

## BIỂU HIỆN CỦA ALBUMIN, CYTOCHROM P450 TRONG QUÁ TRÌNH BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC MÀNG ỒI THÀNH TẾ BÀO GAN

PHẠM VĂN TRẦN, HUỖNH QUANG THUẬN  
Bệnh viện 103, Học viện quân y

### TÓM TẮT

Tế bào gốc màng ối có nguồn gốc từ thai nhi và tuổi phát triển tương đương với tế bào gốc nhũ nhi. Vì vậy, các tế bào gốc phân lập từ màng ối 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 nghiên cứu qui trình phân lập, nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan. Phương pháp nghiên cứu: tách tế bào 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 P450-3A4 (CYP3A4). Kết quả: qui trình tách phân lập tế bào gốc từ màng ối đạt hiệu quả cao, dấu ấn albumin và CYP3A4 được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR 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 gan để phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.

**Từ khóa:** Tế bào gốc, màng ối.

### SUMMARY

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.

**Method:** We isolated stem cell by enzyme trypsin, and characterised its by markers OCT-4 and differentiated its into hepatocyte by treating the cells with insulin and hydrocortisone. **Results:** The protocol of isolation of stem cells from amniotic membrane have high efficiency, albumin and CYP3A4 were determined by RT-PCR technique increase over time in culture.

**Conclusion:** Stem cells isolated from amniotic membrane can differentiate into hepatocytes.

**Keywords:** Recently, amnion-derived cells.

### 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 Capecchi, Martin Evans và Oliver Smithies là những người có liên quan mật thiết với lĩnh vực tế bào gốc [1].

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 [1, 2].

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).

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 [3].

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 hỏng 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 ối 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. Người ta đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng màng ối về phương diện phôi thai học có nguồn gốc từ thai nhi [4]. 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 ối 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 với các mục tiêu nghiên cứu quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối người đồng thời nghiên cứu biểu hiện của albumin, cytochrom p450 trong quá trình biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 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. Phương pháp nghiên cứu.

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

- Màng ối được thu lượm 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 [5]. 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 cận 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 (50µg/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 [6].

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).

### 2.2. 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 mỗi đặc hiệu cho từng gen được mô tả trong bảng sau.

Bảng 1: Các môi dùng để chạy RT-PCR.

Albumin	Sens: 5' - AAATCCCCTGTCATTGCCGAAGTG - 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.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 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 high Glucose có thêm 10% FBS và 1% Penicilline-Streptomycine, trong tủ nuôi cấy NUAIRE classII, 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. 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 1).

- 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.

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

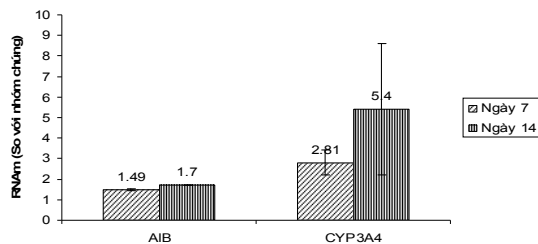
- Sau khi cấy 2 tuần chuyển sang giai đoạn nuôi cấy biệt hóa. Tế bào gốc gốc màng ối được nuôi cấy với mật độ trung bình trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin (2 x 10<sup>-3</sup> M), huyết thanh bào thai bê (10%),

và có thêm insulin (5 µg/ml), hydrocortison (1µM). Sau mỗi 3 ngày thì thay môi trường nuôi cấy một lần để cung cấp dinh dưỡng cho tế bào và loại bỏ các chất độc do tế bào đào thải ra.

- 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. Biểu hiện một số dấu ấn sinh học trong quá trình nuôi cấy:

Biểu hiện ARNm của albumin và cytochrom p450 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 cytochrome P450.



AIB: Albumin; CYP3A4: Cytochrom P450 3A4.

Hình 2: Mức tăng Albumin và Cyt P450

## BÀN LUẬN

### 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. Chúng tôi đếm số lượng tế bào thu được bằng buồng đếm tế bào.

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 thì đã phân cắt hết các mảnh màng ối và số lượng tế bào màng ối thu được là nhiều nhất.

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-3α (HNF-3α) Những yếu tố này cho thấy tế bào gốc màng ối cũng là tế bào gốc đa tiềm năng [6, 7, 8, 9]. 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.

### 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 hydrocortisone, insulin nhằm định hướng tế bào biệt hóa thành tế bào gan.

- Kết quả 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. 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 [9, 10]. 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 [9, 10].

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 [9, 10].

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..... 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... Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra kết luận như sau: 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 high glucose có thêm 10% FBS và 1% Penicilline-Streptomycine thành công. 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. 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. Korbiling 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, Crescenzo 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. Ming-Song Tsai, Jia-Ling Lee, Yu-Jen Chang and Shiaw-Min Hwang (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction Vol.19*, No.6 pp. 1450-1456.

7. Oh Steve KW, Choo Andre BH (2006). Human embryonic stem cell: Technological challenges toward therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and physiology* 33: 489 - 495.

8. Ornella Parolini, Francesco Alviano et al. 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.

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.