

Phát triển mô hình nuôi cấy mảnh mô tử cung *in vitro* ở chuột nhắt trắng ứng dụng trong nghiên cứu liệu pháp tái tạo

Lê Thị Vĩ Tuyết^{1,2,3,*}, Hoàng Thị Diễm Tuyết⁴, Trần Lê Bảo Hà^{1,2,3}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Khoa sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

²Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Bệnh viện Hùng Vương, Việt Nam

Liên hệ

Lê Thị Vĩ Tuyết, Khoa sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: ltvuyet@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 06-02-2023
- Ngày chấp nhận: 17-7-2023
- Ngày đăng: 30-9-2023

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i3.1265>



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Nội mạc tử cung là cấu trúc đặc trưng trải qua các giai đoạn tuần tự liên quan đến sự tái tạo và bong tróc vùng chức năng. Sự tái tạo được cho là phát sinh từ cấu trúc mô đệm và các tế bào gốc cư trú tại lớp đáy của nội mạc. Nhiều bệnh lý nội mạc tử cung ảnh hưởng đến quá trình này dẫn đến mất khả năng sinh sản. Các nghiên cứu liệu pháp tái tạo còn nhiều hạn chế chủ yếu do thiếu các mô hình ở mức độ động vật dễ tiếp cận. Bài báo này trình bày mô hình nuôi cấy tiếp xúc không khí (air-liquid) được thiết lập nhằm khảo sát điều kiện phù hợp trong duy trì sự phát triển mô tử cung *in vitro* ở chuột nhắt trắng. Mô hình nuôi cấy chìm được sử dụng làm đối chứng. Quá trình nuôi cấy kéo dài 16 ngày và các đánh giá về cấu trúc (nhuộm H&E), sức sống (nhuộm sống/chết) và chức năng (cấy phôi) của mô tử cung được thực hiện. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mô tử cung chuột nhắt trắng được nuôi cấy trong mô hình air-liquid có sự phục hồi cấu trúc mô, cấu trúc mô được duy trì đến ngày 12 và suy thoái vào ngày 16. Trong khi đó, mô hình nuôi cấy chìm cho thấy sự suy thoái thể hiện rõ từ ngày 12. Bên cạnh đó, sức sống của mô được nuôi trong điều kiện này cũng cho thấy sự vượt trội so với mô hình nuôi cấy chìm (P-value < 0,05). Ngoài ra, hiện tượng bám của phôi trên bề mặt nội mạc tử cung chỉ được ghi nhận ở nghiệm thức nuôi mô air-liquid. Từ đó có thể thấy, điều kiện air-liquid giúp duy trì cấu trúc mô ổn định trong 12 ngày và cấu trúc này phù hợp trong nghiên cứu điều trị tổn thương mô nội mạc tử cung *in vitro* ở chuột nhắt trắng với thời gian khảo sát lên đến 3 chu kỳ động dục.

Từ khoá: Nội mạc tử cung, nuôi cấy mô, sự làm tổ phôi, sự tái tạo

GIỚI THIỆU

Quá trình tái tạo nội mạc tử cung giữ vai trò quan trọng đối với các chu kỳ điều hòa sự bong tróc và sửa chữa mô trong chu kỳ kinh nguyệt và để chuẩn bị tử cung cho sự làm tổ phôi và mang thai. Tương tác giữa phôi với cơ thể mẹ là cần thiết để bắt đầu, duy trì thai kỳ và được cho là nguyên nhân gây ra tỷ lệ chết phôi sớm khi bị rối loạn¹. Vai trò tiếp xúc đầu tiên của nội mạc tử cung với phôi trong quá trình làm tổ là các tế bào biểu mô nội mạc tử cung, một lớp các tế bào biểu mô trụ đơn, được xác định về cấu trúc và chức năng bởi sự phân bố phân cực của các bào quan, protein và sự hình thành cấu trúc giả tầng¹. Chức năng, sự phát triển và tồn tại của các tế bào biểu mô tương quan với mức độ phân cực của chúng^{2,3}. Tuy nhiên, khi được nuôi trong điều kiện nuôi cấy chìm, tế bào biểu mô không duy trì kiểu hình trong thời gian nuôi cấy kéo dài và biểu hiện những thay đổi rõ rệt về tính toàn vẹn hình thái và chức năng của chúng^{4,5}. Do đó, việc nghiên cứu liệu pháp thúc đẩy phục hồi chức năng nội mạc tử cung thông qua thử nghiệm tương tác phôi và nội mạc tử cung gặp nhiều thách thức. Các nỗ lực trong nhiều năm để nuôi cấy toàn bộ hoặc một số phần sừng tử cung của chuột đều vô ích⁶. Một trong

những lý do chính của sự thất bại là sừng tử cung bao gồm các loại tế bào không đồng nhất được sắp xếp phân lớp đảm bảo cho sự toàn vẹn về cấu trúc và chức năng, trong khi các hệ thống trong ống nghiệm không đủ hỗ trợ để duy trì sự sắp xếp này. Một trở ngại khác là khó xác định vị trí phôi bằng kính hiển vi và các vị trí làm tổ tiếp theo bên trong lòng tử cung được nuôi cấy⁶. Để giải quyết vấn đề này, việc thay đổi điều kiện nuôi cấy, thiết lập môi trường nuôi mô phỏng tương tác bên trong cơ thể là cần thiết.

Mô hình nuôi cấy tiếp xúc không khí (air-liquid) là môi trường tiềm năng trong việc duy trì đặc điểm cấu trúc mô có thành phần biểu mô như nội mạc tử cung bởi vì trong cấu trúc này, các tế bào biểu mô có thể vừa tiếp xúc với môi trường lòng vừa tiếp xúc không khí phù hợp với đặc tính phát triển *in vivo* của chúng. Bên cạnh đó, các thành phần cấu trúc mô nội mạc tử cung được bảo toàn và thử nghiệm liệu pháp điều trị hay đánh giá tương tác phôi với nội mạc tử cung có khả năng thực hiện dễ dàng trên mô hình này. Trong nghiên cứu này, điều kiện nuôi cấy tiếp xúc không khí (air-liquid) *in vitro* của mảnh mô tử cung ở chuột nhắt trắng được thiết lập và thời gian nuôi cấy được khảo sát. Từ đó, nghiên cứu khẳng định vai trò

Trích dẫn bài báo này: Tuyết L T V, Tuyết H T D, Hà T L B. **Phát triển mô hình nuôi cấy mảnh mô tử cung *in vitro* ở chuột nhắt trắng ứng dụng trong nghiên cứu liệu pháp tái tạo.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2023; 7(3):2675-2685.

của điều kiện nuôi cấy tiếp xúc không khí và để xuất khoảng thời gian phù hợp cho các liệu pháp tái tạo có thể được ứng dụng trong mô hình này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng cái *Mus musculus* var. Albino (8–12 tuần tuổi), cân nặng 30–35 gram, được chăm sóc tại Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM). Tại phòng thí nghiệm, chuột được cho ăn uống tự do, được kiểm soát nhiệt độ 20–26°C, chu kỳ sáng tối (12 giờ sáng và 12 giờ tối). Tổng số chuột thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu là 12. Nghiên cứu này được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật (Số: 580B/KHTN-ACUCUS) của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM.

Phương pháp thu nhận mô tử cung

Để thu nhận mô tử cung đồng bộ ở giai đoạn động dục, chuột ở giai đoạn không động dục được lựa chọn thông qua thực hiện tiêu bản mẫu phết tế bào âm đạo. Chuột có mật độ tế bào bạch cầu cao trong tiêu bản mẫu âm đạo được lựa chọn để kích thích động dục. Các liều hormone PMSG 5 IU (ProSpec, Mỹ) và hCG 5 IU (LG Chem Ltd, Hàn Quốc) được tiêm tương ứng vào phúc mạc và bắp đùi chuột với khoảng cách giữa 2 liều tiêm là 48 giờ. Sừng tử cung được thu nhận sau khi tiêm hCG 14–16 giờ và sau đó được cắt đôi theo chiều dọc để lộ khoang tử cung (Hình 1). Các mảnh mô kích thước 2x2 mm được thu nhận bằng dao mổ.

Phương pháp nuôi cấy mô tử cung *in vitro*

Mảnh mô tử cung với kích thước 2 x 2 mm được thu nhận và được nuôi cấy trong hai điều kiện bao gồm nuôi cấy tiếp xúc không khí (air-liquid) và nuôi cấy chìm. Các mảnh mô được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid bằng cách đặt mảnh mô vào giếng chèn của đĩa chèn 12 giếng. Giếng chèn chứa mô tử cung được đặt vào đĩa tương ứng có chứa 1 mL môi trường nuôi mô gồm: DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, Mỹ) chứa 20% FBS (Sigma-Aldrich, Mỹ), 10 nM estradiol (Sigma-Aldrich, Mỹ), 100 nM progesterone (Sigma-Aldrich, Mỹ), 10 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich, Mỹ), 1% ITS (Sigma-Aldrich, Mỹ) và 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Mỹ) (Hình 2). Các mảnh mô được nuôi cấy chìm trong cùng môi trường nuôi cấy được sử dụng làm đối chứng (mảnh mô ngập hoàn toàn trong môi trường nuôi). Đĩa nuôi được ủ ở 37°C, 5% CO₂ (Tủ nuôi Panasonic MCO-170AICUV, Nhật) và môi trường nuôi cấy được thay mỗi hai ngày. Mỗi giếng nuôi chứa 3–6 mảnh mô, thời gian nuôi cấy kéo dài 16 ngày.

Đánh giá sức sống mô nội mạc tử cung

Mảnh mô tử cung kích thước 2 x 2 mm được đánh giá sức sống ở cả hai điều kiện nuôi cấy trong suốt thời gian khảo sát, tại các mốc thời gian ngày thứ 4, 8, 12 và 16 của quá trình nuôi cấy. Mỗi mảnh mô được rửa trong PBS và sau đó được ủ với 100 μ L hỗn hợp thuốc nhuộm đánh giá sức sống là 4 μ M Calcein AM và 6 μ M EthD1 (Live/dead kit, L3224, Thermo, Mỹ). Mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Mô được ghi nhận hình ảnh dưới kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, Nhật Bản).

Đánh giá cấu trúc nội mạc tử cung thông qua mô học

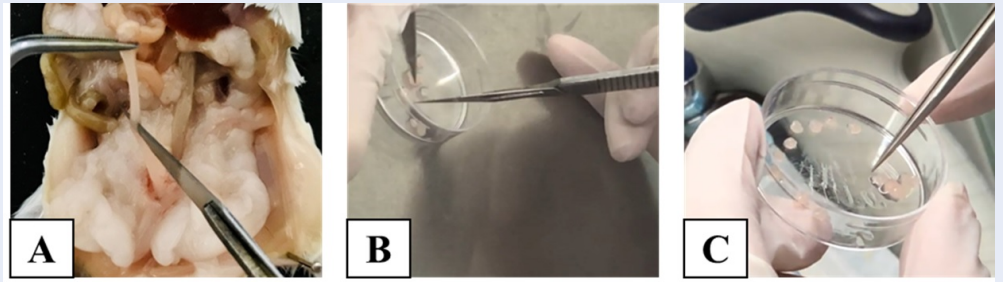
Để đánh giá cấu trúc mô tử cung, các mảnh mô sau khi được thu nhận tại các mốc thời gian khảo sát tiếp tục được cố định trong 10% formalin (Merck, Đức), được bảo quản ở 4 °C qua đêm. Sau đó, các mô này được rửa, khử nước và nhúng trong paraffin để tạo các lát cắt kích thước 5 μ m. Các lát cắt mô được cố định trên lame và được nhuộm với hematoxylin và eosin (H&E, Sigma-Aldrich, Mỹ). Đánh giá này được thực hiện ở cả nội dung khảo sát điều kiện nuôi cấy mảnh mô tử cung *in vitro* tại các mốc thời gian ngày 0, 4, 8, 12 và 16 của quá trình nuôi cấy.

Đánh giá chức năng nội mạc tử cung thông qua khả năng làm tổ phôi

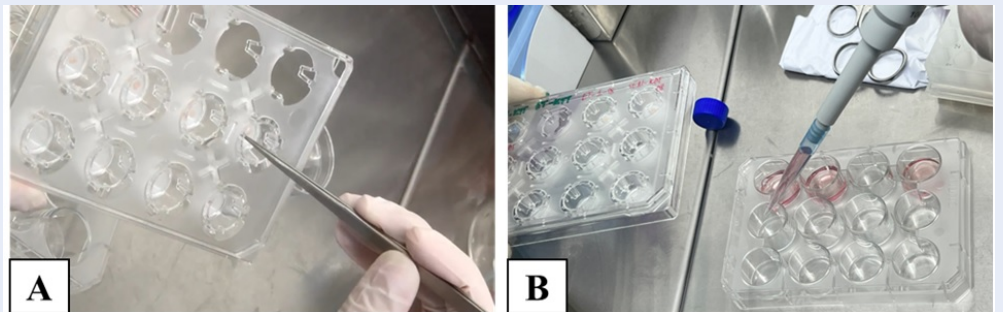
Mô tử cung sau khi được nuôi cấy được đánh giá chức năng hỗ trợ làm tổ của phôi tại thời điểm có hiệu quả tái tạo cấu trúc cao nhất (dựa trên kết quả mô học). Phôi nang được thu nhận bằng cách cho chuột nhắt trắng cái đã được gây siêu bài noãn (10 IU PMSG và 10 IU hCG) giao phối tự nhiên với chuột đực (theo tỉ lệ 1 đực: 2 cái). Nút nhày âm đạo là dấu hiệu nhận diện quá trình giao phối diễn ra thành công. Sau khi giải phẫu, phôi từ sừng tử cung được thu nhận. Thời điểm thu nhận phôi nang là ngày phôi 4,5 (sau liều tiêm hCG 4,5 ngày). Phôi được thu nhận dưới kính hiển vi đảo ngược (Olympus, Nhật Bản) và được bơm lên trên bề mặt nội mạc tử cung dưới kính hiển vi soi nổi (Zeiss SteREO Discovery.V8, Đức). Mô tử cung sau khi được chuyển phôi tiếp tục được nuôi cấy. Đánh giá mô học được thực hiện sau 4 ngày.

Phân tích thống kê dữ liệu

Phần mềm GraphPad Prism 9 và ImageJ được sử dụng để phân tích dữ liệu cường độ ánh sáng ảnh có tín hiệu huỳnh quang với thử nghiệm T-test VÀ ONE-way ANOVA (được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn [Mean \pm SD]). Mục đích kiểm tra cường độ tín hiệu nhận huỳnh quang trong mảnh mô



Hình 1: Thao tác thu nhận mảnh mô tủy xương. A. Tách đôi mô tủy xương theo chiều dọc; B. Thao tác cắt mô tủy xương 2 x 2 mm; C. Thu mô.



Hình 2: Nuôi cấy mô tủy xương *in vitro*. A. Đặt mô tủy xương vào giếng chèn; B. Bổ sung môi trường vào đĩa nuôi.

tủy xương ở 2 điều kiện nuôi theo thời gian. Giá trị P -value $\leq 0,05$ được xác định có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức.

KẾT QUẢ

Đánh giá sức sống của mô

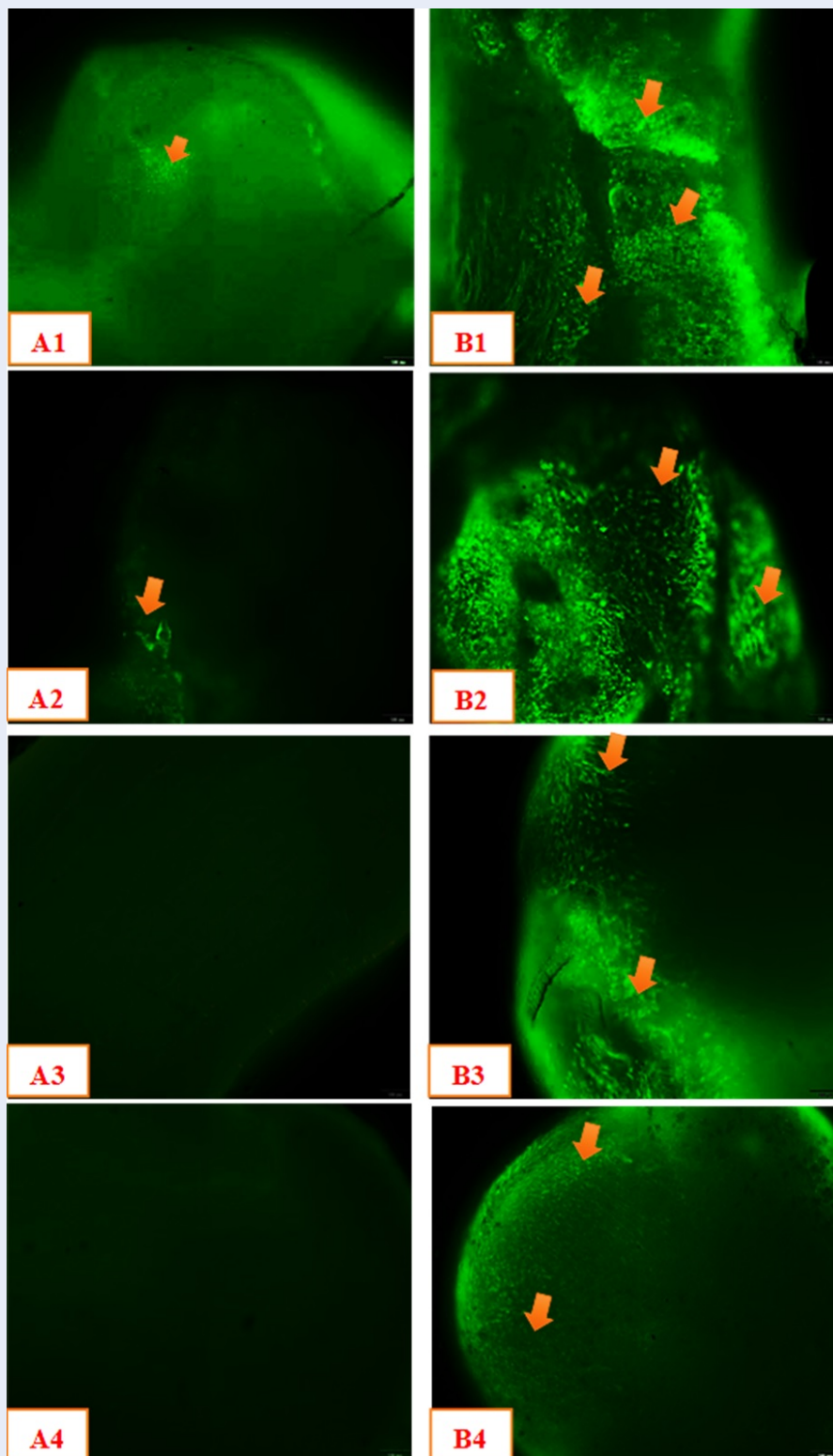
Kết quả nhuộm huỳnh quang đánh giá sức sống mảnh mô tủy xương cho thấy có sự khác biệt về tín hiệu huỳnh quang ánh sáng xanh (Calcein AM, bắt màu các tế bào sống) và ánh sáng đỏ (EthD1, bắt màu các tế bào chết) giữa các mảnh mô được nuôi cấy trong hai điều kiện nuôi khác nhau. Trong đó, các mảnh mô được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang xanh trong suốt 16 ngày nuôi cấy (Hình 3B1–B4). Tín hiệu này chỉ quan sát được đến ngày thứ 8 ở điều kiện nuôi mô chìm (Hình 3A1–A4). Ngược lại, tín hiệu huỳnh quang đỏ đã xuất hiện nhiều vào ngày thứ 4 và kéo dài đến ngày 16 ở nghiệm thức nuôi mô chìm (Hình 4A1–A4). Tín hiệu này chưa rõ ràng vào ngày thứ 4 ở mô được nuôi cấy tiếp xúc không khí (Hình 4B1). Nó trở nên rõ ràng vào ngày thứ 8 và kéo dài đến ngày 16 (Hình 4B2–B4) ở điều kiện này.

Để có nhận định rõ ràng hơn về sức sống mảnh mô trong hai điều kiện nuôi, cường độ huỳnh quang được đo và ghi nhận lại. Kết quả đánh giá về cường độ

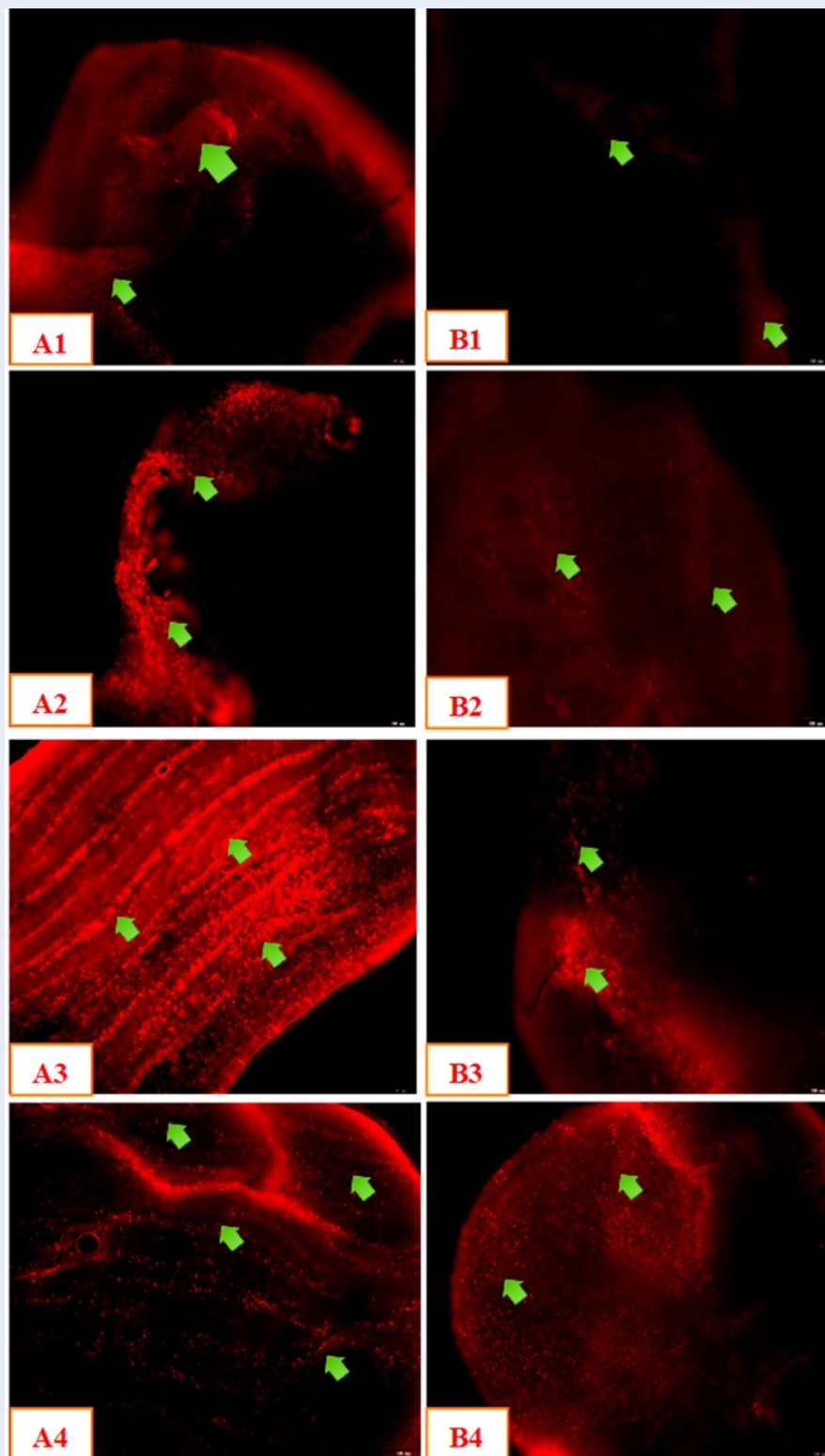
huỳnh quang cho thấy rằng, tín hiệu huỳnh quang xanh có xu hướng giảm ở cả hai điều kiện nuôi cấy sau 16 ngày, tuy vậy, các mảnh mô được nuôi cấy trong điều kiện tiếp xúc không khí có cường độ huỳnh quang xanh cao hơn so với các mảnh mô được nuôi cấy chìm và sự khác biệt này bắt đầu được thể hiện từ ngày 8 ($P < 0,05$). Ở tín hiệu huỳnh quang đỏ, các mảnh mô được nuôi cấy *in vitro* đều có xu hướng bất tín hiệu tăng dần theo thời gian. Các mô được nuôi cấy chìm phát tín hiệu huỳnh quang đỏ cao hơn so với mô được nuôi cấy tiếp xúc không khí. Sự khác biệt này thể hiện rõ ở 8 ngày đầu ($P < 0,05$). Tuy vậy, từ ngày 12 trở đi, tín hiệu huỳnh quang đỏ không có sự khác biệt giữa hai điều kiện nuôi ($P > 0,05$) (Hình 5).

Đánh giá cấu trúc của mô

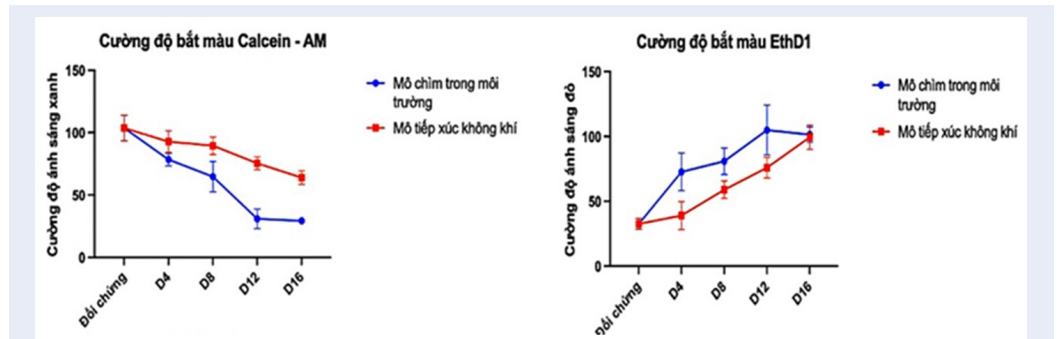
Bên cạnh việc đánh giá sức sống mảnh mô, cấu trúc mô học với sự thay đổi các thành phần cấu thành nội mạc tủy xương cũng được đánh giá nhằm xác định tác động của điều kiện nuôi cấy lên mảnh mô tủy xương theo thời gian. Kết quả quan sát cho thấy, có sự khác biệt về hình thái các lớp nội mạc tủy xương khi nuôi cấy, thí dụ sự thay đổi lớp tế bào biểu mô phủ, hệ thống ống tuyến và lớp nền (stromal) trong nghiệm



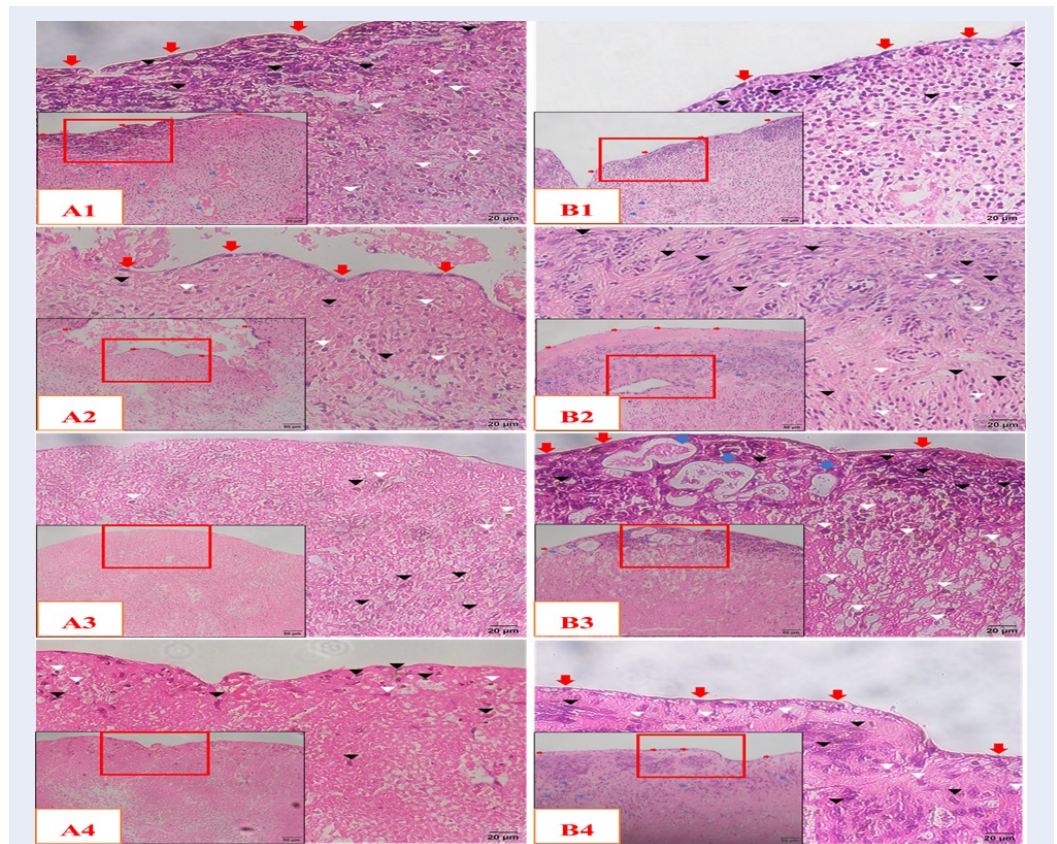
Hình 3: Mảnh mô tử cung được nhuộm Calcein AM sau 16 ngày nuôi (10X). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô chìm ở ngày 4 (A1), ngày 8 (A2), ngày 12 (A3), ngày 16 (A4). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô tiếp xúc không khí ở ngày 4 (B1), ngày 8 (B2), ngày 12 (B3), ngày 16 (B4). Mũi tên cam: tế bào sống.



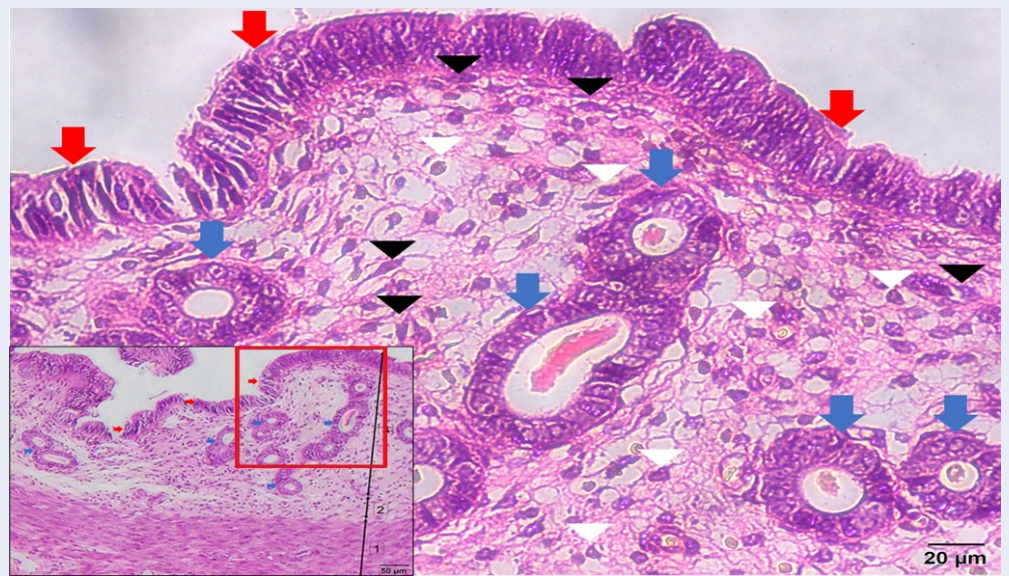
Hình 4: Mảnh mô tử cung được nhuộm EthD1 sau 16 ngày nuôi (10X). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô chìm ở ngày 4 (A1), ngày 8 (A2), ngày 12 (A3), ngày 16 (A4). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô tiếp xúc không khí ở ngày 4 (B1), ngày 8 (B2), ngày 12 (B3), ngày 16 (B4). Mũi tên xanh: tế bào chết.



Hình 5: Đồ thị biểu hiện cường độ ánh sáng huỳnh quang trong hai điều kiện nuôi



Hình 6: Cấu trúc mảnh mô tử cung ở hai điều kiện nuôi theo thời gian (20X, 40X). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô chìm ở ngày 4 (A1), ngày 8 (A2), ngày 12 (A3), ngày 16 (A4). Mảnh mô tử cung trong điều kiện nuôi cấy mô air-liquid ở ngày 4 (B1), ngày 8 (B2), ngày 12 (B3), ngày 16 (B4). Mũi tên xanh: Tuyến tử cung; Mũi tên đỏ: Biểu mô phủ nội mạc tử cung; Đầu mũi tên đen: tế bào mô đệm hình thoi; Đầu mũi tên trắng: tế bào mô đệm hình oval.



Hình 7: Cấu trúc mảnh mô tử cung sau thu nhận (trước nuôi cấy) (20X, 40X). [1] Lớp cơ trơn; [2] Lớp đáy nội mạc tử cung; [3] Lớp chức năng nội mạc tử cung; Mũi tên xanh: Tuyến tử cung; Mũi tên đỏ: Biểu mô phủ nội mạc tử cung; Đầu mũi tên đen: tế bào mô đệm hình thoi; Đầu mũi tên trắng: tế bào mô đệm hình oval.

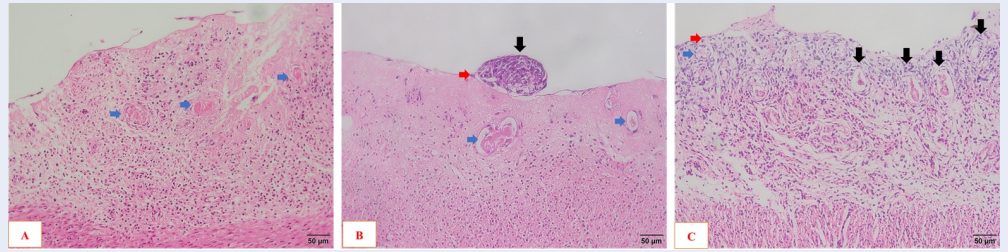
thức nuôi mô chìm và nuôi mô tiếp xúc không khí (air-liquid).

Đầu tiên, về tế bào biểu mô phủ, có sự xuất hiện của tế bào biểu mô phủ ở mảnh mô được nuôi cấy ở cả hai điều kiện khảo sát, tuy vậy, thời gian xuất hiện của tế bào này ở những thời điểm là khác nhau giữa các nghiệm thức. Ở mô hình mảnh mô được nuôi cấy air-liquid, tế bào biểu mô phủ xuất hiện ở tất cả các thời điểm khảo sát (Hình 6B1–B4, mũi tên đỏ). Trong khi đó, tế bào này chỉ xuất hiện ở hai mốc thời gian đầu khảo sát (ngày 4 và ngày 8) ở mảnh mô được nuôi cấy chìm (Hình 6A1–A4, mũi tên đỏ). Tại tất cả các mốc thời gian khảo sát, ở cả hai điều kiện nuôi cấy, tế bào biểu mô phủ chưa đạt được cấu trúc trụ đơn giả tầng, cấu trúc đặc trưng cho giai đoạn cửa sổ làm tổ (Hình 7, mũi tên đỏ). Tuy vậy, dạng đa giác được ghi nhận ở những tế bào biểu mô phủ được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid ở tất cả các mốc thời gian khảo sát (Hình 6B1–B4) và vào thời điểm ngày 4 ở điều kiện nuôi cấy chìm. Dạng hình thoi và có nhiều lông nhưng là đặc trưng nuôi cấy mô chìm ở ngày 8 và sau đó hoàn toàn mất đi từ ngày 12 (Hình 6A1–A4). Hệ thống ống tuyến tử cung giữ vai trò quan trọng trong việc tạo dịch tiết tử cung và kích hoạt biểu hiện thụ thể trong tương tác phôi và nội mạc tử cung. Sự hiện diện và hình dạng tuyến, các tế bào biểu mô tuyến phản ánh chức năng của chúng (Hình 7, mũi tên xanh). Kết quả đánh giá mô học cho thấy, chỉ tại thời điểm ngày 8 và ngày 12 của thử nghiệm nuôi mô air-liquid, tuyến

tử cung mới có hình dạng đặc trưng với lớp đơn các tế bào biểu mô bao phủ quanh lòng ống tuyến. Trong đó, thời điểm ngày 8 còn ghi nhận được những cấu trúc giống tuyến đang hình thành và hiện tượng tiết dịch được ghi nhận ở tuyến tử cung tại thời điểm ngày 12 (Hình 6B2–B3, mũi tên xanh), cấu trúc này dần mất đi vào thời điểm ngày 16 của quá trình nuôi cấy (Hình 6B4, mũi tên xanh). Hoàn toàn không ghi nhận được cấu trúc tuyến hoàn chỉnh này ở điều kiện nuôi cấy chìm (Hình 6A1–A4). Về sự hiện diện của các tế bào mô đệm, các tế bào này tồn tại ở những hình dạng khác nhau trong suốt quá trình nuôi cấy ở cả 2 điều kiện nuôi. Cụ thể, vào thời điểm ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy, tế bào mô đệm tồn tại ở cả hai dạng bao gồm dạng hình thoi (đầu mũi tên đen) và dạng hình oval (đầu mũi tên trắng). Trong đó, tế bào có dạng hình thoi phân bố chủ yếu ở phía trên của lớp chức năng (gắn biểu mô nội mạc tử cung). Tế bào có dạng oval phân bố rộng khắp phía bên dưới của lớp chức năng với khoảng cách giữa các tế bào lớn hơn. Tuy nhiên, mật độ tế bào này giảm đáng kể và gần như mất đi và mất dần dạng oval ở nghiệm thức nuôi cấy chìm.

Đánh giá chức năng mô tử cung sau nuôi cấy

Kết quả quan sát cấu trúc vị trí có phôi ở nghiệm thức nuôi cấy air-liquid chỉ ra rằng, phôi chỉ gắn kết trên bề mặt nội mạc tử cung, chưa quan sát thấy dấu hiệu xâm lấn vào bên trong mô (Hình 8B, mũi tên đen). Mặc dù



Hình 8: Hình ảnh phôi gắn kết trên bề mặt mô nội mạc tử cung. A. Mảnh mô được nuôi cấy chìm; B. Mảnh mô được nuôi cấy air-liquid; C. Mảnh mô tử cung sẵn sàng cho phôi làm tổ (chứng dương). Mũi tên xanh: Tuyến tử cung; Mũi tên đỏ: Biểu mô phủ nội mạc tử cung; Mũi tên đen: Phôi.

vậy, có ghi nhận được hiện tượng tế bào mô đệm quá thừa thớt, tồn tại nhiều vùng vô bào trong cấu trúc vùng chức năng. Khi so sánh với chứng dương (phôi được cấy lên nội mạc tử cung sẵn sàng cho sự làm tổ), phôi có khả năng xâm lấn vào sâu trong nội mạc ở nhóm nghiệm thức này (Hình 8C, mũi tên đen). Không quan sát được phôi ở mảnh mô tử cung được nuôi cấy chìm (Hình 8A).

THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát cho thấy mảnh mô nội mạc tử cung được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid có hình thái cấu trúc mô và sức sống tốt hơn so với các mảnh mô được nuôi cấy chìm. Để giải thích cho hiện tượng này, về mặt cấu trúc mô học, nội mạc tử cung là một cấu trúc rất phức tạp. Đặc biệt trong đó, các tế bào biểu mô bao gồm biểu mô phủ dạng cột giả tầng và biểu mô tuyến trụ đơn với không bào rộng bên trong rất cần thiết trong tương tác phôi và nội mạc tử cung. Bên cạnh đó, sự hiện diện của các tế bào mô đệm với hình dạng oval và phân bố rời rạc. Để đảm bảo duy trì cấu trúc và sức sống nội mạc, điều kiện nuôi cấy air-liquid là cần thiết. Bởi lẽ, các tế bào biểu mô là những tế bào tương tác bề mặt và có vai trò trong việc tạo vi môi trường vi mô bằng cách thấm và tiết dịch⁷. Để duy trì chức năng này, việc nuôi cấy chìm trong dịch môi trường là không phù hợp⁸. Mặt khác, trong phương pháp nuôi cấy chìm, các tương tác tế bào-tế bào và tế bào-môi trường ngoại bào không được thể hiện. Những tương tác này chịu trách nhiệm cho sự biệt hóa, tăng sinh, sức sống, biểu hiện của gene và protein, khả năng đáp ứng với các kích thích và các chức năng khác của tế bào⁹⁻¹¹. Chính vì vậy, sức sống mô, cấu trúc mô được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid duy trì tốt hơn so với điều kiện nuôi cấy chìm. Kết quả này có sự tương đồng với các nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Muruganandan và cộng sự (2020) cho thấy, khi mô tử cung được nuôi cấy trong điều kiện 3D có sử dụng giá thể collagen, mảnh mô có đáp ứng với

các hormone trong môi trường nuôi cấy thông qua sự thay đổi về hình thái của các cấu trúc tuyến và tế bào biểu mô tuyến⁸. Hay nghiên cứu của Chen và Schoen (2019) cũng cho thấy, điều kiện nuôi cấy 3D giúp hỗ trợ duy trì cấu trúc và chức năng lớp biểu mô nội mạc tử cung⁷. Mặc dù các nghiên cứu trước đây cũng xác định hiệu quả của điều kiện nuôi cấy air-liquid ở mảnh mô tử cung. Tuy nhiên, khảo sát lần này thực hiện khảo sát thời gian nuôi cấy dài hơn, khoảng 4 chu kỳ động dục ở chuột nhắt trắng, thay vì 24 giờ hay 3 ngày trong nghiên cứu trên cùng đối tượng^{6,12} hay $\frac{3}{4}$ chu kỳ ở người⁸. Hơn nữa, điều kiện air-liquid được thiết kế trong khảo sát này là hệ thống đĩa chèn, dễ dàng thực hiện nuôi cấy, là mô hình phù hợp trong đánh giá tương tác phôi-nội mạc tử cung trong các nghiên cứu tái tạo nội mạc tử cung thay vì điều kiện nuôi cấy với mô được phủ collagen khó khăn trong việc đánh giá làm tổ phôi và quy trình thực hiện phức tạp⁸.

Tuy vậy, kết quả khảo sát cũng chỉ ra rằng, các mảnh mô tử cung được nuôi cấy trong điều kiện air-liquid với môi trường nuôi cấy có bổ sung FBS, estrogen, progesterone và ITS vẫn chưa thể duy trì được cấu trúc nội mạc tử cung ban đầu với sự trưởng thành về hình thái của các tế bào biểu mô phủ và biểu mô tuyến. Bên cạnh đó, các tế bào mô đệm vẫn chưa hoàn toàn đạt được hình thái oval. Từ đó có thể thấy, mặc dù điều kiện nuôi cấy có khả năng duy trì sức sống mô trong 12 ngày nhưng các yếu tố kích thích từ môi trường vẫn chưa đủ để giúp duy trì được hình thái tế bào trong mô. Cụ thể, các tế bào biểu mô chưa có cấu trúc giả tầng và chưa có hiện tượng phân cực với không bào lớn như hình thái đặc trưng đã được chứng minh trong công bố của Mazur, M. T. và cộng sự trước đây¹³. Bên cạnh đó, kết quả đánh giá khả năng làm tổ của phôi cũng cho thấy kết quả tương tự về sự chưa sẵn sàng của nội mạc tử cung. Cụ thể, phôi được ghi nhận chỉ bám dính và không xâm lấn vào sâu trong nội mạc. Sự xâm lấn của phôi vào nội mạc tử cung

phụ thuộc vào sự sẵn sàng của nội mạc tử cung thông qua hình thái và chức năng của tế bào nội mạc. Sự tiết cytokine, yếu tố tăng trưởng của các tế bào biểu mô, tuyến tử cung và các tế bào mô đệm đã biệt hóa (hình dạng oval, phân bố rời rạc) là điều kiện để thúc đẩy phôi xâm lấn vào sâu bên trong thông qua tương tác phôi–nội mạc thúc đẩy sự hợp bào lá nuôi phôi và tiết enzyme từ cấu trúc này¹⁴. Tuy vậy, trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, hình thái các tế bào nội mạc chưa đạt đến trạng thái sẵn sàng cho quá trình xâm lấn này.

Mặc dù vậy, thời gian mô tử cung chuột được duy trì sức sống sau 12 ngày nuôi cấy tương ứng với 3 chu kỳ động dục ở loài động vật này mở ra tiềm năng ứng dụng mô hình nuôi cấy vào các nghiên cứu tái tạo nội mạc tử cung thời gian dài. Ngoài ra, việc mô tiếp tục duy trì được sức sống sau 4 ngày tính từ thời điểm cho hiệu quả tái tạo mô cao nhất (ngày 8) của quá trình nuôi cấy cũng mang ý nghĩa lớn cho các đánh giá tương tác phôi–nội mạc tử cung sau điều trị hai chu kỳ động dục (ở chuột), thời gian này đủ để khảo sát quá trình gắn kết và xâm nhập của phôi vào nội mạc tử cung¹⁵.

KẾT LUẬN

Điều kiện nuôi cấy air–liquid phù hợp hơn nuôi cấy chìm trong mô hình nuôi cấy mảnh mô tử cung *in vitro*. Cụ thể, mô tử cung được nuôi cấy trong điều kiện air–liquid duy trì được sức sống ổn định trong 8 ngày đầu, không khác biệt với mảnh mô ngay sau thu nhận ($P > 0,05$), sức sống mô có hiện tượng giảm dần từ ngày 12 ($P < 0,05$). Tuy vậy, sức sống của mô được nuôi cấy trong điều kiện này vượt trội hơn hẳn mô được nuôi cấy chìm ($P < 0,05$) và duy trì đến ngày 12 của quá trình nuôi cấy. Bên cạnh đó, cấu trúc mô học cũng chỉ ra rằng, điều kiện nuôi cấy air–liquid hỗ trợ cho việc duy trì cấu trúc mảnh mô tử cung tốt hơn nuôi cấy chìm. Các liệu pháp tái tạo nội mạc tử cung có thể được đánh giá hiệu quả *in vitro* trên mô hình nuôi cấy có air–liquid này trước khi được thực hiện trên động vật và lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số 615/QĐ-SKH-CN

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

EGF Epidermal growth factor: Yếu tố tăng trưởng biểu bì

FBS Fetal bovine serum: Huyết thanh bào thai bò

hCG Human chorionic gonadotropin: Kích dục tố màng đệm người

ITS Insulin transferrin selenium

PMSG Pregnant Mare Serum Gonadotropin: kích dục tố huyết thanh ngựa chửa

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam đoan không có xung đột lợi ích trong việc công bố bài báo này.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Lê Thị Vĩ Tuyết: Thực hiện thí nghiệm, viết bản thảo và liên hệ gửi bản thảo.

Hoàng Thị Diễm Tuyết, Trần Lê Bảo Hà: tham gia hướng dẫn, chỉnh sửa bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen S, Palma-Vera S, Langhammer M, Galuska S, Braun B, Krause E. An air-liquid interphase approach for modeling the early embryo-maternal contact zone. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-7; Available from: <https://doi.org/10.1038/srep42298>.
2. Bissell MJ. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *Int Rev Cytol*. 1981;70:27-100; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61130-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61130-4).
3. Inman JL, Bissell MJ. Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *J Biol*. 2010;9(1):2; Available from: <https://doi.org/10.1186/jbiol213>.
4. Danesh Mesgaran S, Sharbati J, Einspanier R, Gabler C. mRNA expression pattern of selected candidate genes differs in bovine oviductal epithelial cells *in vitro* compared with the *in vivo* state and during cell culture passages. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):44; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0176-7>.
5. Rottmayer R, Ulbrich SE, Kölle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F et al. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*. 2006;132(4):637-48; Available from: <https://doi.org/10.1530/rep.1.01136>.
6. Tan Y, Tan D, He M, Gu M, Wang Z, Zeng G et al. A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice. *Biol Reprod*. 2005;72(3):556-61; Available from: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032821>.
7. Chen S, Schoen J. Air-liquid interface cell culture: from airway epithelium to the female reproductive tract. *Reprod Domest Anim*. 2019;54; Suppl 3:38-45; Available from: <https://doi.org/10.1111/rda.13481>.
8. Muruganandan S, Fan X, Dhal S, Nayak NR. Development of a 3D tissue slice culture model for the study of human endometrial repair and regeneration. *Biomolecules*. 2020;10(1):136; Available from: <https://doi.org/10.3390/biom10010136>.
9. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012;125(13):3015-24; Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>.
10. Von Der Mark K, Gauss V, Von Der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 1977;267(5611):531-2; PMID: 559947. Available from: <https://doi.org/10.1038/267531a0>.
11. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77; Available from: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.

12. Ye TM, Pang RT, Leung CO, Liu W, Yeung WS. Development and characterization of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1581-9; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.013>.
13. Mazur MT, Kurman RJ. Normal endometrium and infertility evaluation. *Diagnosis of endometrial biopsies and curetings*. Springer; 2005. p. 7-33; Available from: https://doi.org/10.1007/978-0-387-26321-2_2.
14. Benkhalifa M, Zayani Y, Bach V, Copin H, Feki M, Benkhalifa M et al. Does the dysregulation of matrix metalloproteinases contribute to recurrent implantation failure? *Expert Rev Proteomics*. 2018;15(4):311-23; Available from: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1464915>.
15. Yoshinaga K. A sequence of events in the uterus prior to implantation in the mouse. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(8):1017-22; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0093-z>.

Development of an *in vitro* mouse cultured uterine tissue model for the endometrial regenerative therapy

Tuyet Thi Vi Le^{1,2,3,*}, Tuyet Thi Diem Hoang⁴, Ha Le Bao Tran^{1,2,3}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Department of Physiology and Animal Biotechnology, Biology and Biotechnology Faculty, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

²Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

³Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Hung Vuong Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Tuyet Thi Vi Le, Department of Physiology and Animal Biotechnology, Biology and Biotechnology Faculty, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: ltvuyet@hcmus.edu.vn

History

- Received: 06-02-2023
- Accepted: 17-7-2023
- Published: 30-9-2023

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i3.1265>



ABSTRACT

The endometrium is a characteristic structure that undergoes sequential phases involving regeneration and shedding of the functional area. It is believed that the stroma and stem cells found in the endothelium's basal layer are what cause regeneration. This process is impacted by numerous endometrial diseases which decrease the fertility. The absence of readily available animal-level models is the fundamental constraint on the research into the regenerative treatment. This paper presented an air-liquid culture model, established to investigate the suitable conditions for maintaining the survival of mouse uterine tissue *in vitro*. The submerged culture model was used as a control. The culture lasted for 16 days. The evaluations of the structure (H & E staining), viability (live/dead staining), and function (embryo implantation) of the uterine tissue were performed to confirm the efficacy of the model. The obtained results showed that the mouse uterine tissues cultured in an air-liquid condition recovered their tissue structure clearly, remained stable throughout the survey up until day 12, and displayed impaired degradation on the 16th day. On the other hand, by the 12th day, the submerged culture model had clearly degraded. Additionally, compared to the submerged culture model, the viability of tissue cultured under air-liquid conditions demonstrated the superiority with the P-value of 0.05. Only the tissues, cultured in an air-liquid environment, showed the embryos attaching to the endometrium's surface. In summary, the air-liquid culture conditions supported the maintenance of a stable tissue structure for 12 days. This model could be suitable for the study of therapies for mouse-damaged endometrial tissue *in vitro* with a duration of up to three estrous cycles.

Key words: Endometrium, implantation, regeneration, tissue culture

Cite this article : Le TTV, Hoang TTD, Tran HLB. **D development of an *in vitro* mouse cultured uterine tissue model for the endometrial regenerative therapy.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2023, 7(3):2675-2685.