

BƯỚC ĐẦU BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ CUỐNG RỒN ĐỊNH HƯỚNG THÀNH TẾ BÀO GAN THÔNG QUA YẾU TỐ PHIÊN MÃ *HNF-4a*

Lê Bắc Việt¹, Nguyễn Huy Hoàng¹, Nguyễn Thanh Ngà², Vi Đại Lâm², Nguyễn Văn Hạnh²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 09.8.2014

Ngày nhận đăng: 30.8.2014

TÓM TẮT

Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO), Việt Nam hiện nay có khoảng 8 triệu người mắc viêm gan B hoặc viêm gan siêu vi C. Nhiễm virus viêm gan B mãn tính là nguyên nhân chính gây bệnh gan ở Việt Nam như xơ gan và ung thư gan. Bên cạnh việc điều trị bằng thuốc thông thường, cấy ghép tế bào gốc định hướng tế bào gan là một phương pháp mới đang được nghiên cứu áp dụng. Trong các loại tế bào gốc, tế bào từ cuống rốn rất phong phú, đa dạng, sẵn có, dễ thu nhận và không vi phạm đạo đức y-sinh học. Ở nghiên cứu này, để bước đầu biệt hóa tế bào gốc trung mô cuống rốn định hướng thành tế bào gan, chúng tôi tiến hành chuyển vùng mã hóa của gen *HNF-4a* – một yếu tố phiên mã cho hơn 100 gen ở tế bào gan – thông qua vector biểu hiện của virus pCMV-EGFP vào trong tế bào gốc. Bên cạnh đó, một số chỉ thị phân tử đặc trưng cho tế bào gốc trung mô như *CD86*, *CD90*, *CD105*, *CD73*... cũng được tiến hành đánh giá khả năng biểu hiện. Kiểm tra sau chuyển gen cho thấy chỉ thị của *HNF-4a* và các chỉ thị đặc trưng cho tế bào gốc trung mô đều biểu hiện trong tế bào sau chuyển gen thông qua phương pháp PCR phiên mã ngược (RT-PCR). Bên cạnh đó, *HNF-4a* đã kích hoạt *AFP* – một chỉ thị đặc trưng cho chức năng gan biểu hiện trong tế bào sau chuyển gen. Kết quả của nghiên cứu này đã mở ra một hướng mới, có nhiều ý nghĩa trong việc điều trị các bệnh liên quan đến gan, đặc biệt ở các bệnh nhân mắc bệnh mãn tính.

Từ khóa: biệt hóa, chuyển gen, *HNF-4a*, pCMV-EGFP, RT-PCR, tế bào gốc cuống rốn, tế bào gan

GIỚI THIỆU

Tế bào gốc là tế bào có khả năng biệt hóa và khả năng tự làm mới. Biệt hóa là khả năng tạo ra các tế bào chuyên hóa trong cơ thể trong khi tự làm mới là quá trình duy trì tính gốc không đổi qua các thế hệ tế bào (Tuch, 2006). Nhờ đó, biệt hóa tế bào gốc thành các dạng tế bào chuyên hóa khác đang là hướng nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng cao. Tế bào gốc không những có số lượng đáng kể trong gia: đoạn phôi thai, chúng còn được tìm thấy trong tủy xương. Đặc biệt, thời gian gần đây, những mô phôi thai phát triển trong quá trình chu sinh như dây cuống rốn là đối tượng được quan tâm của các nhà nghiên cứu như là một nguồn tế bào gốc thay thế cho những nguồn truyền thống (Miki, 2011). Sau mỗi ca sinh nở, dây cuống rốn được thải ra môi trường như một loại rác thải sinh học, do đó nguồn thu mẫu cuống rốn luôn phong phú, sẵn có và không vi phạm các luật đạo đức y học và sinh học. Bên cạnh đó, tế bào gốc cuống rốn cũng có đầy đủ tính chất của một tế bào gốc đa năng như tế bào gốc tủy xương (tế bào gốc tủy xương thuộc loại tế bào gốc trưởng thành),

(Ishige *et al.*, 2009). Những tế bào có chức năng được biệt hóa từ tế bào gốc sẽ là đối tượng tiềm tàng cho các nghiên cứu về trao đổi chất, đánh giá ảnh hưởng và tính đào thải trong quá trình tìm kiếm các loại thuốc mới.

Dây cuống rốn người bao gồm 2 động mạch và 1 tĩnh mạch được bao quanh bởi mạng lưới mô dạng nhầy có tên là Wharton's jelly (Corrao *et al.*, 2013). Những tế bào gốc trung mô (TBGTM) trong dây cuống rốn có thể được phân lập từ dây rốn hoặc ở những phần khác nhau của dây cuống rốn bao gồm máu cuống rốn, vùng quanh mạch máu, vùng Wharton's jelly và màng ối (Ishige *et al.*, 2009; Sarugaser *et al.*, 2009). Tùy vào từng mục đích hướng đến mà tế bào gốc trung mô cuống rốn sẽ được phân lập ở những vùng khác nhau.

Gần đây, một số nghiên cứu biệt hóa các tế bào gốc cuống rốn thành tế bào gan đã mở ra hy vọng cho hàng trăm triệu bệnh nhân xơ gan và ung thư gan (Cai *et al.*, 2007; Cantz *et al.*, 2008). Đặc biệt, năm 2010, Ren và cộng sự đã công bố nghiên cứu phân lập tế bào TBGTM từ cuống rốn và

tiến hành biệt hóa thành tế bào gan (Ren *et al.*, 2010). Tuy nhiên, cho đến nay, cơ chế chính xác của quá trình biệt hóa thành từ TBGTM cuộn rốn thành tế bào gan vẫn cần phải được làm rõ hơn. Bên cạnh những tác nhân môi trường trong các môi trường biệt hóa tế bào gốc như dexamethasone hay yếu tố sinh trưởng như FGF (fibroblast growth factor), một số yếu tố phiên mã, ví dụ như gen *HNF-4a*, cũng đang được tập trung nghiên cứu.

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (*HNF-4a*) là một receptor trong nhân tế bào được mã hóa bởi gen *HNF-4a*. *HNF-4a* là một yếu tố phiên mã liên kết với DNA như là một homodimer. Protein được mã hóa bởi gen này kiểm soát sự biểu hiện của khoảng 100 gen trong đó có hepatocyte factor 1 alpha, một yếu tố phiên mã điều hòa sự biểu hiện của một gen liên quan đến gan (Ishii *et al.*, 2008). Gen này đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của gan, thận, tuyến ruột. *HNF-4a* đã được chứng minh có thể hoạt động như một gen điều phối trong các tác nhân phiên mã trong quá trình định hướng biệt hóa thành tế bào gan (Odom *et al.*, 2004). Những nghiên cứu này cho thấy trong hệ thống nuôi cấy tế bào gốc, sự biểu hiện nâng cao của *HNF-4a* có thể là một sự đảm bảo cho sự cảm ứng biệt hóa thành tế bào gan và các chức năng của tế bào giống như tế bào gan. Nhờ đó, các tế bào có biểu hiện tổng hợp *HNF-4a* sẽ kích hoạt các gen đặc biệt định hướng tế bào gan khác và tăng cường trạng thái biệt hóa của TBGTM (Chen *et al.*, 2010).

Về việc ứng dụng tác nhân *HNF-4a* để biệt hóa tế bào gốc cuộn rốn thành tế bào gan, cho đến nay vẫn chưa có một công bố chính thức nào trên toàn thế giới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sử dụng *HNF-4a* như là yếu tố quan trọng để biệt hóa TBGTM cuộn rốn thành tế bào gan bằng cách chuyển gen *HNF-4a* vào TBGTM cuộn rốn thông qua hệ thống vector biểu hiện ở virus pCMV-EGFP. Thành công trong nghiên cứu này sẽ tạo ra một bước tiến mới trong công nghệ tế bào gốc và điều trị các bệnh liên quan đến gan.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Trong nghiên cứu này, những mẫu TBGTM cuộn rốn đã được phân lập và nuôi cấy được cung cấp bởi Phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Những mẫu này đã được đảm bảo có hình thái hoàn

toàn phù hợp và đặc trưng của TBGTM. Bên cạnh đó, để phục vụ cho việc phân lập và chuyển vùng mã hóa của gen *HNF-4a* vào tế bào gốc, những mẫu tế bào gan đảm bảo không bị nhiễm bất kì loại vi khuẩn hay virus nào được thu thập tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương, 43 Tràng Thi, Hà Nội. Vector biểu hiện pCMV-EGFP thương mại hóa trên thị trường được nhập từ hãng Thermo Scientific, Lithuania.

Phương pháp

Khuếch đại vùng mã hóa (CDS) của gen *HNF-4a*

RNA tổng số được tách chiết từ những mẫu tế bào gan theo bộ kit RNeasy Mini Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ mẫu RNA tổng số, vùng mã hóa (CDS) của gen *HNF-4a* sẽ được khuếch đại nhờ kỹ thuật RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) với 2 cặp mồi đặc hiệu, trong đó mỗi chuỗi được thiết kế có sẵn vị trí cắt của enzyme giới hạn *NheI* (gạch chân): 5'- CTAGCTAGCATGGTCAGCGTGAAC - 3' và mỗi chuỗi có sẵn vị trí cắt của *EcoRI* (gạch chân): 5'- GGAATTCGATAACTTCCTGCTGGTG - 3'. Các hóa chất chạy RT-PCR được lấy theo bộ kit OneStep RT-PCR Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan) với chu trình nhiệt như sau: 50°C/30 phút; 95°C/3 phút; (95°C/30 giây; 55°C/45 giây; 72°C/1 phút 30 giây) x 30 chu kỳ; 72°C/ 10 phút. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Nhân dòng vùng mã hóa gen *HNF-4a* và giải trình tự

Để tiến hành nhân dòng CDS của gen *HNF-4a*, sản phẩm RT-PCR ở trên được gắn với vector tách dòng pTZ57R/T (Thermo Scientific, Lithuania) nhờ xúc tác của enzyme T4 DNA ligase (BioBasic, Canada) ở 22°C trong 30 phút. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5a bằng phương pháp sốc nhiệt. Sản phẩm DNA plasmid tách được từ các khuẩn lạc trên đĩa biến nạp được cắt kiểm tra bằng *EcoRI* sau đó điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Cuối cùng, DNA plasmid có chứa CDS của gen *HNF-4a* được tiến hành giải trình tự trên hệ thống giải trình tự tự động ABI-3100 (Mỹ).

Thiết kế vector chuyển gen

Vector tách dòng pTZ57R/T có chứa CDS của gen *HNF-4a* được xử lý đồng thời với 1 bộ hợp hai enzyme cắt giới hạn là *NheI* và *EcoRI* thu nhận đoạn gen ngoại lai. Đồng thời, vector biểu hiện pCMV-EGFP (Thermo Scientific, Lithuania) cũng

được xử lý bằng tổ hợp hai enzyme này. Sản phẩm gen tinh sạch của hai bước trên được ghép nối với nhau nhờ T4 DNA ligase ở 22°C trong 30 phút và được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α để thu nhận DNA plasmid tái tổ hợp. Những dòng DNA plasmid thu nhận được cắt kiểm tra bằng 2 enzyme giới hạn trên và sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agrose 0,8%.

Chuyển vector tái tổ hợp vào tế bào gốc

Vector biểu hiện pCMV-EGFP tái tổ hợp chứa CDS của gen *HNF-4a* được tiến hành đưa vào trong TBGM cuồng rốn dựa vào bộ kit Lipofectamine® LTX DNA Transfection của hãng Invitrogen (Mỹ). Các bước thí nghiệm được làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết thúc quá trình chuyển gen, tế bào được chuyển sang nuôi trong môi trường DMEM glucose thấp (1g/L), bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum), 5 ng/ml EGF (epidermal growth factor), 50 IU penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 10 µg/ml ciprofloxacin. Thời gian nuôi cấy 3 ngày, ở 37°C và cấp khí CO₂ 5%.

Kiểm tra khả năng biểu hiện của các vector chỉ thị trong tế bào gốc

Toàn bộ tế bào trên đĩa nuôi trước và sau chuyển gen được thu nhận lại và tiến hành tách RNA tổng số thông qua bộ kit RNeasy Mini Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan), các bước tiến hành làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lượng tế bào sau nuôi cấy được hòa cùng với ethanol 70% với tỉ lệ thể tích 1:1, sau đó toàn bộ dung dịch được đưa qua cột tinh sạch bằng những hóa chất trong bộ kit, cuối cùng RNA được hòa loãng bởi 50 µl nước không có RNase. Sản phẩm RNA được sử dụng làm khuôn cho PCR phiên mã ngược (RT-PCR) để kiểm tra biểu hiện của các chỉ thị phân tử cũng như các đối chứng âm trong tế bào thông qua những cặp mồi đặc hiệu được thiết kế (Bảng 1). Trong số các chỉ thị này, chỉ thị biểu hiện của gen *HNF-4a* được khuếch đại để kiểm tra tính hiệu quả của quá trình chuyển gen. Các hóa chất chạy RT-PCR được lấy theo bộ kit OneStep RT-PCR Kit của hãng QIAGEN (Hà Lan) với chu trình nhiệt như sau: 50°C/30 phút; 95°C/3 phút; (95°C/30 giây; 57°C/45 giây; 72°C/1 phút) x 30 chu kỳ; 72°C/ 10 phút. Tất cả sản phẩm RT-PCR đều được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

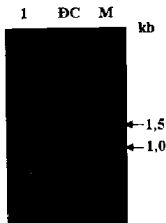
Bảng 1. Trình tự oligonucleotide của các mồi khuếch đại các chỉ thị phân tử bằng RT-PCR

Chỉ thị	Mồi xuôi	Mồi ngược
CD34	5' - AAAACGTGTTGCCCTGAACC - 3'	5' - AAGCCATGGAGATCAGAGGA - 3'
CD73	5' - CCTGCTGAGCTCTGCATAAGTA - 3'	5' - CCCTATTTTACTGGCCAGTGT - 3'
CD86	5' - TCCTGGCTGAGAGAGGAAGA - 3'	5' - AGACTGCCCCATCCCTTAGT - 3'
CD90	5' - TTTGGCCCAAGTTTCTAAGG - 3'	5' - AGATGCCATAAGCTGTGGTG - 3'
CD105	5' - TCCAGCACTGGTGAAGTGAAG - 3'	5' - TGTCTCCCTGCCAGTTAGT - 3'
Eras	5' - GCAAGGTCTCTGTAGGGAGAA - 3'	5' - GCAGCTTTGAAACCCAAAC - 3'
Oct-1	5' - GCAACCTGTAGCTTGGTC - 3'	5' - CTCTCCTTTGCCCTCACAAAC - 3'
GATA4	5' - CCAGAGATTCTGCAACACGA - 3'	5' - ATTTTGGAGTGAGGGGTCTG - 3'
HNF-4a	5' - ATGGTCAGCGTGAAC - 3'	5' - ACTTCTGCTTGGTG - 3'
AFP	5'-TGCAGCCAAAGTGAAGGGGAAGA-3'	5'-CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA-3'
TAT	5'-TGAGCAGTCTGTCCACTGCCT-3'	5'-ATGTGAATGAGGAGGATCTGAG-3'

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại vùng mã hóa gen *HNF-4a*

Trình tự mã hóa (coding sequence – CDS) của gen *HNF-4a* được khuếch đại bởi kỹ thuật RT - PCR nhờ cặp mồi đặc hiệu từ mẫu RNA tổng số tách chiết từ các mẫu tế bào gan (Hình 1). Sản phẩm PCR là một băng DNA duy nhất có kích thước vào khoảng gần 1,4 kb đúng với kích thước tính toán của CDS gen *HNF-4a* khi thiết kế mồi. Đồng thời, băng DNA rõ nét, đặc hiệu và không có dấu hiệu đứt gãy, hoàn toàn phù hợp để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.



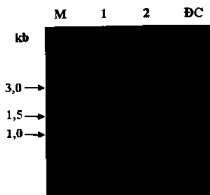
Hình 1. Sản phẩm khuếch đại CDS của gen *HNF-4a* bằng RT-PCR. 1: Sản phẩm RT - PCR; M: DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific). ĐC: đối chứng thay RNA bằng nước.

Nhân dòng vùng mã hóa gen *HNF-4a* và giải trình tự

Sản phẩm RT - PCR của vùng mã hóa gen *HNF-4a* sau khi gắn với vector tách dòng pTZ57R/T được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5a. DNA plasmid từ những khuẩn lạc sau biến nạp được tách chiết và sản phẩm sau khi cắt kiểm tra bằng *EcoRI*. Kết quả cho thấy, sau khi xử lý bằng *EcoRI*, đoạn gen CDS của gen *HNF-4a* (kích thước 1,4 kb) đã được cắt rời khỏi vector có kích thước khoảng 3 kb. Dòng đối chứng không mang gen thì khi cắt bằng enzyme này chỉ cho ra đoạn DNA kích thước 3 kb do vector đã được mở vòng (Hình 2).

Kết quả giải trình tự gen ngoại lai cho thấy trình tự của CDS của gen *HNF-4a* đã được phân lập tương đồng với các gen tương ứng ở người (mã số ngân hàng gen NM_175914) đến 99% (dữ liệu không đưa vào bài). Các sai khác nhỏ về nucleotide đều không làm thay đổi trình tự amino axit khi đưa lên chương trình mã hóa ExPASy (www.expasy.org). Điều này

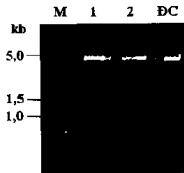
chứng tỏ chúng tôi đã nhân dòng được CDS của gen *HNF-4a* trong *E. coli* DH5a.



Hình 2. Sản phẩm cắt plasmid pTZ57R/T tái tổ hợp bằng enzyme *EcoRI* trên gel agarose 0.8%. 1, 2: plasmid pTZ57R/T mang CDS của gen *HNF-4a*; ĐC: plasmid pTZ57R/T không mang CDS của gen *HNF-4a*; M: DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific)

Thiết kế vector chuyển gen

Vùng CDS gen *HNF-4a* từ vector tái tổ hợp pTZ57R/T đã được cắt bằng *NheI* và *EcoRI*, thu nhận và chuyển vào vector pCMV-EGFP. Vùng CDS trong vector biểu hiện vừa được thiết kế cũng được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme hạn chế trên.



Hình 3. Sản phẩm cắt plasmid pCMV-EGFP tái tổ hợp bằng cặp enzyme hạn chế *NheI* và *EcoRI* trên gel agarose 0.8%. 1, 2: plasmid pCMV-EGFP mang CDS của gen *HNF-4a*; ĐC: plasmid pCMV-EGFP không mang CDS của gen *HNF-4a*; M: DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific)

Kết quả (Hình 3) cho thấy hai dòng plasmid từ hai khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa biến nạp sau khi được xử lý bằng *NheI* và *EcoRI* đều cho ra đoạn DNA kích thước khoảng 1,4 kb tương ứng kích thước vùng CDS của gen *HNF-4a*. Từ kết quả này, có thể khẳng định chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện pCMV-EGFP tái tổ hợp mang CDS của gen *HNF-4a* để tiến hành đưa vào trong tế bào gốc.

Khả năng biểu hiện của các chỉ thị trong tế bào gốc

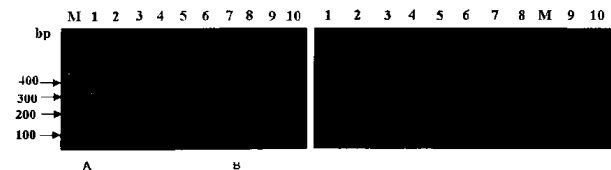
Các chỉ thị phân tử trong tế bào gốc nêu ở bảng 1 được tiến hành kiểm tra khả năng biểu hiện trong cả 2 dòng tế bào gốc trước và sau chuyển gen nhờ kỹ thuật RT-PCR (Hình 4a, 4b) và những kết quả biểu hiện của các marker được thống kê lại ở Bảng 2.

Kết quả từ hình 4 và bảng 2 cho thấy ở cả tế bào gốc trước và sau chuyển gen, các marker đặc trưng cho TBGTM là *CD90*, *CD73*, *CD105* đều được biểu hiện. Ngoài ra các marker bổ sung khác cũng được biểu hiện, đó là các marker của tế bào gốc phôi (Embryonic stem cells) như: *Oct-1*, *Eras* (Tanaka *et al.*, 2009). Các yếu tố phiên mã tham gia vào quá trình phát triển của các cơ quan có nguồn gốc từ nội bì hay trung bì như: *GATA4*, *HNF-3 β* cũng được

biểu hiện. Hơn nữa, cũng có sự hiện diện của chỉ thị phân tử *CD86* - là một protein thể hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên, cung cấp tín hiệu costimulatory (đồng kích thích) cần thiết cho việc tế bào kích hoạt lympho T trong hệ thống miễn dịch của cơ thể. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu marker của TBGTM đã được công bố (Chang *et al.*, 2010). Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng một đối chứng âm là *CD34* - marker của dòng tạo máu. Kết quả là marker này hoàn toàn không được biểu hiện trong cả tế bào trước và sau chuyển gen. Điều đó đảm bảo dòng TBGTM của chúng tôi hoàn toàn không bị lẫn những chỉ thị của dòng tế bào máu - điều vẫn thường xuyên xảy ra trong quá trình nuôi cấy và phân lập TBGTM cuống rốn (La Rocca *et al.*, 2009).

Bảng 2. Thống kê biểu hiện của các marker chỉ thị phân tử trong tế bào gốc

Tên marker	Kích thước (bp)	Biểu hiện	
		Trước chuyển gen	Sau chuyển gen
<i>AFP</i>	216	-	+
<i>HNF-4α</i>	350	-	+
<i>GATA4</i>	290	+	+
<i>CD34</i>	367	-	-
<i>Oct-1</i>	297	+	+
<i>CD86</i>	290	+	+
<i>CD90</i>	265	+	+
<i>Eras</i>	315	+	+
<i>CD105</i>	179	-	+
<i>CD73</i>	308	-	+



Hình 4. Điện di đồ RT-PCR các chỉ thị phân tử trước chuyển gen (A) và sau chuyển gen *HNF-4 α* (B). 1: *CD73*; 2: *CD34*; 3: *CD86*; 4: *CD90*; 5: *CD105*; 6: *Eras*; 7: *Oct-1*; 8: *GATA4*; 9: *HNF-4 α* ; 10: *AFP*; M: marker DNA 100 bp (Thermo Scientific).

Bên cạnh việc kiểm tra biểu hiện của các marker liên quan đến tế bào gốc, 2 chỉ thị liên

quan đến tế bào gan là *AFP* và đặc biệt là *HNF-4 α* được kiểm tra khả năng biểu hiện để đánh giá sự

hiệu quả của quá trình chuyển gen. Trong 2 chỉ thị này, bên cạnh *HNF-4a*, *AFP* mã hóa cho một loại protein ở tế bào chất có tên là alpha fetoprotein. Protein này được sản sinh bởi tế bào gan trong suốt quá trình bào thai và khi được biểu hiện trong cơ thể người trưởng thành, nó thường xuyên có liên quan đến gan (Seo et al., 2013). Kết quả thu nhận là phù hợp khi trước chuyển gen, hai marker này hoàn toàn không biểu hiện trong tế bào, tuy nhiên sau 3 ngày nhiễm vector tái tổ hợp chứa CDS của gen *HNF-4a* vào tế bào, hai chỉ thị đã được biểu hiện thành công. Điều đó cho thấy vector tái tổ hợp hay yếu tố phiên mã *HNF-4a* đã được chuyển vào tế bào gốc và nó sẽ điều tiết sự biểu hiện của các gen liên quan đến tế bào gan (Odom et al., 2004). Từ đó, tế bào gốc cuồng rốn có khả năng được biệt hóa thành tế bào gan hoàn chỉnh. Thêm vào đó, chỉ thị *AFP* có biểu hiện trong tế bào đảm bảo cho sự liên quan giữa tế bào sau chuyển gen với tế bào gan (Xu et al., 2014). Hiện nay, trên thế giới vẫn chưa có công trình công bố chính thức vào về việc biệt hóa thành tế bào gan hoàn chỉnh nhờ chuyển CDS của gen *HNF-4a*. Tất cả mới đang chỉ dừng lại ở mức độ ban đầu, vậy nên cần tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tế bào sau chuyển gen, theo dõi, đánh giá sự phát triển của hình thái của tế bào dưới kính hiển vi cho đến khi hình thành được một tế bào gan hoàn chỉnh với đầy đủ các chức năng chuyên biệt. Thêm vào đó, một số marker chỉ thị đặc trưng cho tế bào gan cũng cần được chạy RT-PCR để kiểm tra sự biểu hiện trong tế bào sau khi nuôi cấy chuyển gen từ 3 tuần cho đến 1 tháng và so sánh với đối chứng dương là các marker tương ứng trong tế bào gan người bình thường.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế được vector biểu hiện mang yếu tố phiên mã *HNF-4a*, từ đó đã thành công trong bước đầu biệt hóa TBGTM cuồng rốn thành tế bào gan thông qua chuyển vector biểu hiện vào tế bào gốc. Ngoài ra, thông qua phương pháp PCR phiên mã ngược, các marker chỉ thị đặc trưng của TBGTM cuồng rốn và đặc biệt của tế bào gan là *HNF-4a* và *AFP* được tiến hành kiểm tra đều có biểu hiện trong tế bào sau chuyển gen.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được lấy kinh phí từ đề tài: "Derivation of hepatocyte-like cells from human umbilical cord matrix stem cell by *HNF-4a*

transfection" do quỹ TWAS, và đề tài nghiên cứu cơ sở cấp cho TS. Nguyễn Văn Hạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45: 1229-1239.
- Cantz T, Manns MP, Ott M (2008) Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res* 331: 271-282.
- Chang HL, Senaratne TN, Zhang L, Szotek PP, Stewart R, Dombkowski D, Pfeffer F, Donahoe PK, Teixeira J (2010) Uterine leiomyomas exhibit fewer stem/progenitor cell characteristics when compared with corresponding normal myometrium. *Reprod Sci* 17: 158-167.
- Chen ML, Lee KD, Huang HC, Tsai YL, Wu YC, Kuo TM, Hu CP, Chang C (2010) HNF-4alpha determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *World J Gastroenterol* 16: 5092-5103.
- Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R (2013) Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol* 28: 1235-1244.
- Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Haraprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A (2009) Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol* 90: 261-269.
- Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, Ikeda R, Terabayashi K, Matsumi Y, Gonda K, Okamoto H (2008) Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology* 48: 597-606.
- La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasa L, Cappello F (2009) Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131: 267-282.
- Miki T (2011) Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2: 25.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe FA, Gifford DK (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381.
- Ren HY, Zhao QJ, Xing W, Yang SG, Lu SH, Ren Q, Zhang L, Han ZC (2010) Differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into low

immunogenic and functional hepatocyte-like cells in vitro]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 32: 190-194.

Saragaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE (2009) Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One* 4: e6498.

Seo SI, Kim SS, Choi BY, Lee SH, Kim SJ, Park HW, Kim HS, Shin WG, Kim KH, Lee JH (2013) Clinical significance of elevated serum alpha-fetoprotein (AFP) level in acute viral hepatitis A (AHA). *Hepatology* 60: 1592-1596.

Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y (2009) ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant* 18: 381-389.

Tuch BE (2006) Stem cells—a clinical update. *Aust Fam Physician* 35: 719-721.

Xu JB, Qi FZ, Xu G, Chen GF, Qin LX, Zhang JH (2014) Value of alpha-fetoprotein and clinical characteristics in patients with liver neoplasm. *Neoplasia* 61: 218-224.

INITIAL ON GUIDED DIFFERENTIATION OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS INTO HEPATIC CELLS THROUGH TRANSCRIPTION FACTOR *HNF-4a*

Le Bac Viet¹, Nguyen Huy Hoang¹, Nguyen Thanh Nga¹, Vi Dai Lam², Nguyen Van Hanh²

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

According to World Health Organization (WHO), there are approximate 8 millions people suffering from hepatitis B or hepatitis C in Vietnam currently. Chronic hepatitis B is the main reason causing liver diseases in Vietnam such as cirrhosis and liver cancer. Along side with ordinary drug treatment therapies, transplanting stem cells orientating liver cells is a novel method which is being investigated for further applications. In all kinds of stem cells, umbilical cord stem cell is a various, abundant and available source which does not violate biomedical ethics. In this study, to initially differentiate umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatic cells, we transfected coding sequence of the *HNF-4a* gene – a transcription factor for more than 100 genes in liver cell into umbilical cord stem cells through expression vector pCMV-EGFP. Moreover, the expression at molecular level of specific molecular markers for mesenchymal stem cell such as *CD86*, *CD90*, *CD105*, *CD73*... were evaluated. Results after transfection displayed *HNF-4a* and all mesenchymal stem cell markers presented in stem cell based on reverse transcription-PCR method. The achievement of this study has established a new research trend which possesses big significances in treatment liver-related diseases for patients.

Keywords: Differentiation, gene transfection, hepatic cells, *HNF-4a*, pCMV-EGFP, umbilical cord stem cells, RT-PCR