

THU NHẬN, NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ NHAU THAI NGƯỜI VÀ BIỆT HÓA THÀNH TẾ BÀO MỠ, TẾ BÀO XƯƠNG *IN VITRO*

TRẦN CẨM TÚ, HOÀNG NGHĨA SƠN

Viện Sinh học nhiệt đới

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Hoá chất

PBS (Phosphate - buffered Saline); cồn 70% (China); Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco - Invitrogen); NH₄Cl; Tris pH7.6 (Invitrogen); Môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Gibco - Invitrogen); môi trường huyết thanh (FBS - Gibco); dung dịch Penicillin - Steptomycin (Gibco - Invitrogen); Basic fibroblast growth factor (b-FGF, Gibco - Invitrogen); collagenas (Gibo - Invitrogen).

Phycoerythrin (PE); Fluorescein isothiocyanate (FITC); Allophycocyanin (APC).

β -glycerol 2-phosphate (Sigma), Ascorbic acid (Sigma), hEGF (Gibco - Invitrogen), Dexamethasone (Sigma); Insulin (Sigma); Indomethacine (Sigma).

AgNO₃ (China); Ethanol (Sigma); Formaldehyde (China); 2-propanol (Sigma); Oil Red O (Wako).

2. Vật liệu

Nhau thai người được thu nhận tại Bệnh viện Phụ sản Hùng Vương.

3. Phương pháp

Nghiên cứu thực nghiệm được tiến hành tại Phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Sinh học Nhiệt đới.

a. Phương pháp xử lý mẫu, thu nhận và nuôi cấy MSCs từ nhau thai

Nhau thai (từ 38 - 40 tuần) thu nhận khi mới sinh đã được sự đồng ý của sản phụ và Bệnh viện. Toàn bộ máu cuống rốn hút bỏ và nhu nhận mô nhau thai xung quanh cuống rốn, sau đó rửa sạch bằng PSB giữ trong ống 50 mL chuyển về phòng thí nghiệm.

Quần thể tế bào gốc trung mô (MSCs - Mesenchymal Stem Cells) đã được chứng minh hiện diện ở các mô thai và mô trưởng thành, bao gồm tủy xương, gan, máu cuống rốn, dịch ối, máu ngoại vi. Tế bào gốc trung mô có thể cảm ứng biệt hóa thành xương, mỡ, sụn, xơ và nội bì khi được nuôi cấy trong môi trường với những điều kiện thích hợp [1, 3, 6, 9, 10].

MSCs thể hiện khả năng biệt hóa đa dòng và đặc điểm điều hòa miễn dịch nên chúng hứa hẹn là một tác nhân liệu pháp rất khả thi. Những dữ liệu về cấy ghép tiền lâm sàng cũng đã chứng minh rằng sự cấy ghép MSCs không chỉ ngăn ngừa sự thải loại mà còn có hiệu quả điều hòa miễn dịch [2].

MSCs là một quần thể hiếm (khoảng 0,001 - 0,01%) trong tủy xương người trưởng thành [6]. Ngoài ra, số lượng của MSCs trong tủy xương giảm dần theo tuổi [7]. MSCs còn tương đối ít trong máu ngoại vi và trong máu cuống rốn [3].

Một nghiên cứu gần đây cho thấy quần thể tế bào MSCs tồn tại trong tĩnh mạch cuống rốn [12]. Hơn thế nữa MSCs còn hiện diện trong các mô như gan, tủy xương, thận [1]. Tuy nhiên, mẫu thuộc những mô trên rất khó thu nhận, do đó việc tìm kiếm một nguồn thích hợp, tránh các vấn đề về đạo đức cũng như thiết lập hệ thống nuôi cấy thích hợp là một thử thách và rất cần thiết.

Bài báo này, trình bày các kết quả nghiên cứu thu nhận tế bào giống MSCs từ nhau thai người, đây là một nguồn rất dồi dào và không ảnh hưởng gì đến sức khỏe con người. Tế bào gốc trung mô thu từ nhau thai biểu hiện các chỉ thị (marker) bề mặt giống MSCs thu từ tủy xương. Nếu sử dụng những tế bào gốc trung mô từ nhau thai (Placenta Mesenchymal Stem Cells - PMSCs) sẽ không gây tranh cãi gì về đạo lý. Nhau thai là một nguồn dồi dào, dễ thu nhận của các tế bào đa tiềm năng phục vụ cho các ứng dụng thực nghiệm và lâm sàng trong tương lai.

Mẫu mô được cắt nhuyễn bằng kéo sau đó xử lý với Trypsin - EDTA 0,25%, ủ trong tủ ấm 37°C khoảng 10 phút. Tiến hành lọc các mẫu mô bằng màng lọc kích thước 100 µm. Ly tâm với vận tốc 1600 vòng/phút trong thời gian 7 phút ở nhiệt độ 4°C, tế bào được thu nhận và dung giải trong dung dịch gồm 155 mM NH₄Cl, 20 mM Tris pH 7,6 trong vòng 5 phút. Rồi tiến hành ly tâm thu cặn tế bào ở tốc độ 1500 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Cặn tế bào được đánh tan trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin và 5 ng/mL bFGF. Tế bào nuôi trong tủ ấm 5% CO₂, 37°C.

Thay môi trường 2 lần/tuần. Khi nuôi được 3 đến 5 ngày, loại bỏ những mảnh mô nhỏ còn sót lại và tế bào tiếp tục được nuôi cấy. Khi các tế bào chiếm hơn 80% diện tích bình nuôi thì tiến hành cấy chuyển bằng trypsin - EDTA 0,25% và pha loãng 3 lần khi chuyển qua bình nuôi mới.

b. Các kiểu hình chỉ thị (marker) bề mặt

Tế bào gốc trung mô từ nhau thai và tủy xương được nhuộm với nhiều loại kháng thể đơn dòng kết hợp với Fluorescein isothiocyanate (FITC) hoặc phycoerythrin (PE) hoặc Allophycocyanin (APC); CD31-PE, CD45-APC, CD105-FITC, CD34-APC, HLA-ABC-FITC, HLA-DR-FICT, CD166-FITC, CD13-PE,

CD73-FITC, CD14-FITC.

Tối thiểu 15.000 sự kiện được phân tích bằng hệ thống flow cytometry (FACS, BD Biosciences) và phân tích bằng phần mềm Cellquest.

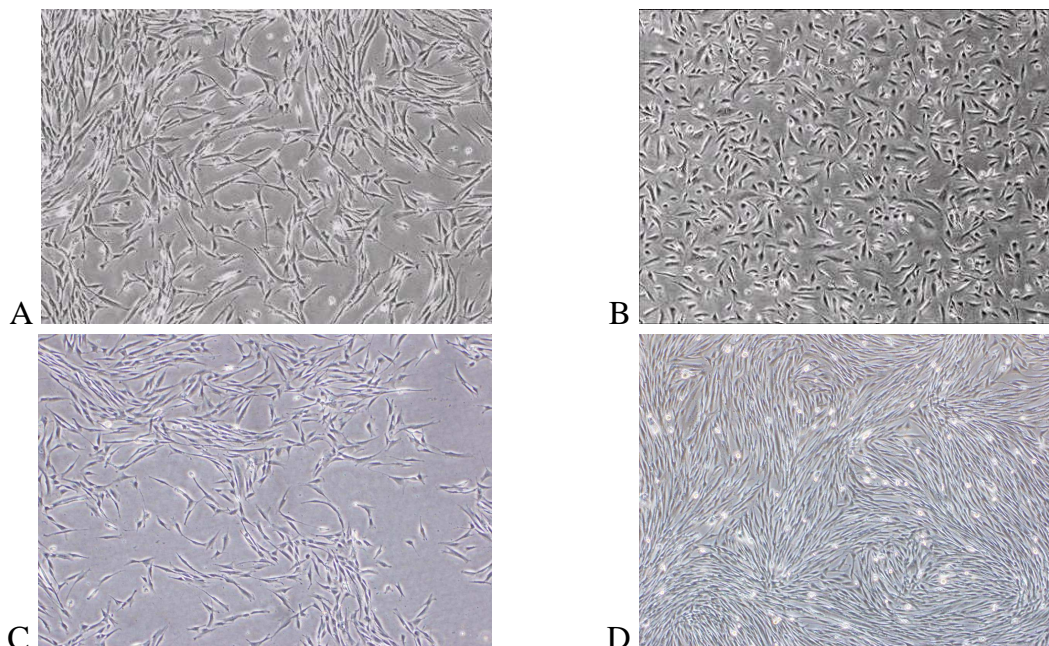
c. Các thí nghiệm về biệt hóa

Tiềm năng biệt hóa của MSCs từ nhau thai được kiểm tra bằng môi trường đặc hiệu. Biệt hóa thành tế bào xương (osteoblast) được cảm ứng bằng môi trường DMEM 1%FBS bổ sung 10 mM β-glycerol 2-phosphate, 0,2 mM Ascorbic acid, 50ng/mL hEGF, 0,1 mM Dexamethasone. Biệt hóa thành tế bào mỡ bằng môi trường DMEM 1%FBS bổ sung 0,1 M dexamethasone, 0,1 mM insulin, 10 mM indomethacine.

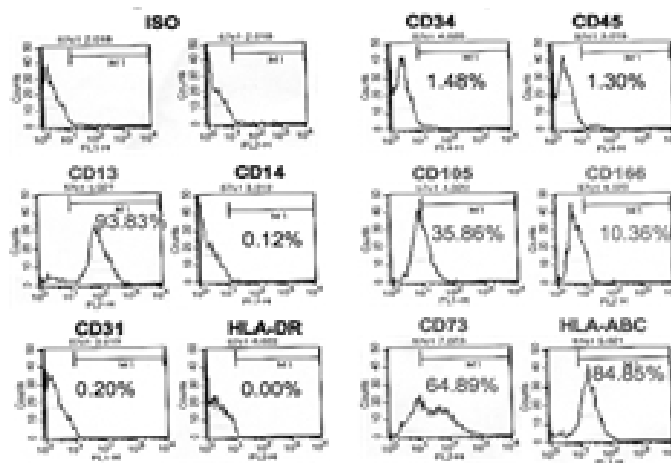
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm kiểu hình các tế bào đã được thu nhận

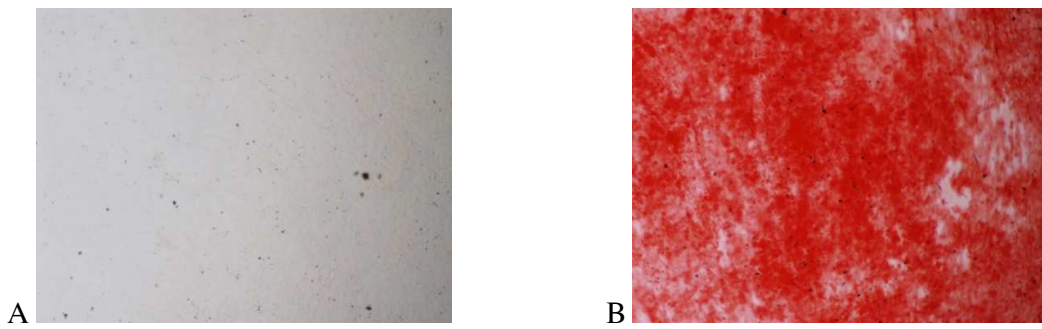
Từ 9 -14 ngày từ thời điểm nuôi cấy ban đầu trong bình nuôi xuất hiện 10 đến 14 quần thể. Các tế bào ban đầu phát triển và có 2 dạng kiểu hình đặc trưng dạng một là dạng quần thể tế bào có hình dạng thon dài giống fibroblast (hình 1A), và dạng khác là kiểu nhiều góc cạnh (hình 1B). Tế bào sau 7 ngày nuôi cấy (hình 1C) và sau 14 ngày nuôi cấy (hình 1D).



Hình 1. Các dạng hình thái tế bào thu nhận từ nhau thai người
A: Tế bào có dạng kiểu hình giống fibroblast; B: Tế bào có dạng kiểu hình góc cạnh;
C: Tế bào sau 7 ngày nuôi cấy; D: Tế bào sau 14 ngày nuôi cấy.

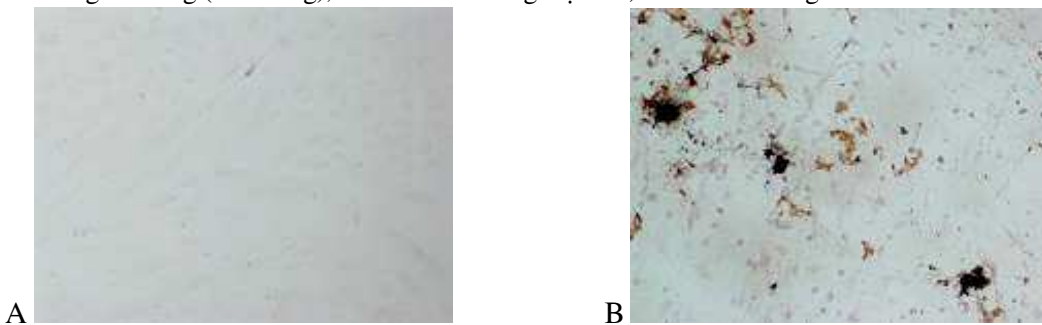


Hình 2. Các marker bề mặt của PMSCs



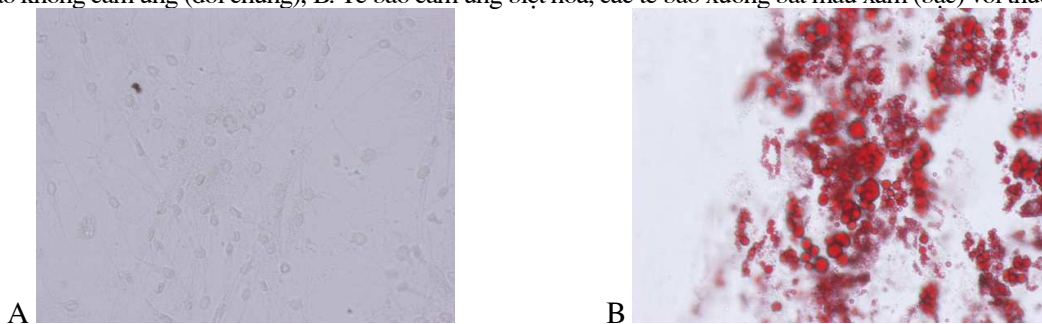
Hình 3. Kết quả nhuộm tế bào bằng Alizarin Red S

A. Tế bào không cảm ứng (đối chứng); B. Tế bào cảm ứng biệt hóa, các tế bào xương bắt màu đỏ với thuốc nhuộm.



Hình 4. Kết quả nhuộm tế bào bằng Von Kossa

A. Tế bào không cảm ứng (đối chứng); B. Tế bào cảm ứng biệt hóa, các tế bào xương bắt màu xám (bạc) với thuốc nhuộm.



Hình 5. Kết quả nhuộm tế bào bằng Oil Red OA.

Tế bào không cảm ứng (đối chứng); B. Tế bào cảm ứng biệt hóa, các giọt lipid trong tế bào mỡ bắt màu đỏ với thuốc nhuộm.

Tuy nhiên, sau khi cấy chuyển bằng trypsin - EDTA, các quần thể tế bào gốc cạnh dần biến mất chỉ còn lại các quần thể tế bào hình thon dài giống fibroblast tiếp tục tăng sinh. Sau đó các quần thể tế bào này được kiểm tra biểu hiện các marker bề mặt bằng hệ thống flow cytometry.

2. Đặc điểm kiểu hình các chỉ thị (marker) bề mặt

Đặc điểm kiểu hình miễn dịch của tế bào gốc trung mô thu từ nhau thai (PMSCs) là chúng dương tính với nhiều chỉ thị (marker) CD105, CD73, CD13, CD166, HLA-ABC. Ngoài ra, PMSCs đã âm tính các chỉ thị (marker) của tế bào gốc tạo máu như CD34, CD45, HLA-DR (hình 2).

3. Các thí nghiệm biệt hóa

Tiến hành nhuộm các mẫu PMSCs đã được cảm ứng để xác định sự biệt hóa của chúng.

Kết quả biệt hóa tế bào xương (osteoblast).

Kết quả nhuộm Alizarin Red S (hình 3) và Von Kossa (hình 4) ở ngày 23 sau cảm ứng bằng môi trường biệt hóa.

Kết quả biệt hóa tế bào mỡ (adipocyte).

Kết quả nhuộm Oil Red O (hình 5) sau 30 ngày cảm ứng bằng môi trường biệt hoá.

III. THẢO LUẬN

Các kết quả thu được cho thấy MSCs có hiện diện trong nhau thai người. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào thông thường có thể thu nhận và tăng sinh tế bào *in vitro* một cách hiệu quả. Mặc dù tế bào nuôi cấy ban đầu bao gồm cả kiểu tế bào giống fibroblast và không giống fibroblast, nhưng chỉ có quần thể giống fibroblast tồn tại sau khi cấy chuyển.

Hiện nay, chưa có chỉ thị (marker) bề mặt nào đặc hiệu hoàn toàn để xác định MSCs, do đó MSCs được xác định dựa vào các đặc tính kiểu hình miễn dịch, dựa vào hình thái và bởi khả năng kéo dài sự tự làm mới trong khi vẫn có thể biệt hóa ra các dòng tế bào trung mô khác. MSCs không biểu hiện chỉ thị (marker) tế bào tạo máu (CD45, CD34, CD14) cũng như chỉ thị (marker) của tế bào nội bì (CD34, CD31) tương tự các kết quả của Pittenger (1999); Van den Heuvel và cs., (1987); Majumdar và cs., (1998).

MSCs biểu hiện một số lượng lớn các phân tử kết dính (CD44 và integrins), vài chỉ thị (marker) tế bào nền (SH-2, SH-3 và SH-4) cũng như vài receptor cytokine (IL-1R, TNF-aR) [4-6, 8].

Từ những kết quả nghiên cứu cho phép khẳng định rằng các tế bào giống MSCs thu nhận từ nhau thai có thể dễ dàng thu nhận và tăng sinh mà không có sự thay đổi nào về đặc tính và hình thái, khi nuôi trong môi trường chỉ với huyết thanh. Nhau thai có thể là một nguồn thu nhận MSCs đầy hứa hẹn và dồi dào. Những dữ liệu ban đầu về khả năng biệt hóa của PMSCs đầy hứa hẹn. Chúng có khả năng biệt hóa ra nhiều loại tế bào như tế bào xương, tế bào mỡ, tế bào sụn... và có thể được sử dụng trong một số liệu pháp như điều trị tổn thương xương, bệnh thiếu máu chi cục bộ, sự hình thành mạch mới.... Ngoài ra, còn vì không vấp phải các vấn đề đạo lý cũng như có thể thu nhận số lượng rất lớn tế bào, PMSCs còn có thể là nguồn thay thế hấp dẫn của các tế bào tiền thân hoặc tế bào gốc phục vụ cho các nghiên cứu cơ bản. Những nghiên cứu tiếp theo cần tiến hành với mục đích tìm hiểu và khám phá các tiềm năng ứng dụng trong lâm sàng.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Giáo sư Osamu Ohneda, Khoa Y học tái sinh và Sinh học tế bào gốc, Đại học Tsukuba, Nhật Bản đã giúp đỡ chúng tôi trong quá trình sàng lọc các biểu hiện marker bề mặt của tế bào gốc cũng như những hỗ trợ về kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Campagnoli C.**, 2001: Blood, 98: 2396-402.
2. **Deans R. J.**, 2000: Exp Hematol, 28:875-84.
3. **Erices A.**, 2000: Haematol, 109: 235-42.
4. **Majumdar M. K.**, 1998: J. Cell Physiol, 176: 57-66.
5. **Majumdar M. K. et al.**, 2003: J. Biomed. Sci, 10: 228-41.
6. **Pittenger M. F. et al.**, 1999: Science, 284: 143-7.
7. **Rao M. S.**, 2001: Mech. Aging. Dev., 122: 713-34.
8. **Van den Heuvel R. L.**, 1987: Br. J. Haematol, 66: 15-20.
9. **Toma C.**, 2002: Circulation, 105: 93-8.

10. **Koc On et al.**, 2000: J. Clin. Oncol, 18: 307-16. 11. **Romanov Y. A.**, 2003: Stem Cells, 21: 105-10.

**ISOLATION, CULTURE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED
FROM HUMAN PLACENTA AND DIFFERENTIATION TO ADIPOCYE,
OSTEOBLAST *IN VITRO***

TRAN CAM TU, HOANG NGHIA SON

SUMMARY

The presence within bone marrow of a population of mesenchymal stem cells (MSCs) able to differentiate into a number of different mesenchymal tissues, including bone and cartilage. Since then MSCs have been demonstrated in a variety of fetal and adult tissues, including bone marrow, fetal blood and liver, cord blood, amniotic fluid and, in adult peripheral blood. MSCs from these sources can be extensively expanded *in vitro* and when cultured under specific conditions retain their ability to differentiate into multiple lineages including bone, cartilage, fat, muscle, nerve, and stromal cells. There has been great interest in these cells both because of their value as a model for studying the molecular basis of differentiation and their therapeutic potential for tissue repair and immune modulation. However, MSCs are a rare population in these tissues. Here we tried to identify cells with MSC-like potency in human placenta. We isolated adherent cells from trypsin-digested term placentas and examined these cells for morphology, surface markers, and differentiation potential and found that they expressed several stem cell markers. We suggest that placenta-derived cells have multilineage differentiation potential similar to MSCs in terms of morphology and cell-surface antigen expression. The placenta may prove to be a useful source of MSCs.

Ngày nhận bài: 15-7-2009