

NHẬN XÉT BƯỚC ĐẦU VỀ PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ Ở BỆNH NHÂN SUY THẬN MẠN TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Trà Thị Khánh Nhi¹, Trần Hữu Phúc¹,
Phan Thị Thùy Hoa², Phan Hoàng Duy², Chế Thị Cẩm Hà¹

TÓM TẮT

Phân lập và nuôi cấy 5 mẫu dịch tủy xương bệnh nhân không có bệnh lý về huyết học và tủy xương hoạt động bình thường, tế bào đơn nhân trung bình thu được là $(2,88 \pm 0,61) \times 10^5$ tế bào/mL và số lượng tế bào MSC sau 22 ngày nuôi trung bình thu được là $(4,80 \pm 0,07) \times 10^4$ tế bào/mL.

Từ đó, áp dụng quy trình phân lập, nuôi cấy tăng sinh MSC ở bệnh nhân suy thận mạn và khẳng định tế bào trung mô qua quá trình biệt hoá. Số lượng tế bào đơn nhân thu được: $(2,26 \pm 0,15) \times 10^5$ (tế bào/mL) và số lượng tế bào MSC thu được sau 22 ngày nuôi trung bình thu được $(4,5 \pm 0,51) \times 10^4$ (tế bào/mL).

Từ khoá: Suy thận mạn, tế bào gốc trung mô, nuôi cấy, biệt hoá.

ABSTRACT

STUDY ON ISOLATION AND CULTURE OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE PATIENT WITH CHRONIC RENAL FAILURE AT HUE CENTRAL HOPITAL

Tra Thi Khanh Nhi¹, Tran Huu Phuc¹,
Phan Thi Thuy Hoa², Phan Hoang Duy², Che Thi Cam Ha¹

Isolation and culture mononuclear cells from the bone marrow of five patients without diseases of the bone marrow and hematological, average the mononuclear cell are obtained: $(2.88 \pm 0.61) \times 10^5$ cells/mL and the average the number of mesenchymal stem cells from five patients bone marrow: $(4.8 \pm 0.07) \times 10^4$ cells/mL in vitro culture after 22 days. These MSC cells could differentiate into adipose. Average number of CFU-f per mL: 45 CFU. Then we applied this protocol of MSC culture and proliferation process for patient chronic renal failure: average the mononuclear cell are obtained: $(2.26 \pm 0.15) \times 10^5$ cells/mL and the average the number of mesenchymal stem cells from five patients bone marrow: $(4.5 \pm 0.51) \times 10^5$ /cells mL in vitro culture after 22 days. The number of CFU-f per mL: 42 CFU.

Key word: patient with chronic renal failure, mesenchymal stem cells, in vitro, differentiate.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Suy thận mạn ảnh hưởng đến 11% dân số trưởng thành và nguyên nhân gây tử vong ở các nước phương Tây [7]. Ở các nước đang phát triển,

ước tính có khoảng 150 triệu người mắc bệnh, Trên thế giới, hơn 1,5 triệu người đang được ghép thận.

Số bệnh nhân chạy thận nhân tạo, ghép thận sẽ tăng lên gấp 2 lần trong 10 năm [6]. Vì vậy, một

1. Đại học Khoa học Huế
2. Bệnh viện Trung ương Huế

- Ngày nhận bài (Received): 10/9/2017; Ngày phản biện (Revised): 2/10/2017;
- Ngày đăng bài (Accepted): 31/10/2017
- Người phản hồi (Corresponding author): Phan Thị Thùy Hoa
- Email: drhoavn@gmail.com; ĐT: 0905997687

Bệnh viện Trung ương Huế

số nước đã sử dụng ghép tế bào gốc để hỗ trợ điều trị dựa vào đặc tính điều biến miễn dịch, tham gia tái tạo và sửa chữa các tế bào thận [2], [10]. Tế bào gốc trung mô là quần thể tế bào tiền thân đa dòng với tiềm năng biệt hoá thành các dòng tế bào có nguồn gốc khác nhau [12]. Nhiều nghiên cứu chứng minh tế bào gốc trung mô sau khi được phân lập, tăng sinh trong môi trường thích hợp, chúng sẽ được kích hoạt bởi các yếu tố biệt hóa để có khả năng di chuyển đến ổ viêm nhiễm ở thận và tại đây chúng sẽ tương tác với vi môi trường nội mô để tiết ra các cytokines đặc hiệu trong điều hòa miễn dịch và tái tạo mô, khả năng tiết các yếu tố kích thích sự phân chia tế bào, các yếu tố ngoại bào dẫn đến sự tái tạo, giúp làm giảm đáp ứng viêm tại vi môi trường vùng tổn thương [1], [5], [9].

Mục tiêu: Đánh giá kết quả tăng sinh tế bào gốc trung mô và xác định đặc tính tế bào gốc trung mô từ bệnh nhân suy thận mạn, mở ra hướng ứng dụng mới của tế bào gốc trong điều trị suy thận.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dịch tủy xương của 6 bệnh nhân tuổi trung bình là 29,2 tuổi, bao gồm:

- 5 bệnh nhân (3 nam, 2 nữ), không có bệnh lý về huyết học và tủy xương hoạt động bình thường. Tuổi từ 4 - 65 tuổi. Thời gian từ tháng 1/2017 đến tháng 9/2017.

- 1 bệnh nhân suy thận mạn do lupus ban đỏ hệ thống, 31 tuổi, nặng 40kg.

Tiêu chuẩn chọn bệnh: Đồng ý tham gia nghiên cứu, không phân biệt giới tính. Các bệnh nhân không bị bệnh máu ác tính hay bệnh lý ung thư khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả

- Quy trình nghiên cứu:

- + Chọc hút 10ml dịch tủy xương từ gai chậu sau trên.

- + Phân lập tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm phân lớp tỷ trọng tế bào.

- + Nuôi cấy tăng sinh tế bào.

- + Xác định các marker bề mặt và biệt hoá sau nuôi cấy.

- Hoá chất - Dụng cụ:

- + DMEM/F12(Sigma), 10%FBS (Invitrogen), IBMX(Invitrogen), Indomethacin, Gentamycin-Streptomycin, Giemsa May-Grunwald, Dexamethasone (Sigma), Trypsin-EDTA 0,25%, Formandehyde, thuốc nhuộm Oil red-O, PBS-Phosphat buffer saline, Ascorbat phosphat, Trypan blue 0,4%.

- Phương pháp tiến hành

- + Phân lập tế bào đơn nhân từ tủy xương, sử dụng phương pháp phân lập tế bào đơn nhân bằng dung dịch Ficoll-hypaque theo quy trình Wolfe (2008).

- + Xác định tỷ lệ tế bào sống chết: 20 μ L dịch treo tế bào nhuộm 20 μ L Trypan Blue 0,4% [8].

- + Nuôi cấy và xác định đặc tính tế bào sau nuôi cấy: Nuôi tế bào với mật độ 50.000 tế bào/cm², thêm 3 mL môi trường, nuôi cấy ở 37°C. Cấy chuyển tăng sinh 3 - 5 lần với mật độ 1000 tế bào/cm² để đánh giá hiệu quả phát triển tế bào. Khi quần thể tế bào trung mô tương đối đồng nhất, tiến hành đánh giá khẳng định tế bào qua kỹ thuật nuôi cấy cụm nguyên bào sợi (CFU-F) và kiểm tra đặc tính tế bào qua sự biệt hóa thành tế bào mỡ.

- + Nuôi tạo cụm Colony Forming Units-Fibroblast (CFU-F): Sau 7 ngày, các MSC tạo cụm CFU từ 40 - 70 tế bào, hình dạng tương tự tế bào fibroblast. Mẫu cụm được nhuộm Giemsa để quan sát và đếm cụm tế bào CFU-F. Đếm số cụm, mỗi mẫu đếm 3 lần, số lượng cụm được tính trung bình.

- + Biệt hoá: Nuôi tế bào với DMEM/F12, 10% FBS có bổ sung 0,5 mM IBMX, 50 μ g ascorbate (Sigma), 50 μ M indomethacin và 0,5 μ M dexamethasone. Sau 2 tuần nuôi cấy với chất cảm ứng tế bào được cố định bằng formandehyde 10% trong 30 phút và nhuộm với Oil Red-O 0,5% trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Oil red-O là thuốc nhuộm lipid, Oil Red-O sẽ hòa tan những vị trí có giọt mỡ và nhuộm đỏ.

- Thống kê và xử lý số liệu: Xử lý số liệu bằng Microsoft Excel 2010.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và nuôi cấy tế bào của mẫu tủy bình thường

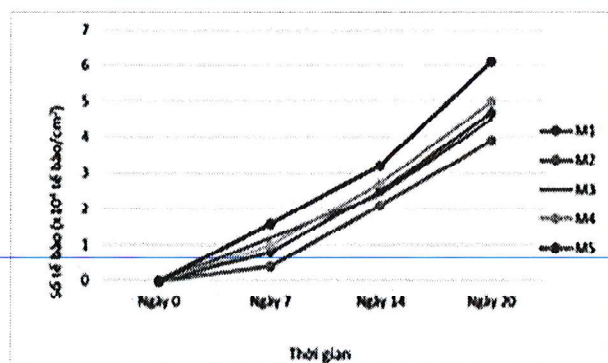
Tiến hành thu mẫu tủy (M1, M2, M3, M4, M5) của 5 bệnh nhân không bị bệnh lý về huyết học và tủy xương hoạt động bình thường. Tuổi trung bình: $33,4 \pm 19,7$ (từ 4 đến 65 tuổi) (Nam: 3 bệnh nhân, Nữ: 2 bệnh nhân). Cân nặng trung bình: $52 \pm 12,9$ kg.

Kết quả thu được:

- Số tế bào đơn nhân trung bình của 5 mẫu tủy sau phân lập là: $(2,88 \pm 0,61) \times 10^5$ tế bào/mL. Trong đó mẫu tủy M5 thu được số lượng tế bào nhiều nhất: $(3,74 \pm 0,21) \times 10^5$ tế bào/mL và thấp nhất là mẫu M2: $(1,88 \pm 0,17) \times 10^5$ tế bào/mL.

Sự tăng sinh tế bào MSC phân lập từ tủy xương của các bệnh nhân này qua nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.1 và hình 3.1.

Bệnh nhân	Số lượng tế bào từ tủy ($\times 10^5$ /mL)
M1	$2,96 \pm 0,10$
M2	$1,88 \pm 0,17$
M3	$2,57 \pm 0,09$
M4	$3,27 \pm 0,20$
M5	$3,74 \pm 0,21$
Trung bình	$2,88 \pm 0,61$



Bảng 3.1 và hình 3.1: Hiệu quả phát triển tế bào của 5 mẫu tủy xương bình thường

So sánh kết quả này với kết quả nghiên cứu của Wolfe và cộng sự (2008), cho thấy số lượng tế bào đơn nhân của chúng tôi thu được ít hơn. Tuy nhiên, ở 5 mẫu, sau 24 - 72h các tế bào đều bám và trải với hình dạng nguyên bào sợi, phù hợp với quy định tiêu chuẩn quốc tế của quần thể MSC trong nuôi cấy invitro.

Đánh giá chung, do nguồn thu dịch tủy hoàn toàn ngẫu nhiên, không chọn lựa độ tuổi và mức độ bệnh nên có sự chênh lệch lớn về số lượng tế bào đơn nhân thu được ở 5 bệnh nhân. Tuy nhiên, ở tất cả mẫu dịch tủy nghiên cứu đều cho thấy có mối tương quan thuận giữa hiệu quả phát triển tế bào với số lượng tế bào đơn nhân thu được. Cụ thể ở mẫu M2 có số lượng đơn nhân thấp nhất: $(3,9 \pm 0,01) \times 10^4$ tế bào/mL và hiệu quả phát triển tế bào sau 10 ngày nuôi cấy là thấp nhất: $13,5 \pm 1,1\%$, sau 20 ngày: $40,1 \pm 1,3\%$. Ngược lại, mẫu 5 có số lượng tế bào đơn nhân cao nhất: $(6,1 \pm 0,03) \times 10^4$ tế bào/mL và hiệu quả phát triển cao nhất sau ngày 10: $45,2 \pm 1,5\%$, sau 20 ngày: $55,1 \pm 1,9\%$. Trung bình 5 mẫu sau nuôi cấy thu được số tế bào MSC là $(4,8 \pm 0,07) \times 10^4$ tế bào/mL.

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu nuôi cấy MSC in vitro từ tủy người [6], [11].

3.2. Kết quả nuôi cấy tế bào của dịch tủy xương bệnh nhân suy thận mạn

Bệnh nhân được hội chẩn là suy thận giai đoạn II do biến chứng của lupus ban đỏ hệ thống. Kết quả xét nghiệm máu có nồng độ Hb 7,2 g/dL (giảm 43,5% so với mức tối thiểu của người bình thường), MCHC 34,4 g/dL. Xét nghiệm sinh hóa cho thấy lượng urea 33,7 mmol/L (tăng 4,2 lần so với mức tối đa của người bình thường) và creatinine 325 μ mol/L (tăng 3,4 lần so với mức tối đa của người bình thường).

Đối chiếu các quy định về xếp loại mức độ bệnh ở Quyết định số 1494/QĐ-BYT ngày 22/04/2015 của Bộ Y tế ban hành tài liệu Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý Huyết học với các kết quả xét nghiệm trên, bệnh nhân được nhận định thiếu máu hồng cầu bình thường, đẳng sắc, có suy tủy,

Bệnh viện Trung ương Huế

nhiễm độc và nhiễm khuẩn.

Số lượng tế bào đơn nhân thu được: $(2,26 \pm 0,15) \times 10^5$ tế bào/mL dịch tủy. Về kết quả nuôi cấy, sau 24 - 72h các tế bào bám và trải tương tự ở các mẫu tủy bình thường, tuy nhiên hiệu quả phát triển tế bào chậm hơn so với tốc độ phát triển ở mẫu tủy bình thường. Số lượng tế bào MSC thu được sau nuôi cấy sơ cấp là $(2,10 \pm 0,30) \times 10^4$ (tế bào/mL) và sau nuôi cấy thứ cấp: $(4,50 \pm 0,51) \times 10^4$ (tế bào/mL).

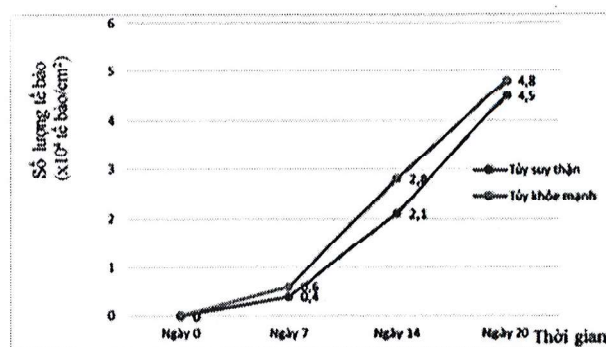
3.3. So sánh kết quả nuôi cấy tế bào của mẫu tủy bệnh nhân suy thận mạn và mẫu tủy bình thường

Tế bào gốc trung mô sau phân lập và tăng sinh, được xác định bằng kỹ thuật nuôi cấy cụm nguyên bào sợi (CFU-F). Chúng tôi tiến hành so sánh hiệu quả nuôi cấy tế bào MSC ở bệnh nhân suy thận mạn so với nhóm tủy bình thường.

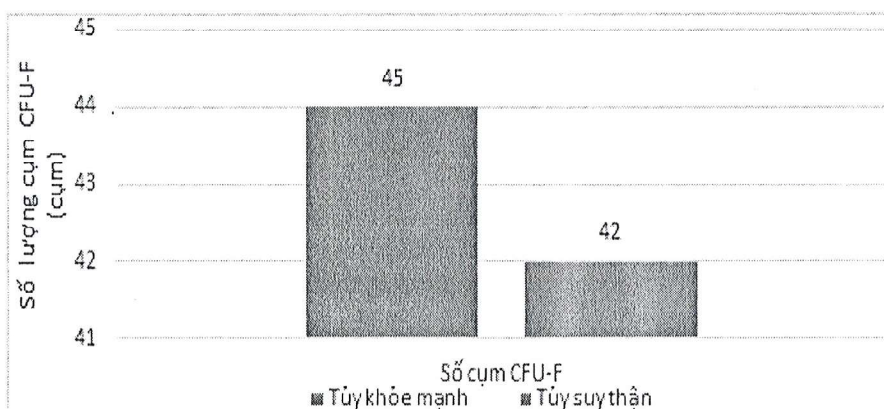
Các mẫu tủy đều được cấy và đếm CFU-F. Số lượng cụm CFU-F thu được: M1: 50 cụm, M2: 37 cụm, M3: 41cụm, M4: 38 và M5: 57 cụm. Kết quả thu được số cụm CFU-F trung bình ở nhóm bệnh

nhân không bị bệnh lý về huyết học là 45 cụm, cho thấy MSC có khả năng tạo CFU mạnh hơn so với bệnh nhân suy thận mạn. Kết quả thu được số cụm CFU-F/ml của bệnh nhân suy thận mạn: 42cụm.

Nhận xét: tốc độ phát triển tế bào trung bình của mẫu tủy bình thường gấp 1,2 lần so với mẫu tủy bệnh nhân suy thận mạn cũng như khả năng tạo cụm CFU-F trung bình của mẫu tủy bình thường cao hơn 1,1 lần của người suy thận mạn.



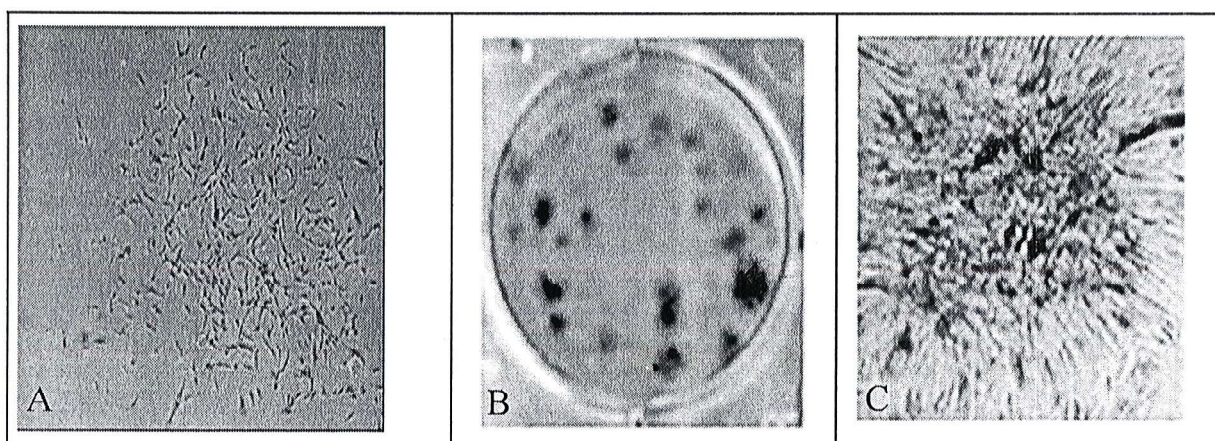
Hình 3.2: So sánh kết quả nuôi cấy tế bào MSC của mẫu tủy bệnh nhân suy thận mạn và mẫu tủy bình thường.



Hình 3.3: Khả năng tạo cụm CFU-F của mẫu tủy bình thường và mẫu tủy bệnh nhân suy thận mạn.

Theo Jose (2002), nguồn thu nhận tế bào MSC để nuôi cấy tăng sinh hiệu quả phụ thuộc rất lớn vào chức năng của dịch tủy [4]. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Bệnh nhân này có hồng cầu 7,2 g/dL, giảm 43,5% so với mức tối thiểu của người bình thường đồng thời định lượng urea 33,7 mmol/L (tăng 4,2 lần người bình thường) và creatinine 325 μ mol/L (tăng 3,4 lần so với mức tối đa của người bình thường).

Các chỉ số trên cho thấy bệnh nhân có dấu hiệu chức năng thận suy giảm thông qua việc giảm sản xuất hồng cầu cũng như khả năng bài tiết creatinine, urea, dẫn đến nhiễm độc máu và gây rối loạn nội tiết làm ảnh hưởng đến các hoạt động sống của TBG trung mô. Nhiều nghiên cứu báo cáo rằng, chỉ nên chọn tủy xương làm nguồn thu nhận MSC đối với bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn I và II [7]. Đối với bệnh nhân có chức năng tủy giảm nên sử dụng mô mỡ làm nguồn thu nhận tế bào MSC.



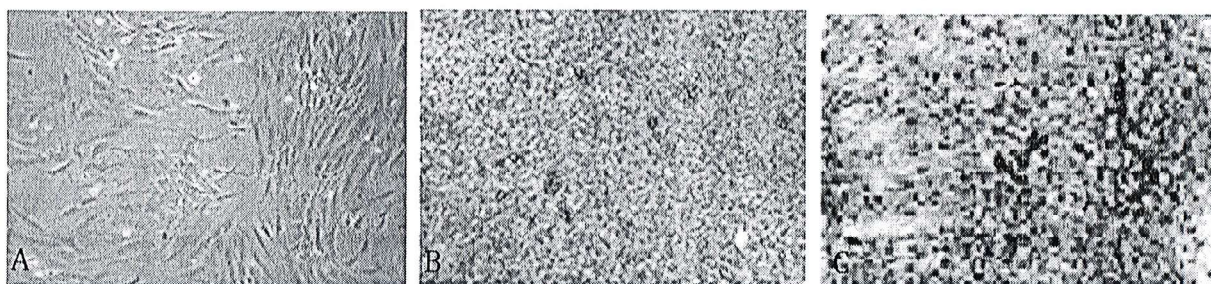
Hình 3.4: Khả năng tạo cụm CFU-F của mẫu tủy bình thường và mẫu tủy người suy thận mạn

(A) Cụm CFU-F trước khi nhuộm quan sát ở vật kính x 40. (B) Cụm CFU-F bắt màu thuốc nhuộm. (C) Cụm CFU-F bắt màu thuốc nhuộm quan sát ở vật kính x 40

3.4. Biệt hóa tế bào trung mô thành tế bào tạo mỡ

Tiến hành bổ sung các chất cảm ứng biệt hóa vào môi trường nuôi cấy. Theo dõi tế bào dưới kính hiển vi từ 3 ngày đến 2 tuần, chúng tôi nhận thấy có sự thay đổi hình dạng của tế bào khi nuôi trong môi trường biệt hóa: tế bào từ dạng thon dài dần dần co tròn lại. Sau 7 ngày, một vài hạt nhỏ lớn dần bên trong tế bào chất. Thời gian biệt hoá kéo dài, các hạt nhỏ dần dần thành hạt mỡ chiếm gần hết thể tích tế bào.

Tiến hành nhuộm Oil Red ở ngày thứ 9 để đánh giá sự tích tụ các giọt mỡ trong tế bào chất. Sự biến diện của các tế bào hạt mỡ chứng minh rằng quá trình biệt hóa thành công. Khi so sánh với tế bào đối chứng các tế bào không thay đổi hình dạng và không bắt màu thuốc nhuộm Oil Red-O (hình 3.5). Dựa vào đặc điểm hình thái tế bào trải, số cụm CFU-F và biệt hoá thành tế bào tạo mỡ, chúng tôi có thể khẳng định các tế bào sau khi phân lập và tăng sinh là các MSC. Kết quả nghiên cứu này là phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới [4], [8], [13].



Hình 3.5. Biệt hóa tế bào thành tế bào mỡ.

- A. Các tế bào ở lô đối chứng, không bổ sung chất cảm ứng biệt hóa.
B. Tế bào mỡ hình dạng khối tròn sau 9 ngày trong môi trường biệt hoá tạo mỡ
C. Các giọt mỡ bắt màu đỏ khi nhuộm với OilRed-O sau 9 ngày cảm ứng biệt hóa.

IV. KẾT LUẬN

4.1. Kết quả nuôi cấy TBG trung mô của mẫu tủy bình thường

Với độ tuổi trung bình là $33,4 \pm 19,7$; số lượng tế bào đơn nhân phân lập được $(2,88 \pm 0,61) \times 10^5$ tế

bào/mL, số lượng TBG trung mô tăng sinh sau nuôi cấy là $(4,80 \pm 0,07) \times 10^4$ tế bào/mL

4.2. Kết quả nuôi cấy TBG trung mô của bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn II, 31 tuổi, thu được số

tế bào đơn nhân là $(2,26 \pm 0,15) \times 10^5$ tế bào/mL, số lượng TBG trung mô tăng sinh sau nuôi cấy $(4,50 \pm 0,51) \times 10^4$ tế bào/mL.

4.3. Kết quả biệt hóa tế bào: Trong môi trường

nuôi cấy có bổ sung 0,5 mM IBMX, 50 μ M indomethacin và 0,5 μ M dexamethasone, sau 2 tuần nuôi cấy các tế bào mỡ bắt màu đỏ, chứng tỏ đó là tế bào gốc trung mô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bi B, Schmitt R, Israilova M et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J. Am. Soc. Nephrol* 2007; 18: p.2486-96.
2. English K, Barry FP, Field-Corbett CP et al (2001), IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells, *Immunol Lett*, 110, pp. 91-100
3. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G (2007), Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury, *Kidney Int*, 72, pp.430-441.
4. Jose J. Minguell, Alejandro E, Paulette Conget (2002), *Mesenchymal Stem Cells*, Santiago, Chile.
5. Kuci S, Kuci Z, Latifi-Pupovci H et al. (2009), Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 4, pp.107-117.
6. Meirelles L.d.S. and Nardi N.B. (2003), Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization, *British journal of haematology*, 123(4), pp.702-711.
7. Mervat EL, Gamla Saadi, et al (2012), Mesenchymal stem cells are a rescue approach for recovery of deteriorating kidney function, *Nephrology*, 17 2012, pp.650-657.
8. Mohammadi-Sangcheshmeh A., et al. (2013), Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (*Camelus dromedarius*), *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 49(2), pp.147-154.
9. Perico, N. et al. (2016), Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility, *Clin. J Am Soc Nephrol*, 6, pp.412-22.
10. Scott R, Ben Nguyen (2015), Pulsed Focused Ultrasound Pretreatment Improves Mesenchymal Stromal Cell Efficacy in Preventing and Rescuing Established Acute Kidney Injury in Mice, *Stem cell*, 33, pp.1241-1253.
11. Steven M. Devinea, Amelia M. Bartholomewb, Nadim Mahmuda, Mary Nelsona, Sheila Patilf, Wayne Hardyf, Cord Sturgeonb, Terry Hewette, Theodore Chungc, Wendy Stocka, Dorie Shera, Scott Weissmana, Karen Ferrerd, Joseph Moscaf, Robert Deansf, Annemarie Moseleyf and Ronald Hoffmana (2001), Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion, *Experimental Hematology*, 29 pp.244-255.
12. Wen Li, Li Wang, et al (2016), Icaritin combined with human umbilical cord mesenchymal stem cells significantly, *Mol Cell Biochem*, 19, pp.443-56.
13. Yang X.-F., et al. (2011), High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Journal of biomedical science*, 18(1), pp.59.