

Đánh giá tác động của Polybrene lên quá trình chuyển gen *GFP* vào tế bào gốc trung mô từ mô mỡ chuột

The impact of Polybrene on *GFP* transfection into mouse adipose derived stem cells

Phạm Lê Bửu Trúc^{1,2*}, Vũ Bích Ngọc², Nguyễn Ngọc Cường^{2,3}, Bùi Thị Vân Anh²

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Tế bào gốc, Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG TP. HCM, Việt Nam

³Công ty TNHH Công nghệ sinh học Dược NANOGEN, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: buutruc@gmail.com

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.14.1.433.2019

Ngày nhận: 03/04/2019

Ngày nhận lại: 04/07/2019

Duyệt đăng: 17/09/2019

Từ khóa:

ADSC, chuyển gen, Gfp, Polybrene, tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (Adipose Tissue-Derived Stem Cells-ADSCs) có những ưu điểm như khả năng tự làm mới, biệt hóa thành nhiều loại tế bào, dễ dàng thu nhận, ít gây xâm lấn, số lượng tế bào dồi dào và đặc biệt là có thể sử dụng làm nguồn tự ghép. Để thực hiện các nghiên cứu nhằm ứng dụng ADSCs cho y học tái tạo và công nghệ mô, việc chuyển gen gfp vào tế bào này nhằm theo dõi sự di cư, biệt hóa và các tác động của tế bào ghép trong cơ thể nhận là một việc cần thiết. Trong nghiên cứu này, ADSCs chuột (mADSCs) được chuyển gen gfp trong điều kiện có (lô polybrene) và không có polybrene (lô non-polybrene). Tác động của polybrene lên quá trình chuyển gen được đánh giá thông qua khả năng phát sáng của tế bào được chuyển gen, phân trăm số tế bào phát sáng và thời gian nhân đôi của tế bào sau chuyển gen. Kết quả cho thấy gen gfp đã được chuyển vào mADSCs ở cả 2 lô: lô polybrene và lô non-polybrene. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen ở lô non-polybrene cao hơn lô polybrene (86,2% > 71,13%). Thời gian nhân đôi của mADSC-gfp ở lô non-polybrene tương đương với thời gian nhân đôi của mADSC bình thường (32,5 giờ ~ 32,64 giờ); trong khi thời gian nhân đôi này ở mADSC-gfp lô polybrene dài hơn lô non-polybrene và lô đối chứng (40,98 giờ > 32,5 giờ ~ 32,64 giờ).

ABSTRACT

Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) have been a promising candidate in regenerative therapies because of their self-renewal and differentiation capacity. They are not only easily harvested by minimally invasive techniques but can also be used as autologous transplantation. However, it is crucial to have more in-depth studies about these techniques before

applying them to humans. Therefore, to have a better understanding and tracking of their behaviors inside the body, transfection of green fluorescent protein (GFP) has been developed to provide a helpful tool for performing in vivo research. In this study, mouse ADSCs (mADSCs) were transfected by GFP lentivirus vector with polybrene (polybrene group) or without polybrene (non-polybrene group). The effect of polybrene on the transfection efficiency was evaluated by the expression of GFP through the glowing ability of transgenic cells, the percentage of glowing cells, and the doubling time of the cells. The results indicated that the gfp gene was successfully transferred into mADSCs of both polybrene and non-polybrene groups. However, the transfection efficiency of the non-polybrene group was higher than that of the polybrene group (86.2% > 71.13%). The doubling time of GFP-mADSCs in the non-polybrene group was equivalent to that of the normal mADSC group (32.5 hours ~ 32.64 hours); while the doubling time of GFP-mADSCs in the polybrene group was longer than the non-polybrene group's and the control group's (40.98 hours > 32.5 hours ~ 32.64 hours).

Keywords:

ADSC, gene transfection, GFP, mesenchymal stem cells, polybrene

1. Tổng quan

Liệu pháp tế bào gốc gần đây đã mang đến những lợi ích to lớn trong y học tái tạo vì những tính chất vốn có của sự đa dạng và tự tái tạo tế bào gốc. Các tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cells- MSCs) là một nhóm các loại tế bào gốc trưởng thành có nguồn gốc từ các mô khác nhau, chẳng hạn như tủy xương, dây rốn và mô mỡ. Mô mỡ là một nguồn thu nhận tế bào gốc dồi dào, các tế bào này được gọi là ADSCs. Hơn thế nữa, mô mỡ có thể được lấy ra khỏi cơ thể mà không gây tác hại đối với sức khỏe người bệnh. Trong khi đó, để thu nhận được tế bào gốc tủy xương, bệnh nhân phải trải qua phẫu thuật chọc hút tế bào từ tủy xương rất đau đớn mà lượng tế bào thu được không nhiều. Trong điều kiện *in vitro* và *in vivo* cụ thể, ADSCs có thể biệt hóa thành các tế bào chức năng khác nhau, bao gồm tế bào xương, mỡ, sụn, cơ tim, tế bào gan, tế bào tụy và tế bào nội mô (Strem et al., 2005). Các đặc tính biệt hóa của ADSCs như khả năng tạo mạch, chống oxy hóa, điều biến miễn dịch đã được chứng minh trong các thí nghiệm và các mô hình cận lâm sàng (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007). Đặc biệt, ADSCs không biểu hiện phức hợp tương hợp mô chính lớp II (MHC-II), do đó cho phép các tế bào này được sử dụng trong cấy ghép đồng loài và khác loài mà không cần tiến hành ức chế miễn dịch ở cơ thể nhận (C. S. Lin, Lin, & Lue, 2012). Trong các nghiên cứu tiền lâm sàng, ADSCs đã cho thấy hiệu quả điều trị tuyệt vời cho các bệnh tiêu hóa, bệnh tự miễn, bệnh tim mạch, tái tạo xương, bệnh thần kinh, bệnh về máu, rối loạn miễn dịch, đái tháo đường, rối loạn tiết niệu và bệnh phổi (Miana & Gonzalez, 2018). Để đánh giá chính xác hiệu suất điều trị, các nghiên cứu có hệ thống về các hành vi của MSC như di cư, tăng sinh và biệt hóa trong cơ thể sau khi cấy ghép là rất quan trọng. Việc phát triển một phương pháp chính xác, nhạy cảm và an toàn để đánh dấu và theo dõi các tế bào gốc là điều cần thiết.

Cho đến nay, có nhiều phương pháp chuyển gen vào tế bào. Tùy thuộc vào dòng tế bào, mục đích nghiên cứu và điều kiện hiện có mà các phương pháp phù hợp sẽ được lựa chọn để

chuyển gen, trong đó có 3 nhóm chính là phương pháp vật lý, hóa học và sinh học. Nhóm chuyển gen bằng phương pháp vật lý gồm có vi tiêm và điện biến nạp. Nhóm chuyển gen bằng phương pháp hóa học gồm có chuyển gen bằng DEAE-dextran, Calcium phosphate và cationic polymer. Nhóm chuyển gen bằng phương pháp sinh học gồm có chuyển gen bằng virus và liposome. Virus được dùng để chuyển gen có chứa gen quan tâm và bị loại bỏ đi các trình tự mã hóa cho protein gây bệnh. Gen chuyển với vector retrovirus xâm nhập một cách hiệu quả vào hệ gen của vật chủ nhưng virus sử dụng phải an toàn, không gây bệnh. Lentivirus là một họ phụ nằm trong họ Retrovirus, trong đó có HIV. Khác với các retrovirus khác, chúng có khả năng xâm nhiễm vào cả tế bào phân chia và tế bào không phân chia. Bộ gen lentivirus có thể chứa tới 9kb gen ngoại lai, có khả năng gắn chèn gen này vào hệ gen tế bào chủ và biểu hiện dài hạn. Hơn nữa, lentivirus có ít nguy cơ gây đột biến gắn chèn và khả năng sinh ung. Ngoài ra, chúng còn có ưu điểm là không gây đáp ứng miễn dịch như đối với Adenovirus.

GFP (Green Fluorescent Protein) là một protein có khả năng phát ánh sáng huỳnh quang xanh lá cây khi được kích thích bởi ánh sáng xanh dương, được tìm thấy trong sứa Thái Bình Dương *Aequorea victoria*. GFP được cấu tạo bởi 238 amino acid và có khối lượng khoảng 26,9kDa. Tinh thể GFP có cấu trúc hình trụ với 11 phiến β tạo nên vách hình trụ và các xoắn α ở đầu và cuối hình trụ. Cơ chế phát quang tự nhiên của loài sứa này nhờ vào 2 loại protein phát huỳnh quang là Aequorin và GFP. Khi Aequorin kết hợp với ion Ca^{2+} , chất này phát ra ánh sáng huỳnh quang màu xanh dương. Ánh sáng này được GFP hấp thụ, đến lượt nó, lại phát ra ánh sáng màu xanh lá cây (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast, & Cormier, 1992). Dòng thương mại ứng dụng gen gfp để chuyển gen được sử dụng có CopGFP Control Lentiviral Particles: sc-108084 của Santa Cruz.

Polybrene (hay còn gọi là Hexadimethrine bromide) là một polycation, có tên gọi theo danh pháp IUPAC là 1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, có công thức phân tử $(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$. Chất này được dùng để tăng cường hiệu quả chuyển gen bằng virus và acid nucleic ngoại lai vào tế bào chủ. Trong chuyển gen, polybrene hoạt động bằng cách trung hòa các lực đẩy tĩnh điện giữa điện tích âm trên bề mặt tế bào và virus, giúp cho virus dễ dàng xâm nhập vào tế bào. Ngoài ra, chất này cũng làm tăng hiệu quả khi chuyển gen bằng cationic lipid. Tuy nhiên, polybrene có khả năng gây độc đối với một số dòng tế bào nhạy cảm.

Hiện nay, trong các ứng dụng tiền lâm sàng của MSCs, việc đánh dấu và theo dõi sự phân bố in vivo và số phận của tế bào gốc cấy ghép theo thời gian là rất quan trọng. Protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP) đã được sử dụng để đánh giá sự ghép tế bào và theo dõi tế bào dài hạn trong nhiều nghiên cứu. Tế bào gốc trung mô nhau thai người (hPMSCs) được chuyển gen gfp cũng cho thấy không ảnh hưởng đến khả năng sống, hình dạng, kiểu hình kháng nguyên bề mặt và tính đa năng của chúng (J. Yu et al., 2015). Một nghiên cứu thực hiện chuyển gen gfp vào hPMSCs và theo dõi ảnh hưởng của việc chuyển gen đến biểu hiện của tế bào đã chỉ ra rằng biểu hiện của gen chỉ thị GFP khi được chuyển vào tế bào gốc là an toàn và không ảnh hưởng đến các con đường trao đổi chất và chuyển hóa của tế bào (Yang et al., 2017).

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *Albino*

Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được thu nhận từ chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *Albino*.

Lentivirus mang gen *gfp*

Vector lentivirus mang gen *gfp* là sản phẩm thương mại copGFP Control Lentiviral Particles (sc-108084) được mua từ hãng Santa Cruz.

Polybrene

Polybrene được mua từ hãng Sigma (code H9268).

Hóa chất sử dụng trong phân tích Flow Cytometry

Kháng thể phân tích tế bào gốc trung mô từ mô mỡ chuột: CD14 FITC, CD34 FITC, CD44 APC, CD45 PerCP, CD90 FITC, CD106 FITC (BD Bioscience).

FACS flow (BD Bioscience).

2.2. Phương pháp

Thu nhận tế bào ứng viên mADSCs

Chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var. *Albino*) 8-12 tuần tuổi được gây mê, cố định và cạo sạch lông vùng bụng. Dùng kéo và kẹp mở ổ bụng chuột để lộ phần mỡ. Loại bỏ mạch máu và các thành phần của cơ quan sinh dục, giữ lại phần mỡ, gấp mỡ vào falcon chứa dung dịch PBS- có bổ sung kháng sinh 5X. mADSCs được thu nhận theo phương pháp của G. Yu và cộng sự (2011).

Các tế bào ứng viên được quan sát dưới kính hiển vi và ghi nhận lại hình thái và sự đồng nhất của quần thể tế bào sau các lần cấy chuyên.

Phân tích kiểu hình kháng nguyên bề mặt của tế bào ứng viên

Kiểu hình kháng nguyên bề mặt được phân tích bằng phương pháp flow cytometry với các kháng nguyên CD14, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 và CD106. Mẫu tế bào được phân tích bằng máy FACS Calibur (BD Bioscience). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm CellQuest Pro ở 10000 tế bào.

Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào ứng viên

Tiềm năng biệt hóa của tế bào ứng viên được đánh giá bằng cách gây cảm ứng biệt hoá tế bào ứng viên thành tế bào xương và tế bào mỡ.

Phương pháp gây cảm ứng biệt hoá tế bào ứng viên thành tế bào xương: tế bào được nuôi cấy trong 21 ngày trong môi trường DMEM F12 chứa 10% FBS, 0,1µM dexamethasone, 50µg/ml ascorbic acid-2 phosphate và 10mM β-glycerol phosphate (tất cả được mua từ hãng Sigma-Aldrich). Sự biệt hóa xương được đánh giá thông qua sự hình thành và tích tụ Calcium bên trong chất nền. Các tế bào được biệt hóa chứa Calcium sẽ bắt màu với thuốc nhuộm Alizarin

Red tạo thành màu đỏ. Các tế bào không hoặc chưa biệt hóa thành nguyên bào xương sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

Phương pháp gây cảm ứng biệt hoá tế bào ứng viên thành tế bào mỡ: tế bào được nuôi cấy trong 21 ngày trong môi trường DMEM F12 chứa 0,5mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 1nM dexamethasone, 0,1mM indo-methacin và 10% FBS (tất cả được mua từ hãng SigmaAldrich). Sự biệt hóa tế bào mỡ được đánh giá bằng cách quan sát các giọt lipid trong các tế bào dưới kính hiển vi và nhuộm với thuốc nhuộm Oil red. Các tế bào mỡ sẽ bắt màu thuốc nhuộm tạo thành màu đỏ. Các tế bào không hoặc chưa biệt hóa thành nguyên bào xương sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

Chuyển gen *gfp* vào tế bào

Để so sánh hiệu quả chuyển gen *gfp* có polybrene, non-polybrene và không chuyển, thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 48 với 3 lô thí nghiệm, mỗi lô gồm 3 giếng, tế bào mADSCs bám dính được xử lý để tách ra khỏi bề mặt bình nuôi bằng Trypsin/EDTA 0,25%, sau đó bất hoạt bằng môi trường nuôi cấy, ly tâm để rửa tế bào và tái huyền phù trong môi trường mới, tế bào được đếm và cho vào các giếng với mật độ ban đầu khoảng 10^5 tế bào/giếng. Việc chuyển gen được tiến hành tại thời điểm 24 giờ sau khi cấy chuyển mADSCs vào đĩa.

Lô không chuyển: mADSCs không được chuyển gen: Bổ sung 200 μ l môi trường MSCs Cult kit.

Lô Polybrene: mADSCs được chuyển gen *gfp* có Polybrene: Bổ sung 200 μ l môi trường chứa lentivirus (hệ số MOI = 1) và nồng độ Polybrene là 8 μ g/ml.

Lô non-polybrene: ADSCs được chuyển gen *gfp* nhưng không có Polybrene: Bổ sung 200 μ l môi trường chứa lentivirus (hệ số MOI = 1).

Các đĩa nuôi cấy được đặt vào tủ nuôi tế bào trong điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Đánh giá hiệu quả chuyển gen

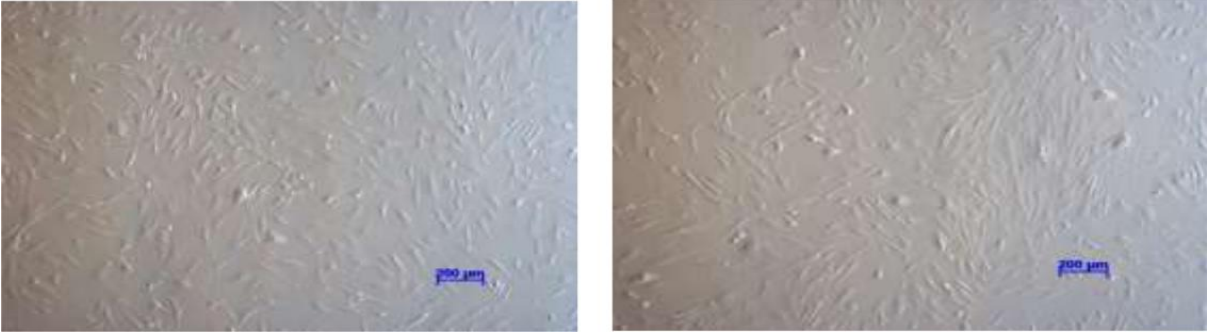
Khảo sát khả năng phát sáng: Tế bào ở các lô thí nghiệm được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi huỳnh quang vào các ngày thứ 3, 9 và 15 sau khi chuyển gen *gfp*.

Khảo sát hiệu quả chuyển gen: Phương pháp Flow cytometry được sử dụng để khảo sát hiệu quả chuyển gen. Mẫu mADSCs được tách, ly tâm rửa với PBS, huyền phù lại với dung dịch Facsflow trong ống li tâm 5ml (BD Biosciences, Mỹ). Phân tích phần trăm tế bào phát sáng xanh lá cây bằng hệ thống FACS Calibur.

Khảo sát thời gian nhân đôi: Tế bào ở 3 lô thí nghiệm được cấy chuyển tế bào vào đĩa chuyên biệt 96 giếng của hệ thống X-CELLigence với mật độ 5.000 tế bào/giếng, mỗi lô thực hiện trên 6 giếng. Các đĩa nuôi được chuyển vào tủ nuôi cấy tĩnh ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Đường cong tăng trưởng được ghi nhận sau 120 giờ.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả thu nhận và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô từ mô mỡ

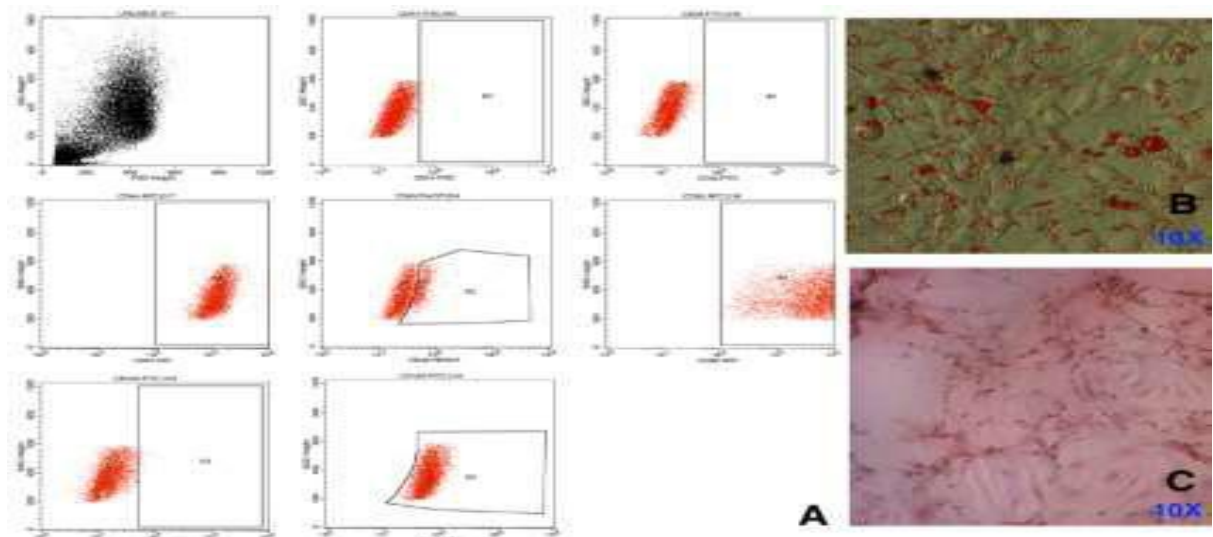


Hình 1. Hình dạng tế bào ứng viên qua lần cấy chuyển 3 (A), và lần cấy chuyển 7 (B)

Sau 10 ngày nuôi cấy, tế bào bám đầy bề mặt bình nuôi, chiếm khoảng 70-80% diện tích bề mặt nuôi cấy. Việc cấy chuyển trong thời điểm này là cần thiết để cung cấp thêm không gian và chất dinh dưỡng cho các tế bào tiếp tục phát triển. Sau khi bám dính trên bề mặt nuôi cấy, các tế bào bắt đầu tăng sinh và gia tăng số lượng. Sau 10 ngày nuôi cấy sơ cấp, mật độ tế bào đạt khoảng 70-80% diện tích bình nuôi. Khi đó, việc cấy chuyển sẽ được thực hiện. Tế bào được xử lý với Trypsin để tách ra khỏi bề mặt nuôi cấy và thu nhận tế bào đơn, sau đó tái huyền phù trong môi trường và chuyển sang bình nuôi mới với mật độ thấp hơn nhằm cung cấp dinh dưỡng và không gian cho tế bào tiếp tục tăng sinh. Sau 3-7 lần cấy chuyển, quần thể tế bào ứng viên đã có sự đồng nhất và ổn định về hình thái, có thể được sử dụng để tiến hành các khảo sát tiếp theo.

3.2. Kết quả định danh tế bào ứng viên

Quần thể tế bào ứng viên được phân tích kiểu hình kháng nguyên bề mặt bằng phương pháp dòng chảy tế bào (flow cytometry), cảm ứng biệt hoá thành tế bào mỡ, tế bào xương.



Hình 2. Các tế bào ứng viên biểu hiện các marker đặc trưng cho tế bào gốc trung mô và biệt hoá thành tế bào chuyên hoá. (A) Các tế bào ứng viên dương tính với CD44, CD90 và CD106; âm tính với các marker CD14, CD34, CD45, và CD105; (B) Tế bào ứng viên biệt hoá thành tế bào mỡ; (C) Tế bào ứng viên biệt hoá thành tế bào xương

Tế bào gốc trung mô ứng viên được phân tích kiểu hình miễn dịch với 7 marker CD14, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 và CD106 ở lần cấy chuyên thứ 3.

Hiện nay, CD44 và CD90 đang được sử dụng như các marker quan trọng trong việc xác định tế bào gốc trung mô (Wagner et al., 2005) (Dominici et al., 2006). Thêm vào đó, CD106 (hay VCAM-1) là thành viên của siêu họ Immunoglobulin (Ig), phân tử bám dính bề mặt tế bào tạo mạch (Pepinsky et al., 1992). CD106 là protein trung gian cho sự kết dính và truyền tín hiệu giữa tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu ưa acid và bạch cầu ưa base với lớp nội mô mạch máu. Do đó, CD106 cũng thường được dùng để định danh tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (Zimmerlin et al., 2010). Kết quả thể hiện quần thể ADSCs ứng viên có sự dương tính mạnh với 3 marker là CD44, CD90 và CD 106. Kết quả này cho thấy quần thể tế bào ứng viên được phân tích có khả năng bám dính tốt trên bề mặt nuôi cấy và mang đặc tính của tế bào gốc trung mô như tương tác tế bào-tế bào, tế bào-chất nền và khả năng “homing”.

Ngược lại, quần thể ADSCs ứng viên âm tính với các marker CD14, CD 34 và CD45. Sự biểu hiện với rất ít các tế bào CD14 và CD45 cho thấy quần thể tế bào được thu nhận không bị tạp nhiễm với các tế bào máu trong quá trình nuôi cấy. Đây cũng là một trong những điều kiện để khẳng định đặc tính của tế bào gốc trung mô (Dominici et al., 2006). Thêm vào đó, CD34 là một marker đặc trưng cho tế bào gốc tạo máu, tế bào máu trưởng thành, tế bào tiền thân tạo máu ở máu cuống rốn, tủy xương và tế bào nội mô, có chức năng điều hòa sự bám dính của tế bào tạo máu với các môi trường vi tạo máu (Mizuno & Hyakusoku, 2014). Đây không phải là marker đặc trưng cho tế bào gốc trung mô nên sự hiện diện với tỉ lệ rất nhỏ cũng góp phần chứng minh quần thể tế bào ứng viên là tế bào gốc trung mô. Điều này cũng tương đồng với kết quả trong báo cáo của Zuk và cộng sự năm 2002 (Zuk et al., 2002). Bên cạnh đó, kết quả còn cho thấy có sự âm tính đối với CD105. CD105 (còn được gọi là Endoglin hay SH2) là một glycoprotein nhóm 1, thành phần phức hợp thụ thể TGF- β . Protein này đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành mạch máu, liên quan đến sự tăng sinh, biệt hóa và di cư của tế bào (Aslan et al., 2006). Sự biểu hiện dương tính với marker này cũng được coi là một trong những tiêu chí để nhận diện tế bào gốc trung mô (Dominici et al., 2006). Ngoài ra sự giảm biểu hiện của CD105- dường như thể hiện sự biệt hóa của MSCs, nghĩa là khả năng tăng sinh và tạo colony rất thấp. Tuy nhiên các báo cáo gần đây cho thấy sự biểu hiện âm tính hay dương tính của CD105 còn phụ thuộc vào nguồn thu nhận, thời gian nuôi cấy *in vitro* và giai đoạn biệt hóa. Sự vắng mặt của CD105 cho thấy MSCs có sự biểu hiện gia tăng của các gen tạo xương, trong khi quần thể có sự dương tính với CD105 lại nghiêng về khả năng tạo sụn (Chang et al., 2013). Đồng thời, trong một báo cáo năm 2013, Anderson, Carrillo-Gálvez, García-Pérez, Cobo, và Martín đã thu nhận và nuôi cấy ADSCs từ mô mỡ chuột Balb/c và C57Bl6, sau đó chọn ra hai quần thể mADSCs với CD105- và CD105+ và thực hiện các thí nghiệm kiểm tra giống nhau. Kết quả cho thấy cả 2 quần thể này đều thể hiện các đặc tính của MSCs tương tự nhau, không có sự khác biệt trong tiềm năng tăng sinh và khả năng tạo colony. Không những vậy, quần thể CD105- còn cho thấy tiềm năng biệt hóa mỡ và xương cao hơn, đồng thời cũng thể hiện hiệu quả ức chế sự tăng sinh của tế bào T *in vitro* cao hơn so với quần thể CD105+ (Anderson et al., 2013). Qua đó cho thấy, các mADSCs âm tính với CD105 không đại diện cho các tế bào đã biệt hóa mà có thể là nhóm khác của quần thể MSCs. Ngoài ra, kết quả âm tính với CD105 còn được thấy trong báo cáo của Yoshimura và cộng sự (2006) thực hiện trên hADSCs (Yoshimura

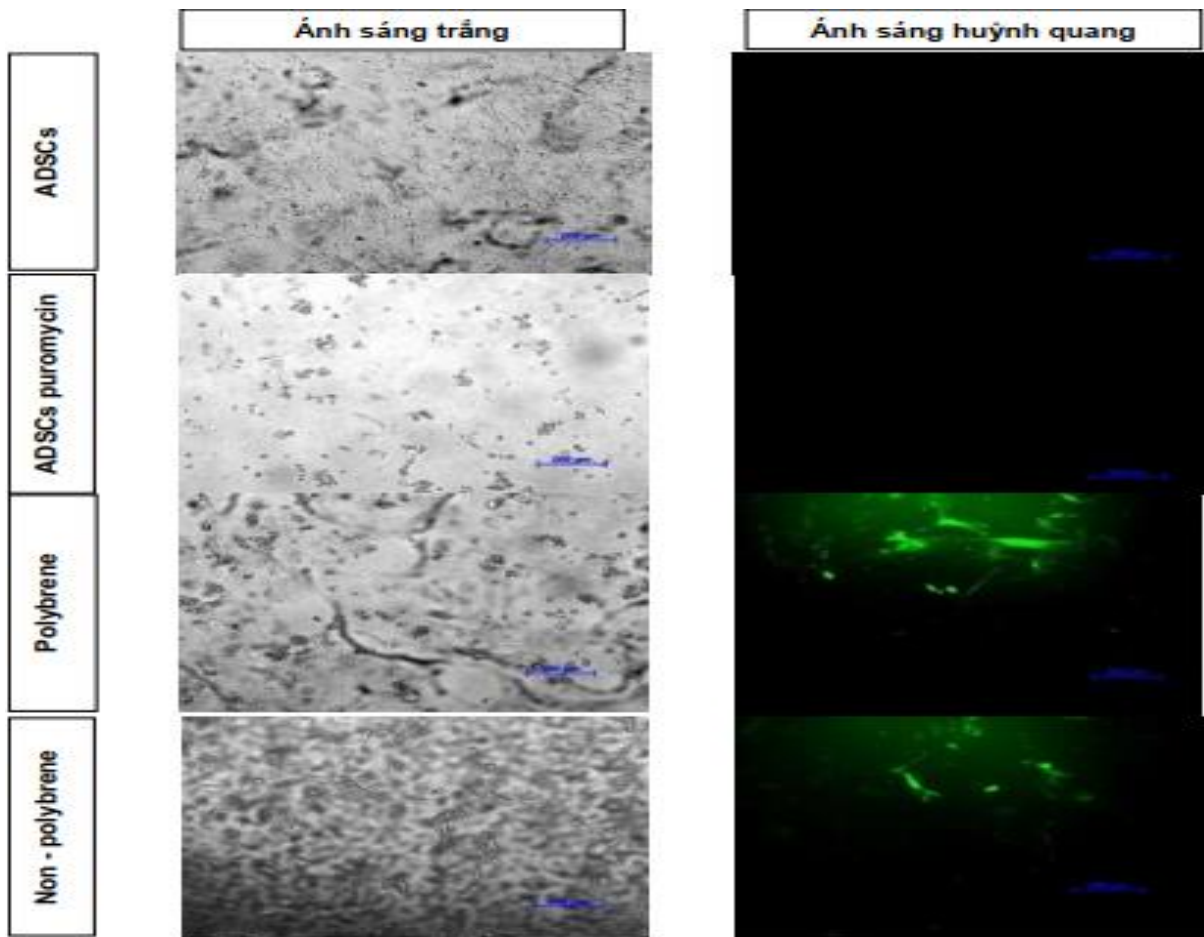
et al., 2006). Như vậy, quần thể tế bào ứng viên thu nhận được đã biểu hiện đúng các marker đặc trưng cho tế bào gốc trung mô sau 3 lần cấy chuyển.

Trong quá trình cảm ứng biệt hóa xương, tế bào chuyển từ hình dạng trải thon dài sang tròn dẹt và tích tụ Canxi bên trong. Sự biệt hóa của tế bào ứng viên được xác nhận bởi sự tích tụ các tinh thể khoáng trong chất nền tạo xương khi nhuộm tế bào với Alizarin Red. Tế bào bắt màu đỏ của thuốc nhuộm ở những vùng tích tụ nhiều Canxi và không bắt màu ở những vùng không tích tụ Canxi. Kết quả này cho thấy quần thể tế bào ứng viên có khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương trong điều kiện *in vitro*.

Sự biệt hóa các tế bào ứng viên thành các tế bào mỡ được thể hiện bởi sự tích tụ các giọt mỡ trong tế bào và được nhuộm màu đỏ bởi thuốc nhuộm Oil Red. Từ các đặc điểm trên, có thể kết luận rằng quần thể tế bào ứng viên thu nhận được chính là tế bào gốc trung mô.

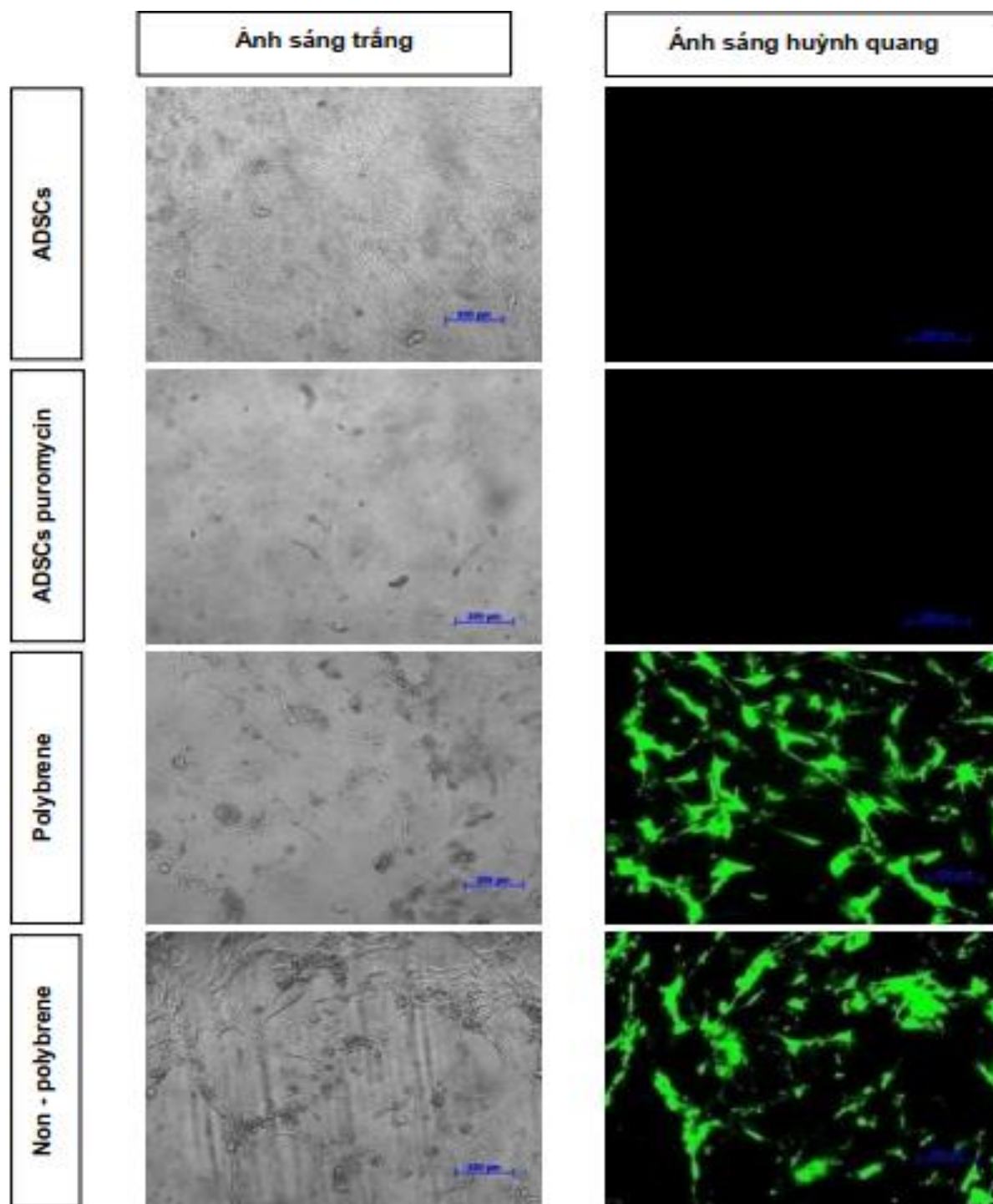
3.3. Kết quả chuyển gen

Sau 3 ngày chuyển gen



Hình 3. Tế bào sau 3 ngày chuyển gen. ADSCs thường không chuyển gen gfp và ADSCs thường không chuyển gen được chọn lọc với puromycin đều không có tế bào phát sáng; lô polybrene và Non-polybrene đều có tế bào phát sáng màu xanh của gen gfp chuyển, trong đó lô polybrene có độ phát sáng cao hơn lô Non-polybrene

Sau 9 ngày chuyển gen



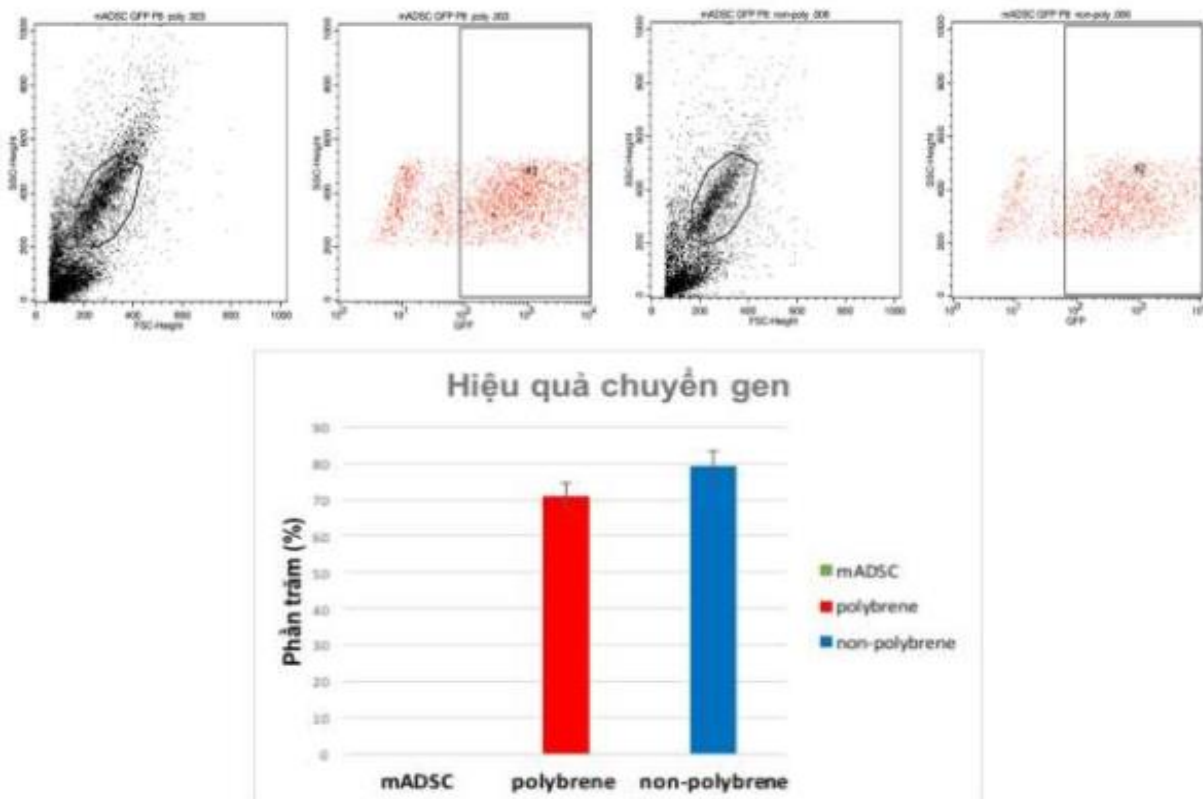
Hình 4. Tế bào sau 9 ngày chuyển gen. ADSCs thường không chuyển gen gfp và ADSCs thường không chuyển gen được chọn lọc với puromycin đều không có tế bào phát sáng; lô polybrene và Non-polybrene đều có tế bào phát sáng màu xanh của gen gfp chuyển, trong đó lô Non-polybrene có độ phát sáng cao hơn lô polybrene

Sau 3 ngày chuyển gen, các tế bào ở lô ADSCs do không được chuyển gen nên không có tín hiệu khi chụp dưới ánh sáng huỳnh quang. Sau khi chọn lọc với puromycin, các tế bào ở lô này đã bị chết do tế bào không có sự biểu hiện của gen kháng puromycin, điều này thể hiện rõ sau 9 ngày, ở lô này chỉ còn lại giéng trống.

Tế bào được chuyển gen bằng lentivirus thương mại (copGFP) có khả năng biểu hiện gen gfp sau khi chuyển gen, đồng thời biểu hiện gen kháng puromycin. Do đó, ở 2 lô tế bào được chuyển gen có sử dụng polybrene (lô polybrene) và không sử dụng polybrene (lô non-polybrene) vẫn còn giữ lại các tế bào sống và có sự biểu hiện huỳnh quang của protein GFP ở các tế bào nhận được gen chuyển. Sau 3 đến 9 ngày, các tế bào này tiếp tục tăng sinh và gia tăng số lượng. Kết quả trên thị trường chụp dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy lô Non-polybrene vào ngày thứ 3 có tín hiệu phát sáng yếu hơn lô polybrene. Tuy nhiên, đến ngày thứ 9 sau chuyển gen, lô Non-polybrene lại có tín hiệu phát sáng mạnh hơn lô polybrene. Kết quả này có thể là do polybrene ban đầu có khả năng giúp tăng hiệu quả chuyển gen vào tế bào, tuy nhiên polybrene có khả năng gây độc lên mADSCs làm giảm khả năng sống sót và tăng sinh về sau của dòng tế bào này. Vì vậy, khả năng tăng sinh của tế bào ở lô Polybrene đã bị giảm bởi tác động của Polybrene so với lô Non-polybrene. Để làm rõ hơn kết quả này, chúng tôi tiếp tục đánh giá hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp flow cytometry.

3.4. Kết quả đánh giá hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp flow cytometry

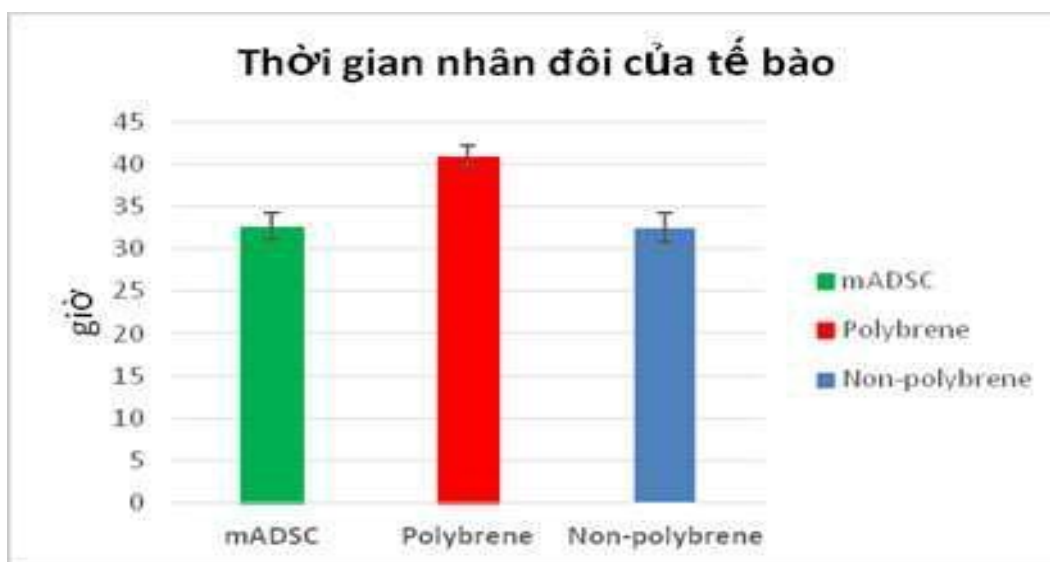
Trong nghiên cứu này, lô ADSCs được sử dụng như dòng tế bào đối chứng để đánh giá hiệu quả chuyển gen giữa việc bổ sung polybrene và không có polybrene nên hiệu quả chuyển gen của lô thí nghiệm này bằng 0.



Hình 5. Kết quả thể hiện hiệu quả chuyển gen của các lô thí nghiệm

Hình trên cho thấy phần trăm tế bào phát sáng ở lô polybrene là 71,13%, trong khi hiệu quả phát sáng của lô Non-polybrene là 86,2%. Kết quả này cho thấy polybrene đã có tác động không tốt đến tế bào chuyển gen.

Nhằm tìm hiểu thêm sự tác động của polybrene lên tế bào chuyển gen, việc khảo sát thời gian tăng sinh của tế bào sau chuyển gen đã được thực hiện bằng hệ thống X-Celligen.



Hình 6. Biểu đồ thể hiện thời gian nhân đôi của tế bào ở các lô thí nghiệm

Kết quả cho thấy thời gian nhân đôi trung bình của các tế bào ở lô ADSCs và Non-polybrene tương đương nhau ($32,64 \pm 1,56$ giờ và $32,50 \pm 1,80$ giờ), trong khi ở lô Polybrene ($40,98 \pm 1,28$ giờ) cao hơn hai lô Non-polybrene và lô ADSCs. Điều này cho thấy tốc độ tăng sinh của mADSC-*gfp* ở lô polybrene thấp hơn 2 lô còn lại. Kết quả này có thể giải thích là do polybrene khi được đưa vào môi trường chuyển gen sẽ đi vào trong tế bào và ảnh hưởng đến quá trình nhân đôi, từ đó làm giảm tốc độ tăng sinh của tế bào. Điều này cũng phù hợp với báo cáo của P. Lin, Correa, Lin, và Caplan (2011), chứng minh tác động ức chế sự tăng sinh của human ADSC của polybrene (P. Lin et al., 2011).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và nuôi cấy thành công ADSCs từ mô mỡ chuột. Chuyển thành công gen *gfp* vào ADSCs ở cả 2 lô: lô polybrene và lô non-polybrene. Trong đó, quá trình chuyển gen ở lô non-polybrene cho kết quả tốt hơn lô polybrene. Thời gian nhân đôi của tế bào mADSC-*gfp* ở lô non-polybrene tương đương với thời gian nhân đôi của tế bào mADSC bình thường; trong khi thời gian nhân đôi này ở tế bào mADSC-*gfp* lô polybrene dài hơn lô non-polybrene và lô đối chứng.

Tài liệu tham khảo

- Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., García-Pérez, A., Cobo, M., & Martín, F. (2013). CD105 (endoglin)-Negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS ONE*, 8(10), Article e76979.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D., & Gazit, Z. (2006). Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*, 24(7), 1728-1737.
- Chang, C. B., Han, S. A., Kim, E. M., Lee, S., Seong, S. C., & Lee, M. C. (2013). Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers. *Osteoarthritis Cartilage*, 21(1), 190-199.
- Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260.
- Lin, C. S., Lin, G., & Lue, T. F. (2012). Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells and Development*, 21(15), 2770-2778.
- Lin, P., Correa, D., Lin, Y., & Caplan, A. I. (2011). Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. *PLoS One*, 6(8), Article e23891.
- Miana, V., & Gonzalez, E. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*, 12, 822-836.
- Mizuno, H., & Hyakusoku, H. (2014). Fat grafting supplemented by adipose-derived stem cells for breast augmentation. In M. A. Shiffman, Di Giuseppe, & F. Bassetto (Eds.), *Stem cells in aesthetic procedures: Art, science, and clinical techniques* (pp. 557-562). Berlin, Germany: Springer.
- Pepinsky, B., Hession, C., Chen, L. L., Moy, P., Burkly, L., Jakubowski, A., ... Lufkin, S. (1992). Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 17820-17826.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green - Fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-233.
- Ricks, D. M., Kutner, R., Zhang, X. -Y, Welsh, D. A., & Reiser, J. (2008). Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(3), 441-450.
- Strem, B. M., Hicok, K. C, Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., ... Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine*, 54(3), 132-141.

- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., ... Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), 1402-1416.
- Yang, J., Wang, N., Chen, D., Yu, J., Pan, Q., Wang, D., ... Li, L. (2017). The impact of GFP reporter gene transduction and expression on metabolomics of placental mesenchymal stem cells determined by UHPLC-Q/TOF-MS. *Stem Cells International*, Article 3167985, 1-12.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., ... Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 64-76.
- Yu, G., Wu, X., Kilroy, G., Halvorsen, C. Y.-D., Gimble, J. M., & Floyd, Z. E. (2011). Isolation of murine adipose-derived stem cells. *Methods Molecular Biology*, 702, 29-36.
- Yu, J., Xu, X., Zhu, C., Pan, Q., Yang, J., Ma, J., ... Li, L. (2015). GFP labeling and hepatic differentiation potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(6), 2299-2308.
- Zimmerlin, L., Donnerberg, V. S., Pfeifer, M. E., Meyer, E. M., Péault, B., Rubin, J. P., & Donnerberg, A. D. (2010). Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A*, 77(1), 22-30.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295.