

NGHIÊN CỨU THU NHẬN TẾ BÀO VÀ KHUNG NGOẠI BÀO TỪ DÂY RÓN ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC TÁI TẠO

Lê Thị Vĩ Tuyết^{1,2}, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ^{1,2}, Hoàng Thị Diễm Tuyết³, Đỗ Xuân Trường⁴, Trần Lê Bảo Hà^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Hùng Vương, Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Bệnh viện Thẩm mỹ Xuân Trường, Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Dây rốn có chứa các tế bào gốc trung mô (UC-MSC), có khả năng biệt hóa thành các tế bào khác nhau trong cơ thể và chứa khung ngoại bào (UC-ECM) giàu cytokine, yếu tố tăng trưởng giữ vai trò quan trọng trong y học tái tạo và kỹ nghệ mô. Nghiên cứu được thực hiện nhằm thu nhận đồng thời UC-MSC và UC-ECM của cùng một dây rốn. Việc phân lập tế bào được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô và khử tế bào để thu nhận khung ngoại bào bằng các chu kỳ đông lạnh - rã đông (1, 3, 5, 7, 10 chu kỳ). Hình thái tế bào được ghi nhận suốt quá trình nuôi cấy, tiềm năng biệt hóa tạo xương của tế bào được đánh giá. Bên cạnh đó, việc định lượng ADN mẫu dây rốn khử tế bào được tiến hành nhằm khẳng định hiệu quả của các phương pháp thu nhận. Kết quả cho thấy, các tế bào sau thu nhận có khả năng, bám dính và tăng sinh từ ngày 7 của quá trình nuôi cấy và những đặc tính này trở nên rõ hơn vào ngày 14 và ngày 21. Các UC-MSC bắt màu với thuốc nhuộm Alizarin Red vào ngày 14 và ngày 21 của quá trình nuôi cấy ứng biệt hóa. Đối với UC-ECM, nồng độ ADN tồn đọng trong những mẫu mô xử lý đông lạnh - rã đông đều thấp hơn ở mẫu mô chưa xử lý. Trong đó, chỉ những mô được khử tế bào bởi quy trình 7, 10 chu kỳ có nồng độ ADN tồn đọng phù hợp với tiêu chuẩn mô vô bào (< 50 ng/mg, P-value $< 0,05$). Nghiên cứu thành công trong việc khẳng định hiệu quả thu nhận UC-MSCs bằng nuôi cấy mảnh mô và UC-ECM bằng đông lạnh - rã đông với số lượng chu kỳ phù hợp (7, 10 chu kỳ). Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng những sản phẩm này trong y học tái tạo hay kỹ nghệ mô.

Từ khóa: Dây rốn, đông lạnh - rã đông, khung ngoại bào, phân lập tế bào, quá trình khử tế bào, sự biệt hóa.

MỞ ĐẦU

Dây rốn, một cấu trúc phần phụ của thai, trở thành mô được quan tâm những năm gần đây trong lĩnh vực y học tái tạo. Sản phẩm từ dây rốn bao gồm tế bào gốc trung mô từ dây rốn (UC-MSCs) và khung ngoại bào (UC-ECM) được nghiên cứu ứng dụng trong các liệu pháp tế bào và liệu pháp kỹ nghệ mô. Hơn thế nữa, dây rốn có chứa các yếu tố kích thích sự tăng sinh, di cư của tế bào; thúc đẩy sự biệt hóa và phát triển mô (Kocić *et al.*, 2017; Secunda *et al.*, 2015). Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã khẳng định vai trò của khung ngoại bào từ mạch máu dây rốn trong chế tạo mảnh ghép mạch máu (Gui *et al.*, 2009), sử dụng như miếng vá ống mật bị tổn thương (Kimura *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2007), hay chế tạo khung nền vô bào từ lớp Wharton's Jelly (WJ) dây rốn định hướng ứng dụng trong kỹ nghệ mô (Jadalannagari *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, tế bào gốc trung mô từ dây rốn (UC-MSCs), đặc biệt là các tế bào được phân lập từ Wharton's Jelly, đã được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng và được khẳng định sự an toàn và hiệu quả trong chữa lành vết thương (Couto *et al.*, 2019). Với tiềm năng ứng dụng cao và nguồn nguyên liệu dồi dào, việc nghiên cứu thu nhận và chế tạo sản phẩm từ dây rốn đã và đang được các nhà khoa học quan tâm. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu về thu nhận hay chế tạo các sản phẩm UC-MSCs và UC-ECM. Phương pháp phổ biến dùng cho việc thu nhận UC-MSCs là sử dụng enzyme hoặc nuôi cấy mảnh mô (Kocić *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2016), và UC-ECM là sử dụng các chất có tính tẩy, enzyme hoặc chất có khả năng thay đổi áp suất thẩm thấu (Jadalannagari *et al.*, 2017; Kocić *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2016). Tuy nhiên, việc thu nhận và chế tạo các sản phẩm từ dây rốn có sử dụng các tác nhân hóa học như vậy ảnh hưởng đến chất lượng đầu ra, độ tinh sạch của chúng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích thiết lập quy trình thu nhận và chế tạo các sản phẩm có nguồn gốc từ mô dây rốn bao gồm tế bào gốc trung mô (UC-MSCs) và khung ngoại bào (UC-ECM) không sử dụng tác nhân hóa học. Thử nghiệm nuôi cấy mảnh mô được thực hiện nhằm thu nhận UC-MSCs dựa trên đặc tính bám dính và biệt hóa của tế bào hay phương pháp đông lạnh - rã đông thu nhận UC-ECM giúp phá vỡ cấu trúc tế bào dựa trên nguyên tắc hình thành tinh thể đá. Các phương pháp này có tiềm năng cao trong hỗ trợ thu nhận các sản phẩm từ dây rốn.

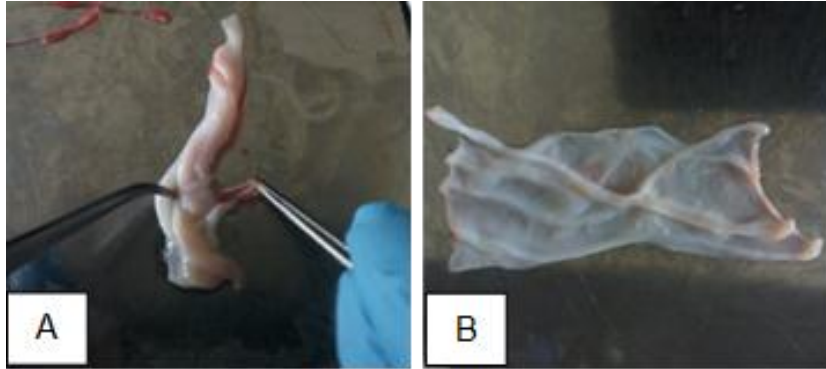
VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Mẫu dây rốn được cung cấp bởi Bệnh viện Hùng Vương, Thành phố Hồ Chí Minh (Quyết định của Hội đồng Y đức Bệnh viện Hùng Vương số 2395/GCN-BVHV). Dây rốn được thu nhận từ trẻ sinh đủ tháng tuổi bằng phương pháp sinh thường. Mẫu dây rốn sau khi được thu nhận sẽ được bảo quản trong PBS (Phosphate

Buffered Saline - Gibco) có bổ sung kháng sinh 1X và được vận chuyển về phòng thí nghiệm ở điều kiện 4°C trong khoảng thời gian 1 - 2 giờ sau khi sinh.

Thu nhận tế bào gốc trung mô từ dây rốn (UC-MSCs)

Các dây rốn được rửa với PBS kháng sinh 1X cho đến khi sạch máu, được để ráo và cắt thành các đoạn dài 5 cm. Mạch máu được loại bỏ khỏi dây rốn (Hình 1). Các mảnh mô kích thước 2 x 2 x 1 mm được chuẩn bị và đặt lên bề mặt đĩa nuôi Ø35 (Nunc) và được ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong môi trường nuôi cấy tế bào DMEM-F12, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Sigma). Đĩa đặt mảnh mô được nuôi ổn định trong 7 ngày, sau đó môi trường nuôi cấy được thay mỗi 3 ngày. Sau 14 ngày nuôi cấy, mảnh mô được thu nhận để tiến hành khử tế bào trong nghiên cứu chế tạo khung ngoại bào, các tế bào bám được tiếp tục nuôi cấy đến khi độ bao phủ của tế bào đạt ≥ 80% diện tích đĩa nuôi. Hình thái tế bào được ghi nhận bằng kính hiển vi đảo ngược Olympus đi kèm hệ thống chụp ảnh với phần mềm Cellsens Entry trong suốt quá trình nuôi cấy.



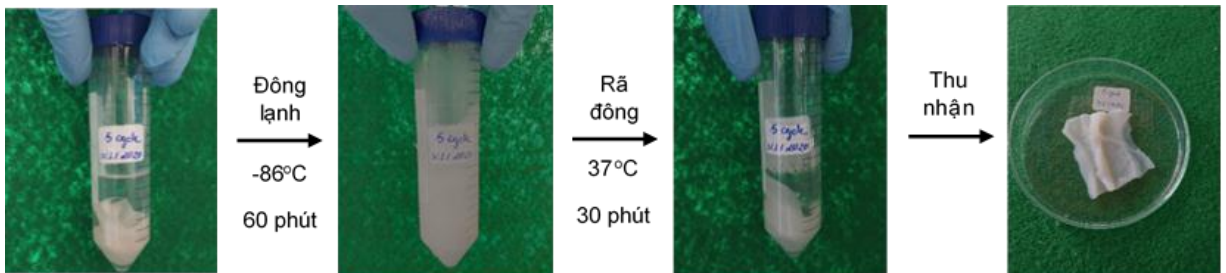
Hình 1. Dây rốn được loại bỏ mạch máu
A. Thao tác loại bỏ mạch máu từ dây rốn; B. Mẫu dây rốn đã loại bỏ mạch máu

Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào sau thu nhận

Các tế bào sau khi được cấy chuyển đến lần thứ 3 sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng biệt hóa. Các tế bào được cấy vào đĩa 4 giếng với mật độ 0,5.10⁴ tế bào/giếng trong môi trường DMEM-F12, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. Sau khi độ bao phủ của tế bào đạt ≥ 80%, môi trường biệt hóa xương (DMEM-F12, 10% FBS, 100 nM Dexamethaxone, 50 µg/mL Ascorbic acid, 10 mM β-glycerolphosphate, 0,05 µM Vitamine D3 (Sigma)) được bổ sung vào đĩa nuôi và thay môi trường mỗi 2 ngày. Sau 21 ngày nuôi cấy trong môi trường biệt hóa, tế bào được cố định với 95% Methanol trong 10 phút. Để đánh giá khả năng biệt hóa xương, sự tích tụ canci được xác định thông qua phương pháp nhuộm Alizarin Red 2% (pH 4,1-4,3) trong 5 phút. Hình ảnh tế bào được ghi nhận dưới kính hiển vi đảo ngược Olympus.

Thu nhận khung ngoại bào từ dây rốn (UC-ECM)

Các mẫu mô được thu nhận trực tiếp ngay sau khi loại bỏ mạch máu từ dây rốn theo quy trình đã được trình bày ở nội dung Thu nhận tế bào gốc trung mô từ dây rốn và mẫu mô đã nuôi cấy để thu nhận tế bào. Chu kỳ đông lạnh-rã đông được thực hiện nhằm phá vỡ cấu trúc tế bào. Các nghiệm thức bao gồm 1, 3, 5, 7, 10 chu kỳ đông lạnh-rã đông tương ứng các nghiệm thức 1C-UCECM, 3C-UCECM, 5C-UCECM, 7C-UCECM, 10C-UCECM và mẫu mô dây rốn không đông lạnh sau khi được loại bỏ mạch máu được sử dụng như nghiệm thức đối chứng (ĐC). Thí nghiệm được tiến hành theo quy trình sau: mẫu mô dây rốn được cho vào ống chứa 50 mL, tiếp tục bổ sung PBS 1X vào ống chứa dây rốn với tỉ lệ thể tích tương ứng (v:v) 1:3. Tiến hành đông lạnh – rã đông theo chu kỳ tương ứng với các nghiệm thức sau cho thời gian đông lạnh – rã đông mỗi chu kỳ là 60 phút (-86°C) : 30 phút (37°C) (Hình 2).



Hình 2. Tiến trình một chu kỳ đông lạnh - rã đông đặc trưng (hình ảnh minh họa của mẫu 5 chu kỳ)

Định lượng ADN

Mẫu dây rốn sau khi được khử tế bào theo các nghiệm thức trên sẽ được đông khô và nghiền nhỏ để thực hiện định lượng ADN. ADN trong các mẫu được tách chiết bằng các sử dụng PureLink™ Genomic ADN Mini Kit (Thermo) theo quy trình được hướng dẫn bởi nhà sản xuất. Hàm lượng ADN được xác định thông qua máy Nano drop (Thermo).

Kiểm định thống kê

Tất cả số liệu được trình bày ở dạng trung bình và độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Kiểm định thống kê được thực hiện nhằm xác định sự khác biệt giữa các nhóm nghiệm thức ở mức ý nghĩa 0,05 và phân tích ANOVA, One sample T-test đã được sử dụng.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Nuôi cấy mảnh mô dây rốn để thu nhận tế bào

Các tế bào bắt đầu có hiện tượng di cư từ mảnh mô ra bề mặt đĩa nuôi vào ngày 7 của quá trình nuôi cấy và hiện tượng này rõ ràng hơn vào ngày 14. Các tế bào tiếp tục tăng sinh và có độ bao phủ đạt $92,83\% \pm 0,03$ bề mặt đĩa nuôi vào ngày 21 so với $15,23\% \pm 0,03$ vào ngày 14. Kết quả tiến độ bám dính, tăng sinh tế bào có nhiều điểm tương đồng với nghiên cứu của Han YF và cộng sự (Han *et al.*, 2013). Các tế bào bám dính sau di cư từ mảnh mô dây rốn có hình thái giống nguyên bào sợi, hình thái điển hình của tế bào gốc trung mô. Hơn nữa, các tế bào duy trì hình thái của chúng sau 3 lần cấy chuyển (Hình 3).



Hình 3. Kết quả tế bào bám dính và tăng sinh sau nuôi cấy mảnh mô

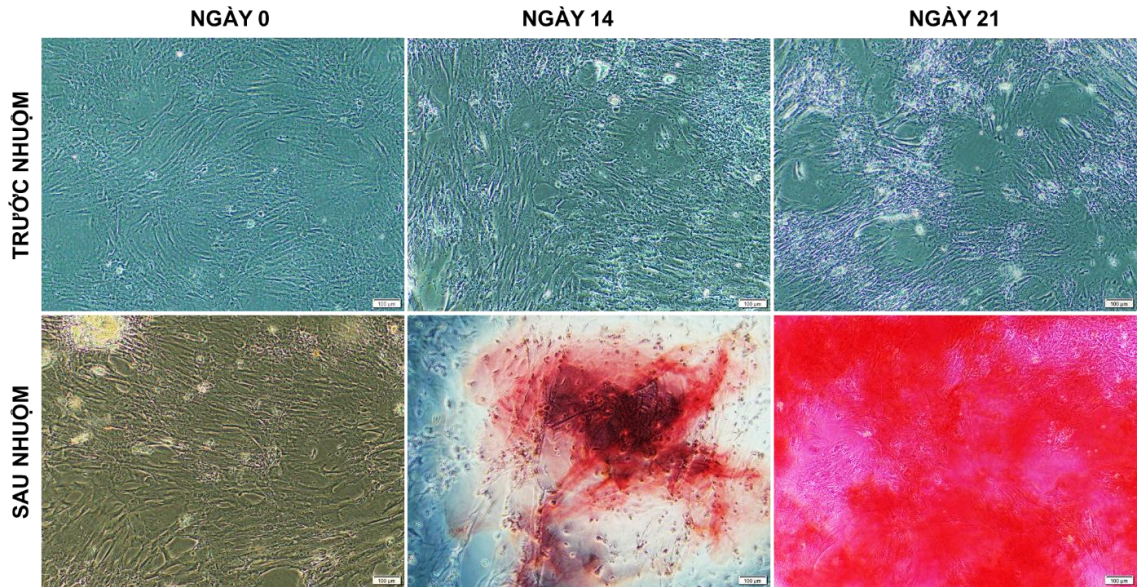
A. Thời điểm sau 14 ngày nuôi cấy (đã loại mảnh mô), B. Thời điểm sau 21 ngày nuôi cấy, C. Thời điểm sau cấy chuyển lần thứ 3

Một vài nghiên cứu khác cũng đã thu nhận tế bào gốc từ dây rốn với phương pháp tương tự (nuôi cấy mảnh mô) hay sử dụng phương pháp khác như enzyme, kết quả các tế bào sau thu nhận đều có hình thái giống nguyên bào sợi như trong mô tả ở trên (Han *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2017). Với phương pháp thu nhận tế bào bằng nuôi cấy mảnh mô, tương tự như phương pháp được mô tả, các nhóm tác giả khác đã chứng minh được tính gốc của các tế bào được thu nhận thông qua sự biểu hiện các marker đặc trưng của dòng tế bào trung mô (Han *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2017). Trong những năm gần đây, các nhóm nghiên cứu cũng đã tập trung vào việc tối ưu hóa quy trình phân lập và tạo dòng các tế bào gốc trung mô từ dây rốn định hướng ứng dụng trong lâm sàng chẳng hạn như trong điều trị thoái hóa khớp gối, tỵ kỉ, hen suyễn, bỏng, vô sinh tự miễn, hay những ứng dụng trong kỹ nghệ mô (Nasadyuk, 2016).

Khả năng biệt hóa tạo xương của tế bào được thu nhận từ mô dây rốn

Các tế bào từ dây rốn sau khi nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hóa tạo xương bắt đầu có sự khác biệt về hình thái. Tại thời điểm ngày 14, sự lắng đọng canxi được ghi nhận khi đĩa nuôi tế bào bắt màu đỏ khi được nhuộm Alizarin Red, sự bắt màu càng rõ rệt và dày đặc hơn vào thời điểm ngày 21 của quá trình nuôi cấy biệt hóa (Hình 4).

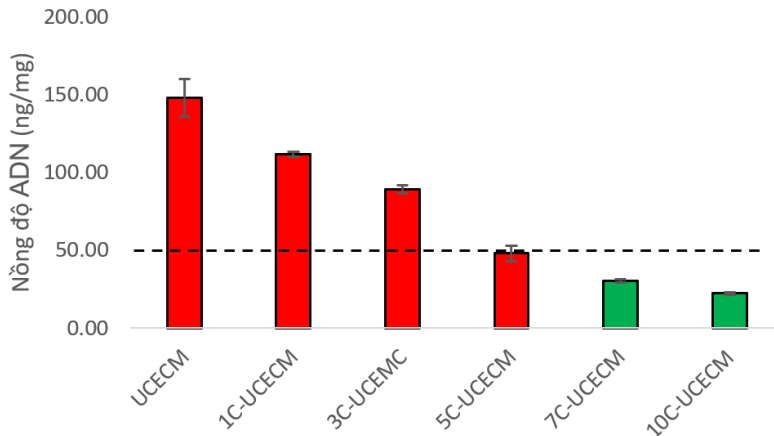
Khả năng biệt hóa tạo xương của tế bào gốc từ dây rốn cũng đã từng được chứng minh trong nghiên cứu của Hassan G và đồng tác giả (2017). Bên cạnh đó, nhóm tác giả này cũng đã chứng minh tiềm năng biệt hóa mỡ của chính dòng tế bào này (Hassan *et al.*, 2017). Với đặc tính của tế bào gốc trung mô, các tế bào gốc được thu nhận từ dây rốn có khả năng biệt hóa thành các tế bào thuộc nhiều mô và cơ quan khác nhau của cơ thể. Do đó, chúng có tiềm năng cao trong định hướng ứng dụng y học tái tạo như điều trị những rối loạn, chấn thương trong cấu trúc mô xương, sụn. Bên cạnh đó, các tế bào gốc trung mô cường rốn cũng được chứng minh là có khả năng di chuyển đến các khớp bị tổn thương và tăng cường tái tạo chúng (Nasadyuk, 2016). Từ đó có thể thấy, tế bào gốc trung mô từ dây rốn là đối tượng nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực y sinh học nói chung, y học tái tạo nói riêng.



Hình 4. Kết quả khả năng biệt hóa tạo xương của tế bào dây rốn

Thu nhận ECM dây rốn

Kết quả xác định hàm lượng ADN cho thấy, tất cả các mẫu bao gồm mẫu dây rốn chưa xử lý khử tế bào (UCECM) và các mẫu xử lý khử tế bào bằng đông lạnh - rã đông như 1C-UCECM, 3C-UCECM, 5C-UCECM, 7C-UCECM và 10C-UCECM tương ứng lần lượt với các quy trình 1, 3, 5, 7, 10 chu kỳ đông lạnh - rã đông đều được ghi nhận có sự tồn đọng ADN. Nồng độ ADN các mẫu thuộc các quy trình xử lý tế bào khác nhau giảm dần khi số lượng chu kỳ đông lạnh - rã đông tăng (P -value < 0,05) nhưng mẫu mô dây rốn được xử lý qua 1, 3, 5 chu kỳ đông lạnh - rã đông tương ứng với các nghiệm thức 1C-UCECM, 3C-UCECM và 5C-UCECM không đạt điều kiện mô vô bào (nồng độ ADN tồn đọng ≥ 50 ng/mg) (Crapo *et al.*, 2011). Tuy nhiên, mẫu dây rốn 7C-ECM và 10C-ECM có nồng độ ADN tồn đọng trên tổng khối lượng mẫu khô tương ứng là $30,45 \pm 1,10$ ng/mg và $22,35 \pm 0,90$ ng/mg đạt tiêu chuẩn mẫu ECM vô bào (< 50 ng/mg) (P -value < 0,05) trong khi nồng độ ADN mẫu chưa qua xử lý khử tế bào là $148,23 \pm 12,15$ ng/mg (Hình 5).



Hình 5. Kết quả định lượng ADN mẫu thí nghiệm

Từng được chứng minh trong nghiên cứu của Janina Burk và đồng tác giả (2013), việc thực hiện chu kỳ đông lạnh - rã đông có ý nghĩa quan trọng trong quá trình khử tế bào mô gân. Các mô được sử dụng chu kỳ đông lạnh - rã đông kết hợp hóa chất cho hiệu quả khử tế bào cao hơn hẳn mẫu mô chỉ được thực hiện khử tế bào bằng hóa chất (Burk *et al.*, 2014). Tuy vậy, thử nghiệm lặp lại chu kỳ đông lạnh - rã đông chưa được nghiên cứu ở mô dây rốn. Hơn nữa, đặc tính ECM dây rốn với các tiềm năng ứng dụng cao như làm vật liệu ghép, cung cấp collagen, GAG hay các yếu tố tăng trưởng cho liệu pháp y học tái tạo cần được nghiên cứu rõ (Gui *et al.*, 2009; Jadalannagari *et al.*, 2017; Kočí *et al.*, 2017). Cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn để làm rõ khả năng bảo tồn đặc tính ECM dây rốn sau khi khử tế bào bằng chu kỳ đông lạnh - rã đông.

KẾT LUẬN

Các tế bào được thu nhận từ quá trình nuôi cấy mảnh mô dây rốn có hình thái giống nguyên bào sợi và hình thái vẫn được duy trì sau 3 lần cấy chuyền. Các tế bào này có khả năng biệt hóa tạo xương khi được nuôi trong môi trường biệt hóa 14 ngày, sự biệt hóa được thể hiện rõ hơn vào ngày 21. Để hoàn thiện nghiên cứu, cần tiếp tục đánh giá các chỉ tiêu để khẳng định tế bào gốc trung mô như sự biểu hiện các dấu ấn bề mặt cũng như khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ và tế bào sụn.

ECM được xử lý khử tế bào bằng 7 và 10 chu kỳ đông lạnh - rã đông cho nồng độ ADN tồn đọng tương ứng là $30,45 \pm 1,10$ ng/mg và $22,35 \pm 0,90$ ng/mg đạt tiêu chuẩn mẫu ECM vô bào (< 50 ng/mg). Các quy trình khử tế bào với 1, 3, 5 chu kỳ đều làm giảm ADN so với mẫu không qua xử lý, tuy nhiên nồng độ ADN tồn đọng trong các mẫu này vượt quá nồng độ cho phép.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Công ty cổ phần Đầu tư New Era Stem Cell - International.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Kočí Z, Výborný K, Dubišová J, Vacková I, Jäger A, Lunov O, Jiráková K, Kubinová Š (2017). Extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord as a scaffold for neural tissue repair and its comparison with extracellular matrix from porcine tissues. *Tiss Engin Part C: Methods* 23(6): 333-345.

Secunda R, Vennila R, Mohanashankar A, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R (2015). Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnol* 67(5): 793-807.

Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, & Niklason LE (2009). Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tiss Engin Part A* 15(9): 2665-2676.

Kimura Y, Hirata K, Mukaiya M, Mizuguchi T, Nobuoka T, Furuhashi T, Katsuramaki T (2005). Biliary injury after laparoscopic cholecystectomy: end-to-end anastomosis covered with umbilical vein. *J Hepato Bili Panc Surg* 12(3): 269-271.

Watanabe M, Yamazaki K, Tsuchiya M, Otsuka Y, Tamura A, Shimokawa K, Kaneko H, Teramoto T (2007). Use of an opened umbilical vein patch for the reconstruction of the injured biliary tract. *J Hepato Bili Panc Sur* 14(3): 270-275.

Jadalannagari S, Converse G, McFall C, Buse E, Filla M, Villar MT, Artigues A, Mellot AJ, Wang J, Detamore MS (2017). Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLoS One* 12(2).

Couto PS, Shatirishvili G, Bersenev A, Verter F (2019). First decade of clinical trials and published studies with mesenchymal stromal cells from umbilical cord tissue. *Regenerat Med* 14(4): 309-319.

Xiao B, Rao F, Guo ZY, Sun X, Wang YG, Liu SY, Wang AY, Guo QY, Meng HY, Zhao Q (2016). Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Neu Regenerat Res* 11(7): 1172.

Han YF, Tao R, Sun TJ, Chai JK, Xu G, Liu J (2013). Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnol* 65(5): 819-827.

Hassan G, Kasem I, Soukkaieh C, Aljamali M (2017). A simple method to isolate and expand human umbilical cord derived mesenchymal stem cells: using explant method and umbilical cord blood serum. *Int J stem Cell* 10(2): 184.

Nasadyuk C (2016). Umbilical cord stem cells: biological characteristics, approaches to banking and clinical application. *Клітинна та органна трансплантологія* 49(2): 230-235.

Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SFJB (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes 32(12): 3233-3243.

Burk J, Erbe I, Berner D, Kacza J, Kasper C, Pfeiffer B, Winter K, Brehm W (2014). Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons. *Tiss Engin Part C: Method* 20(4): 276-284.

ISOLATION OF UMBILICAL CORD-DERIVED CELLS AND EXTRACELLULAR MATRIX TOWARDS THE REGENERATIVE MEDICINE APPLICATIONS

Tuyet Thi Vi Le^{1,2*}, My Thi Ngoc Nguyen^{1,2}, Tuyet Thi Diem Hoang³, Truong Xuan Do⁴, Ha Le Bao Tran^{1,2}

¹ University of Science, Ho Chi Minh City

² Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³ Hung Vuong Hospital, Ho Chi Minh City

⁴ Xuan Truong Paradise Plastic Aesthetic, Ho Chi Minh City

SUMMARY

The umbilical cord contains mesenchymal stem cells (UC-MSCs), which can differentiate into different cells, and growth factors and cytokines-rich extracellular matrix (UC-ECM). These components play an important role in regenerative medicine and tissue engineering. This study was conducted to simultaneously collect UC-MSC and UC-ECM of the same umbilical cord. The operations of umbilical cord tissue culture and decellularization by freezing-thawing cycles (1, 3, 5, 7, 10 cycles) were performed to collect UC-MSCs and UC-ECM, respectively. Cell characteristics were observed by microscopy during culture time. The osteogenic differentiation potency was determined with Alizarin Red staining for 21 days. ADN quantification of the umbilical cord was conducted to confirm the effectiveness of decellularized methods. The results showed that collected cells by tissue culture method were able to migrate, attach and proliferate on the surface of the culture plate from day 7 of the culture time and these characteristics became more apparent on day 14 and day 21. The UC-MSCs stained with Alizarin Red dye on day 14 and day 21 of the induction differentiation time. For UC-ECM, the concentration of residual ADN was different among the treatment groups. The concentrations of residual ADN in the treated samples were lower than the untreated samples. The residual ADN concentrations of decellularized samples of 7 and 10 freezing-thawing cycles were suitable for the acellular tissue standard (< 50 ng/mg, P-value < 0.05). The study was successful in confirming the efficiency of UC-MSCs isolation by tissue culture and UC-ECM collection by freezing-thawing methods with appropriate numbers of repetition cycles (7, 10 cycles). The results of this study are prerequisites for research of individual or combinative products in regenerative medicine and tissue engineering.

Keywords: Cell isolation, Decellularization, Differentiation, Extracellular matrix, Freeze-thaw cycle, Umbilical cord.

* Author for correspondence: Tel: +84-936738303; Email: lvtuyet@hcmus.edu.vn