

## TẠO KHỐI SPHEROID TỪ TẾ BÀO NHÚ BÌ NANG TÓC NGƯỜI NHẪM LÀM MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT TRIỂN NANG TÓC

Nguyễn Phan Như Quỳnh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mộng Thu<sup>1</sup>, Lưu Trần Thanh Uyên<sup>1</sup>, Lưu Trần Phương Thảo<sup>2</sup>, Hồ Nguyễn Quỳnh Chi<sup>3</sup>, Lê Thành Long<sup>3</sup>, Đặng Nguyễn Tường Vân<sup>4</sup>, Tô Minh Quân<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, 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, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Tế bào nhú bì nang tóc (tế bào DP) đóng vai trò điều khiển chu trình phát triển và chu kỳ tái sinh của tóc. Tế bào DP khi nuôi cấy 3D (khối spheroid) có thể khắc phục một số nhược điểm của mô hình nuôi cấy 2D (đĩa nuôi cấy) như mất dần khả năng tăng sinh và suy giảm khả năng kích thích nang tóc. Khối spheroid được thử nghiệm theo phương pháp giọt treo (hanging drop) với những mật độ tế bào:  $1-2,5-5-10 \times 10^3$  tế bào/giọt. Kết quả cho thấy tế bào DP ở P3 cho hiệu quả hình thành spheroid tương tự nhau ở các mật độ tế bào (gần 100%) và tế bào liên kết chặt tạo thành cấu trúc tương tự mô tự nhiên và viền tế bào bao bên ngoài. Tuy nhiên, kích thước và thời gian tạo spheroid khác nhau tùy theo mật độ. Đồng thời, mức độ biểu hiện mRNA marker CD133 và Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) của spheroid cao hơn so với tế bào 2D, lần lượt là  $6,96 \pm 0,57$  và  $7,34 \pm 0,38$  lần và FGF-7 không thay đổi. Ngoài ra, tế bào P9 có suy giảm về tỷ lệ hình thành, gia tăng thời gian tạo spheroid và cấu trúc mô học một số spheroid trở nên lỏng lẻo hơn. Spheroid ( $1-10 \times 10^3$  tế bào DP) có cấu trúc tương tự mô tự nhiên, phù hợp để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

*Từ khóa:* CD133, IGF-1, phương pháp hanging drop, spheroid, tế bào nhú bì.

### MỞ ĐẦU

Nhú bì (dermal papilla, DP) là một quần thể tế bào trung mô nằm dưới vùng bầu tóc. Nhú bì điều hoà chu kỳ phát triển sợi tóc (phát triển – dừng – nghỉ – phát triển) thông qua việc tiết các tác nhân tác động lên tế bào biểu bì xung quanh (Schneider et al. 2009). Vì vậy, tế bào DP được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu kích thích mọc tóc hoặc sự phát triển của nang tóc. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên bề mặt 2D (chai nuôi cấy) *in vitro*, khả năng tăng sinh và khả năng tái tạo nang tóc mới của tế bào DP giảm dần theo thể hệ nuôi cấy. Do đó, việc thử nghiệm trên tế bào DP 2D không phản ánh được hoàn toàn tác dụng của liệu pháp. Mô hình nuôi cấy tế bào 3D có thể cải thiện nhược điểm của 2D và là mô hình tốt để đánh giá tế bào DP trong điều trị rụng tóc. Trong điều kiện nuôi cấy 3D, tế bào DP kết tụ với nhau hình thành cấu trúc gọi là spheroid. Spheroid là cụm tế bào được hình thành bởi sự tự kết tụ và sự tạo thành các liên kết giữa các tế bào trong điều kiện nuôi cấy 3D hoặc trên bề mặt không bám dính để tạo thành cấu trúc giống mô tự nhiên. Trong spheroid, các tế bào DP lân cận kết nối với nhau và tăng tính tương tác giữa tế bào. Đồng thời sự truyền tín hiệu, biểu hiện gen của tế bào trong spheroid ở mức độ cao hơn so với nuôi cấy tế bào bám dính và các hoạt động của tế bào có cách thức tương tự như trong nhú bì tự nhiên (Bejaoui et al. 2022; Białkowska et al. 2020; Chae et al. 2021). Phương pháp giọt treo (hanging drop, HD) thường được sử dụng để tạo môi trường 3D. Trong phương pháp này, giọt môi trường chứa tế bào được bám mặt trong của nắp đĩa petri và treo lơ lửng trong không trung. Tế bào DP trong giọt môi trường kết tụ dưới tác động trọng lực và liên kết với nhau và hợp thành cấu trúc tương tự mô tự nhiên (Białkowska et al. 2020). Spheroid được dùng để đánh giá hoạt tính của hoạt chất kích thích/ức chế tái tạo nang tóc hoặc chất ức chế rụng tóc. Việc đánh giá trên spheroid cho kết quả chính xác và có giá trị thực tế hơn so với tế bào nuôi cấy 2D. Đồng thời, spheroid là mô hình dùng để nghiên cứu quá trình phục hồi nang tóc bằng tế bào tự thân ở những bệnh nhân bị mất chân nang hoặc cấy tóc (Bejaoui et al. 2022). Trong nghiên cứu này, spheroid được tạo thử nghiệm từ tế bào DP nhằm làm mô hình cho các nghiên cứu tiếp theo.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Môi trường nuôi tế bào DP (MTNC): DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, Sigma), 1% kháng sinh penicillin/streptomycin và amphotericin B (Sigma). Tế bào Dermal Papilla (DP) được phân lập từ nang tóc của người cấy tóc với sự đồng ý của bệnh nhân. Nang tóc được thu nhận từ vùng da gáy của 3 bệnh nhân nam, độ tuổi 30-38. Tế bào DP thể hệ P2 trữ lạnh  $-196^{\circ}\text{C}$  trong MTNC bổ sung DMSO 10% và được rã đông trong MTNC bổ sung 20% FBS để sử dụng trong nghiên cứu. Tế bào sau rã đông được nuôi trong MTNC ở điều kiện  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  cho tới khi sử dụng để tạo spheroid.

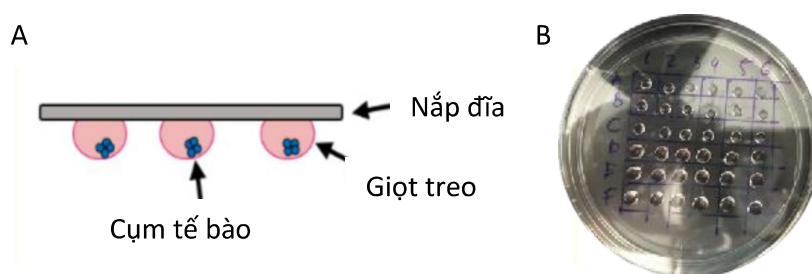
## Phương pháp

### Phương pháp nhuộm vimentin và $\alpha$ -SMA

Tế bào sau khi nuôi cấy thể hệ P3 được kiểm tra sự biểu hiện marker: vimentin và  $\alpha$ -SMA. Tế bào được cố định bằng methanol lạnh, sau đó tăng tính thấm bằng Triton-X100. Sau đó, tế bào được nhuộm với kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vimentin (ab8979, abcam) (anti-vimen) hoặc  $\alpha$ -SMA (ab7817, abcam) (anti-SMA), ủ trong 4°C qua đêm trong điều kiện tránh sáng. Sau đó, tế bào đều được ủ với kháng thể thứ cấp phát huỳnh quang xanh lá (ab150113, abcam) liên kết với anti-vimen và anti-SMA. Tiếp theo, tế bào được nhuộm với 0,1 nM DAPI trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút, dung dịch DAPI được loại bỏ và tế bào được rửa bằng PBS 3 lần và quan sát dưới kính hiển vi.

### Phương pháp tạo spheroid

Phương pháp tạo spheroid được dựa theo Helena Topouzi và đồng tác giả (2017) (Topouzi et al. 2017) với một số thay đổi. Tế bào được thu nhận bằng Trypsin/EDTA và ly tâm để thu sinh khối. Nắp đĩa petri nhựa 90 mm được lật ngược để mặt trong của nắp đĩa hướng lên và tạo những giọt 40  $\mu$ L môi trường MTNC chứa tế bào trên mặt trong của nắp đĩa (mật độ tế bào là 1; 2,5; 5 hoặc  $10 \times 10^3$  tế bào/giọt). Sau đó lật úp nắp đĩa để phủ trên đáy đĩa như ban đầu và đem nuôi ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 5 ngày. Sự hình thành spheroid và kích thước được quan sát và đo bằng kính hiển vi.



Hình 1. Phương pháp Hanging drop

A: Mô hình giọt treo, B: Giọt môi trường chứa tế bào được treo mặt trong nắp đĩa nhìn từ bên trên.

### Phương pháp nhuộm Haematoxyline và Eosin (HE)

Cấu trúc của spheroid được đánh giá bằng phương pháp nhuộm HE. Spheroid được cố định trong khung fibrin được tạo từ huyết tương bò để thuận tiện cho quá trình cắt nhuộm. Spheroid được cố định trong dung dịch 10% Neutral Phosphate Buffered Formalin (NBF 10%) khoảng 1 giờ, sau đó spheroid được thả vào gel fibrin bò đã chuẩn bị từ trước. Tiếp tục cố định toàn bộ khối spheroid/fibrin trong NBF 10% trong 1 giờ. Sau đó mẫu được gửi nhuộm HE tại trường Đại học Y Dược TP. HCM.

### Phương pháp realtime-PCR đánh giá sự biểu hiện mRNA CD133, IGF-1, FGF-7

Sự biểu hiện của CD133, IGF-1 và FGF-7 được đánh giá trên spheroid 5 ngày tuổi ( $5 \times 10^3$  tế bào/spheroid). Đầu tiên, mRNA tổng được tách bằng Trizol và thực hiện phản ứng realtime PCR bằng bộ kit qScript 1-Step, SYBR Green qRT-PCR (Quanta Bioscience), trình tự mỗi phát hiện mRNA của CD133, IGF-1 và FGF-7 được thể hiện trong bảng 1. Dựa trên giá trị C<sub>t</sub> sau khi thực hiện phản ứng, áp dụng phương thức 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> để tính sự biểu hiện tương đối của các gen mục tiêu CD133, IGF-1, FGF-7.

Bảng 1. Trình tự mỗi được sử dụng trong RT-PCR.

Gen mục tiêu	Mũi	Trình tự	Tài liệu tham khảo
IGF-1	F	TGTCCTCCTCGCATCTCTTCTACC	Yamauchi et al., 2009
	R	TAAAAGCCCCTGTCTCCACACACG	
FGF-7	F	TTGTGGCAATCAAAGGGGTG	Yamauchi et al., 2009
	R	CCTCCGTTGTGTGTCCATTTAGC	
CD133	F	TTGCGGTAAACTGGCTAAG	Pellacani et al., 2011
	R	TGGGCTTGTCATAACAGGAT	

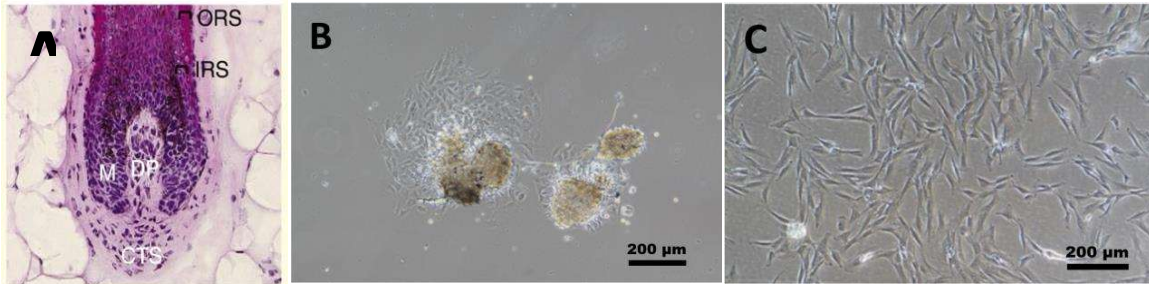
### Phương pháp thu thập và phân tích số liệu

Số liệu được trình bày theo cách Mean  $\pm$  SD, thống kê và đồ thị được thống kê và vẽ bằng GraphPad Prism.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Kết quả biểu hiện marker vimentin và  $\alpha$ -SMA**

Khi nuôi cấy sơ cấp, sau 5 ngày nuôi cấy, tế bào di cư khỏi DP và bắt đầu tăng sinh. Hình dạng tế bào dạng thon dài tương tự như nguyên bào sợi. Khi nuôi tới thế hệ P2, tế bào được đông lạnh cho tới khi sử dụng. Sau rã đông, tế bào DP ở thế hệ P3 sau rã đông được kế thừa hình dạng thon dài: hẹp ở hai đầu và phình to ở giữa do có nhân lớn hình elip, bám trên bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 2). Tế bào P3 được kiểm tra lại sự biểu hiện marker vimentin và  $\alpha$ -SMA. Kết quả cho thấy phần lớn tế bào bắt màu với kháng thể đặc hiệu cho vimentin ( $97,3 \pm 1,8\%$  tế bào trong quần thể tế bào quan sát có màu xanh lá) và kháng thể đặc hiệu cho  $\alpha$ -SMA ( $98,7 \pm 0,8\%$  tế bào trong quần thể tế bào quan sát có màu xanh lá) (Hình 3).

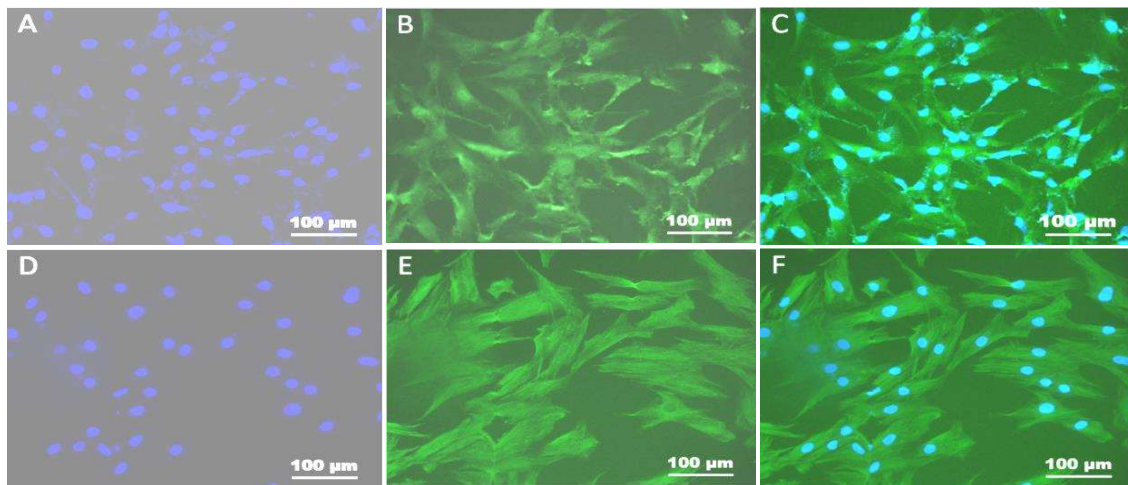


**Hình 2. Tế bào DP nuôi cấy ở các thế hệ khác nhau**

A: Nhuộm mô học DP Schneider et al. 2009 (CTS: Vô bào nang tóc, M: Vùng tế bào tăng sinh, ORS: Vô nang ngoài, IRS: Vô nang trong), B: Nuôi sơ cấp, tế bào di cư khỏi DP, C: Tế bào DP thế hệ P3.

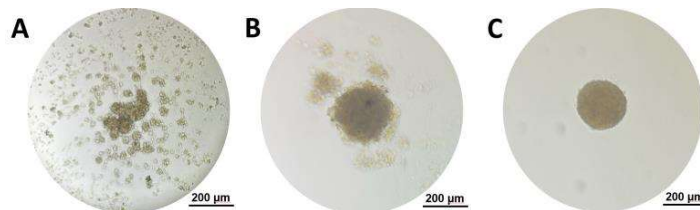
**Kết quả tạo spheroid**

Sau khi cấy lên giọt môi trường, dưới tác động của trọng lực, tế bào bắt đầu kết cụm với nhau hình thành những cụm tế bào nhỏ (sau 24 giờ). Sau đó, các cụm tế bào nhỏ liên kết với nhau tạo thành một cụm tế bào hoàn chỉnh (sau 72 giờ). Sau đó viên spheroid xuất hiện trở nên rõ ràng, rất ít tế bào rời xuất hiện trong giọt môi trường (Hình 4). Đây cũng là một trong những tính chất đặc trưng của tế bào DP.



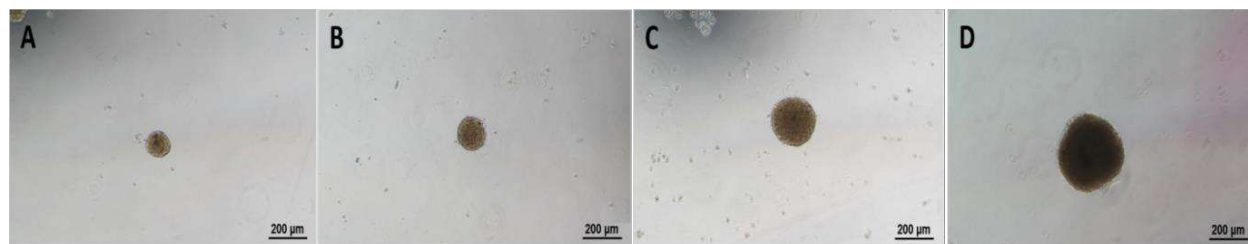
**Hình 3. Tế bào DP nhuộm kháng thể phát hiện vimentin và  $\alpha$ -SMA**

Hàng 1: Kết quả nhuộm với kháng thể đặc hiệu vimentin. Hàng 2: Kết quả nhuộm kháng thể đặc hiệu  $\alpha$ -SMA. A, D: Tế bào nhuộm DAPI, B, E: Tế bào nhuộm với kháng thể đặc hiệu vimentin (B) hoặc  $\alpha$ -SMA (E), tế bào dương tính với kháng thể phát màu xanh lá, C là hình gộp của A và B, F là hình gộp D và E.



**Hình 4. Quá trình hình thành khối spheroid của tế bào DP theo phương pháp Hanging drop**

A: Sau 24 giờ, B: 48 giờ, C: 72 giờ.



**Hình 5. Sự hình thành khối spheroid của tế bào DP ở các mật độ khác nhau**

A:  $1 \times 10^3$  tế bào, B:  $2,5 \times 10^3$  tế bào, C:  $5 \times 10^3$  tế bào, D:  $10 \times 10^3$  tế bào.

Hiện tượng này xảy ra ở tất cả các nhóm thí nghiệm với mật độ tế bào 1; 2,5; 5 và  $10 \times 10^3$  tế bào/giọt. Tuy nhiên, giữa các nhóm thí nghiệm vẫn có sự khác nhau về tỷ lệ hình thành spheroid, ngày hình thành spheroid và đường kính trung bình, kết quả này được liệt kê trong bảng 2. Tỷ lệ hình thành spheroid ở các nhóm không có sự khác biệt về mặt thống kê. Trong khi đó, mật độ ban đầu càng cao thì ngày hình thành spheroid hoàn chỉnh càng dài và đường kính của spheroid càng tăng. Điều này là do mật độ tế bào càng cao thì xuất hiện nhiều cụm tế bào ban đầu và các cụm tế bào cần nhiều thời gian để kết thành khối hoàn chỉnh hơn so với giọt ít tế bào. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Topouzi và cộng sự (2017).

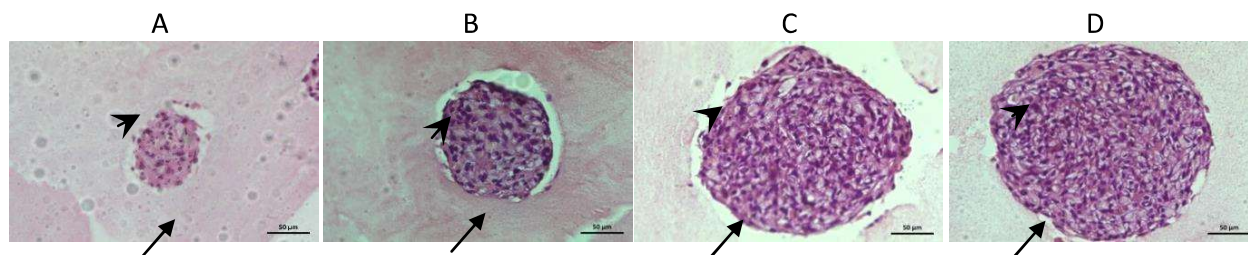
**Bảng 2. Kết quả hình thành spheroid ở các nồng độ tế bào khác nhau.**

<sup>a, b, c, d</sup>: Sự khác biệt về mặt thống kê với  $\alpha = 0,05$

Mật độ tế bào ban đầu	Tỷ lệ hình thành spheroid (%)	Ngày hình thành spheroid	Đường kính trung bình ( $\mu\text{m}$ )
$1 \times 10^3$	$98,1 \pm 1,6\%^a$	$2,5 \pm 0,6^a$	$101,44 \pm 10,28^a$
$2,5 \times 10^3$	$98,5 \pm 1,2\%^a$	$2,8 \pm 0,4^a$	$140,43 \pm 15,93^b$
$5 \times 10^3$	$96,7 \pm 2,6\%^a$	$3,2 \pm 0,8^{ab}$	$205,23 \pm 27,62^c$
$10 \times 10^3$	$96,1 \pm 2,9\%^a$	$3,8 \pm 1,1^b$	$252,19 \pm 24,82^d$

### Kết quả nhuộm HE

Kết quả nhuộm HE cho thấy lớp fibrin cho ra kết quả nhuộm HE là hệ thống dạng lưới sợi protein liên kết với nhau tạo ra cấu trúc lỗ (Hình 6). Khối spheroid được bao bọc bởi fibrin nhưng không hình thành liên kết. Cấu trúc spheroid giữa các nhóm thí nghiệm tương tự nhau, đều có cấu trúc đặc bên trong với sự liên kết dày đặc của tế bào DP, nhân tế bào được thấy bởi lớp màu tím có hình elip. Các tế bào bên ngoài spheroid liên kết với nhau tạo thành lớp viền bao bọc các tế bào bên trong một cách rõ ràng. Tổng hợp các kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành spheroid giữa các nồng độ 1; 2,5; 5 và  $10 \times 10^3$  tế bào/spheroid là tương đương nhau. Mật độ tế bào trung bình trong DP người là 1300 tế bào/DP. Do đó, tất cả các nồng độ trên đều có thể sử dụng để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn.



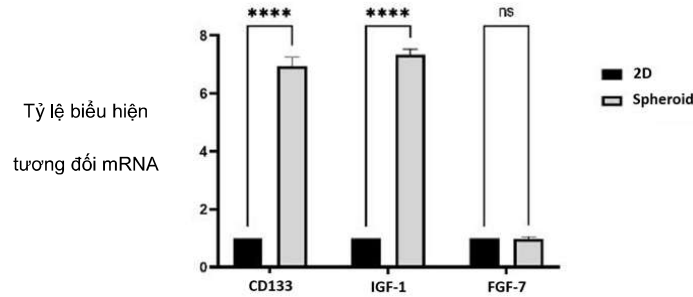
**Hình 6. Kết quả nhuộm mô học spheroid ngày 4 được cố định trong khung fibrin**

A:  $1 \times 10^3$  tế bào, B:  $2,5 \times 10^3$  tế bào, C:  $5 \times 10^3$  tế bào, D:  $10 \times 10^3$  tế bào. Mũi tên: Spheroid, đầu mũi tên: Khung fibrin. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

### Kết quả đánh giá sự biểu hiện mRNA *CD133*, *IGF-1*, *FGF-7*

Tế bào DP tiết ra các yếu tố tăng trưởng và có sự biểu hiện khác nhau đối với hai trạng thái tế bào bám dính bình thường, và 3D spheroid tự do trong môi trường ở mật độ  $5 \times 10^3$  tế bào/spheroid, sau 5 ngày nuôi cấy. *CD133* là một trong những marker tốt giúp phân biệt tế bào DP với các quần thể tế bào da khác. *CD133* được biểu hiện bằng DP spheroid cao hơn nhiều so với tế bào ở trạng thái bám dính, thể hiện được tính chất của tế bào đã khôi phục và có khả năng tạo ra sự hình thành nang tóc trong cơ thể (Zhou et al., 2016). Tiết *IGF-1* giúp kích thích sự tăng sinh tế bào trong pha phát triển và kích hoạt chuyển đổi chu kỳ nang tóc từ pha nghỉ qua pha phát triển, tăng sinh nang tóc. Trong nuôi cấy tế bào DP 2D *in vitro* quá trình sản xuất *IGF-1* giảm dần. *FGF-7* là chất kích thích

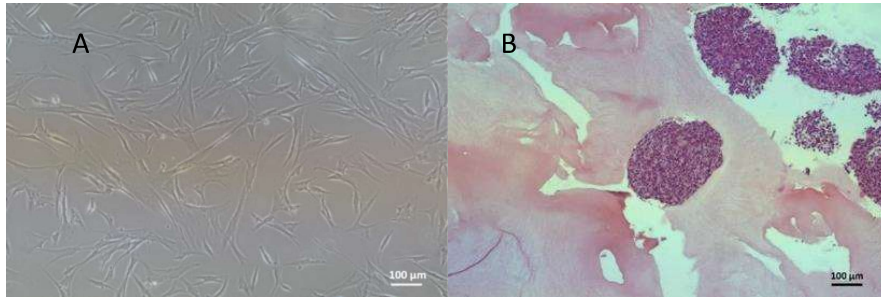
tăng trưởng được tiết bởi tế bào DP theo cơ chế cận tiết (lino et al. 2007; Panchaprateep et al. 2014). Sự biểu hiện mRNA CD133 của spheroid gấp  $6,96 \pm 0,57$  lần so với biểu hiện trong tế bào đối chứng (tế bào nuôi cấy 2D trong cùng thể hệ). Tương tự như CD133, mRNA IGF-1 có mức độ biểu hiện cao vượt trội của spheroid gấp  $7,34 \pm 0,38$  lần so với nhóm đối chứng. Trong khi đó, biểu hiện của mRNA FGF-7 gần như không có sự khác biệt nào giữa spheroid và tế bào đối chứng (Hình 7). Các tế bào nhú bì (DP) được biết là có chức năng điều hoà sự phát triển của tất cả tế bào và chu kỳ của nang tóc. Tuy nhiên, tế bào DP nhanh chóng mất đi tính tự cảm ứng trong quá trình cấy chuyên qua *in vitro* (Žnidarič et al. 2021). Kết quả này cho thấy spheroid gia tăng sự biểu hiện maker cấu trúc và chức năng tế bào nhú bì so với tế bào nuôi cấy 2D.



Hình 7. Đồ thị biểu hiện sự biểu hiện tương đối mRNA các marker của khối spheroid tế bào DP so với nuôi cấy 2D  
\*\*\*\*:  $p < 0,00005$ , ns:  $p > 0,05$ .

### Kết quả đánh giá hiệu quả tạo spheroid tế bào DP P9

Tế bào DP ở thể hệ P9 vẫn tăng sinh tốt, tuy nhiên hình dạng tế bào bắt đầu có sự thay đổi ở cuối thể hệ P9 và thể hiện rõ hơn ở những thể hệ sau. Tế bào trở nên dẹt hơn, tế bào phình to hơn về chiều ngang. Những thay đổi ban đầu về hình dạng tế bào cho thấy bắt đầu có sự thay đổi về tính chất tế bào. Hiện tượng này cũng được ghi nhận bởi Upton và cộng sự (2015) (Upton et al., 2015). Do đó, tế bào P9 được lựa chọn để tạo spheroid và đánh giá lại hiệu quả tạo spheroid. Mật độ  $10 \times 10^3$  tế bào là mật độ spheroid hình thành chậm nhất ở thể hệ P3, do đó mật độ này được sử dụng để so sánh sự hình thành spheroid giữa tế bào P3 và P9 (Bảng 3). Kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành spheroid giảm từ thể hệ P3 xuống P9, thời gian hình thành spheroid kéo dài (sau 6 ngày). Đồng thời, kết quả nhuộm mô học cho thấy một số spheroid P9 có cấu trúc rời rạc, tế bào không liên kết chặt chẽ, viền không được quan sát rõ ràng. Kết quả này cho thấy hiệu quả hình thành spheroid của tế bào P3 tốt hơn so với thể hệ P9. Do đó, tế bào P3 được sử dụng để tạo spheroid cho các thí nghiệm đánh giá chuyên sâu.



Hình 8. Spheroid được hình thành từ tế bào P9 với mật độ  $10 \times 10^3$  tế bào.

A: Tế bào DP P9 trên đĩa nuôi (2D), B: Nhuộm HE spheroid từ tế bào DP P9. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Bảng 3. So sánh kết quả tạo spheroid tế bào DP P3 và DP P9

<sup>a, b</sup>: Sự khác biệt về mật độ thống kê trong cùng 1 cột với  $\alpha = 0,05$

	Tỷ lệ tạo spheroid	Ngày hình thành spheroid	Cấu trúc spheroid
P3	$96,1 \pm 2,9\%^a$	$3,8 \pm 1,1^a$	Đặc tròn, có viền bao rõ ràng
P9	$73,3\% \pm 9,5\%^b$	$6,1 \pm 0,3^b$	Một số spheroid có tế bào rời rạc, nhiều spheroid không có viền tế bào, spheroid dễ bị cát nát khi nhuộm mô học

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu tiến hành để tạo spheroid tế bào DP để tạo mô hình đánh giá cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả thu được cho thấy spheroid có thể được tạo thành công từ tế bào DP, spheroid này có cấu trúc tương tự như cấu trúc tự nhiên và gia tăng sự biểu hiện marker kích thích tái tạo nang tóc như CD133 và IGF-1. Do đó, spheroid có thể sử dụng làm mô hình cho các nghiên cứu đánh giá hoạt chất hoặc cơ chế kích thích mọc tóc.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bejaoui M., Oliva A. K., et al., (2022). 3D spheroid human dermal papilla cell as an effective model for the screening of hair growth promoting compounds: examples of minoxidil and 3, 4, 5-tri-O-caffeoylquinic acid (TCQA). *Cells*, 11(13), 2093.
- Białkowska K., Komorowski P., et al., (2020). Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci*, 21(17), 6225.
- Chae S., Hong J., et al., (2021). The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications. *Theranostics*, 11(14), 6818.
- Iino M., Ehama R., et al., (2007). Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells. *J Invest Dermatol*, 127(6), 1318-1325.
- Panchaprateep R., & Asawanonda P. (2014). Insulin-like growth factor-1: roles in androgenetic alopecia. *Exp Dermatol* 23(3), 216-218.
- Pellacani D., Packer R. J., et al., (2011). Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol Cancer*, 10, 1-14.
- Schneider M. R., Schmidt-Ullrich R., et al., (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*, 19(3), R132-R142.
- Topouzi H., Logan N. J, et al., (2017). Methods for the isolation and 3D culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Exp Dermatol*, 26(6), 491-496.
- Upton J. H., Hannen R. F., et al., (2015). Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *135(5)*, 1244-1252.
- Yamauchi K., & Akira K. (2009). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture. *Arch Dermatol Res*, 301(5), 357-365.
- Zhou L., Yang K., et al., (2016). Activating  $\beta$ -catenin signaling in CD133-positive dermal papilla cells increases hair inductivity. *FEBS J* 283(15), 2823-2835.
- Žnidarič M., Žurga Ž. M., et al., (2021). Design of In Vitro Hair Follicles for Different Applications in the Treatment of Alopecia—A Review. *Biomedicines* 9(4), 435.

## STUDY ON THE FORMATION OF SPHEROIDS FROM HUMAN DERMAL PAPILLA CELLS AS A MODEL FOR HAIR FOLLICLE DEVELOPMENT

**Nguyen Phan Nhu Quynh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Mong Thu<sup>1</sup>, Luu Tran Thanh Uyen<sup>1</sup>, Luu Tran Phuong Thao<sup>2</sup>, Ho Nguyen Quynh Chi<sup>3</sup>, Le Thanh Long<sup>3</sup>, Dang Nguyen Tuong Van<sup>4</sup>, To Minh Quan<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Faculty Of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

<sup>3</sup>Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>4</sup>University of Health Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

**SUMMARY**

Dermal papilla cells (DP cells) play a pivotal role in regulating the hair growth cycle. DP cells cultured in a three-dimensional (3D) (spheroid) can overcome the limitations of 2D culture models (cell culture dishes), such as the loss of proliferative capacity and hair inductivity. The hanging-drop method was used to form spheroids with cell densities of 1, 2.5, 5 or  $10 \times 10^3$  cells/drop. The results indicated that DP cells at passage 3 (P3) effectively formed spheroids at all cell densities (nearly 100%) with histological structure similar to natural tissues: tight cellular junctions and an outer cellular border. However, the spheroid size and formation time varied with cell density. Additionally, the mRNA expression levels of the markers CD133 and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in the spheroids were  $6.96 \pm 0.57$  and  $7.34 \pm 0.38$  times higher, respectively, than those in 2D cells, while FGF-7 levels remained unchanged. Moreover, cells at passage 9 (P9) showed a decreased spheroid formation rate, increased formation time and relatively looser histological structure. In conclusion, spheroids can be formed from P3 DP cells at cell densities of 1, 2.5, 5 or  $10 \times 10^3$  cells/drop, resulting in increased expression of CD133 and IGF-1.

**Keywords:** CD133, Dermal papilla cells, hanging-drop, IGF-1, spheroid.

\* Author for correspondence: Tel: 0908761697. Email: tomquan@hcmus.edu.vn