

DOI: 10.58490/ctump.2025i87.3466

BƯỚC ĐẦU THIẾT LẬP QUY TRÌNH THU NHẬN EXOSOME TỪ DỊCH NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ HƯỚNG ĐẾN ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC TÁI TẠO

Ngô Thái Minh Quân¹, Huỳnh Duy Thảo¹, Nguyễn Tuấn Kiệt¹,
Đương Thị Phương Thanh¹, Trương Quốc Kỳ¹, Tô Minh Quân²,
Trương Công Hoà¹, Nguyễn Thanh Bình^{1,3}, Ngô Minh Vinh¹, Trần Công Toại^{1*}

1. Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

2. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

3. Trường Đại học Thủ Dầu Một

*Email: trancongtoai@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 16/3/2025

Ngày phản biện: 08/4/2025

Ngày duyệt đăng: 25/5/2025

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Exosome đang mở ra một hướng đi mới trong y học tái tạo với khả năng hỗ trợ, sửa chữa và phục hồi mô bị tổn thương. Tiềm năng của chúng trong việc cải thiện sức khỏe và điều trị các bệnh lý phức tạp là rất lớn. Trong tương lai, exosome có thể trở thành một công cụ mạnh mẽ và phổ biến trong y học tái tạo. **Mục tiêu nghiên cứu:** Nghiên cứu bước đầu thiết lập quy trình phân lập, thu nhận và định danh nguồn exosome để cung cấp nguồn exosome đạt tiêu chuẩn và an toàn để phục vụ cho các nghiên cứu trong sinh học và y học. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tế bào gốc trung mô được phân lập từ mô mỡ người. Dịch nuôi cấy tế bào sau đó được thu nhận làm nguồn nguyên liệu để phân lập exosome. Exosome sau khi thu nhận được đánh giá và định danh dựa vào các tiêu chuẩn hình thái, kích thước và sự biểu hiện protein bề mặt theo tiêu chuẩn ISEV. Sản phẩm exosome cũng được định lượng nồng độ protein bằng phương pháp Bradford và đánh giá sự an toàn qua phương pháp đánh giá độ vô khuẩn và sự hiện diện của một số kim loại nặng. **Kết quả:** Dịch sản phẩm exosome sau khi thu nhận có chứa các túi exosome có dạng hình cầu, kích thước các exosome nằm trong khoảng 30 – 200 nm. Các hạt exosome biểu hiện được các protein CD9, CD63 và CD81 bằng flow cytometry. Dịch exosome có nồng độ khoảng 45.22 µg/ml và không có hiện diện một số kim loại nặng được khảo sát như Chì, Cadmium, Asen và Thủy Ngân. **Kết luận:** Sản phẩm exosome đạt tiêu chuẩn theo tiêu chuẩn quốc tế ISEV, đảm bảo an toàn và chất lượng đặc biệt là các nghiên cứu hướng đến y học tái tạo.

Từ khóa: Tế bào gốc trung mô, exosome, y học tái tạo.

ABSTRACT

INITIAL ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR ISOLATING EXOSOME FROM THE CULTURE MEDIUM OF ADIPOSE TISSUE- DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS FOR APPLICATIONS IN REGENERATIVE MEDICINE

Ngo Thai Minh Quan¹, Huynh Duy Thao¹, Nguyen Tuan Kiet¹,
Duong Thi Phuong Thanh¹, Truong Quoc Ky¹, To Minh Quan²,
Truong Cong Hoa¹, Nguyen Thanh Binh^{1,3}, Ngo Minh Vinh¹, Tran Cong Toai^{1*}

1. Pham Ngoc Thach University of Medicine

2. University of Science, Viet Nam National University Ho Chi Minh City

3. Thu Dau Mot University

Background: Exosome is opening a new direction in regenerative medicine with the ability to support, repair, and restore damaged tissue. Their potential in improving health and treating complex diseases is enormous. In the future, exosome may become a powerful and popular tool in regenerative medicine. **Objectives:** To initially establish a process for isolating, collecting, and identifying exosome sources to provide a standardized and safe source of exosome for research in biology and medicine. **Materials and methods:** Mesenchymal stem cells were isolated and expanded from human adipose tissue. The cultured cell supernatant was then used as the source material for exosome isolation. The resulting exosome product was identified based on morphology, size, and surface protein expression according to ISEV standards. The exosome product was also quantified for protein concentration using the Bradford method, and its safety was assessed for sterility and the presence of some heavy metals. **Results:** The exosome product after collection contained spherical exosome, with particle sizes ranging from 30 to 200 nm. By flow cytometry, the exosome particles expressed CD9, CD63, and CD81 proteins. The exosome solution had a concentration of about 45.22 µg/ml and did not contain some heavy metals surveyed, such as Lead, Cadmium, Arsenic, and Mercury. **Conclusion:** The exosome product solution meets ISEV international standards, ensuring safety and quality, especially for studies aimed at regenerative medicine.

Keywords: Mesenchymal stem cells, exosome, regenerative medicine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Exosome là các túi ngoại bào (extracellular vesicles) nhỏ, có kích thước từ 30 - 200 nm. Chúng được hình thành từ các endosome nội bào và được phóng thích ra môi trường ngoại bào khi các túi multivesicular bodies (MVBs) hòa nhập với màng tế bào. Exosome được bao bọc bởi một lớp màng lipid kép, bên trong chứa nhiều loại phân tử sinh học như protein, RNA (mRNA, miRNA) và các loại RNA phiên mã khác, DNA và các loại lipid đặc trưng đóng vai trò duy trì cấu trúc và chức năng của màng [1].

Exosome đóng vai trò quan trọng trong y học tái tạo nhờ khả năng tham gia vào quá trình truyền tín hiệu giữa các tế bào, điều hòa các quá trình sinh học và hỗ trợ phục hồi các mô tổn thương. Do đó, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: thiết lập quy trình phân lập, thu nhận và định danh nguồn exosome để cung cấp nguồn exosome đạt tiêu chuẩn và an toàn để phục vụ cho các nghiên cứu trong sinh học và y học [2].

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Exosome được thu nhận từ tế bào gốc trung mô trong mô mỡ người với quy trình phân lập tế bào được thực hiện theo nghiên cứu trước của chúng tôi [3] và được định danh theo tiêu chí của Hiệp hội Quốc tế về Liệu pháp Tế bào và Gene (International Society for Cell and Gene Therapy – ISCT). Tế bào gốc trung mô sau khi được thu nhận và nhân khối tại lần cấy chuyển thứ 2 sẽ được sử dụng để thu nhận exosome theo quy trình siêu ly tâm [4].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người:** Tế bào gốc trung mô được nuôi cấy sơ cấp và cấy chuyển trong môi trường nuôi cơ bản DMEM/F12 có chứa 15% FBS và kháng sinh penicillin-streptomycin. Sau khi được cấy chuyển lần thứ 2, môi trường nuôi cơ bản được thay thế bằng môi trường nuôi StemPro™ MSC SFM XenoFree (Gibco™) để thu nhận dịch nuôi tế bào và thu nhận exosome.

- **Thu nhận exosome theo phương pháp siêu ly tâm:** Thu nhận exosome bằng phương pháp siêu ly tâm là một kỹ thuật chuẩn, được sử dụng để phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp này đảm bảo thu nhận exosome có độ tinh sạch tương

đối, tránh nguy cơ gây nhiễm các thành phần ngoại lai. Quy trình thu nhận exosome được thực hiện theo các bước ly tâm được tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1. Tóm tắt quy trình thu nhận, phân lập và tinh sạch exosome từ dịch môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô.

STT	Các bước thực hiện	Mục đích	Tốc độ ly tâm (x g)	Thời gian (phút)
1	Ly tâm ban đầu (Low-speed centrifugation)	Loại bỏ các tế bào nguyên vẹn	300	10
		Loại bỏ các mảnh vụn tế bào	2.000	10
2	Ly tâm trung gian (Medium-speed centrifugation)	Loại bỏ các thể apoptotic và vi túi ngoại bào lớn (microvesicles lớn)	10.000	30
3	Siêu ly tâm tốc độ cao (High-speed ultracentrifugation)	Thu nhận exosome	100.000	70
4	Rửa mẫu (Washing step)	Loại bỏ các tạp chất hoặc protein hòa tan còn sót lại	100.000	70
5	Lọc qua phễu lọc 0.20 μm (Sartorius Minisart™)	Vô trùng và tinh sạch dịch exosome sau khi thu nhận		
6	Bảo quản exosome	Bảo quản mẫu ở -20°C để sử dụng trong thời gian dài		

- Định danh exosome theo tiêu chuẩn ISEV:

+ Định danh exosome theo tiêu chuẩn của Hiệp hội Nghiên cứu Túi ngoại bào Quốc tế (International Society for Extracellular Vesicles – ISEV), được quy định trong hướng dẫn MISEV2018 (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles). MISEV2018 đưa ra các tiêu chí cần thiết để xác định và phân loại exosome một cách chuẩn xác [1].

+ Theo đó, exosome có kích thước từ 30 – 200 nm, biểu hiện được các protein đặc trưng cho exosome như nhóm protein Tetraspanins (gồm CD9, CD63, CD81). Trong nghiên cứu này, nhóm chúng tôi sử dụng kính hiển vi điện tử quét (SEM) để đánh giá sự hiện diện và hình thái của exosome trong sản phẩm dịch exosome sau khi thu nhận. Khi có sự hiện diện của exosome, chúng tôi tiếp tục sử dụng phương pháp Bradford protein assay để định lượng hàm lượng protein tổng số dựa trên đường chuẩn xây dựng từ nồng độ BSA xác định. Tiếp theo, sử dụng phương pháp Dynamic Light Scattering (DLS) để đánh giá kích thước hạt. Sau khi ủ exosome với aldehyde/sulfate latex bead (Invitrogen™) và nhuộm kháng thể phát huỳnh quang, phương pháp flow cytometry được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện của một số protein bề mặt trên exosome là nhóm protein Tetraspanins (gồm CD9, CD63, CD81).

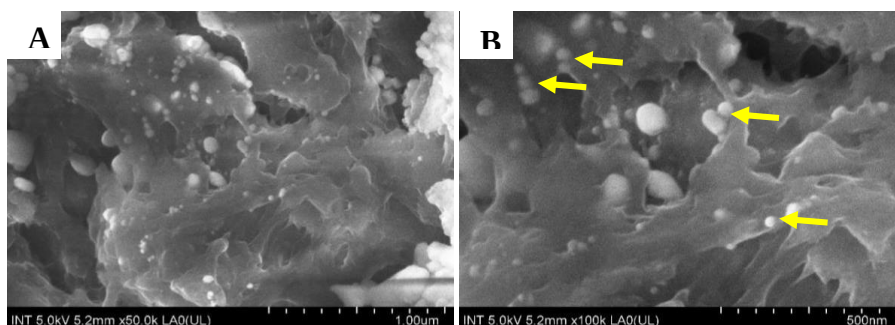
- **Đánh giá hàm lượng một số kim loại nặng độc hại:** Sản phẩm dịch exosome sau khi thu nhận được đánh giá sự hiện diện của một số kim loại nặng như Chì, Cadmium, Asen, Thủy ngân theo phương pháp H235 (ACM THA 05).

- **Đạo đức trong nghiên cứu:** Nghiên cứu này đã được thông qua Hội đồng đánh giá y đức trong nghiên cứu Y sinh cấp cơ sở tại Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch số: 1039/TĐHYKPNT-HĐĐĐ ký ngày 24/01/2024.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

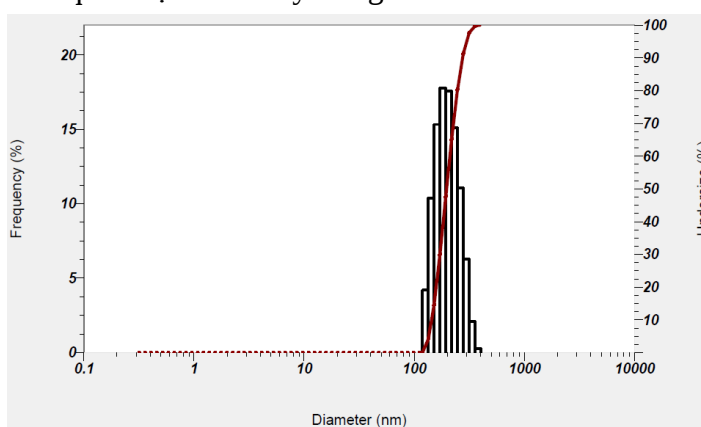
Hình thái và kích thước của exosome

Khi quan sát dịch exosome dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), kết quả cho thấy có sự hiện diện của các túi hình tròn, có đường kính theo thanh tỉ lệ dưới 200 nm (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh FE-SEM của exosome. Sử dụng kính hiển vi điện tử quét để quan sát hình thái và kích thước của các túi exosome cho thấy các túi này có dạng hình cầu (mũi tên màu vàng, hình 1.B) và kích thước nằm trong giới hạn 30 – 200 nm, đạt được tiêu chuẩn của ISEV

Kết quả khảo sát kích thước của các túi này bằng kỹ thuật đo Dynamic Light Scattering (DLS). Kết quả được trình bày trong hình 2.

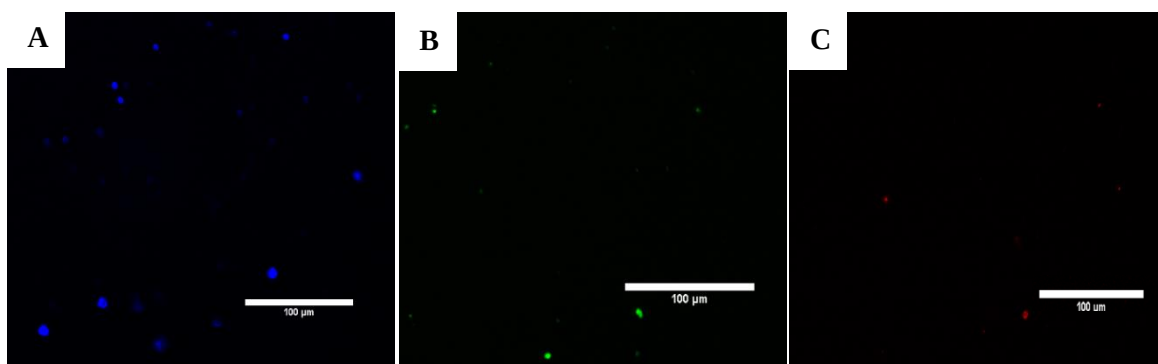


Hình 2. Đo kích thước exosome theo phương pháp Dynamic Light Scattering (DLS).

Kết quả đo cho thấy các túi có kích thước trung bình khoảng 154.5 nm.

Sự biểu hiện các protein bề mặt đặc trưng

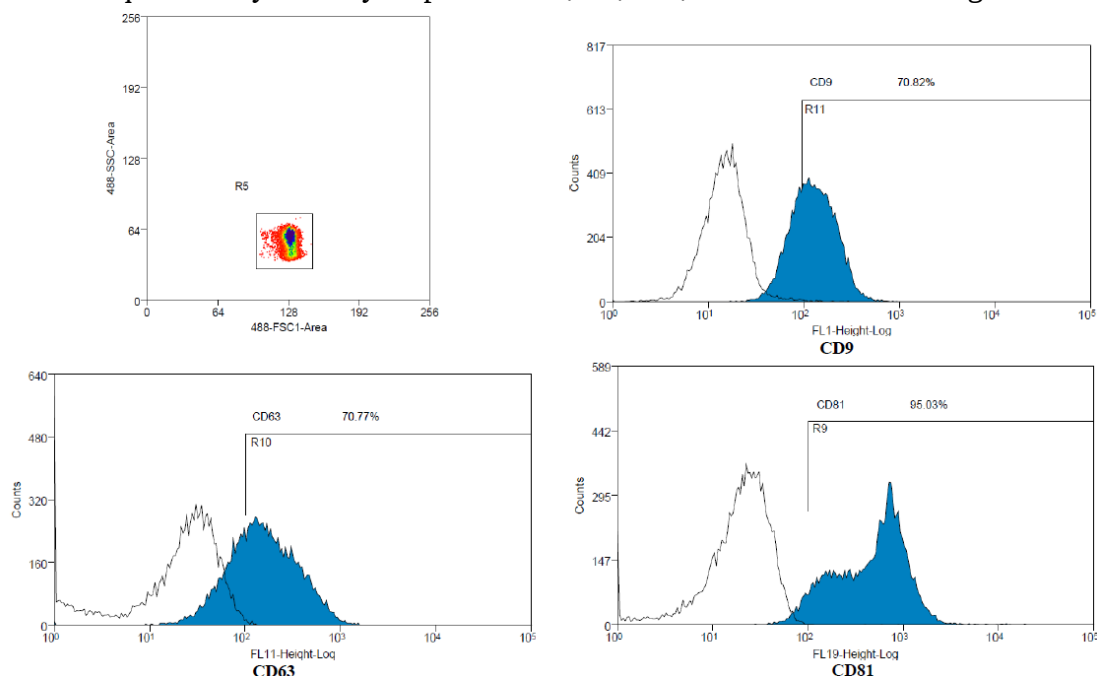
Nhuộm kháng thể phát huỳnh quang tương ứng CD9, CD63 và CD81 được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Kết quả chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang confocal (vật kính 20X) đối với phức hợp exosome-bead cho thấy tín hiệu huỳnh quang của các marker CD9, CD63 và

CD81. (A). Nhuộm kháng thể phát huỳnh quang CD9. (B). Nhuộm kháng thể phát huỳnh quang CD63. (C). Nhuộm kháng thể phát huỳnh quang CD81.

Kết quả flow cytometry để phân tích sự hiện diện của các marker trong hình 4.

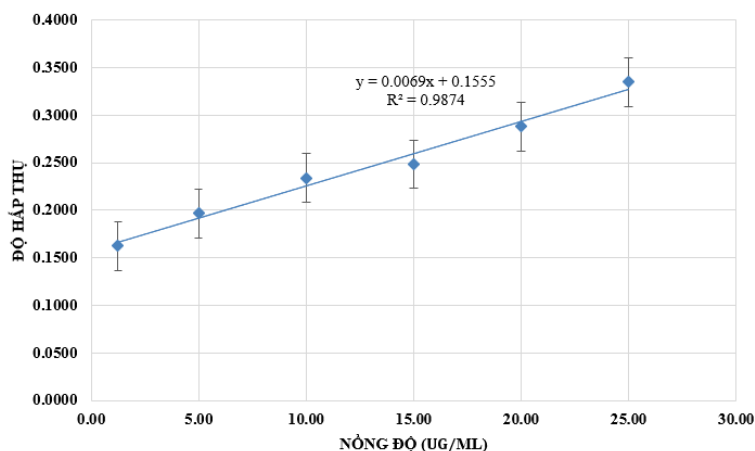


Hình 4. Kết quả đánh giá sự biểu hiện của các CD9, CD63 và CD81 đặc trưng dùng để định danh exosome bằng flow cytometry. Kết quả phân tích cho thấy các marker này đều có hiện diện trên các túi trong dịch sản phẩm exosome. Theo đó, CD9 biểu hiện 70.82%, CD63 biểu hiện 70.77% và CD81 biểu hiện 95.03%.

Nồng độ exosome theo phương pháp đánh giá Bradford

Đánh giá nồng độ của exosome bằng phương pháp Bradford protein assay cho kết quả hàm lượng protein có trong dịch sản phẩm exosome là 45.22 $\mu\text{g/ml}$ ($n=15$) (hình 5).

ĐƯỜNG CHUẨN BSA



Hình 5. Một đường chuẩn BSA để định lượng protein có trong dịch sản phẩm exosome.

Sự biểu hiện của các kim loại nặng

Bảng 2. Kết quả khảo sát sự hiện diện của một số kim loại nặng trong sản phẩm exosome

STT	Chỉ tiêu	Kết quả	Đơn vị	Phương pháp thử
1	Chì (Pb)*	Không phát hiện (LOD = 0.15)	mg/kg	H235 (ACM THA 05)
2	Cadmium (Cd)*	Không phát hiện (LOD = 0.03)	mg/kg	H235 (ACM THA 05)
3	Asen (As)	Không phát hiện (LOD = 0.15)	mg/kg	H235 (ACM THA 05)
4	Thủy Ngân (Hg)	Không phát hiện (LOD = 0.10)	mg/kg	H235 (ACM THA 05)

*Chỉ tiêu được VILAS công nhận

Nhận xét: Kết quả phân tích cho thấy trong dịch sản phẩm exosome không phát hiện sự hiện diện của các kim loại nặng khảo sát.

IV. BÀN LUẬN

Exosome đang mở ra một hướng đi mới trong y học tái tạo với khả năng hỗ trợ sửa chữa và phục hồi mô bị tổn thương. Trong tương lai, exosome có thể trở thành một công cụ mạnh mẽ và phổ biến trong y học tái tạo. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng được exosome trong y học nói chung, chúng ta cần phải có được nguồn cung cấp exosome an toàn, hiệu quả và đảm bảo chất lượng [2], [4]. Đây là điều kiện tiên quyết trước khi nghĩ đến việc ứng dụng chúng trong y học. Do đó, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thiết lập quy trình thu nhận, phân lập và tinh sạch exosome từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô.

Hiện tại trong nước có rất nhiều thông tin đề cập đến exosome nhưng có ít các công trình khoa học công bố có liên quan đến quy trình thu nhận, phân lập cũng như ứng dụng exosome trong điều trị y học [5], [6]. Tuy nhiên, cần phải có nhiều công bố liên quan đến các phương pháp chi tiết và cụ thể hơn để phân lập, thu nhận và tinh sạch exosome an toàn, hiệu quả và đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu thử nghiệm và triển khai ứng dụng trong y học.

Trên thế giới, các nghiên cứu về exosome phải đảm bảo tiêu chuẩn quốc tế để thu nhận được đúng các exosome [1] và an toàn cho các thử nghiệm lâm sàng [7]. Exosome đã được nghiên cứu và thử nghiệm cho nhiều lĩnh vực trong y học tái tạo như các bệnh lý về ung thư [4], [7], các bệnh lý về mắt [8], chế tạo vaccine và đặc biệt là các ứng dụng trong y học tái tạo [9], [10].

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thu nhận thành công dịch exosome và đã đánh giá các tiêu chuẩn an toàn để có thể triển khai các thử nghiệm tiếp theo của exosome trên mô hình tế bào, động vật và tiến tới các thử nghiệm lâm sàng. Nguồn exosome này sẽ giúp cung cấp cho các nhóm nghiên cứu trong nước chưa tiếp cận được với các công nghệ thu nhận, phân lập và tinh sạch exosome để có nguồn nguyên liệu sử dụng. Mặc dù nghiên cứu về exosome vẫn còn là một lĩnh vực nghiên cứu rất mới mẻ ở nước ta nhưng tiềm năng ứng dụng rất triển vọng trong y học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ thông qua đề tài nghiên cứu cấp cơ sở tại Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch theo quyết định số: 406/QĐ-TĐHYKPNT ngày 01/02/2024 của Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch. Mã đề tài: NC.2023.01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I., Blenkiron C., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of extracellular vesicles*. 2024. 13(2), e12404. doi: 10.1002/jev2.12404.
 2. Chen J., Li P., Zhang T., Xu Z., Huang X., et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. 9 (811971), 1-18. doi: 10.3389/fbioe.2021.811971.
 3. Huỳnh Duy Thảo, Trần Lê Bảo Hà, Lê Thanh Hùng, Võ Quốc Vũ, Hoàng Kc Hương và cộng sự. Nghiên cứu quy trình thu nhận tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người hướng đến ứng dụng trong lĩnh vực y học. *Y Học TP. Hồ Chí Minh*. 2013. 17(2), 133-140.
 4. Sidhom K., Obi P.O., and Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21(18), 1-19. doi: 10.3390/ijms21186466.
 5. Hoang Huong Diem, Bui Thi Van Khanh, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Thanh Liem, Than Thi Trang Uyen. Initial characterisation of exosomes released by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and mature dendritic cells, under 'Good Manufacturing Practice' conditions. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*. 2019. 61(3), 45-51. doi: 10.31276/VJSTE.
 6. Nam HB Tran, Diem DN Nguyen, Ngoc Mai Nguyen, Chau Tran, Ngoc Thanh Nguyen Thi et al. Dual-targeting exosomes for improved drug delivery in breast cancer. *Nanomedicine*. 2023. 18(7), 599-611. doi: 10.2217/nnm-2022-0328.
 7. Yang Q., Li S., Ou H., Zhang Y., Zhu G., et al. Exosome-based delivery strategies for tumor therapy: an update on modification, loading, and clinical application. *Journal of Nanobiotechnology*. 2024. 22(1), 1-41. doi: 10.1186/s12951-024-02298-7.
 8. Zhou T., He C., Lai P., Yang Z., Liu Y., et al. miR-204-containing exosomes ameliorate GVHD-associated dry eye disease. *Science advances*. 2022. 8(2), 1-14. doi: 10.1126/sciadv.abj9617.
 9. Adelipour M., Lubman D.M., and Kim J. Potential applications of mesenchymal stem cells and their derived exosomes in regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2023. 23(6), 491-507. doi: 10.1080/14712598.2023.2211203.
 10. Lopes D., Lopes J., Pereira-Silva M., Peixoto D., Rabiee N., et al. Bioengineered exosomal-membrane-camouflaged abiotic nanocarriers: neurodegenerative diseases, tissue engineering and regenerative medicine. *Military medical research*. 2023. 10(1), 1-26. doi: 10.1186/s40779-023-00453-z.
-