới phòng thí nghiệm để bắt đầu quá trình xử lý.

Kết quả thu nhận và nuôi cấy sơ cấp tế bào đơn từ mô nhung hươu

Các tế bào đơn từ vùng mô đang tăng trưởng tạo sụn của nhung hươu được thu nhận thành công bằng quy trình phân tách và thu nhận tế bào đơn của Allen và đồng tác giả (Allen *et al.*, 2002). Vì được thu nhận từ một khối mô đang tăng trưởng tạo sụn nên các tế bào này là một tập hợp của nhiều loại tế bào khác nhau: tế bào hồng cầu, tế bào sụn, nguyên bào sợi, tế bào tạo sụn, các loại tế bào của mô liên kết, tế bào đầu nguồn, tế bào gốc... Do đó, kết quả quan sát bước đầu cho thấy, các tế bào đơn vừa được thu nhận có hình dạng và kích thước không đồng nhất (Hình 1).

Ở thời điểm 24 h sau khi bắt đầu nuôi cấy, đa phần các tế bào nhung hươu lắng xuống đáy flask, một số tế bào bắt đầu bám dính vào bề mặt nuôi cấy, tuy nhiên biểu hiện này chưa rõ ràng (Hình 2A).

Ở thời điểm 48 h sau khi bắt đầu nuôi cấy, các tế

bào nhưng hươu đã bám dính nhiều vào bề mặt nuôi cấy. Nhưng, bên cạnh đó, một số tế bào vẫn ở trạng thái trôi nổi lơ lửng trong môi trường nuôi cấy do không thể phục hồi tổn thương gặp phải trong quá trình thu nhận. Lúc này, môi trường nuôi cấy cũ được thay bằng môi trường mới. Sự thay thế này sẽ cung cấp chất dinh dưỡng giúp các tế bào nhưng hươu phát triển, đồng thời giúp loại bỏ các tế bào không bám dính (tế bào tổn thương không thể phục hồi, tế bào chết). Các tế bào bám dính được tiếp tục nuôi cấy với chế độ thay môi trường 2 ngày/lần.

Ở thời điểm 72 h sau khi bắt đầu nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu đã ổn định và bắt đầu tăng sinh. Lúc này, phần lớn các tế bào có dạng hình thoi, hình dạng đặc trưng của nguyên bào sợi (Hình 2B).

Sau 10 ngày nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu hợp dòng, bám đều và trải rộng trên bề mặt nuôi cấy (Hình 2D). Khi lượng tế bào nhưng hươu chiếm khoảng 70 - 80% diện tích bề mặt nuôi cấy, thao tác cấy chuyển được thực hiện để cung cấp chất dinh dưỡng cũng như không gian cho các tế bào này tiếp tục phát triển.

Nuôi cấy thứ cấp - cấy chuyển tăng sinh

Sau khi nuôi cấy sơ cấp, các tế bào có khả năng bám dính và phân chia sẽ được nhân sinh khối bằng cách cấy chuyển nhiều lần. Ngoài mục đích tăng sinh khối, việc cấy chuyển nhiều lần sẽ giúp loại bỏ dần các tế bào trưởng thành thông qua sự ngắn dần của telomere sau mỗi lần phân bào (tế bào sinh dưỡng có số lần phân chia phụ thuộc vào độ dài của telomere, telomeres rút ngắn lại sau mỗi lần tế bào phân chia, khi telomeres ngắn đến một giới hạn nhất định thì tế bào không phân chia được nữa và tự chết theo chương trình), chỉ giữ lại những tế bào có khả năng tăng sinh dài hạn và khả năng tự làm mới.

Khi vừa cấy chuyển, các tế bào nhưng hươu có dạng hình tròn và trôi lơ lửng trong môi trường, giống như các tế bào đơn khi vừa được thu nhận từ mô nhưng hươu.

Sau 24 h nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu bắt đầu bám dính và trải dài. Sau 48 h nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu đã trải rộng, có dạng hình thoi đặc trưng và tiếp tục tăng sinh. Tuy nhiên, khả năng tăng sinh của tế bào vẫn còn chậm. Sau 3 ngày nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu tăng sinh mạnh. Sau 7 ngày nuôi cấy, các tế bào nhưng hươu hợp dòng và trải đều trên bề mặt nuôi cấy.

Sau khoảng 3 lần cấy chuyển (Hình 4), hình

dạng tế bào nhưng hươu tương đối đồng nhất và giống với hình dạng của các tế bào nhưng hươu có biểu hiện tính gốc được thu nhận bởi Berg và đồng tác giả hay bởi Rolf và đồng tác giả (Hình 3) (Berg *et al.*, 2007; Rolf *et al.*, 2008). Và theo kết quả khảo sát (Bảng 1), số lượng tế bào nhưng hươu tăng lên gấp đôi sau mỗi 48 h nuôi cấy. Như vậy, bước đầu thấy rằng, thời gian giữa hai lần phân bào của tế bào nhưng hươu là 48 h. Kết quả này chưa được báo cáo nào công bố.

Thông thường, một tế bào sinh dưỡng trưởng thành sẽ phân chia khoảng 40 - 60 lần, sau đó chúng đi vào chu trình chết đã được định sẵn (apoptosis). Ở đây, trong khoảng thời gian 180 ngày duy trì nuôi cấy liên tục, với thời gian nhân đôi là 48 h như kết quả khảo sát thu được thì các tế bào nhưng hươu đã phân chia được khoảng 90 lần và các tế bào này vẫn còn có khả năng tăng sinh tiếp nếu tiếp tục nuôi cấy. Vậy, các tế bào nhưng hươu có khả năng tăng sinh dài hạn, nghĩa là ngoài khả năng phân chia chúng còn phải có khả năng tự làm mới - đây chính là một trong những đặc tính của tế bào gốc. Bên cạnh đó, các tế bào này cũng có kiểu hình tương tự như các tế bào nhưng hươu có biểu hiện tính gốc được thu nhận bởi Berg và đồng tác giả hay bởi Rolf và đồng tác giả (Berg *et al.*, 2007; Rolf *et al.*, 2008).

Kết quả chứng minh khả năng biệt hóa của tế bào nhưng hươu

Sau 21 ngày, các tế bào nhưng hươu biến đổi thành tế bào xương và mỡ khi được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa tương ứng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố của Berg và đồng tác giả hay bởi Rolf và đồng tác giả (Berg *et al.*, 2007; Rolf *et al.*, 2008).

Biệt hóa tế bào nhưng hươu thành tế bào xương

Sau khi nuôi cấy 7 ngày trong môi trường cảm ứng biệt hóa, các tế bào bắt đầu thay đổi hình dạng. Các tế bào không còn trải dài mà bắt đầu co lại, tròn hơn và cuối cùng có dạng hạt đậu. Đó là hình dạng đặc trưng của tế bào tạo xương (osteoblast). Cũng giống như khi tế bào gốc đã biệt hóa thành tế bào chức năng, các tế bào nhưng hươu khi được cảm ứng biệt hóa đều ngừng quá trình phân chia.

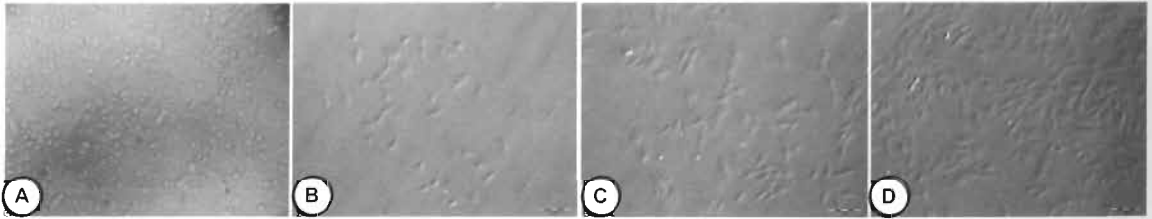
Càng về sau, các tế bào được cảm ứng biệt hóa càng trở nên thô nhám do hiện calcium tích tụ nhiều ở bề mặt tế bào. Và ở giai đoạn 21 ngày sau biệt hóa, các tế bào có hình dạng đặc trưng của tế bào xương nuôi cấy *in vitro* và chất nền ngoại bào cũng được khoáng hóa rõ rệt (Hình 5, 6).

Đây là kết quả của quá trình tế bào nhưng hươu được cam ứng bởi môi trường cam ứng biệt hóa tạo xương với các hóa chất dexamethasone, AsAP và beta glycerol phosphate. Theo các nghiên cứu đã công bố (Graves *et al.*, 1994a; 1994b; Bruder *et al.*, 1997; Jaiswal *et al.*, 1997), các chất này sẽ giúp một tế bào gốc trung mô tích tụ calcium trong tế bào chất, chất nền ngoại bào và sẽ biểu hiện các marker của tế bào tạo xương như sialoprotein, osteocalcin và osteonectin. Trong đó, dexamethasone là một glucocorticoid steroid có khả năng kích thích hoặc ức chế sự biệt hóa thành xương của tế bào gốc trung mô phụ thuộc vào nồng độ của nó (dexamethasone với nồng độ thấp sẽ kích thích biệt hóa thành xương, ngược lại nồng độ cao sẽ kích thích biệt hóa thành mỡ); AsAP sẽ làm quá trình biệt hóa thành xương thuận lợi hơn thông qua việc tổng hợp collagen và tác động kích thích lên sự tăng trưởng của tế bào; beta glycerol phosphate kích thích hình thành chất nền được calci hóa do sự kết hợp với các tác động của dexamethasone và AsAP; EGF sẽ giúp cho tế bào tăng trưởng tốt hơn.

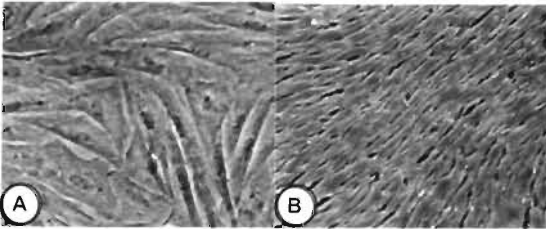
Khi nhuộm với Alizarin Red S, các tế bào được cam ứng biệt hóa bắt màu đỏ (Hình 7). Màu đỏ là phức hợp của thuốc nhuộm với ion calcium hiện diện trong tế bào chất và màng tế bào (tính chất đặc trưng của tế bào xương). Điều này chứng tỏ các tế bào nhưng hươu đã chuyển sang dạng tế bào xương với sự lắng tụ ion calcium trong tế bào chất, cũng như ở chất nền ngoại bào.



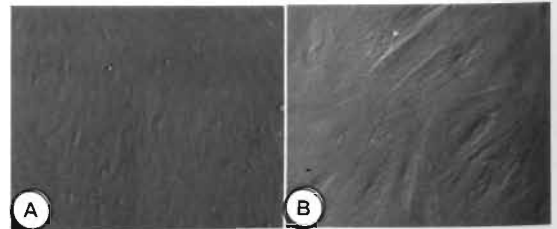
Hình 1. Các tế bào đơn thu nhận từ mô nhưng hươu (X40).



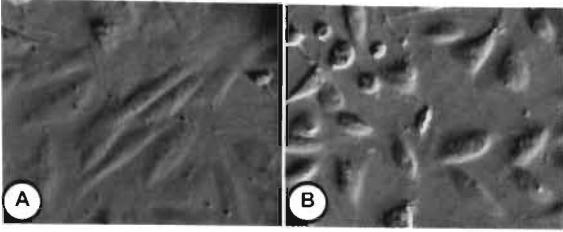
Hình 2. Kết quả nuôi cấy sơ cấp tế bào nhưng hươu (X40). A. Tế bào nhưng hươu ở giai đoạn 24 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy; B. Tế bào nhưng hươu ở giai đoạn 72 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy; C. Tế bào nhưng hươu ở giai đoạn 4 ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy; D. Tế bào nhưng hươu ở giai đoạn 10 ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy.



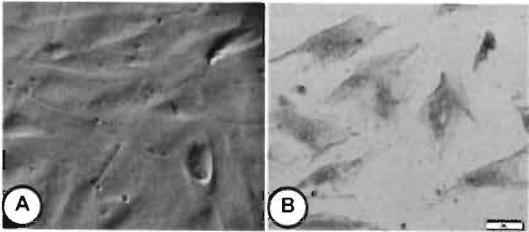
Hình 3. Tế bào nhưng hươu thu nhận bởi Berg và đồng tác giả (A. Tế bào AP (X200) (Berg *et al.*, 2007)) hay bởi Rolf và đồng tác giả (B. Tế bào Stro – 1⁺ (X40) (Rolf *et al.*, 2008)).



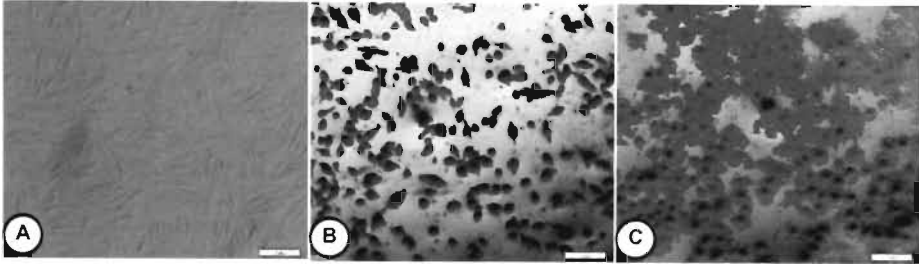
Hình 4. Tế bào nhưng hươu do đề tài thu nhận sau 3 lần cấy chuyển (A. X40, B. X200).



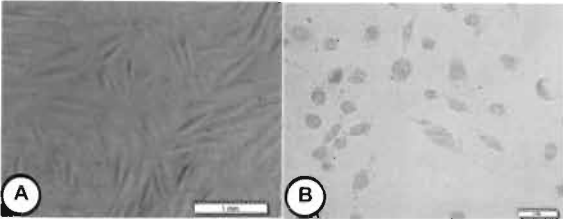
Hình 5. Các tế bào nhũ tương sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào xương (X200). (A. Lô đối chứng, B. Lô thí nghiệm).



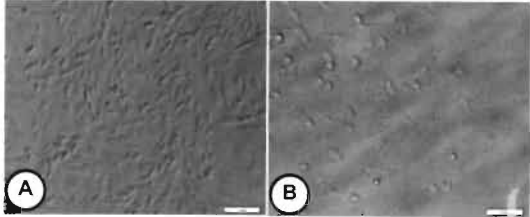
Hình 6. Các tế bào nhũ tương sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào xương (X200). (A. Lô đối chứng, B. Lô thí nghiệm).



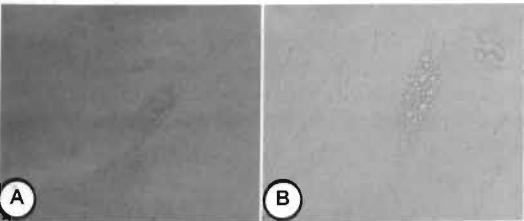
Hình 7. Các tế bào nhũ tương sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào xương dương tính với thuốc nhuộm Alizarin Red S (X40). (A. Lô đối chứng, B & C. Lô thí nghiệm).



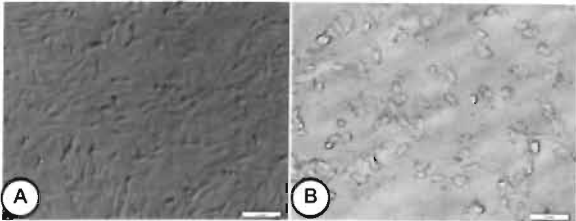
Hình 8. Các tế bào nhũ tương tích tụ giọt mỡ trong tế bào chất sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ (X100). (A. Lô đối chứng, B. Lô thí nghiệm).



Hình 9. Các tế bào nhũ tương sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ (X40). (A. Lô đối chứng, B. Lô thí nghiệm).



Hình 10. Các giọt mỡ tích tụ trong tế bào chất của tế bào nhũ tương sau khi nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ (X200)



Hình 11. Các tế bào nhũ tương sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ dương tính với thuốc nhuộm Oil Red O (X40). (A. Lô đối chứng, B. Lô thí nghiệm).

Bảng 1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào nhung hươu.

	Mật độ tế bào trung bình (tế bào/ml)					
	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10
Đĩa 1	$5,0.10^5$	$9,7.10^5$	$18,2.10^5$	$36,0.10^5$	$72,4.10^5$	$144,2.10^5$
Đĩa 2	$5,0.10^5$	$9,1.10^5$	$17,5.10^5$	$35,8.10^5$	$71,9.10^5$	$143,6.10^5$
Đĩa 3	$5,0.10^5$	$9,4.10^5$	$18,1.10^5$	$36,1.10^5$	$72,2.10^5$	$144,1.10^5$

Biệt hóa tế bào nhung hươu thành tế bào mỡ

Sau khi nuôi cấy 7 ngày trong môi trường cảm ứng biệt hóa, các tế bào nhung hươu bắt đầu tích tụ những giọt mỡ nhỏ trong tế bào chất. Theo thời gian các giọt mỡ nhỏ gộp lại thành những giọt mỡ lớn hơn (Hình 8, 9).

Cũng giống như ở thí nghiệm cảm ứng biệt hóa tạo xương, các tế bào nhung hươu khi được cảm ứng tạo mỡ sẽ ngừng quá trình phân chia.

Đây là kết quả của quá trình tế bào nhung hươu được cảm ứng bởi môi trường cảm ứng biệt hóa tạo mỡ với các hóa chất dexamethasone, 1 - methyl - 3 isobutylxanthine (IBMX), insulin và indomethacin. Theo các nghiên cứu đã công bố (Rosen *et al.*, 2000; Janderova *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003), các chất này sẽ giúp một tế bào gốc trung mô đi vào quá trình biệt hóa tạo mỡ. Trong hầu hết các báo cáo, nồng độ dexamethasone cho sự cảm ứng biệt hóa tạo mỡ của tế bào gốc trung mô cao gấp năm lần so với cảm ứng biệt hóa tạo xương. Dexamethasone có tác dụng cảm ứng cho sự biệt hóa và các yếu tố bổ sung còn lại sẽ kích thích sự biệt hóa. Insulin sẽ kích thích sự thu nhận các phân tử glucose vào tế bào, tạo nguyên liệu cho các phản ứng chuyển hóa thành các giọt mỡ. IBMX là chất ức chế phosphodiesterase, nó khóa sự biến đổi ion cAMP thành 5'AMP. Điều này giúp điều hòa dương tính các protein kinase A, dẫn tới việc giảm sự tăng sinh tế bào và điều hòa dương tính hormone nhạy cảm lipase (HSL). HSL sẽ chuyển đổi triacyl glycerides thành glycerol và acid béo tự do, được biết như quá trình tạo mỡ. Indomethacin là ligand của PPAR (peroxisome proliferators - activated receptor), làm hoạt hóa một nhân tố phiên mã ức chế tín hiệu Wnt, cần thiết cho sự biệt hóa thành mỡ.

Sự xuất hiện của các giọt mỡ nhỏ có thể quan sát được dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 - 400 lần (Hình 10). Dưới kính hiển vi, các giọt mỡ tròn phản chiếu ánh sáng với viền xung quanh màu đen và phần trong có màu trắng sáng. Khi

nhuộm với thuốc nhuộm Oil Red O, các giọt mỡ luôn bắt màu đỏ (Hình 11).

Tóm lại, tế bào nhung hươu có khả năng biệt biệt hóa thành tế bào xương và tế bào mỡ nếu được cảm ứng trong môi trường phù hợp.

KẾT LUẬN

Đã bước đầu thu nhận thành công các tế bào gốc từ mô nhung hươu. Các tế bào nhung hươu thu nhận được có khả năng tăng sinh dài hạn khả năng tự làm mới - và khả năng biệt hóa, chúng có kiểu hình tương đồng với các tế bào có tính gốc. Tiếp theo, các xét nghiệm về mặt sinh học phân tử sẽ được tiến hành để kiểm tra các marker của tế bào gốc nhung hươu. Đồng thời, vai trò của các tế bào gốc này đối với sự tái sinh sừng hươu cũng được khảo cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allen SP, Maden M, Price JS (2002) A Role for Retinoic Acid in Regulating the Regeneration of Deer Antlers. *Dev Biol* 251: 409-423.
- Baksh D, Song L, Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8: 301-316.
- Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B (2007) Red Deer Cloned from Antler Stem Cells and Their Differentiated Progeny. *Biol Reprod* 77(3): 384-394.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self - renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64: 278-294.
- Cegielski M, Calkosinski I, Dziegiel P, Gebarowski T, Podhorska - Okolow M, Skalik R, Zabel M (2006) Search for stem cells in the growing antler stag (*Cervus elaphus*). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50: 247-251.
- Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Chen D (2002) The

STRO - 1⁺ marrow cell population is multipotential. *Cell Tiss Org* 170: 73-82.

Goss RJ (1983) *Deer antlers: Regeneration, function, and evolution*. New York: Academic Press.

Graves SE, Francis MJO, Gundle R, Beresoford JN (1994a) Primary culture of human trabecular bone: Effects of L - ascorate - 2 - phosphate. *Bone* 15: 132-133.

Graves SE, Gundle R, Francis MJO, Beresoford JN (1994b) Ascorbate increases collagen synthesis and promote differentiation in human bone derived cell cultures. *Bone* 15: 133.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem* 64: 295-312.

Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR (2003) Humanmesenchymal stem cells as an *in vitro* model for human adipogenesis. *Obesity Research* 11: 65-74.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells.

Arthritis Rheum 46: 3349-3360.

Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T (2007) Deer Antler Regeneration: Cells, Concepts, and Controversies. *J Morphol* 268: 726-738.

Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G (2003) Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 306-312.

Price JS, Faucheux C, Allen S (2005) Deer antlers as a model of mammalian regeneration. *Curr Top Dev Biol* 67: 1-48.

Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Schulz J, Seymour N, Schliephake H, Napp J, Niebert S, Wolfel H, Wiese KG (2008) Localization and Characterization of STRO - 1⁺ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. *PLoS ONE* 3: e2064. doi:10.1371/journal.pone.0002064.

Rolf HJ, Wiese KG, Siggelkow H, Schliephake H, Bubenik GA (2006) *In vitro* studies with antler bone cells: Structure forming capacity, osteocalcin production and influence of sex steroids. *Osteology* 15: 245-257.

Rosen ED, Spiegelman BM (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16: 145-171.

PRELEMINARY RESULT IN COLLECTING STEM CELLS DERIVED FROM DAPPLE DEER VELVET (*CERVUS NIPPON*)

Nguyen Ngoc Nhu Bang^{1,*}, Nguyen Tien Bang¹, Tran Hoang Dung², Le Thanh Hung¹

¹University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

²Institute of Biotechnology and Food Technology, Ho Chi Minh City University of Industry

SUMMARY

The periodic replacement of antlers is an exceptional regenerative process in mammals, which in general are unable to regenerate complete body appendages. More recent studies, however, showed that, antler regeneration is a stem - cell - based process that depends on the periodic activation of periosteal stem cells. On that basis, we tested to collect stem cells derived from dapple deer velvet. The cells derived from dapple deer velvet have been collected and cultured with DMEM/F12 plus 10% FBS (fetal bovine serum). About 10th day, those cells strongly expand and cover with 70 - 80% flask's surface. At that time, the cells derived from dapple deer velvet are subcultured by using trypsin/EDTA 0.25% to provide nutrients and surface for development. The cells derived from dapple deer velvet is multipotential like stem cells. They could be differentiated to osteocytes in DMEM/F12, 10% FBS medium plus dexamethasone, glycerol phosphate, ascorbate, acid ascorbic; to adipocytes in DMEM/F12, 10% FBS plus isobutyl methylxanthine, dexamethasone, insulin, indomethacin.

Keywords: Deer, velvet, antler cell, velvet cell, regeneration