

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO THIẾT BỊ VI LƯU GIÚP PHÂN LẬP EXOSOME TỪ MÔI TRƯỜNG ĐỒNG NUÔI CÂY TẾ BÀO UNG THƯ VÀ TẾ BÀO THÀNH MẠCH MÁU

Đến tòa soạn 03-07-2023

Nguyễn Thị Phương Nga¹, Trịnh Văn Giáp³, Nguyễn Thành Dương^{2,3*}

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

* Email: ntduong182@gmail.com

SUMMARY

FABRICATION OF MICROFLUIDIC DEVICE FOR EXTRACTION OF EXOSOME FROM CELL CULTURE MEDIUM OF CO-CULTURE CANCER CELLS AND ENDOTHELIAL CELLS

The angiogenesis, the formation of new blood vessels, is crucial for nourishing and developing cells as well as restoring the damaged area. In cancer, angiogenesis plays a crucial role by promoting the formation of new blood vessels to feed cancer cells. These cells actively release signals that stimulate surrounding tissues to initiate and facilitate the process of angiogenesis. Exosomes, extracellular vesicles isolated from cancer cells, have been identified as a precursor for understanding the mechanism of angiogenesis and developing new cancer treatments. Therefore, the evaluation of exosome formation, properties, and the application of exosome as anti-angiogenic drugs carrier for cancer treatment has been widely interested. The main purpose of this research is to fabricate a microfluidics device for co-culturing cancer cells and blood vessel cells, in order to isolate and identify exosome characteristics and their effects on the development of HUVEC cells. In this study, we fabricated a microfluidic device that can be cultured simultaneously with two types of cells from commercially available materials - PMMA machined by laser engraving and PEGDA hydrogel. The microfluidic device consisted of 3 layers, including 2 layers of PMMA (24 x 50 mm) and a layer of cover glass. The isolated exosome from HepG₂ cells had the average size around 65.4 nm by dynamic light scattering (DLS) measurement. Further, HUVEC cells can develop faster at a rate of about 2 times with the present of exosomes from HepG₂ cells than single cell culture. Thus, the device is a promising approach to future cancer treatment with wide range of applications.

Keywords: Exosome, cancer, angiogenesis, microfluidics, PEG

1. GIỚI THIỆU

Ung thư được biết đến là một nhóm các bệnh liên quan đến việc tăng sinh tế bào một cách mất kiểm soát và những tế bào đó có khả năng xâm lấn những mô khác bằng cách phát triển trực tiếp vào mô lân cận hoặc di chuyển đến những bộ phận khác trong cơ thể (di căn). Theo số liệu thu nhập

được của tổ chức Y tế Thế giới, có khoảng 19,3 triệu bệnh nhân ung thư mới và khoảng 10 triệu ca tử vong trong năm 2020 [1]. Tại Việt Nam, theo thống kê của hội nghị khoa học quốc tế và phòng chống ung thư, nước ta có hàng triệu bệnh nhân ung thư với 182.563 ca mắc mới trong năm 2020 [2]. Theo sự phát triển của khoa học và kỹ thuật,

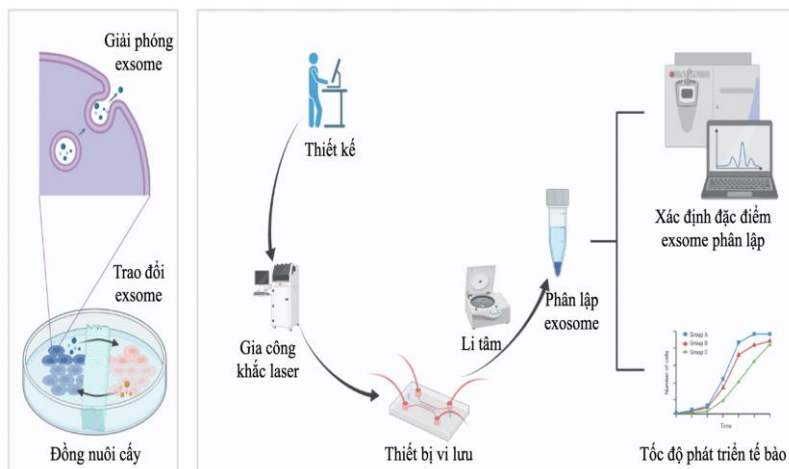
các phương pháp chữa trị ung thư ngày càng hoàn thiện và tân tiến trong đó các phương pháp thường gặp nhất bao gồm: hóa trị, xạ trị, phẫu thuật, điều trị miễn dịch,...[3]. Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn còn những giới hạn nhất định, cần có thêm các phương pháp điều trị mới, hiệu quả hơn để ngăn chặn sự phát triển và giảm thiểu hậu quả của căn bệnh này.

Tăng sinh mạch máu (angiogenesis) là một quá trình tự nhiên của cơ thể, trong đó các mạch máu mới được tạo thành từ các mạch máu đã có trước đó [4,5]. Cơ chế hình thành và nuôi dưỡng khối u là yếu tố quan trọng trong phát triển ung thư và có thể được điều trị bằng các dược chất đã được FDA công nhận như Acid all-trans-retinoic, Asentrioxide, Eribulin, Hydroxyurea, Ixabepilone, Mitotane, Omacetaxine, Romidepsin, Vorinostat [6]. Tuy nhiên, hiệu quả tác động của các thuốc hiện nay đến sự hình thành mạch máu tăng sinh mới còn thấp, khả năng trúng đích đến mạch máu tăng sinh không cao, ảnh hưởng đến mạch máu bình thường [7]. Do đó rất cần nghiên cứu và phát triển các dược chất mới đem lại hiệu quả cao hơn trong điều trị ung thư bằng phương pháp này.

Exosome là các túi ngoại bào, có nguồn gốc từ nội bào với kích thước 40 – 160 nm, được cấu tạo 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 [7,8]. Sự hình thành exosome 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 [9]. Trong khảo sát của Zhang và cộng sự đã chuẩn bị vật liệu vảy có ái lực miễn dịch Tim4@ILI-01 với mục đích làm giàu exosome từ huyết thanh của bệnh nhân bị ung thư biểu mô tuyến cho thấy hiệu quả thu giữ là 85% với kích thước exosome vào khoảng 60-150nm [10]. Tuy nhiên có thể thấy, việc phân lập exosome thường từ các môi trường nuôi cấy tế bào đơn lập không thể hiện chính xác quá trình tăng sinh mạch do đó việc phân lập các môi trường nuôi cấy riêng biệt của các tế bào này cũng bị hạn chế dẫn tới việc đánh giá exosome từ nguồn tế bào cụ thể còn gặp nhiều khó khăn. Chính vì vậy, cần có các thiết bị mới có khả năng mô phỏng quá trình tăng sinh mạch máu, đồng thời giúp phân lập exosome một cách chọn lọc, phục vụ các nghiên cứu về exosome cũng như ứng dụng exosome trong điều trị bệnh.

Trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển thiết bị vi lưu giúp nuôi cấy đồng thời hai dòng tế bào (tế bào mạch máu và tế bào ung thư) có khả năng thông tin liên lạc giữa các loại tế bào với nhau đồng thời giúp phân lập exosome trong dịch nuôi cấy từng loại tế bào một cách riêng rẽ [11]. Qua đó, tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của exosome từ tế bào ung thư tới sự phát triển của tế bào mạch máu ở những điều kiện môi trường khác nhau giúp đánh giá tác động của chúng nhằm đưa ra phương hướng điều trị bệnh mới trong tương lai.



Hình 1: Mô hình vi lưu giúp đồng nuôi cấy tế bào, phân tách môi trường nuôi cấy và phân lập exosome nhằm đánh giá tác động tới sự tăng sinh mạch máu

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Tế bào ung thư gan người (Human Hepatocellular carcinoma cells-HepG₂) và tế bào nội mô tĩnh mạch người (HUVEC) được cung cấp bởi American Type Culture Collection (ATCC- Hoa Kỳ). Môi trường DMEM (Fisher, Hoa Kỳ) được bổ sung thêm 10% FBS (Invitrogen, Hoa Kỳ) và 1% Penicillin-Streptomycin 10.000 U/mL (Mediatech, Hoa Kỳ). 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 FuSheng (Đài Loan). PEGDA (Mw =700 Da) được cung cấp bởi Sigma (Hoa Kỳ). Dung dịch màu thực phẩm cùng thiết bị đẩy xilanh giúp thử nghiệm khả năng hoạt động của tế bào.

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. Hệ vi lưu trên 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, kích thước 24 x 50 mm được xử lý bề mặt để tăng cường khả năng liên kết giữa mặt kính và hydrogel theo quy trình sau: Đầu tiên, kính sẽ được ngâm 12 h trong 50 mL dung dịch NaOH 10%. Sau đó, kính được rửa lần lượt bằng 20 mL etanol 70%, 20 mL etanol 100% và làm khô ở nhiệt độ 70⁰C. Các phiến kính được ngâm với 2 mL TMSPMA trong 12 h trước khi 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 tấm PMMA gia công ở trên bằng keo UV.

Dung dịch PEGDA với các nồng độ khác nhau 1%, 2%, 5%, 8% và 10% được nhỏ từ từ đến đầy vào vùng tròn lớn chính giữa thiết bị. Khối hydrogel được tạo thành khi chiếu dưới đèn UV trong thời gian 180 giây. Sau đó, ba đường ống được gắn vào ba đầu ra và vào trên bề mặt của 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.

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

Chuẩn bị 5 mL dung dịch màu thực phẩm được bơm bằng thiết bị đẩy xi lanh với vận tốc 10 µL/phút vào đầu ống chính giữa của thiết bị. Dòng dung dịch 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 giúp 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 xilanh lần lượt là 10 µL/phút, 20 µL/phút, 50 µL/phút, 100 µL/phút và 200 µL/phút. 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.

2.2.3. Nuôi cấy tế bào

Tế bào HepG₂ được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Fisher, Hoa Kỳ) và được bổ sung thêm 10% FBS và 1% PS. Tế bào HUVEC được nuôi cấy trong môi trường EBM – 2 được bổ sung thêm FBS, hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, GA-1000 và heparin. Các loại tế bào được nuôi cấy trong tủ ẩm ở 37 ⁰C, 5% CO₂ và được thay môi trường mỗi 2 ngày.

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

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 3000 g 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 1 mL 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).

2.2.5. Nghiên cứu các đặc điểm của exosome phân lập

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. 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 và được tính toán theo phương trình Stokes-Einstein.

Hình ảnh exosome được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Các exosome trong PBS được xếp lớp lên lưới kính hiển vi điện tử. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lưới được nhuộm âm bản với 3% 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.

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

Tế bào HUVEC được nuôi ở một giếng của hệ thiết bị. Môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm 1 µg/mL exosome và bơm vào hệ với vận tốc 0,3 µL/phút trong vòng 72 giờ. 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 30 giây. 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.

2.2.7. Thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được thống kê và xử lý bằng phần mềm OriginPro 2022 (OriginLab, MA, USA). Tất cả số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± SD và có độ lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo thiết bị thiết bị vi lưu nuôi cấy đồng thời tế bào

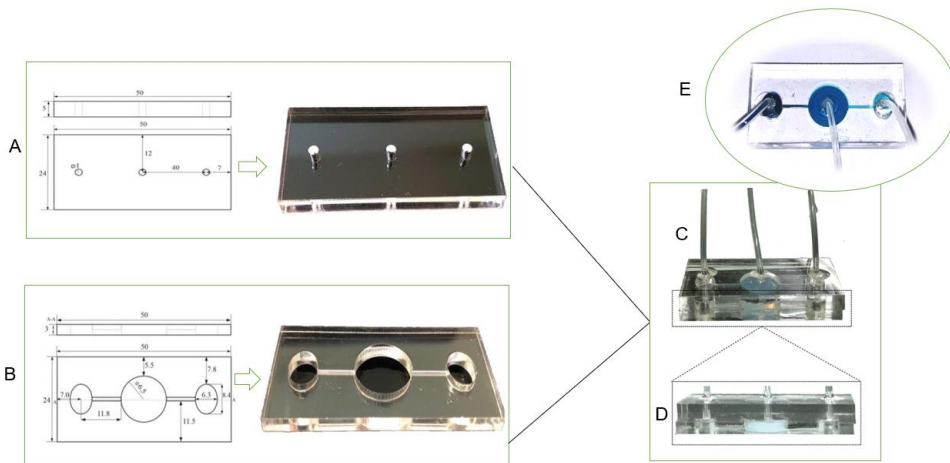
Thiết bị vi lưu được chế tạo bởi 3 lớp trong đó có 2 lớp PMMA và 1 lớp là phiên kính có kích thước 50 × 24 mm (Hình 2). Các chi tiết được tạo bởi tấm PMMA của thiết bị vi lưu được thiết kế bằng phần mềm CoreDraw ver.24.02 với độ dài, độ rộng xác định. Mặt đầu tiên của thiết bị là một tấm PMMA trong với độ dày 5mm được cắt với kích thước 24 × 50 mm, trên đó có 3 lỗ tròn (bán kính 1mm) để có thể dễ dàng nối với các ống nhựa y tế sử dụng làm đầu ra và vào của dòng chảy (Hình 2A). Tấm PMMA thứ 2 có kích thước tương tự với độ dày 3 mm. Tấm PMMA này được cắt laser để có một hình tròn lớn bán kính 6,5mm ở trung tâm để tạo khối hydrogel và 2 hình elip ở 2 bên tương ứng là 2 giếng để tiến hành nuôi cấy tế bào (Hình 2B). Hai vùng cắt hình elip được nối với hình tròn lớn bằng các kênh được chế tạo bằng phương pháp khắc laser với độ dài chiều rộng 1 mm nhằm đảm bảo khả năng di chuyển của vật chất và môi trường thực hiện nuôi cấy tế bào. Mặt dưới cùng của thiết bị là một phiên kính hình chữ nhật được xử lý bằng dung dịch TMSPMA giúp khối hydrogel bám chắc hơn vào bề mặt kính và

không bị trôi theo dòng chảy chất lỏng trong quá trình nuôi cấy tế bào. Việc sử dụng công nghệ cắt và khắc laser giúp chế tạo thành công một thiết bị vi lưu đúng với thiết kế, giá thành rẻ, nhanh, thuận tiện và độ chính xác cao.

Phiên kính sau khi xử lý bề mặt được gắn vào mặt dưới là các kênh khắc của tấm PMMA bằng keo UV. Hỗn hợp dung dịch PEGDA được bơm vào khu vực hình tròn trung tâm của thiết bị với các nồng độ khác nhau và được chiếu đèn UV. Từ đó, tạo ra phản ứng dây chuyền liên kết các phân tử PEGDA lại với nhau tạo khối hydrogel. Sau khi hydrogel đông lại, tấm PMMA được gắn lên phần phía trên bề mặt hydrogel vùng với các ống dẫn để có một thiết bị hoàn chỉnh với kích thước $24 \times 50 \times 7$ mm với 3 đầu vào và ra của dòng chảy (Hình 2C và 2D). Với cấu tạo gồm 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 do chúng không có khả năng bám dính trên bề mặt cũng như bên trong bề mặt hydrogel. Cuối cùng thiết bị được bổ sung dung dịch đệm phosphate và giữ dưới đèn UV để khử khuẩn qua

đèn trước khi đem đi sử dụng nhằm đảm bảo khả năng phát triển của tế bào ở các vùng riêng biệt. Như vậy, nhờ có hệ vi lưu mà thiết bị được đảm bảo khả năng tế bào phát triển ở các vùng riêng mà vẫn giữ liên hệ với nhau qua dòng chảy của môi trường nuôi cấy tế bào.

Dung dịch màu thực phẩm được chuẩn bị để quan sát dòng chảy hoạt động trong thiết bị vi lưu khi qua hydrogel. Khi đó, dòng nước màu sẽ chảy, thẩm thấu qua lớp hydrogel và đi sang hai vùng giếng dùng để nuôi cấy tế bào. Kết quả thu được 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 tiến hành thử nghiệm ở hai nồng độ PEGDA 8% và 5% kết quả cho thấy dung dịch màu thực phẩm có thể dễ dàng di chuyển qua phần hydrogel hơn (Hình 2E). Vì vậy, 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 2: Hình ảnh chế tạo thiết bị vi lưu và mô hình thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị. (A), (B) Hình ảnh thiết kế và các chi tiết của thiết bị PMMA trên thiết bị vi lưu. (C) (D) Hình ảnh thiết bị vi lưu nuôi cấy tế bào hoàn chỉnh (khối trắng ở giữa là khối hydrogel trong thiết bị). (E) Thử nghiệm khả năng hoạt động của thiết bị vi lưu.

3.2 Phân lập exosome từ môi trường nuôi cấy tế bào

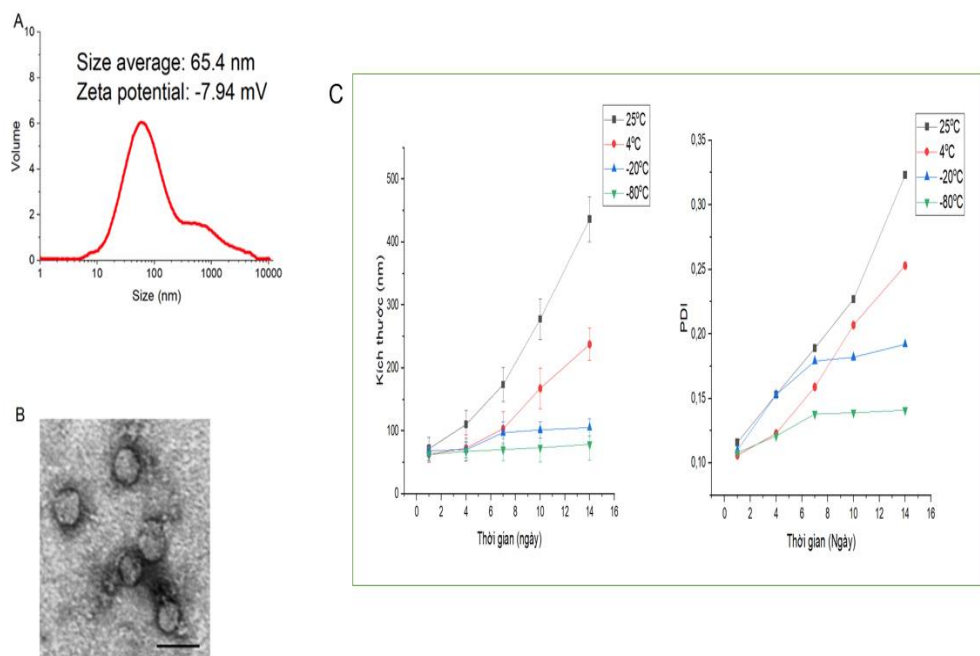
Hai loại tế bào là tế bào ung thư gan người và tế bào nội mô tĩnh mạch người được gieo vào 2 khu

vực nuôi cấy với nồng độ 10^3 tế bào/mL. Hai dòng tế bào này được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào EBM-2 và được bổ sung với các thành phần dinh dưỡng nuôi cấy tế bào HepG₂ qua khối

hydrogel và sang giếng nuôi cấy tế bào HUVEC trong điều kiện nhiệt độ 37 ° C duy trì trong 72 h. Khi lượng tế bào bao phủ 80% bề mặt đĩa nuôi cấy thì được chuyển sang đĩa mới, cho tới khi đủ lượng tế bào cần thiết cho các nghiên cứu tiếp. Hệ vi lưu cho thấy sự phát triển tốt ở cả 2 dòng tế bào trong hệ. Cụ thể, sau 3 ngày, cả 2 loại tế bào này đều phát triển một cách đáng kể và nhanh. Một lưu ý là khi nuôi cấy tế bào trong thiết bị vi lưu cần đảm bảo môi trường khí như nuôi cấy tế bào dạng 2D truyền thống. Trong nghiên cứu, thiết bị bơm được đặt trước bên trong tủ ẩm CO₂ nuôi cấy tế bào nhằm đảm bảo diện tích bề mặt nuôi cấy lớn và đảm bảo được sự ổn định của nồng độ khí trong môi trường nuôi cấy tế bào khi di chuyển trong thiết bị vi lưu.

Để thu lấy exosome được tiết ra từ tế bào HepG₂, sau 72 giờ nuôi cấy, 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 qua một chiều qua giếng nuôi cấy tế bào HepG₂ rồi qua khối hydrogel ra ngoài để thu được dung dịch nuôi cấy tế bào HepG₂. Exosome thu được ở 3L dịch môi trường là $1 \pm 0,15$ mg. Dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm để kết tủa tế bào và vụn tế bào được ly tâm ở 50 mL dịch nổi rồi lọc qua bộ lọc ly tâm. Phần cô đặc đó sẽ được chuyển sang ống tube mới rồi được hình thành, bảo quản lạnh trong ít nhất 12 giờ và được giữ trong dung dịch đệm phosphate.

3.3 Đặc điểm của exosome phân lập



Hình 3: Đặc điểm của exosome phân lập từ môi trường nuôi cấy HepG₂. (A) Sự phân bố các kích thước của exosome, kích thước trung bình và điện thế zeta được đo từ DLS. (B) Hình ảnh TEM của exosome được phân lập từ tế bào HepG₂ (tỉ lệ trung bình 50nm) (C) Độ bền của exosome theo thời gian

Exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào thông qua thiết bị vi lưu kích thước trung bình là 65,4 nm thực hiện bằng phương pháp DLS (Hình 3A). Sự phân bố kích thước không được đồng nhất phù hợp với tính chất của exosome khi tách ra từ tế bào. Kết quả cho thấy sau 14 ngày theo dõi ở điều kiện nhiệt độ 25 và 4 ° C, exosome đều có sự gia tăng về mặt kích thước trung bình với tốc độ khác nhau. Điều kiện nhiệt độ -20 ° C,

kích thước trung bình của exosome sau 4 ngày bảo quản có sự tăng nhẹ từ $68,7 \pm 10,2$ nm lên $70,2 \pm 12,7$ nm. Kích thước của exosome tiếp tục tăng lên $97,5 \pm 17,0$ nm sau 7 ngày bảo quản. Sau đó, chúng tăng lên hơn 100 nm sau ngày 10 và gia tăng nhẹ lên $105,4 \pm 13,8$ nm ở ngày cuối cùng kiểm tra. Kết quả này cho thấy ở -20 ° C, exosome có tốc độ gia tăng kích thước chậm hơn so với điều kiện 25 ° C và 4 ° C. Với điều kiện

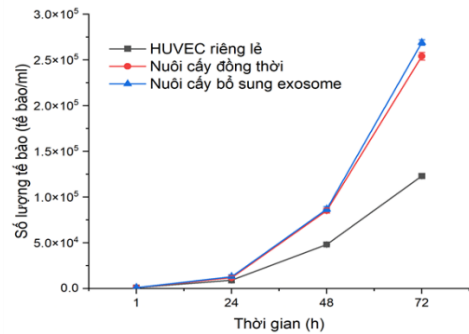
hiệt độ thấp -80°C , kích thước trung bình của exosome có sự tăng nhẹ, không đáng kể. Từ ngày 1 đến ngày 4, kích thước này tăng từ $62,7 \pm 11,2$ nm đến $67,5 \pm 13,4$ nm. Kích thước trung bình là $70,3 \pm 17,2$ nm ở ngày 7 và tiếp tục tăng nhẹ lên $73,4 \pm 22,7$ nm ở ngày 10. Kết quả đo được ở ngày cuối cùng theo dõi của exosome là $79,6 \pm 25,1$ nm. Có thể thấy sau 14 ngày theo dõi, exosome không có sự gia tăng một cách mạnh mẽ về kích thước như ở ba điều kiện nhiệt độ trước đó (Hình 3C).

Điện thế zeta của exosome đo được khi tiến hành phân lập đo được là $-7,94 \pm 0,78$ mV điều đó chứng tỏ rằng exosome có điện tích gần như trung tính (Hình 3B). Như vậy, exosome thu được từ thiết bị vi lưu không chỉ giúp cung cấp môi trường nuôi cấy tế bào mô phỏng ở 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 bỏ tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy khi tiến hành phân lập exosome[12].

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 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. Sau 24 giờ nuôi cấy, 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. 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 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 (Hình 4). So sánh các kết quả giữa hai tế bào HepG2 và HUVEC cho thấy rằng, khi được bổ sung exosome trong điều

kiện phân lập từ tế bào 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 giúp ích trong vấn đề giảm thiểu ung thư trong tương lai.



Hình 4: 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.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát triển thành công một thiết bị vi lưu với kích thước 24 mm x 50 mm x 7 mm 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 rẽ với mô hình nuôi cấy khối u nhân tạo dạng 3D mô phỏng. 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. Việc phân lập và nghiên cứu các đặc điểm của exosome là rất quan trọng, là tiền đề để phát triển phương pháp điều trị ung thư mới nhắm vào các exosome từ tế bào ung thư cũng như xác định cơ chế của sự phát triển ung thư một cách sâu rộng hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài ĐTĐLCN.68/22 của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Flohr, H., & Breull, W, (1975). Effect of etafenone on total and regional myocardial blood flow. *Arzneimittel-Forschung*, **25(9)**, 1400–1403.
- [2] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., 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: A Cancer Journal for Clinicians*, **71(3)**, 209–249.
- [3] Qi, Y., Duan, G., Wei, D., Zhao, C., & Ma, Y, (2022). The Bile Acid Membrane Receptor TGR5 in Cancer: Friend or Foe? *Molecules*, **27(16)**, 5292.
- [4] Makar, A. B., McMartin, K. E., Palese, M., & Tephly, T. R, (1975). Formate assay in body fluids: Application in methanol poisoning. *Biochemical Medicine*, **13(2)**, 117–126.
- [5] Bose, K. S., & Sarma, R. H, (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **66(4)**, 1173–1179.
- [6] Kersten, E, (1975). 6th International Symposium on Maritime Medicine 1974. *Bulletin of the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia*, **26(2)**, 131–132.
- [7] Klingeborn, M., Dismuke, W. M., Bowes Rickman, C., & Stamer, W. D, (2017). Roles of exosomes in the normal and diseased eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, **59**, 158–177.
- [8] Corrocher, R., Tedesco, F., Rabusin, P., & De Sandre, G, (1975). Effect of human erythrocyte stromata on complement activation. *British Journal of Haematology*, **29(2)**, 235–241.
- [9] Feder, J., Marasa, J. C., & Olander, J. V, (1983). The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, **116(1)**, 1–6.
- [10] Wang, C., Zhang, C., Liu, L., A, X., Chen, B., Li, Y., & Du, J, (2017). Macrophage-Derived mir-155-Containing Exosomes Suppress Fibroblast Proliferation and Promote Fibroblast Inflammation during Cardiac Injury. *Molecular Therapy*, **25(1)**, 192–204.
- [11] Fiddian-Green, R. G., & Silen, W, (1975). Mechanisms of disposal of acid and alkali in rabbit duodenum. *The American Journal of Physiology*, **229(6)**, 1641–1648.
- [12] Kidder, G. W., & Montgomery, C. W, (1975). Oxygenation of frog gastric mucosa in vitro. *The American Journal of Physiology*, **229(6)**, 1510–1513.