

PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TỪ MÀNG ỒI NGƯỜI: TÁC DỤNG CỦA MỘT SỐ ENZYM PHÂN CẮT MỀ VÀ BIỂU HIỆN DẤU ẤN OCT-4 CỦA TẾ BÀO GỐC MÀNG ỒI

*Phạm Văn Trân**; *Đỗ Minh Trung***; *Nguyễn Bảo Trân***
*Dương Thị Tuyết****; *Nguyễn Văn Hòa*****; *Trần Ngọc Tuấn***

TÓM TẮT

Tế bào gốc (TBG) là những tế bào chưa biệt hoá, có khả năng trở thành tế bào chuyên biệt và có chức năng mới tương ứng. Tiến hành phân lập tế bào bằng trypsin, collagenase B, percoll với tỷ trọng khác nhau. Xác định TBG bằng dấu ấn OCT-4. Kết quả: quy trình tách phân lập TBG từ màng ối đạt hiệu quả cao, tế bào thu được có biểu hiện dấu ấn của TBG.

* Từ khóa: Màng ối; Tế bào gốc; Trypsin; Collagenase B; Hyaluronidase.

ROLE OF PROTEASES DURING ISOLATION OF AMNIOTIC MEMBRANE STEM CELLS AND EXPRESSION OF OCT-4 BY THESE CELLS

SUMMARY

The amniotic membrane stem cell can differentiate into different mature cells. We isolated stem cell by trypsin, percoll and characterised its by marker OCT-4. Results: Protocol for isolation of stem cells from amniotic membrane had high efficiency. Amniotic membrane stem cells collected express OCT-4, stem cell markers. Amniotic stem cells can be isolated from amniotic membrane by trypsin, collagenase B and percoll.

* *Key words: Amniotic membrane; Stem cells; Trypsin; Collagenase B; Hyaluronidase.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc là tế bào nền móng của tất cả tế bào, mô và cơ quan trong cơ thể, đây là những tế bào chưa biệt hoá, nhưng có khả năng trở thành tế bào chuyên biệt và có chức năng mới tương ứng [1, 2]. Dựa vào nguồn gốc, TBG được phân chia thành 4 loại: TBG phôi (Embryonic stem cells) và tế bào

mầm phôi (Embryonic germ cells), TBG thai (Foetal stem cells), TBG trưởng thành (Adult stem cells/Somatic stem cells). Dựa vào đặc tính hay mức độ biệt hoá, TBG được chia thành: TBG toàn năng hay TBG thủy tổ (totipotent stem cells), TBG vạn năng (pluripotent stem cells), TBG đa năng (multipotent stem cells), TBG đơn năng (mono/unipotential progenitor cells).

* Bệnh viện 103

* Học viện Quân y

** Bệnh viện Bạch Mai

*** Viện 17

Phản biện khoa học: GS. TS. Hoàng Văn Lương

TS. Lê Văn Đông

Màng ối là một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở, là một nguồn cung cấp TBG lý tưởng [3]. Sử dụng TBG màng ối không gặp phải những vấn đề về đạo đức, xã hội [4]. TBG 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 TBG từ màng ối người, phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

* *Thiết bị:*

- Tủ ấm nuôi cấy tế bào 37⁰C, 5% CO₂ (Forma, Mỹ).

- Tủ hotte vô trùng (Sanyo, Nhật), máy ly tâm lạnh.

- Kính hiển vi đối pha có gắn hệ thống truyền hình ảnh kết nối với máy tính (Olympus 30, Nhật).

- Dụng cụ tiêu hao: màng lọc 100 µm, pipette 1 ml, 5 ml, 10 ml, đĩa petri đường kính 10 cm, 6 cm.

* *Hóa chất:*

- Dung dịch dung phân lập tế bào: trypsin, collagenase B, hyaluronidase, percoll (Sigma, Việt Nam), PBS.

- Môi trường nuôi cấy: DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco); soybean trypsin inhibitor (Gibco); huyết thanh bào thai bê (Gibco); axit amin không cần thiết (Gibco), penicillin, streptomycin.

2. Quy trình phân lập TBG từ màng ối.

30 màng ối của sản phụ mổ đẻ, bảo đảm tiêu chuẩn xét nghiệm sàng lọc âm tính với HIV, HBV, HCV, HTLV và giang mai được sử dụng để phân lập tế bào. Vận chuyển màng ối trong dung dịch PBS vô khuẩn về trung tâm nghiên cứu. Cho các mảnh màng

ối có kích thước 1 cm² vào các tuýp 50 ml chứa enzym phân cắt mô trypsin 0,02%, collagenase B 0,1%, hyaluronidase 0,1% [5, 6]. Để tuýp ở nhiệt độ 37⁰C cho tới khi các mảnh màng ối tan rã hoàn toàn. Lọc dung dịch qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 100 µm. Ly tâm với percoll 40,8% và 50,8% (Sigma, Việt Nam) để thu khối tế bào có tỷ trọng khác nhau [5, 6]. Nuôi cấy tế bào thu được trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin (2 x 10⁻³M), huyết thanh bào thai bê (10%), đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần/lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

- Bảo quản TBG màng ối trong điều kiện lạnh âm sâu (-196⁰C) trong môi trường DMEM có 10% DMSO.

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

Tách chiết ARN tổng số từ các tế bào (Kit-Qiagen), sau đó tổng hợp cADN từ ARN tổng số (Kit-Fermentas). Phản ứng PCR định lượng thực hiện trên máy LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) sử dụng kit QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR (Qiagen).

Bảng 1: Các môi dùng để chạy RT-PCR.

18S rARN	Sens : 5'-TGAGAAACGGCTACCCACATC-3'
	Anti-sens : 5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGT-3'
Oct-4 octamer-binding transcription factor 4	Sens : 5'-AGGTGTTTCAGCCAAACGACC-3'
	Anti-sens : 5'-TGATCGTTTGCCCTTCTGGC-3'

Sau khi làm biến tính cADN 15 phút ở 95⁰C, thực hiện 40 - 50 chu kỳ PCR (15 giây: 95⁰C, 25 giây: 58⁰C và 20 giây: 72⁰C). Điện di sản phẩm PCR trên gel acrylamid. Tính toán nồng độ ARNtt của dấu ấn OCT-4 dựa trên nồng độ ARNtt của gen 18S.

4. Kỹ thuật hóa miễn dịch tế bào.

Cố định tế bào trên đĩa nuôi cấy bằng etanol 98%, sau đó được ủ với kháng thể thứ

nhất kháng OCT-4. Kháng thể thứ hai 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 TBG màng ối.

Các enzym khác nhau có thời gian tác dụng khác nhau lên quá trình phân rã các mảnh màng ối, giải phóng tế bào.

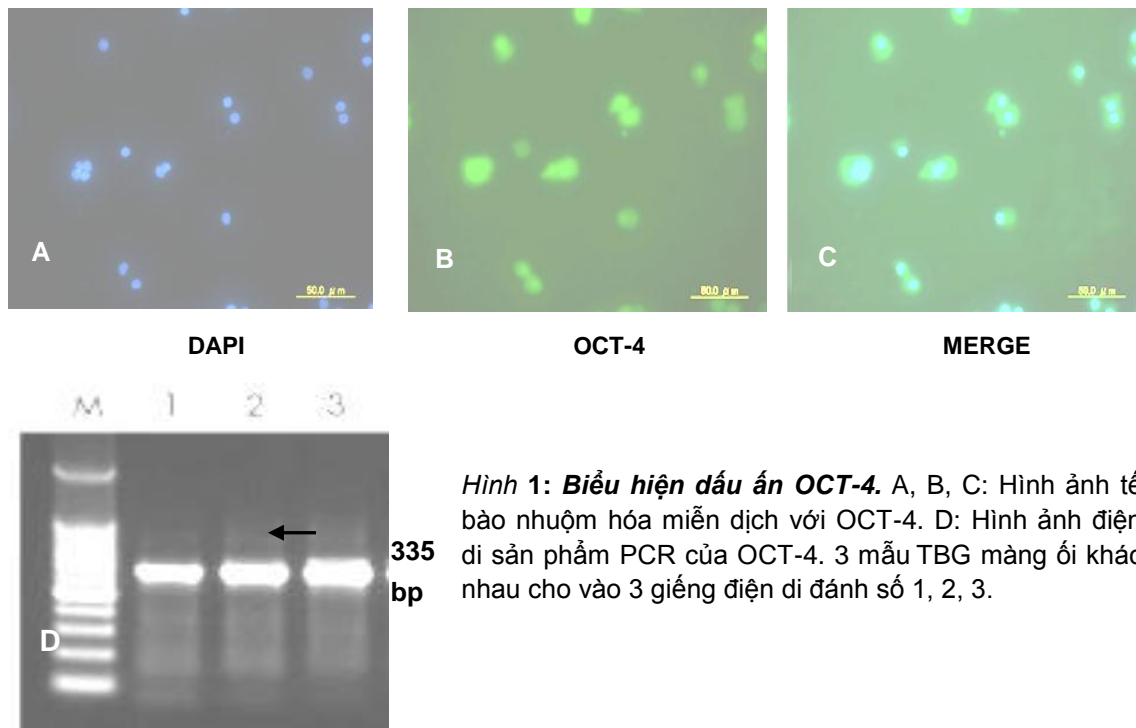
Bảng 2: Thời gian tác dụng của enzym phân cắt mô.

	(phút)
Trypsin 0.2%	45 ± 10
Collagenase B 0,1%	50 ± 10
Trypsin 0.2% + collagenase B 0,1% (tỷ lệ 1:1)	20 ± 10
Hyaluronidase 0,6%	Không tác dụng

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

2. Biểu hiện dấu ấn OCT-4 của TBG màng ối.

Kết quả PCR cho thấy, TBG có biểu hiện dấu ấn OCT-4, phù hợp với kết quả nhuộm hóa miễn dịch tế bào với kháng thể kháng OCT-4 của người.



Hình 1: Biểu hiện dấu ấn OCT-4. A, B, C: Hình ảnh tế bào nhuộm hóa miễn dịch với OCT-4. D: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của OCT-4. 3 mẫu TBG màng ối khác nhau cho vào 3 giếng điện di đánh số 1, 2, 3.

BÀN LUẬN

1. Quy trình phân lập và nuôi cấy tăng sinh TBG màng ối.

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

Về phân tách TBG từ màng ối bằng enzym: nếu chỉ phân cắt màng ối bằng trypsin, số lượng tế bào thu được thấp và thời gian phải kéo dài, có khi mất 60 phút các tế bào biểu mô màng ối mới bị phân cắt hết. Nếu cho thêm collagenase B vào trypsin, 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 (bảng 2).

TBG được nuôi cấy trong đĩa plastic đường kính 10 cm, với môi trường DMEM glucose cao có thêm 10% FBS + 1% penicilline-streptomycine + 1% L-glutamate, trong tủ nuôi cấy HEPA-NUAIRE ở 37°C, không khí có 5% CO₂, độ ẩm bão hòa. Ngay sau khi nuôi cấy 24 giờ, các TBG 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, cấy chuyển nhằm cung cấp đủ chất dinh dưỡng và đảm bảo không gian cho tế bào tăng sinh. Kết quả nuôi cấy và môi trường nuôi cấy cũng tương tự như kết quả các nghiên cứu khác.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 30 mẫu màng ối, đã phân lập thành công TBG

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 cuống rốn, còn vị trí vùng rìa càng xa cuống rốn, thu được ít tế bào hơn.

2. Định danh TBG màng ối.

- Các tế bào màng ối biểu hiện nhiều marker TBG như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3β (HNF-3β)... [7, 8]. Những yếu tố này cho thấy không chỉ TBG biểu mô màng ối, mà còn cả TBG trung mô màng ối cũng là TBG đa tiềm năng [9]. Chúng tôi định danh TBG 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 TBG. Trong khuôn khổ của đề tài, chúng tôi chỉ xác định biểu hiện của marker OCT-4, là marker biểu hiện tính gốc của tế bào.

Việc xác định tính gốc của TBG màng ối bằng OCT-4 đã được nhiều tác giả sử dụng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định sự thay đổi của marker OCT-4 trong quá trình nuôi cấy. Kết quả cho thấy, marker OCT-4 giảm dần theo thời gian. Trong thời gian nuôi cấy TBG màng ối, mặc dù đã cố gắng đảm bảo những điều kiện tốt nhất cho nuôi cấy, như thời gian phân lập TBG 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, CO₂ 5% luôn ổn định, bảo đảm vô trùng, nhưng cũng chỉ nuôi cấy TBG màng ối được trong khoảng 30 - 40 ngày.

KẾT LUẬN

Sử dụng enzym phân cắt mô trypsin 0,2% và collagenase B 0,1% (tỷ lệ 1:1) cho hiệu

quả tối ưu trong quá trình phân lập tế bào từ màng ối. Đã thành công trong xây dựng quy trình phân lập tế bào từ màng ối người và nuôi cấy tăng sinh được TBG màng ối trong môi trường DMEM glucose cao có thêm 10% FBS và penicilline-streptomycine thành công. TBG màng ối người biểu hiện dấu ấn OCT-4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Văn Bé*. Tình hình ghép TBG tại TP. Hồ Chí Minh Việt Nam. *Y học Việt Nam*, số 5/2006, tr.1-4.

2. *Nguyễn Thị Thu Hà*. TBG và ứng dụng trong y sinh học. *Tạp chí Nghiên cứu Y dược học*, phụ bản 32. 2004, 6, tr.13-26.

3. *Phan Kim Ngọc và CS*. Thu nhận TBG trung mô đa năng từ máu cuống rốn người. *Tạp chí Y - Dược học quân sự*. 2008, 33 (2), tr.119-124.

4. *Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định*. Công nghệ TBG. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam. 2009.

5. *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.

6. *Toshio Miki, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, Stephen C. Stroma*. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005, 23, pp.1549-1559.

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

8. *Ben Num IF, Benvenisty*. Human embryonic stem cells as cellular model for human disorder. *Mol Cell Endocrinol*. 2006.

9. *Ayaka Toda, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, and Toshio Nikaido*. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 2007, 105, pp.215-228.

