

**Key words:** *sensation-motor reflex, mountainous pupils*

## NUÔI CÂY, BIỆT HOÁ TẾ BÀO GỐC MÀNG ỎI THÀNH TẾ BÀO GAN

Phạm Hồng Thái<sup>1</sup>, Đỗ Minh Trung<sup>2</sup>, Nguyễn Duy Bắc<sup>2</sup>,  
Nguyễn Lĩnh Toàn<sup>2</sup>, Trần Hải Anh<sup>2</sup>, Phạm Văn Trân<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Bệnh viện hữu nghị đa khoa tỉnh Nghệ an

<sup>2</sup>Học viện quân y

Tế bào gốc màng ỏi về phương diện phôi thai học có nguồn gốc từ thai nhi. Về phương diện tuổi phát triển, chúng tương đương với tế bào gốc nhũ nhi. Vì thế các tế bào gốc phân lập từ màng ỏi có ưu điểm hơn các loại tế bào gốc khác khi sử dụng ghép cho một cơ thể khác gen đồng loài. Mục tiêu của đề tài là đề xuất quy trình phân lập, nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ỏi thành tế bào gan. Các tế bào gốc được phân lập và tách bằng enzym trypsin, xác định tính gốc của tế bào gốc bằng dấu ấn OCT-4 và xác định khả năng biệt hóa thành tế bào gan bằng dấu ấn albumin và cytochrom p4503A4. Kết quả cho thấy quy trình tách phân lập tế bào gốc từ màng ỏi đạt hiệu quả cao, dấu ấn albumin và cytochrom p4503A4 được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Tế bào gốc tách từ màng ỏi có thể nuôi cấy định hướng biệt hóa thành tế bào gan để phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.

**Từ khóa:** tế bào gốc, màng ỏi, tế bào gan

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc (stem cell) là lĩnh vực đang được xã hội và các nhà khoa học quan tâm đặc biệt. Giải thưởng Nobel năm 2007 được trao cho 3 nhà khoa học: Mario R. Capecchi, Martin J. Evans và Oliver Smithies là những người có liên quan với lĩnh vực tế bào gốc.

Tế bào gốc là những tế bào có tiềm năng phát triển, tự làm mới và biệt hóa thành nhiều loại tế bào bình thường khác của cơ thể, chúng có thể bù đắp, thay thế các tế bào bị chết hoặc bị bệnh [2], [3], [4]. Nghiên cứu tế bào gốc không chỉ là nghiên cứu về sinh học tế bào, mà còn nghiên cứu về sinh học phân tử, công nghệ di truyền (genetic engineering), thao tác tế bào, chuyển gen... Nghiên cứu tế bào gốc cũng đang kết hợp với những nghiên cứu về kỹ nghệ mô (tissue engineering) [1], [4]. Tính ứng dụng của tế bào gốc ngày càng rõ rệt. Bước đầu đã có một số bệnh nhân bị

liệt tủy sống, tiểu đường, động mạch vành, ung thư... được điều trị có kết quả khả quan bằng công nghệ tế bào gốc [8].

Ở nước ta, nhu cầu điều trị các bệnh về máu bằng phương pháp ghép tế bào gốc ước tính hàng năm khoảng 300 - 500 trường hợp. Ngoài ra, nhu cầu điều trị các khuyết hồng mô và suy giảm chức năng tế bào trong các cơ quan rất lớn mà khả năng có thể áp dụng phương pháp trị liệu tế bào gốc ngày càng lớn.

Màng ỏi là một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở nhưng nay đã được phát hiện là một nguồn cung cấp tế bào gốc lý tưởng [3], [4], [6], [7], [8]. Người ta đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng màng ỏi về phương diện phôi thai học có nguồn gốc từ thai nhi. Về phương diện tuổi phát triển, chúng tương đương với tế bào gốc nhũ nhi. Vì thế các tế bào gốc phân lập từ màng ỏi có ưu điểm hơn

các loại tế bào gốc khác khi sử dụng ghép cho một cơ thể khác gen đồng loài. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này với mục tiêu đề xuất quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối người, đồng thời nghiên cứu biểu hiện của albumin, cytochrom p450 (Cyt P450) trong quá trình biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

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.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối

- Màng ối được thu thập từ các ca mổ lấy thai theo tiêu chuẩn, được cho ngay vào dung dịch PBS vô khuẩn và được vận chuyển ngay về trung tâm nghiên cứu. Một phần màng ối được tiến hành tách tế bào trong khoảng thời gian không quá 4 giờ kể từ khi mổ lấy thai. Một phần được cố định trong formol sau đó chuyển đúc parafin. Một phần khác được đông lạnh trong dung dịch isopental sau đó bảo quản trong ni tơ lỏng.

- Các tế bào gốc được phân lập từ màng ối bằng các kỹ thuật sử dụng trypsin phối hợp với các biện pháp cơ học. Màng ối được cho

vào dung dịch trypsin 0,02% trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó ly tâm thu lấy cặn tế bào, rửa tế bào bằng dung dịch PBS. Tế bào gốc màng ối được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin (2 x 10<sup>-3</sup>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 môi trường định hướng biệt hóa sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung insulin 5 µg/ml, hydrocortison (1 µM).

#### 2.3.2. Xác định biểu hiện của albumin và Cyt P450 trong quá trình biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan

Xác định biểu hiện của dấu ấn tế bào gan albumin và CYP3A4 bằng kỹ thuật RT-PCR. Quá trình được tóm tắt như sau: Tách chiết RNA tổng số từ các tế bào thu được theo từng giai đoạn phát triển (RNeasy Mini Kit - Qiagen). Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis 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 1.

**Bảng 1.** Các mồi dùng để chạy RT-PCR.

Albumin	Sens: 5' – AAATCCCACTGCATTGCCGAAGTG – 3'
	Anti-sens: 5' – AGGAAGACATCCTTTGCCTCAGCA – 3'
Cytochrom P450 (CYP3A4)	Sens: 5' – TGCTCTTCACCGTGACCCAAAGTA – 3'
	Anti-sens: 5' – AGAGCAAACCTCATGCCAATGCAG – 3'
Oct-4 (Octamer-binding protein 4)	Sens: 5'-GAGGAGTCCCAGGACATGAA-3'
	Anti-sens: 5'-GTGGTCTGGCTGAACACCTT-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). Sản phẩm PCR được giải trình tự để kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng PCR.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối người

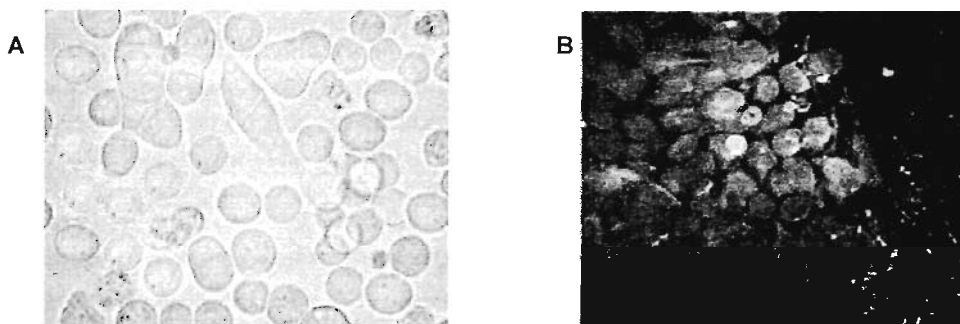
- Tế bào gốc màng ối được phân lập bằng trypsin. Sau khi được phân lập, tế bào được nuôi cấy trong đĩa plastic với môi trường DMEM glucose cao có thêm 10% FBS và 1% Penicillin-Streptomycin, trong tủ nuôi cấy NUAIRE class II, nhiệt độ 37°C, môi trường không khí có 5% CO<sub>2</sub>. Sau 24h, các tế bào gốc bám dính vào bề mặt đáy đĩa nuôi cấy, các tế bào gốc màng ối có hình tròn (hình 1A). Sau mỗi 2-3 ngày thì tiến hành thay môi trường và kiểm tra tình trạng phát triển của các tế bào gốc. Nhuộm OCT-4 để định danh tế bào gốc màng ối (hình 1B).

- Sau khoảng 2 tuần nuôi cấy, mật độ tế bào phát triển bao phủ 50-60% bề mặt đĩa

nuôi cấy. Sau đó tiến hành cấy chuyển nhằm tạo không gian cho tế bào gốc phát triển, và nuôi cấy sang môi trường đặc biệt để biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan.

### 3.2. Nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối người thành tế bào gan

- Sau khi cấy 2 tuần chuyển sang giai đoạn nuôi cấy biệt hóa. Tế bào gốc màng ối được nuôi cấy với mật độ trung bình trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$  M), huyết thanh bào thai bê (10%), và có thêm insulin (5 µg/ml), hydrocortison (1µM). Sau mỗi 3 ngày thay môi trường nuôi cấy một lần để cung cấp chất dinh dưỡng cho tế bào và loại bỏ các chất độc do tế bào đào thải ra.



**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, màu xanh lá OCT-4, màu xanh tím nhuộm nhân bằng DAPI.

- Sau 24 giờ nuôi cấy trên đĩa plastic, kiểm tra thấy các tế bào thưa thớt và chưa biệt hóa. Sau 7 ngày nuôi cấy các tế bào phát triển có mật độ dày đặc và tương đối đồng nhất. Sau 14 ngày, hình thành các nhóm tế bào riêng biệt có hình thái khác nhau. Có những tế bào nhỏ, hình đa diện về mặt hình thái có thể là các tế bào gan. Bên cạnh đó cũng xuất hiện những tế bào có bào tương

trải rộng mà chúng tôi dự đoán là các tế bào của biểu mô đường mật.

### 3.3. Biểu hiện một số dấu ấn sinh học trong quá trình nuôi cấy

Biểu hiện ARN thông tin (ARNm) của albumin và cytochrom p450 (hình 2) chứng tỏ có sự biệt hóa của tế bào gốc. 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 Cyt P450.

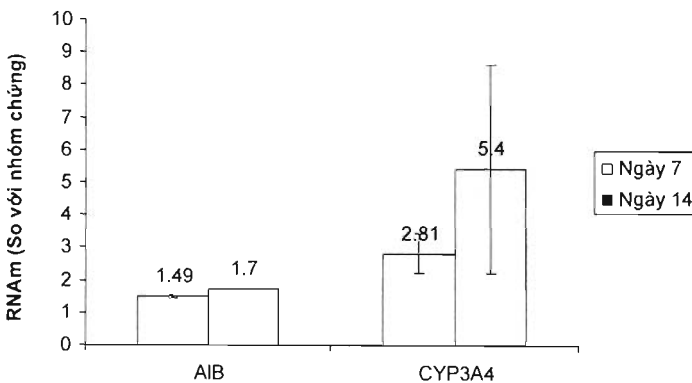
#### 4. BÀN LUẬN

##### 4.1. Về thu gom màng ối và phân lập tế bào gốc màng ối

Để thu gom được màng ối sạch không nhiễm khuẩn phải bóc tách màng ối sớm trước 4h sau khi sản phụ mổ lấy thai. Các bánh rau của các sản phụ đã được sàng lọc âm tính với các test thử HIV, HBV, HCV, HTLV, giang mai, được lấy ngay sau khi mổ đẻ, vận chuyển trong dung dịch PBS 1x và được niêm phong kín bằng giấy parafin, sau đó được chuyển ngay về phòng nuôi cấy tế bào để phân lập tế bào. Chúng tôi thấy nếu để sau 4h mới bóc tách và phân lập tế bào thì

tỷ lệ nuôi cấy tế bào phát triển kém, dễ bị nhiễm khuẩn, nhiễm nấm.

Về phân lập tế bào gốc từ màng ối bằng các enzym, chúng tôi thấy nếu chỉ phân cắt màng ối bằng Trypsin thì số lượng tế bào thu được thấp và thời gian thường phải kéo dài, có khi phải 60 phút các tế bào biểu mô màng ối mới bị phân cắt hết. Nếu cho thêm enzym Hyaluronidase vào Trypsin với tỷ lệ 1:1 thì số lượng tế bào thu được sẽ nhiều hơn. Phân cắt tế bào biểu mô màng ối bằng Trypsin có thêm 1% Hyaluronidase và Collagenase B, thì quá trình phân cắt diễn ra rất nhanh, chỉ trong vòng 30 phút đã phân cắt hết các mảnh màng ối và số lượng tế bào màng ối thu được là nhiều nhất.



AIB: Albumin; CYP3A4: Cytochrom P450 3A4.

**Hình 2.** Mức tăng Albumin và Cyt P450

Các tế bào màng ối biểu hiện nhiều marker tế bào gốc như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ )... Những yếu tố này cho thấy tế bào gốc màng ối cũng là tế bào gốc đa tiềm năng. Chúng tôi định danh tế bào gốc màng ối bằng quan sát trực tiếp trên kính hiển vi đảo ngược sau đó chụp lại hình ảnh các tế bào. Sau đó tiến hành các phản ứng RT-PCR,

hóa miễn dịch tế bào để phát hiện marker của tế bào gốc. Trong khuôn khổ đề tài này, chúng tôi chỉ xác định sự biểu hiện của marker OCT-4, là marker biểu hiện tính gốc của tế bào.

##### 4.2. Về nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan và sự biểu hiện của các dấu ấn sinh học

- Sau khi cấy chuyển lần thứ 2 được 2 tuần, khi các tế bào phát triển bao phủ 50-60% bề mặt đĩa nuôi cấy, chúng tôi bổ sung thêm hydrocortison, insulin nhằm định hướng tế bào biệt hóa thành tế bào gan. Kết quả cho thấy sau 2-3 ngày các tế bào bám dính tốt vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển nhưng chưa thấy sự biệt hóa. Các tế bào vẫn phát triển hình hơi tròn giống như tế bào ban đầu. Điều này chứng tỏ, ở mật độ thấp, khi các tế bào chưa tiếp xúc với nhau, thì các tế bào vẫn chưa biệt hóa mặc dù đã có các cytokin định hướng biệt hóa.

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. Chúng tôi dùng kỹ thuật phân tử để xác định các tế bào đó có biểu hiện của các dấu ấn tế bào gan hay không. 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 thì đã có sự biểu hiện rõ ràng của albumin, còn CYP3A4 tăng thấp. Sở dĩ chúng tôi chọn hai dấu ấn này vì albumin có biểu hiện cả ở tế bào gốc và tế bào gan với mức độ khác nhau. Khi tế bào gốc biệt hóa thành tế bào gan thì biểu hiện của albumin tăng lên. Đây là giai đoạn 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 có các giá đỡ giàu collagen type IV, giàu

laminin. Chúng tôi chưa có điều kiện để tạo môi trường này.

Qua cả hình thái và sự biểu hiện của dấu ấn sinh học đã chứng tỏ các tế bào gốc màng ối đã có sự biệt hóa thành tế bào gan. Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các tác giả khác [3], [4]. Cùng với các nghiên cứu khác về tế bào gốc màng ối như biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào xương, thành tế bào tiết insulin, thành tế bào thần kinh, tế bào cơ tim, tạo tủy tế bào màng ối [4] v.v., trong tương lai tế bào gốc màng ối sẽ mở ra một hướng mới trong điều trị lâm sàng về cấy ghép mô, điều trị bỏng, điều trị đái tháo đường...

## 5. KẾT LUẬN

1. Phân lập được tế bào gốc từ màng ối người, nuôi cấy tăng sinh được các tế bào gốc màng ối trong môi trường DMEM glucose cao có thêm 10% FBS và 1% Penicillin-Streptomycin thành công.

2. Đã biệt hóa được tế bào gan từ tế bào gốc màng ối biểu hiện bằng hình thái và các dấu ấn sinh học Albumin và Cyt P450.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Trân, Hoàng Văn Lương, Dominique Couchie, và Philippe Mavier (2009), Hoạt tính và vai trò của Matrix Metalloproteinase-2 và -9 trong quá trình tái sinh gan từ tế bào gốc, Trung tâm nghiên cứu y sinh dược học - Học viên quân y, Hà đông, Hà nội. INSERM U841 (Viện nghiên cứu y học quốc gia, đơn vị nghiên cứu 841), cộng hòa Pháp.
2. Toda A., Okabe M., Yoshida T. et al. (2007), The potential of amniotic membrane / amnion-derived cells for regeneration of various tissues, J Pharmacol Sci, 105:215-228.
3. Kitagawa K., Yanagisawa S., Watanabe K. et al. (2009), A hyperdry amniotic membrane patch using a tissue adhesive

- for corneal perforations and bleb leaks. *Am J Ophthalmol.* 148(3): 383–389.
4. **Korbling M., Estrov Z. (2003)**, Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 349:570–582.
  5. **Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R. et al. (2001)**, Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(7):1539–1546.
  6. **Izumi M., Pazin B.J., Minervini C.F. et al. (2009)**, Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *J Reprod Immunol.* 81(1):39–43.
  7. **Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J. et al. (2004)**, Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 19(6):1450–1456.
  8. **Oh S.K., Choo A.B. (2006)**. Human embryonic stem cell: technological challenges toward therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 May-Jun;33(5-6):489–495.
  9. **Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P. et al. (2008)**, Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international. Workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells* 26(2):300–311.

#### SUMMARY

**Isolation, characterisation of amniotic stem cells: Expression of Albumin and CYP3A4 during their differentiation into hepatocytes**

**Pham Hong Thai<sup>1</sup>, Do Minh Trung<sup>2</sup>,  
Nguyen Duy Bac<sup>2</sup>,  
Nguyen Linh Toan, Tran Hai Anh<sup>2</sup>,  
Pham Van Tran<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Nghe An friendship hospital*

<sup>2</sup>*Vietnam Military Medical University*

*Recently, amnion-derived cells have been reported to have multipotent differentiation ability, and these cells have attracted attention as a cell source for cell-transplantation therapy. The amnion possesses considerable advantageous characteristics: the isolated cells can differentiate into all three germ layers; they have low immunogenicity and anti-inflammatory functions; and they do not require the sacrifice of human embryos for their isolation, thus avoiding the current controversies associated with the use of human embryonic stem cells. The aim of study is to examine the process of isolating, culturing and differentiating stem cells into hepatocytes. We isolated stem cells by enzyme trypsin, and characterised them by OCT-4 marker and differentiated into hepatocytes by treating the cells with insulin and hydrocortisone. The results showed that the protocol of isolation of stem cells from amniotic membrane was highly effective; albumin and CYP3A4 determined by RT-PCR technique increased over time in culture. Stem cells isolated from amniotic membrane can differentiate into hepatocytes.*

**Key words:** stem cell, amniotic membrane, hepatocyte