

THU NHẬN KHUÔN NỀN NGOẠI BÀO TỪ NGUYÊN BÀO SỢI *IN VITRO*

Nguyễn Thị Thanh Giang, Tô Minh Quân, Phan Kim Ngọc, Trần Lê Bảo Hà

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 24 tháng 07 năm 2009)

TÓM TẮT: Khuôn nền ngoại bào (Extracellular matrix – ECM) đã được chứng minh có khả năng tăng cường sự bám dính, tăng sinh của tế bào cũng như tạo ổ tế gốc *invitro*. Chúng tôi đã tiến hành thu nhận ECM của nguyên bào sợi người nhằm phục vụ cho nhiều nghiên cứu, trong đó có kỹ nghệ mô. Nguyên bào sợi từ da quy đầu người được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS. Sau lần cấy chuyển thứ 3, các nguyên bào sợi được nhận diện bằng phương pháp nhuộm Trichrome và Vimentin. Sau đó, các nguyên bào sợi này được kích thích sản xuất ECM trong môi trường có bổ sung acid ascorbic 0,05%. Các thành phần tế bào được loại bỏ bằng Triton X-100, NH₄Cl, DNase. Sự hiện diện của protein nền được xác định bằng phương pháp nhuộm PAS. Kết quả, trong thành phần ngoại bào của nguyên bào sợi có collagen.

Từ khóa: Khuôn nền ngoại bào, nguyên bào sợi, tế bào gốc, giàn giáo, kỹ nghệ mô

1. GIỚI THIỆU

Khuôn nền ngoại bào (Extracellular matrix - ECM) là hỗn hợp các đại phân tử (polysaccharide, glycoprotein) do tế bào tiết ra, bao xung quanh tế bào [7]. ECM có vai trò quan trọng trong tạo hình cũng như trong duy trì cấu trúc và chức năng tế bào, mô, cơ quan. ECM tăng cường khả năng bám dính, tăng sinh, biệt hóa tế bào cũng như tạo ổ tế bào gốc *in vitro* [3], [8], [10]. Ngoài ra, ECM là một giàn giáo (scaffold) sinh học lý tưởng cho việc tái tạo mô và cơ quan [6], [11]. Việc tạo ra các mô, cơ quan nhân tạo có cấu trúc ba chiều thì nhất thiết phải có một giàn giáo có cấu trúc ba chiều. ECM đáp ứng được yêu cầu trên.

Trên thế giới có rất nhiều công trình nghiên cứu về khuôn nền ngoại bào. Tuy nhiên, ở Việt Nam đây là nghiên cứu tương đối mới, chưa từng được tiến hành. Vì thế, nghiên cứu được tiến hành dựa trên nhiều công trình nghiên cứu của thế giới về ECM. Năm 1998, Hynda K. Kleinman đã tạo màng nền từ khối u (EHS ở chuột), màng này còn được gọi là Matrigel, có tác dụng kích thích sự tăng sinh và biệt hóa của các tế bào biểu mô, tế bào nội mô thành mạch và các tế bào thần kinh. Năm 1999, Israel Vlodavsky và cộng sự đã tiến hành tạo ECM từ các tế bào nội mô giác mạc bò và tế bào nội bì PF-HR9 từ chuột. Theo đó, hoạt động của tế bào được điều hòa bởi giá thể mà tế bào sẽ bám lên, di cư và tăng sinh. Năm 2002, Edna Cukirman và cộng sự đã phát triển kỹ thuật thu nhận ECM từ nguyên bào sợi nuôi cấy *in vitro*, song song là việc thực hiện đối chứng giữa các ECM 2 chiều và 3 chiều thu nhận được. Từ đó cho thấy các ECM 3 chiều kích thích tế bào bám dính, tăng sinh nhiều hơn ECM 2 chiều cũng như đối chứng không có ECM. Năm 2005, Patrick Hohlfield thuộc Bệnh viện Đại học Lausanne (Thụy Sĩ) đã thử nghiệm tác dụng của tế bào da bào thai bò (vào tuần thứ 14) được nuôi cấy và ghép trên lớp nền collagen để làm miếng ghép trên những chỗ da bỏng. Kết quả, tế bào da của bào thai có thể giúp các mô tự hồi phục nhanh và không để lại sẹo, đặc biệt đối với bệnh nhân trẻ. Năm 2007, Cheng Zhe Jin, So Ra Park, Byung Hyune Choi và cs. đã nghiên cứu thu nhận ECM từ tế bào sụn bò để tái tạo sụn của chuột...[2], [4]

Chúng tôi đã tiến hành thu nhận ECM của nguyên bào sợi người nhằm phục vụ cho nhiều nghiên cứu, là tiền đề để hướng tới lĩnh vực kỹ nghệ mô.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu da quy đầu thu nhận từ phòng mổ Khoa Nam, Bệnh viện Bình Dân – Tp. HCM.

Giờ lấy mẫu: 10h – 11h

Thao tác trên mẫu từ 12h đến 16h cùng ngày.

Nghiên cứu được tiến hành trên 98 mẫu da. Có 7 mẫu da trong quá trình nuôi cấy bị nhiễm (do thao tác hoặc do mẫu mang sẵn mầm bệnh) và không sử dụng để nghiên cứu tiếp. Các mẫu da còn lại không bị nhiễm, tất cả được sử dụng để thu nguyên bào sợi tổng hợp ECM.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp thu nhận tế bào đơn từ mẫu mô [1]

Mẫu da thu nhận từ bệnh viện được chứa trong dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline - Gibco) – Kháng sinh 4000IU (penicillin – streptomycin – gentamicin) mang về phòng thí nghiệm.

Rửa mẫu 2 – 3 lần bằng dung dịch PBS – kháng sinh, loại bỏ mô nhầy, mô mỡ.

Ủ các mảnh mô với dispase II 0,5% (Gibco) ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ.

Dùng kẹp để tách bỏ lớp biểu bì. Rửa mẫu trung bì thu nhận được bằng PBS.

Cắt thành từng mảnh mô có diện tích 2 – 3 mm², cho vào bình Roux 25cm² (Nunc).

Cho môi trường DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% FBS (huyết thanh bào thai bò - Gibco) vào bình nuôi. Nuôi mảnh mô trong tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

Thay môi trường mỗi 4 ngày.

Nguyên bào sợi mọc lan ra từ mảnh mô và bám vào bề mặt đáy bình nuôi, khi tế bào hợp dòng khoảng 80% bề mặt nuôi cấy thì thu nhận tế bào đơn.

Thu tế bào đơn bằng cách cho 1ml Trypsin/EDTA (Gibco) 4°C vào các bình Roux sau khi loại bỏ các mảnh mô, ủ trong 4 phút ở nhiệt độ phòng. Khi nguyên bào sợi đã co tròn lại, thêm 1ml môi trường để bất hoạt trypsin, huyền phù nhẹ để thu tế bào.

Ly tâm 1500 vòng/phút trong 10 phút.

Thu phần lắng và huyền phù trong 200μl môi trường nuôi.

Xác định mật độ tế bào và tỷ lệ % tế bào sống bằng cách nhuộm Trypan blue 0,4% (Sigma).

Tế bào đơn thu nhận được ở P1 sẽ được cấy chuyển qua 2 lần, thu nhận tế bào ở P3 để sử dụng trong việc thu nhận ECM

Tế bào ở giai đoạn P3 được quan sát hình dạng, đặc điểm tế bào chất, nhân của tế bào thông qua nhuộm Trichrome và nhuộm Vimentin. Quá trình nhuộm và đọc kết quả được tiến hành tại khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh viện Chợ Rẫy, Tp.HCM và Bệnh viện Đại học Y được Tp.HCM.

2.2.2. Kích thích tế bào tổng hợp protein ngoại bào [5]

Nguyên bào sợi (P3) được nuôi cấy và kích thích tổng hợp protein ngoại bào bằng môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và acid ascorbic 50 μg/ml (Sigma). Nuôi cấy tế bào trong các đĩa nuôi mô 35 mm, mật độ tế bào nuôi cấy là 2x10⁵ tế bào/ ml (2 ml).

Thay môi trường mỗi 2 ngày, sau 10 – 14 ngày, thu nhận ECM khi tế bào đã tổng hợp và chắc chắn đưa protein khuôn nền ra khỏi tế bào.

2.2.3. Loại bỏ các thành phần tế bào thu nhận ECM [9]

Khi chắc chắn tế bào đã tổng hợp và đưa protein khuôn nền ra ngoài tế bào, tiến hành thu nhận khuôn nền sau khi đã loại bỏ các thành tế bào bằng dung dịch PBS chứa Triton X-100

0,05% và NH_4OH 20 mM. Ngoài ra, để loại bỏ các mảnh vụn DNA chúng tôi còn sử dụng DNase 10 U/ml.

2.2.4. Xác định protein chủ yếu của ECM

Thành phần protein của khuôn nền ngoại bào được xác định sau khi nhuộm mẫu bằng phương pháp nhuộm PAS. Qua trình nhuộm và đọc kết quả được tiến hành tại Khoa Giải Phẫu Bệnh, bệnh viện Chợ Rẫy, Tp.HCM.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

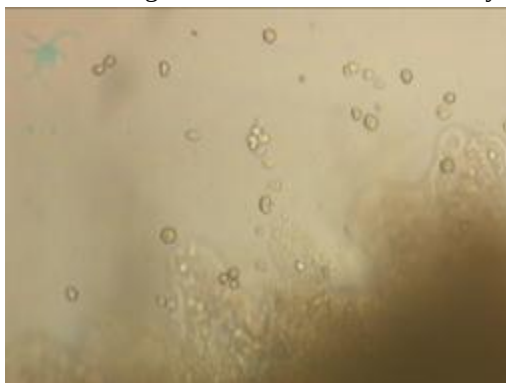
3.1. Kết quả nuôi mô trung bì sơ cấp

Trong 2 ngày đầu tiên nuôi cấy, có vài tế bào rời lan ra từ các mảnh mô.

Đến khoảng ngày thứ 7, thấy rõ các tế bào bám với nhiều hình dạng khác nhau (hình thoi, hình sao) và tế bào chất trải rộng. Đây là giai đoạn tế bào phân bào mạnh.

Sau thời gian thích ứng với môi trường nuôi cấy *in vitro*, các tế bào phân chia mạnh và bắt đầu hợp dòng khoảng từ ngày 12 – 14 sau nuôi cấy. Lúc này các tế bào trải dài, có dạng hình sợi, thuôn dài, tế bào trong suốt, ranh giới giữa các tế bào phân biệt rõ.

Sau 14 ngày nuôi cấy mảnh mô, đây là thời điểm thích hợp để thu nhận tế bào. Tế bào thu nhận được ở giai đoạn P1, tiến hành nuôi cấy thứ cấp để thu nhận tế bào ở giai đoạn P3.



Ngày 2



Ngày 7



Ngày 12



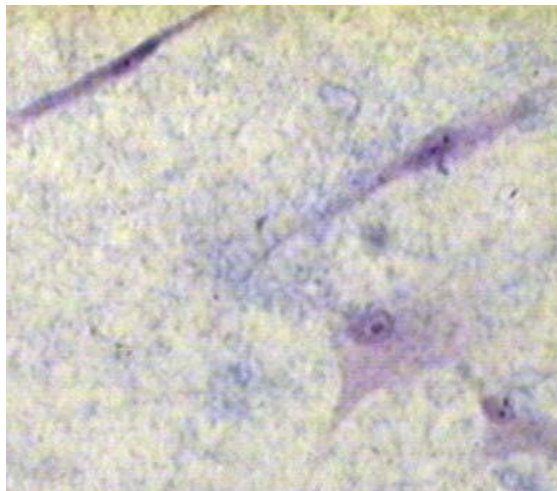
Ngày 14

Hình 1. Tế bào lan ra từ mảnh mô sau các ngày nuôi cấy

3.2.Xác định nguyên bào sợi bằng nhuộm Trichrome và nhuộm Vimentin

3.2.1.Nhuộm Trichrome

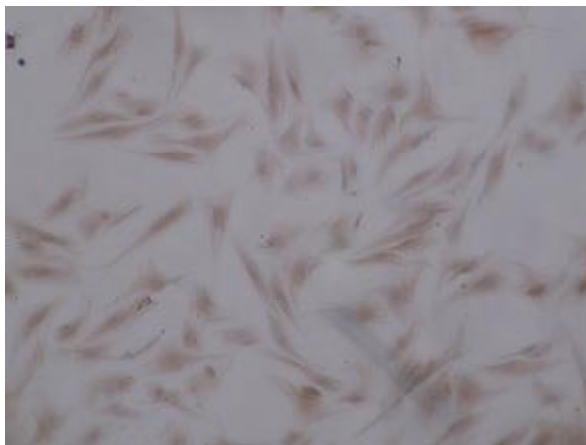
Sau khi nhuộm Trichrome, tế bào dạng hình sợi, hình sao, có hình dạng đặc trưng của nguyên bào sợi. Tế bào có chất nhân mịn, màng nhân rõ, đều và hạch nhân to, rõ điển hình. Bào tương có biên giới rõ và có sự tạo nhánh. Tỷ lệ nhân/ tế bào chất luôn nhỏ hơn 1. Tất cả các tế bào đều nguyên phân bình thường, không có tế bào bất thường. Qua kết quả sau khi nhuộm, khẳng định các tế bào thu nhận được là nguyên bào sợi, tế bào phân chia bình thường và không có lẫn tế bào khác.



Hình 2. Nguyên bào sợi sau khi nhuộm Trichrome

3.2.2.Nhuộm Vimentin

Sau khi nhuộm thấy tế bào dương tính với thuốc nhuộm Vimentin, tế bào bắt màu đậm, phân biệt rõ vùng nhân và tế bào chất.



Hình 3. Nguyên bào sợi sau khi nhuộm Vimentin

3.2.3. Nguyên bào sợi khi được kích thích tổng hợp protein ECM

Nguyên bào sợi (P3) được nuôi cấy trong môi trường nền (môi trường nuôi cấy có bổ sung acid ascorbic) để kích thích tế bào tổng hợp protein ngoại bào. Sau khoảng 9 ngày nuôi cấy trong môi trường nền, các tế bào gần như hợp dòng 100%, không nhận thấy ranh giới giữa các tế bào, trên bề mặt tế bào có các sợi nhỏ li ti, chúng hợp thành một màng sợi nhỏ.



Ngày 5



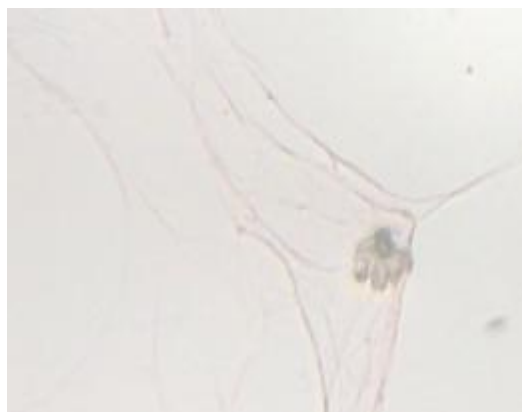
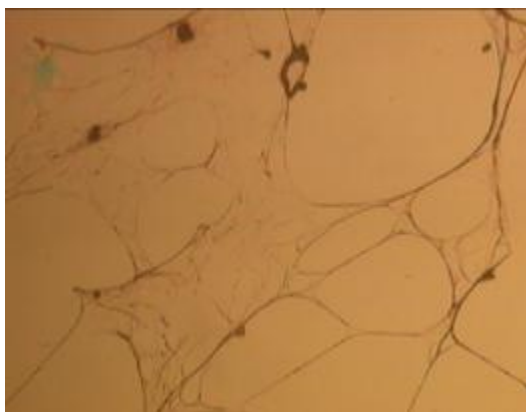
Ngày 12

Hình 4. Nguyên bào sợi sau các ngày nuôi cấy trong môi trường nền

3.3. Xác định thành phần ECM bằng nhuộm Hematoxylin – Eosin và nhuộm PAS

3.3.1. Nhuộm Hematoxylin – Eosin

Sau khi loại bỏ các thành phần tế bào, khuôn nền lúc này chỉ còn là màng lưới protein, không còn nhân và các thành phần bào quan khác. Màng sợi này gồm các sợi li ti đan xen vào nhau, các sợi bắt màu hồng nhạt. Sự đan xen của các sợi đã để lại các khoảng trống nhỏ trên màng, là điều kiện tốt để kích thích tế bào bám và tăng sinh trên khuôn nền.



Hình 5. ECM sau khi được nhuộm Hematoxylin – Eosin

3.3.2. Nhuộm PAS

ECM của nguyên bào sợi chủ yếu là collagen. Để xác định thành phần protein này của khuôn nền, chúng tôi tiến hành nhuộm PAS.

Sau khi nhuộm, khuôn nền bắt màu hồng nhạt của thuốc nhuộm, có thể khẳng định khuôn nền thu nhận được có thành phần chủ yếu là collagen.



Hình 6. Nguyên bào sợi sau khi được nhuộm PAS

4. KẾT LUẬN

Đã nuôi cấy và thu nhận thành công nguyên bào sợi từ mô da quy đầu người. Thu nhận được ECM sau khi loại các thành phần tế bào bằng dung dịch Triton X-100 0,05%, NH_4OH 20mM, DNase 10U/ml. Chứng minh được thành phần chủ yếu của khuôn nền ngoại bào là collagen.

Với kết quả thu được, nghiên cứu có hướng mở rộng hơn để có thể ứng dụng trong phòng thí nghiệm (tạo khuôn nền, kích thích tế bào bám dính và tăng sinh; thu nhận và tinh sạch các protein ngoại bào; nghiên cứu sự di cư của tế bào trong hệ thống giá thể 3 chiều) cũng như ứng dụng lâm sàng (sản xuất vật liệu ghép da có tế bào tự thân, tạo ra các giàn giáo cho tái tạo mô và cơ quan).

COLLECT EXTRACELLULAR MATRIX FROM *IN VITRO* FIBROBLAST

Nguyen Thi Thanh Giang, To Minh Quan, Phan Kim Ngoc, Tran Le Bao Ha
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: *Extracellular matrices (ECM) have been reported to enhance cell attachment and proliferation as well as to create stem cell niches invitro. We harvested ECM from human fibroblasts for a number of researches, including tissue engineering. Fibroblasts were isolated from human foreskins, cultured in DMEM/F12 containing 10% FBS and identified by Trichrome staining and immunohistochemistry for Vimentin. Then, fibroblasts*

were stimulated to synthesize ECM in medium supplemented 0.05% ascorbic acid. Cell constituents were removed by using Triton X-100, NH₄OH and DNase. ECM proteins were evaluated by PAS staining. Results showed that collagen is present in ECM.

Key words: Extracellular matrix, fibroblast, stem cell, scaffold, tissue engineering.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Akira Takashima, *Establishment of Fibroblast Cultures*, Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc., 2.1.1-2.1.12, (1998).
- [2]. Chaw K. C., Manimaran M., Francis E. H. Tay and S. Swaminathan, *Three-dimensional (3D) extra-cellular matrix coating of a microfluidic device*, Journal of physics: 747-751, (2006).
- [3]. Christine A. Cochrane, Claire Shearwood, Michael Walker, Phil Bowler, Derek C. Knottenbelt, *The application of a fibroblast gel contraction model to assess the cytotoxicity of topical antimicrobial agents*, Wounds 15: 8, (2003).
- [4]. Dehong zeng, Aldo Ferrari, Jens Ulmer, Alexey Veligodskiy, Peter Fischer, Joachim Spatz, Yiannis Ventikos, Dimos; Poulikakos, Ruth Kroschewski, *3D Modeling of Mechanical Forces in the Extra-Cellular Matrix during Epithelial Luman Formation*, Biophys J BioFAST, (2006).
- [5]. Edna Cukierman, *Preparation of Extracellular Matrices*, Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc., 10.9.1-10.9.15, (2002).
- [6]. Francesco Rosso, Antonio Giordano, Manlio Barbarisi, Alfonso Barbarisi, *From cell-ECM interactions to tissue engineering*, J. Cell Physiol. 199: 174 – 180, (2003).
- [7]. John R. W. Masters, *Animal Cell Culture* (third edition), Oxford University Press Inc., New York, (2000).
- [8]. Outi Hovatta, Milla Mikkola, Karin Gertow, Anne-Marie Strömberg, Julius Hreinsson, Elisabeth Blennow, Michael Andäng and Lars Ährlund-Richter, *A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells*, Human Reproduction 18: 7, (2003).
- [9]. Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaroa, Stephen F. Badylaka, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials 27: 3675–3683, (2006).
- [10]. Tinois E., Faure M., Chatelain P., Vallier P., Schmitt D, *Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix*, Arch Dermatol Res 279: 241-246, (1987).
- [11]. Stephen F. Badylak, *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*, Biomaterials 28: 3587-3593, (2007).