

## NUÔI CÂY TẾ BÀO GỐC TỪ TỤY RĂNG NGƯỜI

Đoàn Nguyên Vũ<sup>1</sup>, Phạm Trần Hương Trinh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Nhật Uyên<sup>1</sup>, Tô Minh Quân<sup>1</sup>, Phan Kim Ngọc<sup>1</sup>, Trần Lê Bảo Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu<sup>1</sup>, Đặng Vũ Ngọc Mai<sup>2</sup>, Hoàng Đạo Bảo Trâm<sup>3</sup>, Hoàng Tử Hùng<sup>1</sup>, Trịnh Thị Trúc Ly<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Đại học Y Dược, thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Tế bào tủy răng là nguyên liệu quan trọng cho những nghiên cứu trong lĩnh vực tái tạo răng. Trong những năm gần đây, đã có rất nhiều công trình trên thế giới tiến hành nghiên cứu phân lập và nuôi cấy tế bào gốc tủy răng nhằm tái tạo tủy răng trong chữa trị lâm sàng. Đồng thời, tế bào gốc tủy răng là nguồn tế bào gốc tự thân đa tiềm năng, có thể ứng dụng nhằm tái tạo những mô hay cơ quan khác. Tuy nhiên, ở nước ta vấn đề này còn mới mẻ và vẫn chưa có đề tài nào liên quan đến nghiên cứu về tế bào gốc tủy răng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành thu nhận và khử trùng mô tủy răng người bằng Povidine Iodine 10% (Betadine). Mô tủy sau khi tách ra khỏi răng sẽ được đánh giá bằng phương pháp nhuộm hematoxylin và eosin. Sau đó, tế bào tủy răng được phân lập và nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô trong môi trường DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS. Sự hiện diện của tế bào gốc trong hỗn hợp tế bào sau nuôi cấy được xác định bằng phương pháp RT-PCR với hai marker *Oct4* và *CD146*. Kết quả cho thấy, chúng tôi đã thu nhận và nuôi cấy thành công tế bào từ mảnh mô tủy răng người. Tế bào sau nuôi cấy biểu hiện hai marker tế bào gốc là *Oct4* và *CD146*.

**Từ khóa:** nhuộm hematoxylin và eosin, nuôi cấy sơ cấp, RT-PCR, tế bào gốc, tủy răng người

### MỞ ĐẦU

Tế bào gốc là một dạng tế bào đặc biệt, được tìm thấy ở hầu hết các mô và tồn tại trong suốt đời sống của động vật đa bào. Chức năng chính của chúng là duy trì trạng thái ổn định cho tế bào (gọi là nội cân bằng) và thay thế các tế bào chết do tổn thương hay bệnh tật. Để hoàn thành các nhiệm vụ ấy, tế bào gốc phải có hai đặc tính như sau: (i) Có khả năng phân chia vượt qua giới hạn Hayflick (có nghĩa là dòng tế bào này có thể phân chia trên 50 lần); (ii) Có khả năng biệt hóa thành những dạng tế bào của cơ thể trưởng thành.

Các tế bào gốc trung mô rất hiếm, giảm theo tuổi, hiện diện trong tủy xương với tần số là  $0,1 - 5/10^5$  tế bào ở động vật gặm nhấm và  $1 - 20/10^5$  ở người (Short *et al.*, 2003). Ngoài ra, tế bào gốc trung mô cũng có thể được tìm thấy trong mô liên kết, mô mỡ, mô gan và cơ. Tế bào gốc trung mô là những tế bào gốc đa tiềm năng nên chúng có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau khi gặp điều kiện thích hợp như biệt hóa thành tế bào xương, sụn, mỡ, gân, thần kinh...

Trên thế giới, tế bào tủy răng đã được nuôi cấy thành công chỉ trong vài năm gần đây và khả năng ứng dụng rất cao. Đã có rất nhiều nghiên cứu về việc

phân lập tế bào tủy răng của nhiều loài khác nhau và chứng minh rằng chúng có tỉ lệ tăng sinh cao; đồng thời có khả năng biệt hóa thành dạng tế bào khoáng hóa trong môi trường thích hợp (Nakashima, 1991; Nakashima *et al.*, 1994; Kettunen *et al.*, 1998; Buchaille *et al.*, 2000; Yokose *et al.*, 2000). Gần đây, Gronthos và đồng tác giả (2000, 2002) đã cố gắng nghiên cứu đặc điểm độc đáo của quần thể tế bào gốc tủy răng người. Những tế bào này có khả năng tự làm mới và biệt hóa thành nguyên bào ngà. Miura và đồng tác giả (2003) cũng tách được quần thể tế bào gốc trung mô từ răng sữa của trẻ em. Các tế bào gốc răng được xác định là có biểu hiện một số marker của tế bào gốc như *STRO-1* (Sbi, Gronthos, 2003; Shi *et al.*, 2005), *CD146* (Gronthos *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2004) và *Oct4* (Huang *et al.*, 2008).

Tuy nhiên, nước ta vẫn chưa có đề tài nào liên quan đến nghiên cứu tế bào gốc tủy răng. Do đó, chúng tôi tiến hành công trình này như bước khởi đầu đặt nền móng cho những nghiên cứu sau này trong lĩnh vực chữa trị bệnh răng.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu nghiên cứu

Răng cối nhỏ và răng khôn của 10 người tình

nguyên được thu từ Khoa Răng Hàm Mặt, Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh và Khoa Nội Nha, Bệnh viện Răng Hàm Mặt Thành phố Hồ Chí Minh. Răng phải còn nguyên vẹn và không bị sâu thối tủy.

### Phương pháp thu nhận và khử trùng mô tủy răng

Sau khi nhổ ra, mẫu răng được loại bỏ tối đa các phần mô mềm như bao răng, dây chằng nha chu. Các mẫu răng sẽ được bảo quản trong lọ có chứa dung dịch DMEM (Sigma) bổ sung 300 U/ml penicillin, 300 µg/ml streptomycin, 0,75 µg/ml amphotericin B (fungizone<sup>®</sup>). Sau đó, khử trùng bằng Povidone Iodine 10% (Betadine). Tủy răng được lấy ra trong điều kiện vô khuẩn và sang chần tối thiểu.

### Phương pháp phân lập và nuôi cấy tế bào tủy răng

Mẫu tủy được cắt thành những mảnh nhỏ (2x2x1 mm). Những mảnh nhỏ này sẽ được chuyển vào đĩa 35 mm (Nunc). Thêm 2 ml môi trường DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% FBS (huyết thanh thai bò-Gibco), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Nuôi mảnh mô trong tủ nuôi ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, thay môi trường 2 ngày/lần.

### Phương pháp cấy chuyên

Khi tế bào hợp dòng khoảng 80% bề mặt đĩa nuôi thì tiến hành thu nhận tế bào đơn. Tế bào đơn được thu nhận bằng Trypsin/EDTA (Gibco). Sau đó, đem ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy ra một ít dịch huyền phù tế bào để đem đi xác định mật độ tế bào bằng cách nhuộm trypan blue. Chuyển toàn bộ dung dịch tế bào vào bình Roux 25 cm<sup>2</sup> (Nunc), bổ sung 4 ml môi trường và tiếp tục nuôi cấy. Tế bào đơn thu nhận ở P4 sẽ được sử dụng cho phân tích RT-PCR.

### Phương pháp nhuộm hematoxylin và eosin

Mô tủy sau khi được lấy ra khỏi răng sẽ được cố định trong dung dịch formalin 4% đệm phosphate. Sau đó, mẫu được chuyển đến Bộ môn xét nghiệm trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh để nhuộm hematoxylin và eosin.

### Phương pháp RT-PCR

Sự hiện diện của quần thể tế bào gốc tủy răng người được đánh giá thông qua sự biểu hiện của hai marker là *Oc14* và *CD146*. RNA được tách từ mẫu mô tủy răng tươi (mẫu đối chứng) và từ 3x10<sup>5</sup> tế bào tủy răng nuôi cấy ở lần cấy chuyển thứ tư (P4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất Trizol (Sigma). Nghiên

cứu này sử dụng bộ kit RT-PCR one tube Access Quick của Promega. Trong tất cả các phản ứng sử dụng *GAPDH* như là một đối chứng nội.

Trình tự của các primer: *GAPDH* (5'- CAT GAC CTC AAC TAC ATG G -3' (sense), 5'- CAC ACC TAT CAC AAA CAC GG -3' (antisense)), 300bp; *Oc14* (5'- GAC AAC AAT GAG AAC CTT CAG GAG A -3' (sense), 5'- CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA -3' (antisense)), 297 bp; *CD146* (5'- AAG GCA ACC TCA GCC ATG TCG -3' (sense), 5'- CTC GAC TCC ACA GTC TGG GAC -3' (antisense)), 435 bp (Mei-Hui Tai *et al.*, 2004; Mihaela Crisan *et al.*, 2008).

Phản ứng RT-PCR được tiến hành theo chu trình sau: 95°C trong 45 giây, 58°C trong 45 giây và 72°C trong 45 giây với 35 chu kỳ. Sau thời kì biến tính 95°C trong 2 phút. Sau đó, tiến hành ủ thêm 10 phút ở 72°C và giữ lạnh ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.

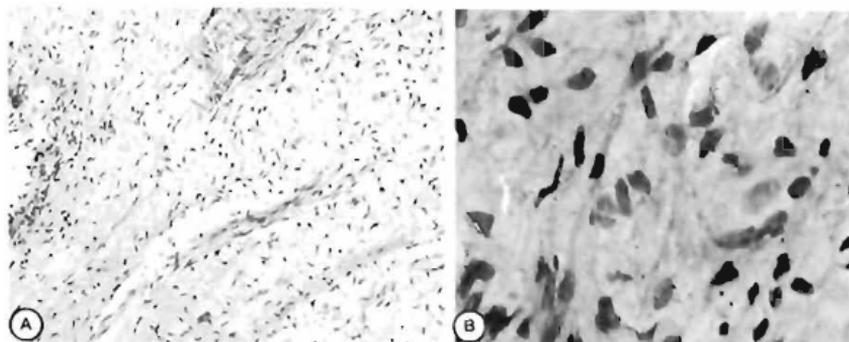
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nhuộm hematoxylin và eosin mô tủy răng

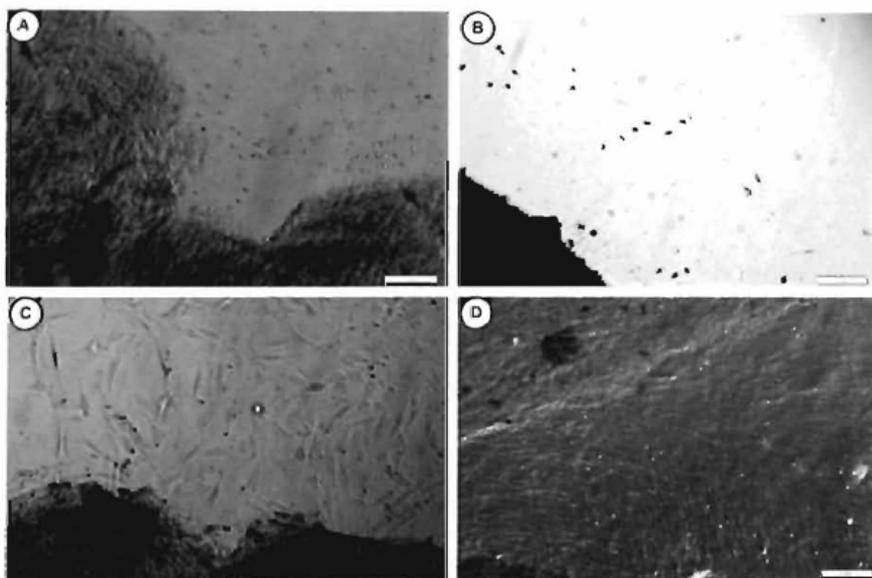
Kết quả nhuộm hematoxylin và eosin mô tủy răng cho thấy mật độ tế bào trong tủy răng dày đặc. Tế bào có nhiều hình dạng nhưng chiếm đa số là các tế bào có hình thoi kéo dài. Các tế bào này có thể là tế bào gốc trung mô hay nguyên bào sợi. Thành phần ngoại bào trong mô tủy có dạng sợi, sắp xếp dày đặc và đều đặn. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho rằng tủy răng là một mô giàu thành phần lưới sợi và chủ yếu là sợi collagen (Stanley, 1962).

### Nuôi sơ cấp mô tủy răng

Quan sát ban đầu, ta nhận thấy có nhiều tế bào hồng cầu đẹp và lõm hai mặt ở xung quanh rìa mảnh mô tủy. Ngoài ra, ta còn nhận thấy các dạng tế bào khác; đây có thể là các tế bào tủy răng thoát ra ngoài trong quá trình cấy mô tủy. Vào ngày nuôi cấy thứ 7, bắt đầu thấy xuất hiện các tế bào di cư từ mảnh mô và bám vào bề mặt đĩa nuôi cấy; các tế bào có rất nhiều hình dạng khác nhau như dạng hình thoi, dạng kéo dài, dạng hình sao, dạng giống tế bào nội mô... Trong những ngày nuôi cấy sau đó, các dạng tế bào dần dần thu hẹp lại; dạng tế bào chiếm ưu thế là dạng tế bào trải rộng, nhân lớn hình oval và có nhiều đuôi bào tương. Ngày thứ 28, các tế bào bắt đầu hợp dòng, trải thành một lớp đơn phủ kín bề mặt đĩa nuôi, đây là thời điểm thích hợp để thu nhận tế bào.



Hình 1. Mô tủy răng sau khi nhuộm hematoxylin và eosin A. 100X. B. 200X



Hình 2. Tế bào mọc lan ra từ mảnh mô sau các ngày nuôi cấy. A. Mảnh mô tủy răng trong đĩa nuôi (100X). B. Tế bào tủy răng sau 7 ngày nuôi cấy (100X). C. Tế bào tủy răng sau 15 ngày nuôi cấy (100X). D. Tế bào tủy răng sau 28 ngày nuôi cấy (100X)

### Thu nhận tế bào sau khi nuôi sơ cấp

Sau khi nuôi mảnh mô tủy, tế bào được tách bằng enzyme (trypsin-EDTA) và xác định mật độ bằng nhuộm trypan blue. Kết quả cho thấy tỉ lệ % tế bào sống thu được rất cao (trung bình 88,06%) và

mật độ đủ để tiến hành nuôi cấy.

### Xác định marker tế bào gốc

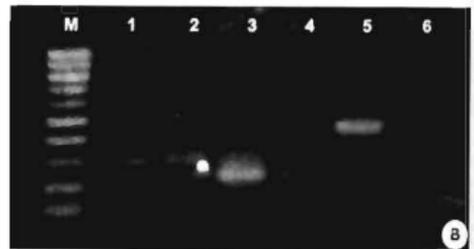
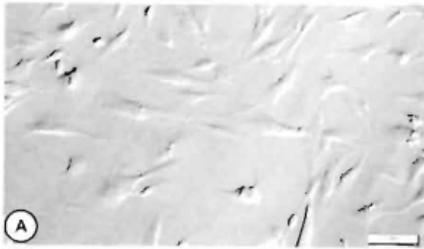
Sau khi thực hiện phản ứng RT-PCR để xác định hai marker của tế bào gốc từ tủy răng là *Ocl4* và *CD146* Kết quả từ hình 4B cho thấy marker *Ocl4*

biểu hiện ở mẫu nuôi cấy tế bào và ca ở mẫu chứng. Marker *CD146* chỉ biểu hiện ở mẫu tế bào nuôi cấy mà không có biểu hiện ở mẫu chứng. Hiện tượng này có thể là do quần thể tế bào gốc trung mô trong hỗn hợp tế bào phân tách từ mô tủy răng ít, chưa đủ mật độ cần thiết. Đây chính là loại tế bào biểu hiện hai marker *CD146* và *Oc14* trong mô tủy răng. Tuy nhiên, ở mẫu đối chứng lại có sự biểu hiện của

marker *Oc14* có thể do sự biểu hiện của gen này mạnh hơn so với *CD146* ở các tế bào gốc trong mảnh mô tủy răng. Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào trung mô này sẽ tăng sinh mạnh nên dẫn đến sự dương tính của mẫu đối với hai marker trên. Tế bào nuôi cấy dương tính với hai marker *Oc14* và *CD146*. Điều này chứng tỏ có sự hiện diện của tế bào gốc trung mô trong hỗn hợp tế bào tủy răng nuôi cấy

**Bảng 1.** Kết quả thu nhận tế bào tủy răng.

Lần	Mật độ tế bào ( $\times 10^3$ tế bào/ml)		% tế bào sống
	Tế bào sống	Tế bào chết	
1	27 $\pm$ 2,08	3 $\pm$ 0,58	90,00
2	24 $\pm$ 1,52	3 $\pm$ 0,58	88,89
3	29 $\pm$ 1,52	5 $\pm$ 0,58	85,29
Trung bình	26,67 $\pm$ 2,52	3,67 $\pm$ 1,15	86,06



**Hình 4. A.** Tế bào tủy răng sau cấy chuyển. **B.** Kết quả RT-PCR M Thang marker, 1, 3, 5 Sản phẩm khuếch đại các gen của tế bào tủy răng nuôi cấy tương ứng *GAPDH* (300 bp), *Oc14* (297 bp), *CD146* (435 bp), 2, 4, 6. Sản phẩm khuếch đại gen của mẫu mô tủy răng đối chứng tương ứng *GAPDH*, *Oc14*, *CD146*

## KẾT LUẬN

Dung dịch DMEM bổ sung 300 UI/ml penicilin, 300  $\mu$ g/ml streptomycin, 0,75  $\mu$ g/ml amphotericin B (fungizone<sup>®</sup>) là dung dịch bảo quản mẫu răng tốt.

Chúng tôi đã nuôi cấy và thu nhận thành công tế bào từ mảnh mô tủy răng người.

Chúng tôi đã xác định được sự hiện diện của quần thể tế bào gốc trung mô trong hỗn hợp tế bào tủy răng người nuôi cấy. Thêm nữa, các tế bào này vẫn duy trì được tính gốc trong quá trình nuôi cấy

Với những kết quả thu được, hướng nghiên cứu có thể tiến xa hơn trong việc thu nhận nguồn tế bào gốc tủy răng nhằm ứng dụng lâm sàng trong nha khoa phục hồi.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi chân thành cảm ơn Bệnh viện Răng Hàm Mật thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp mẫu răng để tiến hành thí nghiệm này

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tucker A, Sharpe P (2004) The Cutting Edge of Mammalian Development: How the Embryo Makes Teeth. *Nat Rev Genet* 5: 499-508.
- Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yehck PC (2002) Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. *J Dent Res* 81(10): 695-700.
- Mauth C, Huiwig A, Graf-Hausner U, Roulet JF (2007) *Restorative Applications for Dental Pulp Therapy, Chapter 3. Topics in Tissue Engineering, Vol 3, Eds Ashammakht N, Reis R, Chiellini E*: 1-32

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH (2006) *In vitro* characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environment. *Cell Tissue Res* 10: 1-23.

Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, Li Y, Jin Y (2006) Differentiation of dental pulp stem cell into Regular-Shaped Dentin-Pulp Complex Induced by Tooth Germ Cell Conditioned Medium. *Tissue Eng* 12: 3097-3105.

Mileich I, Sharpe PT (2004) Neural crest contribution of mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72: 200-212

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC (2004), Bioengineered Teeth from Cultured Rat Tooth Bud Cells. *J Dent Res* 83: 523-528

Kumabe S, Nakatsuka M, Kim GS, Jue SS, Aikawa F, Shin JW, Iwai Y (2006) Human dental pulp stem cell culture and cell Transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn* 84: 147-155.

Langer RS, Vacanti JP (1999) Tissue Engineering: The Challenges Ahead. *Sci Am* 280: 86-89.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM (2007) Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *J Endod* 33: 377-390.

## CULTURE OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS

Doan Nguyen Vu<sup>1</sup>, Pham Tran Huong Trinh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Nhat Uyen<sup>1</sup>, To Minh Quan<sup>1</sup>, Phan Kim Ngoc<sup>1</sup>, Tran Le Bao Ha<sup>1,\*</sup>, Nguyen Thi Thu<sup>2</sup>, Dang Vu Ngoc Mai<sup>2</sup>, Hoang Dao Bao Tram<sup>2</sup>, Hoang Tu Hung<sup>2</sup>, Trinh Thi Truc Ly<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Sciences, Vietnam National University, Hochiminh city

<sup>2</sup>The University of Medicine and Pharmacy at Hochiminh city

<sup>3</sup>International University, Vietnam National University, Hochiminh city

### SUMMARY

Dental pulp cells are important material for studies in tooth regeneration. In recent years, there have been many research reports on the isolation and culture of dental pulp stem cells in order to regenerate dental pulp for clinical treatments. Also, tooth that contains highly multipotent stem cells is a source of cells for other tissue regeneration and repair. However, in Vietnam this problem is still new and there is no any project related to dental pulp stem cells. In this research, we performed the experiments to collect and disinfect human dental pulp tissue by using Povidone iodine 10% (Betadine). Isolated pulp tissues were evaluated through hematoxylin and eosin staining method. After that, dental cells were collected and cultured with DMEM/F12 medium supplemented 10% FBS (fetal bovine serum) by tissue culture method. The presence of stem cells in cultured cells was determined by using RT-PCR method with *Oct4* and *CD146* primers. Results showed that we were successful in collection and culture of cells from human dental pulp tissue. The cultured cells are positive for expression of *Oct4* and *CD146* markers which are stem cell markers.

**Keywords** hematoxylin and eosin staining, primary culture, RT-PCR, stem cells, human dental pulp

\* Author for correspondence: Tel: 84-988575507; Fax: 84-8-38350096; E-mail: [tlbha@hcmuns.edu.vn](mailto:tlbha@hcmuns.edu.vn)