

§3. NGUYÊN LÝ ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

Mục tiêu học tập:

- ❖ Trình bày nguyên lý và các kỹ thuật chính của công nghệ nuôi cấy tế bào.
- ❖ Trình bày phân loại các tế bào gốc và tiềm năng của chúng.
- ❖ Phân tích tầm quan trọng của các ứng dụng nuôi cấy tế bào và tế bào gốc trong y-dược.

Mục tiêu nuôi cấy tế bào:

- ✚ Sử dụng tế bào để sản xuất các protein tái tổ hợp sử dụng trong trị liệu và chẩn đoán.
- ✚ Sử dụng tế bào làm vật chủ nhân bản virus làm vector chuyển gen cho liệu pháp gen và vaccin virus.
- ✚ Nuôi cấy tế bào sơ cấp, tế bào ung thư hoặc tế bào gốc cho nghiên cứu khoa học hay phát triển sản phẩm dược dụng.
- ✚ Nuôi cấy và thu hoạch tế bào với mục đích liệu pháp tế bào hay y học tái tạo (tế bào gốc phôi và tế bào gốc).

Các nguyên lý kỹ thuật nuôi cấy tế bào:

- Các phương tiện và hóa chất được sử dụng trong nuôi cấy tế bào: các thiết bị và môi trường.
- Các loại tế bào được sử dụng: các dòng tế bào bất tử; tế bào sơ cấp nuôi cấy; mô nuôi cấy; tế bào gốc.
- Phân lập và thu nhận các tế bào gốc; xác định hướng ứng dụng tế bào gốc.

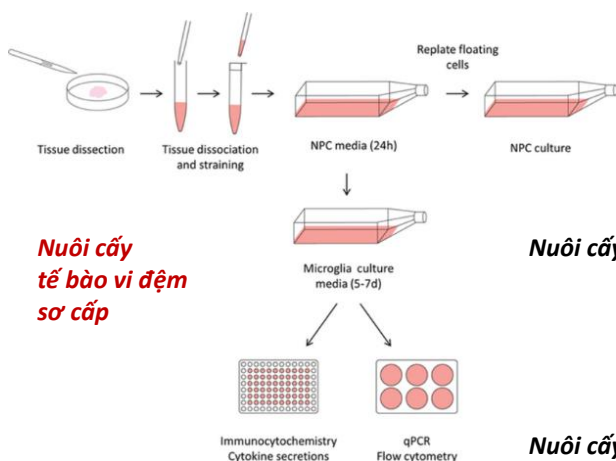
1. Các thiết bị và hóa chất trong nuôi cấy tế bào

Các thiết bị

- Tủ an toàn sinh học
- Tủ nuôi tế bào
- Các chai/ đĩa nuôi tế bào vô trùng;
- Nồi nuôi cấy
- Tủ lạnh
- Chậu ổn nhiệt
- Kính hiển vi

Hóa chất- Môi trường

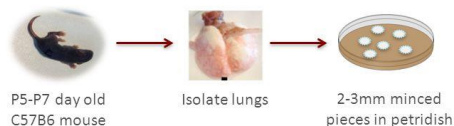
- **Môi trường duy trì:** nhằm đảm bảo tế bào giữ nguyên vẹn cấu trúc và chuyển hóa nhưng không kích thích tế bào phân chia.
- **Môi trường phát triển:** chứa các yếu tố cần thiết để tế bào phân chia và tăng sinh.



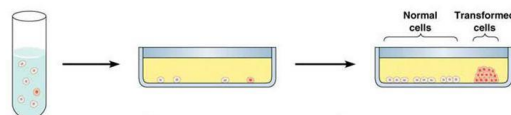
Nuôi cấy:

- tế bào bất tử (liên tục)
- tế bào sơ cấp
- mảnh mô sống

Nuôi cấy tế bào sơ cấp



Nuôi cấy tế bào liên tục



2. Các dòng tế bào bất tử

3T3	Nguyên bào sợi phôi chuột	Sinh sản mạnh mẽ và dễ thao tác; bị ức chế tiếp xúc; ngừng sinh trưởng trong điều kiện mật độ lớn.
HeLa	Tế bào biểu mô người	Xuất xứ từ u cổ tử cung của một bệnh nhân; có thể nhiễm vào các dòng tế bào khác được nuôi cấy; có thể sinh trưởng ở dạng dịch huyền phù.
COS	Thận khỉ	Hiệu quả chuyển nạp tốt; thường được sử dụng làm hệ thống biểu hiện dành cho các protein có mức biểu hiện cao, thời gian biểu hiện ngắn.
293/ 293T/ HEK-293	Tế bào thận phôi người	Dễ dàng chuyển nạp và thao tác; thường được dùng làm hệ thống biểu hiện để nghiên cứu các protein truyền tín hiệu và tái tổ hợp.
MDCK	Tế bào biểu mô thận chó Madin-Darby	Phân cực thành các vùng đỉnh – gốc, được sử dụng trong các nghiên cứu về sự dẫn truyền.
CHO	Tế bào trứng chuột Hamster	Được sử dụng trong biểu hiện gen bền vững và sản sinh mức protein cao cho các thí nghiệm hóa sinh; thường được sử dụng làm hệ thống biểu hiện cho những nghiên cứu về các protein tái tổ hợp và dẫn truyền tín hiệu tế bào.
S2	Các tế bào Drosophila tương tự đại thực bào	Dòng tế bào từ Drosophila được xác định đặc tính kỹ; miễn cảm rất cao với điều trị sử dụng ARNi.
PC12	Tế bào u tủy tuyến thượng thận chuột cống	Tương tự với tế bào thần kinh, có nguồn gốc từ một khối u tủy tuyến thượng thận; có thể biệt hóa thành kiểu hình tế bào thần kinh khi có mặt NGF.
Neuro2A/ N2A	Nguyên bào thần kinh chuột nhắt	Hệ thống kiểu mẫu cho nghiên cứu về trao đổi chất liên quan đến sự biệt hóa của neuron; có thể được biệt hóa định hướng nhờ kích thích từ thụ thể serotonin và cannabinoid.
SH-SY5Y	Nguyên bào máu người, được tạo dòng từ các tế bào trong tủy đỏ	Có hoạt tính dopamine β -hydroxylase, acetylcholinergic, glutamatergic, adenosinergic; sinh trưởng thành cụm các nguyên bào thần kinh với các sợi nhánh thần kinh ngắn, mảnh.

3. Nuôi cấy tế bào và mô sơ cấp

A- Nguồn gốc phân lập

	Ưu điểm	Nhược điểm
Các dòng tế bào bất tử	Dễ sử dụng (nuôi, chuyển nạp...) Đồng nhất về di truyền. Đã được xác định tốt các tính chất Có thể tạo dòng các tế bào ổn định trong biểu hiện gen được quan tâm.	Có thể không có các đặc tính giống với một loại tế bào được quan tâm hoặc tế bào nuôi cấy sơ cấp.
Nuôi cấy tế bào sơ cấp	Tương đồng về kiểu tế bào, tính chất sinh lý và mạch sinh trưởng	Quần thể tế bào không đồng nhất về di truyền.

B- Nuôi cấy tế bào đơn

- Tách riêng rẽ các tế bào sơ cấp
- Nuôi tế bào trên các phiến kính thủy tinh được phủ chất bám dính hai chiều hoặc trong cơ chất ba chiều (đặt nuôi tế bào trên bề mặt hoặc trong cơ chất mà chúng bám dính và phát triển).

Ví dụ: tế bào neuron có thể phát triển sợi trục và các sợi nhánh, tạo các khớp nối thần kinh với nhau, biểu hiện các thụ thể và kênh ion đặc hiệu

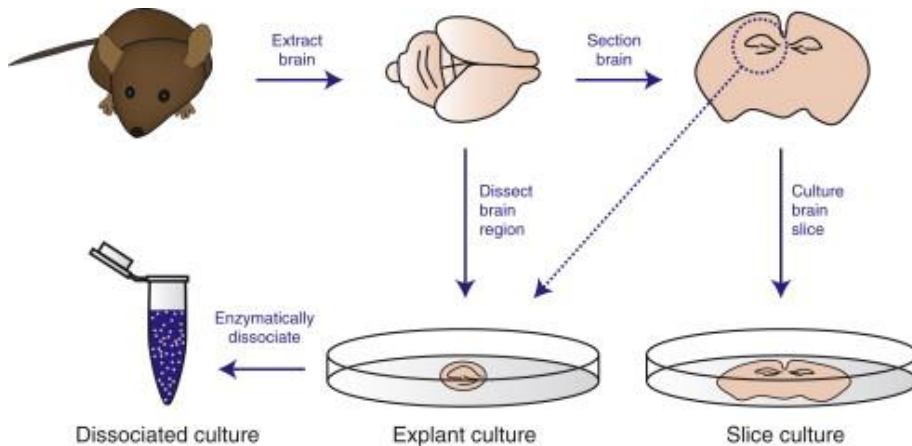
Một số hạn chế

- Tế bào đơn lẻ mất đi tính liên hệ và kết cấu tổ chức gian bào giữa các tế bào trong một mô ở một cơ thể sống, mà trong điều kiện *in vivo*.
- Tế bào nuôi sơ cấp đơn có số lượng rất ít nên lượng vật chất tạo ra cũng không đủ dùng cho các phân tích sinh hóa.
- Tế bào nuôi cấy sơ cấp có tính đồng nhất không cao.

C- Nuôi cấy mảnh mô sống

- Nuôi cấy lát mô não bộ giúp duy trì được cấu trúc và tổ chức toàn vẹn của lát mô (dày khoảng 250 – 400 μm).
- Các lát cắt mô cung cấp nhiều kết quả gần nhất với thực tế và các hình ảnh về cấu trúc sâu bên trong - các vị trí khó tiếp cận *in vivo*.
- Có thể được sử dụng ngay mô nuôi cấy cho các thí nghiệm hoặc theo hình thức nuôi cấy cơ quan đối với các thí nghiệm có thời gian kéo dài hơn (quan sát các biến đổi về cấu trúc và hình thái cơ quan theo thời gian).

Nuôi cấy tế bào liên tục, tế bào sơ cấp và mảnh mô sống



Cell Culture Techniques

M. Carter & J. Shieh, *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (2nd Edition), 2015.

4. Ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào

A- Sản xuất protein tái tổ hợp (Sử dụng các vật chủ nhân thực):

- Vaccin virut: sản xuất vaccine sởi, viêm gan B, quai bị, rubella, dại...
- Các cytokine: interferon và interleukin, hiện nay dần được thay thế bằng sử dụng tế bào nấm men với công nghệ đơn giản hơn. Một số loại cytokine vẫn cần được sản xuất từ đối tượng tế bào động vật.
- Các yếu tố tạo máu: EPO (erythropoietin).
- Hormon tăng trưởng.
- Các kháng thể đơn dòng.
- Các yếu tố đông máu và phân hủy cục máu đông: yếu tố VII, VIII, IX, tPA.

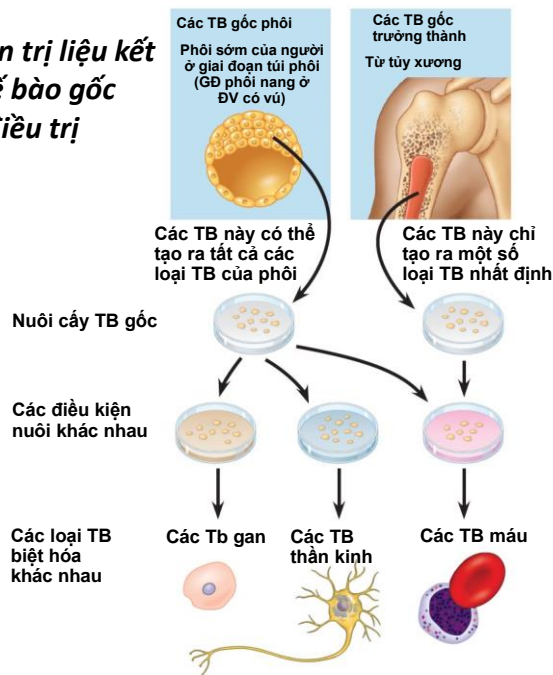
B- Liệu pháp tế bào

- ✓ Nuôi cấy tế bào hoặc mô sống để thay thế hoặc sửa chữa mô bị hư hại.
- ✓ Các tế bào gốc được nuôi *in vitro* → biệt hóa thành tế bào đích có định hướng → cấy ghép/ thay thế mô.

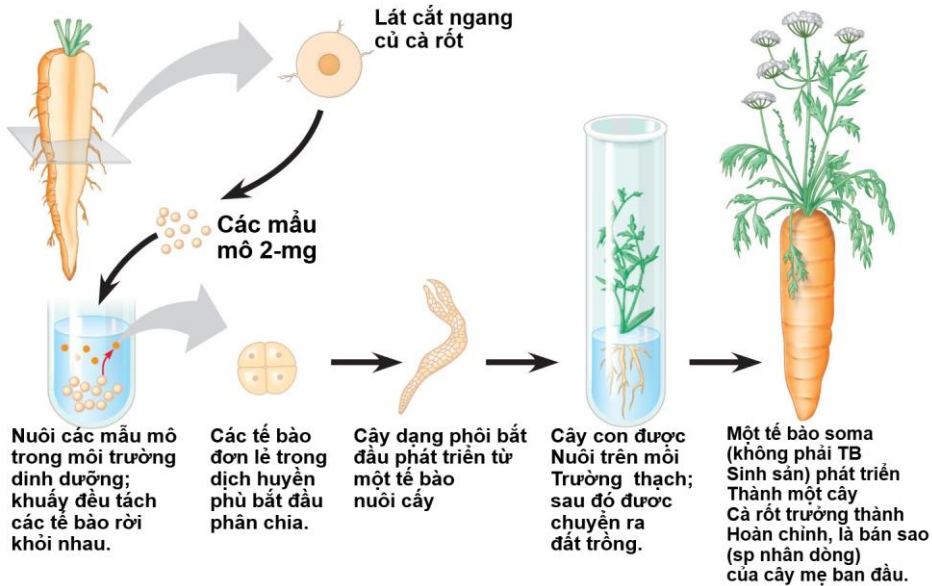
C- Công nghệ mô

- ✓ Công nghệ nuôi tế bào nhằm gây tạo mảnh mô sống *in vitro* với mục đích ghép trở lại cơ thể người bệnh;
- ✓ Nuôi mảnh mô sống sau khi phân lập ngoài cơ thể với mục đích đánh giá và phát triển sản phẩm được dụng mới.

Ứng dụng gen trị liệu kết hợp với tế bào gốc trong điều trị

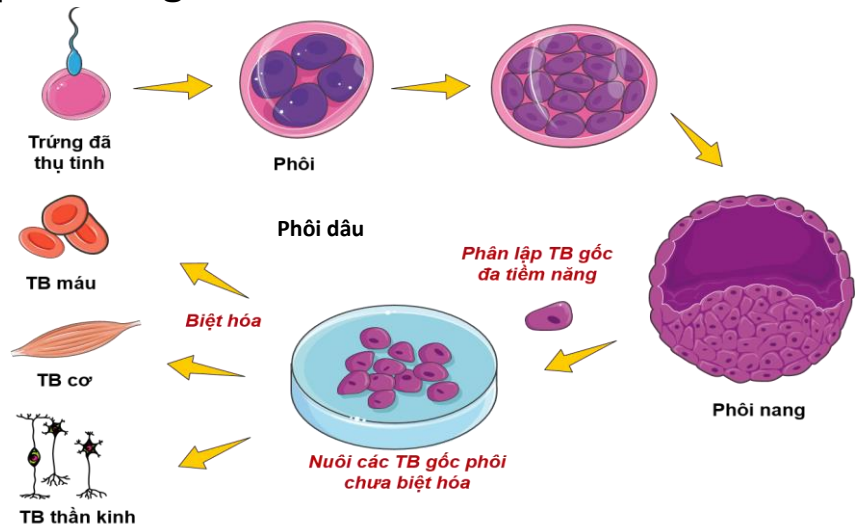


Ứng dụng nuôi cấy mô thực vật



5. Công nghệ tế bào gốc

A- Khái niệm và phân loại



A- Khái niệm và phân loại

Sự tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc phôi

Khác biệt giữa tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành

Tiềm năng phát triển của tế bào gốc

B- Công nghệ tế bào gốc

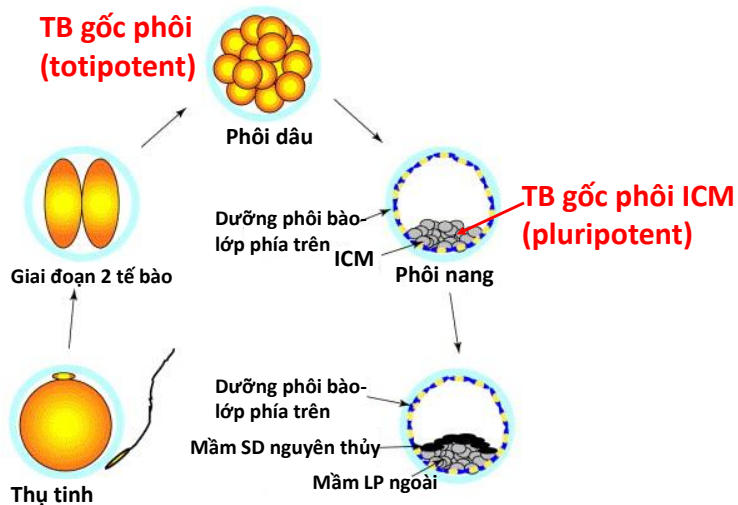
Kỹ thuật thu nhận tế bào gốc phôi

- (i) Tạo tế bào gốc phôi nhờ kỹ thuật chuyển nhân tế bào soma, SCNT (somatic cell nuclear transfer).
- (ii) Cảm ứng tế bào trưởng thành tạo ra tế bào gốc, iPSC (induced Pluripotent Stem Cells)

Kỹ thuật phân lập tế bào gốc trưởng thành

- Tủy đỏ:
- Máu ngoại vi
- Mô mỡ
- Màng trong cuống rốn:

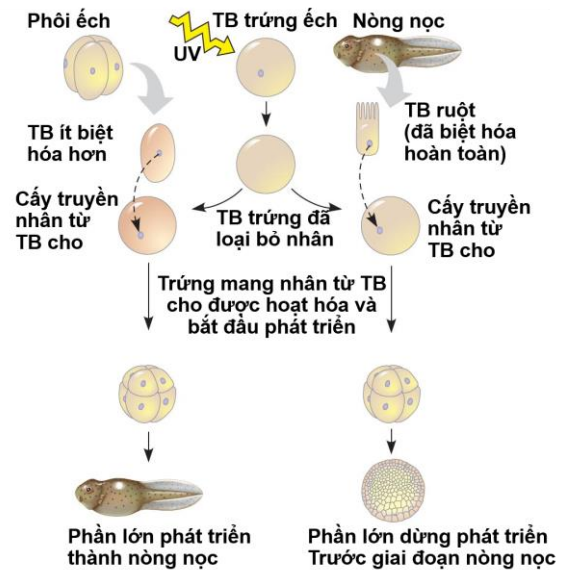
Sự hình thành và phát triển phôi



trends in Biotechnology

Tế bào gốc

- Các tế bào chưa được biệt hóa: có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau và có khả năng **tự thay mới** (self-renewal).
- Tính tự thay mới: khả năng sinh ra các tế bào giống hệt nhau để thay thế chúng- tính chất đặc trưng nhất của tế bào gốc.
- Phân loại dựa trên *cơ sở nguồn phân lập* tế bào ở động vật có xương sống:
 - tế bào gốc phôi
 - tế bào gốc trưởng thành

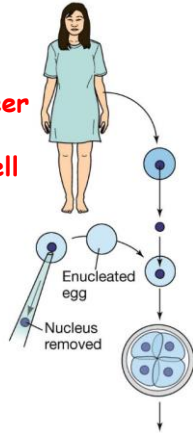


Một số thành tựu của công nghệ tế bào:

- Tạo tế bào gốc chuyển gen thay thế sụn, xương, mỡ, cơ, nội bì và tế bào thần kinh mất chức năng;
- Tái tạo da chữa lành vết bỏng;
- Tạo các tế bào gốc thần kinh điều trị bệnh về não sau khi tiêm vào cơ thể;
- Điều trị ung thư máu bằng tế bào gốc tạo máu; ghép tủy xương
- Phục hồi chức năng cơ tim bằng tế bào gốc.
- Tạo mô cơ, xương trong chấn thương chỉnh hình.
- Tạo ra cơ thể sinh vật hoàn chỉnh: động vật nhân bản, ví dụ cừu Dolly (1996-2003).

Kết hợp gen trị liệu và liệu pháp nhân bản tế bào gốc

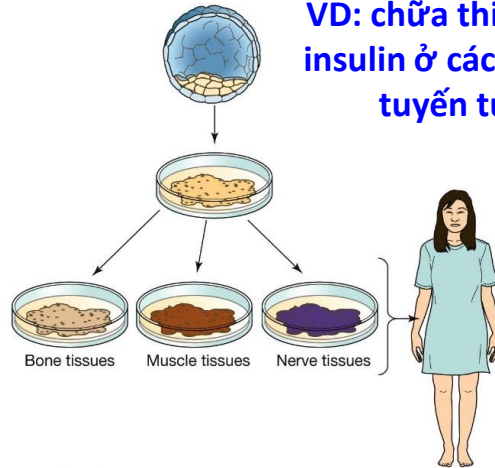
**Genetic Engineer
Cells Before
Nuclear or Cell
Transfer**



LIFE 8e, Figure 19.8 (Part 1)

LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Eighth Edition, © 2007

**VD: chữa thiếu hụt
insulin ở các tế bào
tuyến tụy**



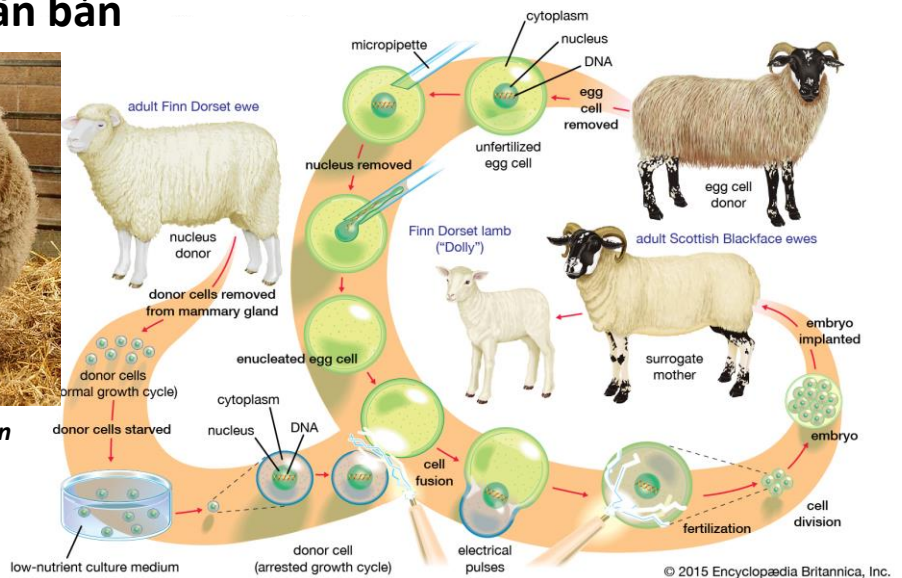
LIFE 8e, Figure 19.8 (Part 2)

LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Eighth Edition, © 2007 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.

Động vật nhân bản



**Dolly standing in her pen
at the Roslin Institute,
near Edinburgh**



© 2015 Encyclopædia Britannica, Inc.