

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY SINH KHỐI TẾ BÀO THÔNG ĐỎ VIỆT NAM TRONG MÔI TRƯỜNG LỎNG

Vũ Bình Dương*; Nguyễn Văn Long*
Phạm Văn Hiến*; Chủ Đức Thành*

TÓM TẮT

Từ callus Thông đỏ Việt Nam, cấy chuyển sang môi trường lỏng SH để nuôi cấy sinh khối tế bào Thông đỏ. Từ đó, sản xuất nguyên liệu thuốc điều trị ung thư paclitaxel và các dẫn chất. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới tốc độ phát triển tế bào, kết quả cho thấy: lựa chọn môi trường SH có bổ sung 3,0 mg/l NAA; 2 mg/l BAP, 30 g đường saccarose, nuôi cấy trong 14 ngày, phù hợp với nuôi cấy tế bào Thông đỏ trên môi trường lỏng. Đã xác định được hàm lượng một số hoạt chất trong sinh khối tế bào thu được từ các nuôi cấy trên, trong đó paclitaxel đạt 0,0124% và baccatin III đạt 0,008%.

* Từ khóa: Thông đỏ; Nuôi cấy tế bào thực vật; Môi trường lỏng; Sinh khối tế bào.

STUDY ON SUSPENSION CELL CULTURE OF VIETNAM TAXUS CELL

SUMMARY

Calli, induced from Vietnam taxus (Taxus wallichiana) was subcultured SH suspension medium for producing paclitaxel and other substances. The research results showed that: SH suspension medium was supplemented NAA 3.0 mg/l, BAP 2.0 mg/l, sucrose 30 g/l within 14 days, appropriate for suspension culturing of Vietnam taxus cell. The results of quantitations in Taxus cellmass found 0.0124% for paclitaxel and 0.008% for baccatin III.

* Key words: *Taxus wallichiana; Plant cell culture; Suspension; Taxus cell mass.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông đỏ Việt Nam (*Taxus wallichiana*) là dược liệu quý hiếm, được ghi trong sách đỏ cần được bảo vệ. Từ Thông đỏ, chiết xuất được paclitaxel (biệt dược Taxol) và các chất baccatin III, 10 deacetyl baccatin III để bán tổng hợp paclitaxel và docetaxel (biệt dược Taxotere). Hiện nay, hai chế phẩm taxol và taxotere được sử dụng phổ biến và hiệu quả trong điều trị nhiều loại ung thư,

như: ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư dạ dày.... Tuy nhiên, giá thành của hai loại thuốc này rất đắt, khoảng 1,5 triệu đồng/liều. Nguyên nhân là do nguồn nguyên liệu khai thác tự nhiên từ các loài Thông đỏ hạn chế, hàm lượng hoạt chất thấp. Ngoài ra, việc tổng hợp hóa học các dược chất này chỉ mang ý nghĩa khoa học, do cấu trúc hóa học phức tạp nên việc tổng hợp không có giá trị thương mại [1]. Vì vậy, một trong những hướng để giải quyết vấn đề thiếu

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

nguyên liệu paclitaxel và các chất để sản xuất thuốc điều trị ung thư là sử dụng công nghệ sinh khối tế bào các loài Thông đỏ (*Taxus sp*). Đây là hướng nghiên cứu mới được áp dụng thành công trên thế giới trong sản xuất paclitaxel [4, 7].

Học viện Quân y đã tiến hành nuôi cấy sinh khối tế bào Thông đỏ để sản xuất nguyên liệu thuốc điều trị ung thư từ nguồn gen dược liệu trong nước. Bước đầu thành công ở giai đoạn tạo callus và duy trì nuôi cấy callus trên môi trường thạch [5, 6]. Hiện nay, đang tiến hành các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo nhằm sản xuất dược paclitaxel. Trong bài này, chúng tôi thông báo kết quả nuôi cấy sinh khối tế bào Thông đỏ trong môi trường lỏng.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu, thiết bị.

- Duy trì nuôi cấy mẫu callus Thông đỏ Việt Nam trên môi trường thạch SH (đủ điều kiện nuôi cấy trên môi trường lỏng).

- Các hóa chất dùng pha chế môi trường nuôi cấy của hãng Sigma (đạt tiêu chuẩn cho nuôi cấy tế bào thực vật), paclitaxel, baccatin III (Sigma) đạt tiêu chuẩn chất chuẩn.

- Máy lắc (MS1 Minishaker, IKA® USA), máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (Alliance Waters 2695D, Mỹ). Hệ thống thiết bị phòng thí nghiệm sạch đạt tiêu chuẩn GMP (Việt Nam) dùng cho nuôi cấy tế bào và các thiết bị chuyên dụng khác...

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Phương pháp nuôi cấy trên môi trường lỏng:*

Cấy chuyển tế bào callus Thông đỏ từ môi trường thạch SH sang môi trường lỏng SH có bổ sung 1 mg/l BAP (6-benzyl amino purin), 2 mg/l NAA (1-naphtalen axit acetic) và 20 g/l đường saccarose. Điều chỉnh môi trường pH = 5,6. Đổ 50 ml môi trường vào bình nón dung tích 125 ml, hấp tiệt khuẩn ở 121°C trong 30 phút. Sau khi môi trường đã nguội, cấy 5 g callus vào. Duy trì nuôi cấy ở 24°C trong điều kiện không có ánh sáng, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sau 0, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16 ngày, lọc lấy khối tế bào, xác định khối lượng tươi (KLT, g/l), khối lượng tế bào khô (KLK, g/l). Đánh giá tốc độ tăng trưởng của khối tế bào (tốc độ tăng trưởng = KLK sau khi thu hoạch/KLK nuôi cấy ban đầu).

* *Khảo sát ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng:*

Sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng khác nhau để lựa chọn như: IBA (Indol butyric acid), NAA nồng độ ban đầu 2 mg/l và BAP 1 mg/l; kinetin (Ki) 0,2 mg/l. Nuôi cấy tế bào trong điều kiện đã lựa chọn. Dựa vào kết quả sinh khối thu được để lựa chọn chất điều tiết sinh trưởng phù hợp.

* *Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đường sử dụng:*

Sau khi lựa chọn thời gian nuôi cấy và các chất điều tiết sinh trưởng thích hợp, tiếp tục khảo sát để lựa chọn nồng độ đường saccarose. Sử dụng đường ở các nồng độ 15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l và 35 g/l. Nuôi cấy theo quy trình chung. Sau đó, lọc, cân xác định KLT và KLK. Từ đó, lựa chọn nồng độ đường thích hợp cho tế bào phát triển tốt nhất.

* Phương pháp định lượng hoạt chất trong sinh khối tế bào Thông đỏ:

Sau khi nuôi cấy bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, tiến hành định lượng paclitaxel và baccatin III trong sinh khối tế bào thu được với các điều kiện: cột C18 Luna L43 (250 × 4,6 mm; 5 μm); thể tích tiêm

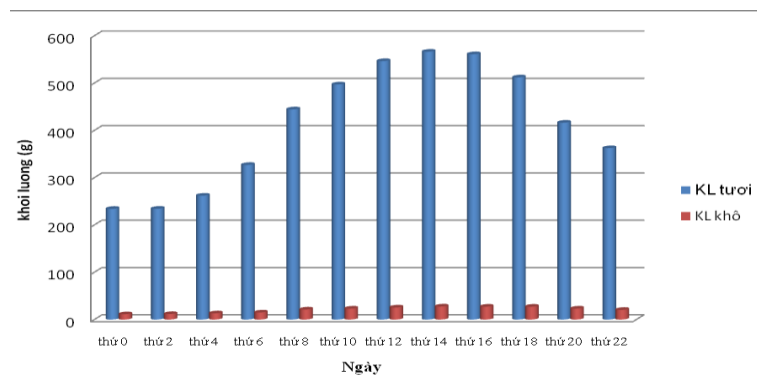
mẫu: 10 μl; detector PDA bước sóng: 228 nm; pha động: ACN-H₂O chạy theo chương trình gradient; tốc độ dòng: 1 ml/phút. Kết quả so sánh với các chuẩn chạy ở cùng điều kiện.

* Phương pháp xử lý kết quả nghiên cứu: bằng phần mềm Execl.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả khảo sát lựa chọn thời gian nuôi cấy tế bào Thông đỏ trên môi trường lỏng.

Từ kết quả nuôi cấy trên môi trường thạch, lựa chọn môi trường lỏng SH bổ sung NAA 3 mg/l; BAP 1 mg/l, đường saccarose 20 g/l để khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy khi cấy chuyển sang môi trường lỏng. Sau ngày thứ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 thu hoạch tế bào, sấy khô, cân xác định khối lượng tế bào (hình 1).



Hình 1: Đồ thị tốc độ phát triển của tế bào Thông đỏ theo thời gian.

Sau ngày nuôi cấy thứ 4, tế bào đã bắt đầu phát triển. Khối lượng tế bào Thông đỏ tăng nhanh từ ngày thứ 4 - 14. Từ ngày thứ 14 - 16, tốc độ tăng chậm dần và sau ngày thứ 16, khối lượng tế bào gần như không tăng, thậm chí còn giảm. Tế bào có hiện tượng sẫm màu. Như vậy, thời gian cho 1 chu kỳ nuôi cấy tế bào Thông đỏ trên môi trường lỏng là 14 ngày.

2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng.

* Lựa chọn chất điều tiết sinh trưởng:

Sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA, IBA nồng độ 2 mg/l). Sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các chất nhóm cytokinin (BAP nồng độ 1,0 mg/l và kinetin 0,2 mg/l). Nuôi cấy tế bào trong môi trường lỏng SH. Sau 14 ngày, lọc lấy tế bào, cân xác định KLT, KLK và tỷ lệ tăng trưởng tế bào.

Bảng 1: Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến tốc độ phát triển của tế bào.

CHẤT ĐIỀU TIẾT SINH TRƯỞNG	KHỐI LƯỢNG (g/l) TẾ BÀO ($\bar{X} \pm SD$) (n = 10)		TỶ LỆ SINH TRƯỞNG (lần)
	KLT	KLK	
NAA (1)	438,58 ± 21,07	21,93 ± 1,05	2,19 ± 0,10
IBA (2)	386,71 ± 18,32	19,34 ± 0,81	1,92 ± 0,08
NAA + Ki (3)	520,38 ± 40,96	26,02 ± 2,05	2,60 ± 0,11
NAA + BAP (4)	565,77 ± 27,31	28,29 ± 1,36	2,83 ± 0,11
IBA + BAP (5)	446,92 ± 16,67	22,34 ± 0,83	2,23 ± 0,09
IBA + Ki (6)	404,62 ± 25,38	20,23 ± 1,27	2,02 ± 0,11
p	$p_{4-1, 4-1, 4-5} < 0,05$		

Khi dùng các chất nhóm auxin riêng lẻ, tốc độ phát triển tế bào chậm hơn so với kết hợp các chất thuộc nhóm cytokinin. Ở nhóm sử dụng NAA và BAP, tốc độ phát triển tế bào tốt nhất (đạt 28,29 g và tỷ lệ sinh trưởng đạt 2,83 lần). Sự khác biệt so với các nhóm khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

* *Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BAP:*

Sử dụng môi trường lỏng SH bổ sung 2 mg/l NAA, 20 g/l đường saccarose và BAP ở các nồng độ khác nhau từ 0,5 mg/l đến 3 mg/l. Sau 14 ngày nuôi cấy, cân xác định KLK, KLT và tỷ lệ sinh trưởng.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến tốc độ tăng trưởng của tế bào.

NỒNG ĐỘ BAP (mg/l)	n	KHỐI LƯỢNG (g/l) TẾ BÀO ($\bar{X} \pm SD$)		TỶ LỆ SINH TRƯỞNG (lần)
		KLT	KLK	
0,5 (1)	10	412,48 ± 28,20	20,62 ± 1,41	2,06 ± 0,07
1,0 (2)	10	565,76 ± 27,31	28,29 ± 1,36	2,82 ± 0,11
1,5 (3)	10	604,02 ± 32,31	30,20 ± 1,61	3,02 ± 0,10
2,0 (4)	10	654,35 ± 30,40	33,56 ± 1,60	3,27 ± 0,06
2,5 (5)	10	656,83 ± 23,81	32,98 ± 1,33	3,28 ± 0,08
3,0 (6)	10	661,93 ± 30,10	33,24 ± 1,63	3,30 ± 0,09
3,5 (7)	10	669,50 ± 24,12	33,61 ± 1,27	3,34 ± 0,08
p	$p_{4-1, 4-2, 4-3} < 0,05, p_{4-5, 4-6} > 0,05$			

Khi nồng độ BAP tăng 0,5 - 2,0 mg/l, tốc độ phát triển của tế bào tăng lên. Trong khi đó, ở nồng độ 2,0 mg/l, tốc độ sinh trưởng của tế bào đạt 3,27 lần ($p_{4-1, 4-2, 4-3} < 0,05$). Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 2,5 mg/l và 3 mg/l, tốc độ phát triển tế bào tăng không đáng kể với $p > 0,05$ ($p_{4-5, 4-6} > 0,05$). Như vậy, nồng độ BAP thích hợp cho nuôi cấy tế bào Thông đỏ Việt Nam là 2 mg/l.

* Ảnh hưởng của nồng độ NAA:

Nuôi cấy tế bào Thông đỏ trong môi trường lỏng SH bổ sung 2,0 mg/l BAP, 20 g đường saccarose, đồng thời thêm NAA ở các nồng độ khác nhau 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg/l. Sau 14 ngày nuôi cấy, thu hoạch tế bào. Xác định KLT, KLK và tỷ lệ tăng trưởng.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tốc độ phát triển tế bào.

NỒNG ĐỘ BAP (mg/l)	n	KHỐI LƯỢNG (g/l) TẾ BÀO ($\bar{X} \pm SD$)		TỶ LỆ SINH TRƯỞNG (lần)
		KLT	KLK	
1,0 (1)	10	507,05 ± 30,38	25,35 ± 1,51	2,53 ± 0,07
2,0 (2)	10	654,35 ± 30,40	33,56 ± 1,60	3,27 ± 0,06
3,0 (3)	10	802,71 ± 31,44	40,31 ± 1,84	4,01 ± 0,10
4,0 (4)	10	810,18 ± 26,87	40,68 ± 1,46	4,05 ± 0,08
5,0 (5)	10	814,48 ± 33,61	40,90 ± 1,79	4,07 ± 0,06
6,0 (6)	10	818,75 ± 31,83	41,11 ± 1,71	4,09 ± 0,09
p	$P_{3-1, 3-2} < 0,05$, $p_{3-4, 3-5, 3-6} > 0,05$			

Khi nồng độ NAA càng tăng, tốc độ phát triển của tế bào Thông đỏ càng nhanh và đạt cao nhất khi sử dụng ở nồng độ 3,0 mg/l (KLK đạt 40,31 g và tỷ lệ tăng trưởng đạt 4,01 lần). Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nồng độ NAA từ 3,0 - 6,0 mg/l, tốc độ phát triển tế bào tăng không đáng kể với $p > 0,05$ ($p_{3-4, 3-5, 3-6} > 0,05$). Như vậy, nồng độ NAA thích hợp cho nuôi cấy tế bào Thông đỏ Việt Nam là 3 mg/l.

* Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường saccarose:

Nuôi cấy tế bào Thông đỏ trong môi trường lỏng SH bổ sung 3 mg/l NAA, 2 mg/l BAP và đường saccarose ở nồng độ từ 15; 20; 25; 30; 35 g/l. Sau 14 ngày nuôi cấy, thu hoạch tế bào, xác định KLK, KLT và tỷ lệ tăng trưởng.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ đường saccarose đến tốc độ phát triển tế bào.

NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG (g/l)	n	KHỐI LƯỢNG (g/l) tế bào ($\bar{X} \pm SD$)		TỶ LỆ SINH TRƯỞNG (lần)
		KLT	KLK	
15 (1)	10	604,02 ± 32,31	30,20 ± 1,61	3,02 ± 0,08
20 (2)	10	802,71 ± 31,44	40,31 ± 1,84	4,01 ± 0,10
25 (3)	10	882,73 ± 39,84	44,33 ± 2,22	4,41 ± 0,11
30 (4)	10	1027,96 ± 34,86	51,61 ± 2,16	5,14 ± 0,09
35 (5)	10	931,15 ± 24,82	46,75 ± 1,29	4,65 ± 0,12
p		$p_{4-1, 4-2, 4-3} < 0,05, p_{4-5} < 0,05$		

Khi tăng nồng độ đường saccarose từ 15 - 30 g/l, tốc độ phát triển tế bào tăng lên và đạt cao nhất khi sử dụng nồng độ đường 30 g/l với tốc độ tăng trưởng đạt 4,14 lần. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nồng độ đường lên 35 g/l, tốc độ phát triển tế bào giảm. Như vậy, nồng độ đường thích hợp cho nuôi cấy tế bào thông đỏ Việt Nam là 30 g/l.

** Kết quả định lượng paclitaxel và baccatin III trong sinh khối tế bào Thông đỏ:*

Nuôi cấy tế bào Thông đỏ trong môi trường SH bổ sung NAA 3 mg/l, BAP 2 mg/l, saccarose 30 g/l. Sau 14 ngày nuôi cấy, thu hoạch tế bào, sấy khô tới khối lượng không đổi. Định lượng paclitaxel và baccatin III bằng HPLC.

Bảng 5: Hàm lượng paclitaxel và baccatin III trong 3 mẫu sinh khối.

MẪU	% HOẠT CHẤT	PACLITAXEL (%)	BACCATIN III (%)
	1		0,0124
2		0,0131	0,0079
3		0,0136	0,0080
4		0,0118	0,0081
5		0,0112	0,0078
6		0,0125	0,0083
Trung bình		0,0124 ± 0,0008	0,0080 ± 0,0002

Hàm lượng paclitaxel và baccatin III trong mẫu sinh khối Thông đỏ Việt Nam nuôi cấy trên môi trường lỏng SH là: 0,0137 ± 0,0003% và 0,0081 ± 0,0001%.

BÀN LUẬN

Quy trình sinh khối tế bào thực vật thường trải qua nhiều giai đoạn khác nhau như: tạo callus, duy trì callus trên môi trường thạch, nuôi cấy tế bào trên môi trường lỏng, nuôi cấy trên hệ thống các bioreactor... Trong đó, giai đoạn nuôi cấy trên môi trường lỏng rất quan trọng, quyết định năng suất và hàm lượng hoạt chất. Vì vậy, cần nghiên cứu khảo sát các yếu tố ảnh hưởng để tế bào phát triển tốt nhất và hàm lượng hoạt chất cao nhất [2].

Thời gian cho một chu kỳ nuôi cấy tế bào là thông số quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình. Vì vậy, phải lựa chọn khoảng thời gian thích hợp sao cho tế bào thu hoạch đạt chất lượng tốt nhất mà không lãng phí môi trường dinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian nuôi cấy tế bào Thông đỏ trên môi trường lỏng ngắn hơn rất nhiều so với nuôi cấy trên môi trường thạch (14 ngày so với 35 ngày) [5]. Kết quả này cũng phù hợp nghiên cứu về thời gian 1 chu kỳ nuôi cấy tế bào thực vật.

Chất điều tiết sinh trưởng đóng vai trò quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ phát triển của tế bào. Trong nuôi cấy tế bào thực vật, thường sử dụng kết hợp các chất sinh trưởng của 2 nhóm auxin (2,4-D, NAA, IBA) và cytokinin (BAP, kinetin). Trong nuôi cấy tế bào Thông đỏ, thường sử dụng cặp chất NAA hoặc 2,4-D kết hợp với BAP [2]. Qua khảo sát kết quả nghiên cứu nuôi cấy tế bào Thông đỏ Việt Nam, khi NAA (nồng độ 3 mg/l) kết hợp với BAP (nồng độ 2 mg/l) tế bào phát triển tốt nhất.

Đường đóng vai trò cung cấp dinh dưỡng cho tế bào phát triển. Ngoài ra, đường góp phần tạo các stress áp lực thẩm thấu tác động vào tế bào, làm tăng sinh hoạt chất [2]. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi sử dụng nồng độ đường 30 g/l, tốc độ tăng trưởng của tế bào Thông đỏ là tốt nhất.

Kết quả định lượng các hoạt chất chính trong sinh khối tế bào thấy: hàm lượng paclitaxel đạt 0,012% và baccatin III đạt 0,0081%. Hàm lượng các chất này thấp so với một số nghiên cứu đã công bố [7]. Tuy nhiên, các mẫu sinh khối chúng tôi sử dụng đều chưa qua giai đoạn nghiên cứu biện pháp kích thích tăng hàm lượng hoạt chất như sử dụng chất làm tăng hoạt chất, nuôi cấy 2 giai đoạn. Vì vậy, đây chỉ là kết quả bước đầu về hàm lượng hoạt chất trong sinh khối tế bào Thông đỏ Việt Nam.

KẾT LUẬN

Sau khi nuôi cấy sinh khối tế bào Thông đỏ trên môi trường lỏng, chúng tôi đạt được kết quả như sau: khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng của tế bào Thông đỏ; lựa chọn môi trường SH có bổ sung 3,0 mg/l NAA; 2 mg/l BAP, 30 g đường saccarose, nuôi cấy 14 ngày; xác định được hàm lượng các hoạt chất trong sinh khối tế bào thu được từ nuôi cấy; trong đó, hàm lượng paclitaxel là 0,0124% và baccatin III là 0,008%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Bình Dương, Phan Đình Châu. Sản xuất thuốc điều trị ung thư paclitaxel từ các loài Thông đỏ bằng công nghệ sinh khối tế bào thực vật. Tạp chí Thông tin Y dược học. 2011, số 8, tr.12-14.

2. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long. Các yếu tố ảnh hưởng tới tốc độ phát triển và hàm lượng hoạt chất trong sinh khối tế bào thực vật. Tạp chí Thông tin Y dược. 2009, số 2, tr.9-13.

3. Vũ Bình Dương, Đào Văn Đôn, Nguyễn Văn Long, Nguyễn Thị Thiện, Phạm Thị Thanh Hà. Nghiên cứu định lượng các hoạt chất trong sinh khối Thông đỏ bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tạp chí Dược học. 2010, số 9, tr.21-24.

4. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Hoàng Văn Lương, Lê Bách Quang. Công nghệ sinh khối tế bào thực vật, hướng mới trong sản xuất nguyên liệu làm thuốc. Tạp chí Thông tin Y dược học, 2008, số 12, tr.6-9

5. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Nguyễn Tùng Linh, Sang Yo Byun. Nghiên cứu quy trình tạo callus Thông đỏ Việt Nam (*Taxus wallichiana*). Tạp chí Dược học. 2008, số 9, tr.24-27.

6. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Tùng Linh. Nghiên cứu duy trì nuôi cấy tế bào Thông đỏ Việt Nam trên môi trường thạch. Tạp chí Y Dược học quân sự. 2010, số 6, tr.26-30.

7. Sonia M, Rosa M, Cusido R. M, et al. Production of the anticancer drug paclitaxel in *taxus baccata* suspension culture. Process Biochemistry. 2011, 46-1, pp.23-34.