

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN TIỀM NĂNG GIA TĂNG VÀ BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO GỐC PHÔI CHUỘT NUÔI CẤY *IN VITRO*

ĐỖ THỊ THẢO, ĐỖ KHÁC HIẾU

Viện Công nghệ sinh học

NGUYỄN MỘNG HÙNG

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

Tế bào gốc (stem cell) mới được chú ý đến trong những năm gần đây do ý nghĩa khoa học và thực tiễn của nó. Khả năng phân chia liên tục và có thể biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau của cơ thể là tiềm năng của tế bào gốc mà các tế bào bình thường (chuyên hóa) khác không có [1,4]. Chính nhờ có tiềm năng này mà tế bào gốc được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như trong liệu pháp tế bào điều trị bệnh đái đường, bệnh lú lẫn (alzheimer), bệnh máu, bệnh tim..., trong nghiên cứu quá trình ung thư hóa tế bào và điều trị ung thư, trong tạo động vật chuyển gen cho các sản phẩm quý, trong nghiên cứu di truyền và quá trình phát triển cá thể...[1,5,6].

Khi nhân nuôi *in vitro* tế bào gốc bằng các môi trường nuôi cấy tế bào động vật thông thường, tế bào gốc nhanh chóng mất đi tiềm năng quý giá này; chúng bị chết do môi trường không phù hợp hay biệt hóa không định hướng thành các loại tế bào chuyên hóa khác nhau, ngừng phân chia rồi chết theo chương trình (apoptosis). Việc nghiên cứu bổ sung các chất vào môi trường nuôi cấy để điều khiển tốc độ gia tăng và biệt hóa định hướng của tế bào gốc đang được tập trung nghiên cứu. Một số công trình nghiên cứu cho thấy nếu bổ sung LIF (Leukemic Inhibit Factor) vào môi trường nuôi cấy thì sẽ duy trì được khả năng gia tăng và biệt hóa của tế bào gốc [2,3]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy dùng môi trường đã nuôi tế bào FC (Feeder Cells) trong 2 ngày để nuôi tế bào gốc cũng sẽ giữ được tế bào gốc không biệt hóa và tiếp tục gia tăng, còn huyết thanh của thai bò và huyết thanh của bê mới sinh vừa thúc đẩy quá trình đổi mới tế bào, vừa thúc đẩy quá trình biệt hóa tự nhiên của tế bào gốc.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu nhận phôi, tách và nhân nuôi tế bào FC của phôi chuột

Chuột nhất trắng dòng Swiss có trọng lượng 25-30g (4-6 tuần tuổi), do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp được theo dõi hàng ngày chu kỳ của tế bào âm đạo. Chuột cái ở thời kỳ tiền động dục được ghép đực (1♀/1♂) và tiếp tục theo dõi trong hai ngày tiếp theo. Ngày thấy có nút trắng hay tinh trùng ở âm đạo được xem là ngày phôi thứ nhất.

Tế bào sợi của phôi chuột còn được gọi là tế bào nuôi FC (Feeder Cells), được tách từ phôi 13-15 ngày tuổi theo phương pháp của Anna M. Wobus (2002) [1].

2. Tách và nhân nuôi tế bào gốc của phôi chuột

Tế bào gốc của phôi chuột ESC (Embryonic Stem Cell) được tách từ phôi 5-6 ngày tuổi theo phương pháp của Claudia Hegert (2002) [2].

3. Tổ chức thí nghiệm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố trong môi trường nuôi cấy đến khả năng gia tăng và biệt hóa của tế bào ESC, chúng tôi tổ chức thí nghiệm như sau:

Tế bào ESC được nuôi trong khay có 48 giếng phủ gelatin 1%; mật độ ban đầu là 100 tế bào trong 400 μ l môi trường/mỗi giếng.

Các môi trường được chuẩn bị như sau: M1 = môi trường RPMI 1640 không có FBS và không có lớp tế bào FC; M2 = môi trường RPMI 1640 có 10% FBS và không có lớp tế bào FC;

M3 = môi trường RPMI 1640 có 10% FBS và có lớp tế bào FC; M4 = môi trường RPMI 1640 có 10% FBS và 40% dung dịch nuôi tế bào FC ở ngày nuôi thứ hai, không có lớp tế bào FC; M5 = môi trường DMEM có 10% FBS và có lớp tế bào FC; M6 = môi trường DMEM có 10% FBS và 40% dung dịch nuôi tế bào FC ở ngày nuôi thứ hai, không có lớp tế bào FC; M7 = môi trường DMEM có 10% NBS và 40% dung dịch nuôi tế bào FC ở ngày nuôi thứ hai, không có lớp tế bào FC.

FBS = huyết thanh của thai bò; NBS = huyết

thanh của bê mới sinh.

Cứ sau hai ngày, tế bào lại được thay môi trường mới cùng loại cho tất cả các giếng nuôi. Đến ngày thứ mười, lớp tế bào ESC được làm bong rời và đếm trong buồng đếm Neubauer có và không có trypan blue.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

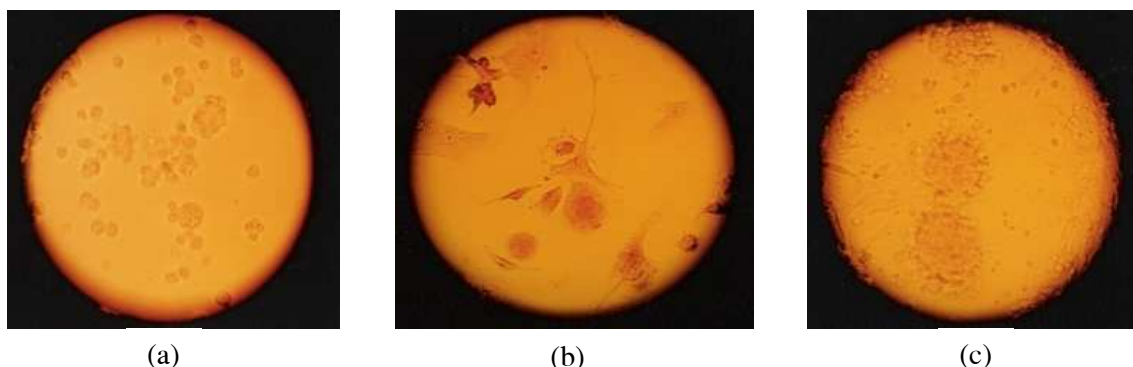
Sự gia tăng và biệt hóa của tế bào gốc của phôi chuột ESC sau 10 ngày nuôi cấy

Môi trường Nuôi cấy	Số ESC ban đầu	Số ESC sau 10 ngày	X% ESC bị biệt hóa	Ngày không còn ESC
M1	100 tb	042,0 ± 03,5	06,8 ± 0,7	18
M2	100 tb	164,8 ± 12,7	80,5 ± 5,2	26
M3	100 tb	339,5 ± 16,2	24,3 ± 2,6	>30
M4	100 tb	296,0 ± 14,8	20,8 ± 2,1	>30
M5	100 tb	390,5 ± 19,6	19,6 ± 1,8	>30
M6	100 tb	320,1 ± 17,1	18,4 ± 1,7	>30
M7	100 tb	280,3 ± 13,3	12,6 ± 1,1	>30

Tế bào ESC nuôi cấy trong môi trường M1 (hình 1a) gần như không phân chia và không biệt hóa, bám yếu ớt trên nền đáy của chai nuôi rồi chết dần; sau 10 ngày, chỉ còn khoảng 42% tế bào ESC và chết hết sau khoảng 18 ngày.

Trong môi trường M2, sau 10 ngày, tế bào ESC (hình 1b) phân chia nhân lên = $164,8 \pm 12,7$, đồng thời một số lớn ($80,5 \pm 5,2\%$) biệt hóa thành tế bào dạng sợi, đa số dạng sao và một ít dạng tế bào thân kinh (tế bào có sợi trục

và phân nhánh). Sau 26 ngày, không còn thấy tế bào ESC (tế bào có dạng hình cầu và có nhân to), tuy nhiên vẫn còn tồn tại một số tế bào chuyên hóa. Về thống kê, sự khác nhau giữa môi trường M1 và môi trường M2 là có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$. Về thành phần, môi trường M2 khác với môi trường M1 là có thêm 10% FBS. Như vậy, rõ ràng FBS có tác dụng kích thích quá trình phân chia cũng như biệt hóa của tế bào ESC.



Hình 1. Tế bào ESC được nhân nuôi trong các môi trường M1 (a), M2 (b) và M3 (c)

Tế bào ESC được nuôi cấy trong môi trường M3 sau 10 ngày đã phân chia và nhân lên nhanh = $339,5 \pm 16,2$, xuất hiện các cụm tế bào thể phôi và $24,3 \pm 2,6\%$ số tế bào ESC bị biệt hóa (hình 1c). Sau 30 ngày, số tế bào ESC và tế bào chuyên hóa vẫn tồn tại với tỷ lệ tương tự như sau 10 ngày (khoảng $24,3\%$). So sánh sự phát triển của tế bào ESC trong môi trường M2 và môi trường M3 cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê, cả về tốc độ phân chia cũng như sự biệt hóa; điều này chứng minh lớp tế bào FC (sau xử lý MC) đã ức chế quá trình biệt hóa của tế bào ESC và trực tiếp hay gián tiếp (thông qua ức chế biệt hóa) làm tế bào ESC tăng nhanh.

Tế bào ESC được nuôi trong môi trường M4 phát triển tương tự như trong môi trường M3 song tốc độ có thấp hơn. Sau 10 ngày, số tế bào ESC = $296,0 \pm 14,8$, xuất hiện các cụm tế bào thể phôi EB và số tế bào ESC bị biệt hóa là $20,8 \pm 2,1\%$. Kết quả về sự phát triển của tế bào ESC trong môi trường M3 và môi trường M4 đã chứng minh cho kết luận của một số tác giả [5], [6] là lớp tế bào FC (sau xử lý MC) đã tiết vào môi trường nuôi dưỡng chúng chất thuộc nhóm LIF có ảnh hưởng đến hoạt động của gen “công tắc Oct-4”.

Trong hai môi trường M5 và M6 sử dụng DMEM, tế bào ESC phân chia nhanh hơn, có tỷ lệ biệt hóa thấp hơn so với trong môi trường M3 và M4 sử dụng RPMI1640. Sau 10 ngày, số tế bào ESC = $390,5 \pm 19,6$ /M5 và = $320,1 \pm 17,1$ /M6; số tế bào ESC bị biệt hóa là $19,6 \pm 1,8\%$ /M5 và $18,4 \pm 1,7\%$ /M6, tương ứng với môi trường M3 và môi trường M4 là = $339,5 \pm 16,2$ /M3, $296,0 \pm 14,8$ /M4 và $24,3 \pm 2,6\%$ /M3, $20,8 \pm 2,1\%$ /M4. Các cụm tế bào thể phôi hình thành trong hai môi trường M5 và M6 cũng có kích thước lớn hơn khi so sánh với hai môi trường M3 và M4.

So sánh sự phát triển của tế bào ESC trong hai môi trường M6 sử dụng FBS với môi trường M7 sử dụng NBS thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê cả về sự gia tăng của tế bào ESC cũng như tỷ lệ biệt hóa; với môi trường M6 số tế bào ESC = $320,1 \pm 17,1$ và tỷ lệ biệt hóa = $18,4 \pm$

$1,7\%$ còn với môi trường M7 tương ứng là = $280,3 \pm 13,3\%$ và $12,6 \pm 1,1\%$. Kết quả này cho thấy tác dụng kích thích quá trình phân chia cũng như biệt hóa tế bào ESC của FBS mạnh hơn NBS.

III. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, có thể rút ra những kết luận sau:

1. Nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 đơn thuần (không có FBS, không có tế bào nuôi FC), tế bào gốc của phôi chuột ESC bị chết do môi trường không phù hợp.

2. Huyết thanh của thai bò FBS và huyết thanh của bê mới sinh NBS đều có tác dụng kích thích quá trình phân chia cũng như biệt hóa của tế bào ESC, song tác dụng của FBS mạnh hơn NBS.

3. Lớp tế bào FC (sau xử lý MC) cũng như dung dịch đã nuôi tế bào FC trong hai ngày có tác dụng kìm hãm quá trình biệt hóa nhưng không ức chế sự phân chia gia tăng của tế bào ESC.

4. Các môi trường M5, M6 và M7 đều có thể sử dụng để nhân nuôi tế bào ESC, tùy theo điều kiện có được và mục đích sử dụng mà chọn môi trường nào cho thích hợp hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anna M. Wobus et al.**, 2002: *Methods in Molecular Biology*, 184: 127-155.
2. **Claudia Hegert et al.**, 2002: *Journal of Cell Science*, 115: 4617-4628.
3. **Helene Boeuf et al.**, 1997: *Journ. Cell Biol.*, 138 (6): 1207-1217.
4. **Janet Rossant et al.**, 2001: *Stem Cells*, 19 (5): 477-482.
5. **Junji Fujikura et al.**, 2002: *Journ. Genes & Development*. 16 (7): 784-789.
6. **Maurizio Pesce et al.**, 2001: *Oct-4. Stem Cells*, 19 (4): 271-278.

EFFECT OF THE SUPPLEMENTED MEDIA ON THE PROLIFERATED AND DIFFERENTIATED CAPACITIES OF *IN VITRO* CULTURED MOUSE STEM CELLS

DO THI THAO, DO KHAC HIEU, NGUYEN MONG HUNG

SUMMARY

The ability of continuous dividing and differentiating into various cell types of living organisms is the potentials of stem cells which make them different from other normal cells. These potentials of stem cells arise many possible applications such as in practical treatment of diabetes, alzheimer, blood cancer, heart disease..., in the studies on carcinogenic process for future suggesting therapies, in producing transgenic animals for making valuable products, in genetic study and evolutionary development. In our studies, we focused on the effects of supplement factors added into the growth media in order to regulate the proliferation and the specialization of stem cells. Our results showed that:

1. Mouse embryonic stem cells (ESC) were died when growing in the plain RPMI1640 medium (without FBS and without Feeder cells FC) due to the unsuitable medium.
2. Both the fetal bovine serum (FBS) and the newborn bovine serum (NBS) had effects on the stimulation of proliferation and differentiation of the ESC; however, FBS showed stronger effect than NBS.
3. The FC (after treatment with MC) as well as the 2 days FC growing extracted medium showed the same effect on the suppression of the differentiation but not the proliferation of the ESC.
4. The M5, M6 and M7 media were all able to be used for the culture of the mouse ESC. The choosen medium only was dependent on the laboratory availability and the scientific purposes.

Ngày nhận bài: 20-6-2005