

dính hẹp nhất ở vị trí ngoài gần, tăng dần ra phía xa và rộng nhất ở vị trí ngoài xa. Ở các răng còn lại của cả hai hàm lợi dính hẹp nhất ở vị trí ngoài giữa.

– Trên cả hai hàm răng, lợi dính phía tiền đình các răng có kích thước dao động từ $1,55 \pm 0,20$ mm đến $3,75 \pm 0,41$ mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Hải Anh, Chu Thị Quỳnh Hương, Đinh

Điêu Hồng và cộng sự. Khảo sát lợi dính ở nam giới trưởng thành. Tạp chí Y học Việt Nam, Số 2, tháng 3. Hà Nội, 2025.

2. Trịnh Đình Hải. Bệnh học quanh răng. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Hà Nội, 2013.

3. Trịnh Đình Hải, Nguyễn Thị Hồng Minh, Trần Cao Bính. National Oral Health Survey of Vietnam 2019. Medical publishing house. Hanoi 2019.

4. Maria E. Itoiz, Fermin A. Carranza. Clinical periodontology. Philadelphia, 2019.

PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY NGUYÊN BÀO SỢI TẠI KHOA RĂNG HÀM MẶT, ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Lê Thanh Nguyên¹, Nguyễn Thu Thủy¹, Nguyễn Ngọc Yến Thu¹,
Huỳnh Công Nhật Nam¹, Lê Thu Hoài¹

TÓM TẮT

Mở đầu: Niêm mạc ở khẩu cái là nguồn để phân lập các nguyên bào sợi cho mục đích nghiên cứu và điều trị. Phân lập tế bào từ vùng cho ghép ở khẩu cái có nhiều thuận lợi vì cắt và thu nhận mảnh ghép rất thường gặp trong điều trị lâm sàng, qui trình đơn giản, lành thương nhanh, ít để lại di chứng hoặc sẹo. Hiện trong nước đã có các nghiên cứu thu nhận nguồn tế bào từ nướu răng, tủy răng, từ nhú chóp răng, từ dây chằng nha chu. Nuôi cấy nguyên bào sợi từ niêm mạc khẩu cái sẽ đóng góp thêm một nguồn tế bào trung mô mới có thể phục vụ cho nghiên cứu cơ bản hay nghiên cứu điều trị. **Mục tiêu:** Phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mô niêm mạc khẩu cái in vitro. **Phương tiện và phương pháp:** Mô mềm từ bệnh nhân có chỉ định phẫu thuật ghép mô mềm tự thân với vị trí lấy ở khẩu cái. Nuôi cấy và phân lập tế bào được thực hiện theo quy trình của Phòng Thí nghiệm Sinh học miệng - Hàm mặt, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. **Kết quả:** Phương pháp nuôi cấy mảnh mô cho phép thu nhận được tế bào có hình thái nguyên bào sợi, đạt mật độ cấy chuyển sau 2 tuần nuôi cấy. **Kết luận:** Phương pháp nuôi cấy mảnh mô đã phân lập và nuôi cấy thành công các tế bào nguyên bào sợi từ mô nướu khẩu cái ở người.

Từ khóa: Nguyên bào sợi, niêm mạc khẩu cái, nuôi cấy mảnh mô

SUMMARY

OPTIMIZE COLLECTING AND CULTURING PROCEDURES OF PRIMARY HUMAN ORAL FIBROBLASTS AT THE FACULTY OF DENTISTRY, UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY AT HO CHI MINH CITY

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thu Thủy

Email: ntthuy@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 13.2.2025

Ngày phản biện khoa học: 20.3.2025

Ngày duyệt bài: 21.4.2025

Introduction: The palatal mucosa constitutes a prime source for the isolation of fibroblast cells, facilitating cutting-edge research and therapeutic interventions. The procurement of cells from this region presents numerous advantages, including streamlined sampling protocols, expedited wound healing and minimal cicatrization. Previous studies conducted in Vietnam have focused on harvesting cells from dental pulp, gingival tissue, dental papilla and periodontal ligaments. The cultivation of fibroblasts from palatal mucosa promises to provide an additional reservoir of mesenchymal cells, thereby augmenting both foundational research and clinical applications.

Objectives: Culture and isolation of primary human oral fibroblast from palatal mucosa in vitro. **Materials and methods:** Autologous soft tissue grafting specimens were harvested from patients undergoing surgical procedures, utilizing palatal mucosa as the donor site. Subsequent cell isolation and cultivation adhered strictly to protocols established by the Oral and Maxillofacial Biology Laboratory at the University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City.

Results: This tissue culture methodology facilitated the isolation of fibroblast cells, reaching culturing density after 14 days of in vitro cultivation.

Conclusion: Primary fibroblast cells from human gingival palatal tissue were effectively isolated and cultivated in vitro. **Keywords:** Fibroblast, palatal mucosa, outgrowth

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nguyên bào sợi là loại tế bào chiếm chủ yếu trong thành phần tế bào của mô liên kết. Trong 1cm^3 mô liên kết có khoảng 200×10^6 nguyên bào sợi, chiếm khoảng 5% thể tích^{1,2}. Nguyên bào sợi thường có dạng thoi hay dạng sao với ít nhánh bào tương, nhân tròn hay bầu dục nằm giữa tế bào^{1,3}.

Nguyên bào sợi là loại tế bào có vai trò quan trọng trong lành thương, duy trì và sửa chữa mô liên kết². Lành thương là một quá trình phức tạp được phối hợp của nhiều yếu tố và rất khó đoán.

Lành thương ở trong miệng được ghi nhận có tốc độ nhanh, ít sẹo hơn so với lành thương ngoài da và đóng vai trò chính là từ nguyên bào sợi. Ngoài chức năng tổng hợp và duy trì các thành phần khung ngoại bào, nguyên bào sợi còn kích thích tăng trưởng mạch máu, biểu mô và tham gia điều tiết miễn dịch. Với ưu điểm dễ phân lập, nuôi cấy và tăng sinh trong điều kiện in vitro làm cho nguyên bào sợi trở thành một nguồn tế bào hấp dẫn cho các nghiên cứu cơ bản và cho các phương thức điều trị dựa trên tế bào⁴.

Ở các nước, nguồn tế bào này đã đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng điều trị các bệnh răng miệng và các bệnh khác. Mô hình nguyên bào sợi là phương tiện giúp tìm hiểu cơ chế tác động và cung cấp bằng chứng có lợi hay có hại cho tiến trình lành thương của nhiều tác nhân hỗ trợ và nhiều phương thức điều trị mới.

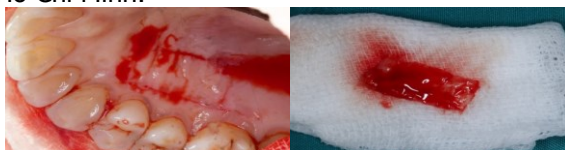
Đánh giá các hoạt động sinh học như sự sống, sự di cư, sự biệt hóa thành nguyên bào sợi cơ của nguyên bào sợi⁵, D Silva và cs đã tìm thấy vai trò của các thành phần khác với nicotin trong khói thuốc có thể tác động lên sự lành thương của mô niêm mạc ở người hút thuốc. Milinkovic và cs⁶ nhận thấy nguyên bào sợi dùng với màng collagen có đặc điểm lành thương tốt, giúp giảm thời gian phẫu thuật và nguy hại cho bệnh nhân.

Ở Việt Nam, đã có các nghiên cứu thu nhận nguồn tế bào từ tủy răng², từ nhú chóp răng¹, từ dây chằng nha chu⁷, nướu răng. Các nghiên cứu đều cho thấy các nguồn tế bào từ răng và từ mô nha chu như vậy đều dễ thu nhận, ít gây xâm lấn đối với người cho. Đặc biệt, việc thu nhận tế bào từ mô khẩu cái không cần nhổ răng như quy trình thu nhận tế bào từ mô dây chằng nha chu hay từ tủy răng và từ nhú chóp răng. Hiện chưa có nghiên cứu công bố về việc phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mô khẩu cái ở người.

Mục tiêu nghiên cứu: Phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mô khẩu cái ở người in vitro.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu nhận mô mềm khẩu cái. Bệnh nhân đến khám và có chỉ định ghép mô liên kết lấy từ khẩu cái tại phòng khám chuyên khoa Khoa Răng Hàm Mặt, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.



Hình 1. Hình lâm sàng phẫu thuật lấy mảnh ghép ở khẩu cái

Tiêu chuẩn chọn:

- Bệnh nhân trên 18 tuổi.
- Bệnh nhân có chỉ định phẫu thuật ghép mô mềm tự thân, lấy mảnh ghép ở vùng khẩu cái.
- Bệnh nhân đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu sau khi được thông báo về mục đích nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh toàn thân: tim mạch, đái tháo đường không kiểm soát, bệnh lý máu, ghép thận, rối loạn thần kinh.

- Mang thai/ cho con bú.

- Bệnh nhân xạ trị.

- Bệnh nhân hút thuốc lá >10 điếu/ngày.

- Bệnh nhân dùng thuốc kháng đông.

- Không hợp tác/tuân thủ điều trị.

Mô khẩu cái được thu nhận với sự đồng ý của bệnh nhân trong điều kiện vô trùng của phòng mổ. Phẫu thuật nha chu do một Bác sĩ của Bộ môn Nha chu thực hiện.

Mô khẩu cái được cho vào dung dịch bảo quản mẫu có chứa kháng sinh và nhanh chóng chuyển về phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nuôi cấy sơ cấp mảnh mô. Việc nuôi cấy và phân lập nguyên bào sợi được thực hiện theo quy trình của Phòng Thí nghiệm Sinh học miệng- Hàm mặt, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

- Khử trùng mô khẩu cái bằng Povidine 10% trong 5-10 giây và rửa lại với NaCl 0.9% - Rửa mô lần lượt theo thứ tự với dung dịch PBS đã hấp và bổ sung kháng sinh 5X, 3X, 1X đã được lọc qua filter 22µm. Thực hiện 2 lần mỗi lần 1 phút mỗi nồng độ.

- Mẫu mô nướu khẩu cái được cắt thành những mảnh mô nhỏ 0.5-1 mm bằng dao 15c.

- Những mảnh mô này được chuyển vào đĩa 35 mm và dùng lamelle ép chặt mô vào đĩa.

- Thêm 2 ml môi trường đã được lọc qua filter 22 µm gồm DMEM/F12 bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò (FBS), 1% L-glutamin, 1% Penicillin-streptomycin 100X.

- Nuôi trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂.

- Thay môi trường ba ngày một lần.

Cấy chuyển tăng sinh. Theo dõi sự tăng sinh của các tế bào đến khi chúng trải thành một lớp đơn phủ kín trên bề mặt dụng cụ nuôi (độ bao phủ đạt gần 80-90%). Lúc này tiến hành tách tế bào và cấy chuyển sang dụng cụ nuôi mới để cung cấp không gian và chất dinh dưỡng cho tế bào tăng sinh và phát triển. Cấy chuyển từ đĩa 35 mm sang bình Roux 25cm²

- Hút bỏ môi trường nuôi cấy cũ trong đĩa 35mm.

- Rửa bề mặt đĩa và lamelle với 1 ml PBS đã

hấp (dùng kẹp gấp đã hấp để chuyển những mảnh mô ép qua đĩa 35 mm khác để nuôi cấy sơ cấp tiếp tục)

- Hút vào 1ml trypsin-EDTA 0.25%; ủ trong tủ ấm 37°C khoảng 2-3 phút để tách tế bào khỏi bề mặt đĩa nuôi (quan sát trên kính hiển vi đảo ngược).

- Huyền phù với 2ml môi trường có bổ sung huyết thanh để bất hoạt trypsin.

- Cho hết dung dịch vào ống falcon 15ml, quay li tâm tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút thu cặn tế bào.

- Chuyển huyền phù sang bình Roux có sẵn 2 ml môi trường nuôi cấy.

- Nuôi trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂.

- Thay môi trường ba ngày một lần.

Cấy chuyển từ bình Roux sang bình Roux

- Đổ bỏ môi trường nuôi cấy cũ trong bình Roux.

- Rửa bề mặt nuôi cấy với 2 ml PBS (rửa 2 lần), hút bỏ hết PBS ở lần cuối.

- Hút vào 1 ml trypsin-EDTA 0.25%; ủ trong tủ ấm 37°C trong khoảng 2-3 phút để tế bào tách khỏi bề mặt bình nuôi (quan sát trên kính hiển vi đảo ngược).

- Huyền phù với 2 ml môi trường có bổ sung huyết thanh để bất hoạt trypsin.

- Cho hết dung dịch vào ống falcon 15ml, quay li tâm tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút thu cặn tế bào.

- Chuẩn bị bình Roux mới với lượng huyền phù tế bào đã thu, cho môi trường nuôi cấy mới tùy thuộc vào kích thước bình Roux.

- Nuôi trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂.

- Thay môi trường ba ngày một lần.

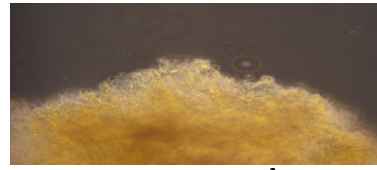
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc điểm mẫu nghiên cứu - mẫu thu nhận. Ba mẫu mô nướu khẩu cái thu nhận trong nghiên cứu này là từ các bệnh nhân nữ trên 18 tuổi lần lượt 29, 36 và 58 tuổi.

Ghép mô mềm tự thân với mảnh ghép lấy từ khẩu cái là một thủ thuật điều trị thường gặp trong lâm sàng gặp ở nhiều độ tuổi khác nhau. Mô nướu khẩu cái sau khi cắt từ bệnh nhân được bảo quản vô trùng trong dung dịch bảo quản phù hợp và tiến hành nuôi cấy trong vòng 24 giờ sau đó.

3.2. Kết quả nuôi sơ cấp mảnh mô. Ba mẫu mô nướu khẩu cái được thu nhận và nuôi sơ cấp bằng phương pháp nuôi mảnh mô. Cả ba mẫu đều không có hiện tượng nhiễm.

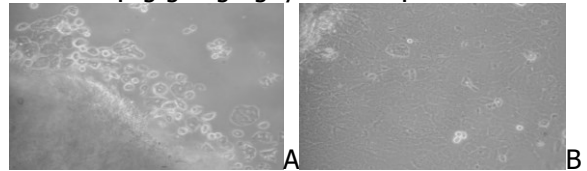
Ban đầu, quan sát đĩa mô ta thấy xung quanh rìa mảnh mô có nhiều tế bào hồng cầu; các tế bào này bị loại dần sau những lần thay môi trường.



Hình 2. Mảnh mô nướu khẩu cái ban đầu và các tế bào ở rìa xung quanh (x40)

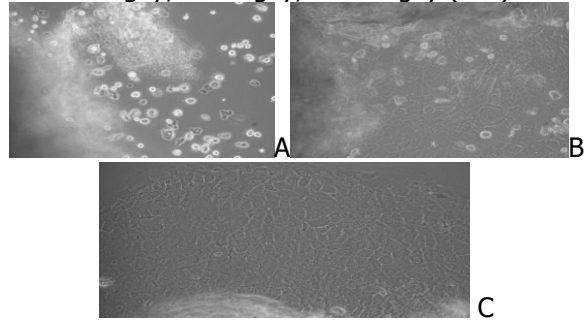
Sau 1 tuần nuôi cấy, các tế bào có dạng trái xoài xuất hiện, đi ra từ trong mảnh mô, bám dính và tăng sinh. Các tế bào có rất nhiều hình dạng khác nhau như dạng hình thoi, dạng kéo dài, hình sao với nhiều đuôi bào tương kéo dài.

Trong những ngày tiếp theo, tế bào trái xoài có dạng hình thoi nguyên bào sợi phát triển tốt và chiếm ưu thế. Gần hai tuần sau nuôi cấy là thời điểm mà hầu hết các dòng đều đồng nhất về hình dạng giống nguyên bào sợi.



Hình 3. Tế bào sau nuôi cấy

A. 2 ngày; B. 8 ngày; C. 12 ngày (x20)



Hình 4. Tế bào dòng 2 sau nuôi cấy

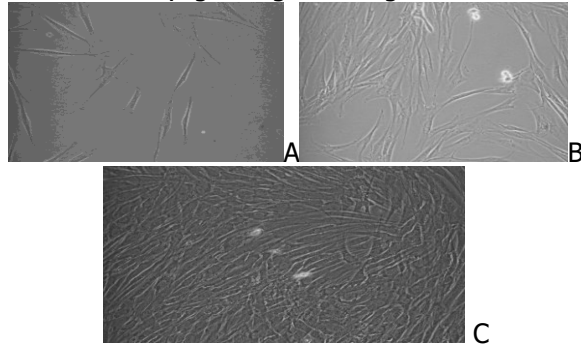
A. 3 ngày, tế bào có nhiều hình dạng; B. 7 ngày, tế bào dạng nguyên bào sợi dần chiếm ưu thế; C. 14 ngày, có hiện tượng hợp dòng và trải thành một lớp đơn phủ kín bề mặt đĩa nuôi (x20)

3.3. Kết quả nuôi cấy thứ cấp - cấy chuyển tăng sinh. Cấy chuyển nhằm cung cấp không gian và chất dinh dưỡng cho tế bào tăng sinh, phát triển và như vậy giúp duy trì dòng tế bào đang có. Qua nhiều lần cấy chuyển, các tế bào có khả năng bám dính và tăng sinh được nhân lên về số lượng sau khi nuôi cấy sơ cấp, cũng như giúp loại bỏ dần các tế bào không

mong muốn, chỉ giữ lại những tế bào tiềm năng có thể tăng sinh dài hạn và tự làm mới.

Khi các tế bào đạt 80-90% độ phủ kín bề mặt dụng cụ nuôi, cấy chuyển được tiến hành. Khi vừa cấy chuyển, các tế bào có dạng hình tròn và lơ lửng trong môi trường. Sau 24 giờ cấy chuyển, tế bào bắt đầu bám trên bề mặt dụng cụ nuôi. Ban đầu khả năng tăng sinh còn chậm do ảnh hưởng của trypsin tách tế bào. Sau 3-5 ngày, các tế bào thích nghi dần với bề mặt nuôi cấy mới và bắt đầu tăng sinh mạnh. Khoảng 10-14 ngày sau cấy chuyển, có thể thấy các tế bào trải đều trên bề mặt nuôi cấy.

Sau 14 ngày cấy chuyển thì các tế bào đã trải thành 1 lớp đơn phủ kín bề mặt dụng cụ nuôi, chủ yếu có dạng hình thoi của nguyên bào sợi, có thể sẵn sàng để cấy chuyển sang thể hệ tiếp theo. Sau khoảng 3-4 lần cấy chuyển, các tế bào có hình dạng tương đối đồng nhất.



Hình 5. Tế bào dòng 3 sau cấy chuyển

A. 1 ngày; B. 10 ngày; C. 15 ngày (x20)

3.4. Kết quả tăng sinh nguyên bào sợi nướu theo thời gian

Nhận xét. Phương pháp nuôi cấy từ mảnh mô trong nghiên cứu này cho thấy tế bào có khả năng tăng sinh tốt. Phương pháp này đã được chứng minh có ưu thế hơn so với phương pháp nuôi cấy tế bào đơn hay tách bằng enzymes. Ha và cs⁷ ghi nhận phân lập tế bào gốc dây chằng nha chu bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô ít tổn thời gian hơn phương pháp xử lý bằng enzyme. Phương pháp xử lý bằng enzyme dù được cho là phóng thích tất cả các tế bào từ mô nhưng về mặt kỹ thuật quá trình này khó khăn và không tránh khỏi một số mức độ tổn thương và mất tế bào.

Nghiên cứu nuôi cấy và nhận diện tế bào gốc nhú chóp răng của Trần Lê Bảo Hà và cs (2014)¹ ghi nhận phương pháp nuôi cấy mảnh mô thu nhận quần thể tế bào tinh sạch hơn so với phương pháp xử lý enzyme. Do ở phương pháp nuôi mảnh mô, ngay từ giai đoạn nuôi sơ cấp ban đầu, mảnh mô nhú chóp với các mạch máu vẫn được giữ nguyên cấu trúc, chỉ những tế bào

có sức sống mạnh mới đi ra từ mảnh mô, bám dính tăng sinh nên tỉ lệ tạp nhiễm các tế bào có nguồn gốc từ máu thấp hơn.

Các đặc điểm tăng sinh phát triển của dòng tế bào trong nghiên cứu này nhanh hơn với dòng tế bào gốc dây chằng nha chu của Ha và cs (2014)¹. Tế bào ở phần rìa mảnh mô sẽ bám vào bề mặt đĩa nuôi cấy vào khoảng ngày thứ ba so với nghiên cứu của Ha và cs¹ là sau một tuần. Ban đầu, các tế bào có rất nhiều hình dạng và kích cỡ khác nhau rất khó phân biệt. Tuy nhiên, dạng tế bào giống nguyên bào sợi chiếm ưu thế vào những ngày nuôi cấy sau. Tế bào đạt mật độ cấy chuyển từ 2 tuần nuôi cấy tương tự nghiên cứu của Ha và cs¹. Y văn cũng đã có ghi nhận đặc điểm tăng sinh của nguyên bào sợi từ mô nướu khẩu cái là nhanh hơn so với nguyên bào sợi từ dây chằng nha chu.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cung cấp thêm một bằng chứng cho phân lập, nuôi cấy thành công nguyên bào sợi nướu khẩu cái từ phương pháp nuôi cấy mảnh mô.

Ý nghĩa của nghiên cứu là cung cấp nguồn tế bào mới cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng lâm sàng trong tương lai. Cần có thêm các nghiên cứu nhận dạng và xác định tỉ lệ tế bào gốc đa tiềm năng trong quần thể tế bào thu nhận này để mở rộng khả năng ứng dụng.

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh theo

hợp đồng số 164/2023/HĐ-DHYD, ngày 14/9/2023

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hà TLB.** Hai phương pháp nuôi cấy tế bào gốc nhú chóp từ răng chưa trưởng thành của người. Tạp chí sinh học 2014;36(1se):226-231.
2. **Hà TLB.** Nghiên cứu nuôi cấy tế bào gốc tủy răng và tạo khung nâng đỡ tế bào gốc tủy răng người. Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên. Đại Học Quốc Gia TP. HCM; 2011.
3. **Hùng HT, Khang HK, Lan NTQ, Trâm HDB.** Mô Phôi Răng Miệng: Phôi học và Mô học Răng và Nha chu. Chương: Cấu trúc mô học của nướu. Xuất bản lần thứ 1 ed. Nhà xuất bản Y Học TP.HCM; 2001:274-290.
4. **Häkkinen L, Larjava H, Fournier BP.** Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. Cytotherapy. Sep 2014;16(9):1171-86.
5. **Silva D, Cáceres M, Arancibia R, Martínez C, Martínez J, Smith PC.** Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. J Periodontal Res. Oct 2012;47(5):599-607.
6. **Milinkovic I, Aleksic Z, Jankovic S, et al.** Clinical application of autologous fibroblast cell culture in gingival recession treatment. J Periodontal Res. Jun 2015;50(3):363-70.
7. **Tran Hle B, Doan VN, Le HT, Ngo LT.** Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine. In Vitro Cell Dev Biol Animal. Aug 2014;50(7):597-602.