

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỖ TRUNG KIÊN

**NGHIÊN CỨU BIỆT HÓA TẠO TẾ BÀO CÓ CHỨC NĂNG
GAN TỪ TẾ BÀO GÓC TRUNG MÔ CUỐNG RÓN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: TS. Nguyễn Văn Hạnh, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: TS. Nguyễn Hữu Đức, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Phản biện 1: TS. Nguyễn Văn Long, Bệnh viện Bưu điện, Tập đoàn Bưu chính viễn thông Việt Nam

Phản biện 2: GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 3: PGS.TS Nguyễn Lai Thành, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

L luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài:

Tế bào có chức năng gan biệt hóa từ tế bào gốc đang là một hướng được các nhà khoa học quan tâm, chúng có nhiều tiềm năng ứng dụng trong trị liệu tế bào hay trong nghiên cứu thử nghiệm sàng lọc các hoạt chất hoặc thuốc ở dạng tế bào chức năng riêng lẻ hoặc phối hợp để tạo các vi cơ quan (organoids).

Để biệt hóa tế bào gốc thành tế bào có chức năng gan có thể sử dụng các tác nhân như các cytokine và các nhân tố tăng trưởng, hoặc chuyển gen. Một số cytokine và các nhân tố tăng trưởng được biết là có tác dụng nhất định đối với sự biệt hóa và phát triển tế bào gan trong điều kiện *in vitro*. Tuy nhiên, việc sử dụng các tác nhân này vẫn có những khác biệt và vẫn còn thiếu một phương thức để đạt hiệu quả như mong đợi.

Nhằm góp phần bổ sung thêm thông tin khoa học và điều kiện biệt hóa mới, cũng như mở ra khả năng nghiên cứu ứng dụng sản xuất tế bào gan cho các mục tiêu trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài **“Nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan từ tế bào gốc trung mô cuống rốn”**.

Mục tiêu: (1) Phân lập và nhân nuôi *in vitro* thành công TBGTM thu từ cuống rốn làm vật liệu để biệt hóa tế bào và có thông tin về các điều kiện liên quan đến tính ổn định, tiềm năng biệt hóa và khả năng duy trì nguồn TBGTM trong điều kiện nuôi *in vitro*; (2) Biệt hóa TBGTM cuống rốn thành tế bào có biểu hiện một số chỉ thị đặc trưng tế bào gan.

Nội dung nghiên cứu: (1) Thu nhận, phân lập và nhân nuôi *in vitro* TBGTM từ mẫu cuống rốn; (2) Nghiên cứu đánh giá tính ổn định, tiềm năng biệt hóa và khả năng duy trì nguồn TBGTM trong điều kiện nuôi *in vitro*; (3) Nghiên cứu biệt hóa TBGTM cuống rốn thành tế bào có biểu hiện các chỉ thị đặc trưng tế bào gan bằng các tác nhân khác nhau trong điều kiện *in vitro*.

Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài:

Đề tài tiếp tục thực hiện, phát triển các nghiên cứu sâu hơn các nghiên cứu đã thực hiện tại viện Công nghệ sinh học cũng như hướng nghiên cứu đang được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm.

Đề tài hoàn thiện sẽ cung cấp những thông tin có giá trị trong lĩnh vực nghiên cứu TBGTM cuống rốn, từ phương pháp thu thập, phân lập và đánh giá tiềm năng tế bào đến khả năng biệt hóa của chúng. Qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng kết quả vào định hướng tạo tế bào gan phục vụ thử nghiệm, sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học, cũng như xây dựng các mô hình để thử nghiệm các loại thuốc mới.

Những đóng góp mới của luận án:

Luận án đã cung cấp đầy đủ các thông tin về khả năng biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan từ nguồn TBGTM phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh. Đề tài là nghiên cứu đầu tiên sử dụng hệ thống Tet-ON kích hoạt thể hiện quá mức gen *HNF4 α* để biệt hóa TBGTM cuống rốn thành tế bào có một số chức năng của tế bào gan.

CHƯƠNG 1-TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Nguồn tế bào gốc trung mô, tiềm năng biệt hóa và ứng dụng

1.1.1. Nguồn tế bào gốc trung mô

Trong nhiều mô khác nhau của cơ thể người đều có mặt của tế bào gốc trung mô (TBGTM). Nguồn TBGTM cơ bản được biết đến là tủy xương, tuy nhiên trong những phát hiện về sau cho thấy nhiều nguồn tách TBGTM với số lượng lớn hơn tủy xương nhiều lần như mô mỡ, máu ngoại vi, răng sữa, máu cuống rốn, màng dây rốn, màng nhau, nội mạc tử cung, màng ối...trong số những nguồn cung cấp TBGTM này, thì dây rốn được xem là nguồn khá lý tưởng.

1.1.2. Tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô

Khả năng tăng sinh mạnh mẽ là một ưu điểm của TBGTM, ngoài ra TBGTM còn có tiềm năng biệt hóa tạo thành nhiều loại tế bào khác nhau

như các tế bào nguyên bào xương, tế bào sụn, tế bào cơ, tế bào mỡ, tế bào thần kinh, tế bào gan,...

1.1.3. Ứng dụng của tế bào gốc trung mô

Ứng dụng lâm sàng qua trị liệu TBG (Stem cell therapy) được xem là tiềm năng ứng dụng quan trọng nhất của TBG. Từ TBG có thể tạo ra các loại tế bào mới, mô mới để bổ sung hoặc thay thế cho các tế bào và mô cơ quan bị tổn thương hay mất chức năng.

1.2. Cấu tạo cuống rốn, ưu điểm của tế bào gốc trung mô từ cuống rốn

1.2.1. Cấu tạo cuống rốn

Đây rốn được bọc bởi màng ối và có cấu tạo gồm có hai động mạch và một tĩnh mạch, bao quanh là các mô nhầy hay gelatin, còn gọi là lớp Wharton's jelly (WJ).

1.2.2. Ưu điểm của tế bào gốc trung mô từ cuống rốn

(1) Dễ thu hoạch và xử lý TBG, không gây bất kỳ ảnh hưởng gì đến sức khỏe của cả mẹ và con. (2) Có thể chủ động kiểm soát tình trạng các bệnh truyền nhiễm đối với các mẫu nghiên cứu bằng các xét nghiệm trước sinh đối với sản phụ. (3) Khả năng phân chia tốt và số lượng tế bào thu được trực tiếp hoặc sau tăng sinh *in vitro* là rất lớn, không còn khả năng tạo ra khối u ác tính như TBG phôi. (4) TBG từ dây rốn có thể lưu trữ lâu dài. (5) Biểu hiện HLA ở mức thấp và ít bị đào thải trong cấy ghép. (6) TBG dây rốn thuộc loại đa tiềm năng, chúng có thể biệt hóa thành các loại tế bào như: tế bào máu, tế bào xương, tế bào cơ tim, tế bào sụn, tế bào mỡ, tế bào gan,....

1.3. Tình hình nghiên cứu

1.3.1. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc người

Nghiên cứu TBG ở Việt Nam được thực hiện từ năm 1995, trên các TBG dòng tủy. Gần đây, việc nghiên cứu TBG phát triển mạnh với nhiều loại tế bào được nghiên cứu như TBG máu cuống rốn. Đối với nguồn TBGTM (chủ yếu là TBG làm giàu từ tủy xương) đã được sử dụng để điều

trị các tình trạng xương khác nhau, chẳng hạn như điều trị lâm sàng bao gồm các ca phức hồi gãy xương chi, gãy xương chày, khắc phục hoại tử đầu xương.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào gan

1.3.2.1. Tình hình nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào gan

Nghiên cứu của Mattiucci và cộng sự (2018) đã chứng minh rằng, TBGTM dây rốn có thể biệt hóa và điều trị bệnh về gan.

Hiện nay, có một số dòng tế bào gan được biệt hóa từ TBG đa năng của người đã được thương mại hóa. Các công ty cung cấp lớn đều ở Mỹ và Nhật Bản (Yokohama; iCell; Otsu), các công ty này cung cấp các loại tế bào có đặc điểm và có chức năng phục vụ cho những thí nghiệm cụ thể.

1.3.2.2. Các hướng biệt hóa tạo tế bào gan

a. Nghiên cứu in vivo và in vitro

Năm 2013, nhóm khoa học Nhật Bản, tại Đại học quốc gia Yokohama thực hiện cấy ghép các TBG đa năng được phân lập từ da và máu người vào gan chuột. Tháng 10 năm 2015 các nhà khoa học tại Đại học Jerusalem Hebrew (Israel) tạo ra bước đột phá mới khi nuôi cấy thành công tế bào gan người có chức năng. Cũng trong năm 2015, nhóm nghiên cứu của tiến sĩ Roel Nusse - Đại học Stanford - Mỹ đã xác định được một quần thể phát triển hạt nhân và các tế bào tự đổi mới tiếp giáp với các tĩnh mạch trung tâm trong gan.

b. Sử dụng hóa chất cảm ứng biệt hóa

Một số hormone, cytokine, vitamin, các ion Ca^{2+} ... một số hóa chất hay sử dụng trong cảm ứng biệt hóa tế bào như Dexamethason, Indomethacin, Hydrocortison, $TGF-\beta$... với một hàm lượng và tỷ lệ nhất định tùy thuộc vào mỗi một loại tế bào.

c. Biệt hóa bằng các chất nền

Tế bào hoạt động nằm trong chất nền ngoại bào ECM (Extra cellular matrix). ECM có chứa các hợp chất cao phân tử như collagen, laminin, fibronectin... Ngoài vai trò làm cấu trúc như một giá thể cho các tế bào, ECM còn có vai trò sinh lý như một vi môi trường của các tế bào.

d. Biệt hóa bằng tổ hợp các cytokine và hóa chất

Trong hầu hết các phương pháp biệt hóa, TBGTM có thể được định hướng tới tế bào có chức năng tế bào gan thông qua các giai đoạn biệt hóa (quá trình biệt hóa gây ra bởi các tác nhân FGF, HGF và các thành phần khác) và giai đoạn trưởng thành tế bào gan (gây ra bởi OSM và dexamethasone) để tạo thành một kiểu hình đặc trưng của tế bào gan chưa trưởng thành.

e. Đồng nuôi cấy với các tế bào đã biệt hóa

Nhóm nghiên cứu của Stecklum (2014) đã sử dụng TBG máu cuống rốn đồng nuôi cấy với tế bào alpha gan chuột AML12. Nhóm tác giả chỉ ra rằng để từng bước nghiên cứu cảm ứng biệt hóa tế bào có thể sử dụng phương pháp đồng nuôi cấy.

f. Biệt hóa bằng phương pháp chuyển gen

Phương pháp này thường được sử dụng để điều hòa sự biệt hóa TBG phôi. Đưa gen cần chuyển vào tế bào nhằm bổ sung một số gen hoạt động vào hệ gen của TBG phôi, khởi động sự biệt hóa TBG theo con đường tạo thành tế bào chuyên hóa mong muốn.

1.3.2.3. Tình hình nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc trong biệt hóa và điều trị các bệnh lý về gan tại Việt Nam

Tại Việt Nam, năm 2013, Đoàn Chính Chung và cộng sự đã biệt hóa TBGTM từ màng cuống rốn thành tế bào gan sử dụng phương pháp biệt hóa dựa vào sự thay đổi môi trường nuôi cấy.

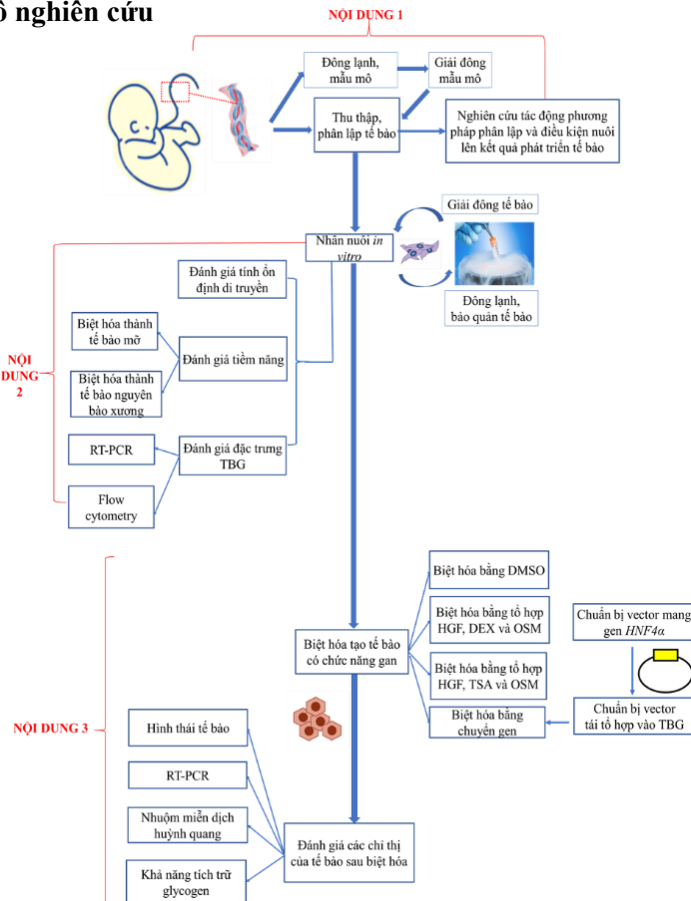
Năm 2014, Nguyễn Thị Kim Nguyễn và cộng sự đã biệt hóa được tế bào giống tế bào gan *in vitro* từ TBG thu nhận từ mô mỡ.

Năm 2015, Trương Thị Hải Nhung đã nghiên cứu điều trị thực nghiệm bệnh xơ gan trên mô hình chuột bị xơ gan sử dụng liệu pháp TBG. Tiếp theo kết quả nghiên cứu này, Nguyễn Minh Thư và cộng sự (2021) cũng đã tiến hành thí nghiệm tiêm TBGTM từ dây rốn với liều 5×10^5 tế bào/con trên chuột tổn thương gan do tắc mật.

Trong nghiên cứu lâm sàng, năm 2021, Đào Trường Giang và cộng sự đã đánh giá kết quả của ghép tế bào gốc tủy xương tự thân để điều trị xơ gan mất bù do viêm gan B.

CHƯƠNG 2- VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Sơ đồ nghiên cứu



2.2. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu

2.2.1. Mẫu nghiên cứu

Mẫu cuống rốn được thu từ những sản phụ khỏe mạnh (thai kỳ đủ tháng, có kết quả âm tính với các xét nghiệm sàng lọc bệnh nhiễm trùng, bao gồm virus HIV, virus viêm gan B, virus viêm gan C, virus CMV và vi khuẩn giang mai) đồng ý hiến tặng, đồng ý qua phiếu tình nguyện tham gia nghiên cứu.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu trong luận án được thực hiện tại Phòng Công nghệ sinh học động vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18, Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội.

2.2.3. Hóa chất và các bộ kit sử dụng

2.2.4. Thiết bị nghiên cứu

2.2.5. Môi trường thao tác, nuôi cấy, bảo quản

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập, phân lập và nhân nuôi tế bào

2.3.2. Phương pháp cấy chuyển tế bào

2.3.3. Phương pháp đông lạnh và giải đông tế bào

2.3.4. Phương pháp nhuộm nhiễm sắc thể

2.3.5. Phương pháp đánh giá tiềm năng biệt hóa của tế bào phân lập được

2.3.6. Phương pháp đánh giá đặc trưng tế bào gốc của tế bào phân lập được

2.3.7. Phương pháp đánh giá tốc độ tăng trưởng tế bào

2.3.8. Phương pháp biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan

2.3.9. Phương pháp đánh giá các chỉ thị của tế bào sau xử lý biệt hóa

2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

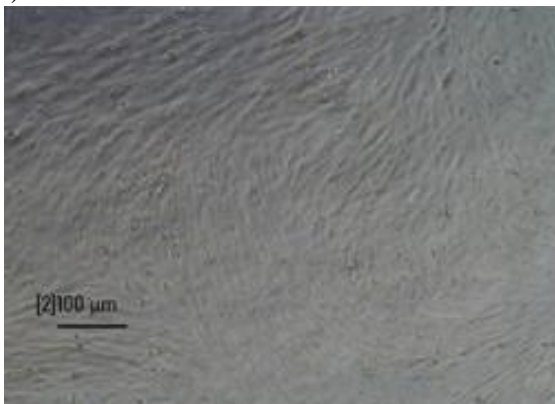
3.1. Thu nhận, phân lập, nhân nuôi *in vitro* TBGTM từ mẫu cuống rốn

3.1.1. Thu nhận, phân lập tế bào gốc từ mảnh mô cuống rốn

Các mẫu mô cuống rốn và mẫu mô thành mạch có kích thước khoảng 1mm³ được nuôi trong các đĩa nuôi 4 giếng (NUNC), trong môi trường DMEM/F12 bổ sung các thành phần khác. Kết quả theo dõi chúng tôi quan sát thấy các tế bào kết dính trên bề mặt đĩa thông qua tế bào mọc ra ở rìa của các mảnh mô từ ngày nuôi cấy thứ 14.

3.1.2. Nhân nuôi *in vitro*, bảo quản lạnh tế bào gốc cuống rốn

Trong quá trình phát triển *in vitro*, có thể quan sát thấy độ đồng nhất chưa cao ở các quần thể các tế bào lúc ban đầu. Từ ngày nuôi cấy thứ 18, các TBGTM tăng sinh rất nhanh, phát triển dày thành nhiều lớp xoắn gổì lên nhau (Hình 3.3).



Hình 3.3. Quá trình phát triển *in vitro* của tế bào phân lập được: Tế bào mọc kín đĩa nuôi thành những mảng song song, cuộn xoắn gổì lên nhau

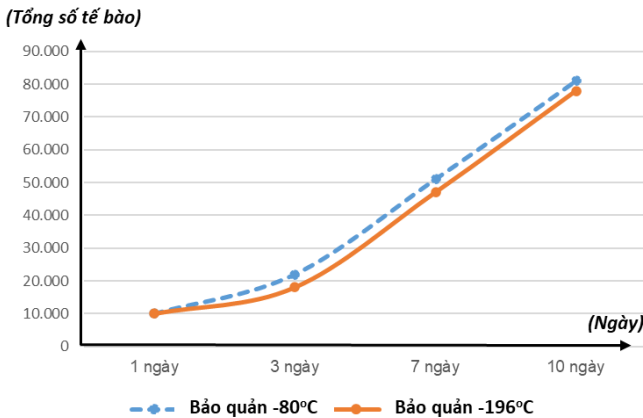
Sau 90 ngày từ khi cọng rạ được cho vào ngân hàng lạnh, chúng tôi giải đông ngẫu nhiên một cọng rạ để kiểm tra tỷ lệ sống sót của các tế bào. Đĩa nuôi tế bào trước đông lạnh cũng được kiểm tra để làm đối chứng so sánh.

Bảng 3.1. Kết quả đếm tế bào và tỷ lệ sống sót tế bào

Mẫu	Mật độ tế bào (tế bào/ml)	Tỷ lệ sống sót (%)
TBGTM trước đông lạnh	295.000 ± 1.732 ^a	98,33 ± 0,58 ^a
TBGTM sau giải đông	72.500 ± 1.322 ^b	85,29 ± 1,56 ^b

Từ bảng 3.1 cho thấy, trước khi cho đông lạnh, tỷ lệ tế bào sống khá cao (98,33 ± 0,58 %). Ở tế bào sau giải đông, tỷ lệ tế bào sống sót giảm, chỉ đạt 85,29 ± 1,56 %, tuy nhiên những tế bào còn sống vẫn mang hình thái nguyên bào sợi đặc trưng của TBGTM.

Chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hai điều kiện bảo quản phổ biến (tủ đông -80°C và nitơ lỏng -196°C). Kết quả chỉ ra ở tế bào sau giải đông có tốc độ tăng trưởng tế bào tương đối cao (từ 10⁴ tế bào/cm² đến 8x10⁴ tế bào/cm² sau 10 ngày nuôi cấy) ở cả trong 2 điều kiện nhiệt độ khảo sát (Hình 3.4).



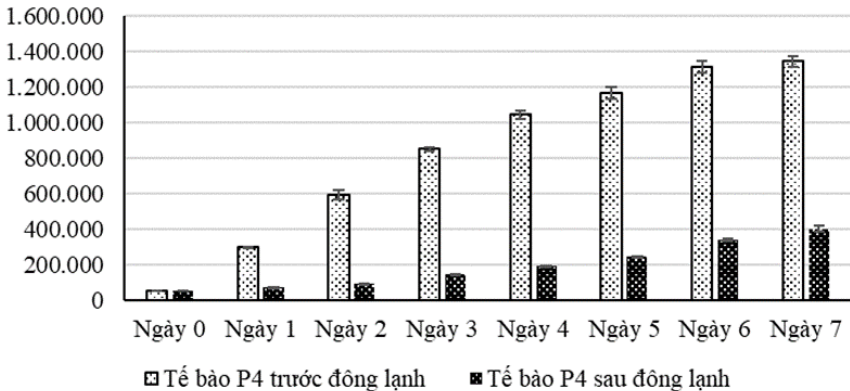
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản TBGTM đến khả năng tăng trưởng của tế bào sau giải đông

Để so sánh khả năng phân lập TBGTM từ mẫu mô trước và sau khi đã được đông lạnh, chúng tôi tiến hành hai lô thí nghiệm. Các TBGTM từ

nhóm phân lập từ mô tươi (nhóm 1) bắt đầu tăng sinh sau 7-10 ngày nuôi cấy. Độ phủ bề mặt đĩa nuôi của tế bào lên 50-60% sau 14-18 ngày nuôi cấy. Trong khi đó TBGTM phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh (nhóm 2) bắt đầu tăng sinh sau 15 ngày nuôi cấy. Phải đến sau 20-25 ngày nuôi cấy, độ phủ bề mặt đĩa nuôi của tế bào ở nhóm này mới đạt 50-60%.

3.1.3. Đánh giá tốc độ tăng trưởng của tế bào

**Tốc độ tăng trưởng của TBGTM
lần cấy chuyển thứ 4 trước và sau đông lạnh**



Hình 3.7. Biểu đồ tốc độ tăng trưởng của tế bào P4 trước đông lạnh và tế bào P4 sau đông lạnh

Theo biểu đồ ở hình 3.7, ta thấy, tốc độ tăng trưởng của tế bào P4 trước đông lạnh tăng rất nhanh ở những ngày đầu, từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 5, và từ ngày thứ 6 trở đi, tốc độ này dần ổn định, lượng tế bào tăng sinh không còn cao. Trong khi đó, TBGTM cuống rốn P4 sau giải đông tăng trưởng rất chậm ở những ngày đầu, và tăng nhanh dần kể từ ngày thứ 5. Tuy nhiên, tốc độ tăng trưởng của tế bào trước đông lạnh nhanh hơn nhiều so với tốc độ tăng trưởng của tế bào sau khi giải đông.

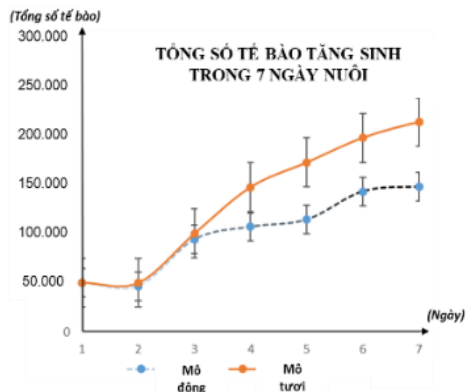
Bảng 3.2. Sự gia tăng TBGTM của mẫu mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh từ giai đoạn cấy chuyển 2 đến giai đoạn cấy chuyển 5.

Lô thí nghiệm	Thời gian nhân đôi mật độ tế bào (giờ)			
	P2	P3	P4	P5
Mô cuống rốn tươi	28,42 ± 0,60 ^a	26,34 ± 0,55 ^a	27,69 ± 0,20 ^a	25,71 ± 0,53 ^a
Mô cuống rốn đông lạnh	36,00 ± 0,93 ^b	33,75 ± 0,55 ^b	40,00 ± 0,39 ^b	40,00 ± 0,63 ^b

Kết quả ở Bảng 3.2 cho thấy ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi thời gian nhân đôi mật độ tế bào giảm nhẹ ở các lần cấy chuyển từ 2 đến 5. Trong khi đó ở phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh, thời gian nhân đôi mật độ tế bào có xu hướng tăng lên muộn hơn. Tại lần cấy chuyển 2, thời gian nhân đôi mật độ tế bào là 36,00 giờ, nhưng thời gian tăng lên 40,00 giờ ở lần cấy chuyển 4 và 5.

Đánh giá số lượng tế bào giữa hai nhóm thí nghiệm, nồng độ tế bào tăng lên trong 7 ngày nuôi cấy đã tăng lên gần như cấp số nhân (Hình 3.8). Trong 3 ngày đầu, số lượng TBGTM được phân lập từ mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh là tương tự nhau, sau đó chúng có một chút chậm trễ trong việc mở rộng và tăng sinh so với số lượng tế bào có nguồn gốc từ mô cuống rốn tươi. Đến ngày thứ 7, tốc độ tăng sinh dần ổn định, lượng tế bào tăng sinh không còn cao.

Hình 3.8. Tổng số tế bào tăng sinh được ghi lại mỗi ngày trong 7 ngày nuôi cấy ở 2 nhóm thí nghiệm: mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh



3.2. Đánh giá tính ổn định, tiềm năng biệt hóa và khả năng duy trì nguồn TBGTM trong điều kiện nuôi *in vitro*

3.2.1. Đánh giá tính ổn định di truyền của TBG phân lập được

Bộ nhiễm sắc thể thu được sau khi phân tích đều cho thấy là bình thường, điển hình. nhiễm sắc thể có số lượng ổn định, cấu trúc không thay đổi ở các lần cấy chuyển thứ 2, 10 và 15.

3.2.2. Đánh giá tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc

3.2.2.1. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào mỡ

Các tế bào tạo mỡ với hình dạng khối tròn bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi tiến hành cảm ứng biệt hóa trong khi không xuất hiện ở tế bào đối chứng. Khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (Merck), chúng luôn bắt màu đỏ chiếm phần lớn tế bào chất. Ngược lại, các tế bào đối chứng không có sự thay đổi về mặt hình thái, không xuất hiện giọt mỡ và bắt màu thuốc nhuộm.

Khi so sánh khả năng biệt hóa TBGTM thành tế bào mỡ ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh cũng cho kết quả tương tự.

3.2.2.2. Biệt hóa tế bào gốc thành nguyên bào xương

Hình thái đặc trưng của nguyên bào xương (osteoblast) ở tế bào được biệt hóa bắt đầu xuất hiện sau 7 ngày nuôi trong môi trường biệt hóa: tế bào chuyển từ dạng dài mỏng thuôn mảnh giống nguyên bào sợi sang dạng tròn và hình hạt đậu. Sự kết hợp của ion calcium (tính chất đặc trưng của nguyên bào xương) hiện diện trong tế bào chất với thuốc nhuộm tạo nên phức hợp có màu đỏ cam.

Khi so sánh khả năng biệt hóa TBGTM thành tế bào xương ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh cũng cho kết quả tương tự.

3.2.3. Đánh giá đặc trưng tế bào gốc trung mô

3.2.3.1. Đánh giá đặc trưng tế bào gốc trung mô bằng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy

Kết quả tỷ lệ biểu hiện dương tính cao trong tế bào với các chỉ thị đặc trưng TBGTM, cụ thể: *CD73* (99,90%), *CD90* (98,20%) và *CD105* (98,50%). Hầu hết các mẫu đều có biểu hiện âm tính với tổ hợp các chỉ thị đặc trưng không biểu hiện trong TBGTM (*CD14*, *CD20*, *CD34*, *CD45*). Với các nguồn phân lập TBG từ cuống rốn mà chúng tôi thực hiện, tỷ lệ chung cho tổ hợp này ở mẫu phân lập từ mô màng cuống rốn là 5,10%.

Ở nhóm TBGTM phân lập từ mô cuống rốn tươi, sự biểu hiện của *CD90* (99,75%), *CD105* (99,51%), *CD73* (99,46%). Ở nhóm TBGTM phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh, sự biểu hiện của các chỉ thị này có giảm hơn, cụ thể *CD90* (96,60%), *CD105* (96,15%), *CD73* (95,20%).

Các dòng TBGTM ổn định hơn vẫn đang được nhóm nghiên cứu của chúng tôi tiếp tục nuôi cấy và lưu trữ. Bảng 3.3 cho thấy quá trình nuôi cấy *in vitro* không ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các chỉ thị bề mặt, thể hiện qua tỷ lệ dương tính không có sự thay đổi đáng kể. Các chỉ thị đặc trưng như *CD73*, *CD90* và *CD105* đều có tỷ lệ biểu hiện rất cao trên >95,03%; và biểu hiện âm tính với tổ hợp các chỉ thị *CD14/CD20/CD34/CD45*.

Bảng 3.3. Biểu hiện của các chỉ thị TBGTM qua các lần cấy chuyển

Chỉ thị đặc trưng TBGTM	Tỷ lệ biểu hiện (%)		
	P3	P9	P15
<i>CD73</i>	95,53 ± 0,20	98,37 ± 0,15	98,70 ± 0,12
<i>CD90</i>	95,27 ± 0,24	96,83 ± 0,30	98,53 ± 0,15
<i>CD105</i>	95,60 ± 0,10	98,43 ± 0,09	99,13 ± 0,33
<i>CD14/CD20/CD34/CD45</i>	4,77 ± 0,09	4,93 ± 0,24	5,07 ± 0,19

3.2.3.2. Đánh giá đặc trưng TBGTM bằng phương pháp RT-PCR

Bảng 3.6. Biểu hiện các chỉ thị bề mặt trong quá trình nuôi in vitro

Nguồn tế bào	Chỉ thị	Kích thước (bp)	Biểu hiện tại P5	Biểu hiện tại P10	Biểu hiện tại P15	Biểu hiện tại P20
Tế bào gốc trung mô (TBGTM)	<i>CD105</i>	179	+	+	+	+
	<i>CD90</i>	265	+	+	+	+
	<i>CD73</i>	308	+	+	+	+
	<i>CD34</i>	367	-	-	-	-
	<i>CD86</i>	290	+	+	+	+
Tế bào gốc phôi	<i>Eras</i>	315	+	+	+	+
	<i>Oct-1</i>	297	+	+	+	+
Tế bào trung bì	<i>GATA4</i>	290	+	+	+	+
	<i>TAT</i>	800	+	+	+	+
Tế bào gan	<i>AFP</i>	216	-	-	-	-
	<i>ALB</i>	136	-	-	-	-
	<i>HNF4α</i>	350	-	-	-	-

Kết quả bảng 3.6 cho thấy, với phương pháp RT-PCR, ở lần cấy chuyển thứ 20 các chỉ thị vẫn duy trì dương tính với các chỉ thị đặc trưng của TBG và âm tính với các chỉ thị chức năng của tế bào gan như ở lần cấy chuyển thứ 5.

3.3. Biệt hóa TBGTM cưỡng rốn thành tế bào có biểu hiện các chỉ thị đặc trưng tế bào gan

3.3.1. Biệt hóa bằng DMSO

TBG cưỡng rốn sau 30 ngày nuôi cấy mặc dù đã có sự khác biệt nhất định về hình thái so với tế bào trước khi xử lý, mặc dù vậy, khi so sánh với với tế bào ung thư gan HepG2 thì vẫn chưa có sự tương đồng.

Bảng 3.7. Biểu hiện của các chỉ thị phân tử ở tế bào sau biệt hóa bằng DMSO

Tên chỉ thị	Kích thước (bp)	Biểu hiện trước khi xử lý DMSO	Biểu hiện chỉ thị phân tử sau xử lý DMSO (30 ngày)			Biểu hiện của các chỉ thị trong tế bào HepG2
			0.01%	0.1%	1%	
<i>CD73</i>	308	+	+	+	+	+
<i>CD34</i>	367	+	+	+	+	+
<i>CD86</i>	290	+	+	+	+	+
<i>CD90</i>	265	+	+	+	+	+
<i>CD105</i>	179	+	+	+	+	+
<i>Eras</i>	315	+	+	+	+	+
<i>Oct-1</i>	297	+	+	+	+	+
<i>GATA4</i>	290	+	+	+	+	+
<i>HNF-4α</i>	350	-	-	-	+	+
<i>ALB</i>	136	-	-	-	-	+
<i>G6P</i>	379	-	-	-	-	+

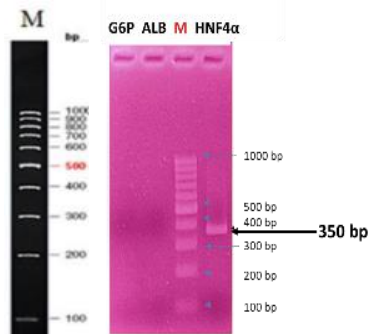
Bảng 3.7 cho thấy, chỉ có yếu tố phiên mã *HNF4 α* liên quan đến chức năng tế bào gan đã được biểu hiện trong TBG sau biệt hóa ở lô thí nghiệm biệt hóa bằng nồng độ 1% DMSO sau 30 ngày.

Đánh giá khả năng tích trữ glycogen của tế bào sau biệt hóa bằng phương pháp nhuộm Periodic acid Schiff (PAS) cho thấy các lô tế bào biệt hóa bằng DMSO đã cho thấy khả năng dự trữ glycogen trong tế bào sau 3 tuần.

3.3.2. Biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, DEX và OSM

Kết quả cho thấy tế bào biểu hiện dương tính với *HNF4 α* sau 4 tuần được biệt hóa. Trong khi các kết quả phân tích RT-PCR trước đó ở các thời điểm 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần đều không biểu hiện. Bên cạnh đó, hai chỉ thị đặc trưng của tế bào gan là *ALB* và *G6P* cũng không được biểu hiện tương tự như trong biệt hóa bằng DMSO.

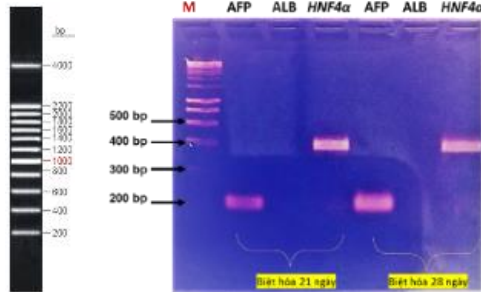
Hình 3.25. Điện di đồ RT-PCR mẫu nuôi cấy 4 tuần sau biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, DEX và OSM (M: Marker DNA 100 bp)



Nhuộm Periodic acid Schiff (PAS) cho thấy ở lô tế bào biệt hóa bằng tổ hợp HGF+DEX +OSM đã cho thấy khả năng dự trữ glycogen trong tế bào sau 3 tuần.

3.3.3. Biệt hóa tổ hợp HGF, TSA và OSM

Hình 3.28. Điện di đồ RT-PCR mẫu nuôi cấy 4 tuần sau biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, TSA và OSM (M: Marker DNA 200 bp)



Kết quả cho thấy với tế bào sau biệt hóa đã biểu hiện 2 chỉ thị liên quan đến tế bào gan là *AFP* và *HNF4α* từ 2 tuần sau khi tiếp xúc với môi trường có bổ sung HGF, TSA và OSM (Hình 3.28).

Tiến hành nhuộm Periodic acid Schiff (PAS) chúng tôi nhận thấy ở lô tế bào biệt hóa bằng tổ hợp HGF + TSA +OSM, khả năng dự trữ glycogen trong tế bào xuất hiện sau 3 tuần tương tự với lô biệt hóa bằng DMSO và tổ hợp HGF +DEX +OSM.

3.3.4. Biệt hóa bằng chuyển gen *HNF4α*

3.3.4.1. Thiết kế vector mang gen *HNF4α* biến nạp vào TBG

Trình tự mã hóa của gen *HNF4α* và cặp môi để khuếch đại trình tự gen mã hóa *HNF4α* đều được đặt tổng hợp theo trình tự đặc hiệu từ công ty TNHH-MTV sinh hóa Phù Sa. Trình tự này được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi *NheI-HNF4α-F* (Môi xuôi) và *PacI-HNF4α-R* (Môi ngược). Sau khi PCR sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0%.

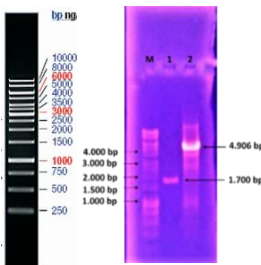
Sau phản ứng cắt, điện di kiểm tra tinh sạch sản phẩm cắt trên gel Agarose đối với 2 mẫu *HNF4α* và pTRE-Tight-BI với kích thước lần lượt khoảng 1.359 bp và 2.856 bp.

Để kiểm tra xem vector pTRE-Tight-BI-*HNF4α* có nối và biến nạp thành công vào *E.coli* hay không, chúng tôi sử dụng phương pháp PCR khuẩn lạc với mỗi *NheI* – *HNF4α-F* (Mồi xuôi) và *PacI* – *HNF4α-R* (Mồi ngược). Điện di kiểm tra sản phẩm PCR thấy có băng *HNF4α*.

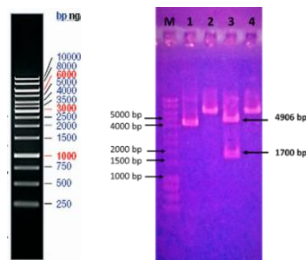
Vector pTet-DualON được nhân lên với số lượng lớn bằng phương pháp biến nạp sốc nhiệt bằng vi khuẩn *E.coli DH5α* sẽ được tách plasmid bằng bộ kit GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo) để thu DNA. Vector sẽ được tạo rỗng để nhận vector pTRE-Tight-BI sau khi được chèn đoạn gen *HNF4α* bằng 2 enzyme *NsiI* và *PacI*.

Bước tiếp theo, DNA plasmid pTRE-Tight-BI-*HNF4α* có chứa gen *HNF4α* cũng được cắt bằng cặp enzyme *NsiI* và *PacI* để tách đoạn gen *HNF4α*.

Sử dụng bộ QIAGEN Gel Extraction Kit để tinh sạch sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI-*HNF4α* và pTet-DualON. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel Agarose ra các băng rõ nét với kích thước của pTRE-Tight-BI-*HNF4α* và pTet-DualON tương ứng lần lượt khoảng 1.700bp và 4.906bp (Hình 3.35). Nối hai sản phẩm cắt bằng T4 ligase để chuyển đoạn DNA *HNF4α* sang vector pTet-DualON để được vector cuối pTRE-*HNF4α*-ON.



Hình 3.35. Kết quả tinh sạch sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI-*HNF4α* và pTet-DualON bằng 2 enzyme *NsiI* và *PacI*



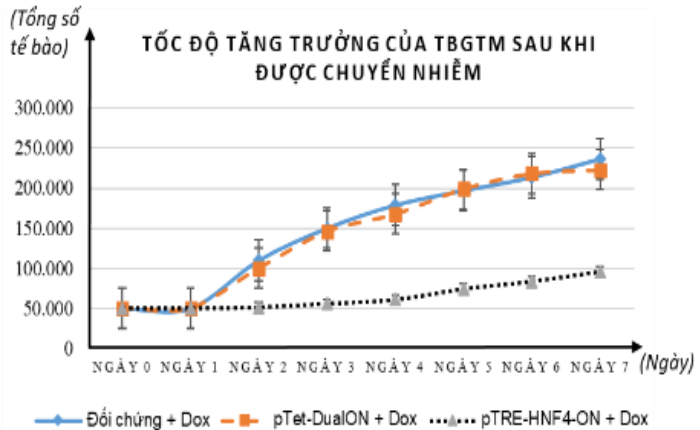
Hình 3.37. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pTRE-*HNF4α*-ON bằng enzyme

Kết quả giải trình tự và dịch mã ra các axit amin theo trình tự thu được cho phép chúng tôi khẳng định rằng đã tạo thành công vector sử dụng hệ thống cải tiến cảm ứng biểu hiện gen Tet-ON là pTRE-*HNF4 α* -ON tái tổ hợp mang CDS của gen *HNF4 α* có khung đọc đúng, có mã khởi đầu và kết thúc phù hợp với thiết kế phục vụ cho việc tiến hành chuyển gen biểu hiện trong TBGTM cuống rốn.

3.3.4.2. Biến nạp vector biểu hiện gen *HNF4 α* vào tế bào gốc

Hình 3.38.

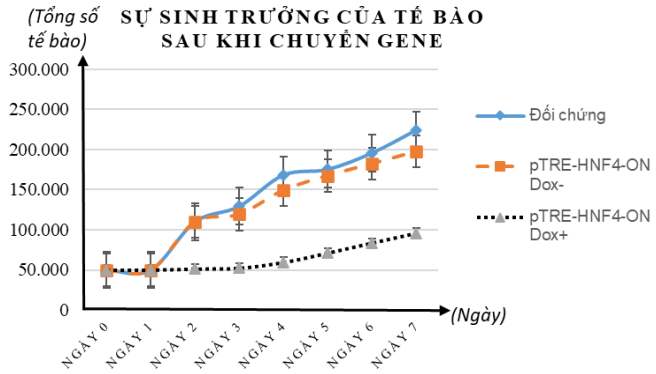
Tốc độ tăng trưởng của TBGTM sau khi được chuyển nhiễm



Hình 3.38 cho thấy việc chuyển vector tái tổ hợp pTRE-*HNF4 α* -ON không hỗ trợ sự gia tăng của TBGTM mà tăng cường sự biệt hóa, dẫn đến giai đoạn pha lag dài hơn, thể hiện TBGTM ngừng phát triển nhanh chóng và bắt đầu biệt hóa.

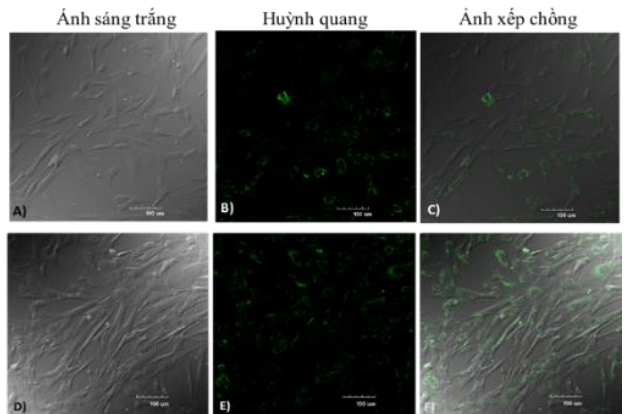
Ở thí nghiệm khác, để đánh giá ảnh hưởng của Dox với chuyển gen. Sau 24 giờ chuyển vector mang gen *HNF4 α* , Doxycycline được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào để hoạt hóa quá trình tổng hợp các protein. Kết quả cho thấy, lô được hoạt hóa bằng Doxycycline tốc độ tăng sinh tế bào giảm rõ rệt, các tế bào duy trì giai đoạn pha lag dài cho thấy tốc độ tăng trưởng thấp hơn đáng kể cho đến ngày thứ 8 (Hình 3.39).

Hình 3.39. Biểu đồ sinh trưởng của tế bào sau khi chuyển gen hoạt hóa bằng Doxycycline

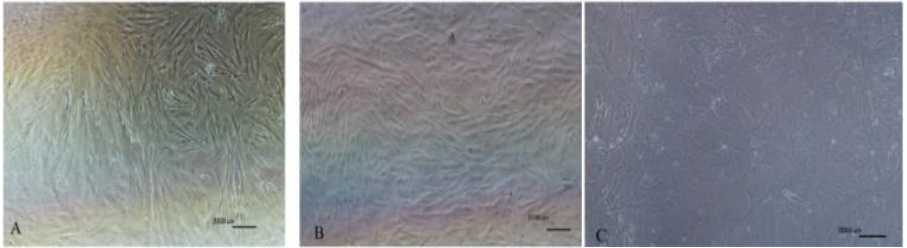


Chúng tôi quan sát sự biểu hiện của các chỉ thị gen bằng kính hiển vi quét laser đồng tiêu sau 24 giờ biến nạp vector mang gen *HNF4 α* . Kết quả cho thấy hầu hết tế bào có biểu hiện của gen ZsGreen1 là điểm chỉ thị của hệ thống Tet-ON. Sự phát huỳnh quang xuất hiện trong tế bào chất của tế bào 2 ngày sau chuyển gen và hoạt hóa bằng Doxycycline ở cả nhóm chuyển gen pTet-DualON (Hình 3.40A, Hình 3.40B, Hình 3.40C) và nhóm chuyển gen pTRE-*HNF4 α* -ON (Hình 3.40D, Hình 3.40E, Hình 3.40F).

Hình 3.40. Sự phát huỳnh quang xuất hiện trong tế bào chất của tế bào 2 ngày sau chuyển gen và hoạt hóa bằng Doxycycline: A), B), C) nhóm chuyển gen pTet-DualON; D), E), F) nhóm chuyển gen pTRE-*HNF4 α* -ON



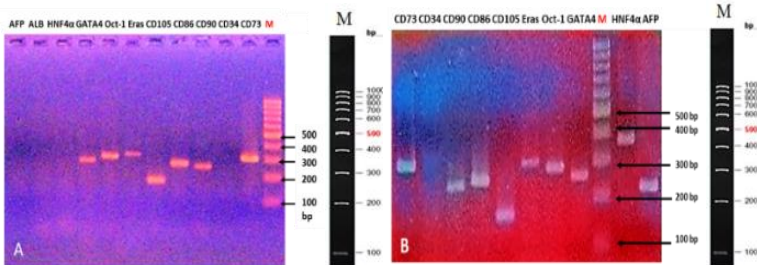
3.3.4.3.. Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào sau chuyển gen



Hình 3.41. Trong quá trình chuyển gen hình thái tế bào có sự biến đổi

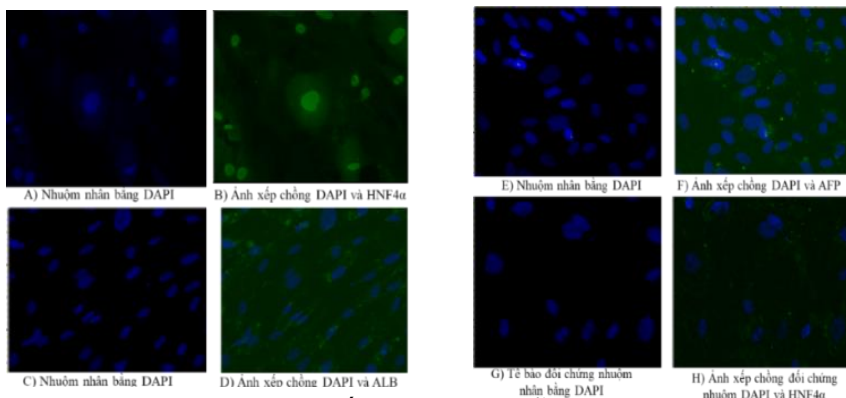
Sau tuần đầu tiên chuyển gen, chúng tôi đã quan sát thấy các tế bào từ hình thái đặc trưng tế bào dạng nguyên bào sợi ban đầu (Hình 3.41A) biến chuyển theo hướng co ngắn lại (Hình 3.41B). Bước sang tuần thứ 2, đã xuất hiện các tế bào có dạng đa giác có hình thái tương đồng với tế bào nhu mô gan với tỷ lệ giữa thể tích tế bào chất và nhân tế bào tăng lên (Hình 3.41C). Ngoài ra, chúng tôi quan sát thấy rằng một số tế bào có 1-3 nhân, đây là dấu hiệu đặc trưng của tế bào gan.

Sau khoảng 21-28 ngày nuôi cấy, RNA tổng số được tách chiết lại và chạy phản ứng PCR phiên mã ngược. Kết quả cho thấy gen *HNF4α* đã được biểu hiện trong TBGTM cuống rốn chuyển gen. Việc gen *HNF4α* biểu hiện, gen này sẽ thúc đẩy sự biểu hiện của các gen khác liên quan đến tế bào gan. Kết quả điện di cũng thể hiện một chỉ thị đặc trưng khác của tế bào gan được biểu hiện đó là chỉ thị AFP được biểu hiện (Hình 3.42).



Hình 3.42. Biểu hiện của các chỉ thị trước và sau khi chuyển gen

A. Trước chuyển gen. B. Sau khi chuyển gen

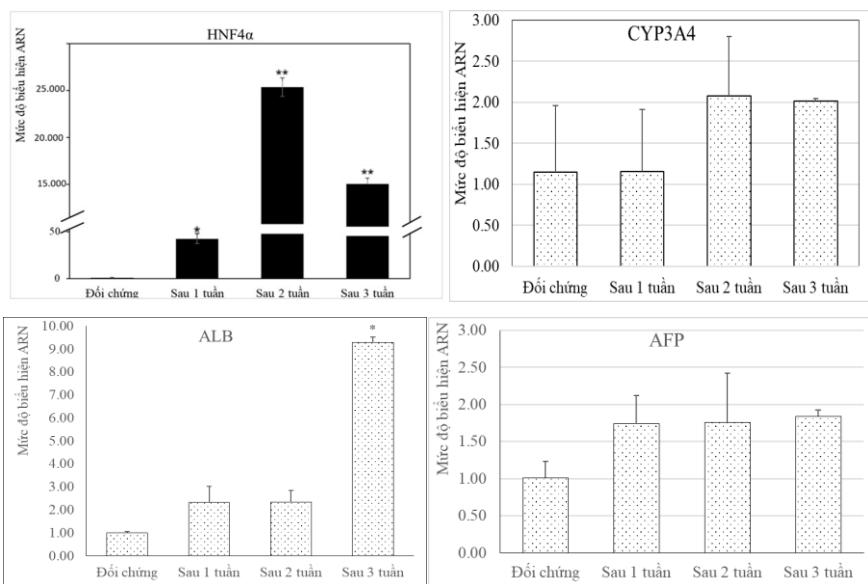


Hình 3.43. Hình ảnh tế bào nhuộm miễn dịch huỳnh quang sau 2 tuần biệt hóa A, B: Tế bào nhuộm với *HNF4α*; C, D: Tế bào nhuộm với ALB; E, F: Tế bào nhuộm với *AFP*; G, H: TBGTM đối chứng không biệt hóa nhuộm với *HNF4α* (Độ phóng đại 100X).

Hình 3.43 cho thấy trong vòng 2 tuần sau khi cảm ứng, các tế bào đã bắt đầu hiển thị dương tính với các chỉ thị đặc trưng chức năng tế bào gan (*HNF4α*, *ALB* và *AFP*). Biểu hiện này phù hợp trong tế bào biệt hóa (Hình 3.43A, 3.43B, 3.43C, 3.43D, 3.43E, 3.43F) so với các tế bào đối chứng (Hình 3.43G, 3.43H). Màu xanh lá cây indocyanine (ICG) chỉ thể hiện trên tế bào sau biệt hóa sau khi ủ trong 1 giờ. Nhân tế bào bắt màu xanh nước biển của thuốc nhuộm DAPI. Ở lô tế bào bằng nhuộm với *HNF4α* (Hình 3.43A, 3.43B), màu xanh lá cây ICG đã quan sát thấy ở nhân tế bào. Chứng tỏ *HNF4α* đã chuyển thành công vào nhân tế bào.

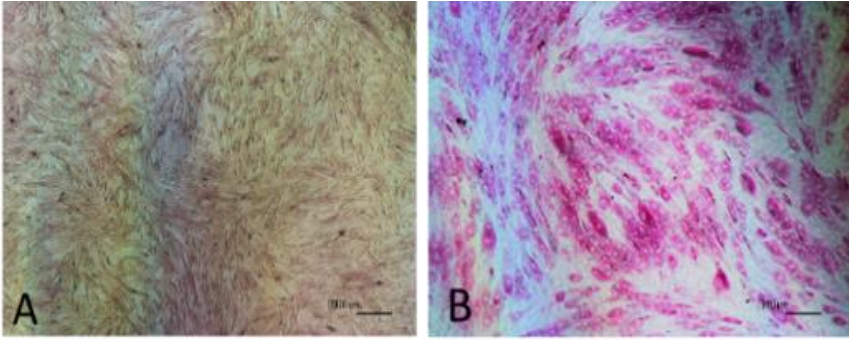
Các TBGTM đã được chuyển gen bằng pTRE-*HNF4α*-ON và được Dox kích hoạt được tiến hành phân tích qPCR để đánh giá mức độ biểu hiện mRNA của *HNF-4α*, *AFP*, *ALB* và *CYP3A4* tại các thời điểm khác nhau. Trong số các gen này, biểu hiện *HNF-4α* mRNA thể hiện sự gia tăng trong các giai đoạn bắt đầu (ngày thứ 7-sau 1 tuần), sau đó là sự gia tăng đáng chú ý vào ngày 14 (sau 2 tuần) và sau đó giảm đáng kể vào ngày 21 (sau 3 tuần)

(Hình 3.44A). Mức độ biểu hiện của gen CYP3A4 không cho thấy tăng có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Mức tăng cao nhất được ghi nhận vào ngày 14 (2,08 lần), sau đó là mức giảm nhẹ vào ngày 21 (2,01 lần) (Hình 3.44B). Mức độ biểu hiện của gen ALB có xu hướng tăng dần so với đối chứng với số lần thay đổi lần lượt là 2,31 sau 7 ngày, 2,33 sau 14 ngày và cao nhất là 9,29 sau 21 ngày (có ý nghĩa thống kê) (Hình 3.44C). Mức độ biểu hiện của gen AFP tăng 1,74 lần so với đối chứng sau 7 ngày. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể về mức độ biểu hiện của gen AFP sau 14 ngày và 21 ngày, với số lần thay đổi lần lượt là 1,76 và 1,84 so với đối chứng (Hình 3.44D).



Hình 3.44: Kết quả qPCR xác định mức độ biểu hiện mRNA của các gen HNF4 α (A), CYP3A4 (B), ALB (C) và AFP (D) tại các thời điểm khác nhau. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả có ý nghĩa thống kê là *P < 0,01; ** P < 0,001.

để biểu hiện *HNF4α* thì tế bào đã bắt màu hồng đỏ của thuốc nhuộm PAS (Hình 3.45B).



Hình 3.45. Kết quả nhuộm PAS của nhóm tế bào chuyển gen *HNF4α* sau 2 tuần

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập, nhân nuôi và bảo quản được TBG từ cuống rốn với biểu hiện các chỉ thị đặc trưng TBGTM như dương tính với *CD73*, *CD90*, *CD105*. Qua phương pháp đánh giá bằng dấu ấn bề mặt cũng cho thấy quần thể tế bào phân lập được có tỷ lệ biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng của TBGTM từ 95,03% đến 99,90%.
2. Các tế bào nhân nuôi ổn định trong điều kiện *in vitro*, có tiềm năng biệt hóa thành tế bào tạo mỡ và tế bào giống nguyên bào xương. Quá trình đông lạnh-giải đông không làm mất đi tính ổn định hình thái của TBGTM cuống rốn tuy nhiên làm giảm tỷ lệ sống sót chỉ đạt $85,29 \pm 1,56\%$ so với tỷ lệ $98,33 \pm 0,58\%$ của TBGTM trước đông lạnh. Khả năng tăng trưởng của tế bào sau giải đông và biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng của TBGTM như *CD73*, *CD90*, *CD105* giảm so với TBGTM trước khi đông lạnh.
3. Đã biệt hóa thành công TBGTM cuống rốn thành tế bào có chức năng gan. Tế bào sau khi biệt hóa đã có sự thay đổi hình thái, phát hiện sớm nhất từ

ngày thứ 7, đến ngày thứ 21 các tế bào có dạng nguyên bào sợi đa phần biến đổi thành các tế bào có dạng hình đa giác, đặc trưng của tế bào gan. Biệt hóa bằng chuyển gen *HNF4 α* qua hệ thống biểu hiện Tet-ON là một phương pháp hiệu quả và nhanh chóng nhất so với các phương pháp biệt hóa bằng DMSO, biệt hóa bằng tổ hợp HGF + DEX + OSM, biệt hóa bằng tổ hợp HGF + TSA + OSM. Cụ thể phân tích RT-PCR cho thấy tế bào sau xử lý đã biểu hiện 2 chỉ thị liên quan đến tế bào gan là *AFP* và *HNF4 α* từ ngày thứ 21 (lô biệt hóa bằng chuyển gen) và ngày thứ 28 (lô biệt hóa bằng các phương pháp còn lại). Khi nhuộm huỳnh quang miễn dịch tế bào ở nhóm biệt hóa bằng chuyển gen, ghi nhận biểu hiện của *HNF4 α* , *ALB* và *AFP* từ ngày 14 sau biệt hóa. Đánh giá khả năng tích trữ glycogen của tế bào sau biệt hóa cho thấy glycogen được lưu trữ trong lô tế bào biệt hóa có biểu hiện cao ở ngày 14 (lô biệt hóa bằng chuyển gen) và ngày 21 (lô biệt hóa bằng các phương pháp còn lại) so với nhóm đối chứng không biệt hóa là âm tính.

KIẾN NGHỊ

- (1) Cần tiếp tục theo dõi trong thời gian dài hơn để điều tra sự ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh, bảo quản tới sự tăng trưởng của tế bào sau phân lập;
- (2) Cần tiếp tục nghiên cứu định lượng so sánh protein trong tế bào bằng hình ảnh Western blot hoặc tiết ra trong môi trường nuôi (ELISA);
- (3) Cần tiếp tục nghiên cứu và tiến hành thêm các đánh giá cần thiết khác cũng như kéo dài thời gian biệt hóa để tạo tế bào gan thành thực thể phục vụ cho mục tiêu sàng lọc chất có hoạt tính sinh học và thử nghiệm thuốc;
- (4) Cần tiếp tục nghiên cứu và tiến hành thêm các đánh giá, theo dõi tế bào gốc và tế bào gan trong điều kiện *in vivo* qua mô hình chuột thí nghiệm.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Đỗ Trung Kiên**, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Quỳnh Anh, Trần Thị Oanh, Nguyễn Hữu Đức, Hoàng Nghĩa Sơn, Chu Hoàng Hà, *Biểu hiện các chỉ thị đặc trưng tế bào gốc trung mô của tế bào gốc phân lập từ dây rốn và nhau thai người*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2017, 15(3A), 1-7.
2. Nguyễn Văn Hạnh, **Đỗ Trung Kiên**, Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Quỳnh Anh, Hoàng Nghĩa Sơn, Chu Hoàng Hà, *Đánh giá tính ổn định của tế bào gốc dây rốn trong nuôi cấy in vitro*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2017, 15(3A), 9-13.
3. **Trung Kien Do**, Van Hanh Nguyen, Thanh Nga Nguyen, Dinh Minh Pham, Trung Nam Nguyen, Thi Thanh Huyen Tran, Thi Thu Huong Ngo, Hoang Ha Chu, *Efficient Isolation and Long-term Red Fluorescent Nanodia-mond Labeling of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Effective Differentiation into Hepatocyte-like Cells*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 2020, 63(e20200082),
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020200082>.
4. Nguyen Thi Nhung, **Do Trung Kien**, Nguyen Thi Hiep, Tran Thi Huong Giang, Nguyen Van Hanh, *Evaluation the ability to isolate and culture stem cells from frozen human umbilical cord tissue*, VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology, 2022, 38(2), 17-22.

