

BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC MÁU CUỐNG RỐN NGƯỜI THÀNH NGUYÊN BÀO XƯƠNG

*Trần Công Toại**; *Huỳnh Duy Thảo**; *Phan Kim Ngọc***; *Nguyễn Phương Thảo**

TÓM TẮT

Máu cuống rốn (MCR) người chứa một nguồn tế bào gốc (TBG) có khả năng biệt hóa thành một số kiểu tế bào khác nhau của cơ thể. Chúng tôi nghiên cứu một phương pháp thu nhận, phân lập và biệt hóa những TBG này thành nguyên bào xương để có thể ứng dụng trong lĩnh vực y học tái tạo, đặc biệt là trong công nghệ mô ghép xương. Đã phân lập những tế bào đơn nhân từ MCR bằng dung dịch ly giải hồng cầu và ficoll - hypaque. Tế bào được cảm ứng tạo xương bằng cách nuôi trong môi trường IMDM với 15% FCS và bổ sung dexamethasone, ascorbic acid, β - glycerol phosphate, vitamin D2 và FGF - 9. Tế bào có những thay đổi về hình thái giống với tế bào xương. Kết quả nhuộm dương tính với Alizarin red, Von kossa và alkaline phosphatase. Kết quả chạy RT - PCR dương tính với osteopontin và osteocalcin. Đã xây dựng được qui trình thu nhận, phân lập và biệt hóa TBG từ máu cuống rốn người thành nguyên bào xương.

* Từ khóa: Máu cuống rốn; Tế bào gốc; Biệt hóa tạo xương; Osteopontin; Osteocalcin.

DIFFERENTIATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD STEM CELLS INTO OSTEOLASTIC LINEAGE CELLS

Tran Cong Toai; Huynh Duy Thao; Phan Kim Ngoc; Nguyen Phuong Thao

SUMMARY

Human umbilical cord blood (UCB) is an incredible source of stem cells which are able to differentiate into many kind of cells of the body. Our team has developed a procedure to collect, isolate, and differentiate UCB stem cells into osteoblast for application in regenerative medicine especial for bone tissue engineering. We have isolated mononuclear cells from umbilical cord blood by erythrolysis solution and ficoll - hypaque solution. Mononuclear cells were induced into osteoblast by using an osteogenic medium IMDM plus 15% FCS, dexamethasone, ascorbic acid, β - glycerol phosphate, vitamin D2 and FGF - 9. Cells started to change shape, assuming the typical osteocyte like shape. Cells were positive with Alizarin red stain, Von kossa stain, and alkaline phosphatase stain. RT - PCR for osteopontin and osteocalcin gene markers were positive. We confirmed the validity of a protocol regarding the isolation, culture and differentiation of UCB stem cells into osteoblasts.

** Key words: Umbilical cord blood; Stem cells; Osteogenic differentiation; Osteopontin; Osteocalcin.*

** Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch; ** Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh*

Phản biện khoa học: GS. TS. Lê Gia Vinh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Máu cuống rốn người là một nguồn mẫu rất dồi dào nhƣng trước đây chưa được quan tâm nghiên cứu, bị bỏ đi và được xử lý như một loại rác thải y tế.

MCR chứa nhiều dòng TBG còn rất trẻ có khả năng phân chia tốt, có thể biệt hóa thành một số loại tế bào khác nhau như: nguyên bào xương [9, 11], nguyên bào sụn [9], tế bào mỡ [9], nguyên bào sợi, nguyên bào cơ, tế bào gan và thậm chí là cả đối với tế bào thần kinh... MCR còn được sử dụng để điều trị một số bệnh về máu và hệ thống miễn dịch có liên quan đến một số bệnh di truyền, ung thư và những rối loạn chức năng có liên quan về máu [1].

Ngoài ra, ưu điểm của MCR là dễ thu nhận, số lượng máu thu được nhiều [7], khi thu nhận máu không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của bà mẹ và bé [6]. Khi tiến hành nghiên cứu và ứng dụng không gặp nhiều khó khăn, cản trở về mặt đạo đức sinh học và luật pháp như những nghiên cứu về TBG phôi người. MCR ngày càng được nhiều người quan tâm nghiên cứu và xem như là một nguồn cung cấp TBG thay thế cho nguồn TBG từ tủy xương và máu ngoại vi trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

Mẫu MCR thu nhận từ những sản phụ sinh tại Bệnh viện Hùng Vương, phải đạt các tiêu chuẩn [2, 4]: các sản phụ đồng ý cho MCR để nghiên cứu, được theo dõi lâm sàng, làm các xét nghiệm trước sinh. Thai được lấy trong khoảng 36 - 42 tuần tuổi.

Thai nhi sinh ra khỏe mạnh, không dị tật bẩm sinh. Mẫu MCR âm tính với các xét nghiệm HIV, HBsAg, anti - HCV, VDRL.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Phân lập tế bào đơn nhân từ MCR:

Lấy MCR ngay sau khi cắt cuống rốn qua đường tĩnh mạch rốn bằng bơm tiêm vô trùng, cho ngay vào thùng vận chuyển và đưa về phòng thí nghiệm. Bảo quản máu tạm thời trong tủ lạnh ở 4⁰C, chờ xử lý.

Sử dụng hai phương pháp khác nhau để phân lập tế bào đơn nhân từ MCR. Sử dụng dung dịch ficoll - hypaque (1,077g/ml, GE Healthcare BioSciences AB) và dung dịch ly giải hồng cầu để thu nhận tế bào đơn nhân.

Dịch tế bào đơn nhân sau khi phân lập sẽ được đánh giá tỉ lệ sống/chết bằng cách nhuộm tế bào với trypan blue (Sigma, USA) và xác định mật độ tế bào/ml. Nhuộm dịch tế bào đơn nhân với dung dịch Giemsa (Merck, Germany) để đánh giá hình thái tế bào.

2.2. Nuôi cấy:

Tế bào đơn nhân sau khi phân lập sẽ được nuôi trong chai nuôi T - 25 cm² ở mật độ 10⁶ - 10⁷ tế bào/ml với môi trường Iscove's modified dulbecco's medium (Sigma, USA), bổ sung 15% fetal calf serum (Sigma, USA), kháng sinh 100 UI/ml penicilin và 100 µg/ml streptomycin.

Nuôi tế bào trong tủ ẩm với 5% CO₂, ở 37⁰C. Thay môi trường 3 ngày/1 lần. Sau 2 - 4 tuần nuôi cấy, tế bào nuôi đạt mật độ phù hợp để tiến hành cấy chuyền (khoảng 60 - 80% diện tích chai nuôi).

2.3. Biệt hoá thành nguyên bào xương:

Tế bào sau thời gian nuôi cấy sơ cấp đạt mật độ phù hợp (khoảng 60% - 80% diện

tích chai nuôi) sẽ được cấy chuyển sang chai nuôi mới với dung dịch trypsin - EDTA (Gibco, Mỹ). Tế bào được cấy chuyển đến lần thứ 3 và tiến hành biệt hóa thành nguyên bào xương với các thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: mẫu tế bào được cấy chuyển ở lần thứ 3, nuôi trong môi trường IMDM, bổ sung 15% FCS, kháng sinh penicilin và streptomycin. Sử dụng làm mẫu chứng âm.

Thí nghiệm 2: mẫu tế bào cấy chuyển ở lần thứ 3, đạt mật độ phù hợp biệt hóa sẽ thay bằng môi trường cảm ứng biệt hóa tạo nguyên bào xương với môi trường: IMDM, 15% FCS, 0,1 μ M dexamethasone (Dex), 10 mM β - glycerolphosphate (β - GI), 100 μ g/ml ascorbic acid (AA) và kháng sinh.

Thí nghiệm 3: mẫu tế bào cấy chuyển ở lần thứ 3, đạt mật độ phù hợp biệt hóa sẽ thay bằng môi trường cảm ứng biệt hóa tạo nguyên bào xương với môi trường sau: IMDM, 15% FCS, 0,1 μ M Dex, 10 mM β - GI, 100 μ g/ml AA, 10^{-7} M vitamin D2 và kháng sinh.

Thí nghiệm 4: mẫu tế bào cấy chuyển ở lần thứ 3, đạt mật độ phù hợp biệt hóa sẽ thay bằng môi trường cảm ứng biệt hóa tạo nguyên bào xương với môi trường sau: IMDM, 15% FCS, 0,1 μ M Dex, 10 mM β - GI, 100 μ g/ml AA, 10 ng/ml FGF - 9 và kháng sinh.

Thí nghiệm 5: mẫu tế bào cấy chuyển ở lần thứ 3, đạt mật độ phù hợp biệt hóa sẽ thay bằng môi trường cảm ứng biệt hóa tạo nguyên bào xương với môi trường sau:

IMDM, 15% FCS, 0,1 μ M Dex, 10 mM β - GI, 100 μ g/ml AA, 10^{-7} M vitamin D2, 10 ng/ml FGF - 9 và kháng sinh.

Theo dõi sự thay đổi về mặt hình thái tế bào và thay môi trường cảm ứng tạo nguyên bào xương mới 3 ngày/lần. Tế bào sau khi biệt hóa sẽ được xác định tạo thành nguyên bào xương in vitro ở các ngày 14, 21 và 27.

2.4. Xác định sự tạo thành xương in vitro:

Nhuộm tế bào với Alizarin red, Von kossa và fast red violet LB salt tại các thời điểm 14, 21 và 27 ngày.

Chạy RT - PCR với 2 marker osteopontin và osteocalcin.

Bảng 1: Trình tự mỗi dùng để chạy RT - PCR.

GEME MỤC TIÊU	TRÌNH TỰ MÔI	SẢN PHẨM TẠO THÀNH (bp)
Osteopontin	S: 5' - CTAGGCATCACCTGTGCCATACC - 3' A: 5' - CTACTTAGACTACTTGACCAGTGA - 3'	330 bp
Osteocalcin	S: 5' - CGCAGCCACCGAGACACCAT - 3' A: 5' - GGGCAAGGGCAAGGGGAAGA - 3'	405 bp

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thu nhận MCR.

Thu nhận MCR tại Bệnh viện Hùng Vương ở trẻ sinh ra bình thường, khỏe mạnh và đạt tiêu chuẩn để thu nhận mẫu [2, 5].

Có 40 mẫu thí nghiệm. Số tuổi mẹ trung bình: $26,25 \pm 0,81$ tuổi. Trọng lượng trung bình của em bé: $3117,50 \pm 60,22$ g.

Thể tích MCR trung bình thu nhận được: $58,73 \pm 3,30$ ml máu. Dựa vào tiêu chuẩn

thu nhận thì thể tích MCR thu được (trung bình $58,725 \pm 3,295$ ml) hoàn toàn phù hợp, an toàn với người tiến hành thí nghiệm và đủ tiêu chuẩn phân lập tế bào đơn nhân, nuôi cấy TBG.

2. Phân lập tế bào đơn nhân từ MCR.

Sau khi phân lập bằng ly tâm dựa vào tỷ trọng ficoll - hypaque: mật độ tế bào trung

bình thu được $14,59 \pm 5,90 \times 10^7$ tế bào/ml. Tỷ lệ tế bào sống/chết > 99,87%.

Sau phân lập bằng dung dịch ly giải hồng cầu: mật độ tế bào trung bình thu được: $8,58 \pm 3,43 \times 10^7$ tế bào/ml. Tỷ lệ tế bào sống/chết 94,98%.

Bảng 2: Kết quả phân lập tế bào bằng ficoll - hypaque và dung dịch ly giải hồng cầu.

SỬ DỤNG DUNG DỊCH FICOLL - HYPAQUE			SỬ DỤNG DUNG DỊCH LY GIẢI HỒNG CẦU		
Số thí nghiệm	Thể tích máu (ml)	Mật độ tế bào/ml ($\times 10^7$)	Số thí nghiệm	Thể tích máu (ml)	Mật độ tế bào/ml ($\times 10^7$)
1	60	17,23	1	18	81,75
2	18	6,75	2	24	2,01
3	24	127,00	3	39	10,90
4	39	48,00	4	14	17,40
5	14	70,50	5	25	0,09
6	25	0,38	6	13	1,50
7	15	0,50	7	30	0,77
8	13	0,41	8	30	6,86
9	30	0,93	9	50	2,60
10	60	4,05	10	72	0,23
11	60	1,70	11	72	6,40
12	72	1,04	12	36	12,90
13	48	1,20	13	48	26,25
14	84	3,00	14	54	5,24
15	30	8,60	15	60	2,18
16	54	6,12	16	36	5,08
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
17	48	2,18	17	48	0,12

18	46	1,22	18	108	1,02
19	70	6,36	19	50	4,50
20	60	3,49	20	60	9,55
21	108	8,96	21	52	5,50
22	60	11,18	22	40	2,30
23	84	9,90	23	48	0,32
24	85	9,53	24	84	0,47

3. Nuôi cấy tế bào MCR in vitro.

Tế bào sau khi phân lập bằng cả hai phương pháp sẽ được nuôi trong môi trường IMDM có bổ sung 15% huyết thanh và kháng sinh.

Sau 5 ngày nuôi cấy (10X) bắt đầu xuất hiện những tế bào có hình dạng giống nguyên bào sợi, hình tròn, hình sao và những tế bào phẳng bám sát bề mặt chai nuôi. Sau 10 ngày nuôi cấy (10X), tế bào giống nguyên bào sợi và hình sao chiếm ưu thế. Sau 14 ngày nuôi (10X), tế bào dạng giống nguyên bào sợi chiếm ưu thế cùng với những tế bào hình sao dạng phẳng mỏng bám sát bề mặt chai nuôi. Sau 14 ngày, tế bào đạt được mật độ cấy chuyển (khoảng 70 - 80% diện tích chai nuôi).

4. Xác định tạo thành nguyên bào xương in vitro.

* *Kết quả nhuộm:*

Tế bào sau khi biệt hóa thành nguyên bào xương khoảng 21 ngày sẽ xác định tạo thành của chất nền và nốt xương.

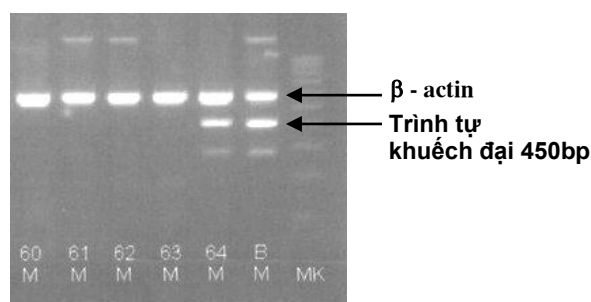
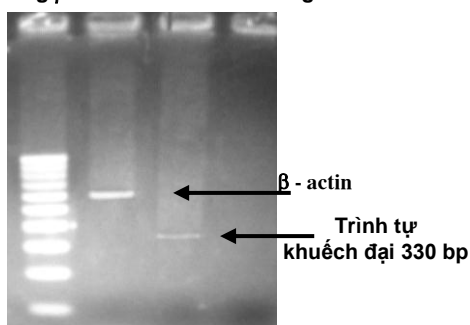
Tế bào nhuộm với Alizarin red (10X) và nuôi trong môi trường biệt hóa tạo xương, khi nhuộm chất nền xương tạo ra sẽ phản ứng với thuốc nhuộm tạo ra màu đỏ đặc trưng của thuốc nhuộm, tế bào nhuộm với Von kossa (10X): các nốt xương tạo ra sẽ phản ứng với thuốc nhuộm tạo ra từng nốt màu đen lớn, rải rác có những nốt xương màu đen nhỏ.

Chúng tôi đã tiến hành nhuộm mẫu với thuốc nhuộm fast red violet LB salt để xác định sự có mặt của enzyme alkaline phosphatase, kết quả cho thấy: tế bào sau nhuộm có xu hướng kết tụ vào nhau thành cụm (cơ sở của sự hình thành nốt xương), ở những nơi có tạo cụm, màu hồng xuất hiện đậm và nhiều hơn những chỗ khác trong chai nuôi, chứng tỏ enzyme alkaline hoạt động ở những nơi này rất mạnh.

* *RT - PCR:*

Để khẳng định kết quả biệt hóa tế bào thành nguyên bào xương in vitro, tiến hành chạy RT - PCR với 2 marker osteopontin (marker sớm) và osteocalcin (marker muộn) với trình tự mỗi như trên. Kết quả cho thấy:

Thang β -Actin Mẫu Mẫu chứng âm



Hình 1: RT - PCR cho marker osteopontin (14 ngày) sau khi biệt hóa. Chạy RT - PCR xuất hiện vạch có kích thước sản phẩm 330 bp cho gen osteopontin.

Hình 2: RT - PCR cho marker osteocalcin (27 ngày) sau khi biệt hóa. Kết quả chỉ có mẫu 64 cho kết quả dương tính với sự xuất hiện của vạch có kích thước 405 bp cho gen osteocalcin.

BÀN LUẬN

Nhìn chung, mẫu MCR đạt tiêu chuẩn để phân lập và nuôi cấy TBG. Thể tích máu sử dụng để phân lập $58,73 \pm 3,30$ ml.

Mật độ tế bào sau khi phân lập từ 2 phương pháp cho thấy: phương pháp sử dụng ficoll - hypaque cho mật độ tế bào cao gấp 1,7 lần so với sử dụng dung dịch li giải hồng cầu. Tỷ lệ tế bào sống/chết khi phân lập bằng ficoll - hypaque cũng cao hơn (99,87% so với 94,98%) phương pháp li giải hồng cầu.

Có nhiều phương pháp khác nhau để phân lập MNC từ MCR. W. Schwinger và CS sử dụng 21 mẫu MCR, thể tích máu $65,0 \pm 22,6$ ml, với 4 phương pháp phân lập MNC khác nhau là ficoll, ficoll 2 lần, dung dịch HES và gelatin. Trong đó, 2 phương pháp ficoll 2 lần và dung dịch HES cho kết quả tốt nhất, mật độ tế bào đơn nhân thu được lần lượt: $21,5 \pm 22,7 \times 10^7$ tế bào/ml và $32,8 \pm 127,4 \times 10^7$ tế bào/ml.

Như vậy, kết quả của nghiên cứu này gần giống với W. Schwinger nhất. Tuy nhiên, trước khi phân lập bằng ficoll - hypaque, chúng tôi đã tiến hành làm Buffycoat để thu nhận tế bào bạch cầu/MNC. Đây có thể được xem như là bước làm giàu hay thu nhận MNC, giúp tiết kiệm được nhiều dung

dịch ficoll - hypaque nhưng vẫn đảm bảo nguồn mẫu có chứa TBG cần phân lập. Tuy nhiên, mật độ tế bào thu được không cao bằng của W. Schwinger. Vì tác giả sử dụng thể tích máu nhiều hơn và dùng ficoll 2 lần (tổng nhiều dung dịch ficoll hơn), nhưng tác giả không đưa ra số liệu % tế bào sống/chết. Tỷ lệ tế bào sống/chết thu được ở đây tương đối cao, > 90% tế bào sống. Mật độ tế bào thu được đảm bảo về mặt số lượng, phù hợp để tiến hành nuôi cấy tế bào ở điều kiện in vitro.

Hình thái tế bào của dịch đơn nhân sau khi phân lập bằng cách nhuộm với Giemsa cũng có sự khác nhau giữa 2 phương pháp: phương pháp dùng ficoll - hypaque, tế bào đơn nhân đồng nhất và dịch tế bào tương đối sạch (ít lẫn tạp tế bào hồng cầu, tiểu cầu và mảnh vỡ tế bào). Ngoài ra, kích thước tế bào cũng đồng nhất hơn, bao gồm tế bào đơn nhân, nhân tròn đều và chiếm gần hết phần bào tương tế bào, có kích thước trung bình.

Tuy nhiên, ở đây cũng có sự khác nhau khá lớn về kết quả nuôi cấy của 2 phương pháp: khi sử dụng ficoll - hypaque để phân lập, tế bào bắt đầu bám dính vào chai nuôi sớm, tế bào nuôi trong môi trường ít lẫn tạp. Sau 3 ngày, trong chai nuôi bắt đầu xuất hiện những tế bào có hình dạng giống

nguyên bào sợi, đó là những tế bào dạng hình thoi. Ngoài ra, còn có xuất hiện những tế bào phẳng và bám sát mặt chai nuôi cũng như những tế bào hình sao. Mật độ đạt được để cấy chuyền sớm hơn so với phương pháp li giải tế bào hồng cầu.

Với phương pháp sử dụng dung dịch li giải tế bào hồng cầu, dịch tế bào thu được không có sự thuần nhất với tế bào đơn nhân, bạch cầu đa nhân và còn sót lại tế bào hồng cầu, tiểu cầu và mảnh vỡ tế bào. Có thể, do thời gian tác dụng của dung dịch chưa đạt hiệu quả tối ưu theo qui trình, nếu để dung dịch tác động hoàn toàn sẽ ảnh hưởng đến chất lượng tế bào khi nuôi cấy (khả năng sống, thời gian bám dính, phát triển và cấy chuyền lâu hơn). Để khắc phục tình trạng trên, thay môi trường nuôi 2 lần/ngày (giúp loại bỏ những tế bào không bám và mảnh vỡ tế bào) nhưng tốn nhiều môi trường. Tuy nhiên ở phương pháp này, thời gian đạt được mật độ cấy chuyền thường lâu hơn so với phương pháp ficoll - hypaque. Nhìn chung, cả 2 phương pháp phân lập đều cho kết quả nuôi tốt. Tế bào phát triển và mọc tốt, có thể cấy chuyền trong khoảng thời gian từ 2 - 4 tuần sau khi nuôi.

Chúng tôi sử dụng môi trường IMDM, 15% FCS và kháng sinh để nuôi tế bào. Ở đây, có một số loại môi trường khác được sử dụng. Oscar K. Lee và CS sử dụng IMDM, 20% FBS, 10 ng/ml bFGF, 2 mM glutamine và kháng sinh; Myoung Woo Lee và CS sử dụng DMEM, 10% FBS, 2 mM glutamine và kháng sinh; Erices [9] và Yu - Jen Chang lại sử dụng α - MEM, 20% FBS, 4 ng/ml β - FGF và kháng sinh; Karren Bieback và CS [10] sử dụng môi trường

MSCGM (MSCGM BlulletKit™). Nhìn chung, môi trường nuôi cấy cho MCR rất đa dạng, có thể sử dụng môi trường IMDM, DMEM, α - MEM, môi trường thương mại pha sẵn. Huyết thanh có thể sử dụng FBS, FCS hoặc huyết thanh của MCR, một số yếu tố tăng trưởng (FGF) và kháng sinh.

** Môi trường biệt hóa:*

Đề biệt hóa tạo nguyên bào xương in vitro cần phải bổ sung một số yếu tố cần thiết như: Dex, AA, β - GI, vitamin D và FGF. Nồng độ của các yếu tố biệt hóa có thể sử dụng khác nhau, tùy theo từng tác giả nhưng có 3 yếu tố không thể thiếu là Dex, AA và β -GI.

Cuối cùng, để xác định tạo thành nguyên bào xương in vitro, có thể sử dụng nhiều cách khác nhau để đánh giá như: Smruti M. Phadnis [8] và Karen Bieback sử dụng cách nhuộm alkaline phosphatase; Marcus Jäger và C. Rosada sử dụng nhuộm hóa mô miễn dịch với những kháng thể khác nhau; Sarah Maurice chạy RT - PCR với các marker (glyceraldehyde - 3 - p, collagen tít I, bone sialoprotein, core binding factor - α 1, osteocalcin, osteopontin); Sarah Maurice sử dụng flow cytometry để đánh giá sự tạo thành nguyên bào xương in vitro. Có thể dùng từng phương pháp khác nhau để đánh giá tế bào biệt hóa, nhưng nên sử dụng kết hợp nhiều phương pháp để xác định tạo thành nguyên bào xương một cách chính xác nhất. Oscar K. Lee chạy RT - PCR trong điều kiện biệt hóa chỉ có Dex, AA và β - GI. Kết quả: RT - PCR cho gen osteopontin và osteocalcin dương tính. Tuy nhiên, Sarah Maurice chạy RT - PCR với gen osteopontin và osteocalcin có sự khác

biệt. Theo Sarah Maurice, gen osteopontin chỉ xuất hiện trong điều kiện nuôi cấy, ngoài Dex, AA và β - Gl cần phải bổ sung thêm vitamin D3 hoặc FGF9. Nếu trong điều kiện nuôi không có vitamin D3 hoặc FGF9, thì không xuất hiện gen osteopontin. Kết quả chạy RT - PCR cho gen osteocalcin chỉ xuất hiện khi trong điều kiện nuôi cấy, ngoài Dex, AA và β - Gl phải bổ sung vitamin D3 và FGF9. Sự có mặt riêng lẻ của vitamin D3 hoặc FGF9 không làm xuất hiện gen osteocalcin. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi gần giống với Sarah Maurice. Ở đây, chúng tôi sử dụng vitamin D2 thay cho vitamin D3, nhưng kết lại cho giống nhau. Gen osteopontin chỉ xuất hiện trong thí nghiệm 3 và 4 (có bổ sung vitamin D2 và FGF9). Gen osteocalcin chỉ xuất hiện trong thí nghiệm 5 (có bổ sung đồng thời vitamin D2 và FGF9). Điều này chứng tỏ, nếu chỉ có vitamin D hoặc FGF9, không đủ mạnh để kích thích hoạt động của gen osteocalcin (một trong những gen muộn của tế bào xương), chỉ khi có sự tham gia đồng thời của 2 yếu tố này mới làm xuất hiện được gen này.

Chúng tôi sử dụng vitamin D2 thay cho vitamin D3 để biệt hóa TBG MCR thành nguyên bào xương in vitro. Vitamin D2 hoàn toàn có thể sử dụng để thay thế vitamin D3.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết lập được một qui trình thu nhận, phân lập, nuôi cấy và biệt hóa TBG MCR thành nguyên bào xương in vitro để có thể ứng dụng trong công nghệ tái tạo mô xương ghép.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Văn Bé*. Nghiên cứu hoàn thiện kỹ thuật chiết tách TBG tạo máu từ máu cuống rốn để điều trị bệnh lý về máu. Đề tài cấp sở, Sở Khoa học - Công nghệ và Môi trường, Sở Y tế TP. HCM, 2004.
2. *Trần Văn Bé*. Tiêu chuẩn - kiểm tra chất lượng trong truyền máu huyết học. Nhà xuất bản Y học, 1999.
3. *Trần Minh Hiếu, Thi Nguyễn Lam, Hiền Lê Thị Diệu, Linh Đỗ Duy, Mật Bửu*. Thu thập, xử lý, đông lạnh MCR. Y học Việt Nam, 2002, 268 (1), tr. 1 - 6.
4. *Huỳnh Nghĩa*. Tình hình thu thập, sàng lọc và xử lý MCR tại Bệnh viện Truyền máu - Huyết học TP. Hồ Chí Minh. Y học Việt Nam, 2004, 299 (6), tr. 5 - 12.
5. *Huỳnh Nghĩa*. Xác định tối ưu tiêu chuẩn người cho MCR. Y học Việt Nam, 2006, 322, tr. 28 - 34.
6. *Thái Mai Duyên Thi*. Tình trạng nhiễm trùng trong lấy MCR. Y học Việt Nam, 221 (2), tr. 7 - 9.
7. *Nguyễn Thị Thủy, Thái Mai Duyên Thi*. Khảo sát thể tích MCR. Tạp chí Y học Việt Nam, 1998, 221 (2), tr. 1 - 6.
8. *Smruti M. Phadnis*. Human umbilical cord blood serum promotes growth, proliferation, as well as differentiation of human bone marrow - derived progenitor cells. In vitro cell, 42, pp. 283 - 286.
9. *Erices A., P. Conget, J. J. Minguell*. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J haematol. 2000, Apr, 109 (1), pp. 235 - 242.
10. *Karen Bieback, Kern Susanne, Kluter Harald, Eichler Hermann*. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical cord blood. Stem Cells, 2004, pp. 625 - 634.