



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002293

(51)⁷ **C12N 5/00; C12N 5/07**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00100

(22) 23/04/2015

(45) 27/04/2020 385

(43) 25/09/2015 330A

(73) **ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**

Phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

(72) **Phạm Văn Phúc (VN); Trương Hải Nhung (VN); Nguyễn Hải Nam (VN)**

(54) **QUY TRÌNH BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ THÀNH TẾ BÀO GAN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan, trong đó quy trình này bao gồm các bước a) chuẩn bị dịch chiết tế bào gan; b) chuẩn bị tế bào gốc trung mô; và c) biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan. Quy trình theo giải pháp hữu ích khác biệt ở chỗ quá trình tạo dịch chiết tế bào gan được thực hiện trong môi trường PBS bổ sung chất ức chế protease và việc phá vỡ mô gan được thực hiện bằng nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C, đồng nhất mẫu bằng siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây để thu dịch chiết tế bào gan dùng để cảm ứng biệt hóa tế bào gốc trung mô, và tế bào gốc trung mô được nuôi cấy biệt hóa trên nền fibronectin với môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và từ 30-60 µg/ml dịch chiết tế bào gan.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học y - dược, chăm sóc sức khỏe và y học tái tạo. Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan ứng dụng trong tái tạo gan và điều trị các bệnh liên quan đến suy thoái tế bào gan.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các tế bào gốc trung mô có tiềm năng biệt hoá thành tế bào gan. Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương (Shi, Mao et al. 2008, Li, Tao et al. 2010, Min Wang 2010, Behshad Pournasr MSc 2011, Mohsin, Shams et al. 2011), tế bào gốc trung mô từ máu dây rốn (Moon, Yoon Hh Fau - Lee et al. 2009) và từ mô mỡ (Sgodda, Aurich et al. 2007, Lue, Lin et al. 2010, Sterodimas, de Faria et al. 2010, Puglisi, Saulnier N Fau - Piscaglia et al. 2011, Ruiz 2011, Abbas Sahebghadam 2012, Harn, Lin et al. 2012) đã được nghiên cứu kỹ. Bằng cách sử dụng các yếu tố tăng trưởng EGF, HGF hay những tác nhân khác như OSM, dexamethason, ITS... để tạo ra MSC đã cũng được công bố (Shi, Mao et al. 2008, Ruiz 2011).

Đã có nghiên cứu cảm ứng biệt hóa tế bào gốc thành tế bào gan dựa vào các môi trường có bổ sung các yếu tố cảm ứng như HGF, OSM, FGF và axit ascorbic. Nguyên tắc chung của quy trình cảm ứng này là: sử dụng các yếu tố tăng trưởng hướng tế bào gan để kích thích tế bào gốc biệt hoá thành tế bào gan trong môi trường có bổ sung các yếu tố này theo tỷ lệ và nồng độ phù hợp (Lue, Lin et al. 2010, Min Wang 2010, Abbas Sahebghadam 2012). Quy trình này có ưu điểm là đã có nhiều công bố liên quan. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất cảm ứng này còn nhiều điều bàn luận vì các quy trình khác nhau lại sử dụng các tỷ lệ và nồng độ rất khác nhau, chi phí mua các yếu tố tăng trưởng và hoá chất là khá cao. Ngoài ra, các yếu tố tăng trưởng vẫn có những rủi ro nhất định. Ngoài ra, việc sử dụng các hóa chất này có khả năng gây phản vệ khi ghép tế bào vào cơ

thể, nên việc sử dụng hóa chất cảm ứng biệt hóa tế bào không được ưu tiên đối với các thành phần nuôi cấy có khả năng cấy ghép để điều trị bệnh.

Theo báo cáo, dịch chiết gan gồm khoảng 643 protein, và các protein này được chia thành các nhóm khác nhau, thực hiện nhiều chức năng quan trọng, bao gồm cả protein tham gia vào quá trình chuyển hóa (54%), vận chuyển protein (7%), cấu trúc protein (5%), yếu tố tăng trưởng và phát triển tế bào gan (2%), bảo vệ protein (2%), protein độc (2%), và nhiều protein khác (Gazzana và Borlak 2009). Protein là thành phần chính tham gia vào quá trình cảm ứng và định hướng biệt hóa MSC thành tế bào gan, và cung cấp đầy đủ các chất cần thiết cho sự tăng trưởng của các tế bào gan. Hơn nữa, một số công bố đã chỉ ra MSC có thể biệt hóa thành tế bào gan bằng cách đồng nuôi cấy MSC với tế bào gan trong ống nghiệm (Lange, Bruns H Fau - Kluth et al. 2006, Chen, Dong Xj Fau - Zhang et al. 2007, Tao 2012).

Cũng đã có một số công bố liên quan đến việc sử dụng dịch chiết tế bào gan cảm ứng tế bào gốc biệt hóa thành tế bào gan, ví dụ, Samaneh Dolati Carvandi, In vitro differentiation of rat mesenchymal stem cells to hepatocyte lineage, Iran J Basic Med Sci, Vol.18, No.1, 01/2015, p.89-97, hoặc Mahmoud elhussiny salameh, The useage of liver extract verses growth factors in the differentiation of mesenchymal stem cells into hepatocyte like cells, Journal of International academic reasearch for multidisciplinary, Vol.2, Issue 2, 3/2014. Nguyễn Thị Kim Nguyễn, Nghiên cứu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người thành tế bào giống tế bào gan in vitro, Tạp chí sinh học 2014, 36(1se): 209-215, tuy nhiên, việc chiết tế bào gan thường được thực hiện bằng enzym hoặc bằng cách nghiền, do đó có khả năng ảnh hưởng đến các thành phần của tế bào gan nên chất lượng biệt hóa tế bào không cao, chưa đáp ứng được khả năng ứng dụng trong y học, cụ thể là trong ứng dụng lâm sàng.

Do đó, cần có quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan hiệu quả, khắc phục được các nhược điểm về hóa chất cảm ứng cũng như hiệu quả cảm ứng sao cho giảm được tối đa các tác dụng phụ của hóa chất sử dụng để cảm ứng, đồng thời đảm bảo được khả năng ứng dụng trong y học lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để khắc phục các nhược điểm nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dịch chiết tế bào gan bằng cách thu nhận tế bào gan chuột, sau khi rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphat (PBS) bổ sung chất kháng sinh/kháng nấm, cắt nhuyễn mô gan trong dung dịch đệm phosphat bổ sung chất ức chế proteaza, sau đó phá vỡ mô bằng cách chuyển mẫu vào trong nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C, sau đó ly tâm ở tốc độ 13000-15000 vòng/phút, thu phần cặn, sau khi hòa tan cặn trong PBS bổ sung chất ức chế proteaza, tiến hành siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây đến khi thu được mẫu đồng nhất, sau khi ly tâm ở 13000-15000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch được lọc qua màng lọc 0,45µm thu được dịch chiết tế bào gan;

b) chuẩn bị tế bào gốc trung mô bằng cách nuôi tế bào gốc trung mô trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và 1X chất kháng sinh/kháng nấm và nuôi ở 37°C, 5% CO₂, cấy chuyển trên môi trường chứa 0,25% trypsin/EDTA đến khi mật độ đạt 70-80% diện tích bề mặt nuôi cấy, tế bào gốc trung mô được nuôi đến thế hệ 4-5; và

c) biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan bằng cách phủ lên trên bề mặt đĩa nuôi cấy fibronectin sau đó bổ sung môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và từ 30-60 µg/ml dịch chiết tế bào gan thu được từ bước a), sau đó bổ sung tế bào gốc trung mô thu được từ bước b) với mật độ 5×10^5 tế bào/cm² và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 21 ngày, thu được tế bào gan; khác biệt ở chỗ:

quá trình tạo dịch chiết tế bào gan được thực hiện trong môi trường PBS bổ sung chất ức chế proteaza và việc phá vỡ mô gan được thực hiện bằng nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C, đồng nhất mẫu bằng siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây để thu dịch chiết tế bào gan dùng để cảm ứng biệt hóa tế bào gốc trung mô; và

tế bào gốc trung mô được nuôi cấy biệt hóa trên nền fibronectin với môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và từ 30-60 µg/ml dịch chiết tế bào gan.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước phá vỡ mô trong nitơ lỏng được thực hiện lặp lại khoảng từ 6 đến 8 lần kết hợp với siêu âm khoảng từ 7 đến 10 lần để thu dịch chiết tế bào gan.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tế bào gốc trung mô được cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy mới sau 3 ngày nuôi cấy đến khi thu được tế bào gan biệt hóa.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tế bào gốc trung mô thu được từ mô mỡ của người, mô mỡ của chuột hoặc mô tủy xương của chuột.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp tế bào gốc trung mô từ tế bào mỡ của người.

Hình 2 là ảnh chụp tế bào gốc trung mô thành tế bào gan biểu hiện sau 21 ngày nuôi cấy, mũi tên xanh chỉ các tế bào có hình đa giác, hình tròn, hình ovan và có nhân lõm, mũi tên đen chỉ các tế bào có 02 nhân.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp được mô tả chi tiết với các ví dụ và phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các ví dụ và các phương án này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị dịch chiết tế bào gan; b) chuẩn bị tế bào gốc trung mô; và c) biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan.

Để thu nhận được dịch chiết tế bào gan, mẫu gan được thu nhận từ chuột bằng cách gây mê động vật, khử trùng vị trí phẫu thuật bằng cồn và providin, sau đó giải phẫu để thu được toàn bộ mô gan. Mẫu gan sau khi thu được này được sử dụng để thu nhận dịch chiết tế bào gan.

Trong bước chuẩn bị dịch chiết tế bào gan, mẫu gan chuột sau khi được thu nhận được rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphat (PBS) bổ sung chất kháng

sinh/kháng nấm. Các chất kháng sinh/kháng nấm là chế phẩm kháng sinh/kháng nấm được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này để xử lý mô và có thể mua được ngoài thị trường. Sau khi cắt nhuyễn mô gan trong dung dịch đệm phosphat bổ sung chất ức chế proteaza. Mẫu mô được phá vỡ bằng cách chuyển vào trong nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C. Quá trình này nhằm phá vỡ kết cấu của tế bào gan, nhưng không ảnh hưởng đến chất lượng thành phần có trong tế bào.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước phá vỡ mô trong nitơ lỏng được thực hiện lặp lại khoảng từ 6 đến 8 lần để thu được tế bào gan tách biệt.

Sau khi phá vỡ mô, tiến hành ly tâm ở tốc độ 13000-15000 vòng/phút, thu phần cặn. Phần cặn được hòa tan trong PBS bổ sung chất ức chế proteaza và tiến hành siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây đến khi thu được mẫu đồng nhất.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quá trình siêu âm được thực hiện trong khoảng từ 7 đến 10 lần để thu dịch chiết tế bào gan.

Dịch sau khi siêu âm được ly tâm ở 13000-15000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch được lọc qua màng lọc 0,45µm thu được dịch chiết tế bào gan đồng nhất.

Trong bước chuẩn bị tế bào gốc trung mô, tế bào gốc trung mô theo giải pháp có thể thu được từ tế bào mô mỡ của người, mô mỡ của chuột hoặc mô tủy xương của chuột. Tế bào gốc trung mô này có thể thu được bằng phương pháp, ví dụ, bằng phương pháp của (Shi, Mao et al. 2008, Li, Tao et al. 2010, Min Wang 2010, Behshad Pournasr MSc 2011, Mohsin, Shams et al. 2011), (Moon, Yoon Hh Fau - Lee et al. 2009) hoặc (Sgodda, Aurich et al. 2007, Lue, Lin et al. 2010, Sterodimas, de Faria et al. 2010, Puglisi, Saulnier N Fau - Piscaglia et al. 2011, Ruiz 2011, Abbas Sahebghadam 2012, Harn, Lin et al. 2012) hoặc Phuc Van Pham (2013).

Tiến hành nuôi tế bào gốc trung mô trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và 1X chất kháng sinh/kháng nấm trong điều kiện nuôi ở 37°C, 5% CO₂. Môi trường nuôi cấy được thay mới sau 3 ngày. Tiến hành cấy chuyển trên môi trường chứa 0,25% trypsin/EDTA đến khi mật độ đạt 70-80% diện tích bề mặt nuôi cấy. Tế bào gốc trung mô được nuôi đến thế hệ 4-5 được sử dụng làm tế bào biệt hóa thành tế bào gan.

Trong bước biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan, đây là quá trình quyết định đến chất lượng tế bào gan thu được. Tiến hành phủ lên trên bề mặt đĩa nuôi cấy fibronectin, sau đó bổ sung môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm là môi trường nuôi cấy cơ bản. Các tác giả đã thử nghiệm và nhận thấy rằng việc sử dụng môi trường cải tiến DMEM/F12 là thích hợp nhất để thu được các tế bào nuôi cấy khỏe mạnh, tạo thuận lợi cho quá trình biệt hóa. Để cảm ứng, môi trường nuôi cấy được bổ sung từ 30-60 $\mu\text{g/ml}$ dịch chiết tế bào gan thu được từ quy trình theo sản xuất, cụ thể là từ bước chuẩn bị dịch chiết tế bào gan. Tế bào gốc trung mô sau khi được nuôi đến mật độ thích hợp nêu trên được bổ sung vào môi trường biệt hóa với mật độ 5×10^5 tế bào/ cm^2 và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 trong 21 ngày, thu được tế bào gan.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tế bào gốc trung mô được cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy mới sau 3 ngày nuôi cấy đến khi thu được tế bào gan biệt hóa.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Chuẩn bị dịch chiết gan

Lấy 2 g mô gan chuột và tiến hành rửa mô gan từ 2-3 lần trong PBS có bổ sung 5ml/l dung dịch kháng sinh/kháng nấm (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cắt nhuyễn mô gan trong môi trường PBS bổ sung chất ức chế protein (PBSi) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) và chuyển mô vào ống đông lạnh (Corning). Phá mẫu mô bằng cách đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng 6-8 lần, 30 giây/lần và rã đông nhanh ở 37°C . Dịch sau khi phá mẫu được ly tâm 15000 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi loại bỏ phần dịch nổi, phần cặn được bổ sung 15ml PBSi vào và tiến hành siêu âm trong thiết bị siêu âm với khoảng thời gian siêu âm/ngiht là 10 giây/20 giây. Thực hiện chu kỳ siêu âm khoảng 10 lần. Phần dịch thu được này được ly tâm mẫu ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi thu được này được lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$. Kết quả thu được 6 mg/ml dịch tế bào gan ($V=20\text{ml}$).

Ví dụ 2: Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan

Tế bào gốc trung mô được tách bằng phương pháp của Phuc Van Phan (2013). Tiến hành nuôi tế bào gốc trung mô trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và 1X chất kháng sinh/kháng nấm trong điều kiện nuôi ở 37°C, 5% CO₂. Môi trường nuôi cấy được thay mới sau 3 ngày. Tiến hành cấy chuyển trên môi trường chứa 0,25% trypsin/EDTA đến khi mật độ đạt 70-80% diện tích bề mặt nuôi cấy. Tế bào gốc trung mô được nuôi đến thế hệ 4-5 được sử dụng làm tế bào biệt hóa thành tế bào gan.

Tiến hành phủ lên trên bề mặt đĩa nuôi cấy fibronectin, sau đó bổ sung môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và 60 µg/ml dịch chiết tế bào gan thu được Ví dụ 1.

Cấy tế bào gốc trung mô vào môi trường nuôi cấy biệt hóa với mật độ 5×10^5 tế bào/cm² và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Môi trường được thay mới sau 3 ngày. Sau 21 ngày nuôi cấy, thu được tế bào gan.

Để làm đối chứng, tế bào gốc trung mô được nuôi trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X antibiotic-mycotic (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) không bổ sung dịch chiết tế bào gan.

Kết quả quan sát trên kính hiển vi được thể hiện trên Hình 1 và Hình 2, theo đó, tế bào gốc trung mô có dạng hình thoi dài, tế bào gan có dạng hình đa giác, đa nhân và vùng nhân lõm.

Kết quả quan sát được thể hiện trên các hình, trong đó Hình 1 là ảnh chụp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người. Hình 2 là ảnh chụp tế bào sau cảm ứng dịch chiết 21 ngày, mũi tên xanh chỉ các tế bào có hình đa giác, hình tròn, hình oval và có nhân lõm, mũi tên đen chỉ các tế bào có 02 nhân.

Để đánh giá sự thay đổi trong việc biểu hiện các gen gen liên quan đến tế bào gan, tiến hành đánh giá bằng phương pháp realtime-PCR để kiểm tra các gen CK18, CK19, albumin, alpha fetoprotein với các cặp mồi đặc hiệu sau.

<i>Tên gen</i>	<i>Trình tự mồi</i>	
<i>CK18</i>	Mồi xuôi	GAGATCGAGGCTCTCAAGGA
	Mồi ngược	CAAGCTGGCCTTCAGATTTC
<i>CK19</i>	Mồi xuôi	ATGGCCGAGCAGAACCGGAA

	Mỗi ngược	CCATGAGCCGCTGGTACTCC
<i>Albumin</i>	Mỗi xuôi	GTGGGCAGCAAATGTTGTAA
	Mỗi ngược	TCATCGACTTCCAGAGCTG
<i>Alpha fetoprotein</i>	Mỗi xuôi	TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAA
	Mỗi ngược	CATAGCGAGCAGCCCCAAAGAAG

Kết quả đánh giá cho thấy hình thái tế bào: tế bào chuyển từ dạng thoi dài đặc trưng của tế bào gốc trung mô sang hình dạng đa giác có vùng nhân lõm đặc trưng của tế bào gan. Mẫu tế bào có cảm ứng dịch chiết tăng biểu hiện CK18 (4,22 lần), Albumin (71,50 lần), alpha-fetoprotein (54,728,32 lần) so với mẫu tế bào không được nuôi trong môi trường bổ sung dịch chiết.

Tế bào cảm ứng dịch chiết biểu hiện protein AAT và albumin từ ngày thứ 14 và biểu hiện mạnh vào ngày 21.

Tế bào cảm ứng dịch chiết có khả năng dự trữ glycogen bằng chứng là tế bào dương tính với thuốc nhuộm Pas.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích cho phép tạo ra dịch chiết tế bào gan với các thành phần tế bào không bị phá vỡ bởi cơ học hoặc bởi enzym, hóa chất. Điều này giúp cho khả năng biệt hóa tế bào gốc thành tế bào trung mô hiệu quả, mở ra hướng điều trị các bệnh gan bằng tế bào gốc trên cơ sở cảm ứng tế bào gan tự thân.

Quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan được thực hiện đơn giản, tiết kiệm, cho phép các phòng thí nghiệm nghiên cứu, tiến hành các thử nghiệm về khả năng ứng dụng tế bào gốc trong điều trị bệnh liên quan đến gan. Hướng tới việc sử dụng quy trình để cảm ứng tế bào gốc tự thân định hướng thành tế bào gan trước khi ghép nhằm nâng cao hiệu quả điều trị.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dịch chiết tế bào gan bằng cách thu nhận tế bào gan chuột, sau khi rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphat (PBS) bổ sung chất kháng sinh/kháng nấm, cắt nhuyễn mô gan trong dung dịch đệm phosphat bổ sung chất ức chế proteaza, sau đó phá vỡ mô bằng cách chuyển mẫu vào trong nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C, sau đó ly tâm ở tốc độ 13000-15000 vòng/phút, thu phần cặn, sau khi hòa tan cặn trong PBS bổ sung chất ức chế proteaza, tiến hành siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây đến khi thu được mẫu đồng nhất, sau khi ly tâm ở 13000-15000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch được lọc qua màng lọc 0,45µm thu được dịch chiết tế bào gan;

b) chuẩn bị tế bào gốc trung mô bằng cách nuôi tế bào gốc trung mô trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và 1X chất kháng sinh/kháng nấm và nuôi ở 37°C, 5% CO₂, cấy chuyển trên môi trường chứa 0,25% trypsin/EDTA đến khi mật độ đạt 70-80% diện tích bề mặt nuôi cấy, tế bào gốc trung mô được nuôi đến thế hệ 4-5; và

c) biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào gan bằng cách phủ lên trên bề mặt đĩa nuôi cấy fibronectin sau đó bổ sung môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và từ 30-60 µg/ml dịch chiết tế bào gan thu được từ bước a), sau đó bổ sung tế bào gốc trung mô thu được từ bước b) với mật độ 5x10⁵ tế bào/cm² và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 21 ngày, thu được tế bào gan;

khác biệt ở chỗ:

quá trình tạo dịch chiết tế bào gan được thực hiện trong môi trường PBS bổ sung chất ức chế proteaza và việc phá vỡ mô gan được thực hiện bằng nitơ lỏng trong 30 giây và tan đông nhanh ở 37°C, đồng nhất mẫu bằng siêu âm 10 giây nghỉ 20 giây để thu dịch chiết tế bào gan dùng để cảm ứng biệt hóa tế bào gốc trung mô; và

tế bào gốc trung mô được nuôi cấy biệt hóa trên nền fibronectin với môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1X chất kháng sinh/kháng nấm và từ 30-60 $\mu\text{g/ml}$ dịch chiết tế bào gan.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó tế bào gốc trung mô thu được từ mô mỡ của người, mô mỡ của chuột hoặc mô tủy xương của chuột.

HÌNH 1



HÌNH 2

