

## NUÔI CÂY TẾ BÀO SỢI TỪ MÔ CHUỘT

Trần Thị Khánh Hòa, Hoàng Thùy Dương, Nguyễn Thị Kim Anh\*

Trung tâm nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

**TÓM TẮT:** Nguyên bào sợi là một trong những loại tế bào có khả năng phân chia với số lượng lớn và được nuôi cấy từ những loại mô khác nhau với những điều kiện đặc biệt cho mỗi trường hợp để thu được số lượng tế bào tối ưu. Nghiên cứu này so sánh sự phát triển các nguyên bào sợi thu nhận từ các mô khác nhau ở chuột trong nuôi cấy sơ cấp và sự ảnh hưởng của cấy chuyển tới tế bào, là cơ sở cho việc tạo nguồn tế bào phục vụ các nghiên cứu trong lĩnh vực y, sinh học. Tế bào được cấy chuyển để duy trì khả năng sống sót và tăng sinh với số lượng lớn hơn. Khả năng phát triển cũng như sống sót của tế bào được kiểm chứng bằng phương pháp đếm tế bào sử dụng Trypan Blue và hình dạng tế bào được nhuộm với 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Kết quả thực nghiệm cho thấy, tế bào từ các cơ quan có khả năng phát triển không đồng nhất trong một khoảng thời gian nhất định; đồng thời, để thu nhận nguyên bào sợi từ mỗi loại mô cũng yêu cầu những điều kiện khác nhau. Ngoài ra, tìm hiểu về sự ảnh hưởng của phương pháp cấy chuyển sẽ giúp quá trình duy trì sự sống cho tế bào phục vụ cho những thực nghiệm trong tương lai.

*Từ khóa:* Nuôi cấy sơ cấp, nuôi cấy tế bào, nguyên bào sợi.

### MỞ ĐẦU

Nuôi cấy sơ cấp là một chu trình tạo ra số lượng tế bào phục vụ cho nuôi cấy thứ cấp và tạo dòng tế bào. Nuôi cấy sơ cấp có hai loại, nuôi cấy tế bào từ mô được cố định và nuôi cấy tế bào đơn được tách từ mảnh mô. Mô động vật từ các cơ quan được liên kết chặt chẽ, chính vì vậy cần tác động lực hoặc enzyme để cắt đứt các cầu nối. Nhiều thí nghiệm đã chứng minh tế bào có thể sinh trưởng số lượng lớn sau một vài ngày hoặc nhiều tuần để sử dụng cho phân tích (Takashima, 1998). Duy trì tế bào phát triển dài hạn đòi hỏi phải tuân thủ nghiêm ngặt kỹ thuật vô trùng để tránh lây nhiễm và tổn thất tiềm năng của các dòng tế bào có giá trị (Phelan, 2007).

Nguyên bào sợi (fibroblast) là một loại tế bào có khả năng tăng trưởng mạnh và là loại tế bào chiếm ưu thế trong các mô liên kết của cơ thể, giữ vai trò quan trọng trong việc thành lập khung của các mô liên kết. Nguyên bào sợi đơn dòng là nguồn tế bào cần thiết cho nhiều nghiên cứu và thường được sử dụng làm tế bào nuôi (feeder cells).

Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển về hình dạng tế bào, bề mặt tế bào, sự liên kết tế bào, đồng thời tác động đáng kể đến sự tăng sinh và phân chia tế bào; vì thế, tỷ lệ cân bằng giữa môi trường và chất dinh dưỡng

đóng vai trò rất quan trọng đối với sự phát triển của tế bào (Ozturk & Palsson, 1990). Nguyên bào sợi sống sót và phát triển tốt nhất trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) cùng với huyết thanh thai bê (Fetal bovine serum, FBS) (Freshney, 2010).

Thay đổi môi trường nuôi giúp tế bào khỏe mạnh vì được cung cấp thêm chất dinh dưỡng, trong khi cấy chuyển là để duy trì cho tế bào nhân lên theo cấp số nhân. Mỗi loại tế bào hay mỗi dòng tế bào đều có những đặc tính riêng và cần tìm hiểu để giúp tế bào duy trì và phát triển một cách tốt nhất. Có thể dễ dàng nhận biết tế bào phát triển tốt hay không ở các điều kiện nuôi cấy mới, nhưng khó có thể biết chúng có thay đổi hay không. Tế bào gốc phôi hoặc tế bào gốc vạn năng có thể thay đổi về mặt di truyền sau khoảng 15-20 lần cấy chuyển (Monya, 2011). Tế bào gốc phôi người H9 và PKU1 khi được cấy chuyển nhiều lần có tác động không tốt tới chức năng của ty thể và có thể ảnh hưởng tới tính đa năng của tế bào (Xie et al., 2011). Tế bào sơ cấp thu trực tiếp từ mô có đặc điểm sinh lý của tế bào *in vivo* tốt hơn so với các dòng tế bào được thiết lập nhưng vòng đời của các tế bào nuôi cấy sơ cấp thường có hạn. Mặc dù vậy, nguyên bào sợi thường tăng sinh nhanh chóng khi nuôi cấy và có thể đạt được số lượng mong muốn trước khi trải qua

quá trình lão hóa (Khan & Gasser, 2016). Nguyên bào sợi từ phôi chuột thường được dùng trong nghiên cứu nuôi cấy tế bào sơ cấp và có một số ưu điểm hơn một số loại tế bào khác thu từ tổ chức mô. Tuy nhiên, để tạo ra tế bào từ phôi khá tốn thời gian và cần có kỹ thuật tốt để thực hiện thành công. Vì thế, khai thác nguyên bào sợi từ da, xương và một số cơ quan nội tạng khác của chuột là một lựa chọn thay thế trong các nghiên cứu cơ chế hoạt động có liên quan đến nhiễm virus hoặc quá trình tạo ra các chất điều hòa chống viêm như cytokines và interferon (Moor & Allen, 2013). Nguyên bào sợi từ chòm đuôi của chuột đã được nghiên cứu thành công tạo nguồn tế bào phục vụ những nghiên cứu chuyên sâu (Hansen et al., 2011; Wakayama, 1999). Một số nghiên cứu thực nghiệm đã sử dụng nghiên cứu trên lâm nền tảng để thực hành như các nghiên cứu nuôi cấy tế bào thận (De Larco & Todaro, 1978), phổi và da của chuột lang (Kumar et al., 1991; Preobrazhenska et al., 2012).

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng sinh trưởng của tế bào ở giai đoạn nuôi cấy sơ cấp thông qua việc thu nhận và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mô xương đuôi, thận và phổi chuột nhắt trắng. Sau đó, tiến hành kiểm tra ảnh hưởng của việc cấy chuyển lặp lại nhiều lần đối với sự phát triển và hình thái tế bào nhằm xác định khả năng sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào từ mô cho các mục đích tạo dòng tế bào phục vụ những nghiên cứu chuyên sâu.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chuột

Chuột dòng ICR từ 12-14 tuần tuổi, 30-40 gram do Viện Pasteur (Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp) được sử dụng để lấy xương đuôi, thận, phổi.

### Thu mẫu mô

Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy vô trùng để nuôi cấy tránh nhiễm khuẩn (Rosalie, 1998). Phủ 1ml porcine gelatin 0,1% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) vào mỗi đĩa nuôi cấy (35mm \* 10mm, Corning Incorporated, Hoa Kỳ) trước khi nuôi cấy 12-24h. Các cơ quan tổ chức mô sử dụng để thu

thập tế bào được tách ra trong điều kiện không nhiễm khuẩn và bảo quản trong PBS 1X (Gibco, Hoa Kỳ).

Xương đuôi được thu nhận và giữ trong PBS 1X. Loại bỏ da đuôi, thu nhận phần xương đuôi bên trong. Mẫu được cắt nhỏ thành từng đoạn 2-3 mm và được rửa sạch nhiều lần với PBS 1X. Hút bỏ gelatin 0,1% và chuyển xương vào đĩa nuôi cấy, đặt kính cố định xương theo phương pháp cố định mẫu, bổ sung 1,5ml môi trường nuôi cấy DMEM (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ)/ 10% FBS (Gibco, Hoa Kỳ)/1% kháng sinh gồm penicillin và streptomycin (Gibco, Hoa Kỳ). Ủ mẫu trong tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> và thay môi trường khi có quá nhiều tế bào và cần bổ sung dinh dưỡng cho môi trường nuôi, hoặc để loại bỏ bớt các mảnh vụn hay tế bào chết.

Thu mẫu mô thận và phổi: Dùng cùn 70% rửa sạch vùng da, thu nhận thận, phổi và giữ mẫu riêng biệt trong PBS 1X. Rửa sạch mẫu nhiều lần với PBS 1X để loại bỏ máu và mô thừa. Nghiền nhỏ mô và tách tế bào đơn với 0,5ml Trypsin EDTA 0,25% trong 5-10 phút, ủ mẫu trong tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sử dụng 0,5ml môi trường bất hoạt Trypsin, thu tế bào từ mẫu vào eppendorf 1.5 ml. Ly tâm với tốc độ 5200 vòng/phút trong 5 phút ở 25°C, thu tế bào với 1ml môi trường nuôi cấy DMEM/ 10%FBS/1% kháng sinh (với mẫu phổi) và DMEM/10% FBS không có kháng sinh (với mẫu thận). Ủ mẫu trong tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> và thay môi trường khi môi trường chuyển màu vàng (pH<6,8). Sau 3 ngày, bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy mẫu thận.

### Nuôi cấy sơ cấp và cấy chuyển

Hút bỏ môi trường cũ, rửa mẫu 2 lần với 2ml PBS 1X. Tách tế bào ra khỏi bề mặt đĩa với 0,5ml Trypsin EDTA 0,25% (Gibco, Hoa Kỳ) và ủ trong tủ nuôi cấy 37°C, 5% CO<sub>2</sub> khoảng 5 phút, bổ sung 0,5ml môi trường bất hoạt Trypsin, ly tâm thu tế bào với tốc độ 5200 vòng/phút trong 5 phút ở 25°C. Quan sát tế bào nuôi cấy phát triển tới mật độ phủ 80-100% bề mặt đĩa nuôi cấy thì cấy chuyển. Tế bào được nuôi trong môi trường nuôi cấy DMEM/10% FBS/1% kháng sinh.

### Đếm tế bào sử dụng Trypan Blue

Thu nhận dịch huyền phù tế bào trong 1ml môi trường. Nhuộm 10 $\mu$ L dịch tế bào với 10 $\mu$ L Trypan Blue 0,2% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), theo tỷ lệ 1:1. Đưa 10 $\mu$ L dung dịch vào buồng đếm hồng cầu. Đếm số tế bào sống và chết trung bình ở 4 góc, mỗi góc gồm 16 ô vuông nhỏ. Sử dụng công thức tính số tế bào:  $Số\ tế\ bào/ml = Trung\ bình\ số\ tế\ bào\ đếm\ được\ ở\ 4\ góc \times 10.000 \times N$ ; trong đó  $N = 2$  là tỷ lệ pha loãng 2 lần với Trypan Blue. Tỷ lệ tế bào sống có trong mẫu được xác định như sau:  $Tỷ\ lệ\ tế\ bào\ sống\ (%) = (Số\ tế\ bào\ sống/Tổng\ số\ tế\ bào) \times 100\%$ .

#### Nhuộm tế bào với DAPI

Thuốc nhuộm 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes, Hoa Kỳ) được pha loãng với PBS 1:50000 trước khi sử dụng. Hút bỏ môi trường cũ và rửa với PBS nhiều lần. Cố định tế bào với 0.5 ml 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), trong 40 phút. Rửa 2 lần với PBS, mỗi lần 15 phút. Xử lý mẫu với 300 $\mu$ l 0,1% Triton X-100(Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) để tăng tính thấm thấu màng tế bào. DAPI được nhuộm tốt nhất sau 1-3 tiếng, ở nhiệt độ phòng, rửa mẫu với PBS 2 lần, 15 phút mỗi lần. Sử dụng 0,3 $\mu$ L DAPI phủ kín bề mặt đĩa cấy, ủ trong 1-5 phút. Rửa sạch thuốc nhuộm với PBS. Quan sát mẫu ở  $\lambda_{358nm} - 461nm$  với kính hiển vi huỳnh quang.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Tế bào phát triển trong quá trình nuôi cấy sơ cấp

Thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* sơ cấp tế bào từ xương đuôi, mô thận và mô phôi phát triển với những kết quả khác nhau sau 7 ngày. Nguyên bào sợi phát triển từ xương cho kết quả tốt, tế bào phát triển dày đặc và lan nhanh. Tế bào phôi được nuôi cấy với mẫu mô sẽ dễ dàng phát triển tốt trong điều kiện thuận lợi. Thí nghiệm trên chuột lang, sau 7 ngày thu được nguyên bào sợi phát triển dày đặc từ mô phôi và cần đến 14 ngày để đạt được  $2,5 \times 10^5$  tế bào/ml (Seluanov, 2010). Với thí nghiệm trên chuột nhắt trắng kết quả được ghi nhận sau 5 ngày, tế bào phôi phát triển rất nhanh, chồng lên nhau

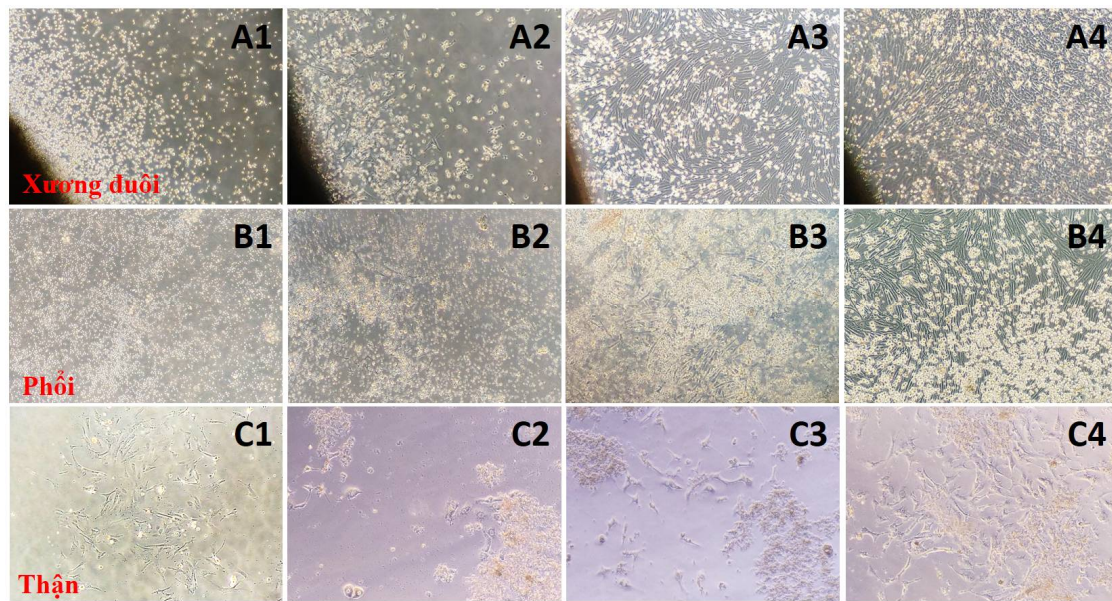
chiếm 80% bề mặt đĩa với xu hướng tăng nhanh và bám tốt ở rìa ngoài đĩa rồi lan nhanh vào trung tâm. Nuôi cấy sơ cấp mô thận tương đối khó do cấu tạo của thận khá phức tạp, với nhiều lớp khác nhau. Nguyên bào sợi thận phát triển từ trung mô-biểu mô chuyển tiếp; vì thế, cần tách riêng phần biểu mô của thận để nuôi cấy (Dressler, 2006). Sau 3 ngày, chỉ có những tế bào đơn rải rác khắp bề mặt đĩa, tế bào phát triển và nhân đôi dần xung quanh chúng với tốc độ tăng sinh chậm, sau 7 ngày chỉ đạt được 40% độ phủ (hình 1).

##### Cây chuyền duy trì sự sống tế bào

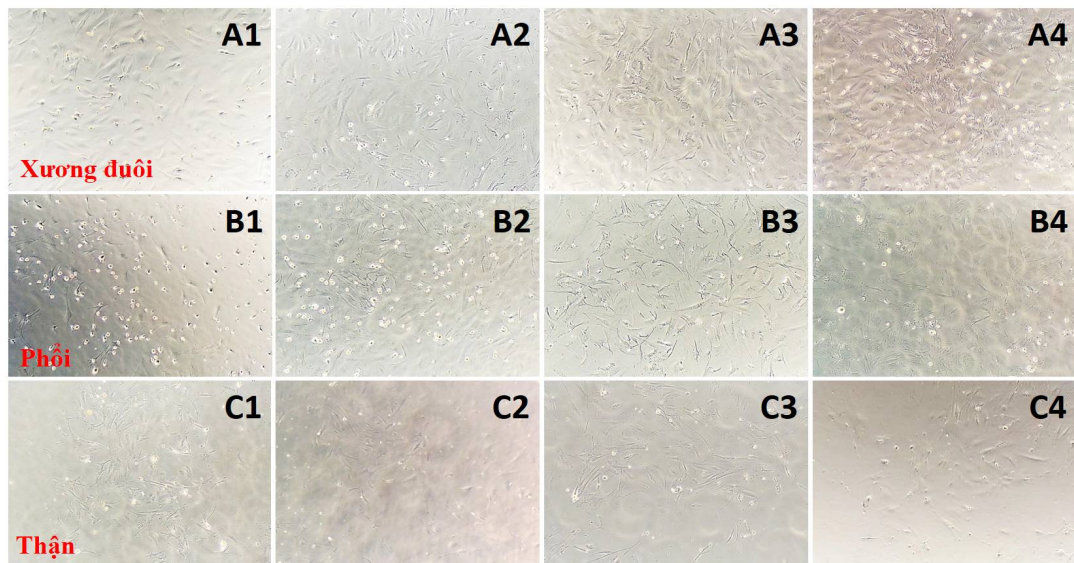
Đối với tế bào từ xương đuôi, qua 4 lần cấy chuyền, nguyên bào sợi vẫn phát triển tốt và nhanh chóng bám dính với bề mặt đĩa theo từng cụm trải đều đĩa, hình thái tế bào ổn định ở dạng hình thoi kéo dài. Trong khi tế bào phôi chịu tác động của quá trình trypsin tách tế bào cũng như cấy chuyền nhiều lần đã khiến cho hình dạng tế bào thay đổi khá rõ rệt, phần lớn tế bào phôi ở dạng tròn vì không có khả năng bám trái trên bề mặt. Tế bào thận có hình thoi dài với nhiều phần bám trái lan dần ra trên bề mặt đĩa và đặc biệt phát triển tốt và ổn định hơn so với tế bào phôi (hình 2).

Cây chuyền tạo điều kiện tối ưu về không gian và môi trường dinh dưỡng giúp tế bào tăng sinh nhanh chóng. Nguyên bào sợi từ xương đuôi dễ dàng và nhanh chóng thích nghi, bám trái và tăng sinh với điều kiện cấy chuyền từ 4 đến 10, 15 lần (Lander et al., 1978). Ở nghiên cứu này, với 4 lần nhắc lại, kết quả ghi nhận nguyên bào sợi xương đuôi phát triển rất khả quan với sự thích nghi nhanh chóng và phát triển ổn định. Nguyên bào sợi từ phôi thích nghi chậm hơn, với thời gian cấy chuyền lặp ngắn đã phần nào ảnh hưởng đến sự phát triển và trạng thái của nguyên bào sợi phôi. Sau 2 lần cấy chuyền, hình dạng nguyên bào sợi phôi thay đổi, bị co lại và dị dạng, hoặc giãn rách với nhân to ra bất thường.

Tương tự, nguyên bào sợi từ mô thận dần bị biến dạng nhưng một số vẫn giữ được dạng hình thoi và bám trái trên bề mặt đĩa cho đến sau 12 ngày, thích nghi tốt hơn tế bào phôi qua quá trình cấy chuyền.



Hình 1. Hình thái nguyên bào sợi nuôi cấy từ (A) xương đuôi, (B) phổi và (C) thận sau (1) 1 ngày, (2) 3 ngày (3) 5 ngày và (4) 7 ngày. Kính hiển vi 10x.



Hình 2. Hình thái nguyên bào sợi nuôi cấy từ (A) xương đuôi, (B) phổi và (C) thận được tái cấy chuyền sau 3 ngày nuôi cấy liên tiếp (1) 3 ngày, (2) 6 ngày (3) 9 ngày và (4) 12 ngày. Kính hiển vi 10x.

#### Xác định số lượng và khả năng tăng sinh tế bào qua các giai đoạn

Tế bào sau khi nuôi cấy sơ cấp, được cấy chuyền với mật độ 100.000 tế bào/ml. Số tế bào tăng sinh được ghi nhận sau 4 lần cấy chuyền

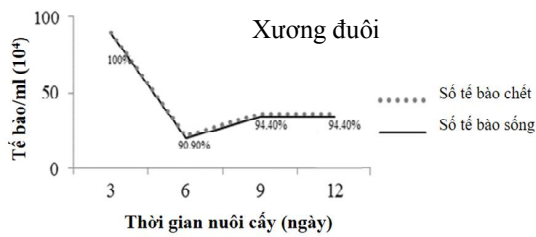
liên tiếp với 3 ngày nuôi cấy.

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, nuôi cấy trên đĩa đường kính 35mm, tế bào từ đuôi và mô phổi có sự phát triển ổn định và nhanh chóng sau 7 ngày, riêng tế bào từ mô thận chậm phát

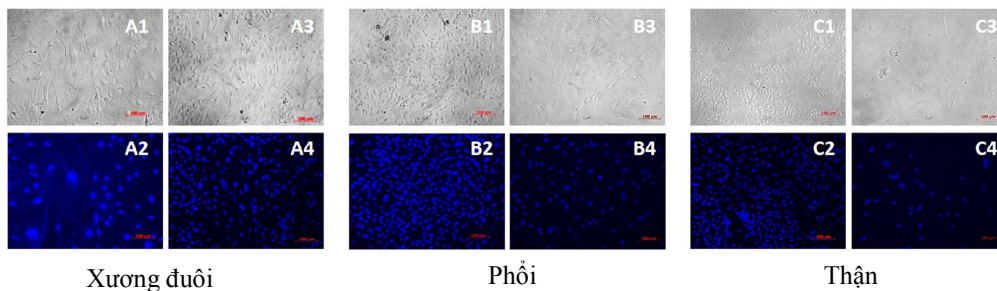
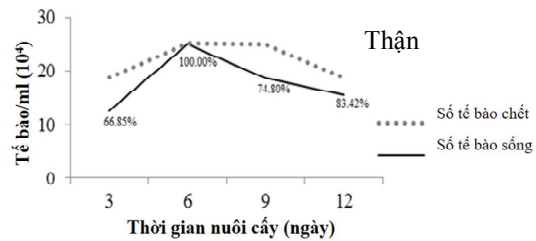
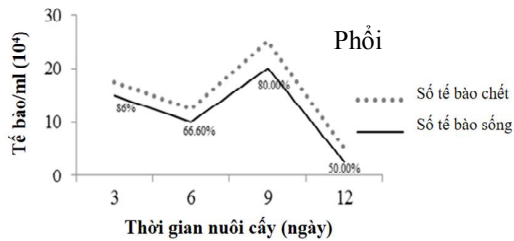
triển hơn và đòi hỏi những điều kiện xử lý mẫu đặc biệt hơn để có thể sinh trưởng tốt hơn. Xương đuôi và phổi thu được số tế bào tương đương  $12 \times 10^4$  và thận với số lượng  $2 \times 10^4$ . So sánh với những trường hợp nuôi cấy tế bào từ phổi thai chuột, nguyên bào sợi có khả năng sinh trưởng nhanh hơn và nhiều hơn, nhưng quy trình cấy chuyền lặp được thực hiện 8 lần dẫn tới sự suy giảm nhanh chóng về số lượng tế bào sau mỗi 3 ngày cấy chuyền với trypsin (Xu, 2005). Nhìn chung, tế bào sẽ bước vào giai đoạn khủng hoảng từ 4 đến 10 hoặc 15 lần cấy chuyền (Lander et al., 1978). Với nhiều lần cấy chuyền liên tiếp mỗi 3 ngày, tế bào mô phổi thể hiện khả năng sinh trưởng bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi môi trường sống cũng như khả năng bám trải sau khi bị trypsin tác động nhiều lần. Đối với nguyên bào sợi từ xương đuôi, dù khả năng sống tốt hơn, nhưng sau lần cấy chuyền thứ 4, số lượng tế bào đã không tăng trưởng nữa. Nguyên bào sợi từ mô thận tăng trưởng

khá tốt, nhưng sau lần cấy chuyền 9 ngày, số lượng tế bào cũng giảm do ảnh hưởng của cấy chuyền như tế bào từ phổi và xương đuôi (hình 3). Với một số lần cấy chuyền nhất định tế bào có thể phát triển nhanh hơn nhờ tăng diện tích tiếp xúc bám trải, nhưng nếu cấy chuyền nhiều lần sẽ gây ảnh hưởng đến sự sống của tế bào, đặc biệt là với những những tế bào có sức chống chịu yếu hơn.

Theo kết quả trên, dễ dàng nhận thấy rằng việc sử dụng nguyên bào sợi nuôi cấy từ xương đuôi sẽ đạt hiệu quả cao hơn với thời gian nuôi cấy sơ cấp ngắn và tốc độ tăng trưởng cũng như sự chống chịu với việc thay đổi môi trường nuôi cấy hoặc cấy chuyền tế bào nhiều lần tương đối ổn định. Ngoài ra, mô xương đuôi có thể tái sử dụng để tiếp tục nuôi cấy sơ cấp 3-4 lần mà không cần sử dụng mẫu mới. Điều này giúp tiết kiệm chi phí cũng như hạn chế sử dụng động vật thí nghiệm để thu nhận mẫu.



Hình 3. Số tế bào sống, chết và tỷ lệ sống của tế bào xương đuôi, phổi, thận cấy chuyền lặp liên tiếp sau 3, 6, 9, 12 ngày nuôi cấy (tế bào/ml).



Hình 4. Hình thái tế bào từ (A) xương đuôi, (B) phổi, (C) thận trước (1, 2) và sau tái cấy chuyền 12 ngày (3, 4) được kiểm tra bằng nhuộm DAPI (2, 4). Kính hiển vi (20x).

### Hình dạng tế bào nhuộm với DAPI

Phương pháp nhuộm DAPI được sử dụng nhằm xác định sự tồn tại của tế bào và hình dạng khác nhau của tế bào phát sinh từ các mô và chịu tác động của cấy chuyên lập. Tế bào từ xương đuôi, mô phổi và thận trước cấy chuyên và sau khi cấy chuyên 12 ngày được nhuộm DAPI (hình 4). Đối với cả 3 mẫu, tế bào trước cấy chuyên có phần màng tế bào vẫn được nhận thấy rõ và hình thái đồng đều hơn so với sau cấy chuyên nhiều lần. Vì DAPI là thuốc nhuộm phát huỳnh quang màu xanh dương được gắn xen vào DNA, dựa trên nguyên tắc “loại trừ”, phần tế bào chất sẽ thể hiện màu giúp dễ dàng nhận diện tế bào. Khi quan sát tế bào được nhuộm với DAPI dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ thấy sự phân bố của tế bào với vùng nhân màu xanh dương trong tế bào. Nguyên bào sợi từ xương đuôi sau và trước cấy chuyên gần như tương đương nhau về sự phân bố thành cụm, hình thái dạng thoi, và bám trải nổi trên bề mặt đĩa. Tuy nhiên, phần màng tế bào sau nhiều lần cấy chuyên đã biến dạng, kích thước và màu sắc nhân không đồng đều. Tương tự với nguyên bào sợi từ phổi, trước cấy chuyên tế bào đồng đều và màng tế bào bám trải hiển thị rõ. Nhưng sau cấy chuyên nhiều lần, màng tế bào kéo giãn dài, màu sắc nhân không đồng đều. Trước cấy chuyên tế bào thận phát triển thành cụm và chỉ phát triển quanh mô, màu sắc nhân và hình dạng tế bào ổn định. Sau 12 ngày cấy chuyên, màng tế bào lan rộng và bám trải trên bề mặt đĩa, chiếm diện tích phát triển của tế bào mới, dị dạng và bắt đầu có biểu hiện yếu dần.

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cung cấp một quy trình đầy đủ về quá trình từ nuôi cấy mô đến cấy chuyên tế bào từ xương đuôi, phổi và thận nhằm duy trì sự sống của tế bào theo thời gian một cách ổn định và sinh trưởng nhanh chóng. Mỗi loại mô đòi hỏi những điều kiện, thời gian và quy trình khác biệt nhau. Việc cấy chuyên nhiều lần sẽ gây tác động đến sự phát triển ổn định của tế bào. Dựa trên những kết quả đã được ghi nhận, những thí nghiệm tiếp theo cần được triển khai để tăng cường khả năng tồn tại của tế bào và tạo nguồn tế bào cho các thí nghiệm trong tương lai.

**Lời cảm ơn:** Đề tài được hỗ trợ về kinh phí của Ủy ban Nhân dân Thành phố Hồ Chí Minh.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- De Larco J. E., Todaro G. J., 1978. Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: Epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J. Cell Physiol.*, 94(3): 335-342.
- Dressler G. R., 2006. The cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 509-529.
- Freshney R. I., 2010. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6<sup>th</sup> Edition.
- Hansen S., Girirajan S., Canfield T., 2011. *Establishment and Propagation of Adult Mouse Fibroblast Cultures*. Elsevier.
- Lander M. R., Moll B., Rowe W. P., 1978. A procedure for culture of cells from mouse tail biopsies: brief communication. *J Natl Cancer Inst.*, 60(2): 477-478.
- Khan M., Gasser S., 2016. Generating primary fibroblast cultures from mouse ear and tail tissues. *J. Vis. Exp.*, 107:53565 doi: 10.3791/53565.
- Kumar R. K., O'Grady R., Li W., Smith L. W., Rhodes G. C., 1991. Primary culture of adult mouse lung fibroblasts in serum-free medium: responses to growth factors. *Exp. Cell Res.*, 193: 398 by Elsevier.
- Monya B., 2011. Stem cells in culture: defining the substrate. *Nature Methods*, 8(4): 293-297.
- Moore C. B., Allen I. C., 2013. Primary ear fibroblast derivation from mice. *Methods Mol Biol*, 1031: 65-70.
- Ozturk S., Palsson O. B., 1990. Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration. *Sadettin. Biotechnology Progress*, 6(2): 121-128.
- Phelan C. M., 2007. *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture*. Curr.

- Protocol Cell Biol., Chapter 1:Unit 1.1. doi: 10.1002/0471143030.cb0101s36.
- Preobrazhenska O., Wright J. L., Churg A., 2012. Regional Heterogeneity in Murine Lung Fibroblasts from Normal Mice or Mice Exposed Once to Cigarette Smoke. Hartl D, ed. PLoS ONE, 7(6): e 39761.
- Rosalie J. C., 1998. Aseptic Technique for Cell Culture. Current Protocols in Cell Biology, 1.3.1-1.3.10. John Wiley & Sons, Inc.
- Seluanov A., Vaidya A., Gorbunova V., 2010. Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures From Rodents. J. Vis. Exp., 4: 2033.
- Takashima A., 1998. Establishment of Fibroblast Cultures. Current Protocols in Cell Biology, 2.1.1-2.1.12 by John Wiley & Sons, Inc.
- Wakayama T., Yanagimachi R., 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. Nat Genet, 22(2): 127-128.
- Xie X., Hiona A., Lee A.S., Cao F., Huang M., Li Z., Cherry A., Pei X., Wu J.C., 2011. Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging. Stem Cells Dev, 20(1): 127-138.
- Xu J., 2005. Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. Current Protocols in Molecular Biology, 70: 28.1:28.1.1-28.1.8.

## CULTURE FIBROBLASTS ISOLATED FROM MOUSE TISSUES

**Tran Thi Khanh Hoa, Hoang Thuy Duong, Nguyen Thi Kim Anh\***

Biotechnology Laboratory, Research and Development Center, Saigon Hi-Tech Park

### SUMMARY

Fibroblasts are cells which multiple a thousand times or cultured from the different tissue types with special conditions for each case to obtain the optimal number of cells. This study aims to compare the growth of primary cultured fibroblast cells derived from different tissues of mice and the influence of the replay subculture on cell's properties, which produce a large source for biomedical researches. Primary cells were subcultured to maintain cell survival and proliferation. The development ability and cell survival were tested by means of cell counting using Trypan Blue and shapes are observed by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. From the experimental results, cells from the organ are capable of heterogeneous development in a certain time period; simultaneously, to obtain fibroblasts from each tissue type also requires different conditions. Also, study on the influence of the subcultures help to maintain cell life for future experiments.

*Keywords:* Fibroblast, kidney, lung, subculture, tail bone.

*Citation:* Tran Thi Khanh Hoa, Hoang Thuy Duong, Nguyen Thi Kim Anh, 2018. Culture fibroblasts isolated from mouse tissues. Tap chi Sinh hoc, 40(1): 69-75. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.8789.

\*Corresponding author: nkanh74@gmail.com

Received 19 October 2017, accepted 12 January 2018