

THU NHẬN VÀ BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÁU CUỐNG RÓN NGƯỜI

Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trần Lê Bảo Hà
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

1. MỞ ĐẦU

Tế bào gốc (stem cell) nói chung và tế bào gốc trung mô nói riêng, hiện đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm vì khả năng đặc biệt và duy nhất của chúng. Đó là khả năng tự làm mới (self renewal) trong một thời gian dài và biệt hoá thành nhiều kiểu tế bào khác nhau trong cơ thể như xương, sụn, mỡ, tế bào thần kinh... [1]. Do đó, chúng có tiềm năng to lớn trong việc cấy ghép để điều trị bệnh (đặc biệt là các bệnh do sự suy thoái tế bào) và trong công nghệ mô (Tissue engineering).

Các giá trị ứng dụng to lớn của tế bào gốc trong y học đã mở ra hướng trị liệu mới: Y học phục hồi (Regenerative medicine) thông qua Liệu pháp tế bào gốc (Stem cell therapy).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu nhận máu cuống rốn

Máu cuống rốn được thu nhận từ các sản phụ đã được xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV... ở Bệnh viện Hùng Vương Thành phố Hồ Chí Minh.

Sau khi thai nhi vừa được sinh ra, tiến hành kẹp phần cuống rốn gần bụng và cắt trên vị trí kẹp 1 cm. Dùng kim tiêm của túi thu máu (có chứa sẵn chất chống đông máu) đưa vào cuống rốn ở vị trí gần nhau thai. Máu cuống rốn sẽ theo kim và ống dẫn chảy vào túi thu máu. Khi máu hết chảy, rút kim ra và mang túi chứa máu về phòng thí nghiệm (được bảo quản lạnh trong đá gel). Thời gian từ khi thu nhận máu đến khi thao tác trong vòng 2 giờ.

2.2. Giai đoạn 1, nuôi cấy sơ cấp tế bào của máu cuống rốn: chọn lọc MSC

Về nguyên tắc, máu trong cuống rốn luôn chứa ba loại tế bào chính: tế bào gốc tạo máu (Hemopoietic Stem Cell_HSC), tế bào máu trưởng thành và MSC. Các MSC và tế bào gốc tạo máu thuộc quần thể các tế bào đơn nhân. Tiến hành thu nhận quần thể tế bào đơn nhân bằng phương pháp li tâm trên gradient nồng độ Ficoll-paque (*Sigma*) ở tốc độ 2.500 vòng/phút, trong 5 phút. Sau đó, thu nhận phân đoạn chứa các tế bào đơn nhân nằm giữa lớp Ficoll-paque và lớp huyết tương bên trên. Trong quá trình li tâm, các tế bào đã biệt hóa với kích thước lớn hơn sẽ đi xuyên qua lớp Ficoll và lắng ở đáy ống li tâm. Các tế bào hồng cầu không nhân nhẹ, nằm trong lớp huyết tương bên trên. Và các tế bào đơn nhân với kích thước trung bình luôn nằm ở lớp giữa.

MSC sẽ được tách khỏi tế bào gốc tạo máu trong quần thể tế bào đơn nhân bằng phương pháp nuôi cấy. Trong nuôi cấy, các MSC sẽ bám dính vào bề mặt (giá thể) nuôi cấy, trong khi đó tế bào gốc tạo máu không có khả năng này.

Tế bào đơn nhân sau khi thu nhận được huyền phù trong môi trường nuôi cấy IMDM, 10% FBS, nuôi trong bình nuôi cấy (Nunc, 25 cm²) sao cho đạt mật độ 3.10⁵ tế bào/cm² ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau 48 giờ, các MSC bắt đầu bám trên bề mặt đáy của bình nuôi, thay môi trường để loại bỏ hết các tế bào không bám (các tế bào chết và tế bào gốc tạo máu), tiếp tục nuôi cho đến khi tế bào mọc đạt tỷ lệ 70-80% bề mặt đáy bình nuôi, với chế độ thay môi trường là 7 ngày/lần.

2.3. Giai đoạn 2, nuôi cấy thứ cấp: cấy chuyển tăng sinh MSC

Khi mật độ MSC trong bình nuôi tăng, đạt khoảng 70-80% tỷ lệ diện tích đáy bình, tiến hành cấy chuyển nhằm cung cấp không gian và chất dinh dưỡng cho MSC.

Quy trình được tiến hành như sau: loại bỏ môi trường cũ và rửa tế bào với 4-5 ml PBSA có bổ sung gentamycin (10 µg/ml) hai lần. Tiếp tục loại bỏ dịch rửa và bổ sung 4-5 ml

trypsin/EDTA 0,05%. Sau 15 giây, tiến hành đổ bỏ dung dịch enzyme nhưng vẫn giữ lại khoảng 1 ml và tiếp tục ủ trong tủ ấm 37°C, từ 2-3 phút. Sau đó, lắc nhẹ bình nuôi cấy để tách tế bào ra khỏi bề mặt đáy. Khi tế bào co tròn và tách ra khỏi bề mặt bình nuôi, phải trung hòa trypsin thừa bằng 10-11 ml môi trường IMDM 10% FBS. Huyền phù tế bào đó được chia đều cho 3 bình nuôi mới.

2.4. Biệt hoá MSC

Các MSC được thu nhận theo phương pháp trên, sau khi cấy chuyển từ 5-7 lần, tiến hành kiểm tra độ tinh sạch, tạo nồng độ thích hợp để cuối cùng sử dụng cho biệt hóa *in vitro*.

2.4.1. Biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ (adipocyte)

Để biệt hóa thành tế bào tạo mỡ, các MSC có nồng độ chuẩn được nuôi trong môi trường IMDM 10% FBS có bổ sung 1 µM dexamethasone, 200 µM indomethacin, 1,7 µM insuline, 500 µM isobutyl-methylxanthine (IBMX) (*Sigma*). Trong đó, dexamethasone là một glucocorticoid steroid có tác dụng cảm ứng cho sự biệt hóa và các yếu tố bổ sung còn lại sẽ kích thích sự biệt hóa. Insuline 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 [10;11]. IBMX là chất ức chế phosphodiesterase làm khóa sự chuyển cAMP thành 5'AMP [8]. Điều này gây nên sự điều hòa dương tính hormone nhạy cảm lipase (HSL). HSL sẽ chuyển triacyl glyceride thành glycerol và acid béo tự do, đây chính là quá trình tạo mỡ [8]. 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 [8;13].

Sự biệt hóa được ghi nhận khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại X20, X40 thấy có sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ. Các tế bào tạo mỡ còn được xác định dựa vào phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (Merck). Oil red là thuốc nhuộm lipid, nó chỉ hòa tan trong lipid và tạo màu đỏ.

2.4.2. Biệt hoá MSC thành nguyên bào xương (Osteoblast)

Các MSC có nồng độ chuẩn được nuôi trong môi trường IMDM 10% FBS có bổ sung 100 nM dexamethasone, 50 µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) và 100 mM β-glycerolphosphate (*Sigma*). Dexamethasone có khả năng hoặc kích thích hoặc ức chế sự biệt hóa thành xương phụ thuộc vào nồng độ của nó. Nồng độ cao của dexamethasone sẽ cảm ứng biệt hóa thành mỡ, trong khi đó, với nồng độ thấp hơn, chất này sẽ kích thích MSC biệt hóa thành xương [2]. AsAP làm dễ dàng quá trình biệt hóa thành xương, bao gồm kích thích sự tổng hợp collagen, ngoài ra nó còn có tác động tăng sinh tế bào [5;6;9]. Cuối cùng, β-glycerolphosphate là yếu tố quan trọng kích thích sự hình thành chất nền được khoáng hóa khi kết hợp với dexamethasone và AsAP [9].

Sau 7-14 ngày nuôi cấy, sự biệt hoá được đánh giá thông qua khả năng tích tụ của calcium trong chất nền nhờ phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red (*Sigma*).

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

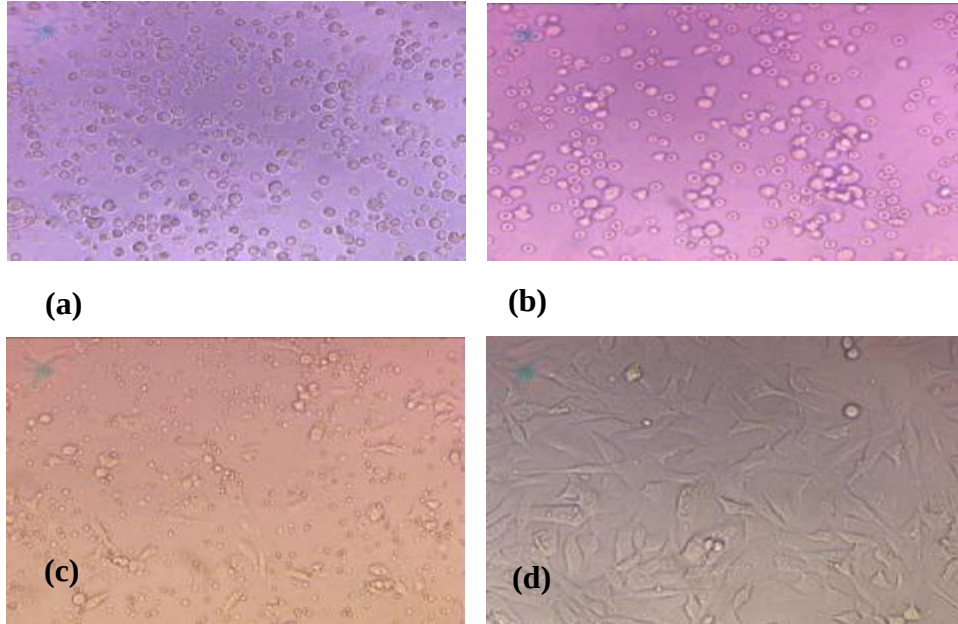
3.1. Giai đoạn 1, nuôi cấy sơ cấp tế bào của máu cuống rốn: chọn lọc MSC

Sau 48 giờ nuôi cấy ở giai đoạn 1, MSC có hiện tượng bám trên bề mặt đáy bình nuôi, trong khi các tế bào tạo máu, tế bào chết vẫn trôi lơ lửng trong dịch huyền phù tế bào.

Sau 72 giờ nuôi cấy, loại bỏ môi trường cũ và thay môi trường mới, nhằm cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của MSC. Khi thay môi trường, đồng thời loại bỏ được những tế bào chết cũng như các tế bào tạo máu còn lơ lửng trong môi trường cũ. Với lần thay môi trường đầu tiên, không tiến hành rửa tế bào vì khả năng bám dính của MSC vào bề mặt đáy bình nuôi vẫn còn yếu.

Sau 4 ngày nuôi cấy, khi các MSC đã bám khá nhiều trên bề mặt đáy bình Roux tạo các colony, chúng có hình dạng đặc trưng, thường là hình thoi, giống nguyên bào sợi.

Sau 5 ngày nuôi cấy, MSC hợp dòng (confluence), bám đều và trải rộng trên bề mặt đáy bình Roux. Khi mật độ MSC tăng, đạt tỷ lệ 70% - 80% diện tích bình nuôi, tiến hành cấy chuyển nhằm cung cấp không gian sống và chất dinh dưỡng cho MSC.



Hình 1. Kết quả nuôi cấy chọn lọc MSC (x20)

(a) MSC vừa mới được thu nhận; (b) Sau 24 giờ nuôi cấy, các MSC bắt đầu bám dính vào bề mặt đáy bình nuôi; (c) Sau 72 giờ nuôi cấy, các MSC bắt đầu trải dài hình dạng và tăng sinh; (d) Sau 7 ngày nuôi cấy, hầu hết các MSC có dạng hình thoi đặc trưng.

3.2. Giai đoạn 2, nuôi cấy thứ cấp: cấy chuyển tăng sinh MSC

Khi vừa được cấy chuyển ở giai đoạn 2, MSC chưa có hình dạng đặc trưng và trôi lơ lửng trong môi trường, giống như khi vừa được thu nhận từ tuỷ xương ở giai đoạn 1.

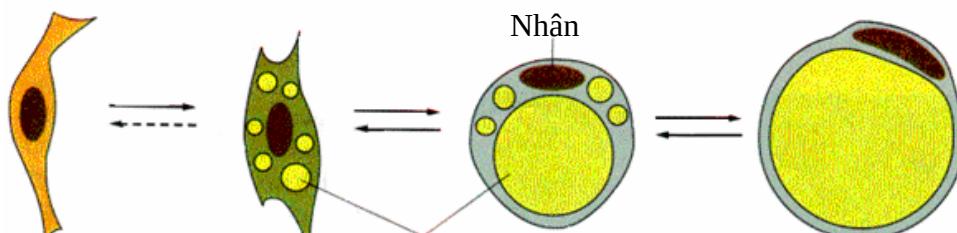
Sau 48 giờ nuôi cấy, MSC bắt đầu bám dính và trải rộng. Sau 72 giờ, MSC đã trải rộng, có dạng hình thoi đặc trưng và tiếp tục tăng sinh. Tuy nhiên, khả năng tăng sinh của tế bào vẫn còn chậm. Sau 120 giờ, MSC hợp dòng và trải đều trên bề mặt bình nuôi.

3.3. Biệt hoá MSC

3.3.1. Biệt hoá MSC thành tế bào tạo mỡ

Sau 48 giờ nuôi cấy, các tế bào bắt đầu tích tụ các giọt mỡ trong tế bào chất. Các giọt mỡ nhỏ góp lại dần thành các giọt lớn. Đến lượt mình, các giọt mỡ lớn sau đó sẽ góp lại thành giọt mỡ lớn hơn, chúng chiếm gần hết thể tích của tế bào và ép nhân tế bào ra phía ngoài, sát với màng. Vì thế, chúng từ dạng dài, trải rộng chuyển sang dạng bầu dục và cuối cùng là hình khối tròn. Các tế bào tạo mỡ với hình dạng khối tròn bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi tiến hành cảm ứng biệt hóa.

Sự xuất hiện các giọt mỡ có thể được quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 hay 400 lần. Dưới kính hiển vi, các giọt mỡ tròn phản chiếu ánh sáng. Khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red, chúng luôn bắt màu đỏ.

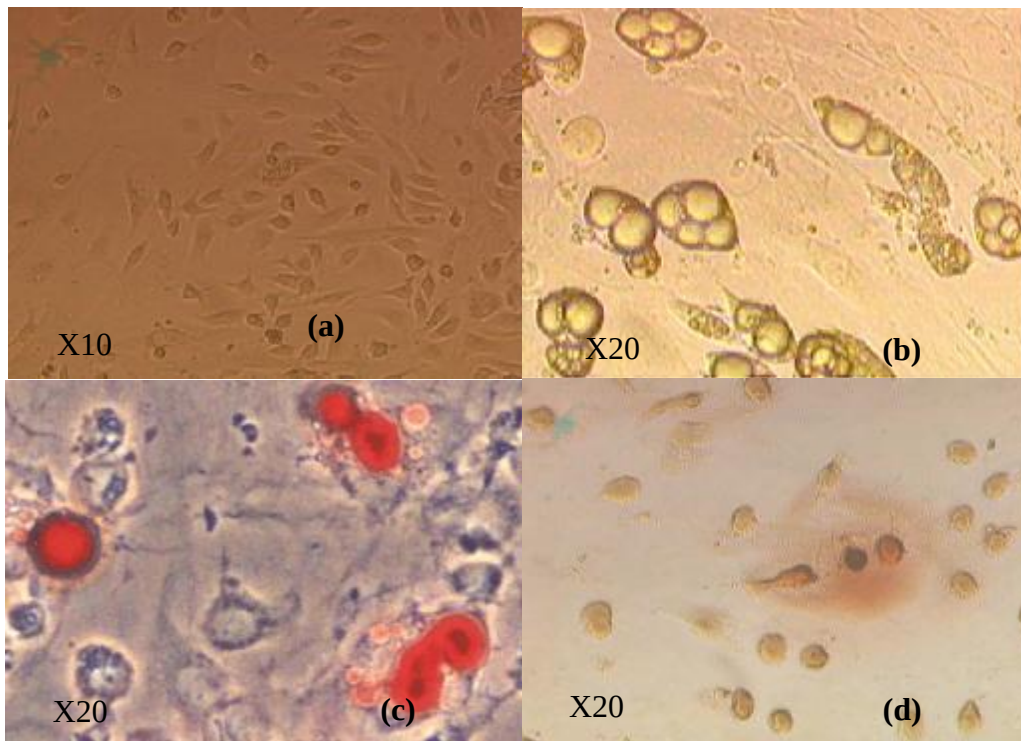


Hình 2. Quá trình biệt hóa từ MSC thành tế bào tạo mỡ

3.3.2. Biệt hoá MSC thành nguyên bào xương

Sau khi nuôi trong môi trường biệt hóa, sau 7 ngày, các tế bào bắt đầu chuyển từ dạng dài sang dạng tròn và cuối cùng là hình hạt đậu. Đó là hình dạng đặc trưng của nguyên bào xương (osteoblast). Khi được cảm ứng biệt hóa, hầu như tất cả các tế bào đều ngừng phân chia. Đây cũng là một dấu hiệu cho thấy tế bào gốc đã biệt hóa thành tế bào chức năng. Điều này tương tự với trường hợp khi cảm ứng biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ.

Khi nhuộm với Alizarin red, các tế bào tròn hay hình hạt đậu bắt màu đỏ cam. Màu đỏ cam là phức hợp của thuốc nhuộm với ion calcium hiện diện trong tế bào chất (tính chất đặc trưng của nguyên bào xương). Điều này chứng tỏ các MSC đã chuyển sang dạng nguyên bào xương với sự lắng tụ muối calcium trong tế bào chất.



Hình 3. Kết quả biệt hoá MSC

(a) Các MSC ở lô đối chứng, không bổ sung chất cảm ứng biệt hóa. (b) Các tế bào tạo mỡ: sau 7-14 ngày trong môi trường biệt hoá tạo mỡ, các tế bào bắt đầu tích tụ các giọt mỡ; (c) Các giọt mỡ bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red; (d) Các tế bào tạo xương: sau 7-14 ngày trong môi trường biệt hóa tạo xương, các tế bào bắt đầu tròn lại và tích tụ calcium trong chất nền. Sự tích tụ calcium được xác định bằng cách nhuộm với Alizarin Red.

4.KẾT LUẬN

Thu nhận và nuôi cấy thành công tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người.

Biệt hóa thành công các tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người thành tế bào tạo mỡ, nguyên bào xương, khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung một số nhân tố cảm ứng biệt hoá thích hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Alhadlaq, A., and Mao, J. J. *Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics*. Stem Cells Dev. 13, 436–448 (2004).

[2] Bruder, S. P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S. E. *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, (1997).

[3] Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea• pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet. 3, 393–403 (1970).

[4] Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp. Hematol. 4, 267–274 (1976).

[5] Graves, S. E., Francis, M. J. O., Gundle, R., and Beresoford, J. N.. *Primary culture of human trabecular bone: Effects of L• ascorate• 2• phosphate*. Bone 15, 132–133 (1994).

[6] Graves, S. E., Gundle, R., Francis, M. J. O., and Beresoford, J. N. *Ascorbate increases collagen synthesis and promote differentiation in human bone derived cell cultures*. Bone 15, 133 (1994).

[7] Gregory, C. A., Prockop, D. J., and Spees, J. L.. *Non• hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation*. Exp. Cell Res. 306, 330–335 (2005).

[8] Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Bruder, S. P. *Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J. Cell. Biochem. 64, 295–312 (1997).

[9] Janderova, L., McNeil, M., Murrell, A. N., Mynatt, R. L., and Smith, S. R. *Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis*. Obes. Res. 11, 65–74 (2003).

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

[11] Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. *Molecular regulation of adipogenesis*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16, 145–171 (2000).