

ĐÁNH GIÁ SỰ BIẾN ĐIỆU TRONG BIỂU HIỆN CÁC GEN CHUYÊN BIỆT CỦA QUÁ TRÌNH BIỆT HÓA *IN VITRO* TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MÁU CUỐNG RÓN NGƯỜI THÀNH TẾ BÀO TIẾT INSULIN

Phạm Văn Phúc¹, Trương Hải Nhung¹, Đặng Hoàng Lâm¹, Phan Kim Ngọc¹, Phan Toàn Thắng²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia Singapore

TÓM TẮT

Tế bào gốc trung mô là tế bào đa tiềm năng. Chúng có thể chuyên biệt hóa thành tế bào tiết insulin và được ứng dụng trong điều trị bệnh tiểu đường. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị bằng phương pháp cấy ghép tế bào gốc còn thấp, đặc biệt là cấy ghép tế bào gốc trung mô. Nguyên nhân có thể là sai sót sự bộc lộ gen trong quá trình chuyên biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tiết insulin. Nghiên cứu này nhằm khảo sát sự biểu hiện 10 gen liên quan đến quá trình biệt hóa tế bào gốc tủy thành tế bào tiết insulin. Tế bào gốc trung mô thu nhận từ máu cuống rốn người được nuôi cấy và biệt hóa thành tế bào xương, tế bào mỡ để chứng minh tiềm năng biệt hóa, sau đó được chuyên biệt hóa thành tế bào tiết insulin bằng quy trình 3 bước: bước 1, xử lý trong môi trường H-DMEM bổ sung FBS và retinoic acid; bước 2, xử lý trong môi trường L-DMEM bổ sung FBS, nicotinamide và EGF; bước 3, xử lý trong L-DMEM bổ sung FBS và exendin-4. Trong mỗi bước của quy trình, sự biểu hiện 10 gen được đánh giá bằng phương pháp RT-PCR. Tập gen của quá trình chuyên biệt hóa được so sánh với tập gen của quá trình biệt hóa *in vivo* thành tế bào beta của các tác giả khác được công bố trước đây. Kết quả RT-PCR cho thấy, có sự biểu hiện 2 gen *nestin* và *Isl-1* đối với tế bào gốc trung mô chưa biệt hóa; 10 gen *nestin*, *Isl-1*, *Pdx-1*, *Ngn-3*, *Pax6*, *Pax4*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Glut-2* và *Insulin* sau quá trình cảm ứng biệt hóa tạo tế bào tiết insulin. Trong khi đó, tế bào gốc tủy biệt hóa *in vivo* thành tế bào beta chỉ biểu hiện 7 gen là *Nestin*, *Pdx-1*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Pax6*, *Glut-2* và *Insulin*. Các khác biệt trong sự biến điệu của quá trình bộc lộ các gen cũng được ghi nhận giữa sự chuyên biệt hóa *in vitro* và biệt hóa *in vivo*. Điều này có nghĩa là đảo tụy được tạo ra từ quá trình biệt hóa *in vitro* tế bào gốc trung mô máu cuống rốn người không hoàn toàn giống với đảo tụy *in vivo*.

Từ khóa: Chuyển biệt hóa, máu cuống rốn, tế bào beta, tế bào gốc, tế bào tiết insulin

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiểu đường gây nhiều biến chứng nguy hiểm; làm giảm sức lao động của hàng triệu người trên khắp thế giới. Bệnh đã được nghiên cứu và điều trị từ những năm 1921 bằng liệu pháp bổ sung insulin. Tuy nhiên, liệu pháp này còn nhiều nhược điểm. Nghiên cứu điều trị bằng cách tái tạo lại tuyến tụy của bệnh nhân là hướng điều trị có nhiều triển vọng (Limbert *et al.*, 2008; Miszta-Lane *et al.*, 2006; Otonkoski, Lundin, 2005). Tế bào gốc trung mô là một ứng viên cho mục đích này. Với tiềm năng biệt hóa lớn, các tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn đã được chứng minh có khả năng biệt hóa thành tế bào tiết insulin (Chang *et al.*, 2008a; b; Chen *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2008a; b; Hisanaga *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Zulewski, 2008).

Các tế bào gốc trung mô từ tủy xương người (Lee *et al.*, 2004; 2006); tủy xương chuột nhắt (Tang *et al.*, 2004); tủy xương chuột công (Chen *et al.*,

2004; Oh *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007); máu cuống rốn người (Ende *et al.*, 2004a; b); lớp Wharton's jelly cuống rốn người (Chao *et al.*, 2008) đã được sử dụng để điều trị trên mô hình chuột bệnh tiểu đường. Một số tác giả đã cho thấy cấy ghép tế bào gốc trung mô người đã chuyển gen PDX-1 có tác dụng làm giảm đường huyết ở chuột bị bệnh tiểu đường (Karnieli *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Tuy vậy, các kết quả đạt được vẫn chưa như mong muốn; như thời gian tác dụng còn ngắn; mức đường huyết giảm chưa đáng kể, hiệu quả điều trị còn thấp.

Theo chúng tôi, hiệu quả điều trị thấp là do quá trình chuyên biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào nội mô (tế bào tiết insulin) có nhiều khác biệt với quá trình biệt hóa *in vitro*, nghĩa là tế bào tiết insulin thu được sau quá trình chuyên biệt hóa không phải là tế bào beta thực sự. Vì thế, nghiên cứu này nhằm đánh giá sự biến điệu trong biểu hiện của các gen chuyên biệt từ tế bào gốc trung mô (mesenchymal stem cell - MSC) máu cuống rốn

thành tế bào tiết insulin và so sánh với quá trình biệt hóa *in vivo*.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu nhận, nuôi cấy, biệt hóa tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người

Thu nhận máu cuống rốn: máu cuống rốn được thu nhận từ sản phụ âm tính với HIV, HBV và HCV ở Bệnh viện Hùng Vương, thành phố Hồ Chí Minh.

Nuôi cấy phân lập tế bào gốc: Máu cuống rốn được pha loãng 2 lần bằng PBSA; sau đó, ly tâm trên gradient Ficoll-paque ($1,077 \text{ g/cm}^3$) để thu nhận quần thể tế bào đơn nhân. Tế bào đơn nhân được nuôi trong môi trường IMDM (Gibco, Invitrogen) bổ sung 20% FBS (10082-139, Gibco), bổ sung kháng sinh 1X (A5955, Sigma). Sau khi tế bào phát triển kín 70 - 80% bề mặt chai nuôi cấy 25 cm^2 , xử lý tế bào với trypsin/EDTA 0,25% và cấy chuyển sang các bình nuôi mới theo tỷ lệ pha loãng 1:3 (Lee *et al.*, 2004; 2006).

Biệt hóa: Để biệt hóa thành tế bào tạo xương: tế bào sau khi phát triển kín 70 - 80% bề mặt bình nuôi 25 cm^2 ở lần cấy chuyển thứ 5 - 7 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo xương: 89% L-DMEM (D5523, Sigma) bổ sung 10% FBS (10082-139, Gibco), 1% kháng sinh (A5955, Sigma), 50 $\mu\text{g/ml}$ AsAP (A4403, Sigma), 0,1 μM dexamethasone (D8893, Sigma), 100 mM beta-glycerophosphate (D50020, Sigma); thay môi trường biệt hóa 4 ngày/lần, trong 21 ngày (Lee *et al.*, 2004; 2006).

Để biệt hóa thành tế bào tạo mỡ: tế bào sau khi phát triển kín 70 - 80% bề mặt bình nuôi 25 cm^2 ở lần cấy chuyển thứ 5 - 7 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo mỡ: 89% L-DMEM (D5523, Sigma) bổ sung 10% FBS (10082-139, Gibco), 1% kháng sinh (A5955, Sigma), 0,5 μM Dexamethasone (D8893, Sigma), 0,5 μM 3-Isobutyl-1-methylxanthin - IBMX (I5879, Sigma), 50 μM Indomethacin (I7378, Sigma) (Lee *et al.*, 2004; 2006).

Biệt hóa thành tế bào tiết insulin: sử dụng quy trình 3 bước (Gao *et al.*, 2008a; b): Bước 1: tế bào được xử lý trong H-DMEM (25 mmol/l glucose) có bổ sung 10% FBS và 10^{-6} mol/l retinoic acid 24 h; sau đó thay bằng H-DMEM bổ sung 10% FBS trong 2 ngày; bước 2: tế bào được xử lý trong L-DMEM bổ sung 10% FBS, 10 mmol/l nicotinamide và 20 ng/ml EGF trong 6 ngày; bước 3: tế bào được xử lý trong L-DMEM bổ sung 10% FBS và 10 nmol/l

exendin-4 trong 6 ngày.

Phương pháp flow cytometry

Các tế bào gốc trung mô ứng viên sau 7 lần cấy chuyển được xác định sự biểu hiện các marker bề mặt CD13, CD14, CD34, CD44, CD45 bằng kỹ thuật flow cytometry trên máy FACSCalibur của BD Bioscience. Các tế bào sau khi phát triển phủ kín khoảng 70% bề mặt bình nuôi được xử lý với trypsin/EDTA 0,25% và thu nhận tế bào đơn. Cứ mỗi 10^6 tế bào được sử dụng để nhuộm với kháng thể trong 30 phút, tối, 4°C . Sau đó, tế bào được rửa 2 lần bằng FACSflow để loại bỏ kháng thể thừa và tái huyền phủ tế bào trong 500 μl FACSflow. Khi tiến hành phân tích, các kháng thể CD13-FITC, CD34-FITC, CD45-FITC được phát hiện bởi kênh FL1 và CD14-PE, CD44-PE được phát hiện bởi kênh FL2. Tất cả các dữ liệu được phân tích ở 10.000 tế bào và bằng phần mềm CellQuest Pro.

Phương pháp nhuộm hóa mô

Nhuộm Sudan Black: loại bỏ môi trường nuôi, thêm 10% formalin, ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, đổ bỏ formalin và thêm một thể tích tương tự formalin mới. Ủ ít nhất là 1 h, tách bỏ toàn bộ formalin, rửa với isopropanol 60%, để đĩa khô hoàn toàn, thêm dung dịch thuốc nhuộm Sudan black, ủ trong 19 phút, tách bỏ thuốc nhuộm và ngay lập tức thêm dH_2O , rửa 4 lần bằng dH_2O ; sau đó, quan sát dưới kính hiển vi.

Nhuộm Alizarin red: Khử nước mẫu tế bào bằng cồn 70%, rửa lại mẫu bằng nước cất, ủ với dung dịch thuốc nhuộm từ 30 giây đến 5 phút, kiểm tra sự xuất hiện màu đỏ cam dưới kính hiển vi đảo ngược, rửa mẫu nhiều lần bằng nước cất hay PBS để loại bỏ thuốc nhuộm; sau đó, quan sát dưới kính hiển vi.

Nhuộm Alkaline phosphatase: Tách bỏ môi trường nuôi, thêm 10% formalin, ủ trong 5 phút, ở nhiệt độ phòng, đổ bỏ formalin và thêm một thể tích tương tự formalin mới. Ủ ít nhất là 1 h, tách bỏ toàn bộ formalin, rửa với isopropanol 60%, rửa 2 lần với PBS-1% Triton X100, không để đĩa khô hoàn toàn (vừa khô), thêm dung dịch thuốc nhuộm, ủ trong tối từ 30 - 120 phút, tách bỏ thuốc nhuộm và ngay lập tức thêm dH_2O , rửa 4 lần bằng dH_2O ; sau đó, quan sát dưới kính hiển vi.

Nhuộm Dithizone: Đổ hết môi trường trong bình nuôi tế bào ra ngoài, bổ sung dung dịch thuốc nhuộm vào, tráng đều lên trên mặt bình, ủ bình trên ở tủ nuôi 37°C , trong 15 - 30 phút. Quan sát sự xuất hiện

màu của các cụm tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược.

Phương pháp RT-PCR

RNA được tách từ 30.10^5 tế bào bằng TRI reagent (Sigma) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Phản ứng RT-PCR được tiến hành sử dụng Kit one-tube của Promega. Trong tất cả các phản ứng, beta-actin được sử dụng làm đối chứng nội. Kết quả được điện di trên gel agarose 2% và sử dụng thang DNA 100 bp (Fermentas).

Các cặp primer sử dụng cho RT-PCR : Insulin (263 bp): xuôi GCAGCCTTTGTGAACCAACA, ngược GTTGACAGTAGTTCTCCAGGTG (Timper *et al.*, 2006); Ngn3 (313 bp) xuôi, GGATGAAAGGATGACGCCTC; ngược, CCGAGTTGAGGTCTGTCAT (Timper *et al.*, 2006); Pax4 (496 bp): xuôi, AGGAGGACCAGGGACTACCGT; ngược, TTTA GGTGGGGTGTCACTCAG (Timper *et al.*, 2006); Glut-2 (298 bp) xuôi, GTACAATGACAG AAGATAAG; TGCTACTAACATGGCTTTGA (Timper *et al.*, 2006); Pdx-1 (220 bp) xuôi, GGATGAAGTCTACCAAGCTCACGC; ngược, CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC (Yuichi *et al.*, 2005) Pax6 (81 bp): xuôi TGCACATTT CCCGAATTCT; ngược, GATGGAGCCAGTC TCGTAATACCT (Timper *et al.*, 2006); Isl-1 (493 bp): xuôi, AGCATCAATGTCTCTCAACTCC; ngược, TGTTGGCAAGGCAATGACC (Yuichi *et al.*, 2005); Nkx6.1 (84 bp): xuôi, TCTTCTGG CCCGGAGTGA; ngược, CCAACAAAATGGA TCCTTGATGA (Timper *et al.*, 2006); Nkx2.2. (154 bp) xuôi, TCTACGACAGCAGCGACAAC; ngược, TTGTCATTGTCCGGTACTC (Timper *et al.*, 2006); NeuroD1 (450 bp) xuôi, TCG TTC AGA CGC TTT GCA AG; ngược, AGA TTG ATC CGT GGC TTT GG (Timper *et al.*, 2006); Osteocalcin (266 bp): xuôi, AGG GCA GCG AGGTAG TGA AGA; ngược, AAG GGCAAG GGG AAG AGG AAA GAA (Mauney *et al.*, 2004); Osteopontin (330 bp): xuôi, CTAGGCATCACCTGTGCCATACC; ngược, CTACTAGACTACTTGACCAGTGCAC (Lee *et al.*, 2004); Thy-1 (239 bp): xuôi, GTCCTTTCTCCCCAATCTC; ngược, GGGAG AACCTGCAAGACTGTT (Timper *et al.*, 2006); SCF (222 bp): xuôi, GGTGGCAAATCTTCC AAAAG; ngược, TCTTTCACGCACTCCACAAG (Timper *et al.*, 2006); c-kit (244 bp) xuôi, GGCATCACGGTGACTTCAAT; ngược, GGTTT GGGGAATGCTTCATA (Timper *et al.*, 2006); CD45 (153 bp): xuôi, CAGGCAGCAATGCTA TCTCA; ngược, CTGTGATGGTGGTGGTGGAG

(Timper *et al.*, 2006); CD34 (348 bp): xuôi, ACAACCTTGAAGCCTAGCCTG; ngược, CAA GACCAGCAGTAGACTG (Jose Marcos *et al.*, 2001); ABCG2 (379 bp): xuôi, AGTTCCA TGGCACTGGCCATA; ngược, TCAGGTAGGC AATTGTGAGG (Cintia *et al.*, 2005); Nestin (495 bp): xuôi, AGAGGGGAATTCCTGGAG; ngược, CTGAGGACCAGGACTCTCTA (Pessina *et al.*, 2004); beta actin (587 bp): xuôi, CCAAGGCC AACCGGAGAAGATGAC; ngược, AGGGTAC ATGGTGGTGCCGCCAGAC (Ichihiro *et al.*, 2002).

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Thu nhận tế bào gốc trung mô máu cuống rốn người

Sự thay đổi hình dạng tế bào khi nuôi sơ cấp và cấy chuyên

Tế bào đơn nhân được nuôi trong bình nuôi 25 cm² (mật độ 1.10^6 tế bào/ml). Sau 24 h nuôi, một số tế bào bắt đầu bám và trải với hình dạng giống nguyên bào sợi; bên cạnh đó, cũng có nhiều tế bào nổi lơ lửng trong dịch nuôi. Sau 7 ngày, các tế bào bắt đầu hợp đồng, quần thể tế bào chiếm chừng 70 - 80% diện tích bề mặt bình nuôi (Hình 2A).

Kết quả phân tích flow cytometry

Kết quả phân tích (Hình 1) cho thấy, các tế bào gốc trung mô ứng viên sau khi thu nhận biểu hiện 2 marker đặc trưng là CD13 với 92,42% tế bào có biểu hiện; và CD44 với 97,07% tế bào có biểu hiện. Trong khi đó, các tế bào này âm tính với các marker như CD34, CD45 và CD14. Thật vậy, CD34 là marker của tế bào gốc tạo máu; CD45 là marker của tế bào bạch cầu trưởng thành. CD14 là marker của tế bào gốc trung mô thu từ tủy xương. Kết quả này tương tự với kết quả của Lee và đồng tác giả (2004, 2006) và Gao và đồng tác giả (2008a; b).

Sự thay đổi tính tạp nhiễm của quần thể tế bào đơn nhân sau khi nuôi

Kết quả xác định biểu hiện gen (Hình 5A) cho thấy tế bào đơn nhân thu nhận được từ phân đoạn giữa sau khi ly tâm gradient Ficoll-paque biểu hiện c-kit, CD45, ABCG2, SCF và CD34; trong khi đó âm tính với Thy1. Quần thể tế bào đơn nhân dương tính với c-kit và CD34 cho thấy quần thể tế bào này có chứa tế bào gốc tạo máu vì c-kit và CD34 là hai marker cho tế bào gốc tạo máu (Rachadi *et al.*, 2001). Kết quả dương tính với ABCG2 và SCF

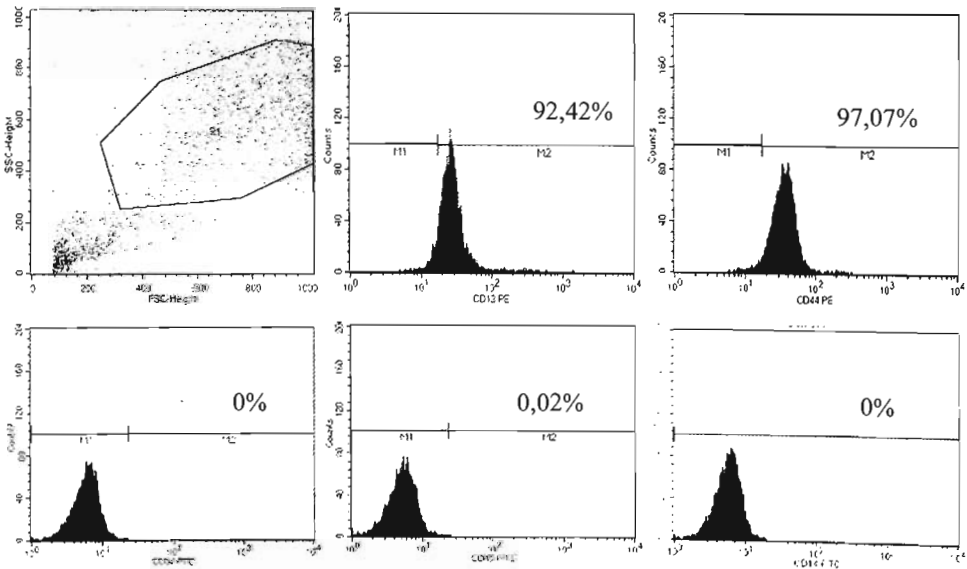
chứng tỏ trong quần thể tế bào đơn nhân có chứa tế bào gốc và tế bào tiết ra SCF. Sự biểu hiện của kênh ABCG2 là đặc trưng cho tế bào gốc vì kênh này có vai trò giải độc cho tế bào. Kênh này được biết là yếu tố gây nên kiểu hình quần thể phụ (side population) trong quần thể tế bào gốc tủy xương hay máu cuống rốn (Goodell *et al.*, 1997). Tuy nhiên, kênh này không chỉ biểu hiện trong tế bào gốc tạo máu mà còn trên nhiều tế bào gốc khác nhau như tế bào gốc trung mô (Nagai *et al.*, 2007). SCF còn gọi là Kit ligand hay Steel factor là ligand của c-kit (CD117). SCF là nhân tố quan trọng cho sự sống, tăng sinh và biệt hóa của HSC và những tế bào tiền thân dòng máu. Trong hỗn hợp tế bào đơn nhân, một trong các tế bào sản xuất SCF là tế bào gốc trung mô (Koç *et al.*, 2001). Sự biểu hiện dương tính của marker này cho thấy rằng trong quần thể đơn nhân có tồn tại tế bào gốc trung mô.

CD45 là marker của các tế bào máu trưởng thành. Kết quả cho thấy, mẫu tế bào đơn nhân dương tính mạnh với marker này, chứng tỏ trong mẫu chứa một lượng lớn các tế bào máu trưởng thành. Trong mẫu ban đầu, các tế bào âm tính với Thy1. Điều này có thể giải thích là lượng tế bào gốc trung mô trong

mẫu ban đầu tồn tại rất ít. Ngược với Thy1, quần thể tế bào này dương tính với SCF tương đối mạnh, do đó có lẽ rằng SCF biểu hiện mạnh trong MSC hay được biểu hiện trên hơn một loại tế bào trong máu cuống rốn.

Từ kết quả này, có thể đưa ra thành phần tế bào trong mẫu tế bào đơn nhân: thành phần nhiều nhất là tế bào máu trưởng thành, tế bào gốc tạo máu và tế bào gốc trung mô; và một phân đoạn các tế bào khác mà không sử dụng marker để nhận diện.

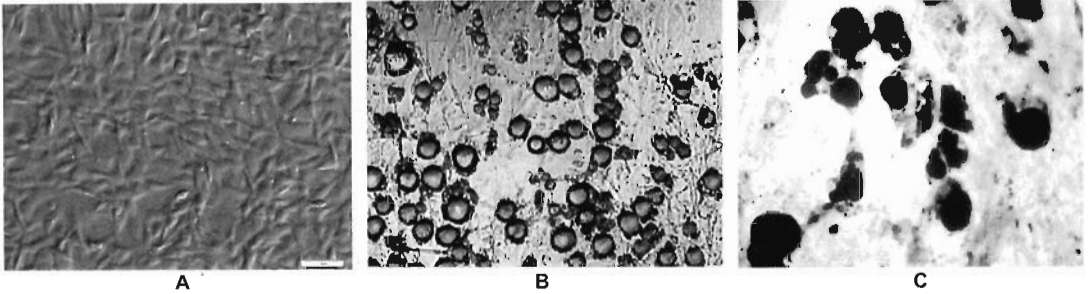
Sau 3 lần cấy chuyển, kết quả cho thấy sự biểu hiện của CD34 biến mất. Điều này có thể giải thích là những tế bào dòng máu này không bám dính trong điều kiện nuôi cấy, nên sau 3 lần cấy chuyển (hơn 6 lần thay môi trường), chúng bị loại bỏ. Kết quả âm tính với marker c-kit hỗ trợ lập luận này. Tương tự các tế bào gốc tạo máu, các tế bào máu trưởng thành cũng bị loại bỏ sau 3 lần cấy chuyển (marker CD45 âm tính). Biểu hiện dương tính yếu của Thy1 cũng được ghi nhận, điều này chứng tỏ tế bào gốc trung mô đã tăng sinh nhiều; cùng với đó các nhân tố cho tế bào gốc như SCF và ABCG2 cũng biểu hiện.



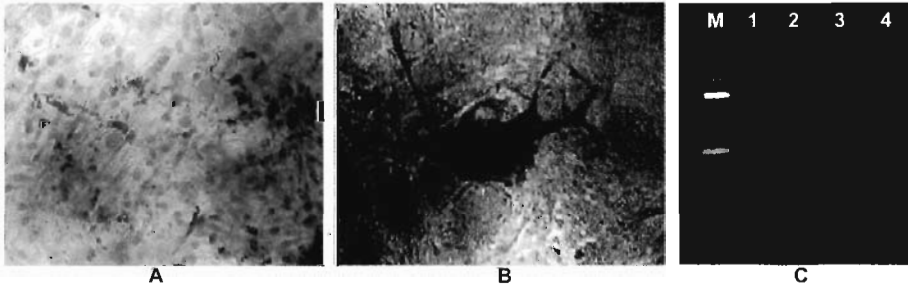
Hình 1. Kết quả phân tích flow cytometry tế bào gốc trung mô 7 ngày nuôi cấy thu nhận với các marker CD13, CD14, CD34, CD45 và CD44.

Sau 5 lần cấy chuyển, kết quả cho thấy quần thể tế bào âm tính hoàn toàn với CD34, c-kit, CD45; điều này có nghĩa là quần thể tế bào gốc tạo máu và tế bào máu trưởng thành đã được loại bỏ hoàn toàn sau các lần cấy chuyển. Quần thể tế bào trong giai đoạn này dương tính với Thy1, SCF, ABCG2 chứng tỏ quần thể tế bào thu nhận được là quần thể tế bào gốc trung mô. Hơn nữa, sau 2 lần cấy chuyển từ thể

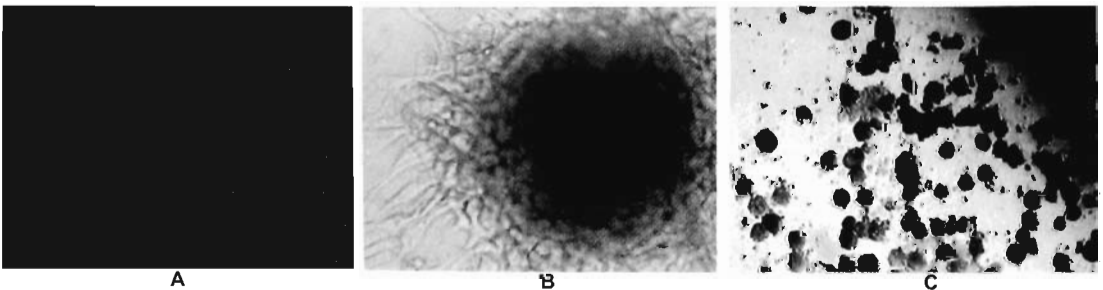
hệ thứ 3 đến thể hệ thứ 5; sự biểu hiện các marker không thay đổi. Điều này cho rằng: (1) quần thể tế bào gốc trung mô ứng viên đã đi dần vào sự ổn định và tinh sạch; (2) quá trình nuôi cấy chuyển không ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen này; (3) sau 3 lần cấy chuyển có thể sử dụng tế bào cho các mục đích nghiên cứu khác vì ở thời gian này quần thể tế bào gần như đã ổn định và tinh sạch.



Hình 2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tạo mỡ. A. Chưa biệt hóa; B. Sau khi biệt hóa: Tế bào tích trữ các giọt mỡ; C. Các giọt mỡ bắt màu đen khi nhuộm với Sudan Black.



Hình 3. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tạo xương. A. Tế bào sau khi biệt hóa bắt màu với thuốc nhuộm Alizarin red; B. Tế bào sau khi biệt hóa bắt màu với thuốc nhuộm cho alkaline phosphatase; C. Điện di sản phẩm RT-PCR xác định tế bào sau khi biệt hóa thành tế bào tạo xương. M. Thang chuẩn 100 bp; 1. Đối chứng âm; 2. *Beta actin* (đối chứng nội) (587 bp); 3. *Osteopontin* (330 bp); 4. *Osteocalcin* (266 bp).



Hình 4. Chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tiết insulin. A. Tế bào bắt đầu co cụm lại sau bước 1; B. Cụm tế bào giống tụy đảo xuất hiện sau bước 2; C. Kết quả nhuộm dithizone các cụm tụy đảo sau bước 3. Kết quả cho thấy các cụm tế bào này dương tính với dithizone.

Kết quả biệt hóa thành tế bào xương và mỡ

Biệt hóa thành tế bào tạo mỡ: Sau 48 h bỏ sung môi trường biệt hóa mỡ, có hiện tượng tích tụ các giọt mỡ trong tế bào chất của các tế bào trong một số lô nghiên cứu (Hình 2B). Sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ li ti trong tế bào chất được quan sát rõ nhất vào ngày thứ 5. Các giọt mỡ nhỏ gộp lại dần thành các giọt lớn. Các giọt mỡ lớn sau đó sẽ gộp lại thành giọt mỡ lớn hơn chiếm gần hết thể tích tế bào và ép nhân tế bào ra ngoài. Các tế bào tạo mỡ với hình dạng tròn bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi tiến hành cảm ứng. Kết quả này tương tự kết quả của Oscar K. Lee (Lee *et al.*, 2004). Khi nhuộm với thuốc nhuộm Sudan Black chúng bắt màu đen (Hình 2C).

Biệt hóa thành tế bào tạo xương: Sau khi xử lý với môi trường cảm ứng biệt hóa 4 ngày, tế bào có sự thay đổi hình dạng nhẹ. Hầu hết các tế bào vẫn còn hình thon dài. Sau 21 ngày xử lý với môi trường biệt hóa, tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin red; sau khi nhuộm, các tế bào và chất nền bắt màu đỏ cam (Hình 3A). Khi nhuộm với Alkaline phosphatase, trên thị trường quan sát, xuất hiện nhiều vị trí với dải màu đỏ (Hình 3B). Đây là kết quả dương tính với thuốc nhuộm alkaline phosphatase. Sau 21 ngày cảm ứng, các tế bào được sử dụng để tách RNA tổng số và đánh giá sự biểu hiện gen thông qua phản ứng RT-PCR với 2 marker *osteocalcin* và *osteopontin*, sử dụng beta actin làm chứng nội. Kết quả điện di cho thấy, quần thể tế bào giai đoạn này dương tính với hai marker là: *osteocalcin* và *osteopontin* (Hình 3C).

Đánh giá sự biểu hiện gen trong quá trình chuyển biệt hóa

Sự thay đổi hình dạng của tế bào

Các MSC được biệt hóa thành tế bào tiết insulin theo quy trình 3 bước của Gao (Gao *et al.*, 2008a; b). Sau 3 ngày (hết bước 1), các tế bào hầu như không thay đổi hình dạng, tế bào vẫn tăng sinh. Trong bước 2, tốc độ tăng sinh của tế bào chậm lại và những tế bào có hình thoi trở nên ngắn, tròn bầu lại và có hình dạng giống tế bào biểu mô vào cuối bước 2 (9 ngày sau khi biệt hóa). Vào 7 ngày sau khi biệt hóa, sự co cụm và rút ngắn của các tế bào làm dồn chúng lại trong một vị trí hình thành một nhóm tế bào ngày càng nén đặc. Từ đó, một số cụm tế bào giống tụy đảo bắt đầu xuất hiện vào khoảng ngày 9, với đường kính từ 200 - 350 μm (Hình 4A). Ở bước 3, nhiều cụm tế bào giống tụy đảo xuất hiện nhiều hơn. Khác với quá trình tạo neurosphere, quá trình tạo các cụm này được tiến hành do sự co rút và dồn lại của một

đám lớn tế bào đang sống ở dạng lớp đơn, những đám tế bào này không có dạng khối cầu nổi lơ lửng; bám tương đối chặt vào bề mặt dụng cụ nuôi (Hình 4B). Khi nhuộm với dithizone, 100% các cụm tế bào giống tụy đảo bắt màu đỏ với thuốc nhuộm (Hình 4C). Sự dương tính với thuốc nhuộm dithizone cho rằng các cụm tế bào này có tích lũy kẽm. Đây là đặc tính của các tụy đảo.

Sự thay đổi biểu hiện gen

Quá trình biệt hóa được tiến hành thông qua 3 giai đoạn, do đó, nghiên cứu này tiến hành khảo sát sự biểu hiện gen ở 4 thời điểm: chưa biệt hóa, sau bước 1 của quá trình biệt hóa; sau bước 2 của quá trình biệt hóa và sau bước 3 của quá trình biệt hóa (Hình 5B).

Khi chưa biệt hóa

Khi chưa biệt hóa: các tế bào ở lần cấy chuyển thứ 3 - 5 được sử dụng để tách RNA tổng số và chạy RT-PCR để xác định sự biểu hiện của 10 gen trong profile gen liên quan đến kiểu hình tiết insulin; sử dụng gen beta actin làm đối chứng nội. Kết quả cho thấy 2 trong số 10 gen kiểm tra biểu hiện trong MSC và các gen còn lại không biểu hiện. Hai gen biểu hiện đó là *Nestin* và *Isl-1*. 8 gen còn lại trong profile gen cho quá trình hình thành tế bào tiết insulin đều không biểu hiện. Sự không biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình hình thành tế bào tiết insulin trong tế bào MSC là hoàn toàn hợp lý; vì tế bào MSC không có kiểu hình của tế bào tiết insulin.

Sau bước 1

Sau bước 1, 4 trong 10 gen khảo sát biểu hiện, bao gồm *Nestin*, *Pdx-1*, *Ngn3*, *Isl-1*. Trong 4 gen đó có 2 gen đã biểu hiện khi chưa biệt hóa. Như vậy, *nestin* và *Isl-1* tiếp tục biểu hiện khi cảm ứng biệt hóa. Với tác động của nồng độ đường cao và chất cảm ứng retinoic acid, MSC biểu hiện ba gen: *Pdx-1*, *Ngn3*.

Như vậy, trong bước 1 của quá trình biệt hóa, dưới tác động của môi trường có nồng độ glucose và acid retinoic, làm mở 2 gen là *Pdx-1* và *Ngn3*. Tuy nhiên, sự biểu hiện của *Ngn3* lại phụ thuộc vào sự biểu hiện của *Pdx-1*. Hay nói cách khác, sự tác động biệt hóa trên nền sự biểu hiện trước của hai gen *Nestin* và *Isl-1* của môi trường cảm ứng đã mở khóa quan trọng *Pdx-1*, từ đó tác động này trở thành một cascade cho sự phiên mã tiếp theo cho gen *Ngn3*.

Sau bước 2

Sau 6 ngày xử lý trong môi trường glucose giảm,

có bổ sung nicotinamide và EGF, tế bào biểu hiện thêm 2 gen là *Pax4* và *Pax6*, nâng tổng số gen biểu hiện liên quan đến quá trình tiết insulin là 6 trong 10 gen khảo sát.

Hai gen này được biết với nhiều vai trò trong nhiều tế bào khác nhau. Trong đó, đối với sự phát triển của tuyến tụy, *Pax6* cần thiết cho sự tạo ra tế bào tiết glucagon - tế bào alpha (St-Onge *et al.*, 1997) và *Pax4* là nhân tố quan trọng trong sự biệt hóa của các tế bào sản xuất insulin và tế bào sản xuất somastatin - tế bào delta (Sosa-Pineda *et al.*, 1997).

Cuối bước 3

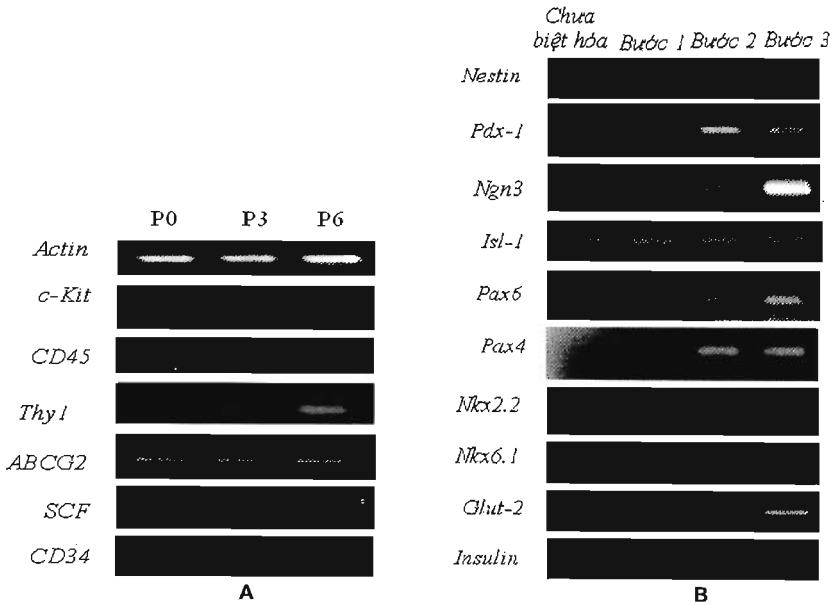
Cuối bước này, 10 trong 10 gen khảo sát biểu hiện; trong đó, có biểu hiện thêm 4 gen mới là *Nkx 2.2*, *Nkx6.1*, *Glut-2* và *insulin*.

Nkx 2.2 và *Nkx 6.1* là hai nhân tố phiên mã được cho là biểu hiện muộn trong quá trình biệt hóa *in vitro* hay phát triển *in vivo*. Người ta thấy rằng hai

gen này biểu hiện tăng khi tế bào đã trở thành tế bào tụy nội tiết (Jensen *et al.*, 2000). Như vậy, có thể hai gen này biểu hiện sẽ hình thành tế bào tụy hoàn thiện về chức năng.

Và cuối cùng là sự biểu hiện của 2 gen cực kì quan trọng là *Glut-2* và *insulin*. *Glut-2* là kênh vận chuyển đường, là bộ phận quan trọng cho sự vận chuyển đường vào trong tế bào tụy; cung cấp thông tin nồng độ đường nhằm gây nên tín hiệu tổng hợp insulin đáp ứng sự gia tăng/giảm lượng đường. Sự biểu hiện gen này là vai trò của exendin-4. Nên một số tác giả cho rằng nếu tụy đảo được biệt hóa từ MSC không xử lý với exendin-4 sẽ không trưởng thành hoàn toàn nên sẽ không đáp ứng được với lượng đường (Dong-Qi Tang *et al.*, 2004).

Như vậy, sau 15 ngày biệt hóa, MSC biệt hóa thành tế bào tiết insulin với sự mở các gen cần thiết cho quá trình sản xuất insulin và đáp ứng với lượng đường.



Hình 5. Điện di sản phẩm RT-PCR xác định sự biểu hiện gen của tế bào gốc đơn nhân khi nuôi cấy chọn lọc (A) và tế bào gốc trung mô biệt hóa thành tế bào tiết insulin (B).

So sánh profile gen biểu hiện trong quá trình biệt hóa và chuyển biệt hóa *in vitro*

Quá trình biệt hóa: Theo kết quả phân tích, tổng hợp của Soria (2001) sự biểu hiện của 10 gen trong

profile gen liên quan đến sự biệt hóa thành kiểu hình beta là quá trình “uyển chuyển”, điều hòa, tương tác giữa các gen; một gen có thể biểu hiện ở giai đoạn này và không biểu hiện ở giai đoạn khác. Khi gen biểu hiện tăng tương tác làm gen khác biểu hiện tăng

hay giảm biểu hiện. Điều này có thể thấy rõ trong cặp gen *Pdx-1*, *Ngn3* hay *Pdx-1* và *Isl-1* hoặc *Ngn3* và *Isl-1*. Gen *nestin* giữ vai trò quan trọng trong suốt quá trình biệt hóa. Một số gen cần cho quá trình biệt hóa biểu hiện mạnh trong giai đoạn đầu; sau đó biểu hiện giảm dần; gen cần thiết cho quá trình sản xuất và điều hòa đáp ứng với lượng đường được biểu hiện sau cùng. Với sự nhận định này, 10 gen trong profile gen có thể chia thành nhóm: (1) nhóm biểu hiện duy trì như *nestin* hay *Pdx-1*; (2) nhóm biểu hiện tạm thời. Nhóm biểu hiện duy trì sẽ biểu hiện suốt quá trình biệt hóa; có vai trò quan trọng trong sự sống, sinh trưởng của tế bào. Nhóm biểu hiện tạm thời có tác động theo kiểu lan truyền. Sự biểu hiện của gen này lôi cuốn gen khác biểu hiện; hay sản phẩm của gen A sẽ làm gen B biểu hiện. Nhưng sau khi gen B biểu hiện thì gen A không biểu hiện. Và đến lượt mình, gen B biểu hiện làm gen C biểu hiện và gen B biểu hiện giảm... Tế bào biệt hóa

giai đoạn cuối cùng có nhóm gen cần cho quá trình sống (*nestin* và *Pdx-1*) và nhóm gen thực hiện chức năng (*Nkx 2.2*, *Nkx 6.1*, *Glut-2* và *insulin*) biểu hiện; trong khi đó, các gen trung gian khác (*Ngn3*, *Isl-1*, *Pax4*) không biểu hiện. Sự biểu hiện của *Pax6* chưa tìm được cách giải thích.

Quá trình chuyển biệt hóa: khác với sự biến đổi trong quá trình biểu hiện các gen chức năng trong quá trình biệt hóa; sự biểu hiện của chúng trong quá trình chuyển biệt hóa chỉ theo một xu hướng: dưới tác dụng của chất cảm ứng, chúng sẽ biểu hiện và tiếp tục biểu hiện đến khi tế bào biệt hóa hoàn toàn (Bảng 1). Trong nghiên cứu này, chưa thấy sự không biểu hiện của bất kì gen nào trong 10 gen khảo sát khi tế bào đã biểu hiện gen insulin. Bên cạnh những nhóm gen biểu hiện trong tế bào beta thì trong tế bào tiết insulin tạo ra bởi sự chuyển biệt hóa còn biểu hiện 3 gen khác là *Isl-1*, *Ngn3* và *Pax4*.

Bảng 1. Tóm tắt kết quả xác định biểu hiện gen trong quá trình biệt hóa và chuyển biệt hóa của tế bào gốc thành tế bào tiết insulin.

Marker	Biệt hóa			Chuyển biệt hóa				
	Giai đoạn sớm	Tế bào cơ chất	Tế bào chuyển dạng	Tế bào beta	Chưa biệt hóa	GD1	GD2	GD3
<i>Nestin</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pdx-1</i>	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Ngn3</i>	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Isl-1</i>	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Pax6</i>	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Pax4</i>	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Nkx 2.2</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Nkx 6.1</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Glut 2</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Insulin</i>	-	-	-	+	-	-	-	+

Theo Soria (2001).

Giả thuyết cho sự thay đổi biểu hiện gen ảnh hưởng đến chức năng của tế bào tiết insulin sau khi biệt hóa

Sự khác nhau về biểu hiện gen trong suốt quá trình biệt hóa thành tế bào tiết insulin từ tế bào gốc nội mô và tế bào gốc trung mô cho thấy sự khác biệt trong chức năng của tế bào tiết insulin được tạo ra theo hai cách này. Có lẽ chính vì điều này mà nhiều tác giả gọi tế bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô là

tế bào tiết insulin, mà không gọi là tế bào beta.

Giả thiết sau đây cho sự khác nhau trong sự biểu hiện gen ảnh hưởng đến chức năng của tế bào tiết insulin:

Pax4, *Ngn3*, *Isl-1* là những gen biểu hiện trong các tế bào giai đoạn sớm của quá trình phát triển tụy *in vivo* và được cho là các gen biểu hiện trong tế bào gốc tụy. Tất cả chúng đều không biểu hiện trong các tế bào tụy trưởng thành. Các cụm tế bào giống tụy

đào được tạo ra trong quá trình chuyển biệt hóa biểu hiện các gen này đồng thời biểu hiện các gen như *Glut-2*, *insulin*. Sự biểu hiện cùng lúc này sẽ gây nên sự tương tác lẫn nhau giữa các sản phẩm gen, gây mất chức năng của sản phẩm (gây hiệu quả điều trị thấp); hay khiến tế bào đi vào quá trình chết theo chương trình (apoptosis) vì rối loạn trong quá trình biểu hiện gen (gây hiệu quả điều trị ngắn).

Theo chúng tôi, một giả thuyết khác cũng có thể là: các tế bào được biệt hóa từ quy trình này là các tế bào tiết insulin chưa trưởng thành. Các tế bào được cho là chưa trưởng thành vì còn biểu hiện các gen của giai đoạn sớm của quá trình biệt hóa tế bào beta. Cũng vì lý do đó mà việc cấy ghép các cụm tế bào giống tụy đảo từ quy trình biệt hóa này có thể cho hiệu quả không cao.

Tuy nhiên, những kết quả trên đây không thể đại diện cho tất cả các quá trình chuyển biệt hóa; thậm chí cũng không thể nói rằng quá trình biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào nội mô - tế bào tiết insulin là quá trình có một số bất thường trong sự biểu hiện. Bởi lẽ những khác biệt trong quá trình biệt hóa và chuyển biệt hóa được phân tích trên đây là dựa vào kết quả biệt hóa theo quy trình của Gao và đồng tác giả (2008a; b) (là quy trình hầu hết các thí nghiệm sử dụng) và kết quả tổng hợp của Soria (Soria, 2001) về quá trình biểu hiện các gen trong quá trình biệt hóa từ tế bào nội mô thành tế bào beta. Do đó, một khả năng có thể là quy trình cảm ứng, chất cảm ứng Gao và đồng tác giả (2008; b) sử dụng có thể tạo ra tế bào tiết insulin nhưng biểu hiện một số sai sót chứ không phải là do quá trình chuyển biệt hóa là mang sai sót. Nghĩa là có thể có một số quy trình biệt hóa khác sẽ không mang các sai sót này. Tuy vậy, đến nay vẫn chưa có các nghiên cứu tương tự nghiên cứu này để khảo sát sự biến đổi biểu hiện gen chuyên biệt trong các quy trình chuyển biệt hóa khác.

KẾT LUẬN

Các tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người biểu hiện *CD90 (Thy1)*, *SCF*, *ABCG2* và không biểu hiện *CD34*, *c-kit*, và *CD45*. Chúng có khả năng biệt hóa thành tế bào thuộc trung mô như xương, mỡ; và chuyển biệt hóa thành tế bào của nội mô như tế bào thần kinh và tế bào tiết insulin.

Quá trình biểu hiện gen của tế bào gốc trung mô chuyển biệt hóa xảy ra như sau: (1) giai đoạn chưa biệt hóa: biểu hiện hai gen *nestin* và *Isl-1*; (2) giai

đoạn biệt hóa bước 1: biểu hiện hai gen *Pdx-1* và *Ngn3*; (3) giai đoạn biệt hóa bước 2: biểu hiện hai gen *Pax 6* và *Pax 4*; (4) giai đoạn biệt hóa bước 3: biểu hiện các gen *Nkx2.2*; *Nkx6.1*; *Glut-2*, *Insulin*.

Quá trình chuyển biệt hóa của tế bào gốc trung mô máu cuống rốn người thành tế bào tiết insulin có một số điểm khác biệt với quá trình biệt hóa từ tế bào gốc/tiền thân tụy. Đó là: (1) thứ tự biểu hiện các gen trong các giai đoạn biệt hóa khác nhau; (2) kết quả biệt hóa cuối cùng ở kiểu hình tiết insulin, cụm tế bào giống tụy đảo vẫn biểu hiện 3 gen: *Pax4*, *Ngn3* và *Isl-1* bên cạnh các gen *Nkx2.2*; *Nkx6.1*; *Glut-2* và *Insulin*.

Quá trình biệt hóa của tế bào gốc trong cơ thể tế bào nội mô là quá trình tinh tế, nhịp điệu, được điều hòa một cách chặt chẽ giữa các gen. Trong khi đó, quá trình chuyển biệt hóa từ tế bào trung mô là quá trình cứng nhắc theo một xu hướng từ không biểu hiện đến có biểu hiện.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bệnh viện Phụ sản Hùng Vương, thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp mẫu máu cuống rốn người và TS. Lê Thị Hào, Đại học Bang Ohio (Ohio State University) đã cung cấp tất cả các primer cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang C, Niu D, Zhou H, Zhang Y, Li F, Gong F (2008a) Mesenchymal stromal cells improve hyperglycemia and insufficient insulin upon diabetic pancreatic microenvironment in pigs. *Cytotherapy* 10(8): 796-805.
- Chang C, Wang X, Niu D, Zhang Z, Zhao H, Gong F (2008b) Mesenchymal Stem Cells Adopt beta-Cell Fate Upon Diabetic Pancreatic Microenvironment. *Pancreas* 38(3): 275-281.
- Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH (2008) Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type I diabetes. *PLoS One* 3(1):e1451.
- Chen LB, Jiang XB, Yang L (2004) Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 10(20): 3016-3020.
- Cintia S de Paiva, Zhuo Chen, Rosa M Corrales, Stephen C Pflugfelder, De-Quan Li (2005) ABCG2 Transporter Identifies a Population of Clonogenic Human Limbal Epithelial Cells. *Stem Cells* 23: 63-73.
- Dong-Qi Tang, Li-Zhen Cao, Brant R Burkhardt, Chang-Qi Xia, Sally A Litherland, Mark A Atkinson, Li-Jun Yang

- (2004) *In vivo* and *in vitro* Characterization of Insulin-Producing Cells Obtained From Murine Bone Marrow. *Diabetes* 53(7): 1721-1732.
- Ende N, Chen R, Reddi AS (2004b) Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 665-669.
- Ende N, Chen R, Reddi AS (2004a) Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 321(1): 168-171.
- Gao F, Wu DQ, Hu YH, Jin GX (2008a) Extracellular matrix gel is necessary for *in vitro* cultivation of insulin producing cells from human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)* 5; 121(9): 811-888.
- Gao F, Wu DQ, Hu YH, Jin GX, Li GD, Sun TW, Li FJ (2008b) *In vitro* cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl Res* 151(6): 293-302.
- Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exists in multiple species. *Nat Med* 3(12): 1337-1345.
- Hisanaga E, Park KY, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T, Mori M, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I (2008) A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin-delta4. *Endocr J* 55(3): 535-543.
- Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK (2005) Differentiation of Insulin-Producing Cells from Human Neural Progenitor Cells. *PLoS Med* 2(4): e103.
- Ichiro Sekiya, Jussi T Vuoristo, Benjamin L Larson, Darwin J Prockop (2002) *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4397-4402.
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P (2000) Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49(2): 163-176.
- Jose Marcos Garcia-Pacheco, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG (2001) Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7(12): 1151-1157.
- Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M (2006) *In vitro* cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340(2): 639-647.
- Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S (2007) Generation of Insulin-producing Cells From Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells By Genetic Manipulation. *Stem Cells* 25(11): 2837-2844.
- Koç O N and Lazarus H M (2001) Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 27(3): 235-239.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103(5): 1669-1675.
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46): 17438-17443.
- Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H, Liu Q, Liu D, Chen L, Pei X (2007) Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 211(1): 36-44.
- Limbirt C, Páth G, Jakob F, Seufert J (2008) Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 79(3): 389-399.
- Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2004) Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Tissue Eng* 10(1-2): 81-92.
- Miszta-Lane H, Mirbolooki M, James Shapiro AM, Lakey JR (2006) Stem cell sources for clinical islet transplantation in type 1 diabetes: embryonic and adult stem cells. *Med Hypotheses* 67(4): 909-913.
- Nagai A, Kim WK, Lee HJ, Jeong HS, Kim KS, Hong SH, Park IH, Kim SU (2007) Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. *PLoS One* 2(12): e1272.
- Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE (2004) Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type 1 diabetes. *Lab Invest* 84(5): 607-617.
- Otonkoski T and Lundin K (2005) Stem cells in the treatment of diabetes. *Ann Med* 37(7): 513-520.
- Pessina A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L (2004) Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323(1): 315-322.
- Rachadi L, El Ghazi L, Bernex F, Panthier JJ, Czernichow

P, Scharfmann R (2001) Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature beta-cells and in the pancreas in development. *Diabetes* 50(9): 515-520.

Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ (2002) *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4397-4402.

Soria B (2001) *In vitro* differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 68(4-5): 205-219.

Sosa-Pineda B (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 385: 399-402.

St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997) Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387(6631): 406-409.

Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, Tang KX, Wang B, Song J, Li H, Wang KX (2007) Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 120(9): 771-776.

Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ (2004) *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53(7): 1721-1732.

Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341(4): 1135-1340.

Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, Cui D, Zhang M, Xu Y, Liu C (2007) Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of isletlike cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 13(24): 3342-3349.

Yuichi Hori, Xueying Gu, Xiaodong Xie, Seung K. Kim (2005) Differentiation of Insulin-Producing Cells from Human Neural Progenitor Cells. *PLoS Med* 2(4): e103.

Zulewski H (2008) Differentiation of embryonic and adult stem cells into insulin producing cells. *Panminerva Med* 50(1): 73-79.

INVESTIGATING MODULATION OF SPECIFIC GENE EXPRESSION IN *IN VITRO* DIFFERENTIATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL INTO INSULIN SECRETING CELL

Pham Van Phuc^{1,*}, Truong Hai Nhung¹, Dang Hoang Lam¹, Phan Kim Ngoc¹, Phan Toan Thang²

¹University of Science, Ho Chi Minh city

²National University of Singapore

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that may serve as a source of cells for generation of surrogate β cell which can apply to treat diabetes. However, effect of diabetic treatment by stem cell transplantation remains low, especially by mesenchymal stem cell transplantation. It is supposed that there are some errors in transdifferentiation process from mesenchymal stem cells into insulin secreting cells. This work investigated expression of ten genes in the gene profile related with differentiation process from pancreatic stem cells into beta cells. Mesenchymal stem cells are derived from human umbilical cord blood. They are cultured and differentiated into osteogenic and adipogenic to examine their differential capacity. Then they are transdifferentiated into insulin secreting cells by three steps protocol: the first, treating in H-DMEM medium supplement with FBS and retinoic acid; the second, treating in L-DMEM supplement with FBS, nicotinamide and EGF; the last, treating in L-DMEM supplement FBS and exendin-4. In each step of this protocol, differentiated cells are investigated via examination of expression of ten genes by RT-PCR method. The gene profile of transdifferentiated cells are compared to that of beta cells *in vivo*. The results showed that mesenchymal stem cells expressed two genes: nestin, Isl-1 when they were not induced. After inducing with some chemicals, insulin secreting cells expressed 10 genes: nestin, Isl-1, Pdx-1, Ngn3, Pax6, Pax4, Nkx2.2, Nkx6.1, Glut-2, Insulin; while beta cells express nestin 7 genes: Nestin, Pdx-1, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax6, Glut-2 and Insulin. Difference in specific gene expression modulation was identified between *in vitro* trans-

* Author for correspondence: Tel: 84-8-38397719; Fax: 84-8-38967365; E-mail: pvphuc@hcmuns.edu.vn

differentiation and *in vivo* differentiation. That means islets derived from *in vitro* trans-differentiation were not fully identical to islets derived from *in vivo* differentiation.

Keywords: *Beta cells, insulin secreting cells, stem cells, trans-differentiation, umbilical cord blood*