

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN MỘT SỐ DẤU ẤN SINH HỌC CỦA TẾ BÀO GỐC MÀNG ỒI

PHẠM VĂN TRẦN,
HUỠNH QUANG THUẬN, ĐỖ MINH TRUNG
Học viện quân y

TÓM TẮT

Màng ối là sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở được phát hiện là một nguồn cung cấp tế bào gốc lý tưởng. Chúng tôi tiến hành đề tài nhằm mục tiêu xác định biểu hiện các dấu ấn sinh học của tế bào gốc màng ối. Phương pháp nghiên cứu: Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê và kháng sinh. Nhiệm vụ miễn dịch tế bào gốc màng ối qua hai lần cấy chuyển với các kháng thể đặc hiệu kháng các kháng nguyên nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu: Tế bào gốc màng ối dương tính với các kháng thể kháng OCT-4, SSEA-4, CK-18, CK-5, Klf-4, Bmi-1, CD49f, CD-271, SCF, Vimentin, NCAM, Cmyc, HNF-4, CD29, Nanog, CD44, Nestin, CD133, và âm tính với SSEA-1, Sox-2. Kết luận: Tế bào gốc màng ối là các tế bào gốc đa tiềm năng không những biểu hiện các dấu ấn của tế bào gốc phôi mà còn biểu hiện dấu ấn của tế bào gốc biểu bì và trung bì.

Từ khóa: Tế bào gốc, màng ối, dấu ấn tế bào gốc.

SUMMARY

Amniotic membrane which is bio-waste in the process of birth was found to be an ideal source of stem cells. Aim of research: Identify of biomarkers for amniotic stem cells. Method: staining of amniotic stem cells (passage two) with specific antibodies against the antigens studied. Results: Amniotic stem cells are positive with OCT-4, SSEA-4, CK-18, CK-5, Klf-4, Bmi-1, CD49f, CD-271, SCF, Vimentin, NCAM, Cmyc, HNF-4, CD29, Nanog, CD44, Nestin, CD133, and negative with SSEA-1, Sox-2. Conclusion: Amniotic stem cells are multipotent not only express the markers of embryonic stem cells, but also express the markers of epidermal and mesoderm stem cells.

Keywords: Stem cell, amniotic membrane, marker.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, tế bào gốc phân lập từ mô trưởng thành hoặc từ phôi vẫn là nguồn tế bào chủ yếu cho y học tái tạo. Tuy nhiên cả hai nguồn tế bào này đều có rất nhiều những hạn chế. Tế bào gốc từ mô trưởng thành của người bệnh tuy không đặt ra vấn đề thải ghép nhưng rất khó phân lập và nuôi cấy tăng sinh. Số lượng tế bào ít, không đủ cho mỗi lần cấy ghép. Ngược lại, tế bào gốc phôi tăng sinh rất mạnh trong môi trường nuôi cấy và dễ dàng biệt hóa thành các tế bào của mô trưởng thành nhưng cần thiết phải kiểm soát chặt chẽ vì rất dễ có khả năng sinh ung thư và khi ghép đồng loài sẽ dễ dàng bị thải ghép theo cơ chế giống như ghép mô và cơ quan trưởng thành. Hơn nữa việc sử dụng tế bào gốc phôi luôn đặt ra tranh cãi về vấn đề đạo đức. Do vậy việc nghiên cứu để tìm ra nguồn tế

bào mới thay thế tế bào gốc trưởng thành và tế bào gốc phôi là hết sức cần thiết.

Tế bào gốc màng ối là các tế bào gốc đa tiềm năng [1]. Những tế bào này có thể biệt hóa thành 3 lớp tế bào mầm, chúng có tính sinh miễn dịch thấp và có khả năng chống viêm. Sử dụng tế bào gốc màng ối không đặt ra vấn đề tranh cãi về đạo đức do không phải sử dụng phôi người. Màng ối đã từng được sử dụng giống như một tấm băng sinh học trong điều trị bỏng, điều trị các vết loét lâu liền mặc dù cơ chế tác dụng của màng ối trong các trường hợp này cho đến nay vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ.

Trước những khó khăn và hạn chế của các loại tế bào gốc lấy từ phôi, thai và từ người trưởng thành kể trên, người ta đã đi tìm và phát hiện ra rằng màng ối 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 ối có ưu điểm hơn các loại tế bào gốc khác khi sử dụng ghép cho một cơ thể khác gen đồng loài. Màng ối một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở nay đã được phát hiện là một nguồn cung cấp tế bào gốc lý tưởng do thu hoạch màng ối không gây ảnh hưởng gì đến sức khỏe của cả mẹ và con, tế bào gốc từ màng ối còn rất trẻ nên khả năng phân chia tốt và số lượng tế bào thu được trực tiếp hoặc sau tăng sinh in vitro là rất lớn. đồng thời việc thu hoạch và cất giữ tế bào gốc màng ối không vi phạm đạo đức. Vì vậy chúng tôi nghiên cứu đề tài xác định các biểu hiện dấu ấn sinh học của tế bào gốc màng ối nhằm mục tiêu định danh tế bào gốc màng ối đáp ứng nhu cầu sử dụng loại tế bào này trong công nghệ tái tạo mô (tissue engineering).

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Kỹ thuật phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối.

Kỹ thuật phân lập và nuôi cấy tế bào gốc màng ối đã được mô tả trong các bài báo đăng tải trước đây [2]. Tế bào gốc được phân lập từ màng ối sử dụng enzym phân cắt mô phối hợp với các biện pháp cơ học [3]. Sau khi phân lập, tế bào gốc được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin (2×10^{-3} M), huyết thanh bào thai bê (10%), hai ngày thay môi trường một lần để loại bỏ những tế bào chết và cung cấp chất dinh dưỡng đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần một lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

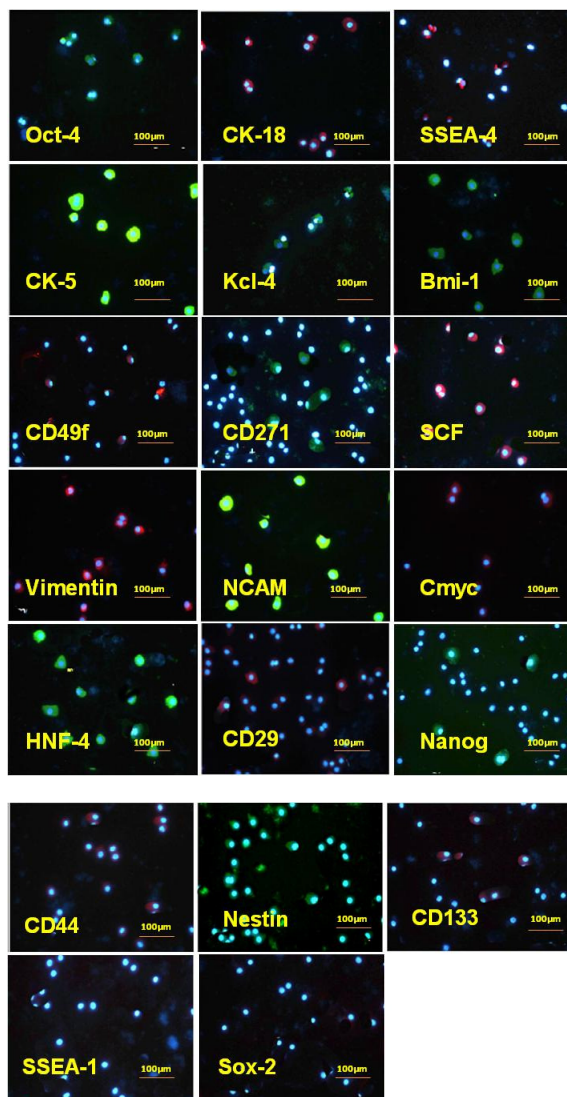
2. Kỹ thuật hóa miễn dịch huỳnh quang.

Tế bào trên đĩa nuôi cấy hoặc thu hoạch bằng trypsin sau đó được dàn trên lam kính. Cố định tế bào bằng etanol 98% hoặc bằng ceton tuyệt đối ở nhiệt độ -20°C trong 10 phút. Rửa tiêu bản bằng PBS 1X. ủ đĩa nuôi cấy hoặc lam kính với kháng thể thứ nhất kháng protein đặc hiệu cần nghiên cứu. Danh mục các kháng thể được trình bày trong bảng 1. Kháng thể thứ hai được gắn với chất huỳnh quang. Quan sát tế bào và chụp hình ảnh trên kính hiển vi huỳnh quang. Tế bào dương tính hiển thị màu xanh lá nếu kháng thể thứ hai gắn với FITC (Fluorescein isothiocyanate), hiển thị màu đỏ nếu kháng thể thứ hai gắn với CY3 (Indocarbocyanine).

Bảng 1: Danh mục tên các kháng thể, công ty cung cấp và tỷ lệ pha loãng dùng trong nghiên cứu.

Kháng thể thứ nhất	Tỷ lệ pha loãng
Oct-4, Rabbit, sc-9081 (Santa Cruz Biotechnology)	1/200
SSEA-4, Mouse, MAB1435 (R&D systeme)	1/50
Ck18, Mouse IgG1, M7080 (Dako)	1/50
CK5, Rabbit, IS780 (Dako)	1/50
KLf-4, Rabbit, Sc 20691 (Santa Cruz Biotechnology)	1/50
Bmi-1, Rabbit, Sc 10745 (Santa Cruz Biotechnology)	1/50
CD49f, Mouse, Cat.No 313604 (Biolegend)	1/50
CD271, Rabbit (BD Biosciences)	1/50
SCF, Mouse, ab64677 (ABCAM)	1/50
Vimentin, Mouse, 28028 (ABCAM)	1/50
NCAM, Goat, AF277 (R&D systeme)	1/50
C-myc, Mouse, Sc-40 (Santa Cruz Biotechnology)	1/50
HNF-4, Goat, ab36175 (ABCAM)	1/50
CD29, Mouse, Sc-9970 (Santa Cruz Biotechnology)	1/50
Nanog, Goat, Sc 30328 (Santa Cruz Biotechnology)	1/100
CD44 (F10,42-20), Mouse, ab46793 (ABCAM)	1/200
Nestin, Rabbit, Sc-20978 (Santa Cruz Biotechnology)	1/200
CD133, Mouse, Ac133 (Biolegend)	1/500
SSEA-1, Mouse, Sc 21702 (Santa Cruz Biotechnology)	1/200
Sox-2, Mouse mAb IgG2A MAB2018 (R&D systeme)	1/50
Kháng thể thứ 2	
Alexa Flour 488 donkey anti mouse IgY (H+L) (Green), Cord No.A2102	1/800
Alexa Flour 546 goat anti Rabbit IgG (H+L) (Red),Cord No.A11008	1/800
Alexa Flour 488 chicken anti goat IgG (H+L), Cord No.A2146.	1/1000
Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (Red), Cord No.A11020	1/800
Alexa Flour 488 goat anti Rabbit IgG (H+L) (Green), Cord No.A11008	1/500
Alexa Flour 488 chicken anti goat IgG (H+L), Cord No.A2146	1/500

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



Hình 1. Xác định đặc tính của tế bào gốc màng ối bằng kỹ thuật hóa miễn dịch huỳnh quang. Tế bào dương tính có màu xanh lá (màu của FITC) hoặc màu đỏ (màu của CY3). Nhuộm nhân tế bào bằng DAPI. Tế bào gốc màng ối biểu hiện dương tính với OCT-4, SSEA-4, CK-18, CK-5, Klf-4, Bmi-1, CD-49f, CD-271, SCF, Vimentin, NCAM, Cmyc, HNF-4, CD-29, Nanog, CD44, Nestin, CD133. Tế bào gốc màng ối âm tính hoàn toàn SSEA-1 và Sox-2.

BÀN LUẬN

Như vậy tế bào gốc màng ối mà chúng tôi thu được cũng biểu hiện các dấu ấn của tế bào gốc phôi như OCT-4, SSEA-4 và SCF như các nghiên cứu khác đã mô tả [4]. Đồng thời, tế bào cũng biểu hiện dấu ấn của tế bào nội bì phôi như HNF-4, dấu ấn ngoại bì phôi như Nestin và NCAM, dấu ấn trung bì phôi như CK-5, CK-18 và Vimentin, [4-6]. Tuy nhiên không phải tất cả các tế bào đều biểu hiện các dấu ấn như nhau. Điều đó cũng chứng tỏ rằng tế bào thu được là không thuần nhất. Kết quả tương tự như nghiên cứu của Coreau và

cộng sự khi phân lập và nuôi cấy tế bào gốc màng ối [7].

Trước đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh cả tế bào HAE (Human Amniotic Epithelial cells) và tế bào HAM (Human Amniotic Mesenchymal cells) biểu hiện nhiều marker tế bào gốc như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3 α (HNF-3 α) □ Những yếu tố này cho thấy không chỉ tế bào gốc biểu mô màng ối mà còn cả tế bào gốc trung mô màng ối cũng là tế bào gốc đa tiềm năng.

Tế bào gốc màng ối không chỉ biểu hiện dấu ấn của tế bào biểu bì như CA125 mà còn biểu hiện các dấu ấn của tế bào biểu mô nói chung như cytokeratin, vimentin [5, 8]. Tế bào gốc màng ối cũng dương tính với CD44 và Nestin. Vimentin dương tính với trên 97.5% trong tổng số tế bào tế bào gốc màng ối nuôi cấy, trong khi chỉ 3.6% tổng số tế bào gốc biểu mô màng ối biểu hiện dương tính với CK14+/vimentin+. Như vậy, tế bào gốc màng ối đồng thời biểu hiện cả marker của tế bào gốc trung mô và các tế bào gốc biểu mô [5]. Điều này chỉ ra rằng tế bào gốc màng ối không hoàn toàn là tế bào gốc biểu mô và ngược lại chúng cũng không hoàn toàn là tế bào gốc trung mô. Trong quá trình phát triển phôi, có sự chuyển dạng tế bào gốc trung mô-biểu mô (epithelial-mesenchymal transition-EMT) trên màng ối [5]. Trên cơ sở đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã không đặt ra vấn đề phân lập tế bào gốc trung mô và tế bào gốc biểu mô. Tế bào gốc màng ối ở giai đoạn sớm biểu hiện các dấu ấn của tế bào gốc phôi như OCT-4, Rex-1, và SCF [4], và dấu ấn của tế bào nội bì phôi như BMP4, α -fetoprotein (FP), GATA-4, và HNF-4 α , dấu ấn ngoại bì phôi như Nestin và NCAM, dấu ấn trung bì phôi như Vimentin và CCK-18, dấu ấn kháng nguyên hòa hợp tổ chức như HLA ABC và HLA DR [4-6]. Tuy nhiên tế bào gốc màng ối không biểu hiện dấu ấn đặc hiệu của trung bì phôi như brachyury, dấu ấn nội bì phôi BMP-2, dấu ấn ngoại bì FGF-5 và PAX-6 [4, 9].

Qua nghiên cứu biểu hiện các dấu ấn sinh học của tế bào gốc màng ối chúng tôi đi đến kết luận sau: Tế bào gốc màng ối là tế bào gốc đa tiềm năng không những biểu hiện các dấu ấn của tế bào gốc phôi mà còn biểu hiện dấu ấn của tế bào gốc biểu mô và trung mô. Kết quả chứng tỏ quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc màng ối đạt hiệu quả cao và tế bào thu được thực sự là tế bào gốc. Tính gốc của tế bào được duy trì trong quá trình nuôi cấy. Như vậy tế bào gốc có thể sử dụng trong nghiên cứu cũng như trong công nghệ mô. phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Koike, T., et al., *Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane: the potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet*. Arch Oral Biol. **56**(10): p. 1170-6.
2. Phạm Văn Trân, Huỳnh Quang Thuận, *Biểu hiện albumin, cytochrom p450 trong quá trình biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan*. Tạp chí y học thực hành, 2012.
3. Miki, T., et al., *Isolation of amniotic epithelial stem cells*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 1**: p. Unit 1E 3.
4. Moon, J.H., et al., *Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1760-70.
5. Kobayashi, M., et al., *Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer*. Cell Transplant, 2008. **17**(3): p. 291-301.
6. Bhandari, D.R., et al., *The simplest method for in vitro beta-cell production from human adult stem cells*. Differentiation. **82**(3): p. 144-52.
7. Coraux, C., et al., *Reconstituted skin from murine embryonic stem cells*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 849-53.
8. Ochsenbein-Kolble, N., et al., *Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair*. J Perinat Med, 2003. **31**(4): p. 287-94.
9. Toda, A., et al., *The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues*. J Pharmacol Sci, 2007. **105**(3): p. 215-28.