

ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM TẾ BÀO SÙNG NGƯỜI ĐƯỢC NUÔI CÂY *IN VITRO*

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

Tế bào sùng chiếm 90% tổng số tế bào của lớp biểu bì. Lớp tế bào sùng nằm ngay trên màng cơ bản được gọi là lớp đáy, chứa các tế bào đang tăng sinh. Đó là các tế bào gốc biểu bì và tế bào khuếch đại nhất thời. Khi được nuôi cấy *in vitro*, các tế bào sùng có khả năng tăng sinh, vẫn giữ tính gốc và hình thành cụm. Ba dạng cụm tế bào sùng hình thành trong nuôi cấy là (i) Holoclone có khả năng tăng sinh lớn nhất, (ii) Paraclone hầu hết là những tế bào đã biệt hóa hoàn toàn, (iii) Meroclone gồm hỗn hợp các tế bào có tiềm năng tăng trưởng khác nhau, là giai đoạn chuyển tiếp giữa holoclone và paraclone. Trong nghiên cứu này, các tế bào sùng người được đánh giá khi nuôi cấy *in vitro*. Các tế bào sùng người được phân lập bằng cách xử lý trypsin/EDTA và nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh SFM (Serum Free Medium). Các marker của tế bào sùng người đã được nhận diện bằng phương pháp RT-PCR. Sự tăng sinh và khả năng tạo cụm của tế bào đã được đánh giá. Kết quả cho thấy các tế bào được nuôi cấy có khả năng tăng sinh (thời gian gấp đôi quần thể là khoảng 24 h), hình thành cụm và biểu hiện các marker phân tử đặc hiệu của tế bào sùng như p63, k5, k14, involucrin.

Từ khóa: lớp đáy, màng cơ bản, môi trường không chứa huyết thanh, tế bào gốc biểu bì, tế bào khuếch đại nhất thời, tế bào sùng

MỞ ĐẦU

Về cấu trúc từ trong ra ngoài, biểu bì được phân thành bốn lớp: lớp đáy, lớp sợi, lớp hạt, lớp sùng. Các lớp được phân biệt dựa vào các đặc điểm hình thái của các tế bào sùng đang trưởng thành (Laura *et al.*, 2003). Tế bào sùng chiếm 90% tổng số tế bào của lớp biểu bì (Ariane *et al.*, 2006; Lê, 2003).

Hai quần thể tế bào sùng của lớp đáy có khả năng tăng sinh là tế bào gốc biểu bì (epidermal stem cell) và tế bào khuếch đại nhất thời (transient amplifying cell - dạng trung gian của tế bào gốc và tế bào biệt hóa cuối cùng) (Fiona, 1998). Tế bào gốc biểu bì có các đặc tính: chu kỳ chậm *in vivo*; có khả năng tự làm mới; có thể được hoạt hóa do tổn thương hoặc các điều kiện nuôi cấy *in vitro* để tăng sinh và tái tạo mô; có tiềm năng tăng sinh cao (Laura *et al.*, 2003; Laure *et al.*, 2003). Các tế bào khuếch đại nhất thời là con cháu của tế bào gốc biểu bì, có khả năng tự làm mới bị giới hạn (khoảng 3 - 5 lần phân chia), có khả năng rút khỏi chu kỳ tế bào và chịu sự biệt hóa cuối cùng (Fiona, 1998).

Khả năng nhân nhanh số lượng tế bào sùng dưới điều kiện nuôi cấy đã được Rheinwald và Green công bố từ năm 1975 (Rheinwald *et al.*, 1975). Đến

nay, có hai phương pháp chính đã được phát triển để nuôi cấy các tế bào sùng *in vitro*: (i) sử dụng môi trường chứa huyết thanh với lớp nuôi dưỡng là nguyên bào sợi chuột bị chiếu xạ liều chết, (ii) sử dụng môi trường không chứa huyết thanh và không có lớp nuôi dưỡng (Tenchini *et al.*, 1992).

Khi được nuôi cấy *in vitro*, các tế bào sùng có khả năng tăng sinh, vẫn giữ tính gốc và hình thành cụm (ba dạng cụm tế bào sùng là holoclone, paraclone, meroclone) (Ariane *et al.*, 2006; Barrandon *et al.*, 1998; John, 2000).

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: Đánh giá đặc điểm tế bào sùng người được nuôi cấy *in vitro* và tạo nguồn tế bào sùng cho thiết kế da nhân tạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

Mẫu da lành của bệnh nhân có chỉ định ghép da.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu nhận và xử lý mẫu

Thu nhận mẫu da, giữ trong PBS (Phosphate

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

Phương pháp phân lập tế bào (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 giờ ở 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 sử dụng pipet để huyền phù. Mật độ tế bào, tỷ lệ % tế bào sống được xác định bằng cách đếm tế bào trong buồng đếm hồng cầu sau khi nhuộm trypan blue.

Phương pháp nuôi, nhân tế bào (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 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 (Defined Keratinocyte Serum Free Medium - Gibco) dành cho tế bào sừng.

Tiếp tục nuôi ở 37°C, 5% CO₂ cho đến khi tế bào tăng trưởng chiếm 70 - 80% bề mặt đĩa nuôi và cấy chuyển.

Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của tế bào

Sau khi nuôi sơ cấp, các tế bào được cấy chuyển sang đĩa 96 giếng với mật độ 3.10^4 tế bào/cm² bề mặt đĩa nuôi trong môi trường.

Xác định mật độ tế bào mỗi ngày bằng cách đếm tế bào trong buồng đếm hồng cầu sau khi nhuộm trypan blue.

Phương pháp nhận diện tế bào bằng RT-PCR

RNA tổng số 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 CTC ATC -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.*, 2001; Annie *et al.*, 1998; Mazlyzam *et al.*, 2007; Virve *et al.*, 2007; Yoshimitsu *et al.*, 2004).

Phản ứng RT-PCR được thực hiện như sau: 45 phút ở 45°C, 3 phút ở 94°C, PCR 35 chu kỳ (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%.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả phân lập tế bào từ mẫu da

Tổng số mẫu da thu nhận: 18.

Số tế bào sống tách được (trung bình $656,4 \pm 19,8.10^4$ /cm² mô da) và tỷ lệ tế bào sống (trung bình $82,75\% \pm 1,86$) thỏa mãn yêu cầu để nuôi cấy. Với 1cm² mô da, số tế bào sống phân lập được đủ để nuôi trong 1 bình roux 25 cm².

Kết quả nhuộm mô học HE cho thấy trong hỗn hợp tế bào đã được thu nhận có chứa hai quần thể tế bào sừng ở lớp đáy là tế bào gốc biểu bì và tế bào khuếch đại nhất thời. Đây là những tế bào có khả năng tăng sinh của biểu bì. Về mặt lý thuyết, trong lớp đáy có 10% tế bào gốc biểu bì và 50% tế bào khuếch đại nhất thời (Lê, 2003).

Kết quả đánh giá sự tăng sinh của tế bào trong nuôi cấy

Hình 4 và bảng 2 cho thấy mật độ tế bào tăng dần từ ngày 2 đến ngày 7, sau đó giảm nhanh.

Khi được nuôi trong môi trường SFM, tế bào sừng tăng sinh và đạt mật độ cao nhất vào ngày 7, thời gian nhân đôi quần thể là khoảng 24 h.

Cứ 1 cm² da được phân lập và nuôi tế bào trong 1 bình roux 25 cm², đến ngày thứ 7 tế bào đã tăng sinh và chiếm đầy bình. Sau khi cấy chuyển ra 2 bình roux mới, sau 7 ngày tế bào sẽ tăng sinh đầy bình. Như vậy, sau 14 ngày nuôi, từ 1 cm² da ban đầu có thể thu nhận được diện tích 50 cm² tế bào sừng. Điều này rất quan trọng trong việc tính toán để thu nhận mảnh da và thời gian nuôi cấy, nhân tế bào thích hợp cho việc cấy ghép trên bệnh nhân.

Bảng 1. Số tế bào sống và % tế bào sống sau khi phân lập.

Mẫu	STB sống x 10 ⁴ /cm ²	% tế bào sống	Mẫu	STB sống x 10 ⁴ /cm ²	% tế bào sống
1	640	71,54	10	558	91,20
2	650	75,75	11	779	76,83
3	574	71,84	12	809	81,31
4	616	77,40	13	507	97,30
5	754	71,60	14	517	97,50
6	695	82,83	15	666	86,70
7	686	80,25	16	666	84,30
8	636	87,26	17	754	87,78
9	657	83,10	18	651	85,00

Bảng 2. Sự tăng sinh của tế bào sừng sau lần cấy chuyển thứ nhất.

Ngày	STB x 10 ⁴ /cm ²			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình
2	0,27	0,27	0,27	0,27
3	0,40	0,50	0,67	0,52
4	0,40	0,67	0,93	0,67
5	0,80	0,93	1,10	0,94
6	1,63	1,90	1,90	1,81
7	2,13	2,30	2,30	2,24
8	1,33	1,87	2,27	1,82
9	0,80	1,07	1,33	1,07
10	0,67	0,53	0,53	0,58

Kết quả nuôi cấy tế bào

Các tế bào sừng tạo dòng có tính không đồng nhất về khả năng tăng trưởng. Khi được nuôi cấy *in vitro*, ba dòng tế bào sừng hình thành là paraclone, meroclone, và holoclone (Ariane *et al.*, 2006; Barrandon *et al.*, 1998; John, 2000).

Holoclone hình thành những cụm lớn và tròn, bao gồm phần lớn các tế bào nhỏ bao xung quanh những tế bào đã biệt hóa phân tầng. Holoclone có khả năng tăng sinh lớn nhất. Paraclone hình thành những cụm nhỏ và không đều, hầu hết là những tế bào đã biệt hóa hoàn toàn. Paraclone chứa các tế bào có vòng sao chép ngắn (ít hơn 15 thế hệ tế bào). Meroclone tạo ra những cụm không có viền tròn và nhỏ hơn các cụm do holoclone tạo ra. Meroclone gồm hỗn hợp các tế bào có tiềm năng tăng trưởng khác nhau, là giai đoạn chuyển tiếp giữa holoclone

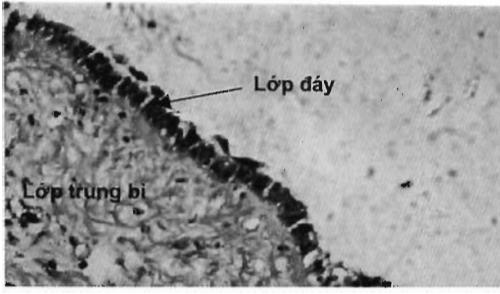
và paraclone.

Kết quả xác định tế bào sừng bằng marker

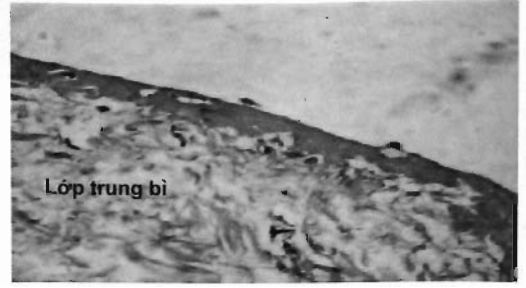
Sau hai lần cấy chuyển, các tế bào được xác định bằng phương pháp RT-PCR với các marker tế bào sừng.

Có nhiều marker để phân biệt các tế bào sừng chưa biệt hóa ở lớp đáy và tế bào sừng biệt hóa. Trong đó, tế bào sừng chưa biệt hóa ở lớp đáy (tế bào gốc và tế bào khuếch đại nhất thời) biểu hiện các marker: p63, K5, K14; tế bào sừng đã biệt hóa biểu hiện marker involucrin.

Tế bào sừng được nuôi cấy biểu hiện dương tính cả marker của tế bào chưa biệt hóa và tế bào đã biệt hóa. Điều này giải thích tính tăng trưởng không đồng nhất của quần thể tế bào và khả năng tự biệt hóa của tế bào trong quá trình nuôi cấy.



A



B

Hình 1. Mô da sau khi tách rời lớp biểu bì - trung bì và thu nhận tế bào lớp đáy. **A.** Lớp đáy có tế bào gốc (nhuộm HE-100X; **B.** Lớp đáy đã được thu nhận (nhuộm HE-100X).



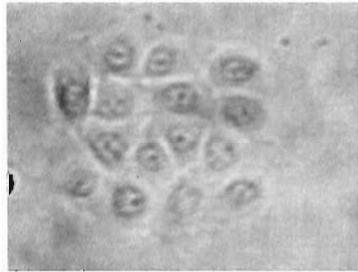
A



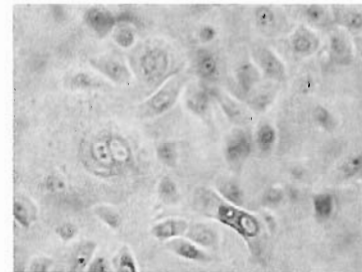
B



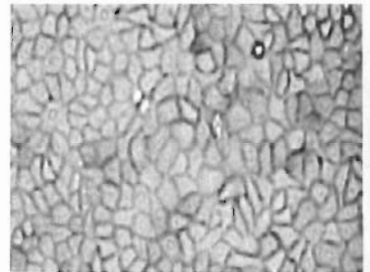
C



D

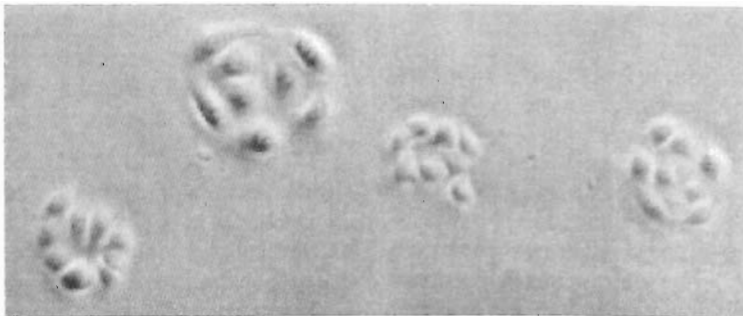


E

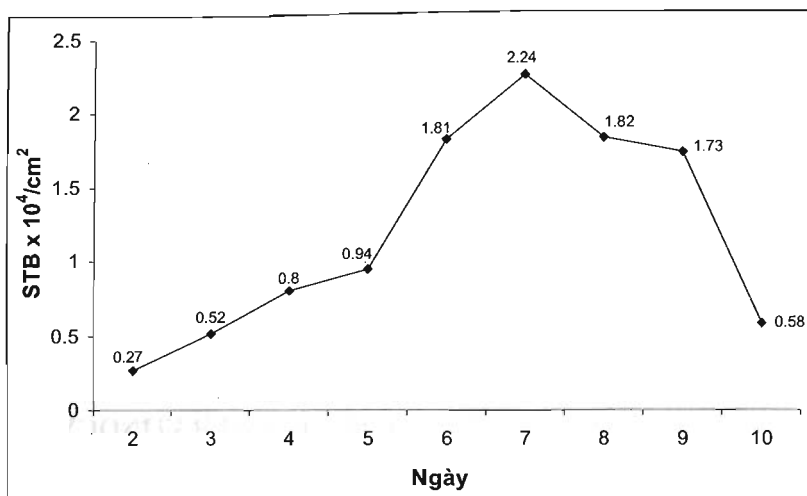


F

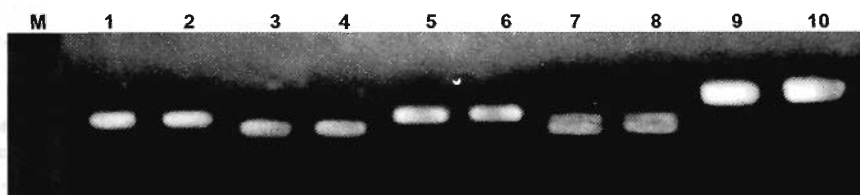
Hình 2. Các kiểu cụm tế bào sừng tạo thành khi được nuôi cấy *in vitro*. Tất cả các cụm được chụp hình từ cùng một đĩa nuôi cấy ở cùng độ phóng đại (100X). Các mẫu cho thấy các tế bào bám và không có khả năng phân chia (**A**), hoặc chỉ phân chia từ một đến bốn lần (**B-D**). (**E**) một dòng lớn nhưng các tế bào sắp xếp thưa bao gồm nhiều tế bào biệt hóa khác nhau. (**F**) một dòng lớn bao gồm các tế bào nằm khít nhau, có khả năng tăng sinh cao.



Hình 3. Các cụm tế bào sừng hình thành trong đĩa nuôi (100X).



Hình 4. Đường cong tăng trưởng của tế bào sừng sau lần cấy chuyển thứ nhất.



Hình 5. Kết quả RT-PCR các marker của tế bào sừng. M. Thang marker; 1, 3, 5, 7, 9. Sản phẩm khuếch đại các gen của tế bào sừng 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.

KẾT LUẬN

Khi được nuôi cấy trong môi trường SFM, các tế bào sừng người có khả năng tăng sinh (thời gian gấp đôi quần thể là khoảng 24 h), hình thành cụm và biểu hiện các marker phân tử đặc hiệu của tế bào sừng như p63, K5, K14, involucrin. Sau 14 ngày nuôi, từ 1 cm² da ban đầu có thể thu nhận được 50 cm² tế bào sừng.

Như vậy, tế bào sừng người có thể được nuôi cấy và nhân để tạo nguồn cho các nghiên cứu ứng dụng được phẫu, mỹ phẩm, da nhân tạo.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Bệnh viện Chấn thương chỉnh hình thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp mẫu da 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.

Ariane R, Yann B (2006) *Essentials of stem cell biology*. Elsevier, Inc.: 440-444.

Barrandon Y, Green H (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2302-2306.

Fiona MW (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Phil Trans R Soc Lond B* 353: 831-837.

John RWM (2000) *Animal Cell Culture - A Practical Approach*. Oxford University press Inc.: 278-297.

Laura A, Elaine F (2003) Stem cells of the skin epithelium.

Proc Natl Acad Sci USA 100: 11830-11835.

Laure G, Yann B (2003) The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr Opin Cell Biol* 15: 771-777.

Lê TT (2003) *Bông - Những kiến thức chuyên ngành*. Nhà xuất bản Y học: 29-39.

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.

Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the cell formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331.

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

Tenchini ML, Ranzati C, Malcovati M (1992) Culture techniques for human keratinocytes. *Burn* 18: S11-S16.

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.

Yoshimitsu A, Koichi H, Michiko K, Katsumasa T, Mitsuhiro O, Hiroshige S (2004) Profiling of differentially expressed genes in human gingival epithelial cells and fibroblasts by DNA microarray. *J Oral Sci* 46: 19-24.

CHARACTERIZATION OF THE CULTURED HUMAN KERATINOCYTES

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

¹University of Science, Ho Chi Minh city

²Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

³Institute of Tropical Biology

SUMMARY

Epidermis accounts for 90% of keratinocytes. The layer of keratinocytes that is closest to the basement membrane is called basal. It contains a number of proliferating cells. These cells are epidermal stem cells and transient amplifying cells. When cultured *in vitro*, keratinocytes are able to maintain proliferating, stemming, colonizing abilities. There are three types of colonies formed *in vitro*: (i) holoclone consists of cells with the highest proliferative capacity; (ii) paraclone consists of nearly differentiated cells; (iii) meroclone possesses of a wide range variety of cells that are different in proliferative capacity. The meroclone is the transient phase between holoclone and paraclone. In this research, characteristics of the cultured human keratinocytes were evaluated. The human keratinocytes were isolated and cultured in SFM (Serum Free Medium). Markers of human keratinocytes were identified by RT-PCR. Proliferating and colonizing abilities of these cells were evaluated. Results showed that the cultured cells proliferated (up to double number in 24 hours). They also formed colonies and expressed the specific markers of keratinocytes such as p63, k5, k14, involucrin.

Keywords: Keratinocyte, epidermal stem cell, transit amplifying cell, basal layer, basement membrane, serum free medium

* Author for correspondence: Tel: 84-988575507 ; Fax: 84-8-38350096; E-mail: tlbha@hcmuns.edu.vn