

COMPLETING THE CHROMOSOME TESTING PROCESS FROM FETAL UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS

Nguyen Minh Duc¹, Nguyen Van Long², Pham Thi Thanh Binh², Nguyen Văn Hoàng²,
Doan Thi Kim Phuong¹, Hoang Thi Hoa², Vu Thi Ha^{1*}

¹Hanoi Medical University

²Buu Dien Hospital

Received 19 March 2025

Accepted 26 June 2025

Abstract: Stem cells from the fetal umbilical cord play a crucial role in treating various diseases, including cardiovascular diseases, neurological disorders, musculoskeletal conditions, and more. However, to ensure treatment effectiveness, stem cells must meet certain standards, including genetic material criteria. Currently, the most fundamental method for testing the integrity of stem cell genetic material at the cellular level is chromosome testing. This research was conducted to complete the chromosome testing process for mesenchymal stem cells from fetal umbilical cord tissue. This cross-sectional study involved 12 umbilical cord tissue samples at the Stem Cell and Genetics Center, Buu Dien Hospital, and Hanoi Medical University. The research results have finalized the procedure from the process of cell culture, harvesting, mitotic arrest, hypotonic shock to the steps of slide staining and chromosome evaluation. The cell division process at metaphase using Colcemid at a final concentration of 200 ng/ml with a 3-hour incubation time, hypotonic shock with a 0.4% KCl solution combined with distilled water and serum in a 4:3:1 ratio, cell fixation with Carnoy's solution, slide staining using the G-banding method, and karyotype analysis of all 12 samples showed normal results of $2n=46$ chromosomes. The research results are significant in contributing to the evaluation of stem cell quality for future disease treatments.

Keywords: mesenchymal stem cells, chromosome, chromosome testing.

* Corresponding author:

E-mail address: vuthiha@hmu.edu.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i5.216>

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RÓN THAI NHI

Nguyễn Minh Đức¹, Nguyễn Văn Long², Phạm Thị Thanh Bình¹, Nguyễn Văn Hoàng²,
Đoàn Thị Kim Phụng¹, Hoàng Thị Hòa², Vũ Thị Hà^{1*}

¹Trường Đại Học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bưu Điện

Nhận ngày 19 tháng 03 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 06 năm 2025

Tóm tắt: Tế bào gốc từ dây rốn thai nhi có tiềm năng lớn trong điều trị các bệnh lý tim mạch, thần kinh, xương khớp.... Tuy nhiên để đảm bảo hiệu quả, tế bào gốc cần đạt một số tiêu chuẩn nhất định trong đó có đánh giá về vật chất di truyền. Kỹ thuật xét nghiệm nhiễm sắc thể là phương pháp cơ bản để đánh giá tính toàn vẹn này ở cấp độ tế bào. Nghiên cứu này nhằm hoàn thiện quy trình xét nghiệm nhiễm sắc thể cho tế bào gốc trung mô từ mô dây rốn. Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 12 mẫu mô dây rốn tại Trung Tâm Tế bào gốc và Di truyền, Bệnh viện Bưu Điện và Trường Đại học Y Hà Nội. Kết quả nghiên cứu đã hoàn thiện từ quá trình nuôi cấy, thu hoạch tế bào, dùng phân bào, sốc nhược trương đến bước nhuộm tiêu bản và đánh giá nhiễm sắc thể. Trong đó, quá trình quá trình phân bào ở kì giữa bằng Colcemid nồng độ cuối cùng 200 ng/ml và thời gian ủ 3 giờ, sốc nhược trương (KCl 0,4%: nước cất: huyết thanh = 4:3:1), cố định (Carnoy), nhuộm băng G. Kết quả phân tích Karyotype trên 12 mẫu đều bình thường (2n=46). Nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá chất lượng tế bào gốc phục vụ điều trị bệnh.

Từ khóa: tế bào gốc trung mô, nhiễm sắc thể, xét nghiệm nhiễm sắc thể.

1. Đặt vấn đề

Tế bào gốc trung mô là nguồn vật liệu quý giá cho liệu pháp tế bào, đặc biệt là ứng dụng trong các thử nghiệm lâm sàng và điều trị bệnh tật bao gồm hệ tim mạch, tiêu hóa, thần kinh, cơ xương khớp. Loại tế bào này mang nhiều đặc tính nổi bật như khả năng tăng sinh và biệt hóa thành nguyên bào xương, tế bào sụn và tế bào mỡ, khả năng bài tiết ra các hoạt chất có đặc tính sinh học đặc biệt [1,2]. Bởi vậy, chúng được nghiên cứu và ứng dụng điều trị rất nhiều bệnh lý khác nhau như bệnh lý thần kinh, cơ xương khớp, tim mạch, bệnh tự miễn [3].

Tuy nhiên, để sử dụng tế bào gốc trong điều trị thì chúng phải đạt được các tiêu chuẩn đánh giá phù hợp. Hiện nay có một số phương pháp đánh giá chất lượng tế bào gốc bao gồm: đánh giá tốc độ phân chia của tế bào, biểu hiện makers định danh tế bào gốc, tiềm năng biệt hóa

xương, sụn, mỡ, độ vô khuẩn, xét nghiệm nội độc tố... và đặc biệt là tính toàn vẹn của bộ nhiễm sắc thể. Trong đó, khuyến cáo sử dụng phương pháp phân tích băng G để kiểm tra tính toàn vẹn về vật chất di truyền và các mẫu không có hiện tượng đột biến nhiễm sắc thể nào tồn tại [4]. Bởi vì theo một số nghiên cứu, những bất thường nhiễm sắc thể có thể phát sinh khối u [5].

Ở Việt Nam hiện nay, các phương pháp đánh giá chất lượng tế bào gốc trước khi điều trị vẫn chưa được phổ biến rộng rãi. Đặc biệt là quy trình đánh giá bộ nhiễm sắc thể của tế bào gốc vẫn còn mới mẻ và chưa được hoàn thiện thành quy trình chuẩn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm hoàn thiện quy trình xét nghiệm nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô từ mô dây rốn thai nhi từ đó cung cấp nguồn tế bào gốc có chất lượng cao cho mục đích điều trị về sau.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

12 mẫu tế bào gốc trung mô thu nhận từ mô cuống rốn và nuôi cấy, thu hoạch, phân tích tại Trung tâm Tế bào gốc, Bệnh viện Bưu Điện và Bộ môn Y Sinh học - Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội. Các mẫu có đủ thông tin và kết quả thu thập được đưa vào nghiên cứu. Thời gian từ 10/2023 đến 10/2024.

Tiêu chuẩn chọn mẫu

- Các mẫu được thu thập từ các sản phụ có nhu cầu lưu trữ tế bào gốc và mô cuống rốn tại Trung tâm và đồng ý tham gia nghiên cứu. Các sản phụ đã được xét nghiệm và xác nhận không nhiễm các vi-rút, vi khuẩn (HBV, HCV, HIV, CMV, HSV, Giang mai, Chlamydia) cấp tính hoặc mãn tính (trừ trường hợp đã điều trị ổn định).

- Mẫu còn nguyên trong dung dịch bảo quản và không có các dấu hiệu nhiễm khuẩn khác.
- Kích thước mẫu đạt tiêu chuẩn với độ dài dây rốn > 5cm.
- Mẫu được thu thập trong vòng 24 giờ, bảo quản nhiệt độ từ 2 – 8°C và mẫu được bao phủ bởi dung dịch Transferring buffer.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Mẫu không có đủ thông tin thu thập
- Sản phụ không đồng ý tham gia nghiên cứu

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu phát triển hoàn thiện quy trình kỹ thuật.

Các bước tiến hành nghiên cứu:

Nghiên cứu được thực hiện thông qua 3 giai đoạn: nuôi cấy tăng sinh và thu hoạch tế bào, dùng phân bào và sốc nhược trương, nhuộm tiêu bản và phân tích kết quả, cụ thể bao gồm:

- Thu thập mẫu mô dây rốn, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc
- Tiến hành dùng quá trình phân bào ở kì giữa bằng Colcemid
- Sốc nhược trương bằng dung dịch KCl kết hợp với nước và huyết thanh bê
- Cố định và làm sạch mẫu vật bằng dung dịch Carnoy.
- Nhỏ dịch thu được lên lam lạnh.
- Nhuộm tiêu bản theo phương pháp nhuộm băng G.
- Đánh giá và phân tích kết quả

Tiêu chuẩn đánh giá:

- Lượng tế bào mọc tốt, đảm bảo đủ số lượng thu hoạch.
- Tế bào nhược trương vừa phải, không co rúm thể hiện ở mức độ bung của cụm nhiễm sắc thể, thuận lợi cho quy trình nhuộm tiêu bản.
- Tiêu bản nhuộm, các nhiễm sắc thể được cắt băng phải tốt, các băng sáng tối rõ ràng.
- Đánh giá bộ nhiễm sắc thể phân tích ít nhất 20 cụm và dao động từ 20-50 cụm trên một mẫu nghiên cứu.

Xử lý số liệu:

- Số liệu nghiên cứu thu thập theo hồ sơ lưu trữ và được nhập vào máy tính, xử lý theo các toán trong chương trình toán thống kê y học chuẩn SPSS 20.0.

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành nhằm mục đích khoa học, bảo mật về các thông tin nghiên cứu theo đúng quy định đồng thời có sự đồng ý của bệnh nhân. Thông tin nghiên cứu và số liệu thu thập là trung thực và chính xác.

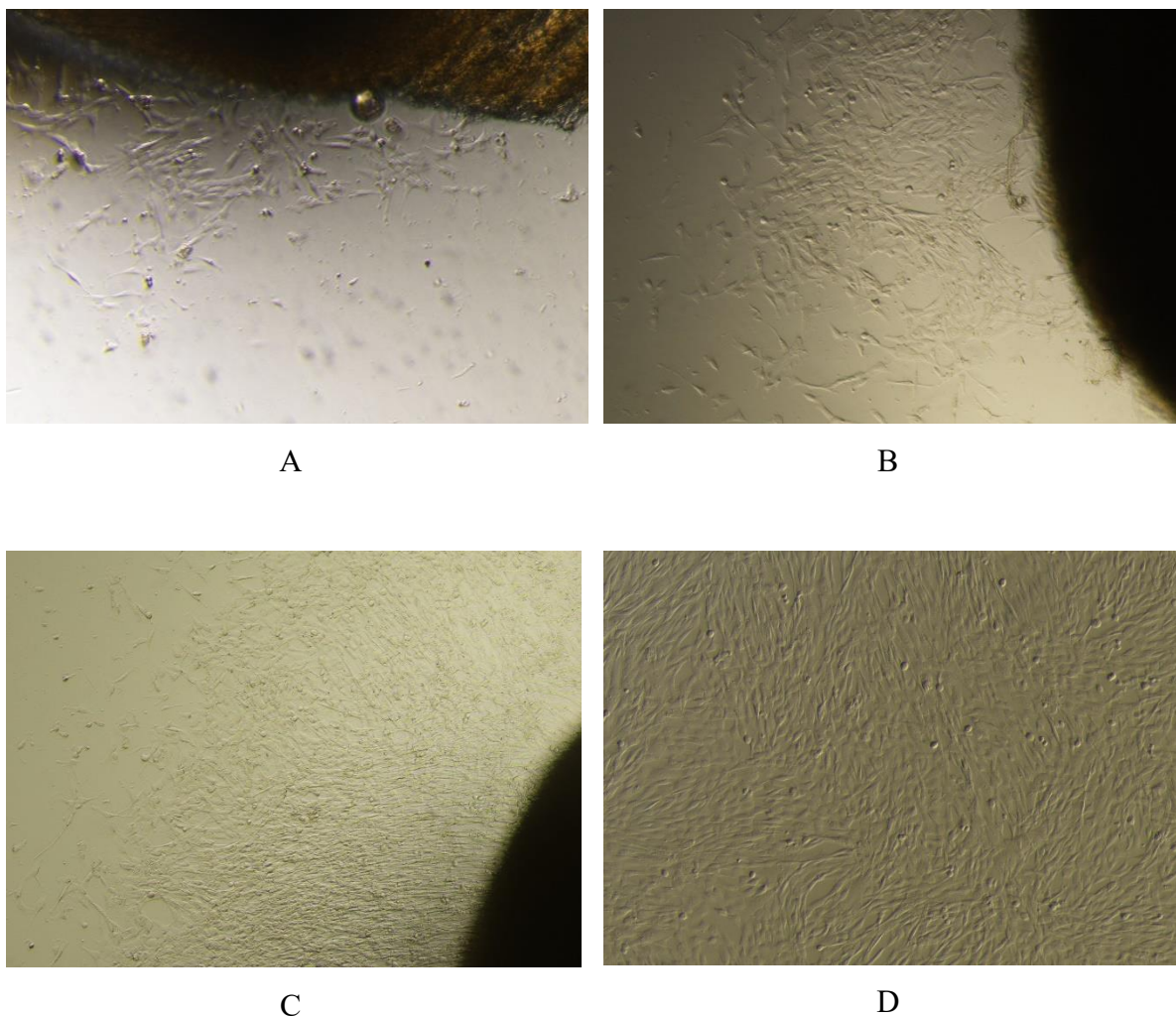
3. Kết quả nghiên cứu

Nghiên cứu đã hoàn thiện và tối ưu quy trình từ giai đoạn nuôi cấy và thu hoạch tế bào gốc, dùng phân bào và sốc nhược trương, nhuộm tiêu bản và phân tích với kết quả cụ thể từng giai đoạn như sau:

3.1. Kết quả thu hoạch, dùng phân bào ở kì giữa bằng Colcemid

Dây rốn được xử lý loại bỏ mạch máu, tách lấy lớp thạch Wharton's Jelly. Sau đó dùng dao mổ cắt mẫu mô nhỏ thành các mảnh vuông có diện tích khoảng 1 mm². Các mảnh mô ở lớp thạch Wharton's Jelly của dây rốn được nuôi cấy trong Flasks T75. Trong quá trình nuôi cấy, quan sát độ phủ tế bào đạt 70%-80% tiến hành thu hoạch tế bào. Trước khi tiến hành thu

hoạch tế bào 3 giờ, tiến hành dừng quá trình phân bào ở kỳ giữa bằng Colcemid. Tiến hành nhỏ dung dịch Colcemid vào Flasks T75 đã có 10 ml môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ cuối cùng đạt được là 200 ng/ml.



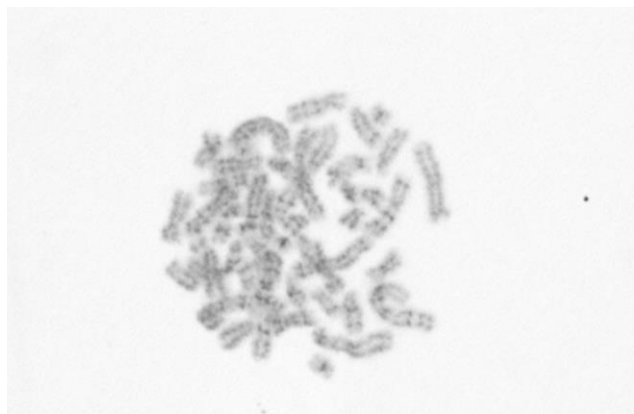
Hình 1. Tế bào gốc trung mô nuôi cấy ở những thời điểm khác nhau

Nhận xét: Hình ảnh (1A) và (1B) mật độ tế bào còn thưa thớt, chưa phù hợp cho thu hoạch. Hình (1C) mật độ tế bào khoảng 70-80% độ bao phủ, là phù hợp cho thu hoạch tế bào. Hình (1D) tế bào dày đặc, mật độ quá cao, các tế bào thường quá kỳ phân chia, không phù hợp với thu hoạch tế bào. Nếu thu hoạch các tế bào ở những ngày này, thường sẽ rất nhiều tế bào nhưng rất khó thu được các tế bào ở kỳ giữa.

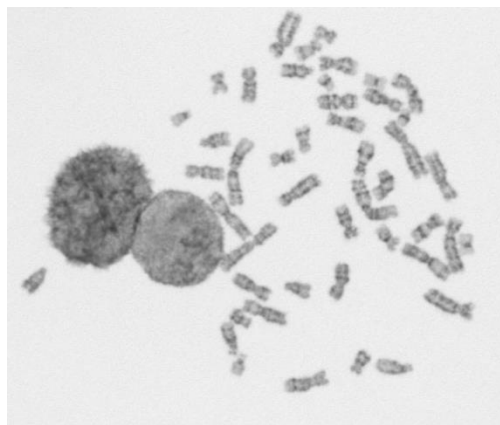
3.2. Kết quả sốc nhược trương

Sau 3 giờ nhỏ dung dịch Colcemid dùng 1 ml dung dịch Deattachment để làm bong tế bào khỏi thành bình nuôi cấy. Sau khi các tế bào được tách khỏi Flasks, tiến hành soi dưới kính hiển vi thấy tế bào co tròn lại. Tiến hành ly tâm thu lấy phần lắng cặn có chứa tế bào. Sốc

nhuộc trương bằng dung dịch KCl 0,4% kết hợp với và nước cất và huyết thanh theo tỉ lệ lần lượt là 4 KCl : 3 nước cất : 1 huyết thanh bê. Lúc này các nhiễm sắc thể được bung ở mức độ thích hợp, ly tâm lấy cặn. Cố định và làm sạch mẫu vật bằng dung dịch carnoy (2 lần). Dung dịch carnoy được pha theo tỷ lệ 3 Methanol : 1 Acid acetic. Sau khi cố định, tiến hành nhỏ dịch thu được lên lam lạnh.



A



B

Hình 2. Kết quả nhuộm trương tế bào

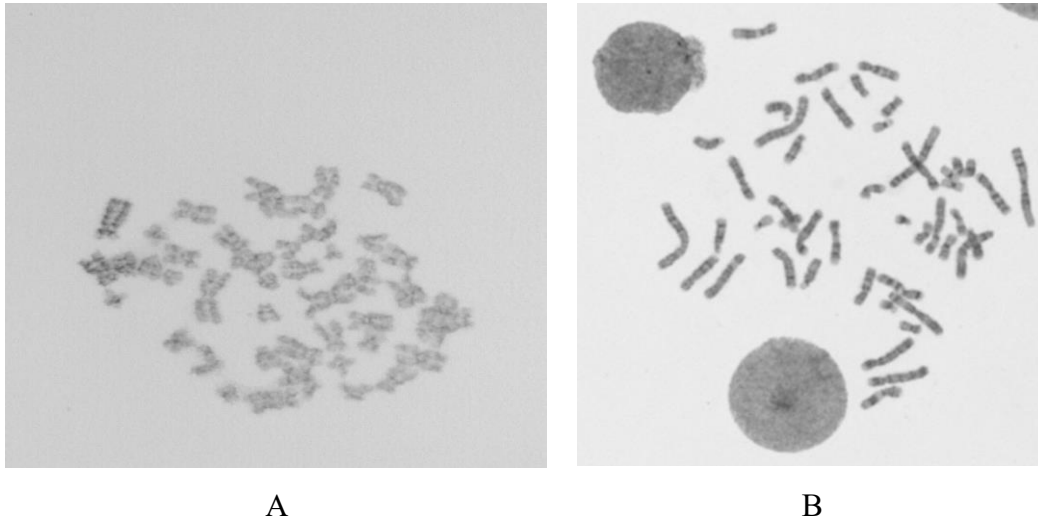
Hình 2A. Tế bào nhuộm trương chưa tốt

Hình 2B. Tế bào nhuộm trương vừa phải

Nhận xét: Khi sử dụng nồng độ KCl chưa tốt, các nhiễm sắc thể co rúm vào nhau như hình 2A rất khó để nhuộm băng cũng như phân tích về sau. Ngược lại nếu dùng nồng độ nhuộm trương thích hợp, các nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô sẽ có hiện tượng bung ở mức độ vừa phải như hình 2B thuận lợi cho các bước tiếp theo.

3.3. Kết quả quy trình nhuộm tiêu bản

Tiêu bản sau khi nhỏ sẽ được làm khô trong tủ ẩm 37 độ C sau 2-3 ngày hoặc 60 độ C sau 24 giờ. Sau đó tiến hành nhuộm tiêu bản theo phương pháp nhuộm băng G. Sử dụng enzym phân giải protein là trypsin pha trong 100 ml NaCl 9‰ với mục đích cắt băng nhiễm sắc thể. Tiến hành pha Giemsa 5% trong đệm pH 6,8 bao gồm KH_2PO_4 và Na_2HPO_4 (theo tỷ lệ 1:1). Tiêu bản sau đó được rửa dưới vòi nước chảy nhẹ để loại bỏ cặn thuốc nhuộm thừa. Để tiêu bản khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.



Hình 3. Kết quả nhuộm băng nhiễm sắc thể theo phương pháp nhuộm băng G

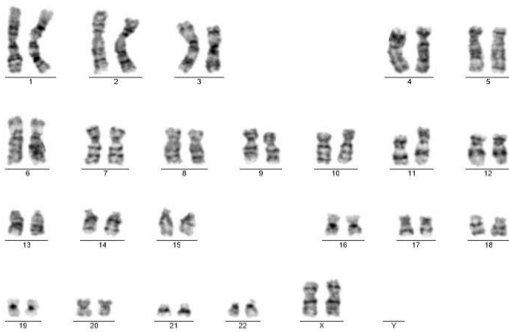
Hình 3A: Kết quả nhuộm băng chưa tốt, có hiện tượng mờ băng

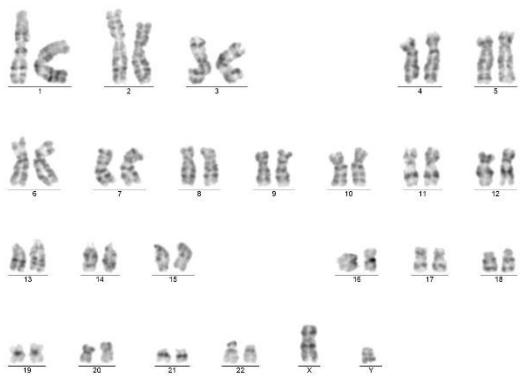
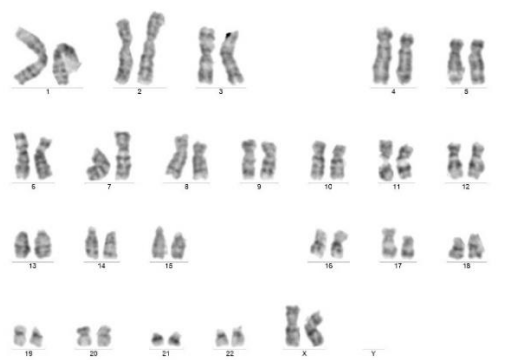
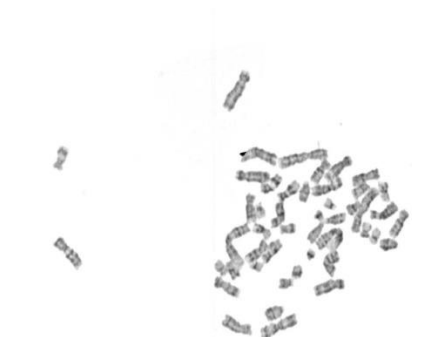
Hình 3B: Kết quả nhuộm băng tốt, các băng sáng tối rõ ràng thuận lợi cho việc phân tích bất thường.

3.4. Kết quả đánh giá nhiễm sắc thể

Tiêu bản sau khi nhuộm và để khô sẽ được phân tích trên kính hiển vi với độ phóng đại x1000 lần. Các cụm nhiễm sắc thể đủ tiêu chuẩn phân tích là những cụm có nhiễm sắc thể phân tán tốt, không chồng lên nhau, còn nền bào tương, kích thước nhiễm sắc thể không dài quá cũng không ngắn quá, băng rõ. Số cụm phân tích giao động từ 20-50 cụm trên một mẫu nghiên cứu.

Về kết quả nhiễm sắc thể đồ ở 12 mẫu tế bào gốc trung mô, ghi nhận kết quả bình thường về số lượng và cấu trúc.

		46,XX
---	--	-------

		46,XY
		46,XX

Hình 4. Kết quả Karyotype của tế bào gốc trung mô dây rốn

4. Bàn luận

Kỹ thuật lập Karyotype từ tế bào gốc trung mô dây rốn là một kỹ thuật tương đối phức tạp. Kỹ thuật này tương đối mới ở Việt Nam, gồm nhiều bước đòi hỏi người thực hiện sự chính xác và kinh nghiệm chuyên sâu. Khi so sánh với các nghiên cứu khác tại Việt Nam, chúng tôi nhận thấy chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá bộ nhiễm sắc thể của tế bào gốc trước khi điều trị cho bệnh nhân, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào mục tiêu hiệu quả điều trị. Do vậy việc hoàn thiện quy trình đánh giá nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô là một kỹ thuật vô cùng hữu ích đảm bảo đáp ứng các tiêu chuẩn trong nước và trên thế giới khi sử dụng loại sản phẩm này trong thực hành lâm sàng.

Trong quá trình thu hoạch tế bào, chúng tôi nhận thấy thời gian tiến hành thu mẫu là vô cùng quan trọng. Bởi vì nếu thu hoạch tế bào quá sớm, tế bào không đủ nhiều cụm để đánh giá. Ngược lại, nếu thu hoạch tế bào quá muộn, tế bào già đi nhiều, chen chúc, rất ít tế bào chuyển sang kỳ giữa. Vì thế chúng tôi nhận thấy, trong quá trình nuôi cấy, khi độ bao phủ tế bào 70%-

80% là phù hợp để thu hoạch đánh giá nhiễm sắc thể. Đối chiếu với các nghiên cứu khác, chúng tôi nhận thấy có nhiều điểm tương đồng như tác giả Lê Thị Bích Phượng cũng ghi nhận mật độ đạt khoảng 70% là thời điểm thích hợp để tiến hành đợt cấy chuyên đầu tiên [6] hay trong nghiên cứu đánh giá sự ổn định nhiễm sắc thể trong quá trình nuôi cấy in vitro của tác giả Brian G Stultz [7].

Để dừng quá trình phân bào, chúng tôi sử dụng Colcemid với thời gian ủ trong 3 giờ. Colcemid có tác dụng ức chế hình thành thoi vô sắc, do đó giúp các tế bào dừng lại ở kỳ giữa của quá trình nguyên phân từ đó việc đánh giá nhiễm sắc thể dễ dàng hơn. Chúng tôi nhận thấy thời gian ủ tối ưu của Colcemid là 3 giờ. Điều này là hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của tác giả Tamara Borgonovo và cộng sự, thời gian ủ dao động từ 1-6 giờ là hợp lý [8]. Việc ức chế phân bào chưa đến 1 giờ là không đủ để tạo ra số lượng cụm kì giữa thích hợp, trong khi hơn 6 giờ ảnh hưởng đến chất lượng của nhiễm sắc thể [8]. Bên cạnh đó, chúng tôi sử dụng nồng độ Colcemid pha loãng cuối cùng là 200 ng/ml. Thời gian ủ và nồng độ này là thích hợp với nồng độ hoạt động của Colcemid để tế bào dừng lại đúng kỳ và đạt kích thước phù hợp để phân tích, không quá dài và không quá ngắn.

Một yếu tố khác ảnh hưởng trực tiếp tới kết quả là giai đoạn sốc nhược trương. Giống như thu hoạch tế bào máu ngoại vi, chúng tôi vẫn sử dụng dung dịch sốc nhược trương KCl. Tuy nhiên nồng độ KCl sử dụng trong nghiên cứu này là 0,4% đồng thời được pha loãng trong dung dịch nước và huyết thanh bê theo tỷ lệ 4 KCl : 3 nước cất : 1 huyết thanh bê. Tỷ lệ này là phù hợp để tế bào nhược trương vừa đủ, cụm nhiễm sắc thể không quá bung cũng như không quá co rúm. Kết quả có thể quan sát được trên hình số 2. Việc kết hợp thêm với huyết thanh bê để tăng mức độ nhược trương, tăng hiệu quả KCl cũng đã được tác giả Brian G Stultz sử dụng trong nghiên cứu đánh giá sự ổn định nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô trong quá trình nuôi cấy [7]. Tiêu bản sau đó được nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm băng G bằng thuốc nhuộm Giemsa, sau đó để tiêu bản khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

Về đánh giá kết quả nhiễm sắc thể đồ, chúng tôi nhận thấy 12 mẫu đều có kết quả bình thường 46 chiếc nhiễm sắc thể, không có bất thường về số lượng và cấu trúc của bộ nhiễm sắc thể. Các mẫu đều được phân tích ít nhất 20 cụm và dao động từ 20-50 cụm trên một mẫu nghiên cứu. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Lê Thị Bích Phượng và tác giả Hager Abouelnaga [6,9]. Tế bào gốc có chất lượng tốt sẽ là nguồn nguyên liệu quý giá cho điều trị hiệu quả bệnh tật về sau.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thành công hoàn thiện quy trình xét nghiệm nhiễm sắc thể của tế bào gốc trung mô từ mô dây rốn thai nhi. Kết quả này sẽ là tiền đề cho quy trình đánh giá chất lượng tế bào gốc trung mô thu nhận từ mô dây rốn trong liệu pháp tế bào gốc ứng dụng điều trị.

Tài liệu tham khảo

- [1] Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regen Med* 2019;4:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.
- [2] Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int* 2018;2018:3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>.
- [3] Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta* 2011;32:S311–5. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.010>.
- [4] Xiang S, Gao W, Peng H, Liu A, Ao Q, Yang M, et al. Standards of clinical-grade mesenchymal stromal cell preparation and quality control (2020 China Version). *J Neurorestoratology* 2020;8:197–216. <https://doi.org/10.26599/JNR.2020.9040021>.
- [5] Walrath JC, Hawes JJ, Van Dyke T, Reilly KM. Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Research. *Adv Cancer Res* 2010;106:113–64. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06004-5).
- [6] Lê Thị Bích Phượng. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn. *Tạp chí y dược quân sự* 6-2018 2018.
- [7] Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, Surdo JLL, Bauer SR, Hursh DA. Chromosomal Stability of Mesenchymal Stromal Cells During In Vitro Culture. *Cytotherapy* 2016;18:336. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.017>.
- [8] Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CLK, Brofman PRS. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev Bras Hematol E Hemoter* 2014;36:202–7. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>.
- [9] Abouelnaga H, El-Khateeb D, Moemen Y, El-Fert A, Elgazzar M, Khalil A. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Egypt Liver J* 2022;12:2. <https://doi.org/10.1186/s43066-021-00165-w>.