

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 GỐC TRUNG MÔ CUÔNG RÓN

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

ĐỒ TRUNG KIẾN

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

TS. Nguyễn Văn Hạnh

TS. Nguyễn Hữu Đức

Hà Nội - Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "**Nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan từ tế bào gốc trung mô cuống rốn**" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 2 tháng 5 năm 2024

Tác giả luận án



Đỗ Trung Kiên

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, cho phép tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành tới TS. Nguyễn Văn Hạnh – Phó trưởng phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và TS. Nguyễn Hữu Đức - Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, là những người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi được học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể các thầy cô giáo, các bạn bè, đồng nghiệp và các nhà khoa học thuộc phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học và Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ về chuyên môn và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới Ban Giám hiệu cùng các đồng nghiệp tại Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản - nơi tôi đang công tác, đã hỗ trợ, tạo điều kiện cho tôi về thời gian và công việc tại cơ quan trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào chức năng gan từ tế bào gốc người và chuột” - đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số: VAST.ĐL.03/16-17 do TS. Nguyễn Văn Hạnh chủ trì.

Cuối cùng tôi xin gửi tới gia đình, người thân, bạn bè lời cảm ơn chân thành nhất vì đã ủng hộ, đồng hành, là chỗ dựa vững chắc và là động lực giúp tôi hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 2 tháng 5 năm 2024

Tác giả luận án



Đỗ Trung Kiên

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	i
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Nguồn tế bào gốc trung mô, tiềm năng biệt hóa và ứng dụng	4
1.1.1. Nguồn tế bào gốc trung mô	4
1.1.2. Tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô.....	5
1.1.3. Ứng dụng của tế bào gốc trung mô	6
1.2. Cấu tạo cuống rốn, ưu điểm của tế bào gốc trung mô từ cuống rốn	10
1.2.1. Cấu tạo cuống rốn.....	10
1.2.2. Ưu điểm của tế bào gốc trung mô từ cuống rốn	11
1.3. Tình hình nghiên cứu	12
1.3.1. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc người	12
1.3.2. Tình hình nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào gan	15
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. Sơ đồ nghiên cứu	27
2.2. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu	28
2.2.1. Mẫu nghiên cứu	28
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	28
2.2.3. Hóa chất và các bộ kit sử dụng	28
2.2.4. Thiết bị nghiên cứu.....	29
2.2.5. Môi trường thao tác, nuôi cấy, bảo quản	29
2.3. Phương pháp nghiên cứu	29
2.3.1. Thu nhận, phân lập và nhân nuôi tế bào	29
2.3.2. Phương pháp cấy chuyển tế bào	30

2.3.3. Phương pháp đông lạnh và giải đông tế bào.....	30
2.3.4. Phương pháp nhuộm nhiễm sắc thể	31
2.3.5. Phương pháp đánh giá tiềm năng biệt hóa của tế bào phân lập được.....	31
2.3.6. Phương pháp đánh giá đặc trưng tế bào gốc của tế bào phân lập được.....	32
2.3.7. Phương pháp đánh giá tốc độ tăng trưởng tế bào.....	34
2.3.8. Phương pháp biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan	35
2.3.9. Phương pháp đánh giá các chỉ thị của tế bào sau xử lý biệt hóa	38
2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu.....	40
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	41
3.1. Thu nhận, phân lập, nhân nuôi <i>in vitro</i> TBGTM từ mẫu cuống rốn	41
3.1.1. Thu nhận, phân lập tế bào gốc từ mảnh mô cuống rốn	41
3.1.2. Nhân nuôi <i>in vitro</i> , bảo quản lạnh tế bào gốc cuống rốn	43
3.1.3. Đánh giá tốc độ tăng trưởng của tế bào	47
3.2. Đánh giá tính ổn định, tiềm năng biệt hóa và khả năng duy trì nguồn TBGTM trong điều kiện nuôi <i>in vitro</i>	50
3.2.1. Đánh giá tính ổn định di truyền của TBG phân lập được	50
3.2.2. Đánh giá tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc	52
3.2.3. Đánh giá đặc trưng tế bào gốc trung mô	55
3.3. Biệt hóa TBGTM cuống rốn thành tế bào có biểu hiện các chỉ thị đặc trưng tế bào gan	63
3.3.1. Biệt hóa bằng DMSO	63
3.3.2. Biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, DEX và OSM	67
3.3.3. Biệt hóa bằng tổ hợp HGF, TSA và OSM.....	70
3.3.4. Biệt hóa bằng chuyển gen HNF4 α	73
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	92
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	94
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	95
PHỤ LỤC 1. PHIẾU TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU	112
PHỤ LỤC 2. BẢN CUNG CẤP THÔNG TIN NGHIÊN CỨU	113
PHỤ LỤC 3. DANH SÁCH CÁ NHÂN TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU.....	116
PHỤ LỤC 4. THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU.....	117

PHỤ LỤC 5. MÔI TRƯỜNG DỪNG TRONG NGHIÊN CỨU.....	121
PHỤ LỤC 6. TRÌNH TỰ CDS CỦA GEN HNF4α	124

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
<i>AFP</i>	Alpha-fetoprotein	
<i>ALB</i>	Albumin	
<i>BSA</i>	Bovine serum albumin	Albumin huyết thanh bò
<i>DEX</i>	Dexamethasone	
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
<i>DMSO</i>	Dimethyl sulfoxide	
<i>Dox</i>	Doxycycline	
<i>ECM</i>	Extra Cellular Matrix	Chất nền ngoại bào
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì
<i>FBS</i>	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh thai bò
<i>FGF</i>	Fibroblast Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi
<i>GF</i>	Grow Factor	Yếu tố tăng trưởng
<i>HGF</i>	Hepatocyte Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng tế bào gan
<i>HNF</i>	Hepatocyte Nuclear Factors	Những yếu tố nhân tế bào gan
<i>HNF-4</i>	Hepatocyte nuclear factor 4	
<i>HNF-4α</i>	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	
<i>OSM</i>	Oncostatin M	
<i>PAS</i>	Periodic Acid-Schiff	Bộ kit Periodic Acid-Schiff
<i>PBS</i>	Phosphate Buffered Saline	
<i>TBG</i>		Tế bào gốc
<i>TBGTM</i>		Tế bào gốc trung mô
<i>TGF</i>	Transforming Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng
<i>TSA</i>	Trichostatin A	
<i>WJ</i>	Wharton's Jelly	Lớp mô đệm thạch Wharton của dây rốn

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1.	Thành phần phản ứng RT-PCR.....	34
Bảng 2.2.	Trình tự oligonucleotide các môi được sử dụng để đánh giá đặc trung TBG và chỉ thị chức năng tế bào gan	34
Bảng 2.3.	Các cặp môi được thiết kế để chuẩn bị vector mang gen <i>HNF4α</i>	37
Bảng 2.4.	Tỷ lệ thành phần phản ứng cắt của <i>HNF4α</i> và pTRE-Tight-BI bằng 2 enzyme <i>NheI</i> và <i>PacI</i>	37
Bảng 2.5.	Tỷ lệ thành phần phản ứng cắt của pTRE-Tight-BI- <i>HNF4α</i> và pTet-DualON bằng 2 enzyme <i>NsiI</i> và <i>PacI</i>	38
Bảng 2.6.	Các đoạn môi được sử dụng trong qPCR.....	39
Bảng 3.1.	Kết quả đếm tế bào và tỷ lệ sống tế bào.....	45
Bảng 3.2.	Sự tăng sinh 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.....	49
Bảng 3.3.	Biểu hiện của các chỉ thị TBGTM qua các lần cấy chuyển.....	59
Bảng 3.4.	Tỷ lệ tế bào biểu hiện các chỉ thị TBG trước và sau đông lạnh.....	59
Bảng 3.5.	Kết quả đo mật độ quang (OD) của các mẫu RNA tách chiết.....	60
Bảng 3.6.	Biểu hiện các chỉ thị bề mặt trong quá trình nuôi <i>in vitro</i>	61
Bảng 3.7.	Biểu hiện của các chỉ thị phân tử ở tế bào sau biệt hóa bằng DMSO.....	64

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1.	Tiềm năng biệt hóa của TBGTM	4
Hình 1.2.	Triển vọng ứng dụng của công nghệ tế bào gốc.....	7
Hình 1.3.	Ứng dụng của TBGTM được thử nghiệm trên lâm sàng (phân loại theo ca bệnh).....	8
Hình 1.4.	Ứng dụng của TBGTM được thử nghiệm trên lâm sàng (phân loại theo pha).....	9
Hình 1.5.	Số lượng và tỷ lệ các thử nghiệm lâm sàng về điều trị TBGTM cho bệnh gan.....	9
Hình 1.6.	Mặt cắt ngang cấu trúc của dây rốn.....	10
Hình 1.7.	Mô hình sử dụng tế bào gan biệt hóa từ tế bào gốc.....	17
Hình 1.8.	Các phân tử nhỏ tạo tế bào có chức năng gan hoặc thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào giống với tế bào gan.....	22
Hình 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu.....	27
Hình 2.2.	Cấu trúc vector pTRE- <i>HNF4α</i> -ON.....	37
Hình 3.1.	Phân lập tế bào gốc cuống rốn từ mảnh mô.....	41
Hình 3.2.	Tế bào mọc sau khi phân lập bằng phương pháp nuôi mảnh mô.....	42
Hình 3.3.	Quá trình phát triển <i>in vitro</i> của tế bào phân lập được.....	44
Hình 3.4.	Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản TBGTM đến khả năng tăng trưởng của tế bào sau giải đông.....	46
Hình 3.5.	Tế bào trước khi đông lạnh (P4) (trái) và sau khi giải đông (P6) (phải).....	46
Hình 3.6.	Các tế bào phát triển từ mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (C), TBGTM che kín bề mặt đĩa nuôi ở giai đoạn cấy chuyển lần 2 từ mô tươi (B) và mô đông lạnh (D).....	47
Hình 3.7.	Biểu đồ tốc độ tăng trưởng của tế bào P4 trước đông lạnh và tế bào P4 sau đông lạnh.....	48

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.....	50
Hình 3.9.	Quan sát nhiễm sắc thể trên kính hiển vi (A) và nhiễm sắc thể đồ (B) của tế bào nuôi ở lần cấy chuyển thứ 2.....	51
Hình 3.10.	Quan sát nhiễm sắc thể trên kính hiển vi và nhiễm sắc thể đồ của tế bào nuôi ở lần cấy chuyển thứ 10 (A), (B) và thứ 15 (C),(D).....	51
Hình 3.11.	Kết quả biệt hóa TBGTM thành tế bào mỡ.....	53
Hình 3.12.	Các tế bào giọt mỡ bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red xuất hiện sau biệt hóa ở nhóm mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (B).....	53
Hình 3.13.	Kết quả biệt hóa TBGTM thành nguyên bào xương.....	54
Hình 3.14.	Các tế bào bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin red ở nhóm mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (B).....	55
Hình 3.15.	Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu tế bào phân lập từ mô cuống rốn ở lần cấy chuyển 4 phân tích bằng flow cytometry.....	56
Hình 3.16.	Tỷ lệ tổ hợp các chỉ thị đặc trưng không biểu hiện trong TBGTM của các mẫu ở lần cấy chuyển 4 phân tích bằng flowcytometry.....	56
Hình 3.17.	Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu cuống rốn tươi ở lần cấy chuyển 2.....	57
Hình 3.18	Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu cuống rốn đông lạnh ở lần cấy chuyển 2	57
Hình 3.19.	Kết quả điện di với các chỉ thị ở lần cấy chuyển 20.....	62
Hình 3.20.	Kết quả điện di với các chỉ thị <i>CD105</i> , <i>CD90</i> , <i>CD73</i> của mẫu tế bào trước đông lạnh, nuôi cấy sau 33 ngày và 21 ngày từ lúc phân lập (A), mẫu tế bào sau giải đông (B).....	63

Hình 3.21.	Hình thái của tế bào trước và khi xử lý bằng DMSO 1% sau 30 ngày và so sánh với tế bào HepG2.....	64
Hình 3.22.	Biểu hiện chỉ thị phân tử của tế bào biệt hóa bằng DMSO 1% sau 30 ngày và so sánh với tế bào HepG2.....	65
Hình 3.23.	Kết quả nhuộm PAS.....	67
Hình 3.24.	Hình thái tế bào biệt hóa bằng tổ hợp HGF, DEX và OSM sau 1 tuần (A) và 2 tuần (B).....	68
Hình 3.25.	Kết quả sản phẩm RT-PCR tế bào nuôi cấy 4 tuần sau biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, DEX và OSM.....	69
Hình 3.26.	Kết quả nhuộm PAS.....	69
Hình 3.27.	Hình thái tế bào xử lý biệt hóa bằng tổ hợp HGF, TSA và OSM sau 1 tuần (A) và 2 tuần (B).....	70
Hình 3.28.	Điện di đồ RT-PCR mẫu nuôi cấy 4 tuần sau biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, TSA và OSM.....	71
Hình 3.29.	Kết quả nhuộm PAS.....	72
Hình 3.30.	Điện di đồ kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại CDS gen <i>HNF4α</i>	73
Hình 3.31.	Kết quả tinh sạch sản phẩm <i>HNF4α</i> và pTRE-Tight-BI cắt bằng enzyme <i>NheI</i> và <i>PacI</i>	74
Hình 3.32.	Đĩa biến nạp sản phẩm nối pTRE-Tight-BI- <i>HNF4α</i> vào <i>E.coli DH5α</i> (A) và điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuôn lạc (B).....	74
Hình 3.33.	Kết quả sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI- <i>HNF4α</i> bằng <i>NheI</i> và <i>PacI</i>	75
Hình 3.34.	Kết quả cắt vector pTet-DualON bằng 2 enzyme <i>NsiI</i> và <i>PacI</i>	76
Hình 3.35.	Kết quả tinh sạch sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI- <i>HNF4α</i> và sản phẩm cắt pTet-DualON bằng 2 enzyme <i>NsiI</i> + <i>PacI</i>	77
Hình 3.36.	Đĩa biến nạp sản phẩm nối pTRE- <i>HNF4α</i> -ON vào <i>E.coli DH5α</i> (A) và điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuôn lạc (B).	77

Hình 3.37.	Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pTRE- <i>HNF4α</i> -ON bằng enzyme.....	78
Hình 3.38.	Tốc độ tăng trưởng của TBGTM sau khi được chuyển nhiễm..	79
Hình 3.39.	Biểu đồ sinh trưởng của tế bào sau chuyển gen hoạt hóa bằng Doxycycline.....	81
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	82
Hình 3.41.	Trong quá trình chuyển gen hình thái tế bào có sự biến đổi....	83
Hình 3.42.	Biểu hiện của các chỉ thị trước và sau khi chuyển gen.....	84
Hình 3.43.	Hình ảnh tế bào nhuộm miễn dịch huỳnh quang sau 2 tuần biệt hóa.....	85
Hình 3.44.	Kết quả qPCR xác định mức độ biểu hiện mRNA của các gen <i>HNF4α</i> (A), <i>CYP3A4</i> (B), <i>ALB</i> (C) và <i>AFP</i> (D) tại các thời điểm khác nhau.....	87
Hình 3.45.	Kết quả nhuộm PAS của nhóm tế bào chuyển gen <i>HNF4α</i> sau 2 tuần.....	90

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài:

Tế bào gốc (TBG) là những tế bào có khả năng tự tạo mới và có tiềm năng biệt hoá thành nhiều loại tế bào khác nhau. Khác với các tế bào khác, TBG chưa có chức năng chuyên môn hóa cụ thể. Việc sử dụng TBG đa năng trong cuống rốn của trẻ sơ sinh được xem là một khám phá quan trọng trong nghiên cứu TBG vì khả năng cung cấp dồi dào với số lượng lớn và có tiềm năng biệt hóa cao từ nguồn TBG này.

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 dạng vi cơ quan (organoids) [1], [2].

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*, bao gồm HGF (Hepatocyte Growth Factor), OSM (Oncostatin M), EGF (epidermal growth factor), các nhân tố tăng trưởng bFGF (basic fibroblast growth factor), insulin, IGF (insulin-like growth factor), nhân tố ức chế bạch cầu LIF (leukemia inhibitory factor). Ngoài ra, các hợp chất hóa học chẳng hạn như dexamethasone và dimethylsulfoxide (DMSO) có thể đóng vai trò trong việc thúc đẩy quá trình biệt hóa thành tế bào gan [3], [4]. Tuy nhiên, việc sử dụng các tác nhân này trong các nghiên cứu hiện nay vẫn có những khác biệt và vẫn còn thiếu một phương thức để đạt hiệu quả như trông đợi.

Với biệt hóa bằng chuyển gen, các tế bào gan cảm ứng (*induced hepatocytes-iHeps*) đã được công bố trong một số báo cáo gần đây cho thấy sự biểu hiện phong phú của các gen liên quan đến chức năng trao đổi chất của tế bào gan, kết quả hoạt hóa biểu hiện các gen hay nhóm gen khác nhau liên quan đến sự trưởng thành về chức năng gan của tế bào sau biệt hóa [5]. Trong việc tái biệt hóa tạo tế bào giống tế bào gan, gen *HNF-4 α* đã được chứng minh có vai trò và lợi thế trong một số công bố gần đây [1]. Khoảng 100 gen trong đó có hepatocyte factor 1-alpha, một yếu tố phiên mã điều hòa sự biểu hiện của một gen liên quan đến gan được biểu hiện do sự kiểm soát của Protein được mã hóa bởi gen *HNF-4 α* . Trong sự phát triển của gan,

thận và tuyến ruột, một trong những gen đóng vai trò quan trọng được biết đến là gen *HNF-4 α* . Trong quá trình định hướng biệt hóa thành tế bào gan, Gen *HNF-4 α* đã được chứng minh có thể hoạt động như một gen chi phối trong các tác nhân phiên mã [6]. Ngoài ra, *HNF-4 α* đóng vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa gan và trong nhiều chức năng của gan, bao gồm chuyển hóa lipid và glucose [7]. *HNF-4 α* cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện và tổng hợp của Globulin liên kết với hormone giới tính, một glycoprotein quan trọng được chủ yếu được sản xuất bởi gan [6].

Các nghiên cứu trước đây có sử dụng phương pháp chuyển nạp gen thông qua hệ thống lenti-virus để biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan sử dụng tác nhân *HNF-4 α* . So với các hệ thống biểu hiện gen được điều hòa khác được biết, thì hệ thống Tet-On đã được chứng minh hơn hẳn ở một số ưu điểm [1]. Hệ thống biểu hiện gen Tet-On được kiểm soát bởi tetracycline được sử dụng để điều chỉnh hoạt động của gen trong nhân tế bào nhân chuẩn trong các môi trường khác nhau, từ nghiên cứu sinh học cơ bản đến ứng dụng công nghệ sinh học và liệu pháp gen. Hệ thống này dựa trên các yếu tố điều hòa kiểm soát hoạt động của operon kháng tetracycline ở vi khuẩn. Hệ thống Tet-On cho phép kích hoạt biểu hiện gen bằng doxycycline (dox). Các ưu điểm của hệ thống này đã được chứng minh như: sự điều hòa chặt chẽ, tính đặc hiệu cao, khả năng đáp ứng cao và thời gian đáp ứng nhanh, mức độ biểu hiện tuyệt đối cao, không gây độc tế bào (catalog PT3898-1 Clontech) [8], [9].

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”**. Các tác nhân được chúng tôi sử dụng để đánh giá bao gồm: DMSO, tổ hợp HGF + DEX + OSM, tổ hợp HGF + TSA +OSM và hệ thống TetON kích hoạt thể hiện quá mức gen *HNF4 α* để biệt hóa tế bào gốc trung mô cuống rốn thành tế bào có một số chức năng của tế bào gan.

Mục tiêu nghiên cứu:

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 chức năng của 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:

Nhiều nghiên cứu sự biệt hóa tạo tế bào gan trong điều kiện *in vitro* từ tế bào gốc bao gồm cả tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc trung mô đã được thử nghiệm và công bố. Các nghiên cứu biệt hóa thành tế bào gan vẫn sử dụng chủ yếu là tế bào gốc trung mô từ các nguồn khác nhau (ví dụ: tủy xương, mô mỡ, máu dây rốn, nhau thai và cuống rốn). Một số cytokine và các nhân tố tăng trưởng bao gồm HGF, OSM, Các hợp chất hóa học chẳng hạn như DMSO, TSA và gen *HNF-4 α* đã được đánh giá là một yếu tố có khả năng biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan. 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.

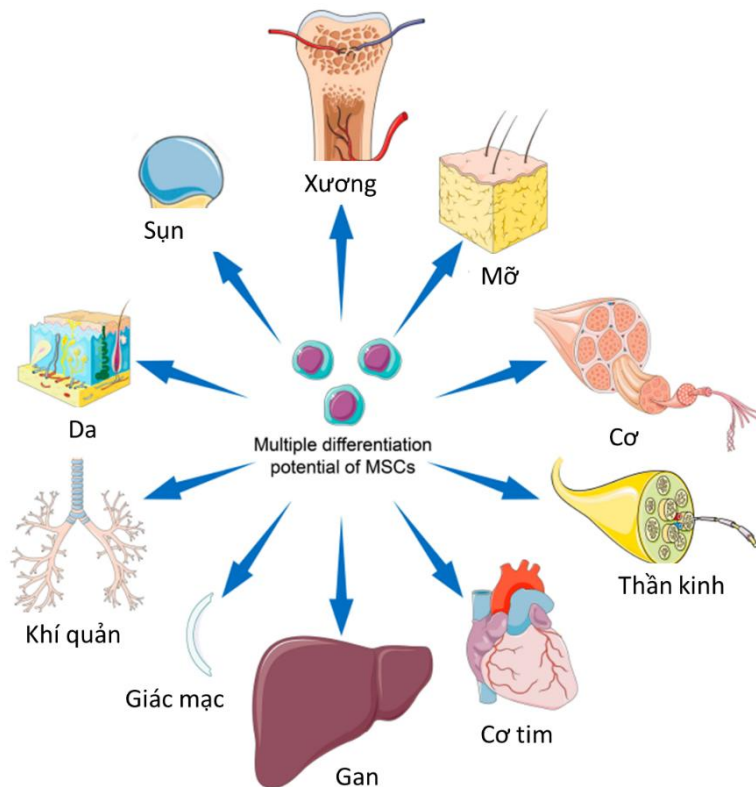
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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 [10], [11].

TBGTM có thể thu thập được từ cơ xương, tủy xương, dây chằng, mô mỡ, nhau thai, dây rốn và máu dây rốn. TBGTM có tiềm năng biệt hóa thành tế bào có nguồn gốc trung mô như nguyên bào xương, sụn, tế bào mỡ và các tế bào thần kinh từ lớp ngoại bì, các mô hệ tuần hoàn, các tế bào gan, cơ tim...(Hình 1.1) [11].



Hình 1.1. Tiềm năng biệt hóa của TBGTM [11]

TBGTM có nguồn gốc từ các mô khác nhau nhưng có cùng một số đặc tính tương tự nhau. Tuy nhiên, một số công trình nghiên cứu đã công bố cho rằng TBGTM có nguồn gốc khác nhau cũng có một số khác biệt như khả năng tăng

sinh, biểu hiện dấu hiệu bề mặt, tính đa tiềm năng và một số dấu hiệu cụ thể khác. Những đặc điểm này có thể được sử dụng trong việc tìm các nguồn TBGTM tốt hơn có chất lượng để ứng dụng trong lĩnh vực y học tái tạo [12].

Trong các nguồn cung cấp TBGTM, nguồn thu thập từ các mô nhau thai, cuống rốn có nhiều ưu điểm đáng kể như tránh được thủ thuật xâm lấn mà thường đi kèm với nguy cơ nhiễm trùng so với các nguồn TBGTM từ các mô trưởng thành. TBGTM từ dây rốn có khả năng cấy ghép tốt hơn có khả năng tăng sinh mạnh hơn so với TBGTM từ tủy xương [13].

So với TBGTM từ các mô trưởng thành, TBGTM ở trẻ sơ sinh có khả năng ức chế miễn dịch mạnh mẽ hơn và tính sinh miễn dịch thấp hơn. Vì vậy, đây như là một nguồn cung cấp tế bào rất hợp lý cho các ứng dụng điều trị [14], [15].

Như vậy, TBGTM có thể phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, tuy nhiên việc sử dụng cuống rốn trẻ sơ sinh để phân lập đã có nhiều ưu điểm như thu được số lượng lớn, tỷ lệ phân lập thành công cao, khả năng ức chế miễn dịch cao, không vi phạm đạo đức và vẫn có tiềm năng biệt hóa của TBG. Cuống dây rốn chính là nguồn để phân lập TBGTM sử dụng trong nghiên cứu này.

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

Mỗi loại tế bào được biệt hóa khi một số lượng gen nhất định của genome biểu hiện và mỗi một loại tế bào được hình thành qua một kiểu biểu hiện riêng của các gen được điều hòa. Vì vậy quá trình biệt hóa tế bào là sự chuyển đổi từ một loại tế bào nguồn thành một loại khác và nó liên quan đến một “công tắc” đóng một số gen đang hoạt động và mở một số gen chưa hoạt động. Những thay đổi này dẫn đến tế bào biến đổi theo chiều hướng phù hợp với các yếu tố kích thích và sẽ tạo thành một kiểu tế bào chuyên biệt nào đó [16].

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,... Ngoài ra TBGTM chính là nguồn cung cấp tế bào để bù đắp lại sự thiếu hụt mô vì TBGTM chính là các tế bào tiền thân trưởng thành đa tiềm năng. Khi xuất hiện các vết thương, ổ gãy xương, ổ viêm, hay chỉ là các điều kiện vi môi trường từ một vị trí đặc biệt nào đó trong cơ thể, dưới tác dụng của các tín hiệu trên, các

TBGTM sẽ được huy động và biệt hóa thành các tế bào có chức năng chuyên biệt [17].

Một nghiên cứu đã chứng minh tiềm năng tăng sinh to lớn của TBGTM khi nuôi cấy TBGTM *in vitro*, sau 70 lần phân chia các tế bào này cho thấy chúng vẫn không thay đổi tiềm năng biệt hóa [17].

1.1.3. Ứng dụng của tế bào gốc trung mô

Nghiên cứu về TBG có thể có thêm những hiểu biết về quá trình biệt hóa tế bào, bản chất của quá trình biệt hóa. Hiểu rõ về quá trình này ta có thể kiểm soát và chủ động tác động để tạo ra các loại tế bào như mong muốn hoặc có thêm thông tin trong việc tìm kiếm các phương thức sàng lọc và điều trị các bệnh di truyền.

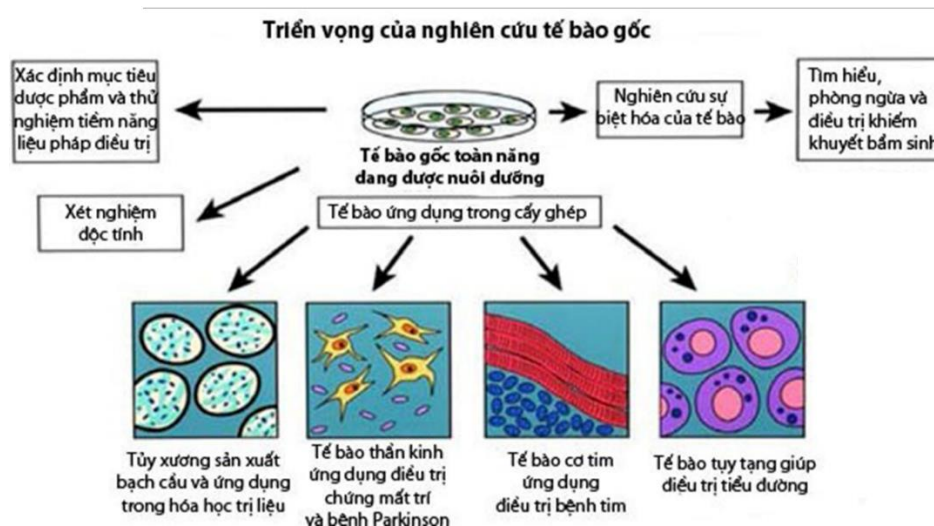
Trên cơ sở các TBG chưa hoàn tất quá trình biệt hóa và khả năng tăng sinh mạnh mẽ của chúng, các nhà khoa học có thể chủ động tạo ra các tế bào giống hệt nhau và ở các giai đoạn bệnh lý, sinh lý khác nhau rất gần với thực tế lâm sàng. Điều này rất có ý nghĩa trong việc nghiên cứu độc tính cũng như cơ chế tác dụng của các loại chế phẩm sinh học hay các loại thuốc [18].

Trong nghiên cứu cơ bản, nghiên cứu phát triển thuốc cũng như ứng dụng vào điều trị trên lâm sàng thì các TBG có rất nhiều triển vọng ứng dụng. Trong nghiên cứu phát triển thuốc thì cần có những mô hình thử nghiệm thuốc (cả tác dụng lẫn độc tính) càng giống với mô hình bệnh lý và có độ lặp lại cao qua các lần thử thì càng chính xác. Thí dụ, muốn khảo sát tác dụng của một thuốc mới có khả năng chữa bệnh Alzheimer thì việc tạo ra được hàng loạt tế bào thần kinh giống hệt nhau để làm mô hình thử thuốc sát với bệnh Alzheimer nhất cần sử dụng công nghệ TBG. Tuy nhiên vẫn cần có thêm nhiều thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng với phương pháp điều trị này [19].

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. Cho tới nay biện pháp hữu hiệu nhất để điều trị những trường hợp này là ghép mô, cơ quan – nhưng nhu cầu ghép mô và tạng lại cao hơn rất nhiều so với nguồn cung cấp.

Trên cơ sở các TBG có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau, chúng

ta có thể chủ động nuôi cấy TBG trong ống nghiệm sau đó biệt hóa chúng thành các tế bào như tế bào cơ, tế bào xương, tế bào thần kinh, tế bào sụn, tế bào tuyến tụy, tế bào cơ tim (Hình 1.2). Do đó, để điều trị một số bệnh thì việc ghép TBG vào cơ thể người bệnh có thể hỗ trợ điều trị một số bệnh như bệnh lý tim mạch, tiểu đường, chấn thương tủy sống, điều trị bệnh Alzheimer, điều trị Parkinson, đột quy não, trong lĩnh vực thẩm mỹ hay thúc đẩy quá trình liền xương...[20].



Hình 1.2. Triển vọng ứng dụng của công nghệ tế bào gốc [21]

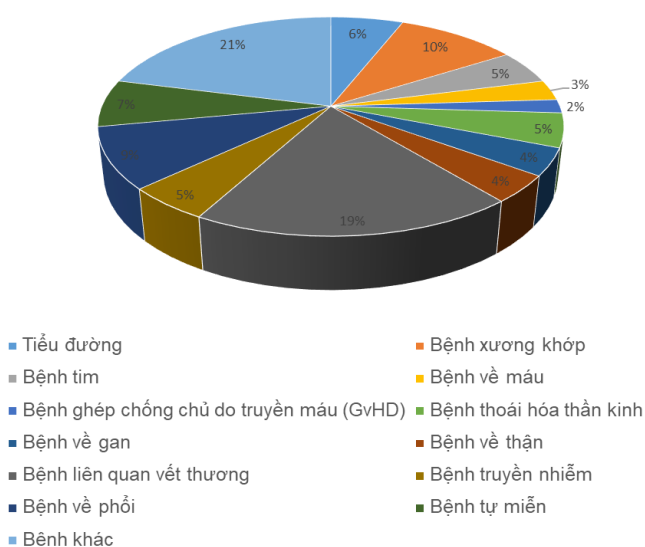
Trên lâm sàng, TBG trưởng thành đã được thử nghiệm trong điều trị các bệnh như các bệnh suy giảm miễn dịch, tai biến mạch máu não, tự kỷ, tự miễn, nhiễm virus Epstein-Barr, thiếu máu, các bệnh máu, bệnh Parkinson, tổn thương tủy sống, tổn thương giác mạc, tạo xương không hoàn chỉnh, các bệnh gan, liền vết thương da, điều trị ung thư kết hợp với tia xạ và hóa chất (ung thư tinh hoàn, ung thư buồng trứng, các khối u đặc, u nguyên bào võng mạc, u não, đa u tủy, ung thư vú, lơ-xê-mi, u lympho Non-Hodgkin, u nguyên bào thần kinh, carcinoma tế bào thận), tiểu đường type I, tái tạo cơ tim sau nhồi máu cơ tim, tổn thương xương và sụn,...[17].

Trong những năm gần đây, trong các loại TBG được sử dụng thì TBGTM là một trong loại TBG được sử dụng nhiều trên lâm sàng và được xem như một mô hình điều trị mới cho một loạt các bệnh vì có thể phân lập và tăng sinh với một số lượng lớn. Đã có ít nhất thử nghiệm lâm sàng trên 12 loại bệnh lý khác nhau dựa trên TBGTM đã được thực hiện, trong đó có nhiều thử nghiệm đã hoàn thành và chứng minh được tính hiệu quả và an toàn. Ứng dụng lâm sàng của TBGTM dựa trên những thuộc tính sinh học quan trọng đó là có tiềm năng biệt hóa thành nhiều

loại tế bào khác nhau, tiết ra nhiều phân tử có hoạt tính sinh học có khả năng phục hồi kích thích các tế bào bị tổn thương và ức chế viêm và để thực hiện chức năng điều hòa miễn dịch.

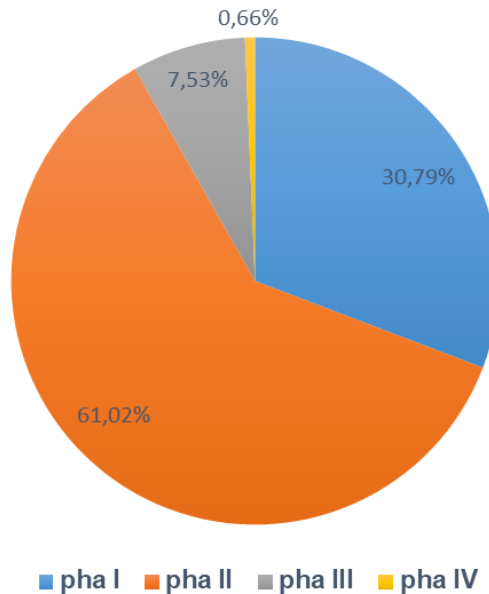
Các thử nghiệm lâm sàng đầu tiên sử dụng nuôi cấy tăng sinh TBGTM được công bố vào năm 1995 và 10 bệnh nhân dị tật khớp giả xương chày bẩm sinh được điều trị bằng tế bào tự thân [22]. Từ thử nghiệm này, một số thử nghiệm lâm sàng khác đã được tiến hành để kiểm tra tính khả thi và hiệu quả của liệu pháp ghép bằng TBGTM. Ngày 12/12/2011, cơ sở dữ liệu về thử nghiệm lâm sàng (<http://clinicaltrials.gov>) đã được thành lập do Viện y tế quốc gia Hoa Kỳ tập hợp. Tính đến năm 2020, sau 10 năm, số liệu công bố đã có hơn 1000 thử nghiệm lâm sàng có sử dụng TBGTM với phạm vi rất rộng cho các ứng dụng điều trị khác nhau (Hình 1.3). Hầu hết những thử nghiệm này trong pha I (30,79%), (nghiên cứu an toàn), pha II (61,02%) (đánh giá về hiệu quả ở bệnh nhân). Chỉ có một số ít những thử nghiệm này trong pha III (7,53%) (so sánh phương pháp điều trị mới với các phương pháp điều trị tiêu chuẩn hoặc đã được biết đến) và mới chỉ có 6 thử nghiệm ở pha IV (0,66%) (hiệu quả đã được chấp thuận và thử nghiệm trên nhóm rộng) (Hình 1.4). Nói chung, TBGTM được dung nạp tốt, với hầu hết các thử nghiệm đã được công bố các tác dụng phụ ở mức độ trung bình, mặc dù một số cho thấy mức độ nhẹ và thoáng qua [23], [24].

Thử nghiệm lâm sàng của TBGTM phân loại theo ca bệnh



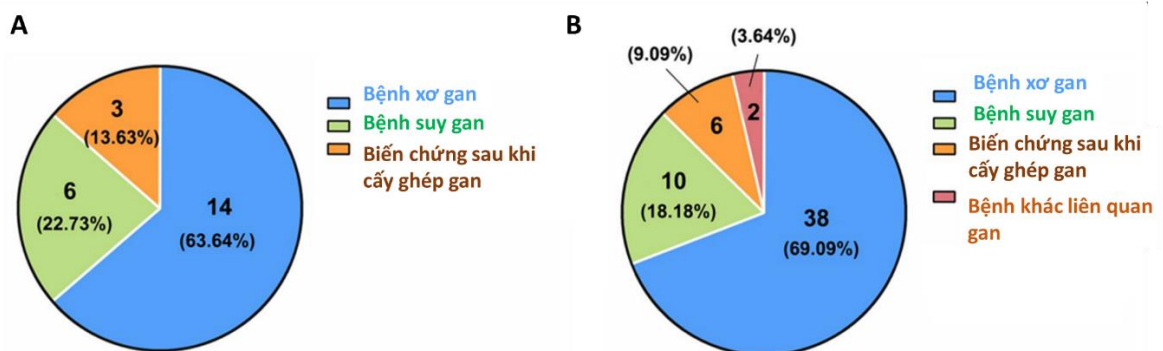
Hình 1.3. Ứng dụng của TBGTM được thử nghiệm trên lâm sàng (phân loại theo ca bệnh) [23]

Thử nghiệm lâm sàng của TBGTM được phân loại theo pha (n=903)



Hình 1.4. Ứng dụng của TBGTM được thử nghiệm trên lâm sàng (phân loại theo pha) [24]

Năm 2020, Yang và cộng sự đã thu thập tổng cộng 23 bài báo thử nghiệm lâm sàng đã hoàn thành và 56 thử nghiệm lâm sàng đang diễn ra về điều trị TBGTM cho bệnh gan được công bố từ năm 2007 đến 2018 (Hình 1.5). Biểu đồ cho phần lớn thử nghiệm trong số đó là về liệu pháp TBGTM cho bệnh xơ gan. Việc phát triển các phương pháp thay thế để điều trị bệnh gan là rất cần thiết. Liệu pháp TBG và y học tái tạo đang được nghiên cứu để cải thiện tiên lượng của những bệnh nhân mắc bệnh gan. Hàng chục các bài báo liên quan đều cho thấy sự an toàn và hiệu quả của việc cấy ghép TBGTM trên người [25].



Hình 1.5. Số lượng và tỷ lệ các thử nghiệm lâm sàng về điều trị TBGTM cho bệnh gan: A) thử nghiệm đã hoàn thành; B) thử nghiệm đang diễn ra [25]

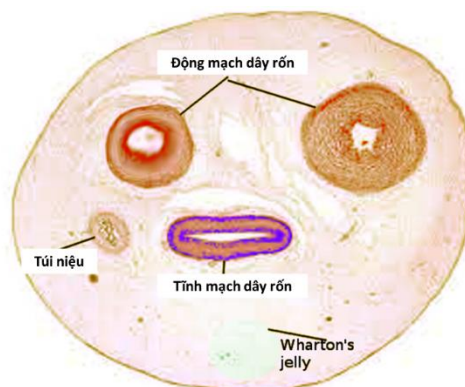
1.2. Cấu tạo cuống rốn, ưu điểm của tế bào gốc trung mô từ cuống rốn

1.2.1. Cấu tạo cuống rốn

Trong quá trình phát triển của phôi thì vào khoảng tuần thứ 5 cuống rốn (dây rốn) được hình thành. Để thực hiện quá trình trao đổi chất giữa thai nhi và cơ thể mẹ, thì việc đảm bảo sự liên tục giữa thai nhi với bánh nhau được thực hiện qua dây rốn [26].

Dây rốn là bộ phận kết nối giữa mẹ và thai nhi, giữ vai trò quan trọng trong vận chuyển chất dinh dưỡng từ cơ thể mẹ sang thai nhi, đảm bảo sự sinh trưởng của thai nhi trong suốt thai kỳ. Chất dinh dưỡng được vận chuyển qua đường máu. Máu từ thai nhi được chuyển qua dây rốn sang nhau thai để tiếp xúc với máu người mẹ, lấy oxy và các chất dinh dưỡng, sau đó lại qua dây rốn chuyển về thai nhi.

Dây 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). Dây rốn thường có đường kính khoảng 2 cm và có chiều dài khoảng 50 cm. Ở lớp WJ, có thể xác định ba vùng khác nhau bao gồm: lớp mô bao quanh các mạch máu, vùng chất nền Wharton và vùng dưới màng ối. Trong các khoảng không gian có hình dạng giống như rãnh thuộc vùng chất nền Wharton là các phân tử collagen loại I, III, VI. Các phân tử heparin sulfate proteoglycan laminin và collagen loại VI nằm xung quanh rãnh này. Các tế bào chất nền là các nguyên bào cơ mảnh có dạng ống biểu hiện actin cơ trơn, desmin và vimentin bao quanh các khoảng không gian chứa đầy chất nền Wharton dạng rãnh. Chỉ có vimentin và desmin ở dây rốn trong giai đoạn phát triển sớm. Các mạch máu được bảo vệ khỏi bị nén là nhờ thành phần và cấu trúc của dây rốn và chính cấu trúc này hỗ trợ cho quá trình trao đổi chất giữa dịch ối và máu dây rốn (Hình 1.6) [27].



Hình 1.6. Mặt cắt ngang cấu trúc của dây rốn [27]

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

Cuống rốn là một trong những nguồn TBGTM phong phú nhất. các TBG tạo máu (Hematopoietic Stem Cell) và TBGTM được tìm thấy trong máu dây rốn, trong khi các TBGTM và các TBG biểu mô (Epithelial Stem Cell) được tìm thấy ở màng bao dây rốn chứa [28], [29]. Gần đây, đã có nhiều nghiên cứu chứng minh dây rốn chứa một số lượng TBG rất dồi dào, ước tính 1 cm² màng bao dây rốn có thể cung cấp 2 triệu TBGTM [26]. Như vậy đây có thể coi là nguồn TBGTM vô tận. Hiện nay, các nhà khoa học chứng minh rằng dây rốn là nguồn cung cấp TBG lý tưởng nhất, sở dĩ như vậy vì TBG này có rất nhiều ưu điểm vượt trội [30]:

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 như HIV, viêm gan B, viêm gan C... đối với các mẫu nghiên cứu bằng các xét nghiệm trước sinh đối với sản phụ.

3. Về phương diện tuổi phát triển, TBG dây rốn là TBG nữ nhi, 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. Các TBG dây rốn không còn là các TBG phôi do vậy không còn khả năng tạo ra khối u ác tính như TBG phôi. Đồng thời có thể thu được nhiều loại TBG bao gồm các TBG trong máu dây rốn (chứa nhiều TBG tạo máu) và các TBGTM và TBG biểu mô từ màng dây rốn, lớp WJ [31].

4. TBG từ dây rốn có thể lưu trữ lâu dài để sử dụng điều trị cho chính người có dây rốn ấy hoặc người thân trong gia đình họ hoặc cho người khác. Xác định trước được kháng nguyên bạch cầu người (human leukocyte antigen– HLA) và các đặc điểm khác của mẫu TBG từ trước để họ xem có phù hợp với người bệnh cần điều trị bằng TBG hay không, từ đó có thể lấy ngay ra để sử dụng cho điều trị mà không mất thời gian tìm kiếm và xét nghiệm cho tế bào [32].

5. Các TBG thu được từ dây rốn và nhau thai biểu hiện HLA ở mức thấp và ít bị đào thải trong cấy ghép. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tế bào này có tính sinh miễn dịch thấp do có chứa ít kháng nguyên hòa hợp mô HLA lớp II đồng thời còn tồn tại các kháng nguyên hòa hợp mô của thai (HLA-G) có tác dụng ức chế miễn dịch nên dễ được cơ thể nhận chấp nhận khi cấy ghép từ người này sang

người khác [33]. Đây là nguồn TBG quan trọng trong việc thay thế tủy xương khi không thể tìm được người cho có HLA phù hợp [34].

6. Cuối cùng, có thể kết luận đây vốn là nguồn TBG lý tưởng vì xét về khả năng biệt hóa, 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,...[35].

1.3. Tình hình nghiên cứu

1.3.1. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc người

Kể từ khi TBG phôi vạn năng được phát hiện năm 1981, với đặc tính chúng có thể tự làm mới vô thời hạn và biệt hóa thành các tế bào đặc trưng của ba lớp mầm nội bì, trung bì và ngoại bì [36]. Tuy nhiên, những nghiên cứu sau đó đã cho thấy những mối quan tâm về đạo đức và kỹ thuật, cũng như nguy cơ hình thành các mô ung thư nếu sử dụng TBG phôi cấy ghép *in vivo* [37]. Điều này đã thúc đẩy hướng nghiên cứu tìm kiếm các TBG đa năng thay thế TBG phôi từ các nguồn tế bào trưởng thành [38].

Các TBG trưởng thành của con người là TBG đa năng như TBG tạo máu và TBGTM, thường được đánh giá không ảnh hưởng về đạo đức và an toàn hơn so với TBG phôi [39]. TBG tạo máu có thể biệt hóa thành tất cả các dòng tế bào máu và tế bào miễn dịch, chúng đã được sử dụng để điều trị các bệnh bạch cầu và rối loạn máu [40]. TBGTM được phân lập từ nhiều nguồn mô từ các cá thể đã trưởng thành [38]. Hiện nay, đã có nhiều các báo cáo về sự biệt hóa của các tế bào này thành các dòng khác nhau như tế bào mỡ, tế bào xương và tế bào thần kinh [41].

Tuy nhiên, việc sử dụng các các TBGTM trong điều trị cũng không phải hoàn toàn thuận lợi và dễ dàng, mà nó cũng có những cản trở và khó khăn do một số lý do nhất định [38]. Đầu tiên, việc phân lập TBG từ các nguồn trưởng thành bao gồm các can thiệp xâm lấn và thường gây đau đớn cho người hiến, cùng với một tỷ lệ biến chứng có thể xảy ra đối với người hiến. Thứ hai, mặc dù chúng có khả năng tăng sinh và biệt hóa khác nhau, nhưng tiềm năng này thường bị giảm khi nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* [42]. Thứ ba, tiềm năng tự đổi mới và biệt hóa của TBG bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi tuổi của người hiến, đặc tính di truyền và những yếu tố môi trường tiếp xúc với tế bào [43].

Năm 2005, Phan Toàn Thắng và cộng sự thuộc trường Đại học Quốc Gia Singapore đã thành công trong việc xác định và phân lập TBG từ màng dây rốn (lining membrane of umbilical cord). Lợi thế của nguồn TBG từ màng dây rốn là đáp ứng được cả hai yêu cầu là số lượng tế bào và không vi phạm y đức. Mỗi dây rốn có đường kính 2 cm và dài 55 cm thì diện tích bề mặt tương đương 330 cm² với số lượng tế bào được phân lập trong 3 tuần sẽ đạt được 6 tỷ tế bào, đây thực sự là số lượng lý tưởng cho các ứng dụng khác nhau trong y học tái tạo và công nghệ mô. Điều quan trọng nữa của công nghệ này liên quan đến chuyên ngành vết thương và vật liệu thay thế. Các TBG từ màng dây rốn bao gồm TBGTM và TBG biểu mô. Các dấu hiệu đặc trưng TBGTM được xác định bao gồm: dương tính với *CD13*, *CD44*, *CD90* và *CD166* và âm tính với *CD14*, *CD34*, *CD45* và HLA-DR [44].

Trong nghiên cứu của Salehinejad và cộng sự năm 2012, nhóm tác giả đã phân lập TBGTM có nguồn gốc từ dây rốn người bằng 4 phương pháp khác nhau: 3 nhóm phân lập bằng enzyme: trypsin (Trp), collagenase/trypsin (CT) và collagenase/hyaluronidase/trypsin (CHT), và một nhóm phân lập bằng phân tách các mảnh mô nhỏ (Exp). Sau đó kết quả phân lập bằng các phương pháp khác nhau được so sánh, sử dụng kỹ thuật nhuộm Trypan blue, nhuộm hóa mô miễn dịch và kỹ thuật đếm tế bào qua dòng chảy (flow cytometry) để kết luận phương pháp phân lập thích hợp nhất [45].

Ở cả 4 nhóm trên cho kết quả khác nhau thể hiện ở khả năng tăng sinh số lượng tế bào biểu hiện chỉ thị của các TBGTM phân lập được. Phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào qua dòng chảy cho thấy trong tất cả các nhóm đều biểu hiện các chỉ thị *CD105*, *CD90*, *CD73*, và *CD44*, trong khi không thể hiện *CD45* và *CD34*. Trong các nhóm khác nhau, các chỉ thị của TBGTM như *CD90*, *CD73*, được biểu hiện khác nhau: ở nhóm Exp chỉ thị *CD73* biểu hiện cao nhất; còn ở nhóm CT và Exp chỉ thị *CD90* biểu hiện cao nhất.

Khả năng tăng sinh cao nhất ở nhóm phân lập bằng phân tách các mảnh mô nhỏ, 60 ngày là thời gian có thể theo dõi tăng sinh tế bào. Trong khi đó sau khoảng 30 ngày nuôi cấy ở các nhóm phân lập bằng enzyme, các tế bào không tiếp tục tăng sinh với tốc độ đáng kể.

Ở phương pháp phân lập bằng enzyme, chỉ sau 2 – 3 giờ TBG đã có thể phân lập được, trong khi phải mất đến 2 – 3 tuần mới quan sát thấy có tế bào mọc ra ở

phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Số lượng tế bào ban đầu thu được ít nhất ở nhóm Trp (1×10^3 tế bào/cm lớp WJ), nhiều hơn ở nhóm CHT ($0,25 \times 10^4$ tế bào/cm lớp WJ) và nhiều nhất ở nhóm CT ($0,5-1 \times 10^4$ tế bào/cm lớp WJ).

Nhóm tác giả cũng quan sát thấy có sự khác nhau về hình thái tế bào giữa nhóm phân lập bằng enzyme và. Các tế bào giống nguyên bào sợi chiếm ưu thế và có tính đồng nhất cao trong nhóm phân lập bằng nuôi cấy mảnh mô. Trong khi không có sự đồng nhất ở quần thể tế bào trong phương pháp enzyme, xuất hiện các tế bào tròn nhỏ xen lẫn với các tế bào giống nguyên bào sợi với độ ngắn, dài khác nhau. Kết quả phân lập TBG đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng phương pháp phân lập bằng nuôi cấy mảnh mô tuy nhiên sẽ tốn nhiều thời gian hơn. Tùy vào mục đích phân lập khi phân lập TBG bằng phương pháp sử dụng enzyme thì cần lựa chọn hỗn hợp enzyme thích hợp [45].

Ở một nghiên cứu khác Karahuseyinoglu và cộng sự đã chỉ ra có thể thu được số lượng lớn TBGTM từ cuống rốn trẻ sơ sinh, cụ thể thu được 4×10^5 tế bào mỗi mẫu, hoặc 10×10^5 đến 15×10^5 tế bào cho 1 cm cuống rốn [46]. Ngoài ra, một nguồn TBGTM dồi dào có thể thu được trong chất nền WJ của cuống rốn. Các tế bào stromal giống nguyên bào sợi có rất nhiều trong WJ bản chất là một mô gelatin trong dây rốn [47]. Khi tiến hành phân lập và nuôi cấy TBGTM từ màng WJ và từ toàn bộ dây rốn, từ ngày 11 và ngày 13 có thể quan sát các tế bào bắt đầu mọc ra. Trong suốt quá trình phân lập và nuôi cấy từ 2 loại này thì trong môi trường nuôi cấy đều không có yếu tố tăng trưởng được thêm vào. Mật độ tế bào bắt đầu tăng và phát triển chiếm 2/3 đĩa nuôi sau khoảng 15 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên khi so sánh bằng kính hiển vi đảo ngược pha, ở nhóm phân lập nuôi cấy từ màng WJ thì mật độ tế bào cao hơn so với nhóm phân lập nuôi cấy từ toàn bộ dây rốn [48].

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. Các nghiên cứu được thực hiện từ cơ bản như đánh giá chất lượng, đo đếm thành phần tế bào trong mẫu thu thập được [49].

Ghép TBG máu để chữa bệnh về khối u ác tính về huyết học đã có một lịch sử lâu dài ở Việt Nam với ca ghép đầu tiên được thực hiện cách đây hơn 20 năm [50]. Mặc dù đã có một số trường hợp sử dụng TBG máu tinh khiết với $CD34+$, hầu hết các trường hợp đã sử dụng phần TBG từ tủy xương, máu cuống rốn hoặc máu ngoại

vi do nhu cầu về số lượng TBG cần huy động. Cho đến nay, hiện có hơn 750 trường hợp ghép TBG máu để điều trị các khối u ác tính tạo máu khác nhau, bao gồm bệnh bạch cầu tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, thiếu máu và beta thalassemia [51]. Những ứng dụng này là một phần của điều trị thường quy tại Việt Nam. Hiệu quả điều trị đã thay đổi giữa các bệnh viện khác nhau [50].

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 phục hồi gãy xương chi, gãy xương chày, khắc phục hoại tử đầu xương. Tất cả các phương pháp điều trị hiện đang được nghiên cứu trong các thử nghiệm lâm sàng thí điểm hoặc pha I/ II. Một số báo cáo cho thấy liệu pháp này là khả thi, nhưng cho đến nay, không có phương pháp điều trị nào được Bộ Y tế phê duyệt như một phương pháp điều trị thông thường. Điều này khác với ghép TBG có nguồn gốc từ mô mỡ, đã cho thấy tác động đáng kể đối với viêm xương khớp gối và được chấp thuận như là một điều trị tiêu chuẩn trong bệnh viện [50]. Thành công của ca ghép TBG có nguồn gốc từ mô mỡ là kết quả của thử nghiệm lâm sàng đa trung tâm, với sự tham gia của Bệnh viện Vạn Hạnh (Tp. Hồ Chí Minh) và Bệnh viện Nguyễn Tri Phương (Tp. Hồ Chí Minh). Cho đến nay, khoảng 1000 bệnh nhân đã được điều trị viêm xương khớp gối bằng liệu pháp này; con số này tiếp tục tăng hàng ngày [51]. Ngoài ra, ghép TBG cũng đã được ghi nhận có kết quả trong điều trị thử nghiệm các bệnh tự kỷ, bại não...[52].

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

Hiện nay, các bệnh về gan là vấn đề sức khỏe nghiêm trọng trên toàn thế giới. Bệnh về gan là một trong những bệnh dẫn đến tỷ lệ tử vong cao và cũng là một trong những bệnh có chi phí điều trị cao [53]. Hàng năm có hàng triệu bệnh nhân chết do bệnh lý về gan trên toàn thế giới [54]. Sử dụng TBG để chữa trị bệnh gan đã được chứng minh có lợi trong hầu hết các trạng thái bệnh về gan. Các nghiên cứu khoa học cho thấy vai trò của TBG trong điều trị và chữa khỏi các bệnh khác nhau như xơ gan, xơ gan mất bù [55], bệnh di truyền liên quan đến gan [56], bệnh ung thư gan [53]. Bởi vì TBG có khả năng biệt hóa tạo thành bất kỳ loại mô, tế bào nào trong cơ thể, do đó nó có tiềm năng rất lớn trong điều trị bệnh khác nhau. Liệu pháp TBG có thể được coi như là một liệu pháp thay thế cho ghép gan, vì nó có tiềm năng to lớn

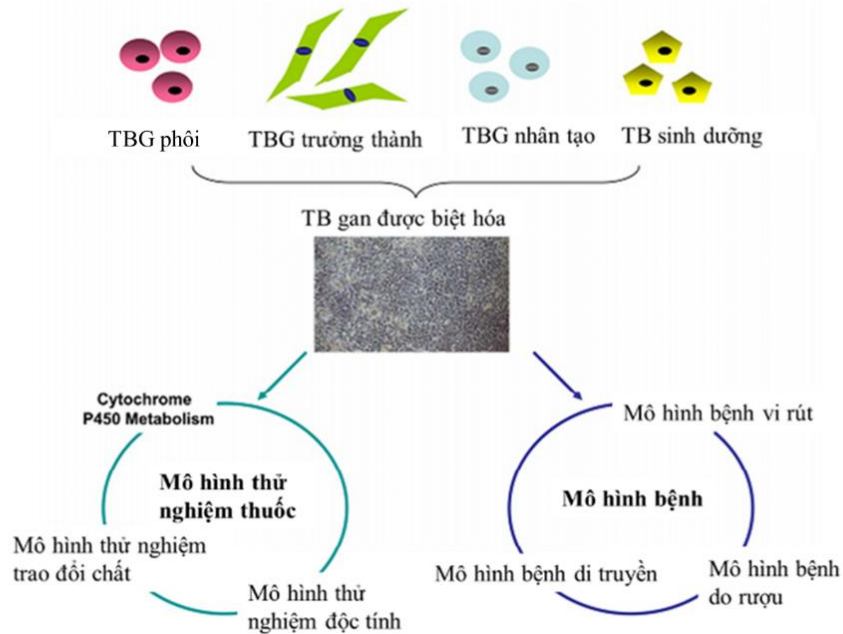
trong phục hồi bệnh suy gan. Liệu pháp TBG có thể được thực hiện ghép TBG trực tiếp hoặc qua một hoặc hai bước trung gian bằng cách biệt hóa định hướng tế bào chức năng *in vitro* [53].

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. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã sử dụng TBG màng dây rốn được phân lập và nhân nuôi trong môi trường *in vitro* và tiến hành biệt hóa tạo thành tế bào có chức năng của tế bào gan. Các tế bào được cấy ghép cho chuột mô hình với bệnh gan đặc trưng, sau đó tiến hành theo dõi đánh giá chuột sau cấy ghép. Kết quả cho thấy, tế bào đã khu trú vào khu vực gan chuột bị bệnh và quá trình cấy ghép tế bào đã góp phần vào phục hồi chức năng của chuột thí nghiệm. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, kết quả ghép TBG màng dây rốn cho hiệu quả tương tự ghép tế bào gan tươi [43].

Để tìm giải pháp điều trị các bệnh liên quan đến gan, một số mô hình đã được phát triển để dự báo khả năng bị tổn thương gan ở người [57]. Tế bào gan tươi được phân lập từ người hiến được công nhận là "tiêu chuẩn vàng" để đánh giá quá trình chuyển hóa trao đổi chất trong gan và độc tính của thuốc [58]. Tế bào gan tươi thể hiện rất nhiều các enzyme chuyển hóa khi thử nghiệm các loại thuốc trong nhiều ngày nuôi cấy mô sau phân lập. Tuy nhiên, biểu hiện enzyme giảm đi rõ rệt trong quá trình nuôi cấy tế bào, nguyên nhân có thể do tế bào nuôi *in vitro* không thể đáp ứng được các phản ứng sinh học ngày càng phức tạp. Ngoài sự không ổn định, tế bào gan tươi khó có thể sử dụng rộng rãi được vì khan hiếm nguồn cung tế bào có chất lượng [42].

Ngược lại với tế bào gan tươi, các tế bào ung thư gan có khả năng nhân nuôi tăng sinh để duy trì, giá thành rẻ và dễ dàng để xử lý [59]. Tuy nhiên, ngoài những lợi thế trên, do sự thiếu hụt một số con đường tín hiệu tế bào quan trọng nên kiểu hình tế bào ung thư thường không biểu hiện chính xác kiểu hình như tế bào gan bình thường [60]. Ví dụ, các tế bào Huh7.5 được sử dụng để nghiên cứu virus viêm gan C (HCV) có khả năng nhân rộng nhưng không lý tưởng để nghiên cứu sự tương tác với virus tế bào chủ do khiếm khuyết trong con đường gen 1 cảm ứng retinoic [61]. Ngoài ra, các dòng tế bào ung thư gan hạn chế hiển thị năng lực trao đổi chất trong với một số loại thuốc do biểu hiện gen *Cytochrome P450 (CYP)* kém. Với sự ra đời của công nghệ TBG đa năng, hiện nay các dòng tế bào gan có nguồn gốc di truyền

rõ ràng có thể sản xuất ở mức độ đáp ứng được nhu cầu của các nghiên cứu thử nghiệm. Đây là hướng nghiên cứu có tiềm năng mang tính cách mạng cho y học hiện đại của TBG được khai thác phục vụ nghiên cứu bệnh và thử nghiệm các loại thuốc mới [60].



Hình 1.7. Mô hình sử dụng tế bào gan biệt hóa từ tế bào gốc [59]

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. Một yếu tố quan trọng đối với các dòng tế bào biệt hóa sản xuất thương mại là chúng sẽ được định hướng cho việc sử dụng để kiểm soát chất lượng thuốc và các xét nghiệm sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học và thử nghiệm độc tính của các hoạt chất cụ thể [62]. Chi phí của một đĩa 24 hoặc 96 giếng chứa tế bào khoảng 2500 USD đối với đơn đặt hàng của các nhà nghiên cứu Hàn Quốc từ các nhà cung cấp từ của Mỹ, và có thể mất 3-6 tháng để nhận được đĩa tế bào gan biệt hóa theo yêu cầu đang nuôi trên đĩa mô hình thử nghiệm [60]. Thông tin về quá trình đánh giá gen biểu hiện, chuyển hóa enzyme hoặc khả năng kháng thuốc của các dòng tế bào gan biệt hóa không được cung cấp rõ ràng, do đó việc sử dụng các tế bào có sẵn trên thị trường thường bị bó hẹp, thiếu linh hoạt và thay đổi mục đích sử dụng các dòng tế bào đặt hàng thường gặp khó khăn. Theo thông tin từ Cellular Dynamics International (CDI), tổ chức được thành

lập bởi James Thomson, báo cáo rằng dòng tế bào gan iCell® của họ biểu hiện 1936 vị trí hấp thụ, phân bố, chuyên hóa, và đánh dấu bằng hơn 200 gen chỉ thị, trong đó bao gồm tất cả các gen được giám sát của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA). Tuy nhiên các gen biểu hiện đặc trưng của dòng tế bào lại không được báo cáo. Do đó, vào thời điểm này, việc sử dụng tế bào gan biệt hóa để dự đoán và sàng lọc các độc tố của các loại thuốc mới được sử dụng song song với các dòng tế bào gan người [60].

Hiện nay, Công ty Takara Bio Europe AB mua Cellectis Europe vào năm 2014 và Fujifilm Holdings Corp mua CDI-Mỹ, do đó các công ty Nhật Bản (ReproCell, Takara Bio Inc, và Fujifilm Holdings Corp) thực hiện đầy đủ các nhu cầu cung cấp tế bào gan biệt hóa ở châu Á, Mỹ và châu Âu [62]. Nói chung, mang một loại thuốc mới ra thị trường chi phí khoảng 800 triệu USD với khoảng 10% thị trường tăng trưởng mỗi năm. Công ty dược phẩm đầu tư khoảng 1,5 tỷ USD để phát triển một loại thuốc mới, và nó thường mất 10-15 năm trước khi thuốc của họ được đưa ra thị trường; 9 trong số 10 loại thuốc ở giai đoạn lâm sàng sẽ không vượt qua kiểm soát chất lượng trước khi ra thị trường [63]. Khoảng 20% các loại thuốc được lưu hành mà không qua bất kỳ thử nghiệm nào trên tế bào gan hoặc thử nghiệm độc tính với tim trong thời gian thử nghiệm tiền lâm sàng [64]. Cuối cùng, khoảng 5% các loại thuốc ứng cử viên trong quá trình phát triển có thể trở thành sản phẩm được cấp phép [65]. Nghiên cứu và chi phí phát triển cao đang dẫn đến giá thuốc cao, vì vậy điều quan trọng để phát triển các phương pháp để tối ưu hóa sự biệt hóa thành thực chức năng của tế bào gan biệt hóa là hướng nghiên cứu được nhiều phòng thí nghiệm nổi tiếng trên thế giới quan tâm. Đồng thời, chúng ta nên mở rộng kiến thức về cơ chế biệt hóa và những sai khác giữa các dòng tế bào gan biệt hóa và các dòng tế bào gan phân lập từ người sử dụng trong điều kiện *in-vitro* và *in vivo*, cũng như ứng dụng lâm sàng.

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. Sau đó họ nhận thấy các mạch máu của TBG người kết nối được với các mạch máu

trên cơ thể chuột thí nghiệm, và bắt đầu thực hiện nhiều chức năng của các tế bào gan ở người trưởng thành [66].

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. Kết quả nghiên cứu được công bố trên tạp chí Nature Biotechnology. Thành công này có thể thúc đẩy một loạt nghiên cứu và ứng dụng liên quan đến gan, từ nghiên cứu độc tính thuốc đến việc tạo ra gan sinh học nhân tạo hỗ trợ cho bệnh nhân chờ ghép. Đáng tiếc là trong khi gan có thể tái sinh nhanh chóng trong cơ thể, thì khả năng này nhanh chóng mất đi khi các tế bào gan được lấy khỏi cơ thể. Đến nay, những nỗ lực để tăng sinh tế bào gan người trong phòng thí nghiệm đã tạo ra các tế bào ung thư bất tử có chức năng chuyển hóa kém. Nguồn cung cấp tế bào gan người khá hiếm hoi và rất khó để tăng sinh chúng mà không làm mất chức năng. Đây là một trở ngại lớn cho phát triển khoa học, lâm sàng và dược phẩm. Cần có các nghiên cứu tiếp theo giải quyết vấn đề này [67].

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. Những tế bào ngoại vi biểu hiện chỉ thị *Tbx3* (*T-box 3*), là lưỡng bội, và do đó khác với tế bào gan trưởng thành, mà chủ yếu là đa bội. Các tế bào con cháu của các tế bào *Tbx3* biệt hóa thành tế bào gan đa bội có thể thay thế tất cả các tế bào gan dọc theo gan trong quá trình đổi mới cân bằng nội môi (Biological homeostasis). Quần thể của các TBG gan được duy trì bởi các tín hiệu *Wnt* (các gen cấu trúc liên quan mã hóa tiết ra các protein truyền tín hiệu) được cung cấp bởi các tế bào nội mô trong tĩnh mạch trung tâm liền kề [68].

Mặc dù đã có nhiều yếu tố làm tác nhân biệt hóa TBGTM thành tế bào gan đã được khảo sát. Cơ chế chính xác của quá trình biệt hóa thành tế bào gan vẫn chưa được hoàn toàn sáng tỏ.

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- β* ... với một hàm lượng và tỷ lệ nhất định tùy thuộc vào mỗi một loại tế bào. Các hóa chất tác động lên tế bào làm tế bào thay đổi sự biểu hiện của gen, hoặc đóng một số gen đang hoạt động và mở một số gen chưa hoạt động.

Những thay đổi này dẫn đến tế bào biến đổi theo chiều hướng phù hợp với kích thích, và sẽ tạo thành một kiểu tế bào chuyên biệt nào đó. Ngoài ra, các nhân tố tăng trưởng thu nhận từ các dịch mô cũng được xem là chất biệt hóa định hướng [69].

Tác dụng DMSO đã được đánh giá là một yếu tố có khả năng biệt hóa TBG thành tế bào gan. Tuy nhiên, việc sử dụng DMSO vẫn có những khác biệt trong một số nghiên cứu. Đối với TBG phôi, theo Pal và cộng sự (2012), hình thái tế bào có thể thay đổi đáng kể và một số gen đặc trưng của tế bào gan được biểu hiện khi tiến hành sử dụng DMSO như một tác nhân biệt hóa [70]. Điều đáng chú ý là khi sử dụng kết hợp DMSO với một số yếu tố phiên mã thì sau 21 ngày xử lý thì một số chỉ thị đặc trưng của tế bào gan đã biểu hiện [71]. Tuy nhiên cho đến nay vẫn còn thiếu một phương thức đạt hiệu thích hợp nhất trong việc sử dụng DMSO như là một tác nhân để biệt hóa thành tế bào gan từ TBG cuống rốn.

c. Biệt hóa bằng các chất nền

Biệt hóa bằng các chất nền dựa vào sự tương tác giữa tế bào và chất nền trong nuôi cấy tế bào *in vitro*. 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. Mỗi mô khác nhau có thành phần ECM của riêng nó. Do đó, việc bổ sung ECM thích hợp vào nuôi cấy *in vitro* giúp các TBG có thể biệt hóa thành các tế bào mong muốn [72].

Trong phát triển gan, một số yếu tố tăng trưởng (Grow Factor – GF) và các thành phần của chất nền ngoại bào ECM dẫn đến sự biệt hóa của tế bào nhu mô gan. Nhóm nghiên cứu của Suzuki và cộng sự đã tiến hành các thí nghiệm để kiểm tra tác động trực tiếp của GF và ECM trong biệt hóa TBG thành tế bào gan. Kết quả cho thấy các yếu tố tăng trưởng tế bào gan gây ra quá trình chuyển đổi albumin (*ALB*), biệt hóa TBG thành tế bào tiền thân gan. Sau đó oncostatin M (OSM) đẩy mạnh sự biệt hóa để tryptophan 2-3 dioxygenase (TO) biểu hiện trong tế bào gan trưởng thành. Trong quá trình chuyển đổi này, ECM là cần thiết để biệt hóa các TBG và tiền chất, nhưng hiệu ứng của chúng chỉ là hỗ trợ [73].

Chất nền ngoại bào ECM qua trung gian sự khác biệt biệt hóa TBG phôi người thành các tế bào beta tuyến tụy, đã thu được các tế bào chức năng mà tiết ra insulin đáp ứng glucose trong mô hình chuột bị tiểu đường. Tuy nhiên chưa sáng tỏ những

tín hiệu sinh hóa và cơ chế dẫn đến sự biệt hóa [74].

Tương tác giữa TBG và chất nền ngoại bào ECM là điều kiện tiên quyết để gây ra biệt hóa tạo dòng tế bào cụ thể và duy trì chức năng sinh học của các TBGTM bằng cách cung cấp một tập hợp các chất hóa học và các tín hiệu cấu trúc. Các tế bào trung mô tủy xương được nuôi cấy trên hệ thống ECM cho thấy một hình dạng trục có khả năng tăng sinh mạnh mẽ và một mức độ ức chế của các loại oxy phản ứng trong tế bào. Những kết quả này chứng minh rằng ECM có thể là một phương pháp hiệu quả để tạo thuận lợi cho sự trưởng thành của gan.

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

Nguồn tế bào gan biệt hóa từ các TBG cảm ứng hoặc TBGTM, nguồn TBG hiện diện trong các mô dễ tiếp cận như mô mỡ, máu và tủy xương. Chúng có các đặc tính giống như TBG, có khả năng tự đổi mới và đa dạng hóa, bao gồm cả các tế bào gan biệt hóa *in vitro* [75]. Trong hầu hết các phương pháp biệt hóa, TBGTM có thể được định hướng biệt hóa thành tế bào có chức năng 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 [76].

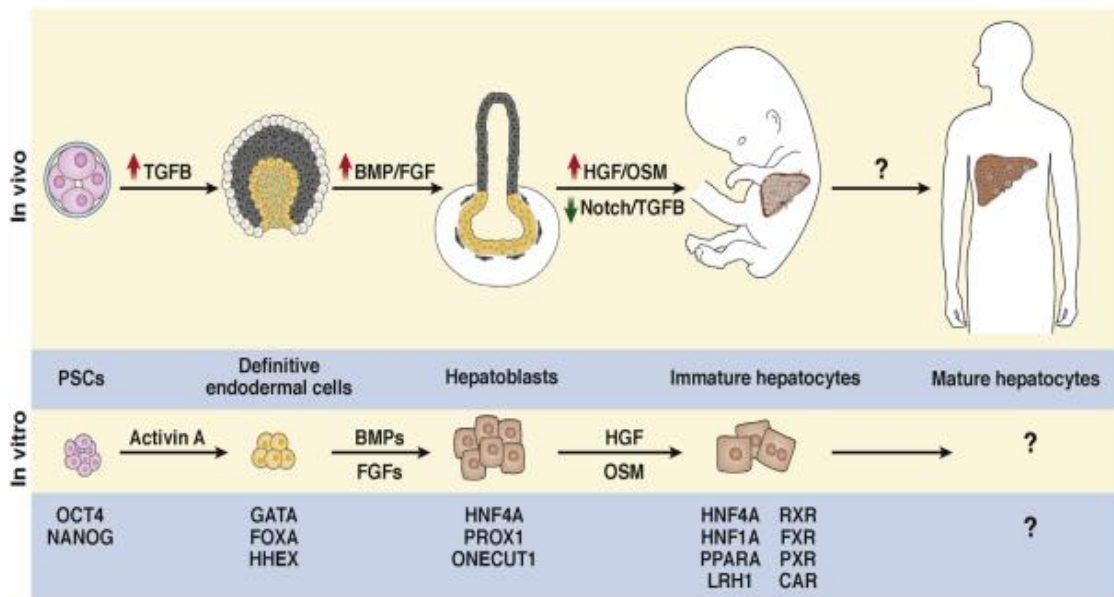
Trong điều kiện *in vitro*, các tác nhân trong trường hợp tế bào được biệt hóa bởi các cytokine chẳng hạn như yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF), OSM, yếu tố tăng trưởng biến đổi (TGF), yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF), bFGF, yếu tố ức chế bạch cầu (LIF) và protein hình thái xương (BMP), có thể hoạt hóa tế bào để biệt hóa TBGTM thành tế bào gan [77]. Vì các loại cytokine và các hợp chất hóa học đã cho thấy những tác động nhất định đối với sự biệt hóa của TBGTM, một số cơ chế của cytokine và sự kết hợp các giao thức của cytokine đã được khám phá, trong khi những loại khác vẫn chưa rõ ràng [78].

Yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) đóng vai trò là tín hiệu khởi đầu của quá trình tái tạo gan, HGF liên quan đến sự phát triển nội tiết trong quá trình phát triển phôi thai [77].

Oncostatin M (OSM) là thành viên phân họ của IL-6, OSM hạn chế hoạt động của các tế bào u ác tính A375 và có khả năng kích thích sự trưởng thành của các tế bào nhu mô gan và chấm dứt chức năng gan phôi thai.

Yếu tố ức chế bạch cầu (LIF) là một thành viên khác của IL-6, liên quan đến việc thu nhận các đặc điểm tế bào gan trong quá trình biệt hóa từ tế bào trung mô tủy xương như protein và biểu hiện gen của các dấu hiệu gan. Protein hình thái xương được xác nhận là có liên quan đến sự điều hòa tế bào của sự tăng trưởng, sinh sản, biệt hóa và apoptosis của tế bào gan. Một thành phần khác là *BMP-2,7* đóng vai trò quan trọng trong việc giúp TBGTM tạo ra các yếu tố phiên mã như *Runx-2* và *Osterix* [78].

Một hợp chất hóa học quan trọng là dexamethasone (DEX), tạo ra sự biểu hiện của yếu tố hạt nhân 4 và CCAAT chất tăng cường protein alpha, hai yếu tố này thuộc về yếu tố hạt nhân tế bào gan và là yếu tố phiên mã quan trọng giúp tế bào biệt hóa thành tế bào có chức năng gan [78]. Sự biểu hiện của các phân tử ức chế tăng trưởng tế bào gan như thụ thể chemokine *CXC*, cyclooxygenase 2 và yếu tố gây thiếu oxy bị ức chế bởi DEX. Quá trình hoạt hóa TBGTM bước vào con đường biệt hóa tạo thành tế bào gan được mô tả ở hình 1.11. Một số phân tử nhỏ có thể thúc đẩy sự biệt hóa của TBGTM thành tế bào giống tế bào gan được hoạt hóa bởi các chất có cấu trúc phân tử nhỏ, các cytokine. Sau đó, các chất như HGF, và OSM..... tiếp tục thúc đẩy quá trình thành thực tế bào gan. Cuối cùng các thành phần như DAPT và A8301 ngăn chặn sự biệt hóa của tế bào tiền thân gan thành các tế bào chức năng gan [79].



Hình 1.8. Các phân tử nhỏ tạo tế bào có chức năng gan hoặc thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào giống với tế bào gan [78]

Trong số tất cả các cytokine và các yếu tố tăng trưởng này, HGF, EGF, TGF và aFGF là những cytokine được sử dụng nhiều nhất để nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào gan. Tuy nhiên, HGF được xem là cytokine quan trọng cho quá trình biệt hóa trong giai đoạn phát triển sớm của TBGTM người thành tế bào gan [75]. Các loài khác nhau, nguồn phân lập khác nhau của TBGTM cũng được đánh giá là tiếp nhận các tín hiệu biệt hóa khác nhau [80]. Việc kích thích cytokine tối ưu, liều lượng, thời gian và sự kết hợp để có hiệu quả biệt hóa cao nhất từ các TBGTM nên được tổ chức khảo sát theo các nguồn và loại TBG (như TBG phôi, TBGTM tủy xương hoặc TBG gan) [75]. Hiện nay công thức các yếu tố tăng trưởng cytokine/tăng trưởng tối ưu được kết hợp nhau tạo ra tế bào gan vẫn còn ở giai đoạn phát triển chưa hoàn thiện [79].

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

Khi thực hiện đồng nuôi cấy, TBG và tế bào đã biệt hóa tương tác mật thiết với nhau, dẫn đến sự truyền các tín hiệu phân tử một cách hiệu quả gây ra sự biệt hóa ở TBG [72]. Nhóm nghiên cứu của Stecklum đã sử dụng TBG máu cuống rốn đồng nuôi cấy với tế bào alpha gan chuột AML12 [81]. So sánh hiệu quả mẫu mô tế bào bằng cách tương tác tế bào trực tiếp hoặc bởi các yếu tố hòa tan (soluble factors) trong tế bào gan. Nhóm nghiên cứu đã bắt chước *in vitro* cấy ghép tiền lâm sàng sử dụng tế bào của con người trong chuột. Kết quả không có sự thay đổi lớn trong tế bào như các hình thái tế bào ngoại trừ có sự hiện diện cao hơn một số cấu trúc quan sát. Đồng nuôi cấy dẫn đến sự biệt hóa, tăng biểu hiện của *SOX17*, *Cx32* và *Cx43*, cũng như *CK8* biểu mô và *CM19*. Nhóm tác giả cũng chỉ ra rằng để từng bước nghiên cứu cảm ứng biệt hóa tế bào có thể sử dụng phương pháp đồng nuôi cấy [81].

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.

Một số nghiên cứu biệt hóa các TBG cuống rốn thành tế bào gan đã mở ra hy vọng cho hàng trăm triệu bệnh nhân xơ gan và ung thư gan [82], [83]. Đã có công bố biệt hóa thành tế bào gan từ TBGTM phân lập từ cuống rốn do Ren và cộng sự tiến hành (2010) [39], [84]. Mặc dù vậy, vẫn còn có nhiều điều chưa rõ về cơ chế

biệt hóa thành tế bào gan từ TBGTM cuống rốn. Gen *HNF4 α* là một trong số các yếu tố phiên mã đang được tập trung nghiên cứu bên cạnh việc thay đổi môi trường biệt hóa sử dụng một số tác nhân như yếu tố sinh trưởng như FGF (Fibroblast Growth Factor) hoặc DEX,...

Hầu hết trong cơ thể động vật, từ động vật biển cho đến cơ thể người đều tìm thấy *HNF4*, đây là một trong những receptor có tính bảo thủ rất cao trong nhân tế bào [85], [86]. Trong tuyến tụy, ruột kết, ruột non, gan, thận đều thấy biểu hiện Protein *HNF4 α* , tuy nhiên biểu hiện của protein này chiếm đa số trong gan [87]. Khoảng 100 gen trong đó có hepatocyte factor 1-alpha, một yếu tố phiên mã điều hòa sự biểu hiện của một gen liên quan đến gan được biểu hiện do sự kiểm soát của Protein được mã hóa bởi gen *HNF-4 α* . Trong sự phát triển của gan, thận và tuyến ruột, một trong những gen đóng vai trò quan trọng được biết đến là gen *HNF-4 α* . Trong quá trình định hướng biệt hóa thành tế bào gan, Gen *HNF-4 α* đã được chứng minh có thể hoạt động như một gen chi phối trong các tác nhân phiên mã [6].

Một số nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện quá mức của *HNF4 α* trong hệ thống nuôi cấy TBG có thể đảm bảo cho sự cảm ứng biệt hóa thành tế bào gan và các chức năng của tế bào giống như tế bào gan. Nhờ đó, các tế bào có biểu hiện tổng hợp *HNF4 α* sẽ kích hoạt các gen đặc hiệu định hướng tế bào gan khác và tăng cường trạng thái biệt hóa của TBGTM [88]. Tuy nhiên, chưa có công bố chính thức nào về việc ứng dụng tác nhân *HNF4 α* để biệt hóa TBG cuống rốn thành tế bào gan cho đến nay.

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. Nhóm tác giả đã chứng minh tế bào gốc từ màng cuống rốn có khả năng biệt hóa thành tế bào có chức năng gan, cụ thể tế bào sau biệt hóa biểu hiện các chỉ thị ALB, AFP, CK18, CK19 và có khả năng dự trữ glycogen sau 21 ngày. Tuy nhiên, sự lựa chọn các yếu tố bổ sung vào môi trường và thời gian cảm ứng cần được xem xét để tăng hiệu quả biệt hóa [89].

Năm 2014, Nguyễn Thị Kim Nguyễn và cộng sự khảo sát khả năng biệt hóa của TBGTM bằng cách bổ sung hóa chất vào môi trường biệt hóa, nhóm nghiên cứu

đã biệt hóa được tế bào giống tế bào gan *in vitro* từ TBG thu nhận từ mô mỡ (Adipose-Derived Stem Cells-ADSCs). Kết quả là tế bào giống tế bào gan với những biểu hiện giống tế bào nhu mô gan về mặt hình thái có thể được biệt hóa từ ADSCs, ngoài ra các tế bào này cũng có khả năng dự trữ glycogen và biểu hiện các gen: *CK18*, *CK19*, albumin, α -fetoprotein khác biệt so với nhóm đối chứng [90].

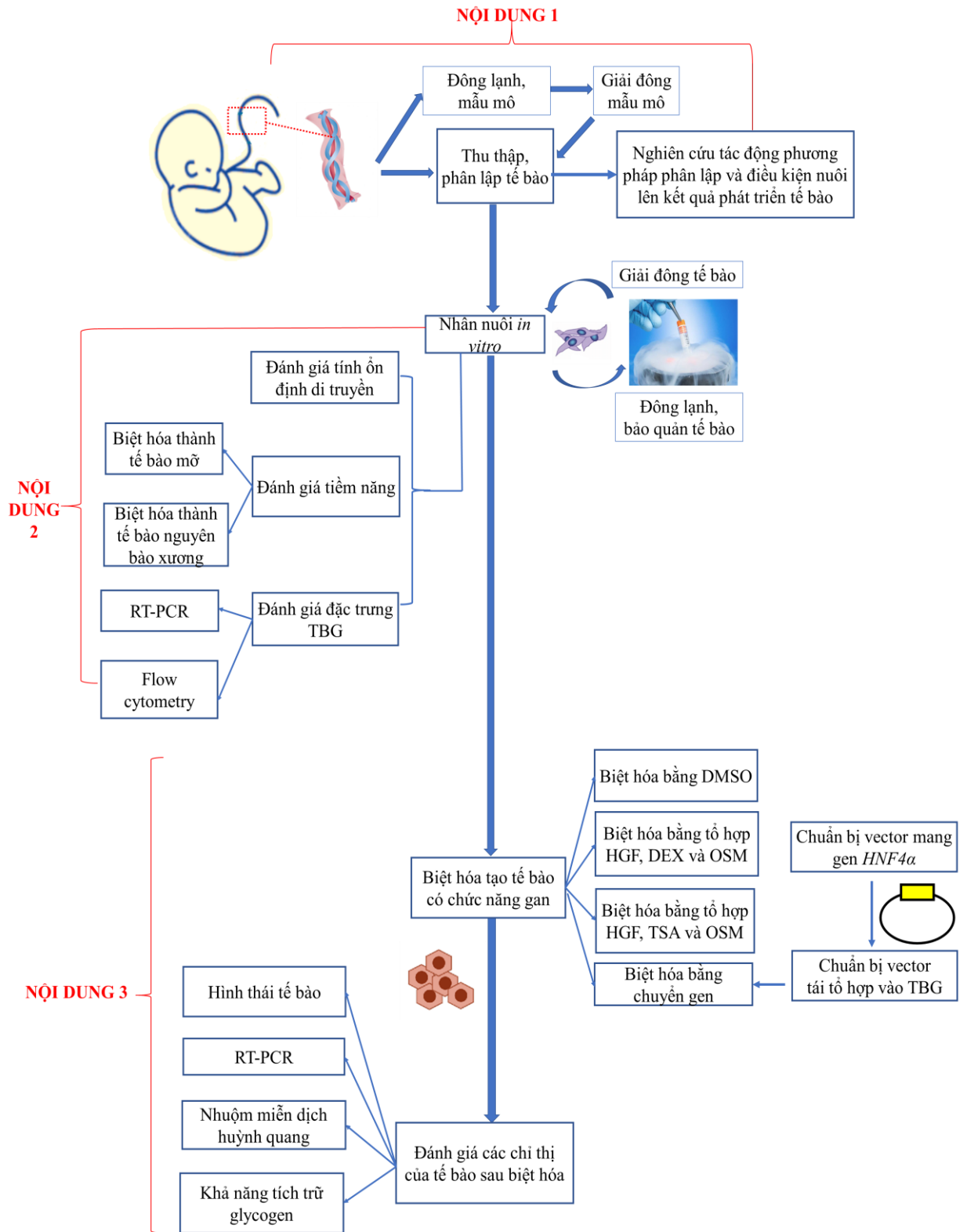
Năm 2015, Trương Thị Hải Nhung cùng nhóm nghiên cứu tại Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu điều trị thực nghiệm bệnh xơ gan trên mô hình chuột bị xơ gan sử dụng liệu pháp TBG. TBGTM được phân lập và tăng sinh từ mô mỡ chuột, sau đó được cảm ứng và biệt hóa thành tế bào gan bằng hóa chất và dịch chiết tế bào gan. Kết quả cho thấy, TBGTM phân lập từ mô mỡ chuột có khả năng biệt hóa thành tế bào giống tế bào gan, sử dụng TBGTM với liều 5×10^5 tế bào/con cho hiệu quả điều trị xơ gan trên chuột [91]. 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. Sau 12 ngày điều trị, so với nhóm đối chứng tiêm PBS, chuột tiêm TBGTM có tỷ lệ sống cao (100%), giảm tổn thương gan, giảm diện tích xơ gan thông qua diện tích hoại tử trung bình là 7,529%, sự tích lũy collagen trong gan trung bình là 1,968% và tỷ lệ dương tính của protein α -SMA là 1,427% [92].

Trong nghiên cứu lâm sàng, năm 2021, nhóm tác giả Đào Trường Giang tại học viện quân y cùng các bác sĩ bệnh viện Trung ương quân đội 108 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 ở 29 bệnh nhân và điều trị phác đồ chung cho bệnh nhân xơ gan. Thu thập 300ml dịch tủy xương, sau đó lọc khối tế bào đơn nhân, truyền vào qua qua động mạch gan. Các bệnh nhân được theo dõi trong 12 tháng và đánh giá kết quả dựa trên xét nghiệm cận lâm sàng và thang điểm theo dõi tình trạng xơ gan (Child- Pugh, MELD) tại thời điểm 6 và 12 tháng. Kết quả ghép tế bào gốc ở bệnh nhân xơ gan bước đầu cải thiện chức năng gan, điểm Child- Pugh, có thể mang lại hiệu quả ở bệnh nhân xơ gan mất bù do virus viêm gan B. Tuy nhiên vẫn cần những nghiên cứu sâu hơn để cân bằng hiệu quả sự an toàn với sự đổi mới của nghiên cứu cấy ghép tế bào gốc nhằm điều trị hiệu quả bệnh gan giai đoạn cuối [93].

Với những ưu điểm của tế bào gốc trung mô cuống rốn mang lại và những lợi thế của hệ thống Tet-On so với các hệ thống biểu hiện gen được điều hòa khác. Đề tài nghiên cứu này của chúng tôi sẽ 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. Đồng thời đề tài là nghiên cứu đầu tiên biểu hiện quá mức gen *HNF4 α* bằng việc sử dụng hệ thống Tet-ON để biệt hóa TBGTM cuống rốn thành tế bào biểu hiện một số đặc trưng của tế bào gan. Kết quả của đề tài sẽ góp phần cung cấp thông tin về khả năng biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan để từ đó có thể ứng dụng kết quả vào hướng tạo tế bào gan, thử nghiệm dược phẩm cũng như mở rộng nghiên cứu ở mức độ cao hơn về cơ chế của quá trình biệt hóa này, để sử dụng trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*, cũng như ứng dụng lâm sàng.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu

2.2.1. Mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu trong luận án thực hiện dưới sự hỗ trợ từ đề tài “Nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào chức năng gan từ tế bào gốc người và chuột” - đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số: VAST.ĐL.03/16-17 đã nghiệm thu do TS. Nguyễn Văn Hạnh chủ trì, cam kết thực hiện đúng nguyên tắc về đạo đức trong 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 (phụ lục 1). Người hiến tặng được giải thích rõ ràng về mục đích sử dụng của mẫu vật và việc quản lý, sử dụng các mẫu vật đảm bảo tuân theo các quy định về y đức trong bản cung cấp thông tin nghiên cứu (phụ lục 2). Danh sách cá nhân tình nguyện tham gia nghiên cứu (phụ lục 3) tuân thủ theo nguyên tắc bảo mật được thể hiện trong bảng cung cấp thông tin nghiên cứu.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu trong luận án được thực hiện tại 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

Hóa chất: PBS (pH 7,4, Gibco, 15374875), DMEM/F12 (Gibco, 10565018), DMEM low glucose (Sigma, D5523), FBS (Sigma, F4135), FBS (Pan Biotech, P30-1302), BSA (Fatty acid free, Sigma, A8806) bFGF (Sigma, F3685), hEGF (E9644), HGF (Sigma, H9661), L- glutamin (Sigma, G7513), Insulin-transferrin-selenium (ITS-G, Gibco, 41400045), Penicillin/ Streptomycin (Sigma, P4333); Streptomycin sulfate (Sigma S-9137), Penicillin-G (Sigma P-3032), Amphotericin (Sigma, PHR1662), Doxycycline (Biobasic, DB0889), Ciprofloxacin (Sigma, 17850), DMSO (Sigma, D2650), Colchicine ($\geq 95\%$ HPLC, Sigma, C9574), Oil Red O (Merck, 1052300025), Alizarin Red (Sigma, A5533), L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) (Sigma, A8960), β - glycerolphosphate (Sigma, G9422), Dexamethasone (D4902),

Oncostatin M (209aa, Sigma, SRP3130), Trichostantine A (Sigma, T8552), Trypsin EDTA (0,25%, phenol red, Gibco, 25200056), Nước (nuclease free, Sigma, W4502), CO₂ (Messer, R744), Hoechst 33342 (Sigma 14533), Hematoxylin (Mayer's, Sigma, MHS16), pTRE-tight-BI (Clontech, 631067), pTet-DualON (Clontech, 631112), *NsiI* (New England Biolabs, R0127S), *PacI* (New England Biolabs, R0547S), T4 DNA ligase (New England Biolabs, M0202S), LB broth powder (Bio Basic, SD7002).

Các bộ kit sử dụng: RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74104), QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 28704), QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, 210212), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, K0502), Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen, A12621), MSC phenotyping kit (Miltenyi Biotec, 130-125-285), kit nhuộm miễn dịch huỳnh quang (Santa Cruz Biotechnology, INC), Periodic Acid-Schiff kit (Sigma, 395B).

2.2.4. Thiết bị nghiên cứu

Các thiết bị nghiên cứu được trình bày trong Phụ lục 4.

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

Các môi trường phân lập, nuôi cấy TBGTM cuống rốn, môi trường đông lạnh tế bào, môi trường biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan được trình bày trong Phụ lục 5.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

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

Mẫu cuống rốn được thu nhận ngay sau khi em bé được sinh ra, dung dịch bảo quản được sử dụng là dung dịch PBS có chứa 100 IU/mL penicilin, 100 mg/mL streptomycin (Sigma) và 0,25 mg/mL amphotericin (Sigma). Mẫu thu thập bảo quản ở 4°C và được vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm, sau đó tiến hành các nghiên cứu trong vòng 4 giờ.

Đầu tiên, sử dụng dung dịch PBS có bổ sung kháng sinh rửa mẫu cuống rốn 2-3 lần. Sau đó cắt mẫu cuống rốn thành từng đoạn dài khoảng 2-4 cm. Tiến hành tách bỏ thành mạch (tĩnh mạch, động mạch) của dây rốn rồi tiếp tục cắt các đoạn cuống rốn này thành từng miếng nhỏ. Cắt các đoạn mô cuống rốn thành các mảnh mô nhỏ có kích thước 1-2 mm³, sau đó chuyển các mảnh mô này vào đĩa nuôi cấy mô 4 giếng (NUNC Ø15, diện tích nuôi cấy 1,9 cm²/giếng), mật độ mảnh mô khoảng 5-8 mảnh mô/giếng, để riêng biệt cho từng loại.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường DMEM/F12 (GIBCO) có bổ sung 15% FBS, 10 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF, 1X insulin-transferrin-selenium (ITS), 2 mM L-glutamine, (Sigma, Hoa Kỳ). Cho 500 μ l môi trường nuôi cấy vào mỗi giếng Nunc đĩa 4 giếng.

Các mẫu mô cuống rốn được nuôi cấy trong tủ ẩm ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, cứ 3 ngày thì thay môi trường nuôi cấy. Khi khoảng 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy được tế bào lan phủ, thì tiến hành xử lý cấy chuyển bằng Trypsin/EDTA 0,25% (Sigma, Hoa Kỳ), gieo lại tế bào vào đĩa nuôi theo tỷ lệ 1 thành 3 với mật độ 50.000 tế bào/ml để duy trì tế bào.

2.3.2. Phương pháp cấy chuyển tế bào

Đầu tiên, tiến hành hút bỏ môi trường cũ, dùng dung dịch PBS 1X (2mL) rửa mẫu 2 lần. Sử dụng 0,5 mL Trypsin EDTA 0,25% (Gibco, Mỹ) để tách tế bào ra khỏi bề mặt đĩa, sau đó ủ trong tủ nuôi cấy 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 5 phút. Tiếp theo để bất hoạt Trypsin, bổ sung 0,5 mL môi trường nuôi để trung hòa Trypsin, tiến hành ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 25°C để thu tế bào. Hòa tan cặn bằng môi trường nuôi cấy (DMEM/F12), sau đó chia đều huyền phù tế bào (nồng độ khoảng 50.000 tế bào/ml) sang các đĩa nuôi cấy mới. Thêm cho đủ 2 mL môi trường nuôi cấy ở mỗi đĩa.

2.3.3. Phương pháp đông lạnh và giải đông tế bào

Tế bào được đông lạnh bằng cách sử dụng DMEM/F12 + 10% DMSO là môi trường đông lạnh. Các tế bào sau khi thu bằng cách xử lý với Trypsin EDTA 0,25% (Gibco, Mỹ) như trên được đưa vào môi trường đông lạnh. Các cọng rạ đông lạnh chứa tế bào được giảm nhiệt độ dần bằng cách giữ ở 4°C trong 30 phút, 0°C trong 60 phút, -20°C trong 20-30 phút, sau đó được bảo quản trong bình chứa Nitơ lỏng -196°C. Để đông lạnh mẫu mô, tiến hành giảm nhiệt độ bằng cách đưa các ống cryotube chứa mẫu mô vào trong tủ -80°C để qua đêm, sau đó cũng được bảo quản trong bình chứa Nitơ lỏng -196°C [94].

Để giải đông tế bào: đầu tiên cọng rạ đông lạnh chứa 150 μ L tế bào được lấy ra khỏi bình Nitơ lỏng, ngâm trong nước 37°C trong khoảng 30 giây, cắt hai đầu cọng và chuyển tế bào sang eppendorf 1,5 ml, bổ sung 1,5 mL môi trường DMEM/F12 trộn đều mẫu bằng pipette, ly tâm thu tế bào với tốc độ 3000 vòng/phút, bỏ dịch và thu tủa

cặn tế bào. Sau đó bổ sung môi trường 1,5 ml môi trường DMEM/F12, hòa tan cụm tế bào rồi gieo đều vào đĩa 4 giếng, nuôi trong tủ 37°C, 5% CO₂ [95]. Để giải đông mẫu mô, sau khi được lấy ra khỏi bình Nitơ lỏng, ngâm ống cryotube trong nước 37°C, bổ sung 1,5 ml môi trường DMEM/F12 trộn đều bằng pipette, sau đó chuyển mảnh mô lên đĩa petri và tiến hành các thao tác phân lập cắt mảnh mô, rồi chuyển vào đĩa nuôi 4 giếng Nunc Ø15 và nhân nuôi tế bào giống mẫu mô tươi như đã mô tả.

2.3.4. Phương pháp nhuộm nhiễm sắc thể

Đĩa 4 giếng nuôi tế bào được bổ sung 5 µL colchicine Stock/1 giếng trong 10 phút ở 39°C (cần lắc nhẹ colchicine trước khi cho vào giếng). Sau đó hút bỏ dịch trên, rửa mẫu bằng 2mL PBS 1X trong 2 lần. Sử dụng 0,5 mL Trypsin EDTA 0,25% (Gibco, Mỹ) bổ sung vào đĩa nuôi cấy, sau đó ủ trong tủ nuôi cấy 37°C, 5% CO₂ khoảng 5 phút, bổ sung 0,5 mL môi trường bất hoạt Trypsin để tách tế bào ra khỏi bề mặt đĩa nuôi. Hút dung dịch và tế bào ra ly tâm 1000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn. Cho vào 9 mL môi trường nhược trương hypotonic, ủ 15 phút ở 37°C. Sau đó hút bỏ môi trường nhược trương. Tiếp theo cho 2 mL môi trường cố định, để 15 phút trong ngăn đá tủ lạnh. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 10 phút, hút bỏ môi trường cũ. Thêm môi trường cố định mới, để 15 phút trong ngăn đá tủ lạnh. Tiếp tục ly tâm 1000 vòng/phút trong 10 phút, hút bỏ môi trường cũ. Cuối cùng, thêm môi trường cố định, hòa tan hết cặn tế bào rồi nhỏ dung dịch chứa tế bào xuống lam kính từ độ cao 50 cm, đây là độ cao phù hợp để tế bào vỡ, giải phóng nhiễm sắc thể ở khoảng cách vừa phải có thể quan sát được, sau đó để mẫu qua đêm. Kiểm tra bằng cách nhuộm Giemsa 5% trong 15 phút, nhiệt độ phòng, quan sát đếm bộ nhiễm sắc thể trên kính hiển vi.

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

2.3.5.1. Phương pháp biệt hóa tế bào mỡ

Tế bào sau khi phát triển kín 60-80% bề mặt đĩa nuôi ở lần cấy chuyển thứ 5-7 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo mỡ: DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh (Sigma), 0,1 µM Dexamethasone 100X (Sigma), 500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin 1000X (IBMX) (Sigma), 200 µM Indomethacin 1000X (Sigma), 1 µM Insuline 100X. Nuôi cấy trong khoảng 21-28 ngày và thay môi trường 2 lần/tuần. Sự biệt hóa được ghi nhận khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 200X thấy có sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ. Các tế bào

tạo mỡ còn được xác định dựa vào phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (Merck) [72].

2.3.5.2. Phương pháp biệt hóa tế bào nguyên bào xương

Tế bào sau khi phát triển kín 60-80% bề mặt đĩa nuôi ở lần cấy chuyển thứ 5-7 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo tế bào nguyên bào xương: DMEM 10% FBS có bổ sung 0,1 μ M Dexamethasone 100X (Sigma), 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) (Sigma) và 10 mM β - glycerolphosphate (Sigma). Nuôi cấy trong khoảng 14-21 ngày và thay môi trường 2 lần/tuần. Sự biệt hoá được đánh giá thông qua khả năng tích tụ của calcium trong chất nền nhờ phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red (Sigma) [72].

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

2.3.6.1. Phương pháp đếm tế bào trong dòng chảy

Việc đánh giá TBGTM được thực hiện bằng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy (flow-cytometry) phân tích sự biểu hiện một số protein bề mặt của tế bào là các dấu ấn cụm biệt hóa CD (cluster of differentiation) đặc trưng cho TBGTM. Các bước thực hiện sử dụng theo kit MSC Phenotyping (Miltenyi Biotec Inc., Mỹ).

Các TBGTM sau khi cấy chuyển tăng sinh được thu nhận bằng cách xử lý với Trypsin EDTA 0,25%. Huyền phù tế bào đơn được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó được chia mỗi loại tế bào trong 2 ống eppendorf và chỉnh về mật độ 1×10^6 tế bào trong 10 μ L để nhuộm với kháng thể hỗn hợp các dấu ấn. Bổ sung 100 μ L dung dịch đệm (PBS+ 0,5% BSA+ 2 mM EDTA) vào mỗi ống. Mật độ tế bào khoảng 1×10^6 /mL được nhuộm với 10 μ L kháng thể tương ứng (10 μ L MSC Phenotyping Cocktail vào ống 1, 10 μ L Isotype Control Cocktail vào ống 2). Mẫu được trộn đều bằng pipet, và ủ ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 10 phút, tránh ánh sáng. Sau đó, các tế bào được rửa bằng cách thêm 1 - 2 mL dung dịch đệm (PBS+ 0,5% BSA+ 2 mM EDTA) và ly tâm 3000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi, bổ sung 500 μ L dung dịch ở trên vào mỗi ống tế bào để đem đi phân tích.

Tất cả các mẫu được phân tích trên máy FACSCalibur và phân tích bằng phần mềm CellQuest Pro (BD Bioscience, Mỹ). Phân tích CD90-FITC được đọc ở kênh FL-2, phân tích CD105-PE được đọc ở kênh FL-3, phân tích CD73-APC được đọc ở kênh FL-6, và các đối chứng âm CD14-/CD20-/CD34-/CD45-PerCP được đọc ở kênh FL-4. Các dấu ấn bề mặt để định danh TBGTM bao gồm: CD73, CD90, và CD105.

2.3.6.2. Phương pháp RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Để đánh giá các đặc trưng của TBGTM cuống rốn của tế bào thu nhận sau nuôi cấy và tính ổn định của các thế hệ tế bào được tạo ra, cụ thể là qua các lần cấy chuyển P5, P10, P15, P20; các chỉ thị phân tử đặc trưng của TBGTM là CD73, CD90, CD105 được chúng tôi sử dụng để đánh giá.

Thu nhận toàn bộ tế bào trên đĩa nuôi và sử dụng bộ kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hà Lan) để tách RNA tổng số thông qua các bước tiến hành làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất như sau:

- Loại bỏ môi trường ban đầu trong đĩa nuôi, sau đó rửa tế bào bằng PBS, và thu tế bào bằng việc xử lý với trypsin EDTA 0,25%. Sau khi các tế bào tách khỏi đĩa nuôi, bổ sung môi trường DMEM/F12, sau đó chuyển toàn bộ sang ống eppdorf 1,5ml. Ly tâm 3000 vòng trong 5 phút. Bỏ dịch nổi.

- Ống eppdorf chứa tế bào sau khi ly tâm được bổ sung 350 μ l đệm RLT và trộn đều bằng pipet. Ly tâm 13000 vòng/ phút trong 3 phút.

- Bổ sung 350 μ l ethanol 70% để tủa RNA bằng cách trộn đều bằng pipet, không ly tâm.

- Chuyển 700 μ l dung dịch trên sang ống eppendorf RNeasy mini spin column (qua cột lọc), ly tâm 13000 vòng trong 15 giây. Bỏ dịch ở dưới cột lọc.

- Rửa bằng cách hút 700 μ l đệm RW1 lên trên cột lọc và ly tâm 13000 vòng/ 15 giây. Sau đó bỏ dịch phía dưới cột lọc.

- Chuyển cột lọc RNeasy column sang ống eppendorf mới. Cho 500 μ l đệm RPE vào cột lọc, và ly tâm 13000 vòng/ 15 giây. Bỏ dịch phía dưới cột lọc.

- Hút tiếp 500 μ l đệm RPE cho vào cột lọc. Ly tâm 13000 vòng/ 2 phút để làm khô màng lọc. Bỏ dịch phía dưới cột lọc.

- Cuối cùng chuyển cột lọc eppdorf 1,5ml mới; và hút 50 μ l RNase-free water nhỏ vào màng cột lọc. Ly tâm 13000 vòng/ 1 phút. Hút dịch trong eppdorf thu được nhỏ lên màng cột lọc, và ly tâm một lần nữa. Dịch thu được chứa RNA tổng số cần thu. Kết quả là 50 μ l RNA tổng số thu được

Bằng những cặp môi đặc hiệu được thiết kế theo Chen và cộng sự 2010 (bảng 2.1), tiến hành chạy RT-PCR để kiểm tra biểu hiện của các chỉ thị phân tử cũng như các chỉ thị đối chứng âm trong tế bào với khuôn là sản phẩm RNA đã thu được ở trên [88].

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng RT-PCR

STT	Thành phần	Thể tích	Nồng độ cuối
1	2X PCR Master Mix	25 μ l	1X
2	Mồi xuôi (10 μ M)	1 μ l	0,4 mM
3	Mồi ngược (10 μ M)	1 μ l	0,4 mM
4	RNA khuôn	1 μ l	1,0 – 2,0 μ g
5	Nước không chứa Rnase	22 μ l	-
	Tổng thể tích	50 μ l	

Bảng 2.2. Trình tự oligonucleotide các mồi được sử dụng để đánh giá đặc trưng TBG và chỉ thị chức năng tế bào gan [88]

Chỉ thị	Mồi xuôi	Mồi ngược
<i>CD34</i>	5'-AAAACGTGTTGCCTTGAACC-3'	5'-AAGCCATGGAGATCAGAGGA-3'
<i>CD73</i>	5'-CCTGCTCAGCTCTGCATAAGTA-3'	5'-CCCTATTTACTGGCCAAGTGT-3'
<i>CD86</i>	5'-TCCTGGCTGAGAGAGGAAGA-3'	5'-AGACTGCCCCATCCCTTAGT-3'
<i>CD90</i>	5'-TTTGGCCCAAGTTTCTAAGG-3'	5'-AGATGCCATAAGCTGTGGTG-3'
<i>CD105</i>	5'-TCCAGCACTGGTGAAGTGAAG-3'	5'-TGTCTCCCCTGCCAGTTAGT-3'
<i>Eras</i>	5'-GCAAGGTCCTGTAGGGAGAA-3'	5'-GCAGCTTTGAAACCCAAAAC-3'
<i>Oct-1</i>	5'-GCAACCCTGTTAGCTTGGTC-3'	5'-CTCTCCTTTGCCCTCACAAAC-3'
<i>GATA4</i>	5'-CCAGAGATTCTGCAACACGA-3'	5'-ATTTTGGAGTGAGGGGTCTG-3'
<i>TAT</i>	5'-TGAGCAGTCTGTCCACTGCCT-3'	5'-ATGTGAATGAGGAGGATCTGAG-3'
<i>HNF4α</i>	5'-ATGGTCAGCGTGAAC-3'	5'-ACTTCCTGCTTGGTG-3'
<i>G6P</i>	5'-GCTGGAGTCCGTGCAGGCATTGC-3'	5'-TAGAGCTGAGGCGGAATGGGAG-3'
<i>ALB</i>	5'-CCAGAAGACACCCTCCAAAGGAC-3'	5'-AACGATGTGGAGTTCACGG-3'
<i>AFP</i>	5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3'	5'-CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA-3'

Các hóa chất chạy RT-PCR được lấy theo bộ kit OneStep RT-PCR Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan) với chu trình nhiệt như sau: 50°C/30 phút; 95°C/3 phút; (95°C/30 giây; 57°C/45 giây; 72°C/1 phút) x 30 chu kỳ; 72°C/10 phút. Tất cả sản phẩm RT-PCR đều được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

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

Số lượng tế bào được đếm bằng cách thu bằng bằng Trypsin EDTA 0,25% trong 3-5 phút, trung hòa bằng DMEM và ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút. Sau đó được nhuộm với Trypan 0,4% và đếm bằng buồng đếm tế bào Neubauer.

Số lượng TB được tính theo công thức: $C = \frac{N}{V}$. Trong đó N: số lượng TB đã đếm được trong buồng đếm; V: thể tích đếm (ml); C: mật độ tế bào (TB/ml). Buồng đếm Neubauer có thể tích $0,1\text{mm}^3 = 1.10^{-4}$ ml do đó công thức tính là: $C = N \times 10^4/\text{ml}$.

Tỷ lệ sống sót của tế bào được tính bằng công thức sau:

$$\text{Tế bào sống (\%)} = \frac{\text{Tổng số tế bào sống}}{\text{Tổng số tế bào}} \times 100 (\%)$$

Để đánh giá tốc độ tăng trưởng của tế bào trong 7 ngày liên tiếp. Tế bào được gieo ở mật độ ban đầu là 5×10^4 tế bào/ giếng trong đĩa nuôi 4 giếng. Tổng số tế bào được đếm tại mỗi ngày, từ ngày 1 đến ngày 7 của quá trình nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Để đánh giá tốc độ nhân đôi tế bào, chúng tôi đếm số lượng tế bào ở mỗi lần cấy chuyển sau mỗi 36 giờ. Mật độ tế bào nuôi ban đầu ở mức 1×10^5 tế bào/ giếng trong đĩa nuôi 4 giếng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi lần cấy chuyển.

Thời gian nhân đôi được tính như sau: $PDt = \frac{t}{PD}$. Trong đó PDt: thời gian nhân đôi tế bào; t: khoảng thời gian sau mỗi lần đếm ($t = 36$); PD: mật độ tế bào nhân lên trong thời gian t ($PD = [\log_{10}(NH) - \log_{10}(NI)] / \log_{10}$; NH: số tế bào ở lần thu đếm, NI: số tế bào ban đầu) [96].

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

2.3.8.1. Phương pháp xử lý biệt hóa bằng DMSO

Dùng môi trường nuôi có bổ sung DMSO ở các nồng độ 0,01%; 0,1% và 1% đối với tế bào ở lần cấy chuyển thứ 3, tiến hành nuôi như bình thường trong vòng 3 ngày, có đối chứng âm và đối chứng dương. Sau đó cứ mỗi 3 ngày/1 lần, tế bào được thay bằng môi trường trên. Sau các khoảng thời gian 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày, tế bào xử lý DMSO được tách ra từ đĩa nuôi cấy bằng Trypsin EDTA 0,25%, 37°C, 5 phút, sau đó được tách RNA tổng số và chạy RT-PCR với các cặp môi đặc hiệu cho TBGTM và tế bào gan. Ở các mẫu tế bào không được xử lý với DMSO (đối chứng âm) thì cũng được tách theo cách tương tự. Những đĩa nuôi cấy còn lại, tiếp tục được duy trì và nuôi cấy để phục vụ cho lần đánh giá tiếp theo. Để đánh giá mức độ tương đồng, chúng tôi cũng sử dụng các chỉ thị trên với tế bào ung thư gan HepG2 (đối chứng dương) để so sánh.

2.3.8.2. Phương pháp xử lý bằng tổ hợp HGF, dexamethasone và oncostain M

TBG cuống rốn được gieo vào đĩa 4 giếng (5×10^5 tế bào/giếng), môi trường nuôi DMEM/F12 được bổ sung các chất với nồng độ tương ứng: huyết thanh bê (FBS): 15%, yếu tố tăng trưởng biểu mô tái tổ hợp người (hEGF): 20 ng/mL (Sigma), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi người tái tổ hợp (bFGF): 10 ng/mL (Sigma), 1% Glutamax, 1% streptomycine/ampiciline, 50 mg/mL Insulin-Transferrin-Selenium (ITS, Sigma). Tế bào được nuôi trong điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Sau 2 ngày nuôi cấy, khi tế bào đạt 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi, môi trường nuôi được thay bằng môi trường biệt hóa I, là môi trường nuôi ở trên, bổ sung thêm 20 ng/mL yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF, Sigma), 1 mM/L Dexamethasone (DEX) (Sigma). Môi trường được thay mới sau mỗi 3 ngày. Sau 2 tuần nuôi bằng môi trường biệt hóa I, tiến hành thay môi trường biệt hóa II. Môi trường biệt hóa II có thành phần tương tự môi trường biệt hóa I nhưng bổ sung thêm oncostatin M (OSM) với nồng độ 20 ng/mL (Sigma) [97].

2.3.8.3. Phương pháp biệt hóa bằng tổ hợp HGF, trichostantine A và oncostatin M

Các TBGTM cuống rốn ở lần cấy chuyển thứ 3 trở lên được nuôi trong đĩa 6 giếng mật độ đạt 70% bề mặt đĩa. Biệt hóa tạo tế bào gan được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp 2 bước. Trong bước đầu tiên kéo dài 7 ngày, tế bào được nuôi cấy trong môi trường bao gồm DMEM bổ sung 10% FBS, 20ng/mL IGF (Sigma), 20 ng/mL HGF (sigma) và 10^{-7} M/L Trichostantine A (Sigma). Ở giai đoạn thứ hai, oncostatin M (Sigma) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ 10 ng/mL và tiếp tục cho đến ngày thứ 21. Môi trường nuôi cấy được thay 2 lần mỗi tuần. Đánh giá quá trình biệt hóa được thực hiện bằng quan sát hình thái tế bào và các kỹ thuật khác ở ngày thứ 7, ngày thứ 14 và ngày thứ 21 [98].

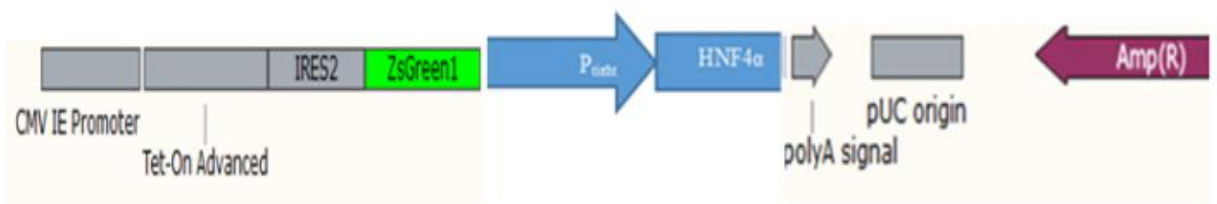
2.3.8.4. Phương pháp biệt hóa bằng chuyển gen *HNF4a*

Chuẩn bị vector mang gen HNF4a

Vector mang gen *HNF4a* được chuẩn bị theo phương pháp gắn vào hệ thống cải tiến cảm ứng biểu hiện gen Tet-ON (viết tắt là hệ thống Tet-ON). Đây là một hệ thống biểu hiện gen mức độ cao trong tế bào với sự kiểm soát chặt chẽ. Gen đích sẽ biểu hiện mức độ cao trong tế bào khi có mặt yếu tố cảm ứng Doxycycline (Dox) [8].

Đầu tiên gen *HNF4a* được chuẩn bị như mô tả của Chen và cộng sự (2010) [89]. Để tiến hành chèn đoạn gen *HNF4a* vào vector TetON, sản phẩm cắt từ vector mang gen *HNF4a* tổng hợp bằng enzyme *NheI* và *PacI* nhờ xúc tác của enzyme T4

ligase (BioBasic, Canada) được gắn với vector tách dòng pTRE-tight-BI (Clontech, Nhật Bản) ở 22°C trong 30 phút. Sử dụng phương pháp sốc nhiệt để biến nạp sản phẩm gắn vào tế bào *E.coli DH5α*. Sử dụng enzyme cắt *NheI* và *PacI* kiểm tra sản phẩm DNA plasmid tách được từ các khuẩn lạc trên đĩa biến nạp, sau đó điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0%. Tiếp theo để tách đoạn gen *HNF4α*, DNA plasmid có chứa gen *HNF4α* được cắt bằng cặp enzyme *NsiI* và *PacI*. Đoạn DNA plasmid thu được này sau đó được chuyển sang hệ thống Tet-ON để được vector cuối pTRE-*HNF4α*-ON.



Hình 2.2. Cấu trúc vector pTRE-*HNF4α*-ON

Các cặp môi được thiết kế được mô tả ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Các cặp môi được thiết kế để chuẩn bị vector mang gen *HNF4α*

Tên môi	Trình tự thiết kế
<i>NheI-HNF4α-F</i>	5'-CCAATG CATATGGTCAGCGTGAACGCGCCCCT-3'
<i>PacI-HNF4α-R</i>	5'-CCTTAATTAATTCTAGATAACTTCCTGCTTGGT-3'
<i>NsiI-Tet.On-F</i>	5'-CCAATGCATTTATCGATGCGGCCGCTCAG-3'
<i>PacI-Tet.On-R</i>	5'-CCTTAATTAATTCTAGATAACTTCCTGCTTGGT-3'

Bảng 2.4. Tỷ lệ thành phần phản ứng cắt của *HNF4α* và pTRE-Tight-BI bằng 2 enzyme *NheI* và *PacI*

STT	Thành phần	<i>HNF4α</i>	pTRE-Tight-BI
1	Enzyme <i>NheI</i>	2,0 μL	2,0 μL
2	Enzyme <i>PacI</i>	2,0 μL	2,0 μL
3	NE Buffer 1.1	5,0 μL	5,0 μL
4	Template	20,0 μL	20,0 μL
5	Water	21,0 μL	21,0 μL
6	Tổng	50,0 μL	50,0 μL

Bảng 2.5. Tỷ lệ thành phần phản ứng cắt của pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* và pTet-DualON bằng 2 enzyme *NsiI* và *PacI*

STT	Thành phần	pTRE-Tight-BI- <i>HNF4α</i>	pTet-DualON
1	Enzyme <i>NsiI</i>	2,0 μ L	2,0 μ L
2	Enzyme <i>PacI</i>	2,0 μ L	2,0 μ L
3	NE Buffer 2.1	5,0 μ L	5,0 μ L
4	Template	20,0 μ L	20,0 μ L
5	Water	21,0 μ L	21,0 μ L
6	Tổng	50,0 μ L	50,0 μ L

Phương pháp chuyển vector tái tổ hợp vào tế bào gốc

Sử dụng bộ kit Lipofectamine® LTX DNA Transfection của hãng Invitrogen (Mỹ) đưa vector biểu hiện pTRE-*HNF4 α* -ON tái tổ hợp chứa gen *HNF4 α* vào trong TBGTM cuống rốn. Thực hiện các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết thúc quá trình chuyển gen, tế bào được chuyển sang nuôi trong môi trường DMEM low glucose (1g/L), bổ sung 5 ng/mL EGF (epidermal growth factor), 10 μ g/mL ciprofloxacin, 50 mg/mL streptomycin, 50 IU penicillin, môi trường cũng bao gồm 10% FBS (fetal bovine serum). Thời gian nuôi cấy 3 ngày trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó, môi trường nuôi cấy sẽ được bổ sung Doxycycline nồng độ 200 ng/mL trong 24 giờ nuôi cấy tiếp theo để hoạt hóa biểu hiện của gen *HNF4 α* .

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

2.3.9.1. Đánh giá bằng chỉ tiêu hình thái và nhuộm miễn dịch

Để nhuộm miễn dịch huỳnh quang, đĩa nuôi cấy được hút bỏ hết môi trường nuôi cũ ra, dùng môi trường rửa tế bào rửa nhẹ tế bào. Sau đó, dùng dung dịch 4% paraformaldehyde cố định mẫu trong 10–20 phút ở nhiệt độ phòng, rồi rửa lại 2–3 lần bằng môi trường rửa tế bào. Tiếp theo, để tạo tính thấm trên màng tế bào, tiến hành nhuộm mẫu với 0,1% Triton X-100 có mặt PBS trong 15 phút rồi rửa lại với PBS, sau đó blocking với 3% BSA trong PBS với 0,1% Triton X-100. Sau đó các đĩa mẫu được ủ với kháng thể đơn dòng trong bộ kit của hãng *Santa Cruz Biotechnology, INC* bao gồm: *ALB(E11): sc-271604*, *AFP(C3) sc 8399* và *HNF4A(H-1): sc374229* (được pha loãng tỷ lệ 1:300 trong PBS) trong 1 giờ. Tiếp theo, tế bào được nhuộm với kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang (goat anti-mouse IgG-FITC, sc-2359). Có thể nhuộm

Hoechst hoặc DAPI để đánh giá nhân tế bào. Để kháng thể phát huỳnh quang, chúng tôi sử dụng bước sóng kích thích là 488 nm. Sử dụng kính hiển vi Nikon Ti2 để thu được phổ huỳnh quang phát ra ở dải bước sóng từ 450 đến 605 nm.

2.3.9.2. Đánh giá các chỉ thị phân tử bằng RT-PCR (reverse transcription-PCR) và qPCR (quantitative PCR)

Các tế bào đã biệt hóa được đánh giá bằng các chỉ thị phân tử ALB, AFP, HNF4 α , G6P, đây là các chỉ thị đặc trưng chức năng của tế bào gan và các chỉ thị này cũng dùng để đánh giá tính ổn định của các khối tế bào tạo ra. Toàn bộ tế bào trên đĩa nuôi trước và sau chuyển gen được thu nhận lại và tiến hành tách RNA tổng số thông qua bộ kit RNeasy Mini Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan), các bước tiến hành làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó chạy RT-PCR theo hướng dẫn bộ kit OneStep RT-PCR Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan). Các bước thực hiện như mô tả ở phần 2.2.6.2. khi thực hiện RT-PCR với TBGTM. Tất cả sản phẩm RT-PCR đều được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

qPCR được tiến hành với nhóm tế bào biệt hóa bằng chuyển gen HNF4 α được thực hiện bởi hệ thống Real time PCR tự động Rotor-Gene Q 5plex-HRM System (QIAGEN, Hilden, Đức). β -actin đã được sử dụng làm gen tham chiếu để chuẩn hóa và định lượng biểu hiện gen. Các chỉ thị được đánh giá là AFP, HNF4 α , CYP4a, ALB, danh sách các đoạn mồi được thể hiện ở bảng 2.6.

Bảng 2.6. Các đoạn mồi được sử dụng trong qPCR

Môi	Môi xuôi	Môi ngược	Nhiệt độ gắn mồi (T _m)	Nguồn tham khảo
AFP	5'-TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA-3'	5'-CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA-3'	58°C	(Chen và cộng sự, 2010 [88])
HNF-4	5'-CTGCTCGGAGCCACAAAGAGATCCATG-3'	5'-ATCATCTGCCACGTGATGCTCTGCA-3'	62°C	Chen và cộng sự, 2010 [88]
CYP3A4	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'	54°C	(Hata và cộng sự, 2020) [99]
ALB	5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGC-3'	5'-AAGGCAAGTCAGGGCATCTCATC-3'	58°C	Chen và cộng sự, 2010 [88]

Đối với mỗi mẫu, mỗi gen được thực hiện ba lần. Mỗi phản ứng qPCR bao gồm 20 ng cDNA với 10 pmol/L mỗi cụ thể và 7,5 μ L GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), tổng thể tích là 15 μ L trong mỗi ống. Các ống được làm nóng trong 3 phút ở 95°C, sau đó 20 giây ở 95°C, 30 giây ở nhiệt độ T_m tương ứng và 30 giây ở 60°C trong 40 chu kỳ. Định lượng biểu hiện gen tương đối được tính toán và phân tích bằng phần mềm Relative Expression Software Tool (REST) 2009 [100].

Trước khi tiến hành, đường nền và chu kỳ ngưỡng (Ct) và hiệu suất PCR do phần mềm Q-rex v1.0 (QIAGEN, Hilden, Đức) cung cấp đã được sử dụng để đo tỷ lệ biểu hiện của mẫu thử nghiệm so với các biện pháp kiểm soát bằng phương pháp Pfaffl (Pfaffl, 2007), mức độ biểu hiện ở các mẫu là giống nhau với độ lệch chuẩn $Ct < 1$, mức độ tin cậy là 0,05 [101].

2.3.9.3. *Đánh giá khả năng tích trữ glycogen*

Phân tích Glycogen tích lũy trong tế bào bằng phương pháp nhuộm Periodic Acid-Schiff (PAS). Để tiến hành nhuộm PAS, môi trường nuôi được loại bỏ khỏi đĩa nuôi cấy và các tế bào được rửa 3 lần bằng PBS. Sau đó, cố định các tế bào bằng dung dịch 4% paraformaldehyd trong 30 phút. Sử dụng bộ kit Periodic Acid-Schiff kit (Sigma) để tiến hành quá trình nhuộm. Bổ sung axit periodic 10g/L trong 10 phút sau đó rửa 3 lần bằng nước cất (ddH₂O), tiếp theo thêm chất thử Schiff trong 15 phút. Tế bào được rửa trong nước cất trong 10 phút và quan sát kết quả nhuộm màu được quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược.

2.3.10. *Phương pháp xử lý số liệu*

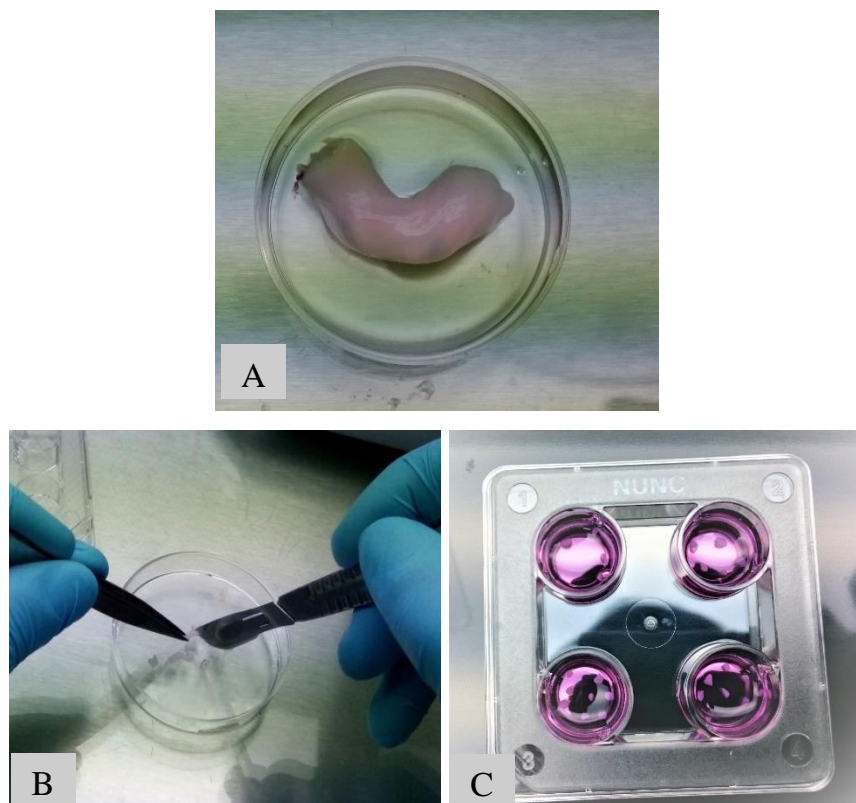
Số liệu được xử lý thống kê sinh học trong chương trình Excel, sử dụng phân tích T-test. Thống kê có ý nghĩa khi so sánh sự khác nhau giữa các số liệu với giá trị $P < 0,05$ và được thể hiện bằng $TB \pm SEM$ trong các thí nghiệm lặp lại.

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

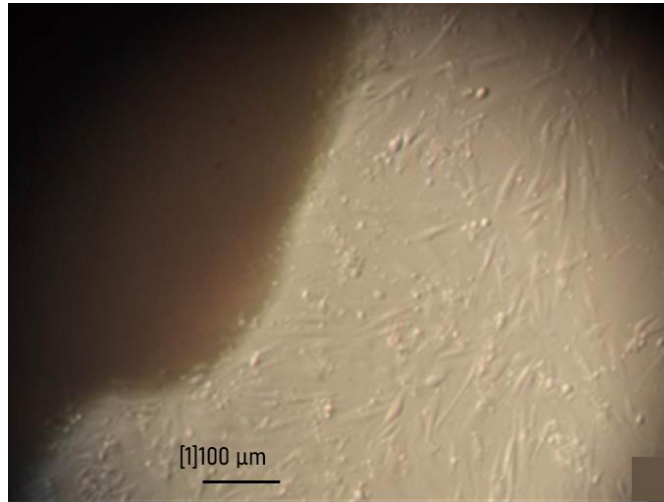
Đoạn dây rốn được đặt trên đĩa nuôi cấy sau khi được rửa sạch, loại bỏ thành mạch, sau đó được phân tách thành các mảnh mô sau đó đặt lên đĩa nuôi cấy. Phần cấu trúc bên trong mô cuống rốn được cắt nhỏ (kích thước 1-2 mm³) bằng dao mổ. Các mẫu mô cuống rốn có kích thước khoảng 1mm³ được nuôi trong các đĩa nuôi 4 giếng (NUNC), trong môi trường DMEM/F12 bổ sung các thành phần khác (Hình 3.1).



Hình 3.1. Phân lập tế bào gốc cuống rốn từ mảnh mô

- A) Mẫu mô cuống rốn; B) Thao tác phân lập mảnh mô cuống rốn trên đĩa nuôi;
C) Đĩa nhân nuôi tế bào

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 (Hình 3.2), tuy nhiên số lượng tế bào còn rất ít, quần thể tế bào dạng nguyên bào sợi (tế bào dài và mỏng, thuôn nhọn hai đầu, có một nhân tròn lớn chứa một hạch nhân) được cho là TBGTM có tỷ lệ khá ít trong quần thể ban đầu khi mới phân lập.



Hình 3.2. Tế bào bắt đầu mọc từ mảnh mô cuống rốn sau khi phân lập bằng phương pháp nuôi mảnh mô (Độ phóng đại 40X)

Để đánh giá tốc độ phát triển của tế bào thì độ bám dính của mảnh mô là một chỉ tiêu rất quan trọng. Tế bào sẽ lơ lửng trong môi trường nếu mảnh mô không bám dính, và như thế tế bào sẽ rất nhanh chết [72]. Kết quả phân lập của chúng tôi cũng tương tự so với một số báo cáo đã công bố. **Mennan** và cộng sự (2013) đã báo cáo kết quả so sánh các phương pháp phân lập TBG từ mẫu dây rốn. Với phương pháp băm nhỏ mẫu dây rốn thành các mảnh nhỏ và sau đó nuôi cấy trong môi trường cơ bản bổ sung môi trường nuôi được đánh giá là tương đối đơn giản và không tốn kém, nhưng đòi hỏi thời gian kéo dài để cấy ghép (thường là 20-30 ngày) vì mức thấp hiệu quả bám dính của mô và sự di chuyển chậm của các tế bào ra khỏi mô ban đầu (khoảng 5-10 ngày) [102]. Để khắc phục những nhược điểm này, Lu và cộng sự (2017) đã tiến hành thu lại mảnh mô đã xuất hiện tế bào và nuôi lại trong đĩa nuôi khác. Qua cách làm này đã tăng được số lượng tế bào với chất lượng không thua kém từ lần phân lập đầu và những lần nuôi sau cho có thời gian tế bào mọc ra nhanh hơn [103]. Các cách làm trên đều phân lập được TBG có chất lượng đạt yêu cầu.

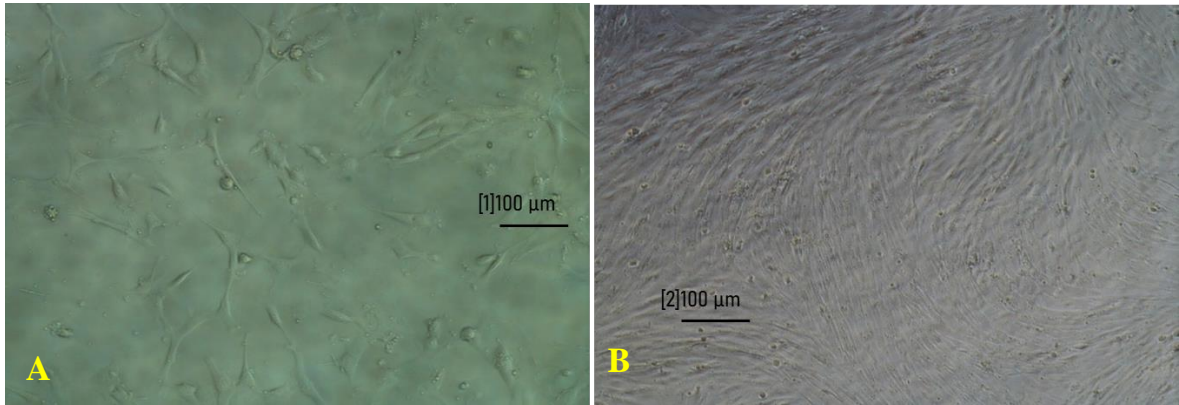
Tiềm năng tăng sinh của tế bào khi được nuôi trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung FBS 10% cao hơn so với khi nuôi trong môi trường không bổ sung FBS. Vì có rất nhiều yếu tố kích thích tăng trưởng tế bào (yếu tố tăng trưởng, các chất dinh dưỡng) có trong FBS. Tuy nhiên khi sử dụng TBGTM trong lâm sàng thì cần xem xét, vì nguy cơ lây truyền prion hay virus động vật từ huyết thanh động vật có thể là nguồn gốc của kháng nguyên ngoại lai gây ra các phản ứng miễn dịch. Vì vậy trong nuôi cấy tế bào, sử dụng môi trường không có huyết thanh là một hướng đi luôn được

chú ý. Nhưng xét theo một khía cạnh khác, việc thiết lập một môi trường không có huyết thanh khó hơn so với môi trường có huyết thanh nên cho đến hiện nay môi trường này chỉ dùng để nuôi cấy những dòng tế bào đặc biệt. Trong nghiên cứu của chúng tôi vẫn sử dụng môi trường có huyết thanh, các môi trường FBS đều là các sản phẩm thương mại của các hãng Sigma và PAN-Biotech, đều được tiệt trùng, phù hợp trong nuôi cấy tế bào người và động vật.

Hiện cũng có nhiều cách tiếp cận khác để phân cắt các mảnh mô, bao gồm sử dụng collagenase có hoặc không có trypsin, hoặc kết hợp collagenase và hyaluronidase có hoặc không có trypsin [45]. Hiệu quả của các phương pháp tùy thuộc vào thành phần và nồng độ enzyme, thời gian tiếp xúc của tế bào với enzyme và quá trình bất hoạt enzyme. Yoon và cộng sự (2013) đã thực hiện so sánh 2 phương pháp phân lập TBGTM bằng nuôi cấy mảnh mô và bằng enzyme. Kết quả cho thấy số lượng tế bào (P0) ở phương pháp nuôi cấy mảnh mô ($4,89 \pm 3,2 \times 10^5$) gấp gần 2,8 lần so với phương pháp phân lập bằng enzyme ($1,75 \pm 2,2 \times 10^5$) [104]. Trong khi đó Skiles và cộng sự (2020) đã chứng minh không có sự khác biệt đáng kể về khả năng tồn tại, hình thái, tốc độ tăng sinh, biểu hiện chỉ thị bề mặt, khả năng biệt hóa của TBG phân lập từ mô cuống rốn khi so sánh 2 phương pháp phân lập bằng nuôi cấy mảnh mô và phân lập bằng enzyme [105]. Trong một nghiên cứu khác, Widowati và cộng sự (2019) đã chỉ ra mặc dù phương pháp phân lập TBGTM cuống rốn bằng phương pháp enzyme là nhanh nhất, nhưng phương pháp phân lập bằng nuôi cấy mảnh mô lại dễ thực hiện hơn, cho tỷ lệ tinh sạch của TBGTM cao hơn phương pháp phân lập bằng enzyme [96]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, phương pháp nuôi cấy mảnh mô là phương pháp được sử dụng để phân lập TBGTM cuống rốn.

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. Vẫn quan sát thấy còn các tế bào ngắn hơn hoặc dạng nhỏ, tròn bên cạnh các tế bào dạng nguyên bào sợi chiếm ưu thế trên bề mặt đĩa nuôi. Đây là các tế bào chưa bám chắc được xuống đĩa nuôi, chúng được phân chia ra từ tế bào ban đầu (Hình 3.3A). Từ ngày nuôi cấy thứ 18, các TBGTM tăng sinh rất nhanh, phát triển dày thành nhiều lớp xoắn gổì lên nhau (Hình 3.3B).



Hình 3.3. Quá trình phát triển *in vitro* của tế bào phân lập được

A) Tế bào phát triển ban đầu chưa đồng nhất

B) Tế bào mọc kín đĩa nuôi thành những mảng song song, cuộn xoắn gổì lên nhau
(Độ phóng đại 40X)

Hình thái nguyên bào sợi của tế bào không thay đổi trong quá trình nuôi cấy tiếp theo trong suốt 10 lần cấy chuyển đầu tiên tương tự như công bố của Yoon và cộng sự (2010) [71].

Tốc độ bao phủ kín bề mặt đĩa nuôi và khoảng thời gian giữa các lần cấy chuyển là hai tiêu chí để chúng tôi đánh giá tốc độ tăng sinh của TBGTM. Trong các nghiên cứu đã được các tác giả công bố và cũng theo quan sát trong thí nghiệm của chúng tôi, khi nuôi cấy lâu dài trong điều kiện *in vitro* thì tốc độ tăng sinh của TBGTM giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Theo Yoon và cộng sự (2010), từ lần cấy chuyển thứ 13 nhóm tác giả quan sát thấy tế bào sẽ ngừng tăng sinh [71]. Còn trong nghiên cứu của Zhao và cộng sự (2019), nhóm tác giả đã so sánh TBGTM giữa các lần cấy chuyển 3, 6 và 15, kết quả cho thấy có sự tương đồng về hình thái, biểu hiện chỉ thị phân tử, nhiễm sắc thể. Tuy nhiên ở nhóm tế bào trong lần cấy chuyển 15 quan sát thấy tốc độ tăng sinh chậm và tỷ lệ tế bào chết nhiều hơn. Mặc dù khi đánh giá tiềm năng biệt hóa tạo tế bào mỡ, nhóm tác giả đã quan sát thấy nhiều giọt lipid hơn ở nhóm TBGTM lần cấy chuyển thứ 15, nhưng khi đánh giá tiềm năng biệt hóa tạo tế bào nguyên bào xương và tế bào sụn thì nhóm này lại yếu hơn so với nhóm TBGTM lần cấy chuyển 3 và 6 [106]. Chính vì vậy sau lần cấy chuyển thứ 4, chúng tôi tiến hành đông lạnh tế bào để tế bào đảm bảo phục vụ cho nghiên cứu về lượng và tiềm năng biệt hóa cao.

Bảo quản đông lạnh (đông lạnh) là quy trình sinh học sử dụng nhiệt độ rất thấp để bảo vệ tế bào và mô sống còn nguyên vẹn trong một thời gian dài. Phương pháp

đông lạnh được chúng tôi sử dụng là phương pháp đông lạnh chậm theo Sercin và cộng sự (2007). Sau bước xử lý bằng Trypsin/EDTA 0,25%, ly tâm thu tế bào thì bổ sung môi trường đông lạnh vào ống chứa tế bào, sau đó các ống này được giảm nhiệt độ dần bằng cách giữ ở 4°C trong 30 phút, 0°C trong 60 phút, -20°C trong 20-30 phút, sau đó được bảo quản trong bình chứa Nitơ lỏng (-196°C) [94].

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. Nhuộm tế bào với Trypan Blue 0,4% và đếm tế bào bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer. Dùng kính hiển vi quang học đếm tổng số tế bào quan sát được và tổng số tế bào sống sót ở mỗi mẫu, lấy kết quả trung bình sau 3 lần đếm để tính ra mật độ tế bào và tỷ lệ sống sót của tế bào. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.1:

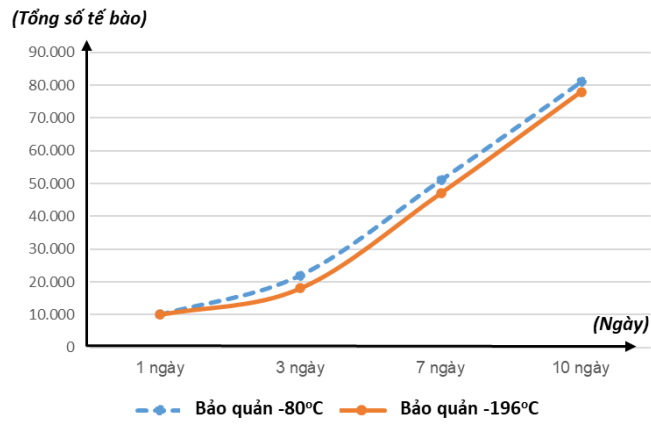
Bảng 3.1. Kết quả đếm tế bào và tỷ lệ sống tế bào

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

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu biểu thị tỷ lệ trung bình ± SEM, số liệu với chú thích khác nhau (a,b) trong cùng một cột là sai khác có ý nghĩa thống kê (P<0.05)

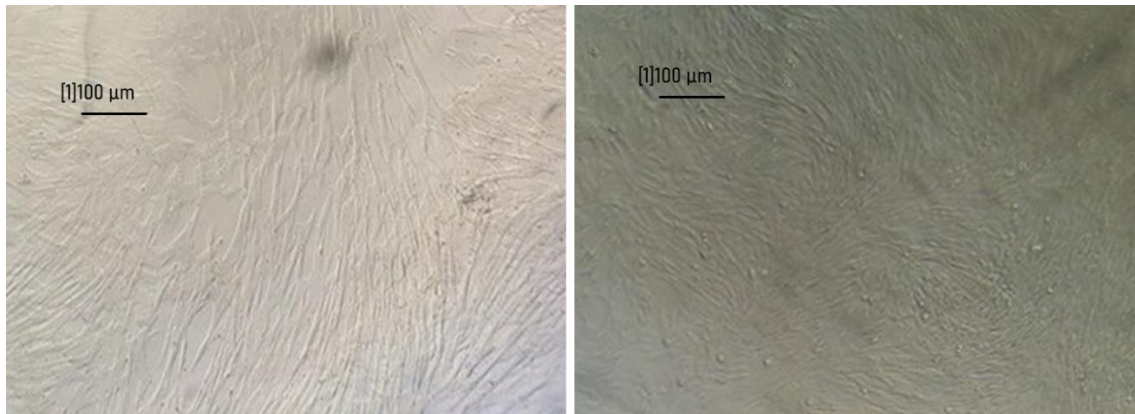
Từ bảng 3.1 cho thấy, trước khi cho đông lạnh, tỷ lệ tế bào sống khá cao (98,33 ± 0,58 %). Ở tế bào sau giải đông, tỷ lệ tế bào sống sống sót giảm, chỉ đạt 85,29 ± 1,56 %, tuy nhiên những tế bào còn sống vẫn mang hình thái nguyên bào sợi đặc trưng của TBGTM.

Nhiệt độ bảo quản cũng là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến các đặc trưng của tế bào, thời gian bảo quản và khả năng phục hồi. Do đó, 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). Như vậy, bảo quản tế bào trong tủ đông -80°C và nitơ lỏng -196°C đều đảm bảo chất lượng tế bào sau giải đông.



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

Tiếp tục nuôi cấy tế bào sau giải đông cho thấy tế bào vẫn phát triển bình thường, tiếp tục tăng sinh trở lại và duy trì trạng thái nguyên bào sợi (Hình 3.5).

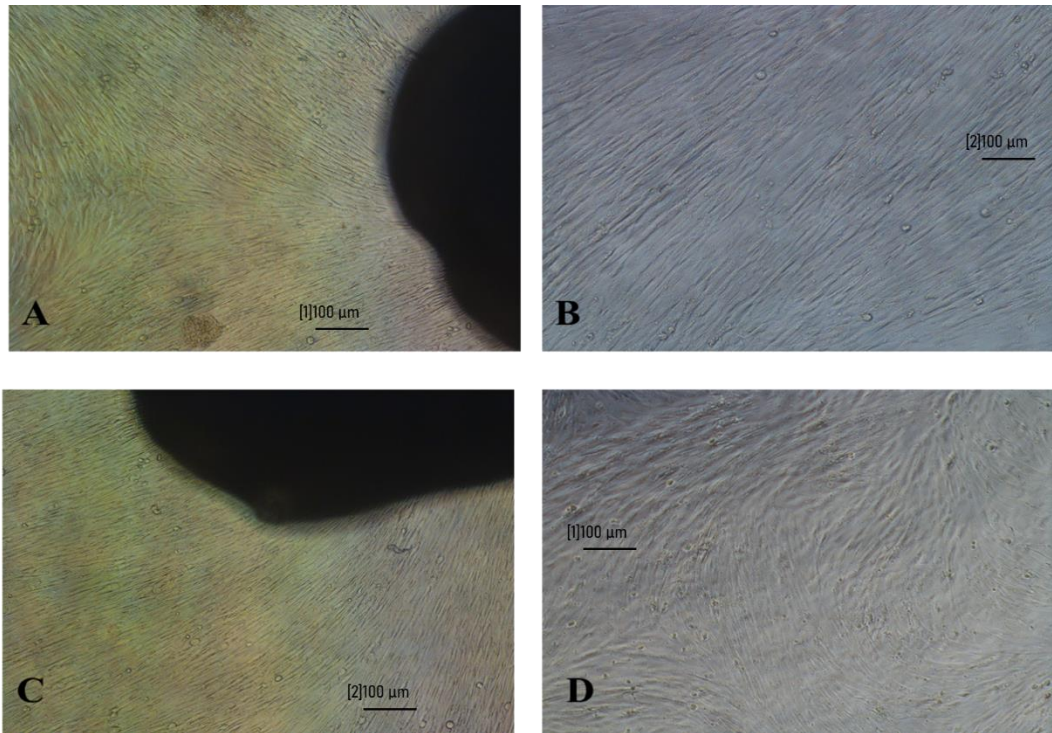


Hình 3.5. Tế bào trước khi đông lạnh (P4) (trái) và sau khi giải đông (P6) (phải)
(Độ phóng đại 40X)

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 (Hình 3.6A, Hình 3.6B).

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%. Việc quan sát hình thái của TBGTM được thực hiện bằng kính hiển vi đảo ngược phân pha sau lần cấy chuyển thứ 2 (Hình 3.6C, Hình 3.6D).



Hình 3.6. Các tế bào phát triển từ mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (C), TBGTM che kín bề mặt đĩa nuôi ở giai đoạn cấy chuyển lần 2 từ mô tươi (B) và mô đông lạnh (D)

(Độ phóng đại 40X)

Chúng tôi nhận thấy, các tế bào đều thể hiện quần thể tế bào dạng nguyên bào sợi điển hình và có sự giống nhau giữa hai nhóm thí nghiệm.

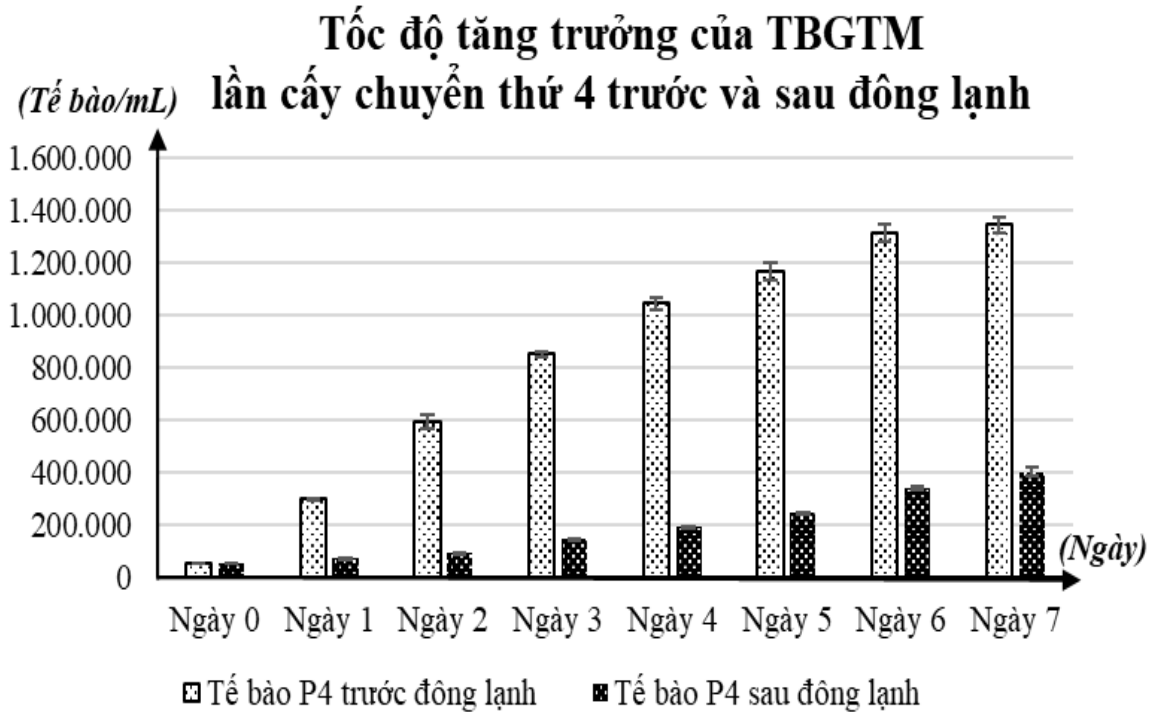
Cho đến các nghiên cứu hiện tại của chúng tôi, đều không có sự khác biệt về hình thái của TBGTM có nguồn gốc từ mẫu mô cuống rốn tươi và mẫu cuống rốn đông lạnh.

Các tế bào sau phân lập, khi tăng sinh đều có đặc điểm của TBGTM như khả năng bám dính và bề mặt đĩa nuôi cấy và có dạng nguyên bào sợi (tế bào dài và mỏng, thuôn nhọn hai đầu, có một nhân tròn lớn chứa một hạch nhân), và chúng giống nhau trong nhiều báo cáo [107], [108], [109].

3.1.3. Đánh giá tốc độ tăng trưởng của tế bào

Chúng tôi lựa chọn tế bào ở lần cấy chuyển thứ 4 trước và sau đông lạnh (P4) để đánh giá tốc độ tăng trưởng của tế bào. Tế bào được thả vào mỗi giếng nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 50.000 tế bào/mL. Tương tự với ống lưu giữ tế bào P4 đông lạnh, chúng tôi cũng giải đông và thả vào mỗi giếng nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 50.000 tế bào/mL. Sau mỗi ngày, đếm số lượng tế bào trong mỗi giếng sử dụng buồng

đếm hồng cầu (Neubauer). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào và đánh giá tốc độ tăng trưởng trong 7 ngày liên tiếp. Kết quả được thể hiện ở biểu đồ dưới đây (Hình 3.7):



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.

Kết luận giống với kết quả của Roy và cộng sự (2014), TBGTM sau khi giải đông sẽ phát triển chậm hơn, thu được số lượng tế bào ít hơn là lượng tế bào thu được ở TBGTM phân lập từ mô tươi. Điều này chứng tỏ, sau đông lạnh, tốc độ tăng trưởng của TBG sẽ giảm đi [110].

Để đánh giá những thay đổi trong tốc độ tăng trưởng tế bào ở hai nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi, và mô cuống rốn đông lạnh, chúng tôi tính toán thời gian nhân đôi mật độ tế bào (Bảng 3.2) và số lượng tế bào tăng lên (Hình 3.8).

Bảng 3.2. Sự tăng sinh 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

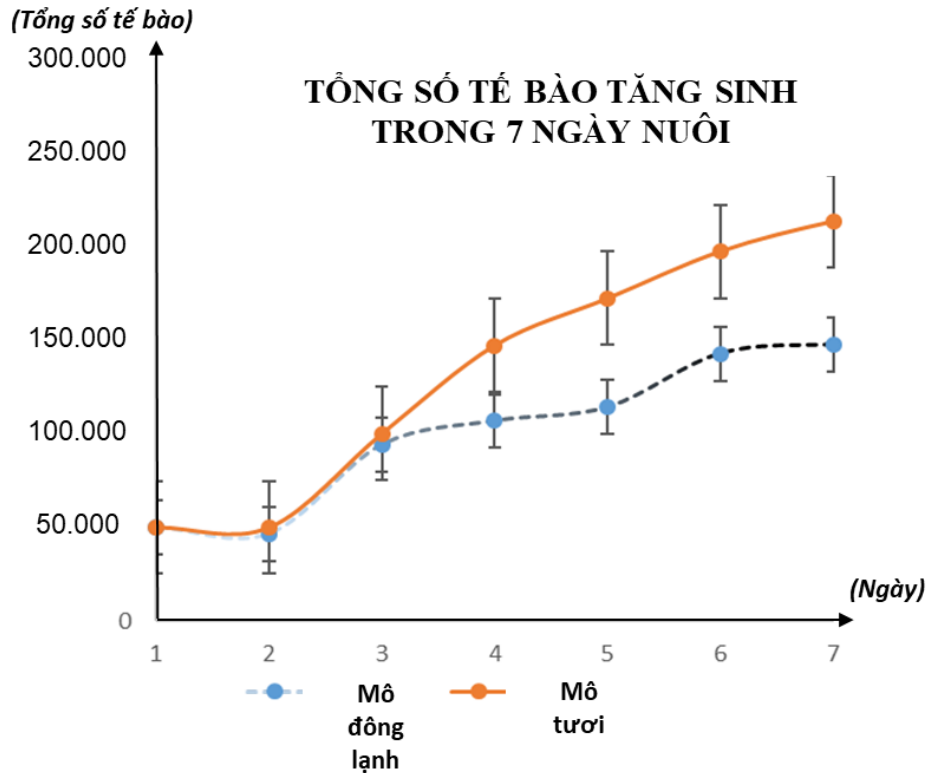
Lô thí nghiệm	Thời gian nhân đôi mật độ tế bào (giờ)			
	P2	P3	P4	P5
Mô cuống rốn tươi	28,42 ± 0,60 ^a	26,34 ± 0,55 ^a	27,69 ± 0,20 ^a	25,71 ± 0,53 ^a
Mô cuống rốn đông lạnh	36,00 ± 0,93 ^b	33,75 ± 0,55 ^b	40,00 ± 0,39 ^b	40,00 ± 0,63 ^b

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu biểu thị tỷ lệ trung bình ± SEM, số liệu với chú thích khác nhau (a,b) trong cùng một cột là sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Kết quả ở Bảng 3.2 cho thấy tế bào phân lập từ mô cuống rốn tươi tốt hơn tế bào phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh, ở bất kỳ lần cấy chuyển nào đều quan sát được thời gian nhân đôi ở lô mô cuống rốn tươi nhanh hơn so với ở lô mô cuống rốn đông lạnh. Thời gian nhân đôi mật độ tế bào phụ thuộc nhiều yếu tố trong đó có điều kiện nuôi cấy tế bào, các yếu tố tăng trưởng, nhiệt độ, áp suất... Ở lần cấy chuyển 3 có sự giảm thời gian nhân lên mật độ tế bào ở cả 2 lô, tuy nhiên ở các lần cấy chuyển tiếp theo so với lần cấy chuyển 2 theo xu hướng chung. Ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi thời gian nhân đôi mật độ tế bào xu hướng 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 lại 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. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê thể hiện khi so sánh thời gian nhân đôi mật độ tế bào giữa 2 nhóm lô mô cuống rốn tươi và lô mô cuống rốn đông lạnh. Tuy vậy, thời gian nhân đôi mật độ tế bào đều ngắn hơn $60,00 \pm 3,00$ giờ theo báo cáo của Chen và cộng sự (2015) [111]. Điều này chứng tỏ, TBGTM chúng tôi đã phân lập và nuôi cấy ở cả 2 lô thí nghiệm phát triển rất tốt trong điều kiện thí nghiệm nghiên cứu đặt ra.

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.



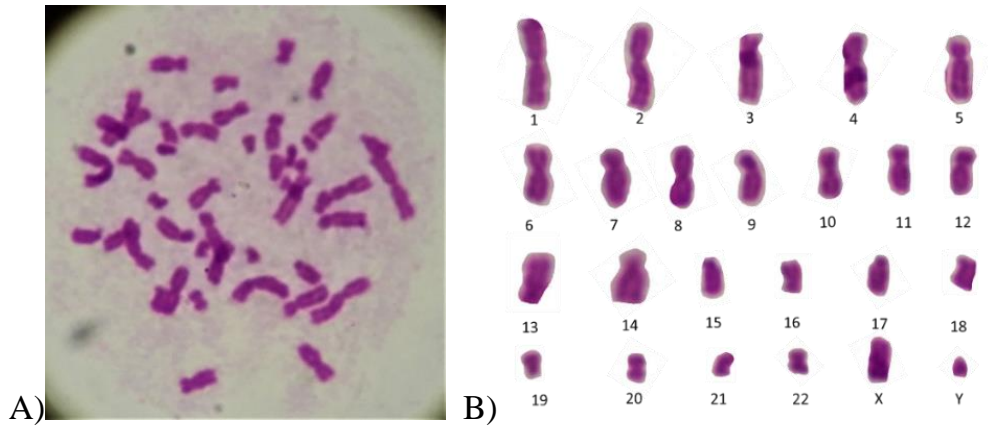
Hình 3.8. Tổng số tế bào tăng sinh được ghi lại mỗi ngày trong 7 ngày nuôi cấy ở 2 nhóm thí nghiệm: mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh

Có thể thấy phương pháp đông lạnh, bảo quản và giải đông tế bào của chúng tôi đảm bảo để thu được TBGTM với tốc độ tăng trưởng tốt nhất, đảm bảo quá trình đạt chất lượng và các đặc trưng cần thiết của TBGTM.

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

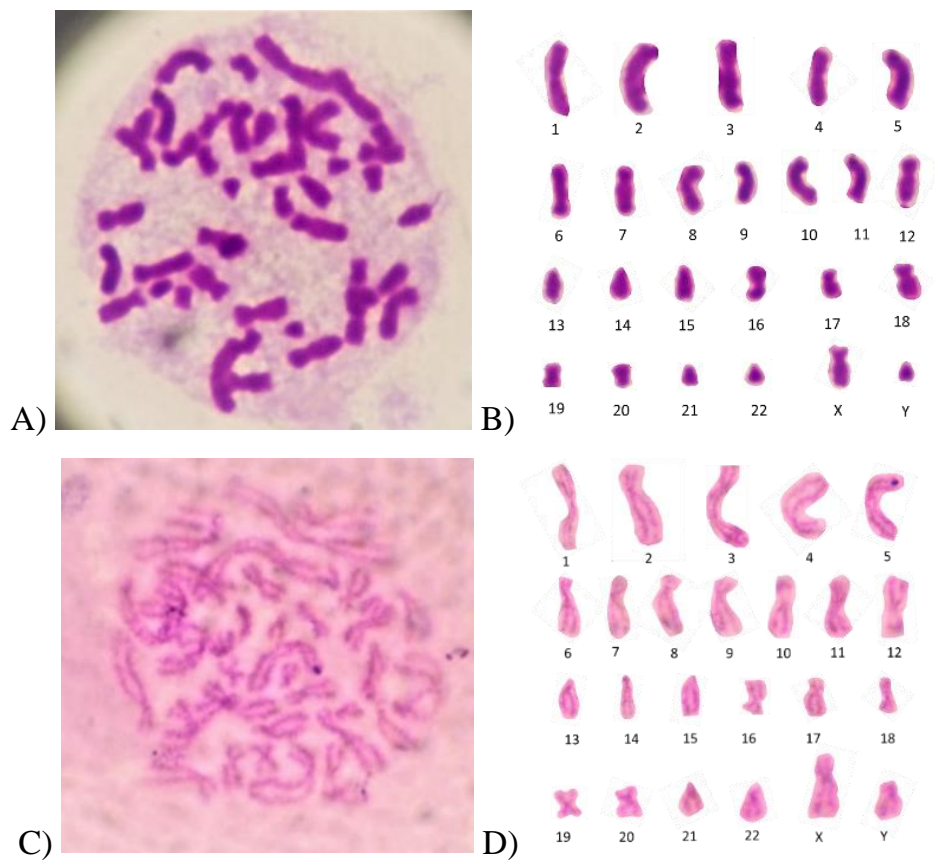
3.2.1. Đánh giá tính ổn định di truyền của TBG phân lập được

Chúng tôi dùng 3 mẫu ở lần cấy chuyển thứ 2 để tiến hành phân tích nhiễm sắc thể của TBG. Bộ nhiễm sắc thể thu được sau khi phân tích đều cho thấy là bình thường, điển hình do đó có thể sử dụng nguồn tế bào này để đánh giá tính ổn định di truyền của TBG (Hình 3.9).



Hình 3.9. Quan sát nhiễm sắc thể trên kính hiển vi (A) và nhiễm sắc thể đồ (B) của tế bào nuôi ở lần cấy chuyển thứ 2 (Độ phóng đại 1.000X)

Để xác định tác động của việc nuôi cấy nhân số lượng TBG trong điều kiện *in vitro* đến sự ổn định của nhiễm sắc thể. Với mục đích này, TBG nuôi cấy ở các lần cấy chuyển thứ 2, 10 và 15 được xử lý và phân tích bộ nhiễm sắc thể. Kết quả cho thấy, nhiễm sắc thể có số lượng ổn định, cấu trúc không thay đổi ở các lần đánh giá (Hình 3.10).



Hình 3.10. Quan sát nhiễm sắc thể trên kính hiển vi và nhiễm sắc thể đồ của tế bào nuôi ở lần cấy chuyển thứ 10 (A), (B) và thứ 15 (C), (D) (Độ phóng đại 1.000X)

Trong điều kiện *ex vivo*, nghiên cứu về đặc điểm nhiễm sắc thể của tế bào ở lần cấy chuyển thứ 3 – 4 và ở lần cấy chuyển thứ 10 – 12, Osipova và cộng sự cũng đã chứng minh các nhiễm sắc thể ở 2 giai đoạn trên không thay đổi trong suốt quá trình nuôi cấy, trong quá trình tăng sinh tế bào thể dị bội có xuất hiện nhưng không thay đổi [112].

Đối với liệu pháp trị liệu sử dụng tế bào, để cấp đủ số lượng tế bào cho mỗi lần cấy ghép thì việc nuôi cấy *in vitro* từ nguồn tế bào cho ít ỏi ban đầu là rất cần thiết. Quá trình nuôi cấy *in vitro* là một trong những tác nhân chính dẫn đến suy giảm tiềm năng của TBG và đặc biệt là tính ổn định của cấu trúc di truyền, cụ thể là bộ nhiễm sắc thể của tế bào. Việc nhân nuôi tế bào cần được thiết lập ở mức độ đáp ứng sự ổn định đặc tính di truyền và tiềm năng TBG phải được duy trì. Trong nghiên cứu Hladik và cộng sự (2019) cũng đã xác nhận bộ nhiễm sắc thể TBGTM chuột ổn định trong quá trình nhân nuôi *in vitro* [113].

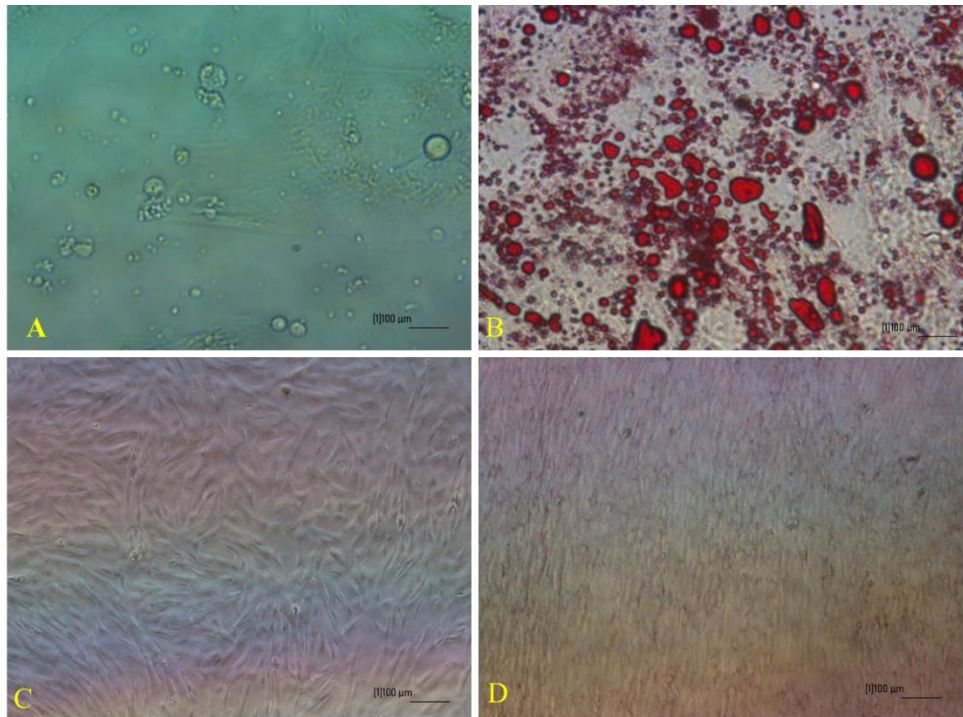
3.2.2. Đánh giá tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc

Khả năng biệt hóa đa dòng của TBGTM cuống rốn đã được chứng minh bằng cách tạo ra sự biệt hóa tạo thành tế bào nguyên bào xương và tế bào mỡ. Sự biệt hóa được ghi nhận khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 200X.

3.2.2.1. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào mỡ

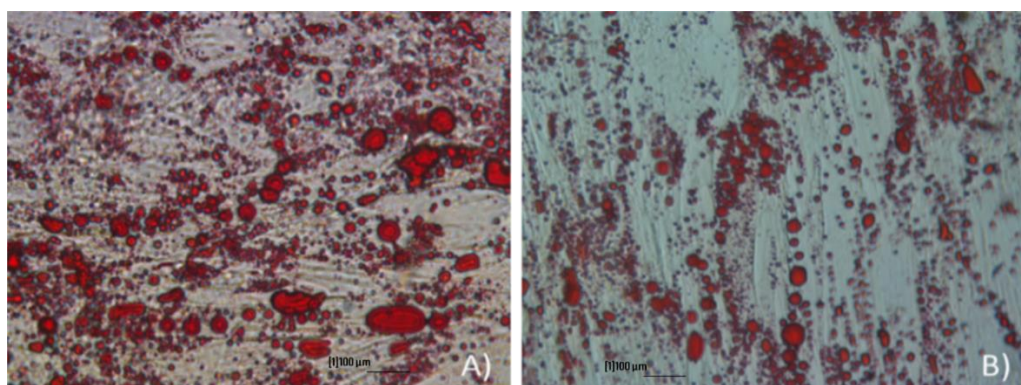
Các tế bào tạo mỡ với hình dạng khối tròn bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi tiến hành cảm ứng biệt hóa (Hình 3.11A) trong khi không xuất hiện ở tế bào đối chứng (Hình 3.11C).

Chúng tôi quan sát thấy, các tế bào tròn lớn hơn với nhiều không bào có lipid đã xuất hiện trong tế bào chất từ TBGTM cuống rốn sau 21 ngày biệt hóa bằng môi trường biệt hóa tạo mỡ. Sự xuất hiện các giọt mỡ có thể được quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 hay 400 lần. Tế bào tạo mỡ được biệt hóa từ TBGTM có hình thái co tròn, các giọt lipid xuất hiện. Dưới kính hiển vi, các giọt mỡ tròn phản chiếu ánh sáng. Khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (Merck), chúng luôn bắt màu đỏ chiếm phần lớn tế bào chất (Hình 3.11B). 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 (Hình 3.11D).



Hình 3.11. Kết quả biệt hóa TBGTM thành tế bào mỡ (Độ phóng đại 200X)
 Các tế bào (P5) được nuôi trong môi trường biệt hóa tạo mỡ: bắt đầu tích tụ tạo giọt mỡ sau 7- 14 ngày (A), bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red tại ngày thứ 14 (B); Các TBGTM ở lô đối chứng (P5), không bổ sung chất cảm ứng biệt hóa: trong môi trường nuôi cấy (C), được nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (D)

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. Kết quả cho thấy những tế bào này đã biệt hóa thành tế bào mỡ. Các giọt mỡ xuất hiện sau 3 tuần và tăng kích thước một chút vào cuối giai đoạn biệt hóa (Hình 3.12).

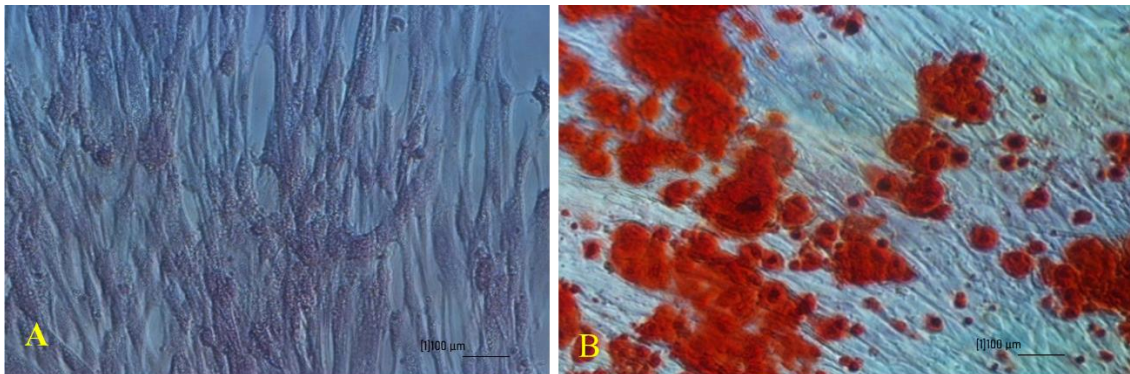


Hình 3.12. Các tế bào giọt mỡ bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil red xuất hiện sau biệt hóa ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (B) (Độ phóng đại 200X)

Trong môi trường biệt hóa, dexamethasone là một glucocorticoid steroid có vai trò cảm ứng cho sự biệt hóa, trong khi các yếu tố bổ sung khác có vai trò kích thích cho sự biệt hóa. Indomethacin là chất gắn của PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) một loại receptor nhân tế bào giúp hoạt hóa nhân tố phiên mã ức chế đường truyền tín hiệu *Wnt*, thúc đẩy biệt hóa tế bào thành tế bào mỡ. Trong khi đó, IBMX ức chế phosphodiesterase ngăn cản quá trình cAMP chuyển đổi sang 5'AMP. Chính vì đó gây biểu hiện một enzyme lipase nhạy cảm với nội tiết tố (HSL), enzyme này sẽ thủy phân triacyl glyceride thành các acid béo tự do và glyceril. Cùng lúc đó, Insuline với vai trò điều chỉnh chuyển hóa glucose thu nhận vào tế bào làm vật liệu cho phản ứng chuyển đổi tạo các giọt mỡ [17], [114].

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 thon mảnh giống nguyên bào sợi sang dạng tròn và hình hạt đậu (Hình 3.13A).

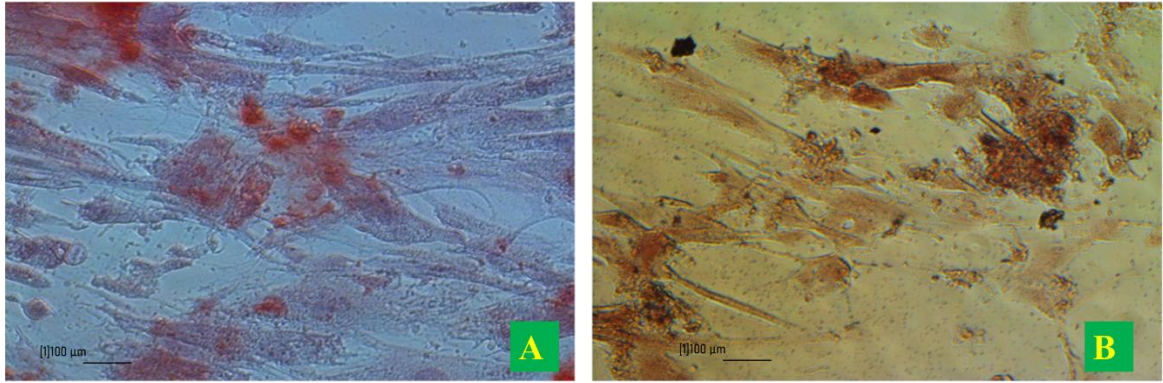


Hình 3.13. Kết quả biệt hóa TBGTM thành nguyên bào xương

(A) Các tế bào (P5) được nuôi trong môi trường biệt hóa bắt đầu chuyển từ dạng dài sang dạng tròn và hình hạt đậu. (B) Các tế bào nguyên bào xương bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin red (Độ phóng đại 200X)

Sau 2 tuần nuôi cấy, tỷ lệ các tế bào có dạng hình hạt đậu hoặc hình tròn tăng lên rõ rệt. Các tế bào này bắt màu đỏ cam khi tiếp xúc với thuốc nhuộm Alizarin red. 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 (Hình 3.13B). Đây là một minh chứng cho việc các TBGTM đã được biệt hóa thành nguyên bào xương thể hiện trong tế bào chất có sự lắng tụ của muối calcium.

Khi so sánh khả năng biệt hóa TBGTM thành tế bào nguyên bào xương ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi và mô cuống rốn đông lạnh cũng cho kết quả tương tự. Sau 3 tuần biệt hóa TBGTM thành tế bào nguyên bào xương, ở hai nhóm thí nghiệm đều xuất hiện các tinh thể bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin red (Hình 3.14).



Hình 3.14. Các tế bào bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin red ở nhóm mô cuống rốn tươi (A) và mô cuống rốn đông lạnh (B)

(Độ phóng đại 200X)

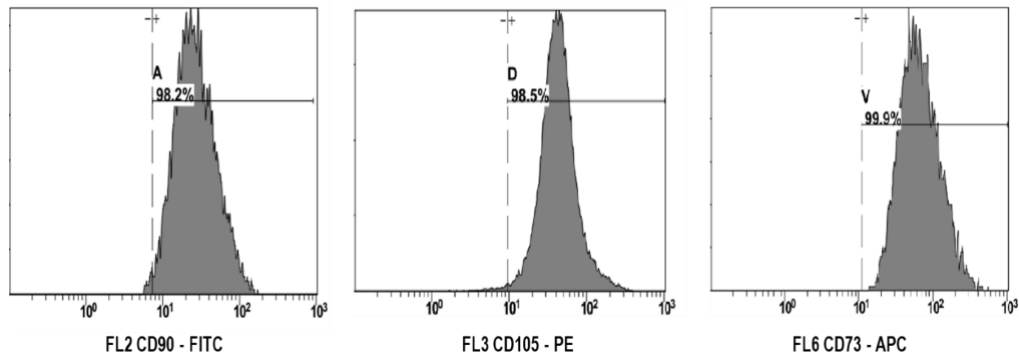
Phụ thuộc vào mức nồng độ mà Dexamethasone ức chế biệt hóa hoặc kích thích biệt hóa tế bào thành nguyên bào xương. Cụ thể, Dexamethasone với nồng độ cao sẽ cảm ứng biệt hóa tế bào thành các giọt mỡ, ngược lại, với nồng độ Dexamethasone thấp hơn, chất này sẽ kích thích biệt hóa TBGTM thành nguyên bào xương. Môi trường biệt hóa còn gồm có ASAP có tác dụng làm tăng sinh tế bào, kích thích sự tổng hợp collagen và thúc đẩy quá trình biệt hóa tế bào thành nguyên bào xương. Cùng với đó, β -glycerolphosphate là yếu tố quan trọng khi kết hợp với ASAP và Dexamethasone giúp kích thích sự hình thành chất nền được khoáng hóa [115].

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

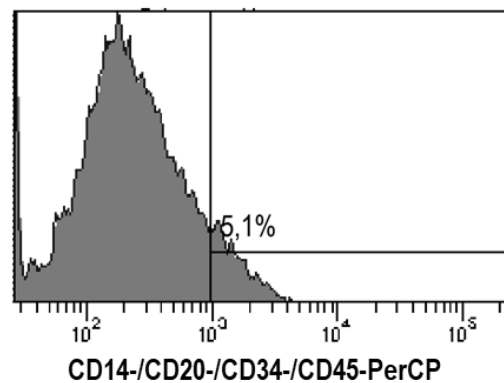
Mặc dù TBG có thể được trích xuất thành công tại tất cả các vị trí trong các mô cuống rốn từ các mô quanh mạch máu, vùng thạch Wharton, màng mô cuống rốn, các mô quanh mạch máu được đánh giá là mô tổ chức có chứa lượng lớn TBG [102], [116].

Chúng tôi tiến hành phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy (flow cytometry) để đánh giá biểu hiện với các chỉ thị đặc trưng của TBGTM phân lập từ mô cuống rốn ở lần cấy chuyển thứ 4. Kết quả ở hình 3.15 thể hiện 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%) (Hình 3.15).



Hình 3.15. Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu tế bào phân lập từ mô cuống rốn ở lần cấy chuyển 4 phân tích bằng flow cytometry

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% (Hình 3.16).



Hình 3.16. Tỷ lệ tổ hợp các chỉ thị đặc trưng không biểu hiện trong TBGTM phân lập từ mẫu mô cuống rốn ở lần cấy chuyển 4 phân tích bằng flow cytometry

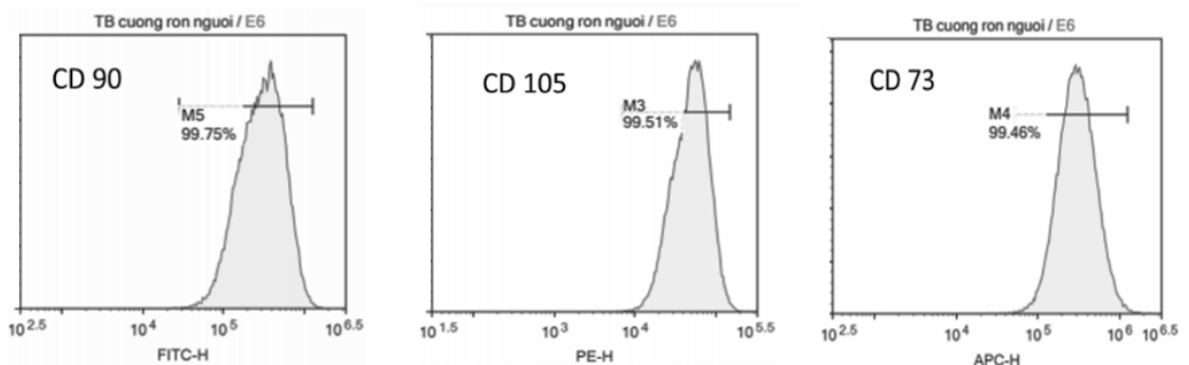
Kết quả cũng tương đồng với nghiên cứu của Salehinejad và cộng sự (2012) khi phân lập các TBGTM từ lớp nhầy cuống rốn người. Theo nhóm tác giả này công bố, biểu hiện của *CD90* đạt 72,23% và 55,79%, tương ứng với nhóm phân lập bằng enzyme và nhóm phân lập bằng mảnh mô, biểu hiện của *CD73* đạt tỷ lệ cao hơn trong nhóm phân lập bằng mảnh mô (74,47%) so với nhóm phân lập bằng tổ hợp enzyme (13,33%) [45].

Năm 2011, nhóm nghiên cứu của Koliakos và cộng sự, cũng chỉ ra tế bào phân lập được từ cuống rốn dương tính với CD105 ($81,90 \pm 17,80\%$), CD90 ($99,40 \pm 1,40\%$) và CD29 ($95,50 \pm 5,30\%$) ($n = 67$) và âm tính đối với CD45 ($11,10 \pm 5,50\%$) ($n = 30$) [117]. Các kết quả cũng được báo cáo tương tự với các nhóm nghiên cứu [33], [48].

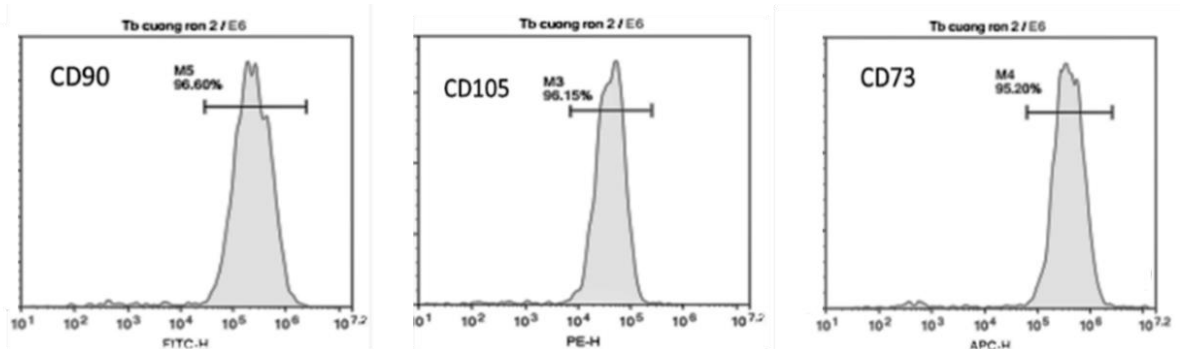
Chúng tôi cũng sử dụng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy để so sánh khả năng biểu hiện các chỉ thị TBGTM ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi với nhóm phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh.

Các tế bào ở giai đoạn cấy chuyển lần 2 được phân tích đếm tế bào qua dòng chảy xác định dấu hiệu bề mặt tế bào của CD73, CD90 và CD105. Kết quả cho thấy sự biểu hiện mức độ cao của TBGTM ở cả hai nhóm tế bào.

Ở nhóm TBGTM phân lập từ mô cuống rốn tươi, sự biểu hiện của CD90 (99,75%), CD105 (99,51%), CD73 (99,46%) (Hình 3.17). 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%) (Hình 3.18).



Hình 3.17. Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu cuống rốn tươi ở lần cấy chuyển 2



Hình 3.18. Biểu hiện các chỉ thị bề mặt TBGTM của mẫu cuống rốn đông lạnh ở lần cấy chuyển 2

Trong nghiên cứu này, các dấu hiệu bề mặt của TBGTM ở nhóm phân lập từ mô cuống rốn đông lạnh thấp hơn nhóm phân lập từ mô cuống rốn tươi, nhưng sự biểu hiện vẫn cao hơn so với một số nghiên cứu của các tác giả khác.

Năm 2016, Phạm Văn Phúc và cộng sự đã nghiên cứu biểu hiện chỉ thị phân tử của tế bào phân lập từ lớp chất nền dây rốn và đánh giá qua các lần cấy chuyển. Kết quả cho thấy ở lần cấy chuyển thứ 2, tế bào có tỷ lệ phần trăm dương tính cao *CD13*, *CD29*, *CD44* và *CD90* (80,65% đến 93,77%), tỷ lệ phần trăm dương tính trung bình với *CD105* và *CD146* (28,34% đến 39,07%) và tỷ lệ phần trăm dương tính thấp với *CD10*, *CD14*, *CD34* và *CD117* (2,12% đến 12,80%) (n=3). Đối với lần cấy chuyển thứ 10, tế bào được duy trì có tỷ lệ phần trăm dương tính cao *CD13*, *CD29*, *CD44* và *CD90* (94,58% đến 96,05%), và có sự gia tăng biểu hiện *CD10*, *CD105* và *CD146* (38,45% đến 78,16%) (n=3) [118].

Anahita và cộng sự (2014) cũng cho thấy TBG được phân lập từ dây rốn của người, màng ối và của mô nhau thai cũng đều dương tính với *CD105*, *CD44* và *CD90* và âm tính với *CD34*, *CD133* [119]. Trong nghiên cứu TBG phân lập từ nhau thai, Shalini và cộng sự (2012) cũng chỉ ra ở lần cấy chuyển sớm (P2), hơn 90% tế bào phân lập được biểu hiện dương tính với *CD29*, *CD105*, *CD73*, *CD90*. Tất cả các mẫu cho thấy âm tính *CD45* và *CD34* [120].

Kết quả biểu hiện các chỉ thị đặc trưng khá đồng nhất sau lần cấy chuyển đầu tiên chứng tỏ tế bào phân lập theo phương pháp của chúng tôi đã được tối ưu hóa. Theo các nghiên cứu đã công bố, TBGTM sau các lần cấy chuyển tiếp theo sẽ cho tỷ lệ biểu hiện chỉ thị phân tử ở mức độ cao hơn (khoảng 90%) [121], [122].

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 kết quả từ phân tích đếm tế bào qua dòng chảy chứng minh rằng chúng có khả năng duy trì chỉ thị bề mặt đặc trưng khi nuôi cấy *in vitro* trong thời gian dài.

Các chỉ thị đặc trưng như *CD73*, *CD90* và *CD105* sau khi phân tích đối với TBG cuống rốn 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
CD73	95,53 ± 0,20	98,37 ± 0,15	98,70 ± 0,12
CD90	95,27 ± 0,24	96,83 ± 0,30	98,53 ± 0,15
CD105	95,60 ± 0,10	98,43 ± 0,09	99,13 ± 0,33
CD14/CD20/ CD34/CD45	4,77 ± 0,09	4,93 ± 0,24	5,07 ± 0,19

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu % biểu thị tỷ lệ trung bình ± SEM, số liệu với chú thích khác nhau (a,b) trong cùng một hàng là sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Để đánh giá tính ổn định của tế bào trong bảo quản lạnh, chúng tôi phân tích các đặc trưng của TBG bằng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy với tế bào trước và sau đông lạnh. Chúng tôi tiến hành giải đông lô tế bào đông lạnh ở lần cấy chuyển thứ hai (P2) và nuôi cấy sau 6 ngày để mật độ tế bào đạt 80-90% đĩa nuôi, lượng tế bào thu được đạt khoảng 1×10^6 tế bào/mL thì thực hiện để kiểm tra sự biểu hiện của các chỉ thị bề mặt.

Tỷ lệ biểu hiện các chỉ thị của các tế bào trước và sau đông lạnh được thể hiện trong bảng 3.4. Kết quả cho thấy quần thể tế bào trước đông lạnh có tỷ lệ biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng của TBGTM từ 98% trở lên. Trong khi đó, biểu hiện các chỉ thị đều giảm sau đông lạnh tuy nhiên, mức độ giảm không giống nhau. Chỉ thị CD90 giảm nhiều nhất từ 98,00% trước đông lạnh còn 83,60% sau đông lạnh. Nguyên nhân của điều này có thể do ảnh hưởng của quá trình đông lạnh khiến giảm tỷ lệ biểu hiện của các chỉ thị tế bào sau đông lạnh.

Bảng 3.4. Tỷ lệ tế bào biểu hiện các chỉ thị TBG trước và sau đông lạnh

Chỉ thị	Tỷ lệ biểu hiện (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
CD73	99,00 ± 0,12	98,40 ± 0,06

<i>CD90</i>	98,00 ± 0,17 ^a	83,60 ± 0,12 ^b
<i>CD105</i>	98,00 ± 0,18 ^a	95,20 ± 0,12 ^b

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu % biểu thị tỷ lệ trung bình ± SEM, số liệu với chú thích khác nhau (a,b) trong cùng một hàng là sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Bảo quản lạnh đại diện cho tiêu chuẩn vàng trong lưu trữ và vận chuyển tế bào, nhưng tác dụng của nó đối với TBGTM vẫn chưa được thật sự rõ ràng. Những đánh giá có hệ thống đã được thực hiện để đánh giá tác động của bảo quản lạnh đối với TBGTM tùy xương và cố gắng khám phá lý do đằng sau một số kết quả gây tranh cãi được thể hiện trong các báo cáo. Bahsoun và cộng sự (2019) đã thống kê 41 nghiên cứu liên quan đến đông lạnh và đánh giá sau đông lạnh trong điều kiện *in vitro* để tiến hành phân tích. Kết quả cho thấy, hầu hết các nghiên cứu đều kết luận rằng bảo quản lạnh không ảnh hưởng đến hình thái TBGTM, biểu hiện các chỉ thị đánh dấu bề mặt, khả năng biệt hóa hoặc tăng sinh [123]. Do vậy, kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu được công bố trước đây.

Theo nghiên cứu của Bharti và cộng sự (2018) đã chỉ ra rằng, các TBGTM cuồng rôn trước và sau khi đông lạnh – giải đông đều biểu hiện các chỉ thị đặc trưng cho TBGTM là: *CD90*, *CD73*, *CD105* [124]. So sánh với thí nghiệm của Bharti chúng tôi nhận thấy rằng, kết quả thí nghiệm của chúng tôi hoàn toàn giống với kết quả của Bharti. Điều này chứng tỏ, các TBGTM được chúng tôi phân lập có tính ổn định biểu hiện các chỉ thị đặc trưng cả trước và sau khi đông lạnh.

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

Chúng tôi sử dụng máy đo quang phổ BiosSpectrometer (Eppendorf – Đức) để xác định hàm lượng và độ tinh sạch của mẫu và những kết quả được thống kê ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả đo mật độ quang (OD) của các mẫu RNA tách chiết

Mẫu TBGTM	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{280nm}	Hàm lượng RNA (ng/μl)
Mẫu 1	0,442	0,223	1,98	176,7
Mẫu 2	0,432	0,224	1,93	173,2

Mẫu 3	0,472	0,235	2,01	183,2
Trung Bình	0,449	0,227	1,97	177,7

Kết quả đạt đến trên 1,9 ở tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ khi đo quang phổ với các bước sóng 260 nm và 280 nm chứng tỏ các mẫu RNA chúng tôi tách chiết được có độ tinh sạch cao. Từ bảng kết quả trên cũng thể hiện hàm lượng RNA khá cao trong các mẫu với kết quả đo quang phổ 260 nm. Các kết quả trên khẳng định mẫu RNA đã được tách chiết hoàn toàn đủ tiêu chuẩn làm khuôn mẫu cho phản ứng RT – PCR.

Việc nuôi cấy sau hơn 2 tuần, chúng tôi đã chọn lọc được các TBGTM thuần nhất có hình dạng giống như nguyên bào sợi, có tiềm năng tăng sinh từ quần thể tế bào hỗn hợp ban đầu. Bằng các nguyên liệu được chuẩn bị theo hướng dẫn của bộ kit QIAGEN® OneStep RT – PCR Kit, sử dụng mẫu RNA có độ tinh sạch và hàm lượng cao để chạy phản ứng RT-PCR kiểm tra biểu hiện của các chỉ thị đặc trưng của TBGTM với các cặp mồi đặc hiệu.

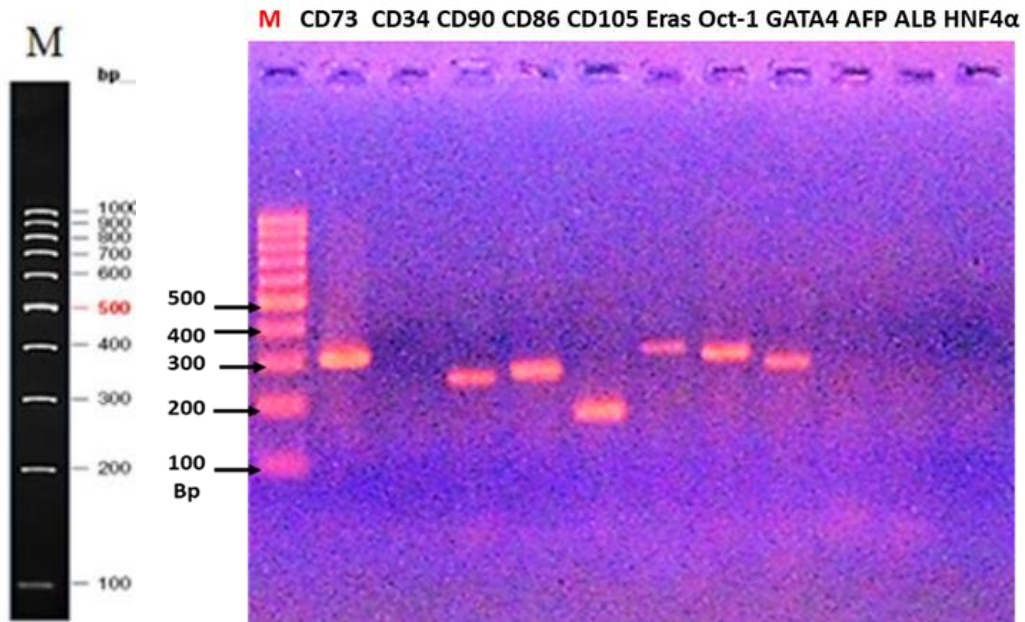
Để xác định tính ổn định của tế bào trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, TBG được đánh giá các chỉ thị tương ứng ở các lần cấy chuyển thứ 5, 10, 15 và 20. Kết quả cho thấy, với phương pháp RT-PCR, ở lần cấy chuyển thứ 20 các chỉ thị vẫn duy trì biểu hiện âm tính với các chỉ thị chức năng của tế bào gan và biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng của TBG giống lần cấy chuyển thứ 5 (Bảng 3.6).

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	+	+	+	+
Tế bào gan	<i>AFP</i>	216	-	-	-	-

	<i>ALB</i>	136	-	-	-	-
	<i>HNF4α</i>	350	-	-	-	-

Sản phẩm RT – PCR được kiểm tra, đánh giá bằng điện di trên gel agarose 1.5%. Kết quả chạy điện di như sau:



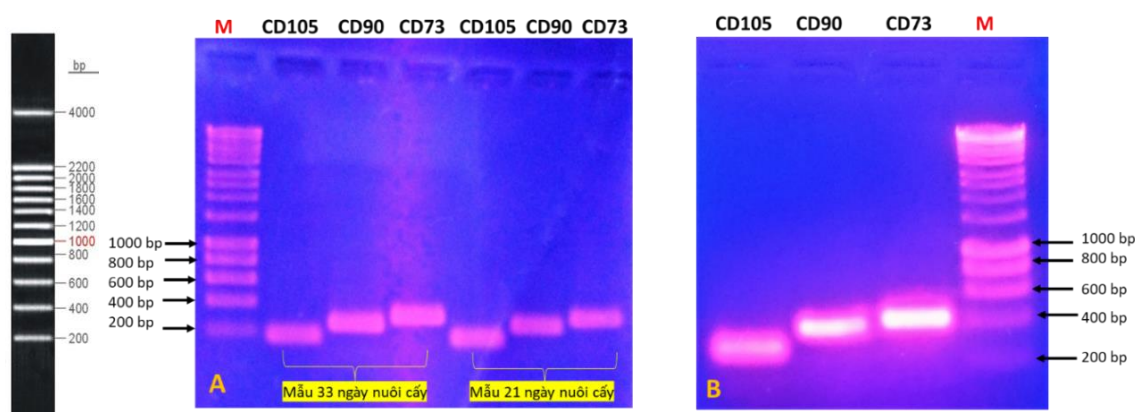
Hình 3.19. Kết quả điện di với các chỉ thị ở lần cấy chuyên 20

M: thang chuẩn DNA 100 bp (Thermo Scientific).

Từ bảng 3.6 và hình 3.19 cho thấy, *CD34* là chỉ thị của TBG máu không biểu hiện ở TBG phân lập được, trong khi đó các chỉ thị đặc trưng cho TBGTM là: *CD105*, *CD90*, *CD73* đều dương tính. Điều này chứng tỏ rằng dòng tế bào thu được không có lẫn TBG máu. Kết quả này được đưa ra phù hợp với các thí nghiệm tương tự với Mennan và cộng sự (2013) khi phân lập từ các vùng khác nhau của mẫu dây rốn [102]. Ngoài ra các chỉ thị của TBG phôi (Embryonic stem cells) như: *Oct-1*, *Eras* cũng cùng được biểu hiện. *GATA4* là một trong những yếu tố phiên mã tham gia vào quá trình hình thành và phát triển của các cơ quan có nguồn gốc từ trung bì cũng được biểu hiện. Một trường hợp lưu ý trong thí nghiệm này là có sự biểu hiện của chỉ thị *CD86*. *CD86* được biết đến là một protein biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên có tác dụng kích hoạt tế bào T trong cơ thể bằng việc cung cấp các tín hiệu đồng kích thích. Với việc có mặt của *CD86* trên, trong các lần thí nghiệm sau chúng tôi sẽ cần đánh giá phân tích thêm ở các mẫu khác.

Khi dùng tế bào HepG2, một dòng tế bào ung thư gan, làm mẫu đối chứng, có những chỉ thị đặc trưng cho tế bào gan như *ALB*, *HNF4 α* , *G6P* được biểu hiện, trong khi đó ở mẫu TBGTM sau phân lập thì kết quả cho thấy những chỉ thị trên không biểu hiện. Chúng tôi đã phân tích RT –PCR mẫu TBGTM đang nuôi cấy và ra kết không có bất cứ dấu hiệu về các chỉ thị đặc trưng nào cho tế bào gan. Vì vậy, để phục vụ cho các thí nghiệm biệt hóa sau này, nguồn TBGTM chúng tôi đang nuôi cấy hoàn toàn có thể dùng được.

Ở cả hai lô tế bào trước đông lạnh và sau giải đông, chúng tôi đều phân tích biểu hiện các chỉ thị đặc trưng cho TBGTM là: *CD105*, *CD90*, *CD73*. Kết quả được thể hiện ở hình 3.20.



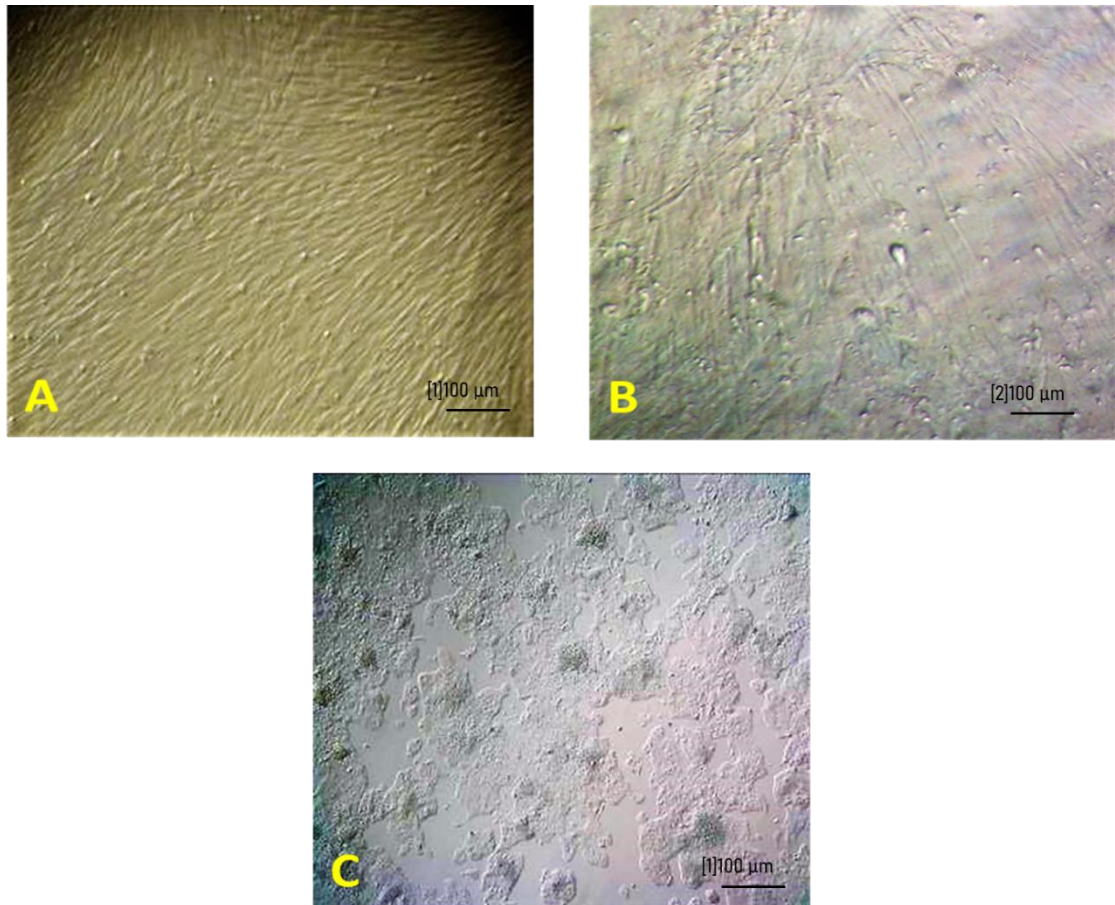
Hình 3.20. Kết quả điện di với các chỉ thị *CD105*, *CD90*, *CD73* của mẫu tế bào trước đông lạnh, nuôi cấy sau 33 ngày và 21 ngày từ lúc phân lập (A), mẫu tế bào sau giải đông (B) (Thang chuẩn DNA 200 bp).

Quan sát cả hai hình ảnh, chúng tôi nhận thấy, các băng điện di đều rất rõ, đều và đẹp, điều này chứng tỏ, trong thí nghiệm này của chúng tôi, quá trình đông lạnh hay tác động của DMSO trong môi trường đông lạnh không ảnh hưởng đến tính ổn định của các chỉ thị bề mặt đặc trưng của TBGTM cuống rốn.

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

3.3.1. Biệt hóa bằng DMSO

TBG cuống 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 (Hình 3.21A, Hình 3.21B), mặc dù vậy, khi so sánh với với tế bào ung thư gan HepG2 thì vẫn chưa có sự tương đồng (Hình 3.21C).



Hình 3.21. Hình thái của tế bào (P3) trước và khi xử lý bằng DMSO 1% sau 30 ngày và so sánh với tế bào HepG2 (Độ phóng đại 40X)

A) tế bào trước khi xử lý DMSO; B) tế bào ngày thứ 30 sau xử lý DMSO

1. tế bào HepG2 ngày thứ 3 sau cấy chuyển

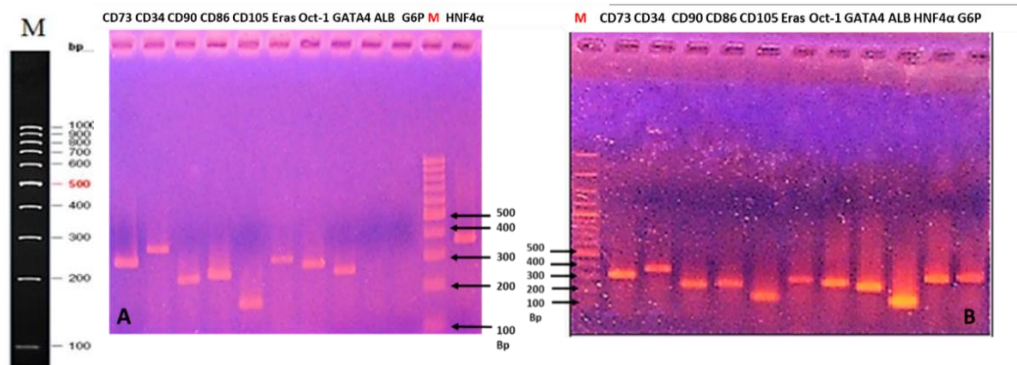
Cả 2 dòng TBG trước và sau khi xử lý DMSO được đánh giá qua sự biểu hiện của các chỉ thị phân tử bằng kỹ thuật RT-PCR. Các chỉ thị phân tử trong TBG ở bảng 2.1 được tiến hành kiểm tra và những kết quả biểu hiện của các chỉ thị được thống kê lại ở bảng 3.7. Ngoài các chỉ thị liên quan đến TBG được kiểm tra đánh giá, để đánh giá hiệu quả của quá trình biệt hóa bằng DMSO thì biểu hiện của các chỉ thị liên quan đến tế bào gan là *HNF4α*, *G6P* và *ALB* được tập trung phân tích.

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 chỉ thị phân tử 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%	
CD73	308	+	+	+	+	+

CD34	367	+	+	+	+	+
CD86	290	+	+	+	+	+
CD90	265	+	+	+	+	+
CD105	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	-	-	-	-	+

Qua kết quả ở 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. Mặc dù biểu hiện *HNF4 α* có tương đồng với kết quả biểu hiện ở nhóm tế bào ung thư gan HepG2 đem cùng phân tích. Tuy nhiên, các chỉ thị *G6P* hay *ALB* thì lại không biểu hiện ở các lô thí nghiệm biệt hóa bằng DMSO (Hình 3.22A), trong khi 2 chỉ thị này thể hiện rõ ở tế bào HepG2 (Hình 3.22B). Sự xuất hiện của *HNF4 α* được cho là sẽ kích thích các gen liên quan khác đến quá trình biệt hóa thành tế bào gan.



Hình 3.22. Biểu hiện chỉ thị phân tử của tế bào biệt hóa bằng DMSO 1% sau 30 ngày (A) và so sánh với tế bào HepG2 (B) (Thang chuẩn 100 bp)

Việc kết quả RT-PCR có biểu hiện CD34 trong mẫu TBGTM trước khi xử lý biệt hóa bằng DMSO là một trường hợp không phổ biến. Cần được nghiên cứu đánh giá trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ở tế bào trước xử lý, chỉ thị *HNF4 α* hoàn toàn không biểu hiện. Kết quả này là đồng nhất với các nghiên cứu về xử lý biệt hóa, tuy nhiên chỉ thị *HNF4 α* đã được

biểu hiện sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả đã chứng minh *HNF4α* một yếu tố phiên mã trong quá trình tạo tế bào gan đã được hoạt hóa trong TBG dưới sự tác động của DMSO nồng độ 1%. Và *HNF4α* qua cơ chế sẽ kích thích sự biểu hiện của các gen khác liên quan đến tế bào gan. Như thế, việc tạo thành tế bào gan hoàn chỉnh bằng việc biệt hóa TBG cuống rốn là có cơ sở khoa học. Giải thích cho việc phải đến sau 4 tuần nuôi cấy kể từ khi tế bào được xử lý biệt hóa, thì chỉ thị phân tử của tế bào gan là *HNF4α* mới được thể hiện là do hiệu suất chưa đủ lớn của quá trình hoạt hóa biểu hiện gen bằng DMSO trong TBGTM. Điều này dẫn đến chưa nhiều tế bào biểu hiện gen *HNF4α* xuất hiện.

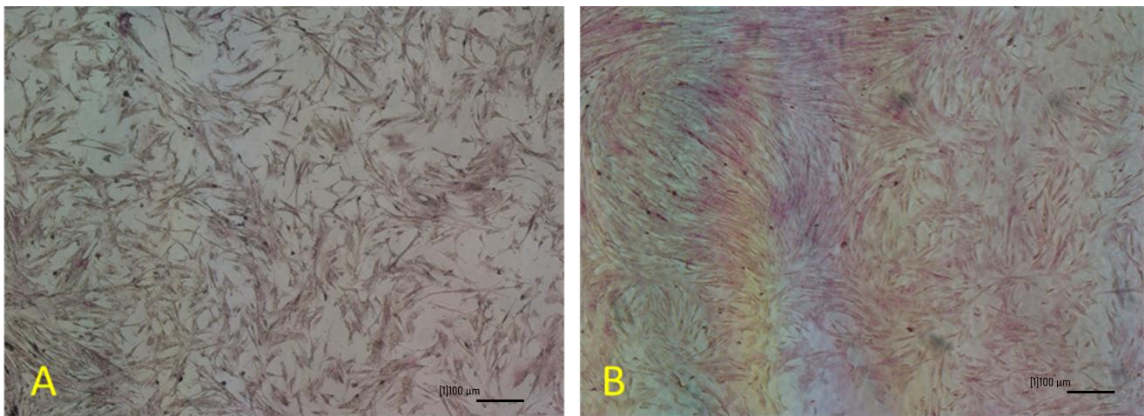
Kết quả cũng cho thấy hai gen chỉ thị đặc trưng cho tế bào gan là *G6P* và *ALB* cũng không được biểu hiện. Kết quả này có thể do thời gian protein *HNF4α* biểu hiện sau khi xử lý biệt hóa bằng DMSO chưa đủ để cho nó có thể tác động và kích hoạt biểu hiện tới những gen liên quan. Hoặc việc hoạt hóa tế bào cần có quá trình để tế bào gan trưởng thành và những gen liên quan đến chức năng gan ở giai đoạn muộn được kích hoạt. Do đó, để tế bào sau xử lý bằng DMSO biểu hiện được những gen chỉ thị này, quá trình nuôi cấy cần tiếp tục nghiên cứu theo dõi với những mốc thời gian dài hơn 4 tuần và có thể phải bổ sung các yếu tố hoạt hóa để tế bào thành thực chức năng.

Hiện nay, vẫn chưa có những công bố chính thức về khả năng biệt hóa thành tế bào gan trưởng thành nhờ kích hoạt gen *HNF4α* bằng sử dụng DMSO. Các nghiên cứu này mới đang chỉ dừng lại ở mức độ tạo tế bào giống tế bào gan. Theo thông báo của Du và cộng sự (2018), việc biệt hóa từ TBG thành tế bào gan ở người có thể có được bằng cách sử dụng một phương pháp khá đơn giản và hiệu quả là sử dụng kết hợp với các phân tử nhỏ khác với DMSO. Quá trình biệt hóa đảm bảo tạo ra tế bào có đặc điểm đặc trưng của tế bào gan [79].

Đánh giá khả năng tích trữ glycogen của tế bào sau biệt hóa bằng phương pháp nhuộm Periodic acid Schiff (PAS). Đây là phương pháp nhuộm miễn dịch được sử dụng để nhận diện các polysaccharide bao gồm glycogen, glycoproteins và glycolipids trong các tế bào và mô cơ quan [125]. Glycogen chiếm khoảng 10% trọng lượng gan và sự tích tụ Glycogen trong gan đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa đường huyết của cơ thể [126]. Trong nghiên cứu này, phương pháp nhuộm

PAS được sử dụng để nhận diện glycogen có mặt trong tế bào nhằm đánh giá hiệu quả biệt hóa tế bào gan từ TBGTM.

Kết quả nghiên cứu cho thấy TBGTM cuống rốn không được biệt hóa có dạng dài và nhân tế bào kéo dài theo chiều dài của tế bào ở một thể đồng nhất. Các thể polysaccharide đều được nhuộm đồng đều trên vùng xung quanh tế bào (Hình 3.23A). Trong khi đó ở các lô tế bào biệt hóa bằng DMSO đã cho thấy khả năng dự trữ glycogen trong tế bào sau 3 tuần thể hiện các tế bào bắt màu thuốc nhuộm rõ hơn (Hình 3.23B).



Hình 3.23. Kết quả nhuộm PAS

A) TBGTM cuống rốn (P3) không biệt hóa; B) TBGTM cuống rốn biệt hóa sau 3 tuần với DMSO (Độ phóng đại 100X)

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

Sự biệt hóa tuần tự theo quá trình bất chức sự phát triển của gan gây ra sự thay đổi hình thái dần dần từ hình dạng giống như nguyên bào sợi đến hình dạng giống như hình bầu dục, tròn và cuối cùng là hình đa giác.

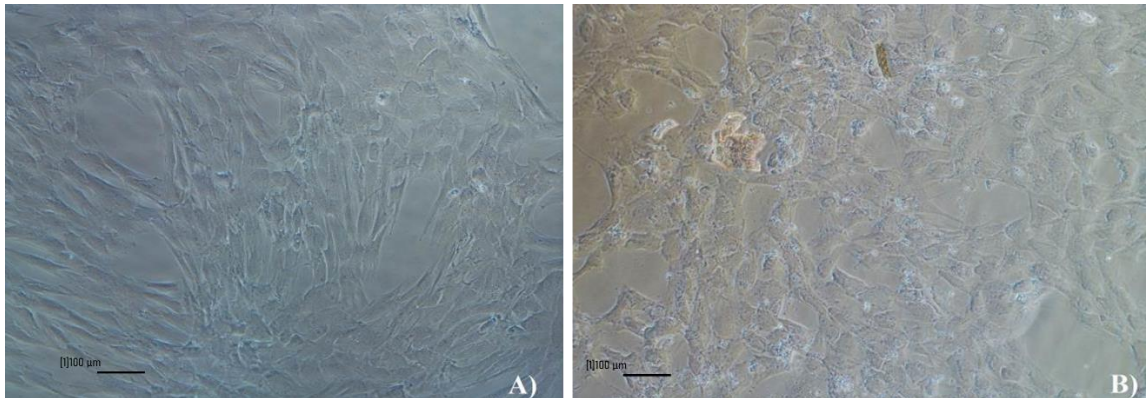
Từ sau mỗi tuần, các tế bào đã được kiểm tra bằng kính hiển vi đảo ngược (vật kính 10X đến 40X) để đánh giá hình thái tế bào (xuất hiện dạng thay đổi khác với dạng nguyên bào sợi), khả năng sống của tế bào và khả năng nhiễm vi sinh vật.

Sau khi tiếp xúc với môi trường khởi tạo có chứa HGF và FGF-4 (bước khởi đầu), các tế bào dần mất đi các cạnh sắc nét và dần dần bị thu hẹp lại, dẫn đến sự chuyển đổi từ hình thái lưỡng cực nguyên bào sợi sang hình dạng tròn hoặc hình bầu dục (Hình 3.24A).

Sự thay đổi hình thái được phát hiện sớm nhất là vào ngày thứ 7 ở khu vực có mật độ tế bào cao và được truyền vào khu vực có mật độ tế bào thấp, do đó khoảng

70% các tế bào được biệt hóa trở thành hình bầu dục và hình tròn vào cuối quá trình bắt đầu bước vào quá trình thay đổi. Các tế bào bắt đầu có biểu hiện co lại, khác với hình thái TBGTM thông thường. Sự co thắt tế bào chất đã được tiến triển hơn nữa trong bước trưởng thành và hầu hết các tế bào được nuôi trong môi trường biệt hóa biến thành các tế bào tròn nhỏ rất giống với các tế bào hình đa giác (Hình 3.24B).

Mức độ hình thay đổi hình thái ở các tế bào trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu biệt hóa tạo tế bào gan từ TBGTM được công bố trước đây [84].

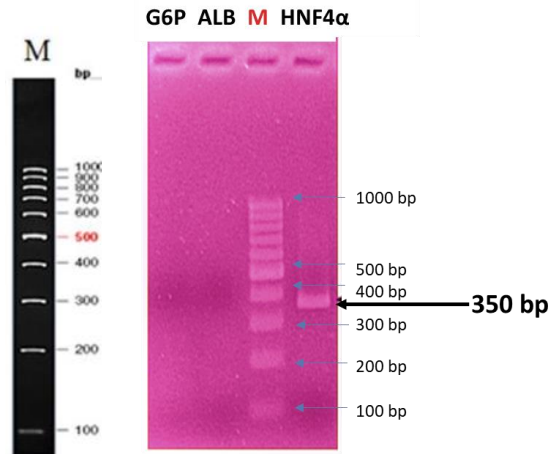


Hình 3.24. Hình thái tế bào biệt hóa bằng tổ hợp HGF, DEX và OSM sau 1 tuần (A) và 2 tuần (B) (Độ phóng đại 100X)

Trong khi nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp kết hợp giữa các tác nhân FGF + HGF + ITS + DEX để biến đổi các tế bào gan tiền thân thành tế bào gan trưởng thành, nhưng kết quả thu được nhiều không đạt hiệu quả như mong đợi [78]. Một số nhà nghiên cứu đã thêm hỗn hợp FGF + HGF [127] hoặc FGF + HGF + OSM [128] để gây biệt hóa tạo tế bào gan từ TBG. Các đánh giá chức năng tế bào biệt hóa dựa theo các dấu hiệu tế bào gan đặc trưng như khả năng tiết albumin và khả năng tiết urê, lưu trữ glycogen và lipoprotein mật độ thấp. Trong khi đó, một số nghiên cứu khác nhấn mạnh vào khả năng chuyển đổi chức năng gan bằng cách thêm các yếu tố gây cảm ứng [129], tác dụng kết hợp của các tác nhân như DEX, ITS và nicotinamide hoặc chủ yếu tập trung vào việc điều khiển các con đường chuyển hóa đơn lẻ [130]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng HGF với nồng độ 20 ng/mL bổ sung thêm 1 mmol/L Dexamethasone (DEX), huyết thanh bê 15%. Sau 2 tuần nuôi, bổ sung thêm oncostain M (OSM) với nồng độ 20 ng/mL. Các kết quả ban đầu cho thấy hình dạng tế bào giống tế bào gan đã quan sát được ở ngày thứ 7.

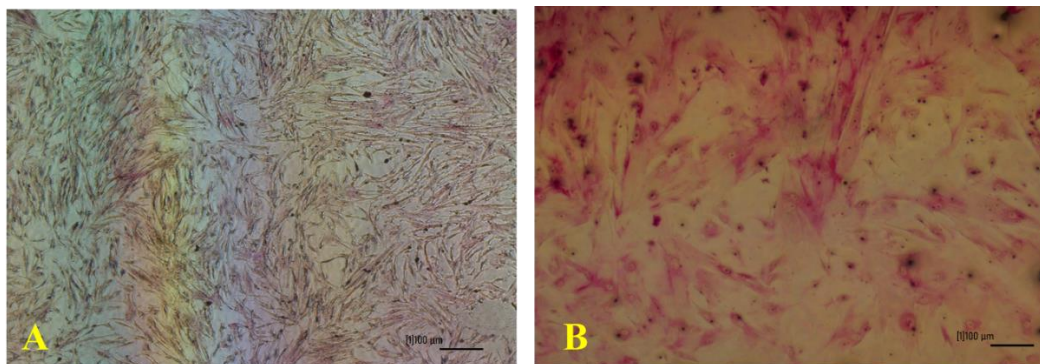
Biểu hiện của tế bào sau khi xử lý được thể hiện trong hình 3.25. Kết quả cho thấy tế bào biểu hiện dương tính với *HNF4α* sau 4 tuần được biệt hóa. Trong khi các

kết quả phân tích RT-PCR trước đó ở các thời điểm 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần đều không biểu hiện. Điều đó cho thấy ban đầu lượng tế bào biệt hóa nhỏ, số lượng RNA không đủ lớn để có thể phát hiện bằng RT-PCR. 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. Kết quả sản phẩm RT-PCR tế bào 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. Các tế bào quan sát có dạng ngắn hơn, các thể glycogen tập trung ở vùng gần nhân tế bào và nhân tế bào chia nhiều thùy. Một số tế bào còn thất rõ có hai nhân ở trong, đây cũng chính là một đặc trưng của tế bào gan là có nhân kép hoặc nhiều nhân tế bào (*Hình 3.26B*). Những đặc trưng này khác so với lô tế bào không được biệt hóa (*Hình 3.26A*).



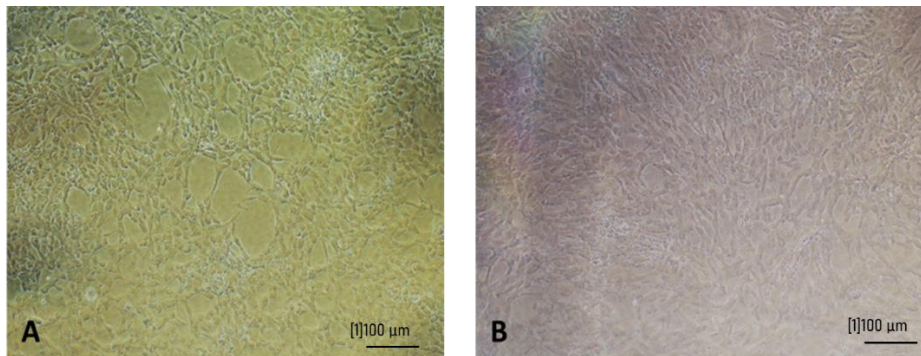
Hình 3.26. Kết quả nhuộm PAS

A) TBGTM cuống rốn (P3) không biệt hóa; B) TBGTM cuống rốn biệt hóa sau 3 tuần với tổ hợp HGF +DEX +OSM (Độ phóng đại 100X)

3.3.3. Biệt hóa bằng tổ hợp HGF, TSA và OSM

Một tổ hợp các chất khác tiếp mà chúng tôi khảo sát đến khả năng biệt hóa tạo tế bào có chức năng gan đó là tổ hợp HGF, TSA và OSM. Tương tự, từ sau mỗi tuần, các tế bào đã được kiểm tra bằng kính hiển vi đảo ngược (vật kính 10X đến 40X) để đánh giá hình thái, khả năng sống của tế bào và khả năng nhiễm vi sinh vật.

Sau khi tế bào tiếp xúc với môi trường có chứa HGF, TSA và OSM, chúng tôi quan sát thấy các tế bào bắt đầu thay đổi hình thái. Những thay đổi đầu tiên được ghi nhận vào ngày thứ 7 sau khi biệt hóa thể hiện ở hình thái tế bào. Các tế bào có biểu hiện co lại, khác với hình thái TBGTM thông thường. Sau khi tiếp tục nuôi cấy trong môi trường biệt hóa, quá trình co ngán tế bào tiếp tục xảy ra, các tế bào có hình thù co lại (Hình 3.27A). Ở tuần thứ 2 sau biệt hóa các tế bào có dạng nguyên bào sợi đa phần chuyển thành các tế bào có dạng hình đa giác, đặc trưng của tế bào gan (Hình 3.27B).

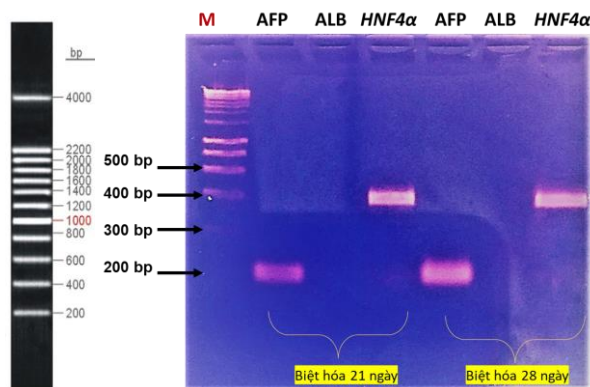


Hình 3.27. Hình thái tế bào xử lý biệt hóa bằng tổ hợp HGF, TSA và OSM sau 1 tuần (A) và 2 tuần (B) (Độ phóng đại 40X)

Cho đến nay, để nghiên cứu tác nhân biệt hóa, một loạt các phương pháp nuôi cấy đã được phát triển nhằm thúc đẩy quá trình biệt hóa TBG trưởng thành thành tế bào gan. Hầu hết các giao thức sử dụng các yếu tố tăng trưởng quan trọng cho sự phát triển hoặc tái tạo gan. Trong số các yếu tố nguy ý trong sự phát triển gan phôi, yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF), được sản xuất bởi các tế bào trung mô tim, được tham gia vào giai đoạn đầu của việc tạo mẫu nội tiết gây ra quá trình định hình chức năng tế bào gan [131]. Oncostatin M (OSM), một thành viên của họ cytokine interleukin-6 được sản xuất bởi các tế bào tạo máu, được vận chuyển đến cơ quan sinh dục ở giai đoạn sơ sinh và dường như có tác động đến quá trình phát triển gan và tạo máu ở thai nhi [132]. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng nhận thấy rằng

corticosteroid, HGF và EGF đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sinh học gan [133], [134]. Những thông báo khoa học đã cho thấy, HGF là một yếu tố tăng sinh mạnh mẽ hơn cho tế bào gan của người trong nuôi cấy *in vitro* hơn so với EGF và đóng một vai trò quan trọng trong phát triển và tái tạo gan ở người [135]. Thêm vào đó, với sự bổ sung của Trichostantin A, một tác nhân gây biệt hóa định hướng tế bào gan được đánh giá có hiệu quả cao [136].

Phân tích bằng RT-PCR với các chỉ thị liên quan đến tế bào gan là *AFP* (alpha-fetoprotein), *ALB* (albumin), *HNF4 α* để đánh giá hiệu quả của quá trình xử lý. 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 *HNF4 α* từ 2 tuần sau khi tiếp xúc với môi trường có bổ sung HGF, TSA và OSM (Hình 3.28). Bên cạnh *HNF-4 α* , *AFP* mã hóa cho một loại protein ở tế bào chất có tên là alpha fetoprotein. Protein này được sản sinh bởi tế bào gan trong suốt quá trình bào thai và khi được biểu hiện trong cơ thể người trưởng thành, nó thường xuyên có liên quan đến gan. So với tế bào trước khi biệt hóa, trong tế bào hai chỉ thị này hoàn toàn không biểu hiện, tuy nhiên sau 3 tuần và sau 4 tuần biệt hóa hai chỉ thị đã được biểu hiện. Tuy nhiên, một chỉ thị liên quan đến tế bào gan khác là *ALB* vẫn chưa được biểu hiện.



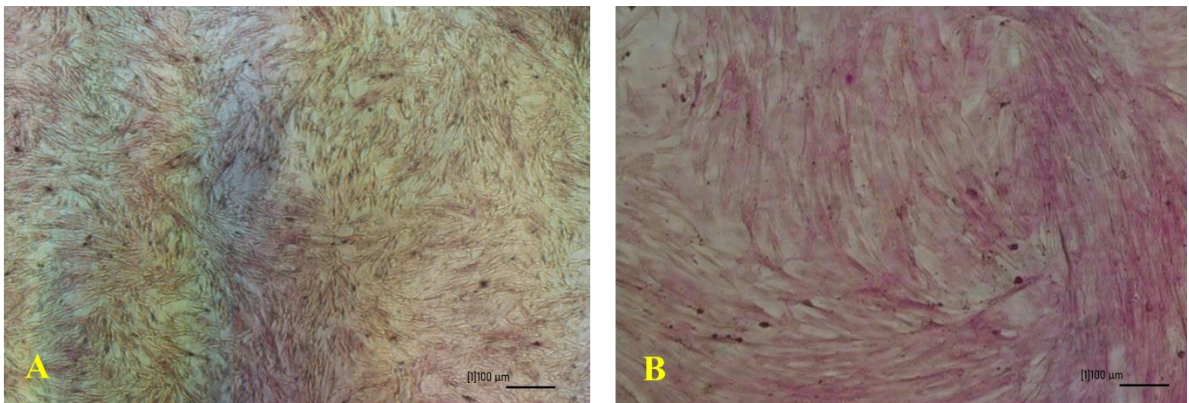
Hình 3.28. Điện di đồ RT-PCR mẫu nuôi cấy 4 tuần sau biệt hóa bằng tổ hợp của HGF, TSA và OSM (M: Marker DNA 200 bp)

Đoàn Chính Chung và cộng sự (2013) khi nghiên cứu biệt hóa TBGTM từ dây rốn, sử dụng thay đổi môi trường nuôi cấy bằng bổ sung tổ hợp các chất HGF, FGF-4, OSM, dexamethasone, nicotiamide và ITS. Nhóm tác giả công bố, tế bào biệt hóa đã biểu hiện chỉ thị *AFP* và *ALB* sau 21 ngày biệt hóa khi phân tích RT-PCR. Sử dụng Real-time RT-qPCR để phân tích, nhóm tác giả còn phát hiện các chỉ

thị này không biểu hiện nhiều trong 7 ngày biệt hóa đầu, tuy nhiên tế bào biệt hóa biểu hiện *ALB* mức độ tăng dần từ 7 ngày đến 21 ngày. Trong khi đó với chỉ thị *AFP*, tế bào biểu hiện tăng lên từ ngày 7 đến ngày 14, nhưng lại giảm dần từ ngày 14 đến ngày 21, liên quan đến quá trình biệt hóa [89].

Năm 2014, Nguyễn Thị Kim Nguyễn và cộng sự cũng khảo sát khả năng biệt hóa *in vitro* của TBGTM từ mô mỡ thành tế bào giống tế bào gan bằng cách môi trường có bổ sung HGF, FGF, nicotiamide, OSM, dexamethasone và ITS. Nhóm nghiên cứu đã chứng minh được TBGTM từ mô mỡ có khả năng biệt hóa thành tế bào giống tế bào gan, biểu hiện hình thái này tương tự với tế bào nhu mô gan, có khả năng dự trữ glycogen và có biểu hiện cao các gen đặc trưng cho tế bào gan như: *CK18*, *AFP*, *CK19*, *ALB* so với lô đối chứng không biệt hóa. Cụ thể từ ngày thứ 5 sau biệt hóa, tế bào đã biểu hiện *AFP*, điều này có thể khẳng định tế bào được xử lý biệt hóa thành tế bào có chức năng gan đang trải qua giai đoạn sớm của quá trình tạo tế bào gan trưởng thành. Với chỉ thị *ALB*, tế bào biểu hiện từ ngày 21 sau biệt hóa [90].

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 (Hình 3.29B). TBGTM cuống rốn không được biệt hóa vẫn duy trì có dạng dài đồng nhất và các thể polysaccharide đều được nhuộm đồng đều trên vùng xung quanh tế bào (Hình 3.29A).



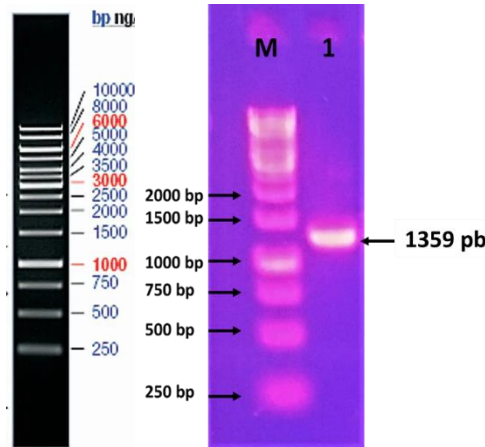
Hình 3.29. Kết quả nhuộm PAS

A) TBGTM cuống rốn (P3) không biệt hóa; B) TBGTM cuống rốn biệt hóa sau 3 tuần với tổ hợp HGF + TSA + OSM (Độ phóng đại 100X)

3.3.4. Biệt hóa bằng chuyển gen *HNF4 α*

3.3.4.1. Thiết kế vector mang gen *HNF4 α* biến nạp vào TBG

Trình tự mã hóa của gen *HNF4 α* và cặp môi để khuếch đại trình tự gen mã hóa *HNF4 α* đều được đặt tổng hợp theo trình tự đặc hiệu từ công ty TNHH-MTV sinh hóa Phù Sa. Trình tự này mã hóa của gen *HNF4 α* được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi *NheI-HNF4 α -F* (Môi xuôi) và *PacI-HNF4 α -R* (Môi ngược). Sau khi PCR sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0% (Hình 3.30).

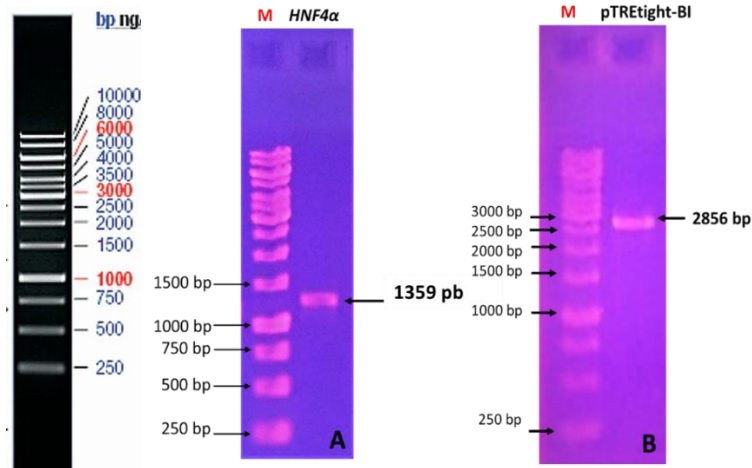


Hình 3.30. Điện di đồ kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại CDS gen *HNF4 α*

M: Thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific); 1: Sản phẩm PCR *HNF4 α*

Hình ảnh điện di cho thấy trên kênh sản phẩm chỉ xuất hiện một băng DNA duy nhất trong khoảng 1000 bp đến 1500 bp, có kích thước vào khoảng gần 1,4 kb tương ứng với kích thước tính toán của gen *HNF4 α* khi thiết kế môi (tổng chiều dài 1.359 bp). Sản phẩm băng DNA rõ nét, có độ đặc hiệu cao và không có dấu hiệu đứt gãy hay nhiễu, do vậy có thể sử dụng sản phẩm PCR này chuyển vào vector pTRE-Tight-BI.

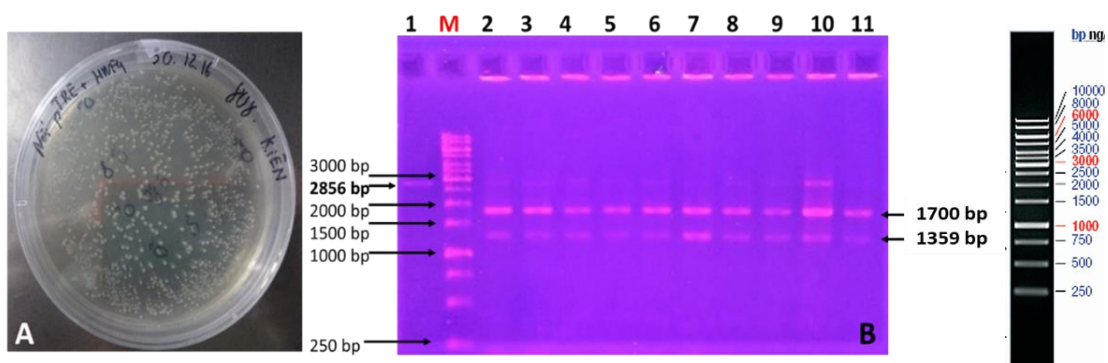
Sau phản ứng cắt, điện di kiểm tra tinh sạch sản phẩm cắt trên gel Agarose đối với 2 mẫu *HNF4 α* và pTRE-Tight-BI với kích thước lần lượt khoảng 1.359 bp và 2.856 bp. Bước tinh sạch sử dụng bộ QIAquick® Gel Extraction Kit (Hãng QIAGEN), kiểm tra điện di trên gel agarose 1,0%.



Hình 3.31. Kết quả tinh sạch sản phẩm *HNF4α* và pTRE-Tight-BI cắt bằng enzyme *NheI* và *PacI*: A) *HNF4α*; B) pTRE-Tight-BI (Thang chuẩn DNA 1 kb Thermo Scientific)

Hình 3.31 cho thấy sản phẩm cắt của *HNF4α* và pTRE-Tight-BI sau khi điện di cho hai băng vạch với kích thước tương ứng đúng như lý thuyết. Đồng thời, băng DNA rõ nét, có kích thước tương ứng với dự đoán và không có dấu hiệu đứt gãy. Qua hình ảnh điện di có thể nhận định quá trình tinh sạch đã thu được sản phẩm cắt enzyme có chất lượng đáp ứng cho thí nghiệm tiếp theo. Sản phẩm được cắt và tinh sạch với băng vạch quan tâm sẽ được dùng để làm nguyên liệu nối tiếp theo.

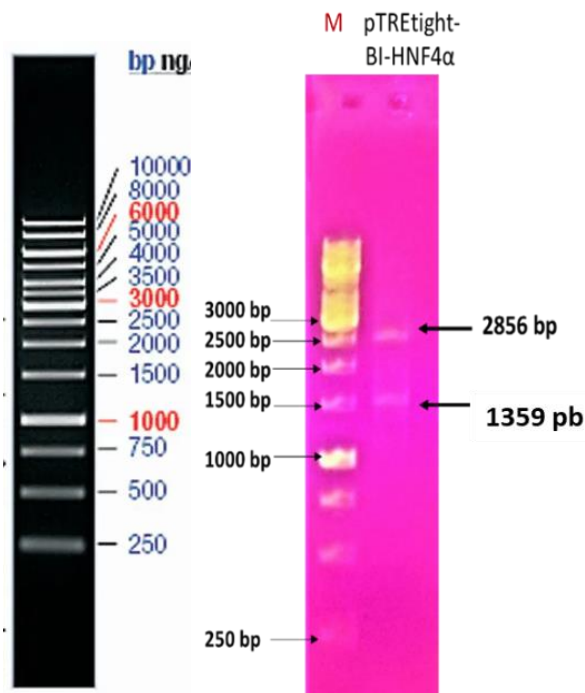
Để kiểm tra xem vector pTRE-Tight-BI-*HNF4α* có nối và biến nạp thành công vào *E.coli* hay không, chúng tôi sử dụng phương pháp PCR khuẩn lạc với môi *NheI* – *HNF4α-F* (Môi xuôi) và *PacI* – *HNF4α-R* (Môi ngược). Điện di kiểm tra sản phẩm PCR thấy có băng *HNF4α* (Hình 3.32).



Hình 3.32. Đã biến nạp sản phẩm nối pTRE-Tight-BI-*HNF4α* vào *E.coli* *DH5α* (A) và điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc (B)

Đường chạy 1: pTRE-Tight-BI đối chứng; M: Thang chuẩn DNA 1kb; đường chạy số 2 đến 11 sản phẩm PCR khuẩn lạc sau biến nạp pTRE-Tight-BI-*HNF4α*

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc thấy băng *HNF4 α* (1.359 bp). Để đảm bảo chắc chắn hơn, chúng tôi tiếp tục nhân sinh khối các khuẩn lạc này trong môi trường LB lỏng có ampiciline để tách chiết plasmid, rồi cắt plasmid vừa tách được bằng hai enzyme *NheI* và *PacI*. Hai enzyme *NheI* và *PacI* được lựa chọn do nó vừa nằm trong vùng MCS – Multiple Cloning Site của vector lại vừa nằm trên trình tự thiết kế môi của đoạn gen ngoại lai (*HNF4 α*). Điện di kiểm tra sản phẩm cắt, nếu nối và biến nạp thành công thì theo lý thuyết sẽ tạo ra 2 băng có kích thước 1.359 bp và 2.856bp.



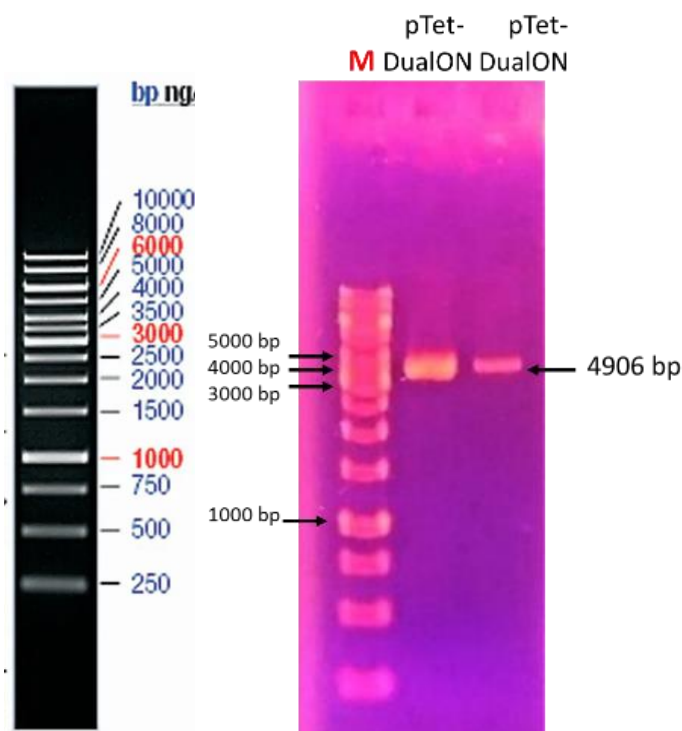
Hình 3.33. Kết quả sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* bằng *PacI* và *NheI*
(Thang chuẩn DNA 1 kb Thermo Scientific)

Điện di sản phẩm PCR colony và tách plasmid sau khi đã biến nạp sản phẩm nối T4 giữa *HNF4 α* và pTRE-Tight-BI, kết quả được thể hiện ở hình 3.33 cho thấy: đã tạo thành công vector pTRE-Tight-BI- *HNF4 α* bằng phương pháp tổng hợp gen và nối qua vector.

Với mục đích nghiên cứu chuyển biệt hóa TBGTM cứng rón thành tế bào giống tế bào gan thông qua phương pháp biểu hiện quá mức *HNF4 α* , chúng tôi tạo ra vector pTRE-*HNF4 α* -ON có cơ chế điều hòa biểu hiện gen nhờ cảm ứng Dox giống với hệ thống Tet-On. Cơ chế của vector này như sau: Khi vector này được chuyển vào trong tế bào, tế bào sẽ biểu hiện Tet-On Advanced và protein phát huỳnh quang

màu xanh lá cây ZsGreen1. Protein ZsGreen1 đóng vai trò chỉ thị cho sự chuyển gen *HNF4 α* thành công vào tế bào. Khi có mặt của chất cảm ứng Dox, protein Tet-On Advanced thay đổi cấu trúc và bám đặc hiệu vào vị trí đáp ứng của nó trên promoter P_{tight} , giúp hoạt hóa promoter này làm cho *HNF4 α* ở phía hạ nguồn được phiên mã.

Đầu tiên, vector pTet-DualON được nhân lên với số lượng lớn bằng phương pháp biến nạp sốc nhiệt bằng vi khuẩn *E.coli DH5 α* sẽ được tách plasmid bằng bộ kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo) để thu DNA. Vector sẽ được tạo rỗng để nhận vector pTRE-Tight-BI sau khi được chèn đoạn gen *HNF4 α* bằng 2 enzyme *NsiI* và *PacI* (Hình 3.34).

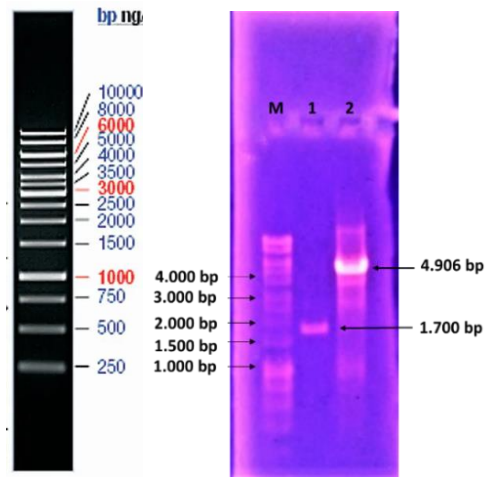


Hình 3.34. Kết quả cắt vector pTet-DualON bằng 2 enzyme *NsiI* và *PacI*

(Thang chuẩn DNA 1 kb Thermo Scientific)

Bước tiếp theo, DNA plasmid pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* có chứa gen *HNF4 α* cũng được cắt bằng cặp enzyme *NsiI* và *PacI* để tách đoạn gen *HNF4 α* .

Sử dụng bộ QIAGEN Gel Extraction Kit để tinh sạch sản phẩm cắt pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* 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-*HNF4 α* và pTet-DualON tương ứng lần lượt khoảng 1.700bp và 4.906bp (Hình 3.35).



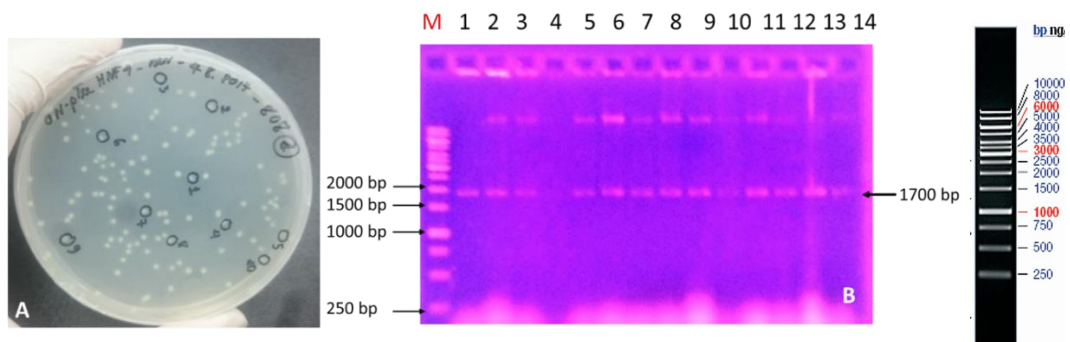
Hình 3.35. Kết quả tinh sạch sản phẩm pTRE-Tight-BI-*HNF4α* và sản phẩm cắt pTet-DualON bằng 2 enzyme *NsiI* + *PacI*

M: Thang chuẩn 1kb Thermo Scientific; 1: pTre-Tight-BI-*HNF4α*; 2: pTet-DualON + *PacI* + *NsiI* tinh sạch

Nối hai sản phẩm cắt bằng T4 ligase để chuyển đoạn DNA *HNF4α* sang vector pTet-DualON để được vector cuối pTRE-*HNF4α*-ON. Sản phẩm nối cũng được bất hoạt enzyme tiến hành biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli DH5α* đã được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh Ampicillin 50 mg/mL để chọn dòng, nuôi sinh khối số lượng lớn và tách DNA plasmid.

Kiểm tra sản phẩm nối và biến nạp bằng PCR colony (PCR khuẩn lạc) với môi *NsiI* – *HNF4α*-F (Mũi xuôi) và *PacI* – *HNF4α* (Mũi ngược). Điện di kiểm tra sản phẩm PCR thấy có băng pTRE-Tight-BI-*HNF4α* thì biến nạp thành công.

Kết quả tách tách plasmid và điện di kiểm tra thể hiện trong hình 3.36.

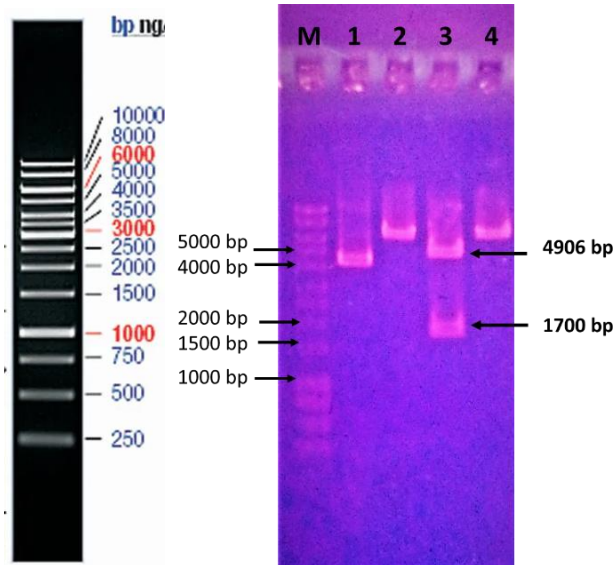


Hình 3.36. Đã biến nạp sản phẩm nối pTRE-*HNF4α*-ON vào *E.coli DH5α* (A) và điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc (B)

M: Thang chuẩn DNA 1 kb; 1: pTRE-Tight-BI-*HNF4α* đối chứng; 2-14: sản phẩm PCR plasmid pTRE-*HNF4α*-ON

Chọn plasmid ở hình 3.36 có kích thước phù hợp (có băng pTRE-Tight-BI-*HNF4 α*), chúng tôi tiếp tục nhân sinh khối khuẩn lạc này trong môi trường LB lỏng có Ampiciline 50 mg/mL để tách chiết plasmid, rồi cắt plasmid vừa tách được bằng hai enzyme *NsiI* và *PacI*. Chúng tôi cũng kiểm tra sản phẩm cắt plasmid với từng enzyme *NsiI*, *PacI* riêng rẽ (Hình 3.37).

Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng hai enzyme *PacI* và *NsiI* xuất hiện băng 1.700 bp của pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* .



Hình 3.37. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pTRE-*HNF4 α* -ON bằng enzyme
M: Thang chuẩn DNA 1 kb; 1: plasmid; 2: plasmid + *PacI*; 3: Plasmid + *NsiI* +
PacI; 4: Plasmid + *NsiI*

Kết quả điện di đồ cho thấy các băng DNA đều rất đặc hiệu. Xử lý với tổ hợp enzyme cắt *NsiI* + *PacI* với dòng plasmid được lựa chọn từ khuẩn lạc rồi riêng lẻ trên đĩa biến nạp cho kết quả ra hai băng có kích thước tương đồng với băng của vector và DNA lai ghép (đường chạy số 3). Băng trên có độ lớn khoảng 4.900 bp toàn phù hợp với kích thước của vector pTet-DualON thương mại thông thường. Trong khi băng dưới có độ dài khoảng gần 1.700 bp hoàn toàn phù hợp với kích thước của pTRE-Tight-BI-*HNF4 α* có chứa gen *HNF4 α* .

Ngoài ra, khi so sánh sản phẩm cắt plasmid với từng enzyme *PacI*, *NsiI* riêng rẽ thì đều cho kết quả là các băng cùng kích thước (đường chạy số 2 và 4), và băng này lớn hơn băng của plasmid khi chưa cắt bởi enzyme.

Kết quả giải trình tự gen (phụ lục 6) và tiến hành dịch mã bằng phần mềm chuyên dụng ra các axit amin theo trình tự thu được cho phép khẳng định rằng đã cải

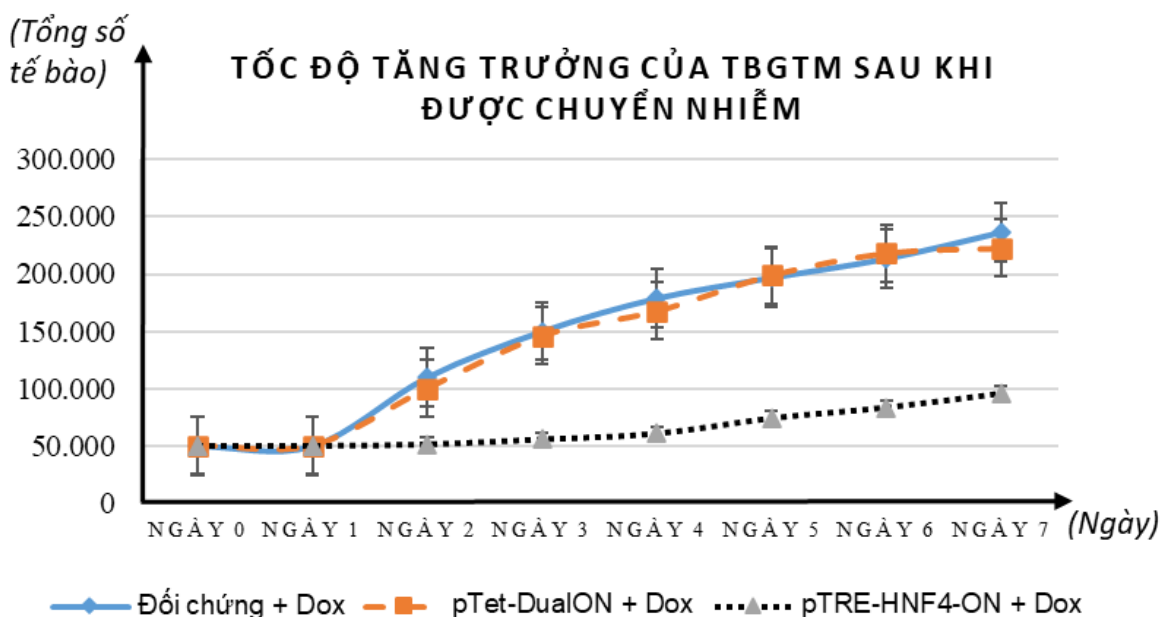
tiến thành công vector sử dụng hệ thống cảm ứng biểu hiện gen Tet-ON là pTRE-*HNF4 α* -ON tái tổ hợp mang CDS của gen *HNF4 α* có trình tự đúng, có trình tự mã khởi đầu và kết thúc phù hợp với thiết kế phục vụ cho việc tiến hành chuyển chuyển gen biểu hiện trong TBGTM cuống rốn.

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

Vector biểu hiện pTRE-*HNF4 α* -ON tái tổ hợp chứa gen *HNF4 α* được tiến hành đưa vào trong TBGTM cuống rốn dựa vào bộ kit Lipofectamine® LTX DNA Transfection sản xuất bởi Invitrogen (Mỹ). Các đĩa nuôi được quan sát, phân tích sau 2 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần.

Để đánh giá ảnh hưởng của môi trường biệt hóa tế bào chức năng gan và tác động của vector tái tổ hợp pTRE-*HNF4 α* -ON với vai trò của Dox, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên 3 nhóm tế bào. Nhóm đầu tiên là TBGTM chỉ chuyển nước tinh khiết (ddH₂O) làm đối chứng âm, nhóm thứ hai là TBGTM chuyển với vector pTet-DualOn và nhóm thứ ba là TBGTM chuyển với vector tái tổ hợp pTRE-*HNF4 α* -ON. Tất cả môi trường đều được bổ sung Dox ở nồng độ 200 ng/mL.

Sau khi chuyển nhiễm, 2 nhóm đầu tiên được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy TBGTM, trong khi nhóm thứ ba được nuôi cấy với môi trường biệt hóa tế bào gan. Kết quả cho thấy, sau khi chuyển nhiễm, không có tế bào chết đáng kể nào được ghi nhận, tế bào ở các nhóm 1 và 2 tiếp tục phát triển đi vào pha log. Tuy nhiên, nhóm 3 cho thấy tốc độ tăng trưởng thấp hơn đáng kể so với 2 nhóm trên (Hình 3.38).

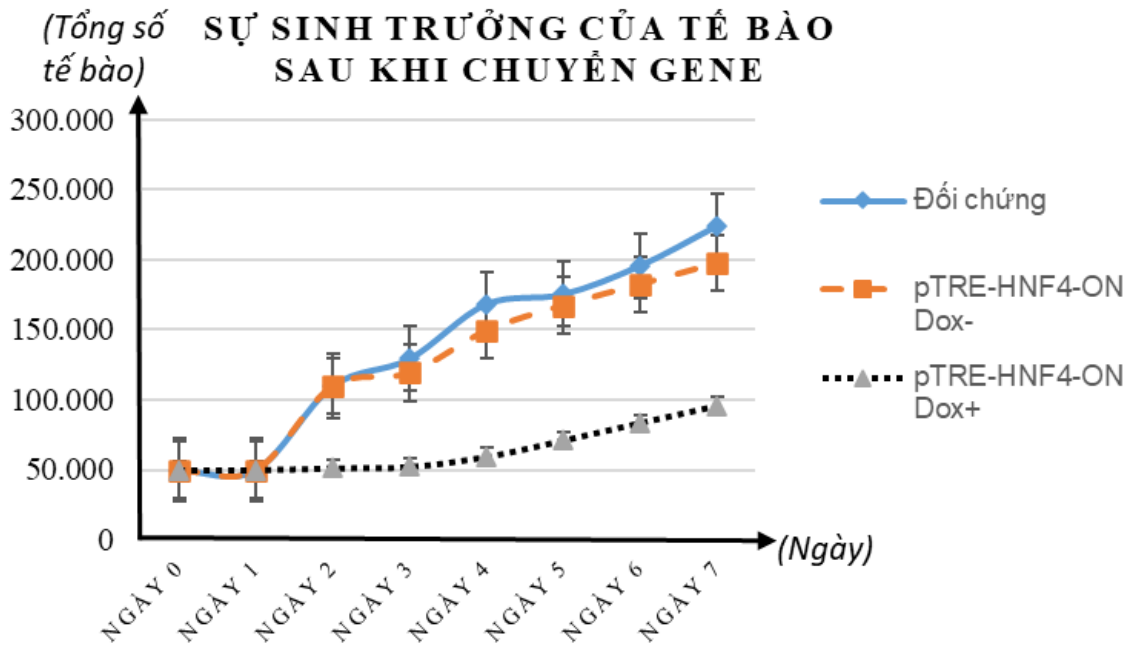


Hình 3.38. Tốc độ tăng trưởng của TBGTM sau khi được chuyển nhiễm

Hình 3.38 cho thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể về đường cong tăng trưởng và hình thái của TBGTM của nhóm 1 và 2. Như vậy hệ thống Tet-ON không ảnh hưởng đến khả năng sống, đặc tính của tế bào gốc và không gây ra sự khác biệt của TBGTM trong điều kiện nuôi cấy bình thường. Mặc dù độc tính của Dox đã được tuyên bố là tương quan trực tiếp với nồng độ và có thể gây độc ở nồng độ thấp, Lee và cộng sự năm 2013 đã chỉ ra rằng Dox không có chất độc đối với TBGTM [137]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tất cả môi trường đều được bổ sung Dox ở nồng độ 200 ng/mL. Theo đề xuất của hãng Clontech, nồng độ 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ Dox cần thiết cho cảm ứng của hệ thống Tet-ON thấp hơn nhiều so với mức độ độc cho nuôi cấy tế bào hoặc nghiên cứu chuyển gen [8].

Mặt khác, ở nhóm TBGTM chuyển nhiễm với pTRE-*HNF4 α* -ON. 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. Môi trường biệt hóa tế bào chức năng gan gan vẫn được cung cấp 15% FBS có chứa yếu tố tăng trưởng, điều này làm cho TBGTM vẫn phát triển với tỷ lệ thấp hơn so với TBGTM bình thường, trong khi ở các phương pháp phân lập khác sử dụng môi trường không có huyết thanh tế bào ngừng phát triển và chỉ thay đổi đặc tính. Việc biểu hiện quá mức gen *HNF4 α* bằng cách sử dụng pTRE- *HNF4 α* -ON dẫn đến sự thay đổi đáng kể về hình thái và biểu hiện gen của TBGTM.

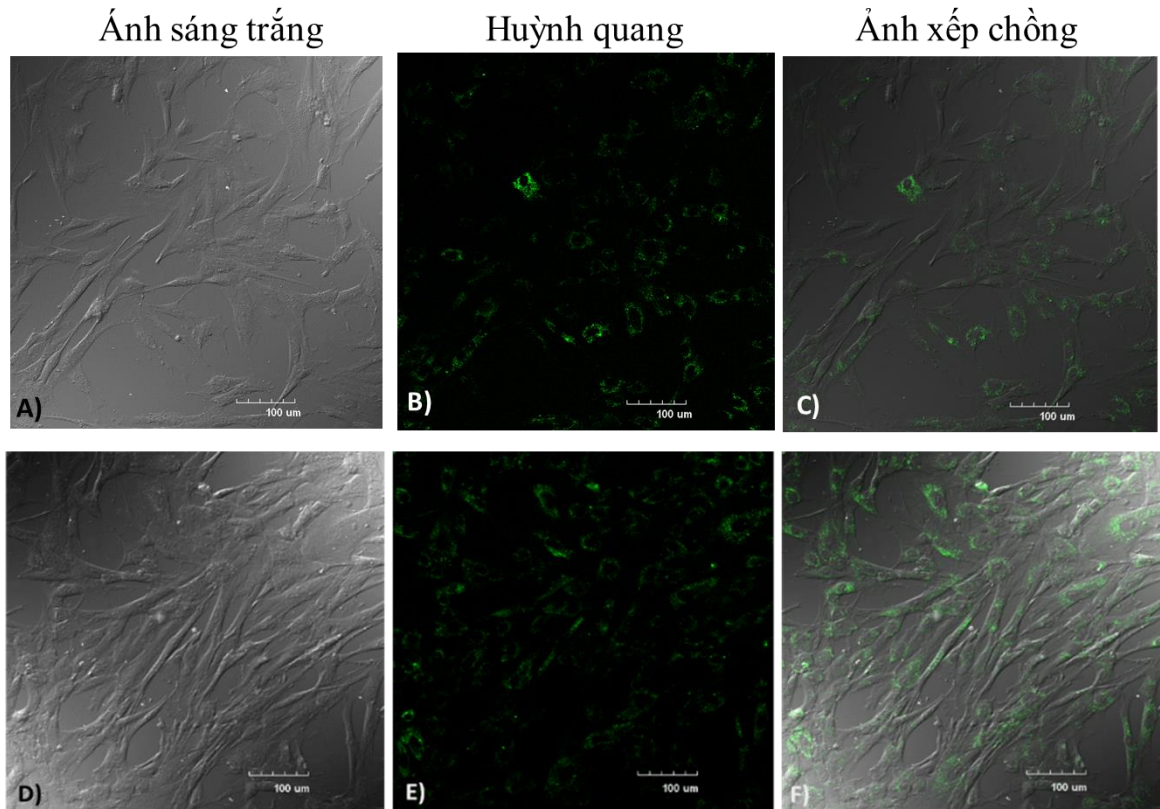
Ở thí nghiệm khác, để đánh giá ảnh hưởng của Dox với chuyển gen. Sau 24 giờ chuyển vector mang gen *HNF4 α* , Doxycycline được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào để hoạt hóa quá trình tổng hợp các protein. Sau khi chuyển nhiễm, không có sự chết tế bào đáng kể nào được ghi nhận. Khi kiểm tra tốc độ tăng trưởng của tế bào, kết quả cho thấy, lô TBGTM đối chứng không có sự khác biệt so với lô chuyển gen nhưng không hoạt hóa bằng Doxycycline. Ở hai nhóm này cho thấy giai đoạn pha lag ngắn hơn trong khoảng 2 ngày đầu, sau đó là giai đoạn pha log nhanh đến ngày 8 cho đến khi đạt được đến pha cân bằng. Trong khi đó, 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

Các kết quả trên đều phù hợp với các nghiên cứu đã công bố. Theo Vuong và cộng sự (2015), *HNF4 α* là một trong những gen có chức năng ức chế tế bào tăng sinh [138]. Còn vai trò của Dox như đã trình bày ở trên trong hệ thống biểu hiện gen Tet-ON. Promoter (P_{CMV}) của hệ thống Tet-On khởi đầu quá trình phiên mã của rTetR và VP16 tổ hợp của hai gen này gọi là rtTA. Khi bổ sung kháng sinh Doxycycline (Dox) hoặc Tetracycline (Tet) vào môi trường, kháng sinh này sẽ kết hợp với rtTA làm thay đổi cấu hình không gian của rtTA vào TRE làm promoter $P_{miniCMV}$ hoạt động khởi đầu quá trình phiên mã gen đích. Ngược lại môi trường không được bổ sung Dox hoặc Tet thì rtTA không liên kết vào TRE làm cho promoter $P_{miniCMV}$ bị ức chế, ngăn cản phiên mã của gen đích.

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* để phát hiện các TBGTM đã được chuyển nhiễm thành công hay không. Kết quả cho thấy hầu hết tế bào có biểu hiện của gen ZsGreen1. ZsGreen1 là các protein thương mại và huỳnh quang sáng đóng vai trò 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 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-*HNF4α*-ON

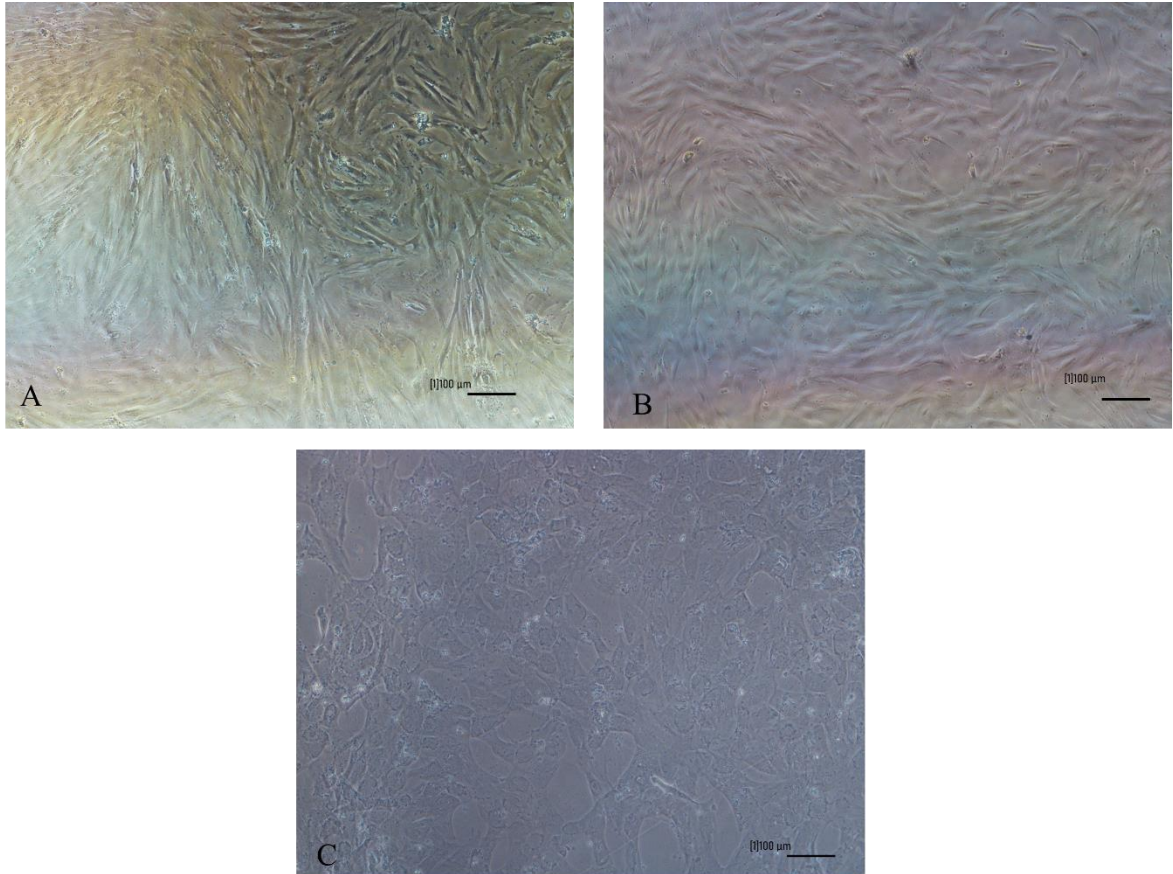
Như vậy, chúng tôi đã chuyển gen thành công *HNF4α* vào TBGTM cuống rốn. Tuy chưa có điều kiện để sàng lọc những tế bào biểu hiện *HNF4α* để biết hiệu suất chuyển gen, nhưng kết quả quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang cho thấy hầu như 100% tế bào đều biểu hiện mạnh của protein ZsGreen1 phát huỳnh quang màu xanh lá cây trong tế bào chất, trong khi lô tế bào đối chứng không quan sát thấy sự biểu hiện protein này.

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

Tế bào sau khi được chuyển gen *HNF4α* được nuôi trong môi trường biệt hóa. Chúng tôi đã nhận thấy hình thái tế bào thay đổi mỗi ngày qua quan sát bằng kính hiển vi. Trong khi các tế bào trong nhóm đối chứng giữ được hình thái giống như nguyên bào sợi của chúng, các TBGTM đã được chuyển gen bằng pTRE-*HNF4α*-ON và được Dox kích hoạt bắt đầu mất hình dạng.

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.

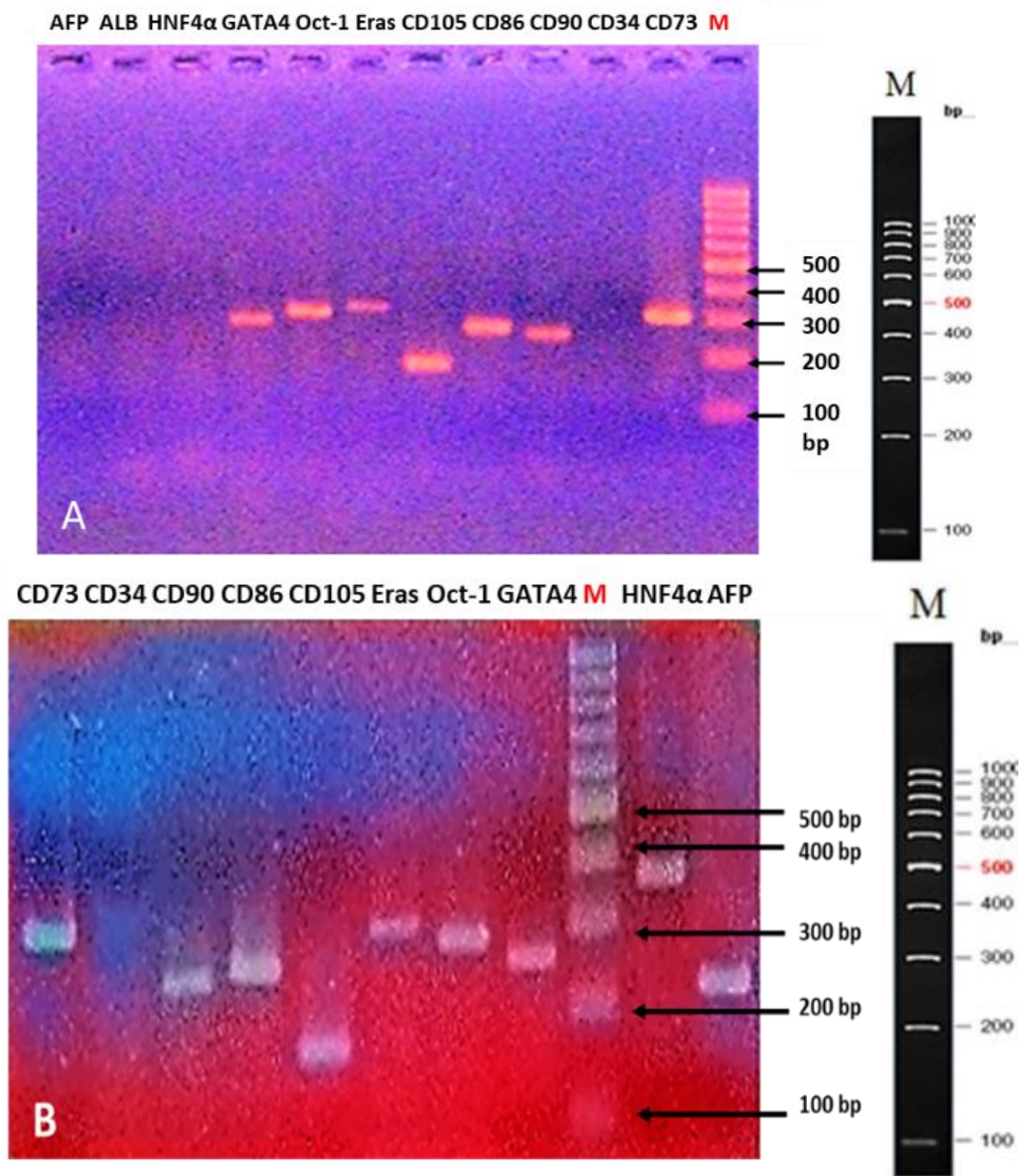


Hình 3.41. Trong quá trình chuyển gen hình thái tế bào có sự biến đổi

- A) Tế bào ban đầu có dạng giống nguyên bào sợi,
 B) Hình thái tế bào sau tuần đầu chuyển gen; C) Hình thái tế bào dạng đa giác xuất hiện sau 2 tuần chuyển gen (Độ phóng đại 200X)

Chúng tôi so sánh với các kết quả nghiên cứu khác đã công bố. Kết quả thay đổi hình dạng tế bào cũng tương tự với nghiên cứu của Ballester và cộng sự (2019) tuy nhiên nhóm tác giả trên lại không đề cập tới việc đánh giá trạng thái tế bào ở các khoảng thời gian khác nhau [139]. Ở nghiên cứu khác, Xie và cộng sự (2019) đã đánh giá hình dạng tế bào thay đổi sau các khoảng thời gian là 15 và 30 ngày sau chuyển gen. Kết quả tế bào bắt đầu biến đổi sang hình dạng của tế bào nhu mô gan từ ngày thứ 15, và hầu như toàn bộ tế bào biến đổi hình thái tương tự giống tế bào gan phân lập từ mô gan từ ngày thứ 30 sau biệt hóa [140].

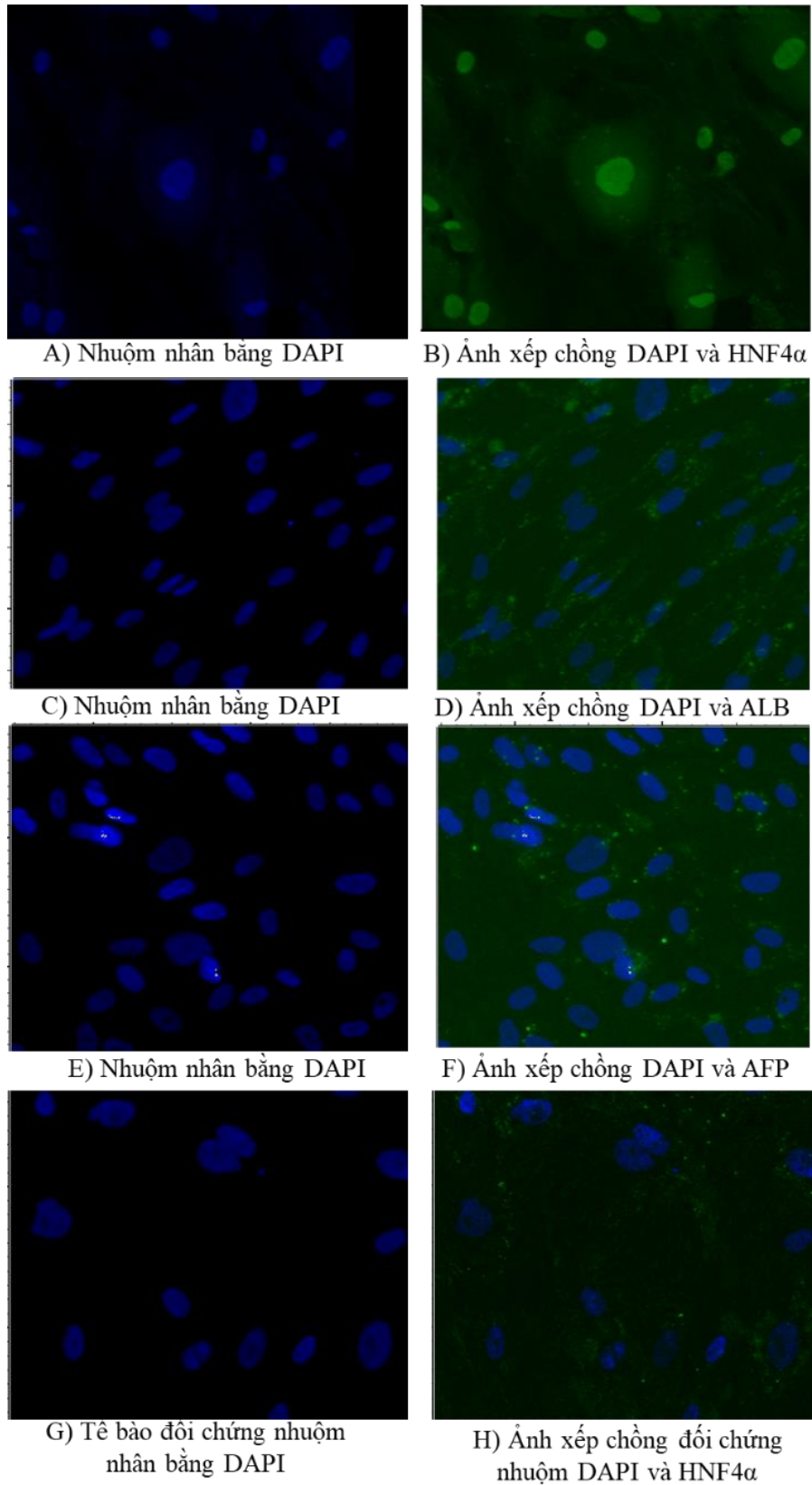
Sau khoảng 21-28 ngày nuôi cấy, RNA tổng số được tách chiết lại và chạy phản ứng PCR phiên mã ngược. Kết quả cho thấy gen *HNF4 α* đã được biểu hiện trong TBGTM cuồng rốn chuyển gen. Việc gen *HNF4 α* biểu hiện, gen này sẽ thúc đẩy sự biểu hiện của các gen khác liên quan đến tế bào gan. Kết quả điện di cũng thể hiện một chỉ thị đặc trưng khác của tế bào gan được biểu hiện đó là chỉ thị AFP cũng 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

1: *CD73*; 2: *CD34*; 3: *CD86*; 4: *CD90*; 5: *CD105*; 6: *Eras*; 7: *Oct - 1*; 8: *GATA4*;
9: *HNF4 α* ; 10: *AFP*; M: Thang chuẩn DNA 100 bp (Thermo Scientific).



Hình 3.43. Hình ảnh tế bào nhuộm miễn dịch huỳnh quang sau 2 tuần biệt hóa A, B: Tế bào nhuộm với *HNF4 α* ; C, D: Tế bào nhuộm với ALB; E, F: Tế bào nhuộm với *AFP*; G, H: TBGTM đối chứng không biệt hóa nhuộm với *HNF4 α* (Độ phóng đại 100X).

Sử dụng kính hiển vi soi ngược phản pha Olympus IX83 quan sát tế bào sau khi được nhuộm miễn dịch. 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 (*HNF4 α* , *ALB* và *AFP*). Biểu hiện này phù hợp trong tế bào biệt hóa (Hình 3.44A, 3.43B, 3.43C, 3.43D, 3.43E, 3.43F) so với các tế bào đối chứng (Hình 3.44G, 3.44H). 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 *HNF4 α* (Hình 3.43A, 3.43B), màu xanh lá cây ICG đã quan sát thấy ở nhân tế bào. Chứng tỏ *HNF4 α* đã chuyển thành công vào nhân tế bào.

Để đánh giá đặc trưng tế bào gan sau tái mã hóa, các chỉ thị *AFP*, *ALB* và *HNF4 α* được sử dụng. Kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang của tế bào sau 2 tuần biệt hóa trong nghiên cứu của chúng tôi so với một số công bố trước đây có sự tương đồng ở biểu hiện của các chỉ thị liên quan [139], [140], [141].

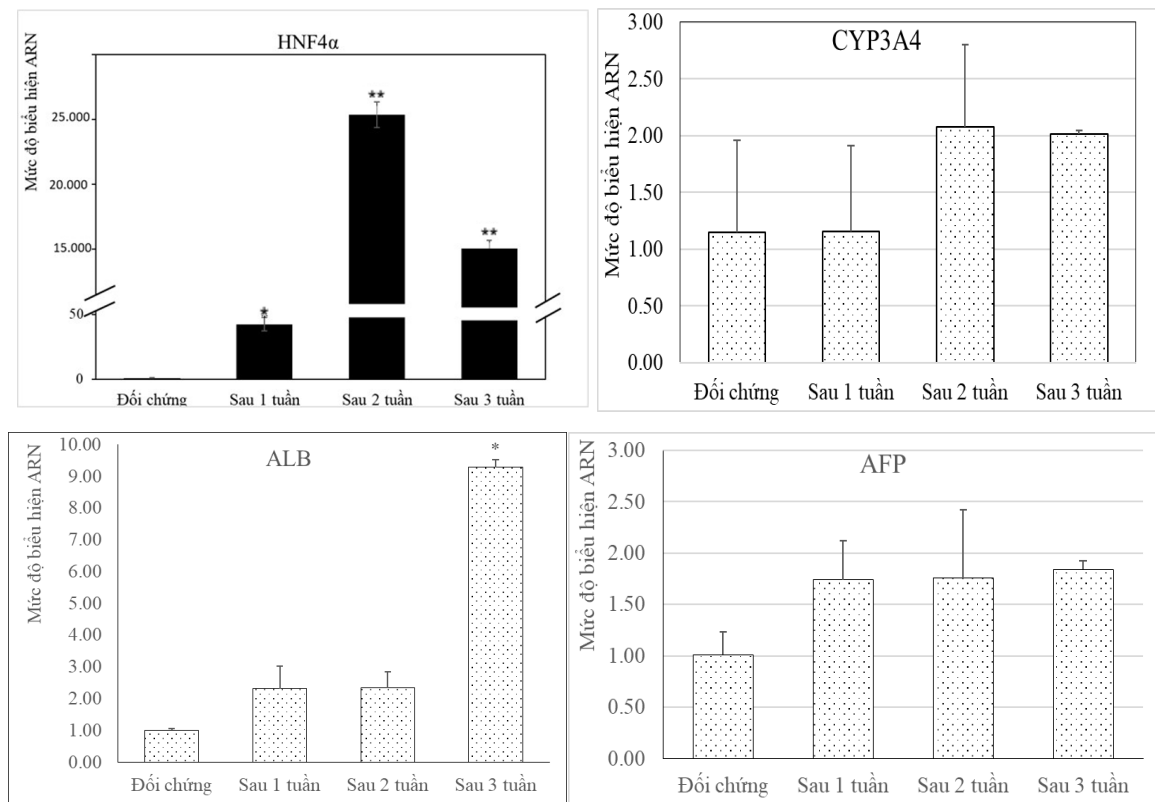
Kết quả cũng tương tự với nghiên cứu của Moore và Moghe, 2009 khi sử dụng tổ hợp các yếu tố HGF, Dexamethasone và OSM để biệt hóa TBG phôi người thành dòng tế bào gan. Các tế bào ban đầu không có biểu hiện albumin và Cytokeratin 18. Vào tuần thứ 2, albumin bắt đầu tăng lên (7,02%) trong khi Cytokeratin 18 được tăng lên khá nhiều (48,38%). Đối với nuôi cấy dài hạn tế bào sau biệt hóa, ở tuần thứ 4, 72,8% tế bào dương tính với albumin và 72,9% là dương tính với cytokeatin 18 [142].

Trong nghiên cứu thử nghiệm trên mô hình động vật, Zhang và đồng tác giả đã chứng minh hiệu quả của TBGTM từ máu cuống rốn trong điều trị xơ gan trên chuột. Sự biểu hiện của *ALB*, *AFP*, *CK18* và *CK19* là dương tính yếu và mờ nhạt ở các thời điểm 1 hoặc 2 tuần, tương ứng trong nhóm chuột bị xơ gan. Tuy nhiên, ở 2, 4, hoặc 8 tuần sau khi truyền TBGTM, với sự kéo dài thời gian cấy ghép, biểu hiện tích cực của *ALB*, *AFP*, *CK18* và *CK19* đã tăng dần, trong khi đó có biểu hiện giảm của *AFP* và *CK19* trong nhóm xơ gan ở 8 tuần sau khi cấy truyền TBG [143].

Liên quan đến chức năng trao đổi chất của tế bào gan cho thấy sự biểu hiện rộng rãi của các gen, các tế bào gan cảm ứng (iHep) thể hiện sự trưởng thành về chức năng khi được hoạt hóa biểu hiện các gen hay nhóm gen khác nhau được mô tả trong các báo cáo đã công bố [5]. Để đạt được khả năng biểu hiện quá mức của nhiều yếu tố phiên mã, hầu hết các phương pháp tái lập trình sử dụng kết hợp các gen trong

vector riêng lẻ, mỗi vector mang một gen biểu hiện một yếu tố cụ thể. Các nghiên cứu đã tạo ra được các quần thể tế bào biểu hiện nhiều yếu tố đặc trưng của tế bào gan [144]. Bằng cách điều chỉnh lượng *HNF4α* và khoảng thời gian biểu hiện, có thể tăng cường chức năng gan của tế bào gan cảm ứng (iHeps) [5], [140].

Đề tài nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh chỉ cần chuyển nạp một gen *HNF4α* duy nhất vào TBGTM cuống rốn thì có thể tạo ra được các tế bào giống tế bào gan. Dựa trên các minh chứng về tác dụng thúc đẩy chuyển đổi mạnh nhất, *HNF4α* được đánh giá là gen đóng vai trò quan trọng nhất [5]. Các báo cáo khác đã công bố cũng cho kết quả tương đồng khi tái lập trình gan trực tiếp ở người bằng việc sử dụng gen *HNF4α* [5], [145]. Như vậy, bằng việc biểu hiện quá mức gen *HNF4α* quá trình biệt hóa TBGTM thành tế bào gan sẽ được thúc đẩy, và chứng minh rằng trong việc tái lập trình trực tiếp gan thì gen *HNF4α* có một vai trò quan trọng.



Hình 3.44. Kết quả qPCR xác định mức độ biểu hiện mRNA của các gen *HNF4α* (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 * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$.

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 *HNF4α*, *AFP*, *ALB* và *CYP3A4* tại các thời điểm khác nhau. Trong số các gen này, biểu

hiện HNF-4 α 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).

Sự biểu hiện quá mức của HNF4 α góp phần vào sự biệt hóa của gan và điều chỉnh trực tiếp các gen đặc hiệu của tế bào gan khác bao gồm HNF4 α , ALB và AFP đã được công bố trong các nghiên cứu tương tự của Hu và cộng sự (2016) và Shi và cộng sự (2019) [6] [146]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp như công bố của Wang và cộng sự (2017): sự biểu hiện quá mức của HNF4 α đã làm tăng quá trình phiên mã và biểu hiện của ALB. Biểu hiện ALB tăng lên đáng kể từ ngày thứ 12, cao nhất ở ngày thứ 16 và bắt đầu giảm từ ngày thứ 20 [147].

Mức độ biểu hiện gen thu được cũng tương đồng với kết quả trong nghiên cứu được thực hiện bởi Khosravi và cộng sự (2018) [148]. Nhóm tác giả đã phân tích để xác định mức độ biểu hiện mRNA của Sox17, FoxA2, HNF4 α , ALB, AFP và CK18 của tế bào biệt hóa TBGTM cưỡng rốn bằng việc biểu hiện quá mức các gen miR-106a, miR-574-3p and miR-451 tại các thời điểm khác nhau.

Với việc biểu hiện quá mức gen miR-574-3p, biểu hiện mRNA của Sox17 (từ ngày 1 đến ngày 4) và FoxA2 (từ ngày 4 đến ngày 9) tăng lên trong các giai đoạn bắt đầu. Mức độ biểu hiện mRNA của AFP tăng đáng kể giữa ngày 9 và ngày 14 và sau đó giảm vào ngày 21 sau khi kích thích tế bào gan. Mức độ biểu hiện mRNA của các gen quan tâm khác chẳng hạn như HNF4 α , ALB và CK18 không thay đổi ngoại trừ HNF4 α có xu hướng tăng vào ngày thứ 21. Khi chúng tôi so sánh nhóm đối chứng (các TBGTM cưỡng rốn mà không biến nạp miR) với sự thay đổi miR-574, nhóm tác giả đã quan sát thấy rằng miR này đã thay đổi kiểu hình từ dạng nguyên bào sợi của TBGTM thành kiểu hình nội bì. Nói cách khác, các tế bào được chuyển nhiễm miR

có hình dạng gần tròn vào ngày thứ 14 nhưng không có hình dạng tế bào gan và biểu hiện gen.

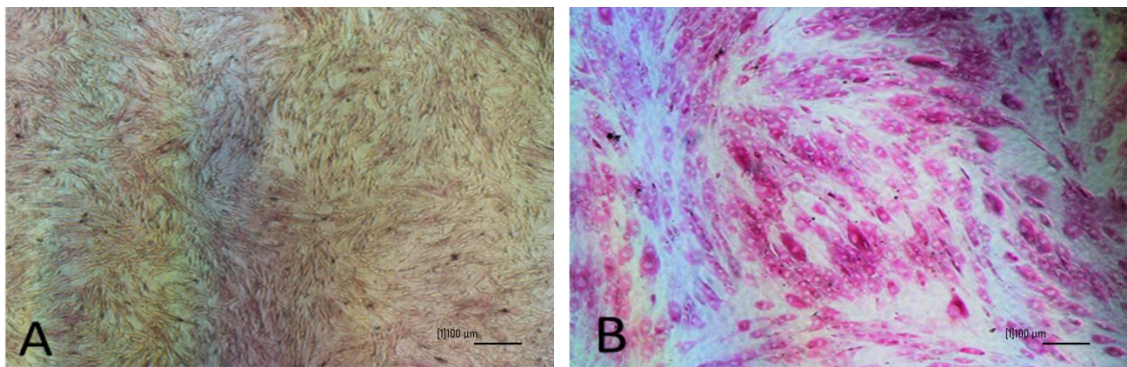
Với việc biểu hiện quá mức gen miR-106a, kết quả của nhóm tác giả cho thấy miR-106 làm tăng biểu hiện mRNA của gen AFP (vào ngày thứ 9 và ngày thứ 14) tuy nhiên không đáng kể so với đối chứng. Tuy nhiên không quan sát bất kỳ biểu hiện mRNA thay đổi đáng chú ý nào của gen HNF4 α , ALB và CK18 trong quá trình thí nghiệm. Với sự thay đổi miR-106, cũng quan sát thấy rằng miR này đã thay đổi kiểu hình nguyên bào sợi của UC-MSC thành kiểu hình nội bì. Nói cách khác, các tế bào được chuyển đổi miR một lần nữa hiển thị hình dạng gần như tròn vào ngày 14 nhưng không phải là hình dạng tế bào gan và biểu hiện gen.

Với việc biểu hiện quá mức gen miR-451, phân tích qPCR thực không cho thấy bất kỳ sự thay đổi đáng chú ý nào về mức độ mRNA của FoxA2, chỉ có thể tăng đáng kể Sox17 (giữa ngày 1 và ngày 4). Có khác so với việc biểu hiện quá mức các gen mi khác, việc thay đổi miR-451 không làm thay đổi đáng kể hình thái của TBGTM cuống rốn, các tế bào được thay đổi giữ nguyên nguyên bào sợi của chúng giống như kiểu hình vào ngày 14.

Trong thí nghiệm biểu hiện quá mức đồng thời các gen miR-106a, miR-574-3p and miR-45, nhóm tác giả đã chỉ ra sự tăng rất đáng kể trong biểu hiện Sox17 mRNA ở giai đoạn bắt đầu (từ ngày 1 đến ngày 4). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của nó đã giảm đáng kể kể từ ngày thứ 9. Ngoài ra, biểu hiện mRNA của FoxA2 được tăng cường bắt đầu từ ngày thứ 4 và đạt đỉnh cao nhất vào ngày thứ 9. Biểu hiện này sau đó giảm xuống sau ngày thứ 9 và duy trì ổn định cho đến 28 ngày. Về mức độ biểu hiện mRNA của AFP, chúng tôi lại quan sát thấy sự gia tăng đáng kể vào ngày 9 và ngày 14, sau đó giảm vào ngày 21 sau khi gây cảm ứng tế bào gan [148].

So sánh và đối chiếu với các nghiên cứu đã công bố, những kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi có thể gợi ý một phương pháp đầy hứa hẹn để biệt hóa trực tiếp các TBGTM (đặc biệt là các TBGTM cuống rốn) thành các tế bào tế bào gan bằng hệ thống Tet-On. Những thay đổi này tương tự như những gì Sekiya và Suzuki quan sát được [149]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi nhận thấy rằng sự biểu hiện quá mức của HNF4 α đã thể hiện các chỉ thị tế bào gan sớm hơn các báo cáo khác (Hu và cộng sự 2016; Asumda và cộng sự 2018) [146] [150]. Các kết quả cần tiếp tục nghiên cứu thêm.

Đánh giá khả năng tích trữ glycogen của tế bào sau biệt hóa. Ở nhóm biệt hóa bằng chuyển gen bằng vector pTRE-*HNF4α*-ON. Khi so sánh giữa tế bào được hoạt hóa bằng Doxycycline và không hoạt hóa bằng Doxycycline. Hình 3.45 thể hiện kết quả tế bào được nhuộm với PAS sau 2 tuần xử lý. Tế bào không bắt màu khi nhuộm PAS ở lô tế bào không hoạt hóa bằng Doxycycline (Hình 3.45A). Còn ở lô tế bào hoạt hóa bằng Doxycycline để biểu hiện *HNF4α* thì tế bào đã bắt màu hồng đỏ của thuốc nhuộm PAS (Hình 3.45B). Phản ứng nhuộm PAS chính là thể hiện khả năng tích lũy glycogen của tế bào. Vùng nhân tế bào được thấy rõ có hai thùy tròn tương ứng với nhân kép hay 2 nhân trong tế bào. Trong khi đĩa tế bào không bổ sung Doxycycline, nhân tế bào đều ở trạng thái đơn nhân, không bắt màu thuốc nhuộm PAS. Kết quả này của chúng tôi cũng tương đồng với báo cáo của Ballester và cộng sự (2019) [139].



Hình 3.45. Kết quả nhuộm PAS của nhóm tế bào chuyển gen *HNF4α* sau 2 tuần
A) Kết quả nhuộm PAS âm tính với Tế bào biệt hóa không bổ sung Doxycycline; B)
Kết quả nhuộm PAS dương tính với Tế bào biệt hóa có bổ sung Doxycycline
(Độ phóng đại 100X)

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện ít nhất 3 lần và chúng đều cho kết quả tương tự. Như vậy chứng tỏ TBGTM cuống rốn sau khi biệt hóa có khả năng dự trữ glycogen tương tự như tế bào gan.

Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với một số nghiên cứu của Zhang và cộng sự năm 2009. Để đánh giá khả năng hấp thu lipoprotein và khả năng lưu giữ glycogen và của tế bào biệt hóa, phương pháp khảo nghiệm hấp thu LDL (*Low-density lipoprotein*) và phương pháp nhuộm PAS (Periodic acid–Schiff) đã được nhóm tác giả đã tiến hành. Kết quả cho thấy tế bào có thể hấp thu LDL với tỷ lệ cao

85,8% và khả năng tích trữ glycogen với tỷ lệ phần trăm là 82,9% thể hiện các tế bào nhuộm màu đỏ tươi [135].

Trong công bố của nhóm tác giả Hu và cộng sự (2016), tế bào gan cảm ứng được biệt hóa bằng cách biểu hiện quá mức *HNF4 α* trong TBGTM có nguồn gốc từ tủy xương sử dụng vector lentivirus EF1a-*HNF4 α* -hrGFP. Tế bào gan cảm ứng của Hu và cộng sự đã cho thấy sự biểu hiện khả năng tích trữ glycogen sau 7 ngày điều này tương đồng với kết quả của chúng tôi [146]. Do đó có thể nhận định rằng *HNF4 α* giúp những TBGTM cuộn rốn và TBGTM có nguồn gốc tủy xương có được sự biểu hiện khả năng tích trữ glycogen với thời gian như nhau.

Khi nhóm nghiên cứu của Ballester và cộng sự năm 2019 dùng nồng độ Dox ở 250 ng/mL thì những tế bào gan cảm ứng của họ cũng đã cho thấy khả năng glycogen sau 10 ngày biệt hóa. Trong khi tế bào biệt hóa của chúng tôi đạt được khả năng tích trữ glycogen sau 7 ngày với 200 ng/mL. Những điều này nói lên rằng nồng độ Dox đóng một vai trò nhất định liên quan đến thời gian tích trữ glycogen của tế bào chức năng gan biệt hóa [139]. Để nâng cao hiệu quả chuyển gen cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu nồng độ Dox kích hoạt cảm ứng biểu hiện gen *HNF4 α* .

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 để 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 CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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 Nanodiamond Labeling of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Effective Differentiation into Hepatocyte-like Cells*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 2020, 3(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.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T. Yamaguchi, J. Matsuzaki, T. Katsuda, Y. Saito, H. Saito and T. Ochiya, *Generation of functional human hepatocytes in vitro: current status and future prospects*, *Inflammation and Regeneration*, 2019, 39, 13.
2. W.C. Peng, L. J. Kraaier and T. A. Kluiver, *Hepatocyte organoids and cell transplantation: What the future holds*, *Experimental & Molecular Medicine*, 2021, 53(1), 1512–1528.
3. M. Cipriano, J. C. Correia, S. P. Camões, N. G. Oliveira, P. Cruz, H. Cruz, M. Castro, J. L. Ruas, J. M. Santos, J. P. Miranda, *The role of epigenetic modifiers in extended cultures of functional hepatocyte - like cells derived from human neonatal mesenchymal stem cells*, *Archives of Toxicology*, 2016.
4. M. Tomizawa, F. Shinozaki, Y. Motoyoshi, T. Sugiyama, S. Yamamoto and N. Ishige, *Oncostatin M in William's E medium is suitable for initiation of hepatocyte differentiation in human induced pluripotent stem cells*, *Molecular Medicine reports*, 2017, 15, 3088-3092.
5. D. Nakamori, H. Akamine, K. Takayama, F. Sakurai and H. Mizuguchi, *Direct conversion of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by ATF5, PROX1, FOXA2, FOXA3, and HNF4A transduction*, *Scientific reports*, 2017, 7(1), 16675.
6. Y. Shi, D. Zhou, B. Wang, D. Zhou and B. Shi, *Roles and mechanisms of action of HNF - 4 α in the hepatic differentiation of WB - F344 cells*, *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43, 1021-1032.
7. K. Takayama, M. Inamura, K. Kawabata, K. Katayama, M. Higuchi, K. Tashiro, A. Nonaka, F. Sakurai, T. Hayakawa, M. K. Furue and H. Mizuguchi, *Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4A Transduction*, *Molecular Therapy*, 2012, 20(1), 127–137.
8. Clontech Laboratories – Takara Bio USA. Inc, *Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System User Manual*, 2008, Available from: <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3898-1.pdf>.

9. A. T. Das, L. Tenenbaum and B. Berkhout, *Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression*, *Current Gene Therapy*, 2016, 16, 156-167.
10. Y. Deng, Y. Zhang, L. Ye, T. Zhang, J. Cheng, G. Chen, Q. Zhang and Y. Yang, *Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10- producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF*, *Scientific reports*, 2016, 6, 37566.
11. Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang and J. Ding, *Review: Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine*, *Cells*, 2019, 8, 886.
12. S. Ryutaro, Y. Akihito, T. Sachiko, I. Akira, H. Hideharu, K. Fumitaka and U. Minoru, *Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms*, *Cytotherapy*, 2012, 14, 1171–1181.
13. Y. Zhang, K. Dilaware, D. Julia and T. Edda, *Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-14.
14. W. Shihua, Q. Xuebin and C. Z. Robert, *Clinical applications of mesenchymal stem cells*, *Journal of Hematology & Oncology*, 2012, 5, 19.
15. C. C. Tereza, F. F. Heitor, F. G. Andrea, B. N. Juliana, S. F. Camila, C. F. Marina, L. A. Alexandre and G. Roberto, *Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum- free three-dimensional system*, *BMC Biotechnology*, 2012, 12, 18.
16. Lê Văn Đông, Phạm Mạnh Hùng, *Công nghệ tế bào gốc và tạo clôn*. *Tạp chí Thông tin Y học*, 2006, 8, 4-11.
17. A. C. Jeffrey, *Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis*. *Journal of the Neurological Sciences*, 2013.
18. E. Fritche, T. Haarmann-Stemmann, J. Kapr, S. Galanjuk, J. Hartmann, P. R. Mertens, A. A. M. Kämpfer, R. P. F. Schins, J. Tigges and K. Koch, *Review: Stem Cells for Next Level Toxicity Testing in the 21st Century*, *Small*, 2021, 17, 2006252.
19. A. E. Hernández and E. García, *Review Article: Mesenchymal Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease*, *Hindawi Stem Cells International*, 2021,

Article ID 7834421.

20. D. M. Hoang, P. T. Pham, T. Q. Bach, A. T. L. Ngo, Q. T. Nguyen, T. T. K. Phan, G. H. Nguyen, P. T. T. Le, V. T. Hoang, N. R. Forsyth, M. Heke and L. T. Nguyen, *Review article: Stem cell-based therapy for human diseases*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022(7), 272.
21. P. D. Telles, M. A. D. A. M. Machado, V. T. Sakai, J. E. Nor, *Pulp tissue from primary teeth : new source of stem cells*, *Journal of Applied Oral Science*, 2011, 19(3), 189-194.
22. G. Nicola, L. Gina, M. Marina, R. Costantina, B. Marina, D. P. Benedetta, S. Angelica, M. Cristina, A. Caterina, T. Denise, F. Andrea and A. Franco, *New Insights into Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications for Bone Regeneration in Pediatric Orthopaedics*, *Stem Cells International*, 2013, 1-11.
23. L. Rifai and F.A. Saleh, *Conventional and alternative Mesenchymal stem cell therapies for treatment of diabetes*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, 1312, 97-106.
24. E. R-F. David, E. F-G. Luis, A. S-M. John, A. B-B. Silvia, I. C. Arnold, A. B-S. Hugo, *Mesenchymal stem cells current clinical applications: A systematic review*, *Archives of Medical Research*, 2021, 52(1), 93-101.
25. X. Yang, Y. Meng, Z. Han, F. Ye, L. Wei and C. Zong, *Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: full of chances and challenges*. *Cell Biosci* 2020, (10): 123.
26. C. D. Campli, A. C. Piscaglia, L. Pierelli, S. Rutella, G. Bonanno, M. R. Alison, A. Mariotti, F. M. Vecchio, M. Nestola, G. Monego, F. Michetti, S. Mancuso, P. Pola, G. Leone, G. Gasbarrini, A. Gasbarrini, *A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury*. *Digestive and Liver Disease*, 2004, 36(9), 603–613.
27. M. Basta and B. J. Lipsett, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Umbilical cord, [Updated 2021 Jul 31]*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557389/>.
28. I. Ishige, T. Nagamura-Inoue, M. J. Honda, R. Harnprasopwat, M. Kido, R.

- Harnprasopwat, M. Kido, M. Sugimoto, H. Nakauchi, A. Tojo, *Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord*. International Journal of Hematology, 2009, 90, 261-269.
29. T. Deuse, M. Stubbendorff, K. Tang-Quan, N. Phillips, M. A. Kay, T. Eiermann, T. T. Phan, H. D. Volk, H. Reichenspurner, R. C. Robbins, S. Schrepfer, *Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells*, Cell Transplant, 2011, 20(5), 655–667.
30. A. Bongso and C. Y. Fong, *The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord*, Stem Cell Reviews, 2013, 9(2), 226-240.
31. M. M. Carmen, D. R. Ciucă, S. Olga, S. Şusman, D. Mişu, *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane*, Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2009, 50(1), 73–77.
32. G. Lepperdinger, R. Brunauer, A. Jamnig, G. Laschober, M. Kassem, *Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapy?*, Experimental Gerontology, 2008, 43(11), 1018-1023.
33. H. H. Cheong, J. Masilamani, T. T. Phan, S. Y. Chan, *Cord lining progenitor cells: potential in vitro adipogenesis model*, International Journal of Obesity (Lond), 2010, 34 (11), 1625-1633.
34. M. Kot, M. Baj-Krzyworzeka, R. Szatanek, A. Musiał-Wysocka, M. Suda-Szczurek and M. Majka, *Review: The Importance of HLA Assessment in “Off-the-Shelf” Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies*, International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20, 5680.
35. R. Berebichez-Fridman and P. R. Montero-Olvera, *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review*, Sultan Qaboos University Med J, 2018, 18(3), 264–277.
36. L. M. Hoffman and M. K. Carpenter, *Characterization and culture of human embryonic stem cells*, Nature Biotechnology, 2005, 23(6), 699-708.

37. C. E. Goldring, P. A. Duffy, N. Benvenisty, P. W. Andrews, U. Ben-David, R. Eakins, B. K. Park, *Assessing the safety of stem cell therapeutics*, *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6), 618-628.
38. C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, D. Svinarich, R. Dodds, C. K. Govind, G. R. Chaudhry, *Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential*, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2019, 13(9), 1738-1755.
39. H. Y. Ren, Q. J. Zhao, W. Xing, S. G. Yang, S. H. Lu, *Differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into low immunogenic and functional hepatocyte-like cells in vitro*, *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2010, 32, 190-194.
40. J. Y. Lee, S-H. Hong, *Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration*, *International Journal of Stem Cells*, 2020, 13, 1-12.
41. R. Moraghebi, A. Kirkeby, P. Chaves, R. E. Rönn, E. Sitnicka, M. Parmar, N. B. Woods, *Term amniotic fluid: an unexploited reserve of mesenchymal stromal cells for reprogramming and potential cell therapy applications*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, 8(1), 190.
42. A. L. Russell, R. Lefavor, N. Durand, L. Glover and A. C. Zubair, *Modifiers of mesenchymal stem cell quantity and quality*. *Transfusion*, 2018, 58(6), 1434-1440.
43. D. Mattiucci, G. Maurizi, P. Leoni, A. Poloni, *Aging- and Senescence-associated Changes of Mesenchymal Stromal Cells in Myelodysplastic Syndromes*. *Cell Transplant*, 2018, 27(5), 754-764.
44. G. J. Aleksandra, C. B. Martha, *Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease*, *Experimental Neurology*, 2013, 247, 25-38.
45. P. Salehinejad, N. B. Alitheen, A. M. Ali, A. R. Omar, M. Mohit, E. Janzamin, F. S. Samani, Z. Torshizi, S. N. Nematollahi-Mahani, *Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2012, 48, 75-83.

46. S. Karahuseyinoglu, O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G. G. Akay, D. O. Demiralp, A. Tukun, D. Uckan, A. Can, *Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys*, Stem cells, 2007, 25(2), 319-331.
47. D. W. Kim, M. Staples, K. Shinozuka, P. Pantcheva, S. D. Kang, C. V. Borlongan, *Wharton's Jelly Derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications*, International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(6), 11692-11712.
48. F. Hendijani, H. S. Aliabadi, S. H. Javanmard S. H, *Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by expant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix*, Cell and Tissue Banking, 2014, 15, 555-565.
49. Trần Văn Bé, Nguyễn Tấn Bình, Huỳnh Nghĩa, Trần Quốc Tuấn, *Nghiên cứu máu cuống rốn tại bệnh viện truyền máu huyết học Tp. HCM*, Kỷ yếu Hội thảo nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc trong y học, 2010, 9-15.
50. P. V. Pham, N. Vu, O. Huynh, M. Truong, T. Pham, L. Dang, N. Phan and K. D. Truong, *An evolution of stem cell research and therapy in Viet Nam*. Progress in Stem Cell, 2018, 5(1), 235-250.
51. Bạch Quốc Khánh, *Tình hình nghiên cứu tế bào gốc ở Việt Nam*, Kỷ yếu Hội nghị khoa học về tế bào gốc lần thứ 5, Hà Nội, 2019.
52. P. H. Nguyen, V. T. Nguyen, T. T. Chu, L. H. Truong, T. T. H. Do, T. D. Nguyen, A. V. Bui, T. A. Ngo, U. T. T. Than, L. T. Nguyen, *Factors Affecting Human Umbilical Cord Blood Quality Before Cryopreservation: The Importance of Birth Weight and Gestational Age*. Biopreservation and Biobanking, 2019, 16.
53. C. Nicolas, Y. Wang, J. Luebke-Wheeler and S. L. Nyberg, *Stem Cell Therapies for Treatment of Liver Disease*, Biomedicines, 2016, 4 (2), 2-18.
54. L. Siddiqui, T. Jeevani, P. Naga Anusha and A. Hima Bindu, *Stem Cell Therapy for Liver Diseases*, Journal of Stem Cell Research & Therapy, 2011, 1(3), 1-3.
55. S. Nikeghbalian, B. Pournasr, N. Aghdami, A. Rasekhi, B. Geramizadeh, S. M. Hosseini Asl, M. Ramzi, F. Kakaei, M. Namiri, R. Malekzadeh, A. Vosough Dizaj, S. A. Malek-Hosseini, H. Baharvand, *Autologous transplantation of*

- bone marrow-derived mononuclear and CD133 (+) cells in patients with decompensated cirrhosis*. Archives of Iranian Medicine, 2011, 14, 12-17.
56. H. Li, Y. Lu, R. P. Witek, L. J. Chang, M. Campbell-Thompson, M. Jorgensen, B. Petersen, S. Song, *Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of alpha1-antitrypsin*. Molecular Therapy, 2010, 18, 1553-1558.
57. G. M. Thiele, L. W. Klassen, D. J. Tuma, *Formation and immunological properties of aldehyde-derived protein adducts following alcohol consumption*, Methods in Molecular Biology, 2008, 447, 235–257.
58. E. L. Lecluyse, E. Alexandre, *Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue*, Methods in Molecular Biology, 2010, 640, 57–82.
59. P. Sun, X. Zhou, S. Farnworth, A. Patel and D. Hay, *Modeling human liver biology using stem cell-derived hepatocytes*, International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14 (11), 22011-22021.
60. D. Little, R. Ketteler, P. Gissen, M. J. Devine, *Using stem cell–derived neurons in drug screening for neurological diseases*, Neurobiology of Aging, 2019, 78, 130-141.
61. H. Omura, F. Liu, T. Shimakami, K. Murai, T. Shirasaki, J. Kitabayashi, M. Funaki, T. Nishikawa, R. Nakai, A. Sumiyadorj, T. Hayashi, T. Yamashita, M. Honda and S. Kaneko, *Establishment and Characterization of a New Cell Line permissive for Hepatitis C Virus Infection*, Scientific reports, 2019, 9, 7943.
62. J. Han, J. H. Kim, *Recent Advances for Enhancing Drug Metabolizing Functions of Hepatocyte-like Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells*, Hanyang Medical Reviews, 2015, 35, 196-206.
63. K. L. Chapman, H. Holzgreffe, L. E. Black, M. Brown, G. Chellman, C. Copeman, J. Couch, S. Creton, S. Gehen, A. Hoberman, L. B. Kinter, S. Madden, C. Mattis, H. A. Stemple, S. Wilson, *Pharmaceutical toxicology: designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, 66, 88-103.
64. L. Hutchinson, R. Kirk, *High drug attrition rates—where are we going wrong?* Nature Reviews Clinical Oncology, 2011, 8, 189-90.

65. S. P. Potta, T. Šarić, M. Heke, H. Bahudhanapati, J. Hescheler, *Human Pluripotent stem cell applications in drug discovery and toxicology – an over-view*, In Atwood CS, Meethal SV, eds. *Pluripotent stem cell biology – advances in Mechanisms, Methods and Models*, Atlanta: Intech, 2014, 181-96.
66. T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, T. Ogaeri, R. R. Zhang, Y. Ueno, Y. W. Zheng, N. Koike, S. Aoyama, Y. Adachi and H. Taniguchi, *Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant*, *Nature*, 2013, 499, 481–484.
67. G. Levy, D. Bomze, S. Heinz, S. D. Ramachandran, A. Noerenberg, M. Cohen, O. Shibolet, E. Sklan, J. Braspenning and Y. Nahmias, *Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes*, *Nature Biotechnology*, 2015, 33(12), 1264-1271.
68. B. Wang, L. Zhao, M. Fish, Y. L. Catriona and N. Roel, *Self–renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver*, Macmillan Publishers Limited, 2015.
69. C. Vater, P. Kasten, M. Stiehler, *Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells*, *Acta Biomaterialia*, 2011, 7, 463–477.
70. R. M. M. Pal, A. K. Das, R. Bhonde, *Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells*. *Archives of Toxicology*, 2012, 86(4), 651-661.
71. H. H. Yoon, B. Y. Jung, Y. K. Seo, K. Y. Song, J. K. Park, *In vitro hepatic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell*. *Process Biochemistry*, 2010, 45, 1857–1864.
72. Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định, *Công nghệ Tế bào gốc*, NXB Giáo dục Việt Nam, 2009.
73. A. Dunn, M. Marcinczyk, M. Talovic, K. Patel, G. Haas and K. Garg, *Role of Stem Cells and Extracellular Matrix in the Regeneration of Skeletal Muscle*, *Muscle Cell and Tissue – Current Status of Research Field*, 2018, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75828>.
74. K. Narayanan, Y. L. Vivian, S. Jiayi, W. T. Zhen, R. Divya, L. Shyh-Chyang, G. Shujun, C. A. W. Andrew and Y. Y. Jackie, *Extracellular Matrix-Mediated*

- Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: Differentiation to Insulin-Secreting Beta Cells*, Tissue engineering: Part A, 2014, 20(1), (2).
75. V. Miceli, M. Bulati, G. Iannolo, G. Zito, A. Gallo, P. G. Conaldi, *Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22, 763.
 76. Q. Pan, S. M. Fouraschen, F. S. Kaya, M. M. Versteegen, M. Pescatori, A. P. Stubbs, W. Van Ijcken, A. Van der Sloot, R. Smits, J. Kwekkeboom, H. J. Metselaar, G. Kazemier, J. De Jonge, H. W. Tilanus, G. Wagemaker, H. L. Janssen, L. J. Van der Laan, *Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts*, Liver Transplantation, 2011, 17(5), 596-609.
 77. A. Afshari, S. Shamdani, G. Uzan, S. Naserian, N. Azarpira, *Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells*, Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1), 54.
 78. Y. Wang, X. Yu, E. Chen, L. Li, *Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases*, Stem Cell Research & Therapy, 2016, 7, 71.
 79. X. Du, T. Shen, H. Wang, X. Qin, D. Xing, D. Ye, Q. Ye, Z. Shi, Z. Fang, Y. Zhu, Y. Yang, Z. Peng, C. Zhao, L. Bin, X. Li, G. Liu, *Adaptation of hepatic lipid metabolism and mitochondria in dairy cows with mild fatty liver*. Journal of Dairy Science, 2018, 101(10), 9544-9558.
 80. A. Banas, T. Teratani, Y. Yamamoto, M. Tokuhara, F. Takeshita, M. Osaki, *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009, 24, 70–77.
 81. M. Stecklum, A. Wulf-Goldenberg, B. Purfurst, A. Siegert, M. Keil, K. Eckert and I. Fichtner, *Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells*. The Society for In vitro Biology, 2014.
 82. J. Cai, Y. Zhao, Y. Liu, F. Ye, Z. Song, H. Qin, S. Meng, Y. Chen, R. Zhou, X. Song, Y. Guo, M. Ding and H. Deng, *Directed differentiation of human*

- embryonic stem cells into functional hepatic cells*, *Hepatology*, 2007, 45(5), 1229-1239.
83. T. Cantz, M. P. Manns, M. Ott, *Stem cells in liver regeneration and therapy*, *Cell and Tissue Research*, 2008, 331, 271-282.
 84. F. Yin, W. Y. Wang, W. H. Jiang, *Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis in vitro and in vivo: From biological characteristics to therapeutic mechanisms*, *World Journal of Stem Cells*, 2019, 26, 11(8), 548-564.
 85. E. Bolotin, K. Chellappa, W. Hwang-Verslues, J. M. Schnabl, C. Yang and F. M. Sladek, *Nuclear Receptor HNF4a Binding Sequences are Widespread in Alu Repeats*, *BMC Genomics* 2011, 12, 560.
 86. J-P. Babeu, F. Boudreau, *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks*, *World Journal of Gastroenterology* 2014, 20(1), 22-30.
 87. E. Bolotin, H. Liao, T. C. Ta, C. Yang and W. Hwang-Verslues, J. R. Evans, T. Jiang, F. M. Sladek, *Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays*, *Hepatology*, 2010, 51(2), 642-653.
 88. M. L. Chen, K. D. Lee, L. C. Huang, Y. L. Tsai, Y. C. Wu, T. M. Kuo, C. P. Hu and C. Chang, *HNF-4alpha determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow*, *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16, 5092-5103.
 89. C. C. Doan, T. L. Le, N. S. Hoang, N. D. Ky, H. C. Nguyen, V. D. Le, M. S. Do, *Differentiation of Human Umbilical Cord Lining Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells*, *ISRN Stem Cells*, 2013, Article ID 749587, 10 pages.
 90. Nguyễn Thị Kim Nguyễn, Trương Hải Nhung, Mai Thị Trang, Nguyễn Hải Nam, Phạm Văn Phúc, *Nghiên cứu đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người thành tế bào giống tế bào gan in vitro*, *Tạp chí sinh học*, 2014, 36(1), 209-215.
 91. Trương Hải Nhung, *Nghiên cứu điều trị thực nghiệm bệnh xơ gan trên mô hình chuột bị xơ gan sử dụng liệu pháp tế bào gốc*, *Đại học Khoa học tự*

- nhiên– Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Luận án tiến sĩ sinh học, 2016.
92. Nguyễn Thị Minh Thư, Lê Văn Trình, Đặng Minh Thành, Trương Hải Nhung, *Bước đầu đánh giá tác động của tế bào gốc trung mô từ dây rốn trên mô hình chuột tổn thương gan do tắc mật*, Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, 2021, 16(1), 3-19.
 93. Đào Trường Giang, Trần Việt Tú, Mai Hồng Bằng, *Nghiên cứu kết quả điều trị xơ gan mất bù do viêm gan virus B bằng phương pháp ghép tế bào gốc tủy xương*, Tạp chí y học Việt Nam, 2021, 506(2).
 94. K. Sercin, C. Ozgur, K. Emine, K. Fadil and G. A. Guvem, *Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys*. Stem cells, 2007, 25, 319-331.
 95. H. S. Mandana, E. Annette and K. Jens, *Cryopreservation and Revival of Human Mesenchymal Stromal Cells*. Methods in Molecular Biology, 2016, 1416, 3939-4584.
 96. W. Widowati, R. F. Gunanegara, R. Rizal, et.al, *Comparative analysis of Wharton's jelly mesenchymal stem cell (WJ-MSC) isolated using explant and enzymatic methods*, Journal of Physics: Conference series, 2019, 1374, 012024.
 97. W. Zhang, W. Li, B. Liu, P. Wang, W. Li, H. Zhang, *Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from human fetal hepatic progenitor cells in vitro*, Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(5), 2051-2058.
 98. M. Ayatollahi, M. Soleimani, S. Z. Tabei, S. M. Kabir, *Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I*. World Journal of Stem Cells, 2011, 26, 3(12), 113-21.
 99. K. Hata, S. Tomatsu, M. Takahashi, A. Sasaki, Y. Umekawa, K. Miyashita, K. Ogura, G. Toshima, M. Maeda, J. Takahashi and M. Kakuni. *Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB-cells® , human primary hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel in vitro system for screening anti-lipidemic drugs*. Biomedical Research, 2020, 41(1): 32-42.
 100. M. W. Pfaff, G. W. Horgan, L. Dempfle. *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative*

- expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Research, 2002, 30(9), e36, doi: 10.1093/nar/30.9.e36.
101. M. W. Pfaffl. *Relative quantification*. In Real-time PCR ed. Dorak, M.T. London: Taylor & Francis, 2007.
 102. C. Mennan, K. Wright, A. Bhattacharjee, B. Balain, J. Richardson, S. Roberts, *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord*, BioMed Research International, 2013, 916136.
 103. H. Y. Lu, W. J. Du, C. X. Liu, Q. X. Meng, Y. S. Fu, J. N. Shi, T. T. Zhang, Y. Zhang. *Efficient generation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells by explant re-culture method*. Chinese Journal of Biologicals, 2017, 30(6), 649-654.
 104. J. H. Yoon, E. Y. Roh, et al., *Comparison of explant – derived and enzymatic digestion -derived MSCs and the growth factors from Wharton’s jelly*, Biomed Research International, 2013, Article ID 428726.
 105. M. L. Skiles, A. J. Marzal, K. S. Brown, J. M. Shamonki, *Comparison of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved material and extracted by explantation and digestion methods utilizing a split manufacturing model*, Cytotherapy, 2020, 22, 581-591.
 106. Q. Zhao, L. Zhang, Y. Wei, H. Yu, L. Zou, J. Hou, H. Yang, B. Song, T. Wei, D. Wu, W. Zhang, L. Zhang, D. Liu, Z. Li, Y. Chi, Z. Han and Z. Han, *Systematic comparison of hUC-MSCs at various passages reveals the variations of signatures and therapeutic effect on acute graft-versus-host disease*, Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10, 354.
 107. R. Secunda, R. Vennila, A. M. Mohanashankar, M. Rajasundari, S. Jeswanth, R. Surendran, *Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study*, Cytotechnology, 2014, DOI 10.1007/s10616-014-9718-z.
 108. D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, V. Charwat, *Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells*, Cytometry, Part A, 2018, 93 (1).

109. U. Rashid, A. Yousaf, M. Yaqoob, E. Saba, M. Moaen-Ud-Din, S. Waseem, S. K. Becker, G. Sponder, J. R. Aschenbach, M. A. Sandhu, *Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources*, BMC Veterinary Research, 2021, 17, 388.
110. S. Roy, S. Arora, P. Kumari and M. Ta, *A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells*, Cryobiology, 2014, 68, 467–472.
111. H. Chen, Q. L. Tang, X. Y. Wu, L. C. Xie, L. M. Lin, G. Y. Ho, L. Ma, *Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules*, Molecular medicine report, 2015, 12, 819-828.
112. E. Y. Osipova, T. V. Shamanskaya, O. A. Kurakina, V. A. Nikitina, B. B. Purbueva, A. Y. Ustugov, D. Y. Kachanov, E. V. Skorobogatova, Z. M. Dishlevaya and S. A. Roumiantsev, *Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells during Ex Vivo Expansion*, Journal of Advances in Medicine and Medical Research, 2011, 1(3), 85-95.
113. D. Hladik, I. Höfig, U. Oestreicher, J. Beckers, M. Matjanovski, X. Bao, H. Scherthan, M. J. Atkinson, M. Rosemann, *Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent recognition of DNA breaks and increases genetic instability*, Stem Cell Research & Therapy, 2019, 29, 10(1), 218.
114. M. D. Pratheesh, E. G. Nitin, N. K. Amar, K. D. Pawan, S. Bhaskar, G. Saikumar, Amarpal, G. T. Sharma, *Isolation, culture and characterization of caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid*, Research in Veterinary Science, 2013, 94, 313–319.
115. F. Lagenbach and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*, Stem Cell Research & Therapy 2013, 4, 117.
116. S. Nievaleve, *Concise review: Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell bank*, Progress in Stem Cell, 2017, 4(3-4), 241-246.
117. I. Koliakos, N. Tsagias, Karagiannis, *Mesenchymal cell isolation from Wharton's jelly, in perspective to clinical applications*, Journal of Biological Research (Thessalon), 2011, 16, 194-201.

118. P. V. Phuc, C. N. Truong, L. T. B. Phuong, T. D. X. Tung, V. B. Ngoc, B. T. H. Khanh and P. K. Ngoc, *Isolation and Proliferation of Umbilical Cord Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications*, Cell and Tissue Banking, 2016, 17 (2), 289–302.
119. S. Anahita, A. Negar, H. K. Mohammad, *Differentiation of human induced pluripotent stem cells into Insulin like cell clusters with miR186 and miR375 by using chemical transfection*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174, 242-258.
120. V. Shalini, S. Pratheep, V. Sharmili, G. Elizabeth, R. Rajesh, *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue*. World Journal of Stem Cells, 2012, 4(6), 53-61.
121. S. Huang, L. Xu, Y. Sun, T. Wu, K. Wang, G. Li, *An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow*, Journal of Orthopaedic Translation, 2015, 3(1), 26–33.
122. J. Yang, D. J. Ryan, W. Wang, J. C. H. Tsang, G. Lan, H. Masaki, X. Gao, L. Antunes, Y. Yu, Z. Zhu, J. Wang, A. A. Kolodziejczyk, L. S. Campos, C. Wang, F. Yang, Z. Zhong, B. Fu, M. A. E. Maslin, M. Wood, Y. Tanaka, X. Chen, A. C. Wilkinson, J. Bussell, J. White, R. R. Solis, W. Reik, B. Gottgens, S. A. Teichmann, P. P. L. Tam, H. Nakauchi, X. Zou, L. Lu, P. Liu, *Establishment of mouse expanded potential stem cells*. Nature, 2017, 550, 393–397.
123. S. Bahsoun, K. Coopman and E. C. Akam, *The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review*, Journal of Translational Medicine, 2019, 17, 397.
124. D. Bharti, S. B. Shivakumar, J. K. Park, I. Ullah, R. B. Subbarao, J. S. Park, S. L. Lee, B. W. Park and G. J. Rho, *Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord*, Cell and Tissue Research, 2018, 372(1), 51-65.
125. M. T. Shafiei, C. M. C. Gonczi, M. S. Rahman, A. East, J. Francois, P. J. Darlington, *Mononuclear cells with periodic acid schiff staining*, Journal of Visualized Experiments, 2014, 94, 52199.

126. H. M. Hasan, K. G. Botros, M. A. El-Shahat, H. A. Abdallah, M. A. Sobh, *In vitro differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into functioning hepatocytes*, Alexandria Journal of Medicine, 2017, 53, 167–173.
127. X. Q. Kang, W. J. Zang, L. J. Bao, D. L. Li, T. S. Song, X. L. Xu, X. J. Yu, *Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes*. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(47), 7461-7465.
128. S. Y. Ong, H. Dai, L. W. Leong, *Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells*, Tissue Engineering, 2006, 12(12), 3477-3485.
129. C. Lange, P. Bassler, M. V. Lioznov, H. Bruns, D. Kluth, A. R. Zander, H. C. Fiegel, *Liver specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells*, World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(29), 4497-4504.
130. M. J. Seo, S. Y. Suh, Y. C. Bae, J. S. Jung, *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 328(1), 258-264.
131. R. Talens-Visconti, A. Bonora, R. Jover, V. Mirabet, F. Carbonell, J. V. Castell, M. J. Go´mez-Lecho´n, *Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*, sWorld Journal of Gastroenterology, 2006, 12(36), 5834–5845.
132. C. D. Richards, *Review Article: The Enigmatic Cytokine Oncostatin M and Roles in Disease*, Hindawi Publishing Corporation ISRN Inffammation, 2013, Article ID 512103.
133. T. Nakamura and S. Mizuno, *Review: The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its signififcance for cell biology, life sciences and clinical medicine*, The Proceedings of the Japan Academy Series B, 2010, 86.
134. N. Itoh, Y. Nakayama and M. Konishi, *Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease*, Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2016, 4, 30.
135. Y. N. Zhang, P. C. Lie, X. Wei, *Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton’s jelly into hepatocyte-like cells*, Cytotherapy, 2009, 11, 548-558.

136. M. A. G. Nesrien, A. M. A. Reham, D. Nehal, A. E. S. Asmaa, *Differentiation of Bone Marrow: Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells*, Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, 2016, 32(3), 276–283.
137. H. H. Lee, M. J. O'Malley, N. A. Friel, C. R. Chu, *Effects of doxycycline on mesenchymal stem cell chondrogenesis and cartilage repair*. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(2), 385-393.
138. L. M. Vuong, K. Chellappa, J. M. Dhahbi, J. R. Deans, B. Fang, E. Bolotin, N. V. Titova, N. P. Hoverter, S. R. Spindler, M. L. Waterman, F. M. Sladek, *Differential Effects of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Isoforms on Tumor Growth and T-Cell Factor 4/AP-1 Interactions in Human Colorectal Cancer Cells*, Molecular and Cellular Biology, 2015, 35(20), 3471-90.
139. M. Ballester, M. Bolonio, R. Santamaria, J. V. Castell, C. Ribes-Koninckx and R. Bort, *Direct conversion of human fibroblast to hepatocytes using a single inducible polycistronic vector*, Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10(1), 1-10.
140. B. Xie, D. Sun, Y. Y. Du, J. Jia, S. C. Sun, J. Xu, Y. F. Liu, C. G. Xiang, S. T. Chen, H. F. Xie, Q. Wang, G. Li, X. Lyu, H. Shen, S. Li, M. Wu, X. Zhang, Y. Pu, K. Xiang, W. Lai, P. Du, Z. Yuan, C. Li, Y. Shi, S. Lu, H. Deng, *A two-step lineage reprogramming strategy to generate functionally competent human hepatocytes from fibroblasts*, Cell Research, 2019, 29, 696–710.
141. K. P. Simeonov, H. Uppal, *Direct Reprogramming of Human Fibroblasts to Hepatocyte-Like Cells by Synthetic Modified mRNAs*, PloS ONE, 2014, 9(6), e100134.
142. R. N. Moore and P. V. Moghe, *Expedited growth factor mediated specification of human embryonic stem cells toward the hepatic lineage*, Stem cell Research, 2009, 3(1), 51-62.
143. Z. Zhang, W. Zhu, H. Ren, X. Zhao, S. Wang, H. Ma, X. Shi, *Mesenchymal stem cells increase expression of heme oxygenase 1 leading to anti inflammatory activity in treatment of acute liver failure*, Stem cell Research & Therapy, 2017, 8, 70.
144. P. Huang, L. Sun, L. Zhang, L. Hui, *Conversion of Fibroblasts to Hepatocytes In Vitro*, Methods in Molecular Biology, 2019, 1905, 93-101.

145. P. Huang, L. Zhang, Y. Gao, Z. He, D. Yao, Z. Wu, J. Cen, X. Chen, C. Liu, Y. Hu, D. Lai, Z. Hu, L. Chen, Y. Zhang, X. Cheng, X. Ma, G. Pan, X. Wang, L. Hui, *Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes*, *Cell stem cell*, 2014, 14, 370–384.
146. X. Hu, P. Xie, W. Li, Z. Li, H. Shan, *Direct induction of hepatocyte-like cells from immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells by overexpression of HNF4 α* , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 16, 478(2), 791-7.
147. P. Wang, M. Cong, T. Liu, H. Xu, L. Wang, G. Sun, A. Yang, D. Zhang, J. Huang, Y. Sun, W. Zhao, H. Ma. J. Jia, H. You. *Inhibitory effects of HNF4 α on migration/maltransformation of hepatic progenitors: HNF4 α -overexpressing hepatic progenitors for liver repopulation*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, 8(1): 1-11.
148. M. Khosravi, N. Azarpira, S. Shamdani, S. Hojjat-Assari, S. Naserian, M. H. Karimi. *Differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to hepatocyte cells by transfection of miR-106a, miR-574-3p, and miR-451*. *Gene*, 2018, 667: 1-9.
149. S. Sekiya and A. Suzuki. *Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors*. *Nature*, 2011, 475(7356): 390-393.
150. F. Z. Asumda, K. E. Hatzistergos, D. M. Dykxhoorn, S. Jakubski, J. Edwards, E. Thomas and E. R. Schiff. *Differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules*. *Differentiation*, 2018, 101: 16–24.

PHỤ LỤC 1. PHIẾU TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi,

Xác nhận rằng

- Tôi đã đọc các thông tin được cung cấp về nghiên cứu “**Nghiên cứu biệt hóa tế bào chức năng gan từ tế bào gốc người và chuột**” tại Bản cung cấp thông tin nghiên cứu và Phiếu tình nguyện tham gia nghiên cứu). Tôi đã được các cán bộ nghiên cứu giải thích rõ về nghiên cứu và các thủ tục đăng ký tình nguyện tham gia vào nghiên cứu.
- Tôi đã có cơ hội được hỏi các câu hỏi về nghiên cứu và tôi hài lòng với các câu trả lời đưa ra.
- Tôi đã có thời gian và cơ hội để cân nhắc tham gia vào nghiên cứu này.
- Tôi đã hiểu được rằng tôi có quyền được tiếp cận với các thông tin được mô tả trong Phiếu cung cấp thông tin nghiên cứu.
- Tôi hiểu rằng tôi có quyền rút khỏi nghiên cứu vào bất cứ thời điểm nào vì bất cứ lý do gì.
- Tôi đồng ý rằng các bác sỹ đang điều trị cho tôi (nếu có) sẽ được thông báo về việc tham gia nghiên cứu của tôi.

Đánh dấu vào ô thích hợp:

Có:

Không:

Tôi nhận một bản sao của Bản thông tin cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu này. Tôi tự nguyện đồng ý tham gia.

Chữ ký của người tham gia:

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của Người lấy mẫu/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký tên dưới đây, xác nhận rằng bệnh nhân/người tình nguyện tham gia nghiên cứu ký bản chấp thuận đã đọc toàn bộ bản thông tin trên đây, các thông tin này đã được giải thích cặn kẽ cho Ông/Bà và Ông/Bà đã hiểu rõ bản chất, các nguy cơ và lợi ích của việc Ông/Bà tham gia vào nghiên cứu này.

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

PHỤ LỤC 2. BẢN CUNG CẤP THÔNG TIN NGHIÊN CỨU

Tên nghiên cứu: “Nghiên cứu biệt hóa tế bào chức năng gan từ tế bào gốc người và chuột”

Mã số: VAST.ĐL.03/16-17

Đơn vị chủ trì: Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nghiên cứu viên: TS. Nguyễn Văn Hạnh

Chức vụ: Trưởng phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học.

Vai trò trong đề tài: Chủ nhiệm đề tài

THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU:

Mục đích và cách tiến hành nghiên cứu

- Giải thích mục đích của nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành trên tế bào gốc trung mô được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh và biệt hóa thành tế bào có chức năng gan. Đây là nghiên cứu mang tính chất nghiên cứu cơ bản và thực hiện trong phòng thí nghiệm.
- Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng: 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.
- Tiêu chuẩn loại trừ khỏi nghiên cứu: Loại trừ trong tình huống người tham gia từ chối, hoặc sản phụ mang thai kỳ thiếu tháng hay có kết quả dương tính với một trong 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.
- Ai sẽ là người đánh giá các thông tin cá nhân và y khoa để lựa chọn anh/chị/... tham gia vào nghiên cứu: Bác sĩ sản khoa, thành viên nghiên cứu viên của đề tài, các thông tin cá nhân và y khoa đều được bảo mật, tuân thủ các nguyên tắc về đạo đức, tuân thủ pháp luật của Nhà nước CHXHCN Việt Nam.
- Số người sẽ tham gia vào nghiên cứu: 12 người
- Giải thích khoảng thời gian đối tượng cần tham gia: Sản phụ tham gia vào trước thời gian sinh đẻ.
- Mô tả các thủ tục đối tượng sẽ thực hiện: Mẫu cuống rốn được thu nhận ngay sau khi em bé được sinh ra, được thu nhận quản bảo trong dung dịch bảo quản. Phụ sản không phải làm thêm các thủ tục nào khác.

- Cách tuyển chọn đối tượng (nhằm đảm bảo sự công bằng): Các đối tượng được lựa chọn trong độ tuổi sinh đẻ
- Lợi ích của việc thực hiện nghiên cứu và của đối tượng tham gia nghiên cứu: Người hiến mẫu đóng góp cho nghiên cứu khoa học.
- Nếu nghiên cứu có thu thập bệnh phẩm, phần mẫu còn dư sau khi nghiên cứu này sẽ được hủy hay không?: Phần mẫu đã tiến hành nghiên cứu, thì phần còn dư sẽ được tiêu hủy, đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học trong phòng thí nghiệm.
- Nếu có thu thập bệnh phẩm, phần mẫu còn dư sẽ được lưu để sử dụng cho nghiên cứu khác trong tương lai? Phần mẫu mà chưa sử dụng đến, sẽ được lưu bảo quản trong ngân hàng lạnh, để phục vụ cho thí nghiệm tiếp theo. Sau khi tiến hành thí nghiệm, phần còn dư cũng sẽ được tiêu hủy, đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học trong phòng thí nghiệm.

Quyền lợi của đối tượng

- Quyền lợi của đối tượng được ghi rõ: Sản phụ có quyền từ chối nghiên cứu, rút khỏi nghiên cứu và có quyền từ chối các câu hỏi riêng tư.

Các nguy cơ và bất lợi

- Mô tả các nguy cơ và bất tiện có thể thấy trước với đối tượng: Quá trình thu mẫu không có bất kỳ rủi ro nào so với việc không lấy mẫu.

Bảo mật thông tin

- Ghi rõ việc mô tả các biện pháp để giữ và đảm bảo tính bảo mật của các bản ghi liên quan đến người tham gia : Nhóm nghiên cứu có nghĩa vụ tuyệt đối giữ bí mật về tất cả các thông tin liên quan tới sản phụ đồng ý hiến tặng. Tên và địa chỉ của sản phụ sẽ không được công khai trong các phiếu thu thập thông tin và mẫu cuống rốn. Tên của sản phụ sẽ không được nhắc đến trong bất kỳ biểu mẫu nào. Thông tin thu thập sẽ được cất giữ trong tủ có khóa hoặc mật khẩu trên máy tính. Những cán bộ khác không thể tiếp cận dữ liệu này kể cả cán bộ thu thập số liệu. Khi nghiên cứu kết thúc, các thông tin sẽ hủy.
- Cam kết thông tin thu thập được chỉ sử dụng trong nghiên cứu mà không nhằm bất cứ mục đích nào khác.

Người liên hệ

- Cung cấp họ tên địa chỉ số điện thoại liên hệ của nhân viên sẽ là người trả lời các câu hỏi liên quan đến nghiên cứu và liên quan đến quyền của đối tượng tham gia:

Nếu sản phụ hoặc người nhà sản phụ gặp vấn đề rắc rối liên quan đến việc thu mẫu này hoặc có bất kỳ câu hỏi nào liên quan đến nghiên cứu, hãy liên lạc với:

TS. Nguyễn Văn Hạnh – chủ nhiệm đề tài VAST.ĐL.03/16-17, Trưởng phòng Công nghệ phôi – Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Điện thoại: 0985255047

NCS. Đỗ Trung Kiên – Khoa công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Điện thoại: 0983109979

PHỤ LỤC 3. DANH SÁCH CÁ NHÂN
TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU

STT	Họ và tên	Tuổi	Tình trạng sức khỏe
1	P.Q.A	24	Tốt, không viêm nhiễm
2	T.T.H	26	Tốt, không viêm nhiễm
3	Đ.T.V.A	27	Tốt, không viêm nhiễm
4	P.T.H	33	Bình thường, không viêm nhiễm
5	N.T.N	32	Tốt, không viêm nhiễm
6	T.Q.L	25	Tốt, không viêm nhiễm
7	N.T.H.N	34	Tốt, không viêm nhiễm
8	N.T.L	30	Bình thường, không viêm nhiễm
9	L.T.H.H	29	Tốt, không viêm nhiễm
10	H.T.N	28	Tốt, không viêm nhiễm
11	Đ.T.H	30	Tốt, không viêm nhiễm
12	N.T.P	26	Tốt, không viêm nhiễm

Ghi chú:

Tên viết tắt: ví dụ Nguyễn Thị Vân Anh – NTVA; Lê Thu Hương – LTH

PHỤ LỤC 4. THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

STT	Tên thiết bị	Hãng	Mã
1	Bàn ám soi kính hiển vi	Tokai-Hit (Nhật Bản)	Tpi – UNIX
2	Bể ổn nhiệt	ASONE (Nhật Bản)	16-3-003713 (1604771A)
3	Bàn soi Gel	UPV (Mỹ)	M -26V
4	Bình nitơ	L'Air liquide (Pháp)	Serial No. 001236
5	Buồng đếm	Neubauer-Đức	Mariendeld
6	Cân điện tử	Mettler Toledo (Thụy Sĩ)	Model: XS250DUV TDNR 18.6.3.1084.895 X250BDUV Service info, SNR B548772774
7	Cộng rạ đông lạnh	IMV (Pháp)	006937
8	Đĩa nuôi 4 giếng (Ø15, diện tích nuôi cấy 1,9 cm ² /giếng)	Swedesboro, NJ, USA (Mỹ)	Nunc MultiDishes, Thomas Scientific
9	Đĩa pectri 60mm	Thomas, Scientific (Mỹ)	Falcon 351007
10	Kính hiển vi huỳnh quang Olympus	Olympus (Nhật Bản)	BX-51, Olympus, Tokyo, Nhật Bản
11	Kính hiển vi soi ngược phản pha huỳnh quang Olympus	Olympus (Nhật Bản)	IX83, Olympus, Tokyo, Nhật Bản
12	Kính hiển vi huỳnh quang Zeiss	Zeiss (Đức)	LSM510 Meta,
13	Kính hiển vi phản pha	Nikon (Nhật Bản)	Ti-U
14	Kính hiển vi quang học	Nikon (Nhật Bản)	Eclipse TE2000-S

		Bản)	
15	Kính hiển vi soi nổi Nikon	Nikon (Nhật Bản)	Model: II-PS 100W/A No.2119528. Input AC100V 150VA 50/60Hz KCC-REM-NYC-TI- PS100WA
16	Kính hiển vi soi nổi Olympus	Olympus (Nhật Bản)	Microscope KCC-REM-OLY-022400002 Model BX53F 100-120/220-240 1.7/0.8A 50/60Hz, SN 6L 44666 201611 Tokyo 163-0914
17	Lò vi sóng	Saiko (Nhật Bản)	Saiko MW-G223
18	Màng lọc vô trùng	Sartorius (Đức)	SAR61821, SAR61831
19	Máy cô mẫu ly tâm chân không Genevac	SP Scientific (Mỹ)	miVac Quattro
20	Máy chu trình nhiệt PCR	Eppendorf (Đức)	AG22331
21	Máy điện di	Bio-Rad (Mỹ)	Powerpac 300
22	Máy đo pH	HANNA (Việt Nam)	HI2211
23	Máy đo quang phổ UV-VIS	Eppendorf (Đức)	BioSpectrometer Basic
24	máy flowcytometry	BD Bioscience (Mỹ)	FACSCalibur
25	Máy lắc	UNIEQUIP	Unitwist 300
26	Máy lắc ổn nhiệt	Daihan Scientific (Hàn Quốc)	WIS – 10R
27	Máy ly tâm	Tomy (Nhật)	Low speed centrifuge LCX-

			100 Speed 10000 RPM Serial No: 52425004 Tokyo.1790073
28	Máy ly tâm	Eppendorf (Đức)	Centrifuge 5424-R
29	Máy thống lọc nước siêu sạch	Young in Chromass (Hàn Quốc)	AQUAMAX ULTRA 370 SERIES
30	Máy voltex	N-Biotek (Hàn Quốc)	NB – 105V
31	Nồi hấp khử trùng	Hirayama (Nhật Bản)	HV-85
32	Tủ cấy vô trùng	ASTECC (Nhật)	Model No: AH-160 Serial No: BO61700283 Power:AC220V 8A 50Hz Japan 811-2207
33	Tủ lạnh	Panasonic (Việt Nam)	NR-BL340PSVN
34	Tủ lạnh -20°C	Nihon Freezer	GS-3120HC20H828993379
35	Tủ lạnh -80°C	Nihon Freezer	CLN-32UD21512143
36	Tủ nuôi lắc	Alabtech (Hàn Quốc)	LSI 3016R
37	Tủ nuôi lắc	N-Biotek,	NB 205QF
38	Tủ nuôi tế bào	ASTECC (Nhật)	Model No: APC-50DR Serial No: 50D1700861 Power: AC230V 5A 50/60 Hz Japan 811-2207
39	Tủ nuôi tế bào	Sanyo (Nhật Bản)	MCO-20AIC
40	Tủ stock	Alaska	16-3-003712
41	Thiết bị hút, nhả tế bào	Eppendorf (Đức)	Research plus

42	Hệ thống Real time PCR Rotor-Gene Q 5plex-HRM System	QIAGEN, Hilden, (Đức)	Cat. No. / ID: 9002370
----	--	--------------------------	------------------------

PHỤ LỤC 5. MÔI TRƯỜNG DÙNG TRONG NGHIÊN CỨU

1. Môi trường bảo quản vận chuyển công rôn: môi trường PBS (phosphate buffered saline) có chứa 100 IU/mL penicilin, 100 mg/mL streptomycin (Sigma) và 0,25 mg/mL amphotericin (Sigma)

2. Môi trường DMEM/F12 nuôi cấy tế bào (300 mL):

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (mL)
DMEM/ F12		246
FBS	15%	45
bFGF	50 ng/mL	0,06
EGF	100 ng/mL	0,03
Insulin Transferrin Seleniumm A (ITS)	1X	3
Glutamine	2mM	3
Penicillin/Streptomycin	1%	3

3. Môi trường cảm ứng tạo mỡ (50 mL):

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (mL)
DMEM/ F12		43,5
FBS	10%	5
Dexamethasone 100X	0,1 μ M	0,5
Indomethacin 1000X	200 μ M	0,05
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 1000X	500 μ M	0,05
Insuline 100X	2mM	0,05
Penicillin/Streptomycin	1%	1

4. Môi trường cảm ứng tạo tế bào nguyên bào xương (100 mL):

Thành phần	Nồng độ	Lượng
DMEM low glucose		89 mL
FBS	10%	10 mL
Dexamethasone 100X	0,1 μ M	196,2 μ L
L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP)	100 μ M	0,0029 g
β - glycerolphosphate	10 mM	0,2160 g
Penicillin/Streptomycin	1%	1 mL

5. Môi trường đông lạnh tế bào: DMEM/F12 bổ sung thêm 10% DMSO

6. Môi trường rửa tế bào: DMEM/F12

7. Môi trường DMEM low glucose (100 mL):

Thành phần	Nồng độ	Lượng
DMEM powder D2902 (Sigma)	10 g/L	1 g
bFGF	10 ng/mL	20 μ L
EGF	10 ng/mL	20 μ L
NaHCO ₃	3,7 g/L	0,37 g
Penicillin/Streptomycin	1%	1 mL

8. Môi trường biệt hóa bằng DMSO: DMEM/F12 bổ sung thêm DMSO ở các nồng độ 0,01%; 0,1% và 1%

9. Môi trường biệt hóa bằng tổ hợp HGF, dexamethasone và OSM:

TBG cuống rốn được nuôi cấy trong môi trường nuôi DMEM/F12 bổ sung 15% FBS, FGF, EGF, các chất kháng sinh trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó được biệt hóa như sau:

Môi trường biệt hóa I (14 ngày): Môi trường nuôi tế bào bổ sung thêm 20 ng/mL yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF, Sigma), 1 mM/L Dexamethasone (DEX) (Sigma).

Môi trường biệt hóa II (14 ngày): Môi trường biệt hóa I + oncostain M (OSM) với nồng độ 20 ng/mL.

10. Môi trường biệt hóa bằng tổ hợp HGF, trichostantine A và OSM:

TBG cuống rốn được nuôi cấy trong môi trường nuôi DMEM/F12 bổ sung 15% FBS, FGF, EGF, các chất kháng sinh trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó được biệt hóa như sau:

Môi trường biệt hóa I (7 ngày): Môi trường nuôi tế bào bổ sung thêm 20ng/mL IGF (Sigma), 20 ng/ mL HGF (sigma) và 10⁻⁷ M/L Trichostantine (Sigma).

Môi trường biệt hóa II (14 ngày): Môi trường biệt hóa I + oncostain M (OSM) với nồng độ 10 ng/mL.

11. Môi trường nuôi tế bào sau chuyển gen:

Kết thúc quá trình chuyển gen, tế bào được chuyển sang nuôi trong môi trường DMEM low glucose (1g/L), bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum), 5 ng/mL EGF,

50 IU penicillin, 50 mg/mL Streptomycin, 10 µg/mL ciprofloxacin. Thời gian nuôi cấy 3 ngày, ở 37°C và cấp khí CO₂ 5%. để hoạt hóa biểu hiện của gen *HNF4α*, Môi trường nuôi cấy sẽ được bổ sung Doxycycline nồng độ 200 ng/mL trong 24 giờ nuôi cấy tiếp theo.

PHỤ LỤC 6. TRÌNH TỰ CDS CỦA GEN *HNF4 α*

Homo sapiens hepatocyte nuclear factor 4 4 alpha variant 4 (NR2A1) mRNA, complete cds
 Sequence ID: [HQ692868.1](#) Length: 1359 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1359 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2510 bits(1359)	0.0	1359/1359(100%)	0/1359(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTCAGCGTGAACGCGCCCTCGGGGCTCCAGTGGAGAGTTCTTACGACACGTCCCCA			60
Sbjct 1	ATGGTCAGCGTGAACGCGCCCTCGGGGCTCCAGTGGAGAGTTCTTACGACACGTCCCCA			60
Query 61	TCAGAAAGGCACCAACCTCAACGCGCCCAACAGCCTGGGTGTCAGCGCCCTGTGTGCCATC			120
Sbjct 61	TCAGAAAGGCACCAACCTCAACGCGCCCAACAGCCTGGGTGTCAGCGCCCTGTGTGCCATC			120
Query 121	TGCGGGGACCGGGCCACGGGCAAACACTACGGTGCCTCGAGCTGTGACGGCTGCAAGGGC			180
Sbjct 121	TGCGGGGACCGGGCCACGGGCAAACACTACGGTGCCTCGAGCTGTGACGGCTGCAAGGGC			180
Query 181	TTCTTCCGGAGGAGCGTGCAGGAAGAACCACATGTACTCCTGCAGATTTAGCCGGCAGTGC			240
Sbjct 181	TTCTTCCGGAGGAGCGTGCAGGAAGAACCACATGTACTCCTGCAGATTTAGCCGGCAGTGC			240
Query 241	GTGGTGGACAAAGACAAGAGGAACCAGTGCCGCTACTGCAGGCTCAAGAAATGCTTCCGG			300
Sbjct 241	GTGGTGGACAAAGACAAGAGGAACCAGTGCCGCTACTGCAGGCTCAAGAAATGCTTCCGG			300
Query 301	GCTGGCATGAAGAAGGAAGCCGTCCAGAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCGAAGGTCA			360
Sbjct 301	GCTGGCATGAAGAAGGAAGCCGTCCAGAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCGAAGGTCA			360
Query 361	AGCTATGAGGACAGCAGCCTGCCCTCCATCAATGCGCTCCTGCAGGCGGAGGTCTGTCC			420
Sbjct 361	AGCTATGAGGACAGCAGCCTGCCCTCCATCAATGCGCTCCTGCAGGCGGAGGTCTGTCC			420
Query 421	CGACAGATCACCTCCCCGTCTCCGGGATCAACGGCGACATTCGGGCGAAGAAGATTGCC			480
Sbjct 421	CGACAGATCACCTCCCCGTCTCCGGGATCAACGGCGACATTCGGGCGAAGAAGATTGCC			480
Query 481	AGCATCGCAGATGTGTGTGAGTCCATGAAGGAGCAGCTGCTGGTTCTCGTTGAGTGGGCC			540
Sbjct 481	AGCATCGCAGATGTGTGTGAGTCCATGAAGGAGCAGCTGCTGGTTCTCGTTGAGTGGGCC			540
Query 541	AAGTACATCCCAGCTTTCTGCGAGCTCCCCCTGGACGACCAGGTGGCCCTGCTCAGAGCC			600
Sbjct 541	AAGTACATCCCAGCTTTCTGCGAGCTCCCCCTGGACGACCAGGTGGCCCTGCTCAGAGCC			600
Query 601	CATGCTGGCGAGCACCTGCTGCTCGGAGCCACCAAGAGATCCATGGTGTTCAGGACGTG			660
Sbjct 601	CATGCTGGCGAGCACCTGCTGCTCGGAGCCACCAAGAGATCCATGGTGTTCAGGACGTG			660
Query 661	CTGCTCCTAGGCAATGACTACATTGTCCCTCGGCACTGCCCGGAGCTGGCGGAGATGAGC			720
Sbjct 661	CTGCTCCTAGGCAATGACTACATTGTCCCTCGGCACTGCCCGGAGCTGGCGGAGATGAGC			720
Query 721	CGGGTGTCCATACGCATCCTTGACGAGCTGGTGTGCCCTTCCAGGAGCTGCAGATCGAT			780
Sbjct 721	CGGGTGTCCATACGCATCCTTGACGAGCTGGTGTGCCCTTCCAGGAGCTGCAGATCGAT			780
Query 781	GACAATGAGTATGCCTACCTCAAAGCCATCATCTTCTTTGACCCAGATGCCAAGGGGCTG			840
Sbjct 781	GACAATGAGTATGCCTACCTCAAAGCCATCATCTTCTTTGACCCAGATGCCAAGGGGCTG			840
Query 841	AGCGATCCAGGGAAGATCAAGCGGCTGCGTTCAGGTCAGGTGAGCTTGGAGGACTAC			900
Sbjct 841	AGCGATCCAGGGAAGATCAAGCGGCTGCGTTCAGGTCAGGTGAGCTTGGAGGACTAC			900

```

Query 841 AGCGATCCAGGGAAGATCAAGCGGCTGCGTTCCCAGGTGCAGGTGAGCTTGGAGGACTAC 900
          |||
Sbjct 841 AGCGATCCAGGGAAGATCAAGCGGCTGCGTTCCCAGGTGCAGGTGAGCTTGGAGGACTAC 900

Query 901 ATCAACGACCGCCAGTATGACTCGCGTGGCCGCTTTGGAGAgctgctgctgctgctgccc 960
          |||
Sbjct 901 ATCAACGACCGCCAGTATGACTCGCGTGGCCGCTTTGGAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCCC 960

Query 961 ACCTTGCAAGCATCACCTGGCAGATGATCGAGCAGATCCAGTTCATCAAGCTCTTCGGC 1020
          |||
Sbjct 961 ACCTTGCAAGCATCACCTGGCAGATGATCGAGCAGATCCAGTTCATCAAGCTCTTCGGC 1020

Query 1021 ATGGCCAAGATTGACAACCTGTTGCAGGAGATGCTGCTGGGAGGGTCCCCAGCGATGCA 1080
          |||
Sbjct 1021 ATGGCCAAGATTGACAACCTGTTGCAGGAGATGCTGCTGGGAGGGTCCCCAGCGATGCA 1080

Query 1081 CCCCATGCCACCACCCCTGCACCCTCACCTGATGCAGGAACATATGGGAACCAACGTC 1140
          |||
Sbjct 1081 CCCCATGCCACCACCCCTGCACCCTCACCTGATGCAGGAACATATGGGAACCAACGTC 1140

Query 1141 ATCGTTGCCAACACAATGCCCACTCACCTCAGCAACGGACAGATGTGTGAGTGGCCCCGA 1200
          |||
Sbjct 1141 ATCGTTGCCAACACAATGCCCACTCACCTCAGCAACGGACAGATGTGTGAGTGGCCCCGA 1200

Query 1201 CCCAGGGGACAGGCAGCCACCCCTGAGACCCACAGCCCTCACCGCCAGGTGGCTCAGGG 1260
          |||
Sbjct 1201 CCCAGGGGACAGGCAGCCACCCCTGAGACCCACAGCCCTCACCGCCAGGTGGCTCAGGG 1260

Query 1261 TCTGAGCCCTATAAGCTCCTGCCGGGAGCCGTCGCCACAATCGTCAAGCCCTCTCTGCC 1320
          |||
Sbjct 1261 TCTGAGCCCTATAAGCTCCTGCCGGGAGCCGTCGCCACAATCGTCAAGCCCTCTCTGCC 1320

Query 1321 ATCCCCAGCCGACCATACCAAGCAGGAAGTTATCTAG 1359
          |||
Sbjct 1321 ATCCCCAGCCGACCATACCAAGCAGGAAGTTATCTAG 1359

```