

TẠO TẤM TẾ BÀO SỪNG NHIỀU LỚP TRÊN MÀNG COLLAGEN TỪ MÀNG ỒI NGƯỜI

Trần Lê Bảo Hà¹, Trần Công Toại², Hoàng Nghĩa Sơn³

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học nhiệt đới

TÓM TẮT

Biểu bì là lớp ngoài cùng của da, cấu thành từ biểu mô vảy phân tầng biệt hóa cuối cùng. Biểu bì đóng vai trò bảo vệ đầu tiên của cơ thể chống lại những tác động bất lợi của môi trường như các tác nhân sinh học, hóa học, vật lý. Mô biểu bì gồm nhiều lớp tế bào sừng có thể được tạo ra *in vitro* để ứng dụng trong chữa trị các tổn thương da cấp và mãn tính. Trong nghiên cứu này, tấm tế bào sừng nhiều lớp được tạo ra từ tế bào sừng người trưởng thành và màng collagen từ màng ổi. Tế bào sừng được phân lập, nuôi, nhân trong môi trường không huyết thanh SFM (Serum Free Medium). Màng collagen được thu nhận từ màng ổi đã được loại bỏ lớp tế bào biểu mô và đánh giá bằng phương pháp nhuộm HE. Sau khi được cấy chuyển lên màng collagen, tế bào sừng được kích thích tăng sinh và biệt hóa thành nhiều lớp bằng cách để tiếp xúc không khí. Sản phẩm tấm tế bào sừng nhiều lớp được đánh giá bằng RT-PCR, hóa mô miễn dịch. Kết quả cho thấy, màng ổi đã được loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô sau khi xử lý enzyme và cơ học. Các tế bào sừng đã tăng trưởng, tạo 4 - 5 lớp trên màng collagen và biểu hiện marker tế bào sừng đã và chưa biệt hóa sau 7 ngày tiếp xúc không khí. Các tế bào sừng dương tính với marker tăng sinh (p63) nằm sát trên màng collagen, các tế bào bên trên là những tế bào sừng đã biệt hóa.

Từ khóa: Biểu bì, collagen, màng ổi, môi trường không huyết thanh, tế bào sừng

MỞ ĐẦU

Sự khép vết thương cần một vật liệu để hồi phục chức năng hàng rào của biểu bì và sáp nhập vào vết thương đang lành. Hiện nay, tự ghép vạt da vẫn là "tiêu chuẩn vàng" để tái tạo bề mặt các vết thương lớn. Tuy nhiên, vùng da cho để tự ghép bị hạn chế trong các vết thương rộng. Điều này thúc đẩy phát triển các liệu pháp khác như là kỹ thuật ghép tấm tế bào biểu bì nuôi cấy (Cultured epithelial autograft - CEA) (Raymund *et al.*, 2005)

Các tấm tế bào biểu bì nuôi cấy thường gồm 3 - 5 lớp tế bào và rất khó cầm giữ. Do đó, cần có một công cụ để thao tác tấm tế bào này. Để khắc phục, một số vật liệu đã được sử dụng để mang tấm tế bào sừng như màng collagen loại I của bò, PHEMA (poly(2-hydroxyethyl methacrylate)), PIAAm (N-Isopropylacrylamide), PPS (plasma polymerised functional surface) (Barbora *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003; Masayuki *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005).

Màng ổi bao gồm một lớp đơn tế bào biểu mô, một màng cơ bản, một lớp đặc vô bào, lớp nguyên bào sợi và lớp xếp bên dưới. Màng cơ bản của màng ổi gồm laminin 5, collagen loại IV, VII, XVII, tương

tự với màng cơ bản của da về hình thái và siêu cấu trúc (Nakamura *et al.*, 2004). Màng ổi có tính kháng viêm, kháng xơ hóa, kháng sẹo, kích thích biểu mô hóa và tính sinh miễn dịch thấp... (Hassan *et al.*, 2008; Oyama *et al.*, 2003). Màng ổi loại biểu mô đã được sử dụng làm giá thể trong công nghệ mô giác mạc, sụn, thần kinh (Jin *et al.*, 2007; Tseng, 2001; Ueno *et al.*, 2006).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng màng collagen từ màng ổi loại biểu mô để làm giá thể nuôi tế bào sừng nhằm tạo tấm tế bào sừng nhiều lớp *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Da lành của bệnh nhân có chỉ định ghép da và màng ổi của sản phụ sinh mổ.

Phương pháp thu nhận mẫu

Thu nhận mẫu da, màng ổi của sản phụ vừa sinh đã được xét nghiệm âm tính HIV, viêm gan siêu vi B, viêm gan siêu vi C, giang mai, giữ trong PBS

(Gibco) lạnh có kháng sinh và chuyển về phòng thí nghiệm, thao tác trong vòng 4 h.

Phương pháp xử lý màng ối (Hassan *et al.*, 2008)

Màng ối được rửa trong dung dịch PBS cho đến khi sạch máu, sạch các mô sống không cần thiết. Sau đó, lắ màng ối trong dung dịch trypsin 0,25% - EDTA 0,02% (Sigma) trong 30 phút ở 37°C và dùng một dụng cụ mềm cạo bỏ lớp tế bào biểu mô HAM, tránh làm vỡ màng đáy. Hiệu quả bóc tách lớp tế bào biểu mô màng ối được đánh giá bằng phương pháp nhuộm hematoxylin và eosin (nhuộm HE).

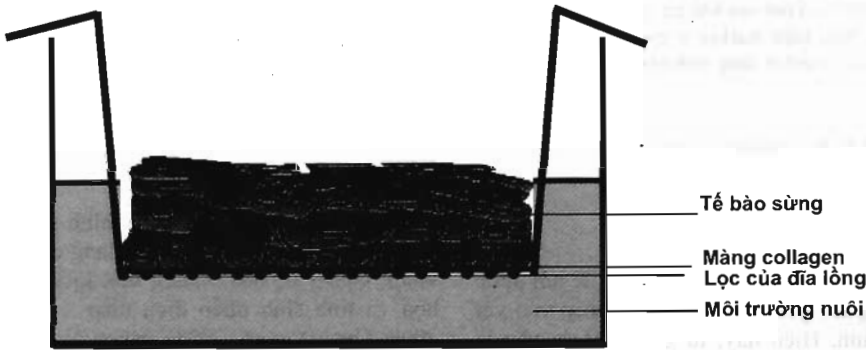
Phương pháp phân lập tế bào sừng (Susan, 2003)

Mẫu da được rửa 3 lần trong PBS và loại bỏ phần thừa (lông, mỡ). Sau đó, cắt mẫu da thành mảnh nhỏ và ủ với Trypsin-EDTA (Gibco) trong 18 h, 4°C. Lớp

biểu bì và lớp trung bì được tách rời bằng cơ học, thu nhận tế bào sừng rời từ lớp biểu bì bằng cách dùng pipet để huyền phù. Mật độ tế bào, tỷ lệ % tế bào sống được xác định bằng cách đếm tế bào sau khi nhuộm trypan blue.

Phương pháp nuôi, nhân tế bào sừng (Susan, 2003)

Tế bào tách rời được nuôi trong môi trường sơ cấp: DMEM bổ sung FBS (Fetal Bovine Serum), EGF (Epidermal Growth Factor), hydrocortisone, cholera toxin (Sigma) với mật độ 3×10^5 tế bào/cm² bề mặt đĩa nuôi. Sau hai ngày, thay môi trường sơ cấp bằng môi trường không huyết thanh SFM (Serum Free Medium - Gibco) dành cho tế bào sừng. Tiếp tục nuôi ở 37°C, 5% CO₂ cho đến khi tế bào tăng trưởng đạt 70 - 80% bề mặt đĩa nuôi và cấy chuyển.



Hình 1. Minh họa phương pháp nuôi cấy tế bào sừng trong đĩa lồng. Các tế bào sừng được phơi ngoài không khí, dinh dưỡng được cung cấp từ môi trường bên dưới qua các lỗ lọc của đĩa lồng.

Phương pháp nuôi tế bào sừng trên màng collagen

Màng collagen được trải trên đáy của đĩa lồng (đĩa insert) và cấy chuyển tế bào sừng lên màng collagen với mật độ 3×10^4 tế bào/cm² bề mặt màng, ủ ở 37°C, 5% CO₂. Môi trường được thay bên ngoài và bên trong đĩa lồng mỗi 2 ngày/lần.

Phương pháp tạo tấm nhiều lớp tế bào sừng

Khi tế bào sừng tăng sinh kín bề mặt collagen, hút hết môi trường trong đĩa lồng ra. Tiếp tục thay môi trường bên ngoài đĩa lồng mỗi ngày, kéo dài 7 ngày.

Phương pháp xác định tế bào sừng bằng RT-PCR

RNA tổng được ly trích bằng Trizol (Sigma). Sự biểu hiện gen được đánh giá bằng One step RT-PCR (Promega). Sự biểu hiện gen β -actin người được sử dụng làm đối chứng.

Trình tự của các primer: p63 (5'- CAG ACT CAA TTT AGT GAG -3' (sense), 5'- AGC TCA TGG TTG GGG CAC -3' (antisense)), 440 bp; involucrin (5'-TCC TCC AGT CAA TAC CCA TC-3' (sense), 5'- CTT CAT TCC CAG TTG CTCA.

TC-3' (antisense)), 373 bp; K14 (5'- ATG ATT GGC AGC GTG GAG -3' (sense) 5'- GTC CAG

CTG TGA AGT GCT T -3' (antisense)), 390 bp; K5 (5'- CCC AGT ATG AGG AGA TTG CCA ACC -3' (sense), 5'- TAT CCA GAG GAA ACA CTG CTT GTG -3' (antisense)), 475 bp; β -actin (5'- CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C -3' (sense), 5'- AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C -3' (antisense)), 587 bp (Adriana *et al.*, 1998; Adriana *et al.*, 2001; Mazlyzam *et al.*, 2007; Virve *et al.*, 2007).

Phản ứng RT-PCR được thực hiện như sau: 45 phút ở 45°C, 3 phút ở 94°C, PCR 35 chu kì (45 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C, 90 giây ở 72°C), ủ 10 phút ở 72°C bằng Thermocycler của Eppendorf. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%.

Phương pháp nhận diện tế bào sừng còn khả năng tăng sinh

Các tế bào sừng còn khả năng tăng sinh trong tấm tế bào được nhuộm hóa mô miễn dịch với marker tế bào gốc biểu bì là p63.

Sau khi tạo lớp, tấm tế bào sừng được cắt lát và nhuộm với kháng thể p63 dòng 4A4. Kết quả được quan sát và chụp hình dưới kính hiển vi quang học Olympus.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả nuôi, nhân tế bào sừng

Sau khi được phân lập và nuôi trong môi trường không huyết thanh, các tế bào sừng bắt đầu tạo thành cụm vào ngày 3 - 4. Sau đó, các cụm này lớn dần và hợp vào nhau tạo thành lớp đơn tế bào trên bề mặt đĩa nuôi sau 7 ngày.

Kết quả xử lý loại biểu mô màng ối

Sau khi xử lý với enzyme (trypsin-EDTA) 30 phút và cơ học (cạo) toàn bộ lớp biểu mô màng ối đã được loại bỏ. Kết quả này phù hợp với một số công trình đã được công bố (Hassan *et al.*, 2008; Ishino *et al.*, 2004).

Kết quả nuôi tế bào sừng trên màng collagen

Sau khi xử lý, màng collagen được trải lên đĩa lòng với mặt biểu mô đưa lên trên. Điều này giúp cho tế bào sừng được cấy lên sẽ tiếp xúc trực tiếp với bề mặt màng cơ bản của màng ối.

Kết quả cho thấy màng collagen kích thích tế bào bám dính nhanh hơn. Màng cơ bản của màng ối gồm laminin 5, collagen loại IV, VII, XVII, tương tự với màng cơ bản của da về hình thái và siêu cấu trúc

(Nakamura *et al.*, 2004). Do đó, các protein ngoại bào này sẽ giúp tế bào bám dính nhanh và di cư.

Sau 7 ngày nuôi trên màng collagen, các tế bào sừng đã tạo thành lớp đơn.

Kết quả xác định tế bào sừng bằng RT-PCR

Sau khi tạo nhiều lớp trên màng collagen, các tấm tế bào được xác định bằng phương pháp RT-PCR với các marker tế bào sừng.

Kết quả cho thấy, các tế bào biểu hiện cả 4 marker tế bào sừng, trong đó có 3 marker tế bào chưa biệt hóa là p63, k5, k14 và marker tế bào đã biệt hóa là involucrin.

Các tế bào sừng trong tấm tế bào *in vitro* biểu hiện dương tính các marker như các tế bào sừng trong mô da đối chứng. Điều này cho thấy các tế bào được biệt hóa tạo lớp vẫn còn giữ tính gốc.

Kết quả tạo nhiều lớp tế bào sừng trên màng collagen

Sau 7 ngày tiếp xúc không khí, mẫu mô được nhuộm hóa miễn dịch với kháng thể p63. Đối chứng là mẫu da nguyên. Cả hai mẫu đều có tế bào dương tính với marker tăng sinh, chưa biệt hóa p63. Mẫu tấm tế bào *in vitro* có 4 - 5 lớp tế bào sừng với các tế bào dương tính p63 nằm sát trên màng collagen, các tế bào bên trên là những tế bào sừng đã biệt hóa. Kết quả này phù hợp với đặc điểm mô học của da với các tế bào gốc biểu bì dương tính p63 nằm ở lớp đáy, ngay trên màng cơ bản.

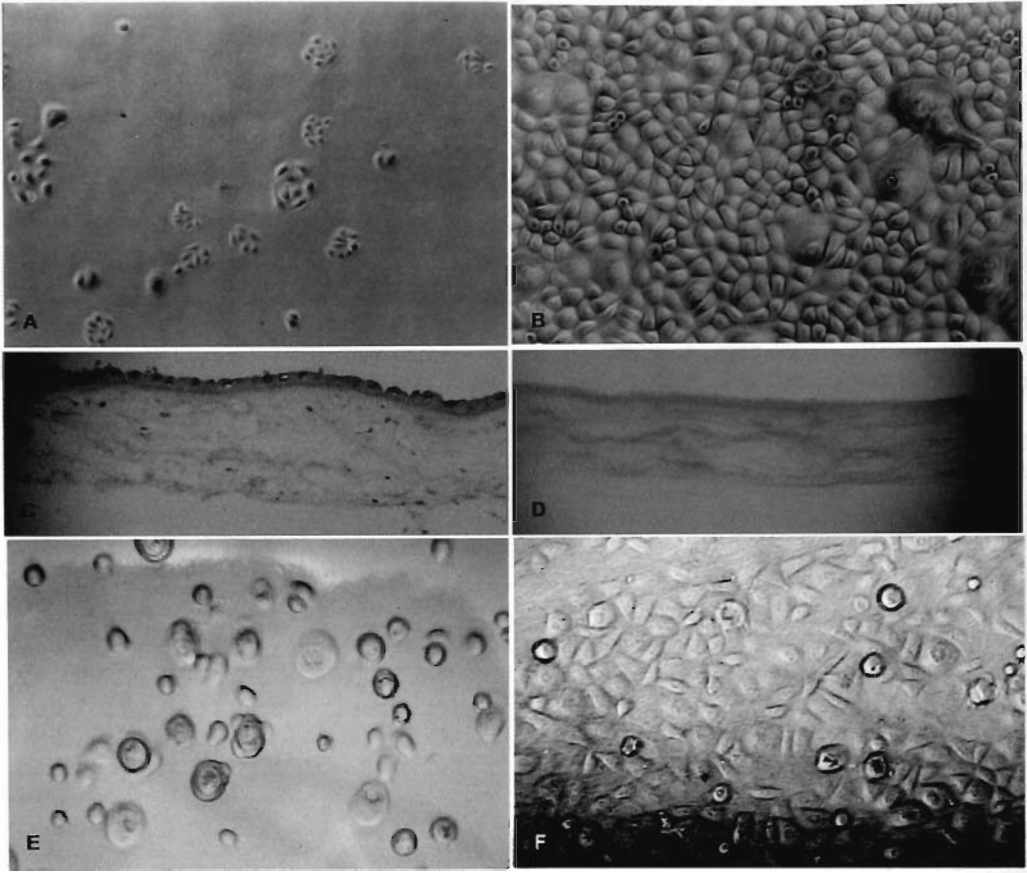
Sau khi tạo lớp, tấm tế bào sừng được tách ra dễ dàng khỏi bề mặt đĩa nuôi bằng cách kéo lột màng collagen. Như vậy, màng collagen từ màng ối là vật mang lý tưởng cho tấm tế bào sừng.

KẾT LUẬN

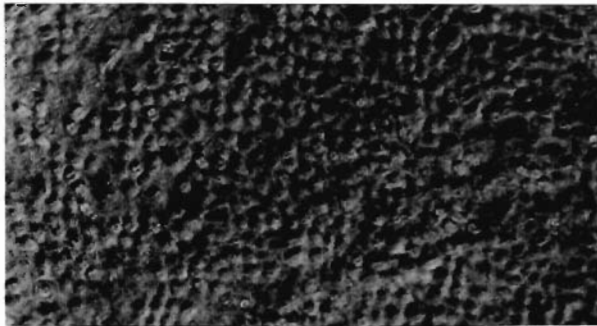
Màng ối đã được loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô sau khi xử lý enzyme và cơ học, thu được màng collagen.

Các tế bào sừng đã tăng trưởng, tạo 4 - 5 lớp trên màng collagen và biểu hiện marker tế bào sừng đã và chưa biệt hóa sau 7 ngày tiếp xúc không khí. Các tế bào biểu hiện marker tế bào gốc biểu bì (p63) nằm ngay trên màng collagen.

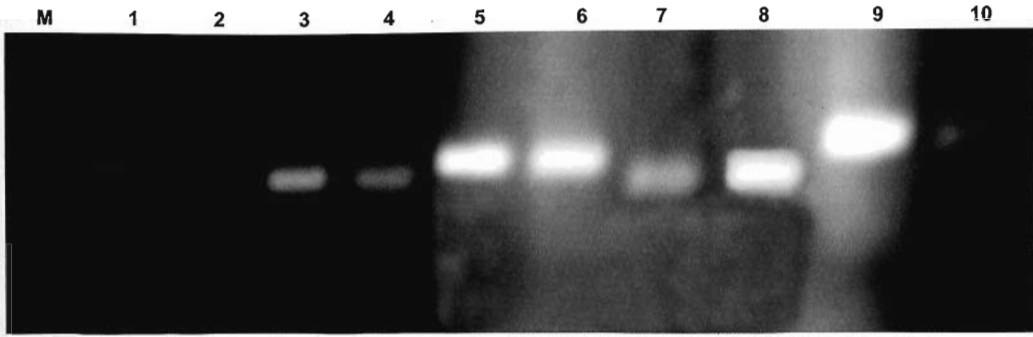
Với kết quả thu được, hướng nghiên cứu có thể tiến xa hơn trong ứng dụng lâm sàng để điều trị các tổn thương mắt da trên bệnh nhân.



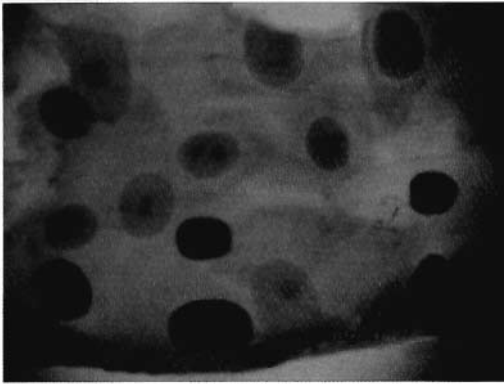
Hình 2. A. Các cụm (40X) và lớp đơn tế bào sừng trong đĩa nuôi; B Các cụm (100X) và lớp đơn tế bào sừng trong đĩa nuôi; C. Màng ối nguyên vẹn (100X); D. Màng ối đã loại hoàn toàn lớp biểu mô (100X). E. Tế bào sừng bám trên đĩa nuôi sau 3 h cấy chuyên (100X); F. Tế bào sừng bám trên màng collagen sau 3 h cấy chuyên (100X).



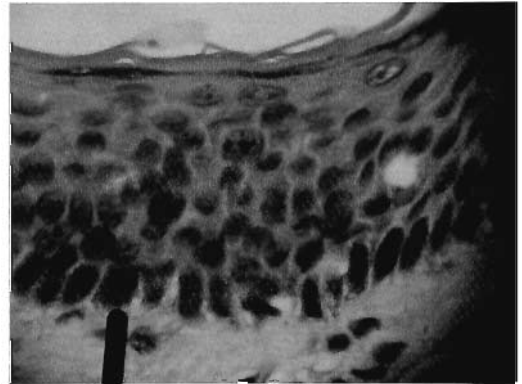
Hình 3. Lớp đơn tế bào sừng trên màng collagen (40X).



Hình 4. Kết quả RT-PCR các marker của tế bào sùng. M. Thang marker; 1, 3, 5, 7, 9. Sản phẩm khuếch đại các gen của tế bào sùng nuôi cấy tương ứng p63 (440 bp), k14 (390 bp), k5 (475 bp), involucrin (373 bp), β -actin (587 bp); 2, 4, 6, 8, 10. Sản phẩm khuếch đại gen của mẫu da bình thường đối chứng tương ứng p63, k14, k5, involucrin, β -actin.



A



B

Hình 5. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể p63 mô biểu bì trên màng collagen (A) và mẫu da đối chứng (B) (400X). Các tế bào bắt màu nâu: dương tính p63.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Bệnh viện Chấn thương chỉnh hình, Bệnh viện Phụ sản Hùng Vương đã cung cấp mẫu da và màng ối người để tiến hành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adriana C, Arzu S, Sandrine W, David FF, Stan PCB (2001) SPRR4, a novel cornified envelope precursor: UV-dependent epidermal expression and selective incorporation into fragile envelopes. *J Cell Sci* 114: 3837-3843.

Annie Y, Mourad K, Yunmei W, Emily G, Mark DF, Volker D, Nancy CA, Daniel C, Frank M (1998) p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol Cell* 2 : 305-316.

Barbora D, Zuzana H, Jiří V, Radana, Zuzana K, Jiří M, Martin P (2003) Reconstruction of epidermis by grafting of keratinocytes cultured on polymer support - clinical study. *Inter J Dermatol* 42: 219-223.

Hassan N, Habibollah P, Abolhassan A (2008) Properties of HAM in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 15: 88-89.

Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S (2004) Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 800-806.

Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee KY, Kang CK, Min BH (2007) Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tiss Eng* 13: 693-702.

Jones I, James SE, Rubin P, Martin R (2003) Upward migration of cultured autologous keratinocytes in Integra artificial skin: a preliminary report. *Wound Repair Regen*

11: 132-138.

Masayuki Y, Mika U, Ai K, Chie K, Akihiko K, Teruo O (2001) Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheet without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng* 7: 473-480.

Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L, Ruszymah BHI (2007) Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns* 33: 355-363.

Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Shimizu Y, Kinoshita S (2004) Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 93-99.

Oyama N, Bhogal BS, Carrington P, Gratian MJ, Black MM (2003) Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immuno-blotting. *Br J Dermatol* 148: 939-944.

Raymund EH, Markus D, Gilbert W, Bjoern S (2000) Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tiss Eng* 6: 53-67.

Raymund EH, Jürgen K, Ulrich K, Justus B, Alexander DB (2005) Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 9: 592-608.

Susan SY (2003) *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley Sons, Inc. : 155-160.

Tseng SC (2001) Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Biosci Rep* 21: 481-489.

Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai Y (2006) Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9554-9559.

Virve P, Jussi V, Tuula S, Leo T (2007) Effects of TGF- β 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine* 40: 44-51.

Zhu N, Warner RM, Simpson C, Glover M, Hemon CA, Kelly J, Fraser S, Brotherston TM, Ralston DR, MacNeil S (2005) Treatment of burns and chronic wounds using a new cell transfer dressing for delivery of autologous keratinocytes. *Eur J Plast Surg* 28: 319-330.

CREATION OF MULTILAYERED KERATINOCYTE SHEET ON COLLAGEN FROM HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE

Tran Le Bao Ha^{1,*}, Tran Cong Toai², Hoang Nghia Son³

¹University of Natural Sciences, Hochiminh City

²Pham Ngoc Thach University of Medicine, Hochiminh City

³Institute of Tropical Biology

SUMMARY

Epidermis composed of terminally differentiated stratified squamous epithelium is the outermost layer of the skin. The epidermis is the major barrier protect the body from inhospitable environment factors such as biological, chemical, physical factors. Epidermis which consists of the multilayered keratinocytes could be created *in vitro* for the treatment of acute burn injuries and chronic wounds. In this study, the multilayered keratinocyte sheets were created from the adult human keratinocytes and the amniotic collagen membrane. Human keratinocytes were isolated, cultured, amplified in serum free medium. Collagen membrane was derived from human amniotic membrane of which the epithelium was removed and evaluated by HE staining. After subcultured on collagen membrane, keratinocytes were stimulated for proliferation and differentiation to create multilayer by airlifting. The multilayered keratinocyte sheet characteristics were evaluated by using RT-PCR and immunohistochemistry. The results showed that epithelial cells were removed completely from the human amniotic membrane by enzyme and mechanical treating. Keratinocytes proliferated and formed 4 - 5 layers on collagen. They also expressed some differentiation and proliferation markers at 7 days after airlifting. The keratinocytes which were positive with proliferative marker (p63) lied closely on the collagen membrane and upper of the cells differentiated.

Keywords: Amniotic membrane, collagen, epidermis, keratinocyte, serum free medium

* Author for correspondence: Tel: 0988575507; Fax: 84-8-38350 096; E-mail: tlbha@hcmuns.edu.vn