

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TỪ MÀNG ỒI NGƯỜI

PHẠM VĂN TRÂN, HUỖNH QUANG THUẬN.  
Học viện quân y – Bộ quốc phòng;

### TÓM TẮT

Tế bào gốc là tế bào có khả năng tự làm mới và biệt hoá thành các tế bào chuyên biệt có chức năng mới tương ứng. Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu quy trình phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối người. Phương pháp nghiên cứu: phân lập tế bào bằng trypsin, collagenase B, percoll với tỷ trọng khác nhau. Xác định tế bào gốc bằng dấu ấn OCT-4. Kết quả: Quy trình tách phân lập tế bào gốc từ màng ối đạt hiệu quả cao, tế bào thu được có biểu hiện dấu ấn của tế bào gốc. Kết luận: Quy trình phân lập tế bào gốc màng ối bằng trypsin, collagenase B và percoll đạt hiệu quả cao và dễ ứng dụng. Các tế bào gốc màng ối biểu hiện dấu ấn OCT-4, dấu ấn của tế bào gốc.

**Từ khóa:** Màng ối, tế bào gốc, trypsin, collagenase B, hyaluronidase.

**Tên tiếng anh:** Isolation, storage and culture of amniotic membrane stem cells.

### SUMMARY

The amniotic membrane stem cell can differentiate into different mature cells. The aim of study is to examine the process of isolating and culturing of stem cells isolated from amniotic membranes. Method: We isolated stem cell by trypsin, percoll and characterised its by marker OCT-4. Results: Protocol for isolation of

stem cells from amniotic membrane has high efficiency. Amniotic membrane stem cells collected express OCT-4. Conclusion: Amniotic stem cells can be isolated from amniotic membrane by trypsin, collagenase B and percoll.

**Keywords:** Amniotic membrane, stem cell, trypsin, collagenase B, hyaluronidase.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc là tế bào nền móng của tất cả các tế bào, mô và cơ quan trong cơ thể, đây là những tế bào chưa biệt hoá nhưng có khả năng trở thành các tế bào chuyên biệt và có chức năng mới tương ứng. Dựa vào nguồn gốc, các tế bào gốc được phân chia thành 4 loại đó là: Tế bào gốc phôi (Embryonic stem cells) và tế bào mầm phôi (Embryonic germ cells), tế bào gốc thai (Foetal stem cells), tế bào gốc trưởng thành (Adult stem cells/Somatic stem cells). Dựa vào đặc tính hay mức độ biệt hoá, tế bào gốc được chia thành: Tế bào gốc toàn năng hay tế bào gốc thủy tổ (totipotent stem cells), tế bào gốc vạn năng (pluripotent stem cells), tế bào gốc đa năng (multipotent stem cells), tế bào gốc đơn năng (mono/unipotential progenitor cells).

Màng ối là một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở là một nguồn cung cấp tế bào gốc lý tưởng. Sử dụng tế bào gốc màng ối không gặp phải

những vấn đề về đạo đức, xã hội. Các tế bào gốc phân lập từ màng ối có tính sinh miễn dịch thấp, không có khả năng ung thư hóa và có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài với mục tiêu nghiên cứu quy trình phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc từ màng ối người phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối

Tế bào gốc được phân lập từ màng ối của các sản phụ mổ để bảo đảm tiêu chuẩn xét nghiệm sàng lọc âm tính với HIV, HBV, HCV, HTLV và giang mai. Tiến hành

tách tế bào bằng các enzym phân cắt mô trypsin 0,02%, collagenase B 0,1%, hyaluronidase 0,1% có phối hợp với các biện pháp cơ học. Ly tâm với percoll 40,8% và 50,8% (Sigma, Viet Nam) để thu được khối tế bào gốc. Tế bào gốc màng ối được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$ M), huyết thanh bào thai bê (10%) đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần một lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

- Bảo quản tế bào gốc màng ối trong điều kiện lạnh âm sâu (-196°C) trong môi trường DMEM có 10% DMSO.



Hình 1: Quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối

#### 2. Kỹ thuật RT-PCR xác định biểu hiện của ARN thông tin

Tách chiết RNA tổng số từ các tế bào (Kit -Qiagen) sau đó tổng hợp cDNA từ RNA tổng số (Kit - Fermentas). Phản ứng PCR định lượng được thực hiện trên máy LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) sử dụng kit QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR (Qiagen). Cặp chất mồi đặc hiệu cho từng gen được mô tả trong bảng sau.

Bảng 1: Các mồi dùng để chạy RT-PCR.

18S rRNA	Sens: 5'-TGAGAAACGGCTACCCATC-3'
	Anti-sens: 5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGT-3'
Oct-4 octamer-binding transcription factor 4	Sens: 5'-AGGTGTTTCAGCCAACGACC-3'
	Anti-sens: 5'-TGATCGTTTGCCCTTCTGGC-3'

Sau khi làm biến tính cDNA 15 phút ở 95°C, từ 40 đến 50 chu kỳ PCR được thực hiện (15 giây: 95°C, 25 giây: 58°C và 20 giây: 72°C). Điện di sản phẩm PCR trên gel acrylamid nồng độ ARNtt của dấu ấn OCT-4 được tính toán dựa trên nồng độ ARNtt của gen 18S.

#### 3. Kỹ thuật hóa miễn dịch tế bào

Tế bào trên đĩa nuôi cấy được cố định bằng etanol 98% sau đó được ủ với kháng thể thứ nhất kháng OCT-4. Kháng thể thứ hai được gắn với chất huỳnh quang. Quan sát tế bào và chụp hình ảnh trên kính hiển vi huỳnh quang.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối.

Các enzym khác nhau có thời gian tác dụng khác nhau lên quá trình phân rã màng ối, giải phóng tế bào (bảng 2). Bảng 2: Thời gian tác dụng của enzym phân cắt mô.

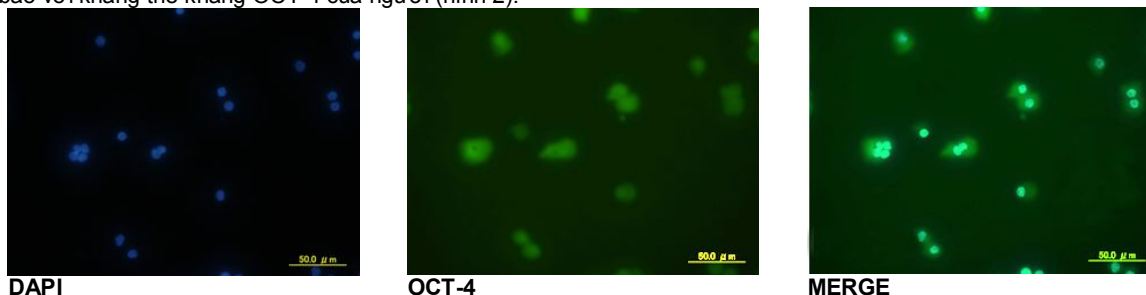
Số thứ tự	Tên enzyme	Thời gian làm tan rã màng ối (phút)
1	Trypsin 0.2%	45 +/- 10
2	Collagenase B 0.1%	50 +/- 10
3	Trypsin 0.2% + Collagenase B 0.1% (tỷ lệ 1:1)	20 +/- 10

4	Hyaluronidase 0.6%	Không tác dụng
---	--------------------	----------------

- Sau khi được phân lập, tế bào gốc màng ối được nuôi cấy trong đĩa plastic. Sau 24 giờ, các tế bào gốc bám dính vào bề mặt đáy đĩa nuôi cấy, các tế bào gốc màng ối có hình tròn hoặc hình đa diện. Sau mỗi 2-3 ngày thì tiến hành thay môi trường và kiểm tra tình trạng phát triển của các tế bào gốc. Sau khoảng 2 tuần nuôi cấy, mật độ tế bào phát triển bao phủ 50-60% bề mặt đĩa nuôi cấy. Sau đó tiến hành cấy chuyển nhằm tạo không gian cho tế bào gốc phát triển và nuôi cấy sang môi trường đặc biệt để biệt hóa tế bào gốc thành các loại tế bào khác nhau.

## 2. Biểu hiện dấu ấn OCT-4 của tế bào gốc màng ối

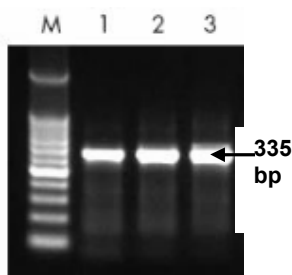
Kết quả PCR cho thấy tế bào gốc có biểu hiện dấu ấn OCT-4. Kết quả phù hợp với kết quả nhuộm hóa miễn dịch với OCT-4, màu xanh lá OCT-4, màu xanh tím nhuộm nhân bằng DAPI. C: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của OCT-4. Ba mẫu tế bào gốc màng ối khác nhau được cho vào 3 giếng điện di đánh số 1, 2, 3.



DAPI

OCT-4

MERGE



**Hình 2. Biểu hiện dấu ấn OCT-4.** A, B, C: Hình ảnh tế bào nhuộm hóa miễn dịch với OCT-4, màu xanh lá OCT-4, màu xanh tím nhuộm nhân bằng DAPI. C: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của OCT-4. Ba mẫu tế bào gốc màng ối khác nhau được cho vào 3 giếng điện di đánh số 1, 2, 3.

## BÀN LUẬN

### 1. Quy trình phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối:

Để thu được tế bào có khả năng sống tốt trong môi trường nuôi cấy, tế bào cần phải được phân lập trong thời gian 4 giờ kể từ khi mổ lấy thai. Nếu để sau 4h mới bóc tách và phân lập tế bào thì tỷ lệ nuôi cấy tế bào phát triển kém và dễ bị nhiễm khuẩn và nhiễm nấm.

Về phân tách tế bào gốc từ màng ối bằng các enzym, nếu chỉ phân cắt màng ối bằng trypsin thì số lượng tế bào thu được thấp và thời gian thường phải kéo dài, có khi phải 60 phút các tế bào mô màng ối mới bị phân cắt hết. Nếu cho thêm collagenase B vào trypsin thì số lượng tế bào thu được sẽ nhiều hơn và thời gian tan rã màng ối sẽ nhanh hơn. Hyaluronidase hầu như không có tác dụng phân rã màng ối mặc dù đã có một số tác giả trên thế giới dùng enzym này để phân lập tế bào từ các mô liên kết.

Tế bào gốc được nuôi cấy trong đĩa plastic đường kính 10cm, với môi trường DMEM high glucose có thêm 10% FBS + 1% Penicilline-Streptomycine + 1% L-glutamate, trong tủ nuôi cấy HEPA-NUAIRE ở 37°C, không khí có 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa. Ngay sau khi nuôi cấy 24 giờ, các tế bào gốc màng ối có xu hướng bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển thành những cụm tế bào hình tròn và có kích thước trung bình. Sau 2 tuần nuôi cấy, mật độ tế bào phát triển bao phủ khoảng 50-60% bề mặt đĩa nuôi cấy thì cấy chuyển nhằm cung cấp đủ chất dinh dưỡng và đảm bảo không gian cho các tế bào tăng sinh. Kết quả nuôi cấy và môi

trường nuôi cấy cũng tương tự như kết quả của các nghiên cứu khác.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 30 mẫu màng ối, chúng tôi đã tiến hành phân lập thành công tế bào gốc từ màng ối bằng enzym. Các vị trí trên màng ối thu được nhiều tế bào nhất là vị trí gần trung tâm màng ối gần với cuống rốn, còn vị trí vùng đĩa càng xa cuống rốn thì thu được ít tế bào hơn.

### 2. Định danh tế bào gốc màng ối

Các tế bào màng ối biểu hiện nhiều marker tế bào gốc như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3β (HNF-3β)... Những yếu tố này cho thấy không chỉ tế bào gốc biểu mô màng ối mà còn cả tế bào gốc trung mô màng ối cũng là tế bào gốc đa tiềm năng. Chúng tôi định danh tế bào gốc màng ối bằng quan sát trực tiếp trên kính hiển vi đảo ngược sau đó tiến hành các phản ứng RT-PCR, hóa miễn dịch tế bào để phát hiện marker của tế bào gốc. Trong khuôn khổ của đề tài, chúng tôi chỉ xác định sự biểu hiện của marker OCT-4, là marker biểu hiện tính gốc của tế bào.

Việc xác định tính gốc của tế bào gốc màng ối bằng OCT-4 đã được nhiều tác giả sử dụng. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng đã xác định sự thay đổi của marker OCT-4 trong quá trình nuôi cấy. Kết quả chỉ ra rằng marker OCT-4 giảm dần theo thời gian. Trong thời gian nuôi cấy tế bào gốc màng ối, mặc dù đã cố gắng đảm bảo những điều kiện tốt nhất cho nuôi cấy như thời gian phân lập tế bào gốc từ màng ối, phòng nuôi cấy tế bào luôn được vệ sinh tiệt khuẩn, môi trường nuôi cấy

thích hợp, tủ nuôi cấy có nhiệt độ 37°C, CO<sub>2</sub> 5% luôn ổn định, bảo đảm vô trùng, nhưng chúng tôi cũng chỉ nuôi cấy tế bào gốc màng ối được trong khoảng 30-40 ngày.

#### **KẾT LUẬN**

Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi đã có được quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối người có hiệu quả cao và nuôi cấy tăng sinh được các tế bào gốc màng ối trong môi trường DMEM high Glucose có thêm 10% FBS và Penicilline-Streptomycine thành công.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trần Văn Bé (2006). Tình hình ghép tế bào gốc tại TP. Hồ Chí Minh Việt Nam. *Y học Việt Nam*, số 5/2006: 1-4.
2. Nguyễn Thị Thu Hà (2004). Tế bào gốc và ứng dụng trong y sinh học. *TCNCYDH phụ bản 32 (6)*: 13-26.
3. Phan Kim Ngọc và CS (2008). Thu nhận tế bào gốc trung mô đa năng từ máu cuống rốn người. *Tạp chí y dược học quân sự*. 33(2):119-124.
4. Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định (2009). Công nghệ tế bào gốc. *Nhà xuất bản giáo dục*

*Việt Nam.*

5. Anna M. Wobus et al (2002). Embryonic stem cell as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Method in Molecular Biology*, 184: 127 - 155.

6. Ben - Num IF, Benvenisty (2006). Humanembryonic stem cells as cellular model for human disorder. *Mol Cell Endocrinol*.

7. Ayaka Toda, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, and Toshio Nikaido (2007). The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci* 105, 215 – 228.

8. Toshio Miki, Keitaro Mitamura, Mark A. Ross, Donna B. Stolz, Stephen C. Strom (2007). Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology* 75 (2007) 91–96.

9. Toshio Miki, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, Stephen C. Stroma (2005). Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells* 2005;23:1549–1559.