

## THU NHẬN TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ (MESENCHYMAL STEM CELL) NGƯỜI TỪ MÁU CUỐNG RỒN

Dương Thị Bạch Tuyết <sup>(i)</sup>, Phạm Văn Phúc <sup>(ii)</sup>

Trần Thanh Đây <sup>(iii)</sup>

### 1. Mở đầu

Hiện nay tế bào gốc trung mô (MSC) được ứng dụng nhiều trong y học: cấy ghép tự thân, công nghệ mô... đem lại hiệu quả cấy ghép cao. Nhưng nguồn cung cấp MSC gặp nhiều khó khăn, đặc biệt là MSC thu nhận từ bào thai gây nhiều tranh cãi từ cộng đồng.

Máu cuống rốn – một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh sản, nay được biết là nguồn cung cấp tế bào gốc trung mô lý tưởng bởi có nhiều ưu điểm: không gây tranh cãi từ cộng đồng, nguồn cung cấp dồi dào, sự biểu hiện kháng nguyên tương hợp mô của MSC từ máu cuống rốn thấp, tiềm năng biệt hoá cao...

Hiện nay, người ta đã thu nhận và nuôi cấy MSC từ máu cuống rốn bằng phương pháp li tâm máu cuống rốn trong dung dịch Phecoll, hoặc dùng hạt bead gắn kháng thể chuyên biệt vào MSC. Nuôi cấy MSC trong môi trường IMDM hoặc D'MEM có bổ sung hai nhân tố tăng trưởng bFGF, EGF. Đây là phương pháp đất tiền.

Ở Việt Nam, nghiên cứu về máu cuống rốn còn khá mới mẻ, đặc biệt là MSC từ máu cuống rốn. Cho đến nay chưa thấy có báo cáo nào về thu nhận, nuôi cấy, ứng dụng MSC từ máu cuống rốn, có thể do quy trình phức tạp và môi trường nuôi cấy quá đắt. Hướng đến mục đích khai thác MSC từ máu cuống rốn nhằm ứng dụng trong nghiên cứu và y học, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài này.

### 2. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1 Vật liệu

– Máu cuống rốn thu nhận tại Bệnh viện Phụ sản Hùng Vương đã qua xét nghiệm âm tính với HIV, HBV và một số bệnh khác.

<sup>(i)</sup> Người hướng dẫn, TS, Khoa Sinh học, Trường ĐHSB Tp.HCM

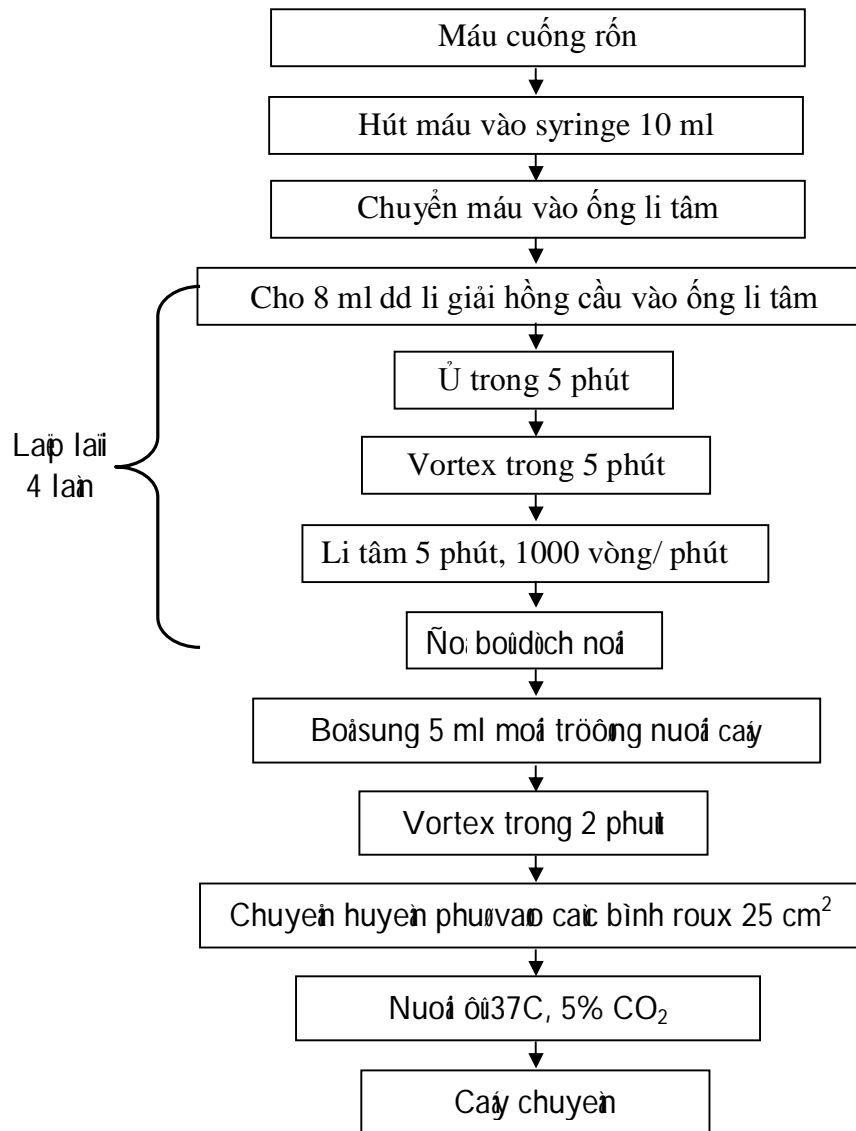
<sup>(ii)</sup> Người hướng dẫn, CN, Trường ĐHKHTN, ĐHQG Tp.HCM.

<sup>(iii)</sup> Sinh viên Khoa Sinh học, Trường ĐHSB Tp.HCM.

**2.2 Phương pháp**

**2.2.1. Thu nhận máu cuống rốn :** được thu nhận ngay khi em bé vừa sinh ra.

**2.2.2. Phương pháp thu nhận tế bào đơn nhân từ máu cuống rốn**



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ qui trình thu nhận tế bào gốc từ máu cuống rốn

**2.2.3. Nuôi cấy chọn lọc tế bào gốc từ quần thể tế bào đơn nhân**

*Tiến hành*

Để xác định môi trường phù hợp nhất, tốt nhất trong điều kiện có thể, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm nuôi cấy chọn lọc sau:

+ **Thí nghiệm 1** : Nuôi cấy trong môi trường E'MEM 10%FBS, nuôi ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>. Chúng tôi tiến hành thử nghiệm nuôi cấy với môi trường này đầu tiên vì đây là môi trường cơ bản của nuôi cấy tế bào động vật.

+ **Thí nghiệm 2** : Nuôi cấy trong môi trường D'MEM 10% FBS, nuôi ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>. Nếu nuôi cấy trên môi trường E'MEM thất bại, nghiên cứu sẽ nuôi cấy trên môi trường D'MEM 10% FBS.

+ **Thí nghiệm 3** : Nuôi cấy trong môi trường D'MEM/F12 10% FBS, nuôi ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>. D'MEM/F12 là sự kết hợp theo tỉ lệ 1:1 của môi trường D'MEM và F12 của Sato.

+ **Thí nghiệm 4** : Nuôi cấy trong môi trường D'MEM/F12 10% FBS + SFM, nuôi ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>. Môi trường D'MEM/F12 10% FBS + SFM là sự kết hợp theo tỉ lệ 1:1 của môi trường D'MEM/F12 10% FBS và SFM.

+ **Thí nghiệm 5** : Nuôi cấy trong môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM, nuôi ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>. Môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM là sự kết hợp theo tỉ lệ 1:1 giữa D'MEM/F12 10% FBS và môi trường CM.

– Huyền phù tế bào đơn cho vào bình Roux 25 cm<sup>2</sup>, đặt trong tủ nuôi 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>.

– Đánh giá kết quả: theo dõi sự tồn tại, trạng thái bám dính, thay đổi hình dạng, tăng sinh và phát triển của tế bào trong từng môi trường để xác định môi trường tối ưu cho tế bào.

*Phương pháp đánh giá trạng thái bám dính và so sánh số lượng tế bào bám dính giữa các môi trường*

– Trạng thái bám dính được đánh giá bằng khả năng cố định trên bề mặt bình Roux. Khi di chuyển bình Roux các tế bào bám này không trôi nổi theo dòng môi trường lay động.

– Để so sánh số lượng tế bào bám dính trong các môi trường khác nhau, chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào/cụm tế bào bám dính vào bề mặt nuôi trong 10 thị trường khác nhau (được chọn ngẫu nhiên) ở độ phóng đại 20X của kính hiển vi đảo ngược Olympus. Để tránh đếm lại 2 lần 1 thị trường, tiến hành đếm bắt đầu tại 1 góc của bình Roux sau đó di chuyển theo đường thẳng, đến góc bên kia, tiếp tục di chuyển xuống góc dưới, cứ thế đếm cho đủ 10 thị trường. (Có hình minh họa trong báo cáo chính).

Kết quả sau khi đếm sẽ được tính trung bình cộng. Các môi trường được khảo sát 3 lần. Khả năng bám dính của các tế bào trong các môi trường được so sánh biểu thị bằng bảng.

#### *Phương pháp đánh giá khả năng phát triển của tế bào sau khi bám*

Sau 24 giờ, tiến hành thay môi trường nuôi cấy sơ cấp, trong bình nuôi cấy còn hầu hết là các tế bào bám và một ít tế bào hồng cầu sót lại. Sau 24 -48 giờ tiếp, thay môi trường lần 2. Sau 2 lần thay môi trường, các tế bào trong bình nuôi cấy chỉ còn là các tế bào bám được.

Tế bào được gọi là phát triển sau khi bám là tế bào có khả năng trải hình dạng giống tế bào fibroblast (không còn hình cầu) (có hình minh họa trong báo cáo chính).

Để đánh giá khả năng phát triển, các tế bào có hình dạng giống fibroblast (tế bào gốc trung mô) được đếm trong 10 thị trường với phương pháp tương tự trên. Số tế bào bám được tính trung bình trong 10 lần đếm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Kết quả đánh giá trên 2 mặt: số lượng tế bào trải giữa các thí nghiệm và hiệu quả phát triển của tế bào.

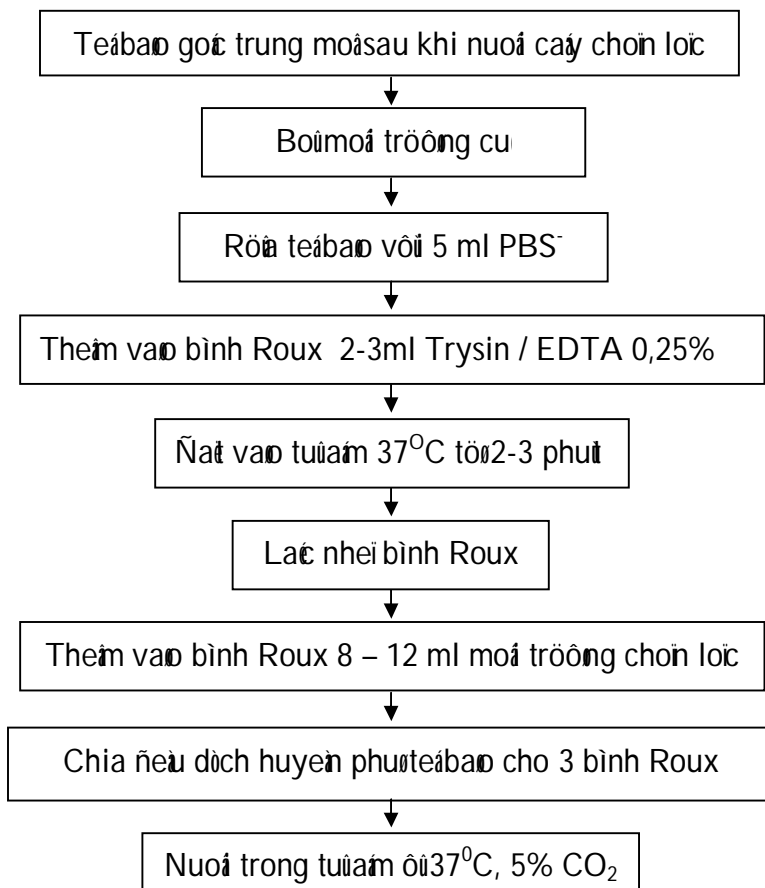
$$\text{Hiệu quả phát triển} = \text{Số tế bào phát triển} / \text{Số tế bào bám dính}.$$

#### **2.2.4. Nuôi cấy làm giàu tế bào gốc trung mô**

##### *Phương pháp đánh giá khả năng tăng sinh*

Chúng tôi xác định số lượng tế bào nuôi cấy được sau các ngày 7 ngày, 10 ngày, 13 ngày, 16 ngày, 19 ngày, 21 ngày và 24 ngày. Để làm việc này, mẫu tế

bào nuôi sơ cấp sau 24 ngày được cấy chuyển vào trong 14 giếng của đĩa 4 giếng. Lần lượt sau 7, 10, 13, 16, 19, 21, 24 ngày, tiến hành tách lấy tế bào và đếm bằng buồng đếm hồng cầu.



**Hình 2.2. Sơ đồ qui trình cấy chuyển**

### 2.2.5. Phương pháp xác định tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô khi nuôi cấy sẽ bám trên bề mặt nuôi cấy, có hình dạng giống hình dạng của nguyên bào sợi. Tuy vậy, về hình dạng, các tế bào gốc trung mô có một số điểm khác với nguyên bào sợi.

Các tế bào gốc trung mô có thân bầu hơn các nguyên bào sợi. Trong khi đó, nguyên bào sợi có hình dạng sợi dài. (Có hình minh họa trên báo cáo chính).

### 2.2.6. Xử lí số liệu

Các số liệu thu nhận được sẽ xử lí bằng Phần mềm Microsoft Excel và Phần mềm xử lí thống kê Stataphic 7.0.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1 Thu nhận máu cuống rốn

- Thể tích máu trung bình thu được trong các lần thu mẫu là: 24,57 ml.

### 3.2 Thu nhận tế bào đơn nhân

Sau mỗi lần li tâm trong dung dịch li giải hồng cầu ở tốc độ 1000 vòng/1phút trong 5 phút, dung dịch trong ống li tâm (máu cuống rốn + dung dịch li giải) sẽ nhạt màu dần. Nguyên nhân: tế bào hồng cầu vỡ ra và nổi lên trên, sẽ bị loại bỏ. Sau 4 lần li tâm liên tiếp, thu được một vệt màu trắng trải dài từ đáy lên trên miệng ống (phần nhiều ở đáy ống li tâm), đó là tế bào gốc đơn nhân.

#### 3.2.1. Kết quả thí nghiệm

Trong quá trình tiến hành các thí nghiệm, chỉ có Thí nghiệm 5 cho kết quả thích hợp để tiếp tục công việc nghiên cứu của đề tài.

#### *Thí nghiệm 5: Nuôi cấy bằng môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM*

Từ kết quả các thí nghiệm, chúng tôi tiến hành kết hợp môi trường D'MEM/F12, 10% FBS và môi trường CM, với suy nghĩ là môi trường D'MEM/F12, 10% FBS sẽ cung cấp chất dinh dưỡng cần cho sự phát triển và môi trường CM cung cấp các yếu tố tăng trưởng cần cho sự bám dính và tăng sinh. Nhiều nghiên cứu cho thấy môi trường CM chứa nhiều (1) chất cần cho sự bám dính, (2) yếu tố tăng trưởng, (3) các chất chuyển hoá thứ cấp... Với bằng chứng rằng, môi trường CM đã sử dụng thành công cho nuôi cấy các tế bào khó nuôi như tế bào gốc phôi chuột, người; sử dụng trong nghiên cứu tạo dòng để kích thích sự phát triển của chỉ một tế bào thành dòng.

- Sau 24 giờ, các tế bào bám dính rất nhiều, số tế bào bám dính trung bình trên 1 thị trường được đếm là 39,73 tế bào, cao gấp 1,70 lần so với thí nghiệm 3.

Như vậy, môi trường D'MEM/F12 10%FBS + CM kích thích sự bám dính của tế bào cao.

**Bảng 3.1. Số tế bào bám dính ghi nhận trên 10 thị trường, trong 3 lô (sau 24 giờ)**

Thò trống Lần lặp lại	Thò trống										Trung bình
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	34	20	37	71	54	20	86	23	50	22	41,7
2	34	25	50	27	30	32	18	52	26	31	32,5
3	19	22	34	40	34	39	78	98	20	12	39,6
											39,73

- Sau 72 giờ, số lượng tế bào phát triển của một thị trường được ghi nhận khá nhiều (trung bình là 35,8 tế bào, cao gấp 1,52 lần so với thí nghiệm 3 trên môi trường D'MEM/F12 10%FBS).

**Bảng 3.2. Số tế bào phát triển ghi nhận trên 10 thị trường, trong 3 lô (sau 72 giờ)**

Thò trống Lần lặp lại	Thò trống										Trung bình
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	30	31	18	24	56	54	15	34	45	20	32,7
2	44	35	10	23	10	42	24	37	29	31	28,5
3	29	21	24	47	24	49	88	88	10	82	46,2
											35,8

- Sau 10 ngày, 13 ngày, 16 ngày..., số lượng tế bào trong một thị trường có thể đến trên 100 tế bào, nên chúng tôi chuyển sang phương pháp xác định số lượng bằng buồng đếm. Kết quả được giải thích tại mục 3.3.

Như vậy, sự kết hợp giữa môi trường D'MEM/F12, 10% FBS và CM tạo ra một môi trường mới, với khả năng tăng cường sự bám dính, kích thích sự phát triển, đẩy mạnh sự tăng sinh của tế bào gốc trung mô máu cuống rốn.

**3.2.2. So sánh kết quả giữa các thí nghiệm**

**Bảng 3.3. Tổng kết khả năng sống và bám dính của tế bào nuôi sơ cấp**

Môi trường	Trạng thái tế bào		
	Bám *	Phát triển **	Tăng trưởng ***
E'MEM 10% FBS	-	-	-
D'MEM 10% FBS	+	-	-
D'MEM/F12 10% FBS	++	++	+
D'MEM/F12 10% FBS + SFM	-	-	-
D'MEM/F12 10% FBS + CM	+++	+++	+++

**Khả năng bám dính**

Sau 24 giờ cho thấy: các tế bào trong môi trường DMEM/F12 10% FBS + CM bắt đầu bám dính vào bề mặt nuôi cấy với số lượng lớn. Trong khi đó, trong môi trường D'MEM 10% FBS, D'MEM/F12 10% FBS số lượng tế bào bám ít, tế bào trong môi trường E'MEM 10% FBS, DMEM/F12 10%FBS + SFM gần như không có tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi. Như vậy, các môi trường khảo sát trong giới hạn của đề tài, môi trường DMEM/F12 10% FBS + CM tạo điều kiện tốt nhất cho sự bám dính của tế bào.

**Bảng 3.4. Khả năng bám dính của tế bào trong các môi trường nuôi cấy (sau 24 giờ)**

Môi trường	E'MEM	D'MEM	D'MEM/F12	D'MEM/F12 + SFM	D'MEM/F12 + CM
Số lượng tế bào trung bình trong một thò trường	0	2,0	22,3	0	39,73

**Khả năng phát triển**

Sau 72 giờ cho thấy: các tế bào trong môi trường D'MEM/F12 10%FBS + CM phát triển với số lượng lớn, có hình dạng đặc trưng. Trong môi trường D'MEM/F12 10%FBS, tế bào phát triển khá nhiều. Ba môi trường còn lại (E'MEM 10% FBS, D'MEM 10% FBS, D'MEM/F12 10% FBS + SFM) không thấy có tế bào phát triển. Như vậy, các môi trường khảo sát trong giới hạn của đề



tài, môi trường D'MEM/F12 10%FBS + CM tạo điều kiện tốt nhất cho sự phát triển của tế bào.

**Bảng 3.5. Khả năng phát triển của tế bào trong các môi trường nuôi cấy (sau 72 giờ)**

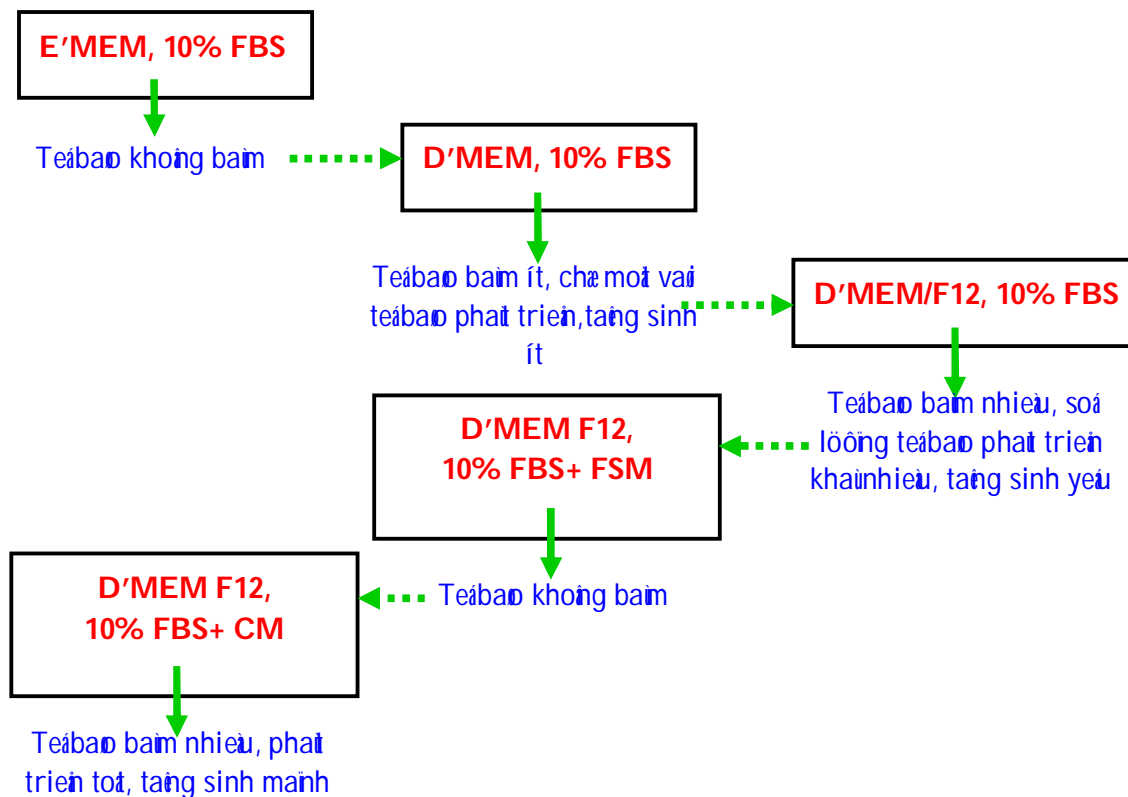
Môi trường	E'MEM	D'MEM	D'MEM/F12	D'MEM/F12 + SFM	D'MEM/F12 + CM
Số lượng tế bào trung bình trong một thò trường	0	0	23,6	0	35,8

**Khả năng tăng trưởng**

Sau 7 ngày nuôi cấy sơ cấp cho thấy: Các tế bào trong môi trường D'MEM/F12 10%FBS có tăng trưởng nhưng chậm. Trong khi đó, trong môi trường E'MEM 10% FBS, D'MEM 10% FBS, D'MEM/F12 10% FBS + SFM tế bào không tăng trưởng. Chỉ trong môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM số lượng tế bào tăng trưởng mạnh. Như vậy, các môi trường khảo sát trong giới hạn của đề tài, môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM tạo điều kiện tốt nhất cho sự tăng trưởng tế bào.

**Bảng 3.6. Khả năng tăng trưởng của tế bào trong các môi trường nuôi cấy (sau 7 ngày)**

Môi trường	E'MEM	D'MEM	D'MEM/F12	D'MEM/F12 + SFM	D'MEM/F12 + CM
Số lượng tế bào trung bình trong một thò trường	0	0,73	19,1	0	> 100 tế bào/ thò trường



Hình 3.1. Sơ đồ tổng kết kết quả nuôi cấy chọn lọc trong các loại môi trường

### 3.3 Cấy chuyền và tăng sinh

Các mẫu nuôi cấy sơ cấp được trong môi trường D'MEM/F12, 10% FBS + CM cho thấy kết quả tốt nhất được chọn làm mẫu để nuôi cấy tăng sinh.

Số lượng tế bào được xác định trong 3 lô, trong 7 ngày được tổng kết trong 7 lần như sau :

Bảng 3.7. Kết quả nuôi cấy tăng sinh trong môi trường D'MEM/F12, 10% FBS + CM

Ngày	7	10	13	16	19	21	24
Số tế bào trung bình ( $\times 10^4$ )	2,33	6,89	10,00	11,78	20,88	22,66	25,99
LSD, 95%	a	b	c	c	d	D	f

## Nhận xét

- Theo thời gian, các tế bào khi nuôi cấy trong môi trường D'MEM/F12, 10% FBS + CM gia tăng số lượng.
- Từ ngày 7 đến ngày 13, tế bào gia tăng nhanh số lượng; từ ngày 13 đến ngày 21 gia tăng số lượng chậm. Thật vậy, từ ngày 13 đến ngày 16 và từ ngày 19 đến ngày 21, sự gia tăng không có ý nghĩa thống kê. Nguyên nhân, có lẽ khi tăng mật độ đến một giá trị nhất định, các tế bào giảm sút khả năng sinh sản, cùng với sự cạn kiệt chất dinh dưỡng vào thời điểm đó.
- So với môi trường IMDM bổ sung với bFGF và EGF mà nhiều tác giả sử dụng trong nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn thì hiệu quả tăng sinh này gần tương đương.
- Như vậy, môi trường D'MEM/F12, 10% FBS + CM có hiệu quả tốt trong việc nuôi cấy, phát triển tế bào gốc trung mô máu cuống rốn người. Sự bổ sung CM có hiệu quả tương đương với bổ sung bFGF và EGF. Kết quả này cho thấy phù hợp với một số công trình công bố khi thay thế CM bằng bFGF và EGF trong việc nuôi cấy tế bào gốc phôi người và chuột.

## 4. Kết luận và đề nghị

### 4.1 Kết luận

1. Có thể thu nhận tế bào đơn nhân bằng phương pháp li tâm hỗn hợp tế bào máu cuống rốn với dung dịch li giải hồng cầu.
2. Môi trường E'MEM 10% FBS, D'MEM/F12 10% FBS+SFM không thích hợp cho nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ cuống rốn.
3. Môi trường D'MEM 10% FBS, D'MEM/F12 10% FBS cho hiệu quả nuôi cấy tương đối tốt. Tuy nhiên số lượng tế bào bám dính và phát triển vẫn còn ít.
4. Môi trường D'MEM/F12 10% FBS + CM cho hiệu quả phát triển tốt nhất với tế bào bám nhiều và phát triển mạnh.

## 4.2 Đề nghị

1. So sánh môi trường nuôi cấy D'MEM/F12 10%FBS + CM với môi trường được sử dụng ở nhiều nơi khác là IMDM + bFGF + EGF.

2. Biệt hoá tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người nhằm ứng dụng trong y học.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phan Kim Ngọc (2002), "Giáo trình thực tập cơ sở : Công nghệ sinh học động vật", NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM.
- [2]. Phạm Văn Phúc (2005), Luận văn tốt nghiệp "Thu nhận và tinh sạch tế bào mầm từ phôi chuột (*Mus musculus* var *Albino*) và tạo lớp feeder MEF nuôi tế bào mầm", Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM.
- [3]. Nguyễn Thị Hằng (2006), Luận văn tốt nghiệp "Thu nhận, nuôi cấy và biệt hoá nguyên bào sợi (*Fibroblast*) chuột thành tế bào mỡ (*Adipocyte*)", Trường Đại học Sư phạm Tp.HCM.
- [4]. Nguyễn Vũ Thanh Vy (2004), Luận văn tốt nghiệp "Thiết lập qui trình phân tách tế bào đơn nhân từ máu cuống rốn bằng *Percoll*", Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM.
- [5]. Stewart Sell MD (2004), *Stem cell handbook*. Humana Press Inc, Totowa.
- [6]. Cheng L. Quasba P, Vanguri P et al. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD 34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000; 184:58-69.
- [7]. Daniel R. Marshak, Richard L. Gardner, David Gottlieb (2001), *Stem cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [8]. I.Robert (2004), Mesenchymal stem cell. *Vox Sanguinis*. 38-41.
- [9]. Moustapha Kassen và CS (2004), *Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology*.