



Original Article

# Exosomes Support the Viability of Mesenchymal Stem Cells in the Storage Condition of 4 °C

Than Thi Trang Uyen<sup>1,2,\*</sup>, Dao Huy Hoang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Vinmec Hi-Tech Center, Minh Khai, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Vinmec-VinUni Institute of Immunology, VinUniversity, Da Ton, Gia Lam, Hanoi, Vietnam*

Received 04<sup>th</sup> September 2024

Revised 10<sup>th</sup> June 2025; Accepted 13<sup>th</sup> June 2025

**Abstract:** Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UCMSCs) and their exosomes have attracted significant attention due to their various potential for therapeutic applications. In this study, we expanded UCMSCs and evaluated several short-term preservation buffers on the cell viability. The results showed that UCMSCs were split up to the 5<sup>th</sup> passage (P5), which expressed typical characteristics of mesenchymal stem cells in terms of morphology, marker expression, colony forming, and multilineage differentiation ability. UCMSCs survived up to 48 hours in three preservation buffers. Additionally, three buffers without exosomes were able to maintain a cell survival rate of > 75% at 24 hours for all experiment groups. For the buffers supplied with exosomes, we observed a cell survival rate of > 80% at 24 hours in all experiment groups, and at 48 hours, the percentage of viable cells was higher than that of the buffer group without exosome supplement, except for the group of  $2 \times 10^6$  cells/mL in buffer A (Glucose, Human serum albumin, Heparin calcium, Ascorbic acid, Non-essential amino acid) and C (Ringer lactate), and  $5 \times 10^6$  cells/mL in buffer C. Furthermore, exosomes increased the cell clustering in all three buffer solutions. These results indicate the potential of directly using preservation buffers and cells in vivo and the real application.

**Keywords:** Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, exosomes, storage buffer, cell viability.

\* Corresponding author.

E-mail address: [uyentthan@gmail.com](mailto:uyentthan@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5813>

# Exosome hỗ trợ khả năng sống của tế bào gốc trung mô trong dung dịch bảo quản ở điều kiện 4 °C

Thân Thị Trang Uyên<sup>1,2,\*</sup>, Đào Huy Hoàng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện nghiên cứu Miễn dịch Vinmec - VinUni, Đại học Vin, Đa Tốn, Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 04 tháng 9 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 10 tháng 6 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 6 năm 2025

**Tóm tắt:** Tế bào gốc trung mô dây rốn (TBGTMDR) và exosome tiết ra từ chúng đã thu hút được sự quan tâm đáng kể do tiềm năng đa dạng trong ứng dụng điều trị. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nuôi cấy tăng sinh TBGTMDR và tiến hành đánh giá một số loại dung dịch bảo quản tạm thời kết hợp với exosome lên khả năng sống của tế bào. Kết quả cho thấy TBGTMDR nuôi đến lần cấy chuyển thứ 5 (P5) có đặc điểm điển hình của tế bào gốc trung mô về hình thái, biểu hiện dấu ấn chỉ thị, khả năng tạo cụm và khả năng biệt hoá đa dòng. Tế bào có khả năng sống trong cả ba loại dung dịch bảo quản đến 48 giờ. Dung dịch bảo quản không bổ sung exosome có khả năng duy trì tỷ lệ tế bào sống > 75% ở 24 giờ. Với nhóm dung dịch bảo quản có bổ sung exosome, các nhóm đều cho tỷ lệ tế bào sống > 80% ở 24 giờ; và đến 48 giờ, tỷ lệ tế bào sống đều cao hơn nhóm dung dịch bảo quản không bổ sung exosome, ngoại trừ nhóm 2 x 10<sup>6</sup> tế bào/mL ở dung dịch bảo quản A (Glucose, Albumin huyết thanh người, Heparin calcium, Axit ascorbic, Axit amin không thiết yếu) và C (Ringer lactate) và 5 x 10<sup>6</sup> tế bào/mL ở dung dịch bảo quản C. Thêm vào đó, exosome lại làm tăng kết cụm tế bào ở cả ba loại dung dịch bảo quản. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng phát triển dung dịch bảo quản tế bào sử dụng trực tiếp trong điều kiện *in vitro* và ứng dụng thực tế.

**Từ khóa:** Tế bào gốc trung mô dây rốn, exosome, dung dịch bảo quản, tỷ lệ sống tế bào.

## 1. Mở đầu

Tế bào gốc trung mô (TBGTM) có nguồn gốc trung bì và được coi là dòng tế bào gốc đa tiềm năng do khả năng tự tái tạo và biệt hoá thành nhiều loại tế bào khác nhau [1]. Theo Hiệp hội Quốc tế về Liệu pháp Tế bào (ISCT) (<https://isctglobal.org/>), TBGTM được xác định bởi các đặc điểm như khả năng bám dính trong nuôi cấy 2D, biểu hiện mạnh các dấu ấn bề mặt (CD73, CD90 và CD105) và khả năng biệt hoá đa dòng. TBGTM có thể phân lập được từ nhiều nguồn khác nhau, bao gồm tủy xương, máu dây rốn, dây rốn, nhau thai, mô mỡ hoặc thậm chí là phổi,... [2]; trong đó TBGTMDR được sử dụng rộng rãi nhất do việc thu thập

không xâm lấn, nguồn mô trẻ, khả năng tăng sinh và sức sống tế bào tốt hơn so với TBGTM từ tủy xương và mô mỡ [3, 4]. Đối với các dòng TBGTM sơ cấp, tế bào sẽ già đi và mất dần tính gốc khi ở các giai đoạn sau, chẳng hạn như giảm tỷ lệ biểu hiện dấu ấn chỉ thị bề mặt, giảm khả năng biệt hoá, tăng biểu hiện già hoá. Tuy nhiên, một số nghiên cứu vẫn chỉ ra rằng TBGTM sơ cấp vẫn có khả năng duy trì đặc tính gốc này lên đến P10 [5].

TBGTM có khả năng ứng dụng trong điều trị các tình trạng liên quan đến miễn dịch, tái tạo mô và chống xơ hóa thông qua các đặc tính như: i) Điều hòa miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng, chẳng hạn như ức chế sự tăng sinh của tế bào lympho cùng với việc kích thích các đại thực bào chuyển từ trạng thái M1 sang M2 [6, 7]; ii) Tái tạo mô bằng cách tiết ra các yếu tố tăng trưởng như yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF), yếu tố tăng trưởng biến đổi beta

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: uyentthan@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5813>

(TGF- $\beta$ ), yếu tố tăng trưởng tế bào sừng (KGF), yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) và các cytokine khác [8]; và iii) Chống xơ hóa thông qua việc tiết ra yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) và tái cấu trúc chất nền ngoại bào [9].

Nhằm ứng dụng TBGTM trong điều trị các bệnh lý phức tạp, và các bệnh lý có yêu cầu đặc biệt về độ an toàn và hiệu quả và cá nhân hóa y học tái tạo, các yếu tố đang được quan tâm hiện nay là liều lượng tế bào, nguồn gốc TBGTM, quy trình thu thập và điều kiện tăng sinh tế bào, thời gian cấy ghép và thậm chí là cá thể hoá nguồn TBGTM [10-12]. Bên cạnh đó, việc duy trì chất lượng của TBGTM trước khi ghép hoặc sử dụng cho mục đích khác (ví dụ như mực in 3D) cũng đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong trong đảm bảo hiệu quả liệu pháp TBGTM. Trước khi sử dụng, tế bào cần phải được đưa về điều kiện nhiệt độ thường, đặc biệt là khi ứng dụng trong in 3D hoặc làm nguyên liệu cho các loại súng phun tế bào điều trị vết thương diện rộng. Tuy nhiên, TBGTM rất nhạy cảm với nhiệt độ và môi trường xung quanh. Ví dụ, TBGTM từ tủy xương người sau thu hoạch bị thiếu hụt huyết thanh, điều này có thể gây căng thẳng cho tế bào [12, 13], từ đó có thể sẽ làm thay đổi biểu hiện gen [14] và khiến tỷ lệ tế bào chết tăng dần theo thời gian bảo quản. Hoặc khi nhiệt độ không ổn định, có thể gây tổn thương nghiêm trọng đến màng tế bào, thay đổi cấu trúc protein và làm mất chức năng tế bào [15, 16]. Như vậy, việc duy trì nhiệt độ tối ưu, ổn định trong suốt quá trình bảo quản và rã đông đóng vai trò quan trọng để đảm bảo tính toàn vẹn và chức năng của TBGTM trong các ứng dụng y học.

Bên cạnh đó, exosome được cho là có khả năng hỗ trợ khả năng sống tế bào thông qua cơ chế chống oxy hoá, tăng cường sửa chữa tổn thương màng và ổn định vi môi trường tế bào. Điều này giúp bảo vệ TBGTM khỏi tổn thương trong quá trình bảo quản. Nhóm nghiên cứu của Yang Zhou và cộng sự đã lần đầu tiên chứng minh được khả năng kết hợp giữa TBGTM và exosome tiết từ chính TBGTM trong thúc đẩy quá trình liền vết thương [17]. Hiệu quả đạt được thông qua sự kết hợp này là làm tăng quá trình biểu mô hoá, giảm sẹo và tăng cường quá

trình hình thành mạch máu [17]. Tuy nhiên, cho đến nay, chúng tôi chưa tìm thấy công trình khoa học nào đánh giá vai trò của exosome trong bảo quản TBGTM. Đồng thời, cũng chưa thấy có nghiên cứu nào đánh giá khả năng sống của TBGTM ở điều kiện bảo quản thường hoặc 4 °C nhằm ứng dụng làm mực in 3D sinh học và nguyên liệu cho các loại súng phun tế bào. Do vậy, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại dung dịch bảo quản TBGTM ở 4 °C dưới sự hỗ trợ của exosome tiết ra từ chính dòng TBGTM thử nghiệm.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô dây rốn

TBGTM ở lần cấy chuyển thứ 2 (P2) (cung cấp bởi nhóm nghiên cứu EV - Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, thu thập và phân lập theo Quyết định của Hội đồng Y đức số: 278/2020/QĐ-VINMEC) được rã đông trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12) (Gibco, Massachusetts, Hoa Kỳ) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) (Gibco, Massachusetts, Hoa Kỳ). Sau đó, hỗn hợp này được ly tâm ở tốc độ  $500 \times g/5$  phút/4 °C để thu tế bào. Phần cặn tế bào sẽ được huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy (DMEM/F12 + 10% FBS) và cấy vào chai nuôi với mật độ 375,000 tế bào/chai T75 (Nunc, Thermo Scientific, Massachusetts, Hoa Kỳ) đã được phủ một lớp cơ chất CTS™ CELLstart™ (pha loãng trong PBS với tỷ lệ 1: 300). Tế bào sẽ được nuôi ở 37 °C với 5% CO<sub>2</sub> từ 4 đến 5 ngày cho đến khi bao phủ 80 - 90% bề mặt chai nuôi cấy sẽ tiến hành cấy chuyển. Tế bào được sử dụng trong nghiên cứu sẽ được thu hoạch ở P5.

### 2.2. Phân tích dấu ấn chỉ thị tế bào gốc trung mô dây rốn

TBGTM sau khi thu hoạch ở P5 sẽ được xác định dấu ấn bề mặt bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) với bộ Human Analysis Kit (BD Biosciences, Hoa Kỳ), bao gồm các kháng nguyên dương (CD90, CD73, và CD105) và các kháng nguyên âm

(CD45, CD34, CD11b/CD19, và HLA-DR). Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của bộ Kit và tế bào ủ với kháng thể ở điều kiện tối để tránh làm ảnh hưởng đến khả năng phát huỳnh quang. Mẫu tế bào được đọc và phân tích bằng máy flow cytometer (Beckman Coulter, Hoa Kỳ) tích hợp phần mềm Navios 3.2 để phân tích dữ liệu.

### 2.3. Xác định khả năng tạo cụm của Tế bào gốc trung mô dây rốn

Một trong số đặc điểm của tế bào gốc là khả năng tạo cụm (colony-forming unit - CFU) khi được gieo cấy với mật độ tế bào thấp. Bổ sung 2 mL môi trường nuôi cấy tế bào vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng, cấy tế bào vào với mật độ 4 tế bào/cm<sup>2</sup> và ủ trong điều kiện 37 °C/5% CO<sub>2</sub> trong 14 ngày, thay mới môi trường sau mỗi 3 - 4 ngày. Tiếp theo, môi trường nuôi được loại bỏ và rửa tế bào bằng PBS, cố định tế bào bằng methanol 100% và sau đó nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm Giemsa (Sigma) (pha trong nước cất với tỷ lệ 1:10) trong khoảng 5 - 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ thuốc nhuộm và rửa đĩa tế bào bằng nước khử ion từ 2 đến 3 lần. Quan sát các cụm tế bào bắt màu tím dưới kính hiển vi. Trong đó, quần thể tế bào được xác định là cụm khi số tế bào đạt tối thiểu 20 tế bào/cụm.

### 2.4. Xác định khả năng biệt hoá đa dòng của tế bào gốc trung mô dây rốn

Trước tiên, TBGTMDR được gieo trên bề mặt đĩa nuôi cấy với mật độ 4000 tế bào/giếng của đĩa 96 giếng trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS. Sau 2 - 3 ngày, khi mật độ tế bào đạt 70 - 80% bề mặt chai nuôi cấy, loại bỏ môi trường nuôi tăng sinh và bổ sung môi trường biệt hóa (100 µL/giếng). Sau 20 - 21 ngày nuôi, tế bào được cố định bằng dung dịch PFA 4% trong vòng 30 - 60 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dung dịch cố định, tiến hành nhuộm mẫu biệt hóa xương với Alizarin Red S (pH = 4,2, 100 µL/giếng) trong vòng 15 phút và rửa tế bào 2 lần với nước cất (100 - 200 µL). Nhuộm biệt hóa mỡ với thuốc nhuộm Oil Red O (1 Oil Red O : 2 nước cất) (100 µL/giếng) trong 15 phút ở nhiệt độ thường. Nhuộm biệt hóa sụn với Alcian Blue trong 60 - 90 phút, hút bỏ thuốc

nhuộm và rửa tế bào 1 lần với HCl 0,1N (100 - 200 µL/giếng) và 2 lần với nước cất (100 - 200 µL/giếng). Sau đó, các mẫu tế bào đã nhuộm được soi kiểm tra và chụp ảnh bằng kính hiển vi soi ngược.

### 2.5. Phân lập exosome từ nuôi cấy Tế bào gốc trung mô dây rốn

Khi TBGTMDR ở P5 nuôi đạt độ che phủ 80% - 95% bề mặt chai nuôi cấy thì tiến hành thu hoạch dịch nổi. Tiếp theo, dịch nổi được ly tâm ở lực  $16.500 \times g/30$  phút (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Hoa Kỳ) để loại bỏ cặn là tế bào chết, mảnh vụn, thể tế bào chết theo chương trình và các vi thể. Dịch nổi tiếp tục được ly tâm ở  $100.000 \times g/90$  phút/4 °C để thu cặn là exosome. Cặn exosome thu được sẽ tái huyền phù trong 1 mL PBS. Exosome được thu thập theo quy trình của nhóm nghiên cứu EV (Trung tâm Công nghệ cao Vinmec), theo quy trình này exosome có biểu hiện hình thái điển hình cái bát (cup-shaped) và biểu hiện marker CD63 [18].

### 2.6. Phân tích theo dõi chuyển động hạt nano (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA)

Kích thước hạt exosome được phân tích bằng kỹ thuật theo dõi chuyển động hạt nano (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA). Exosome được ủ với dung dịch nhuộm Cell Mask Green (CMG) trong điều kiện tránh ánh sáng, với tỷ lệ 9 µL exosome : 1 µL CMG, trong 1 giờ. Exosome đã nhuộm màu sau đó được pha loãng với PBS để đạt nồng độ  $10^5 - 10^9$  hạt/mL. Sau đó, bơm 1 mL hỗn hợp exosome vào buồng chứa mẫu và thiết lập chương trình ở chế độ laser (laser mode) để phát hiện tín hiệu huỳnh quang ở bước sóng 488 nm và chế độ tán xạ (scatter mode). Phần mềm sẽ đo kích thước hạt exosome dựa trên nguyên lý chuyển động Brown của hạt trong dịch lỏng.

### 2.7. Xác định tỷ lệ sống tế bào trong dung dịch bảo quản

TBGTMDR và exosome sau khi thu hoạch sẽ trộn với các dung dịch bảo quản khác nhau để đánh giá khả năng sống của tế bào. Các nồng độ tế bào thử nghiệm:

Nhóm 1:  $1 \times 10^6$  tế bào/mL dung dịch bảo quản.

Nhóm 2:  $2 \times 10^6$  tế bào/mL dung dịch bảo quản.

Nhóm 3:  $5 \times 10^6$  tế bào/mL dung dịch bảo quản.

Nhóm dung dịch bảo quản thử nghiệm gồm dung dịch bảo quản (A, B, C) không bổ sung exosome và dung dịch bảo quản (A, B, C) bổ sung exosome tiết ra từ số lượng tế bào tương ứng với mật độ tế bào thử nghiệm. Tức là dung dịch bảo quản + exosome từ  $1 \times 10^6$  tế bào,  $2 \times 10^6$  tế bào và  $5 \times 10^6$  tế bào.

Thành phần dung dịch bảo quản như sau:

Dung dịch bảo quản A: Glucose, Albumin huyết thanh người, Heparin calcium, Axit ascorbic, Axit amin không thiết yếu;

Dung dịch bảo quản B: Phosphate buffer saline, Trehalose, Heparin calcium, Albumin huyết thanh người;

Dung dịch bảo quản C: Ringer lactate.

Tế bào và exosome được pha loãng trong các loại dung dịch bảo quản và bảo quản ở điều kiện  $4^\circ\text{C}$ . Các nhóm tế bào sẽ được đánh giá tỷ lệ sống trong ba mốc thời điểm khác nhau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ.

Để đánh giá tỷ lệ sống của tế bào, chúng tôi nhuộm tế bào với Trypan Blue sau đó nhỏ vào buồng đếm hồng cầu Neubauer và quan sát bằng kính hiển vi để xác định tỷ lệ sống.

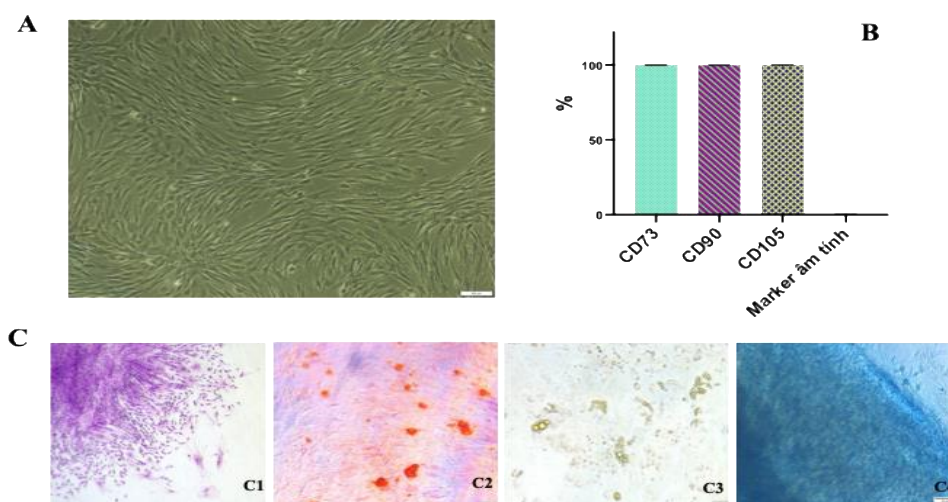
## 2.8. Trình bày dữ liệu và phân tích thống kê

Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình và so sánh nhóm sử dụng ANOVA trên phần mềm Graph Prism (phiên bản Prism 10). Sự khác biệt giữa các nhóm được xem là có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Kết quả phân tích đặc điểm của tế bào gốc trung mô dây rốn

TBGTMDR ở P5 sẽ được quan sát kiểm tra hình thái, khả năng tạo cụm, khả năng biệt hoá đa dòng và biểu hiện dấu ấn bề mặt. Kết quả cho thấy, TBGTMDR sau khi nuôi đến P5 đều biểu hiện hình thái đặc trưng của tế bào gốc trung mô dạng thuần dài giống nguyên bào sợi, có kích thước tương đồng nhau (Hình 1A). Đây là các đặc điểm điển hình của TBGTMDR trong nuôi cấy 2D và phù hợp với dữ liệu công bố trước đây [5].



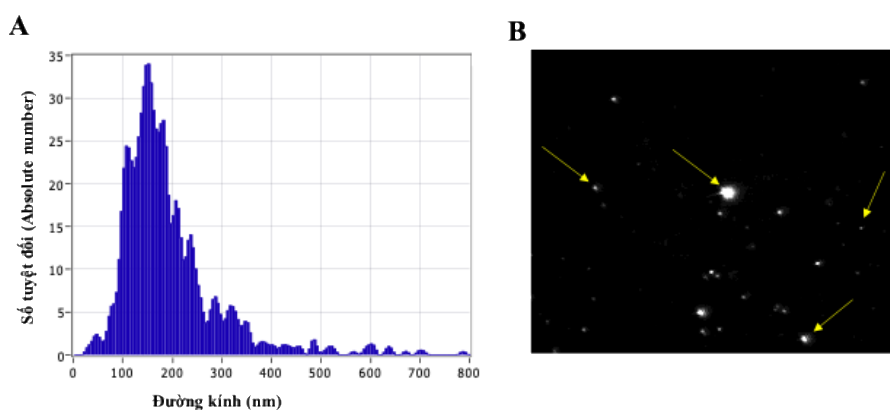
Hình 1. Đặc điểm của TBGTMDR ở P5.

A) Hình thái TBGTMDR ở P5 quan sát dưới kính hiển vi khi ở mật độ che phủ khoảng 80 - 90% bề mặt chai nuôi cấy. B) Biểu hiện dấu ấn bề mặt của TBGTMDR ở P5. C) Khả năng tạo cụm và biệt hoá đa dòng của TBGTMDR ở P5; trong đó C1): ảnh minh hoạ khả năng tạo cụm, C2): ảnh minh hoạ khả năng biệt hoá xương, C3): ảnh minh hoạ khả năng biệt hoá mỡ, C4): ảnh minh hoạ khả năng biệt hoá sụn.

Bên cạnh đó, dấu ấn bề mặt dương tính (CD73, CD90 và CD105) của TBGTMDR P5 biểu hiện cao hơn 95% và dấu ấn bề mặt âm tính (CD11b/CD19, CD34, CD45 và HLA-DR) biểu hiện nhỏ hơn 2% (Hình 1B). Khi kiểm tra khả năng tạo cụm và khả năng biệt hoá, TBGTMDR ở P5 đều có khả năng tạo cụm và biệt hoá đa dòng thành tế bào xương, sụn và mỡ (Hình 1C). Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với các kết quả công bố trước đây và biểu hiện nhất quán đáp ứng các tiêu chí của ISCT [5]. Do vậy TBGTMDR ở P5 trong nghiên cứu này vẫn đáp ứng đủ tiêu chuẩn của một dòng tế bào gốc trung mô theo ISCT.

### 3.2. Kết quả phân lập exosome

Chúng tôi sử dụng phương pháp siêu ly tâm để phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy của TBGTMDR P5 theo quy trình của nhóm nghiên cứu đã công bố trước đây [18]. Exosome sau khi thu được phân tích về phân bố kích thước bằng kỹ thuật NTA. Kết quả cho thấy exosome phân bố từ 40 nm đến 350 nm, với đỉnh cao nhất ở 150 nm (Hình 2). Các hạt exosome thu được tập trung chủ yếu ở dải kích thước 100 nm - 180 nm. Đặc điểm kích thước này cho thấy các hạt thu được trong phân đoạn exosome phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đây [19, 20].



Hình 2. Hình ảnh hạt exosome và phân bố kích thước exosome bằng phương pháp NTA.  
A) Sự phân bố kích của quần thể exosome thu được sau khi sử dụng phương pháp siêu ly tâm.  
B) Exosome chụp dưới kính hiển vi của NTA, mũi tên chỉ ví dụ các hạt exosome chụp được.

### 3.3. Khả năng sống của tế bào trong các loại dung dịch bảo quản không bổ sung exosome

Để có thể dễ dàng ứng dụng TBGTMDR trong điều kiện 4 °C, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng sống của tế bào trong các loại dung dịch bảo quản khác nhau có bổ sung exosome và dung dịch bảo quản không bổ sung exosome. Kết quả cho thấy rằng, nhìn chung, tỷ lệ tế bào sống ở cả ba mật độ tế bào đều giảm đi từ thời điểm 12 giờ, 24 giờ và giảm mạnh ở 48 giờ trong ba loại dung dịch bảo quản có bổ sung exosome và không bổ sung exosome (Hình 3).

Đối với khả năng sống của tế bào trong dung dịch bảo quản không bổ sung exosome, tại thời điểm 12 giờ, tỷ lệ tế bào sống ở các mật độ

khác nhau ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  và  $5 \times 10^6$  tế bào/mL) trong cả ba loại dung dịch bảo quản A, dung dịch bảo quản B và dung dịch bảo quản C đều lớn hơn 80% (Hình 3). Tại thời điểm 24 giờ, tỷ lệ tế bào sống sót giảm dần xuống còn > 75% ở cả ba loại dung dịch bảo quản, và không có sự khác biệt giữa ba loại dung dịch bảo quản ở mật độ tế bào  $1 \times 10^6$  và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Tuy nhiên, với mật độ tế bào cao nhất là  $5 \times 10^6$  tế bào/mL, tỷ lệ tế bào sống trong dung dịch bảo quản A cao hơn so với dung dịch bảo quản B và C. Tới thời điểm 48 giờ, tỷ lệ tế bào sống giảm đáng kể ở cả ba dung dịch bảo quản, tỷ lệ tế bào chết cao nhất quan sát thấy ở dung dịch bảo quản B với cả ba mật độ tế bào khác nhau.



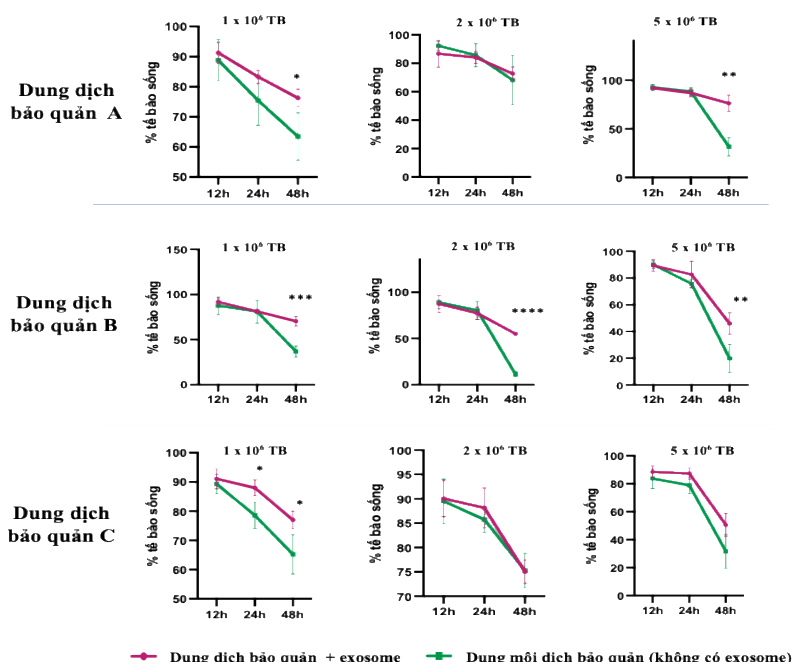
Cụ thể, tỷ lệ tế bào sống giảm xuống còn 36,8% (mật độ  $1 \times 10^6$  tế bào/mL), 19,9 % (mật độ  $5 \times 10^6$  tế bào/mL) và 11,4 % (mật độ  $2 \times 10^6$  tế bào/mL) ở dung dịch bảo quản B, đều thấp hơn đáng kể so với dung dịch bảo quản A và dung dịch bảo quản C. Ở mật độ  $5 \times 10^6$  tế bào/mL, tỷ lệ tế bào sống ở cả ba loại dung dịch bảo quản đều giảm xuống < 35% sau 48 giờ, tuy nhiên không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa ba loại dung dịch bảo quản này. Các kết quả này cho thấy, dung dịch bảo quản A có khả năng duy trì khả năng sống của tế bào tốt hơn ở mật độ tế bào thấp ( $1 \times 10^6$  và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL) và kém hơn với mật độ cao ( $5 \times 10^6$  tế bào/mL). Điều này trái với các nghiên cứu trước đây về mật độ tế bào không có ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào trong quá trình bảo quản đông lạnh [21, 22]. Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ đánh giá trong điều kiện  $4^\circ\text{C}$ , do vậy sẽ có sự sai khác với điều kiện bảo quản tế bào ở  $-80^\circ\text{C}$  hay trong ni tơ lỏng. Đồng thời, chưa có nghiên cứu nào đánh giá các loại dung dịch bảo quản tế bào sử dụng trực tiếp (không cần phải loại bỏ dung dịch hoặc rửa tế bào

trước khi sử dụng) trong thời gian dài ở điều kiện không đông lạnh. Do vậy, cần phải có thêm đánh giá về ảnh hưởng của mật độ tế bào cũng như thành phần các loại đệm, dung dịch bảo quản với mục đích ứng dụng trực tiếp tế bào ở điều kiện không đông lạnh này.

### 3.4. Khả năng sống của tế bào trong các loại dung dịch bảo quản có bổ sung exosome

Đối với khả năng sống của tế bào trong dung dịch bảo quản có bổ sung exosome, tỷ lệ tế bào sống cao hơn so với dung dịch bảo quản không bổ sung exosome (Hình 3).

Ở thời điểm 12 giờ, kết quả tương tự như trong dung dịch bảo quản không bổ sung exosome khi tất cả các mật độ tế bào khác nhau đều sống > 80%. Tới 24 giờ, tỷ lệ tế bào sống ở tất cả các điều kiện đều giảm dần, tuy nhiên tỷ lệ sống tế bào vẫn cao hơn 80% ngoại trừ điều kiện dung dịch bảo quản B có bổ sung exosome với số lượng tế bào  $2 \times 10^6$  tế bào/mL (77%). Tới 48 giờ, dung dịch bảo quản A có bổ sung exosome vẫn có khả năng duy trì hơn 75% số lượng tế bào sống ở tất cả các điều kiện thử nghiệm.



Hình 3. Tỷ lệ tế bào sống trong các loại dung dịch bảo quản có bổ sung exosome và không bổ sung exosome ở các thời điểm 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ.

Đối với dung dịch bảo quản B, chỉ có điều kiện mật độ tế bào  $1 \times 10^6$  tế bào/mL có tỷ lệ tế bào sống > 50%, còn các mật độ tế bào khác đều có tỷ lệ tế bào sống < 50%. Ở dung dịch bảo quản C có bổ sung exosome, chỉ có mật độ tế bào  $5 \times 10^6$  có tỷ lệ sống thấp là 50%, hai mật độ tế bào  $1 \times 10^6$  và  $2 \times 10^6$  đều sống cao > 75%. Điều đáng lưu ý là tại thời điểm 48 giờ, tế bào ủ trong các dung dịch bảo quản có bổ sung exosome ở hầu hết các mật độ đều cho tỷ lệ tế bào sống cao hơn so với dung dịch bảo quản không bổ sung exosome. Điều này cho thấy dung dịch bảo quản có bổ sung exosome có khả năng duy trì tế bào sống tốt hơn so với dung dịch bảo quản không bổ sung exosome.

Kết quả này có thể là do exosome có mang nhiều yếu tố có khả năng bảo vệ sự sống tế bào. Tuy nhiên, chúng tôi cũng chưa tìm thấy có nghiên cứu khoa học nào đánh giá khả năng exosome bảo vệ tế bào trong điều kiện thường. Chỉ có các nghiên cứu về exosome bảo vệ tế bào và chức năng của chúng trong nuôi cấy 2D [23, 24].

Trong nghiên cứu này, đối với hai loại dung dịch bảo quản A và B, chúng tôi bổ sung albumin huyết thanh người, axit amin không thiết yếu và axit ascorbic giúp cung cấp dinh dưỡng cho tế bào và giúp tăng cường chuyển hoá trong tế bào khi bảo quản. Thêm vào đó, DNA có thể bị tổn thương trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$ , vì vậy, chúng tôi bổ sung trehalose vào dung dịch bảo quản B để giảm thiểu sự tổn thương của DNA [27]. Dữ liệu từ nghiên cứu này của chúng tôi chỉ đưa ra được dung dịch bảo quản A và C tốt hơn dung dịch bảo quản B, tuy nhiên chưa thực sự khẳng định được loại dung dịch bảo quản nào có thể ứng dụng do còn thiếu các nghiên cứu về chức năng tế bào sau bảo quản. Do vậy, cần thiết triển khai các nghiên cứu sâu hơn nữa để chứng minh ảnh hưởng của các thành phần trong dung dịch bảo quản này đến khả năng sống, chức năng tế bào và tính phù hợp cho ứng dụng thực tế.

### 3.5. Khả năng kết dính của tế bào bảo quản trong các loại dung dịch bảo quản

Tại mỗi thời điểm kiểm tra, chúng tôi quan sát sự kết dính tế bào trong các điều kiện dung dịch

bảo quản. Đối với dung dịch bảo quản không bổ sung exosome, chúng tôi không quan sát thấy tế bào kết dính tại cả ba thời điểm theo dõi (12 giờ, 24 giờ và 48 giờ) ở dung dịch bảo quản A và dung dịch bảo quản B; tuy nhiên, chúng tôi ghi nhận sự kết dính tế bào trong dung dịch bảo quản C bắt đầu từ 24 giờ trong nhóm nghiên cứu mật độ tế bào  $1 \times 10^6$ /mL dung dịch bảo quản. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở các nhóm nghiên cứu mật độ tế bào cao hơn  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Điển hình với nhóm thí nghiệm mật độ cao  $5 \times 10^6$  tế bào/mL, cả ba loại dung dịch bảo quản đều cho thấy sự kết dính của tế bào từ thời điểm 12 giờ bảo quản (Hình 4A).

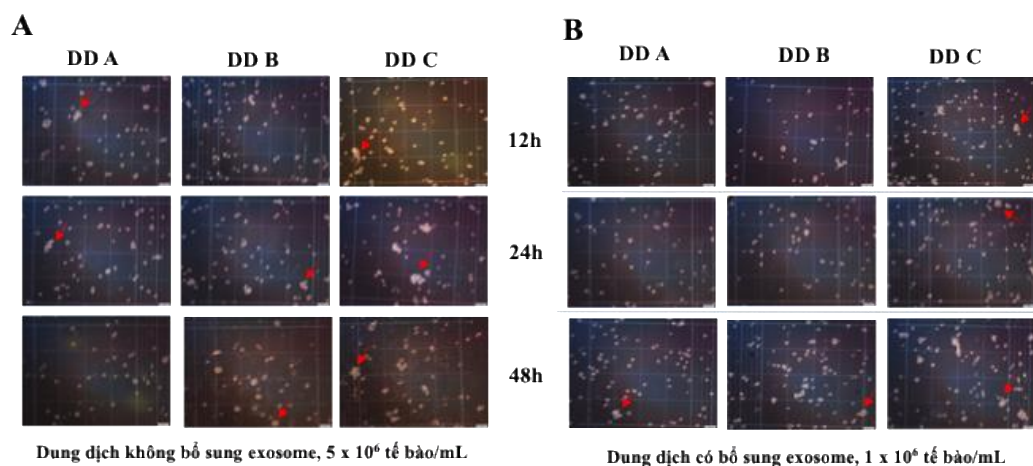
Trái ngược với nhóm dung dịch bảo quản không bổ sung exosome, các nhóm nghiên cứu trong dung dịch bảo quản có bổ sung exosome đều có biểu hiện các tế bào bám dính tạo cụm với nhau nhiều hơn. Ở mật độ tế bào  $1 \times 10^6$  tế bào/mL, các dung dịch bảo quản đều làm cho tế bào kết dính với nhau tại 48 giờ, thậm chí tại thời điểm 12 giờ ở dung dịch bảo quản C (Hình 4B).

Ở mật độ tế bào  $2 \times 10^6$  tế bào/mL, các tế bào kết dính với nhau từ thời điểm 24 giờ ở dung dịch bảo quản A và dung dịch bảo quản C. Đặc biệt, tế bào ở mật độ cao nhất  $5 \times 10^6$  tế bào/mL kết dính ở tất cả các thời điểm trong cả ba loại dung dịch bảo quản. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng việc sử dụng muối (có trong dung dịch bảo quản B) có thể làm tăng cường sự kết dính ở các tế bào biểu mô trong khoang bụng [25]. Do vậy, chúng tôi đã bổ sung thêm heparin calcium với vai trò loại bỏ sự kết dính tế bào trong huyền phù, mà không làm giảm sự phát triển của tế bào [26]. Tuy nhiên, hiệu quả đạt được không như mong đợi khi mà tất cả các dung dịch bảo quản đều gây ra hiện tượng tế bào kết dính với nhau sau 48 giờ. Đáng chú ý là khả năng kết dính tế bào tăng lên trong nhóm dung dịch bảo quản có bổ sung exosome. Theo y văn, exosome có khả năng điều hoà hình thái tế bào và tăng cường sự kết dính của tế bào gốc trung mô từ tủy xương [27].



Bên cạnh đó, có thể là trên bề mặt tế bào và exosome có các thụ thể tương tác và kết dính với nhau để thúc đẩy chức năng tương tác tế bào đích. Do vậy, exosome có thể là cầu nối kết

đính giữa các tế bào hoặc kích thích tế bào tăng khả năng bám dính. Điều này có thể là lý do tại sao khi bổ sung exosome vào dung dịch bảo quản thì các tế bào lại có sự kết dính mạnh mẽ hơn.



Hình 4. Hình ảnh đếm tế bào trong buồng đếm tế bào.

A) Mật độ tế bào  $5 \times 10^6$  tế bào/mL dung dịch bảo quản không bổ sung exosome.

B) Mật độ tế bào  $1 \times 10^6$  tế bào/mL dung dịch bảo quản có bổ sung exosome.

DD A: dung dịch bảo quản A, DD B: dung dịch bảo quản B, DD C: dung dịch bảo quản C.

#### 4. Kết luận

Tế bào gốc trung mô dây rốn có khả năng sống trong dung dịch bảo quản A (Glucose, Albumin huyết thanh người, Heparin Calcium, Axit ascorbic, Axit amin không thiết yếu), dung dịch bảo quản B (Phosphate buffer saline, Trehalose, Heparin Calcium, Albumin huyết thanh người) và dung dịch bảo quản C (Ringer Lactate) đến 48 giờ ở điều kiện  $4^\circ\text{C}$ . Khả năng sống của tế bào giảm đi theo thời gian. Trong dung dịch bảo quản có chứa exosome, khả năng sống của tế bào tốt hơn đáng kể cho tới thời điểm 48h. Tuy nhiên, tế bào trong dung dịch bảo quản chứa exosome lại có mức độ kết dính với nhau cao hơn so với trong dung dịch bảo quản không bổ sung exosome. Đồng thời, điểm hạn chế của nghiên cứu là thiếu đánh giá đặc điểm và chức năng tế bào sau bảo quản; do vậy cần có thêm các nghiên cứu về khả năng tăng sinh, tính gốc và chức năng tế bào sau quá trình bảo quản trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### Lời cảm ơn

Chúng tôi cảm ơn Dự án VINIF.2021.DA00193 đã tài trợ triển khai các nội dung trong bài báo này.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] G. Sheng, The Developmental Basis of Mesenchymal Stem/stromal Cells (MSCs), BMC Developmental Biology, Vol. 15, 2015, pp. 44, <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0094-5>.
- [2] J. Ma, J. Wu, L. Han, X. Jiang, L. Yan, J. Hao, H. Wang, Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Membrane, Umbilical Cord, and Chorionic Plate under Serum-free Condition, Stem Cell Research & Therapy, Vol. 10, No. 1, 2019, pp. 19, <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1104-x>.
- [3] T. N. Inoue, H. He, Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells: Their Advantages and Potential Clinical Utility, World Journal Stem Cells, Vol. 6, No. 2, 2014, pp. 195-202, <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.195>.

- [4] J. Bagge, J. N. MacLeod, L. C. Berg, Cellular Proliferation of Equine Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Decline with Increasing Donor Age, *Frontiers in Veterinary Science*, Vol. 7, 2020; pp. 602403, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.602403>.
- [5] L. M. Hang, N. T. Lung, H. H. Diem, B. Q. Trung, N. T. N. Ha, M. T. Hien, T. P. Dong, N. D. Tu, N. T. Liem, T. T. T. Uyen, Differential Development of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells During Long-Term Maintenance in Fetal Bovine Serum-Supplemented Medium and Xeno- and Serum-Free Culture Medium, *Cellular Reprogramming*, Vol. 23, No. 6, 2021, pp. 359-369, <https://doi.org/10.1089/cell.2021.0050>.
- [6] M. D. Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, A. M. Gianni, Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli, *Blood*, Vol. 99, No. 10, 2002, pp. 3838-43, <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3838>.
- [7] V. Miceli, M. Bulati, G. Iannolo, G. Zito, A. Gallo, P. G. Conaldi, Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, No. 2, 2021, <https://doi.org/10.3390/ijms22020763>.
- [8] G. D. Sagaradze, N. A. Basalova, A. Y. Efimenko, V. A. Tkachuk, Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 8, 2020, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576176>.
- [9] M. D. Kim, S. S. Kim., H. Y. Cha, S. H. Jang, D. Y. Chang, W. Kim, H. Suh-Kim, J. H. Lee, Therapeutic Effect of Hepatocyte Growth Factor-Secreting Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Liver Fibrosis, *Experimental & Molecular Medicine*, Vol. 46, No. 8, 2014, pp. e110, <https://doi.org/10.1038/emm.2014.49>.
- [10] G. Li, X. A. Zhang, H. Wang, X. Wang, C. L. Meng, C. Y. Chan, D. T. Yew, K. S. Tsang, K. Li, S. N. Tsai, S. M. Ngai, Z. C. Han, M. C. Lin, M. L. He, H. F. Kung, Erratum to: Comparative Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Bone Marrow, Umbilical Cord and Placenta: Implication in The Migration, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 720, 2012, [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0254-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0254-1_18).
- [11] R. Pal, M. Hanwate, M. Jan, S. Totey, Phenotypic and Functional Comparison of Optimum Culture Conditions for Upscaling of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 3, No. 3, 2009, pp. 163-174, <https://doi.org/10.1002/term.143>.
- [12] H. S. Sohn, J. S. Heo, H. S. Kim, Y. Choi, H. O. Kim, Duration of in Vitro Storage Affects the Key Stem Cell Features of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Transplantation, *Cytotherapy*, Vol. 15, No. 4, 2013, pp. 460-466, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.015>.
- [13] K. Muraki, M. Hirose, N. Kotobuki, Y. Kato, H. Machida, Y. Takakura, H. Ohgushi, Assessment of Viability and Osteogenic Ability of Human Mesenchymal Stem Cells After Being Stored in Suspension for Clinical Transplantation, *Tissue Engineering*, Vol. 12, No. 6, 2006, pp. 1711-1719, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1711>.
- [14] K. A. Lee, W. Shim, M. J. Paik, S. C. Lee, J. Y. Shin, Y. H. Ahn, K. Park, J. H. Kim, S. Choi, G. Lee, Analysis of Changes in The Viability and Gene Expression Profiles of Human Mesenchymal Stromal Cells over Time. *Cytotherapy*, Vol. 11, No. 6, 2009, pp. 688-97, <https://doi.org/10.3109/14653240902974032>.
- [15] P. Mazur, *Principles of Cryobiology*, CRC Press, 2006, pp. 3-56.
- [16] J. G. Baust, J. M. Baust, *Advances in Biopreservation* (1<sup>st</sup> ed.), CRC Press, 2006.
- [17] Y. Zhou, B. Zhao, X. L. Zhang, Y. J. Lu, S. T. Lu, J. Cheng, Y. Fu, L. Lin, N. Y. Zhang, P. X. Li, J. Zhang, J. Zhan, Combined Topical and Systemic Administration with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (HadsC) and HADSC-Derived Exosomes Markedly Promoted Cutaneous Wound Healing and Regeneration, *Stem Cell Research & Therapy*, Vol. 12, No.1, 2021, pp. 257, <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02287-9>.
- [18] H. H. Diem, N. D. Tu, N. H. Phuong, N. X. Hung, D. T. X. Phuong, D. V. Duc, D. T. M. Phuong, B. T. H. Hue, T. Q. Mai, V. M. Duc, H. T. M. Nhung, N. T. Liem, T. T. T. Uyen, Differential Wound Healing Capacity of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Originated from Bone Marrow, Adipose Tissue and Umbilical Cord Under Serum- and Xeno-Free Condition, *Frontiers in Molecular Biosciences*, Vol. 7, 2020, pp. 119, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00119>.

- [19] N. T. Huyen, D. H. Hoang, D. M. Chau, N. X. Hung, H. H. Diem, D. X. Hai, T. Q. Trung, N. D. Tu, N. T. Liem, T. T. T. Uyen, Cytokine-primed Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Enhanced Therapeutic Effects of Extracellular Vesicles on Osteoarthritic Chondrocytes, *Front Immunol.*, Vol. 13, 2022, pp. 1041592, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1041592>.
- [20] K. E. Thane, A. M. Davis, A. M. Hoffman, Improved Methods for Fluorescent Labeling and Detection of Single Extracellular Vesicles Using Nanoparticle Tracking Analysis, *Scientific Reports*, Vol. 9, No. 1, 2019, pp. 12295, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48181-6>.
- [21] S. Rowley, W. Bensinger, T. Gooley, C. Buckner, Effect of Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopreservation, *Blood*, Vol. 83, No. 9, 1994, pp. 2731-2736, <https://doi.org/10.1182/blood.V83.9.2731.2731>.
- [22] S. Bahsoun, M. J. Brown, K. Coopman, E. C. Akam, Cryopreservation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells at High Concentration is Feasible, *Biopreservation and Biobanking*, Vol. 21, No. 5, 2022, pp. 450-457, <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0017>.
- [23] X. Sun, J. H. Jung, O. Arvola, M. R. Santoso, R. G. Giffard, P. C. Yang, C. M. Stary, Stem Cell-Derived Exosomes Protect Astrocyte Cultures From in Vitro Ischemia and Decrease Injury as Post-Stroke Intravenous Therapy, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 13, 2019, pp. 394, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00394>.
- [24] G. D. Micó, M. Mittelbrunn, Role of Exosomes in the Protection of Cellular Homeostasis, *Cell Adhesion & Migration*, Vol. 11, No. 2, 2017, pp. 127-34, <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1251000>.
- [25] J. Cwalinski, R. Staniszewski, E. Baum, T. Jasinski, B. Mackowiak, A. Bręborowicz, Normal Saline May Promote Formation of Peritoneal Adhesions, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, Vol. 8, No. 6, 2015, pp. 8828-8834.
- [26] L. Li, J. Qin, Q. Feng, H. Tang, R. Liu, L. Xu, Z. Chen, Heparin Promotes Suspension Adaptation Process of CHO-TS28 Cells by Eliminating Cell Aggregation, *Molecular Biotechnology*, Vol. 47, No. 1, 2011, pp. 9-17, <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9306-1>.
- [27] Y. Lan, Q. Jin, H. Xie, C. Yan, Y. Ye, X. Zhao, Z. Chen, Z. Xie, Exosomes Enhance Adhesion and Osteogenic Differentiation of Initial Bone Marrow Stem Cells on Titanium Surfaces, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 8, 2020, pp. 583234, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.583234>.