

Nhận biết và nuôi cấy đơn dòng tế bào gốc phân lập từ nút phôi của túi phôi chuột

Đặng Văn Đức^{1,*}, Nguyễn Lai Thành¹, Bùi Việt Anh¹, Đỗ Doãn Lợi²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, Đống Đa, Hà Nội

Nhận ngày 19 tháng 01 năm 2010

Tóm tắt. Ở Việt Nam, công nghệ tế bào gốc vẫn còn khá mới mẻ đặc biệt là tế bào gốc phôi (Embryonic stem cells – ESCs). Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào tế bào gốc trưởng thành và hầu hết mới chỉ thu được những thành công bước đầu. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm thiết lập và hoàn thiện phương pháp phân lập cũng như nuôi cấy lâu dài ESCs từ nút phôi của túi phôi chuột nhắt trắng dòng Swiss. ESCs sau khi phân lập đã tạo thành những cụm đặc trưng và được nhân lên qua các lần cấy chuyển. Việc xác định khả năng duy trì đặc tính gốc của loại tế bào này trong nuôi cấy được thực hiện với hai loại marker là Alkaline phosphatase và protein nhân tổ phiên mã Oct3/4 (Octamer 3/4 – Oct3/4). Kết quả nhuộm hóa mô đối với Alkaline phosphatase và miễn dịch huỳnh quang đối với Oct3/4 cho thấy các tế bào gốc phôi chuột (mouse embryonic stem cells - mESCs) sau 5 lần cấy chuyển với gần 30 ngày nuôi cấy vẫn giữ được đặc điểm của tế bào gốc.

Từ khóa: Tế bào gốc phôi, tế bào gốc phôi chuột, Alkaline phosphatase, Oct3/4.

1. Mở đầu

ESCs là một dạng tế bào gốc đơn nhất thu nhận từ nút phôi (inner cell mass) của túi phôi (blastocyst) động vật có vú. ESCs có khả năng tự đổi mới và biệt hóa thành tất cả các dạng tế bào của cơ thể trưởng thành. Bằng chứng là khi nuôi cấy *in vitro*, ESCs tạo nên các quần lạc tế bào được gọi là thể phôi (embryoid bodies), có những vùng biệt hóa thành các dạng tế bào khác nhau có nguồn gốc từ ba lá phôi [1-5]. Khi tiêm ESCs vào chuột thiếu hụt hệ thống miễn dịch sẽ

tạo thành u quái mang các loại mô là dẫn xuất của ba lá phôi [6,7]. mESCs có khả năng tạo nên thể khảm và đặc biệt là tạo nên cơ thể khảm dòng sinh [8]. Một vài dòng mESC được chứng minh có khả năng tạo thành các bào thai [9].

Sau khi dòng mESC đầu tiên được thu nhận năm 1981 [10,11], các dòng ESC khác cũng đã được phân lập từ nhiều loài động vật khác nhau, đặc biệt tế bào gốc phôi người (human embryonic stem cells – hESCs) đã được Thomson tạo dòng vào năm 1998 [12-17]. ESCs được chứng minh biệt hóa *in vitro* thành các tế bào giống tế bào gốc tạo máu [18], tế bào thần kinh [19-22], tế bào cơ tim [23,24], các tế

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-35589653.
E-mail: ducdv85_vn@yahoo.com

bào nội mô [25,26] và các tế bào đảo tụy tiết insulin...[27-29]. Điều này cho thấy ESCs có tiềm năng biệt hóa thành tất cả những dạng tế bào điển hình có nguồn gốc từ ba lá phôi. Chính vì tiềm năng biệt hóa đặc biệt của ESCs làm cho chúng trở thành một trong những mô hình tốt nhất để nghiên cứu: phôi sinh học, các quá trình biệt hóa, liệu pháp thay thế tế bào và mô, phương tiện cho liệu pháp gen, trong nghiên cứu cơ chế các bệnh ở người, phát triển và thử độc tính dược phẩm...[20,29-31].

Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh được rằng mESCs biểu hiện enzyme Alkaline phosphatase. Nó là một enzyme thủy phân chịu trách nhiệm cắt gốc phosphate ra khỏi rất nhiều các phân tử như các nucleotide, protein và các alkaloid, do vậy, nó được sử dụng như là một marker đặc trưng và được sử dụng phổ biến để xác định các dòng ESC chưa biệt hóa [32,33]. Ngoài ra, mESCs biểu hiện mạnh các marker bề mặt kháng nguyên đặc hiệu giai đoạn phôi-1 (Stage-specific embryonic antigen-1 - SSEA-1), kháng nguyên nhận dạng khối u-60 (Tumor recognition antigen-60 - TRA-1-60) và TRA-1-81 [34,35]. ESCs cũng biểu hiện một số gen đặc hiệu, điển hình là Oct3/4, một nhân tố phiên mã có liên quan đến quá trình tự đổi mới của ESCs [36-38]. Một nhân tố phiên mã điển hình khác là Nanog cũng có vai trò trong quá trình tự đổi mới của tế bào và thường được sử dụng để xác định ESCs chưa biệt hóa [39-41]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn hai loại marker ứng cử viên là Alkaline phosphatase và Oct3/4 để tiến hành nhận biết mESCs nuôi cấy *in vitro* có còn biểu hiện những marker đa tiềm năng hay không.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Động vật

Đối tượng nghiên cứu chúng tôi sử dụng trong thí nghiệm là chuột nhắt trắng dòng Swiss

(*Mus musculus*) được cung cấp bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Chuột cái được kích thích siêu bài noãn để thu phôi theo mô tả của Nagy và cộng sự [42]. Chuột thành thục sinh sản (2-3 tháng tuổi, trọng lượng từ 28-32g) được nuôi trong điều kiện 14 giờ chiếu sáng và 10 giờ tối. Chuột cái được tiêm hormone PMSG (10IU/chuột) vào giữa chu kỳ sáng, sau 46-48 giờ tiêm hCG (10IU/chuột) và được ghép đôi với chuột đực. 18h sau khi tiêm hCG tiến hành kiểm tra chuột phối. Chuột cái có dấu hiệu giao phối được nhốt riêng và chăm sóc đến 3,5 ngày để thu phôi.

2.2. Chuẩn bị lớp tế bào nuôi

mESCs được thu nhận theo mô tả của Nagy và cộng sự, tuy nhiên, cũng có một chút biến đổi [42]. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng lớp tế bào nuôi là các nguyên bào sợi phôi chuột (mouse embryonic fibroblasts - mEFs) được thu nhận từ thai chuột 13,5 ngày như mô tả trước đây của Klimanskaya và cộng sự [43]. Chúng tôi thường sử dụng mEFs ở lần cấy chuyển thứ 1 hoặc thứ 2 để làm lớp tế bào nuôi bởi vì chúng tôi thấy rằng mEFs ở các lần cấy chuyển sau đó (các lần cấy chuyển thứ 3-5) đã trở nên già hóa, do vậy không hỗ trợ nhiều cho ESCs tăng sinh không biệt hóa. mEFs được bất hoạt phân bào bằng Mitomycin C (Sigma) nồng độ 10 μ g/ml trong 2,5 - 3 giờ. Sau khi xử lý bằng Mitomycin C, tế bào được rửa bằng PBS, phân tách bằng trypsin và được cấy ở mật độ khoảng 4x10⁴ tế bào/cm² trong các đĩa nuôi cấy 96 giếng (Corning) đã phủ gelatin để tiến hành thí nghiệm phân lập mESCs.

2.3. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc phôi chuột

Để thu nhận túi phôi, chuột cái đã giao phối được giết ở khoảng 3,5 ngày sau khi giao phối và tử cung của chúng ngay lập tức được chuyển

sang PBS đã được làm ấm trước tới 37°C. Sau khi loại hết mỡ bám xung quanh, tử cung được chuyển sang môi trường M2 (Sigma) và tiến hành lấy phôi ra khỏi tử cung bằng cách sử dụng bơm tiêm 1ml hút môi trường bơm vào tử cung để đẩy phôi ra ngoài như mô tả của Nagy và cộng sự [42]. Thao tác thu nhận túi phôi được thực hiện dưới kính hiển vi soi nổi. Các phôi phát triển tốt được chuyển bằng pipet Pasteur đầu nhỏ đường kính xấp xỉ 200 μm sang các vi giọt môi trường M2 trước khi đưa nuôi cấy trên lớp tế bào nuôi đã bất hoạt phân bào được chuẩn bị trước đó 24 - 48 giờ. Môi trường nuôi cấy ESCs bao gồm FBS (20% v/v) (Gibco), LIF (2000U/ml) (Sigma), Non-essential amino acid (100 μM) (Gibco), β -mercaptoethanol (100 μM) (Gibco), L-Glutamine (2mM) (Gibco), HEPES (2mM) (Gibco), Penicillin/Streptomycin (100U/ml Penicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) (Gibco), Knockout DMEM (Gibco). Đĩa tế bào nuôi đã bất hoạt phân bào được thay môi trường bằng môi trường nuôi cấy ESCs trước khi đặt túi phôi 1-3 giờ. Túi phôi sẽ thoát khỏi màng sáng và bắt đầu bám dính xuống lớp tế bào nuôi sau 1-2 ngày nuôi cấy. Sau khoảng 5-6 ngày nuôi cấy, khối tế bào nút phôi lúc này đã thực sự lớn và có hình dạng của một quần lạc tế bào gốc đặc trưng. Lần phân tách khối tế bào nút phôi đầu tiên được tiến hành như mô tả của Klimanskaya và cộng sự [43]. Khối tế bào nút phôi sinh trưởng tốt sau khi được tách ra khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy bằng một pipet Pasteur đầu nhỏ sẽ được chuyển sang từng giếng của đĩa 96 giếng. Mỗi một khối tế bào nút phôi được phân tách bằng trypsin thành những cụm tế bào nhỏ hơn và chuyển sang lớp tế bào nuôi mới được chuẩn bị trước đó từ 24 đến 48 giờ trong đĩa 96 giếng. Quá trình nuôi cấy những quần lạc có hình thái giống ESCs sau lần cấy chuyển thứ nhất được tiến hành theo mô tả của Klimanskaya và cộng sự [43]. Những giếng có các quần lạc tế bào giống ESCs sẽ được xử lý

bằng trypsin và cấy chuyển toàn bộ vào đĩa nuôi cấy có diện tích bề mặt lớn hơn (như đĩa 24 giếng hoặc đĩa nuôi cấy đường kính 35 cm) đã có sẵn lớp tế bào nuôi.

2.4. Nhuộm hóa mô marker đặc trưng Alkaline phosphatase

Phương pháp nhuộm Alkaline phosphatase sử dụng kit Leukocyte Alkaline Phosphatase (Sigma) được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Tế bào sinh trưởng được cố định bằng dung dịch cố định (Citrate solution + Acetone + Formandehide) trong 1-2 phút. Sau khi cố định rửa tế bào bằng nước cất 2 lần trong 45 giây. Để ướt và nhuộm tế bào bằng kit FRV hoặc FBB 15 phút trong tối. Sau 15 phút rửa lại tế bào 2 lần bằng nước cất trong 2 phút và có thể quan sát.

2.5. Nhuộm miễn dịch huỳnh quang protein đặc hiệu Oct3/4

Tế bào sinh trưởng trên các phiến kính tròn được cố định bằng PBS chứa 4% Paraformaldehyde (Sigma) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng PBS 3 lần, tế bào được tạo tính thấm bằng Triton X-100 (Sigma) ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, tế bào được rửa lại bằng PBS và ủ trong PBS chứa 2% BSA trong 10 phút (Gibco). Kháng thể thứ nhất kháng Oct3/4 (1:150, Sigma) được ủ với tế bào trong 60 phút. Sau khi rửa bằng PBS, ủ tiếp với kháng thể thứ 2 (Invitrogen) gắn huỳnh quang trong 60 phút. Nhân tế bào được nhuộm bằng Hoeschst 33342 (Invitrogen).

3. Kết quả và thảo luận

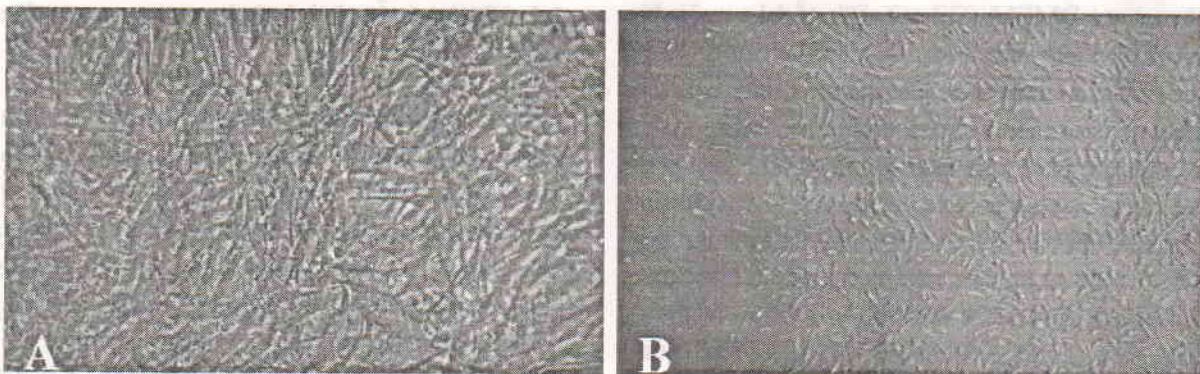
3.1. Kết quả chuẩn bị lớp tế bào nuôi

Năm 1981, Evans và cộng sự công bố đã thiết lập được dòng mESC đầu tiên đăng trên

tạp chí Nature sử dụng mEFs làm lớp tế bào nuôi [10]. Sau đó, năm 1998, Thomson và cộng sự công bố trên tạp chí Science việc phân lập được dòng hESC đầu tiên có khả năng tăng sinh không biệt hóa sử dụng lớp tế bào nuôi là mEFs [6]. Dựa trên những công bố đó mà rất nhiều phòng thí nghiệm tế bào gốc trên thế giới tiếp tục sử dụng mEFs làm lớp tế bào nuôi trong nghiên cứu ESCs. Các tế bào nuôi này sẽ giúp hỗ trợ sự tăng sinh không biệt hóa và luôn luôn tự đổi mới của mESCs trong nuôi cấy. mEFs được thu nhận từ thai chuột 12,5 – 13,5 ngày phải được bất hoạt phân bào để ngăn cản sự tăng sinh của chúng và hỗ trợ sự tăng sinh cho mESCs. Kết quả nuôi cấy mESCs sử dụng lớp tế bào nuôi của chúng tôi cho thấy mEFs ở lần nuôi cấy nguyên phát (Hình 1A) có khả năng hỗ trợ sinh trưởng và sự tăng sinh không biệt hóa cho ESCs tốt hơn mEFs qua nhiều lần cấy

chuyển bởi khi đó mEFs đã trở nên già hơn và mất những khả năng này. mEFs được bất hoạt phân bào bằng Mitomycin C nồng độ $10\mu\text{g/ml}$ trước khi được sử dụng làm lớp tế bào nuôi từ 24-48h. Mật độ mEFs cũng ảnh hưởng rất nhiều đến sự sinh trưởng và tăng sinh của mESCs. Mật độ mEFs thích hợp sẽ hỗ trợ mESCs tốt nhất (Hình 1B).

Nếu mật độ mEFs cao sẽ ức chế sinh trưởng của mESCs, còn nếu mật độ mEFs thấp sẽ không có khả năng hỗ trợ sinh trưởng cho mESCs. mEFs phân lập từ thai chuột 12-13,5 ngày khi nuôi cấy chúng có dạng hình thoi, dài, có tua thuôn nhọn hai đầu và bám dính xuống bề mặt đĩa nuôi cấy. Các nguyên bào sợi đang phát triển mạnh có thể được cất giữ lạnh trong vòng 6 tháng để làm nguồn tế bào nuôi chủ động trong nuôi cấy tế bào gốc.



Hình 1. mEFs thu nhận từ thai chuột 13,5 ngày.

(A): mEFs ở lần nuôi cấy nguyên phát sau 3 ngày nuôi cấy (10x20).

(B): mEFs đã bất hoạt phân bào với mật độ tốt được sử dụng làm lớp tế bào nuôi mESCs (10x10).

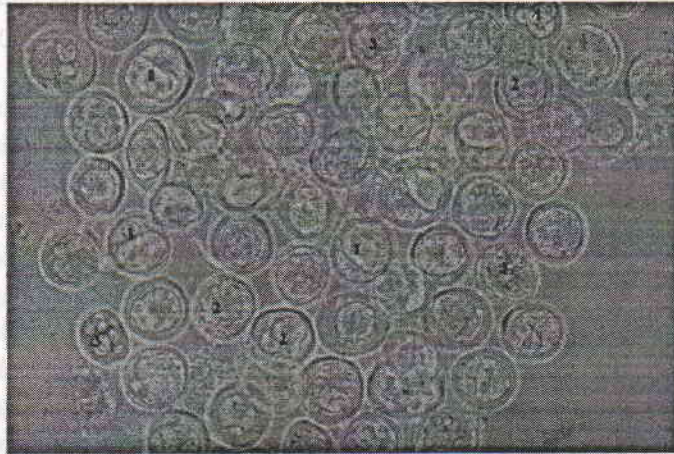
3.2. Kết quả kích thích chuột siêu bài noãn

Siêu bài noãn được tiến hành bằng cách tiêm kích dục tố để kích thích và làm tăng rụng trứng tự nhiên. Kích dục tố được sử dụng phổ biến là PMSG tác động giống như kích dục tố nội sinh của hormone kích thích nang trứng FSH, sau đó sử dụng kích dục tố màng đệm người hCG tác động giống hormone kích thể

vàng LH. Điều quan trọng của việc tiêm hormone kích thích siêu bài noãn là làm tăng gấp nhiều lần số lượng trứng rụng đối với mỗi con cái và kiểm soát được thời gian rụng trứng độc lập với chu trình tự nhiên, qua đó luôn luôn chủ động được về nguồn phôi phục vụ mục đích thí nghiệm. Trong những công bố nghiên cứu về mESCs đăng trên các tạp chí chuyên ngành

thì phôi cũng được thu từ những chuột cái siêu bài noãn được kích thích bằng hormone [33,43,44]. Chúng tôi đã tiến hành 32 lần thí nghiệm kích thích siêu bài noãn trên 192 chuột cái và sử dụng tổng cộng 22 chuột đực để tiến hành giao phối với các chuột cái này. Kết quả là có tổng cộng 106 chuột có giao phối (đạt tỷ lệ giao phối khoảng 55,2%), trong 106 chuột giao phối có 92 chuột có phôi (đạt tỷ lệ 48%). Tổng cộng số phôi thu được khi mổ chuột giai đoạn 3,5 ngày là 2.024 phôi, trong đó có 1.522 túi phôi (tỷ lệ là 75,20%), 458 phôi dâu (tỷ lệ 22,63%), 26 phôi 4 tế bào (tỷ lệ 1,28%), 18 phôi 2 tế bào (tỷ lệ 0,89%). Như vậy là có sự

xuất hiện phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau nhưng đại đa số vẫn là túi phôi. Mặt khác, chúng tôi cũng đã thu nhận các phôi dâu để nuôi cấy *in vitro* và đều nhận được các phôi phát triển được đến giai đoạn túi phôi. Nhưng túi phôi loại này cũng cho kết quả phân lập mESCs tương tự như từ túi phôi thu trực tiếp từ tử cung chuột mẹ. Một chuột cái siêu bài noãn được thụ tinh sẽ cho trung bình khoảng 22 phôi, có những chuột cho từ 40-50 phôi, thậm chí là nhiều hơn. Trong khi đó chuột thụ tinh tự nhiên chỉ cho từ 4-11 phôi. Các phôi chuột sau khi thu từ tử cung được giữ trong môi trường M2 ở 37°C (Hình 2).



Hình 2. Phôi thu nhận từ chuột siêu bài noãn sau khi thụ tinh 3,5 ngày.

(1): Túi phôi với nút phôi và xoang túi phôi nhìn rõ. (2): Phôi dâu đang ở giai đoạn dồn ép lại và bề mặt xù xì. (3): Phôi chết với tế bào chất phân mảnh và phôi có màu đen, điều đó cho thấy phôi đang bị phân hủy. (4): Phôi giai đoạn 4 tế bào vẫn còn xuất hiện ở giai đoạn này, điều đó chứng tỏ phôi này có thể đã ngừng phát triển.

3.3. Phân lập và nuôi cấy đơn dòng mESCs từ khối tế bào nút phôi của túi phôi

Ở giai đoạn 3,5 ngày, túi phôi được bao quanh bởi màng sáng. Màng sáng có vai trò trong thụ tinh đặc hiệu loài, bảo vệ nó còn có chức năng giúp phôi tránh làm tổ ở ống dẫn trứng. Một ngày trước khi tiến hành thí nghiệm phân lập mESCs tiến hành thay môi trường mESCs cho tế bào ở các đĩa nuôi cấy 96 giếng

có sẵn mEFs đã bắt hoạt phân bào. Các túi phôi được rửa 3-4 lần trong các vi giọt môi trường M2 để làm sạch phôi. Sử dụng pipet Pasteur đã kéo đặt phôi vào trung tâm của giếng. Sau đó các giếng sẽ được kiểm tra sự có mặt của phôi (Hình 3A). Sau 1-2 ngày nuôi cấy phôi trên lớp tế bào nuôi cùng với môi trường nuôi cấy thích hợp, túi phôi thoát khỏi màng sáng và bắt đầu bám xuống lớp tế bào nuôi. Sau khi thoát khỏi màng sáng, lớp dưỡng bào xung quanh chuyên

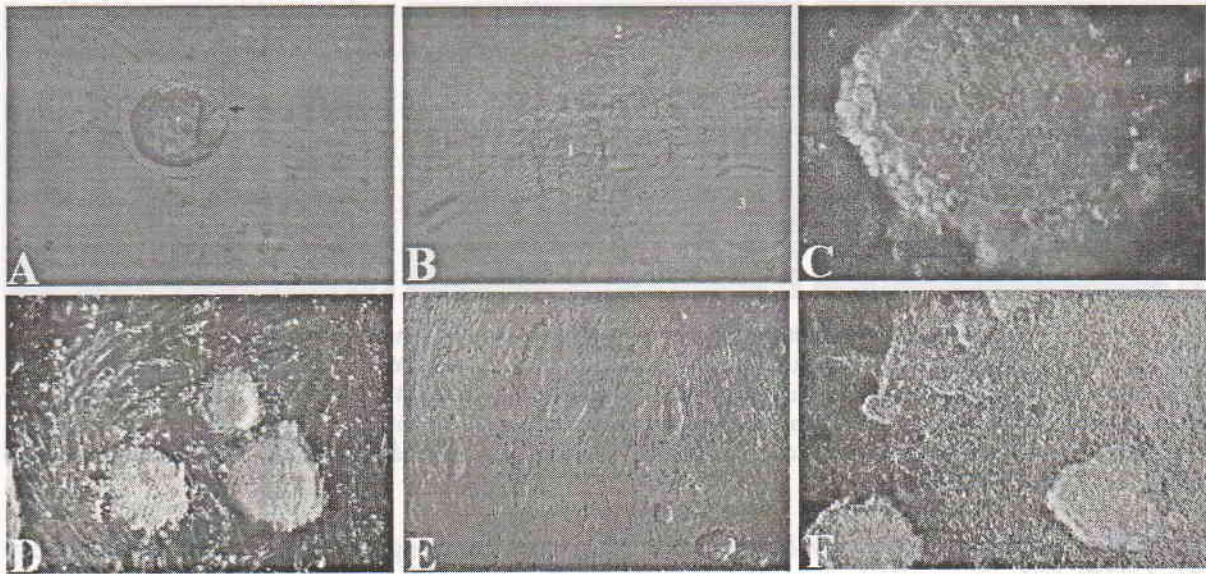
dạng, bắt đầu sinh trưởng và bám xuống lớp tế bào nuôi phía dưới. Nút phôi có hình thái như một quần lạc bám nhẹ lên trên. Quần lạc phát triển lớn dần, với những tế bào có kích thước lớn. Khối tế bào nút phôi nở ra, có thể dễ dàng nhận thấy cụm tế bào nút phôi đang tăng dần lên về kích thước (Hình 3B). Sau 3 ngày nuôi cấy các tế bào dưỡng bào sinh trưởng mạnh xung quanh. Trong khi đó cụm tế bào nút phôi nhìn rõ hơn và tăng nhanh về kích thước. Lúc này chúng có hình thái rất đặc trưng của các quần lạc tế bào gốc đang trong quá trình tăng sinh.

Phân tách khối tế bào nút phôi sinh trưởng mạnh đúng thời điểm có lẽ là yếu tố quyết định trong việc nhân nuôi mESCs (thường là khoảng 5-6 ngày) (Hình 3C). Nếu như phân tách sớm, khối tế bào nút phôi sẽ không đủ tế bào để sinh trưởng và các tế bào sẽ chết. Nếu như phân tách quá muộn, khối tế bào nút phôi sẽ biệt hóa thành các dạng tế bào khác nhau và có thể thành các tế bào chuyên hóa. Như vậy sẽ không thu được các quần lạc giống ESCs. Khối tế bào nút phôi phát triển tốt sẽ được phân tách bằng enzyme thành những cụm tế bào nhỏ khoảng 5-10 tế bào. Ở lần phân tách khối tế bào nút phôi này không nên chia thành các tế bào riêng rẽ.

Sau khi phân tách cụm tế bào nút phôi nuôi cấy, các tế bào sẽ sinh trưởng chậm hơn. Tế bào cần phải được thay môi trường và kiểm tra hàng ngày. Chúng ta nên kiểm tra và thay môi trường vào một giờ nhất định trong ngày. Lúc này, có ba khả năng có thể xảy ra: (i) xuất hiện các dạng tế bào hay quần lạc không giống ESCs, (ii) trong đĩa nuôi cấy chủ yếu là các quần lạc giống ESCs, (iii) trong đĩa nuôi cấy có cả những quần lạc giống ESCs và các dạng tế bào khác nhau.

Trong trường hợp không thấy xuất hiện các quần lạc sau 8 ngày kể từ ngày phân tách khối tế bào nút phôi thì cần loại bỏ đĩa nuôi cấy đó. Các đĩa nuôi cấy xuất hiện các quần lạc hay dạng tế bào không phải ESCs cũng bị loại bỏ. Những đĩa nuôi cấy có cả quần lạc giống ESCs và các quần lạc hay dạng tế bào không giống ESCs thì tiến hành cấy chuyển những quần lạc đẹp như đối với phân tách khối tế bào nút phôi bám ở bên trên. Những đĩa nuôi cấy xuất hiện chủ yếu các quần lạc giống ESCs thì cấy chuyển theo những quy trình chuẩn đối với nuôi cấy mESCs như mô tả ở phần phương pháp.

Khi các quần lạc tế bào đạt đến kích thước có thể cấy chuyển (đường kính quần lạc khoảng 400 μm) thì được cấy chuyển như mô tả ở trên. mESCs sau 3 và 4 lần cấy chuyển (Hình 3D và Hình 3E) vẫn giữ được những đặc điểm đặc trưng về hình thái của tế bào gốc trong nuôi cấy *in vitro* đó là khả năng tăng sinh và hình thành những quần lạc tế bào sau khi cấy chuyển 2-3 ngày. mESCs ở lần cấy chuyển thứ 5 vẫn tạo thành các quần lạc khi nuôi cấy (Hình 3F). Tuy nhiên, xung quanh các quần lạc này đã xuất hiện rất nhiều các tế bào lớn phân tán thành lớp đơn có hình tròn với nhân lớn và nhân chiếm hầu hết tế bào chất. Điều này cho thấy các tế bào này đã có dấu hiệu biệt hóa. Sang đến lần cấy chuyển thứ 6 đã chiếm ưu thế, chỉ còn rất ít tế bào tạo thành cụm dạng ESCs. Nguyên nhân gây nên hiện tượng này có thể là kỹ thuật nuôi cấy chưa cao đặc biệt là việc nhận định được giai đoạn cấy chuyển thực sự thích hợp. Bên cạnh đó còn do sự khác nhau giữa các đợt mEFs, các đợt huyết thanh khác nhau cũng tác động đến sự tăng sinh không biệt hóa của mESCs. Ngoài ra còn có một số nguyên nhân khác dẫn đến tình trạng biệt hóa mESCs phụ thuộc vào các con đường truyền tín hiệu...



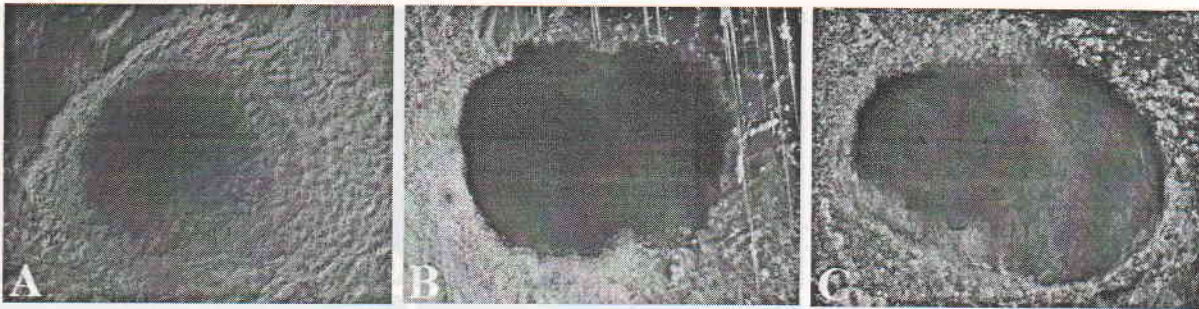
Hình 3. Phân lập và nuôi cấy mESCs.

- (A): Túi phôi chuột trên lớp tế bào nuôi với màng sáng nhìn rất rõ (mũi tên) (10x10).
 (B): Túi phôi sinh trưởng trên lớp tế bào nuôi sau 2 ngày. Bên cạnh túi phôi đang bám xuống là màng sáng. Các tế bào dưỡng bào đã bắt đầu sinh trưởng và bám xuống lớp tế bào nuôi. Khối tế bào nút phôi đang nở ra, có thể dễ dàng nhận thấy cụm tế bào nút phôi đang tăng dần lên về kích thước. (1): Nút phôi, (2): Lớp dưỡng bào, (3): Màng sáng (10x10).
 (C): Khối tế bào nút phôi thích hợp để phân lập mESCs ở ngày nuôi cấy thứ 5. Khối tế bào nút phôi lúc này đã đủ lớn và vẫn giữ được hình thái của một quần lạc mESC. Đây là giai đoạn thích hợp để tiến hành phân tách khối tế bào nút phôi.
 (D): Các quần lạc mESC ở lần cấy chuyển thứ 2 (10x10).
 (E): Các quần lạc mESC ở lần cấy chuyển thứ 4. Sau 4 lần cấy chuyển các quần lạc này vẫn giữ được hình thái đặc trưng của mESCs khi nuôi cấy in vitro (10x5).
 (F): mESCs ở lần cấy chuyển thứ 5 vẫn tạo thành các quần lạc khi nuôi cấy (10x10). Tuy nhiên, xung quanh các quần lạc đã xuất hiện rất nhiều các tế bào hình tròn, to, tế bào sáng với nhân lớn và nhân chiếm hầu hết tế bào chất. Điều này cho thấy các tế bào này đã có dấu hiệu biệt hóa.

3.4. Nhận biết mESCs nuôi cấy qua sự biểu hiện Alkaline phosphatase

Alkaline phosphatase là một enzyme thủy phân chịu trách nhiệm cắt gốc phosphate ra khỏi rất nhiều các phân tử như các nucleotide, protein và các alkaloid. Alkaline phosphatase là một marker đặc trưng, phổ biến không những ở các dòng mESC, hESC mà còn đặc trưng cho cả những dòng ESC cá, gà, lợn... Kết quả nhuộm Alkaline phosphatase của chúng tôi cho thấy các quần lạc tế bào dương tính với Alkaline phosphatase (các quần lạc tế bào có màu đỏ đặc trưng) (Hình 4). Tuy nhiên, các tế bào bao bên ngoài các quần lạc không bắt màu đỏ tươi, điều

này cho thấy các tế bào bên ngoài nhận được ít sự hỗ trợ tương tác giữa các tế bào hơn nên có những dấu hiệu biệt hóa (Hình 4A). Điều này cũng thường hay gặp phải khi nuôi cấy ESCs nguyên phát. Theo các tài liệu nghiên cứu trên thế giới thì sau khoảng 8-10 lần cấy chuyển các tế bào sẽ trở nên ổn định hơn và không có hiện tượng như vậy. Bằng việc tiếp tục cấy chuyển phân tế bào bên trong các quần lạc tương ứng với phần bắt màu đỏ tươi với thuốc nhuộm Alkaline phosphatase, chúng tôi tiếp tục thu được những quần thể tế bào dương tính với Alkaline phosphatase ở các lần cấy chuyển tiếp theo (lần cấy chuyển thứ 4 - Hình 4B và lần cấy chuyển thứ 5 - Hình 4C).



Hình 4. Sự biểu hiện Alkaline phosphatase ở mESCs nuôi cấy *in vitro*.

(A): Khối tế bào nút phôi sau 5 ngày nuôi cấy, các tế bào bên trong có màu đỏ tươi điều đó chứng tỏ các tế bào này biểu hiện Alkaline phosphatase. (B): Quần lạc mESC ở lần cấy chuyển thứ 4, sau 25 ngày nuôi cấy vẫn biểu hiện Alkaline phosphatase. (C): Sự biểu hiện Alkaline phosphatase của quần lạc mESC ở lần cấy chuyển thứ 5. Mức độ biểu hiện Alkaline phosphatase sau lần cấy chuyển thứ 5 đã giảm so với lần cấy chuyển thứ 4, điều này có thể là do mESCs đang dần biệt hóa (10x20).

3.5. Nhận biết mESCs nuôi cấy bằng marker đặc hiệu Oct3/4

Oct3/4 (hay còn gọi là Pou5F1) được biết đến như là nhân tố phiên mã giữ vai trò quyết định được biểu hiện đặc hiệu ở mESCs, phôi giai đoạn sớm cũng như các tế bào sinh dục và nó giữ vai trò quan trọng trong việc duy trì tính đa tiềm năng của mESCs. Do những thuộc tính của Oct3/4 mà nó luôn được lựa chọn là marker

hàng đầu trong việc nhận biết mESCs nuôi cấy lâu dài *in vitro*. Kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang protein Oct3/4 sử dụng hai loại kháng thể, kháng thể thứ nhất kháng Oct3/4 dạng IgM được sản xuất từ thỏ và kháng thể thứ 2 kháng IgM thỏ gắn huỳnh quang màu đỏ cho thấy có sự biểu hiện của protein Oct3/4 ở các quần lạc mESC sau 4 lần cấy chuyển (Hình 5B). Nhân tế bào được nhuộm bằng Hoechst 33342 (Hình 5C).

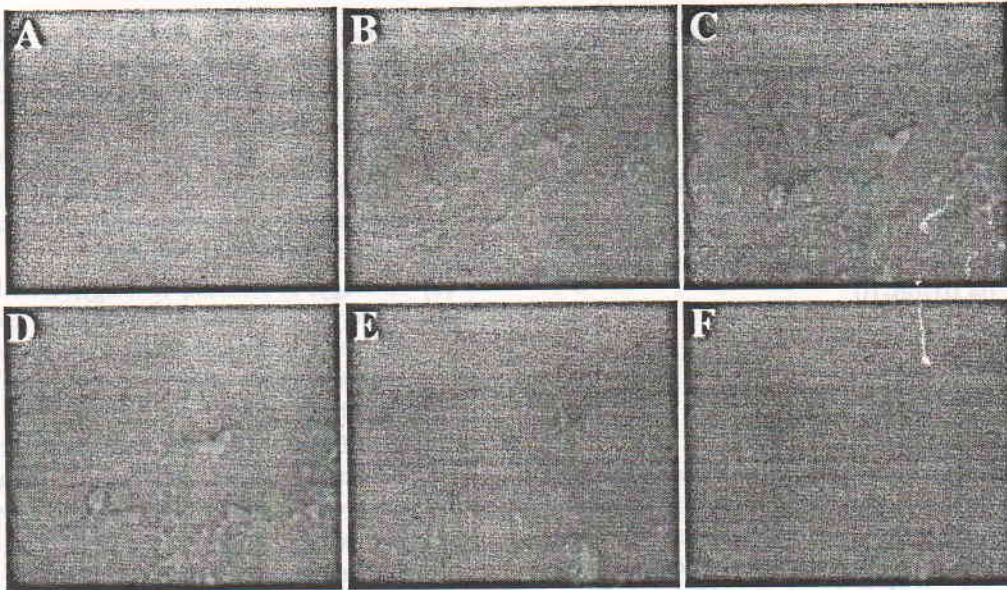


Hình 5. Sự biểu hiện Oct3/4 của mESCs sau 4 lần cấy chuyển ở cùng một hiển vi trường.

(A): Quần lạc mESC ở ánh sáng thường. (B): Quần lạc mESC ở ánh sáng tử ngoại phát hiện protein Oct3/4 có màu đỏ (Cy3). (C): Quần lạc mESC ở ánh sáng tử ngoại phát hiện nhân có màu xanh da trời (DAPI) được nhuộm bằng Hoechst 33342 (10x20).

Kết quả chụp ảnh bằng kính hiển vi laser quét cận cảnh một quần lạc mESCs từ trên đỉnh đến sát đáy của đĩa nuôi cấy cho thấy mức độ biểu hiện của Oct3/4 tăng dần từ trên bề mặt quần lạc vào giữa và giảm dần khi xuống phía dưới của quần lạc, phần nằm sát đáy đĩa nuôi cấy (Hình 6). Cũng giống như kết quả nhuộm Alkaline phosphatase, phần bên trong giữa biểu

hiện Oct3/4 mạnh hơn các phần xung quanh. Điều này có thể được lý giải rằng các tế bào bên trong nhận được sự hỗ trợ của các tế bào xung quanh nhiều nhất nên ít biệt hóa nhất. Các tế bào bên ngoài phải tiếp xúc với môi trường nên dễ cảm ứng bởi môi trường và biệt hóa nhanh hơn.



Hình 6. Ảnh chụp cận cảnh một phần của quần lạc mESC ở lần cấy chuyển thứ 5 biểu hiện Oct3/4 bằng kính hiển vi laser quét.

Thứ tự ảnh từ A đến F được quét từ trên đỉnh của quần lạc đến sát đáy của đĩa nuôi cấy. Các bức ảnh cho thấy mức độ biểu hiện của Oct3/4 tăng dần từ trên bề mặt quần lạc vào trong giữa và giảm dần từ trong giữa quần lạc xuống phía dưới của quần lạc, phần nằm sát đáy đĩa nuôi cấy. Cũng giống như kết quả nhuộm Alkaline phosphatase, phần trong giữa biểu hiện Oct3/4 mạnh hơn các phần xung quanh. Điều này có thể được lý giải rằng các tế bào bên trong nhận được sự hỗ trợ của các tế bào xung quanh nhiều nhất nên ít biệt hóa nhất. Các tế bào bao bên ngoài phải tiếp xúc với môi trường nên dễ cảm ứng bởi môi trường và biệt hóa nhanh hơn (10x63).

4. Kết luận

Với những kết quả trên chúng tôi rút ra được những kết luận sau:

- Đã phân lập, nuôi cấy, bảo quản và phục hồi được dòng mEFs sử dụng làm lớp tế bào nuôi trong nuôi cấy mESCs.

- Xây dựng và hoàn thiện được kỹ thuật kích thích chuột cái siêu bài noãn với hiệu quả cao, qua đó luôn luôn chủ động nguồn phôi sử dụng để phân lập mESCs.

- Áp dụng thành công các kỹ thuật thu, chuyển và nuôi cấy phôi chuột *in vitro*.

- Phân lập, nuôi cấy và duy trì mESCs tăng sinh trong gần 30 ngày với 5 lần cấy chuyển mà vẫn giữ được những đặc điểm hình thái của mESCs.

- Nhận biết được mESCs bằng phương pháp nhuộm Alkaline phosphatase và marker đặc hiệu Oct3/4. mESCs sau 5 lần cấy chuyển vẫn dương tính với Alkaline phosphatase và biểu hiện protein Oct3/4.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài KC.04.01.04/06-10: "Nghiên cứu phân lập, nhân nuôi tế bào gốc nội mô mạch máu dây rốn trẻ sơ sinh và tế bào gốc

phôi chuột. Theo dõi các tế bào gốc trong cơ thể nhận trong điều trị bệnh suy tủy sau chiếu xạ liều cận chết ở động vật thí nghiệm” dưới sự chủ trì của TS. Nguyễn Lai Thành - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Chúng tôi bày tỏ lòng biết ơn tới Bộ Khoa học và Công nghệ, Ban Chủ nhiệm Chương trình KC-04 và chủ nhiệm đề tài KC.04.01/06-10.

Tài liệu tham khảo

- [1] T.C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, R. Kemler, The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, *J Embryol Exp Morphol*, 87(1), (1985) 27.
- [2] F. Fathi, T. Altiraihi, S. Mowla, M. Movahedin, Formation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cells cultured on silicon-coated surfaces, *Cytotechnology* 59(1), (2009) 11.
- [3] J. Itskovitz-Eldor, M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, N. Benvenisty, Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, 6 (2000) 88.
- [4] M.L.M. Khoo, L.R. Mcquade, M.S.R. Smith, J.G. Lees, K.S. Sidhu, B.E. Tuch, Growth and Differentiation of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells: Effect of Glucose and Basic Fibroblast Growth Factor. *Biology of Reproduction* 73(6) (2005) 1147.
- [5] C. Vigneau, K. Polgar, G. Striker, J. Elliott, D. Hyink, O. Weber, H.-J. Fehling, G. Keller, C. Burrow, P. Wilson, Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies Generate Progenitors That Integrate Long Term into Renal Proximal Tubules In Vivo, *Journal of the American Society of Nephrology* 18(6), (2007) 1709.
- [6] J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282(5391) (1998) 1145.
- [7] A.M. Wobus, H. Holzhausen, P. Jakel, J. Schoneich, Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152(1) (1984) 212.
- [8] A. Bradley, M. Evans, M.H. Kaufman, E. Robertson, Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309(5965) (1984) 255.
- [9] A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, J.C. Roder, Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(18), (1993) 8424.
- [10] M.J. Evans, M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819), (1981) 154.
- [11] G.R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12) (1981) 7634.
- [12] C.A. Cowan, I. Klimanskaya, J. McMahon, J. Atienza, J. Witmyer, J.P. Zucker, S. Wang, C.C. Morton, A.P. McMahon, D. Powers, D.A. Melton, Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *N Engl J Med*,. 350(13), (2004) 1353.
- [13] M. Mitalipova, Z. Beyhan, N.L. First, Pluripotency of Bovine Embryonic Cell Line Derived from Precompacting Embryos. *Cloning*, 3(2) (2004) 59.
- [14] E. Notarianni, C. Galli, S. Laurie, R. Moor, M. Evans, Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep, *J Reprod Fertil Suppl* 43 (1991) 255.
- [15] M. Sims, N.L. First, Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13) (1994) 6143.
- [16] H. Suemori, T. Tada, R. Torii, Y. Hosoi, K. Kobayashi, H. Imahie, Y. Kondo, A. Iritani, and N. Nakatsuji, Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn*, 222(2), (2001) 273.
- [17] J.A. Thomson, J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, R.A. Becker, J.P. Hearn, Isolation of a primate embryonic stem cell line.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17) (1995) 7844.
- [18] Y. Wang, F. Yates, O. Naveiras, P. Ernst, G.Q. Daley, Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52) (2005) 19081.
- [19] H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa, S. Kaneko, Y. Kuwana, S. Nakanishi, S.-I. Nishikawa, Y. Sasai, *Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell Derived Inducing Activity*. 28(1) (2000) 31.
- [20] A.L. Perrier, V. Tabar, T. Barberi, M.E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N.L. Harrison, L. Studer, Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), (2004) 12543.
- [21] N.S. Roy, C. Cleren, S.K. Singh, L. Yang, M.F. Beal, S.A. Goldman, Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12(11), (2006) 1259.
- [22] Y. Yiping, Y. Dali, D.Z. Ewa, D. Zhongwei, W. Brian, V. Chuck, A.P. Robert, A.T. James, Z. Su-Chun, Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 23(6) (2005). 781.
- [23] T.C. Mcdevitt, M.A. Laflamme, C.E. Murry, Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39(6), (2005) 865.
- [24] C. Xu, S. Police, N. Rao, M.K. Carpenter, Characterization and Enrichment of Cardiomyocytes Derived From Human Embryonic Stem Cells, *Circ Res* 91(6), (2002) 501.
- [25] M. Hirashima, H. Kataoka, S. Nishikawa, N. Matsuyoshi, and S.-I. Nishikawa, Maturation of Embryonic Stem Cells Into Endothelial Cells in an In Vitro Model of Vasculogenesis, *Blood* 93(4), (1999) 1253.
- [26] J. Yamashita, H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao, S.I. Nishikawa, Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors, *Nature* 408 (6808), (2000) 92.
- [27] S. Assady, G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K.L. Skorecki, M. Tzukerman, Insulin Production by Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes* 50(8), (2001) 1691.
- [28] K. Chan, S. Raikwar, N. Zavazava, Strategies for differentiating embryonic stem cells (ESC) into insulin-producing cells and development of non-invasive imaging techniques using bioluminescence, *Immunol Res* 39 (2007) 261.
- [29] P.R. Sudhanshu, Z. Nicholas, Insulin producing cells derived from embryonic stem cells: Are we there yet? *Journal of Cellular Physiology* 218(2), (2009) 256.
- [30] A.M. Wobus, K.R. Boheler, Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy, *Physiol. Rev.* 85(2) (2005) 635.
- [31] W.Z. Zhu, K.D. Hauch, C. Xu, M.A. Laflamme, Human embryonic stem cells and cardiac repair. *Transplantation Reviews* 23(1), (2009) 53.
- [32] Y. Chung, I. Klimanskaya, S. Becker, J. Marh, S.-J. Lu, J. Johnson, L. Meisner, R. Lanza, Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres, *Nature* 439 (7073), (2006) 216.
- [33] W. Sayaka, H. Takafusa, S. Rinako, S. Yuko, B. Hong-Thuy, M. Eiji, W. Teruhiko, Efficient Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Single Blastomeres and Polar Bodies, *Stem Cells* 25(4), (2007) 986.
- [34] I. Gimis, Y. Luo, T. Miura, S. Thies, R. Brandenberger, S. Gerecht-Nir, M. Amit, A. Hoke, M.K. Carpenter, J. Itskovitz-Eldor, M.S. Rao, Differences between human and mouse embryonic stem cells, *Developmental Biology*, 269(2), (2004) 360.
- [35] O. Gordeeva, N. Krasnikova, A. Larionova, T. Krylova, G. Polyanskaya, R. Zinov'eva, D. Gulyaev, M. Pryzhkova, N. Nikol'skii, N. Khrushchov, Analysis of expression of genes specific for pluripotent and primordial germ cells in human and mouse embryonic stem cell lines, *Doklady Biological Sciences* 406(1), (2006) 115.
- [36] S. Masui, Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A.A. Sharov, M.S.H. Ko, H. Niwa, Pluripotency governed by Sox2 via

- regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells, *Nat Cell Biol* 9(6), (2007) 625.
- [37] J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, A. Smith, *Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4*. 95(3), (1998) 379.
- [38] Z.-X. Wang, C.H.-L. Teh, J.L.L. Kueh, T. Lufkin, P. Robson, L.W. Stanton, Oct4 and Sox2 Directly Regulate Expression of Another Pluripotency Transcription Factor, Zfp206, in Embryonic Stem Cells, *Journal of Biological Chemistry* 282(17), (2007) 12822.
- [39] I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith, *Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells*. 113(5), (2003) 643.
- [40] K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka, *The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells*. 113(5), (2003) 631.
- [41] G. Pan, J.A. Thomson, Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency, *Cell Res* 17(1), (2007) 42.
- [42] A. Nagy, M. Gersenstein, K. Vintersten, and R. Behringer, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., 2003.
- [43] I. Klimanskaya, R. Lanza, *Methods in Enzymology: Embryonic Stem Cells*. Academic Press, (2006) 418.
- [44] M. Hashemi-Tabar, F. Javadnia, M. Orazizadeh, M. Baazm, Isolation and differentiation of mouse embryonic stem cells, *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 3(1), (2005) 42.

Identification and culture of embryonic stem cells derived from inner cell mass of mouse blastocysts

Dang Van Duc¹, Nguyen Lai Thanh¹, Bui Viet Anh¹, Do Doan Loi²

¹Faculty of Biology, College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Dong Da, Hanoi

In Vietnam, stem cell technologies, specially in embryonic stem cells (ESCs), are in progress of initiation. Current researches have focused mainly on adult stem cells and almost the results obtained have been just initial successes. In this study, we established and improved the method for isolation and long term culture of embryonic stem cells derived from inner cell mass of mouse blastocysts (*Mus musculus*). The ESCs from inner cell mass formed the colonies after isolation and passing. During the cultivation, we determined pluripotency of this type of the cell with two makers alkaline phosphatase and Oct3/4 transcriptional factor protein. The results of histochemical staining with alkaline phosphatase and immunofluorescence stain for Oct3/4 indicated that mouse embryonic stem cells after five passages with approximately 30 days of culture still remain the characters of stem cells.

Keywords: Embryonic stem cells, mouse embryonic stem cells, Alkaline phosphatase, Oct3/4.