

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TĂNG SINH VÀ BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẠO CỤM

Nguyễn Quang Tùng*, Trần Công Hoàng**,
Trần Thị Mỹ Dung*, Nguyễn Anh Trí **, Đỗ Trung Phần*

TÓM TẮT

Tế bào gốc (TBG) tạo máu-có khả năng tăng sinh và biệt hoá thành các tế bào máu, được thu gom từ tủy xương, từ máu dây rốn hay từ máu ngoại vi sau huy động. **Mục tiêu:** Nghiên cứu khả năng tăng sinh và biệt hoá của TBG tạo máu sau thu gom từ tủy xương, từ máu dây rốn và từ máu ngoại vi sau huy động bằng G-CSF. **Phương pháp:** Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm trong môi trường methylcellulose có bổ sung các yếu tố kích thích tạo máu. Đếm và xác định số lượng, loại cụm tế bào hình thành. **Kết quả và bàn luận:** Số cụm đa dòng (CFU-GEMM) của mẫu tủy xương đạt cao nhất (20.3%), tiếp đến là máu dây rốn (9.4%) và thấp nhất là mẫu máu ngoại vi sau huy động (2.5%). **Kết luận:** Phương pháp nuôi cấy tạo cụm có thể dùng để đánh giá khả năng tăng sinh và biệt hoá của tế bào gốc tạo máu.

Từ khoá: Tế bào gốc tạo máu, tăng sinh và biệt hoá, nuôi cấy tạo cụm.

SUMMARY:

Studying Proliferation and differentiation of Hemopoietic stem cells from peripheral blood, bone marrow and cord blood

Hematopoietic stem cells (HSC)-with the capacity of proliferation and differentiation into all functional blood cells-can be collected from bone marrow, umbilical cord blood and from mobilized peripheral blood as well. **Objective:** Assessment of the proliferation and differentiation of HSCs. **Method:** Using colony assay in Methylcellulose supported with colony-forming stimulating factors. Count and identify the colony after two weeks of culture. **Results**

and discussion: The percentage of CFU-GEMM is highest with bone marrow samples (20.3%), and then cord blood sample (9.4%) and mobilized peripheral blood samples (2.5%).

Conclusion: Colony assay can be use for assessment of the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells.

Keywords: Hematopoietic stem cell, proliferation and differentiation, colony assay.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đặc trưng của tế bào gốc tạo máu là khả năng tự tái tạo (self-renewal), biệt hoá thành các tế bào máu trưởng thành. Kết quả thực nghiệm cho thấy các tế bào này tạo thành các cụm (colony) của các dòng tế bào máu bằng kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm tế bào (colony assay) và có thể tái tạo mô tạo máu thực nghiệm trên động vật sau khi chiếu xạ liều chí tử [6].

Bình thường, tỷ lệ tế bào gốc tạo máu-có dấu ấn CD34-thường rất thấp, khoảng 1 tế bào trong tổng số từ 10^4 đến 10^6 tế bào có nhân tủy xương, và hầu hết ở trạng thái nghỉ, không phân bào. Tỷ lệ này còn thấp hơn khi khảo sát máu dây rốn và hầu như không có ở máu ngoại vi trong điều kiện bình thường [3].

Số lượng tế bào mang dấu ấn CD34 là một trong các chỉ số quan trọng nhất để xác định liều tế bào gốc tạo máu sử dụng cho ghép tự thân hay đồng loại. Nhiều nghiên cứu đã xác định liều tối thiểu để đảm bảo mọc ghép tốt là 2.10^6 CD34/kg thể trọng người nhận đối với ghép tự thân, trong khi

* Trường đại học Y Hà Nội

** Viện Huyết học-Truyền máu trung ương

đó, để ghép đồng loại, liều tế bào cần sử dụng khoảng $2-4.10^6/\text{kg}$ [5,6]. Tuy nhiên, không phải tất cả những tế bào mang dấu ấn CD34 đều có đặc tính của tế bào gốc tạo máu, do vậy, kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm được sử dụng như một biện pháp để xác định chính xác hơn quần thể tế bào gốc tạo máu có khả năng tăng sinh và biệt hóa in vitro [6]. Kết quả khảo sát khả năng tạo cụm tế bào cũng được coi là một trong những chỉ số quan trọng để tính liều tế bào gốc sử dụng cho ghép.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát khả năng tăng sinh và biệt hóa của tế bào gốc tạo máu in vitro bằng kỹ thuật nuôi cấy trong môi trường methylcellulose bán lỏng, có bổ sung đầy đủ các yếu tố kích thích tạo cụm đa dòng và đơn dòng, với các nguồn tế bào gốc được thu gom từ tủy xương, từ máu dây rốn và từ máu ngoại vi sau huy động bằng yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch cầu hạt (G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

a. Các mẫu tế bào gốc thu gom từ máu ngoại vi :

- 10 đơn vị tế bào thu gom từ máu ngoại vi có huy động bằng Filgrastim (Leukokin, Hàn Quốc). Thu gom bằng máy

tế bào tự động trên máy COBE-Spectra với bộ kit và quy trình chuẩn của hãng sản xuất (Gambro, Mỹ), theo quy trình đã mô tả [2].

b. Các mẫu tủy xương và máu dây rốn:

- 10 mẫu dịch hút tủy xương, thu gom từ gai chậu sau trên của những người cho tình nguyện, khỏe mạnh, tuổi từ 22 đến 41.

- 20 mẫu máu dây rốn có thể tích ≥ 90 ml, thu gom theo quy trình đã mô tả [1].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Các mẫu nghiên cứu sau khi thu gom được tiến hành khảo sát các chỉ số tế bào máu, số lượng tế bào CD34 và tiến hành nuôi cấy tạo cụm.

- Các chỉ số tế bào máu được xác định trên máy đếm tế bào laser XT-2000i (Sysmex, Nhật Bản) tại Labo Tế bào-Tổ chức học, Viện Huyết học-Truyền máu quốc gia.

- Tế bào CD34 được xác định trên máy FACS Callibur (Becton-Dickinson, Mỹ) tại Khoa Huyết học, bệnh viện TW Quân đội 108.

- Khả năng tăng sinh và biệt hóa của tế bào gốc tạo máu: sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tạo colony bằng môi trường Methylcellulose có bổ sung sẵn các yếu tố kích thích (Stem Cells, Canada). Kỹ thuật được tiến hành theo quy trình của hãng cung cấp sinh phẩm, thời gian nuôi cấy 2 tuần, tại Labo Di truyền, Viện Huyết học-Truyền máu quốc gia.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả thu gom tế bào gốc tạo máu

3.1.1. Các chỉ số bạch cầu và CD34

Các tế bào CD34 là chỉ số hiện được sử dụng phổ biến nhất trong định liều tế bào gốc tạo máu cho ghép. Số lượng tế bào CD34 được sử dụng để ghép càng nhiều, tỷ lệ ghép thành công càng cao, và thời gian mọc ghép càng rút ngắn. Bên cạnh đó, số lượng bạch cầu, tế bào đơn nhân (Mono nucleated cells: MNC) cũng được sử dụng để ước lượng liều tế bào cần cho ghép, đặc biệt có ích trong quá trình thu gom tế bào gốc từ tủy xương hay từ máu dây rốn.

Bảng 1. Các chỉ số bạch cầu và CD34 từ các nguồn cung cấp

	Máu ngoại vi (n=10)	Tủy xương (n=10)	Máu dây rốn (n=20)
Bạch cầu (G/l)	238.5 ± 57.6	26.8 ± 7.0	12.6 ± 2.9
Tỷ lệ % MNC	67.8 ± 5.8	64.2 ± 5.5	63.6 ± 10.4
Số lượng MNC (G/l)	161.2 ± 38.4	17.2 ± 5.6	8.1 ± 3.2
Tỷ lệ % CD34	0.37 ± 0.16	0.29 ± 0.08	0.12 ± 0.04
Số lượng CD34 (10 ³⁶ /ml)	0.89 ± 0.41	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.03
Số cụm /10 ⁵ tế bào	242 ± 37	306 ± 42	160 ± 24

Sử dụng máy tách COBE-Spectra (Gambro, Mỹ), chúng tôi thu được số lượng bạch cầu đạt 238.5 ± 57.6 G/l. Tỷ lệ tế bào CD34 trong sản phẩm đạt $890 \pm 410 \times 10^3$ /ml. Sato và cộng sự sử dụng cùng loại máy tách tiến hành thu gom trên người cho tình nguyện cũng thu được kết quả tương tự [7].

Tỷ lệ bạch cầu đơn nhân trong các mẫu thu gom được đạt trên 60%. Số lượng ở mẫu máu ngoại vi huy động đạt 161.2 ± 38.4 G/l, ở mẫu tủy xương đạt 17.2 ± 5.6 G/l và ở mẫu máu dây rốn đạt 8.1 ± 3.2 G/l. Đây là chỉ số có ý nghĩa trong việc đánh giá chất lượng của mẫu tế bào gốc sử dụng cho ghép và một số

tác giả đề xuất và sử dụng liều 2.10^8 tế bào đơn nhân/kg cân nặng người nhận [3].

Tỷ lệ và số lượng tế bào CD34 đạt cao nhất ở các mẫu thu gom từ máu ngoại vi ($0.37 \pm 0.16\%$ tương đương $0.89 \pm 0.41 \cdot 10^6$ CD34/ml), và thấp nhất ở các mẫu thu gom từ máu dây rốn ($0.12 \pm 0.04\%$ tương đương $0.15 \pm 0.03 \cdot 10^6$ CD34/ml).

Tổng số cụm (colony) tạo thành từ 10^5 tế bào của từng mẫu nghiên cứu đạt nhiều nhất là từ tủy xương (306 ± 42 cụm), tiếp đến là các mẫu máu ngoại vi huy động (242 ± 37 cụm) và thấp nhất là máu dây rốn (160 ± 24 cụm).

3.1.2. Kết quả nuôi cấy tạo colony tế bào

Tiến hành cấy 10^5 tế bào của từng mẫu trên môi trường Methylcellulose có bổ sung các yếu tố kích thích tạo máu, mỗi mẫu cấy trong 3 đĩa petri, chúng tôi xác định các loại cụm tế bào được hình thành sau 2 tuần, kết quả được trình bày trong bảng 2, biểu đồ 1 và hình 1 như sau:

Bảng 2. Số lượng các cụm đa dòng, đơn dòng từ các nguồn cung cấp

	Máu ngoại vi (n = 5)		Tủy xương (n = 5)		Máu dây rốn (n = 10)	
	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%
CFU - GEMM	6	2.5%	62	20.3%	15	9.4%
CFU - GM	48	19.8%	48	15.7%	21	13.1%
BFU - E	89	36.8%	122	39.9%	73	45.6%
CFU - G	90	37.2%	44	14.3%	43	26.9%
CFU - M	9	3.7%	30	9.8%	8	5.0%
Số colony/10 ⁵ tế bào	242	100%	306	100%	160	100%

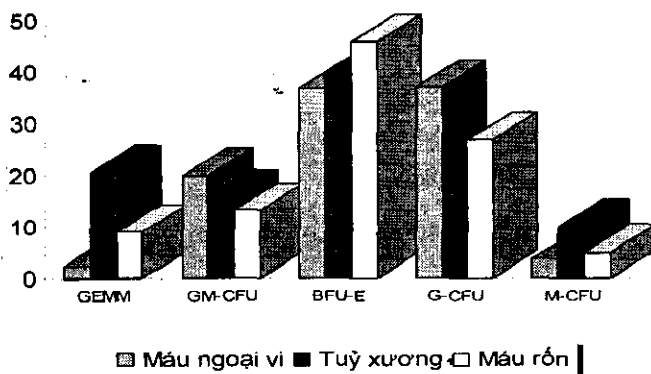
- Cụm đa dòng (CFU - GEMM) cao nhất ở dịch hút tủy xương (20.3%), tiếp đến là MCR (9.4%) và máu huy động (2.5%).

- Cụm dòng bạch cầu hạt và mono (CFU - GM) xuất hiện nhiều nhất ở máu huy động (19.8%), tiếp theo là tủy xương (15.7%) và MCR (13.1%).

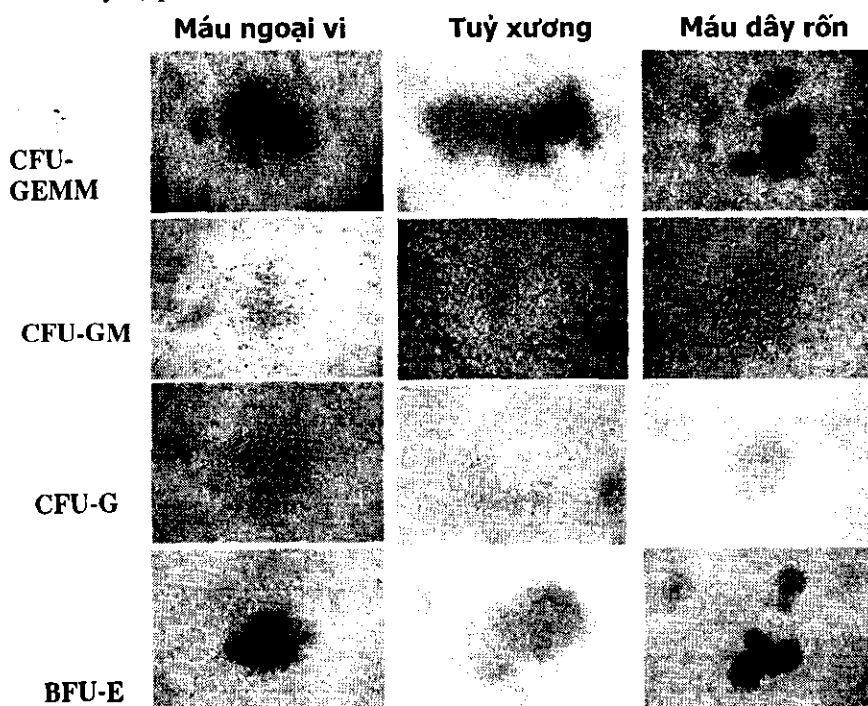
- Cụm dòng bạch cầu hạt (CFU-G) cao nhất ở mẫu máu ngoại vi huy động (37.2%), tiếp

đến là máu dây rốn (26.9%) và thấp nhất là tủy xương (14.3%).

- Cụm dòng hồng cầu (BFU-E) cao nhất ở mẫu máu dây rốn (45.6%), tiếp đến là tủy xương (39.9%) và thấp nhất là máu ngoại vi huy động (36.8%).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ phần trăm các loại colony tế bào từ các nguồn cung cấp



Hình 1. Các loại colony tế bào từ 3 nguồn cung cấp

IV. KẾT LUẬN

Qua khảo sát các mẫu nghiên cứu chúng tôi có những kết luận sau:

- Tỷ lệ tế bào CD34 đạt cao nhất ở máu ngoại vi thu gom sau huy động bằng G-CSF

($0.37 \pm 0.16\%$), tiếp đến là tủy xương ($0.29 \pm 0.08\%$) và máu dây rốn ($0.12 \pm 0.04\%$).

- Về khả năng tạo cụm:

+ Tạo cụm đa dòng (CFU-GEMM) của mẫu tủy xương đạt cao nhất (20.3%), tiếp

đến máu dây rốn (9.4%) và máu ngoại vi huy động (2.5%).

+ Tạo cụm hỗn hợp dòng hạt-mono (CFU-GM) cao nhất là các mẫu máu ngoại vi huy động (19.8%), tiếp đến là tủy xương (15.7%) và thấp nhất là máu dây rốn (13.1%).

+ Tạo cụm dòng bạch cầu hạt (CFU-G) cao nhất ở mẫu máu ngoại vi huy động (37.2%), tiếp đến là máu dây rốn (26.9%) và thấp nhất là tủy xương (14.3%).

+ Tạo cụm dòng hồng cầu (BFU-E) cao nhất ở mẫu máu dây rốn (45.6%), và thấp nhất ở máu ngoại vi huy động (36.8%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Thị Mỹ Dung, Nguyễn Quang Tùng, Đỗ Trung Phần.* Nghiên cứu xây dựng quy trình thu gom tế bào gốc tạo máu từ máu rốn đạt hiệu quả cao", Tạp chí nghiên cứu Y học. 2007 (49): 69-72.

2. *Nguyễn Quang Tùng, Nguyễn Anh Trí, Đỗ Trung Phần.* Kết quả thu hoạch tế bào CD34 máu ngoại vi của người trưởng thành khỏe mạnh sau huy động bằng G-CSF sử dụng cho ghép tủy đồng loài. Tạp chí nghiên cứu Y học. 2006 (47): 13-19.
3. *Đỗ Trung Phần.* Tế bào gốc. Tế bào gốc và bệnh lý tế bào gốc tạo máu. NXB Y học (2009): 4-20.
4. *Claudio G. Brunstein and John E. Wagner.* Umbilical cord blood transplantation. In the Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. 2009, 1643-1664.
5. *Larghero J, Garcia J, Gluckman E.* Sources and procurement of stem cells. In the Hematopoietic Stem cell Transplantation. 5th ed. 2008: 112-127.
6. *Mervin C. Yoder.* Overview of stem cell biology. In the Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. 2009, 187-199.
7. *Sato N, Sawada K, Takahashi TA et al.* A time course study for optimal harvest of peripheral blood progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. Exp. Hematol. 1994, 22 (10): 973-8.

CAN THIỆP DINH DƯỠNG NÂNG CAO SỨC KHOẺ TRẺ EM DỰA TRÊN GIÁO DỤC BÀ MẸ CẢI THIẾN THÓI QUEN DINH DƯỠNG

*Phạm Xuân Anh**

TÓM TẮT

Một can thiệp dinh dưỡng tổng thể để nâng cao sức khỏe trẻ em theo chỉ số chiều cao và cân nặng đã được thiết kế dựa trên việc giáo dục bà mẹ nhằm cải thiện thói quen dinh dưỡng bao gồm cả kiến thức và thực hành cho toàn bộ quá trình từ nhận thức đến hành vi và thói quen. Thiết kế là một nghiên cứu đánh giá trước sau đối chứng can thiệp. Theo dõi hàng tháng cân nặng và chiều cao của 208 trẻ trong nhóm can thiệp và 256 trẻ trong nhóm đối chứng để đánh giá bằng phương pháp phân tích hồi quy. Kết quả cho thấy cân nặng và chiều cao trung bình hàng tháng ở các nhóm can thiệp phân bố theo đường hồi quy tuyến tính tăng dần còn mức tăng hàng tháng của cân nặng và chiều cao ở

các nhóm đối chứng lại giảm dần. Hệ số góc B dương của chiều cao và cân nặng ở tất cả các nhóm can thiệp cao hơn ở các nhóm đối chứng và hệ số góc B âm của tăng chiều cao và cân nặng của các nhóm can thiệp lại thấp hơn của các nhóm chứng. Điều này có nghĩa là nhóm can thiệp tăng nhiều cân nặng và chiều cao hơn nhóm đối chứng đồng thời giảm sự mất đi trong tăng cân nặng và chiều cao.

SUMMARY

Nutritional intervention to enhance child health based on education of mothers for improving their nutritional habit

A comprehensive nutritional intervention to enhance child health on indicators of weight and

* Trung tâm CSSK sinh sản Hà Nội