

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ XÁC ĐỊNH BIỂU HIỆN MỘT SỐ
DẤU ẤN CỦA TẾ BÀO GỐC TRONG MÀNG ỒI NGƯỜI ĐÔNG KHÔ**

**Đỗ Minh Trung*;
Trần Hải Anh*;
Nguyễn B□b Trân*
Toshio Nikaido**;
Phạm Văn Trân*****

TÓM TẮT

Màng ối hiện nay được biết đến với nhiều hữu ích trong công nghệ mô cứng như khả năng ứng dụng trong cấy ghép. Membrane đóng vai trò như là một màng sinh học giúp làm giảm đau đáng kể ở vết thương bỏng nhờ khả năng bám dính, che phủ bề mặt vết thương và nhanh làm lành vết thương. Mục tiêu: tạo được tấm tế bào màng ối đông khô không độc, có thể co giãn, đàn hồi theo nhiệt độ người, dễ sử dụng và như một vật liệu thích hợp che phủ trong điều trị vết thương bỏng. Membrane ối sau khi thu thập được xử lý làm sạch, đông khô, đóng gói và khử trùng bằng chiếu xạ. Đánh giá đặc tính sinh học, đặc điểm hình thái của tấm tế bào màng ối tạo được và xác định biểu hiện một số dấu ấn của tế bào gốc (TBG) như Oct4, vimentin, collagen type I, Ck5, desmin bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch (HMMD). Kết quả cho thấy, tấm tế bào màng ối người đông khô vẫn giữ được đặc tính sinh học.

* Từ khóa: Màng ối người; Màng ối người đông khô; Tế bào gốc.

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION THE EXPRESSION OF STEM CELL
MARKERS IN FREEZE-DRIED HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE**

SUMMARY

Human amniotic membranes are known to be useful in many tissues engineering as well as applied in transplantation. Amniotic membrane as a biological membrane can significantly reduce pain in the burn wounds due to its ability adhesion, surface coverage and wound healing. The aim of this study was to produce freeze-dried human amniotic membrane which is non-toxic, elastic and easy to use as dressing material in burn wounds treatment. After collecting, the fresh membrane was cleaned, freeze-dried, packaged and sterilized and then irradiatedly sterilized. The product was evaluated on biological and morphological characteristics and tested for expression of some stem cells markers (including Oct4, vimentin, collagen type I, Ck5, desmin) by immunohistochemistry techniques. The results showed that the freeze-dried human amniotic membranes retained its main biological features with the expression of Oct4, vimetin, collagen type I, Ck5, desmin.

* Key words: Human amniotic membrane; Freeze-dried human amniotic membrane; Stem cells.

* Học viện Quân y

** Trường Đại học Toyama - Nhật Bản

*** Bệnh viện 103

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Nguyễn Gia Tiến
TS. Nguyễn Đăng Dũng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ mô (Tissue engineering - TE) được phát triển bằng việc sử dụng các vật liệu sinh học thay thế nhằm khôi phục, duy trì và cải thiện chức năng của mô. Màng ối được Davis sử dụng lần đầu tiên cho cấy ghép da vào năm 1910. Kể từ đó, màng ối được sử dụng rộng rãi như một vật liệu sinh học hữu ích trong việc kiểm soát vết bỏng, vết thương da và loét mạn tính ở chân. Màng ối được xem như một nguồn cung cấp mô hay tế bào phù hợp trong cấy ghép dựa trên hiệu quả chống viêm và tính sinh miễn dịch thấp (Hao và CS, 2005). Ghép màng ối đã được sử dụng thành công ở bệnh nhân bị dị tật bẩm sinh khó lành và không đáp ứng với điều trị y khoa. Đối với yếu tố sinh miễn dịch, các dấu hiệu lâm sàng của thải ghép cấp tính không thấy khi ghép màng ối trên những người tình nguyện. Màng ối tươi có thể được bảo quản ở -80°C để sử dụng cho cấy ghép, nhưng chỉ được một vài tháng và không thuận tiện trong vận chuyển, bảo quản và sử dụng. Hiện nay, tấm tế bào màng ối người đông khô đã được ứng dụng điều trị lâm sàng tại Nhật Bản và một số nước phát triển khác. So sánh với màng ối tươi, màng ối đông khô gần như không thay đổi về cấu trúc, chức năng và rất dễ xử lý khi điều trị các tổn thương có kích thước khác nhau. Màng ối người đông khô đã được ứng dụng trong điều trị, mang lại kết quả tốt cho bệnh nhân. Được sự hỗ trợ kỹ thuật của các

chuyên gia nghiên cứu về TBG từ Trường Đại học Toyama (Nhật Bản), chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo tấm tế bào màng ối người đông khô (freeze-dried) và xác định biểu hiện một số dấu ấn của tế bào trong tấm tế bào màng ối người đông khô tạo được.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

30 mẫu màng ối của các sản phụ mổ đẻ, bảo đảm tiêu chuẩn xét nghiệm sàng lọc âm tính với HIV, HBV, HCV, giang mai... Màng ối được thu thập, bảo quản đảm bảo vô trùng và chuyển về trung tâm nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Chuẩn bị màng ối:

Nhau thai thu nhận sau ca mổ đẻ được đặt vào trong bình bảo quản vô trùng có chứa PBS hoặc môi trường RPMI-1640 lạnh, vận chuyển về trung tâm nghiên cứu trong điều kiện nhiệt độ lạnh khoảng 4°C . Tiến hành bóc tách màng ối trong phòng sạch, thời gian không quá 4 giờ kể từ khi thu thập.

* Tạo tấm tế bào màng ối người đông khô:

Cắt màng ối thành từng miếng, nhanh chóng hạ lạnh và bảo quản ở nhiệt độ âm sâu từ -50°C đến -80°C . Sau đó, đưa màng ối vào thiết bị đông khô; kết thúc quá trình đông khô, đóng gói bảo quản, đưa đến cơ sở chiếu xạ; kết thúc quá trình chiếu xạ, kiểm tra độ vô trùng, xác định các marker và các thông số khác của các tấm tế bào màng ối đông khô tạo được.

* Xét nghiệm HMMD:

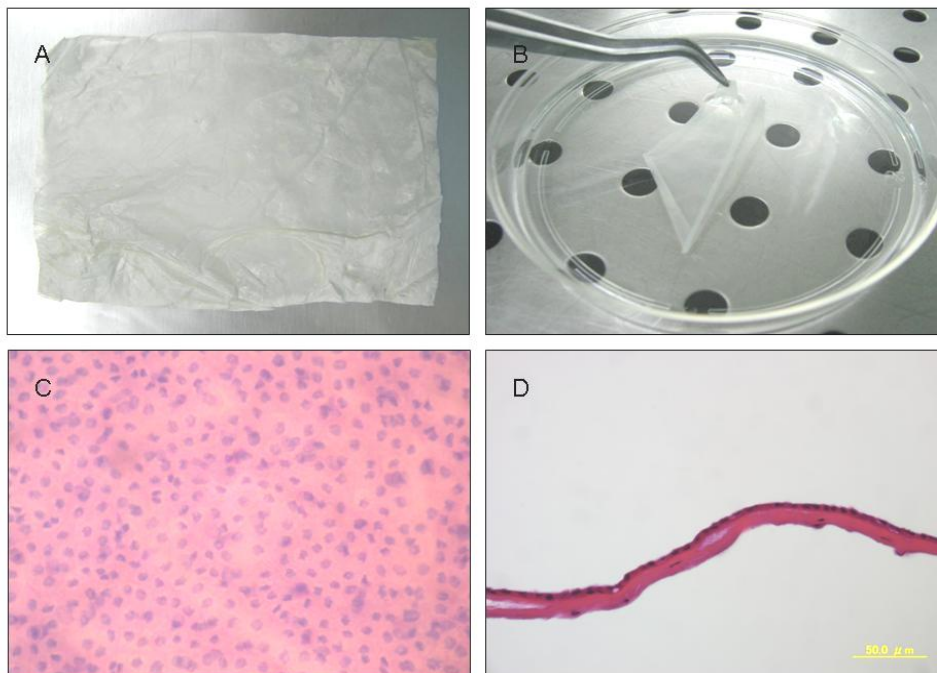
Mẫu màng ối sau khi đúc parafin được cắt mỏng, dán lên lam kính, làm khô ở 45°C. Khử parafin trong xylen và cồn trong 10 phút. Ức chế peroxidase nội bào bằng hydrogen peroxide 0,03% trong 20 phút. Ủ với kháng thể đơn clon kháng collagen tít I, desmin, Oct3/4, Ck5, Ck18, vimentin và rửa tiêu bản bằng PBS. Ủ với kháng thể thứ hai có gắn biotin trong 1 giờ. Ủ với phức hợp streptavidine peroxidase trong 20 phút. Hiện thị màu với cơ chất DAB. Rửa tiêu bản với nước cất.

Nhuộm với hematoxylin tạo nền tương phản trong 2 phút và rửa tiêu bản với nước cất. Khử nước bằng cồn và xylen. Dán lamen và quan sát, chụp lưu lại hình ảnh trên kính hiển vi. Kết quả sau khi nhuộm HMMD: âm tính: chỉ có màu xanh tím của hematoxylin nhuộm nhân; dương tính: nếu có hiện diện của kháng nguyên trên tế bào; phức hợp kháng nguyên - kháng thể - streptavidine màu sẽ cho màu vàng nâu (màu của DAB).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả chế tạo tấm tế bào màng ối đông khô.

30 mẫu màng ối đông khô đã được chế tạo, đóng gói, chiếu xạ, kiểm tra vô khuẩn, độ ẩm và làm tiêu bản nhuộm HE. Kết quả cho thấy, các màng ối đông khô đều âm tính với vi khuẩn và nấm tổng số. Nhuộm HE, kiểm tra màng ối đông khô thấy, màng ối khô vẫn giữ được cấu trúc, rất nhẹ, mỏng và dễ xử lý khi sử dụng.

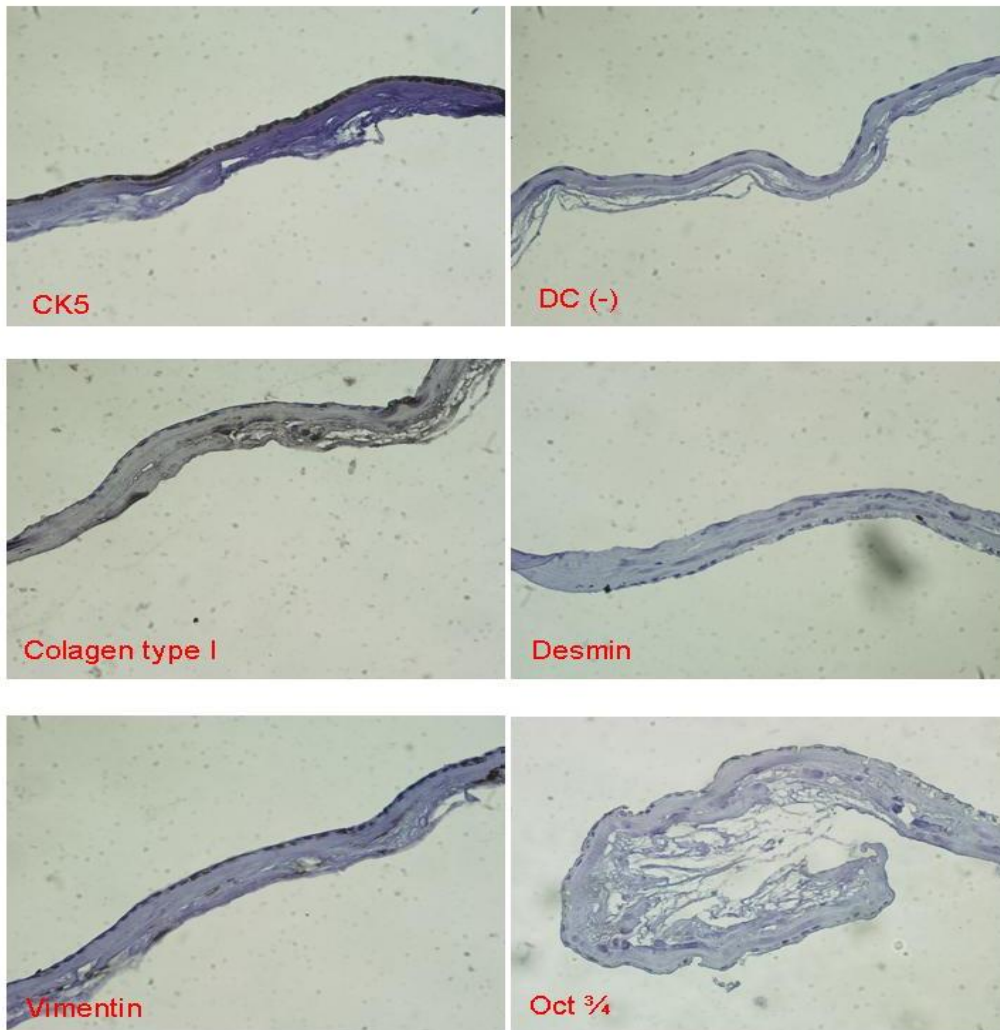


Hình 1: Hình ảnh về tấm tế bào màng ối người đông khô:

A: Tấm tế bào màng ối người đông khô; B: Tấm tế bào sau khi ngâm vào nước muối sinh lý 1 phút; C: Nhuộm HE; D: Nhuộm HE (tiêu bản cắt ngang).

2. Kỹ thuật xác định biểu hiện mô của dấu ấn của TBG biểu mô bằng kỹ thuật HMMD.

Xác định TBG biểu mô bằng kỹ thuật HMMD với các dấu ấn của TBG biểu mô. Kết quả cho thấy, tế bào biểu hiện dương tính với dấu ấn của TBG là Oct4, Sox2, SSEA4 và các dấu ấn của tế bào biểu mô vimentin, Ck18; biểu hiện âm tính với desmin.



Hình 2: Biểu hiện các dấu ấn Oct4, vimentin, Ck5, collagen tít I, desmin của tấm tế bào màng ối người đông khô xác định bằng kỹ thuật HMMD.

Màng ối là một mô có nguồn gốc bào thai và được cấu tạo bởi 3 màng chính: màng biểu mô đơn, màng nền dày và màng

vô mạch. Màng ối là một màng sinh học được ứng dụng nhiều trong cấy ghép, muốn sử dụng được, màng ối cần phải

được thu thập, xử lý, bảo quản và đảm bảo vô trùng trong tất cả các giai đoạn. Ngân hàng Mô châu Âu, Ngân hàng Mô Hoa Kỳ và FDA đã thiết lập các tiêu chuẩn với việc duy trì đặc tính sinh học của mô và giảm thiểu nguy cơ lây truyền tác nhân gây nhiễm. Ngoài áp dụng các tiêu chí để sàng lọc và lựa chọn, kết quả mẫu xét nghiệm phải âm tính để đảm bảo tối thiểu nguy cơ lây truyền bệnh truyền nhiễm, một số xét nghiệm vi sinh cũng được thực hiện, các mẫu thử phải âm tính với vi khuẩn và nấm tổng số. Đối với mẫu màng ối đông khô chúng tôi tạo được: có thể do màng ối bị nhiễm bởi hệ sinh vật âm đạo ở các ca sinh nở bình thường, do đó, cần tuyển chọn mẫu từ những sản phụ mổ đẻ, sinh một, đủ tháng, bảo đảm tiêu chuẩn xét nghiệm sàng lọc âm tính với HIV, HBV, HCV, giang mai... Màng ối sau khi đông khô được đóng gói, chiếu xạ, kiểm tra vô trùng bằng xét nghiệm vi sinh, kết quả đều cho âm tính với vi khuẩn và nấm tổng số. Kết quả sau khi nhuộm HE cho thấy, cấu trúc màng ối không thay đổi so với màng ối tươi. Như vậy, bằng phương pháp đông khô làm cho tinh thể nước được thăng hoa và chuyển thành thể khí. Phương pháp này giúp màng tế bào duy trì được kích thước và hình dạng tế bào ban đầu. Màng ối đông khô có thể được sử dụng bằng cách ngâm trong nước muối sinh lý trong 1 - 2 phút (*hình 2B*), màng ối vẫn trong suốt và giữ được đặc tính đàn hồi, co giãn.

Màng ối có nhiều đặc điểm và khả năng thích hợp để sử dụng trong kỹ thuật mô. Các lớp biểu mô của màng ối bao gồm những tế bào có đặc tính của TBG. Theo mô tả, những tế bào này biểu hiện dấu ấn của TBG vạn tiềm năng (pluripotent) và có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Tế bào biểu mô màng ối cũng là một nguồn cung cấp tế bào sử dụng trong công nghệ mô. Màng ối như một giá đỡ (scaffold)

và có các thành phần như collagen, fibronectin, laminin và proteoglycans khác, là thành phần quan trọng cho tế bào tăng trưởng. Màng ối tươi của người đã được chứng minh và xem như một nguồn cung cấp mô hay tế bào phù hợp trong cấy ghép dựa trên hiệu quả chống viêm và tính sinh miễn dịch thấp (Hao và CS, 2005; Niknejad H và CS, 2008) [7]. Màng ối người như một băng sinh học, được sử dụng trong nhiều thập kỷ qua với các tiện ích và đặc tính mong muốn trong ứng dụng điều trị bệnh giác mạc và tổn thương do bỏng.

Sử dụng màng ối tươi gặp khó khăn trong vận chuyển và lưu trữ, trước đây một số phương pháp đã được sử dụng để bảo quản như đông lạnh ở nhiệt độ thấp hoặc bảo quản trong glycerol ở nhiệt độ âm sâu, nhưng chỉ có thể lưu trữ trong vài tháng và đòi hỏi nhiều thiết bị đắt tiền, công kênh như tủ lạnh ở nhiệt độ thấp... Màng ối đông khô tạo được có thể khắc phục được nhược điểm này. Để đảm bảo vô trùng và an toàn cho sử dụng, việc khử trùng rất quan trọng. Tuy nhiên, liệu màng ối đông khô được khử trùng bằng chiếu xạ có giữ được đặc điểm sinh học hay không?

Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật HMMD để xác định biểu hiện một số dấu ấn của màng ối đông khô với các dấu ấn Ck5, vimentin, collagen tít I, Oct3/4, desmin. Màng ối và tế bào của màng ối người thường biểu hiện các dấu ấn biểu bì như Ca125 và dấu ấn biểu mô phổ biến như cytokeratin và biểu hiện dương tính với các dấu ấn như desmin, vimentin (Toda A và CS, 2007) [1]. Nghiên cứu của Ilancheran S và CS (2007) [5], tế bào biểu mô ở màng ối người biểu hiện dấu ấn của TBG như Oct4 (octamer binding protein 4), NANOG, SOX2 (SRY-related HMG-box gene 2) và REX-1 (Silvia Di'az-Prado và CS, 2011; Parolini và CS, 2009; Miki và CS, 2007, 2005, Toda và CS, 2007)

[1, 3, 4]. Kết quả hình 2 cho thấy các dấu ấn Ck5, vimentin, collagen tít I biểu hiện dương tính mạnh, Oct 3/4 dương tính nhưng yếu hơn, dấu ấn desmin cho kết quả âm tính. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu của các giả khác trên thế giới về đặc điểm của màng ối cũng như màng ối đông khô. Như vậy, màng ối sau khi đông khô, được chiếu xạ khử trùng, vẫn giữ được đặc tính sinh học và lý học. Màng ối đông khô tạo được rất nhẹ, dễ dàng vận chuyển và bảo quản. Kết quả bước đầu này mở ra một hướng mới trong tạo nguồn vật liệu sinh học cho lĩnh vực cấy ghép mô trong tương lai.

KẾT LUẬN

Đã tạo được tấm tế bào màng ối người đông khô, tấm tế bào sau khi chiếu xạ đảm bảo độ vô trùng và có biểu hiện dương tính với một số dấu ấn như vimentin, collagen tít I, Ck5, Oct4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ayaka Toda, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, Toshio Nikaido. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007, 105, pp.215-228.
2. Kiyotaka Kitagawa, Shuichiro Yanagisawa, Kazuhiko Watanabe, Tatsuya Yunoki, Atsushi Hayashi, Motonori Okabe, Toshio Nikaido. A hyperdry amniotic membrane patch using a tissue adhesive for corneal perforations and bleb leaks. *American Journal of Ophthalmology.* 2009, 148 (3), pp.383-389.

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

4. Silvia Di'az-Prado, Emma Muinos-Lo'pez, Tamara Hermida-Go'mez, Claudia Cicione, M Esther Rendal-Va'zquez, Isaac Fuentes-Boquete, Francisco J De Toro, Francisco J Blanco. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation.* 2011, 1, pp.162-171.

5. Ilancheran. S, Michalska. A, Peh. G, Wallace. EM, Pera. M, Manuelpillai. U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod.* 2007, 77, pp.577-588.

6. Parolini. O, Soncini. M, Evangelista. M, Schmidt. D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine. *Regen Med.* 2007, 4, pp.275-291.

7. Niknejad. H, Peirovi. H, Jorjani. M, Ahmadiani. A, Ghanavi. J, Seifalian. AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008, 15, pp.88-99.

8. Insausti. CL, Blanquer. M, Bleda. P, Iniesta. P, Majado. MJ, Castellanos. G, Moraleda. JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histo-pathol.* 2010, 25, pp 91-98.

9. Haochuan. Li, Jerry. Y Niederkorn, Sudha Neelam, Elizabeth Mayhew, R Ann Word, James P McCulley, Hassan Alizadeh. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *IOVS.* 2005, 46 (3).

10. G. Saraswathy, SE. Noorjahan, S. Chinni Krishnan, Ganga Adhkrishnan, TP. Sastry. Preparation of hydrogels using human amniotic membrane and their characteratation. *Trends Biomater Artif Organs.* 2004, 17 (2), pp.31-36.

Ngày nhận bài: 16/5/2012

Ngày giao phản biện: 26/7/2012

Ngày giao bản thảo in: 31/8/2012

