

ĐẶC ĐIỂM PHÂN LẬP VÀ MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA TẾ BÀO GỐC MÔ MỠ NGƯỜI

*Đinh Văn Hán**

TÓM TẮT

Tế bào gốc (TBG) mô mỡ là các tế bào (TB) đa tiềm năng, có khả năng biệt hóa tương tự TBG trung mô tủy xương. Trong lĩnh vực y học tái tạo, các TBG mô mỡ có tiềm năng ứng dụng trong sửa chữa và điều trị tổn khuyết mô. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định cách thức phân lập TBG mô mỡ bằng phương pháp sử dụng enzym collagen. Tiến hành khảo sát một số đặc tính của TBG mô mỡ về hình thái, khả năng tạo tập đoàn (colony) và đường cong tăng trưởng của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, quần thể TB đạt trạng thái 100% độ che phủ bề mặt nuôi cấy vào ngày thứ 10 khi nuôi trong môi trường DMEM có hàm lượng glucose cao, được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê. TB có hình dạng giống nguyên bào sợi và độ tăng trưởng đạt trạng thái cao nguyên vào ngày thứ 5 - 7. Các colony của TBG mô mỡ là dạng colony giống nguyên bào sợi (CFU-F) với tỷ lệ tạo colony là 14 - 17% số lượng TB nghiên cứu.

* Từ khóa: Tế bào gốc mô mỡ; Đặc tính; Đặc điểm phân lập; Dạng colony giống nguyên bào sợi.

ISOLATING FEATURES AND CHARACTERISTICS OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS

SUMMARY

Adipose-derived stem cells (ADSCs) are pluripotent cells, which have differentiation similar to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In regenerative medicine, ADSCs have potential applications for the repair and treatment of damaged tissues. In this study, we determined the way of isolation of ADSCs with collagenase method. We also investigated some characteristics of ADSCs in morphology, colony forming efficiency and growth curve. The result showed that the cell population was confluent at day 10 of maintaining in DMEM high glucose added 10% Fetal Bovine Serum. The cells have fibroblastic shape and obtain plateau at day 6 - 7 in culture condition. The colonies of ADSCs are Colony Forming Unit - Fibroblast (CFU-F) with the ratio is 14 - 17% of cells seeded.

* *Key words: Adipose-derived stem cells; Features; Isolation; Colony forming unit - Fibroblast.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc là lĩnh vực y học được chú trọng nghiên cứu nhằm chế tạo các sản phẩm ứng dụng trong điều trị bệnh ở người trong thế kỷ 21, đặc biệt là các bệnh nan y. TBG trung mô lần đầu tiên được mô tả là dạng TB từ tủy xương, có khả năng tạo

dòng, bám dính bề mặt nuôi cấy [7] và có khả năng biệt hóa thành TB mô mỡ, TB sụn và TB xương [8, 9]. Chúng được xác định là có mặt ở rất nhiều mô cơ quan khác nhau như cơ, não và mô mỡ [10]. Ngày nay, nghiên cứu cho thấy TBG trung mô từ tủy xương và mô mỡ rất giống nhau về quần thể TB và kiểu hình TB.

* Viện Bông Quốc gia

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Lê Văn Đông

TBG mô mỡ thể hiện đặc điểm của TBG trung mô như hình thái dạng nguyên bào sợi, là TB bám bề mặt nuôi cấy, có các dấu ấn biệt hóa của TB trung mô, có khả năng biệt hóa thành TB mỡ, TB sụn, TB cơ... Do mô mỡ là loại mô sẵn có với số lượng lớn và dễ thu hồi, ít gây bất lợi cho bệnh nhân (BN) nên TBG mô mỡ có thể là nguồn TB đầy hứa hẹn cho y học tái tạo trong tương lai, đặc biệt trong ghép tự thân. Các nhà nghiên cứu đề xuất nhiều cách thức phân lập TBG mô mỡ khác nhau, có tác giả phân lập theo cách kinh điển là nuôi mô mỡ trong đĩa nhựa có môi trường dinh dưỡng và chờ cho TB tự mọc từ collagen và thu TB có hình sao hoặc hình thoi là TBG trung mô. Có tác giả lại dùng collagen để phá hủy cấu trúc mô, sau đó ly tâm lọc lấy TB. Môi trường nuôi cấy cũng được công bố với nhiều công thức khác nhau, các tác giả dùng môi trường cơ bản khác nhau như DMEM, DMEM-F12, CMRL1066... Ngay DMEM thì cũng có tác giả dùng môi trường cơ bản là DMEM có hàm lượng glucose cao, nhưng có tác giả dùng môi trường có hàm lượng glucose thấp, hoặc thành phần các yếu tố bổ sung chưa thống nhất... Khối TB thu được có thành phần TB khác nhau, gồm TBG trung mô, TB máu... có tác giả sử dụng nguyên khối TB sau khi phân lập để điều trị vết thương, nhưng cũng có tác giả sử dụng có chọn lọc chỉ TBG trung mô thuần nhất... Cách thức sử dụng TB để tăng tối đa hiệu quả những lần ghép điều trị vết thương khác nhau, có tác giả dùng khối TB tiêm vào vết thương, có tác giả phun hỗn dịch TB lên vết thương, hoặc nuôi cấy TBG trung mô trên giá đỡ và ghép vào bề mặt vết thương. Chính vì vậy, cần có những nghiên cứu đánh giá để xây dựng quy trình phù hợp cũng như tiêu chuẩn khối TB dùng điều trị, chỉ định hay cách thức sử dụng

TBG trung mô trong điều trị vết thương. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Xác định đặc điểm phân lập và một số đặc tính của TBG mô mỡ ở người.*

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu nghiên cứu.

Hóa chất nghiên cứu chủ yếu bao gồm: DMEM có hàm lượng glucose 4,5 g/l; huyết thanh bào thai bê (FBS); collagen; trypsin/EDTA; antibiotic/antimycotic do hãng Gico/Life Tech cung cấp.

Mẫu mô mỡ dùng để phân lập TBG mô mỡ của người thu từ BN di chứng bỏng cần phẫu thuật ghép da dày của 30 người. BN hoặc người nhà BN này đều đồng ý hiến phần mỡ bỏ đi dùng cho nghiên cứu. Người hiến mô mỡ có xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV và giang mai. Các mẫu hồ sơ hiến mô được ghi chép theo quy định của Bộ Y tế.

2. Phân lập TBG mô mỡ.

Thu mô mỡ trong điều kiện vô trùng của phòng mổ và chứa trong tube vô trùng có môi trường bảo quản DMEM với 500 U/ml penicillin, 500 µg/ml streptomycin và amphotericin B, bảo quản trong 4°C cho đến khi xử lý mô mỡ để phân lập TB. Mô mỡ được rửa 3 lần bằng PBS để loại bỏ các cấu trúc thuộc mạch máu, da... mà không phải mô mỡ. Sau đó, đặt mô mỡ vào đĩa Petri mới đã có ít DMEM và 5% kháng sinh, cắt mô mỡ thành các mẫu nhỏ.

Bổ sung lượng collagen đã tính toán để đảm bảo nồng độ cuối cùng trong tube mô mỡ là 0,15%, lắc mạnh nhiều lần hoặc sục bằng pipet. Đặt tube hỗn dịch trên vào bể nước ấm 37°C và lắc khoảng 30 phút, sau 10 phút lại lắc một lần. Sau 30 phút, thêm FBS để dừng tác dụng của enzym, ly tâm

tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi ly tâm, hút bỏ dịch nổi và thu TB lắng dưới đáy tube. Đếm số lượng TB thu được trong buồng đếm Nauebaer để xác định nồng độ TB có trong hỗn dịch thu được. Sau khi tính toán nồng độ TB, cấy vào đĩa petri hoặc chai nuôi cấy với số lượng hỗn dịch TB sao cho đạt 20.000 TB/cm² bề mặt nuôi cấy. Sau đó, cấy TB qua đệm trong tủ ấm 37⁰C, có 5% CO₂ trong môi trường nuôi cấy là DMEM/10% FBS, bổ sung 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin.

Sau 48 giờ, hút bỏ dịch nổi, bao gồm môi trường nuôi cấy và TB chết hoặc TB không thuộc nguồn gốc trung mô, rửa bề mặt đĩa nuôi bằng PBS để loại bỏ hoàn toàn thành phần mỡ còn sót lại. Bổ sung môi trường mới và thay môi trường sau mỗi 2 - 3 ngày tùy thuộc mật độ TB bám bề mặt đĩa nuôi cấy.

Quan sát TB và tiến hành thu TB bằng quy trình sử dụng trypsin khi mật độ TB đạt 80% diện tích che phủ. Đếm xác định số lượng TB thu được bảo quản lạnh sâu hoặc cấy trở lại đĩa nuôi với mật độ 5.000 TB/cm² cho tới thế hệ thứ 5 để cung cấp cho nghiên cứu tiếp theo.

3. Xác định số lượng TB.

Tiến hành trypsin để tách TB khỏi bề mặt nuôi cấy, lấy vào ống nghiệm 1 ml hỗn dịch TB đã trypsin. Lấy hỗn dịch TB bằng đầu pipet pasteur, bơm nhẹ hỗn dịch TB vào mép buồng đếm và để hỗn dịch tự chảy đầy vào buồng đếm Neubauer. Đếm số lượng TB dưới kính hiển vi trên đơn vị diện tích 1 mm². Tính số lượng TB theo công thức: $C = n/v$ (n: số lượng TB đã đếm được trong buồng đếm, v: thể tích đếm (ml), C: mật độ TB (TB/ml). Trong buồng đếm Neubauer

có thể tích 0,1 mm³ = 1.10⁻⁴ ml, do đó công thức tính là: $C = n \times 10^4/\text{ml}$.

4. Phân tích đường cong tăng trưởng của TBG mỡ.

TB thu được sau khi dùng trypsin và đếm, bổ sung môi trường nuôi cấy để đạt được nồng độ TB là 10.000/ml. Cấy TB trở lại đĩa nuôi cấy 12 giếng, mỗi giếng 2 ml dung dịch TB. Sau 24 giờ nuôi cấy, thu lại và đếm số lượng TB, mỗi lần đếm 6 giếng. Sau đó, cứ sau 24 giờ một bộ 6 giếng tiếp theo lại thu và đếm TB cho đến ngày thứ 8. Số lượng TB sau đó được tính toán và biểu diễn thể hiện đường cong tăng trưởng.

5. Bảo quản và phục hồi TB sau bảo quản.

Các TB thu được chưa sử dụng hay trong thời gian chờ thí nghiệm khác sẽ bảo quản để duy trì tính ổn định của TB. Môi trường bảo quản TBG trung mô gồm 10% DMSO và 90% môi trường tăng trưởng. Các tube TB được hạ nhiệt độ với tốc độ giảm 1⁰C/phút cho tới âm 80⁰C và chuyển sang tủ lạnh âm 152⁰C.

Khi có nhu cầu sử dụng cho thí nghiệm, phục hồi TB được bằng cách lấy ống TB bảo quản từ tủ lạnh sâu và nhanh chóng đặt chúng vào bể nước đã chuẩn bị trước là loại bể nước loại 5 lít (water bath) đạt 37⁰C và độ mức nước đạt 10 cm. Hút TB từ ống chuyển sang chai nuôi cấy hoặc chứa vào ống ly tâm. Từ từ thêm môi trường nuôi cấy vào hỗn dịch TB ở tốc độ 10 ml trong khoảng thời gian 2 phút. Lấy lượng nhỏ TB đã pha loãng để đánh giá tỷ lệ sống/chết của TB sau bảo quản. Cấy TB trở lại chai nuôi cấy để tiếp tục nhân lên hoặc dùng vào thí nghiệm khác.

6. Xác định khả năng tạo dòng của TB (CF-E).

Hỗn dịch TB đơn lẻ được chuẩn bị và cấy trong đĩa nuôi cấy nhựa có đường kính 60 mm với mật độ 50 TB/cm². Sau đó đĩa nuôi cấy được duy trì trong 2 - 3 tuần để theo dõi sự phát triển của colony. Cố định đĩa TB nuôi cấy bằng cồn tuyệt đối và nhuộm Giemsa, một nhóm TB được xác định là đơn vị colony khi có ít nhất 50 TB. Khả năng tạo colony (CF - E) tính toán theo tỷ lệ % số colony đạt được so với số TB cấy.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm phân lập và hình thái TB.

Các mẫu mô mỡ đạt các tiêu chuẩn sàng lọc, tuổi người hiến mô mỡ để nghiên cứu < 10 tuổi; trung bình 7,8 ± 4,3. Số lượng mô mỡ nghiên cứu là 10 - 20 g, trung bình 15 ± 5,8 g. Thời gian từ khi thu hồi đến khi xử lý để phân lập TB 5 - 9 giờ, trung bình 6,4 ± 3,9 giờ. Qua 20 mẫu mô xử lý phân lập TB, 01 mẫu có test TB dương tính với mycoplasma, không mẫu nào bị nhiễm nấm, 02 mẫu bị nhiễm khuẩn.

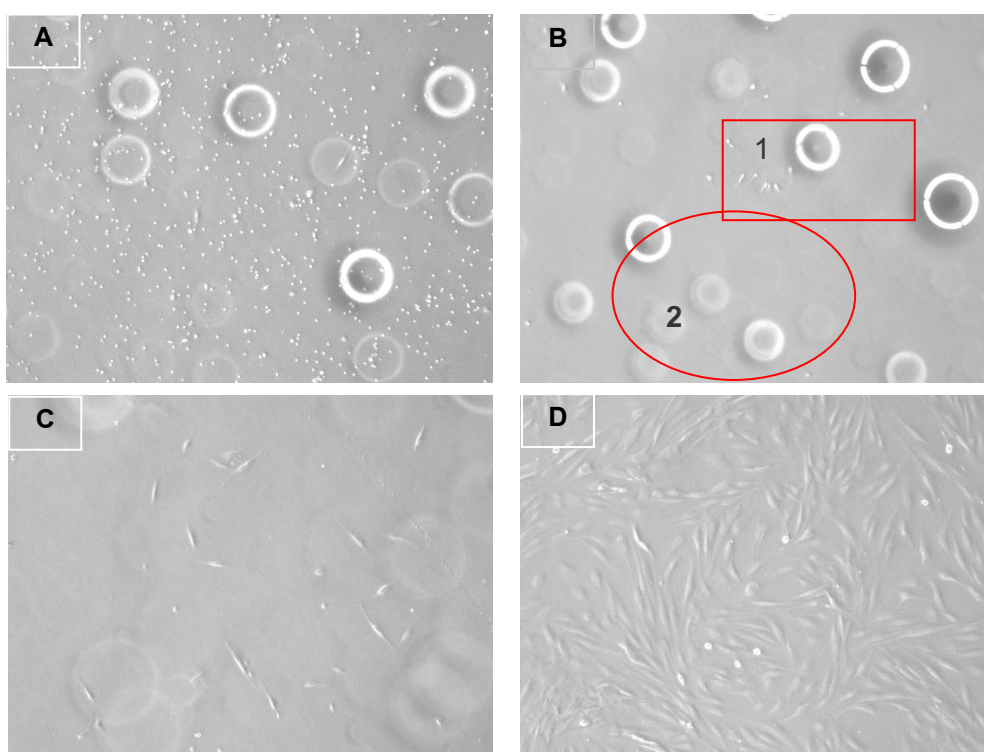
Với 17 mẫu mô xử lý và phân lập thành công, số lượng TB thu được sau khi xử lý mẫu mô là 2,4 x 10⁶ ± 1,4 x 10⁶/g mô. Các TB nhân lên nhanh chóng trong môi trường nuôi cấy DMEM/10% FBS/1% AB. TB cơ bản có hình dạng tương tự như nguyên bào sợi có hình sao với nhánh bào tương dài. Các TB thuộc loại TB bám dính vào bề mặt nuôi cấy của đĩa nhựa và chỉ tạo đơn lớp, không thấy chồng lấn lên nhau, kể cả khi đã đạt 100% độ che phủ.



Ảnh 1: Xử lý mô để phân lập TBG. Mô mỡ được cắt nhỏ bằng kéo trong đĩa petri (ảnh A). Tube mô mỡ sau ly tâm, phần mỡ nổi (1) và dung dịch (2) được loại bỏ, thu lấy cục TB màu trắng (3) lắng ở đáy tube (ảnh B).

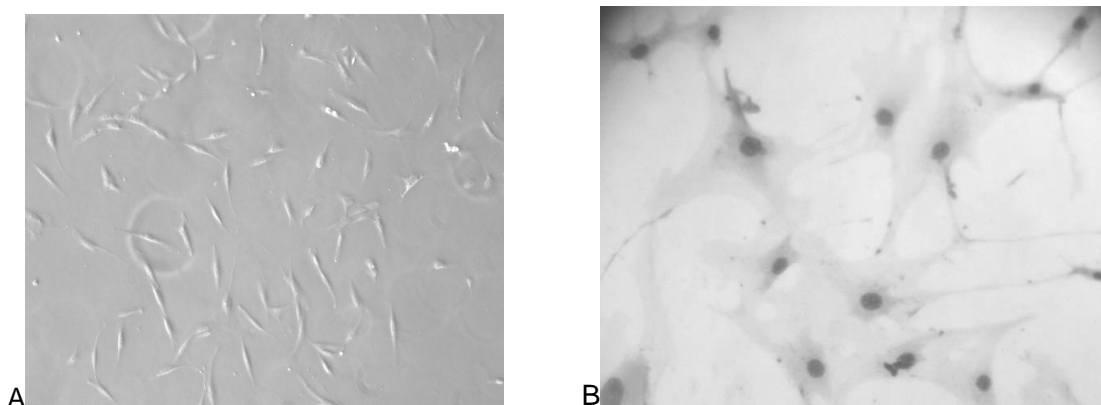
CHỈ TIÊU	GIÁ TRỊ		
	Min	Max	Trung bình
Số lượng TB thu được/g mô	2,4 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	2,46 ± 1,4
Tỷ lệ % TB sống	96,3	97,2	96,4 ± 1,7

TBG mỡ bắt đầu dính xuống bề mặt nuôi cấy sau khoảng 4 - 6 giờ, khi đĩa nuôi đặt trong tủ ấm 37⁰C và 5% khí CO₂. Đầu tiên, TB có hình tròn nhỏ hoặc hình không xác định, quan sát thấy cùng với một số TB máu đơn nhân. Dần dần, các TB bệt và giãn rộng ra xung quanh, có hình thoi dài hoặc ngắn, sau đó là hình nhiều góc cạnh ở thời điểm 48 giờ.



Ảnh 2: Diễn biến phân lập TBG mỡ. Sau 48 giờ, dịch nổi có nhiều mảnh vỡ của mô, TB (A). Sau khi thay môi trường, quan sát rõ các TB bám vào bề mặt nuôi cấy (B). TB mọc nhiều hơn sau 4 ngày (C). TB sau 10 ngày đạt 80% (D). (Hiện vi đảo ngược, 50X).

Khi nhuộm Giemsa, TB bắt màu hồng nhạt, nhân hình trứng và bắt màu kiềm đậm thể hiện TB có khả năng phân chia mạnh. TB từ mẫu mô đều có hình dạng tương tự, không có nhân quái nhân chia.

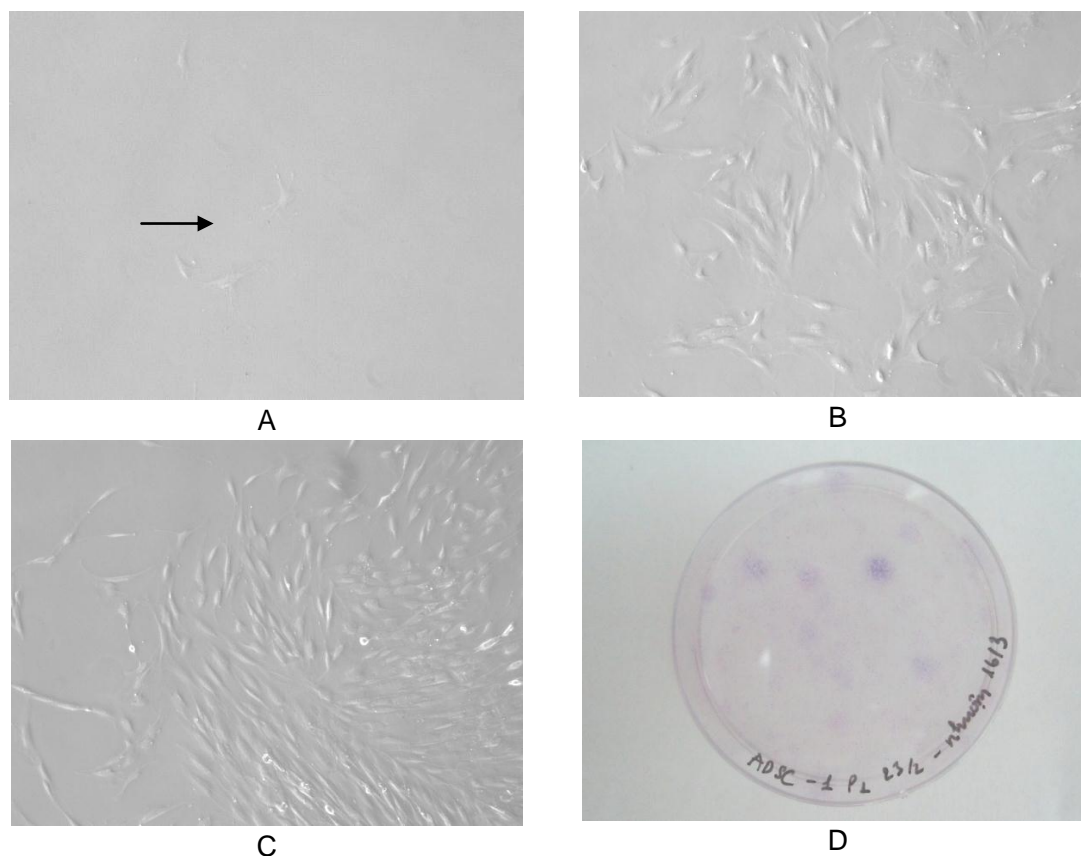


Ảnh 3: Đặc tính của TBG mô mỡ. TB bám dính, có hình dạng nguyên bào sợi, mọc đơn lớp (A). Khi nhuộm Giemsa, TB có hình sao, bào tương trải rộng với nhiều nhánh, có nhánh dài, nhân TB hình tròn và hình trứng, ranh giới bờ nhân rõ rệt, nhân bắt màu kiềm đậm (C, D). TB thuộc mẫu mô số 02, hiện vi đảo ngược và nhuộm Giemsa).

2. Khả năng tạo colony của TB.

Các TB đầu dòng sẽ tạo colony, thí nghiệm này đánh giá bằng test CFU-F.

Kết quả cho thấy số lượng TB có khả năng sinh tập đoàn của khối TB mới tách từ mô mỡ là $7,5 \pm 1,8\%$. Các thể hệ từ P1 - P5 đạt 14,6 - 17,3%, tùy vào thể hệ TB.



Ảnh 4: Khả năng tạo colony của TBG mỡ. Ngày thứ nhất, TB ít và mọc rải rác (A). Ngày thứ 10, các colony rõ hơn (B). Ngày thứ 20, colony dày và các TB hình thoi (C). Các đĩa colony sau khi nhuộm giemsa (D).

Bảng 2: Khả năng tạo CFU-F theo các thể hệ TB (n = 5).

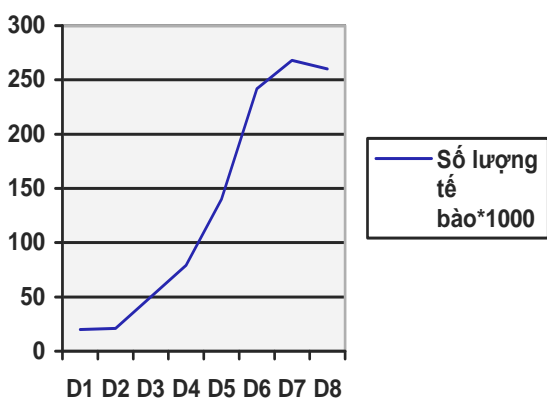
Thể hệ TB	Số TB	Số CFU	%CFU-F
P1	50/cm ²	9 - 15	14,6 ± 1,5
P3	50/cm ²	15 - 18	16,5 ± 1,9
P5	50/cm ²	14 - 19	17,3 ± 1,8

Các TB có xu hướng tạo colony nhiều hơn khi tăng số lần cấy chuyển lên đến P3, P5. Các TB đã dần được tinh lọc, TB không thuộc trung mô sẽ chết trong lần cấy chuyển đầu tiên. Colony TBG mỡ thuộc dạng colony fibroblast, TB không đứng thành cụm như các TB biểu mô.

3. Kết quả nhân rộng TB và khả năng tồn tại trong điều kiện bảo quản.

TBG mỡ vào pha tăng trưởng theo cấp số nhân vào ngày thứ 2 và đạt được hình cao nguyên vào ngày thứ 6 - 7.

Sau 3 tháng, các ống TB được chuyển từ tủ lạnh sâu âm 152 độ vào bồn nước ấm 37°C trong 5 phút. Mỗi tube 2 ml TB, sau đó chuyển vào tube ly tâm 15 ml và pha loãng trong môi trường nuôi cấy ở 37°C, ly tâm loại bỏ dịch nổi, đếm số lượng TB và xác định số lượng TB chết bằng xanh trypan. Tiến hành thí nghiệm xác định khả năng tạo colony của TB bảo quản lạnh sâu và làm thí nghiệm khác. Kết quả: không thấy sự khác nhau về tỷ lệ sống, chết và khả năng tạo colony của TB bảo quản sau 3 tháng.



Biểu đồ 1: Đường cong tăng trưởng của TBG mỡ.

BÀN LUẬN

1. Đặc điểm phân lập TBG mỡ.

Mô mỡ được xác định là một trong những nguồn TBG trung mô quan trọng trong liệu pháp TBG tự thân điều trị bệnh. Những thí nghiệm phân lập TB đầu tiên, dựa theo phương pháp kết dính mô mà không sử dụng enzym để phân cắt mô. Có 5 thí nghiệm độc lập sử dụng phương pháp này. Tuy

phương pháp phân lập TB này đơn giản, nhưng không hiệu quả như đối với các loại mô khác mà chúng tôi đã từng làm, bao gồm mô da, dây rốn. Trong khi đó, các mẫu nghiên cứu sử dụng enzym collagen đều đạt thành công trong phân lập TBG trung mô.

Môi trường phân lập được sử dụng theo đa số các tác giả bao gồm DMEM được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê [4, 6]. Môi trường này, một số tác giả cải tiến chút ít để tăng khả năng phân chia của TB như thêm FGF- β [5]. Các công thức này, cho thấy TB có khả năng bám dính và tăng sinh tốt. Để thay thế huyết thanh bào thai bê, có tác giả sử dụng luôn huyết thanh tự thân của người bệnh [3]. Môi trường của chúng tôi sử dụng theo đa số các tác giả đó là DMEM có hàm lượng glucose 4,5 g/l, được bổ sung huyết thanh bào thai bê để đạt nồng độ 10%, các kháng sinh cũng được bổ sung với 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin và amphotericin B.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi: chỉ 1 ngày sau đã thấy có TB bám dính ở bề mặt nuôi cấy. Thay môi trường mẫu TB 2 - 3 lần trong một tuần và chỉ trong vòng 10 - 15 ngày, hầu hết các mẫu TB đều đạt 80 - 90% độ che phủ, thu hoạch bằng quy trình sử dụng trypsin.

Trong nghiên cứu này, thu TBG trung mô giống nguyên bào sợi được tinh lọc thông qua phương pháp phân lập có sử dụng enzym. Quan sát các thí nghiệm thấy, số lượng TB phân lập từ một khối lượng mô mỡ rất lớn, khoảng 2 triệu TB cho mỗi gram mô. Thông qua nhuộm xanh trypan, khả năng sống của TB sau phân lập rất lớn, đạt khoảng 94 - 96%. Tuy nhiên, hầu hết trong số đó không phải là TBG trung mô, đa số các TB nổi cùng với mảnh vỡ của mô, chúng được loại bỏ bằng việc thay môi

trường nuôi cấy sau 24 - 48 giờ. Chỉ một số ít TB bám dính ở bề mặt nuôi cấy quan sát được sau khi hút bỏ dịch nổi. Các TB này sau đó nhân lên rất nhanh chóng trong môi trường có 10% huyết thanh. Mặc dù chỉ từ một số rất ít TB ban đầu, sau hơn 1 tuần, mật độ của chúng đã đạt 90% độ che phủ bề mặt nuôi cấy. Tuy nhiên, khi quan sát lâu hơn, hầu hết các TB có hình thoi và hình sao, chúng không mọc thành 2 - 3 lớp như TB biểu mô, mà chỉ mọc thành 1 lớp duy nhất, kể cả khi chúng đã đạt tới độ che phủ 100%.

2. Một số đặc tính TBG mỡ.

TBG trung mô là TB được xác định có khả năng bám dính trên bề mặt nuôi cấy, chúng có hình thoi hoặc hình sao, có khả năng biệt hóa thành TB chức năng khác nhau như TB xương, TB sụn, TB mỡ, TB cơ cả in vitro hay in vivo [1, 2].

Các TB tủy xương có khả năng bám dính vào bề mặt nhựa nuôi cấy được gọi là TBG trung mô, thường tạo ra colony dạng fibroblast trong nuôi cấy (colony - forming unit - fibroblasts) [11]. Nghiên cứu này xác định tính gốc của TB phân lập thông qua khảo sát khả năng tạo colony của chúng. Kích thước colony lớn cho thấy chúng có khả năng tăng sinh và di cư. Tuy nhiên, khả năng tạo colony cũng dễ bị thay đổi, nếu TB không giữ được tính gốc của nó trong quá trình nuôi cấy, cho thấy, các TB đến p5 vẫn có khả năng nhân lên mạnh mẽ, với tỷ lệ cấy 1:3; chỉ sau 5 - 6 ngày đã đạt độ che phủ 90%, ở các thế hệ từ p1 - p5, TB vẫn tạo được colony.

Về hình thái TB: TBG mỡ bắt đầu dính xuống bề mặt nuôi cấy sau khoảng 4 - 6 giờ khi đĩa nuôi được đặt trong tủ ấm 37°C và 5% khí CO₂. Đầu tiên, TB có dạng hình tròn nhỏ hoặc hình không xác định được, quan

sát thấy cùng với một số TB máu đơn nhân. Dần dần, các TB bệt và giãn rộng ra xung quanh, có hình thoi dài hoặc ngắn, sau đó hình nhiều góc cạnh ở thời điểm 48 giờ. Khi đạt 100% độ che phủ, TBG mỡ không phát triển thành dạng cuộn xoáy. Nhuộm Giemsa thấy, nhân TB có hình dáng bình thường như các nguyên bào sợi, nhưng chúng có đặc điểm bắt màu kiềm đậm, điều này thể hiện các TB đang nhân lên và có khả năng phân chia tốt. Với kết quả này, chúng tôi thấy hình thái TB phân lập cũng giống như một số tác giả đã nghiên cứu trước đây.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập TBG từ mô mỡ và nhân rộng số lượng TB. Các TB phân lập được có đặc điểm TB dạng trung mô bao gồm: TB có dạng hình sao hoặc hình thoi với nhân hình trứng và hình tròn; TB bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy nhựa; TB có khả năng tạo colony, colony có đặc điểm dạng fibroblasts.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002,13, pp.4279-4295.
2. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, 284, pp.143-147.
3. Noriyoshi Mizuno, Hideki Shiba et al. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell Biology International*. 2006, 30 (6), pp.521-524.

4. Naoki Morimoto, Satoru Takemoto et al. In vivo culturing of a bilayered dermal substitute with adipo-stromal cells. *Journal of Surgical Research*. 2008, 146, pp.246-253.

5. Katharina Timper, Dalma Seboek et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 341, pp.1135-1140.

6. Cagri A.U, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: Biomechanical and immunohistochemical evaluation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2012 xx, pp.1-9.

7. A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, N.V. Latsinik, A.F. Panasyuk, I.V. Keiliss-Borok. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974, 17, pp. 331-340.

8. R.F. Pereira, K.W. Halford, M.D. O'Hara, D.B. Leeper, B.P. Sokolov, M.D. Pollard, O. Bagasra, D.J. Prockop. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1995, 92, pp.4857-4861.

9. I. Titorencu, V.V. Jinga, E. Constantinescu, A.V. Gafencu, C. Ciohodaru, I. Manolescu, C. Zaharia, M. Simionescu. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy*. 2007, 9, pp.682-696.

10. Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002, 418, pp.41-49.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phôi bản: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

