

**TẠO TẤM TẾ BÀO SỪNG TỪ TẾ BÀO MÁU CUỐNG RÓN TRÊN
GIÁ THỂ MÀNG ỒI**

Hồ Điền^{1*}, Trần Thị Thanh Thủy², Lương Thị Mỹ Linh¹, Trần Công Toại²

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch

*Email: hdiem@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 31/10/2022

Ngày phản biện: 11/5/2023

Ngày duyệt đăng: 07/7/2023

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Mong muốn tạo ra một sản phẩm nguồn gốc sinh học đáp ứng hiệu quả trong việc điều trị bỏng và các tổn thương mất da, do đó nghiên cứu “Tạo tấm tế bào sừng từ tế bào máu cuống rốn trên giá thể màng ối” được thực hiện. **Mục tiêu nghiên cứu:** Tạo tấm tế bào sừng nhiều lớp trên giá thể màng ối. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm mô tả. Đối tượng nghiên cứu là máu cuống rốn và màng ối từ bánh nhau của trẻ mới sinh. Thu nhận tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn, định danh, nuôi cấy tăng sinh tế bào. Thu nhận, xử lý màng ối thành giá thể mang tế bào. Chuyển tế bào gốc trung mô lên màng ối và tiến hành biệt hóa thành tế bào sừng khi mật độ tế bào đạt 60-80% diện tích. Quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược ghi nhận sự thay đổi hình dạng tế bào. Sự biến đổi hình dạng tế bào hay sự biệt hóa đạt 80% tiến hành quá trình tạo tầng bằng phương pháp airlifting. Quá trình được thực hiện trong 7 ngày. Sản phẩm được đánh giá: hình thái, sự biểu hiện các marker P63, CK 5/6 và sự liên kết tế bào với tế bào, tế bào với giá thể qua phương pháp chụp TEM. **Kết quả:** Thu nhận đúng tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn. Thu nhận, xử lý thành công màng ối thành giá thể mang tế bào. Tạo được tấm tế bào sừng có 3-5 lớp tế bào. **Kết luận:** Tạo thành công tấm tế bào sừng có nhiều lớp tế bào trên giá thể màng ối.

Từ khóa: Tế bào gốc trung mô, máu cuống rốn, tế bào sừng, màng ối.

ABSTRACT

**CREATE KERATINOCYTES PLATE FROM CORD BLOOD
STEM CELLS ON THE SUBSTRATE AMNION**

Ho Dien^{1*}, Tran Thi Thanh Thuy², Luong Thi My Linh¹, Tran Cong Toai²

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Pham Ngoc Thach University of Medicine

Background: Products of biological origin effective response in the treatment of burns and skin lesions loss is a matter of urgency. we proceed the study: “Create keratinocytes plate from cord blood stem cells on the substrate amnion”. **Objectives:** Create keratinocytes plate with multiple layers on the substrate amnion. **Materials and method:** The study was designed experimental description. Subjects of study were cord blood and amniotic membranes from the placenta of a full-term newborn. We collected mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, identify and cultivate cell proliferation. Receiving and processing of the amniotic membrane into a carrier cell. Mesenchymal stem cell transplantation from umbilical cord blood to amnion. When the cell density reaches 60-80% of the area, we performed differentiation of mesenchymal stem cells into keratinocytes. Observe under the reverse microscope to record the change in cell shape. Cell shape change reached 80%. We conducted the cascading process by airlifting method. The airlifting process was done in 7 days. Products evaluated: morphology (HE), expression of P63, CK 5/6, and TEM. **Result:** Successfully obtained mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Receive and treat the membranes successfully into cell-bearing media. Successfully create keratinocytes plate

with 3-5 layers of cells. **Conclusion:** Successful generation of keratinocytes plate with multiple layers on the substrate amnion.

Keywords: Mesenchymal stem cell, umbilical cord blood, keratinocyte, amnion.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Da bao phủ 1,5-2m² diện tích bề mặt và được xem là hệ miễn dịch không đặt hiệu của cơ thể con người. Bỏng là nguyên nhân đứng thứ năm về số trường hợp mắc nhưng là nhóm nguyên nhân dẫn đầu về tử vong và để lại di chứng trong các nhóm nguyên nhân gây ra tai nạn thương tích. Trong điều trị bỏng, ghép da tự thân là “tiêu chuẩn vàng” để che phủ và tái tạo bề mặt vết thương. Tuy nhiên, phương pháp này không những gây thêm thương tổn cho bệnh nhân mà còn không thể áp dụng đối với các loại bỏng hoặc tổn thương mất da diện rộng. Tế bào gốc đã tạo ra một cuộc cách mạng lớn trong lĩnh vực y sinh học nói chung và y học nói riêng. Tế bào gốc trung mô thu nhận từ máu cuống rốn đang được các nhà nghiên cứu quan tâm vì một số đặc tính đặc biệt như thu nhận máu cuống rốn dễ dàng, không gây đau đớn, không ảnh hưởng đến mẹ và bé; khả năng gây đáp ứng miễn dịch thấp và ít gây ra phản ứng đào thải miễn dịch ghép ở người nhận; trong máu cuống rốn có những tế bào có khả năng biệt hoá thành tế bào xương, sụn, mỡ, gan, thận kinh, cơ và tế bào sừng [1]. Bên cạnh đó, màng ối người được xem như là một loại màng sinh học điều trị hiệu quả vì chúng có khả năng kháng viêm, kháng khuẩn và khả năng gây ra các đáp ứng miễn dịch khi ghép là rất thấp [2]. Mong muốn tạo ra một sản phẩm nguồn gốc sinh học đáp ứng hiệu quả trong việc điều trị bỏng, tổn thương mất da. Chúng tôi thực hiện đề tài: “Tạo tẩm tế bào sừng từ máu cuống rốn trên giá thể màng ối”. Mục tiêu tổng quát của đề tài là tạo được tẩm tế bào sừng có nhiều lớp tế bào trên giá thể màng ối với mục tiêu cụ thể: Thu nhận tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người; Tạo giá thể collagen dùng để mang tế bào từ màng ối người; Tạo tẩm tế bào sừng có nhiều lớp tế bào từ sự kết hợp giữa tế bào gốc trung mô và màng collagen.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Máu cuống rốn và màng ối từ bánh nhau của trẻ mới sinh đủ tháng bằng phương pháp sinh mổ tại Bệnh viện Trung Vương, Thành phố Hồ Chí Minh.

- **Tiêu chuẩn chọn mẫu:** Thai đủ tháng; Sản phụ có xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV, VDRL và không mắc lao, ung thư, bệnh tự miễn, bệnh tâm thần; Thu nhận trong điều kiện phẫu thuật sau mổ bắt con; Sản phụ không bị các tai biến trong khi chuyển dạ, không bị nhiễm trùng ối và không bị vỡ ối sớm.

- **Tiêu chuẩn loại trừ:** Sản phụ có 1 trong các xét nghiệm dương tính với HIV, HBV, HCV, VDRL hoặc bị mắc bệnh lao, bệnh ung thư, bệnh tự miễn, bệnh tâm thần, hay xảy ra các tai biến trong lúc chuyển dạ; Thai nhi bị nhiễm trùng bào thai hoặc bị dị tật bẩm sinh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** Thực nghiệm mô tả.

- **Mẫu và cỡ mẫu:** Mẫu được chọn thuận tiện ngẫu nhiên. Mỗi quy trình lập lại tối thiểu 3 lần.

- **Nội dung nghiên cứu:**

+ Thu nhận máu cuống rốn: Máu cuống rốn được lấy bằng ống tiêm 50 ml và kim tiêm 18G từ tĩnh mạch rốn cho vào ống ly tâm 50 mL vô trùng đã tráng heparin (5000 IU/mL).

+ Phân lập tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn: Dựa trên quy trình đã công bố của Bộ môn Mô Phôi – Di Truyền, Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch [3].

+ Nuôi sơ cấp và cấy chuyển tăng sinh tế bào gốc trung mô: Tế bào sau khi phân lập được nuôi trong môi trường DMEM/F12, 10% FBS, nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Khi tế bào phát triển đạt 70-80% diện tích bề mặt đáy chai nuôi thì tiến hành cấy chuyển mẫu sang chai nuôi mới.

+ Định danh tế bào gốc trung mô: Dựa vào tiêu chuẩn định danh tế bào gốc trung mô của Hiệp hội Tế bào quốc tế: Khả năng bám dính, khả năng biệt hóa (biệt hóa thành tế bào mỡ và nguyên bào xương) và biểu hiện marker bề mặt (sử dụng kỹ thuật dòng chảy xác định các marker bắt buộc dương tính trên 95% là CD70, CD90, CD105).

+ Thu nhận và xử lý màng ối thành giá thể mang tế bào: Thu nhận màng ối bằng phương pháp cơ học, lắc trong dung dịch PBS 2 giờ. Ngâm màng ối trong hỗn hợp Trypsin 0,25% - EDTA 0,02% trong 30 phút ở 37°C và lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Cạo bỏ nhẹ nhàng lớp tế bào biểu mô màng ối và rửa lại bằng dung dịch PBS.

+ Tạo tấm tế bào sừng trên giá thể mang tế bào: Tế bào phát triển đạt 60-80% diện tích giá thể thì tiến hành biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào sừng theo quy trình đã công bố của Bộ môn Mô Phôi – Di Truyền, Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch [3].

+ Tạo lớp cho tấm tế bào sừng bằng phương pháp airlifting: Tế bào đã biệt hóa khoảng 80% diện tích đĩa nuôi thì tiến hành airlifting. Hút hết môi trường biệt hóa cả bên trong và bên ngoài đĩa nuôi. Thay môi trường biệt hóa PCM : K-SFM với tỉ lệ 1:9 mỗi ngày bên ngoài đĩa nuôi và kéo dài 7 ngày.

+ Đánh giá tấm tế bào sừng: Mẫu được đánh giá dựa vào đặc điểm hình thái (nhuộm HE đánh giá sự thay đổi hình dạng tế bào vào ngày thứ 14), hóa mô miễn dịch (kiểm tra dấu ấn tế bào sừng bằng marker P63 và CK 5/6) và chụp TEM (kiểm tra sự liên kết giữa tế bào và tế bào, tế bào và giá thể).

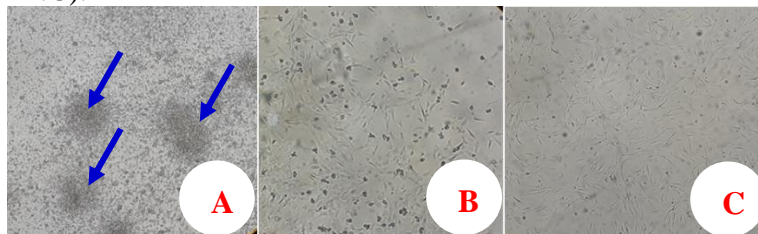
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn

Trong 23 mẫu máu cuống rốn có 6 mẫu không phân lập được tế bào gốc trung mô. Tỉ lệ phân lập thành công tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn: Nhóm máu cuống rốn có thể tích ban đầu < 30 mL là 0%, nhóm có thể tích máu cuống rốn ban đầu từ 30 mL đến dưới 50 mL là 77,8% và nhóm lớn hơn hoặc bằng 50 mL là 90,9%.

3.2. Nuôi sơ cấp và cấy chuyển tăng sinh tế bào

Sau bốn ngày nuôi sơ cấp, các tế bào bám đáy, tạo cụm và phát triển lan ra xung quanh (Hình 1.A). Tế bào hình thoi có nhánh đặc trưng của tế bào gốc trung mô. Các tế bào MSC phân nhánh, liên kết với nhau và phát triển lan rộng khắp bề mặt đáy chai nuôi trong những ngày kế tiếp (Hình 1.B). Kết quả sau khi cấy chuyển ghi nhận tế bào thuần nhất về hình dạng (Hình 1.C).



Hình 1. Kết quả nuôi sơ cấp và cấy chuyển tế bào gốc trung mô (KHV đảo ngược; 10X)

Nhận xét: (A) Các tế bào tạo cụm (mũi tên xanh). (B) Các tế bào phân nhánh có hướng liên kết tạo thành mạng lưới. (C) Tế bào phát triển sau 2 ngày cấy chuyên. Hình dạng tế bào thuần nhất.

3.3. Định danh tế bào gốc trung mô

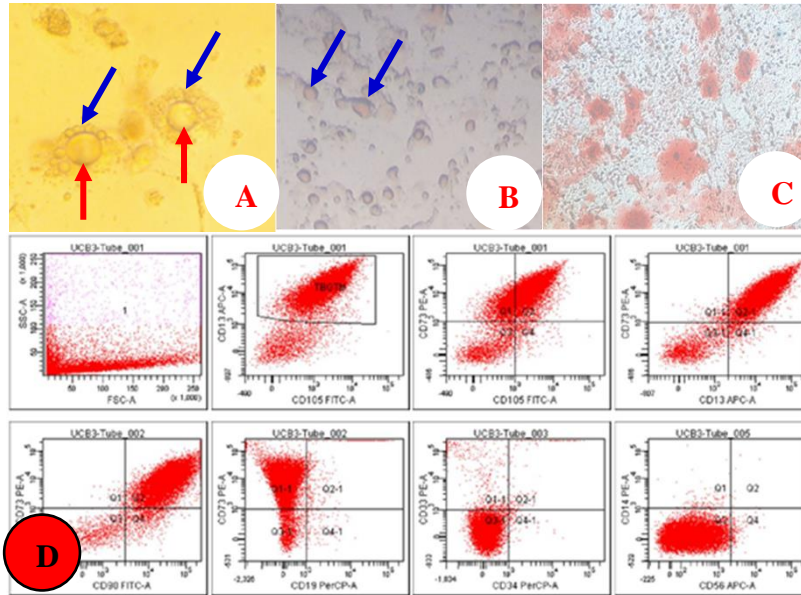
- **Khả năng bám dính:** Các MSC bám trên bề mặt đáy chai nuôi, tăng sinh và không bong tróc trong quá trình thay môi trường nuôi.

- **Khả năng biệt hóa:**

+ Biệt hóa thành tế bào mỡ: Chúng tôi sử dụng thể hệ P3 để biệt hóa thành tế bào mỡ. Các MSC biến chuyển hình dạng và tích trữ các hạt lipid trong bào tương. Các hạt lipid có hiện tượng tập trung lại thành một không bào lớn chứa lipid (Hình 2.A). Nhuộm Oil – red O ngày thứ 7 của quá trình biệt hóa MSC thành tế bào mỡ, các hạt lipid bắt màu đỏ cam (Hình 2.B).

+ Biệt hóa thành nguyên bào xương: Sau khi nuôi đến ngày thứ 14, nhuộm mẫu với alizarin red để xác định khả năng tạo chất nền xương (Hình 2.C).

- **Kết quả marker bề mặt:** Mẫu nghiên cứu biểu hiện các marker CD105, CD73, CD90 ở MSC phù hợp với tiêu chuẩn của Hiệp hội liệu pháp tế bào quốc tế (Hình 2.D)

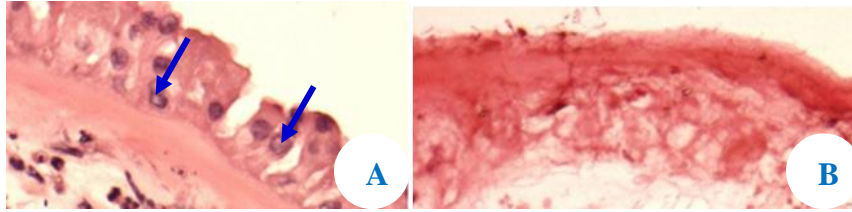


Hình 2. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô (KHV đảo ngược; 20X) và chạy flow cytometry

Nhận xét: (A) Các hạt lipid tích tụ (mũi tên xanh) và tập trung thành một hạt lipid lớn ở trung tâm (mũi tên đỏ). (B) Các hạt lipid bắt màu đỏ cam của thuốc nhuộm (mũi tên xanh). (C) Thuốc nhuộm kết hợp canxi trong chất nền do nguyên bào xương tiết ra cho màu đỏ đặc trưng. (D) Kết quả phân tích ghi nhận một quần thể (#96%) được cho là tế bào gốc trung mô có kiểu hình: CD73+ CD90+ CD105+.

3.4. Thu nhận và xử lý màng ối thành màng collagen nuôi tế bào

Kết quả nhuộm HE giữa màng ối chưa qua xử lý Trypsin – EDTA (Hình 3.A) và màng ối đã qua xử lý (Hình 3.B). Lốp tế bào biểu mô màng ối bị bóc tách toàn bộ trong khi cấu trúc dưới biểu mô còn nguyên vẹn sau xử lý.

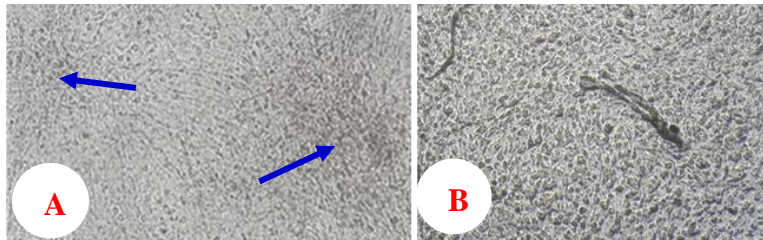


Hình 3. Kết quả nhuộm HE màng ối (KHV quang học; 40X)

Nhận xét: (A) Màng ối chưa xử lý, tế bào biểu mô chưa bị bóc tách (mũi tên xanh). (B) Màng ối sau khi xử lý đã loại bỏ hoàn toàn tế bào biểu mô.

3.5. Biệt hóa tế bào sừng trên giá thể collagen

Đặc điểm phát triển của các MSC trên giá thể là tạo 1 nốt trung tâm và dần lan ra xung quanh. MSC sau 6 ngày biệt hóa, hình dạng tế bào biến đổi sang hình đa diện, tạo từng cụm và dần phát ra xung quanh (Hình 4.A). Sau 12 ngày biệt hóa, các tế bào biến đổi hình dạng thành hình đa diện và phát triển lan rộng khắp giá thể nuôi tế bào (Hình 4.B).



Hình 4. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào sừng (KHV đảo ngược; 10X)

Nhận xét: (A) Các cụm tế bào trung mô bắt đầu biến đổi hình dạng (mũi tên xanh). (B) Tế bào biến đổi sang hình dạng đa diện.

3.6. Tạo và đánh giá tấm tế bào sừng nhiều lớp tế bào trên giá thể collagen

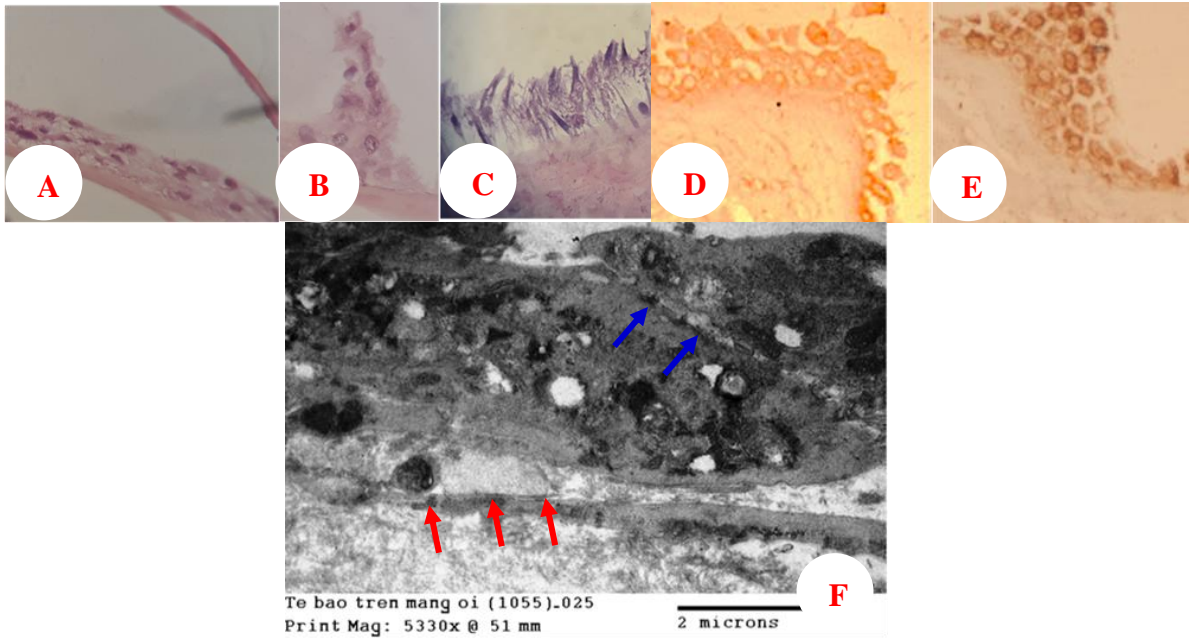
Chúng tôi tiến hành nâng tầng tế bào bằng phương pháp airlifting. Sau 7 ngày airlifting tiến hành thu mẫu và đánh giá kết quả.

- **Kết quả nhuộm HE:** Các tế bào có khả năng tạo lớp, nhân tế bào hình tròn hạt nhân rõ điển hình (Hình 5.A và Hình 5.B). Mẫu chứng âm, các MSC sau khi airlifting vẫn có hình thoi và tạo lớp không rõ (Hình 5.C).

- **Kết quả nhuộm P63:** P63 cho kết quả dương tính với mẫu chứng dương là mẫu mô tuyến vú (Hình 5.D).

- **Kết quả nhuộm CK 5/6:** CK 5/6 cho kết quả dương tính với mẫu chứng dương là mẫu da người (Hình 5.E).

- **Kết quả chụp TEM:** Nhóm nghiên cứu chúng tôi ghi nhận có các liên kết giữa tấm tế bào và màng collagen; giữa các tế bào liền kề với nhau (Hình 5.F).



Hình 5. Kết quả nhuộm HE, hóa mô miễn dịch (KHV quang học; 40X) và chụp TEM của tằm tế bào sừng sau tạo lớp

Nhận xét: (A) Kết quả nâng tầng ở ngày thứ 7. (B) Kết quả nâng tầng ở ngày thứ 14. (C) Mẫu chứng âm tế bào gốc trung mô không biệt hóa. Các tế bào gốc trung mô không tạo được tầng và hình ảnh giống tế bào sừng. (D) Kết quả nhuộm P63 dương tính. (E) Kết quả nhuộm CK 5/6. (F) Kết quả ghi nhận có sự xuất hiện các liên kết giữa tế bào và tế bào (mũi tên xanh); giữa tế bào và giá thể (mũi tên đỏ).

IV. BÀN LUẬN

4.1. Thu nhận tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn

Thu nhận thành công tế bào gốc trung mô theo tiêu chuẩn của Hiệp hội liệu pháp tế bào quốc tế [4]. Kết quả của nhóm nghiên cứu cũng tương đồng với các tác giả khác như: Nguyễn Minh Phương [5], Fu Guo Chen và cộng sự [6], Tatiana Taís Sibov và cộng sự [7]. Tuy nhiên vẫn có 6 mẫu không phân lập được tế bào gốc trung mô do có hiện tượng tán huyết trong quá trình thu nhận và xử lý ban đầu. Tỷ lệ phân lập thành công tế bào cho thấy thể tích máu cuống rốn ban đầu thu nhận càng lớn thì tỷ lệ phân lập thành công tế bào gốc trung mô càng cao.

4.2. Thu nhận và xử lý màng ối thành giá thể mang tế bào

Kết quả của nhóm nghiên cứu phù hợp với tác giả Trần Lê Bảo Hà [8]. Khả năng thu nhận màng ối, xử lý tế bào trên màng có khả thi với tỷ lệ đạt 100% theo quy trình nhóm nghiên cứu.

4.3. Tạo tằm tế bào sừng nhiều lớp tế bào trên giá thể collagen phương pháp airlifting

Kết quả của nhóm nghiên cứu tạo được tằm tế bào có từ 3-5 lớp trên giá thể.

- Về mặt hình thái, kết quả của nhóm nghiên cứu phù hợp với tác giả Lujun Yang [9].
- Về biểu hiện dấu ấn marker, nhóm nghiên cứu đã tạo được dòng tế bào biểu mô với dấu ấn P63 dương tính, biểu hiện cho tế bào lớp đáy của biểu mô. Bên cạnh đó, CK 5/6

duy tính là dấu chỉ điểm cho bộ khung ở tế bào sừng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Trần Công Toại [10].

- Về hình thức liên kết tế bào, các liên kết thiết yếu để tạo độ bền chắc cho tấm liên kết tế bào. Đó là các thể liên kết điển hình giữa tế bào và tế bào hay thể bán liên kết giữa tế bào và giá thể nuôi.

V. KẾT LUẬN

Tế bào gốc trung mô phân lập từ máu cuống rốn có khả năng biệt hóa và tạo tấm tế bào sừng có nhiều lớp tế bào trên giá thể tạo từ màng ối. Với kết quả này, nhóm nghiên cứu hi vọng sẽ có công trình nghiên cứu tiếp theo trên mô hình động vật thí nghiệm nhằm tiến thêm một bước trong khả năng ứng dụng điều trị lâm sàng cho các trường hợp bỏng hoặc tổn thương mất da.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim S. W., Han H., Chae G. T., Lee S. H., Bo S., et al. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells*, 2006. 24(6), 1620-1626. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0365>.
2. Mamede A. C., Carvalho M. J., Abrantes A. M., Laranjo M., Maia, C. J., Botelho M. F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and Tissue Research*. 2012. 349, 447-458. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-012-1424-6>
3. Trần Công Toại, Nguyễn Quang Hưng, Nguyễn Hoàng Viễn Thanh. Nghiên cứu quy trình phân lập tế bào gốc máu cuống rốn ứng dụng trong nuôi cấy và biệt hóa. *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*. 2008. 12(1), 36-42.
4. Gabrielis K. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblast, *Acta medica lituanica*. 2012. 19, 75-79. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v19i2.2313>.
5. Nguyễn Minh Phương. Phân lập, nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. 2016.
6. Chen, F. G., et al. Clonal analysis of nestin+ vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *Journal of Cell Science*. 2007. 120, 2875-2883. <https://doi.org/10.1242/jcs.03478>
7. Sibov T. T., Severino P., Marti L. C., Pavon L. F., Oliveira D. M., et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*. 2012. 64, 511-521. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10616-012-9428-3>
8. Trần Lê Bảo Hà. Nghiên cứu xác lập quy trình nuôi cấy tế bào sừng người trên màng collagen từ màng ối người hướng tới ứng dụng ghép tự thân điều trị các tổn thương mất da. Luận án tiến sĩ sinh học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh. 2010.
9. Yang L., Shirakata Y., Shudou M., Dai X., Tokumaru S., et al. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res*. 2006. 326, 69-77. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-006-0208-2>
10. Tran C.T., Huynh D.T., Gargiulo C., Nguyen P.T., Tran T.T., et al. *In vitro* culture of Keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonese culture. *Cell Tissue Bank*. 2011. 12(2), 125-33. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10561-010-9174-8>