

Tạo tế bào thần kinh tiết Orexin-A từ tế bào gốc vạn năng cảm ứng của người Việt Nam

Đặng Thị Minh Anh^{1,2}, Đỗ Minh Hiếu^{2,3}, Nguyễn Thị Hồng Nhung², Nguyễn Xuân Hưng^{2,4*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

³Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bách Khoa, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁴Khối Khoa học Sức khỏe, Trường Đại học VinUni, xã Đa Tốn, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/5/2023; ngày chuyển phân biện 10/5/2023; ngày nhận phân biện 30/5/2023; ngày chấp nhận đăng 5/6/2023

Tóm tắt:

Bệnh ngủ rũ tuýp 1 là hội chứng rối loạn thần kinh ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc kiểm soát giấc ngủ, gây ra bởi sự suy giảm số lượng tế bào thần kinh tiết Orexin. Mặc dù có ý nghĩa quan trọng đối với khoa học và đời sống, các nghiên cứu về bệnh thần kinh nói chung và bệnh ngủ rũ nói riêng vẫn bị hạn chế bởi việc không thể tiếp cận nguồn mẫu từ não bộ người cũng như khó khăn trong việc nuôi cấy các dòng tế bào thần kinh. Với mục đích khắc phục rào cản này, chúng tôi tiến hành tạo tế bào thần kinh tiết Orexin-A từ tế bào gốc vạn năng cảm ứng (hiPSCs), sử dụng môi trường biệt hóa có bổ sung N-acetyl-D-mannosamine (ManNAc) và Bone morphogenetic protein 4 (BMP4). Chúng tôi đánh giá đặc tính các tế bào biệt hóa được bằng phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang, phản ứng real-time PCR và kỹ thuật ELISA cạnh tranh. Kết quả cho thấy, nghiên cứu đã tạo thành công dòng hiPSC mang những đặc trưng của tế bào gốc vạn năng. Tế bào thần kinh tiết Orexin-A tạo thành từ hiPSCs đã cho kết quả biểu hiện dương tính với NCAM1 và TUBB3, tăng biểu hiện gen hypocretin (*HCRT*) và có khả năng tiết Orexin-A. Dựa trên tiền đề này, tế bào thần kinh tiết Orexin-A được tạo ra sẽ là cơ sở cho việc xây dựng mô hình bệnh trên tế bào và các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế các bệnh thần kinh liên quan.

Từ khóa: biệt hóa, orexin, tế bào gốc vạn năng cảm ứng, tế bào thần kinh.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.6, 3.5

Establishment of Vietnamese human induced pluripotent stem cell-derived Orexin-A neurons

Thi Minh Anh Dang^{1,2}, Minh Hieu Do^{2,3}, Thi Hong Nhung Nguyen², Xuan Hung Nguyen^{2,4*}

¹University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Vinmec Hi-Tech Center, 458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

³Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Khoa Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁴College of Health Sciences, VinUniversity, Da Ton Commune, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 8 May 2023; revised 30 May 2023; accepted 5 June 2023

Abstract:

Narcolepsy type 1 is a neurological disorder that severely affects sleep control due to a decrease in orexin neurons. Although research on neurological diseases, including narcolepsy, is vital for advancing science and improving human life, progress is hindered by the challenge of obtaining human brain samples as well as the difficulty in culturing neuronal cell lines. To overcome this obstacle, we generated Orexin-A neurons from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) by utilising a differentiation medium supplemented with N-acetyl-D-mannosamine (ManNAc) and Bone morphogenetic protein 4 (BMP4). The cells obtained from our study were characterised using immunofluorescence staining, real-time PCR, and competitive ELISA technique. The results show that our research successfully generated a hiPSC line with pluripotent stem cell characteristics. Furthermore, Orexin-A neurons derived from hiPSCs showed positive results for NCAM1 and TUBB3 markers, an increase in *HCRT* gene expression, and the capacity to secrete Orexin-A. These promising findings suggest that our hiPSC-derived Orexin-A neurons could serve as a foundation for cell-based disease modelling and further investigations into the underlying mechanisms of related neurological disorders.

Keywords: differentiation, human induced pluripotent stem cells, neuron, orexin.

Classification numbers: 1.6, 2.6, 3.5

*Tác giả liên hệ: Email: v.hungnx1@vinmec.com

1. Đặt vấn đề

Bệnh ngủ rũ tuýp 1 là hội chứng rối loạn thần kinh hiếm gặp với đặc trưng là mất trương lực cơ, buồn ngủ quá mức vào ban ngày và rối loạn giấc ngủ vào ban đêm [1]. Cho tới nay, các nhà khoa học vẫn chưa tìm ra phương pháp đặc trị cho bệnh, do đó bệnh nhân phải điều trị triệu chứng bằng thuốc suốt đời [2], gây ảnh hưởng xấu đến cuộc sống và sức khỏe của người bệnh cũng như gánh nặng kinh tế cho gia đình [3]. Về mặt bệnh lý, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự suy giảm hoặc mất chức năng của tế bào thần kinh tiết Orexin là nguyên nhân chính dẫn đến bệnh ngủ rũ tuýp 1 [1].

Mặc dù nguyên nhân của bệnh ngủ rũ đã được biết đến từ lâu, song cơ chế phát sinh bệnh ở cấp độ phân tử và tế bào vẫn chưa thực sự rõ ràng, một trong các nguyên nhân là do khó tiếp cận nguồn tế bào thần kinh tiết Orexin trong não người để phục vụ cho nghiên cứu. Để khắc phục trở ngại này, công nghệ hiPSCs - được phát triển từ năm 2007 bởi K. Takahashi và cs (2007) [4], đã mang lại cơ hội chưa từng có cho nghiên cứu cơ chế gây bệnh ở người. hiPSCs với những ưu điểm về nguồn tế bào phong phú và dễ dàng tiếp cận, không gặp phải những rào cản về đạo đức và quan trọng nhất là tiềm năng biệt hóa thành hầu hết các loại tế bào trong cơ thể, trở thành công cụ hữu ích giúp thiết lập các mô hình bệnh trong phòng thí nghiệm [5].

Trên thế giới, những nghiên cứu liên quan đến biệt hóa hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin còn tương đối hạn chế. Hầu hết các mô hình đánh giá bệnh *in vitro* và *in vivo* sử dụng tế bào thần kinh tiết Orexin đều được thực hiện trên động vật, phổ biến là chuột [6-8]. Những mô hình này tuy dễ tiếp cận nhưng hạn chế bởi nhiều khác biệt giữa người và động vật khác, do vậy, việc thiết lập và sử dụng tế bào có nguồn gốc từ người trở nên cần thiết hơn bao giờ hết. Về lĩnh vực này, ngoài nghiên cứu của F.T. Merkle và cs (2015) [9], K. Hayakawa và cs (2017) [10], cho tới nay vẫn chưa có công bố mới hơn. Tại Việt Nam, ứng dụng công nghệ tế bào gốc trong điều trị bệnh đang có những bước tiến đáng kể, tuy nhiên vẫn đang giới hạn trong việc sử dụng tế bào gốc đa năng với khả năng biệt hóa thành số lượng hữu hạn các tế bào khác nhau. Đối với hiPSCs, nghiên cứu mới chỉ bắt đầu trên chuột năm 2016. Hiện tại, chúng tôi chưa ghi nhận có công bố của nhóm nghiên cứu nào về hướng biệt hóa hiPSCs của người Việt Nam thành tế bào thần kinh tiết Orexin.

Nhận thức được tầm quan trọng trong nghiên cứu tế bào thần kinh, chúng tôi hướng đến mục tiêu tạo ra tế bào thần kinh tiết Orexin-A sử dụng dòng hiPSC có nguồn gốc từ máu cuống rốn với ưu điểm về hàm lượng, thủ thuật ít xâm lấn và dễ tiếp cận hơn so với các nguồn tế bào gốc khác [11]. Kết quả công bố trong nghiên cứu hy vọng sẽ đóng góp trong việc xây dựng ngân hàng tế bào gốc của người Việt Nam, trở thành nguồn tài nguyên quý giá để hỗ trợ những

nghiên cứu chuyên sâu hơn về bệnh ngủ rũ cũng như các bệnh lý liên quan khác trong tương lai.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Dòng hiPSCs có nguồn gốc từ máu cuống rốn được tạo ra bằng phương pháp chuyển gen thông qua virus Sendai tại Trung tâm Công nghệ cao Vinmec.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo tế bào gốc vạn năng cảm ứng

Các hiPSCs được tái lập trình từ tế bào gốc tạo máu theo quy trình tương tự như công bố trước đó [12]. Trước hết, chúng tôi phân lập tế bào đơn nhân từ máu cuống rốn của một thai phụ khỏe mạnh 32 tuổi bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng sử dụng Ficoll (GE, Mỹ) và nuôi cấy chọn lọc tăng sinh các tế bào gốc tạo máu trong môi trường StemMACS™ HSC Expansion (Miltenyi, Mỹ) trên đĩa 6 giếng (Corning, Mỹ) trong 9 ngày. Các tế bào được đánh giá khả năng sống và độ tinh khiết bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (BD FACSLyric™ Flow Cytometry, Becton Dickinson, Mỹ). Khi tỷ lệ tế bào gốc tạo máu dương tính với dấu ấn bề mặt CD34 trên 85%, 3 véc tơ virus Sendai (Sendai Cytotune™ 2.0, Invitrogen - Mỹ) mang 4 yếu tố tái lập trình c-MYC, SOX2, KLF4 và OCT4 sẽ được đưa vào tế bào để tạo dòng hiPSCs. 2 tuần sau khi tái lập trình, các cụm tế bào gốc sơ khai được cấy chuyển và nuôi tăng sinh trong môi trường mTeSR1 (StemCELL, Canada) và dòng hiPSCs (VRISGi003-A) bộc lộ hình thái giống như tế bào gốc phôi đã được chọn để kiểm tra đặc tính hoàn chỉnh. Dòng hiPSC tạo thành được kiểm tra đặc tính thông qua nhuộm alkaline phosphatase (Alkaline Phosphatase Staining Kit - Abcam, Anh); nhuộm miễn dịch huỳnh quang với các chỉ thị đặc trưng cho tính vạn năng là SOX2, OCT4, NANOG, TRA 1-60 và xác nhận khả năng biệt hóa thành 3 lớp phôi thông qua nhuộm miễn dịch huỳnh quang với chỉ thị đặc trưng: OTX-2 (lớp ngoại bì), BRACHYURY (lớp trung bì), SOX17 (lớp nội bì).

2.2.2. Biệt hóa tế bào gốc vạn năng cảm ứng thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A

Khi mật độ bao phủ bề mặt của hiPSCs đạt 70-80%, chúng tôi tiến hành tách tế bào bằng Accutase (StemCELL, Canada). Sau đó, hiPSCs được đồng nuôi cấy trên lớp dưỡng bào từ tế bào mô đệm của chuột - PA6 (Riken, Nhật Bản) trong môi trường mTeSR1 (StemCELL, Canada) có bổ sung Y-27632 (Sigma, Mỹ) trong 24 giờ. Môi trường biệt hóa cơ bản (SDIA) bao gồm: môi trường Glasgow's minimum essential medium (GMEM, Gibco, Mỹ) chứa 25 nM đường glucose, 10% Knockout serum replacement (KSR, Invitrogen, Mỹ), 0,1 mM axit amin không thiết yếu (Non-essential amino acid, NEAA, Gibco, Mỹ) và 0,1 mM dung môi β -mercaptoethanol

(Invitrogen, Mỹ). Môi trường biệt hóa được thay cách ngày. Từ ngày thứ 7, bổ sung 0,6 μ M N-acetyl-D-mannosamine (Sigma, Mỹ) và 5 nM BMP4 (Peprotech, Mỹ) vào môi trường SDIA để kích thích quá trình biệt hóa hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin [10]. Sau 20 ngày, chúng tôi tiến hành thu tế bào để đánh giá đặc tính.

2.2.3. Xác định nồng độ Orexin-A bằng phương pháp ELISA

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định nồng độ peptit Orexin-A tiết ra từ tế bào thần kinh tiết Orexin-A như đã mô tả trong nghiên cứu của K. Hayakawa và cs (2017) [10]. Sau 20 ngày biệt hóa, tế bào sẽ được ủ trong 500 μ l môi trường SDIA có bổ sung Leptin và Ghrelin (Sigma, Mỹ) tại 37°C trong 3 giờ để kích thích tế bào tiết Orexin-A. Cuối cùng, chúng tôi xác định nồng độ peptit Orexin-A trong dịch nuôi cấy bằng bộ kit OREXIN-A Fluorescent EIA (Phoenix Pharmaceuticals, Mỹ).

2.2.4. Nhuộm miễn dịch huỳnh quang

Sau 20 ngày biệt hóa, chúng tôi tiến hành cố định tế bào bằng dung dịch IC Fixation (Invitrogen, Mỹ) ngay trên đĩa nuôi cấy trong 15 phút tại nhiệt độ phòng, tăng tính thẩm thấu bằng dung dịch Permeabilization Buffer (Invitrogen, Mỹ) trong 30 phút và chặn các liên kết không đặc hiệu bằng dung dịch PBS (đệm phosphate buffered saline - Gibco, Mỹ) + 5% BSA (Sigma, Mỹ) trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào được nhuộm bằng kháng thể đặc hiệu: SOX2, OCT4, NANOG, TRA 1-60 (Miltenyi, Đức); OTX-2, BRACHYURY, SOX17 (R&D Systems, Mỹ); NCAM1, TUBB3 (Abcam, Anh) ủ qua đêm ở 4°C và nhận tế bào được nhuộm bằng DAPI trong 5 phút. Sau đó, tiến hành chụp ảnh tế bào bằng kính hiển vi đồng tiêu (Confocal - Molecular devices, Mỹ). Các hình ảnh được xử lý bằng phần mềm ImageJ.

2.2.5. Kiểm tra biểu hiện gen HCRT bằng real-time PCR

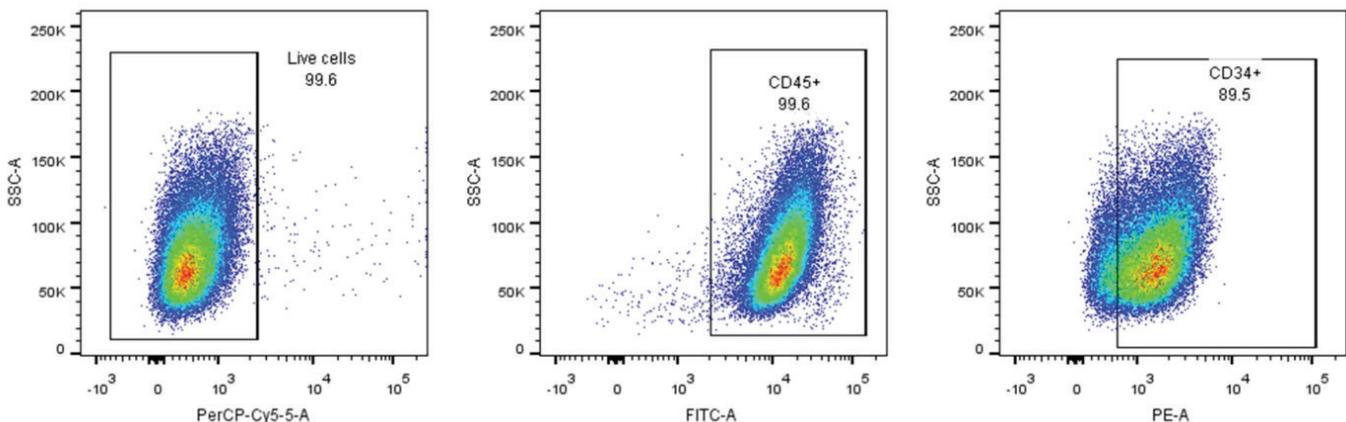
Tế bào được thu vào ngày thứ 20 sau quá trình biệt hóa để tách RNA (Ribonucleic acid) sử dụng kit RNEasy Mini (Quantabio, Mỹ), sau đó phiên mã ngược thành cDNA

(complementary Deoxyribonucleic acid) sử dụng kit qScript cDNA Synthesis (Quantabio, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cDNA được dùng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen thời gian thực, sử dụng kit PerfeCTA SYBR Green SuperMix (Quantabio, Mỹ) và thu tín hiệu trên máy 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). Xác định mức độ biểu hiện của gen *HCRT* trên mRNA (messenger RNA) đích sau khi chuẩn hoá với gen nội kiểm *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate). Trình tự các cặp mồi sử dụng: mồi cho gen *HCRT* gồm 5'-TGA TTA TGG GTC GTC GCG TA-3' (mồi xuôi) và 5'-AAC TAT CCT CCG AAC GCG AC-3' (mồi ngược) [13]; mồi cho gen *GAPDH* gồm 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3' (mồi xuôi) và 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' (mồi ngược) [12, 14].

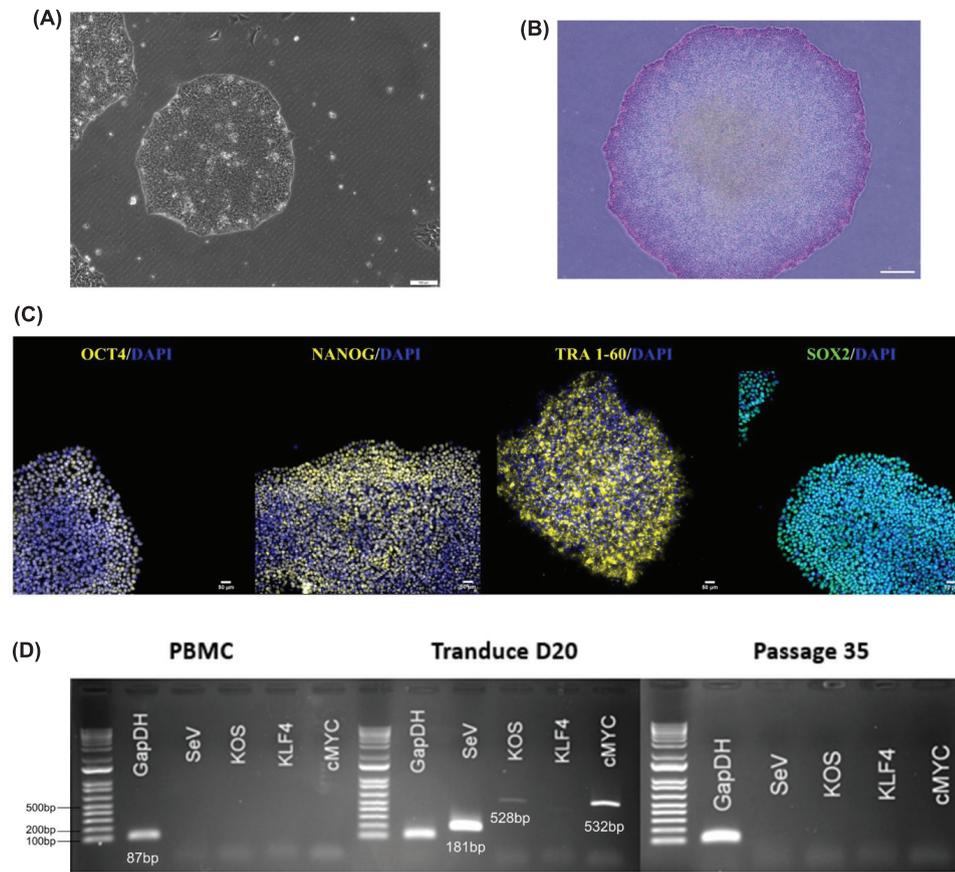
3. Kết quả

3.1. Tạo dòng hiPSC từ tế bào gốc tạo máu

Các tế bào gốc tạo máu được tinh sạch, nuôi cấy tăng sinh trong vòng 9 ngày với một lần cấy chuyển và được chuyển gen khi tỷ lệ tế bào dương tính với CD34 đạt 89,5% (hình 1). Cụm tế bào gốc hình thành sau 3 tuần chuyển gen (hình 2A) và sự phát triển của các cụm tế bào gốc được xác định thông qua biểu hiện dương tính với chỉ thị alkaline phosphatase (hình 2B). hiPSCs đời cấy chuyển thứ 6 biểu hiện dương tính với các chỉ thị bề mặt đặc trưng của tế bào gốc vạn năng, cụ thể là: SOX2, OCT4, NANOG và TRA 1-60 (hình 2C). Sau nhiều đời cấy chuyển, hiPSCs được tiến hành kiểm tra sự tồn tại của virus Sendai thông qua gen SeV bằng phản ứng khuếch đại gen (RT-PCR). Hình ảnh từ kết quả điện di cho thấy, gen SeV xuất hiện ở đời cấy chuyển đầu tiên và biến mất hoàn toàn sau đời cấy chuyển thứ 35 (hình 2D). Sau cùng, sự nguyên vẹn về hình thái và số lượng bộ nhiễm sắc thể của hiPSCs qua nhiều đời sau chuyển gen được xác nhận thông qua nhiễm sắc thể đồ (không thể hiện ở bảng kết quả). Như vậy, chúng tôi đã tạo thành công dòng hiPSCs mang đầy đủ các đặc tính đặc trưng của tế bào gốc phôi.



Hình 1. Tỷ lệ dương tính của tế bào với CD34 trước khi chuyển gen. Sau 9 ngày nuôi cấy, ít nhất 10^5 tế bào đã được thêm vào ống chứa kháng thể 7AAD-PerCP-Cy5 + CD45-FITC + CD34-PE và tỷ lệ tế bào dương tính được xác định bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.



Hình 2. Kiểm tra đặc tính của dòng tế bào gốc vạn năng cảm ứng tạo thành. (A) Hình thái cụm tế bào gốc sau 3 tuần chuyển gen, thước đo 100 μm , độ phóng đại 10X; (B) Biểu hiện dương tính trên bề mặt hiPSCs khi nhuộm alkaline phosphatase (ALP), thước đo 100 μm , độ phóng đại 10X; (C) Biểu hiện dương tính các chỉ thị đặc trưng cho tính vạn năng của hiPSCs: human anti-SOX2 - FITC, human anti-OCT4 - PE, human anti-NANOG - PE, human anti-TRA 1-60 - PE, thước đo 50 μm , độ phóng đại 20X; (D) Kết quả phản ứng khuếch đại gen (RT-PCR) đối với gen SeV của virus Sendai và các gen tái lập trình (KOS, cMYC, KLF4) xuất hiện ở dòng hiPSC sau 20 ngày chuyển gen (Tranduce D20) và biến mất sau khi tế bào được cấy chuyển liên tục 35 đời (Passage 35) với gen *GAPDH* là gen nội kiểm. Thang chuẩn: 1 kb.

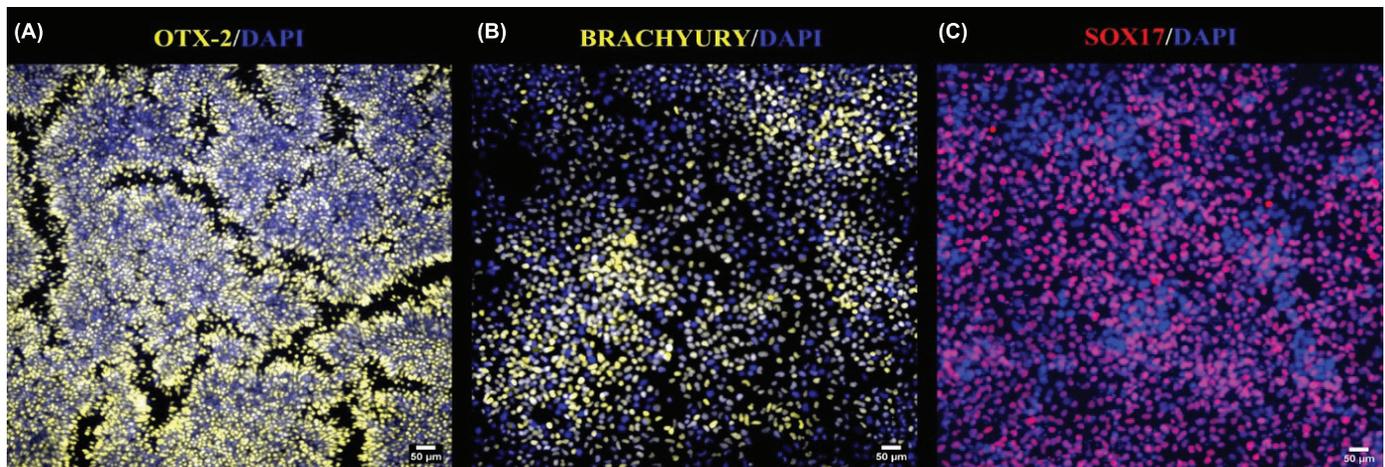
3.2. Khả năng biệt hóa của hiPSCs thành 3 lớp phôi

Khả năng biệt hóa thành các tế bào thuộc 3 lớp phôi là một trong những chỉ tiêu giúp xác định tính vạn năng của hiPSCs *in vitro*. Dòng hiPSCs tạo thành sau khi biệt hóa với môi trường đặc hiệu đã cho kết quả dương tính với các chỉ thị đặc trưng của 3 lớp phôi: OTX-2 ở lớp ngoại bì, BRACHYURY ở lớp trung bì và SOX17 ở lớp nội bì (hình 3).

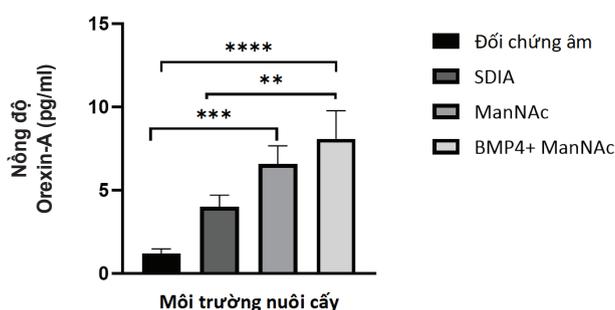
3.3. Biệt hóa tế bào gốc vạn năng cảm ứng thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A

3.3.1. Nồng độ Orexin-A thông qua phương pháp ELISA

Khả năng tiết Orexin-A là đặc tính quan trọng của tế bào thần kinh tiết Orexin-A. Số liệu thu được từ phản ứng ELISA cho thấy, nồng độ Orexin-A ở các tế bào được nuôi trong môi trường biệt hóa cơ bản (SDIA) có bổ sung ManNAc và môi trường SDIA có bổ sung ManNAc + BMP4 cho kết quả cao hơn hẳn



Hình 3. Các tế bào gốc vạn năng cảm ứng thể hiện khả năng biệt hóa thành 3 lớp phôi. Tế bào gốc vạn năng cảm ứng được nuôi trong môi trường biệt hóa thành các lớp phôi tương ứng (ngoại bì, trung bì và nội bì). Sau 5 ngày biệt hóa (đối với lớp trung bì và nội bì) hoặc 7 ngày biệt hóa (đối với lớp ngoại bì), tế bào được nhuộm miễn dịch huỳnh quang với các chỉ thị: OTX-2 đặc trưng cho lớp ngoại bì (A), BRACHYURY đặc trưng cho lớp trung bì (B), SOX17 đặc trưng cho lớp nội bì (C). Thước đo: 50 μm , độ phóng đại 20X.

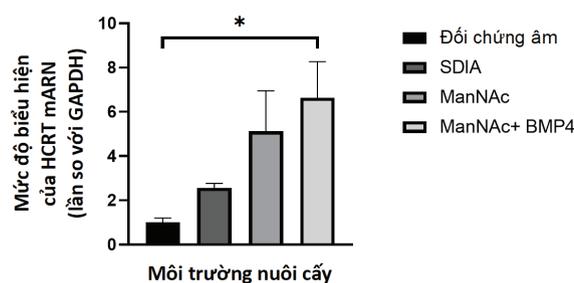


Hình 4. Nồng độ Orexin-A đo được từ môi trường nuôi cấy. Tiến hành biệt hoá hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A theo quy trình 20 ngày dùng các môi trường khác nhau: môi trường nuôi cấy tế bào gốc - mTeSR1 (đối chứng âm), môi trường biệt hóa cơ bản (SDIA), môi trường SDIA bổ sung ManNAc (ManNAc), môi trường SDIA bổ sung cả ManNAc và BMP4 (ManNAc + BMP4). Các tế bào được kích thích bởi Ghrelin, Leptin trong 3 giờ và đo nồng độ Orexin-A bằng ELISA (n= 6), sử dụng phương pháp thống kê one-way ANOVA (****: p<0,0001; ***: p<0,001; **: p<0,01). Xử lý thống kê trên phần mềm Graphpad Prism 8.

so với mẫu tế bào chỉ nuôi bằng môi trường SDIA không bổ sung ManNAc hoặc BMP4. Trong đó, nồng độ Orexin-A trung bình đo được từ môi trường SDIA, SDIA + ManNAc, SDIA + ManNAc + BMP4 lần lượt là $4 \pm 0,71$, $6,57 \pm 1,10$ và $8,09 \pm 1,69$ pg/ml. Hơn nữa, khi so sánh với mẫu đối chứng được nuôi trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc thông thường (mTeSR1) với nồng độ Orexin-A trung bình là 1,2 pg/ml thì tất cả các mẫu dịch nuôi cấy từ tế bào biệt hóa đều cho kết quả cao vượt trội (hình 4). Đặc biệt, so với mẫu đối chứng, 2 mẫu biệt hóa trong môi trường SDIA có bổ sung ManNAc và môi trường SDIA bổ sung ManNAc + BMP4 đều đo được nồng độ Orexin-A cao hơn từ 6 đến 8 lần với giá trị p lần lượt nhỏ hơn 0,001 và 0,0001. Như vậy, môi trường biệt hóa chúng tôi sử dụng đã có tác dụng rõ rệt lên khả năng biệt hóa hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A, thể hiện bằng việc tế bào có khả năng tiết ra Orexin-A khi được kích thích bằng Ghrelin và Leptin.

3.3.2. Biểu hiện gen HCRT bằng phương pháp RT-PCR

Để kiểm tra liệu ManNAc có thật sự ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen *HCRT* - đặc trưng cho tế bào thần kinh tiết Orexin-A, chúng tôi tiến hành so sánh biểu hiện gen *HCRT* trong các mẫu tế bào được nuôi trong các môi trường khác nhau tại ngày thứ 20 của quá trình biệt hóa, bằng phản ứng khuếch đại gen thời gian thực RT-qPCR (hình 5). Có thể thấy, mẫu tế bào được nuôi trong môi trường SDIA bổ sung ManNAc và môi trường SDIA bổ sung ManNAc + BMP4 có sự khác biệt vượt trội so với môi trường SDIA trong việc tăng biểu hiện gen *HCRT* (sử dụng gen nội kiểm *GAPDH*). Trong đó, mẫu thu từ môi trường SDIA bổ sung ManNAc và môi trường SDIA bổ sung ManNAc + BMP4 lần lượt có



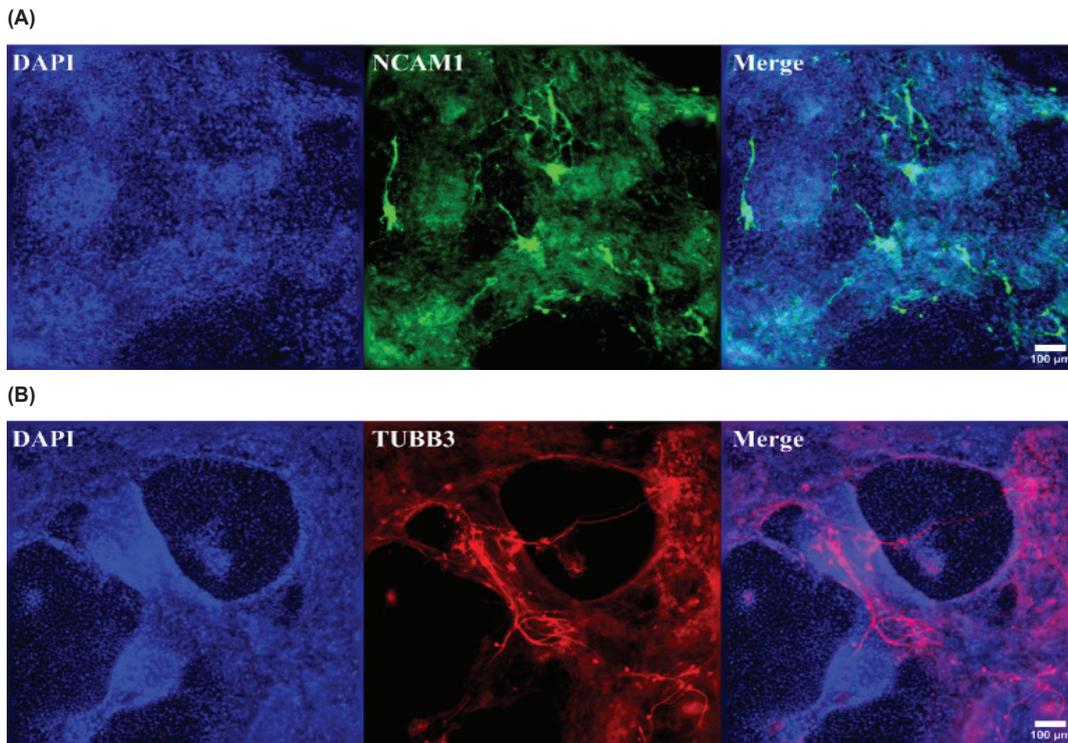
Hình 5. Biểu hiện gen HCRT trong các mẫu tế bào sau biệt hóa. hiPSCs sau 20 ngày nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc - mTeSR1 (đối chứng âm); môi trường biệt hóa cơ bản (SDIA); môi trường SDIA bổ sung ManNAc (ManNAc); và môi trường SDIA bổ sung cả ManNAc và BMP4 (ManNAc + BMP4) được tách RNA, thu cDNA và kiểm tra biểu hiện gen *HCRT* sử dụng gen nội kiểm *GAPDH*. Sử dụng kiểm định thống kê Kruskal-Wallis (n=3, p<0,05). Xử lý thống kê trên phần mềm Graphpad Prism 8.

biểu hiện gen *HCRT* gấp khoảng 5 và 6,6 lần biểu hiện gen nội kiểm *GAPDH*, so sánh với mẫu thu từ môi trường SDIA có biểu hiện gen *HCRT* gấp khoảng 2,5 lần gen nội kiểm *GAPDH*. Bên cạnh đó, không có sự khác biệt lớn trong biểu hiện gen *HCRT* giữa 2 môi trường được bổ sung ManNAc và ManNAc + BMP4. Vì vậy, chúng tôi đưa ra kết luận ManNAc làm tăng cường biểu hiện gen *HCRT* của tế bào và góp phần quan trọng trong quá trình biệt hóa tạo tế bào thần kinh tiết Orexin-A từ hiPSCs.

3.3.3. Kiểm tra các chỉ thị bề mặt đặc trưng thông qua nhuộm miễn dịch huỳnh quang

β -tubulin III (TUBB3) là một thành phần vi ống thuộc họ tubulin hầu như chỉ được tìm thấy trong các tế bào thần kinh [15, 16]. Bên cạnh đó, phân tử liên kết tế bào thần kinh - 1 (neural cell adhesion molecule 1 - NCAM1) tham gia vào việc hình thành và duy trì các khớp thần kinh, là các kết nối giữa các tế bào thần kinh cho phép giao tiếp và truyền tín hiệu trong não [17]. Do TUBB3 và NCAM1 phân lớn chỉ xuất hiện ở tế bào thần kinh nên chúng thường được sử dụng làm chỉ thị đặc trưng cho loại tế bào này. Để chắc chắn về khả năng hình thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A từ hiPSCs, chúng tôi tiến hành nhuộm miễn dịch huỳnh quang mẫu tế bào với TUBB3 và NCAM1. Kết quả cho thấy, tế bào sau biệt hóa biểu hiện dương tính với cả 2 chỉ thị đặc trưng NCAM1 (hình 6A) và TUBB3 (hình 6B).

Với các kết quả trên, chúng tôi có thể khẳng định nghiên cứu đã bước đầu thành công trong việc biệt hóa hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A mang những đặc tính cơ bản nhất của tế bào thần kinh.



Hình 6. Biểu hiện dương tính của các chỉ thị TUBB3 và NCAM1 đặc trưng cho tế bào thần kinh. hiPSCs được biệt hóa trong môi trường SDIA có bổ sung ManNAc + BMP4. Mẫu tế bào được thu tại ngày biệt hóa thứ 20 và tiến hành nhuộm miễn dịch huỳnh quang với chỉ thị đặc trưng cho tế bào thần kinh: NCAM1 (A) và TUBB3 (B). Thước đo 100 µm, độ phóng đại 10X.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành biệt hóa hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A và thu được kết quả khả quan. Cụ thể, tế bào sau biệt hóa mang những đặc tính điển hình của tế bào thần kinh tiết Orexin-A như biểu hiện dương tính với các chỉ thị đặc trưng NCAM1 và TUBB3, có khả năng tiết Orexin-A và tăng biểu hiện gen *HCRT*. Nồng độ Orexin-A trung bình chúng tôi đo được từ mẫu nuôi trong môi trường SDIA có bổ sung ManNAc + BMP4 là $8,09 \pm 1,69$ pg/ml, thấp hơn so với công bố của K. Hayakawa và cs (2017) [10] (khoảng 10 pg/ml). Mặc dù vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy có sự thay đổi rõ rệt về biểu hiện gen *HCRT* và nồng độ Orexin-A của tế bào khi bổ sung ManNAc vào môi trường biệt hóa, tương đồng với công bố trước đó [10]. Qua đó, khẳng định vai trò của chất này đối với quá trình biệt hóa tạo tế bào thần kinh tiết Orexin-A từ hiPSCs. Về cơ chế hoạt động của ManNAc trong tế bào, K. Hayakawa và cs (2013) [6] đã đưa ra giả thiết rằng ManNAc có tác dụng chuyển những yếu tố kích thích quá trình acetyl hóa histone H3/H4 và khử methyl hóa DNA như Mgea5, p300, CBP đến locus gen *HCRT*, làm thay đổi trạng thái biểu sinh và góp phần tăng biểu hiện

của gen này. Mặc dù chúng tôi chưa thực hiện nghiên cứu để kiểm tra giả thiết trên, nhưng từ kết quả thu được kết hợp với những công bố trước đó, giả thiết của nhóm tác giả này đưa ra hoàn toàn có cơ sở [6].

Từ các kết quả của nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tiến gần hơn đến mục tiêu y học cá thể hóa tại Việt Nam, bắt đầu từ việc tạo hiPSCs từ máu ngoại vi [14], biệt hóa thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A và sử dụng các tế bào này như mô hình trong nghiên cứu các bệnh thần kinh. Về vấn đề cải tiến để nâng cao hiệu suất và khả năng ứng dụng thực tiễn, nghiên

cứ của K. Hayakawa và cs (2017) [10] đã chứng minh rằng ngoài ManNAc, các dẫn xuất của chất này (ManNFAc, ManNCOOMe, ManNCOOEt...) không những có khả năng kích thích hiPSCs biệt hóa thành tế bào thần kinh tiết orexin mà còn tăng đáng kể hiệu quả biệt hóa. Bên cạnh đó, việc sử dụng tế bào nền PA6 mặc dù có những ưu điểm như quy trình đơn giản và hiệu quả biệt hóa tốt nhờ khả năng cảm ứng của tế bào mô đệm [18], nhưng các tế bào thần kinh tiết orexin tạo thành sẽ mang yếu tố động vật khiến các nghiên cứu xa hơn như thử nghiệm lâm sàng, cấy ghép tế bào vào cơ thể người trở nên khó khăn hơn. Vì vậy, chúng tôi sẽ tiến hành các phương pháp cải tiến để thay thế lớp tế bào nền PA6. Ngoài ra, sự khác biệt về mặt sinh lý giữa tế bào thần kinh tiết orexin trưởng thành trong não bộ và tế bào biệt hóa *in vitro* cũng là điểm hạn chế trong nghiên cứu này [19].

Mặc dù nghiên cứu vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế và cần tối ưu thêm về mặt quy trình nhưng các kết quả thu được bước đầu đã cho thấy tiềm năng của việc sử dụng hiPSCs trong biệt hóa tạo tế bào thần kinh tiết orexin *in vitro*. Kết quả này đồng thời góp phần xây dựng tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế hoạt động, tương tác với các loại tế

bào khác của tế bào thần kinh tiết orexin, cũng như thiết lập mô hình bệnh liên quan đến tổn thương, suy giảm tế bào này. Trong tương lai, chúng tôi sẽ tiếp tục tối ưu và thực hiện thêm các nghiên cứu chuyên sâu với mong muốn tạo ra dòng tế bào thần kinh tiết orexin có thể ứng dụng trong tạo mô hình nghiên cứu cơ chế bệnh và hướng tới các liệu pháp đặc trị cho bệnh ngủ rũ nói riêng và các bệnh thần kinh nói chung.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thành công trong việc tái lập trình tế bào gốc tạo máu thành hiPSCs ở người Việt Nam, từ đó biệt hoá hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A. Tế bào thu được sau biệt hóa có khả năng tiết Orexin-A ra môi trường, biểu hiện gen *HCRT* tăng, đồng thời tế bào biểu hiện dương tính với các chỉ thị bề mặt đặc trưng NCAM1, TUBB3. Môi trường SDIA có bổ sung ManNAc và BMP4 kết hợp với lớp nền tế bào PA6 thể hiện vai trò đáng kể trong quá trình biệt hoá hiPSCs thành tế bào thần kinh tiết Orexin-A, với nồng độ Orexin-A đo được từ mẫu môi trường là 8,09 pg/ml và biểu hiện gen *HCRT* tăng gấp 6,6 lần so với gen *GAPDH*.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) đã cấp kinh phí cho việc thực hiện đề tài với mã số 108.06-2018.309.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] T.E. Scammell (2015), “Narcolepsy”, *N. Engl. J. Med.*, **373**(27), pp.2654-2662, DOI: 10.1056/NEJMra1500587.

[2] L. Barateau, R. Liblau, C. Peyron, et al. (2017), “Narcolepsy type 1 as an autoimmune disorder: Evidence, and implications for pharmacological treatment”, *CNS Drugs*, **31**(10), pp.821-834, DOI: 10.1007/s40263-017-0464-6.

[3] P. Jennum, R. Ibsen, S. Knudsen, et al. (2013), “Comorbidity and mortality of narcolepsy: A controlled retro- and prospective national study”, *Sleep*, **36**(6), pp.835-840, DOI: 10.5665/sleep.2706.

[4] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, et al. (2007), “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors”, *Cell*, **131**(5), pp.861-872, DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

[5] J. Gorecka, V. Kostiuk, A. Fereydooni, et al. (2019), “The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing”, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**(1), DOI: 10.1186/s13287-019-1185-1.

[6] K. Hayakawa, M. Hirosawa, Y. Tabei, et al. (2013), “Epigenetic switching by the metabolism-sensing factors in the generation of orexin neurons from mouse embryonic stem cells”, *J. Biol. Chem.*, **288**(24), pp.17099-17110, DOI: 10.1074/jbc.M113.455899.

[7] R.K. Tisdale, A. Yamanaka, T.S. Kilduff (2021), “Animal models of narcolepsy and the hypocretin/orexin system: Past, present, and future”, *Sleep*, **44**(6), DOI: 10.1093/sleep/zsaa278.

[8] R.B. Valnet, L. Yshii, C. Queriaux, et al. (2016), “CD8 T cell-mediated killing of orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **113**(39), pp.10956-10961, DOI: 10.1073/pnas.1603325113.

[9] F.T. Merkle, A. Maroof, T. Wataya, et al. (2015), “Generation of neuropeptidergic hypothalamic neurons from human pluripotent stem cells”, *Development*, **142**(4), pp.633-643, DOI: 10.1242/dev.117978.

[10] K. Hayakawa, Y. Sakamoto, O. Kanie, et al. (2017), “Reactivation of hyperglycemia-induced hypocretin (HCRT) gene silencing by N-acetyl-d-mannosamine in the orexin neurons derived from human iPS cells”, *Epigenetics*, **12**(9), pp.764-778, DOI: 10.1080/15592294.2017.1346775.

[11] H. Koh, X. Zhen, J. Kim, et al. (2022), “Generation and characterization of human umbilical cord blood-derived induced pluripotent stem cells (KRIBBi005-A)”, *Stem Cell Res.*, **60**, DOI: 10.1016/j.scr.2022.102674.

[12] T.T.T. Tran, T.H.N. Nguyen, T.T. Nguyen, et al. (2021), “Establishment of a Vietnamese ethnicity induced pluripotent stem cell line (VRISGi001-A) from umbilical cord blood hematopoietic stem cells under a feeder-free system”, *Stem Cell Research*, **53**, DOI: 10.1016/j.scr.2021.102345.

[13] K. Misawa, D. Mochizuki, A. Imai, et al. (2018), “Analysis of site-specific methylation of tumor-related genes in head and neck cancer: Potential utility as biomarkers for prognosis”, *Cancers*, **10**(1), DOI: 10.3390/cancers10010027.

[14] T.H.N. Nguyen, T.T.T. Tran, T.H. Luong, et al. (2022), “Generation of an erythroid progenitor-derived iPSC line, VRISGi002-A, from a healthy 27-year-old Vietnamese donor under a feeder-free system”, *Stem Cell Research*, **62**, DOI: 10.1016/j.scr.2022.102824.

[15] K.F. Sullivan, D.W. Cleveland (1986), “Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes”, *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **83**(12), pp.4327-4331, DOI: 10.1073/pnas.83.12.4327.

[16] D.V. Caccamo, M.M. Herman, A. Frankfurter, et al. (1989), “An immunohistochemical study of neuropeptides and neuronal cytoskeletal proteins in the neuroepithelial component of a spontaneous murine ovarian teratoma. Primitive neuroepithelium displays immunoreactivity for neuropeptides and neuron-associated beta-tubulin isotype”, *The American Journal of Pathology*, **135**(5), pp.801-813.

[17] V. Vukojevic, P. Mastrandreas, A. Arnold, et al. (2020), “Evolutionary conserved role of neural cell adhesion molecule-1 in memory”, *Transl. Psychiatry*, **10**(1), DOI: 10.1038/s41398-020-00899-y.

[18] H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa, et al. (2000), “Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity”, *Neuron*, **28**(1), pp.31-40, DOI: 10.1016/s0896-6273(00)00083-0.

[19] R. Dolmetsch, D.H. Geschwind (2011), “The human brain in a dish: The promise of iPSC-derived neurons”, *Cell*, **145**(6), pp.831-834, DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.034.