

QUÁ TRÌNH BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ THÀNH TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO GAN BẰNG CÂY DƯỘC LIỆU NÚC NÁC *Oroxylum indicum* (L.)

Đặng Thị Thu Hà*, Nguyễn Thị Tâm, Thân Trọng Nhã Khuê

Trường Đại học Khoa Học Huế

Email: dangthithuha2805@gmail.com

Ngày nhận bài: 24/4/2023; ngày hoàn thành phản biện: 26/4/2023; ngày duyệt đăng: 4/12/2023

TÓM TẮT

Gần đây, đã có nhiều công bố cho rằng, các tế bào gốc trung mô có thể thay đổi các kiểu hình đặc trưng trong một số điều kiện biệt hoá thích hợp và chúng được lập trình lại để chuyển biệt hóa thành các tế bào của các lớp mô khác. Quá trình chuyển biệt hóa được gọi là "sự mềm dẻo của tế bào gốc". Tế bào gốc trung mô, hiện diện trong các mô khác nhau, bao gồm cả tủy xương, ngoài việc biệt hóa thành xương, sụn, cơ trơn và cơ xương, được cho là có khả năng chuyển biệt hóa thành tế bào da, gan, tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô từ dây rốn thành tế bào tương tự tế bào gan dưới ảnh hưởng của cao chiết từ cây Núc Nác *Oroxylum indicum*. Bằng phương pháp GC-MS chúng tôi đã định danh và xác định 17 chất hiện diện trong cao chiết cây Núc Nác, trong đó có 76,5% các chất có đặc tính bảo vệ gan. Cao chiết Núc Nác ở nồng độ 100 µg/ml có bổ sung 5µg/ml HGF có khả năng chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tương tự tế bào gan.

Từ khóa: Tế bào gốc trung mô, biệt hóa tế bào gan, Núc Nác, *Oroxylum indicum* (L.).

1. MỞ ĐẦU

Các bệnh lý về gan là gánh nặng kinh tế rất lớn trên toàn cầu, ung thư gan xếp thứ sáu trên thế giới và thứ nhất ở Việt Nam. Đến năm 2040, số ca mắc hoặc tử vong do ung thư gan sẽ tăng hơn 50% nếu thế giới không nỗ lực hơn nữa để phòng ngừa [1]. Sự thiếu hụt nghiêm trọng nguồn gan hiến tặng để điều trị suy gan giai đoạn cuối cho thấy nhu cầu cấp thiết về các lựa chọn điều trị thay thế. Tế bào gốc giúp ức chế quá trình xơ gan, giảm viêm gan, tăng kích thước mô gan khỏe mạnh, thúc đẩy quá trình tự phục hồi. Khi đi vào gan, tế bào gốc có thể biệt hóa thành tế bào gan khỏe mạnh hoặc có thể dung hợp với tế bào gan cũ để tái tạo tế bào gan. Đồng thời tế bào gốc tiết các

cytokine chống viêm, điều hòa miễn dịch, từ đó kích thích quá trình tự tái tạo của gan. Các tế bào tương tự tế bào gan có nguồn gốc từ các tế bào gốc khác nhau cũng là nguồn tế bào tiềm năng cho hỗ trợ bệnh lý gan.

Cao chiết từ Núc Nác *Oroxylum indicum* (L.) chứa nhiều chất chống oxy hóa, chống viêm, kháng nấm, chống ung thư, kháng khuẩn, bảo vệ thần kinh và thúc đẩy sửa chữa mô gan, tổn thương thận do thuốc, giảm viêm gan, bảo vệ gan, trị đái tháo đường, chống viêm khớp, chống tăng lipid máu và chống béo phì trong cả nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* [11]. Việc sử dụng các hợp chất khác nhau từ Núc Nác *O. indicum* (L.) để hỗ trợ khả năng chuyển biệt hoá tế bào gốc trung mô thành tế bào tương tự tế bào gan nhằm cung cấp bằng chứng khoa học hỗ trợ tiềm năng trị liệu của cây Núc Nác đối với các mục đích sử dụng cây thuốc cổ truyền và định hướng cho nghiên cứu trong tương lai để tạo điều kiện khai thác thương mại.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng phương pháp nghiên cứu

- Dây rốn thu nhận tại Khoa Sản-Bệnh viện Trung Ương Huế được sự đồng ý của bệnh viện, bác sĩ và gia đình. Tuổi thai phụ từ 18-30 tuổi, không mắc các bệnh truyền nhiễm.

- Vỏ thân cây Núc Nác được thu hái từ tháng 11 năm 2022 tại Nghệ An, Việt Nam.



Hình 1: Vỏ thân cây Núc Nác

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và nuôi tăng sinh tế bào gốc từ thạch Wharton dây rốn theo Naimisha Beeravolu và cs (2017) [4]. Nuôi sơ cấp: 6-8 mảnh/chai T-flask 25cm² trong StemMACS Expansion Media Kit XF(Đức) + 10% FBS + 1% kháng sinh. Nuôi thứ cấp: khi tế bào đạt 70-80% bề mặt chai, tách tế bào bằng Trypsin/EDTA 0,25% và mật độ 1000 tế bào/cm². Thay môi trường 2 lần/tuần.

Nuôi tạo cụm CFU-Fs theo phương pháp Patrice Penfornis và Radhika Pochampally (2016) [9] khi kết thúc giai đoạn cấy chuyển P3. Nuôi tạo cụm CFU-F với mật độ 100 tế bào/cm²/ chai T25. Một cụm CFU-F được xác định là cụm có đường kính lớn hơn 1mm hoặc số lượng tế bào lớn hơn 50. Sau 7-10 ngày, nhuộm các cụm với H&E (Hematoxyline-Eosyn) để quan sát hình thái và đếm số lượng cụm.

Xác định marker bề mặt: Xác định đặc tính tế bào bằng máy FACS CANTO II và bộ kit Sigma (Mỹ). Sử dụng các kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang để phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên trên bề mặt và trong tế bào, từ đó cung cấp thông tin về kiểu hình miễn dịch và tỷ lệ của các quần thể tế bào trước khi biệt hoá.

Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành xương, sụn, mỡ bằng bộ kit biệt hóa của HyClone (Mỹ). TBG trung mô sau cấy chuyển P3, tiến hành nuôi trong môi trường có các chất cảm ứng đặc hiệu để biệt hóa thành nguyên bào xương, tế bào sụn, tế bào tạo mỡ. Khi tế bào trong chai đạt mật độ 80%, tiến hành sử dụng bộ kit của HyClone để biệt hóa.

HyClone™ AdvanceSTEM™ Osteogenic Differentiation Kit dùng để biệt hoá xương. HyClone™ AdvanceSTEM™ Chondrogenic Differentiation Kit dùng để biệt hoá sụn. HyClone™ AdvanceSTEM™ Adipogenic Differentiation Kit dùng để biệt hoá mỡ.

Quy trình tách chiết cao chiết Núc Nác: Vỏ thân cây Núc Nác rửa sạch, cắt nhỏ và sấy ở 40°C. Xay ở dạng bột mịn, ủ ethanol 96°/ 24h, tỷ lệ 1:10 (W/V) ở nhiệt độ phòng. Thu dịch lọc và cô cạn ở nhiệt độ 50°C đến khi mẫu sánh, màu vàng sẫm, còn lại 5% dung môi. Cao chiết được thu nhận và bảo quản ở 4°C [7].

Phân tích thành phần của Núc Nác bằng phương pháp GS-MS bằng máy sắc ký khí - phối phổ GC-MS tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Thừa Thiên Huế.

Đếm tế bào lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình. Mật độ tế bào được xác định bằng công thức: $Số\ tế\ bào/mL = A \times 10.000 \times 25 \times n$ (A: số tế bào trung bình trong 5 ô, n: độ pha loãng).

Nuôi tế bào với cao chiết Núc Nác: loại bỏ môi trường nuôi cấy và thay môi trường mới. Tế bào được xử lý với Oroxylum icdicum pha loãng 2 lần nối tiếp (50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml) trong 24h [36]. Sau khi xử lý, các tế bào ở tất cả các nhóm được nhuộm theo phương pháp của Çelik Uzuner S (2018) [5].

Chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô dây rốn thành tế bào tương tự tế bào gan:

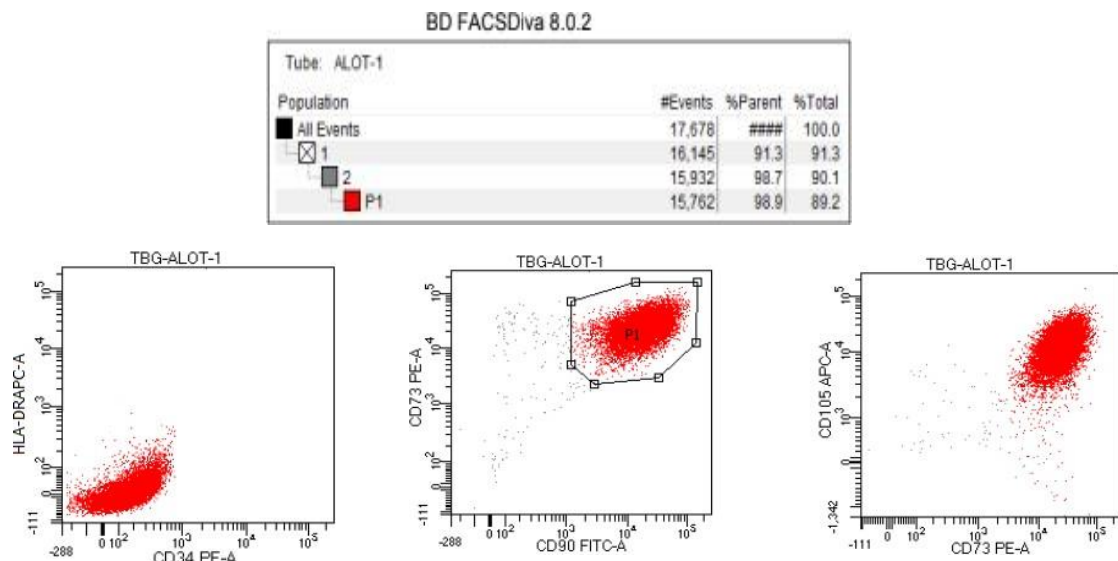
Tiến hành thí nghiệm khi tế bào ở giai đoạn P3, mật độ nuôi 2x10⁴ tế bào/cm²/T25, thử nghiệm với 4 nghiệm thức như sau:

- Nghiệm thức 1: StemMACS +10% FBS +1% kháng sinh (Lô đối chứng)
- Nghiệm thức 2: StemMACS +10% FBS +1% kháng sinh + 100µg/ ml cao chiết Núc Nác.
- Nghiệm thức 3: StemMACS +10% FBS +1% kháng sinh + 5µg/mL HGF.
- Nghiệm thức 4: StemMACS +10% FBS +1% kháng sinh+ 100µg/ ml cao chiết Núc Nác +5µg/mL HGF

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

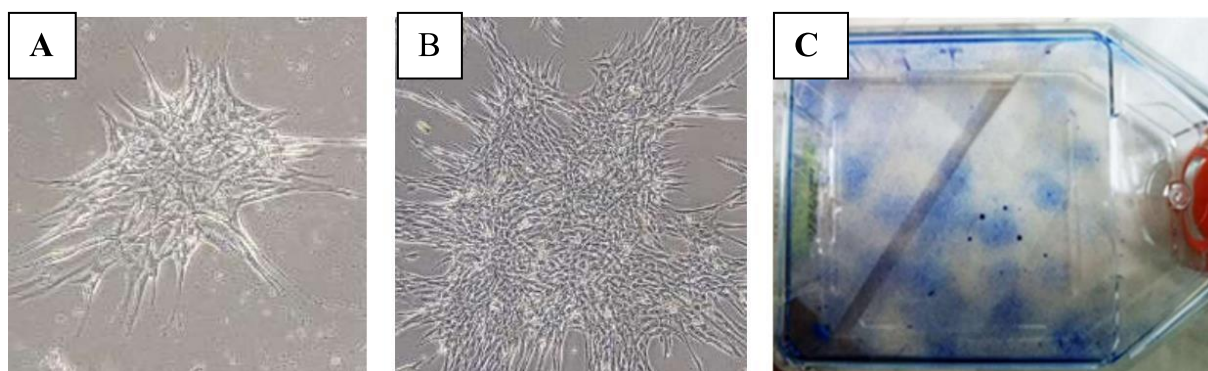
3.1. Phân lập và đánh giá chất lượng tế bào gốc trung mô

Nuôi sơ cấp 17-20 ngày và tiếp tục nuôi thứ cấp P1, P2 để tạo quần thể tế bào tương đối đồng nhất. Đánh giá các marker bề mặt tế bào bằng kháng thể đơn dòng, âm tính với CD34, HLA, đồng thời dương tính với CD90, CD105, CD73 > 98%. Kết quả FACS của chúng tôi tương đồng với *Chui-Yee Fong et al* (2007) về biểu hiện marker bề mặt của tế bào trung mô dây rốn, dương tính với CD90, CD105 và âm tính với CD34, HLA [6].



Hình 2: Kết quả xác định marker bề mặt của tế bào gốc trung mô

Kết quả nuôi cấy tạo cụm CFU-F: Trong *in vitro* tế bào gốc trung mô với khả năng bám dính có hình dạng tương tự nguyên bào sợi nhưng là một quần thể không đồng nhất của các tế bào tiền thân. Vì vậy sau khi nuôi tăng sinh cần đánh giá khả năng tạo cụm (CFU-F), đây là một trong những tiêu chuẩn quan trọng để xác định chất lượng tế bào gốc trung mô.



Hình 3: Kết quả nuôi tạo cụm CFU-F

A: Cụm CFU-F 3 ngày; B: Cụm CFU-F 10 ngày;

C: Quan sát cụm CFU-F bằng mắt thường sau 10-14 ngày.

Vì tế bào gốc trung mô trong điều kiện nuôi *in vitro* là một quần thể tế bào gốc không đồng nhất, vì vậy việc xác định tế bào gốc trung mô có chứa các tập hợp con tế bào duy nhất có chức năng đặc biệt. Bằng kỹ thuật nuôi cụm nguyên bào sợi trong chai nuôi T- flask 25 cm² với mật độ 100 tế bào/cm². Sau 3-5 ngày, các tế bào gốc trung mô bắt đầu phân chia và hình thành những cụm nhỏ xung quanh tế bào mẹ ban đầu. Sau 10-14 ngày, các cụm CFU-F đã hình thành với số lượng tế bào 50-70/cụm và đường kính hơn 1mm.

Khi nhuộm, các cụm CFU-F bắt màu đậm tạo thành các đốm lớn trên chai nuôi và có thể quan sát bằng mắt thường. Các tế bào mô trung mô tăng sinh trong *in vitro* thể hiện các đặc tính khác nhau khi được nuôi bằng các phương pháp khác nhau và các môi trường nguồn nguyên liệu khác nhau. Như vậy, với kết quả tạo cụm CFU-F thu được trong nghiên cứu này, cho thấy tế bào thể hiện các đặc tính của tế bào gốc trung mô.

Bảng 1: Bảng số liệu số lượng và cụm tế bào ở các ngày khác nhau.

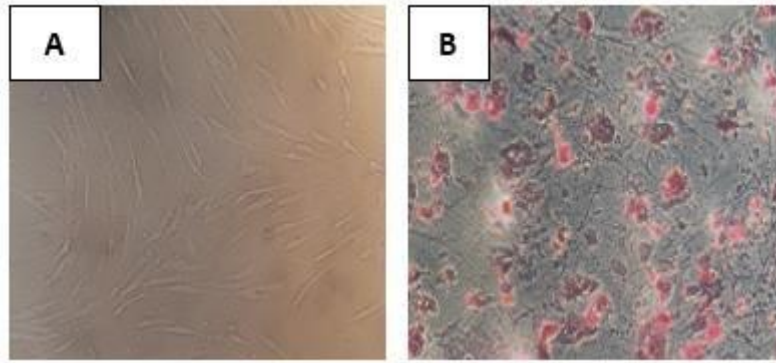
Ngày	Số cụm	Số lượng tế bào
3-5	9	8 ± 2
7-10	12	50 ± 5

Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào xương, sụn, mỡ: Xác định khả năng biệt hóa tế bào gốc trung mô thành các dạng tế bào thuộc dòng trung mô như tế bào xương, sụn và mỡ. Việc xác định tiềm năng, tính mềm dẻo của tế bào là cần thiết trước khi tiến hành nghiên cứu chuyển biệt hóa các tế bào gốc trung mô từ lớp thạch Wharton của dây rốn.

Biệt hóa thành nguyên bào xương: Sau 9-11 ngày bổ sung môi trường cảm ứng biệt hóa, hình thái tế bào chuyển thành dạng tế bào nguyên bào xương, dưới tác động

của yếu tố tăng trưởng, các tế bào gốc trung mô có sự tích tụ ion calcium trong tế bào chất, việc cung cấp các chất cảm ứng đã tác động và kích thích sự biệt hóa.

Calcium được tích tụ nhiều dần theo thời gian và chuyển đổi kiểu hình các tế bào gốc trung mô sang nguyên bào xương. Kết quả được thể hiện khi nhuộm tế bào với thuốc nhuộm Alizarin Red, các ion calcium bắt màu đỏ với thuốc nhuộm.



Hình 4: Sự biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào xương

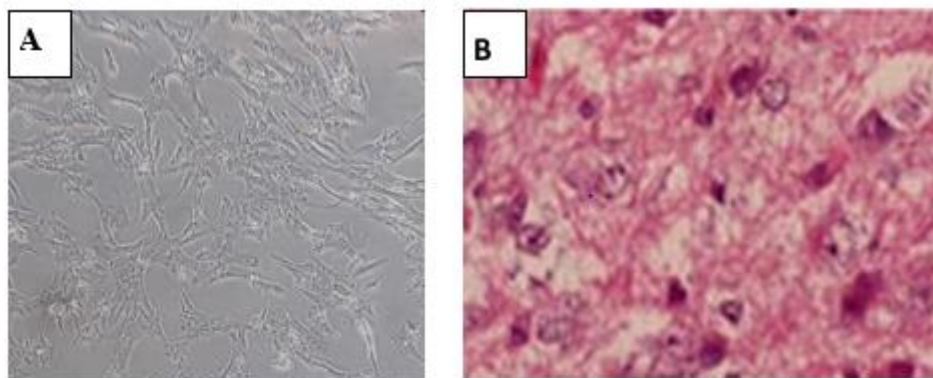
A: trước khi biệt hóa (x10)

B: Tế bào có dạng nguyên bào xương sau khi biệt hóa (x10)

Kết quả biệt hóa tế bào thành dạng nguyên bào xương của chúng tôi tương tự với Penolazzi và cs (2009) [10], Allahbakhshi và cs (2013) [3].

Biệt hóa thành tế bào sụn

Sau khi 14 ngày nuôi cấy trong môi trường biệt hóa, có sự thay đổi về hình thái (Hình 5A). Sau khi nhuộm bằng Alizarin Red, các tế bào bắt màu đỏ như hình dưới (Hình 5B).



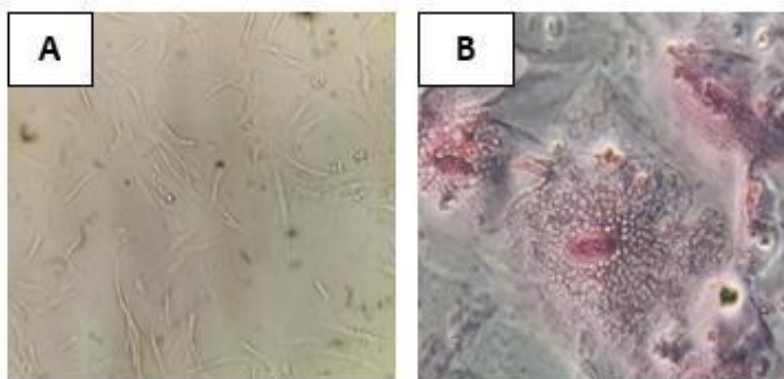
Hình 5. Sự biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào sụn

A: Tế bào gốc trung mô biệt hóa thành dạng tế bào sụn trước khi nhuộm (x10) ;;

B: Tế bào gốc trung mô biệt hóa thành dạng tế bào sụn sau khi nhuộm (x40)

Biệt hóa thành tế bào mỡ

Ở ngày thứ 10 sau khi bổ sung chất cảm ứng biệt hóa, bắt đầu xuất hiện các chấm là giọt mỡ tích tụ dần trong tế bào chất. Các giọt mỡ nhỏ ngày càng nhiều và có xu hướng tích tụ, góp thành giọt mỡ lớn vào ngày thứ 21. Sử dụng thuốc nhuộm Oil red là thuốc nhuộm lipid, nó chỉ hòa tan trong lipid và tạo màu đỏ. Các tế bào mỡ bắt màu đỏ khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil Red. Điều này cho thấy các tế bào gốc trung mô đã được cảm ứng biệt hóa thành dạng giống tế bào mỡ và kết quả được trình bày ở Hình 6.



Hình 6: Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào mỡ

A: Tế bào gốc trung mô trước khi biệt hóa

B: Tế bào giống tế bào mỡ sau khi biệt hóa được nhuộm Núc nácl red

3.2. Kết quả GC-MS của cao chiết Núc Nác

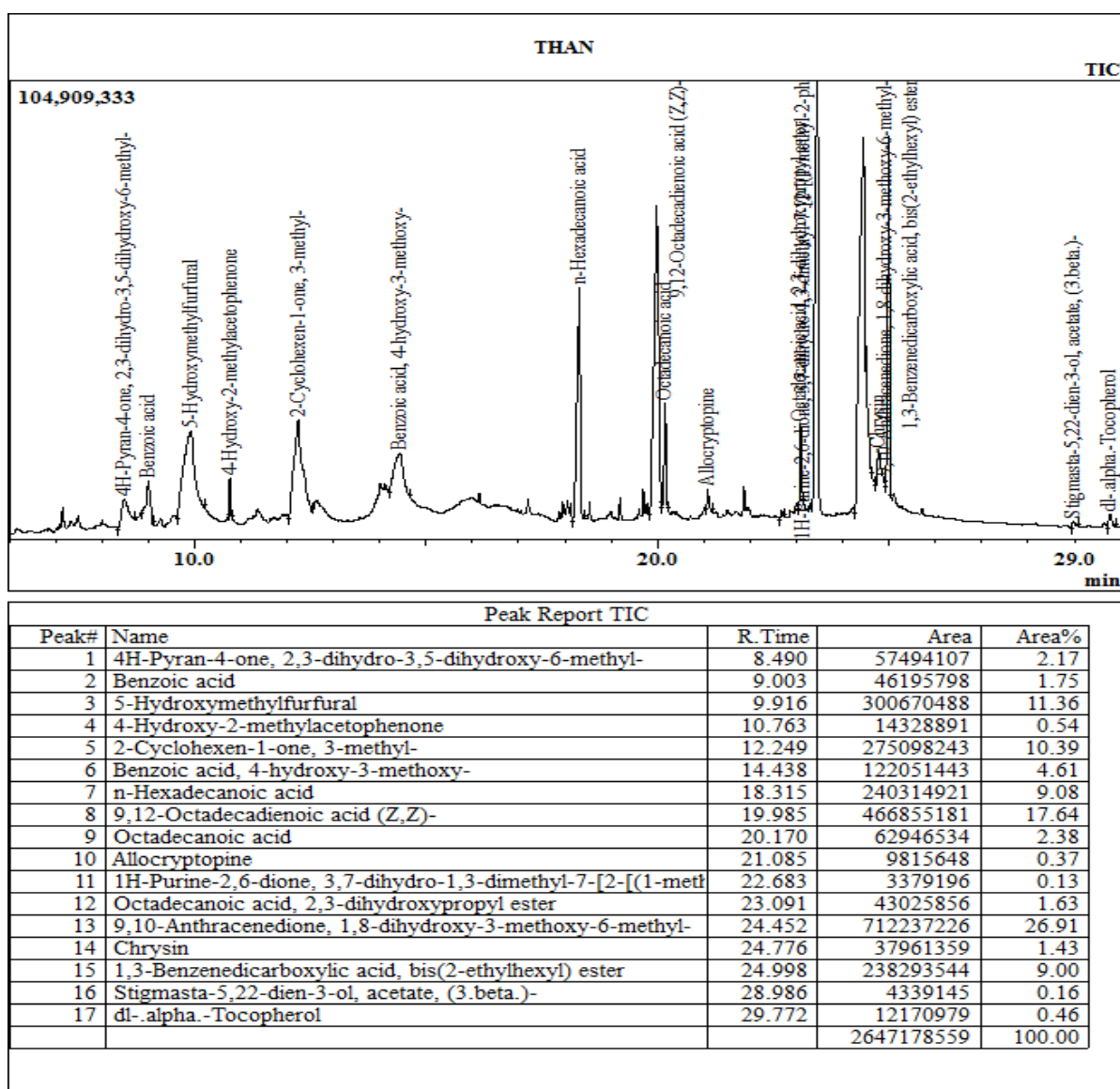
Từ kết quả GC-MS chúng tôi xác định được 17 hợp chất bằng dung môi Ethanol. Cao chiết bằng Ethanol chứa các hợp chất tiêu biểu như 9,10-Anthracenedione-1,8- dihydroxy-3- methoxy-6-methyl (26,91%), 9,12 Octadecanoic acid (17.64%), 5-Hydroxymethylfurfural (,36%), 2-Cyclohexen-1-one-3-methyl (10,39%), n-Hexadecanoic acid (9,08%)...

Theo Yomica L. Powder, hợp chất 9,10-Anthracenedione-1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl chiếm tỷ lệ lớn nhất (26,91%) trong cao chiết có tác dụng chống ung thư, chống viêm, kháng khuẩn và bảo vệ gan. Ngoài ra, chất này được sử dụng trong điều trị viêm gan, xơ gan và ung thư và đã cho thấy cải thiện chức năng gan [2].

5- Hydroxymethylfurfural (11,36%) là một andehyde thơm, tồn tại trong cà phê, trái cây sấy khô... Bên cạnh đó, hợp chất này còn có tác dụng chống oxy hóa và gây ra quá trình apoptosis ở các dòng tế bào u ác tính [3].

Hợp chất 9,12 Octadecanoic acid (17.64%) và n- Hexadecanoic acid (9,08%) là các acid béo có tác dụng chống oxy hóa mạnh và ức chế đa dạng vi sinh vật, ức chế tế bào ung thư vú, ung thư gan... nhờ tham gia vào quá trình apoptosis [13].

Trong cao chiết này, chúng tôi cũng nhận thấy rằng có 76,5% các chất (4H-Pyran-4-one- 2, 3-dihydro-3,5 dihydroxy-6-methyl; Benzoic acid; 5-Hydroxymethylfurfural ;4-Hydroxy- 2-methylacetophenone; Benzoic acid, 4 hydroxyl-3 -methoxy, n- Hexadecanoic acid; Allocryptopine; 1,8 - dihydroxy -3-methoxy-6-methyl - 9,10 - Anthracenedione; dl- alpha- Tocopherol; 9,12 -Octadecadienoic, chrysin) [7], [8], [11], [12] đặc tính bảo vệ gan và điều trị gan, bao gồm chống xơ hóa, chống viêm, chống virus và chống ung thư gan . Bên cạnh đó, một số nghiên cứu gần đây cho thấy các chất như chrysin và 9,10-Anthracenedione-1,8- dihydroxy-3-methoxy-6-methyl kích hoạt các con đường tín hiệu AMPK/PI3K, Wnt để bảo vệ gan [13].



Hình 7: Thành phần hóa học của cao chiết ethanol của thân cây Núc Nác

3.3. Khảo sát khả năng chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô từ cưỡng rốn thành tế bào tương tự tế bào gan từ cao chiết Núc Nác

Các công trình nghiên cứu mới trên thế giới cho thấy một số hợp chất hoạt tính sinh học từ thực vật làm tăng tốc độ tái tạo mô, biệt hóa tế bào gốc và điều hòa miễn dịch... các hợp chất từ thực vật đóng vai trò là chất trung gian có hoạt tính sinh học trong việc điều chỉnh tốc độ phân bào và biệt hóa tế bào thông qua các con đường tín hiệu phức tạp như BMP2, Runx2 và Wnt. Từ các kết quả nghiên cứu hiện đại về được lý của cây Núc Nác đã cung cấp bằng chứng khoa học ở mức độ phân tử về khả năng hỗ trợ hiệu quả điều trị bệnh gan của y học truyền thống. Tuy nhiên, vấn đề sử dụng cao chiết cây Núc Nác để biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào gan vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu.

Với lý do trên, chúng tôi tiến hành nuôi với mật độ 2×10^4 tế bào/cm², bổ sung môi trường cảm ứng biệt hóa theo 4 nghiệm thức.

Hiện tại, các giao thức biệt hóa tế bào gốc ở gan được tối ưu hóa dựa trên các tín hiệu hóa học hòa tan được đưa vào môi trường nuôi cấy và tế bào sau quá trình biệt hóa thường giữ lại kiểu hình chưa trưởng thành. Để thúc đẩy sự biệt hóa và trưởng thành của gan hơn nữa, các vật liệu sinh học có thể được thiết kế để tái hấp thu các tương tác chất nền ngoại bào của tế bào ở cả hai cấu hình 2D và 3D đã được áp dụng cho nghiên cứu quá trình biệt hóa gan và nêu bật vai trò của chúng trong việc trình bày các dấu hiệu sinh hóa đối với các nguồn tế bào gốc khác nhau.

Quan sát và theo dõi liên tục trong suốt quá trình biệt hóa đến ngày thứ 21, chúng tôi nhận thấy:

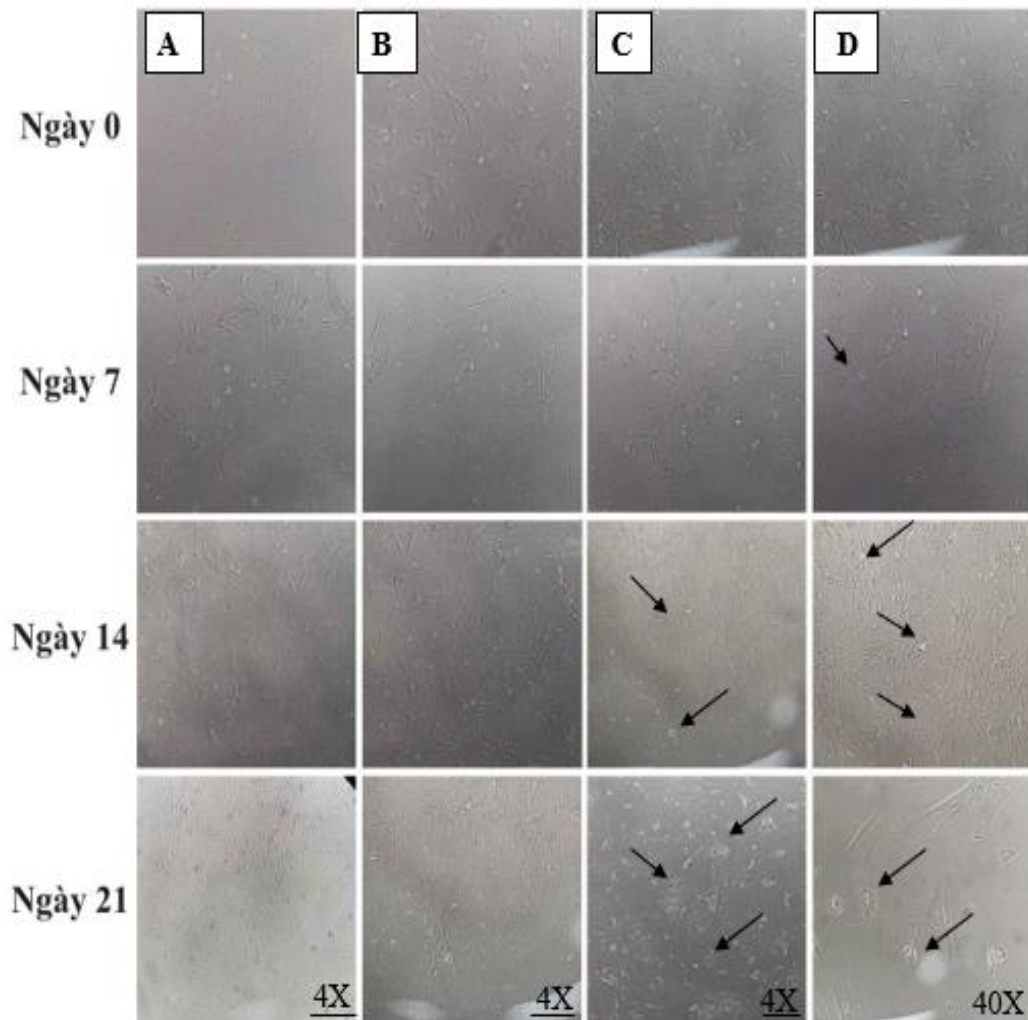
- Nhóm 1: Đối chứng: Tế bào gốc trung mô P3 nuôi với môi trường StemMASC +1% kháng sinh, mật độ tế bào đạt 80% chai nuôi, hình thái tế bào thon dài và nhọn dần về phía hai đầu, 100% các tế bào vẫn giữ nguyên hình thái đặc trưng của nguyên bào sợi.

- Nhóm 2: Tế bào gốc trung mô P3 nuôi với môi trường StemMASC + 1% kháng sinh + cao chiết núc nác ở nồng độ 100µg/mL. Một số vi trường xuất hiện 30% quần thể tế bào có dạng co lại, mất dần hình thái đặc trưng nguyên bào sợi.

- Nhóm 3: Tế bào gốc trung mô P3 nuôi với môi trường StemMASC + 1% kháng sinh + HGF ở nồng độ 5µg/mL. Diện tích quần thể tế bào gốc trung mô mất dần hình thái đặc trưng nguyên bào sợi và chuyển sang kiểu tế bào tròn oval chiếm khoảng 30% diện tích bề mặt.

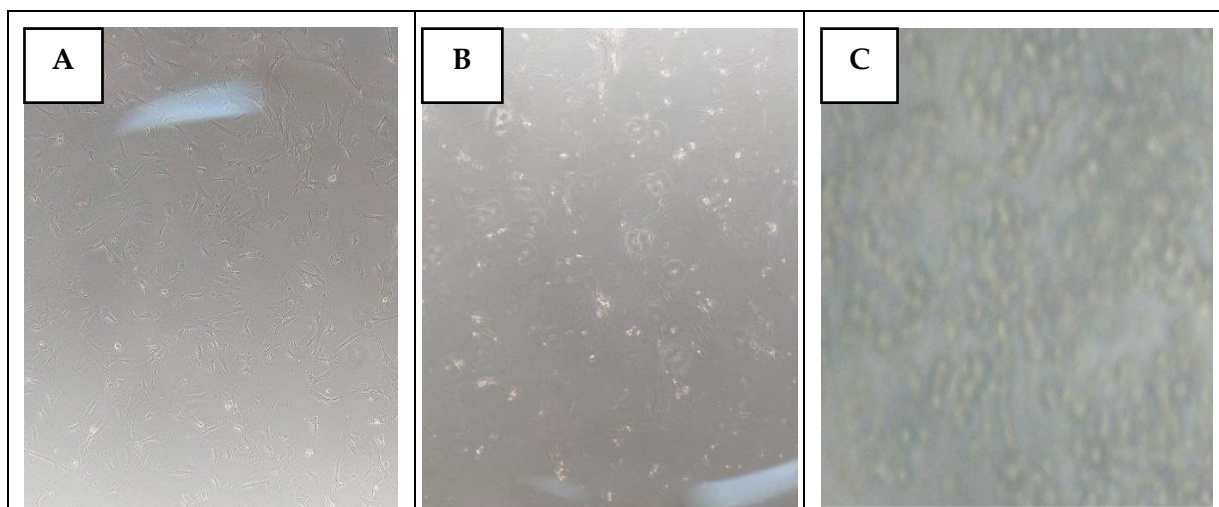
- Nhóm 4: Tế bào gốc trung mô P3 nuôi với môi trường StemMASC+ 100µg/ ml cao chiết núc nác +5µg/mL HGF. Dấu hiệu hình thái đặc trưng các dạng tế bào nguyên bào sợi giảm rõ rệt, đa phần diện tích bề mặt toàn chai nuôi là các tế bào tròn, oval, đa

giác. Đặc biệt sau 14 ngày xuất hiện một vài tế bào có nhân và hình bầu dục. Có thể lý giải rằng ở nghiệm thức này, khi bổ sung của các hợp chất từ cao chiết Núc Nác và yếu tố tăng trưởng tế bào gan, đồng thời HGF còn đóng vai trò thúc đẩy sự phát triển mô ba chiều, sự kết hợp của cả 2 yếu tố này đã hỗ trợ thúc đẩy quá trình chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào giống tế bào gan thông qua tác dụng hiệp đồng và tương tác với các chất đặc hiệu thông qua giai đoạn trao đổi chất, các hợp chất từ cao chiết Núc Nác tương tác với tế bào nhờ các thụ thể trên màng sinh học để định hướng, điều chỉnh thúc đẩy quá trình chuyển biệt hóa.



Hình 8: Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô từ cuống rốn thành tế bào giống tế bào gan từ cao chiết Núc Nác sau 2-3 tuần

A: Nhóm đối chứng; B: Nhóm 2: Tế bào sau khi cấy chuyển được nuôi trong môi trường stemMAC có bổ sung 1% kháng sinh + cao chiết núc nác ở nồng độ 100µg/ mL ; C: Nhóm 3: Tế bào sau khi cấy chuyển được nuôi trong môi trường stem MAC có bổ sung 1% kháng sinh + HGF ở nồng độ 5µg/mL; D: Nhóm 4: Tế bào sau khi cấy chuyển được nuôi trong môi trường stem MAC có bổ sung cao chiết núc nác ở nồng độ 100µg/ ml +5µg/mL HGF.



Hình 9: Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô từ cuống rốn thành tế bào giống tế bào gan từ cao chiết Núc Nác sau 3-4 tuần.

A: Đối chứng; B. Tế bào biệt hóa sau 21 ngày; C. Tế bào biệt hóa sau 30 ngày

Sau 21 ngày, sự co thắt tế bào chất tiến triển hơn nữa và số lượng tế bào hình bầu dục tăng lên trong nuôi cấy. Hầu hết các tế bào trở thành hình bầu dục hoặc tròn nhỏ. Tuy nhiên, các tế bào sau khi biệt hóa có hình thái chỉ tương tự tế bào gan, một số tế bào có dạng đa giác.

Như vậy trong môi trường biệt hóa này, chúng tôi sử dụng các hợp chất sinh học được chiết xuất từ cao chiết Núc Nác có tác dụng trong sự định hướng thành tế bào gan thông qua kích hoạt con đường tín hiệu PI3K-Akt bằng các chất chrysin; 9,10-Anthracenedione-1,8- dihydroxy-3-methoxy-6-methyl từ cao chiết Núc Nác [13]. Với mục đích làm cho quần thể tế bào gốc không còn giữ tính gốc - những đặc tính gốc ban đầu giảm và ngừng phân chia tăng sinh tế bào. Yếu tố định hướng bổ sung vào sẽ tham gia vào quá trình trao đổi chất, điều hòa quần thể biệt hoá thành các tế bào chuyên biệt, cụ thể các tế bào gốc trung mô không còn duy trì kiểu hình nguyên bào sợi. Các tế bào biểu hiện hình thái gần giống với tế bào gan người. Điều này đã dẫn đến câu hỏi liệu có nên cung cấp thêm tín hiệu để cải thiện hơn nữa quá trình khác biệt hóa hay không.

Khoảng 111 hợp chất đã được tách ra từ Núc Nác, đa số chứa các hợp chất như flavonoid, pterocarpan, naphthoquinones, anthraquinone, glycoside phenylethanoid và cyclohexylethanoids, trong đó flavonoid chiếm hàm lượng lớn.

Năm 2018, Mai Nagasaka và cs chỉ ra rằng chrysin chiết xuất từ vỏ thân cây Núc Nác có tác dụng ức chế sự tiến triển của ung thư biểu mô tế bào gan thông qua việc ngăn chặn sự biểu hiện của phối tử p53 bằng con đường ATM-Chk2 [8]. Bên cạnh đó, Sushree Sangita Mohapatra và cs đã chỉ ra rằng cao chiết ethanol 70% của vỏ thân

Núc Nác làm giảm huyết thanh, ALT, ALP, γ -glutamyltransferase (GGT) và tổng lượng bilirubin ở những ngày sau điều trị khác nhau ở chuột Wistar được điều trị bằng carbon tetrachloride [12]. Với thời gian nuôi cùng chất định hướng trong 3-4 tuần, kết quả các tế bào tiến dần đến sự thay đổi kiểu hình. Kết quả cũng được Xin-Qin Kang và cs mô tả khi biệt hóa tế bào gan: sự co thắt tế bào chất tiến triển hơn nữa sau 2 tuần và hầu hết các tế bào trở thành các tế bào tròn nhỏ rất giống với hình bầu dục [14].

Hiện nay, trên thế giới vẫn chưa có công trình công bố chính thức nào về việc biệt hóa tế bào gốc trung mô giống tế bào gan hoàn chỉnh nhờ kích hoạt gen HNF-4 α bằng các hợp chất sinh học đặc biệt là cây Núc Nác. Tất cả mới chỉ dừng lại ở mức độ ban đầu và đánh giá được lý của cây Núc Nác.

Vì vậy, cần tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tế bào sau chuyển gen, theo dõi, đánh giá sự phát triển 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 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 [11].

Trong thập kỷ qua, một loạt các giao thức đã được thiết lập để biệt hóa iPSC của người trưởng thành thành tế bào gan trong ống nghiệm, thông qua biểu hiện dựa trên virus của các yếu tố phiên mã gan, sử dụng các yếu tố tăng trưởng, các phân tử nhỏ, hoặc sự kết hợp khác nhau của các yếu tố tăng trưởng và các phân tử nhỏ để tóm tắt lại các con đường truyền tín hiệu chính liên quan đến các giai đoạn khác nhau của quá trình tạo gan ở phôi thai. Tuy nhiên, sự biệt hóa trực tiếp của tế bào gan vẫn còn nhiều thách thức. Mặc dù việc tạo ra các tế bào tương tự tế bào gan thành công đã đạt được thông qua các giao thức này, nhưng hiệu quả biệt hoá và khả năng tái tạo không phải là lý tưởng. Thông thường, quy trình biệt hóa cần được tối ưu hóa cho các dòng iPSC khác nhau bằng cách tinh chỉnh nồng độ của các yếu tố tăng trưởng hoặc phân tử nhỏ khác nhau và điều chỉnh thời gian điều trị. Quan trọng hơn, các tế bào biệt hóa cuối cùng đã được tiết lộ là bao gồm một quần thể không đồng nhất với các tế bào biểu hiện các mức độ trưởng thành khác nhau và đôi khi là các tế bào không đặc hiệu; điều này đã dẫn đến sự không chắc chắn đáng kể về giá trị tiềm năng của chúng trong các ứng dụng xuôi dòng. Để cải thiện độ tin cậy của công nghệ này, điều cần thiết là phát triển một hệ thống biệt hóa tế bào gan mạnh mẽ, hiệu quả cao, đồng nhất và có thể tái tạo. Thông thường, các tế bào gốc (TBG) được biệt hóa bằng cách đưa vào các tổ hợp tín hiệu hóa học như các yếu tố tăng trưởng hoặc các phân tử nhỏ để kích thích các TBG thành tế bào tương tự tế bào gan. Trong đó biệt hóa tế bào gan chủ yếu dựa vào việc sử dụng các yếu tố tăng trưởng để tái hấp thu các tín hiệu phát triển trong *in vitro*. Các yếu tố cảm ứng khác như cảm ứng cơ học, hợp chất hóa học cũng thúc đẩy sự biệt hóa của TBG.

Cần tiếp tục nghiên cứu xác định các dấu ấn miễn dịch bề mặt tế bào như dương tính CD99+, âm tính CD184–CD10– để khẳng định các tế bào tiền thân gan và theo dõi biểu hiện của enzyme chuyển hóa FAH trong quá trình biệt hóa tế bào gan.

4. KẾT LUẬN

Các tế bào gốc trung mô đã được phân lập và nuôi tăng sinh: Dương tính với CD105, CD73, CD90 và âm tính với CD34. Chúng có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, sụn, mỡ.

Đã bào chế thành công cao chiết Núc Nác *O. indicum* (L.) có chứa 76,5% thành phần các chất có đặc tính bảo vệ gan như 1,8 – dihydroxy -3-methoxy-6- methyl – 9,10 – Anthracenedione; dl- alpha- Tocopherol; 9,12 -Octadecadienoic, chrysin.

Cao chiết Núc Nác *O. indicum* (L.) ở nồng độ 100 µg/ml định hướng quá trình biệt hóa tế bào gốc trung mô. Nghiệm thức 100 µg/ml cao chiết Núc Nác kết hợp 5µg HGF có khả năng chuyển biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào có hình thái tương tự tế bào gan.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được hỗ trợ bởi Phòng Nghiên cứu Khoa học và Hợp tác quốc tế, Trường ĐH Khoa học, ĐH Huế. Chân thành cảm ơn Khoa Sản, Khoa Huyết học Xét nghiệm – Bệnh viện Trung Ương Huế đã hỗ trợ trong suốt thời gian nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ Y tế (2018), Dược điển Việt Nam, Nhà xuất bản Y học.
- [2]. Nguyễn Văn Hạnh, Vi Đại Lâm, Nguyễn Hữu Đức, Đỗ Trung Kiên, Nguyễn Việt Linh (2015), “Nghiên cứu tác động của DMSO trong biệt hóa tạo tế bào giống tế bào gan từ gốc cuống rốn”. *Tạp chí Sinh học*, 37(1se), 190-195.
- [3]. Allahbakhshi Elham, Hashemitabar Mahmoud, Shariati Mehrdad, Tabandeh Mohammad Reza, and SoLGI Ghasem (2013), Differentiation of the definitive endoderm from Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJMSC), *Journal of Biological Research*, 20 (1), pp.217-227
- [4]. Beeravolu Naimisha et al. (2017), Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from the human umbilical cord and fetal placenta, *JoVE*, 122, pp.e55224.
- [5]. Çelik Uzuner S. (2018). Development of a Direct Trypan Blue Exclusion Method to Detect Cell Viability of Adherent Cells into ELISA Plates. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilim Derg*, March, pp.99–104.

- [6]. Fong Chui Yee, Richards M, Manasi N, Biswas A, and Bongso A (2007), Comparative growth behavior and characterization of stem cells from human Wharton's jelly", *Reproductive Biomedicine Online*, 15 (6), pp.708-718.
- [7]. Hengpratom, T., Lowe, G. M., Thumanu, K., Suknasang, S., Tiamyom, K., & Eumkeb, G. (2018). *Oroxylum indicum*(L.) Kurz extract inhibits adipogenesis and lipase activity *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1-14.
- [8]. Nakahara, K., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., & Trakoontivakorn, G. (2001). Antimutagenic Activity against Trp-P-1 of the Edible Thai Plant, Núc nác Vent. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(10), 2358-2360.
- [9]. Penfornis Patrice and Pochampally Radhika (2016), *Colony forming unit assays*, Springer, Humana Press, New York, pp.159-169.
- [10]. Penolazzi Letizia et al. (2009), Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, *Reproductive Biology Endocrinology*, 7 (1), pp.106.
- [11]. Singh, V., & Chaudhary, A. K. (2011). A review on the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Oroxylum indicum* vent. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(5), pp.483.
- [12]. Sirovina, D., Oršolić, N., Končić, M. Z., Kovačević, G., Benković, V., & Gregorović, G. (2013). Quercetin vs chrysin: effect on liver histopathology in diabetic mice. *Human & Experimental Toxicology*, 32(10), pp.1058-1066.
- [13]. Sun, W., Liu, P., Yang, B., Wang, M., Wang, T., Sun, W., ... & Li, J. (2021). A network pharmacology approach: Inhibition of the NF- κ B signaling pathway contributes to the NASH preventative effect of an Núc nác seed extract in oleic acid-stimulated HepG2 cells and high-fat diet-fed rats. *Phytomedicine*, 88, 153498.
- [14]. Xin-Qin Kang et al (2005), Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes, *World J Gastroenterol*, 11(47), pp. 7461-7465.

**TRANS-DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS
UMBILICAL INTO HEPATOCYTE LIKE CELLS BY A TRADITIONAL
MEDICINAL HERB *Oroxylum indicum* (L.)**

Thu Ha Dang Thi*, Tam Thi Nguyen, Nha Khue Than Trong

University of Sciences, Hue University

Email: dangthithuha2805@gmail.com

ABSTRACT

It has been showed recently that mesenchymal stem cells can be reprogrammed to transdifferentiate into cells of different germ layers and tissues under appropriate conditions, hence losing their tissue- or germ layer-specific characteristics. The transdifferentiation process is referred to as "stem cell plasticity". In addition to differentiating into bone, cartilage, smooth muscle, and skeletal muscle, mesenchymal stem cells—which are found in a variety of tissues, including bone marrow—have also been reported to transdifferentiate into skin, liver, neurons, and glia. This study aims to evaluate the transdifferentiation potential of mesenchymal stem cells from to hepatocyte-like cells by a traditional medicinal herb under the influence of *Oroxylum indicum* (L.) extract. By the GC-MS method, 17 substances have been identified in the composite of *O. indicum* (L), of which 76.5% have hepatoprotective properties. The aqueous extract at a concentration of 100 µg/ml with the addition of 5 µg/ml HGF has the ability to transform mesenchymal stem cells into similar hepatocytes.

Keywords: Mesenchymal stem cell, hepatocyte differentiation, *Oroxylum indicum* (L).



Đặng Thị Thu Hà sinh ngày 28/05/2000 tại Thừa Thiên Huế. Hiện tại là sinh viên năm cuối chuyên ngành Công nghệ sinh học tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Tế bào gốc; sinh học phân tử; phân tích, đánh giá hàm lượng độc tính và các hoạt tính sinh học từ dược liệu lên hoạt động tế bào in vitro



Nguyễn Thị Tâm sinh ngày 25/02/2000 tại Quảng Nam. Hiện đang là sinh viên năm cuối hệ Kỹ sư chuyên ngành Công nghệ sinh học tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Tế bào gốc, tế bào ung thư và nghiên cứu các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật.



Thân Trọng Nhã Khuê sinh ngày 22/01/2000 tại Thừa Thiên Huế. Hiện đang là sinh viên năm cuối ngành Công nghệ sinh học tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học ứng dụng, tế bào gốc và nghiên cứu Exosomes.