

HAI PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC NHÚ CHÓP TỪ RĂNG CHƯA TRƯỞNG THÀNH CỦA NGƯỜI

Trần Lê Bảo Hà

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh, tlbha@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT: Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng quần thể tế bào gốc trung mô có thể được phân lập từ mô nhú chóp ở răng chưa trưởng thành của người. Trong nghiên cứu này, mẫu mô nhú chóp của người được thu nhận và khử trùng bằng dung dịch phosphate buffer saline (PBS) bổ sung kháng sinh 4X. Sau đó, mẫu mô được nuôi cấy sơ cấp bằng hai phương pháp: nuôi cấy mảnh mô và nuôi cấy tế bào đơn. Sự hiện diện của tế bào gốc trung mô được xác định thông qua sự biểu hiện các marker bề mặt bằng kỹ thuật flow cytometry và khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương và tế bào mỡ. Kết quả, chúng tôi đã nuôi cấy thành công tế bào từ mô nhú chóp răng của người và chứng minh chúng có khả năng tăng sinh, dương tính mạnh ($\geq 95\%$) các marker CD73, CD44, CD90, âm tính ($\leq 2\%$) các marker CD34, CD45, HLA-DR; đồng thời có khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương và tế bào mỡ. Từ những kết quả đạt được, chúng tôi kết luận rằng tế bào phân lập từ mô nhú chóp là tế bào gốc trung mô; đây là một nguồn tế bào giàu tiềm năng ứng dụng trong điều trị lâm sàng và công nghệ nuôi cấy mô.

Từ khóa: Mô nhú chóp, nuôi cấy mô tế bào, tế bào gốc nhú chóp, tế bào gốc trung mô.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, Việt Nam được coi là nước có tỷ lệ người mắc bệnh răng miệng cao hàng đầu thế giới. Phương pháp phổ biến để điều trị các trường hợp sâu răng đến tủy chỉ loại bỏ tủy răng hư chứ không phục hồi được răng sâu. Sau một thời gian, chất lượng răng sau khi trám sẽ giảm, răng trở nên giòn, dễ gãy hơn. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào và nuôi cấy mô đã mở ra những hướng điều trị mới, hiệu quả hơn cho tổn thương nội nha.

Hiện nay, tế bào gốc trung mô là nguồn tế bào được nghiên cứu nhiều nhất nhờ tiềm năng tái tạo các mô, cơ quan bị bệnh hay tổn thương. Tế bào gốc trung mô có khả năng tự làm mới và tăng sinh mạnh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Ngoài ra, chúng còn là những tế bào gốc đa tiềm năng có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau khi gặp điều kiện thích hợp như tế bào xương, sụn, mỡ, gân, thần kinh... Các tế bào gốc trung mô rất hiếm, giảm theo tuổi, có trong tủy xương với tần số là $0,1-5 \times 10^{-5}$ tế bào ở động vật gặm nhấm và $1-20 \times 10^{-5}$ ở người. Mặt khác, tế bào gốc trung mô cũng có thể được phân lập dễ dàng từ mô liên kết, mô mỡ, mô gan, cơ và các mô của cơ quan răng [6, 7].

Trong vài năm gần đây, quần thể tế bào gốc nhú chóp được phân lập thành công từ mô mềm tại chóp chân răng vĩnh viễn chưa trưởng thành,

chúng có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và đóng chóp chân răng. Những tế bào gốc này đã được chứng minh có khả năng biệt hóa thành các dạng tế bào khoáng hóa (nguyên bào ngà và nguyên bào xương), mỡ, sụn và thần kinh dưới môi trường cảm ứng thích hợp. Ngoài ra, các tế bào này còn biểu hiện những marker đặc trưng của tế bào gốc trung mô như STRO1, ALP, CD24, CD73, CD44, CD90, CD105, CD146 và âm tính với các marker CD34, CD45, HLA-DR, CD18 [4, 8, 9]. So sánh với tế bào gốc tủy răng, tế bào gốc nhú chóp răng có tốc độ tăng sinh nhanh hơn và tiềm năng tái tạo ngà *in vivo* cao hơn [2, 5]. Khi kết hợp với tế bào gốc dây chằng nha chu trên giá thể hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP), dòng tế bào gốc này có khả năng hình thành phức hợp chân răng/bao răng *in vivo* [1, 4, 5].

Tuy nhiên, Việt Nam vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào liên quan đến dòng tế bào gốc đa tiềm năng này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài như bước khởi đầu đặt nền móng cho những nghiên cứu sau này trong lĩnh vực điều trị nội nha.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu được sử dụng là mẫu mô nhú chóp của người tình nguyện được thu nhận từ khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược tp. Hồ Chí

Minh. Người hiến răng phải được xét nghiệm đông máu, không bị sâu răng, không bị viêm nha chu.

Phương pháp thu nhận và nuôi cấy tế bào nhú chóp

Sau khi mẫu răng được thu nhận, sử dụng lưỡi dao phẫu thuật tách mô nhú chóp khỏi chân răng. Sau đó, mô nhú chóp được rửa với PBS (Gibco) vô trùng có bổ sung kháng sinh. Các tế bào được thu nhận bằng hai phương pháp (nuôi cấy mảnh mô và nuôi cấy tế bào đơn) trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và kháng sinh, kháng nấm (Sigma). Các tế bào nhú chóp ở thể hệ thứ tư được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp nuôi cấy tạo bào lạc (colony)

Tế bào được nuôi cấy với mật độ khoảng 100 tế bào/đĩa 35mm trong 12 ngày. Các bào lạc (khoảng hơn 40 tế bào) được xác định bằng cách nhuộm với thuốc nhuộm Crystal violet.

Phương pháp flow cytometry xác định các marker bề mặt tế bào

Các tế bào được thu nhận bằng cách xử lý với trypsin/EDTA 0,25% và được điều chỉnh để mật độ đạt 10^6 tế bào/ml. Các tế bào được huyền phù trong 1ml FACS Flow và nhuộm với 10 μ l kháng thể trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (CD44-PE, CD73-PE, CD90-PE, CD34-FITC, CD45-FITC, HLA DR-FITC, BD Sciences, San

Jose, CA). Làm lạnh mẫu trong 15 phút ở 4°C. Tiến hành đánh giá marker tế bào bằng máy FACS Calibur sử dụng phần mềm Cell Quest Pro.

Phương pháp biệt hóa tế bào nhú chóp thành nguyên bào xương

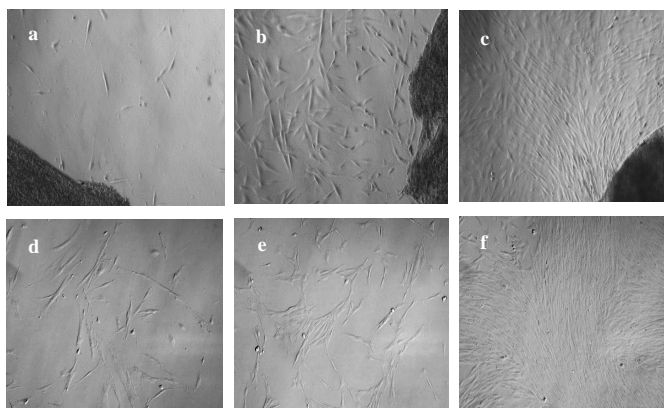
Tế bào được biệt hóa thành nguyên bào xương bằng cách nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 50 μ g/ml L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) và 100 mM β -glycerolphosphate (Sigma). Sau 3 tuần, tiến hành nhuộm tế bào đã biệt hóa bằng Alizarin red và chạy phản ứng Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) để xác định sự biểu hiện của 2 gene Osteocalcin (150 bp) và Runx2 (127 bp).

Phương pháp biệt hóa tế bào nhú chóp thành tế bào mỡ

Tế bào được biệt hóa thành tế bào mỡ bằng cách nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS; 100 nM dexamethasone; 0,2 mM indomethacin; 10 μ g/ml insulin; 0,5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX) (Sigma). Sau 3 tuần, tiến hành nhuộm tế bào đã biệt hóa bằng Oil red.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nuôi cấy tế bào nhú chóp



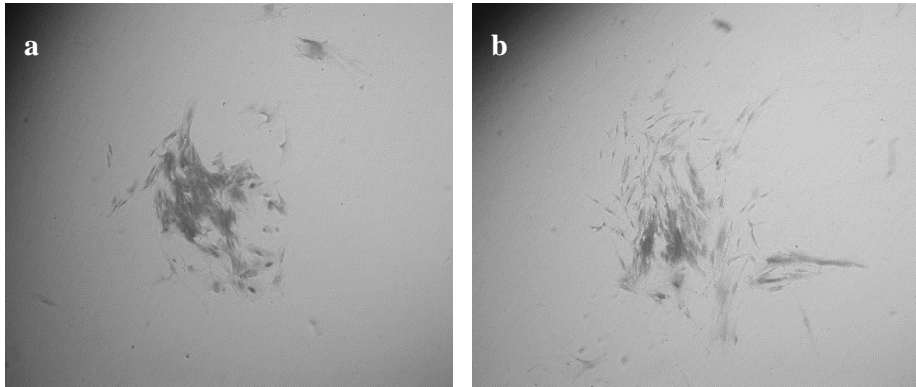
Hình 1. Tế bào nhú chóp sau các ngày nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô (a, b, c) và phương pháp nuôi cấy tế bào đơn (d, e, f) (100X).

a. Tế bào nhú chóp sau 5 ngày nuôi cấy; b. Tế bào nhú chóp sau 15 ngày nuôi cấy; c. Tế bào nhú chóp sau 21 ngày nuôi cấy; d. Tế bào nhú chóp sau 24 giờ nuôi cấy; e. Tế bào nhú chóp sau 7 ngày nuôi cấy; f. Tế bào nhú chóp sau 15 ngày nuôi cấy.

Trong phương pháp nuôi cấy mảnh mô, vào ngày nuôi cấy thứ 5 đã bắt đầu xuất hiện các tế bào trải với nhiều hình dạng khác nhau như dạng hình thoi, dạng kéo dài, dạng hình sao. Những ngày nuôi cấy sau đó, dạng chiếm ưu thế là dạng tế bào trải rộng, nhân lớn hình oval và có nhiều đuôi bào tương. Ngày thứ 21, các tế bào bắt đầu hợp dòng, tạo thành một lớp đơn

trên bề mặt nuôi cấy. Ở phương pháp nuôi cấy tế bào đơn, quan sát ban đầu cho thấy hỗn hợp tế bào đơn có nhiều hình dạng và kích thước không đồng nhất. Về sau, các dạng tế bào này cũng dần dần thu hẹp lại. Sau 14 ngày nuôi cấy, các tế bào đồng nhất về hình dạng và bắt đầu hợp dòng.

Kết quả nuôi cấy tạo bào lạc



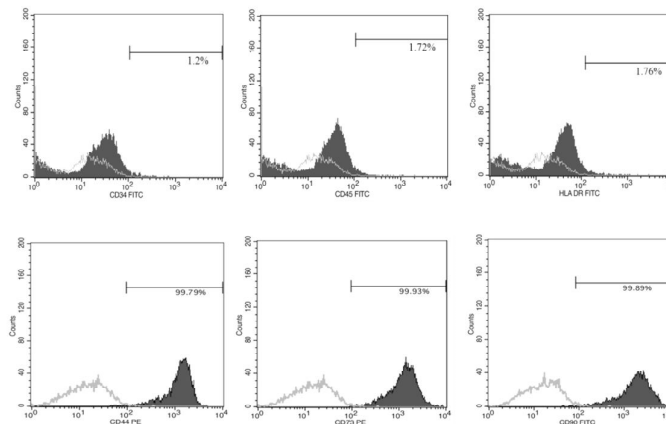
Hình 2. Cụm bào lạc hình thành

- a. Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô (100X);
b. Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy tế bào đơn (100X).

Các tế bào nhú chóp được cấy vào đĩa 35mm với mật độ 100 tế bào/đĩa để khảo sát khả năng hình thành các đơn vị bào lạc (colony forming unit-CFU). Sau 12 ngày, kết quả cho thấy các tế bào có khả năng hình thành các cụm bào lạc với hơn 40 tế bào trong một cụm. Sự hình thành CFU chứng minh được khả năng

tăng sinh và phát triển mạnh của tế bào nhú chóp trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả Sonoyama et al. (2004), Huang et al. (2009) [4, 8].

Kết quả xác định các marker bề mặt



Hình 3. Kết quả chạy flow cytometry các marker bề mặt CD44, CD73, CD90, CD34, CD45, HLA-DR

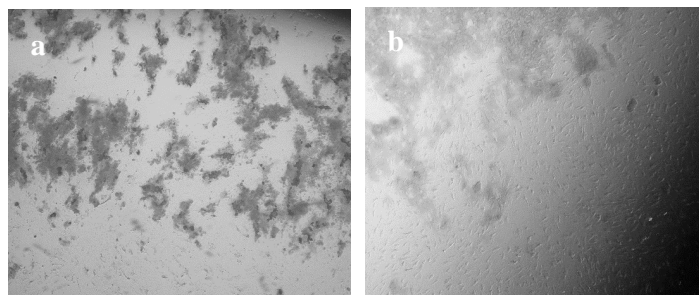
Các tế bào núchóp nuôi cấy ở thể hệ thứ tư được đánh giá sự biểu hiện marker bề mặt bằng flow cytometry. Một marker được xem là âm tính nếu tỷ lệ dương tính nhỏ hơn 2% trong tổng số tế bào dương tính khi đánh giá bằng kỹ thuật flow cytometry. Ngược lại, một marker được xem là dương tính khi tỷ lệ biểu hiện của chúng trên tổng số tế bào khảo sát khoảng 95%. Kết quả cho thấy, các tế bào ứng viên dương tính mạnh với các marker CD44 (99,79%), CD73 (99,93%), CD90 (99,89%) và âm tính với các marker CD34 (1,20%), CD45 (1,72%), HLA-DR (1,76%) (hình 3).

Kết quả biệt hóa tế bào núchóp thành nguyên bào xương

Tế bào núchóp ở lần cấy chuyển thứ tư được tiến hành biệt hóa thành nguyên bào xương. Sau khi nuôi cấy 10 ngày trong môi

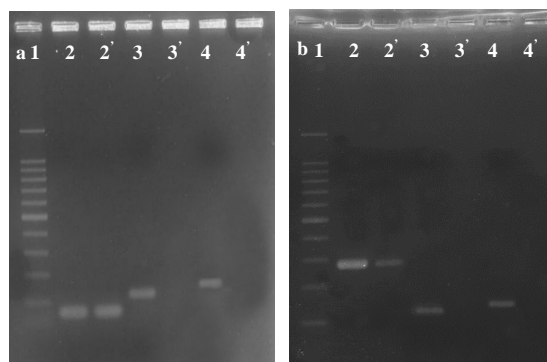
trường cảm ứng biệt hóa, các tế bào bắt đầu thay đổi hình dạng từ hình thoi sang dạng co tròn. Sau 21 ngày, chất nền ngoại bào được khoáng hóa rõ rệt hình thành các nốt calcium do các tế bào biệt hóa co cụm lại. Khi được nhuộm với Alizarin red, các vùng tế bào biệt hóa thành công sẽ bắt màu đỏ, là màu của phức hợp thuốc nhuộm và ion calcium hiện diện trong tế bào chất cũng như chất nền ngoại bào (hình 4).

Ngoài ra, kết quả chạy RT-PCR cho thấy mẫu tế bào biệt hóa dương tính với 2 gen Runx2 và Osteocalcin (hình 5). Từ hai kết quả trên, chúng tôi kết luận tế bào núchóp đã biệt hóa thành các nguyên bào xương. Kết quả biệt hóa trên cũng phù hợp với kết quả đã được công bố trong nghiên cứu của Sonoyama et al. (2008), Huang et al. (2009, 2010), Wang et al. (2012) [4, 5, 8, 9].



Hình 4. Kết quả nhuộm Alizarin red tế bào núchóp biệt hóa thành nguyên bào xương

- Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô (100X);
- Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy tế bào đơn (100X).



Hình 5. Kết quả RT-PCR 2 gene Osteocalcin (150 bp) và Runx2 (127 bp)

- Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô; b. Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy tế bào đơn; 1. Thang DNA chuẩn 100 bp; 2, 2'. Gen β -actin; 3, 3'. Gen Runx2; 4, 4'. Gen Osteocalcin; 2, 3, 4. Mẫu thí nghiệm; 2', 3', 4'. Đối chứng âm.

Kết quả biệt hóa tế bào nhú chóp thành tế bào mỡ

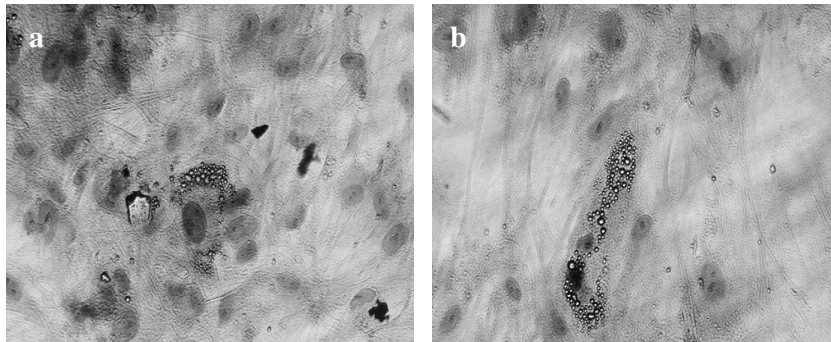
Các tế bào ban đầu có dạng hình thoi dài sẽ chuyển thành dạng bầu dục và dạng hình cầu. Các tế bào tạo mỡ bắt đầu xuất hiện vào ngày thứ 7 sau khi cảm ứng biệt hóa. Số lượng tế bào tạo mỡ gia tăng theo thời gian, khoảng từ 2-3 tuần. Ban đầu, các giọt mỡ với kích thước nhỏ xuất hiện, sau đó các giọt mỡ nhỏ hợp thành các giọt mỡ lớn và ép nhân tế bào ra ngoài.

Sự tích tụ các giọt mỡ bên trong tế bào có thể quan sát dễ dàng dưới kính hiển vi đảo ngược, khi nhuộm với Oil red, các giọt mỡ bắt màu đỏ. Kết quả này cho thấy các tế bào nhú chóp ứng viên thu nhận theo quy trình trên có khả năng biệt hóa thành tế bào tạo mỡ. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây của tác giả Sonoyama et al. (2008), Huang et al. (2010) [4, 5, 8].

Ủy ban tế bào gốc mô và trung mô của Hội liệu pháp tế bào quốc tế (ISCT) đã đưa ra ba tiêu chí để khẳng định tế bào gốc trung mô người, đó là (1) khả năng bám dính, tăng sinh

và hình thái đặc trưng của tế bào trên bề mặt của dụng cụ nuôi cấy; (2) các tế bào phân tích phải dương tính với các marker đặc trưng của tế bào gốc trung mô như CD90, CD73, CD105, CD44 và âm tính đồng thời với các marker thuộc dòng tế bào tạo máu như CD14, CD34, CD45 và HLA-DR và (3) tiềm năng biệt hóa thành tế bào xương, mỡ hay sụn [3].

Trong nghiên cứu này, tế bào gốc trung mô từ mô nhú chóp người được phân lập và nuôi cấy bằng hai phương pháp (nuôi cấy mảnh mô và nuôi cấy tế bào đơn). Các tế bào này có hình thái giống với nguyên bào sợi người, tương đối đồng nhất về hình dạng sau 3-5 lần cấy chuyển và có khả năng hình thành các bào lạc khi nuôi cấy mật độ thấp. Về kiểu hình miễn dịch, các tế bào này âm tính với các marker CD34, CD45, HLA-DR và dương tính đồng thời với các marker CD44, CD90, CD73. Quần thể tế bào được phân lập có khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương và tế bào mỡ dưới điều kiện thích hợp. Những kết quả trên đã chứng tỏ trong quần thể tế bào nuôi cấy có sự hiện diện của tế bào gốc trung mô.



Hình 6. Kết quả nhuộm Oil red tế bào nhú chóp biệt hóa thành tế bào mỡ
a. Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô (200X);
b. Tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy tế bào đơn (200X).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã thành công trong nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô nhú chóp của người bằng hai phương pháp: nuôi cấy mảnh mô và nuôi cấy tế bào đơn. Nghiên cứu đã cho thấy, tế bào gốc nhú chóp sẽ là một nguồn tế bào gốc đa tiềm năng ứng dụng trong y học tái tạo, đặc biệt là trong kỹ thuật nuôi cấy mô.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ trong khuôn khổ đề tài mã số ĐTĐL.2012-G34.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe S., Yamaguchi S., Watanabe A., Hamada K., Amagasa T., 2008. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with

- immature apex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371: 90-93.
2. Bakopoulou A., Leyhausen G., Volk J., Tsiftoglou A., Garefis P., Koidis P., 2011. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of Oral Biology*, 56: 709-721.
 3. Dominici M., Le Blanc K., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317.
 4. Huang G. T., Gronthos S., Shi S., 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88: 792-806.
 5. Huang G. T., Yamaza T., Shea L. D., Djouad F., Kuhn N. Z., Tuan R. S., 2010. Stem/Progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering, Part A* 16: 605-615.
 6. Marion N. W., Mao J. J., 2006. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods in Enzymology*, 420: 339-361.
 7. Short B., Brouard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnan A., Simmons P. J., 2003. Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*, 34: 565-571.
 8. Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R. S., Wang S., Shi S., 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34: 166-171.
 9. Wang S., Mu J., Fan Z., Yu Y., Yan M., Lei G., 2012. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Research*, 8: 346-356.

TWO METHODS FOR CULTURE OF APICAL PAPILLA STEM CELLS FROM IMMATURE HUMAN TOOTH

Tran Le Bao Ha

University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City

SUMMARY

Recent studies have demonstrated that populations of mesenchymal stem cells can be isolated from apical papilla tissues in immature human teeth. In this study, human apical papilla tissues were collected and sterilized with phosphate-buffered saline (PBS) containing antibiotics. After that, apical papilla cells were isolated by two methods: outgrowth method and enzyme digestion method. The presence of mesenchymal stem cells was determined by the expression of surface markers via flow cytometry techniques and the ability to differentiate into osteoblasts and adipocytes. As a result, we have successfully cultured cells from human apical papilla tissues and proved that they have the ability to proliferate, strongly positive ($\geq 95\%$) markers CD73, CD44, CD90, negative ($\leq 2\%$) markers CD34, CD45, HLA-DR, and also have the ability to differentiate into osteoblasts and adipocytes. From these results, we conclude that cells isolated from apical papilla tissues are the mesenchymal stem cells. These sources of stem cells have potential applications in clinical therapy and tissue engineering.

Keywords: Apical papilla, tissue engineering, enzyme digestion method.

Ngày nhận bài: 15-7-2013