



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.009

## KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY *in vitro* TẾ BÀO ĐƠN NHÂN ĐƯỢC CHIẾT TỪ MÁU NGOẠI VI NGƯỜI

Nguyễn Thanh Thy, Lê Thị Thảo Nguyễn và Nguyễn Thị Minh Thuận\*

Bộ môn Sinh hóa, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Minh Thuận (email: minhthuan.nguyen49@yahoo.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 27/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Optimization of *in vitro* culture conditions for human peripheral blood mononuclear cells

### Từ khóa:

DMSO/NH<sub>3</sub>, FBS, nuôi cấy tế bào, PHA, tế bào đơn nhân ngoại biên, tối ưu hóa

### Keywords:

Cell culture, DMSO/NH<sub>3</sub>, FBS, optimization, PBMCs, PHA

### ABSTRACT

The purpose of this study is to optimize some conditions for human PBMCs *in vitro* culture. PBMCs were isolated within 4 hours from the EDTA – coagulated whole blood samples collected from the 10 healthy volunteers. 100  $\mu$ L of a cell suspension (approximately  $5 \times 10^5$  cells/mL) were added to each well in a 96 well microplate and incubated at 37°C, 95±5% humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 24 hrs. Then the isolation of PBMCs from 6 ml whole blood using 10 mL Leucosep® tube was optimized; cell viability using trypan blue dye was evaluated; the suitable solvents for the dissolution of formazan crystals in the MTT assay and the conditions of PBMCs *in vitro* culture such as PBMCs density per well, FBS concentration, time for PBMCs culture and PHA mitogen concentration for PBMCs proliferation were examined. The results of this study showed that the centrifuge speed and time for isolating PBMCs from 6 mL whole blood using Leucosep® tube was determined at 1200 xg for 20 minutes. After that, PBMCs viability was found above 95% using trypan blue and hemocytometer. The dissolution of formazan crystals in DMSO/NH<sub>3</sub> was better than in either DMSO, isopropanol or isopropanol/HCl. Moreover, the optimal conditions for cell culture media containing 10% FBS, 1.5% PHA mitogen and the range of PBMCs density from 10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> cells/well were determined. These results may be used for the further studies to assess the effects of medicinal plants or new drugs on *in vitro* PBMCs proliferation.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu hóa một số điều kiện nuôi cấy *in vitro* tế bào đơn nhân được phân lập từ máu ngoại vi người (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs). Các tế bào PBMCs được phân lập trong vòng 4 giờ từ khi thu thập máu toàn phần của 10 người tình nguyện đã được chống đông bằng EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) với ống Leucosep® 10 mL. Cho 100  $\mu$ L hỗn dịch  $5 \times 10^5$  tế bào/mL vào giếng trên đĩa 96 giếng, nuôi ở 37°C, độ ẩm 95 ± 5%, 5% CO<sub>2</sub>/24 giờ. Độ sống tế bào được khảo sát bằng phương pháp trypan blue, khảo sát dung môi hòa tan tinh thể formazan và các điều kiện nuôi cấy tế bào như nồng độ FBS (fetal bovine serum), mật độ tế bào PBMCs trong giếng, thời gian nuôi và nồng độ chất phân bào PHA (phytohaemagglutinin) cần cho sự tăng sinh PBMCs. Kết quả thu được: với vận tốc ly tâm 1.200 xg/20 phút, hơn 95% tế bào PBMCs được chiết từ 6 ml máu toàn phần được tìm thấy vẫn sống với hemocytometer. Sự hòa tan của formazan trong DMSO/NH<sub>3</sub> tốt hơn trong dung môi DMSO (dimethyl sulfoxide), isopropanol và isopropanol/HCl. PBMCs tăng trưởng tốt nhất trong môi trường nuôi cấy có FBS 10%, mật độ 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> tế bào/giếng và PHA 1,5%. Các điều kiện tối ưu này có thể ứng dụng cho các thử nghiệm khảo sát tác động của dược liệu hay chất hóa được mới trên sự tăng trưởng tế bào PBMCs.

Trích dẫn: Nguyễn Thanh Thy, Lê Thị Thảo Nguyễn và Nguyễn Thị Minh Thuận, 2019. Khảo sát một số điều kiện nuôi cấy *in vitro* tế bào đơn nhân được chiết từ máu ngoại vi người. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 72-78.

## 1 GIỚI THIỆU

Các bệnh lý liên quan đến rối loạn hệ miễn dịch ngày càng phổ biến. Nguyên nhân có thể do tình trạng suy giảm miễn dịch hoặc do đáp ứng miễn dịch quá mức cần thiết. Trong trường hợp sức đề kháng của cơ thể giảm, cơ thể dễ bị tấn công bởi các tác nhân gây bệnh bên ngoài như: virus, vi khuẩn, nấm... và dễ mắc các bệnh lý nhiễm trùng, viêm nhiễm, ung thư... (Jantan *et al.*, 2015). Mặt khác, nếu đáp ứng miễn dịch trở nên quá mạnh, trong một số trường hợp chống lại chính cơ thể, gây ra các bệnh lý tự miễn như: viêm khớp dạng thấp, thấp khớp, lupus, vẩy nến, hen suyễn... (Wang *et al.*, 2015). Trong dân gian, có rất nhiều dược liệu được người dân sử dụng thành bài thuốc y học cổ truyền để điều trị các bệnh lý liên quan đến bất thường hệ miễn dịch. Việc sử dụng các dược liệu trong y học cổ truyền mang lại những lợi ích nhất định cho bệnh nhân như giảm các tác dụng phụ đáng kể khi so sánh với dùng thuốc tân dược. Điều này mở ra một hướng nghiên cứu mới đầy tiềm năng cho dược học hiện đại bởi sự đa dạng và có sẵn của nguồn nguyên liệu dược liệu.

Hiện nay, trên thế giới đã có rất nhiều nghiên cứu nhằm tìm hiểu, đánh giá tính hiệu quả của các dược liệu trong điều trị các bệnh liên quan đến hệ thống miễn dịch. Các nghiên cứu này có quy mô từ *in vitro* (Amirghofran *et al.*, 2011; Aldahlawi, 2016) cho đến *in vivo* (Sarma and Khosa, 1994; Harput *et al.*, 2005; Arreola, 2015; Singh, 2016), được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của các dược liệu có nguồn gốc tự nhiên trong sự tăng sinh, hoạt hóa các tế bào miễn dịch (như đậu bắp (*Abelmoschus esculentus*) làm tăng nồng độ lympho T, IL-12 và INF- $\gamma$ ) hoặc ức chế, giảm hoạt tính của tế bào miễn dịch (như cỏ xạ hương (*thymus vulgaris*) ức chế sự tăng sinh *in vitro* PBMCs (peripheral blood mononuclear cells); ngưi bàng (*Arctium lappa*) ức chế IL-6 và TNF- $\alpha$ ). Một trong những mô hình được sử dụng rộng rãi là mô hình *in vitro* nuôi cấy tế bào miễn dịch đơn nhân phân lập từ máu ngoại vi người (PBMCs) để thử hoạt tính làm tăng sinh hoặc ức chế miễn dịch của dược liệu. Hiện nay, ở Việt Nam vẫn chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá tác động của dược liệu hoặc thuốc trên sự tăng sinh hoặc gây độc tế bào PBMCs của người. Mặt khác, các điều kiện nuôi cấy tế bào PBMCs người trong các nghiên cứu trên thế giới cũng không thống nhất vì mục đích các nghiên cứu khác nhau. Hơn nữa, việc xác định khả năng sống của tế bào thường được sử dụng để đánh giá các hợp chất có ảnh hưởng lên sự tăng trưởng tế bào hoặc gây ra độc tính trực tiếp trên tế bào, thậm chí gây chết tế bào hay không. Ngày nay, có rất nhiều loại phương pháp dùng để định lượng tế bào, nhưng phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyl tetrazolium bromide) hay được sử dụng vì đơn giản, nhanh chóng, chính xác hơn phương pháp đếm tế bào bằng cách nhuộm trypan blue. Tuy nhiên, phương pháp định lượng MTT cũng phải được tối ưu hóa về điều kiện và thời gian định lượng để đạt được kết quả tốt hơn.

Với mong muốn tìm được điều kiện nuôi cấy tế bào PBMCs có thể được dùng cho các nghiên cứu sâu hơn về miễn dịch, đề tài “**Khảo sát một số điều kiện nuôi cấy *in vitro* tế bào đơn nhân được chiết từ máu ngoại vi người**” được thực hiện với các mục tiêu cụ thể sau: Tối ưu hóa quy trình chiết các tế bào PBMCs là phân đoạn giàu tế bào lympho nhất từ máu ngoại vi người; Tối ưu hóa phương pháp đánh giá tỷ lệ sống của tế bào với MTT; Khảo sát một số điều kiện trong quá trình nuôi cấy tế bào PBMCs.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu máu toàn phần sau khi được thu thập từ 10 tình nguyện viên khỏe mạnh (5 nam, 5 nữ) cho vào ống vô khuẩn chứa chất chống đông EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) sẽ được tập hợp thành lượng máu đồng nhất. Những người tình nguyện này có sức khỏe bình thường (dựa vào kết quả kiểm tra sức khỏe trong vòng 2 tháng trước khi lấy mẫu) và thỏa mãn các tiêu chí sau: tuổi trên 18, không mắc bệnh nhiễm trùng, không dùng kháng sinh trong thời gian 3 tháng trước ngày lấy máu, âm tính với các bệnh viêm gan B, viêm gan C, HIV, không dùng thuốc kháng viêm hoặc ức chế miễn dịch, và đã ký tên vào bản đồng thuận tình nguyện cho mẫu nghiên cứu.

Các tế bào PBMCs được phân lập càng sớm càng tốt (nghiên cứu này thực hiện phân lập tế bào trong vòng 4 giờ để tránh tế bào PBMCs bị chết ở môi trường ngoài cơ thể) ở nhiệt độ phòng kể từ lúc lấy mẫu. Việc lấy mẫu đảm bảo các quy định của Bộ Y tế về đạo đức nghiên cứu Y sinh học.

### 2.2 Vật liệu, hóa chất thuốc thử

Các ống Leucosep® 10 mL của hãng Greiner được dùng để phân lập PBMCs. Dung dịch RPMI-1640, huyết thanh FBS (fetal bovine serum), kháng sinh penicillin/streptomycin, phytohaemagglutinin-M của hãng Gibco được dùng trong môi trường nuôi cấy tế bào PBMCs. Thuốc nhuộm trypan blue (Himedia) và đệm phosphate buffer saline (PBS) 1X của hãng Himedia. Thuốc thử 3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromid (MTT) là của Sigma - Aldrich. Tất cả hóa chất chất thuốc thử đều đạt điều kiện vô khuẩn.

### 2.3 Phương pháp nghiên cứu

Toàn bộ quy trình thu thập mẫu máu và xử lý mẫu đều được thực hiện ở điều kiện vô khuẩn tại nhiệt độ phòng trong phòng nuôi cấy tế bào của Viện Sinh học Nhiệt đới, thành phố Hồ Chí Minh.

#### 2.3.1 Tối ưu hóa quy trình phân lập tế bào PBMCs từ máu ngoại vi người

Cho 6 mL máu toàn phần chống đông bằng EDTA vào ống Leucosep® 10 mL. Ly tâm mẫu ở nhiệt độ phòng với các tốc độ và thời gian khảo sát là 1.000 xg/ 10 phút, 1.200 xg/ 10 phút, 1.200 xg/ 20 phút. Sau khi rửa các tế bào PBMCs 2 lần, mỗi lần với 10 mL PBS, tế bào PBMCs được phân tán trong các môi trường khảo sát là PBS hoặc môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (MTNCHC) gồm RPMI-1640 + 10% FBS + 1% (penicillin 100 IU/mL và streptomycin 100 µg/mL). Đánh giá tỷ lệ sống của tế bào trong dịch vừa chiết bằng phương pháp nhuộm trypan blue và soi trên buồng đếm hemocytometer Hirschmann (EM Techcolor).

#### 2.3.2 Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp định lượng MTT

##### a. Khảo sát dung môi hòa tan tinh thể formazan trong phương pháp MTT

Cho 100 µL hỗn dịch  $5 \times 10^5$  tế bào/mL vào giếng trên đĩa 96 giếng. Đặt đĩa 96 giếng vào tủ ấm ở nhiệt độ 37°C, độ ẩm  $95 \pm 5\%$  với 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ. Sau đó, cho 10 µL dung dịch MTT 5 mg/mL vào mỗi giếng, ủ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm  $95 \pm 5\%$  trong 4 giờ. MTT sẽ được tế bào sống khử thành formazan. Hút nhẹ nhàng 100 µl môi trường ra khỏi từng giếng, thêm 100 µL dung môi hòa tan tinh thể formazan (DMSO hoặc DMSO/ NH<sub>3</sub> 0,016 N hoặc isopropanol hoặc isopropanol/HCl 0,04 N). Xác định bước sóng cho độ hấp thụ cực đại của formazan trong các dung môi trên máy đo quang Benchmark Plus Microplate Reader BIO-RAD.

##### b. Khảo sát mật độ tế bào PBMCs nuôi trong các giếng

Phương pháp định lượng MTT xác định khả năng sống và tăng sinh của tế bào động vật có vú đã được đề xuất bởi Mosmann (Mosmann, 1983). Phương pháp này dựa vào việc tế bào sống có khả năng chuyển muối tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) bởi enzym dehydrogenase ở ty thể thành sản phẩm formazan có màu xanh tím. Lượng formazan sinh ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống trong môi trường. Tuy nhiên, phương pháp MTT phụ thuộc nhiều yếu tố như dòng tế bào nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, số lượng (mật độ) tế bào trong môi trường nuôi cấy, dung môi hòa tan tinh thể formazan... Vì vậy, việc xác định khoảng mật độ tế

bào nuôi cấy là cần thiết để tối ưu hóa phương pháp MTT.

Pha giai mẫu hỗn dịch tế bào chứa khoảng  $10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $7,5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ , và  $10^6$  tế bào/mL bằng hỗn hợp môi trường RPMI-1640 + 10% FBS + 1% kháng sinh. Cho 100 µL hỗn dịch tế bào vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, mỗi nồng độ làm 3 mẫu thử. Chuẩn bị mẫu trắng như mẫu thử nhưng không có tế bào PBMCs. Đo độ hấp thụ (OD) của dung dịch formazan và tính kết quả theo công thức  $OD_{thực} = OD_{thử} - OD_{trắng}$

#### 2.3.3 Khảo sát điều kiện nuôi cấy tế bào PBMCs

##### a. Khảo sát nồng độ FBS và thời gian nuôi cấy tế bào PBMCs

Thông thường các nghiên cứu đánh giá độc tính tế bào *in vitro* chỉ thực hiện trong vòng 72 giờ. Vì vậy, để theo dõi độ sống tế bào dưới ảnh hưởng của nồng độ huyết thanh FBS theo thời gian, chúng tôi đánh giá độ sống của các tế bào PBMCs trong các giếng có mật độ ban đầu là  $5 \times 10^5$  tế bào/mL trong các môi trường nuôi cấy chứa nồng độ FBS thay đổi là 5%, 10%, 15% với các khoảng thời gian nuôi cấy tế bào khác nhau là 24, 48, 72 giờ. Mỗi mức nồng độ FBS và thời gian nuôi tế bào được thực hiện lặp lại 3 lần. Các tế bào được nuôi trong tủ ấm ở 37°C, độ ẩm  $95 \pm 5\%$  với 5% CO<sub>2</sub>. Tỷ lệ sống của tế bào sau một khoảng thời gian nuôi sẽ được đánh giá bằng phương pháp MTT.

##### b. Khảo sát môi trường nuôi cấy tế bào PBMCs

Sự tăng sinh các tế bào PBMCs trong 3 môi trường nuôi cấy khác nhau là RPMI-1640, DMEM và DMEM F12 được khảo sát với các khoảng thời gian nuôi cấy là 24, 48, 72 giờ. Tỷ lệ sống của tế bào sau một khoảng thời gian nuôi cấy sẽ được đánh giá bằng phương pháp MTT. Mẫu thử là các giếng trên đĩa 96 giếng có chứa 100 µL hỗn dịch tế bào PBMCs với mật độ  $5 \times 10^5$  tế bào/mL. Mỗi nồng độ thực hiện trên 3 giếng. Quy trình nuôi tế bào PBMCs với các điều kiện tương tự như trên. Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh được xem là tốt nhất khi độ hấp thụ của sản phẩm formazan cao nhất.

##### c. Khảo sát nồng độ PHA trong môi trường nuôi cấy PBMCs

Việc tối ưu hóa nồng độ PHA được thực hiện trên cả 2 môi trường nuôi cấy là RPMI-1640 và DMEM. Dung dịch PHA gốc (từ nhà sản xuất) sẽ được pha loãng bằng môi trường RPMI-1640 hoặc DMEM thành các nồng độ 0,5%; 1%; 1,5%; 2%. Mỗi nồng độ thực hiện trên 3 giếng. Quy trình nuôi tế bào PBMCs với các điều kiện tương tự như trên. Nồng độ PHA trong các môi trường nuôi cấy hoàn

chính được xem là tối ưu khi tỷ lệ tăng sinh tế bào được tính theo độ hấp thu của sản phẩm formazan là cao nhất.

2.3.4 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Microsoft Excel 2013. Kết quả được biểu diễn dưới dạng: trung bình (mean) ± độ lệch chuẩn (SD – standard deviation). So sánh các giá trị trung bình được thực hiện bằng phép kiểm T-test. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê nếu giá trị  $p < 0,05$ .

3 KẾT QUẢ

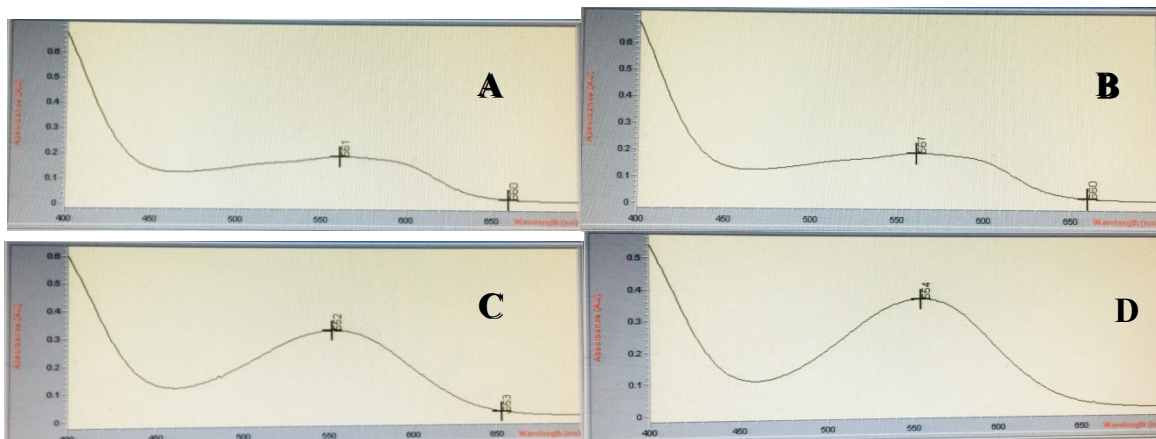
**Kết quả tối ưu hóa quy trình phân lập PBMCs từ máu ngoại vi người:** Sau khi ly tâm mẫu máu với tốc độ ly tâm 1.200 xg trong 20 phút và cấy tế bào PBMCs được phân tán trong dung dịch PBS cho tỷ lệ tế bào sống là 94,32%, thấp hơn so với khi được phân tán trong MTNCHC (97,11%) (Bảng 1). Tuy nhiên, hai tỷ lệ này khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 1: Kết quả đánh giá khả năng sống của tế bào trong các môi trường phân tán cấy tế bào khác nhau bằng phương pháp trypan blue**

	Dung dịch PBS	MTNCHC
Số lượng tế bào sống (trung bình ± SD)	124,5 ± 15,63 (110 - 145)	126 ± 13,04 (108 - 137)
Số lượng tế bào chết (trung bình ± SD)	7,5 ± 2,38 (5 - 10)	3,75 ± 1,71 (2 - 6)
Tổng số tế bào	132	129,75
% Tế bào sống	94,32%	97,11%

3.1 Kết quả khảo sát dung môi hòa tan tinh thể formazan

Độ hấp thu trung bình của formazan trong dung môi DMSO/NH<sub>3</sub> đạt cao nhất tại bước sóng 555 nm và khác nhau có ý nghĩa so với độ hấp thu trong các dung môi isopropanol, isopropanol/HCl, DMSO (Hình 1).



**Hình 1: Phổ của formazan trong các dung môi**

(A) isopropanol; (B) isopropanol/HCl; (C) DMSO; (D) DMSO/NH<sub>3</sub>

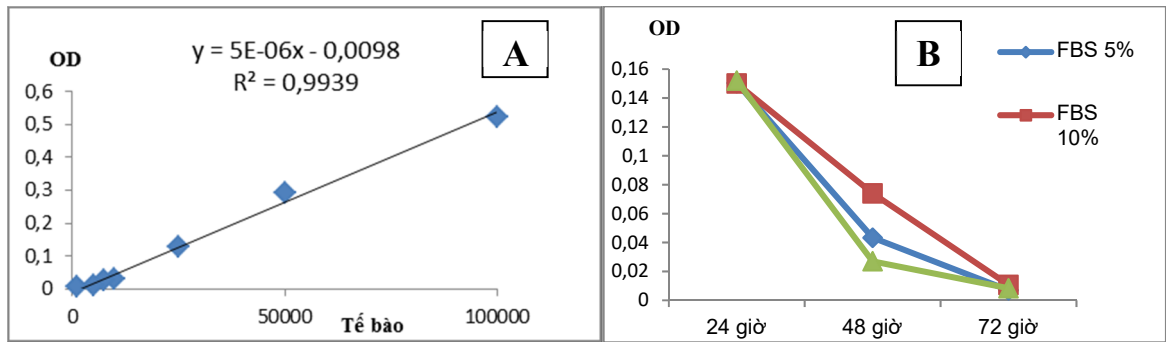
**Bảng 2: Kết quả đo độ hấp thu của formazan trong các dung môi khác nhau**

STT	DMSO (550 nm)	DMSO/NH <sub>3</sub> (555 nm)	Isopropanol (560 nm)	Isopropanol/HCl (570 nm)
1	0,209	0,228	0,191	0,103
2	0,201	0,222	0,184	0,102
3	0,196	0,224	0,186	0,104
4	0,212	0,230	0,192	0,101
5	0,222	0,229	0,194	0,099
Trung bình ± SD	0,208 ± 0,010	0,227 ± 0,003	0,189 ± 0,004	0,102 ± 0,002
RSD%	0,048	0,015	0,022	0,019

3.2 Kết quả tối ưu mật độ tế bào, nồng độ FBS và thời gian nuôi cấy tế bào

Khoảng mật độ tế bào tối ưu để nuôi cấy dành cho các thử nghiệm được xác định từ 10<sup>4</sup> đến 10<sup>5</sup> tế bào/giếng (Hình 2A). Mặt khác, sau khi nuôi cấy tế bào được 48 giờ, mật độ tế bào trong các giếng giảm so

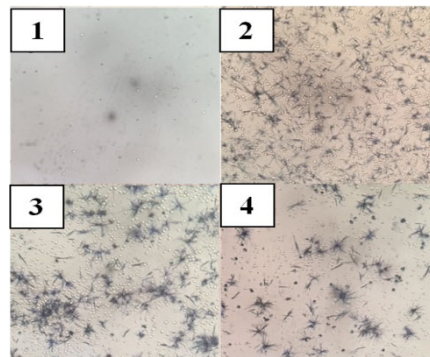
với thời điểm 24 giờ, nhưng môi trường có nồng độ FBS 10% cho độ hấp thu formazan cao hơn hẳn hai môi trường có FBS 5% và 15% (Hình 2B). Như vậy, MTNCHC cho tế bào PBMCs có nồng độ FBS 10% và thời gian nuôi cấy từ 24-48 giờ được xác định là tối ưu cho các thử nghiệm sau này.



**Hình 2:** (A) Tương quan giữa mật độ tế bào ( $10^4$ - $10^5$  tế bào/giếng) và độ hấp thu; (B) sự thay đổi số lượng tế bào PBMCs theo nồng độ FBS và thời gian nuôi cấy tế bào

**3.3 Kết quả khảo sát môi trường nuôi cấy tế bào PBMCs**

Tại mỗi thời điểm khảo sát, độ hấp thu của formazan trong các môi trường nuôi cấy giảm theo thứ tự DMEM > RPMI-1640 > DMEM F12 có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Đồng thời, ở giữa 3 thời điểm, độ hấp thu của formazan hình thành từ tế bào giảm dần theo thời gian 24, 48, 72 giờ (Hình 3 và Bảng 3). Như vậy, môi trường DMEM được xem là thích hợp hơn cho việc nuôi cấy PBMCs.



**Hình 3:** Minh họa lượng tinh thể formazan trong các giếng chứa  $5 \times 10^5$  tế bào/mL tại các thời điểm nuôi cấy (1) T0, (2) T24 giờ, (3) T48 giờ và (4) T72 giờ

**Bảng 3:** Kết quả đo độ hấp thu formazan trong các môi trường khác nhau tại 24, 48, 72 giờ

Thời gian		RPMI-1640	DMEM	DMEM F12
24 giờ	Lần 1	0,206	0,226	0,113
	Lần 2	0,215	0,239	0,139
	Lần 3	0,191	0,232	0,12
	Trung bình $\pm$ SD	0,204 <sup>(1)</sup> $\pm$ 0,012	0,232 <sup>(2)</sup> $\pm$ 0,006	0,124 <sup>(3)</sup> $\pm$ 0,013
48 giờ	Lần 1	0,153	0,207	0,081
	Lần 2	0,152	0,204	0,083
	Lần 3	0,156	0,211	0,079
	Trung bình $\pm$ SD	0,154 <sup>(4)</sup> $\pm$ 0,002	0,207 <sup>(5)</sup> $\pm$ 0,004	0,081 <sup>(6)</sup> $\pm$ 0,002
72 giờ	Lần 1	0,095	0,106	0,066
	Lần 2	0,089	0,103	0,062
	Lần 3	0,093	0,102	0,07
	Trung bình $\pm$ SD	0,092 <sup>(7)</sup> $\pm$ 0,003	0,104 <sup>(8)</sup> $\pm$ 0,002	0,066 <sup>(9)</sup> $\pm$ 0,004

Ghi chú: (2), (1):  $p = 0,01 < 0,05$ ; (2), (3):  $p = 0,0001 < 0,05$ ; (5), (4):  $p = 1,1.10^{-5} < 0,05$ ; (5), (6):  $p = 3,4.10^{-7} < 0,05$ ; (8), (7):  $p = 0,003 < 0,05$ ; (8), (9):  $p = 6,6.10^{-5} < 0,05$  (t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances)

**3.4 Kết quả khảo sát nồng độ PHA trong quy trình nuôi cấy PBMCs**

Ở mức nồng độ PHA 1,5% (tt/tt), tỷ lệ tăng sinh tế bào PBMCs đạt mức độ cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với những nồng độ còn lại sau 48 giờ nuôi

cấy ( $p < 0,05$ ). Ở nồng độ PHA 1%, tế bào tăng nhiều hơn so với giếng có nồng độ PHA 2%. Kết quả này phù hợp với cả 2 môi trường khảo sát là RPMI-1640 và DMEM (Bảng 4). Từ các kết quả thực nghiệm trên, nồng độ PHA 1,5% (tt/tt) đã được xác định là tối ưu cho các thử nghiệm trên tế bào PBMCs.

**Bảng 4: Kết quả tỷ lệ tăng sinh tế bào PBMCs được nuôi ở các môi trường có nồng độ PHA khác nhau**

Môi trường	Thử nghiệm	Tỷ lệ tăng sinh tế bào PBMCs ở các nồng độ PHA khác nhau (%)			
		PHA 2%	PHA 1,5%	PHA 1%	PHA 0,5%
RPMI-1640	Lần 1	3,68	12,88	11,31	3,37
	Lần 2	5,69	12,44	3,18	0,37
	Lần 3	4,75	13,69	6,31	0,68
	Trung bình ± SD	4,71 <sup>(1)</sup> ± 1	13 <sup>(2)</sup> ± 0,63	6,94 <sup>(3)</sup> ± 4,1	1,48 <sup>(4)</sup> ± 1,65
P		< 0,05			
DMEM	Lần 1	2,73	9,75	4,42	1,49
	Lần 2	1,95	10,14	3,96	0,84
	Lần 3	2,92	10,14	4,29	1,75
	Trung bình ± SD	2,53 <sup>(5)</sup> ± 0,51	10,01 <sup>(6)</sup> ± 0,22	4,22 <sup>(7)</sup> ± 0,23	1,36 <sup>(8)</sup> ± 0,46
P		< 0,05			

Ghi chú: (2), (1):  $p = 0,0001 < 0,05$  ; (2), (3):  $p = 0,03 < 0,05$  ; (2), (4):  $p = 0,0001 < 0,05$  ; (6), (5):  $p = 1,06.10^{-5} < 0,05$  ; (6), (7):  $p = 3,3.10^{-6} < 0,05$  ; (6), (8):  $p = 4,3.10^{-6} < 0,05$  (t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances)

## 4 THẢO LUẬN

### 4.1 Về kết quả khảo sát dung môi hòa tan tinh thể formazan

Sự thay đổi định hấp thu cực đại của formazan trong các dung môi hòa tan có thể do pH của các dung môi khác nhau làm chuyển dịch bước sóng hấp thu cực đại.

### 4.2 Về kết quả khảo sát mật độ tế bào, nồng độ FBS và thời gian nuôi cấy tế bào

– Về kết quả khảo sát mật độ tế bào, loại tế bào khác nhau sẽ sản sinh ra lượng formazan khác nhau. Do đó, có những loại tế bào dòng như tế bào dòng ung thư hạch ở chuột, đồ thị biểu diễn mật độ tế bào/giếng theo độ hấp thu formazan tuyến tính từ 200 đến 50.000 tế bào trên giếng (Mosmann, 1983). Trong khi đó, kết quả nghiên cứu này cho thấy mật độ của tế bào PBMCs nên chọn ở mức  $10^4$  đến  $10^5$  tế bào/giếng cho các thử nghiệm trên PBMCs.

– Huyết thanh cung cấp các chất dinh dưỡng, các hormon và các yếu tố tăng trưởng... cần thiết cho sự sống tế bào. Thời gian nuôi cấy tế bào là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến độ sống tế bào vì phụ thuộc vào dòng tế bào và môi trường dinh dưỡng (Arora, 2013). Về kết quả khảo sát nồng độ FBS cho môi trường nuôi cấy, khi thời gian nuôi cấy càng dài thì lượng tế bào trong các giếng khảo sát giảm càng nhiều có thể do tế bào PBMCs là loại tế bào sơ cấp, không thể tự tăng sinh được nếu không có chất kích thích phân bào (như PHA) (Panda and Ravindran, 2013). Mặt khác, môi trường nuôi cấy không đủ chất dinh dưỡng cung cấp cho quá trình sống và phát triển của tế bào trong thời gian dài.

### 4.3 Về kết quả khảo sát môi trường nuôi cấy tế bào

Việc chọn lựa một môi trường nuôi cấy đặc biệt quan trọng vì có thể tác động một cách có ý nghĩa

đến sự thành công của các thực nghiệm nuôi cấy tế bào. Thông thường, môi trường nuôi cấy được lựa chọn phụ thuộc vào dạng tế bào nuôi cấy, mục đích nuôi cấy và nguồn nguyên vật liệu có sẵn để nghiên cứu. RPMI-1640 là một môi trường đa năng cho các tế bào động vật có vú và hay được sử dụng hỗ trợ sự tăng trưởng của nhiều tế bào huyền phù như tế bào lympho người... Trong kết quả nghiên cứu này, dường như môi trường DMEM thích hợp hơn cho việc nuôi cấy PBMCs, thể hiện qua độ hấp thu cao hơn so với kết quả từ 2 môi trường còn lại. Tuy nhiên, việc lựa chọn môi trường phù hợp cho dòng tế bào nuôi cấy còn phải phụ thuộc nhiều yếu tố khác như mục đích nghiên cứu và nguyên vật liệu có sẵn trong phòng thí nghiệm (Arora, 2013).

### 4.4 Về kết quả khảo sát nồng độ PHA

Với nồng độ PHA 1,5%, tỷ lệ tăng sinh PBMCs trong 48 giờ là cao nhất, phù hợp với hướng dẫn của nhà sản xuất (1-2%). Ở các nồng độ PHA thấp (0,5% hay 1%), tỷ lệ tăng sinh tế bào thấp hơn ở nồng độ PHA 1,5% có thể do lượng PHA ít nên tế bào phân chia kém hơn. Nhưng ở nồng độ PHA 2%, tỷ lệ tăng sinh tế bào lại thấp hơn có thể giải thích do tế bào tăng trưởng quá nhanh nên môi trường không đủ dinh dưỡng cho nuôi cấy tế bào. Mặt khác, tế bào đã sản sinh ra nhiều độc tố trong môi trường nuôi cấy gây chết tế bào. Kết quả này phù hợp với cả 2 môi trường khảo sát là RPMI-1640 và DMEM.

## 5 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, một quy trình nuôi cấy tế bào tối ưu cần cho các thử nghiệm khảo sát tác động của dược liệu hay chất hóa dược mới trên sự tăng trưởng tế bào PBMCs đã được xây dựng với các kết quả tối ưu hóa như sau: với vận tốc ly tâm 1.200 xg trong 20 phút, hơn 95% tế bào PBMCs được chiết từ 6 mL máu toàn phần với ống Leucosep® 10mL đã được tìm thấy vẫn sống bằng phương pháp nhuộm trypan blue và đếm trên hemocytometer; dung môi

DMSO/NH<sub>3</sub> được xác định hòa tan tinh thể formazan tốt nhất trong phương pháp MTT; các điều kiện tối ưu cho môi trường nuôi cấy PBMCs là nồng độ FBS 10%, mật độ từ 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> tế bào/giếng, nồng độ chất kích thích phân bào PHA là 1,5% (tt/tt) cần cho sự tăng trưởng PBMCs.

### LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến ban lãnh đạo và nhân viên của Viện Sinh học Nhiệt đới đã tạo điều kiện và tận tình giúp đỡ nhóm nghiên cứu thực hiện được đề tài này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Jantan, I., Ahmad, W. and Bukhari, S.N., 2015. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science*, 6: 655.

Wang, L., Wang, F.S. and Gershwin, M.E., 2015. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*. 278(4): 369-395.

Amirghofran, Z., Hashemzadeh, R., Javidnia, K., Golmoghaddam, H. and Esmacilbeig, A., 2011. In vitro immunomodulatory effects of extracts from three plants of the Labiatae family and isolation of the active compound(s). *Journal of Immunotoxicology*. 8(4): 265-273

Aldahlawi, A.M., 2016. Modulation of dendritic cell immune functions by plant components. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 4(2): 55-62

Sarma, D. and Khosa, R., 1994. Immunomodulators of plant origin – a review. *Ancient Science of Life*. 13(3-4): 326-331

Harput, U.S., Saracoglu, I. and Ogihara, Y., 2005. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytotherapy Research*. 19(4): 346-348

Arreola, R., Quintero-Fabián, S., López-Roa, R.I., Flores-Gutiérrez, E.O., Reyes-Grajeda, J.P., Carrera-Quintanar, L. and Ortuño-Sahagún, D., 2015. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of Immunology Research*, 2015

Singh, N., 2016. A review on herbal plants as immunomodulators. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 7(9): 3602 – 3610

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63

Panda, S.K. and Ravindran, B., 2013. In vitro Culture of Human PBMCs, accessed on 15 July 2018. Available from <https://bio-protocol.org/e322>

Arora, M., 2013. Cell Culture Media: A Review, accessed on 10 July 2018. Available from <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>.