

# ẢNH HƯỞNG CỦA LOẠI TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ LẦN CẤY CHUYỂN ĐẾN HÀM LƯỢNG PROTEIN EXOSOME ĐƯỢC TIẾT RA

Thân Thị Trang Uyên<sup>1,2\*</sup>, Hoàng Hương Diễm<sup>1#</sup>, Nguyễn Thị Tuyết Anh<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Miễn dịch Vinmec-VinUni, Hà Nội, Việt Nam

#Tác giả có đóng góp như nhau trong nghiên cứu.

## TÓM TẮT

Thế tiết ngoại bào exosome, đặc biệt là exosome từ tế bào gốc trung mô, đang nổi lên như là một đối tượng tiềm năng cho ứng dụng chẩn đoán và trị liệu. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu ứng dụng này đang gặp phải rào cản là dòng tế bào ổn định tiết exosome, quy mô sản xuất và mức độ ổn định của các thành phần sinh học trong exosome. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm tìm mối liên hệ của loại tế bào gốc trung mô sơ cấp và số lần cấy chuyển (passage – P) lên hàm lượng protein exosome được tế bào tiết ra trong quá trình nuôi tế bào 2D. Kết quả cho thấy rằng, tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy có hình dạng thuôn dài và giống nguyên bào sợi và exosome thu được có hình thái giống cái bát (cup-shaped). Không có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome từ các mẫu exosome được tiết ra từ hai loại tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ và từ các P khác nhau (P5, P6 và P7) của dòng tế bào gốc trung mô dây rốn. Kết quả từ phép phân tích tương quan cho thấy các P khác nhau (P5, P6 và P7) của tế bào gốc trung mô dây rốn không làm ảnh hưởng đến hàm lượng protein exosome được tiết ra ( $r^2 = 0,015$ ). Đồng thời, hai loại tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ nuôi cấy sơ cấp cũng không liên quan đến hàm lượng protein exosome tiết ra ( $r^2 = 0,019$ ). Các dữ liệu từ nghiên cứu này cho thấy rằng trong điều kiện nuôi cấy 2D bình thường, hàm lượng protein exosome tiết ra không bị tác động bởi tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô dây rốn và mô mỡ và tế bào ở các giai đoạn cấy chuyển cao.

*Từ khóa:* Protein tổng số, tế bào gốc trung mô, thế tiết exosome.

## MỞ ĐẦU

Thế tiết ngoại bào (extracellular vesicles/EV) là các túi nhỏ có lớp màng lipid kép giống như màng tế bào và được tiết ra từ nhiều loại tế bào khác nhau (Hoang *et al.*, 2020). Chúng được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy tế bào và nhiều loại dịch cơ thể như huyết tương, nước tiểu, nước bọt, dịch ối và sữa mẹ (Lasser *et al.*, 2011). Thế tiết hay EV được phân làm 3 loại: thể tế bào chết theo chương trình - apoptotic body (1 - 5  $\mu$ m), vi thể/vi bóng bào - microvesicle (100 - 1000 nm) và thể exosome (50 - 200 nm) (Than *et al.*, 2017). Trước đây, thế tiết ngoại bào được coi là rác thải từ tế bào; tuy nhiên, các nghiên cứu đã chứng minh rằng thế tiết có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý học của cơ thể do chúng có thể tác động đến chính nhóm tế bào tiết ra chúng (autocrine) hoặc tác động đến các tế bào khác ở môi trường xung quanh (paracrine).

Tế bào gốc trung mô hiện đang là loại tế bào gốc được sử dụng rộng rãi nhất trong thử nghiệm lâm sàng nhằm mục đích điều trị nhiều bệnh lý khác nhau. Tuy nhiên, ngày càng nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu quả trị liệu của tế bào gốc trung mô chủ yếu thông qua các chất tiết hơn là cơ chế biệt hoá trực tiếp của chúng (Lai *et al.*, 2010; Phinney & Prockop, 2007; Turturici *et al.*, 2014). Các nghiên cứu gần đây cho thấy chức năng sinh học và khả năng ứng dụng cao của các thế tiết ngoại bào được tiết ra từ tế bào gốc trung mô là do thành phần chất mang chứa bên trong nó. Đặc biệt trong quá trình liền vết thương, EV có khả năng thúc đẩy khả năng di chuyển và tăng sinh tế bào, thúc đẩy tế bào tăng sản xuất collagen và sự hình thành các mạch máu mới, tái biểu mô hóa và giảm độ rộng sẹo (Than *et al.*, 2017). Đối với thoái hoá sụn khớp, EV có vai trò giảm viêm, điều hoà miễn dịch môi trường sụn khớp, giảm đau và tái tạo cấu trúc nền (extracellular matrix) (Nguyen *et al.*, 2021). Các loại thế tiết ngoại bào khác nhau hoặc cùng loại thế tiết nhưng được tạo ra từ các điều kiện nuôi cấy khác nhau (có hay không có các chất kích thích) sẽ mang các hoạt chất khác nhau. Do vậy, khả năng tác động của EV và các hoạt chất trong từng loại EV tới các quá trình sinh học tế bào là khác nhau và cần được đánh giá để lựa chọn loại thế tiết ngoại bào phù hợp.

Y văn hiện nay đã cung cấp cơ sở khoa học cho hướng sử dụng thế tiết từ tế bào gốc trung mô như một loại thuốc mới trong các liệu pháp y học tương lai. Tuy nhiên, rào cản của việc phát triển và sử dụng thế tiết ngoại bào đó là nguồn tế bào ổn định tiết thế tiết, quy trình và điều kiện nuôi cấy tế bào để tiết thế tiết có thành phần ổn định và mức độ đáp ứng quy mô đủ để có thể sản xuất thế tiết phục vụ nhu cầu điều trị. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm tra mức độ tương quan giữa các lần cấy chuyển tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp và loại tế bào gốc trung mô từ dây rốn và mô mỡ đến số lượng thế tiết được tiết ra thông qua hàm lượng protein tổng số của exosome.

## NGUYÊN VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên vật liệu

Tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ được đã được thu thập và lưu trữ tại Ngân hàng mô Vinmec.

### Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tế bào được rã đông trong bể ổn nhiệt 37°C và chuyển sang ống ly tâm chứa sẵn 5 mL môi trường nuôi cấy. Dung dịch tế bào được ly tâm với lực 400 x g trong vòng 4 phút ở 20°C để làm lắng tế bào. Cặn tế bào được hoà tan trong 3 mL môi trường nuôi cấy StemMACS™ MSC Expansion Media Kit (Miltenyi Biotec, Đức). Tế bào được nhuộm và đếm bằng cách lấy 10 µL dịch huyền phù tế bào trộn đều với 10 µL Trypan Blue (Gibco, Mỹ), sau đó nhỏ 10 µL dịch tế bào vào buồng đếm Neubauer cải tiến (InCyto, Hàn Quốc) và đếm tế bào bằng máy hemocytometer. Chai nuôi cấy tế bào sẽ được xử lý bề mặt bằng cơ chất CTS™ CELLstart™ (Gibco, Mỹ) đã pha loãng với PBS (Invitrogen, Mỹ) theo tỷ lệ 1:300 trong 1 giờ ở 37°C trước khi cấy tế bào. Tế bào được cấy vào chai nuôi cấy với mật độ 5000 tế bào/cm<sup>2</sup> và nuôi trong môi trường nuôi cấy StemMACS™ MSC Expansion Media Kit (Miltenyi Biotec, Đức) trong điều kiện 37°C và 5% CO<sub>2</sub>.

Khi tế bào đạt mật độ 90% bề mặt chai nuôi cấy, dịch nuôi tế bào được hút bỏ và tế bào được rửa bằng dung dịch PBS (Invitrogen, Mỹ). Sau khi loại bỏ dịch rửa PBS, bổ sung 2 mL dung dịch Enzyme CTS™ TrypLE™ (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) vào chai nuôi cấy T75 và ủ trong tủ nuôi cấy ở 37°C trong 3 phút. Tiếp theo, tế bào được hỗ trợ tách rời khỏi bề mặt chai bằng cách vỗ nhẹ cạnh bên của chai nuôi cấy, và enzyme sẽ được trung hoà bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy với thể tích bằng với thể tích enzyme đã sử dụng trước đó. Tế bào sẽ được thu lại bằng ly tâm với lực 400 x g trong vòng 4 phút ở 20°C, sau đó được đánh tan trong môi trường nuôi cấy và chuyển vào chai nuôi tế bào.

### Phương pháp ly tâm thu thể tiết exosome

Môi trường điều hoà nuôi cấy tế bào đầu tiên được ly tâm ở 300 x g trong 5 phút để loại bỏ các mảnh vỡ tế bào. Sau đó môi trường tiếp tục được ly tâm ở lực 2.000 x g trong 30 phút và 15.000 x g trong 30 phút để loại bỏ các quần thể thể tiết kích thước lớn. Tiếp theo, môi trường điều hoà tiếp tục được ly tâm ở 100.000 x g trong 90 phút để phân lập thể tiết exosome (Crescitelli *et al.*, 2013). Cuối cùng, exosome sẽ được hoà tan lại trong PBS (Invitrogen, Mỹ) để rửa và thu lại bằng thực hiện ly tâm ở 100.000 x g trong 90 phút. Cặn exosome thu được sẽ được đánh tan trong PBS (Invitrogen, Mỹ) để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### Phương pháp xác định đặc điểm hình thái của thể tiết ngoại bào bằng kính hiển vi điện tử truyền qua

Nhằm phân tích đặc điểm hình thái của thể tiết, phương pháp nhuộm âm tính và soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Mẫu exosome được rã đông và cố định với 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Mỹ) với tỷ lệ về thể tích 1 EV : 1 paraformaldehyde. Tiếp đó, nhỏ 5 µL dung dịch chứa thể tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn đã cố định lên một màng Formvar-carbon coated grids (Ted Pella Inc., Mỹ) và để lắng 20 phút ở nhiệt độ thường. Nhuộm exosome với uranyl-oxalate trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và soi thể tiết exosome dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (JEOL 1100 TEM) tại Phòng Siêu cấu trúc - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

### Phương pháp đo protein tổng số bằng BCA

Mẫu thể tiết exosome bảo quản ở nhiệt độ -80°C được rã đông đến nhiệt độ phòng và đo hàm lượng protein tổng số sử dụng bộ kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Chất chuẩn và hoá chất được chuẩn bị theo hướng dẫn đi kèm của bộ kit. Mẫu exosome cần đo (đã rã đông) và chất chuẩn (ở các dải nồng độ khác nhau) được hút và nhỏ vào từng giếng của đĩa đã thiết kế (25 µL/giếng). Tiếp theo, bổ sung vào mỗi giếng 200 µL dung dịch Working Reagent và lắc đều trong vòng 30 giây. Đĩa thí nghiệm được đậy nắp và ủ ở 37°C trong vòng 30 phút. Sau khi kết thúc ủ, đĩa thí nghiệm sẽ được để ở nhiệt độ phòng (khoảng 10 phút) và đo độ hấp thụ tại bước sóng 562 nm bằng máy đo quang phổ Glomax (Promega, Mỹ). Giá trị hấp thụ đo được và nồng độ chất chuẩn sẽ được sử dụng để dựng được đường chuẩn (có dạng  $y = ax + b$ ) thể hiện mối tương quan giữa nồng độ chất chuẩn và độ hấp thụ, từ đó tính ra nồng độ protein tương ứng.

### So sánh tương quan và thống kê

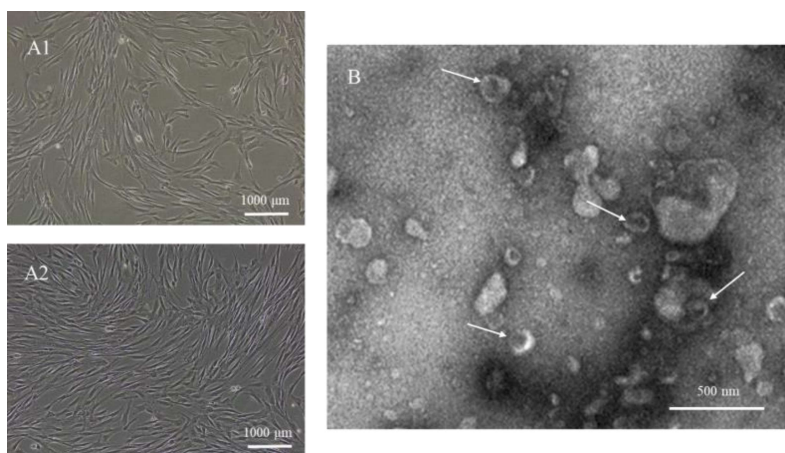
Phần mềm Excel được sử dụng để phân tích dữ liệu và trình bày biểu đồ. Biểu đồ phân tán (scatterplot) để biểu diễn sự phân tán của mẫu và phân tích hiệp phương sai và hệ số tương quan để đánh giá mối tương quan của lần cấy chuyển với hàm lượng protein thu được. Dữ liệu trung bình được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nuôi cấy tế bào gốc trung mô và phân lập exosome

Trong quá trình nuôi cấy, cả tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ sơ cấp đều có biểu hiện kiểu hình thuôn dài và giống nguyên bào sợi (Hình 1 A1-A2). Đây là kiểu hình điển hình của tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy.

Đồng thời, khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), exosome thu được có kiểu hình giống cái bát (cup-shaped) và kích thước trong khoảng từ 50 nm đến 200 nm (Hình 1B). Đây cũng là hình thái điển hình của exosome được nhuộm âm tính và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả này tương đồng với các kết quả của chúng tôi trước đây cũng như các kết quả công bố quốc tế của các nhóm nghiên cứu khác (Hoang *et al.*, 2020). Khi quan sát hình ảnh dưới kính hiển vi TEM, chúng tôi nhận thấy bên cạnh những hạt có đặc điểm hình thái và kích thước của exosome, có những hạt có kích thước lớn (khoảng 500 nm) và hạt tròn không có hình cái bát. Những hạt kích thước lớn hoặc nhỏ, bề mặt hạt không trơn nhẵn có thể là các vi thể (microvesicle) lẫn vào quần thể exosome trong quá trình phân lập do hai quần thể thể tiết này có sự giao thoa về mặt kích thước, và vì phương pháp siêu ly tâm không có khả năng tinh sạch các quần thể thể tiết có sự giao thoa về kích thước (Patel *et al.*, 2019; Vlassov *et al.*, 2012). Để phân tách được exosome và vi thể, cần thiết phải sử dụng phương pháp ly tâm dựa vào tỷ trọng (gradient centrifugation) để tách các hạt quần thể có trọng lượng khác nhau (Patel *et al.*, 2019).



**Hình 1. Đặc điểm hình thái của tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy và exosome**

A1) Hình thái của tế bào gốc trung mô dây rốn; A2) Hình thái tế bào gốc trung mô mô mỡ;  
B) Hình thái đại diện của exosome phân lập từ tế bào gốc trung mô dây rốn (mũi tên màu trắng).

### Biểu hiện của protein exosome tiết ra trong quá trình nuôi cấy

Sau khi exosome thu được từ phương pháp ly tâm, cặn exosome được đo hàm lượng protein tổng số và tính tương ứng với hàm lượng protein exosome được tiết ra từ 1 triệu tế bào. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy, cứ 1 triệu tế bào gốc trung mô dây rốn trong nuôi cấy từ P5 đến P7 có thể tiết ra từ 18,040 μg đến 20,928 μg protein. Mặc dù có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome được tiết ra giữa các tế bào gốc trung mô dây rốn ở P5, P6 và P7, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, cứ 1 triệu tế bào gốc trung mô mỡ (P3) có thể tiết ra 25,254 μg protein exosome. Khi so sánh với hàm lượng protein exosome do tế bào gốc trung mô mô mỡ (P3) và dây rốn (ở P5, P6 và P7) tiết ra, chúng tôi cũng nhận thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Trong nghiên cứu này, tế bào gốc trung mô mô mỡ phát triển chậm hơn ở các giai đoạn cấy chuyển cao từ P5 trở đi; do vậy, chúng tôi không thu được đủ exosome ở các P5, P6 và P7 để so sánh với exosome từ tế bào gốc trung mô dây rốn ở P tương ứng. Vấn đề này sẽ cần phải khắc phục và giải quyết ở các nghiên cứu tiếp theo.

Hàm lượng exosome thu được phản ánh hiệu suất thu hồi exosome, tỷ lệ exosome với protein và mức độ tinh sạch của exosome (Patel *et al.*, 2019). Hàm lượng protein exosome khó có thể so sánh trực tiếp giữa các nghiên cứu, tuy nhiên trong báo cáo của Webber & Clayton cho biết, cứ khoảng  $10^9 - 10^{10}$  hạt exosome có thể thu được 1 μg protein tổng số (Webber & Clayton, 2013). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tính hàm lượng protein tổng số của exosome nhằm mục đích đánh giá khả năng tiết của tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, chúng tôi không đếm được hạt exosome để tính được tỷ lệ exosome và protein trong mẫu nghiên cứu thu được. Bên cạnh đó, do số lượng mẫu thu được trong giai đoạn nghiên cứu là khác nhau, nên cỡ mẫu của tế bào gốc trung mô mô mỡ thu được ít hơn so với dây rốn. Do vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, nhóm nghiên cứu cần phải tăng cỡ mẫu sinh học để đảm bảo mức độ đồng đều về cỡ mẫu cho các nhóm nhằm nâng cao giá trị kết quả đo được.

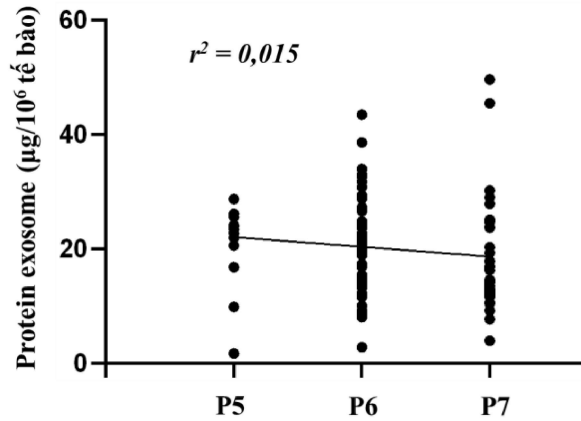
**Bảng 1. Biểu hiện protein exosome tổng số do tế bào gốc trung mô tiết ra.**

|            | Protein/1 triệu tế bào (μg) | SD     | n  |
|------------|-----------------------------|--------|----|
| TBGTMDR_P5 | 20,429                      | 7,660  | 12 |
| TBGTMDR_P6 | 20,928                      | 7,814  | 67 |
| TBGTMDR_P7 | 18,040                      | 9,909  | 33 |
| TBGTMMM_P3 | 25,254                      | 14,992 | 7  |

TBGTMDR: tế bào gốc trung mô dây rốn; TBGTMMM: Tế bào gốc trung mô mô mỡ; SD: Độ lệch chuẩn; n: Cỡ mẫu.

**Sự tương quan giữa lần cấy chuyển và hàm lượng protein exosome tổng số do tế bào gốc trung mô dây rốn tiết ra**

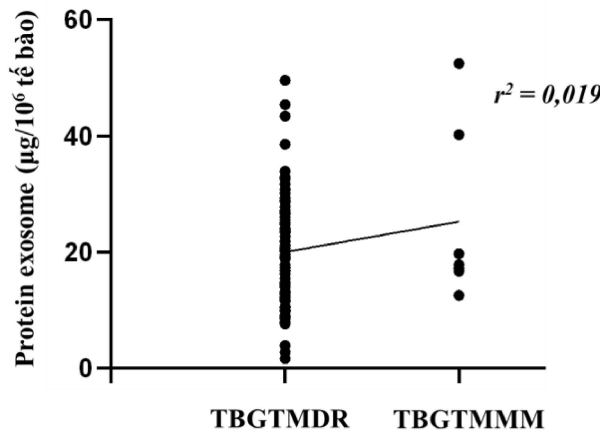
Để kiểm tra sự tương quan giữa các lần cấy chuyển với lượng exosome được tiết ra thông qua đo protein tổng số của exosome, chúng tôi tiến hành đo protein tổng số của exosome thu được từ tế bào gốc trung mô dây rốn ở P5, P6 và P7. Kết quả cho thấy, không có sự tương quan giữa các lần cấy chuyển P5, P6 và P7 của tế bào gốc trung mô dây rốn với lượng protein exosome được tiết ra (hệ số tương quan  $r^2 = 0,015$ ;  $p = 0,198$ ). Điều này cho thấy, có thể tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp ở các lần cấy chuyển lớn có thể đã ổn định hơn và có khả năng tiết exosome đều hơn. Thông thường, tế bào nuôi cấy sơ cấp sẽ không tiết exosome ổn định bằng các dòng tế bào do tế bào sơ cấp đang trong giai đoạn thích nghi với điều kiện tăng sinh bên ngoài cơ thể (Le Gall *et al.*, 2020). Tuy nhiên, dữ liệu của chúng tôi cho thấy rằng, tế bào gốc trung mô dây rốn ở giai đoạn từ P5 trở đi đã ổn định trong việc tiết protein exosome.



Hình 2. Biểu đồ phân tán biểu diễn mối tương quan giữa lần cấy chuyển tế bào gốc trung mô dây rốn (P5, P6 và P7) với hàm lượng protein exosome được tiết ra trong quá trình nuôi cấy

**Sự tương quan giữa loại tế bào và hàm lượng protein exosome tổng số do tế bào tiết ra**

Tương tự, chúng tôi kiểm tra liệu loại tế bào gốc trung mô sơ cấp dây rốn và tế bào gốc trung mô sơ cấp mô mỡ có ảnh hưởng đến hàm lượng protein exosome tiết ra hay không. Kết quả cho thấy, không có mối tương quan nào về hai loại tế bào này với hàm lượng protein exosome được tiết ra (hệ số tương quan  $r^2 = 0,019$ ,  $p = 0,135$ ). Hiện chưa thấy có báo cáo nào về khả năng tiết protein exosome của các dòng tế bào gốc trung mô, tuy nhiên đã có báo cáo về khả năng tiết protein exosome của các dòng tế bào ung thư tụy (DU145, LNCAP, PC3), ung thư bàng quang (HT1376) và ung thư vú (MCF7) (Webber & Clayton, 2013). Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng không chỉ ra hàm lượng protein tương ứng với số lượng tế bào tiết nên rất khó khăn cho việc so sánh giữa các nghiên cứu khác nhau.



Hình 3. Biểu đồ phân tán biểu diễn mối tương quan giữa loại tế bào với hàm lượng protein exosome được tiết ra trong quá trình nuôi cấy

TBGTMDR: Tế bào gốc trung mô dây rốn; TBGTMMM: Tế bào gốc trung mô mô mỡ.

## KẾT LUẬN

Tế bào gốc trung mô dây rốn tiết ra một lượng protein exosome ổn định ở P5, P6 và P7. Không có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome tiết ra từ tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ sơ cấp. Đồng thời, không có mối tương quan giữa các lần cấy chuyển (P5, P6 và P7) của tế bào gốc trung mô dây rốn và hai loại tế bào gốc trung mô (từ dây rốn và mô mỡ) với hàm lượng protein exosome tiết ra trong quá trình nuôi cấy thông thường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., . . . Lötval, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal Of Extracellular Vesicles*, 2, 1-10.
- Hoang, D. H., Nguyen, T. D., Nguyen, H. P., Nguyen, X. H., Do, P. T. X., Dang, V. D., . . . Than, U. T. T. (2020). Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum- and xeno-free condition. *Front Mol Biosci*, 7, 119. doi:10.3389/fmolb.2020.00119
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., . . . Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 4(3), 214-222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003
- Lässer, C., Valadi, H., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., . . . Lotvall, J. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal Of Translational Medicine*, 9(1), 9-9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Le Gall, L., Ouandaogo, Z. G., Anakor, E., Connolly, O., Butler Browne, G., Laine, J., . . . Duguez, S. (2020). Optimized method for extraction of exosomes from human primary muscle cells. *Skeletal Muscle*, 10(1), 20. doi:10.1186/s13395-020-00238-1
- Nguyen, T. H., Duong, C. M., XH, N., & UTT, T. (2021). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for osteoarthritis treatment: extracellular matrix protection, chondrocyte and osteocyte physiology, pain and inflammation management. *Cells*, 10(11). doi:10.3390/cells10112887
- Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M. d., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports*, 9(1), 5335. doi:10.1038/s41598-019-41800-2
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Leavesley, D., & Parker, T. (2017). Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *Int J Mol Sci*, 18(5). doi:10.3390/ijms18050956
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., & Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(7), C621-633. doi:10.1152/ajpcell.00228.2013
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1820(7), 940-948. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles*, 2. doi:10.3402/jev.v2i0.19861

## EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL TYPES AND PASSAGES ON THE EXOSOMAL PROTEIN AMOUNT SECRETED

Than Thi Trang Uyen<sup>1,2\*</sup>, Hoang Huong Diem<sup>1#</sup>, Nguyen Thi Tuyet Anh<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Vinmec Hi-Tech Center, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup> Vinmec-VinUni Institute of Immunology, Hanoi, Vietnam

# Authors contributed equally in this study.

### ABSTRACT

Exosomes are emerging as a potential candidate for diagnostic and therapeutic applications. Therefore, exosomes originating from mesenchymal stem cells have attracted interest from scientists who want to develop them into drugs for disease treatments, particularly in regenerative medicine. However, the limitations of this applied research direction are the consistent cell lines that secrete exosomes, the isolation and production scale, and the stability of components carried by exosomes. Our study aims to investigate the relationship between primary mesenchymal stem cell types, the passage and the exosomal protein quantity secreted by the cells during 2D cell culture. The results showed that mesenchymal stem cells expressed an elongated and fibroblast-like morphology, and exosomes expressed cup-shaped morphology. There was no difference in exosomal protein amounts from samples originating from two cell types of umbilical cord mesenchymal stem cells and adipose tissue and among different passages (P5, P6, and P7) of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Data from correlation analysis showed that umbilical cord-derived mesenchymal stem cells at P5, P6, and P7 did not affect the amount of exosomal protein secreted ( $r^2 = 0.015$ ). Additionally, primary umbilical cord- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells did not relate to the amount of exosomal protein secretion ( $r^2 = 0.019$ ). This study shows that under normal 2D culture conditions, the amount of exosomal proteins secreted is not affected by types of primary mesenchymal stem cells derived from the umbilical cord and adipose tissue and cells at the different passages.

*Keywords:* Exosomes, mesenchymal stem cells, total protein.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0865662355; Email: v.uyenttt@vinmec.com