

BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RÓN THÀNH TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO BIỂU MÔ DA

Đoàn Chính Chung^{1,3*}, Lê Thành Long³, Hoàng Nghĩa Sơn³,
Nguyễn Hoàng Chương¹, Đỗ Minh Sĩ¹, Lê Văn Đông²

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, tp. Hồ Chí Minh

²Học viện Quân Y, Hà Nội

³Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *dcchung@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT: Tế bào gốc (TBG) trung mô dây rốn có thể thu nhận mà không gặp phải những rào cản về đạo đức. Các tế bào này có khả năng tăng sinh mạnh, tự làm mới và tiềm năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung đánh giá tiềm năng biệt hóa của TBG trung mô dây rốn thành các tế bào biểu mô da. Trong nghiên cứu này, các TBG ứng viên được phân lập bằng kỹ thuật nuôi cấy mô bám dính và được mô tả một số đặc điểm về kiểu hình miễn dịch, tiềm năng biệt hóa. Tế bào sau 3 lần cấy chuyển được cảm ứng biệt hóa thành tế bào biểu mô da. Kết quả cho thấy, các TBG dây rốn có hình thái giống nguyên bào sợi, tiềm năng tăng sinh mạnh và biệt hóa thành tế bào mỡ, nguyên bào xương. Các tế bào này dương tính với CD73, CD90, CD105, CD166, nhưng âm tính với các marker của tế bào máu CD19, CD34, CD45 và HLA-DR. Sau quá trình biệt hóa, các tế bào được cảm ứng có sự thay đổi hình thái nhất định so với các tế bào đối chứng, đồng thời biểu hiện một số gen *Cytokeratin 18 (CK18)*, *Cytokeratin 19 (CK19)* và *P63*, trong khi các tế bào đối chứng không biểu hiện các gen này. Đặc biệt, cả tế bào biệt hóa và tế bào đối chứng đều biểu hiện gen *$\beta 1$ -integrin*. Những kết quả này chứng tỏ TBG trung mô từ dây rốn có thể biệt hóa thành tế bào biểu mô da *in vitro* dưới điều kiện nuôi cấy phù hợp và có thể sử dụng như một nguồn tế bào lý tưởng cho kỹ thuật mô da nhân tạo.

Từ khóa: Biệt hóa, dây rốn, tế bào gốc trung mô, tế bào biểu mô da.

MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, việc ứng dụng liệu pháp tế bào gốc (TBG) đã ít nhiều mang đến những thành công nhất định trong việc phục hồi các tổn thương lớn trên da do bỏng sâu hay khuyết hồng da lớn [9, 14]. Hiện nay, bên cạnh nguồn TBG tự thân từ tủy xương, các TBG trung mô giàu tiềm năng từ mô dây rốn cũng được chú trọng nhiều trong điều trị cấy ghép tự thân và cấy ghép khác gen cùng loài. Nguyên nhân do các tế bào này sở hữu một số ưu điểm vượt trội như tính thái loại bởi hệ thống miễn dịch cấy ghép thấp, có khả năng ức chế và điều biến miễn dịch, tiềm năng tăng sinh và biệt hóa cao, không gặp phải vấn đề về y đạo đức và nguồn mẫu thu nhận dồi dào [8, 20], vì vậy, có thể sử dụng để cấy ghép cho các bệnh nhân, đặc biệt trong trường hợp không có sẵn nguồn TBG tự thân. Tuy nhiên, khi ứng dụng TBG trung mô dây rốn vào điều trị các tổn thương da, vẫn chưa có thông tin về vấn đề liệu các tế bào này có thể biệt hóa trực tiếp thành các tế bào da hay không.

Nghiên cứu của Dai et al. (2007) [6] trên mô hình chuột bị tổn thương khuyết hồng da cho thấy, các TBG trung mô từ máu dây rốn có thể tồn tại trong 2 tuần xung quanh vị trí tổn thương, và thúc đẩy quá trình lành hóa vết thương thông qua khả năng biệt hóa thành các tế bào biểu mô dương tính với CK8⁺/CK10⁺ sau khi được cấy ghép. Ngoài ra, nghiên cứu cũng phát hiện thấy các tế bào dương tính với NST Y⁺/HLA-I⁺ trong các tế bào được phân lập từ mẫu da sinh thiết. Tuy nhiên, nghiên cứu của Tark et al. (2010) [21] cho thấy, các tế bào này thúc đẩy quá trình lành hóa vết thương thông qua cơ chế cận tiết bằng cách gia tăng hàm lượng yếu tố chuyển dạng β (TGF- β), một trong các yếu tố đóng vai trò quan trọng quyết định khả năng lành hóa vết thương, thay vì biệt hóa thành các tế bào da. Hay các TBG trung mô từ màng ối có khả năng thúc đẩy sự lành hóa vết thương trên mô hình chuột đái tháo đường bị tổn thương khuyết hồng da thông qua hai cơ chế: biệt hóa thành một số tế bào biểu mô

đương tính với CK19⁺ trong vùng mô tổn thương và kích thích quá trình hình thành mạch máu mới thông qua sự gia tăng nồng độ một số yếu tố như IGF-1, EGF và IL-8 [12]. Ngược lại, nghiên cứu của Schneider et al. (2010) [19] cho thấy, TBG trung mô từ dây rốn hỗ trợ quá trình lành hóa vết thương da bằng khả năng biệt hóa thành các nguyên bào cơ với sự biểu hiện đồng thời các marker biểu mô và trung mô pan-CK⁺/SMA⁺/vimentin⁺.

Mặc dù có rất nhiều nghiên cứu đánh giá tiềm năng biệt hóa *in vivo* của các TBG trung mô dây rốn trong việc thúc đẩy quá trình lành hóa vết thương, tuy nhiên, có rất ít các nghiên cứu *in vitro* được báo cáo về vấn đề này. Nghiên cứu của Kamolz et al. (2006) [11] cho thấy, các TBG từ máu dây rốn có thể biệt hóa thành các tế bào biểu mô *in vitro* khi đồng nuôi cấy với các tế bào biểu mô trưởng thành. Tuy nhiên, nghiên cứu không chỉ ra cụ thể loại TBG nào trong máu dây rốn (TBG tạo máu hay TBG trung mô) thực sự tham gia vào quá trình này. Nghiên cứu của Tran et al. (2011) [22] cũng cho thấy, tiềm năng biệt hóa thành các tế bào sừng *in vitro* của TBG trung mô máu dây rốn khi được nuôi cấy với một số yếu tố như EGF và KGF. Việc thiếu một mô hình *in vitro* gây cản trở cho việc nghiên cứu các cơ chế phân tử, các yếu tố đóng vai trò quan trọng trong sự định hướng biệt hóa thành các tế bào da và sự hình thành cấu trúc da hoàn chỉnh trong các cá thể sau khi được cấy ghép TBG. Vì vậy, việc đánh giá tiềm năng biệt hóa của TBG trung mô từ dây rốn thành tế bào biểu mô da *in vitro* là một hướng đi cần thiết của việc ứng dụng TBG trong kỹ thuật mô da nhân tạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập và nuôi cấy TBG ứng viên từ dây rốn

Mẫu dây rốn (âm tính với HBV, HCV, HIV) sau khi thu nhận được quản bảo trong dung dịch PBS có bổ sung 2% kháng sinh Pen-Strep (GIBCO Invitrogen, Đức) ở 4°C cho tới khi thao tác. Mẫu dây rốn được rửa lại 2-3 lần với PBS và được cắt thành từng đoạn khoảng 2-4 cm. Các đoạn này được cắt thành từng tấm nhỏ, tách bỏ động mạch, tĩnh mạch của dây rốn và

lớp dịch nhầy Wharton's Jelly dọc theo chiều dài của tấm. Sau đó, các đoạn dây rốn được cắt thành các mảnh mô nhỏ với kích thước 2-3 mm³ và được chuyển vào đĩa nuôi cấy mô 100mm. Môi trường nuôi cấy gồm DMEM/F12 (GIBCO Invitrogen), 15% FBS, 10ng/ml FGF, 10 ng/ml EGF, 2 mM L-glutamine, 1X insulin-transferrin-selenium (ITS) (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Các mẫu mô được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ và môi trường nuôi cấy được thay 2 lần/tuần. Khi tế bào đạt 70-80% diện tích bề mặt dụng cụ nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển bằng Trypsin/EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) theo tỷ lệ 3:1.

Phân tích marker bề mặt của TBG ứng viên

Các TBG ứng viên sau 3 lần cấy chuyển được xác định sự biểu hiện các marker bề mặt bằng kỹ thuật flow cytometry. Khoảng 10⁶ tế bào được sử dụng để nhuộm với kháng thể trong 30 phút ở 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa lại 2 lần bằng dung dịch FACSflow để loại bỏ kháng thể thừa và tái huyền phù trong 500 µl dung dịch FACSflow. Khi tiến hành phân tích, các kháng thể có gắn chất phát huỳnh quang FITC hay PE: CD19-FITC, CD34-FITC, CD45-FITC, HLA-DR-FITC và CD73-PE, CD90-PE, CD105-PE, CD166-PE (BD Biosciences, Hoa Kỳ) lần lượt được phát hiện bởi kênh FL1 và FL2. Tất cả các dữ liệu được phân tích bằng phần mềm CellQuest Pro trên hệ thống FACSCalibur (BD Biosciences). Toàn bộ thí nghiệm được lặp lại ít nhất 2 lần.

Biệt hóa TBG ứng viên thành nguyên bào xương và tế bào mỡ

Để biệt hóa thành tế bào mỡ, các tế bào được cảm ứng bằng môi trường DMEM-low glucose, bổ sung 10 µM dexamethazone, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacine, 0,5 mM Isobutyl-methylxanthane và 10% FBS (Sigma-Aldrich). Hiệu quả biệt hóa được đánh giá thông qua quy trình nhuộm Oil Red [13]. Tế bào được cố định bằng dung dịch paraformaldehyde 4% trong 1 giờ, sau đó rửa lại bằng isopropanol 75% và nhuộm với thuốc nhuộm Oil red trong 10 phút. Cuối cùng, tiến hành khử nhuộm bằng isopropanol 100% trong 15 phút. Để biệt hóa thành nguyên bào xương, các tế bào được cảm ứng bằng môi trường DMEM-low glucose, bổ

sung 10 mol/L dexamethasone, 50 μ mol/L ascorbic acid-2 phosphate, 10 mmol/L β -glycerol phosphate và 10% FBS (Sigma-Aldrich). Kết quả biệt hóa được đánh giá thông qua phương pháp RT-PCR [13]. Các quy trình biệt hóa được tiến hành trong 2 tuần. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM-low glucose, 10% FBS được sử dụng làm đối chứng.

Biệt hóa TBG trung mô thành tế bào biểu mô da

Quy trình biệt hóa được tiến hành trong 3 tuần gồm 2 bước. Bước 1: tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM-low glucose, bổ sung 10 ng/ml KGF và 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich) trong 1 tuần; bước 2: sau 1 tuần nuôi cấy, tế bào được chuyển sang môi trường SFM (GIBCO Invitrogen) có bổ sung 20 ng/ml HGF và 50 ng/ml IGF-2 (Sigma-Aldrich) trong 2 tuần; tế bào đối chứng được nuôi cấy trong DMEM-low glucose, bổ sung 10% FBS. Sự thay đổi hình thái của tế bào đối chứng và tế bào biệt hóa được theo dõi liên tục trong quá trình biệt hóa. Các tế bào này cũng được đánh giá sự biểu hiện một số gen đặc trưng của tế bào biểu mô như *CK18*, *CK19*, *P63* và *β 1-integrin* bằng kỹ thuật RT-PCR.

Thu nhận RNA tổng số và RT-PCR

RNA tổng số của tế bào biệt hóa và đối chứng được tách bằng Trizol (Sigma-Aldrich) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng RT-PCR được thực hiện bằng bộ kit AccessQuick™ RT-PCR (Promega, Hoa Kỳ) với phản ứng phiên mã ngược: 45 phút ở 45°C, kết thúc ở 95°C trong 2 phút. Chu trình nhiệt PCR: 94°C trong 45 giây, 55°C-60°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút với tổng số chu kỳ 35. Sau khi chu kỳ cuối hoàn tất, ủ 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được phân tích điện di trên gel agarose 2% và quan sát bằng hệ thống chụp gel tự động GelDoc It (UVP, Hoa Kỳ). Trình tự các primer: Osteopontin F: CTAGGCATCACCTGTGCCA TACC, R: CTACTTAGACTACTTGACCAGT GAC (330) Osteocalcin F: CGCAGCCACCGA GACACCAT, R: GGGCAAGGGCAAGGGGA AGA (405bp). CK18 F: TGGTACTCTCCTCA ATCTGCTG, R: CTCTGGATTGACTGTG GAAGT (149 bp). CK19 F: AGGTGGATTCC GCTCCGGGC, R: ATCTTCCTGTCCC

TCGAGCA (460 bp). P63 F: CAGACTCAAT TTAGTGAG, R: AGCTCATGGTTGGGGC AC (611 bp). β 1-integrin F: AATGTTTCAGTG CAGAGCC, R: TTGGGATGATGTCCGGGA (640 bp). GAPDHhu: F: ACAGTCAGC CGCATCTTCT T. R: ACGACCAAATCCGTT GACTC (94 bp) [4, 13, 22].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái và khả năng tăng sinh của TBG trung mô

Sự xuất hiện các tế bào bám trải có hình thái giống với nguyên bào sợi ở giữa các khoảng trống của các khối mô được quan sát thấy sau 7 ngày nuôi cấy (hình 1a). Sau 10-12 ngày nuôi cấy, các tế bào bám trải hình thành các cụm tế bào xung quanh các khối mô. Vào thời điểm này, các khối mô được loại bỏ. Các tế bào bám trải dần dần định hướng theo một chiều nhất định. Sau 3 lần cấy chuyển, các tế bào có sự đồng nhất tương đối về mặt hình thái (hình 1b). Tế bào được phân lập từ dây rốn trong nghiên cứu này có hình thái tương tự như các TBG trung mô được phân lập từ tủy xương người, tuy nhiên, khả năng tăng sinh của TBG trung mô từ dây rốn lớn hơn so với TBG trung mô từ tủy xương [3].

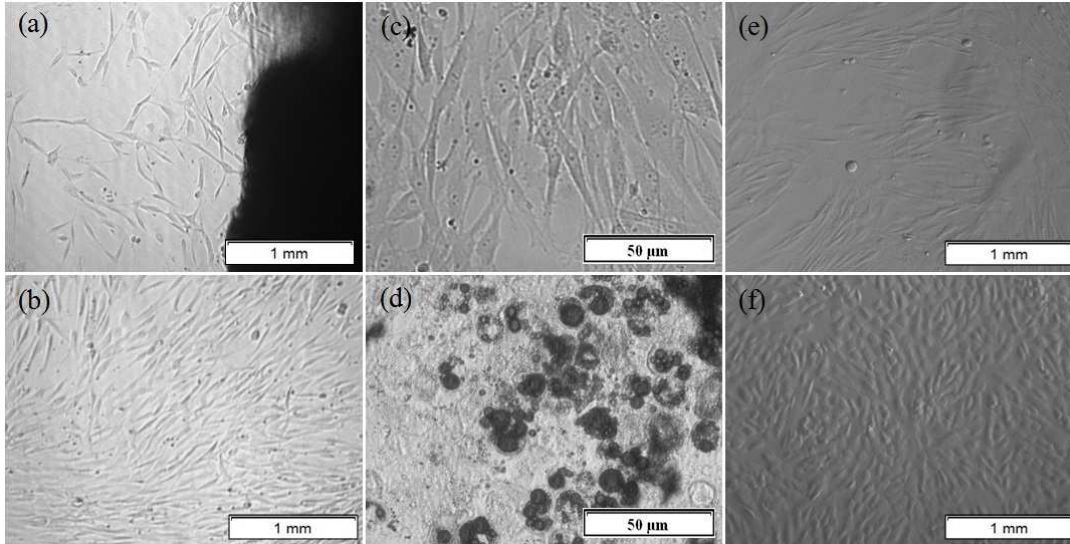
Tiềm năng biệt hóa *in vitro* và kiểu hình miễn dịch của TBG trung mô

TBG trung mô được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để cảm ứng biệt hóa thành nguyên bào xương, tế bào tạo mỡ. Tế bào tạo mỡ được biệt hóa từ TBG trung mô có hình thái co tròn, các giọt lipid xuất hiện, chiếm phần lớn tế bào chất và bắt màu đỏ với thuốc nhuộm Oil red (hình 1d), ngược lại, các tế bào đối chứng không có sự thay đổi về mặt hình thái (hình 1c). Tương tự, các nguyên bào xương được biệt hóa từ TBG trung mô biểu hiện hai gen đặc trưng của tế bào xương là *osteopontin* và *osteocalcin* sau 2 tuần biệt hóa, trong khi đó, các tế bào đối chứng không biểu hiện hai gen này (hình 3b).

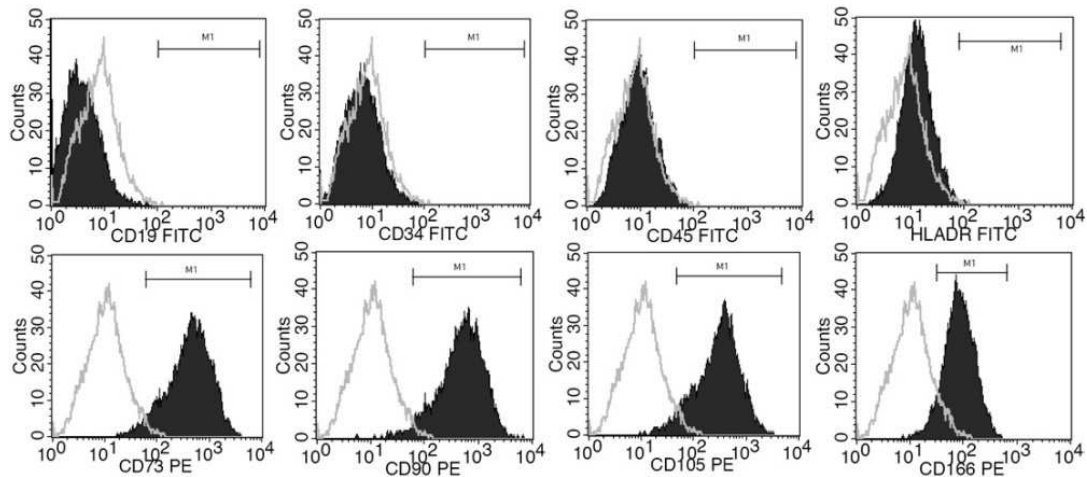
Các marker bề mặt của tế bào sau 3 lần cấy chuyển được phân tích bằng hệ thống flow cytometer, các marker dương tính và âm tính được phân tích đồng thời. Kết quả cho thấy, hầu hết tế bào đều âm tính với các marker của tế bào máu như CD19 (kháng nguyên của tế bào

mono), CD34 (marker đặc trưng của TBG tạo máu), CD45 (kháng nguyên của tế bào bạch cầu trưởng thành), HLA-DR (biểu hiện ở tế bào mono, đại thực bào và tế bào lympho B) và dương tính với các marker CD73, CD90, CD105 và CD166 (hình 2), trong đó CD73,

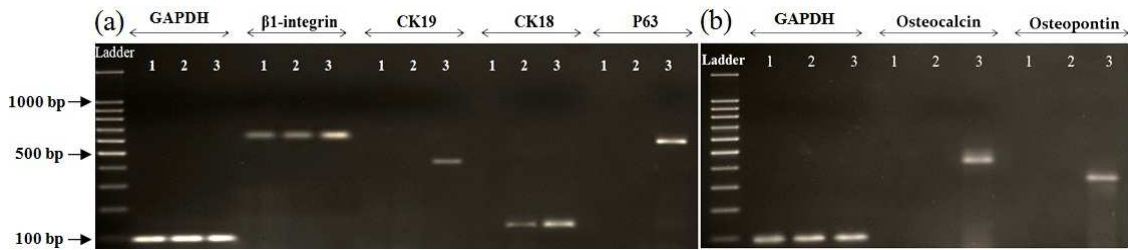
CD90 và CD105 được xem như là các marker quan trọng để nhận diện TBG trung mô người [7]. Kết quả này chứng tỏ quần thể tế bào phân tích không tạp nhiễm với các dòng tế bào máu và có kiểu hình miễn dịch tương đối đồng nhất sau 3 lần cấy chuyền.



Hình 1. Hình thái của của TBG từ dây rốn sau 7 ngày nuôi cấy (a) và sau 3 lần cấy chuyền (b). Sự thay đổi hình thái tế bào trước (c) và sau khi biệt hóa thành tế bào mỡ, tế bào biệt hóa bắt màu đỏ với thuốc nhuộm Oil Red (d). Tế bào chuyển dần từ trạng thái bám trải (e) sang trạng thái co tròn và tăng sinh chậm (f) sau quá trình biệt hóa thành tế bào biểu mô da.



Hình 2. Kết quả phân tích các marker bề mặt của TBG từ dây rốn bằng hệ thống máy flow cytometer với các kháng thể có gắn chất phát huỳnh quang FITC hoặc PE.



Hình 3. Kết quả phân tích RT-PCR. Sự biểu hiện *CK18*, *CK19*, β 1-*intergrin* và *P63* của tế bào trước và sau khi biệt hóa (a). Tế bào đối chứng (giếng 1), tế bào biệt hóa sau 1 tuần (giếng 2) và sau 3 tuần (giếng 3). Sự biểu hiện *osteocalcin* và *osteopontin* của tế bào trước và sau khi biệt hóa (b). Tế bào đối chứng (giếng 1). Tế bào biệt hóa sau 1 tuần (giếng 2) và sau 2 tuần (giếng 3). *GAPDH* sử dụng làm đối chứng nội.

Như vậy, các TBG trung mô từ dây rốn trong nghiên cứu này có các đặc điểm sinh học tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đó [3, 18, 23], đồng thời cũng đáp ứng các tiêu chí mà Ủy ban Tế bào gốc phôi và trung mô của Hiệp hội liệu pháp Tế bào quốc tế (ISCT) đưa ra để xác định TBG trung mô người [7].

Khả năng biệt hóa *in vitro* của TBG trung mô thành tế bào biểu mô da

Trong lô thí nghiệm đối chứng, tế bào vẫn duy trì trạng thái bám trải và tăng sinh mạnh sau 1 tuần (hình 1e), trong khi đó, các tế bào cảm ứng biệt hóa có sự thay đổi hình thái rõ rệt. Các tế bào này chuyển từ trạng thái bám trải sang trạng thái co tròn và tăng sinh chậm (hình 1f). Ngoài ra, trong quá trình quan sát sự thay đổi hình thái của các tế bào biệt hóa, nhóm nghiên cứu nhận thấy sự thay đổi hình thái của tế bào dường như xảy ra rõ ràng hơn và nhanh hơn ở những vùng có mật độ tế bào cao so với những vùng có mật độ tế bào thấp. Điều này cho thấy, sự tương tác giữa các tế bào có thể là một trong các yếu tố cần thiết cho sự chuyển biệt hóa của dòng tế bào trung mô thành dòng tế bào biểu mô [1]. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu cũng tiến hành tách và loại bỏ lớp biểu mô, tĩnh mạch và động mạch dây rốn trước khi nuôi cấy, do đó, việc tạp nhiễm các tế bào biểu mô trong nuôi cấy có thể tránh được. Như vậy, sự thay đổi hình thái của tế bào sau quá trình biệt hóa tương tự như các kết quả nghiên cứu đã được công bố trước đây khi tiến hành nuôi cấy các TBG từ máu dây rốn trong môi trường có sự hiện diện của các yếu tố tăng

trường như KGF và EGF [22] hay đồng nuôi cấy với các tế bào sừng [11].

Các tế bào biệt hóa biểu hiện *CK18* sau 1 tuần cảm ứng biệt hóa (sau bước 1) và biểu hiện *CK19* và *P63* sau 3 tuần cảm ứng biệt hóa (sau bước 2) khi phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR (hình 3a). Trong đó, *P63* có thể được sử dụng như một marker để nhận diện tế bào biểu mô da hay tế bào sừng [16, 22]. *CK18* và *CK19* là các marker đặc trưng của các tế bào tiền thân biểu mô hay TBG da [10, 15]. Sự thay đổi hình thái của tế bào kết hợp với sự biểu hiện một số gen đặc trưng của tế bào biểu mô chứng tỏ sự chuyển biệt hóa có xảy ra trong tế bào biệt hóa sau quá trình cảm ứng. Kết quả này càng được củng cố khi phân tích sự biểu hiện của β 1-*integrin*. Đặc biệt, β 1-*integrin* được phát hiện trong cả tế bào đối chứng và tế bào biệt hóa và sự biểu hiện của β 1-*integrin* trong tế bào biệt hóa cao hơn so với tế bào đối chứng (hình 3a). Điều này chứng tỏ các TBG trung mô từ dây rốn có tiềm năng biệt hóa thành các tế bào biểu mô. Vì β 1-*integrin* được xem như một marker trung gian chỉ thị cho sự chuyển biệt hóa giữa lớp trung mô và lớp biểu mô [17]. Ngoài ra, một số nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện của β 1-*integrin* ảnh hưởng lớn đến sự biệt hóa thành tế bào sừng *in vitro* [2].

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá sự thay đổi hình thái, sự biểu hiện một số gen ở mức phiên mã mRNA, chưa tiến hành đánh giá ở mức độ protein và các thử nghiệm *in vivo* để xác định các tế bào biệt hóa có thực sự là các tế bào biểu mô da trưởng

thành hay không. Vì vậy, chúng tôi gọi các tế bào biệt hóa này là các tế bào giống tế bào biểu mô da. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, trong quá trình biệt hóa thành dòng tế bào biểu mô, các tế bào tiền thân có thể xuất hiện trong giai đoạn đầu của quá trình biệt hóa (sau 1 tuần cảm ứng, tế bào chỉ biểu hiện *CK18* và *$\beta 1$ -intergrin*) và các tế bào trưởng thành có thể hình thành trong giai đoạn sau của quá trình biệt hóa (sau 3 tuần cảm ứng, tế bào biểu hiện cả *CK18*, *CK19*, *P63* và *$\beta 1$ -intergrin*). Điều này cho thấy, quá trình chuyên biệt hóa *in vitro* của TBG trung mô thành tế bào biểu mô có một số điểm tương đồng với quá trình biệt hóa *in vivo* trong cơ thể sống. Vai trò của các yếu tố như KGF, EGF, HGF và IGF-2 trong môi trường cảm ứng có thể là điểm khởi đầu cho sự chuyên biệt hóa *in vitro*, vì đây là những yếu tố cần thiết và được sản xuất nhiều trong quá trình hình thành lớp biểu mô *in vivo*. Ngoài ra, khả năng sản xuất các yếu tố tự tiết và cận tiết của tế bào cảm ứng cũng có thể là một lý do thúc đẩy quá trình chuyên biệt hóa xảy ra bởi quá trình biệt hóa dường như xảy ra nhanh ở các vùng có mật độ tế bào cao.

KẾT LUẬN

Tế bào gốc trung mô có thể phân lập và dễ dàng thu nhận từ dây rốn. Các tế bào này có thể biệt hóa thành các tế bào giống tế bào biểu mô da khi được nuôi cấy trong điều kiện phù hợp. Kết quả nghiên cứu này góp phần củng cố thêm cơ sở cho việc ứng dụng lâm sàng và việc tìm hiểu quá trình biệt hóa cũng như tiềm năng biệt hóa của tế bào này. TBG trung mô từ dây rốn hi vọng sẽ là một nguồn tế bào lý tưởng cho kỹ thuật mô da nhân tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akino K., Mineda T., Akita S., 2005. Early cellular changes of human mesenchymal stem cells and their interaction with other cells. *Wound Repair. Regen.*, 13(4): 434-440.
2. Bagutti C., Hutter C., Chiquet-Ehrismann R., Fassler R., Watt F. M., 2001. Dermal fibroblast-derived growth factors restore the ability of beta(1) integrin-deficient embryonal stem cells to differentiate into keratinocytes. *Dev Biol.*, 231(2): 321-333.
3. Baksh D., Yao R., Tuan R. S., 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25(6): 1384-1392.
4. Chun-mao H., Hang-hui C., 2007. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells *in vitro*. *Differentiation*, 75(4): 292-298.
5. Crowe M. J., Doetschman T., Greenhalgh D. G., 2000. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J. Invest. Dermatol.*, 115(1): 3-11.
6. Dai Y., Li J., Li J., Dai G., Mu H., Wu Q., Hu K., Cao Q., 2007. Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Burns*, 33(4): 418-428.
7. Dominici M., Le Blanc K., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317.
8. Friedman R., Betancur M., Boissel L., Tuncer H., Cetrulo C., Klingemann H., 2007. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 13(12): 1477-1486.
9. Fu X., Li H., 2009. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. *Cell Tiss. Res.*, 335(2): 317-321.
10. Jones P. H., Watt F. M., 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73(4): 713-724.
11. Kamolz L. P., Kolbus A., Wick N., Mazal P. R., Eisenbock B., Burjak S., Meissl G., 2006. Cultured human epithelium: Human umbilical cord blood stem cells differentiate

- into keratinocytes under in vitro conditions. *Burns*, 32(1): 16-19.
12. Kim S. W., Zhang H. Z., Guo L., Kim J. M., Kim M. H., 2012. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. *PLoS ONE*, 7(7): 1-11.
 13. Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Hsieh S. L., Chen T. H., 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5): 1669-1675.
 14. Liu P., Deng Z., Geng X., Huang S., Jin Y., 2008. Tissue engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif. Organs*, 32(12): 925-931.
 15. Michel M., Torok N., Godbout M.J., Germain L., 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro. *J. Cell Sci.*, 109(5): 1017-1028.
 16. Pellengrini G., Dellambra E., Martinelli E., Bondanza S., Ponzon D., McKeon F., De Luca M., 2001. P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(6): 3156-3161.
 17. Pittenger M. F., Mackay A. M., Mosca J. D., Craig S., Marshak D. R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-147.
 18. Qiao C., Xu W., Zhu W., Hu J., Mao F., Yang H., Wang X., Chen Y., 2008. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol. Int.*, 32(1): 8-15.
 19. Schneider R. K., Püllen A., Kramann R., Bornemann J., Knüchel R., Perez-Bouza A., 2010. Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differentiation*, 79(3): 182-193.
 20. Secco M., Zucconi E., Vieira N. M., Fogaça L. L., Cerqueira A., Carvalho M. D., Jazedje T., Okamoto O. K., Muotri A. R., Zatz M., 2008. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood. *Stem Cells*, 26(1): 146-150.
 21. Tark K. C., Hong J. W., Kim Y. S., Hahn S. B., Lee W. J., Lew D. H., 2010. Effects of human cord blood mesenchymal stem cells on cutaneous wound healing in leprdb mice. *Ann Plast Surg.*, 65(6): 565-572.
 22. Tran C. T., Huynh D. T., Tran T. T., Huynh M. T., Nguyen T. T., Filgueira L., Strong D. M., 2011. In vitro culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonesse culture. *Cell Tissue Bank*, 12(2): 125-133.
 23. Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Lai M. C., Chen C. C., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7): 1330-1337.

DIFFERENTIATION OF HUMAN UMBILICAL CORD-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS INTO EPIDERMAL-LIKE CELLS

**Doan Chinh Chung^{1,3}, Le Thanh Long³, Hoang Nghia Son³,
Nguyen Hoang Chuong¹, Do Minh Si^{1,3}, Le Van Dong²**

¹University of Science, VNU, HCM City

²Medical Military University, Hanoi

³Institute of Tropical Biology, VAST

SUMMARY

Umbilical cord derived - mesenchymal stem cells (UCMSCs) can be readily obtained, avoid ethical debates or moral constraints, and show excellent pluripotency and proliferation potential. Therefore, the aim

of this study was to examine the differentiation potential of UCMSCs into epidermal cells. In this study, UCMSCs were isolated by a tissue attachment culture method and characterized their immunophenotype and their differentiation potency. On the third passage, UCMSCs were induced to differentiate into epidermal cells in induction media. The results showed that UCMSCs exhibited a fibroblast-like morphology, owned strong proliferation and differentiation capacity into adipocytes and osteoblasts. Isolated UCMSCs were strong positive for CD73, CD90, CD105 and CD166, but not CD19, CD34, CD45 and HLA-DR. After differentiation, the induced cells had morphological changes when compared with the non-induced cells, and expressed *CK18*, *CK19*, and *P63* whereas non-induced cells were not. Interestingly, both induced cells and non-induced cells expressed *β 1-integrin*. These results demonstrated that UCMSCs might trans-differentiate into epithelial cells *in vitro* under appropriate culture conditions. These cells may be useful for artificial skin tissue engineering in the future.

Keywords: Differentiation, umbilical cord, mesenchymal stem cells, epidermal- like cells.

Ngày nhận bài: 7-3-2013