

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRỊNH VĂN GIÁP

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÍNH
CHẤT, ĐẶC ĐIỂM CỦA EXOSOME TỪ TẾ BÀO
UNG THƯ GAN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM

TRỊNH VĂN GIÁP

**SINH HỌC
THỰC NGHIỆM**

2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRỊNH VĂN GIÁP

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÍNH CHẤT, ĐẶC
ĐIỂM CỦA EXOSOME TỪ TẾ BÀO UNG THƯ GAN**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
1. Nguyễn Thành Dương

Hà Nội - 2022

CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy và truyền đạt kiến thức trong suốt thời gian tôi học tập và nghiên cứu tại Học viện. Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn đến các đơn vị chuyên môn, ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ tôi để luận văn được hoàn thành.

Đặc biệt tôi xin chân thành cảm ơn thầy giáo, TS. Nguyễn Thành Dương, người đã định hướng, giúp đỡ, trực tiếp hướng dẫn và tận tình chỉ bảo tôi trong suốt quá trình nghiên cứu, xây dựng và hoàn thiện luận văn này.

Tôi cũng xin được cảm ơn tới gia đình, những người thân, các đồng nghiệp và bạn bè đã thường xuyên quan tâm, động viên, chia sẻ kinh nghiệm, cung cấp các tài liệu hữu ích trong thời gian học tập, nghiên cứu cũng như trong suốt quá trình thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

MỤC LỤC

CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC HÌNH	vii
DANH MỤC BẢNG	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1 : TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tổng quan về ung thư.....	3
1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới	3
1.1.2. Tình hình ung thư ở Việt Nam	4
1.1.3. Hiện trạng ung thư gan	5
1.1.4. Các phương pháp điều trị ung thư hiện nay	6
1.2. Sự tăng sinh mạch máu và định hướng trong điều trị ung thư	6
1.2.1. Sự tăng sinh mạch máu	6
1.2.2. Tầm quan trọng của tăng sinh mạch máu trong điều trị ung thư ..	7
1.2.3. Các mô hình tăng sinh mạch máu để thử nghiệm thuốc	8
1.3. Tổng quan về exosome – thông tin liên lạc giữa các tế bào	9
1.3.1. Giới thiệu về exosome	9
1.3.2. Các phương pháp phân lập exosome	10
1.3.3. Một số tính chất đặc điểm của exosome	12
1.4. Thiết bị vi lưu	14
1.5. Sự cần thiết của nghiên cứu.....	14
1.6. Mục tiêu nghiên cứu.....	15
CHƯƠNG 2 : PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. Nguyên vật liệu:	17

2.2. Phương pháp nghiên cứu:.....	17
CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	23
3.1. Chế tạo thiết bị thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào và phân lập môi trường nuôi cấy tế bào	23
3.2. Phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào	33
3.3. Nghiên cứu một số tính chất của exosome phân lập được.....	38
3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của exosome phân lập được từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG ₂ tới sự phát triển của tế bào HUVEC	41
CHƯƠNG 4 : KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	46
4.1 Kết luận.....	46
4.2 Kiến nghị.....	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	47

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DNA	Deoxyribonucleic acid	Acid Deoxyribonucleic
HBV	Hepatitis B virus	Virus viêm gan B
HCC	HepatoCellular Carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào gan
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor	Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu
EVs	Extracellular Vesicles	Túi ngoại bào
MMPs	Matrix metalloproteinases	Ma trận metalloproteinase
ILV	intraluminal vesicle	Túi nội mạc
DCexo	Dendritic cells	Tế bào đuôi gai
RNA	Ribonucleic Acid	Acid Ribonucleic
SEM	Scanning electron microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
TEM	Transmission electron microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường cơ bản cho nuôi cấy tế bào
PEG	Polyethylene glycol	
PEGDA	Polyethylene Glycol Diacrylate	
PBS	Phosphate buffered saline	Dung dịch muối đệm phosphate
TMSPMA	3-Trimethoxysilyl propyl methacrylate	
FBS	Fetal Bovine Serum	Dịch huyết thanh bò

PDMS	Polydimethylsiloxane	
HepG2	Hepatocellular Carcinoma cell line	Tế bào ung thư gan người
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Tế bào nội mô con người tĩnh mạch chính rốn
PMMA	Poly Methyl Methacrylate	Nhựa PMMA

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Tỷ lệ các bệnh ung thư trên toàn thế giới	3
Hình 1.2 Số liệu ung thư tại Việt Nam	4
Hình 1.3: Sự tăng sinh mạch máu.	7
Hình 1.4 Cấu trúc exosome.	10
Hình 3.1 Hình ảnh thiết kế các chi tiết PMMA của thiết bị vi lưu. (A) Bản thiết kế tấm PMMA thứ nhất của thiết bị vi lưu. (B) Bản thiết kế tấm PMMA thứ hai của thiết bị vi lưu.	23
Hình 3.2 Hình ảnh các chi tiết PMMA của thiết bị vi lưu. (A) Tấm PMMA thứ nhất của thiết bị vi lưu được chế tạo bằng phương pháp cắt và khắc laser. (B) Tấm PMMA thứ hai của thiết bị vi lưu được chế tạo bằng phương pháp cắt và khắc laser	25
Hình 3.3 Mô phỏng quá trình tạo hydrogel từ dung dịch PEGDA có bổ sung chất kích hoạt quang PI	27
Hình 3.4 Hình ảnh mô phỏng các lớp chi tiết của thiết bị vi lưu.	28
Hình 3.5 Hình ảnh thiết bị hoàn chỉnh (khối trắng ở giữa là khối hydrogel trong thiết bị)	29
Hình 3.6. Thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị vi lưu	30
Hình 3.7 Nuôi cấy tế bào trong thiết bị vi lưu. Tế bào HepG ₂ trong hệ sau 3 ngày nuôi cấy (bên trái). Tế bào HUVEC trong hệ sau 3 ngày nuôi cấy (bên phải) (tỷ lệ 100 μ m).....	32
Hình 3.8 Exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG ₂ . (A) Sự phân bố các kích thước của exosome, kích thước trung bình (size average) và điện thế zeta (zeta potential) được đo từ DLS. (B) Hình ảnh TEM của exosome phân lập từ tế bào HepG ₂ (tỷ lệ = 50 nm)	34
Hình 3.9. Một số protein chỉ dấu của exosome phân lập từ tế bào HepG ₂	39
Hình 3.10 Chỉ dấu NKG2D được xác định trên tế bào HepG ₂ và từ dịch nuôi cấy tế bào HepG ₂	40
Hình 3.11 Chỉ dấu NKG2D được xác định trên exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG ₂ và từ dịch nuôi cấy tế bào HepG ₂	41
Hình 3.12 Tốc độ phát triển của tế bào HUVEC khi nuôi cấy được bổ sung exosome từ HepG ₂ hoặc nuôi cấy đồng thời với HepG ₂ trong hệ vi lưu, so sánh với nuôi cấy tế bào HUVEC riêng lẻ.....	42
Hình 3.13 Vai trò của exosome được phân lập từ HepG ₂ trong ung thư gan.	44

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Các phương pháp phân lập exosome.....	12
Bảng 3.1 Các giá trị kích thước trung bình và PDI của exosome được bảo quản ở 2 điều kiện khác nhau là 25 °C và 4 °C ở ngày 1, ngày 4, ngày 7, ngày 10 và ngày 14	36
Bảng 3.2 Các giá trị kích thước trung bình và PDI của exosome được bảo quản ở 2 điều kiện khác nhau là -20 °C và -80 °C ở ngày 1, ngày 4, ngày 7, ngày 10 và ngày 14.	37

MỞ ĐẦU

Hiện nay, ung thư vẫn là một trong những căn bệnh có nguy cơ tử vong cao trên thế giới và cũng như ở Việt Nam. Việc nghiên cứu các cơ chế và tìm kiếm các phương pháp điều trị ung thư là một vấn đề hết sức cấp thiết, nhận được nhiều sự quan tâm. Với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, nhiều phương pháp điều trị ung thư như hoá trị, xạ trị, phẫu thuật, ghép tế bào gốc hay liệu pháp miễn dịch được đưa ra thử nghiệm và triển khai điều trị cho bệnh nhân ung thư. Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn chưa đạt được kỳ vọng như mong đợi do những hạn chế về tác dụng phụ của phương pháp cũng như giới hạn đối với một số loại ung thư nhất định.

Gần đây, một khái niệm mới trong việc điều trị ung thư là bỏ đói tế bào được đưa ra và đã nhận được nhiều sự quan tâm chú ý của các thầy thuốc và nhà khoa học trên khắp thế giới. Do ung thư là bệnh lý mà trong đó tế bào ung thư phát triển nhanh, mất kiểm soát, chúng cần nhiều hơn các dưỡng chất để nuôi sống các tế bào trong khối u. Điều này dẫn tới việc cơ thể cần phát triển các mạch máu tới các khu vực có tế bào ung thư sinh sống để đưa các chất dinh dưỡng tới đây. Tăng sinh mạch máu (hay còn gọi là angiogenesis) là sự hình thành mạch máu từ hệ mạch hiện có. Đây là một quá trình quan trọng giúp cơ thể tăng trưởng và phát triển. Tuy nhiên, sự hình thành mạch này cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự hình thành và phát triển của các khối u. Theo cơ chế được đưa ra trong quá trình phát triển của ung thư, các tế bào ung thư tiết ra các chất kích thích là tín hiệu để hình thành mạch máu, giúp vận chuyển các chất chuyển hoá đến khối u giúp chúng tiếp tục phát triển và di căn. Chính vì vậy, việc nghiên cứu các tín hiệu này là rất quan trọng, giúp làm rõ cơ chế phát triển của ung thư cũng như định hướng phương pháp điều trị ung thư bằng cách ngăn ngừa sự tăng sinh mạch máu ở các khu vực khối u này.

Exosome là những túi ngoại bào có màng bao bọc (EVs) được giải phóng từ ngăn nội tiêu của hầu hết các tế bào nhân thực. Các exosome được tạo ra khi khoang nội trung gian, thể đa túi (MVB) hợp nhất với màng plasma. Sau đó các túi nội mạc (ILV) được giải phóng vào môi trường ngoại bào. Các exosome này có kích thước nhỏ cỡ 30 – 150 nm, vận chuyển protein, lipid và

các vật chất di truyền của tế bào. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng exosome tham gia vào quá trình hình thành mạch máu trong sự phát triển của ung thư bằng cách vận chuyển các thành phần tiền ung thư như yếu tố tăng trưởng mạch máu nội mô (VEGF), metalloproteinase hay microRNA. Ngoài ra, exosome cũng thúc đẩy quá trình hình thành mạch máu bằng cách ức chế HIF-1, một nguyên tố giúp thúc đẩy quá trình hình thành mạch máu trong cơ thể. Bằng việc hình thành các mạch máu mới, tế bào ung thư có thể xâm lấn mô lân cận, di chuyển khắp cơ thể và hình thành các di căn mới. Vì vậy, việc vận chuyển và giải phóng exosome đóng một vai trò quan trọng trong việc hình thành, phát triển và di căn của ung thư đến các cơ quan. Chính vì vậy, việc phân lập exosome đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu về ung thư cũng như tìm kiếm các phương pháp điều trị ung thư mới trong tương lai.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tiến hành chế tạo hệ vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào ung thư và tế bào mạch máu. Ưu điểm của hệ vi lưu giúp các tế bào được nuôi cấy ở các khu vực riêng biệt nhưng vẫn đảm bảo thông tin liên lạc giữa hai loại tế bào với nhau thông qua môi trường nuôi cấy được luân chuyển trong kênh vi lưu. Bên cạnh đó, hệ vi lưu cũng có khu vực giúp thu nhận môi trường nuôi cấy dễ dàng, giúp phân lập exosome thuận tiện theo từng nhu cầu nghiên cứu. Từ đó, nghiên cứu cũng làm rõ một số đặc điểm của exosome phân lập từ tế bào ung thư gan làm tiền đề để xác định cơ chế tăng sinh mạch máu và mở ra hướng điều trị ung thư mới trong tương lai.

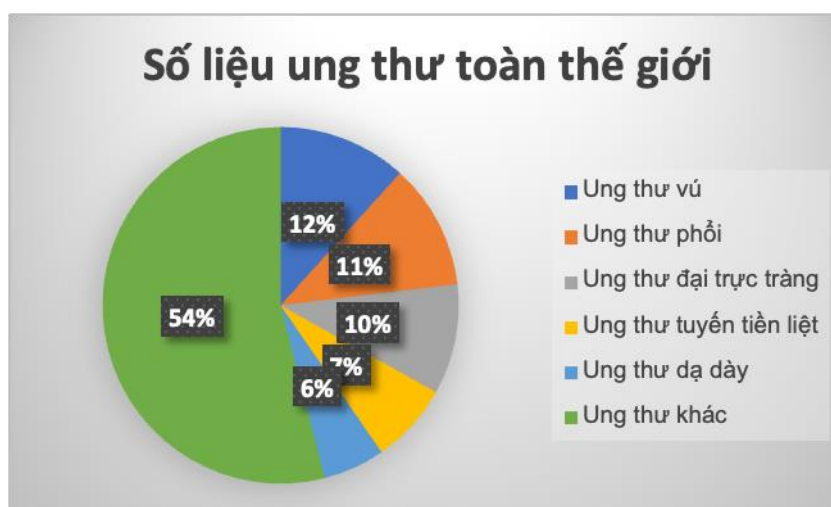
CHƯƠNG 1 : TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về ung thư

1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới

Ung thư là tập hợp các bệnh lý về sự phát triển nhanh chóng không có kiểm soát của các tế bào bất thường không bị loại bỏ bởi hệ thống miễn dịch. Các tế bào ung thư ảnh hưởng tới các tế bào bình thường xung quanh hình thành thêm các mạch máu bao quanh tạo thành khối u sau đó di căn qua các cơ quan khác của cơ thể [1]. Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến sự hình thành ung thư trong đó chủ yếu là do lối sống và thực đơn ăn uống không lành mạnh, môi trường sinh sống bị ô nhiễm, tiếp xúc với môi trường chứa chất gây ung thư và nhiều nguyên nhân khác.

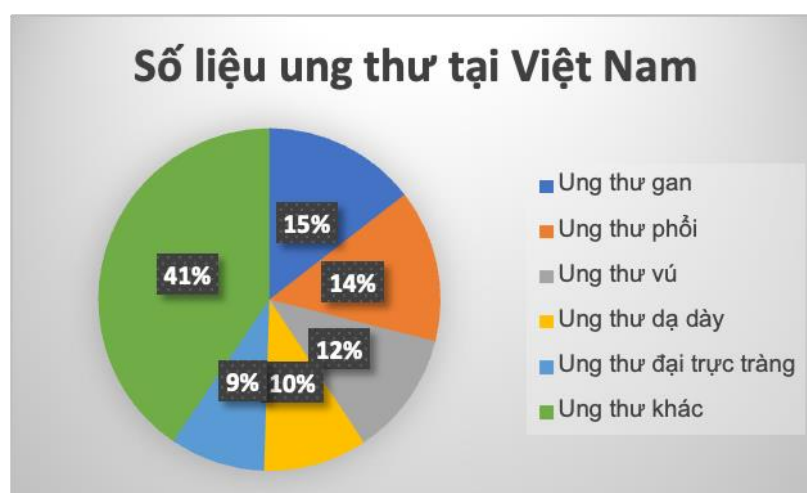
Căn bệnh ung thư đã và đang trở thành gánh nặng trên toàn cầu. Dựa trên các thông số thu thập được của tổ chức Y tế thế giới, vào năm 2020, toàn cầu có khoảng 19.3 triệu ca ung thư và khoảng 10 triệu ca tử vong do ung thư, trong đó 5 loại ung thư có tỷ lệ mắc cao nhất bao gồm ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến và ung thư dạ dày [1], [2]. Dựa trên một bài đánh giá từ Hoa Kỳ, ung thư đã trở thành nguyên nhân tử vong thứ hai tại Hoa Kỳ [3], [4], [5]. Ngoài ra ung thư còn trở thành một gánh nặng kinh tế cho nền y tế toàn cầu. Tại Hoa Kỳ, chi phí y tế dành cho ung thư năm 2020 đã tăng 27% so với năm 2010.



Hình 1.1 Tỷ lệ các bệnh ung thư trên toàn thế giới [5]

1.1.2. Tình hình ung thư ở Việt Nam

Theo thống kê của Hội nghị khoa học quốc tế về phòng chống ung thư, số ca bệnh ghi nhận được ở Việt Nam thuộc nhóm cao thứ hai trên toàn cầu. Hàng năm, Việt Nam có thêm 200.000 ca mắc mới, nâng số ca tử vong lên 82.000 ca. Việt Nam có tỷ lệ tử vong là 73.5%, trên thế giới là 59.7%, ở các quốc gia phát triển là 49.4%, các quốc gia đang phát triển cũng chỉ ở mức 67.9% [6]. Điều này cảnh báo rằng tỷ lệ tử vong do ung thư ở Việt Nam đang tăng lên đến mức báo động, một phần là do chẩn đoán bệnh muộn, khiến cho việc điều trị giảm hiệu quả. Theo như số liệu tại bệnh viện K Trung ương cung cấp, tỷ lệ đăng ký điều trị ung thư của năm sau cao hơn từ 20% - 30% so với năm trước. Ngoài ra, các bệnh viện ung bướu khác cũng gặp phải tình trạng không đủ giường điều trị vì thực tế công tác phòng chống và điều trị bệnh ung bướu ở Việt Nam chỉ đáp ứng được 25% nhu cầu của bệnh nhân.



Hình 1.2 Số liệu ung thư tại Việt Nam [1].

Các chuyên gia y tế đã chỉ ra rằng có rất nhiều nguyên nhân khiến tỷ lệ mắc bệnh ở Việt Nam tăng không kiểm soát. Dưới đây là 3 lý do chính dẫn đến nguyên nhân gây bệnh:

- *Do cường độ công việc quá sức.* Các cuộc khảo sát gần đây cho thấy rằng có tới 95% lao động và doanh nghiệp có vốn đầu tư FDI phải làm tăng ca và làm ca đêm. Hầu hết các công nhân lao động đều mắc các bệnh về sức khỏe nhưng vấn đề về bảo hộ lao động ở Việt Nam cũng chưa được chú trọng. Những công ty hoá chất, phóng xạ vẫn chưa được trang bị đầy đủ đồ bảo hộ.

- *Ô nhiễm môi trường.* Hiện nay, vấn đề ô nhiễm không khí từ khói bụi, hoá chất, và thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam đã góp phần làm gia tăng tỷ lệ nhiễm bệnh ung thư phổi và vòm họng. Đặc biệt ở thủ đô Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh, mức độ ô nhiễm không khí đã đạt đến mức tím – mức cực kỳ nguy hiểm. Ngoài ra chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm thấp, ô nhiễm đất, thực phẩm có tồn dư nhiều hóa chất độc hại là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến bệnh ung thư dạ dày, đại tràng và thực quản.

- *Chế độ dinh dưỡng.* Thói quen ăn uống ở Việt Nam thường nghiêng về sở thích cá nhân hơn là tuân theo chế độ ăn uống lành mạnh. Các món ăn sộng như gỏi hay đồ nướng vô cùng phổ biến trong các bữa ăn hàng ngày nhưng tiềm ẩn mối đe dọa đến từ các tế bào gây biến đổi gen. Bên cạnh đó, nhưng hộ nghèo và dân tộc thiểu số trên vùng cao thiếu thốn về nhận thức và kinh tế dẫn đến việc vẫn tiêu thụ thực phẩm thiu mốc, quá hạn sử dụng khiến cơ thể tích tụ chất độc. Hiện nay, các sản phẩm đóng gói ăn liền có chứa chất bảo quản và chất kích thích cũng đáng e ngại. Tất cả những nguyên nhân trên đều góp phần tăng tỷ lệ ung thư liên quan đến đường tiêu hóa [7].

1.1.3. Hiện trạng ung thư gan

Trong năm 2018 đã ghi nhận 840.000 ca mắc ung thư gan mới trên toàn thế giới, nâng số ca tử vong lên 700.000 ca, một tỷ lệ đáng báo động. 78% nguyên nhân mắc bệnh ung thư gan là do bệnh nền virus viêm gan B (HBV) và virus viêm gan C (HCV). Đặc biệt, tỷ lệ mắc ung thư ở nam cao hơn so với nữ giới.

Tại Việt Nam, theo hội thảo chuyên đề gan mật Việt Nam – Nhật Bản được tổ chức tại Bệnh viện Bạch Mai (Hà Nội) vào 2018 đã đề cập đến tình trạng ung thư gan ở nước ta. Việt Nam đứng thứ 4 trong số 25 nước có tỷ lệ mắc ung thư gan cao nhất thế giới. Bên cạnh đó, ung thư gan cũng là nguyên nhân thứ 2 gây tử vong liên quan đến ung thư, chỉ sau ung thư phổi. Giám đốc khu vực Tây Thái Bình Dương của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) - Shin Young-soo cho biết lượng tiêu thụ bia ở người Việt Nam đã ở mức đáng báo động. Trung bình một người Việt Nam trên 15 tuổi uống khoảng 8,3 lít cồn nguyên chất mỗi năm, nhiều hơn các quốc gia khác như Trung Quốc (7,2 lít), Campuchia (6,7 lít), Philippines (6,6 lít) và Singapore (2 lít). Theo thông tin từ Bộ Y tế, Việt Nam có hơn 7,8 triệu bệnh nhân mắc viêm gan B và khoảng

991.000 bệnh nhân mắc viêm gan C. Trong số các trường hợp viêm gan B, có hơn 51.000 trường hợp tiến triển thành xơ gan và hơn 14.000 ca khác tiến triển thành ung thư. Trong số các bệnh nhân viêm gan C, có hơn 13.000 ca chuyển sang xơ gan và 6.000 ca chuyển sang ung thư gan.

Ung thư hiện đang là vấn đề nan giải mà các nước trên thế giới phải tìm cách giải quyết và cải thiện, trong đó có Việt Nam. Tỷ lệ tử vong do bệnh ung thư cao gấp 9 lần số ca tử vong tai nạn giao thông, đến 73% tổng số người bệnh ở Việt Nam. Tỷ lệ tử vong này cao đa phần là do 87,8% bệnh nhân ung thư gan đến điều trị trong giai đoạn muộn.

Những dữ liệu trên đã phản ánh được mức độ nguy hiểm của bệnh ung thư. Một trong những nguyên nhân chủ yếu dẫn đến tình trạng nghiêm trọng của căn bệnh này là do người dân chưa tìm hiểu kỹ càng và trang bị những biện pháp tầm soát để phát hiện căn bệnh này kịp thời. Điều này chứng tỏ việc nghiên cứu các phương pháp điều trị mới cho ung thư gan là rất cần thiết để giảm thiểu tỷ lệ tử vong do ung thư gan nói riêng và ung thư nói chung không chỉ ở Việt Nam mà còn trên toàn thế giới.

1.1.4. Các phương pháp điều trị ung thư hiện nay

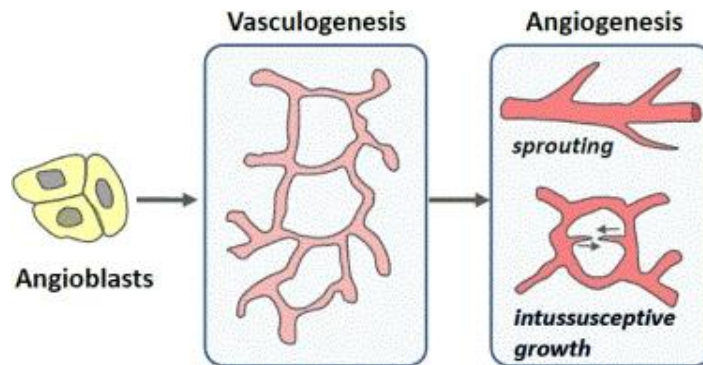
Theo sự phát triển của khoa học và kỹ thuật, các phương pháp chữa trị ung thư càng ngày càng hoàn thiện và tân tiến trong đó các phương pháp thường gặp nhất bao gồm: phẫu thuật, xạ trị, hóa trị, điều trị miễn dịch, điều trị nội tiết. Các phương pháp có thể phối hợp với nhau giúp việc chữa trị trở nên dễ dàng hơn cũng như giúp kéo dài tuổi thọ của những bệnh nhân ung thư. Tuy nhiên, một số phương pháp bị giới hạn về khả năng ứng dụng với một số loại ung thư riêng biệt. Không chỉ vậy các phương pháp này có những tác dụng phụ không thể tránh khỏi và để lại những di chứng nghiêm trọng đối với cơ thể người bệnh.

1.2. Sự tăng sinh mạch máu và định hướng trong điều trị ung thư

1.2.1. Sự tăng sinh mạch máu

Hiện tượng tăng sinh mạch máu (angiogenesis), là hiện tượng các mạch máu mới được hình thành từ các mạch máu cũ một cách bất thường ở vùng tổn thương [8], [9]. Tăng sinh mạch máu là cơ chế cần thiết để nuôi dưỡng và phát triển tế bào cũng như để hồi phục khu vực bị thương tổn. Sự tăng sinh

mạch máu có hai loại hình thành mạch, hình thành mạch và hình thành mạch chia tách. Sự hình thành mạch chia tách là quá trình mạch mở rộng vào lòng mạch rồi bị tách làm đôi.



Hình 1.3: Sự tăng sinh mạch máu [10].

Quá trình hình thành mạch bắt đầu khi cơ chế cảm nhận oxy ở các mô phát hiện thiếu oxy, các mô sẽ tiết ra yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF-A). Tế bào đỉnh nội mô, các tế bào ở đỉnh của mầm mạch có các thụ thể VEGF-A, phát triển thông qua ma trận mạch hướng tới VEGF-A. Phần màng mỏng ở tế bào đỉnh nội mô sẽ tiết ra các enzyme protease ví dụ như ma trận metalloproteinase (MMPs) phân hủy chất nền ngoại bào và màng đáy bao quanh tế bào nội mô. Từ đó các tế bào nội mô sẽ xâm nhập và cố định vào lớp nền. Sau đó, các tế bào nội mô có cuống sẽ phát triển khiến mầm mao mạch dài ra. Các không bào phát triển và liên kết lại với nhau hình thành các lumen trong các tế bào có cuống. Khi các tế bào đỉnh của nhiều mao mạch hội tụ tại nguồn tiết VEGF-A sẽ hợp nhất tạo thành thông đạo để cung cấp máu và oxy. Pericyte hay còn gọi là tế bào mural sẽ gắn vào thành các mao mạch và ổn định mao mạch [11], [12].

Quá trình hình thành mạch chia tách bắt đầu với các tế bào nội mô xảy ra tiếp xúc với nhau, hai lớp nội mô bị xuyên thủng, cuối cùng pericyte và nguyên bào sợi sẽ xâm nhập và bao phủ tạo thành kẽ giữa hai mạch mới [13].

1.2.2. Tầm quan trọng của tăng sinh mạch máu trong điều trị ung thư

Ung thư là sự phát triển một cách bất thường và nhanh chóng của các tế bào ung thư, vì vậy các khối u cần được cung cấp oxy và chất dinh dưỡng để phát triển và tăng trưởng cả về kích thước và số lượng tế bào. Các khối u sẽ phát ra tín hiệu hóa học để hình thành các mạng lưới mạch máu mới để cung cấp oxy và chất dinh dưỡng, nếu không có các mạch máu này, các khối u sẽ bị

hoại tử hoặc thậm chí bị apxe. Khi được nuôi dưỡng sẽ xâm lấn các mô lân cận và khi đạt tới kích thước nhất định sẽ bắt đầu xâm lấn các bộ phận khác của cơ thể.

Các tế bào ung thư sản xuất VEGF và tiết ra các mô xung quanh, các tế bào ung thư khi tiếp xúc với tế bào nội mô sẽ liên kết với thụ thể của tế bào nội mô. VEGF sẽ truyền tín hiệu vào nhân của tế bào nội mô nhằm thúc đẩy hình thành các tế bào nội mô mới, các tế bào nội mô này sẽ hình thành ma trận metalloproteinase rồi phá vỡ chất nền ngoại bào cho phép sự di truyền của tế bào nội mô. Từ đó các tế bào nội mô sẽ hình thành các mạng lưới mạch máu mới cũng cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của khối u [14-16].

1.2.3. Các mô hình tăng sinh mạch máu để thử nghiệm thuốc

Khái niệm bỏ đói tế bào ung thư, phương pháp ngăn chặn quá trình tăng sinh mạch máu, cắt đứt con đường nuôi dưỡng tế bào ung thư là một phương hướng được các nhà khoa học chú ý tới. Phương pháp này có thể hạn chế sự phát triển của các tế bào khối u, tuy nhiên những hạn chế về nhận biết quá trình hình thành mạch là lực cản lớn nhất đối với các nhà khoa học. Tế bào ung thư cần gửi đi tín hiệu tới các mô xung quanh nhằm kích thích quá trình tăng sinh mạch máu, vì vậy việc nghiên cứu các tín hiệu này có thể làm rõ cơ chế phát triển của ung thư cũng như định hướng phương pháp điều trị ung thư bằng cách ngăn ngừa sự tăng sinh mạch máu ở các khu vực khối u [17].

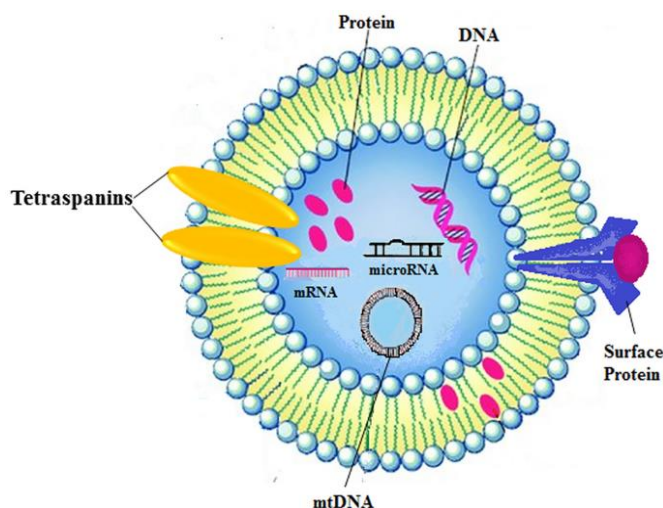
Sau nghiên cứu về sự ảnh hưởng của quá trình hình thành mạch máu lên khối u của Folkman vào năm 1971, các mô hình tăng sinh mạch máu để thử nghiệm thuốc đã được nghiên cứu nhằm thử nghiệm hiệu quả các loại thuốc chống hình thành mạch máu [18]. Trong thí nghiệm của Serbedzija và đồng nghiệp, họ quan sát quá trình tăng sinh mạch máu của loài cá sọc vằn. Họ tiêm VEGF vào trứng để quan và quan sát được quá trình tăng sinh mạch máu ở các mẫu thí nghiệm [19]. Sau đó họ thử nghiệm các phôi thai sử dụng các liều SU5416 khác nhau và nhận ra phôi thai dung liều 2 μM ức chế hoàn toàn sự hình thành các mạch máu mới. Các mô hình hai chiều được thực hiện bởi Folkman, Vailhahé, Kubota, Feder, Maciag hay Pelletier [20-25]. Các tế bào được trải song song ở đáy đĩa nuôi cấy rồi phủ lên một lớp protein kết dính và một lớp gel (collagen, fibrin hoặc matrigel) rồi quan sát quá trình hình

thành của các cấu trúc giống mao quản, tạo tiền đề cho định nghĩa hình thành mạch nội mô trong ống nghiệm. Tuy nhiên ở các mô hình hai chiều, các mao quản không phát triển theo chiều dọc hạn chế sự phát triển của quá trình tăng sinh mạch máu, vì vậy các nhà khoa học chuyển hướng sang nuôi cấy ba chiều do cấu trúc ba chiều có thể mô hình hóa hầu hết các sự kiện xảy ra trong quá trình hình thành mạch. Trong thí nghiệm của Akita, tế bào động mạch chủ của chuột được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy và được đổ một lớp collagen và môi trường nuôi cấy [26]. Sau bảy ngày ủ, các mầm mao mạch được hình thành và di truyền trong lớp gel. Hai loại thuốc thử thalidomide và lovastatin được sử dụng cho thấy khả năng ức chế sự sinh trưởng của các mầm mao mạch ngăn cản sự tăng sinh mạch máu. Trong thí nghiệm của Sarah và đồng nghiệp, họ nuôi cấy các tế bào từ các mô khối u được cung cấp từ bệnh viện, các tế bào huyền phù trong đĩa 24 giếng và được nuôi cấy khoảng hai tuần rồi được thử nghiệm với các loại thuốc chống tạo mạch. Thí nghiệm cho thấy nồng độ các chất chống tạo mạch từ 50 nM sorafenib ($p < 0,005$) và 25 nM sunitinib ($p < 0,05$) dẫn đến sự ức chế đáng kể sự hình thành ống [27].

1.3. Tổng quan về exosome – thông tin liên lạc giữa các tế bào

1.3.1. Giới thiệu về exosome

Exosome là các túi ngoại bào, có nguồn gốc từ nội bào và có kích thước khác nhau đáng kể với dải 40 – 160 nm [28]. Exosome được hình thành bởi lớp kép phospholipid cấu thành từ các protein bề mặt tế bào, tetraspanins, lipid và carbohydrate, bên trong nhân chứa protein, lipid và axit nucleic. Các thành phần này của exosome phụ thuộc vào thành phần của tế bào giải phóng ra chúng [29]. Exosome được hình thành khi các túi bào dung hợp với màng tế bào hình thành các túi kẽ (ILV) trong đa mạch nội bào (MVB) và giải phóng chúng vào khoảng gian bào dưới dạng các exosome nhỏ [30]. Nhiều nghiên cứu đã tìm thấy exosome trong máu, huyết tương, dịch não tủy, nước tiểu, tinh dịch, nước bọt, dịch khớp, sữa, nước mắt và dịch mũi [31], [32], [33].



Hình 1.4 Cấu trúc exosome [34].

Qua nghiên cứu, các nhà khoa học đã chỉ ra rằng quá trình bài tiết exosome ra khỏi cơ thể có thể loại bỏ các protein và các RNA không cần thiết ra khỏi cơ thể [35]. Ngoài ra, exosome được coi là yếu tố quan trọng giúp liên lạc giữa các tế bào, bằng việc điều chỉnh vi môi trường của mô [36]. Exosome tham gia vào các quá trình sinh lý như sửa chữa hoặc phát triển mô của hệ thần kinh, các quá trình bệnh lý (hình thành và phát triển ung thư, điều chỉnh hệ thống miễn dịch trong nhiễm trùng, xơ vữa động mạch và các bệnh thoái hóa thần kinh như Parkinson, Alzheimer và xơ cứng teo cơ một bên) [37-41].

1.3.2. Các phương pháp phân lập exosome

Việc phân lập và làm giàu các exomes sẽ giúp đánh giá các chức năng sinh học của chúng. Tuy nhiên các exosome có bất đồng về nguồn gốc, kích thước và chức năng khiến cho việc cô lập chúng trở nên khó khăn [42]. Với ứng dụng exosome khác nhau sẽ đối ứng với các kỹ thuật khác nhau cũng trong đó kỹ thuật siêu ly tâm, kỹ thuật phân lập dựa trên kích thước, kết tủa polyme, kỹ thuật bắt giữ ái lực miễn dịch thường được sử dụng hơn [43-44].

Kỹ thuật siêu ly tâm là kỹ thuật đang được sử dụng rộng rãi nhất và được coi là tiêu chuẩn cho việc chiết tách exosome. Kỹ thuật này thích hợp cho việc chiết tách các thành phần mẫu với sự khác biệt về liều lượng và hệ số lắng [45]. Quá trình siêu ly tâm được chia làm hai bước, Đầu tiên thực hiện ly tâm với tốc độ trung bình thấp để loại bỏ các tế bào chết, các vụn tế bào, túi ngoại bào có kích thước lớn. Sau đó để tách các thể ngoại bào ở tốc độ cao hơn với lực ly tâm $100.000 \times g$, các exosome sẽ được rửa bằng PBS để loại

bỏ các tạp chất như protein gây ô nhiễm [46] [47]. Tuy nhiên phương pháp này không có lợi cho quá trình phân tích xuôi dòng do tốn nhiều thời gian, chi phí cao, hư hỏng cấu trúc, tập hợp thành khối và đồng phân tách lipoprotein [48].

Kỹ thuật kết tủa polyme thường sử dụng polyethylene glycol (PEG) làm môi trường, và các exosome được thu hoạch trong điều kiện ly tâm bằng cách làm giảm độ hòa tan của exosome [49]. Do exosome có đặc điểm sinh lý tương đồng với virus nên phương pháp này thường được dùng để phân lập exosome với virus [50]. Các polyme sẽ bọc các exosome, sau một thời gian ủ ngắn có thể ly tâm để tạo các viên exosome đã kết tủa. Các exosome phân lập có cấu trúc hoàn chỉnh và kích thước đồng nhất, và các đặc điểm sinh học của chúng không bị ảnh hưởng bất lợi đáng kể, nhưng chúng có thể bị pha tạp với các hạt khác có kích thước tương tự, dẫn đến giảm độ tinh khiết [51].

Sắc ký ái lực miễn dịch là công nghệ tách và tinh chế dựa trên sự liên kết có ái tính của protein và các thụ thể protein có trong màng ngoài nhiễm sắc thể và ngược lại, để cô lập exosome mong muốn khỏi hỗn hợp không đồng nhất [52]. Các exosome được phân lập bởi phương pháp này có độ tinh khiết cao. Tuy nhiên, các điều kiện bảo quản của exosome thu được bằng phương pháp này tương đối khắc nghiệt và không thích hợp cho việc phân tách exomes trên quy mô lớn. Sự hấp phụ giao thoa không đặc hiệu của chất nền sẽ tạo ra các protein gây nhiễu, làm cho phương pháp này khó phổ biến.

Kỹ thuật trích ly dựa trên kích thước là kỹ thuật phân tách dựa trên khác biệt về kích thước giữa các exomes và các thành phần khác nhau trong sinh học mẫu. Cho hỗn hợp đi qua các màng lọc, các phân tử lớn sẽ không thể đi qua lỗ gel nhỏ, từ đó thu được exosome [52]. Tuy phương pháp này có giá thành rẻ nhưng các hạt exosome có thể bị pha tạp với các hạt có kích thước tương tự [53].

Bảng 1.1 Các phương pháp phân lập exosome.

Kỹ thuật phân lập	Ưu điểm	Nhược điểm	Tài liệu tham khảo
Siêu ly tâm	- Có thể phân lập các exosome với liều lượng khác nhau.	- Tốn thời gian. - Chi phí cao.	[48]
Kết tủa polymer	- Các exosome phân lập có cấu trúc hoàn chỉnh và kích thước đồng nhất. - Các đặc điểm sinh học của exosome không bị ảnh hưởng đáng kể.	- Các exosome có độ tinh khiết không cao.	[51]
Sắc ký ái lực	- Exosome có độ tinh khiết cao.	- Điều kiện bảo quản exosome tương đối khắc nghiệt. - Không thích cho quy mô lớn.	[52]
Trích ly dựa trên kích thước	- Giá thành rẻ.	- Các hạt exosome có thể bị pha tạp bởi các hạt có kích thước tương tự.	[53]

1.3.3. Một số tính chất đặc điểm của exosome

Các túi ngoại bào exosome được tiết ra từ các tế bào sống khác nhau sẽ được cấu tạo bởi các thành phần khác nhau, vì vậy các exosome sẽ có các đặc tính riêng biệt.

Với các exosome được tiết ra từ đại thực bào giàu miR-155, chất điều hòa nội tiết đối với sự tăng sinh và viêm của nguyên bào sợi khi tim bị tổn thương [54]. Trong khảo sát của Zheng và cộng sự, họ kích thích dòng tế bào RAW264.7 của đại thực bào (LPS-Ex) tiết ra exosome để tạo ra sự bảo vệ thần kinh bằng cách tăng cường phân cực kiểu hình M2 kháng viêm vi mô [55].

Các exosome bắt nguồn từ tế bào đuôi gai (DCexo) có các thành phần phân tử biểu hiện bề mặt của DCexo bao gồm MHCI và MHCII chức năng, các phân tử kích thích (CD80, CD86 và CD40), tetraspanins (CD9, CD63 và CD81), tích phân $\alpha\beta 2$ ($\alpha\beta 2$), ICAM-1, sữa hạt cầu béo-yếu tố 8 EGF, và các thành phần khác của tương tác tế bào [56]. Giống như các tế bào đuôi gai, DCexo có khả năng kích hoạt các tế bào T CD4 và CD8, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đóng chức năng quan trọng trong hệ miễn dịch. Các protein tế bào như tubulin và actin có thể nhắm mục tiêu hiệu quả đến các tế bào thụ thể ở xa [57]. Ngoài ra, Dex là một phương tiện liên lạc các DC thông qua vận chuyển RNA.

Do nhu cầu dinh dưỡng để phát triển mạnh mẽ của các tế bào ung thư, tế bào ung thư tiết ra các exosome nhằm vận chuyển tín hiệu. Các exosome chứa các RNA không mã hóa ví dụ như microRNA 105, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hình thành mạch. Ngoài ra, các exosome tiết ra từ tế bào ung thư còn chứa các yếu tố quan trọng khác như VEGF, MMPs ảnh hưởng quan trọng tới quá trình tăng sinh mạch máu [58].

Các exosome có nguồn gốc từ tế bào trung mô chứa các cytokine và các yếu tố tăng trưởng, lipid tín hiệu, mRNA và miRNA điều chỉnh. Khi mô bị tổn thương, nồng độ tương đối của cơ chất và sản phẩm enzym bị thay đổi, enzym được kích hoạt, và tế bào trung mô tiết ra các exosome được nội bào hóa bởi mô bị tổn thương để khôi phục chức năng bình thường của tế bào [59]. Ngoài ra, một số đặc tính điều hòa miễn dịch đã nói ở trên của MSC có thể được chuyển sang các exosome. Zhang và cộng sự nghiên cứu exosome trung mô tế bào làm trung gian cho việc sửa chữa sụn. Qua phương pháp nuôi cấy tế bào chondrocyte, sự tăng sinh và xâm nhập tế bào nhanh chóng trong quá trình sửa chữa sụn qua trung gian exosome được cho là do sự hoạt hóa adenosine qua trung gian CD73 của exosomal đối với tín hiệu AKT và ERK [60].

Ngoài các tế bào kể trên, các tế bào sống khác như tế bào lympho, tế bào biểu mô màng ối, tế bào mast cũng tiết ra exosome vận chuyển các protein và axit nucleic phản ánh sinh lý tế bào và bệnh lý tế bào của chúng, thể hiện các chức năng khác nhau trong cơ thể sống. Xie và cộng sự đã chứng minh rằng các exosome tế bào mast có thể liên kết với IgE đặc hiệu với chất

gây dị ứng tự do [61]. Nghiên cứu của Hadley về những thay đổi do viêm gây ra bởi các exosome có nguồn gốc từ biểu mô màng ối trong tế bào tử cung như là một loại tín hiệu qua trung gian exosome này là một cơ chế giao tiếp mới giữa thai nhi và mẹ [62]. Các MicroRNA Exosomal có nguồn gốc từ tế bào lympho thúc đẩy quá trình chết của tế bào β tuyến tụy và có thể góp phần gây ra bệnh tiểu đường Loại 1 [63].

1.4. Thiết bị vi lưu

Thiết bị vi lưu là một lĩnh vực nghiên cứu đang phát triển liên quan đến thao tác của chất lỏng ở cấp độ vi mô và chúng được thấy phổ biến nhất bởi các thiết bị có kích thước nhỏ hơn 1 mm. Các hệ thống vi lưu cho phép thu nhỏ, tích hợp, tự động hóa và song song hóa chung và nhất quán các quá trình hóa học (sinh học). Những lợi ích đa dạng này đã giúp vi lỏng tìm thấy các ứng dụng trong nhiều lĩnh vực bao gồm hóa học phân tích, sản xuất năng lượng, tách tế bào, và sinh học phân tử. Một số trong đó, nuôi cấy tế bào là một hướng đã được tác động đáng kể. Nuôi cấy tế bào đề cập đến việc duy trì và phát triển tế bào trong môi trường phòng thí nghiệm được kiểm soát. Việc nuôi cấy tế bào trong hệ vi lưu đã được nghiên cứu và phát triển với thiết bị và kỹ thuật để nuôi cấy, duy trì, phân tích và thử nghiệm các tế bào với khối lượng vi mô. Ngoài ra một ưu điểm khác của hệ vi lưu giúp các tế bào được nuôi cấy ở các buồng nuôi cấy riêng nhưng vẫn đảm bảo thông tin liên lạc giữa các loại tế bào với. Các thông tin của từng loại tế bào sẽ thông qua môi trường nuôi cấy được luân chuyển trong kênh vi lưu để liên lạc với các dòng tế bào khác. Sự phát triển các kỹ thuật này giúp các nghiên cứu hiểu được rõ hơn sự tương tác giữa các tế bào và thông số nuôi cấy quan trọng. Các mô hình nuôi cấy tế bào trong ống nghiệm như vậy là cơ sở chính của nghiên cứu sinh học tế bào thực nghiệm và nghiên cứu y học lâu dài.

1.5. Sự cần thiết của nghiên cứu

Như đã thấy, ung thư là một vấn đề sức khỏe hết sức quan ngại cả trên thế giới và Việt Nam. Hiện đây vẫn được coi như căn bệnh nan ý cướp đi sinh mạng của rất nhiều người hàng năm. Chính vì vậy, các nghiên cứu tìm ra giải

pháp trong điều trị ung thư là vô cùng cần thiết. Ý tưởng “bỏ đói” tế bào ung thư được đưa ra và nhận được rất nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trong và ngoài nước. Việc các tế bào ung thư phát triển một cách không kiểm soát, nhu cầu về các chất dinh dưỡng cần thiết của chúng cao. Ở khu vực có khối u, lượng mạch máu tập trung ở đây là rất nhiều. Do đó, việc ngăn cản sự tạo thành các mạch máu này là một giải pháp để “bỏ đói” tế bào ung thư, từ đó gây chết một cách tự nhiên các khối u.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng exosome tham gia vào quá trình hình thành mạch máu trong sự phát triển của ung thư bằng cách vận chuyển các thành phần tiền ung thư như yếu tố tăng trưởng mạch máu nội mô (VEGF), metalloproteinase hay microRNA. Ngoài ra, exosome cũng thúc đẩy quá trình hình thành mạch máu bằng cách ức chế HIF-1, một nguyên tố giúp thúc đẩy quá trình hình thành mạch máu trong cơ thể. Vì vậy, việc vận chuyển và giải phóng exosome đóng một vai trò quan trọng trong việc hình thành, phát triển và di căn của ung thư đến các cơ quan. Do đó, các nghiên cứu về exosome đóng vai trò quan trọng để xác định rõ các cơ chế gây bệnh ung thư cũng như đưa ra các phương pháp điều trị ung thư mới trong tương lai.

Hiện nay các mô hình tăng sinh mạch máu thường sử dụng phương pháp nuôi cấy đồng thời các tế bào. Tuy nhiên, việc phân lập các môi trường nuôi cấy riêng biệt của các tế bào này là rất khó khăn gây hạn chế trong việc biệt hoá các exosome. Chính vì vậy, chúng tôi sẽ tiến hành chế tạo hệ vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào ung thư và tế bào mạch máu. Ưu điểm của hệ vi lưu giúp các tế bào được nuôi cấy ở các khu vực riêng biệt nhưng vẫn đảm bảo thông tin liên lạc giữa hai loại tế bào với nhau thông qua môi trường nuôi cấy được luân chuyển trong kênh vi lưu. Bên cạnh đó, hệ vi lưu cũng có khu vực giúp thu nhận môi trường nuôi cấy dễ dàng, giúp phân lập exosome thuận tiện theo từng nhu cầu nghiên cứu. Từ đó, nghiên cứu cũng làm rõ một số đặc điểm của exosome phân lập từ tế bào ung thư gan làm tiền đề để xác định cơ chế tăng sinh mạch máu và mở ra hướng điều trị ung thư mới trong tương lai.

1.6. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với một số mục tiêu chính:

1. *Chế tạo thiết bị nuôi cấy đồng thời tế bào ung thư gan và tế bào mạch máu để thu exosomes*
2. *Thu nhận, đánh giá đặc điểm, tính chất của exosomes làm tiền đề để xác định cơ chế tăng sinh mạch trong ung thư*

Với mục tiêu trên, một thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời hai dòng tế bào được thiết kế, chế tạo và phát triển. Thiết bị vi lưu được chế tạo từ các vật liệu sẵn có theo phương pháp đã được thương mại hoá nên chi phí giá thành thấp, phù hợp cho việc sản xuất công nghiệp số lượng lớn cũng như thay đổi tùy theo nhu cầu của từng phòng thí nghiệm. Trên thiết bị này tế bào ung thư gan được nuôi cấy đồng thời với tế bào mạch máu cũng như định hướng dòng chảy để thu được dịch môi trường nuôi cấy giúp phân lập exosome một cách chủ động. Nghiên cứu được thực hiện với 4 nội dung chính:

1. *Chế tạo thiết bị thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào và phân lập môi trường nuôi cấy tế bào*
2. *Phân lập exosomes từ môi trường nuôi cấy tế bào*
3. *Nghiên cứu một số tính chất của exosome phân lập được*
4. *Nghiên cứu ảnh hưởng của exosome phân lập được từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG2 tới sự phát triển của tế bào HUVEC*

CHƯƠNG 2 : PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu:

Tế bào ung thư gan người Human hepatocellular carcinoma cells HepG₂ được cung cấp bởi ATCC (Hoa Kỳ) với ký hiệu tế bào HB-8065. Tế bào nội mô tĩnh mạch người HUVECs mã CRL-1730 được đặt mua từ ATCC (Hoa Kỳ) với ký hiệu tế bào CRL-1730. Tế bào HepG₂ được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Fisher, Hoa Kỳ) và được bổ sung thêm 10% FBS (Invitrogen, Hoa Kỳ) và 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL) (Mediatech, Hoa Kỳ). Tế bào HUVEC được nuôi cấy trong môi trường EBM – 2 (Lonza, Hoa Kỳ) được bổ sung thêm FBS (10 mL), hydrocortisone (0,20 mL), hFGF-B (2,00 mL), VEGF (0,50 mL), R3-IGF-1 (0,50 mL), ascorbic acid (0,50 mL), hEGF (0,50 mL), GA-1000 (0,50 mL) và heparin (0,50 mL).

Tấm mica trong PMMA được mua từ sản phẩm thương mại của công ty Fu Sheng (Đài Loan). Phiến kính được cung cấp bởi Duran (Đức). Kháng thể kháng CD63 đa dòng của thỏ được mua từ Abcam, Hoa Kỳ. Kháng thể kháng HSPG2 của thỏ được mua từ ProteinTech, Trung Quốc. GAPDH được sử dụng như một phương pháp điều chỉnh bên trong và kháng thể chống GAPDH được mua từ CoWin Biotech, Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Chế tạo thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào ung thư gan và tế bào mạch máu

Thiết bị gồm hai lớp PMMA và một lớp kính phía dưới cùng. Các tấm PMMA của thiết bị được thiết kế bởi phần mềm CorelDraw 2020 (Corel Corporation, Canada) và được gia công chế tạo bằng cách cắt và khắc laser trên máy cắt và khắc laser chuyên dụng tại cơ sở dịch vụ cắt khắc laser (Phan Long Ltd, Việt Nam). Các miếng PMMA sau khi được gia công được rửa bằng dung dịch nước cất và cồn 90⁰ để loại bỏ các bụi bẩn sau khi gia công.

Tấm kính hình chữ nhật 24 x 50 mm được xử lý bề để tăng cường khả năng kết nối giữa mặt kính và hydrogel theo quy trình sau. Đầu tiên, kính sẽ được ngâm 12h trong dung dịch 50ml NaOH 10%. Sau đó, kính được rửa bằng 20 ml etanol 70%, 20 ml etanol 100% và làm khô ở nhiệt độ 70°C. Các

kính được ngâm với 2ml TMSPMA trong 12h. Sau đó, kính được làm sạch một lần nữa bằng nước cất, 20 ml etanol 70% và 20ml etanol 100%.

Sau khi được làm sạch, mặt kính được gắn với miếng PMMA 3mm bằng keo UV.

2.2.2. Lắp ráp thiết bị vi lưu

Dung dịch PEGDA được chuẩn bị với các nồng độ khác nhau 1%, 2%, 5%, 8% và 10% (theo thể tích) bằng cách pha PEGDA ($M_w = 700$ Da, Sigma, Hoa Kỳ) với dung dịch đệm phosphate (pH = 7,4). Các dung dịch được bổ sung chất khơi mào phản ứng quang hoá photoinitiat (PI) với nồng độ 0,02%.

Dung dịch PEGDA với các nồng độ khác nhau được nhỏ từ từ đến đầy vào vùng tròn lớn chính giữa thiết bị. Sau đó, thiết bị được đặt dưới đèn chiếu UV. Thời gian chiếu UV để hydrogel hình thành trong thiết bị với các nồng độ dung dịch PEGDA khác nhau được ghi nhận nhằm xác định thời gian chiếu phù hợp.

Sau đó, ba đường ống được gắn vào ba đầu (ra và vào của môi trường nuôi cấy) được gắn vào thiết bị bằng keo UV. Cuối cùng, thiết bị được bổ sung dung dịch đệm phosphate và giữ dưới đèn UV để khử khuẩn qua đêm trước khi được đem đi sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị vi lưu

Dung dịch màu thực phẩm được chuẩn bị để quan sát dòng chảy hoạt động trong thiết bị vi lưu. Cụ thể, 5 ml dung dịch màu thực phẩm được bơm bằng thiết bị đẩy xi lanh với vận tốc 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ vào đầu ống chính giữa của thiết bị. Dòng nước màu sẽ chảy, thẩm thấu qua lớp hydrogel và đi sang hai vùng giếng dùng để nuôi cấy tế bào. Khả năng hoạt động của dòng chảy dung dịch màu trong hệ vi lưu khi đi qua hydrogel được hình thành với các nồng độ khác nhau được theo dõi để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ PEGDA tới hoạt động của thiết bị.

Bên cạnh đó, dòng dung dịch màu thực phẩm được đẩy vào thiết bị với các vận tốc khác nhau nhờ thiết bị đẩy xylanh lần lượt là 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ và 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Sự nứt vỡ của hydrogel và mặt kính đáy được theo dõi để kiểm tra khả năng hoạt động cũng như giới hạn hoạt động của thiết bị.

2.2.4. Nuôi cấy tế bào

Tế bào HepG2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM. Tế bào HUVEC được nuôi cấy trong môi trường EBM – 2 (Lonza, Hoa Kỳ). Các loại tế bào được nuôi cấy trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂ và được thay môi trường mỗi 2 ngày. Khi lượng tế bào bao phủ 80% bề mặt đĩa nuôi cấy thì được cấy chuyển sang đĩa mới, cho tới khi đủ lượng tế bào cần thiết cho các nghiên cứu tiếp theo. Tế bào HUVEC được sử dụng có passage từ P4 tới P6.

Khi tế bào HepG2 và HUVEC đủ để tạo dung dịch có nồng độ 10³ tế bào/ml thì các tế bào được bơm đồng thời vào 2 khu vực nuôi cấy tế bào trong thiết bị vi lưu. Thiết bị được để yên trong 1 giờ để tế bào bám dính xuống bề mặt thiết bị trước khi được bơm môi trường nuôi cấy tế bào EBM-2 như trên theo hướng đi qua giếng nuôi cấy tế bào HepG2 qua khối hydrogel tới giếng nuôi cấy tế bào HUVEC và thải ra ngoài. Hệ vi lưu được đưa vào tủ ấm, nhiệt độ 37°C và môi trường có 5% CO₂ trong khi môi trường vẫn liên tục được bơm qua hệ với tốc độ 0,3 µl/min, duy trì trong 72h cho tới khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo

2.2.5. Phương pháp đếm tế bào

Tế bào được thu nhận bằng bổ sung 1 ml Trypsin-EDTA 0.25% được thêm vào vùng nuôi cấy tế bào HUVEC và được hút nhẹ ra sau 30s. Dung dịch PBS được thêm vào để làm sạch môi trường trước khi 1 ml dung dịch EBM-2 mới được nhỏ vào lại. Sau đó, lấy ra 100 µL tế bào HUVEC cho vào ống Eppendorf mới và thêm 400 µL 0,4% Trypan Blue (nồng độ cuối cùng 0,32%) và trộn nhẹ nhàng. Buồng đếm tế bào Neubauer được sử dụng. Pha loãng dịch tế bào HUVEC thu được ở thiết bị vi lỏng cho trong mỗi ô nhỏ của buồng đếm có khoảng 5-10 tế bào (không lớn hơn 10 tế bào và nhỏ hơn 2,5 tế bào). Ô lớn từ 10-50 tế bào. Lắc đều ống nghiệm pha loãng mẫu. Dùng micropipette 100ul nhỏ dung dịch chứa HUVEC vào giữa buồng đếm, dùng tay tráng nhẹ buồng đếm để dung mẫu tràn đầy khoang đếm. Đặt lại bằng phiến kính, thao tác tránh bọt khí lọt vào trong phiến kính.

2.2.6. Phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào

Để thu lấy exosome được tiết ra từ tế bào HepG2, sau 72h nuôi cấy đồng thời 2 loại tế bào trong thiết bị, hệ vi lưu được điều chỉnh đóng đầu ra ở

giếng nuôi cấy tế bào HUVEC và mở đầu ra ở khu vực hydrogel. Môi trường nuôi cấy tế bào sẽ đi một chiều qua giếng nuôi cấy tế bào HepG2, rồi qua khối hydrogel và ra ngoài để thu lấy dung dịch nuôi cấy tế bào HepG2. Exosome được phân lập từ phần dịch môi trường nuôi cấy tế bào HepG2 bằng bộ kit kết tủa dung dịch exosome ExoQuick-TCTM (System Biosciences, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đầu tiên, dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm ở 3000g trong 15 phút để kết tủa tế bào và vụn tế bào nếu có trong dịch. Sau đó, 50 ml dịch nổi được lọc qua bộ lọc ly tâm Amicon Ultra-15 (Millipore, Đức) thu được 1ml dịch cô đặc. Phần cô đặc này được chuyển sang ống tube mới. Một mL dung dịch ExoQuick-TC được pha loãng với 5 mL dịch nổi. Các hạt nhỏ được hình thành, bảo quản lạnh qua đêm trong ít nhất 12 giờ và ly tâm ở 1500 g trong 30 phút vào ngày hôm sau. Cuối cùng, các exosome được lưu giữ trong dung dịch đệm phosphat (PBS).

Exosome được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (25 °C), 4 °C, -20 °C và -80 °C để khảo sát độ bền của exosome trong các điều kiện bảo quản. Dung dịch exosome được lấy ra ở các ngày 1, 4, 7, 10 và 14 và đo kích thước hạt bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic light scattering - DLS).

2.2.7. Phương pháp Western Blot

Protein được điều chế bằng cách phân rã exosomes trong dung dịch đệm (RIPA) (Applygen, Trung Quốc), sau đó được phân tách bằng phương pháp điện di gel SDS-PAGE, và chuyển qua điện áp 100V tới màng polyvinylidene difluoride (PVDF) (Millipore) trong thời gian 1 giờ. Sau đó, màng được khóa lại (blocking) bằng dung dịch đệm Tris – Buffered saline với 5% skim-milk. Sau khi được xử lý, màng được ủ qua đêm với các kháng thể sơ cấp ở 4°C. Sau đó màng lại được ủ với các kháng thể thứ cấp có gắn enzyme peroxidase trong 1 giờ. Hoạt tính miễn dịch được phát hiện và phân tích bằng phương pháp điện hóa phát quang trên thiết bị LAS 4000 (GE Helthcare).

2.2.8. Nghiên cứu một số tính chất vật lý của exosome phân lập được từ tế bào HepG2

Kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (DLS) được sử dụng để xác định kích

thước exosome phân lập được từ dịch nuôi cấy tế bào. Các exosome chiết xuất được pha loãng thành dung dịch có nồng độ 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bằng dung dịch đệm PBS và sau đó được chuyển vào một cuvet và thêm 100 μl PBS. Kết quả được phân tích phân tích bằng máy Nano Zetasizer 100 (Malvern, Anh Quốc) với Laser He-Ne (633 nm) cho chùm tia tới ở góc phát hiện 173° và nhiệt độ 25°C . Phép đo kích thước được thực hiện trong một cuvet thạch anh khối lượng thấp. Dữ liệu thu được được tính bằng phương trình Stokes-Einstein.

Các exosome trong PBS được xếp lớp lên lưới kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy -TEM) (HT7820, Hitachi, Nhật Bản). Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lưới được nhuộm âm bản với 3% axit vonfram hydrat trong 2 phút. Các lưới này sau đó được kiểm tra và chụp ảnh lại ở một điện áp gia tốc 80 kV. Hình ảnh kỹ thuật số (3296×2472 pixel) được chụp bằng camera CCD (EM-14830 Ruby 2, Jeol, Nhật Bản).

2.2.9. Phân tích các phân tử đánh dấu trên bề mặt exosome.

Sự biểu hiện của các phân tử đánh dấu trên bề mặt exosome đã được xác nhận bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy trên máy đo lưu lượng dòng chảy tế bào FACS (BD Biosciences, Hoa Kỳ). Các hạt latex IDC kích thước 4.0 μm được sử dụng làm hạt chuẩn để xác định kích thước cho phân tích đếm tế bào dòng chảy. Cụ thể, hạt latex IDC (5 μL , $1,4 \times 10^7$ hạt) và dung dịch exosome (20 μg) trong PBS (20 μL) được trộn với một rô to trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các kháng thể đơn dòng liên hợp FITC (FITC-anti-CD63, -anti-CD81 -anti-CD314 (NKG2D) và -anti-HSP70) được thêm vào dung dịch ở nồng độ thích hợp và được ủ qua đêm ở 4°C . Dung dịch sau đó được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng / phút trong 3 phút để các hạt kết hợp với exosome được phân lập và rửa bằng PBS bổ sung 2% FBS.

2.2.10. Ảnh hưởng của exosome tới sự phát triển của tế bào HUVEC

Để kiểm tra khả năng phát triển tế bào HUVEC khi được bổ sung exosome từ tế bào ung thư gan HepG₂, các tế bào được nuôi cấy trong thiết bị vi lưu. Tương tự như nuôi cấy tế bào để thu exosome, tế bào HUVEC được nuôi ở một giếng của hệ thiết bị. Môi trường nuôi cấy tế bào EBM-2 như trên được bổ sung thêm 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ exosome phân lập từ thí nghiệm trước đó và bơm

vào hệ với vận tốc 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ trong vòng 72h. Sau lần lượt từng khoảng thời gian là 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được loại bỏ và rửa lại bằng PBS. 1 ml Trypsin-EDTA 0.25% được thêm vào vùng nuôi cấy tế bào HUVEC và được hút nhẹ ra sau 30s. Dung dịch PBS được thêm vào để làm sạch môi trường trước khi 1 ml dung dịch EBM-2 mới được nhỏ vào lại. Dung dịch EBM-2 và tế bào toàn bộ được chuyển sang ống Eppendorf và xoay nhẹ để đảm bảo các tế bào được phân bố đều. Sau đó, lấy ra 100 μL tế bào HUVEC cho vào ống Eppendorf mới và thêm 400 μL 0,4% Trypan Blue (nồng độ cuối cùng 0,32%) và trộn nhẹ nhàng. Dùng pipet lấy 100 μL huyền phù tế bào được xử lý bằng Trypan Blue nhỏ nhẹ vào thiết bị đếm tế bào để thu được kết quả số lượng tế bào HUVEC.

Thí nghiệm đối chứng âm được tiến hành tương tự như trên nhưng môi trường nuôi cấy tế bào không được bổ sung exosome. Ngoài ra, thí nghiệm đối chứng khác được thiết kế khi nuôi cấy đồng thời hai loại tế bào trong hệ vi lưu được thiết lập tương tự như các thí nghiệm trước chỉ khác trong quá trình nuôi cấy tế bào, sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ, tế bào HUVEC được phân lập để đếm số lượng tế bào với các thao tác tương tự thử nghiệm nuôi cấy tế bào HUVEC được bổ sung thêm exosome phân lập từ tế bào ung thư gan HepG₂.

2.2.11. *Phân tích thống kê*

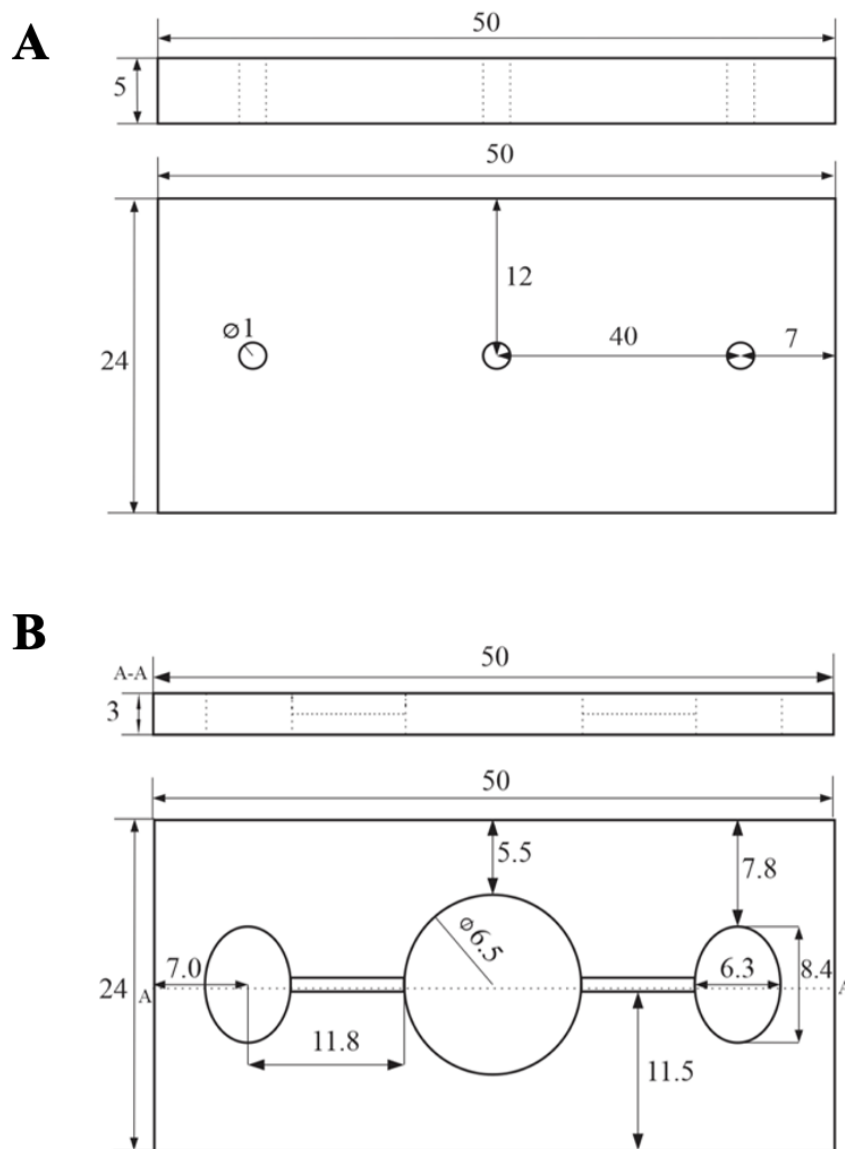
Mỗi thử nghiệm được thực hiện ít nhất với ba thí nghiệm độc lập. Dữ liệu được hiển thị dưới dạng \pm STD. Sự khác biệt thống kê được phân tích bằng phương pháp Student-t và giá trị P nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo thiết bị thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào và phân lập môi trường nuôi cấy tế bào

3.1.1. Thiết kế và gia công các chi tiết của thiết bị

Các chi tiết tạo bởi tấm PMMA của thiết bị vi lưu được thiết kế bằng phần mềm CorelDraw ver. 24.02 được trình bày như Hình 3.1.



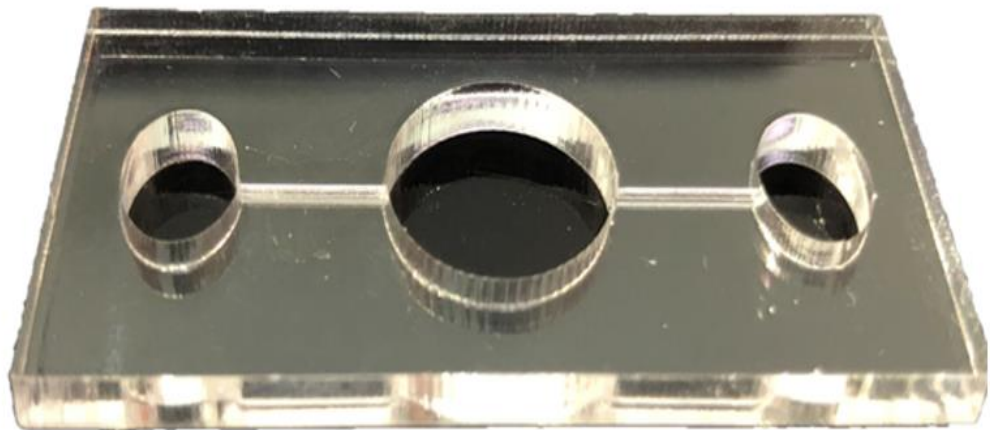
Hình 3.1 Hình ảnh thiết kế các chi tiết PMMA của thiết bị vi lưu. (A) Bản thiết kế tấm PMMA thứ nhất của thiết bị vi lưu. (B) Bản thiết kế tấm PMMA thứ hai của thiết bị vi lưu.

Các tấm PMMA được thiết kế với độ dài, độ rộng xác định. Các lỗ để ống dẫn và các giếng được thiết kế để cắt bằng laser. Các đường kênh được thiết kế để khắc trên bề mặt tấm PMMA.

Các tấm PMMA được cắt và khắc laser chính xác theo thiết kế bằng máy cắt và khắc laser thương mại. Thời gian gia công hoàn thiện thiết bị rất nhanh chóng, dễ dàng nhưng vẫn đảm bảo các bộ phận theo đúng thiết kế đặt ra. Các miếng PMMA sau khi được gia công và làm sạch được minh họa như Hình 3.2.

Thiết bị gồm 3 lớp trong đó có 2 lớp PMMA và 1 lớp là phiến kính có kích thước 50 x 24 mm.

- (i) Lớp đầu tiên của thiết bị là một tấm PMMA trong dày 5 mm được cắt với kích thước 24 x 50 mm. Trên tấm PMMA 5 mm này có 3 lỗ tròn (bán kính 1 mm) được cắt laser để có thể nối với ống nhựa y tế sử dụng làm đầu vào và đầu ra của dòng chảy. Khoảng cách giữa các lỗ tròn được nêu chi tiết như trong Hình 1A.
- (ii) Tấm PMMA thứ 2 là một tấm PMMA trong dày 3mm, có kích thước 24 x 50 mm. Tấm PMMA này được cắt laser để có một hình tròn lớn bán kính 6.5 mm ở trung tâm để tạo khối hydrogel và 2 hình elip ở hai bên là 2 giếng nuôi cấy tế bào. Hai vùng cắt hình elip được nối với hình tròn lớn bằng các kênh được chế tạo bằng phương pháp khắc laser với chiều rộng của kênh là 1 mm, đảm bảo khả năng di chuyển của vật chất và môi trường nuôi cấy tế bào.
- (iii) Mặt dưới cùng của thiết bị là một phiến kính kích thước 24 x 50 mm có bề mặt được xử lý bằng dung dịch TMSPPMA giúp khối hydrogel bám chắc hơn vào bề mặt kính và không bị trôi theo dòng chất lỏng trong quá trình nuôi cấy tế bào và các thử nghiệm khác.

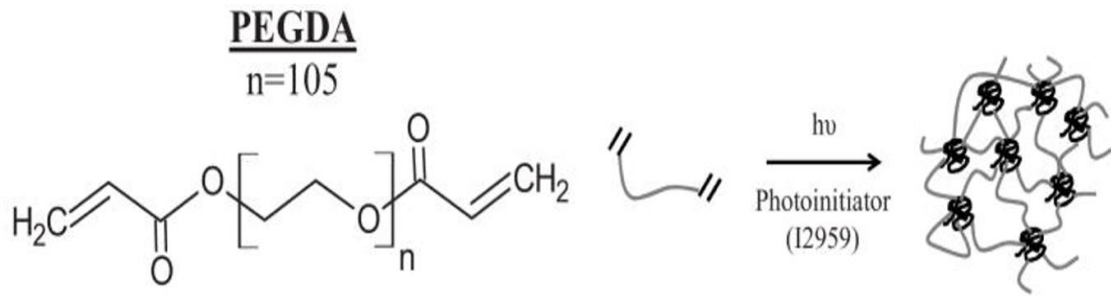
A**B**

Hình 3.2 Hình ảnh các chi tiết PMMA của thiết bị vi lưu. (A) Tấm PMMA thứ nhất của thiết bị vi lưu được chế tạo bằng phương pháp cắt và khắc laser. (B) Tấm PMMA thứ hai của thiết bị vi lưu được chế tạo bằng phương pháp cắt và khắc laser

Có thể thấy, các chi tiết PMMA của thiết bị được gia công sắc nét, có kích thước phù hợp với thiết kế. Thời gian gia công nhanh khi sử dụng máy khắc và cắt laser thương mại hiện có mặt rộng rãi trên thị trường. Giá thành của cắt và khắc laser chỉ dao động trong khoảng 10.000 VNĐ cho mỗi chi tiết bao gồm cả nguyên vật liệu. Xét về mặt tổng thể thiết bị vi lưu được chế tạo với chi phí tổng cộng là 26.000 VNĐ bao gồm (1) tấm PMMA (2 tấm x 10.000 VNĐ), (2) tấm phiến kính kích thước 24 mm x 50 mm (1.000 VNĐ), ống dẫn y tế đường kính ngoài 2 mm (3.000 VNĐ), hydrogel (1.500 VNĐ) keo UV (500 VNĐ). Đây là một lợi thế rất lớn khi so sánh với các phương pháp chế tạo hệ vi lưu khác, ví dụ như khắc quang học sử dụng đế silicon. Chính vì vậy, việc sử dụng công nghệ cắt và khắc laser giúp chế tạo các chi tiết hệ vi lưu với giá thành rẻ, thời gian gia công nhanh, thuận tiện cho các phòng thí nghiệm nghiên cứu hoá học, y sinh và các ngành khác có liên quan với nguồn ngân sách hạn chế.

3.1.2. Lắp ráp và hoàn thiện thiết bị

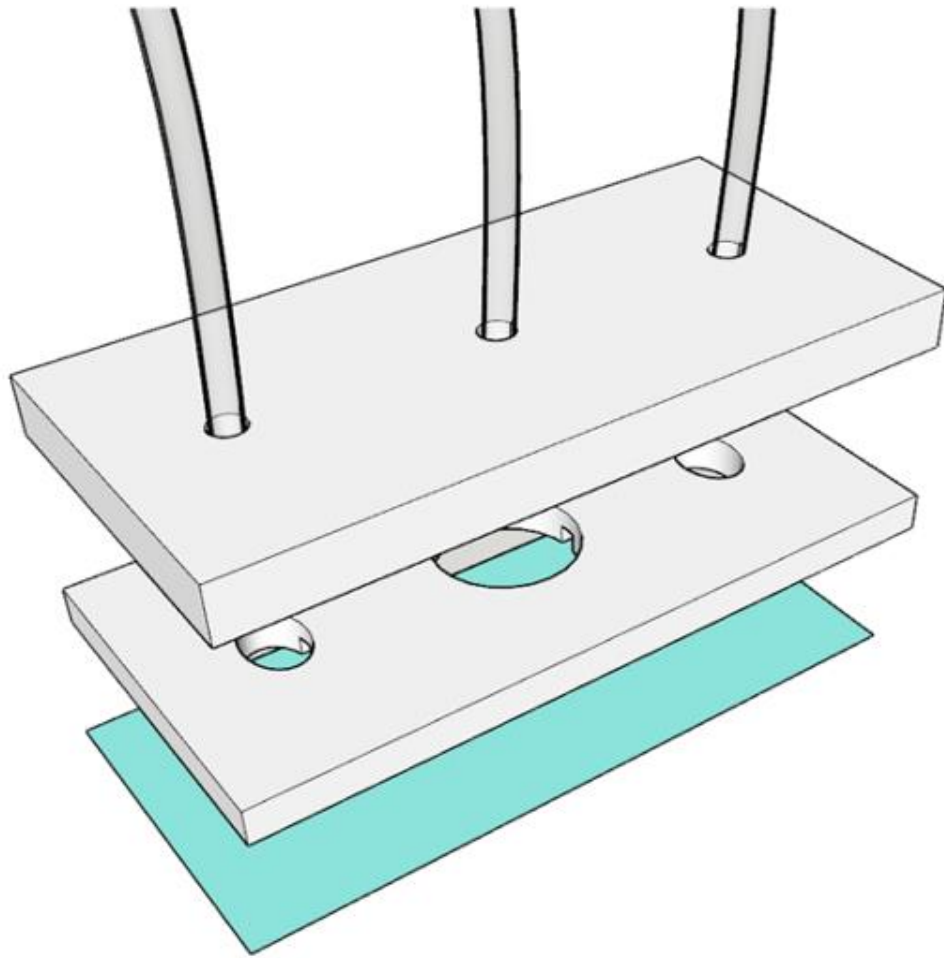
Phiến kính đã được xử lý bề mặt bằng TMSPPMA được gắn vào mặt dưới gồm các kênh khắc của tấm PMMA bằng keo UV sau cho lớp keo không chảy vào trong kênh. Sau đó, hỗn hợp dung dịch PEGDA với các nồng độ khác nhau (1 mL) được bơm vào khu vực hình tròn trung tâm của thiết bị và được chiếu đèn UV. Thời gian chiếu đèn UV được xác định là giá trị làm đông khối hydrogel có kích thước hình trụ tròn với kích thước tương đương vùng tròn được thiết kế ở trung tâm của thiết bị. Cơ chế tạo thành hydrogel được biểu diễn trong hình 3.3. Khi kích thích dung dịch hỗn hợp bằng tia UV thì chất kích hoạt quang PI tạo thành các gốc tự do. Các gốc tự do này tham gia phản ứng với nối đôi trong phân tử PEGDA và tạo gốc tự do khác. Từ đó xảy ra phản ứng dây chuyền để liên kết các phân tử PEGDA lại với nhau tạo thành khối hydrogel. Độ đặc của khối được quyết định bởi nồng độ PEGDA có trong dung dịch ban đầu.



Hình 3.3 Mô phỏng quá trình tạo hydrogel từ dung dịch PEGDA có bổ sung chất kích hoạt quang PI

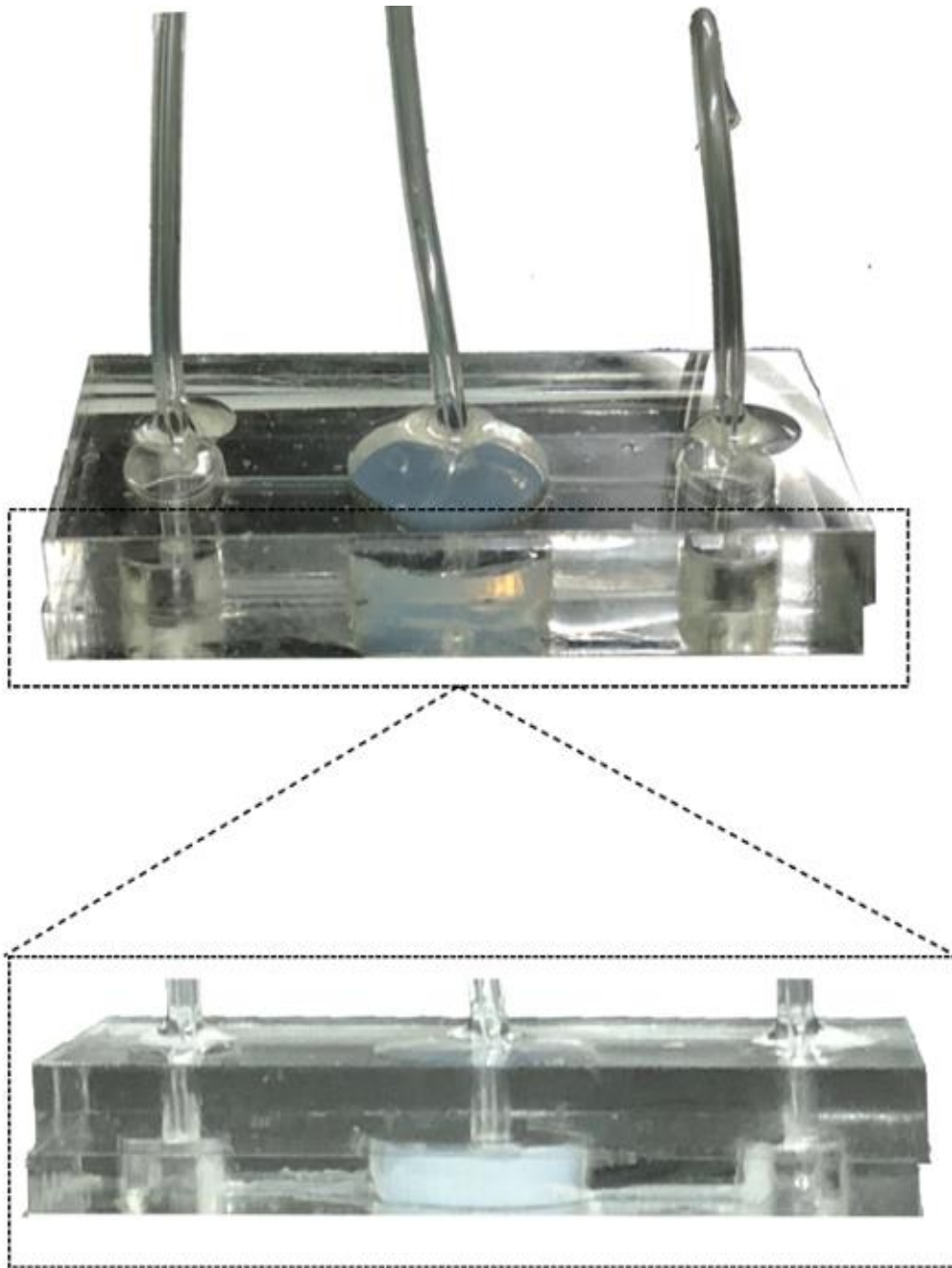
Các nồng độ PEGDA 1%, 2% 5%, 8% và 10% đã lần lượt được thử nghiệm. Kết quả cho thấy với nồng độ PEGDA 1%, hỗn hợp dung dịch hydrogel vẫn là chất lỏng và không đông sau 30 phút đặt dưới UV. Hỗn hợp dung dịch hydrogel 2% PEGDA chỉ đông một phần sau 30 phút được chiếu UV và với nồng độ 5% PEGDA thì hydrogel đông hoàn toàn. Khi tăng thêm nồng độ PEGDA lên 8% thì chỉ sau 10 phút chiếu, hydrogel đã đông hoàn toàn và tốc độ đông của hydrogel được tăng nhanh hơn khi nồng độ PEGDA là 10%.

Sau khi hydrogel đông lại, tấm PMMA 5mm được gắn lên phía trên bề mặt hydrogel cùng với khác ống dây để có một thiết bị hoàn chỉnh. Thiết bị sau khi hoàn thành được minh họa như Hình 3.4 và Hình 3.5. Thiết bị có kích thước 24 mm x 50 mm x 9 mm với 3 đầu vào và ra của dòng chảy. Bên trong thiết bị có 3 giếng, 2 giếng ở 2 bên được sử dụng để nuôi cấy tế bào, giếng trung tâm được làm đầy bởi khối hydrogel giúp ngăn cản sự phát triển của tế bào ra khỏi khu vực nuôi cấy. Điều này có được là do tế bào không có khả năng bám dính trên bề mặt hydrogel cũng như bên trong khối hydrogel. Chính vì vậy, hệ vi lưu của thiết bị được đảm bảo khả năng tế bào phát triển ở các vùng riêng nhưng vẫn liên hệ được với nhau qua dòng chảy của môi trường nuôi cấy tế bào.



Hình 3.4 Hình ảnh mô phỏng các lớp chi tiết của thiết bị vi lưu.

Như vậy có thể thấy, từ thiết kế, gia công các chi tiết cũng như lắp ráp tạo thành thiết bị vi lưu hoàn chỉnh rất nhanh, chỉ khoảng vài giờ đồng hồ. Việc chế tạo không đòi hỏi các thiết bị đắt tiền, hiện đại hay yêu cầu về nhân lực có trình độ cao được đào tạo chuyên sâu. Đây là ưu điểm rất lớn của phương pháp chế tạo thiết bị vi lưu này, từ đó tạo thuận lợi để triển khai các nghiên cứu ứng dụng thiết bị này trong thời gian tới.

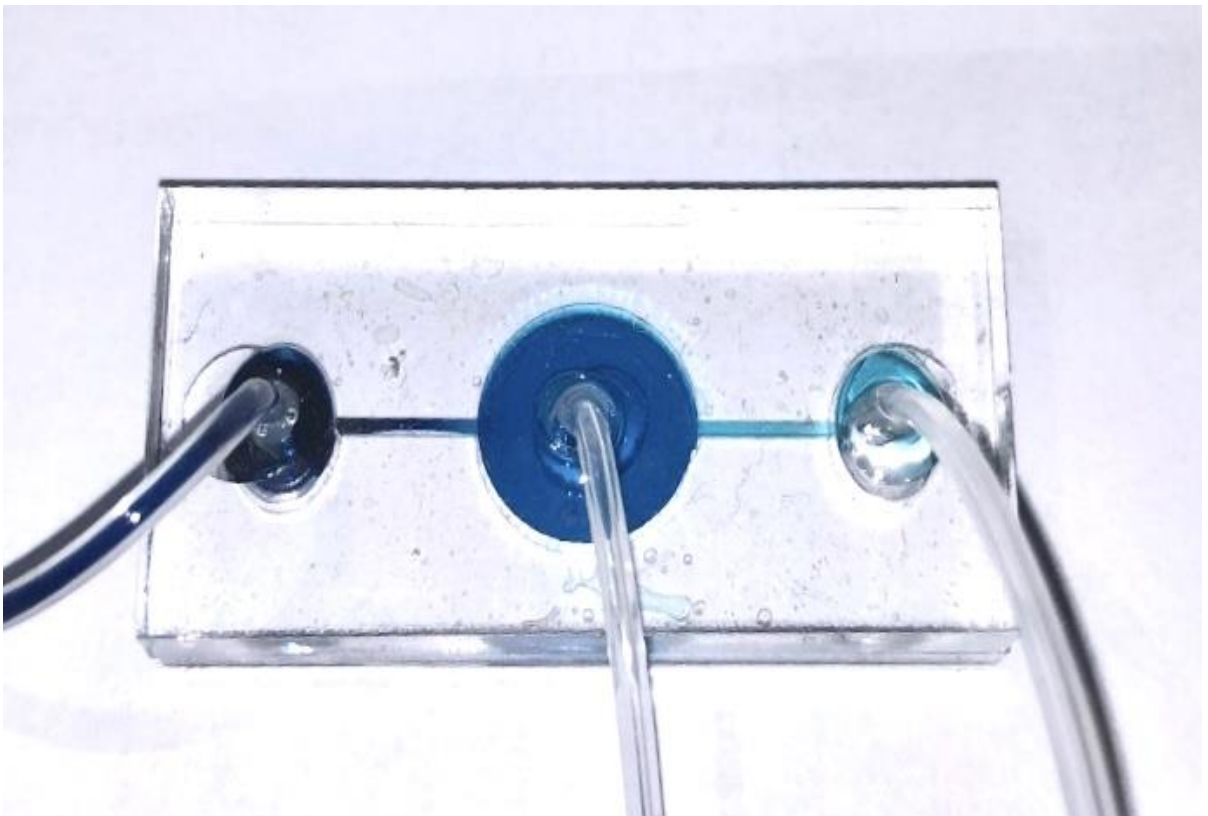


Hình 3.5 Hình ảnh thiết bị vi lưu nuôi cấy tế bào hoàn chỉnh (khối trắng ở giữa là khối hydrogel trong thiết bị)

Về mặt giá thành, thiết bị vi lưu được chế tạo bằng các nguyên vật liệu rẻ tiền, phổ biến như PMMA, phiên kính, ống nhựa y tế, hydrogel. Kể cả chi phí gia công các chi tiết thì tổng chi phí để chế tạo một hệ vi lưu dưới 100.000 VND, tạo điều kiện để các nhóm nghiên cứu khác có thể triển khai nhanh chóng.

3.1.3. Thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị vi lưu

Khả năng hoạt động của dòng vi lưu khi qua hydrogel được kiểm tra bằng việc sử dụng dung dịch màu thực phẩm. Kết quả cho thấy ở nồng độ dung dịch là 10%, dòng dung dịch màu khó chảy qua do hydrogel có kết cấu đặc gây cản trở một phần dòng chảy. Khi hydrogel có nồng độ PEGDA thấp, dòng dung dịch màu có thể dễ dàng di chuyển qua hơn. Vì vậy khi thử nghiệm ở hai nồng độ PEGDA là 8% và 5%, kết quả cho thấy dung dịch màu thực phẩm có thể dễ dàng di chuyển qua phần hydrogel. Tuy nhiên, nồng độ PEGDA được chọn để sử dụng trong thiết bị là 8% vì thời gian đông khi chiếu UV của nồng độ này nhanh hơn nồng độ 5% mà vẫn có thể đảm bảo khả năng hoạt động của thiết bị. Thêm vào đó, ở nồng độ 8%, hydrogel có độ ổn định hơn, và phần hydrogel khó bị phá vỡ hơn khi hoạt động ở dòng chảy có vận tốc cao (hình 3.6).



Hình 3.6. Thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị vi lưu

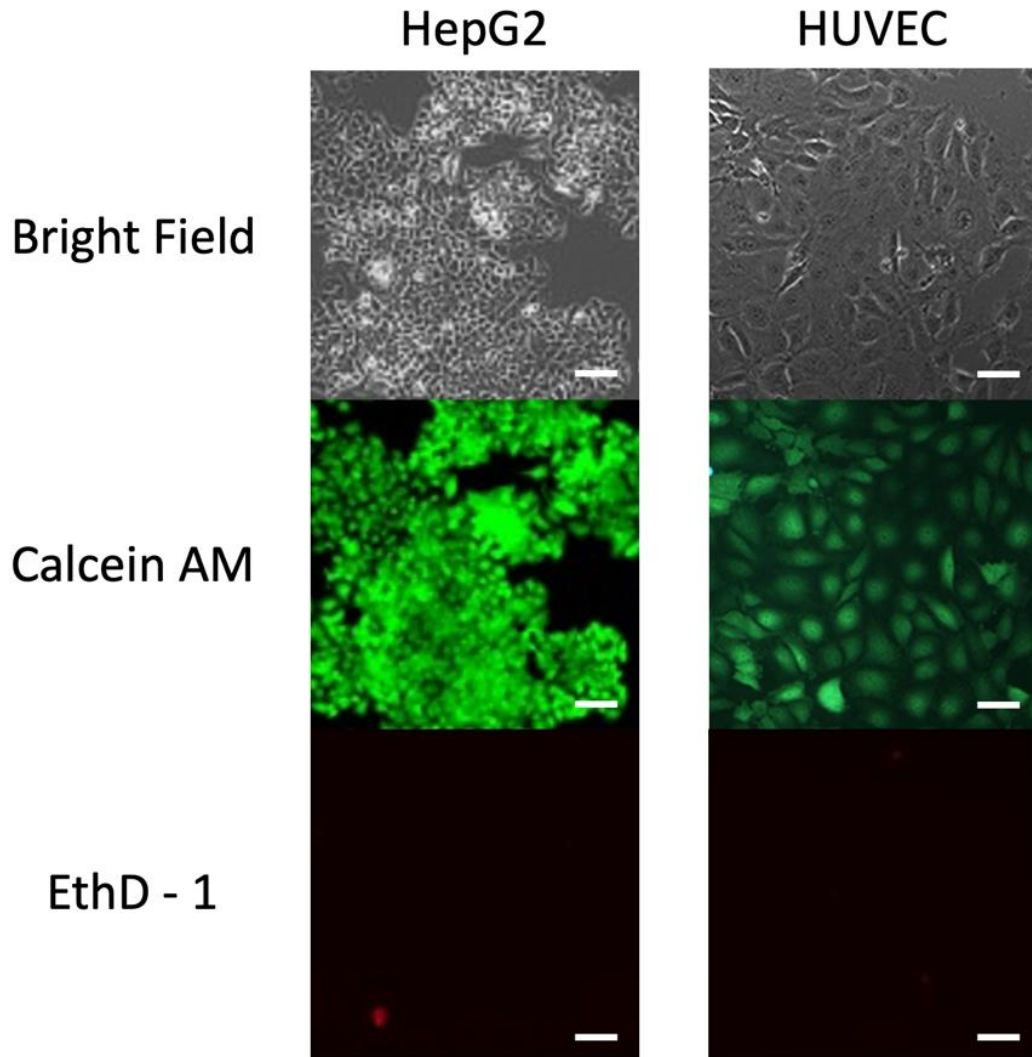
Sự rò rỉ của thiết bị được kiểm tra bằng dung dịch màu với 5 vận tốc đầu vào lần lượt là 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ và 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kết quả thử nghiệm rò rỉ của thiết bị cho thấy với tốc độ bơm cao nhất trong các thử nghiệm thiết bị thì hệ thiết bị vẫn hoạt động tốt, không ảnh hưởng gì tới cấu trúc thiết bị cũng như khối hydrogel nằm bên trong thiết bị. Thông qua các kết quả cho thấy thiết bị hoàn toàn có khả năng làm việc thoải mái với tốc độ bơm dung dịch cao.

Đây cũng là ưu điểm rất lớn của thiết bị vi lưu nhằm nuôi cấy đồng thời tế bào ung thư gan và tế bào mạch máu để từ đó phân lập môi trường nuôi cấy nhằm thu exosome phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, đây cũng là cơ sở để cải tiến hệ thiết bị với công suất lớn hơn, phù hợp với việc sản xuất exosome với quy mô công nghiệp phục vụ nhu cầu ứng dụng trong Y sinh học trong thời gian tới.

3.1.4. Nuôi cấy tế bào trên thiết bị

Hai loại tế bào HepG₂ và HUVEC được gieo vào 2 khu vực nuôi cấy của thiết bị với nồng độ là 10³ tế bào/mL. Hai dòng tế bào được nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy tế bào EBM-2 được bổ sung một số thành phần với dòng chảy từ giếng nuôi cấy tế bào HepG₂ qua khối hydrogel và sang giếng nuôi cấy tế bào HUVEC trong tủ nuôi cấy điều kiện nhiệt độ 37⁰C và 5% CO₂ trong khi môi trường vẫn liên tục được bơm qua hệ với tốc độ 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$, duy trì trong 72h. Sau 3 ngày, tế bào HepG₂ và HUVEC đã phát triển lần lượt như trong hình 3.7. Do đó, hệ vi lưu đã cho thấy sự phát triển tốt ở cả hai dòng tế bào trong hệ.

Thêm vào đó, để kiểm tra chính xác hơn khả năng sống sót của tế bào, thử nghiệm sự sống/chết đã được thực hiện ngay khi kết thúc nuôi cấy. Thử nghiệm đã sử dụng phương pháp nhuộm huỳnh quang kép nhuộm CaAM/EthD-1 và kết quả cho thấy hai dòng tế bào trong vùng nuôi cấy trong hệ vi lưu đều có tỷ lệ sống cao và các tế bào chết rất hiếm gặp trong 2 khu vực nuôi cấy. Tỷ lệ sống sót này của cả 2 dòng tế bào HepG₂ và HUVEC đã khẳng định hệ vi lưu này có khả năng nuôi cấy thành công đồng thời hai dòng tế bào với khả năng tồn tại cao.



Hình 3.7 Nuôi cấy tế bào trong thiết bị vi lưu. Tế bào HepG₂ trong hệ sau 3 ngày nuôi cấy (bên trái). Tế bào HUVEC trong hệ sau 3 ngày nuôi cấy (bên phải) (tỷ lệ 100 μm)

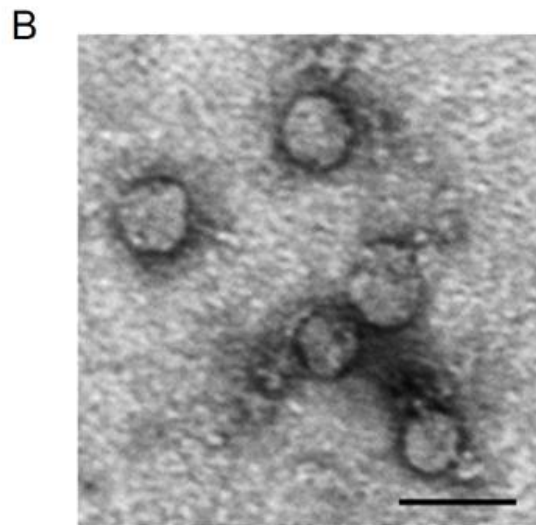
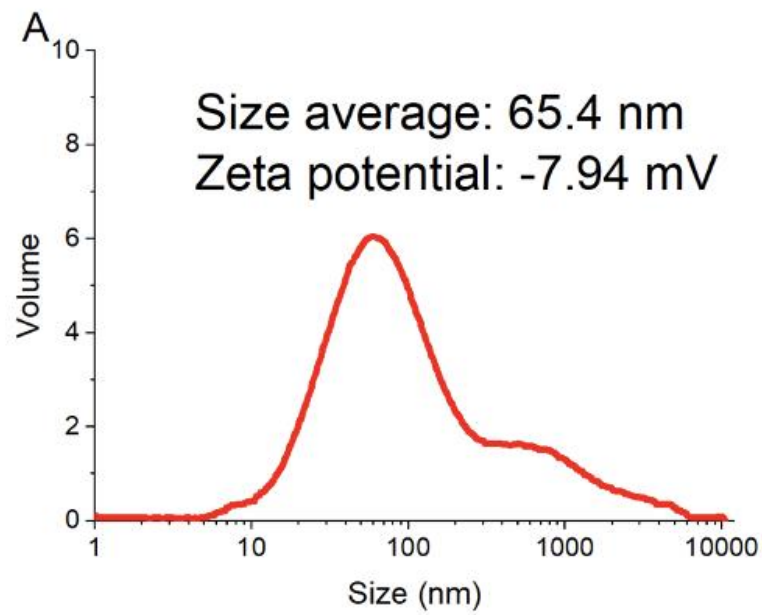
Một trong những vấn đề cần quan tâm khi nuôi cấy tế bào trong hệ vi lưu là đảm bảo môi trường khí như nuôi cấy tế bào dạng 2D truyền thống (độ ẩm 95% và 5% CO_2). Khi nuôi cấy tế bào dạng 2D, diện tích bề mặt nuôi cấy lớn, các điều kiện môi trường dễ khuếch tán và duy trì ổn định trong hệ. Đây cũng là một hạn chế khi nuôi cấy tế bào trong hệ vi lưu do các hệ vi lưu là hệ kín, khí không khuếch tán đến được khu vực nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên với hệ vi lưu sử dụng trong nghiên cứu, thiết bị bơm môi trường nuôi cấy được đặt trực tiếp bên trong tủ ẩm CO_2 nuôi cấy tế bào, môi trường nuôi cấy đảm bảo các điều kiện tương tự như khi nuôi cấy tế bào ở dạng 2D truyền thống. Thêm

vào đó, hệ vi lưu có dòng chảy ngăn, đảm bảo sự ổn định của nồng độ khí trong môi trường nuôi cấy tế bào khi di chuyển trong hệ vi lưu.

Các mô hình mô hình hai chiều tăng sinh mạch máu, của Ingber và Folkman, Vailhahé, Kubota, Feder, Maciag hay Pelletier [20-25] sử dụng tế bào được trải song song ở đáy đĩa nuôi cấy rồi phủ lên một lớp protein kết dính và một lớp gel (collagen, fibrin hoặc matrigel) rồi quan sát quá trình hình thành của các cấu trúc giống mao quản. Bên cạnh đó, các mô hình hai chiều có hạn chế khi các mao quản không phát triển theo chiều dọc, không phản ánh đúng sự phát triển của quá trình tăng sinh mạch máu. Do đó, các mô hình ba chiều được chế tạo, ví dụ như trong thí nghiệm của Akita, tế bào động mạch chủ của chuột được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy và được đổ một lớp collagen và môi trường nuôi cấy [26]. Sau bảy ngày ủ, các mao mạch được hình thành và di truyền trong lớp gel. So với các mô hình này, hệ vi lưu được chế tạo trong nghiên cứu này được chế tạo khá đơn giản, nhưng vẫn đảm bảo sự liên hệ giữa tế bào ung thư và tế bào mạch máu. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào được luân chuyển theo định hướng, đảm bảo tính chọn lọc trong việc thu nhận môi trường nuôi cấy tế bào khi cần thiết.

3.2. Phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào

Exosome được phân lập thành công trong môi trường nuôi cấy tế bào HepG2 khi chạy qua hệ hydrogel và thu được ở đầu ra có khối hydrogel. Exosome thu được ở 3L dịch môi trường là 1 mg, và được đo bằng phương pháp DLS có kích thước trung bình là 65,4 nm (hình 3.8 A). Có thể thấy, kích thước exosome nằm chủ yếu trong khoảng từ 30 tới 150 nm, ngoài ra còn có một số hạt bị tích tụ có kích thước lớn hơn khoảng 1000 nm. Sự phân bố kích thước của exosome không được đồng nhất phù hợp với tính chất của exosome khi tách ra từ tế bào. Exosome mang các đặc tính di truyền của tế bào và thể hiện một số tính chất của tế bào nguồn gốc của nó.



Hình 3.8 Exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG2. (A) Sự phân bố các kích thước của exosome, kích thước trung bình (size average) và điện thế zeta (zeta potential) được đo từ DLS. (B) Hình ảnh TEM của exosome phân lập từ tế bào HepG2 (tỷ lệ = 50 nm)

Bên cạnh đó, điện thế zeta của exosome đo được là $-7.94 \pm 0.78\text{mV}$ chứng tỏ exosome có điện tích gần trung tính. Như vậy kích thước và điện tích của exosome tương đồng với các nghiên cứu khác trước đây [28], [29].

Ngoài ra, hình ảnh exosome cũng được quan sát trên ảnh chụp TEM của exosome đã được phân lập trong thí nghiệm (hình 3.8 B). Các hạt exosome có kích thước dao động trong khoảng 30 – 150 nm tương tự như kết quả đo DLS.

Như vậy, exosome thu được từ hệ vi lưu tương đồng với các phương pháp khác [28], [29]. Có thể thấy, thiết bị vi lưu không chỉ giúp cung cấp môi trường nuôi cấy tế bào mô phỏng môi trường động vật, mà còn thuận tiện cho việc phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào, giúp giảm thiểu thời gian loại tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy khi phân lập exosome.

Để xác định được độ ổn định của exosome sau khi phân lập, các exosome được bảo quản trong 4 điều kiện nhiệt độ là $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Thời gian theo dõi độ ổn định là trong vòng 14 ngày kể từ khi phân lập thành công exosome với Ngày 1 là được mặc định coi là ngày exosome được phân lập. Kết quả trong bảng 3.1 và bảng 3.2 cho thấy sau 14 ngày theo dõi, exosome đều có sự gia tăng về mặt kích thước trung bình và chỉ số đồng nhất (PDI). Tuy nhiên sự gia tăng về 2 yếu tố này đều có tốc độ khác nhau.

Ở điều kiện $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, kích thước trung bình của exosome tăng một cách nhanh chóng. Kích thước trung bình ngày đầu tiên đo được là $71.7 \pm 18.0\text{ nm}$ và sau 3 ngày, kích thước trung bình của exosome tăng lên hơn 100 nm. Sau 1 tuần bảo quản ở nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, kích thước trung bình đã tăng lên $173.5 \pm 27.0\text{ nm}$ và tiếp tục tăng mạnh lên gần 300 nm sau 10 ngày bảo quản. Giá trị này của exosome tiếp tục tăng lên đến $436.2 \pm 35.5\text{ nm}$ ở ngày 14 kiểm tra.

Ở điều kiện $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, kích thước trung bình ban đầu của exosome là 62.7 nm và kích thước này có sự tăng nhẹ lên $72.2 \pm 20.7\text{ nm}$ sau 4 ngày bảo quản. Đến ngày 7, nó tiếp tục tăng lên $103.5 \pm 27.0\text{ nm}$ và tăng mạnh lên $167.6 \pm 32.5\text{ nm}$ ở ngày số 10 kiểm tra. Sau 14 ngày theo dõi, kích thước trung bình của exosome đo được là $237.6 \pm 25.5\text{ nm}$.

Ngoài ra, kết quả của các chỉ số PDI cũng cho thấy sự gia tăng đáng kể ở hai điều kiện $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ở hai điều kiện này, PDI ban đầu lần lượt là

0.116 và 0.106 và sau 14 ngày theo dõi, chỉ số PDI tăng lên tương ứng là 0.323 và 0.253. So sánh với hệ số PDI được chấp thuận ($PDI < 0.200$) kết quả này lớn hơn rất nhiều đặc biệt là ở 25°C .

Bảng 3.1 Các giá trị kích thước trung bình và PDI của exosome được bảo quản ở 2 điều kiện khác nhau là 25°C và 4°C ở ngày 1, ngày 4, ngày 7, ngày 10 và ngày 14

Nhiệt độ	25°C		4°C	
	Kích thước trung bình (nm)	PDI	Kích thước trung bình (nm)	PDI
Ngày 1	71.7 ± 18.0	0.116	62.7 ± 13.0	0.106
Ngày 4	110.2 ± 22.7	0.153	72.2 ± 20.7	0.123
Ngày 7	173.5 ± 27.0	0.189	103.5 ± 27.0	0.159
Ngày 10	277.6 ± 32.5	0.227	167.6 ± 32.5	0.207
Ngày 14	436.2 ± 35.5	0.323	237.6 ± 25.5	0.253

Điều này có thể kết luận rằng, với điều kiện nhiệt độ 25°C và 4°C các exosome được phân lập từ dịch tế bào HepG₂ không có sự ổn định về mặt kích thước và chỉ số PDI.

Điều kiện nhiệt độ tiếp tục được giảm xuống -20°C , kích thước trung bình của exosome sau 4 ngày bảo quản có sự tăng nhẹ từ 68.7 ± 10.2 nm lên 70.2 ± 12.7 nm. Kích thước của exosome tiếp tục tăng lên 97.5 ± 17.0 nm sau 7 ngày bảo quản. Sau đó, chúng tăng lên hơn 100 nm sau ngày 10 và gia tăng

nhẹ lên 105.4 ± 13.8 nm ở ngày cuối cùng kiểm tra. Kết quả này cho thấy ở 20°C , exosome có độ ổn định, tốc độ gia tăng kích thước chậm hơn so với điều kiện 25°C và 4°C .

Bảng 3.2 Các giá trị kích thước trung bình và PDI của exosome được bảo quản ở 2 điều kiện khác nhau là -20°C và -80°C ở ngày 1, ngày 4, ngày 7, ngày 10 và ngày 14.

Nhiệt độ	-20°C		-80°C	
	Kích thước trung bình (nm)	PDI	Kích thước trung bình (nm)	PDI
Ngày 1	68.7 ± 10.2	0.110	62.7 ± 11.2	0.108
Ngày 4	70.2 ± 12.7	0.153	67.5 ± 13.4	0.121
Ngày 7	97.5 ± 17.0	0.179	70.3 ± 17.2	0.138
Ngày 10	101.6 ± 12.5	0.182	73.4 ± 22.7	0.139
Ngày 14	105.4 ± 13.8	0.192	78.6 ± 25.1	0.141

Với điều kiện nhiệt độ giảm xuống -80°C , kích thước trung bình của exosome có sự phát triển rất nhẹ. Từ ngày 1 đến ngày 4, kích thước này tăng từ 62.7 ± 11.2 nm đến 67.5 ± 13.4 nm. Kích thước trung bình là 70.3 ± 17.2 nm ở ngày 7 và tiếp tục tăng nhẹ lên 73.4 ± 22.7 nm ở ngày 10. Kết quả đo được ở ngày cuối cùng theo dõi của exosome là 79.6 ± 25.1 nm. Có thể thấy

sau 14 ngày theo dõi, exosome không có sự gia tăng một cách mạnh mẽ về kích thước như điều kiện ba điều kiện nhiệt độ trước đó.

So sánh về chỉ số đồng nhất PDI, ở -20°C , chỉ số này ban đầu được đo là 110 và sau 14 ngày bảo quản, PDI có sự tăng mạnh lên 0.192. Với điều kiện -80°C , PDI có độ ổn định cao. PDI đo được ở ngày đầu là 0.108 và tăng lên 0.141 sau 14 ngày bảo quản. Mặc dù ở -20°C chỉ số PDI vẫn nằm trong điều kiện chấp nhận ($\text{PDI} < 0.200$) nhưng so với ở điều kiện -80°C , chỉ số PDI không ổn định bằng.

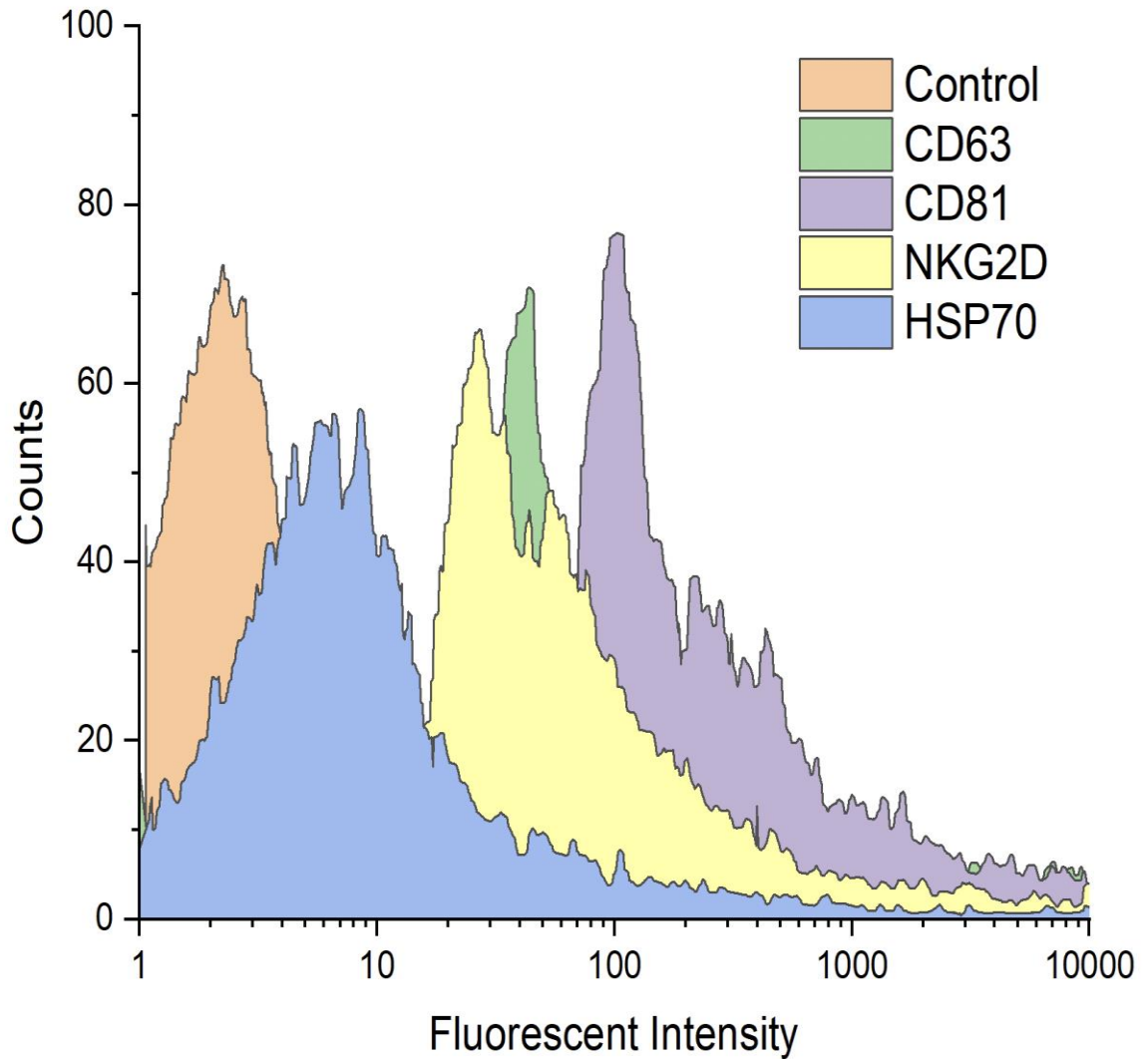
Từ các kết quả bảng 3.1 và 3.2 có thể thấy, điều kiện nhiệt độ bảo quản exosome tốt nhất sau khi được phân lập là -80°C với kích thước trung bình không tăng nhiều và chỉ số PDI biến động thấp.

3.3. Nghiên cứu một số tính chất của exosome phân lập được

Các phân tử đánh dấu được biểu thị trên bề mặt của exosome có thể được phát hiện khi sử dụng hạt $4\ \mu\text{m}$ làm dấu hiệu để phân tích tế bào dòng chảy. Các exosome được phân lập từ tế bào HepG₂ thể hiện sự có mặt của các chất chỉ thị CD63 và CD81 trên bề mặt, đây cũng được coi như là các dấu hiệu quen thuộc của các exosome (hình 3.9).

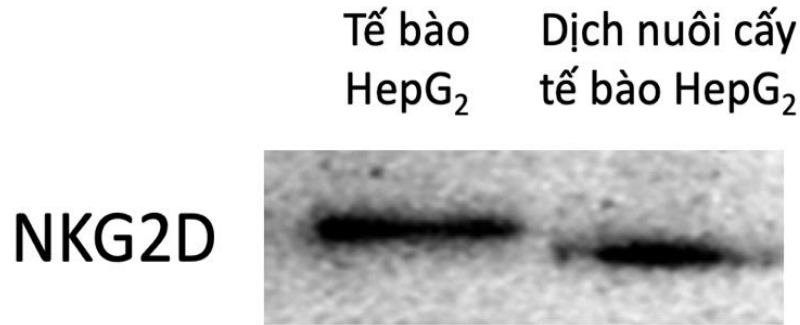
Bên cạnh đó, biểu hiện của chất đánh dấu NKG2D, là một thụ thể kích hoạt cho các tế bào NK, NKT, CD8 (+) và $\gamma\delta\text{T}$, cũng được phát hiện trong thí nghiệm này (hình 3.9). Thêm vào đó, khoảng 25% các exosome biểu hiện HSP70, một protein sốc nhiệt do ứng suất gây ra (Hình 3.9). Những dữ liệu này cho thấy các tế bào HepG₂ tạo ra các exosome và các mục tiêu HepG₂ có thể được thu thập thành công từ thiết bị được chế tạo trong nghiên cứu này.

Một số nghiên cứu chuyên sâu cũng chỉ ra sự tương đồng của tế bào HepG₂ và exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂. Hình 3.10 cho thấy chỉ dấu NKG2D được tìm thấy cả trên tế bào HepG₂ và trong dịch nuôi cấy tế bào HepG₂ bằng phương pháp western blot phân tích protein.



Hình 3.9. Một số protein chỉ dấu của exosome phân lập từ tế bào HepG2

Ngoài ra, chỉ dấu này cũng được tìm thấy trên exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ và môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂. Tuy nhiên, chúng không được tìm thấy một cách rõ ràng trong môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ sau khi phân lập exosome (hình 3.11). Điều này chứng tỏ chỉ dấu NKG2D mang đặc tính của tế bào HepG₂ và được exosome từ tế bào HepG₂ lưu giữ. Đây có thể làm cơ sở giúp chẩn đoán sự có mặt của tế bào ung thư gan trong cơ thể thông qua việc xác định exosome từ tế bào.

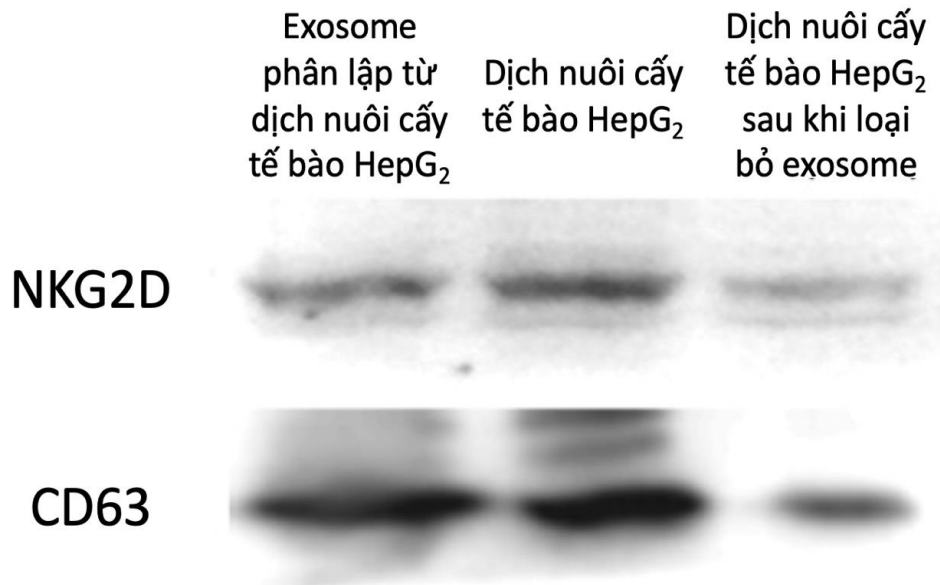


Hình 3.10 Chỉ dấu NKG2D được xác định trên tế bào HepG₂ và từ dịch nuôi cấy tế bào HepG₂

Điều này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm của exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào ung thư. Bên cạnh đó, trong trường hợp tăng sinh mạch máu, do nhu cầu dinh dưỡng để phát triển mạnh mẽ của các tế bào ung thư, tế bào ung thư tiết ra các exosome nhằm vận chuyển tín hiệu từ tế bào ung thư tới tế bào mạch máu. Các exosome chứa các RNA không mã hóa đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hình thành mạch. Ngoài ra, các exosome tiết ra từ tế bào ung thư còn chứa các yếu tố quan trọng khác như VEGF, MMPs ảnh hưởng quan trọng tới quá trình tăng sinh mạch máu [90]. Các yếu tố này cần được nghiên cứu và phân tích thêm để xác định các cơ chế chuyên sâu của tăng sinh mạch máu và làm tiền đề giúp mở ra hướng điều trị ung thư trong tương lai gần.

Bên cạnh đó, exosome có tiềm năng trở thành người vận chuyển các tác nhân chống ung thư [65]. Nhờ lớp phospholipid, exosome có tính linh hoạt, có thể chứa đựng các loại thuốc ưa nước hoặc kỵ nước khác nhau [66]. Các nhà khoa học đã chứng kiến các tế bào ung thư thiếu oxy sẽ hấp thụ một cách khao khát các exosome được tạo ra trong điều kiện thiếu oxy [67]. Ngoài ra các tế bào exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô có thể xâm nhập vào vị trí các khối u [68]. Các túi ngoại bào có nguồn gốc từ tế bào ung thư có thể được sử dụng làm chất vận chuyển hiệu quả các loại thuốc như paclitaxel, làm tăng độc tính tế bào của chúng [69]. Tuy nhiên các exosome cũng gặp phải một số khuyết điểm vì chúng dễ dàng bị đào thải khỏi cơ thể, ngoài ra việc

lưu trữ exosome vẫn chưa được điều tra rõ ràng, năng suất chữa bệnh còn thấp. Do đó, việc hiểu rõ hơn về cách thức các exosome tham gia vào quá trình này là một thách thức quan trọng, có thể mở ra những con đường tiềm năng để phát triển các loại thuốc mới chống tạo mạch để điều trị ung thư.

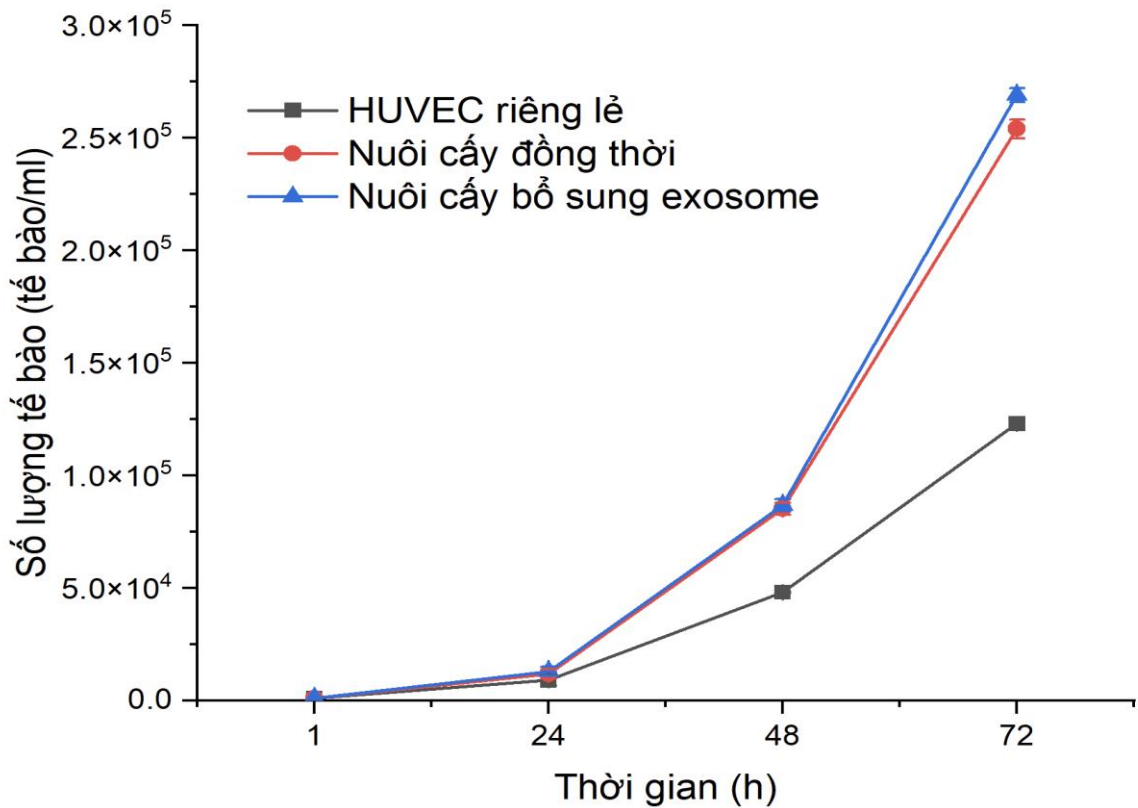


Hình 3.11 Chỉ dấu NKG2D được xác định trên exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ và từ dịch nuôi cấy tế bào HepG₂

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của exosome phân lập được từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ tới sự phát triển của tế bào HUVEC

Để xác định ảnh hưởng của exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂, thử nghiệm nuôi cấy tế bào HUVEC được bổ sung exosome cũng đã được thực hiện với nồng độ HUVEC ban đầu là 10³ tế bào/ml. Sau 24 giờ nuôi cấy ở điều kiện tiêu chuẩn, HUVEC phát triển với nồng độ là 1,3 x 10⁴ tế bào/ml. Và sau 72 giờ số lượng tế bào HUVEC đã phát triển lên đến 2,59 x 10⁵ tế bào/ml. So với nhóm đối chứng, tốc độ này hoàn lớn hơn nhiều so với khi HUVEC được nuôi cấy riêng biệt. Sau 48 giờ, số lượng tế bào HUVEC khi nuôi cấy riêng biệt là 4,9 x 10⁴ tế bào/ml, còn sau 72 giờ, nồng

độ tế bào HUVEC trong dung dịch thu được khi nuôi cấy riêng biệt là $1,1 \times 10^5$ tế bào/ml.



Hình 3.12 Tốc độ phát triển của tế bào HUVEC khi nuôi cấy được bổ sung exosome từ HepG₂ hoặc nuôi cấy đồng thời với HepG₂ trong hệ vi lưu, so sánh với nuôi cấy tế bào HUVEC riêng lẻ

Để xác định ảnh hưởng của việc nuôi cấy đồng thời hai loại tế bào trong thiết bị vi lưu và so sánh sự phát triển của tế bào nội mô HUVEC khi có sự xuất hiện của exosome, hai dòng tế bào được thêm vào hệ vi lưu với nồng độ ban đầu là 10^3 tế bào/ml với kết quả được trình bày trong hình 3.12. Sau 24 giờ nuôi cấy, HUVEC được kiểm tra nồng độ ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Kết quả cho thấy khi nuôi cấy đồng thời với tế bào HepG₂, số lượng tế bào HUVEC đếm được là $1,29 \times 10^4$ tế bào/ml. Sự khác biệt đáng kể giữa 2 điều kiện nuôi cấy được thể hiện rõ rệt sau 48 giờ. Sau 48 giờ, số lượng tế bào HUVEC nuôi cấy riêng biệt là $4,81 \times 10^4$ tế bào/ml, thấp hơn so với khi được nuôi cấy đồng thời cùng HepG₂ là $8,62 \times 10^4$ tế bào/ml. Số

lượng tế bào HUVEC ở 2 điều kiện nuôi cấy đồng thời và riêng lẻ tiếp tục tăng lần lượt lên đến $2,54 \times 10^5$ tế bào/ml và $1,24 \times 10^5$ tế bào/ml sau 72 giờ nuôi cấy. Những kết quả tăng sinh của HUVEC cho thấy với điều kiện nuôi cấy đồng thời, HUVEC có sự phát triển mạnh mẽ hơn.

So sánh các kết quả này cho thấy, khi được bổ sung exosome được phân lập từ HepG₂ và khi nuôi cấy đồng thời với HepG₂, tốc độ phát triển của HUVEC gần như là tương tự nhau. Không có sự khác biệt khi nuôi cấy đồng thời hai loại tế bào cũng như bổ sung exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ trong môi trường nuôi cấy tế bào HUVEC. Từ những kết quả này, có thể kết luận rằng exosome là một tín hiệu liên lạc giữa HepG₂ và HUVEC và giúp HUVEC hình thành, tăng sinh nhanh hơn.

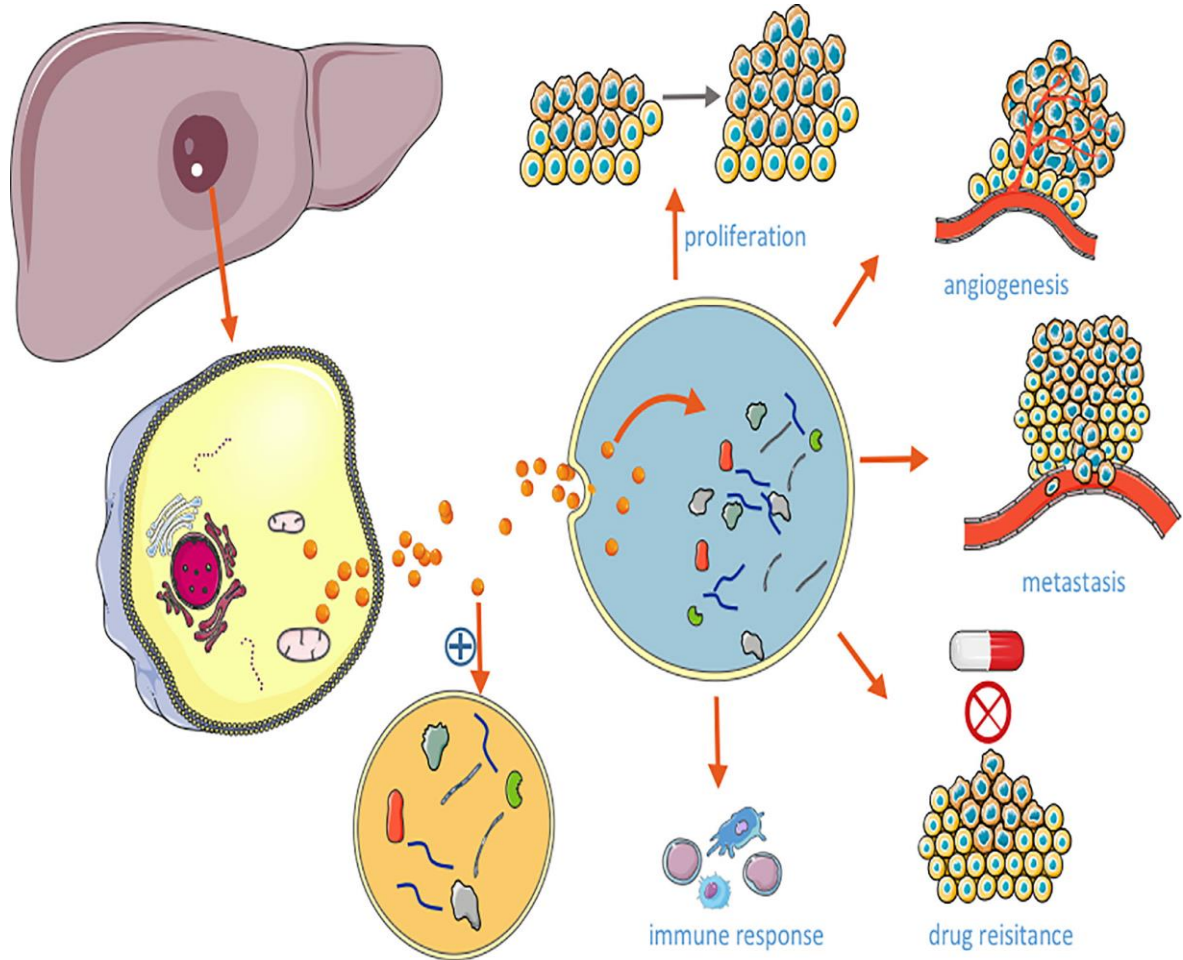
Đây là một cơ sở quan trọng mở ra hướng điều trị bệnh mới, đặc biệt là ung thư mới trong tương lai:

Thứ nhất, việc hạn chế liên lạc giữa tế bào ung thư và tế bào thành mạch máu hay cụ thể hơn là hạn chế số lượng exosome liên lạc giữa các loại tế bào này sẽ giúp giảm thiểu sự phát triển của khối u, giảm thiểu năng lượng và dinh dưỡng cung cấp cho khối u. Từ đó, hình thành phương pháp điều trị bệnh mới.

Thứ hai, việc hướng đích của các exosome được giải phóng từ các tế bào ung thư tới các tế bào thành mạch máu có thể tận dụng exosome để làm hệ thống vận chuyển thuốc. Các chất có hoạt tính sinh học có thể được gói gém trong exosome để vận chuyển tới tế bào thành mạch máu. Do có khả năng hướng đích, các hệ thống này giúp vận chuyển các chất có hoạt tính sinh học tới đúng vị trí mong muốn để tăng cường cũng như tiêu diệt các tế bào đích giúp cải thiện khả năng điều trị bệnh. Sử dụng exosome để vận chuyển thuốc được kỳ vọng an toàn hơn các hệ thống vận chuyển thuốc khác do đây là thành phần được tiết ra từ cơ thể, không bị hệ thống miễn dịch tấn công và tiêu diệt. Với phương pháp này, chúng ta có thể sử dụng exosome trực tiếp từ người bệnh để dùng cho người bệnh (y học cá thể hoá).

Thứ ba, hình thành phương pháp chẩn đoán sớm một số bệnh, đặc biệt là ung thư. Việc “bắt” các hạt exosome trong cơ thể giúp xác định các đặc điểm bất thường, hoạch định các phương pháp để phát hiện sớm bệnh, giúp

hỗ trợ và nâng cao hiệu quả điều trị bệnh, giúp can thiệp kịp thời, tránh trường hợp điều trị bệnh muộn kém hiệu quả.



Hình 3.13 Vai trò của exosome được phân lập từ HepG₂ trong ung thư gan

Các nhận định này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu khác khi nghiên cứu chuyên sâu về exosome và vai trò của exosome trong ung thư gan (hình 3.13). Các nghiên cứu cho thấy, exosome là tác nhân thực hiện các chỉ thị từ tế bào ung thư để gây ra các vấn đề khác cho cơ thể. Tế bào ung thư gan tiết ra các exosome ảnh hưởng tới quá trình nhân tế bào, quá trình hình thành mạch máu, quá trình di căn của khối u cũng như ảnh hưởng quá trình kháng thuốc và hệ thống miễn dịch của cơ thể. Đây là các tính chất rất quan trọng cần nghiên cứu để hiểu rõ hơn về cơ chế của bệnh cũng như nghiên cứu giảm thiểu các tác động của tế bào ung thư tới cơ thể và tìm ra những phương hướng điều trị bệnh mới trong tương lai. Chính vì vậy, việc phân lập và

ngiên cứu các đặc điểm của exosome là rất quan trọng giúp làm sáng tỏ những cơ chế này.

CHƯƠNG 4 : KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu chế tạo thiết bị, phân lập và đánh giá Exosome thu được trên thiết bị vi lưu trong quá trình nuôi cấy đồng thời tế bào HUVEC và HepG₂ đã thu nhận được một số kết quả:

1. Nghiên cứu đã phát triển thành công một thiết bị vi lưu giúp nuôi cấy đồng thời 2 dòng tế bào khác nhau và thuận tiện trong phân lập được dịch nuôi cấy tế bào một cách riêng lẻ.
2. Từ dịch tế bào HepG₂ được tách riêng lẻ, exosome đã được phân lập thành công với kích thước trung bình 65,4 nm. Các exosome sau khi phân lập mang các đặc điểm của tế bào HepG₂.
3. Kết quả nghiên cứu cũng đã chỉ ra, việc thêm exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào HepG₂ vào quá trình nuôi cấy tế bào thành mạch máu HUVEC cho thấy nồng độ tế bào HUVEC sau khi được bổ sung là 8.19×10^5 tế bào/ml. Thêm vào đó, HUVEC được bổ sung exosome cũng được so sánh có tốc độ phát triển tương tự như khi được nuôi cấy đồng thời với tế bào HepG₂. Điều này đã chứng minh rằng exosome hoạt động như là đối tượng mang thông tin liên lạc, truyền tín hiệu giữa tế bào ung thư gan HepG₂ và tế bào nội mô tĩnh mạch HUVEC.

4.2 Kiến nghị

1. Thiết bị vi lưu sẽ được hướng tới đăng ký một giải pháp hữu ích từ đó có thể ứng dụng hoặc nhân rộng mô hình trong các nghiên cứu khác.
2. Ngoài ra thành công của nghiên cứu này cũng mở ra một hướng đi quan trọng trong tương lai để thiết kế và chế tạo một thiết bị vi lưu với mô hình nuôi cấy khối u nhân tạo dạng 3D mô phỏng sự phát triển của khối u *in vivo* nhằm mô phỏng chính xác hơn nữa mối liên hệ giữa các khối u và tế bào tăng sinh mạch máu, từ đó kiến nghị sẽ có những nghiên cứu sâu hơn để tăng tính ứng dụng hệ vi lưu cũng như Exosome trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] “Cancer.” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Feb. 23, 2022).
- [2] Sung.H..., 2021, GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, 71, pp. 209–249.
- [3] Torre LA., Bray F, Siegel RL., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A., 2015, Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), pp. 87-108.
- [4] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel RL., Torre LA., Jemal A., 2020, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, 68(6), pp. 394-424.
- [5] Sung H., Ferlay J., Siegel RL., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin*, 71(3), pp. 209-249.
- [6] Siegel RL., Miller KD., Jemal A., 2020, Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J Clin*, 70(1), pp. 7-30.
- [7]. Lisa Fayed, 2021, Causes and Risk Factors of Cancer.
- [8]. Adair TH., Montani JP., Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Overview of Angiogenesis.
- [9] Honnegowda TM., Kumar P., Udupa EGP., Kumar S., 2015, Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing, *Plast Aesthet Res*, 2, pp. 243-9.
- [10]. Lynne Eldridge, What is Angiogenesis in Cancer?, MD, Updated on December 01, 2019.
- [11]. Carmeliet P., De Smet F., Loges S., Mazzone M., 2009, Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: Tip cells lead the way, *Nat Rev Clin Oncol*, 6, pp. 315–26.

- [12]. Chien S., 2007, Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, pp. H1209–24.
- [13]. Burri P., Hlushchuk R., Djonov V., 2004, Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance, *Developmental Dynamics*, 231, pp. 474–88.
- [14]. Mizejewski GJ., 1999, Role of integrins in cancer: survey of expression patterns, *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, pp.124–38.
- [15]. Nelson AR., Fingleton B., Rothenberg ML., 2000, Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications, *J Clin Oncology*, 18, pp.1135–49.
- [16]. Huang H., 2017, Dystemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation, and Promotes Angiogenesis after Spinal Cord Injury in Rats, *Journal of Neurotrauma*, 24, pp. 3388–3396.
- [17]. Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M., 2006, Angiogenesis in cancer, *Vasc Health Risk Manag*, 2(3), pp. 213-219.
- [18]. Folkman J., 1971, Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, pp. 1182 -6.
- [19]. Serbedzija N., 1999, Zebra®sh angiogenesis: A new model for drug screening, *Angiogenesis*, 3(4), pp. 353–359.
- [20]. Ingber DE., Folkman J., 1989, Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: Role of extracellular matrix, *J Cell Biol*, 109, pp. 317–330.
- [21]. Kubota Y., Kleinman Martin GR., Lawley TJ, 1988, Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, *J Cell Biol*, 107, pp. 1589–1598.

- [22]. Vailhé B., Ronot X., Tracqui P., Usson Y., 1997, *in vitro* angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin and is related to $\alpha v \beta 3$ integrin localisation, *in vitro Cell Dev Biol*, 33, pp. 763–773.
- [23]. Feder J., Marasa JC., Olander JV., 1983, The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown *in vitro*, *J Cell Physiol*, 116, pp. 1–6.
- [24]. Maciag T., Kadish L., Wilkins L., Stemerman MB., Weinstein R., 1982, Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells, *J Cell Biol*, 94, pp. 511–520.
- [25]. Pelletier L., Regnard J., Fellman D., Charbord P., 2000, An *in vitro* model for the study of human bone marrow angiogenesis: Role of hematopoietic cytokines, *Lab Invest*, 80, pp. 501–511.
- [26]. Akita, M., 2014, Development of In Vitro Method for Assaying Anti-Angiogenic Effect of Drugs, *Anti-Angiogenesis Drug Discovery and Development*, pp. 63–111.
- [27]. Sarah Line Bring Truelsen, Nabi Mousavi, Haoche Wei, Lucy Harvey, Rikke Stausholm, Erik Spillum, Grith Hagel, Klaus Qvortrup, Ole Thastrup, Henrik Harling, Harry Mellor, Jacob Thastrup, 2021, The cancer angiogenesis co-culture assay: In vitro quantification of the angiogenic potential of tumoroids, *Plos One*, 16(7), pp. 0253258.
- [28]. Kalluri R., LeBleu VS., 2020, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, 367(6478), pp. 6977.
- [29]. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath JP., Prindal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Thery C., 2016, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(8), pp. E968–E977.
- [30]. Kobina Essandoh, Guo-Chang Fan, Chapter 1 - Insights into the Mechanism of Exosome Formation and Secretion, Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes, Academic Press, 2015, Pages 1-19.

- [31]. Kanninen N., Bister N., Koistinaho J., Malm T., 2016, Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 3, pp. 403–410.
- [32]. Esa A., Connolly K., Williams R., Archer C., 2019, Extracellular Vesicles in the Synovial Joint: Is there a Role in the Pathophysiology of Osteoarthritis?, *Malays Orthop J*, 1, pp. 1–7.
- [33]. Klingeborn M., Dismuke W., Bowes Rickman C., Stamer W., 2017), Roles of exosomes in the normal and diseased eye, *Progress in Retinal and Eye Research*, 59, pp. 158–177.
- [34]. Frydrychowicz M., Kolecka-Bednarczyk A., Madejczyk M., Yasar S., Dworacki G., 2015, Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer, *Scand J Immunol*, 81(1), pp. 2-10.
- [35]. Jafari, Ameneh, Babajani, Amirhesam, Abdollahpour-Alitappeh, Meghdad, Ahmadi, Nayeb Ali, Rezaei tavirani, Mostafa, 2021, Exosomes and cancer: from molecular mechanisms to clinical applications, *Medical Oncology*, 38, p. 10.
- [36]. Qin J., Xu Q., 2014, Functions and application of exosomes, *Acta Pol Pharm*, 71(4), pp. 537-43.
- [37]. Lin Y., Lu Y., Li X., 2020, Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents, *J Drug Target*, 28(2), pp. 129-141..
- [38]. Delevoeye C., Marks S., Raposo G., 2019, Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system, *Current Opinion in Cell Biology*, 59, pp. 147–158.
- [39]. McGough, Vincent J., 2016, Exosomes in developmental signalling, *Development*, 143, pp. 2482–2493.
- [40]. Tkach M., Théry C., 2016, Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go, *Cell*, 164, pp. 1226–1232.

- [41]. Pashoutan Sarvar, Shamsasenjan K., Kbarzadehlaleh K., 2016, Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: New Opportunity in Cell-Free Therapy, *Adv Pharm Bull*, 6(3), pp. 293–299.
- [42] Kalluri R., LeBleu VS., 2020, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, 367(6478), pp. 6478.
- [43] Zhang Y., Bi J., Huang J., Tang Y., Du S., Li P., 2020, Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications, *Int J Nanomedicine*, 15, pp. 6917-6934
- [44]. Takuma Yamashita, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura, 2018, Possibility of Exosome-Based Therapeutics and Challenges in Production of Exosomes Eligible for Therapeutic Application, *J-STAGE*, pp. 835-842.
- [45] Livshits MA., Khomyakova E., Evtushenko EG., 2015, Isolation of exosomes by differential centrifugation: theoretical analysis of a commonly used protocol, *Sci Rep*, 5(1), pp. 17319.
- [46]. Clotilde Théry AS., Raposo G., Amigorena S., 2006, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 30(1).
- [47] Johnstone RM., 1992, The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins, *Biochem Cell Biol*, 70(3–4), pp.179–190.
- [48] Yang XX., Sun C., Wang L., Guo XL., 2019, New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes, *J Control Release*, 308, pp. 119–129.
- [49] Brown PN., Yin H., 2017, Polymer-Based Purification of Extracellular Vesicles, *Methods Mol Biol*, 1660, pp. 91-103.
- [50] Oh DK., Hyun CK., Kim JH., Park YH., 1988, Production of penicillin in a fluidized-bed bioreactor: control of cell growth and penicillin production by phosphate limitation, *Biotechnol Bioeng*, 32(4), pp. 569–573.
- [51] Boing AN., van der Pol E., Grootemaat AE., Coumans FA., Sturk A., Nieuwland R., 2014, Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography, *J Extracell Vesicles*, 3(1), pp. 23430.

- [52] Zarovni N., Corrado A., Guazzi P., Zocco D., Lari E., Radano G., 2015, Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches, *Methods*, 87, pp. 46–58.
- [53] Vergauwen G., Dhondt B., Van Deun J., 2017, Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research, *Sci Rep*, 7(1), pp. 2704.
- [54] Wang C., Zhang C., Liu L., 2017, Macrophage-Derived mir-155-Containing Exosomes Suppress Fibroblast Proliferation and Promote Fibroblast Inflammation during Cardiac Injury, *Molecular Therapy*, 5, 192-204.
- [55] Zheng Y., He R., Wang P., 2019, Exosomes from LPS-stimulated macrophages induce neuroprotection and functional improvement after ischemic stroke by modulating microglial polarization, *Biomater Science*, 3, 1774
- [56] Yao Y., Fu C., Zhou L., Mi QS., Jiang A., 2021, DC-Derived Exosomes for Cancer Immunotherapy, *Cancers (Basel)*, 3(15), pp. 3667.
- [57] Kim Y., Choi Y., Kim H., 2020, Functionalized exosome harboring bioactive molecules for cancer therapy, *Cancer*, 489, 155-162.
- [58] Yan W., Wu X., Zhou W., Cao M., 2018, Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells, *Nat. Cell. Biol*, 20 (2018), pp. 597-609.
- [59] Liu T., Zhu Y., Zhao R., 2020, Visualization of exosomes from mesenchymal stem cells in vivo by magnetic resonance imaging, *Magn. Reson. Imaging*, 68 (2020), pp. 75-82.
- [60] Zhang S., Chuah S., Lai RC., 2018, MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity, *Biomaterials*, 156 (2018), pp.16-27.

- [61] Xie G., Yang H., Peng X, 2018, Mast cell exosomes can suppress allergic reactions by binding to IgE, *J. Allergy. Clin. Immu*, 141 (2018), pp. 788-791.
- [62] Hadley E., Miller S., Salomon C., 2018, S. Mesiano, R.N. Taylor, B.D. Taylor, Amnion epithelial cell-derived exosomes induce inflammatory changes in uterine cells, *Am, J. Obstet. Gyneco*, 219 (2018), pp. 478.
- [63] Guay C., , Regazzi R., 2019, Lymphocyte-Derived Exosomal MicroRNAs Promote Pancreatic β Cell Death and May Contribute to Type 1 Diabetes Development, *Cell. Metab*, 29 (2019), pp. 348-361.
- [64] Li S and Chen L (2022) Exosomes in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* 12:793432.
- [65]. Lorenc T., Klimczyk K., Michalczywska I., Słomka M., Kubiak-Tomaszewska G., Olejarz W., 2020, Exosomes in Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy, *Int. J. Mol. Sci*, 21, pp. 2118.
- [66]. They C., Zitvogel L., Amigorena S., 2002, Exosomes: Composition, biogenesis and function, *Nat. Rev. Immunol*, 2, pp. 569–579.
- [67]. Jung K., Jo H., Yu J.H., Gambhir S.S., Pratz G., 2018, Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes, *Biomaterials*, 177, pp. 139–148.
- [68]. Naseri Z., Oskuee R.K., Jaafari M.R., Moghadam M.F., 2018, Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo, *Int. J. Nanomed*, 13, pp. 7727–7747.
- [69]. Saari H., Lázaro-Ibáñez E., Viitala T., Vuorimaa-Laukkanen E., Siljander P., Yliperttula M., 2015, Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells, *J. Control. Release*, 220, pp. 727–737.