

8. **Clement CI, Kampougeris G, Ahmed F, Cordeiro MF, Bloom PA.** Combining phacoemulsification with endoscopic cyclophotocoagulation to manage cataract and glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2013; 41(6):546-551.
9. **Vernon SA, Koppens JM, Menon GJ, Negi AK.** Diode laser cycloablation in adult glaucoma: long-term results of a standard protocol and review of current literature. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2006; 34(5):411-420.

## ẢNH HƯỞNG IN VITRO CỦA NANO BERBERINE LÊN SỰ CO GEL COLLAGEN CỦA NGUYÊN BÀO SỢI NướU NGƯỜI

Lê Nguyễn Lâm<sup>1</sup>, Trần Văn Vui<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** nghiên cứu vai trò của Nano Berberine trong quá trình lành thương trong miệng bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, mục tiêu nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của Nano Berberine lên đặc tính co gel collagen của nguyên bào sợi nướu người. **Phương tiện và vật liệu:** thử nghiệm co gel collagen được thực hiện bằng cách cấy tế bào vào collagen type I để tạo gel hình đĩa. Collagen type I để trùng hợp để tạo mạng lưới sợi mô phỏng khung collagen trong mô liên kết. Nồng độ Nano Berberine gốc là 2%, tương đương 20.000 µg/µl. Tiến hành pha loãng dung dịch Nano Berberine gốc ra các nồng độ 1/10, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>. Nano Berberine được cung cấp bởi trung tâm nghiên cứu Triển khai – Khu công nghệ cao, Thành phố Hồ Chí Minh. **Kết quả:** ghi nhận co gel collagen được ở nghiệm thức môi trường tiêu chuẩn. Các nghiệm thức của môi trường không bổ sung dinh dưỡng và nghiệm thức thí nghiệm đều không ghi nhận co gel collagen. Tuy vậy, không ghi nhận sự khác biệt co gel collagen đáng kể về mặt thống kê khi so sánh cả 3 nghiệm thức với ngày 0. **Kết luận:** nghiệm thức môi trường tiêu chuẩn có co gel collagen. Các nghiệm thức của môi trường không bổ sung dinh dưỡng và nghiệm thức thí nghiệm đều không ghi nhận co gel collagen.

**Từ khóa:** Nano Berberine, nguyên bào sợi nướu người, co gel collagen.

### SUMMARY

#### EVALUATION THE IN VITRO EFFECT OF NANO BERBERINE ON COLLAGEN GEL CONTRACTION OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLATS

**Objectives:** In order to provide a scientific basis for the application of BBr in the healing of gingival-oral tissues, we carried out a research survey with the aim of evaluating the in vitro effects of Nano BBr on some biological properties collagen gel contraction of hGF. **Materials and methods:** The collagen gel contraction test is performed by implanting cells into type I collagen to form a disc-shaped gel. Type I

collagen is easy to polymerize to create a fibrous network that mimics the collagen framework in the connective tissue. Nano Berberine 2% was diluted 1, 1/10, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup> to the hGF culture plates that had been incubated for 24h. Use Nano BBr at a proven non-toxic concentration to evaluate the biological properties of hGF collagen gel contraction in cultures containing Nano BBr. Cell culture and tests were carried out at the Laboratory of Biomedical Materials and Tissue Engineering, University of Natural Sciences, Viet Nam National University, Ho Chi Minh City. **Results:** The obtained results showed that collagen gel contraction was recorded in the medium standard treatment. The standard treatments without nutritional supplementation and the experimental treatments did not record collagen gel contraction. However, no statistically significant difference in collagen gel contraction was observed when all 3 treatments were compared with 0 day. **Conclusions:** Collagen contraction was recorded in the medium standard treatment. The standard treatments without nutritional supplementation and the experimental treatments did not record collagen gel contraction.

**Keywords:** Nano Berberine, human gingival fibroblasts, collagen gel contraction.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nguyên bào sợi nướu là loại tế bào có vai trò quan trọng trong lành thương, duy trì và sửa chữa mô liên kết nướu. Cùng với tủy răng, nhú chóp răng, dây chằng nha chu, nướu là nguồn để phân lập nguyên bào sợi cho mục đích nghiên cứu và điều trị. Phân lập tế bào từ nướu có nhiều thuận lợi vì cắt và thu nhận mô nướu rất thường gặp trong điều trị lâm sàng, qui trình đơn giản, lành thương nhanh, ít để lại di chứng hoặc sẹo.

Berberine (BBr) là một alkaloid thuộc nhóm isoquinoline gần đây có được sự chú ý trong những năm gần đây do có tác dụng dược lý như chống ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và kháng viêm. Mirhadi E (2018)<sup>3</sup>, cho rằng Berberine được chứng minh có tác dụng tăng sinh nguyên bào sợi có nguồn gốc từ dây chằng nha chu ở người (tế bào hPDL). Theo nghiên cứu của Moscato S, et al. (2008)<sup>4</sup> nguyên bào sợi là kiểu tế bào đặc biệt nhất trong mô liên kết loại

<sup>1</sup>Trường Đại Học Y Dược Cần Thơ

Chịu trách nhiệm chính: Lê Nguyễn Lâm

Email: lenguyenlam@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.12.2022

Ngày phản biện khoa học: 13.2.2023

Ngày duyệt bài: 27.2.2023

tế bào thường gặp nhất trong các mô liên kết, có nguồn gốc từ những tế bào trung mô trong phôi thai và những tế bào nguyên bào sợi phân chia trong cơ thể trưởng thành. Là thành phần chính của nướu và nguyên bào sợi là tế bào sản xuất collagen chính trong nướu.

Với xu hướng phát triển của nha khoa thẩm mỹ và nha khoa phục hình trong thời gian gần đây, một số tổn thương tại vùng răng miệng gây nên do vật thể lạ như: trụ cấy ghép, vật thể dùng trong chỉnh hình nha... Với mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của Nano Berberine lên sự co gel collagen của nguyên bào sợi nướu người nhằm đánh giá vai trò Nano Berberine có thể tu sửa nền ngoại bào để hình thành và co lại vết sẹo ở nguyên bào sợi.

**II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Từ tháng 6/2021- 12/2021.

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thử nghiệm in vitro.

- Cỡ mẫu: Nghiên cứu thăm dò, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

- Chọn mẫu: Tế bào nguyên bào sợi nướu người (hGF) ở thể hệ P3 (tế bào nuôi cấy đến lần chuyển.

thứ 3). Nguyên bào sợi nướu người hGF được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**Chuẩn bị tế bào.** Xác định số lượng tế bào trong Flask nuôi cấy. Xác định lượng huyền phù tế bào cần lấy để đảm bảo mật độ 10<sup>4</sup> tế bào/gel cho thử nghiệm co gel collagen.

**Chuẩn bị nghiệm thức:**

Thực hiện 6 nghiệm thức với 18 giếng:

- Nồng độ Nano Berberine không gây độc đã được khảo sát trong nội dung 1.

- Môi trường nuôi cấy có FBS 10% (nhóm chứng dương).

- Môi trường nuôi cấy không huyết thanh (nhóm chứng âm).

- Gel collagen không chứa hGF.

**Tiến hành thử nghiệm**

- Trộn 50 µl huyền phù tế bào vào 100 µl dung dịch collagen type I đảm bảo mật độ 10<sup>4</sup> tế bào/gel rồi cho vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng.

- Đem ủ đĩa ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ.

- Tách gel ra khỏi thành giếng bằng cách

chạy nhẹ đầu tip pipet 100 µl dọc theo các mép gel cẩn thận để không bị cắt hoặc rách gel, đảm bảo không có gel bám vào đĩa.

- Hút hết dung dịch ra khỏi giếng.

- Bổ sung vào giếng 100 µl môi trường nuôi cấy có huyết thanh.

- Đem ủ đĩa ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ.

- Hút hết môi trường nuôi cấy và bổ sung 100 µl nghiệm thức đã chuẩn bị.

- Đem ủ đĩa ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 30 phút.

- Hút hết nghiệm thức và bổ sung 100µl môi trường nuôi cấy có huyết thanh.

- Đem ủ đĩa ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

- Thay môi trường 3 ngày/lần.

- Chụp hình các giếng ở mốc 0 giờ và 7 ngày.

**Tiêu chuẩn đánh giá.** Các mẫu gel collagen ở từng nghiệm thức được chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số có vị trí cố định. Diện tích bề mặt gel được xác định từ hình ảnh thu được với phần mềm ImageJ (Viện y tế Quốc gia Mỹ). Để tiêu chuẩn hóa cho việc so sánh, mức độ co gel được xác định bằng phần trăm của diện tích gel ở thời điểm sau 7 ngày so với diện tích gel ban đầu (0 giờ) trong mỗi giếng. Phần trăm diện tích gel collagen sau 7 ngày càng nhỏ thì khả năng co gel collagen càng cao, điều này đồng nghĩa với Nano berberine có ảnh hưởng làm tăng co gel collagen. Nếu phần trăm diện tích gel collagen của Nano berberine sau 7 ngày tương đương với nhóm chứng dương thì Nano berberine không ảnh hưởng co gel collagen theo nghiên cứu Ngo P (2006) <sup>5</sup>

Phân tích và xử lý số liệu nghiên cứu: Sử dụng phần mềm GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, CA, USA) cho phân tích thống kê. Sử dụng kiểm định t-test cho việc phân tích giữa các nhóm thí nghiệm khác nhau, với mức ý nghĩa thống kê p<0,05.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Bảng 3.1. Nghiệm thức đánh giá tác động của Nano Berberine 2% x 10<sup>-4</sup> lên sự co gel collagen của hGF**

	Ngày 0	Ngày 7		
		CM10	F12	B-CM
Đĩa 1	100%	97,2%	142,8%	115,6%
Đĩa 2	100%	95,9%	123,9%	102,5%
Đĩa 3	100%	89,4%	117,1%	108,2%

F12: Môi trường cơ bản DMEM-F12 (không có bổ sung FBS), CM10: Môi trường nuôi cấy đầy đủ (có bổ sung 10% FBS); B-CM: Môi trường nuôi cấy đầy đủ có bổ sung Nano Berberine 2% x 10<sup>-4</sup>.

Tác động của Berberine lên sự co gel

collagen của HGF được đánh giá thông qua thí nghiệm trên 3 đĩa tại ngày 0 để tham chiếu và 3

thí nghiệm thức CM10, F12, B-CM tại ngày 7 để đánh giá co gel collagen.

**Bảng 3.2. Diện tích co collagen tại ngày 0 và ngày 7**

Ngày	Ngày 0	Ngày 7 TB ± ĐLC [KTC 95%]	p1	p2
CM10	100%	94,2% ± 4,2% [83,8% - 104,5%]	0,135	0,067
F12	100%	127,9% ± 13,3% [94,9% - 161%]	0,068	0,071
B-CM	100%	108,8% ± 6,5% [92,5% - 125%]	0,146	1

Kết quả đánh giá tỉ lệ diện tích mẫu trên đĩa collagen; TB ± ĐLC: Trung bình ± Độ lệch chuẩn

p1: Kiểm định so sánh sự khác biệt giữa ngày 7 với ngày 0;

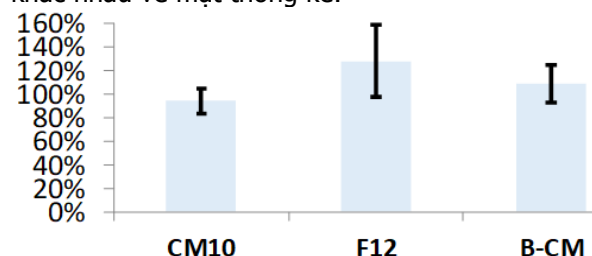
p2: Kiểm định so sánh sự khác biệt tại ngày 7 giữa các nhóm

F12: Môi trường cơ bản DMEM-F12;

CM10: Môi trường nuôi cấy đầy đủ (có bổ sung 10% FBS);

B-CM: Môi trường nuôi cấy đầy đủ có bổ sung Nano Berberine 2% x 10<sup>-4</sup>

Khi so sánh cả 3 thí nghiệm thức với ngày 0, mức độ co gel collagen ở ngày 7 có sự khác biệt khi so sánh giữa các thí nghiệm thức khác. Đặc biệt trong đó, kết quả cho thấy thí nghiệm thức CM10 có sự co đáng kể khi so sánh với F12. Sự co gel collagen giữa thí nghiệm thức CM10 và B-CM không khác nhau về mặt thống kê.



**Biểu đồ 3.3. Phần trăm diện tích co collagen tại ngày 7**

CM10: Môi trường nuôi cấy đầy đủ (có bổ sung 10% FBS);

F12: Môi trường cơ bản DMEM-F12;

B-CM: Môi trường nuôi cấy đầy đủ có bổ sung Nano Berberine 2% x 10<sup>-4</sup>

#### IV. BÀN LUẬN

Nguyên bào sợi nướu dễ phân lập, nuôi cấy và tăng sinh trong điều kiện in vitro làm cho nguyên bào sợi nướu trở thành một nguồn tế bào hấp dẫn cho các nghiên cứu cơ bản và cho các phương thức điều trị dựa trên tế bào. 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 nướu hiện vẫn 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 và nhiều phương thức điều trị mới trong đó có laser. Nghiên cứu này đã sử dụng nguồn tế bào tự phân lập từ mô nướu để làm đối tượng nghiên cứu như cách làm của tác giả Damante CA (2009)<sup>2</sup>. Bản chất trung mô của nguồn tế bào thu nhận cung đã được xác định thông qua quan sát hình thái tế bào và đánh giá sự biểu hiện marker đặc trưng bằng phương pháp nhuộm hóa tế bào miễn dịch và cách nhận diện này là gần giống với nghiên cứu của Damant (2009)<sup>1</sup>.

Theo Yu G (2017)<sup>8</sup> quần thể nguyên bào sợi thu nhận từ mô nướu có khả năng chứa tế bào gốc đa tiềm năng. Vì các yêu cầu về tăng trưởng in vitro tương tự nhau nên hai loại tế bào này có thể được phân lập theo cùng một phương pháp từ cùng một mẫu mô. Việc thêm vào kết quả nhận dạng và xác định tỉ lệ tế bào gốc đa tiềm năng trong quần thể tế bào thu nhận từ nướu răng như nghiên cứu này sẽ giúp mở rộng khả năng ứng dụng cho nguồn tế bào đã phân lập.

Theo nghiên cứu của Vernon R B (2002)<sup>7</sup> một thử nghiệm mức độ co gel collagen điển hình, các tế bào được nhúng trong một mạng lưới hình đĩa (gel) của các sợi collagen loại I tự nhiên sẽ nén các sợi và do đó, làm giảm đường kính của đĩa collagen. Mức độ co thắt của collagen thường được định lượng bằng cách đo đường kính hoặc diện tích của đĩa đệm. Trong quá trình xét nghiệm mức độ co gel collagen, ma sát hoặc độ bám dính (hoặc cả hai) giữa gel và dụng cụ nuôi cấy của chúng có thể khiến gel bị co lại không hoàn toàn hoặc có hình dạng méo mó. Sự xuất hiện như vậy làm giảm khả năng tái lập và độ tin cậy của phép đo kích thước gel. Để giải quyết những vấn đề này, tác giả đã phát triển một thử nghiệm mức độ co gel collagen hỗ trợ bởi dầu để tạo ra một môi trường có độ ma sát và độ bám dính thấp xung quanh gel collagen đang co lại. Thử nghiệm mức độ co gel collagen R được thực hiện với thiết bị đơn giản và được thực hiện dễ dàng, nhạy cảm và luôn tạo ra các gel hoàn chỉnh nhất quán với sự biến dạng tối thiểu.

Ở mô nướu người, nguyên bào sợi là loại tế bào chiếm chủ yếu trong thành phần tế bào của mô liên kết nướu. Trong 1cm<sup>3</sup> mô liên kết nướu

có khoảng 200x106 nguyên bào sợi, chiếm khoảng 5% thể tích. Nguyên bào sợi thường có dạng thoi hay dạng sao với ít nhánh bào tuong, nhân tròn hay bầu dục nằm giữa tế bào. Nguyên bào sợi được bao quanh chặt chẽ bởi các sợi collagen và phân bố quanh các mạch.

Sự co vết thương có thể được mô hình hóa in vitro bằng cách cấy nguyên bào sợi vào gel collagen dạng sợi trong môi trường có huyết thanh. Collagen sẽ co lại trong vòng 1-2 ngày. Sự co gel collagen làm co rút vết thương và thu hẹp vết sẹo. Phương pháp nuôi cấy tế bào trong gel collagen đã trùng hợp mô phỏng môi trường sinh lý phù hợp hơn môi trường nuôi cấy tế bào bình thường vì tế bào có thể nhận những tín hiệu tương tự với điều kiện in vivo <sup>2</sup>

Tác động của Nano Berberine lên sự co gel collagen của hGF được đánh giá thông qua thí nghiệm trên 3 đĩa tại ngày 0 để tham chiếu và 3 nghiệm thức CM, F12, TN tại ngày 7 để đánh giá co gel collagen.

Không ghi nhận sự khác biệt co gel collagen đáng kể về mặt thống kê khi so sánh cả 3 nghiệm thức với ngày 0. Mức độ co gel collagen ở ngày 7 có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Trong đó, nghiệm thức CM có sự co đáng kể khi so sánh với F12. Sự co gel collagen giữa nghiệm thức CM và TN không khác nhau về mặt thống kê.

Mức độ co gel collagen ở ngày 7 có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Trong đó, nghiệm thức CM có sự co đáng kể khi so sánh với F12 và TN. Sự co gel collagen giữa nghiệm thức F12 và TN không khác nhau về mặt thống kê.

Sự tổng hợp collagen từ nguyên bào sợi trong khung ngoại bào chỉ xảy ra khi có sự hiện diện của áp lực oxy cao, sự hiện diện của nghiệm thức CM gia tăng sự khuếch tán oxy vào mô tạo thuận lợi cho quá trình sửa chữa và hình thành collagen của vết thương <sup>5</sup>.

Theo nghiên cứu của Rui Zhou vào năm 2021 tiến hành nghiên cứu về khả năng lành thương nhanh của BBr cho thấy việc điều trị bằng BBr đã làm tăng đáng kể khả năng lành thương tăng cường tổng hợp chất nền ngoại bào. Phân tích sâu hơn cho thấy BBr đã kích hoạt TRxR1 ức chế tín hiệu JNK do đó protein này làm giảm thioredoxin cũng như các chất nền khác, và đóng vai trò trong chuyển hóa selen và bảo vệ chống lại stress oxy hóa và quá trình chết tế bào, từ đó thúc đẩy tăng sinh tế bào. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) bị giảm, yếu tố chuyển đổi tăng trưởng  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) tăng và các

chất ức chế mô của MMP 1 (TIMP1), giúp đẩy nhanh quá trình chữa lành vết thương <sup>6</sup>.

Đây là nghiên cứu bước đầu về ảnh hưởng của dung dịch Nano BBr trên tế bào của mô nha chu (hGF) – in vitro. Nghiên cứu cung cấp bằng chứng về độc tính cũng như các bằng chứng khác về co gel collagen của dung dịch Nano BBr đối với tế bào. Kết quả cũng cho thấy môi trường và điều kiện thích hợp với tác động của Nano BBr lên nguyên bào sợi người.

## V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy co gel collagen được ghi nhận ở nghiệm thức môi trường tiêu chuẩn. Các nghiệm thức của môi trường không bổ sung dinh dưỡng và nghiệm thức thí nghiệm đều không ghi nhận co gel collagen. Tuy vậy, không ghi nhận sự khác biệt co gel collagen đáng kể về mặt thống kê khi so sánh cả 3 nghiệm thức với ngày 0.

Mức độ co gel collagen ở ngày 7 có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Trong đó, nghiệm thức môi trường tiêu chuẩn có sự co đáng kể khi so sánh với nghiệm thức của môi trường không bổ sung dinh dưỡng và nghiệm thức thí nghiệm. Sự co gel collagen giữa nghiệm thức của môi trường không bổ sung dinh dưỡng và nghiệm thức thí nghiệm không khác nhau về mặt thống kê.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Damante CA** (2009), "Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts", *Lasers Med Sci* November, 24 (6), pp. 885-891.
2. **Matthias Chiquet, Christos Katsaros, Dimitris Kleetsas** (2015), "Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair", *Periodontol 2000*, 68 (1), pp. 21-40.
3. **Mirhadi E, M. Rezaee, B. Malaekheh-Nikouei** (2018), "Biomedicine & Pharmacotherapy", Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis, 104, pp. 465-473
4. **Moscato S, et al** (2008), "Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges", *Micron*, 39(5), pp. 569-579.
5. **Ngo P, Ramalingam P, Phillips J A, et al** (2006), "Collagen gel contraction assay", *Methods Mol Biol*, 341, pp.103-9.
6. **Rui Zhou, Changpei Xiang, Guangzhao Cao, et al** (2021), "Berberine accelerated wound healing by restoring TrxR1/JNK in diabetes", *Clinical Science*, 135 (4).
7. **Vernon R B, Gooden M D** (2002), "An improved method for the collagen gel contraction assay". *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 38 (2), pp. 97-101.
8. **Yu G** (2017), "Gingival Fibroblasts as Autologous Feeders for Induced Pluripotent Stem Cells", *J Dent Res*, 95 (1), pp. 110 –118.