

Nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào tụy

Phạm Văn Trân*; Đỗ Minh Trung**; Lê Thành Hà**

Trần Hải Anh**; Phạm Minh Đàm**; Toshio Nikaido***

TÓM TẮT

Sử dụng tế bào gốc (TBG) trong điều trị các bệnh tụy bẩm sinh đã và đang trở thành vấn đề thời sự. Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu quy trình phân lập, nuôi cấy biệt hóa TBG màng ối thành tế bào beta đảo tụy. Tách tế bào bằng enzym trypsin, nuôi cấy định hướng biệt hóa bằng môi trường DMEM có bổ sung nicotinamide, β -mercaptoethanol và các yếu tố sinh trưởng. Xác định tính gốc của tế bào gốc bằng dấu ấn OCT-4 và xác định khả năng biệt hóa thành tế bào beta tụy bằng dấu ấn insulin. Kết quả: quy trình tách phân lập TBG từ màng ối đạt hiệu quả cao, xác định dấu ấn insulin bằng kỹ thuật RT-PCR tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Như vậy: TBG tách từ màng ối có thể nuôi cấy định hướng biệt hóa thành tế bào β đảo tụy, phục vụ cho nghiên cứu và điều trị.

* Từ khóa: Màng ối; Tế bào gốc; Insulin; Tụy.

Culture and differentiation of amniotic stem cells into beta pancreatic cells

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 beta cells. Method: We isolated stem cell by enzyme trypsin, and characterised its by markers OCT-4 and differentiated its into beta cells by treating the cells with nicotinamide, β -mercaptoethanol and different grow factors. Results: Protocol for isolation of stem cells from amniotic membrane had high efficiency, insulin was determined by RT-PCR technique increased over time in culture. Conclusion: Stem cells isolated from amniotic membrane can be differentiate into beta cells.

* Key words: Amniotic membrane; Stem cells; Insulin; Pancreas.

* Bệnh viện 103

** Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay nhiều trung tâm nghiên cứu trên thế giới đã thành công trong việc sản

xuất insulin từ TBG thai nhi nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Bên cạnh đó, phương pháp ghép tế bào tụy (pancreatic cells) khỏe mạnh đồng loài hoặc sử dụng TBG lấy từ tủy xương vào tụy bệnh nhân (BN) điều trị bệnh tiểu đường tít 1. Tuy nhiên, nguồn tế bào này có hạn và còn đang tranh cãi về vấn đề đạo đức.

TBG (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 TBG.

Tính ứng dụng của TBG ngày càng rõ rệt. Bước đầu đã có một số BN bị liệt tủy sống, tiểu đường, động mạch vành, ung thư... được điều trị có kết quả khả quan bằng công nghệ TBG.

Ở nước ta, nhu cầu điều trị bệnh tiểu đường tít I bằng phương pháp ghép TBG ước tính hàng năm có khoảng 300 - 500 trường hợp. Ngoài ra, nhu cầu điều trị ung thư tụy và suy giảm chức năng tế bào tụy bằng cách áp dụng phương pháp trị liệu TBG ngày càng trở nên cần thiết.

Màng ối là một sản phẩm thường bỏ đi trong quá trình sinh nở, là một nguồn cung cấp TBG lý tưởng. Sử dụng TBG màng ối không gặp phải những vấn đề về đạo đức, xã hội. TBG phân lập từ màng ối có tính sinh miễn dịch thấp, không có khả năng ung thư hóa. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài với mục tiêu: Nghiên cứu quy trình phân lập TBG từ màng ối người, đồng thời nghiên cứu khả năng biệt hóa thành tế bào beta của tuyến tụy nhằm sử dụng tế bào này sản xuất insulin hoặc cấy ghép.

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.

** Quy trình phân lập TBG từ màng ối:*

Vận chuyển màng ối trong dung dịch PBS vô khuẩn về trung tâm nghiên cứu, tách tế bào trong khoảng thời gian không quá 4 giờ kể từ khi mổ lấy thai.

Cho màng ối vào dung dịch trypsin 0.02% trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sử dụng các loại enzym khác nhau như hyaluronidase 1%, collagenase B 0,6 mg/ml nhằm tìm ra loại enzym tối ưu. Ly tâm, thu lấy cặn tế bào, rửa tế bào bằng dung dịch PBS. Nuôi cấy TBG màng ối trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin (2×10^{-3} M), huyết thanh bào thai bê (10%) đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần/lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

Biệt hóa TBG thành tế bào beta bằng môi trường định hướng biệt hóa, sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 10 mM nicotinamide, 55 µM β- mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate.

** Xác định biểu hiện của OCT-4, insulin trong quá trình biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào beta:*

- Kỹ thuật RT-PCR xác định biểu hiện của ARN thông tin:

Tách chiết ARN tổng số từ tế bào thu được theo từng giai đoạn phát triển (RNeasy Mini Kit -Qiagen). Tổng hợp cADN từ ARN tổng

số (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit - Fermentas). Thực hiện phản ứng PCR định lượng 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 mồi dùng để chạy RT-PCR.

18S rARN	Sens: 5'-TGAGAAACGGCTACCACATC-3'
	Anti-sens: 5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGT-3'
Insulin	Sens: 5'-TGGTGCAGGCAGCCTGCAG-3'
	Anti-sens: 5'-GTTCAAGGGCTTTATCCATCTCTC-3'
OCT-4 (Octamer-binding protein 4)	Sens: 5'-GAGGAGTCCCAGGACATGAA-3'
	Anti-sens: 5'-GTGGTCTGGCTGAACACCTT-3'

Sau khi làm biến tính cADN 15 phút ở 95°C, từ 40 - 50 chu kỳ, thực hiện PCR (15 giây: 95°C, 25 giây: 58°C và 20 giây: 72°C). Tính toán nồng độ ARNtt của từng dấu ấn nghiên cứu dựa trên nồng độ ARNtt của gen 18S.

- Kỹ thuật Western blot và định lượng protein đặc hiệu:

Ly giải tế bào ở 4°C trong dung dịch Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.5, PMSF 3 mmol/l, aprotinin 10 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, ly tâm 11.000 vòng/10 phút để loại bỏ xác tế bào. Mỗi mẫu lấy 10 µl dịch trong chứa 25 µg protein cho vào giếng, điện di trên gel sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 10% (SDS-PAGE). Chuyển protein trên gel lên màng nitrocellulose, sau đó ủ với kháng thể chuột nhất (Sigma, Việt Nam) kháng insulin, OCT-4 của người. Xác định protein phản ứng với kháng thể thứ nhất bằng kháng thể thứ hai gắn peroxydase (Sigma, Việt Nam). Kết quả biểu hiện bằng hình ảnh trên phim sau khi tương tác với chất phát quang

(ECL⁺, Amersham Biosciences). Định lượng đồng thời insulin theo phương pháp điện hóa phát quang trên máy Asxym (Abbott). Định lượng protein toàn phần theo phương pháp dùng thuốc thử coomasie.

- Kỹ thuật hóa miễn dịch tế bào:

Cố định tế bào trên đĩa nuôi cấy bằng etanol 98%, sau đó ủ với kháng thể thứ nhất kháng insulin hoặc kháng OCT-4. Gắn kháng thể thứ hai với chất huỳnh quang. Quan sát tế bào và chụp hình ảnh trên kính hiển vi huỳnh quang.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân lập, nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa TBG màng ối người.

Phân lập TBG màng ối bằng trypsin, nuôi cấy trên đĩa plastic với môi trường DMEM. Sau 24 giờ, tế bào bám dính vào bề mặt đáy đĩa nuôi cấy, TBG màng ối có hình tròn (*hình 2a*). Sau 2 - 3 ngày, tiến hành thay môi trường và kiểm tra tình trạng phát triển của TBG. Nhuộm OCT-4 để định danh TBG màng ối (*hình 2b*).

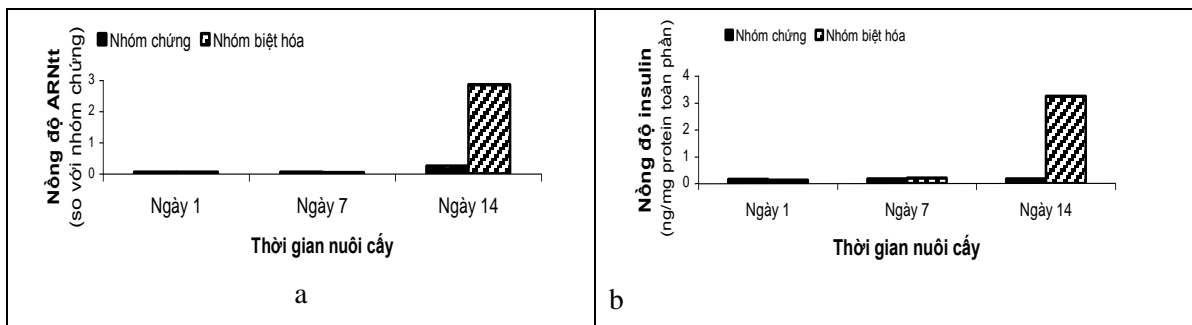
Sau 24 giờ nuôi cấy trên đĩa plastic, kiểm tra thấy các tế bào thừa thớt và chưa biệt hóa. Sau 7 ngày nuôi cấy, tế bào phát triển có mật độ dày đặc và tương đối đồng nhất. Sau 14 ngày, hình thành các nhóm tế bào riêng biệt có hình thái khác nhau. Có tế bào nhỏ, hình tròn hoặc đa diện về mặt hình thái có thể là tế bào beta tụy. Vì phương pháp phân lập không hoàn toàn thu được 100% TBG nên có nhiều loại tế bào khác nhau. Trong khuôn khổ của đề tài chúng tôi không xác định rõ từng loại tế bào.

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

* *Biểu hiện của insulin - dấu ấn TBG biệt hóa thành tế bào beta:*

Biểu hiện ARNtt của insulin chứng tỏ có TBG biệt hóa thành tế bào beta (hình 1a). Sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa plastic thấy: nồng độ ARNtt của insulin (xác định bằng

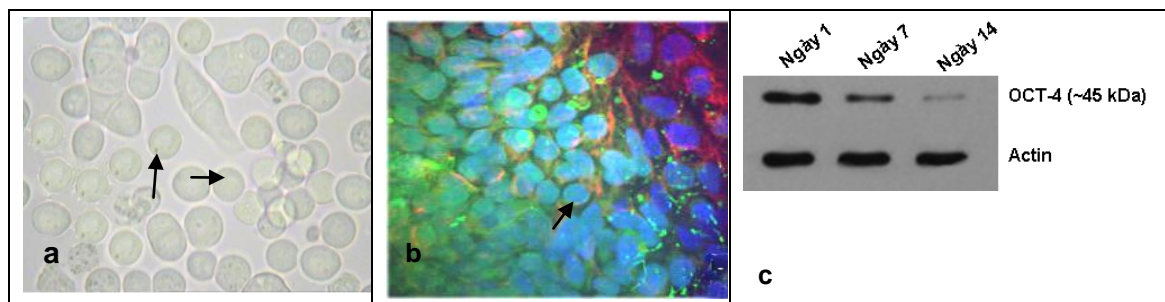
RT-PCR) không tăng. Sau 14 ngày nuôi cấy trên plastic, trong nhóm có bổ sung môi trường nuôi cấy nicotinamide và β -mercaptoetanol thấy insulin tăng cao. Kết quả định lượng protein insulin phù hợp với kết quả định lượng ARNtt (hình 1b). Kết quả hóa miễn dịch tế bào thấy TBG biểu hiện rõ nét insulin trong nhóm được xử lý với nicotinamide và β -mercaptoetanol.



Hình 1: Biểu hiện ARNtt (a) và protein (b) của Insulin. Nồng độ ARNtt và protein tăng sau 7 ngày (ngày 7 - 14) sau khi nuôi cấy tế bào với nicotinamide và β -mercaptoethanol. Tính toán kết quả ARNtt so với nhóm chứng. Tính toán kết quả định lượng protein dựa trên nồng độ protein toàn phần trong dung dịch ly giải tế bào.

* *Biểu hiện OCT-4 - dấu ấn của TBG.*

Trái với dấu ấn insulin, nồng độ ARNtt OCT-4, dấu ấn TBG giảm dần theo thời gian trong nhóm được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nicotinamid và β -mercaptoetanol. Hình ảnh hóa miễn dịch tế bào ngày thứ 14 rất ít tế bào còn biểu hiện OCT-4.



Hình 2. 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. c: Western blot OCT-4: Dịch ly giải tế bào gốc màng ối nuôi cấy trong môi trường định hướng biệt hóa thành tế bào Beta ngày thứ 1, 7, 14. 25 μ g protein/10 μ l của mỗi mẫu dịch ly giải tế bào cho vào mỗi giếng trên gel điện di. Dùng actin để kiểm tra lượng protein cho vào mỗi giếng.

BÀN LUẬN

1. Về thu gom màng ối và phân lập TBG màng ối.

Toàn bộ qui trình kỹ thuật được tiến hành trong điều kiện vô khuẩn. Lấy màng ối trong khi mổ đẻ, vận chuyển trong dung dịch PBS 1x. Tiến hành phân lập tế bào trong vòng 4 giờ kể từ khi mổ đẻ. Nếu để sau 4 giờ mới phân lập, tế bào không còn khả năng phát triển, dễ bị nhiễm khuẩn, nhiễm nấm.

Về phân lập TBG từ màng ối bằng enzym: nếu chỉ phân cắt màng ối bằng trypsin, số lượng tế bào thu được thấp và thời gian phải kéo dài, có khi mất 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, số lượng tế bào thu được sẽ nhiều hơn. Chúng tôi đếm số lượng tế bào thu được bằng buồng đếm tế bào.

Phân lập tế bào màng ối bằng trypsin có thêm 1% hyaluronidase và collagenase B, quá trình phân cắt diễn ra rất nhanh, 30 phút đã phân cắt hết các mảnh màng ối và số lượng tế bào màng ối thu được nhiều nhất. Tuy nhiên, khả năng sống của tế bào giảm.

Các tế bào màng ối biểu hiện nhiều marker TBG như octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), GATA-4, hepatocyte nuclear factor-3 β (HNF-3 β)... Những yếu tố này cho thấy TBG màng ối cũng là TBG đa tiềm năng. Quan sát trực tiếp TBG màng ối trên kính hiển vi đảo ngược, sau đó chụp lại hình ảnh tế bào. Tiến hành phản ứng RT-PCR, hóa miễn dịch tế bào để phát hiện marker của TBG. Trong khuôn khổ đề tài này, chúng tôi dùng dấu ấn OCT-4 để xác định tính gốc của tế bào.

2. Về nuôi cấy biệt hóa TBG màng ối thành tế bào tụy và biểu hiện của các dấu ấn sinh học.

Tế bào trong nhóm chứng nuôi cấy trong môi trường cơ bản DMEM. Tế bào định hướng biệt hóa thành tế bào beta tụy, sau khi cấy 7 ngày, các tế bào phát triển bao phủ 50 - 60% bề mặt đĩa nuôi cấy, bổ sung thêm nicotinamide và β -mercaptoetanol nhằm định hướng tế bào biệt hóa thành tế bào tụy.

Kết quả: sau 2 - 3 ngày, các tế bào bám dính tốt vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển nhưng chưa thấy biệt hóa. Những tế bào vẫn phát triển hình tròn, giống như tế bào ban đầu. Điều này chứng tỏ, ở mật độ thấp, khi tế bào chưa tiếp xúc với nhau, các tế bào vẫn chưa biệt hóa, mặc dù đã có cytokin định hướng biệt hóa.

Quá trình biệt hóa TBG thành tế bào tụy có thể chia thành 2 giai đoạn: giai đoạn biệt hóa chức năng, tức là giai đoạn mà các TBG bắt đầu biểu hiện dấu ấn đặc hiệu của tế bào tụy. Giai đoạn thứ hai: giai đoạn biệt hóa về hình thái, tế bào tụy sắp xếp tạo thành tiểu đảo Langerhans và hình thành cấu trúc hình thái của tụy. Chúng tôi dùng kỹ thuật phân tử để xác định tế bào đó có biểu hiện của dấu ấn tế bào tụy hay không. Do điều kiện của nghiên cứu, chỉ xác định dấu ấn sinh học của tế bào beta tụy là insulin, vì đây là loại tế bào tiết insulin. Chúng tôi thấy, ở ngày thứ 7, đã có biểu hiện rõ ràng của insulin ở cả mức độ ARN và protein. Sở dĩ chúng tôi chọn dấu ấn này vì insulin có biểu hiện cả ở TBG và tế bào tụy với mức độ khác nhau. Khi TBG biệt hóa thành tế bào tụy, biểu hiện của insulin tăng lên. Như vậy, khi tế bào tăng sản xuất insulin, có thể nói về chức năng TBG đã trở thành tế bào có chức năng của tế bào tụy. Tuy nhiên, để TBG phát triển hoàn toàn thành tế bào tụy, tạo cấu

trúc giống tụy, cần phải có môi trường ngoại bào đặc biệt mà ở đó có giá đỡ giàu collagen tít IV, giàu laminin. Chúng tôi chưa có điều kiện để tạo môi trường này.

Qua hình thái và biểu hiện của dấu ấn sinh học đã chứng tỏ TBG màng ối có biệt hóa thành tế bào tụy. Nghiên cứu này phù hợp với các tác giả khác.

KẾT LUẬN

Cùng với những nghiên cứu khác về TBG màng ối như: biệt hóa TBG màng ối thành tế bào xương, tế bào gan, tế bào thần kinh, tế bào cơ tim... Trong tương lai, TBG màng ối sẽ mở ra một hướng mới trong điều trị lâm sàng về cấy ghép mô, điều trị đái tháo đường, sản xuất insulin in vitro dùng cho BN tiểu đường tít I... Từ những kết quả thu được, chúng tôi đưa ra kết luận như sau: phân lập được TBG từ màng ối người, nuôi cấy tăng sinh được TBG màng ối trong môi trường DMEM nồng độ glucose cao có thêm 10% FBS và 1% penicillin-streptomycin thành công. Đã biệt hóa được tế bào có chức năng của tế bào beta tụy từ TBG màng ối, biểu hiện bằng hình thái dấu ấn sinh học insulin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Trân, Dominique Couchie, Philippe Mavier. 2009. Hoạt tính và vai trò của matrix metalloproteinase-2 và -9 trong quá trình tái sinh gan từ TBG. Tạp chí Y-Dược học quân sự. 2009, tập 34, số 3, tr.83-88.
2. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? N Engl J Med. 2003, 349, pp.570-582.
3. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001, Jun, 42 (7), pp.1539-1546.
4. Masanori Izumi, Benjamin J. Pazin, Crescenzo F. Minervini, Jörg Gerlach, Mark A. Ross, Donna B. Stolz, Morris E. Turner, Robert L. Thompson, Toshio Miki. Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. Journal of Reproductive Immunology. 2009.
5. Ayaka Toda, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, and Toshio Nikaido. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. J Pharmacol Sci. 2007, 105, pp.215-228.
6. Kiyotaka Kitagawa, Shuichiro Yanagisawa, Kazuhiko Watanabe, Tatsuya Yunoki, Atsushi Hayashi, Motonori Okabe and Toshio Nikaido. A hyperdry amniotic membrane patch using a tissue adhesive for corneal perforations and bleb leaks. American Journal of Ophthalmology. 2009, Vol 148, Issue 3, September, pp.383-389.
7. Oh Steve KW, Choo Andre BH. Human embryonic stem cell: Technological challenges toward therapy. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2006, 33, pp.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, pp.300-311.

9. *Toshio Miki, Keitaro Mitamura, Mark A. Ross, Donna B. Stolz, Stephen C. Stroma* identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*. 2007,75, pp.91-96.

10. *Toshio Miki, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, Stephen C. Stroma* stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005, 23, pp.1549-1559.