

ĐÁNH GIÁ VỀ PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ TỦY XƯƠNG TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Nguyễn Thị Hào¹, Phan Thị Thùy Hoa¹, Trần Thị Phương Túy¹,
Phan Hoàng Duy¹, Nguyễn Đình Thiện¹

DOI: 10.38103/jcmhch.2020.61.15

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát về sự phân lập tế bào đơn nhân từ tủy xương và đánh giá hiệu suất tăng sinh tế bào gốc trung mô của tủy xương trong quá trình nuôi cấy.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Dịch tủy xương của bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính, nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Kết quả: Tổng số lượng tế bào đơn nhân sau phân lập trung bình là $373,74 \times 10^6$ tế bào và tỷ lệ sống đều trên 90%. Số ngày nuôi cấy trung bình là 12,44 ngày, hiệu quả phát triển tế bào đạt 86,29%. Tỷ lệ MSC dương tính với các marker của tế bào gốc trung mô trung bình là 93,11% và tỷ lệ sống trung bình là 96,48%.

Kết luận: Có thể thu nhận tế bào đơn nhân sau khi phân lập từ tủy xương người với tỷ lệ sống cao. Trong quá trình nuôi cấy, hiệu quả phát triển tế bào khá cao, tế bào thu được sau nuôi cấy có chứa quần thể tế bào gốc trung mô.

Từ khóa: tế bào gốc trung mô từ tủy xương, phân lập, nuôi cấy, hiệu quả phát triển.

ABSTRACT

STUDY ON THE ISOLATION AND CULTURE OF THE BONE MARROW - DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AT HUE CENTRAL HOSPITAL

Nguyen Thi Hao¹, Phan Thi Thuy Hoa¹, Tran Thi Phuong Tuy¹,
Phan Hoang Duy¹, Nguyen Dinh Thien¹

Objectives: To investigate the isolation of mononuclear cells from bone marrow and evaluate the efficiency of mesenchymal stem cell proliferation in the culture process.

Research methods: Bone marrow fluid from patients with acute traumatic brain injury, Cross-sectional descriptive.

Results: The total number of mononuclear cells after isolation is 373.74×10^6 cells and the survival rate is over 90%. The average number of days of culture is 12.44 days, the efficiency of cell development reaches 86.29%. The percentage of MSC positive for mesenchymal stem cells markers averaged 93.11%

1. Bệnh viện Trung ương Huế - Ngày nhận bài (Received): 9/4/2020; Ngày phản biện (Revised): 25/04/2020;
- Ngày đăng bài (Accepted): 29/05/2020
- Người phản hồi (Corresponding author): Nguyễn Thị Hào
- Email: bsnguyenthahaor@gmail.com

and the average survival rate was 96.48%.

Conclusion: Mononuclear cells can be collected after isolation from human bone marrow with high survival rates. During culture, the cell development efficiency is quite high, the cells obtained after culture contain mesenchymal stem cell populations.

Keywords: Bone marrow-derived Mesenchymal stem cells, isolate, culture, develop efficiency.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tủy xương là một mô lý tưởng để nghiên cứu tế bào gốc vì khả năng tiếp cận của nó và vì liều lượng và đáp ứng tăng sinh của tế bào gốc có nguồn gốc từ tủy xương có thể dễ dàng được nghiên cứu. Tủy xương chứa hai quần thể tế bào gốc riêng biệt: tế bào gốc tạo máu (HSC) và tế bào gốc trung mô (MSC). Bên cạnh kinh nghiệm ghép tủy xương trong điều trị ung thư máu bằng HSC, các tế bào gốc khác có nguồn gốc từ tủy xương cũng trở thành một công cụ chính trong y học tái tạo [10].

Tế bào gốc trung mô (MSC) là quần thể tế bào có đặc tính tự tái tạo và biệt hoá đa dạng thành nhiều loại tế bào khác nhau trong môi trường thích hợp, bao gồm tế bào xương, tế bào sụn, tế bào mỡ, tế bào cơ tim và tế bào thần kinh [5], [6], [7]. MSC có thể thu nhận từ rất nhiều nguồn khác nhau, trong đó các nguồn thu nhận phổ biến là ở máu ngoại vi, tủy xương, dây rốn [9], [11].

Hiệu quả của MSC đã được chứng minh trong liệu pháp tế bào và y học tái tạo như tái tạo cơ tim, da, gan, tụy, xương, sụn,... [8], [12]. Ở Việt Nam đã có nhiều đề tài liên quan đến ghép tế bào gốc tạo máu trên bệnh nhân bệnh lý về máu và cơ quan tạo máu, u đặc và một số đề tài liên quan tế bào gốc trung mô liên quan đến điều trị cơ xương khớp, bệnh phổi mạn tính [1]. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài này với mục tiêu khảo sát về sự phân lập tế bào đơn nhân từ tủy xương và đánh giá hiệu suất tăng sinh tế bào gốc trung mô của tủy xương trong quá trình nuôi cấy tế bào.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

27 bệnh nhân bị chấn thương sọ não cấp tính, chỉ số Glasgow 5-8, có máu tụ dưới màng não, xuất huyết não.

Tiêu chuẩn chọn bệnh:

Tất cả bệnh nhân tham gia nghiên cứu phải được sự đồng thuận của người thân và được thông qua Hội đồng Y đức Bệnh viện.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân chấn thương sọ não kèm đa chấn thương nặng.
- Bệnh nhân có tiền sử về bệnh thần kinh ngoại biên hoặc bệnh tự miễn, các bệnh mãn tính như tăng huyết áp, đái tháo đường, hạn chế về mặt nhận thức, bệnh viêm mãn tính, ung thư ác tính, bệnh gan mãn tính, sử dụng thuốc kháng viêm thường xuyên, bệnh lý về máu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.2. Hoá chất - Vật tư tiêu hao và trang thiết bị

Môi trường StemMACS XF, Trypsin-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich), Ficoll-Paque Plus 1.077g/ml, Trypan Blue 0,4%, PBS, NaCl 9‰, MSC Phenotyping Kit, Màng lọc 70µm, chai nuôi 75 cm², 25 cm², ống Falcon (15ml và 50ml), pipet 10ml, 1000µl, 200µl.

Tủ âm CO₂, máy ly tâm, kính hiển vi soi ngược, tủ an toàn sinh học cấp II, máy đếm tế bào dòng chảy FACS Canto II (Mỹ).

2.2.3. Quy trình nghiên cứu

Bước 1: Thu thập tủy xương

Tiến hành tại phòng mổ vô trùng với đầy đủ các trang thiết bị hiện đại của Khoa Gây mê hồi sức A – Bệnh viện TW Huế.

Bước 2: Phân lập tế bào đơn nhân

- Tách lớp Buffy coat: Quay ly tâm túi dịch tủy xương bằng máy ly tâm túi máu Sorval, tốc độ 3670 vòng/phút trong 7 phút, sau đó cho lên bàn ép túi máu để tách lấy lớp Buffy coat, chứa phần lớn tế bào có nhân.

- Phân lập (tách) khối tế bào đơn nhân: Pha loãng dịch Buffycoat bằng dung dịch PBS, tỷ lệ

Bệnh viện Trung ương Huế

1/3 và lọc với màng lọc 70 μ m nhằm loại mảnh xương, hạt mỡ... Cho 20 ml dung dịch Ficoll-Paque Plus 1.077g/ml vào ống nón đáy nhọn loại 50 ml, sau đó cho vào 30 ml dung dịch Buffycoat đã pha loãng 1/3 trên bề mặt Ficoll. Thao tác ở bước này phải thật nhẹ nhàng tránh làm xáo trộn bề mặt tiếp xúc với Ficoll. Ly tâm 1800 vòng (rpm) trong 20 phút. Tách lấy vòng nhẫn ở giữa (vòng tế bào đơn nhân), cho vào 1 ống nghiệm 50ml khác. Rửa lớp này 2 lần bằng PBS với tốc độ ly tâm 2500 vòng trong 5 phút. Huyền dịch thành 12 – 14ml bằng dung dịch nước muối sinh lý 9‰ (và có thể kèm huyết tương giàu tiểu cầu), lấy 1 - 2ml để kiểm tra chất lượng sản phẩm (đếm tế bào...) và 1 - 2ml để nuôi cấy, còn lại 10ml để ghép cho bệnh nhân.

Bước 3: Nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tế bào thu được sau khi ly tâm với Ficoll-Paque được nuôi tăng sinh trong chai T-flask với mật độ 5×10^4 tế bào/cm² ở điều kiện nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95%. Sau 24-36 giờ đầu tiên, tế bào không bám dính được loại bỏ. Các tế bào bám dính phát triển thành các cụm tế bào trong 3-7 ngày. Khi mật độ tế bào đạt 80-90% diện tích, tế bào được tách với Trypsin/EDTA 0.25% và rửa sạch ba lần bằng PBS.

- Đánh giá khả năng phát triển của tế bào:

Sau 2 lần thay môi trường, các tế bào trong chai nuôi cấy chỉ còn là các tế bào bám dính. Tế bào được gọi là phát triển sau khi bám là các tế bào có khả năng trải hình dạng giống tế bào fibroblast (không còn là hình cầu). Để đánh giá khả năng phát triển, các tế bào có hình dạng giống tế bào fibroblast (tế bào gốc trung mô) được đếm trong 10 thị trường. Số tế bào bám được tính trung bình trong 10 lần đếm.

Hiệu quả phát triển = Số tế bào phát triển / Số tế bào bám dính.

- Xác định đặc tính tế bào gốc trung mô: Tế bào gốc trung mô sau nuôi cấy được nhuộm với các kháng thể đơn dòng và cho thấy CD34 (âm tính), CD73, CD90, và CD105 (dương tính).

2.2.4. Thống kê và xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê y học, phần mềm SPSS 20.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phân bố tuổi, giới

Chỉ tiêu		n	%
Tuổi	≤ 20	1	3,70
	21-40	13	48,15
	41-60	10	37,04
	≥ 60	3	11,11
	$X \pm SD$	$39,70 \pm 14,55$	
Nam		24	88,89
Nữ		3	11,11

Độ tuổi trung bình của các bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu là $39,70 \pm 14,55$, chủ yếu tập trung vào nhóm có độ tuổi lao động (từ 21 tới 60 tuổi). Đa số bệnh nhân là nam giới, chiếm tỷ lệ 88,89%.

3.2. Phân lập tế bào đơn nhân

3.2.1. Đặc điểm khối tế bào tủy xương thu được

	Trung bình	Tối thiểu	Tối đa
Thể tích tủy (ml)	$261,11 \pm 21,18$	250	300
Buffy coat (ml)	$87,30 \pm 20,04$	50	120
WBC tủy ($\times 10^6$ /ml)	$19,18 \pm 2,88$	14,32	25,81
TBĐN tủy ($\times 10^6$ /ml)	$5,80 \pm 1,12$	3,31	8,72
Tổng TBĐN tủy ($\times 10^6$ tế bào)	$1290,19 \pm 247,13$	915	1826

Tùy vào thể trạng và cân nặng bệnh nhân mà thể tích tủy được lấy khác nhau. Thể tích dịch tủy trung bình thu được là $261,11 \pm 21,18$ ml và thể tích trung bình của Buffy coat là $87,30 \pm 20,04$ ml. Dịch tủy thu được của chúng tôi ít hơn so với nghiên cứu của Lê Phước Quang trên đối tượng bệnh nhân khuyết hồng xương, khớp giả (300-400 ml), điều này có thể lý giải là do nghiên cứu của chúng tôi không chỉ sử dụng tế bào đơn nhân sau phân lập mà còn nuôi cấy để tăng sinh số lượng nên lượng tủy không cần thiết phải lấy nhiều [2]. Tổng số lượng tế bào đơn nhân trong khối tế bào tủy xương thu được là $1290,19 \pm 247,13 \times 10^6$ tế bào.

3.2.2. Đặc điểm tế bào đơn nhân của tủy xương sau phân lập

	Trung bình	Tối thiểu	Tối đa
WBC ($\times 10^6/\text{ml}$)	$41,93 \pm 9,78$	23,32	63,50
TBĐN ($\times 10^6/\text{ml}$)	$28,53 \pm 5,96$	16,32	37,83
Tổng TBĐN sau tách ($\times 10^6$ tế bào)	$373,74 \pm 73,69$	229	492
Tỷ lệ sống TBĐN (%)	$97,48 \pm 2,38$	90,00	99,00

Sau khi phân lập, tổng số lượng tế bào đơn nhân thu được là $373,74 \times 10^6$ tế bào, giảm so với số lượng tế bào đơn nhân dịch tủy xương. Nguyên nhân là do Ficoll chúng tôi sử dụng chủ yếu giữ lại tế bào MSC và do tế bào mất đi một phần trong quá trình phân lập. Tỷ lệ sống của tế bào đơn nhân sau phân lập được xác định bằng kỹ thuật nhuộm Trypan Blue 0,4%, đếm tế bào trên kính hiển vi quang học, đếm cả số tế bào sống và số tế bào chết. Tỷ lệ tế bào sống = số lượng tế bào sống / (số lượng tế bào sống + số lượng tế bào chết) $\times 100$. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ sống tế bào đơn nhân sau phân lập đều trên 90%, trung bình là $97,48 \pm 2,38$ %. Kết quả của chúng tôi tương tự với tác giả Lê Phước Quang [2].

3.3. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô

3.3.1. Số ngày nuôi cấy MSC

Số ngày nuôi cấy trung bình là 12,44 ngày (tối thiểu là 9 ngày, tối đa là 15 ngày).

3.3.2. Hiệu suất tăng sinh tế bào

Thị trường Chỉ số	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Trung bình
Số tb bám dính	31	36	21	52	71	22	78	35	44	33	42,3
Số tế bào phát triển	29	34	24	37	63	30	65	28	32	24	36,5
Hiệu quả phát triển tế bào											86,29%

Sau 24-36 giờ, các tế bào bám dính rất nhiều, số tế bào bám dính trung bình trên một thị trường là 42,3 tế bào. Sau 72 giờ, số tế bào phát triển của một thị trường khá nhiều, trung bình là 36,5 tế bào. Hiệu quả phát triển của tế bào là 86,29%. Kết quả của chúng tôi tương đồng với tác giả Nguyễn Thanh Thủy và cộng sự khi nuôi cấy MSC từ mô mỡ với hiệu quả phát triển là 84,3% và tác giả Dương Thị Bạch Tuyết và CS với 90,11% [3], [4]. Điều này chứng tỏ môi trường nuôi cấy chúng tôi đang sử dụng có khả năng kích thích sự bám dính và phát triển của tế bào, có triển vọng trong việc nuôi cấy, phát triển tế bào gốc trung mô từ tủy xương người.

3.3.3. Đánh giá chất lượng tế bào

	Trung bình	Tối thiểu	Tối đa
WBC ($\times 10^6/\text{ml}$)	$27,83 \pm 7,71$	14,61	47,96
MSC ($\times 10^6/\text{ml}$)	$25,95 \pm 7,33$	13,50	44,80
Tổng số lượng tế bào MSC ($\times 10^6$ tế bào)	$311,55 \pm 87,87$	162	537
Tỷ lệ MSC dương tính với CD73,90,105 (%)	$93,11 \pm 3,18$	86,60	99,00
Tỷ lệ sống MSC (%)	$96,48 \pm 1,97$	95,00	99,00

Sau khi mật độ tế bào đạt 89-90% thì tiến hành tách MSC. Tổng số lượng tế bào MSC thu được trung bình là $311,55 \pm 87,87 \times 10^6$ tế bào. Trong đó tỷ lệ MSC dương tính với các marker của tế bào gốc trung mô trung bình là 93,11% và tỷ lệ sống trung bình cũng khá cao với 96,48%. Từ đó cho thấy khối tế bào thu được sau tách có chứa quần thể tế bào gốc trung mô.

IV. KẾT LUẬN

- Có thể thu nhận tế bào đơn nhân sau khi phân lập từ tủy xương người.
- Tỷ lệ sống tế bào đơn nhân sau phân lập đều trên 90%, trung bình là $97,48 \pm 2,38\%$.
- Trong quá trình nuôi cấy, tế bào bám dính và phát triển tốt, hiệu quả phát triển khá cao

(86,29%).

- Tế bào thu được sau nuôi cấy có chứa quần thể tế bào gốc trung mô.

V. KIẾN NGHỊ

Nuôi cấy và biệt hóa tế bào gốc trung mô từ tủy xương để ứng dụng trong y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hà và cs (2011), “Nghiên cứu xây dựng sử dụng tế bào gốc tạo máu tự thân để điều trị các tổn thương cơ, xương khó liền”, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.
2. Lê Phước Quang (2010), “Nghiên cứu chất lượng khối tế bào gốc từ tủy xương bằng phương pháp ly tâm phân lớp tỷ trọng tế bào”, Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Y Dược Huế.
3. Nguyễn Thanh Thủy và cs (2018), “Nhận xét bước đầu về nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người tại Bệnh viện Trung ương Huế”, Tạp chí Y học Việt Nam, số đặc biệt - 2018.
4. Dương Thị Bạch Tuyết và cs (2007), “Thu nhận tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem cells) người từ máu cuống rốn”, Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh, số 12, trang 173 - 184.
5. Baer P.C. and Geiger H. (2012), “Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity”, Stem cells international. 2012.
6. Dominici M., et al. (2009), “Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa”, Transplantation. 87(9S), pp. S36 - S42.
7. Gnocchi M., Melo Luis G. (2009), “Bone Marrow - Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium”, Stem Cells in Regenerative Medicine, pp 281 - 294.
8. Kim N. and Cho S.-G. (2013), “Clinical applications of mesenchymal stem cells”, The Korean Journal of internal medicine. 28(4), pp. 387 - 402.
9. Lyahyai J., et al. (2012), “Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood”, BMC veterinary research. 8(1), p. 169.
10. Togel F. and Westenfelder C. (2007), Adult Bone Marrow – Derived Stem Cells for Organ Regeneration and Repair, Developmental Dynamics 236, pp. 3321 - 3331.
11. Zou Z., et al. (2010), “More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body”, Expert opinion on biological therapy. 10(2), pp. 215 - 230.
12. Zuk A. et al (2001), “Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies”, Tissue engineering, Vol.7, Iss. 2, pp. 211 - 228.