

KHẢO SÁT TÁC ĐỘNG CỦA TỐC ĐỘ LÀM LẠNH VÀ NỒNG ĐỘ HUYẾT THANH LÊN TỈ LỆ SỐNG VÀ TÍNH GỐC CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ SAU KHI ĐÔNG LẠNH

Phạm Văn Phúc⁽¹⁾, Nguyễn Thanh Tâm⁽²⁾, Vương Thị Hồng Nhung⁽¹⁾,
Dương Thị Bạch Tuyết⁽²⁾, Phan Kim Ngọc⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 28 tháng 07 năm 2009)

TÓM TẮT: Tế bào gốc trung mô có thể được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau, trong đó máu cuống rốn là một nguồn tế bào gốc trung mô dồi dào. Việc bảo quản các tế bào gốc này sao cho có thể duy trì được tính gốc và tỉ lệ sống cao sau khi bảo quản là cần thiết cho các ứng dụng y học. Nghiên cứu này nhằm xác định tỉ lệ sống và tính gốc của các tế bào gốc trung mô sau khi đông lạnh bằng các phương pháp và môi trường bảo quản khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy: tính gốc của các tế bào gốc trung mô không bị ảnh hưởng bởi quy trình bảo quản và môi trường bảo quản. Tất cả các tế bào gốc còn sống sau các quy trình bảo quản trong các môi trường bảo quản khác nhau đều có thể hình thành các tập đoàn cũng như biệt hóa thành xương và mỡ. Trái lại, tỉ lệ sống của tế bào gốc trung mô sau giải đông bị ảnh hưởng lớn bởi phương pháp đông lạnh và thành phần huyết thanh của môi trường bảo quản.

Từ khóa: Tế bào gốc trung mô, đông lạnh, máu cuống rốn, tính gốc.

1. MỞ ĐẦU

Tế bào gốc trung mô máu cuống rốn là một trong những nguồn tế bào gốc quý. Chúng có thể biệt hóa thành nhiều kiểu tế bào khác nhau thuộc trung mô, nội mô và biểu mô. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng thành công nguồn tế bào gốc này trong điều trị cận lâm sàng và lâm sàng trên nhiều bệnh [8]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về bảo quản đông lạnh và xác định các ảnh hưởng của quá trình đông lạnh đến tính gốc của các tế bào này vẫn chưa được nghiên cứu nhiều.

Nghiên cứu này tập trung vào khảo sát các tác động của phương pháp đông lạnh và thành phần huyết thanh trong môi trường đông lạnh đến tỉ lệ sống sót của tế bào sau khi giải đông nhằm xây dựng quy trình đông lạnh hiệu quả nhất để bảo quản nguồn tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người nói riêng và tế bào gốc trung mô nói chung.

Nghiên cứu sử dụng 3 phương pháp đông lạnh thường được sử dụng nhất trong các tế bào sinh dưỡng là: (1) đông lạnh *in situ*: các tế bào được đông lạnh trực tiếp trong các flask 25 cm² (Nunc, Đức) nuôi trong môi trường bảo quản lạnh ở nhiệt độ -80°C; (2) đông lạnh nhanh: tế bào được đông lạnh trong cryotube 1,8 ml trong môi trường bảo quản, được giảm nhiệt độ dần dần (4°C trong 30 phút, -20°C trong 45 phút, -80°C qua đêm; và sang hôm sau cho vào nitơ lỏng); (3) đông lạnh cực nhanh hay thủy tinh hóa: tế bào trong môi trường bảo quản trong cryotube được đặt trực tiếp vào nitơ lỏng.

Chúng tôi sử dụng chất bảo quản là DMSO với nồng độ 10%, bổ sung trong môi trường nuôi tế bào gốc trung mô máu cuống rốn IMDM với các nồng độ huyết thanh FBS khác nhau: 20%, 50% và 90% (với kí hiệu: Môi trường 1: 20% FBS, 10% DMSO, 70% IMDM; Môi trường 2: 50% FBS, 10% DMSO, 40% IMDM; Môi trường 3: 90% FBS, 10% DMSO).

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu nhận tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người

Tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn được thu nhận theo quy trình của Oscar K. Lee và cs, 2004 [10]. Máu cuống rốn thu nhận từ các sản phụ đã được xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, ở Bệnh viện Hùng Vương Thành phố Hồ Chí Minh. Thu nhận quần thể tế bào đơn nhân bằng phương pháp li tâm trên gradient nồng độ Ficoll-paque (Sigma) ở tốc độ 2.500 vòng/phút, trong 5 phút. Sau đó, thu nhận phân đoạn tế bào đơn nhân nằm giữa lớp Ficoll-paque và lớp huyết tương bên trên.

Tế bào đơn nhân sau khi thu nhận được huyền phù trong môi trường nuôi cấy IMDM, 20% FBS, nuôi trong bình nuôi cấy (Nunc, 25 cm²) sao cho đạt mật độ 3.10⁵ tế bào/cm² ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau 48 giờ, các tế bào gốc trung mô bắt đầu bám trên bề mặt bình nuôi, thay môi trường để loại bỏ các tế bào không bám (các tế bào chết và tế bào gốc tạo máu), tiếp tục nuôi đến khi tế bào đạt mật độ 70-80% diện tích bề mặt bình nuôi cấy với chế độ thay môi trường là 4 ngày/lần.

Khi mật độ tế bào MSC trong bình nuôi đạt khoảng 70-80%, tiến hành cấy chuyển tăng sinh. Các tế bào sau khi được cấy chuyển 7 lần sẽ được sử dụng để đông lạnh. Chất bảo quản lạnh được sử dụng là DMSO, với tỉ lệ 10%; đây là tỉ lệ được sử dụng trên hầu hết các dòng tế bào sinh dưỡng và tế bào gốc phôi cho tỉ lệ sống cao sau khi giải đông [3; 5; 6; 7; 11].

2.2. Phương pháp đông lạnh nhanh

Các tế bào gốc trung mô máu cuống rốn sau khi nuôi cấy trong flask 25 cm² với mật độ tế bào chiếm khoảng 70% bề mặt được tách bằng trypsin/EDTA 0,25%. Huyền phù tế bào được li tâm 2500 vòng/phút trong 5 phút và chỉnh mật độ tế bào về 10⁶ tế bào/ml. Li tâm hút 1 ml huyền phù trên (2500 vòng/phút trong 5 phút) để thu nhận tế bào. Tái huyền phù cận tế bào bằng 1 ml môi trường đông lạnh (tương ứng từng môi trường), chuyển toàn bộ huyền phù tế bào trên vào Cryotube 1,8 ml (Nunc). Dán nhãn và đánh dấu dòng tế bào, loại môi trường tương ứng trên Cryotube.

Đặt các Cryotube trên vào tủ mát 4°C trong 30 phút và chuyển sang tủ lạnh -20°C trong 45 phút, sau đó chuyển sang tủ lạnh -80°C và để qua đêm. Sáng hôm sau mang các Cryotube đặt vào bình nitơ lỏng (-196°C) để bảo quản. Thí nghiệm được tiến hành 10 lần lặp lại, mỗi lần tiến hành 3 mẫu; mỗi mẫu chứa 1 triệu tế bào gốc trung mô. Kết quả được tính về tỉ lệ phần trăm và xử lí bằng phần mềm thống kê Statgraphic version 7.0.

2.3. Phương pháp đông lạnh cực nhanh (thủy tinh hóa)

Tế bào gốc trung mô máu cuống rốn nuôi trong flask 25cm² (70% bề mặt phát triển), được tách bằng Trypsin/EDTA 0,25%. Huyền phù tế bào đơn thu nhận được li tâm 2500 vòng/phút trong 5 phút và chỉnh mật độ tế bào về 10⁶ tế bào/ml. Hút 1 ml huyền phù trên, li tâm 2500 vòng/phút trong 5 phút để thu nhận tế bào. Huyền phù cận tế bào với 1 ml môi trường đông lạnh (tương ứng từng môi trường) vào cận tế bào trên, chuyển toàn bộ huyền phù tế bào trên vào Cryotube 1,8 ml. Dán nhãn và đánh dấu dòng tế bào, loại môi trường tương ứng trên Cryotube. Đặt các Cryotube vào bình nitơ lỏng (-196°C). Thí nghiệm được tiến hành 10 lần lặp lại, mỗi lần tiến hành 3 mẫu; mỗi mẫu chứa 1 triệu tế bào gốc trung mô. Kết quả được tính về tỉ lệ phần trăm và xử lí bằng phần mềm thống kê Statgraphic version 7.0.

2.4. Phương pháp đông lạnh *in situ* (đông lạnh trong bình nuôi)

Tế bào gốc trung mô máu cuống rốn trong flask 25 cm² phát triển đến 70% diện tích bề mặt nuôi. Đổ bỏ dịch nuôi ra ngoài, rửa lại tế bào 2 lần bằng PBSA. Bổ sung 4 ml môi trường đông lạnh (tương ứng từng môi trường). Dán nhãn, viết kí hiệu tương ứng lên các bình nuôi và

đặt vào tủ lạnh -80°C . Thí nghiệm được tiến hành 10 lần lặp lại, mỗi lần tiến hành 3 mẫu; mỗi mẫu chứa 1 triệu tế bào gốc trung mô. Kết quả được tính về tỉ lệ phần trăm và xử lí bằng phần mềm thống kê Statgraphic version 7.0.

2.5. Phương pháp giải đông

Lấy Cryotube ra khỏi bình nitơ lỏng (-196°C) hoặc lấy flask ra khỏi tủ lạnh (-80°C). Đặt vào bể ổn nhiệt ở 37°C trong 3 -5 phút đến khi tan hết đá. Chuyển tế bào sang ống nghiệm vô trùng chứa môi trường IMDM, 40% FBS đã làm ấm. Ly tâm nhẹ 800 vòng/phút trong 3-5 phút. Tái huyền phù tế bào trong 1 ml môi trường IMDM, 20% FBS. Hút 10 μl huyền phù trên đi xác định hiệu quả sống bằng cách nhuộm đếm với Trypan blue. Phần huyền phù còn lại được pha loãng 4 lần, nuôi ở 37°C , 5% CO_2 sau 1-3 ngày để xác định khả năng tăng sinh và phát triển.

2.6. Đánh giá tế bào sau giải đông

Các tế bào sau khi giải đông được đánh giá thông qua 3 chỉ tiêu: tỉ lệ sống chết (thông qua phương pháp đếm với trypan blue), khả năng tự làm mới (thông qua phương pháp colony assay) và khả năng biệt hóa thành xương và mỡ [10].

Biệt hóa thành tế bào tạo mỡ (adipocyte)

Để biệt hóa thành mỡ, các MSC được nuôi trong môi trường IMDM 10% FBS bổ sung 1 μM dexamethasone, 200 μM indomethacin, 1,7 μM insuline, 500 μM isobutyl-methylxanthine (Sigma). Sự biệt hóa được ghi nhận khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại X20, X40 thấy có sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ.

Biệt hoá thành tế bào tạo xương (Osteoblast)

Các tế bào MSC được nuôi trong môi trường IMDM 10% FBS bổ sung 100 nM dexamethasone, 50 $\mu\text{g/ml}$ L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) và 100 mM β -glycerolphosphate (Sigma).

Phân tích RT-PCR

Kiểu hình của tế bào tạo xương được đánh giá thông qua sự biểu hiện của các gen marker như osteopontin (hOSP) và osteocalcin (hOC).

RNA được tách từ 3-30. 10^5 tế bào MSC sử dụng TRI reagent (Sigma) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Phản ứng RT-PCR được tiến hành sử dụng Kit one-tube của Stratagene. Trong tất cả các phản ứng sử dụng beta-actin như là một đối chứng nội. Phản ứng PCR được tiến hành theo chu trình sau: 94°C trong 40 giây, 56°C trong 50 giây, và 72°C trong 60 giây với 40 chu kì, sau thời kì biến tính 94°C trong 5 phút. Sau 49 chu kì, tiến hành ủ thêm 7 phút ở 72°C và làm lạnh xuống 4°C trong 5 phút.

Các primer sử dụng cho RT-PCR với trình tự như sau: Osteocalcin: sense 5'-CGCAGCCACCGAGACACCAT-3', antisense 5'-GGGCAAGGGCAAGGGGAAGA-3' (405bp); Osteopontin: sense 5'-CTAGGCATCACCTGTGCCATACC-3', antisense 5'-CTACTTAGACTACTTGACCAGTGAC-3' (330 bp); Beta-actin, Sense: 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3', antisense: 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3' (587 bp).

Kết quả RT-PCR được chạy điện di trên gel agarose 3%, quan sát kết quả dưới bàn đèn UV.

3. KẾT QUẢ-THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ phần trăm tế bào sống sau khi đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh nhanh

Dựa vào kết quả cho thấy sự khác biệt rõ rệt tỷ lệ phần trăm của tế bào sống giữa 3 môi trường. Ở môi trường 1 với tỷ lệ tế bào sống là 23,5172 % thấp hơn rất nhiều so với môi trường 2 là 64,7806% và môi trường 3 là 78,2187%.

Ba môi trường sử dụng, chỉ khác nhau về nồng độ huyết thanh bổ sung, điều này gợi cho thấy rằng nồng độ huyết thanh đã ảnh hưởng đến sức sống sót của tế bào khi đông lạnh.

Nhiều nghiên cứu từ trước đến hiện nay đều cho thấy huyết thanh có vai trò cực kì quan trọng trong nuôi cấy tế bào, với nhiều thành phần chưa biết rõ; huyết thanh có thể hồi phục màng tế bào, trung hòa tính độc của DMSO, đệm pH tốt, điều hòa áp suất thẩm thấu... vì thế với nồng độ huyết thanh càng cao thì tỷ lệ sống của tế bào càng cao.

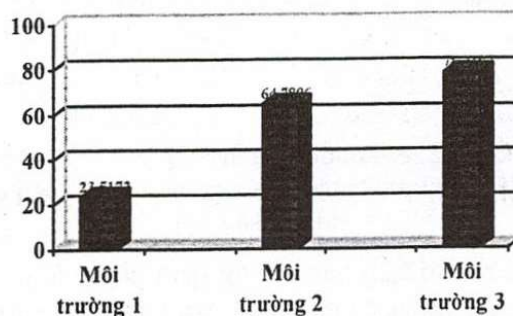
Ở độ tin cậy 95% (LSD = 95%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phần trăm tế bào sống của ba môi trường là khác nhau và tỷ lệ này tăng dần từ môi trường 1 đến môi trường 2 và môi trường 3.

3.2. Tỷ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông ở phương pháp đông lạnh cực nhanh

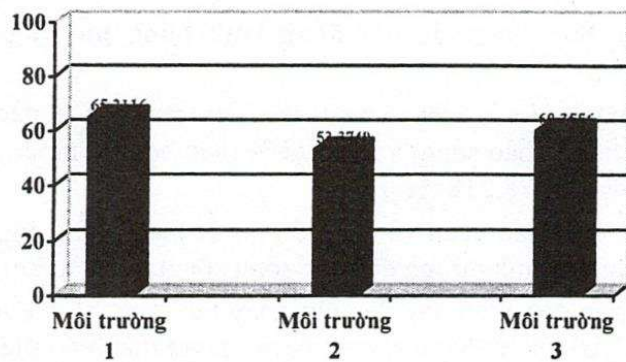
Sau khi giải đông, tỷ lệ tế bào sống ở 3 môi trường là: môi trường 1 là 65,2116 % ; môi trường 2 là 53,3749 % và môi trường 3 là 60,3556 %.

Theo kết quả này, dường như rằng nồng độ huyết thanh không ảnh hưởng *quan trọng* đến tỷ lệ sống của tế bào sau khi giải đông. Tỷ lệ phần trăm các tế bào sống sau giải đông không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể giải thích như sau:

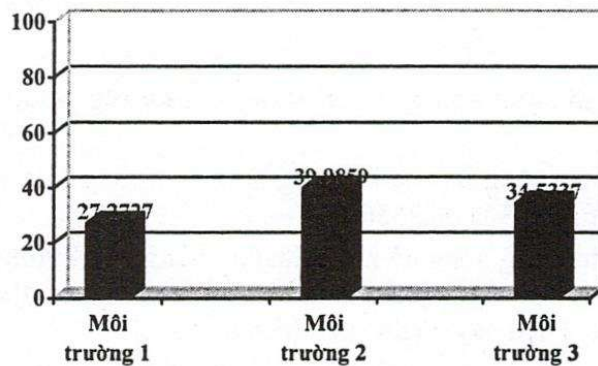
Khi tiến hành phương pháp đông lạnh cực nhanh, sau khi cho môi trường đông lạnh vào tế bào, tế bào trong môi trường bảo quản được đặt trực tiếp vào bình nitơ lỏng ở nhiệt độ -196°C , trong tế bào xảy ra hiện tượng hình thành tinh thể thủy tinh (glass) thay vì hình thành băng đá (ice) nội bào. Tuy nhiên, vì nhiệt độ giảm quá nhanh từ 25°C của nhiệt độ phòng xuống -196°C trong 1 - 2 giây hay giảm tốc độ $12.000^{\circ}\text{C}/\text{phút}$; thời gian để tế bào mất nước khi bổ sung chất đông lạnh vào quá ngắn nên vẫn còn một lượng lớn nước tồn tại trong tế bào chất của tế bào khi đông lạnh. Tuy rằng những phân tử nước này không gây hại cho tế bào vì chúng tồn tại ở dạng tinh thể thủy tinh (kính) nên không làm chết tế bào. Song, vấn đề nghiêm trọng có thể xảy ra ở quá trình giải đông. Khi giải đông, tế bào ở -196°C về 37°C , nên các tinh thể thủy tinh chuyển từ trạng thái này sang trạng thái tinh thể đá rồi trở lại trạng thái lỏng. Vì thế, khi có sự xuất hiện các tinh thể đá là nguyên nhân gây chết tế bào. [1; 2; 9]



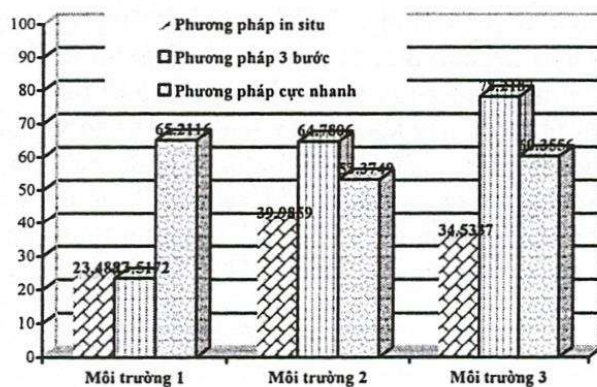
a)



b)



c)



d)

Hình 1. Tỷ lệ phần trăm tế bào sống sau khi đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh nhanh (a), cực nhanh (b), và *in situ* (c). (d) Tỷ lệ phần trăm tế bào sống trong các phương pháp và môi trường đông lạnh khác nhau.

Thật vậy, nhiều nghiên cứu khi tiến hành đông lạnh phiêu bằng phương pháp này, các tác giả phải sử dụng môi trường có áp suất thẩm thấu cao hơn môi trường đông lạnh tế bào theo quy trình bình thường (3 bước) để loại bỏ nhanh chóng các phân tử nước nội bào, làm giảm sự hình thành các tinh thể đá khi giải đông; và khi đó tỷ lệ sống sẽ được cải thiện.

Trong quá trình đông lạnh 3 bước (nhanh); tế bào chịu tác động giảm dần của nhiệt độ trong trạng thái tiếp xúc với chất độc DMSO, trong khi chúng chưa hoàn toàn ngừng tăng trưởng nên nồng độ huyết thanh càng cao sẽ giúp tế bào giảm được các tác động bất lợi của DMSO gây ra. Trong khi đó, trong quy trình đông lạnh cực nhanh, thời gian tế bào chuyển từ trạng thái còn sống về trạng thái tiềm tàng quá ngắn nên huyết thanh không phát huy được vai trò hạn chế tác động xấu của DMSO. [1; 3].

3.3. Tỷ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông ở phương pháp đông lạnh *in situ*

Trong phương pháp đông lạnh *in situ*, tỉ lệ sống của tế bào sau quá trình đông lạnh là không cao, ở cả ba môi trường đều thấp hơn 50% tế bào sống. Tỉ lệ tế bào sống ở môi trường 1 luôn thấp hơn môi trường 2 và môi trường 3 vì nồng độ huyết thanh trong môi trường đông lạnh thấp chỉ chiếm 10%. Điều này một lần nữa khẳng định ảnh hưởng của huyết thanh đến sự sống sót của các tế bào trong các quá trình đông lạnh nhiệt độ hạ chậm.

Ở môi trường 2 và môi trường 3 với nồng độ huyết thanh khác nhau nhưng tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông là như nhau. Điều này có thể giải thích là ở phương pháp đông lạnh này huyết thanh ảnh hưởng đến sức sống của tế bào là có ngưỡng tác động (tuy nhiên ngưỡng này chưa xác định trong nghiên cứu này).

Nhiều nghiên cứu tiến hành đông lạnh tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc trung mô từ tủy xương và tế bào gốc phôi cho thấy hầu hết các kết quả với tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau giải đông cao được đề nghị là 40-50% huyết thanh bổ sung trong môi trường nuôi. Điều này có thể suy luận rằng, nếu sử dụng nồng độ huyết thanh thấp thì tỉ lệ phần trăm tế bào sống sót sau giải đông thấp hơn hay là ngưỡng nồng độ 40-50% là cho kết quả tốt. Việc tăng nồng độ huyết thanh cao hơn không được đề nghị trong hầu hết các nghiên cứu vì giá thành của tế bào sau khi giải đông tăng rất cao (huyết thanh là thành phần chiếm đến 99% giá của một môi trường nuôi).

Ở độ tin cậy 95% (LSD = 95%), cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ tế bào sống ở môi trường 1 so với môi trường 2 và môi trường 3. Trong khi đó, môi trường 2 và môi trường 3 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.4. Tỷ lệ sống của các tế bào ở các môi trường và các phương pháp đông lạnh khác nhau

Trong môi trường 1 (10% FBS), tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông giữa hai phương pháp *in situ* và đông lạnh nhanh là tương đương nhau (23,4887% và 23,5172%); phương pháp đông lạnh cực nhanh cho tỉ lệ phần trăm tế bào sống rất cao so với hai phương pháp còn lại (gấp chừng 2,5 lần). Điều này có thể giải thích:

Trong phương pháp đông lạnh nhanh và *in situ*, tế bào chuyển từ nhiệt độ 25°C xuống -80°C chậm, với nồng độ huyết thanh thấp, nên số lượng tế bào chết nhiều. Trong khi đó, ở phương pháp đông lạnh cực nhanh, do sự thay đổi nhiệt độ cực nhanh nên tác động của DMSO làm hại tế bào giảm.

Điều thấy rõ hơn trong môi trường 2 khi đông lạnh bằng 3 phương pháp trên. Ở môi trường với nồng độ huyết thanh cao (50%), sức sống của tế bào tăng lên đáng kể, gợi ý cho rằng độc tính của DMSO giảm khi nồng độ huyết thanh tăng. Tỉ lệ phần trăm tế bào sống trong 3 môi trường có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ phần trăm tế bào sống cao nhất ở phương pháp đông lạnh nhanh. Như vậy, nếu đông lạnh với môi trường có 50% FBS trong môi trường nuôi và bằng phương pháp đông lạnh nhanh thì sẽ có tỉ lệ tế bào sống cao nhất.

Trong môi trường 3, tỉ lệ tế phần trăm tế bào sống cao nhất vẫn được ghi nhận ở phương pháp đông lạnh nhanh. Có lẽ, trong phương pháp này nhiệt độ giảm từ từ, nếu bổ sung nồng độ huyết thanh thích hợp thì sức sống của các tế bào sau khi giải đông khá cao.

Tóm lại, các phương pháp đông lạnh khác nhau khi tiến hành đông lạnh với một môi trường đông lạnh sẽ cho kết quả tỉ lệ phần trăm tế bào sống khác nhau.

3.5. Sự tương quan hồi quy giữa nồng độ huyết thanh trong môi trường bảo quản và tỉ lệ sống sót sau giải đông

Các kết quả thực nghiệm được phân tích ANOVA cho thấy:

Trong phương pháp đông lạnh nhanh nồng độ huyết thanh có ảnh hưởng đến tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông: ở nồng độ huyết thanh càng cao, tỉ lệ sống cao. Tuy nhiên, khi phân tích ANOVA cho thấy sự tương quan này không tuyến tính hay nói cách khác khi tăng nồng độ huyết thanh càng cao thì tỉ lệ phần trăm tế bào sống không tăng theo. Một lần nữa cho thấy, sự tác động của huyết thanh lên tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau giải đông là ngưỡng tác động.

Trong phương pháp đông lạnh in situ: nồng độ huyết thanh cũng có ảnh hưởng đến sức sống của tế bào sau giải đông. Các số liệu cho thấy, sức sống của tế bào ở nồng độ huyết thanh 50% và 90% là như nhau nhưng cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nồng độ huyết thanh 20%. Như vậy, trong thí nghiệm, ngưỡng tác động lên sức sống của tế bào đông lạnh khi giải đông cho thấy rõ rệt. Sự tương quan của tỉ lệ phần trăm tế bào sống sau khi giải đông và tỉ lệ phần trăm huyết thanh là không tuyến tính hay chỉ tuyến tính trong một khoảng nào đó (có thể dưới 50% huyết thanh) mà nghiên cứu chưa xác định.

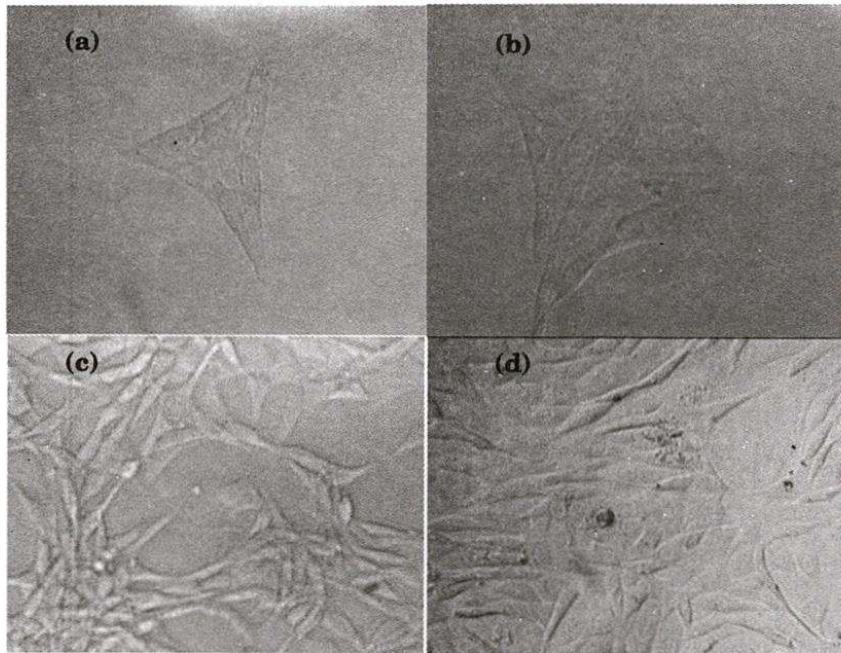
Trong phương pháp đông lạnh cực nhanh: sự tương quan giữa tỉ lệ phần trăm tế bào sống và tỉ lệ phần trăm huyết thanh là không có.

Như vậy, từ các phân tích trên có thể kết luận rằng: sự tác động của huyết thanh lên sức sống của tế bào có ý nghĩa khi tế bào chìm trong môi trường bảo quản tiếp xúc DMSO và nhiệt độ giảm từ từ. Vai trò bảo vệ của huyết thanh không thấy rõ khi tiến hành đông lạnh cực nhanh (hay giảm nhiệt độ cực nhanh). Trong nghiên cứu, chưa xác định tác động có hay không của huyết thanh lên sức sống khi đông lạnh cực nhanh (không có tiến hành bảo quản tế bào trong môi trường không có huyết thanh).

3.6. Kết quả xác định colony assay

Kết quả đếm các colony hình thành từ các tế bào còn sống sau giải đông cho thấy, 100% các tế bào còn sống sẽ hình thành các tập đoàn sau 24 giờ, 48 giờ. Sau 7 ngày, các colony hợp dòng và mật độ đạt từ 70-80% diện tích bề mặt bình nuôi.

Các tế bào sau khi giải đông đã cấy chuyển 3 lần (đến thời điểm viết báo cáo) và vẫn cho thấy khả năng tăng sinh mạnh.

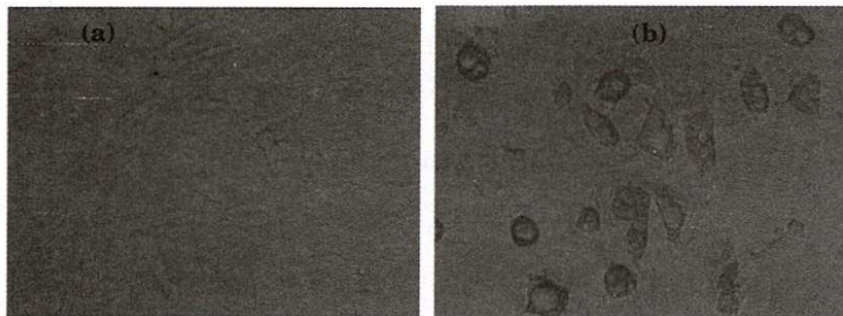


Hình 2. Kết quả xét nghiệm colony assay. Các cụm tế bào hình thành sau khi nuôi cấy 3 ngày (a), 5 ngày (b), 7 ngày (c) và 10 ngày (d).

Quá trình tăng sinh hình thành tập đoàn và hợp dòng của các tế bào sau khi giải đông là tương tự với các tế bào trước khi đông lạnh. Thời gian thế hệ của các tế bào được xác khoảng 24 giờ. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu của một số tác giả khác trên thế giới về thời gian thế hệ các tế bào gốc trung mô từ tủy xương người.

3.7. Biệt hoá hành tế bào tạo mỡ

Sau 48 giờ, các tế bào bắt đầu tích tụ các giọt mỡ trong tế bào chất. Các giọt mỡ nhỏ góp lại dần thành các giọt lớn. Các giọt mỡ lớn sau đó sẽ góp lại thành giọt mỡ lớn hơn chiếm gần hết thể tích tế bào và ép nhân tế bào ra ngoài. Vì thế, chúng từ dạng dài, trải rộng chuyển sang dạng bầu dục và cuối cùng là hình tròn. Các tế bào tạo mỡ với hình dạng tròn bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi tiến hành cảm ứng.



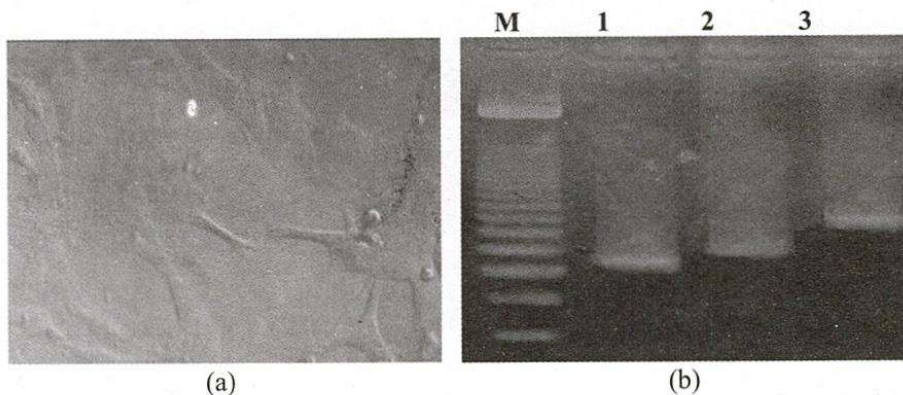
Hình 3. Tế bào sau khi biệt hóa trong môi trường cảm ứng tạo mỡ 7 ngày. (a) Tế bào trước khi cảm ứng biệt hóa, (b) Tế bào sau khi cảm ứng biệt hóa.

Sự xuất hiện các giọt mỡ có thể quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 hay 400 lần. Dưới kính hiển vi, các giọt mỡ có dạng tròn, phản chiếu ánh sáng.

3.8. Biệt hóa thành tế bào tạo xương

Sau khi nuôi trong môi trường biệt hóa, sau 7 ngày, các tế bào bắt đầu chuyển từ dạng dài sang dạng tròn và hình hạt đậu. Đó là hình dạng đặc trưng của tế bào tạo xương (osteoblast). Khi được cảm ứng biệt hóa, hầu như tất cả các tế bào đều ngừng phân chia. Đây cũng là một dấu hiệu cho thấy tế bào gốc đã biệt hóa thành tế bào chức năng. Điều này cũng đúng với trường hợp khi cảm ứng biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ.

Các tế bào sau khi cảm ứng biệt hóa dương tính với các marker cho tế bào xương là osteocalcin và osteopontin khi xác định bằng RT-PCR.



Hình 4. (a) Tế bào gốc trung mô khi chưa biệt hóa, (b) Kết quả chạy RT-PCR của mẫu tế bào gốc trung mô sau khi biệt hóa xương. M: thang chuẩn (100 bp), 1: osteopontin, 2: osteocalcin, 3: beta actin.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp đông lạnh nhanh với môi trường 90% FBS và 10% DMSO cho kết quả tốt nhất (78,22% tế bào sống sau giải đông) trong các phương pháp khảo sát. Trong phương pháp đông lạnh cực nhanh, sức sống của tế bào sau khi giải đông trong 3 môi trường bảo quản chứa 10% DMSO và lần lượt 20%, 50% và 90% FBS là tương đương nhau (khoảng 60%). Trong phương pháp đông lạnh *in situ*: sức sống tế bào trong ba môi trường là khác nhau, tỉ lệ sống cao hơn ở môi trường 2 và 3 với 10% DMSO, 50% và 90% FBS; nhưng thấp hơn 50% tế bào sống sau khi giải đông.

Trong ba phương pháp đông lạnh, dù ở môi trường nào thì tỉ lệ phần trăm tế bào sống của phương pháp đông lạnh nhanh cũng cao hơn phương pháp đông lạnh *in situ*, và tương đối cao hơn ở phương pháp đông lạnh cực nhanh. Tác động của huyết thanh lên sức sống tế bào sau khi giải đông là có, nhưng chỉ tồn tại trong một ngưỡng nhất định (có thể là 50%).

Tính gốc của tế bào gốc trung mô máu cuống rốn sau quá trình đông lạnh bằng ba phương pháp với ba môi trường khác nhau sẽ không thay đổi, tiềm năng tăng sinh và phát triển của chúng trước và sau khi giải đông là như nhau.

Để bảo quản tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn, nếu sử dụng đông lạnh nhanh thì nên chọn môi trường đông lạnh là 90% FBS và 10% DMSO. Nếu sử dụng phương pháp cực nhanh thì nên chọn môi trường với 10% FBS và 10% DMSO vì sẽ giảm giá thành. Phương pháp này cũng có lợi điểm khác là tiến hành rất nhanh (chỉ trong 15 phút, kể cả thời gian đưa tế bào vào cyotube) với phương pháp đông lạnh nhanh (tốn chừng 3 giờ để đưa vào nitơ lỏng). Phương

pháp đông lạnh *in situ* dù với môi trường có nồng độ huyết thanh cực cao (90%) cũng cho tỉ lệ phần trăm tế bào sống rất thấp (<50%). Song phương pháp này có nhiều ưu điểm: (1) không sử dụng cryotube, (2) Giảm thao tác thu nhận tế bào nên giảm nguy cơ nhiễm, (3) Tiến hành rất nhanh (chừng 2-3 phút), (4) Không cần sử dụng bình nitơ lỏng, (5) Chi phí thấp.

INVESTIGATING COOLING RATE AND FETAL BOVINE SERUM CONCENTRATION ON SURVIVAL AND STEMNESS OF MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER CRYOPRESERVATION

Pham Van Phuc⁽¹⁾, Nguyen Thanh Tam⁽²⁾, Vuong Thi Hong Nhung⁽¹⁾

Duong Thi Bach Tuyet⁽²⁾, Phan Kim Ngoc⁽¹⁾

(1)University of Science, VNU-HCM

(2)University of Pedagogy, HCM city

ABSTRACT: *Mesenchymal stem cells (MSCs) can be derived from many different sources. Umbilical cord blood is a rich source of MSCs. The cryopreservation of MSCs that MSCs are still alive and differentiate into many different kinds of functional cells is very important. The aims of this research are to identify ratio of alive and dead cells as well as stemness of them after thaw. The results showed that the stemness was not affected by cryopreservative protocols or media. All cells being alive after thaw could form colonies and differentiate into adipocytes and osteoblasts. Ratio of alive and dead cells was affected very much by cryopreservative protocols and media.*

Keywords: *Mesenchymal stem cell, cryopresevation, umbilical cord blood, stemness.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Clarke DM, Hollister WR, Baust JG, Van Buskirk RG, *Cryosurgical Modeling: Sequence of Freezing and Cytotoxic Agent Application Affects Cell Death*. Mol Urol. 3(1): 25 – 31, (1999).
- [2]. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC, *The Effect of Extracellular Ice and Cryoprotective Agents on the Water Permeability Parameters of Human Sperm Plasma Membrane during Freezing*. Hum Reprod. 15(5): 1125 – 1135, (2000).
- [3]. Gao D, Critser JK, *Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells*. ILAR J. 41(4): 187 – 196, (2000)..
- [4]. Han B, Bischof JC, *Direct Cell Injury Associated with Eutectic Crystallization during Freezing*. *Cryobiology*. 48(1): 8 – 21. Lanza RP, Langer R, Vacanti J. Chapter 24 (1997). *Cryopreservation. Principles of Tissue Engineering*. Edition 2, Academic Press, San Diego, CA. 293 – 305, (2004).
- [5]. Mazur P, *Cryobiology: The Freezing of Biological Systems*. Science. 168(934): 939 – 949, (1970).
- [6]. Mazur P, Leibon SP, Chu EH, *A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury*. Evidence from Chinese Hamster Tissue-Culture Cells. *Exp Cell Res*. 71(2): 345 – 355, (1972).

- [7]. Moustapha Kassen, *Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 95, 209 – 214, (2004)..
- [8]. Orief Y, Mosgau AS, Dafopoulos K, Al-Hasani S, *Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques?* Middle East Fertility Society Journal. 10(3): 171 – 184, (2005).
- [9]. Oscar K. Lee, Tom K. Kuo, Wei-Ming Chen, Kuan-Der Lee, Shie-Liang Hsieh and Tain-Hsiung Chen, *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood, 103: 1669-1675, (2004).
- [10]. Son JH, Kim KH, Nam YK, Park JK, Kim SK, *Optimization of Cryoprotectants for Cryopreservation of Rat Hepatocyte*. Biotechnol Lett. 26 (10): 829 – 833, (2004).