

kiểm soát đường huyết chưa tốt (HbA1c \geq 7%, n = 216), với r = 0,14, và p < 0,01

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thành Công, Nguyễn Thy Khuê, “Hội chứng chuyển hoá ở bệnh nhân đái tháo đường type 2”, Kỷ yếu toàn văn các đề tài khoa học, Tạp chí Y học thực hành số 507 – 508, 2005; trang 331 – 340.
2. Hồ Trường Bảo Long, Huỳnh Đức Thanh, Huỳnh Bá Minh Hoàng, “Khảo sát mối liên quan giữa HbA1C với bilan lipid ở bệnh nhân ĐTĐ type2”, báo cáo toàn văn tại hội nghị khoa học bệnh viện đa khoa tỉnh Lâm Đồng 2010.
3. Thượng Thị Ngọc Thảo, “Đánh giá nồng độ huyết sắc tố HbA1C trên bệnh nhân đái tháo đường type 2 mới chẩn đoán tại BVĐK Bình Dương”, báo cáo toàn văn tại Hội nghị khoa học bệnh viện đa khoa Bình Dương 2007.
4. Nguyễn Bá Việt, Hoàng Trung Vinh, “Nghiên cứu nồng độ HbA1c ở bệnh nhân đái tháo đường type 2”, Kỷ yếu toàn văn các đề tài khoa học, Tạp chí Y học thực hành số 507 – 508, 2005; trang 628 – 632.
5. Delamater Alan M. (2006), “Clinical use of hemoglobin A1c to improve diabetes management”, Clinical Diabetes, Vol. 24, No. 1, pp 6 – 8
6. Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes – 2010 (01/2010), Diabetes Care, Vol. 33, No. Supplement 1, s4 – s10.
7. Haseeb Ahmad Khan (2007), “Clinical significance of HbA1c as a marker of circulating lipids in male and female type 2 diabetic patient”, Acta Diabetologica, Vol. 44, No. 4.
8. Heisler M., Piette John D., Spencer M., Kieffer E., Vijan S. (2005), “The relationship between knowledge of recent HbA1c values and diabetes care understanding and self-management”, Diabetes Care, vol. 28, No. 4, pp 816 – 822.

PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC MÀNG ỒI THÀNH TẾ BÀO GAN VÀ TẾ BÀO BETA

Phạm Văn Trân¹, Đỗ Minh Trung¹,
Nguyễn Duy Bắc¹, Trần Hải Anh¹, Toshio Nikaido².

TÓM TẮT

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành các tế bào trưởng thành khác nhau. Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu qui trình phân lập, nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan và tế bào beta tụy đảo. Phương pháp nghiên cứu: tách tế

bào bằng trypsin, percoll với tỷ trọng khác nhau. Nuôi cấy định hướng biệt hóa bằng môi trường DMEM có bổ sung insulin, hydrocortison, nicotinamide, β -mercaptoethanol và các yếu tố sinh trưởng. Xác định tính gốc của tế bào gốc bằng dấu ấn OCT-4. Xác định khả năng biệt hóa thành tế bào gan bằng dấu ấn albumin, CYP3A4

1: Học viện quân y.

2: Khoa y học tái tạo, Đại học Toyama, Nhật Bản

và thành tế bào beta tụy bằng dấu ấn insulin. Kết quả: qui trình tách phân lập tế bào gốc từ màng ối đạt hiệu quả cao, dấu ấn biệt hóa tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Kết luận: Tế bào gốc tách từ màng ối có thể nuôi cấy định hướng biệt hóa thành tế bào giống tế bào gan và giống tế bào β tụy đảo để phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.

Từ khóa: Màng ối, tế bào gốc, tế bào gan, tế bào beta.

SUMMARY

Isolation and differentiation of amniotic stem cells into hepatocytes and into beta pancreatic cells.

The amniotic stem cell can differentiate into different mature cells. The aim of study is to examine the process of isolating, culturing and differentiating stem cells into hepatocytes and beta cells. Method: We isolated stem cell by trypsin, percoll and characterised its by markers OCT-4 and differentiated its into hepatocytes and beta cells by treating the cells with insuline, hydrocortisone, nicotinamide, β -mercaptoethanol and different grow factors. Results: Protocol for isolation of stem cells from amniotic membrane has high efficiency. Differating markers such as albumin, CYP3A4, insulin was determined by RT-PCR technique increase over time in culture. Conclusion: Amniotic stem cells can differentiate into like-hepatocytes and like-beta cells.

Keywords: Amniotic membrane, stem cells, hepatocytes, beta cells.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong một số bài báo đăng trên các tạp chí trong nước và quốc tế trước đây chúng tôi đã công bố kết quả nghiên cứu quá trình biệt hóa của tế bào gốc trưởng thành thành tế bào gan. Hiện nay nhiều trung tâm nghiên cứu trên thế giới đã thành công trong việc sử

dụng tế bào gốc trưởng thành, tế bào gốc thai nhi để biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau phục vụ cho cấy ghép. Tuy nhiên nguồn tế bào này có hạn và thường gặp nhiều tranh cãi về vấn đề đạo đức.

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 tế bào gốc từ màng ối người đồng thời nghiên cứu khả năng biệt hóa thành tế bào beta của tuyến tụy nhằm mục đích có thể sử dụng tế bào này sản xuất insulin hoặc sử dụng cho cấy ghép.

II. 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 đẻ bảo đảm tiêu chuẩn xét nghiệm sàng lọc âm tính với HIV, HBV, HCV, HTLV và giang mai. Tiến hành tách tế bào bằng trypsin 0.02%, percoll 40,8% và 50,8% (Sigma, Vietnam). Tế bào gốc màng ối được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), L-glutamin (2×10^3 M), huyết thanh bào thai bê (10%) đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần một lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan bằng bằng môi trường định hướng biệt hóa sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 5 μ g/ml insulin, 1 μ M hydrocortison. Biệt hóa thành tế bào beta bằng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 10 mM

nicotinamide, 55 μ M β - mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate.

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[®] SYBR[®] 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.

<i>18S rRNA</i>	<i>Sens</i> : 5'-TGAGAAACGGCTACCACATC-3'
	<i>Anti-sens</i> : 5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGT-3'
<i>Insulin</i>	<i>Sens</i> : 5'-TGGTGCAGGCAGCCTGCAG-3'
	<i>Anti-sens</i> : 5'- GTTCAAGGGCTTTATTCCATCTCTC-3'
Albumin	<i>Sens</i> : 5' – AAATCCCACTGCATTGCCGAAGTG – 3'
	<i>Anti-sens</i> : 5' – AGGAAGACATCCTTTGCCTCAGCA – 3'
Cytochrom P450 (CYP3A4)	<i>Sens</i> : 5' – TGCTCTTCACCGTGACCCAAAGTA – 3'
	<i>Anti-sens</i> : 5' – AGAGCAAACCTCATGCCAATGCAG – 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). Nồng độ ARNm của từng dấu ấn nghiên cứu được tính toán dựa trên nồng độ ARNm của gen 18S.

3. Kỹ thuật Western blot và định lượng protein đặc hiệu

Tế bào được ly giải ở 4°C trong dung dịch Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.5, PMSF 3 mmol/l, aprotinin 10 μ g/ml, pepstatin 1 μ g/ml, leupeptin 1 μ g/ml. Điện di trên gel polyacrylamide 10% (SDS-PAGE). Protein trên gel được chuyển lên màng nitrocellulose, sau đó được ủ với kháng thể chuột nhất (Sigma, Việt Nam) kháng OCT-4 của người. Protein phản ứng với kháng thể thứ nhất sẽ được xác định bởi kháng thể thứ hai gắn với peroxydase (Sigma, Việt Nam). Kết quả được biểu hiện bằng hình ảnh trên phim sau khi tác dụng với chất phát quang (ECL⁺, Amersham Biosciences). Insulin được định lượng theo phương pháp điện hóa

phát quang trên máy Asxym (Abbott). Protein toàn phần được định lượng theo phương pháp dùng thuốc thử coomasie.

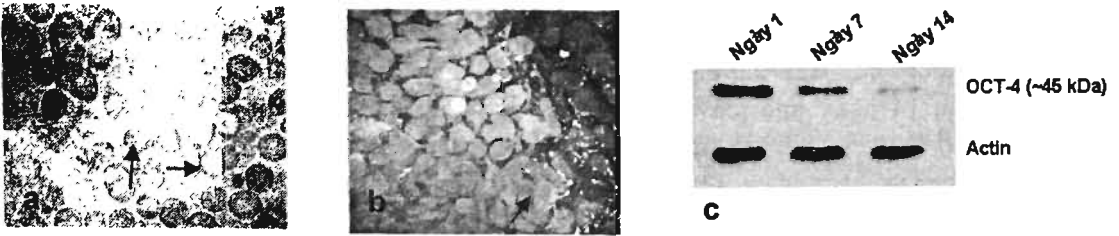
4. Kỹ thuật hóa miễn dịch tế bào

Tế bào trên đĩa nuôi cấy được cố định bằng etanol 98% sau đó được ủ với kháng thể thứ nhất kháng insulin hoặc 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.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Biểu hiện của OCT-4 dấu ấn của tế bào gốc

Trên kính hiển vi đối quang chụp trực tiếp trên đĩa nuôi cấy, tế bào gốc là các tế bào có kích thước nhỏ, hình tròn (hình 1a). Trên kính hiển vi huỳnh quang nhuộm hóa miễn dịch tế bào, tế bào gốc dương tính với OCT-4 (hình 1b). Kết quả Western blot cho thấy protein OCT-4 giảm theo thời gian trong nhóm được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung các yếu tố định hướng biệt hóa.

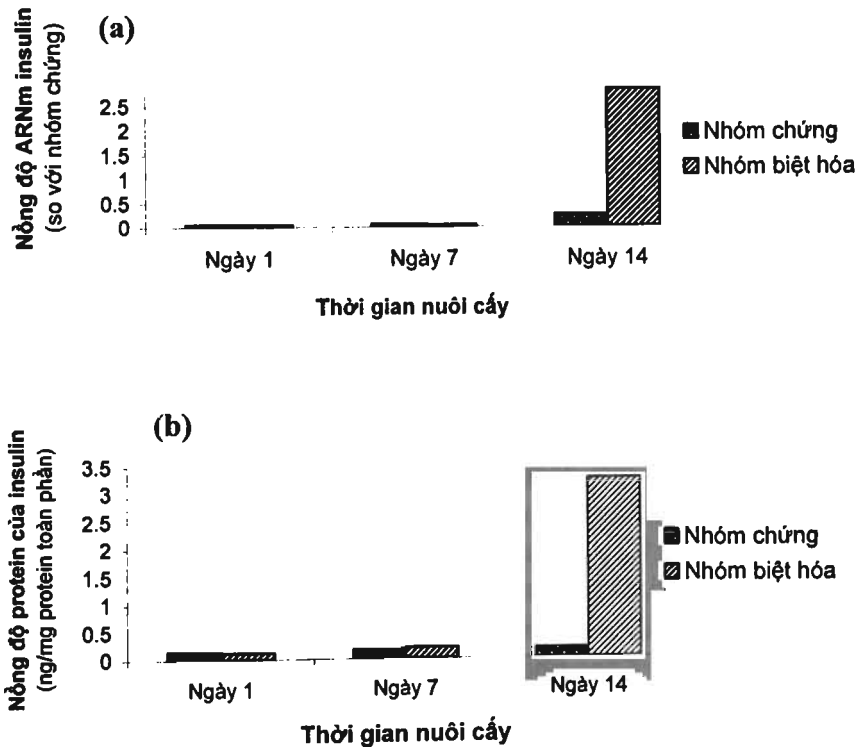


Hình 1. Hình ảnh tế bào gốc màng ối người sau 7 ngày nuôi cấy.

a: Chụp ảnh trực tiếp trên đĩa nuôi cấy qua kính hiển vi đối pha (Độ phóng đại 200X). **b:** Nhuộm hóa miễn dịch tế bào với OCT-4, máu xanh lá OCT-4, máu xanh tím nhuộm nhân bằng DAPI. **c:** *Western blot* OCT-4. Actin được dùng để kiểm tra lượng protein cho vào mỗi giếng điện di.

2. Biểu hiện của Insulin Dấu ấn tế bào gốc biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy đảo

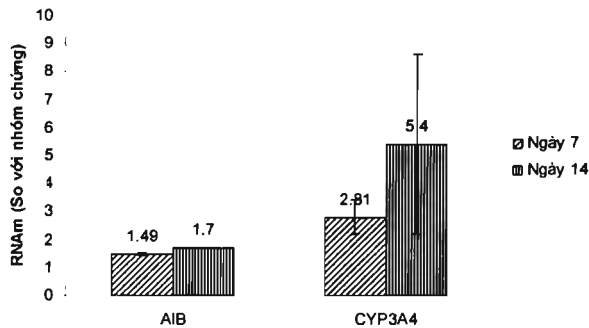
Nuôi cấy trên đĩa plastic, sau 7 ngày thấy nồng độ ARNm insulin (xác định bằng RT-PCR) không tăng. Sau 14 ngày, trong nhóm có bổ sung trong môi trường nuôi cấy Nicotinamide và β -mercaptoetanol thấy tăng ARNm insulin (hình 2a). Kết quả định lượng protein insulin cũng phù hợp với kết quả định lượng ARNm (hình 2b).



Hình 2: Biểu hiện ARNtt (a) và protein (b) của Insulin

3. Biểu hiện của Albumin và CYP3A4 - Dấu ấn tế bào gốc biệt hóa thành tế bào gan

Sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa plastic thấy biểu hiện ARNm của albumin tăng nhiều, Cyt p450 tăng ít. Sau 14 ngày nuôi cấy trên plastic, thấy sự tăng albumin ổn định và tăng cao cytochrome P450.



AIB: Albumin; CYP3A4: Cytochrom P450 3A4.

Hình 3: Mức tăng Albumin và Cyt P450

IV. BÀN LUẬN

1. Nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào beta tụy

Phân lập tế bào gốc từ màng ối bằng trypsin và percoll có tỷ trọng khác nhau có thể phân lớp các loại tế bào của màng ối. Các tế bào màng ối biểu hiện nhiều dấu ấn tế bào gốc như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3 β (HNF-3 β)... Những yếu tố này cho thấy tế bào gốc màng ối cũng là tế bào gốc đa tiềm năng. Trong khuôn khổ đề tài này, chúng tôi dùng dấu ấn OCT-4 để xác định tính gốc của tế bào (hình 1b, 1c).

Quá trình biệt hóa tế bào gốc thành tế bào tụy có thể chia thành hai giai đoạn: Giai đoạn biệt hóa chức năng, tức là giai đoạn mà các tế bào gốc bắt đầu biểu hiện các dấu ấn đặc hiệu của tế bào tụy. Giai đoạn thứ hai là giai đoạn biệt hóa về hình thái, các tế bào tụy sắp xếp tạo thành tiêu đảo Langerhans và hình thành các cấu trúc hình thái của tụy. Do điều kiện của nghiên cứu, chúng tôi chỉ xác định dấu ấn sinh học của tế bào beta tụy là insulin vì đây là loại tế bào tiết insulin. Kết

quả cho thấy, từ ngày thứ 7, trong môi trường biệt hóa, tế bào gốc biểu hiện insulin ở cả mức độ ARN và protein (hình 2a, b). Những ngày tiếp theo, biểu hiện của insulin tăng dần theo thời gian. Như vậy, khi tế bào tăng sản xuất insulin có thể nói về chức năng, tế bào gốc đã trở thành tế bào có chức năng của tế bào tụy. Qua biểu hiện của dấu ấn sinh học insulin chứng tỏ các tế bào gốc màng ối đã có sự biệt hóa thành tế bào tụy. Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các tác giả khác.

2. Nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan

Quá trình biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan có thể chia thành hai giai đoạn: Giai đoạn biệt hóa chức năng, tức là giai đoạn mà các tế bào gốc bắt đầu biểu hiện các dấu ấn đặc hiệu của tế bào gan. Giai đoạn thứ hai là giai đoạn biệt hóa về hình thái, các tế bào gan sắp xếp tạo thành các bè gan và hình thành các vi quản mật. Do điều kiện của nghiên cứu, chúng tôi chỉ xác định 2 dấu ấn sinh học của tế bào gan là Albumin và Cyt P450. Nghiên cứu của chúng tôi thấy, ở ngày thứ 7 tế bào gốc biểu hiện albumin và CYP3A4

(hình 3). Các dấu ấn này tăng theo thời gian. Tăng Albumin là biểu hiện sớm nhất của quá trình biệt hóa. Giai đoạn cuối cùng của quá trình biệt hóa chức năng là sự biểu hiện của dấu ấn CYP3A4. Như vậy, khi xuất hiện CYP3A4 có thể nói về chức năng, tế bào gốc đã trở thành tế bào gan biệt hóa. Tuy nhiên để tế bào gốc phát triển hoàn toàn thành tế bào gan, tạo các bè gan và hình thành các vi quản mật, cần phải có môi trường ngoại bào đặc biệt mà ở đó giàu collagen type IV, giàu laminin tương tự như trong tổ chức của gan người bình thường. Chúng tôi chưa có điều kiện để tạo môi trường này.

V. KẾT LUẬN:

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra kết luận như sau: Đã biệt hóa được tế bào có chức năng giống tế bào gan biểu hiện bằng dấu ấn sinh học albumin, CYP3A4 và thành tế bào có chức năng giống tế bào beta tụy từ tế bào gốc màng ối biểu hiện bằng dấu ấn sinh học insulin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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.
2. Kiyotaka Kitagawa, Shuichiro Yanagisawa, Kazuhiko Watanabe, Tatsuya Yunoki, Atsushi Hayashi, Motonori Okabe and Toshio Nikaido (2009). A Hyperdry Amniotic Membrane Patch Using a Tissue Adhesive for Corneal Perforations and Bleb Leaks. *American Journal of Ophthalmology*, Vol 148, Issue 3, September 2009, Pages 383-389.
3. Korbling M, Estrov Z (2003). Adult stem cells for tissue repair a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349: 570 - 582.
4. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jun; 42(7):1539-46.
5. Masanori Izumi, Benjamin J. Pazin, Crescenio F. Minervini, Jörg Gerlach, Mark A. Ross, Donna B. Stolz, Morris E. Turner, Robert L. Thompson, Toshio Miki (2009). Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*.
6. Oh Steve KW, Choo Andre BH (2006). Human embryonic stem cell: Technological challenges toward therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and physiology* 33: 489 - 495.
7. Ornella Parolini, Francesco Alviano et all. Concise review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international. Workshop on placenta derived stem cells. *STEM CELLS* 2008;26:300–311.
8. T. Pham Van, D. Couchie, N. Martin-Garcia, Y. Laperche, E.S. Zafrani, P. Mavier. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in liver regeneration from oval cells in rat. *Matrix Biol*. 2008;27:674–681.
9. 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.
10. Toshio Miki, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, Stephen C. Strom (2005). Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1549–1559.