

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỘC TỔ TẢ TÁCH CHIẾT TỪ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TRÊN DÒNG TẾ BÀO HEPA-1C1C7 VÀ H4-II-E-C3

Đỗ Minh Trung^{1*}, Nguyễn Minh Phương³, Phạm Thế Tài¹, Lê Văn Đông^{1,2}

TÓM TẮT: Độc tố tả (*Cholera toxin - CT*) là yếu tố độc lực chủ yếu của vi khuẩn tả (*Vibrio cholerae*), đồng thời là tác nhân chính gây bệnh tả. Với mục tiêu tạo nguồn nguyên liệu chế tạo kit phát hiện và antidote chống độc tố tả sau này, cần phải có độc tố tả tinh sạch và còn hoạt tính. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, độc tố tả sau khi được tách tinh sạch từ môi trường nuôi cấy, được đánh giá hoạt tính trên hai dòng tế bào Hepa-1c1c7 (Hepa) và H4-ii-e-c3 (H4). Kết quả đã nuôi cấy tăng sinh ổn định được hai dòng tế bào làm mô hình thử nghiệm. Đã thử được hoạt tính độc tố tả tách tinh chế từ môi trường nuôi cấy trên dòng tế bào Hepa và H4, độc tố tả sau 24 giờ được tiếp xúc với tế bào, độc tố có hoạt tính làm tế bào thay đổi hình dạng, làm tế bào bị vỡ, chết và kiểm tra khả năng tăng sinh của tế bào sau khi tiếp xúc với độc tố tả bằng kỹ thuật MTT.

Từ khóa: Độc tố tả, *Vibrio cholerae*, Hepa, H4, GM₁-ELISA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm đầu thập niên 1950, các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra việc tiêm các độc tố vào đoạn ruột (vòng hồi tràng - ileal loops) của thỏ và các động vật khác như lợn, chó... gây ra hiện tượng có tích tụ chất lỏng trong ruột [5,6,7]. Từ phát hiện này dẫn đến thử nghiệm độc tố tả trên ruột của thỏ trưởng thành và được sử dụng rộng rãi từ trước những năm 1970. Mô hình này cũng đã được sử dụng để nghiên cứu cơ chế hoạt động của độc tố tả, *E. coli* LT, *Salmonella*, một số loại vi sinh vật gây độc và độc tố khác [6,7]. Sau khi ruột thỏ được đưa ra ngoài và thắt lại từng đoạn để thử nghiệm, tiếp đó tế bào vi khuẩn sinh độc tố hay độc tố được tiêm vào mỗi một đoạn của vòng hồi tràng và theo dõi sau 18 giờ [5,7]. Các con thỏ thử nghiệm sẽ bị giết và lấy ruột để đánh giá về khối lượng, chiều dài ruột, thể tích chất lỏng trên 1 đoạn vòng hồi tràng

bị kích thích bởi độc tố CT. Tuy nhiên thử nghiệm này không chỉ làm cho động vật đau đớn dẫn đến chết mà còn tiêu tốn thời gian, rườm rà và khó khăn trong tiêu chuẩn hóa thí nghiệm. Ngoài phương pháp thử nghiệm trên còn có các phương pháp khác như thử nghiệm độc tố trên thỏ bảy ngày tuổi, chuột, ELISA...[3,5] tuy nhiên phương pháp thử trên thỏ bảy ngày tuổi đánh giá cũng giống như phương pháp thử trên thỏ trưởng thành, Phương pháp ELISA kiểm tra được hoạt tính độc tố ở dạng phản ứng kháng nguyên kháng thể nhưng không kiểm tra được cơ chế tác động của độc tố trên tế bào được. Chính vì vậy trong nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu đánh giá hoạt tính của độc tố tả tách chiết từ môi trường nuôi cấy *V.cholerae* trên tế bào Hepa và H4.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Độc tố tả tách chiết từ môi trường nuôi cấy *V.cholerae* được sử dụng trong nghiên cứu [1,2]. Dòng tế bào H4-II-E-C3 (CRL-1600) Hepatoma (*Rattus norvegicus*) và Hepa-1c1c7 (CRL-2026) (ATCC, Mỹ) được sử dụng làm mô hình nghiên cứu.

Các hóa chất, thiết bị nghiên cứu: Các môi trường và thành phần nuôi cấy được sử dụng EMEM, DMEM, FBS, (ATCC,

¹Trung tâm nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

² Bộ môn Độc học – Phóng xạ Quân sự, Học viện Quân y

³ Bộ môn Y học Quân binh chủng, Học viện Quân y

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Đỗ Minh Trung

Email: dominhtrungut@yahoo.com

Ngày nhận bài: 15/5/2015

Ngày nhận bài phản biện: 1/6/2015

Ngày chấp nhận đăng: 8/6/2015

Mỹ), Penicillin-Streptomycin (Sigma, Mỹ). D-PBS, PBS Trypsin/EDTA 0,25, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Glutamine (Sigma, Mỹ). Các dụng cụ nuôi cấy: chai T75, Plate 96 giếng (Corning) và các hóa chất, vật tư tiêu hao khác đều đạt tiêu chuẩn phân tích được cung cấp từ Merck, Sigma và các hãng có uy tín khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

Để sử dụng dòng tế bào Hepa và H4 để làm mô hình để thử nghiệm hoạt tính độc tố tả. Tế bào được lấy ra bình bảo quản -196°C rồi giải đông và tiến hành nuôi cấy tế bào. Tế bào Hepa được nuôi cấy trong môi trường EMEM bổ sung 10% FBS, 1 % kháng sinh, tế bào H4 nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, nuôi cấy hai dòng tế bào này ở 37°C , 5% CO_2 .

Tế bào được nuôi cấy tăng sinh mật độ để bào đạt được khoảng 80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành hút loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, rửa tế bào. Thêm trypsin-EDTA để ở 37°C và quan sát các tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược cho đến khi lớp tế bào được phân tách. Thêm môi trường nuôi cấy và hút tế bào nhẹ nhàng bằng pipet. Ly tâm và rửa 3 lần bằng D-PBS, hoàn nguyên tế bào bằng môi trường nuôi cấy, chia tế bào ra làm nhiều đĩa nuôi cấy mới để nuôi cấy tiếp và thử nghiệm độc tố tả.

2.2.2. Đánh giá hoạt tính độc tố tả bằng kỹ thuật MTT

Kỹ thuật MTT là một kỹ thuật đo màu để khảo sát sự tồn tại và tăng sinh của tế bào động vật. Phương pháp này dựa trên

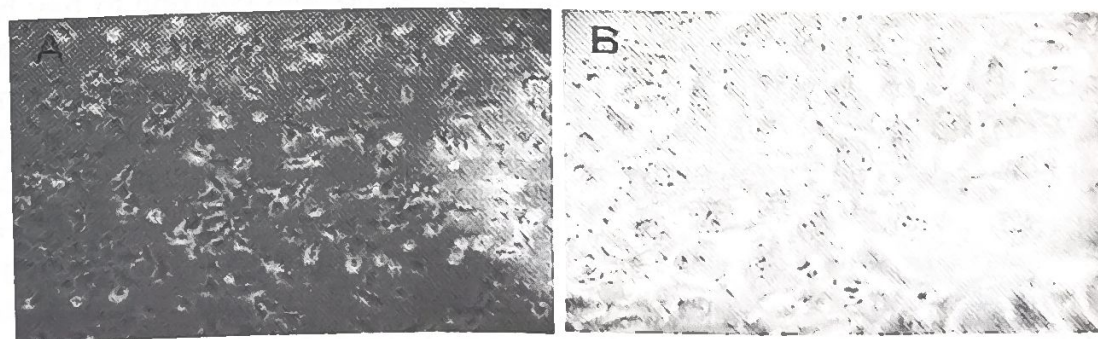
hoạt động của enzyme dehydrogenase của ty thể trong các tế bào sống. Tế bào Hepa và H4 được cấy chuyển và nuôi cấy trong đĩa 96 giếng, sau khi 24 giờ nuôi cấy tế bào được tiếp xúc với độc tố tả ở những nồng độ khác nhau (độc tố tả này đã được kiểm tra độ tinh sạch và đánh giá hoạt tính bằng kỹ thuật GM1-ELISA trước khi tiếp xúc với tế bào), sau 24 giờ tiếp xúc với độc tố tả bổ sung dung dịch MTT 5 mg/ml lần lượt được thêm vào các giếng nuôi cấy tế bào. Số lượng tinh thể formazan tạo thành được đánh giá bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 595 nm. Kết quả sẽ phản ánh hoạt tính độc tố tả ảnh hưởng đến tế bào nuôi cấy bằng sự nguyên vẹn về hình thái tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược và sự tăng sinh của tế bào.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào

Nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào Hepa:

Tế bào Hepa sau khi giải đông, hoàn nguyên tế bào và nuôi cấy trong môi trường EMEM như đã mô tả ở phần phương pháp. Sau 24 giờ kiểm tra, chụp ảnh đánh giá tế bào và cứ 2 ngày thay môi trường một lần kết quả thể hiện ở hình 1.

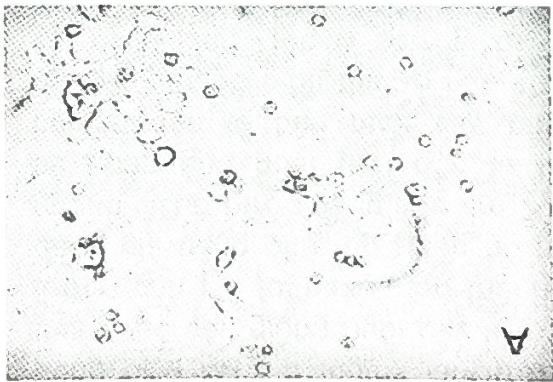
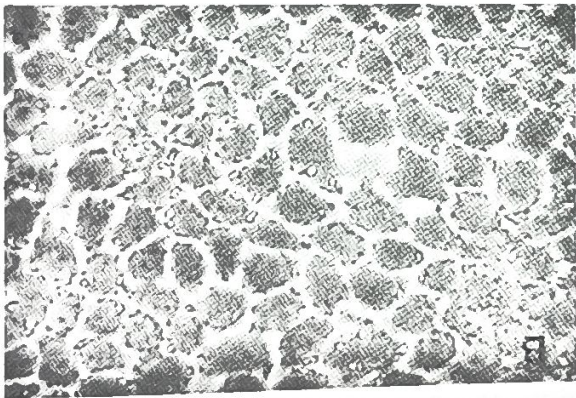


Hình 1. Nuôi cấy tăng sinh tế bào Hepa
(A: tế bào Hepa 24 giờ nuôi cấy, 100X); B: tế bào Hepa sau 8 ngày nuôi cấy, 200X).

chuyển tăng sinh và bảo quản tế bào để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào H4:

Tế bào H4 sau khi giải đông được nuôi cấy trong môi trường DMEM như đã mô tả ở phần phương pháp. Sau 24 giờ kiểm tra, chụp ảnh đánh giá tế bào và cứ 2 ngày thay môi trường một lần kết quả thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Hình ảnh về nuôi cấy tế bào H4

(A: tế bào H4 sau 24 giờ nuôi cấy, 100X; B: tế bào H4 sau 8 ngày nuôi cấy, 200X)

Để đánh giá việc bảo quản tế bào tốt, môi đông một ống tế bào được bảo quản trong nitơ lỏng ra và tiến hành rà đông, nuôi cấy phục hồi. Kết quả là tế bào phát triển trở lại bình thường chỉ sau 3 ngày nuôi phục hồi. Như vậy, việc nuôi cấy ổn định và lưu giữ bảo quản dòng tế bào Hepa và H4 đã được thực hiện thành công. Các tế bào này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo để thử hoạt tính của độc tố tả.

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính độc tố tả

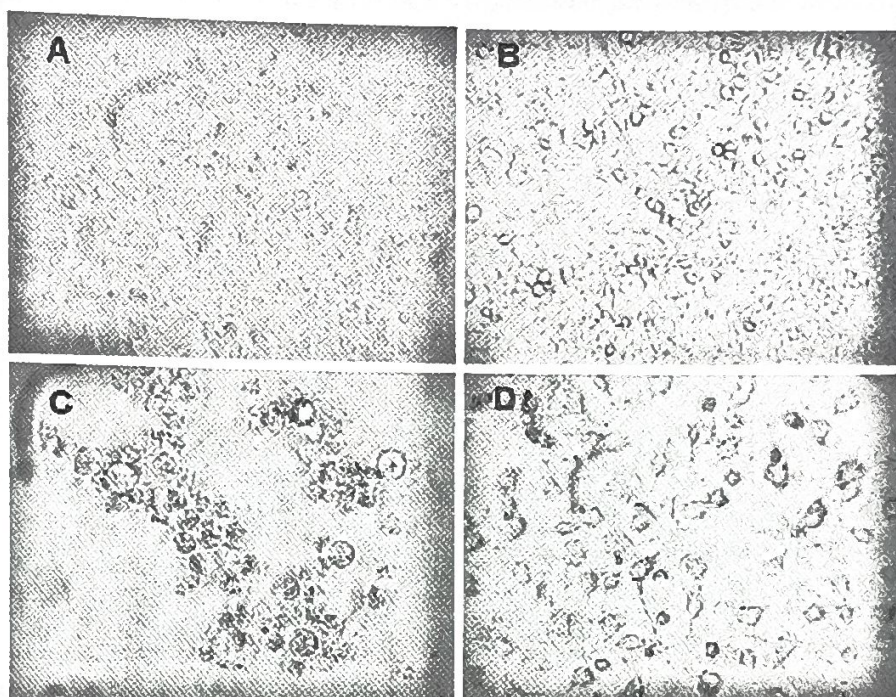
Hầu hết các phương pháp để đánh giá thử nghiệm của độc tố hay hoạt tính của một chất nào đó tác động hay ảnh hưởng đến tế bào đều dựa trên một trong hai thông số đặc tính đó là hoạt động trao đổi chất hoặc tính nguyên vẹn của màng tế bào ở những tế bào nguyên vẹn. Chính vì vậy chúng tôi sử dụng tế bào Hepa và H4 để đánh giá hoạt tính của độc tố tả. Kết quả sau khi tiếp xúc độc tố tả kết quả được thể hiện như sau: với tế

Kết quả sau khi giải đông nuôi cấy tăng sinh hai dòng tế bào Hepa và H4: quan sát dưới kính hiển vi kết quả cho thấy sau 24 giờ cả hai dòng tế bào này bắt đầu bám dính trên bề mặt đĩa nuôi cấy, cho đến ngày thứ 3 trở đi tế bào bắt đầu tăng sinh, kết quả đến ngày thứ 8 tế bào che phủ khoảng 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển và bảo quản tế bào để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Về hình thái, đặc điểm dòng tế bào này khi nuôi cấy có dạng điển hình là hình đa diện và khả năng bám dính tốt trên bề mặt đĩa nuôi cấy.

Sau khi tế bào đạt mật độ khoảng 80%, tế bào bắt đầu được chia ra thành nhiều bình nuôi cấy mới. Tế bào được duy trì ổn định bằng cách thay môi trường mới, trung bình 3 ngày một lần. Sau khi cấy chuyển 2 – 4 thế hệ một nửa số tế bào đã được giữ đông, bảo quản trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% DMSO, giữ ở -196°C bảo quản trong nitơ lỏng.

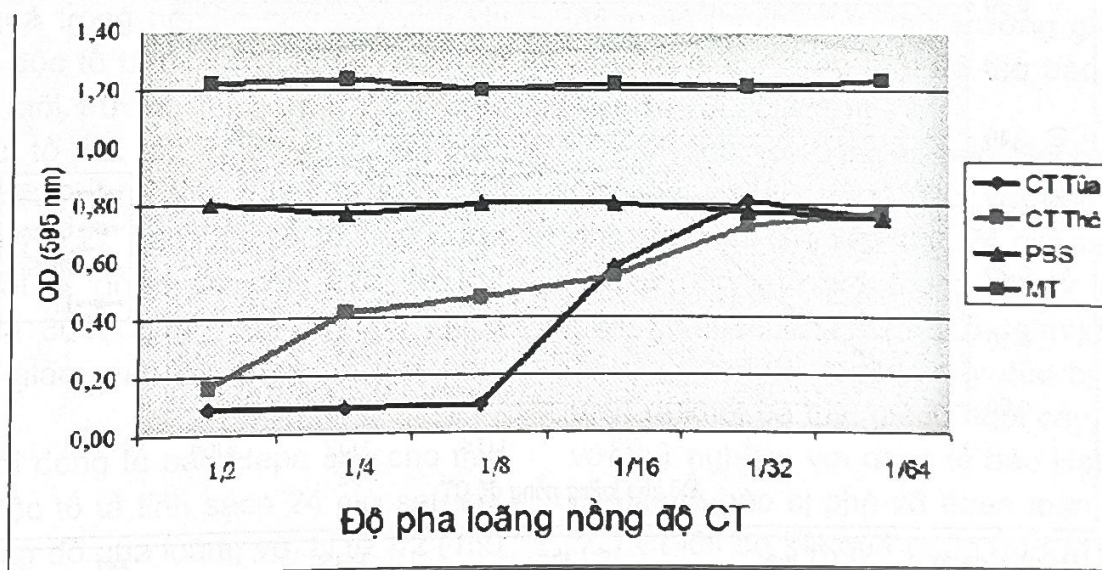
bào Hepa kết quả được thể hiện ở hình 3,4, với tế bào H4 được thể hiện ở hình 5,6.

Kết quả thử hoạt tính độc tố trên dòng tế bào Hepa:



Hình 3. Thử hoạt tính độc tố tả trên dòng tế bào Hepa

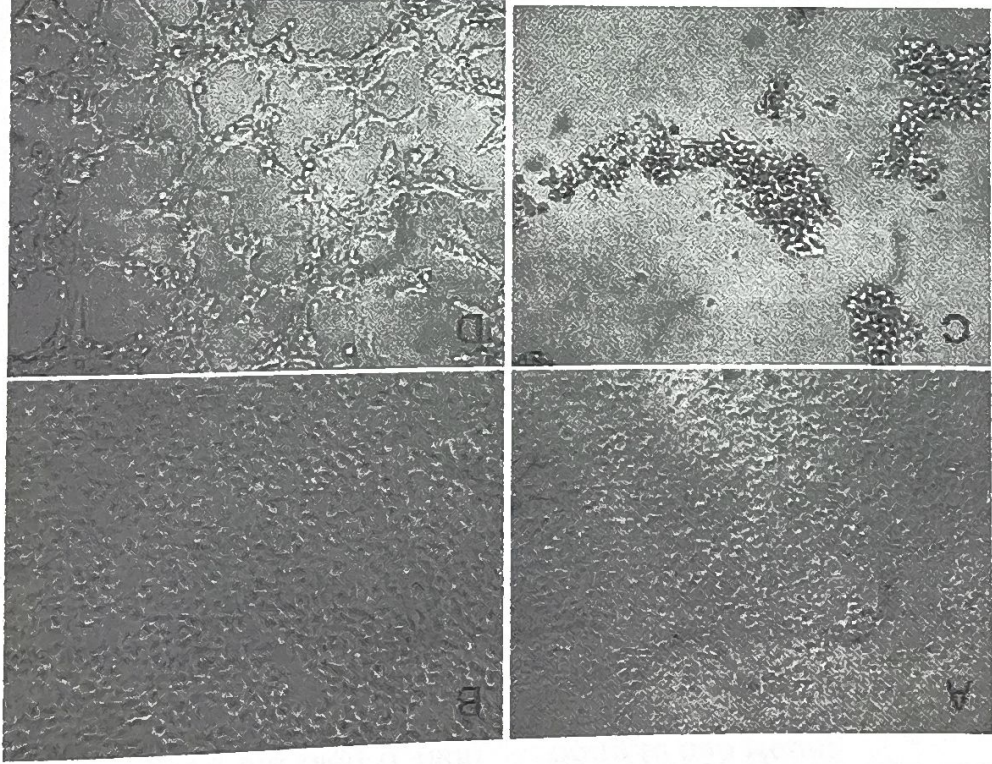
(A: Tế bào Hepa - Đối chứng không bổ sung độc tố tả; B: tế bào Hepa – nuôi cấy bổ sung PBS; C, D: Nuôi cấy Hepa bổ sung độc tố, 200X).



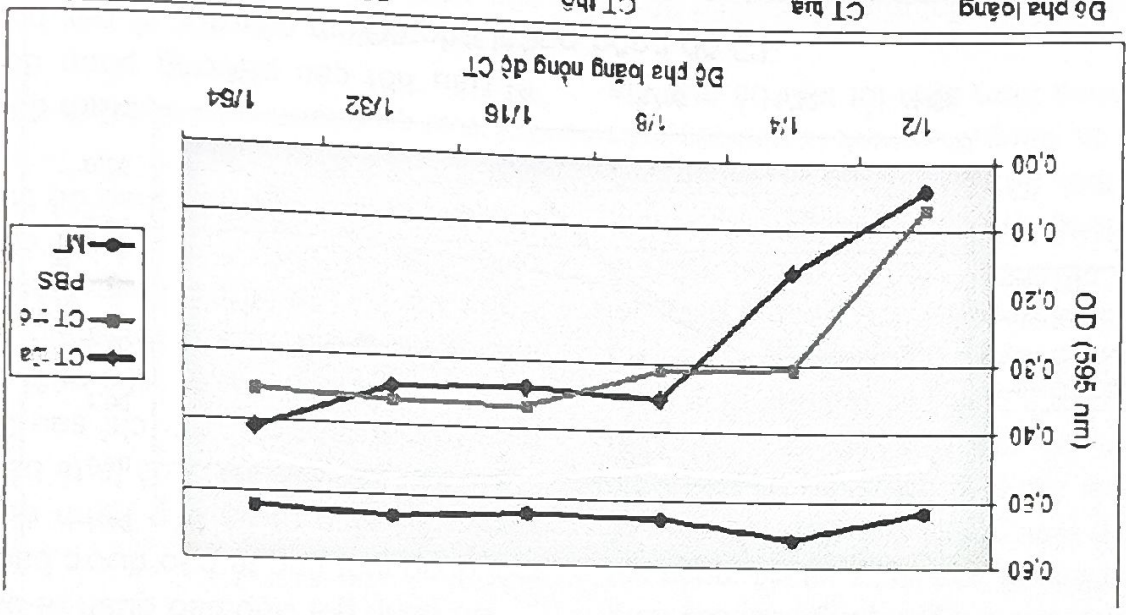
Độ pha loãng nồng độ CT	CT hòa (Mean + SD)	CT thể (Mean + SD)	PBS (Mean + SD)	MT (Mean + SD)
1/2	0,0871 – 0,0008	0,1669 – 0,0317	0,7974 ± 0,0474	1,2196 ± 0,0011
1/4	0,0873 – 0,0029	0,4144 – 0,0520	0,7694 ± 0,1622	1,2361 ± 0,0008
1/8	0,0956 – 0,0873	0,4669 – 0,0330	0,7974 ± 0,0992	1,1891 ± 0,0007
1/16	0,5739 – 0,0574	0,5446 – 0,0157	0,7957 ± 0,1386	1,2243 ± 0,0056
1/32	0,8091 – 0,0054	0,7212 – 0,0141	0,7727 ± 0,0409	1,2090 ± 0,0032
1/64	0,7444 ± 0,0060	0,7650 ± 0,0888	0,7462 ± 0,1283	1,2292 ± 0,0099

Hình 4. Kết quả đo phản ứng MTT đánh giá hoạt tính độc tố tả trên dòng tế bào Hepa (n=3)

Kết quả thử hoạt tính độc tố tả trên dòng tế bào H4:



Hình 5. Thử hoạt tính độc tố tả trên dòng tế bào H4
(A: Tế bào H4 - Đối chứng không bổ sung độc tố tả; B: tế bào H4 - nuôi cấy bổ sung PBS; C, D: Nuôi cấy H4 bổ sung độc tố tả, 200X)



Hình 6. Kết quả đo phản ứng MTT đánh giá hoạt tính độc tố tả trên dòng tế bào H4 (n=3)

Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn phương pháp thử nghiệm MTT dựa theo nghiên cứu của Mosmann T., 1983 [4] để đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào để đánh giá hoạt tính của độc tố tả tinh sạch được. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên các tế bào sống và chuyển hóa có ti thể hoạt động sinh ra các enzyme enzyme dehydrogenase gây ra phản ứng khử MTT tạo ra các tinh thể formazan có màu tím. Tinh thể formazan tạo thành là sản phẩm của hoạt động trao đổi chất của tế bào. Lượng MTT được chuyển hóa hay lượng tinh thể formazan được tạo ra trong trong thử nghiệm ít, cường độ màu khi đo sẽ thấp đồng nghĩa với tế bào tăng sinh ít hoặc không tăng sinh như vậy hoạt tính của độc tố tả mạnh làm phá vỡ và ức chế tế bào. Lượng MTT được chuyển hóa hay lượng tinh thể formazan được tạo ra trong trong thử nghiệm nhiều, có nghĩa tế bào vẫn có thể tăng sinh như vậy hoạt tính của độc tố thấp hoặc không có độc tính hay bị mất hoạt tính.

Kết quả trong nghiên cứu này sau khi sử dụng độc tố tả thô, độc tố tả Tách tinh sạch từ môi trường cảm ứng *V.cholerae* sinh độc tố là sản phẩm của kết quả nghiên cứu của công trình đã công bố trước đó [1,2], các độc tố tả này được đồng nhất ở nồng độ ban đầu để thử nghiệm là 300 µg/ml, sau đó pha loãng nồng độ giảm dần rồi dùng để thử hoạt tính.

Đối với dòng tế bào Hepa sau cho tiếp xúc với độc tố tả tinh sạch 24 giờ sau kết quả ở nồng độ pha loãng với tỷ lệ 1/2 (150 µg/ml) cho đến 1/8 (37,5 µg/ml) tất cả tế bào trong giếng nuôi cấy đều bị chết và tách ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, hầu hết các tế bào bị phá vỡ (hình 3C) và khi đo kết quả phản ứng MTT hệ số đo OD thấp (hình 4). Đối với độc tố tả thô là sản phẩm thu được từ dịch nuôi cấy và loại bỏ sinh khối tế bào *V.cholerae* kết quả tương tự như ở nồng độ pha loãng 1/2 của độc tố tả

tinh sạch tất cả các tế bào đều bị chết, ở nồng độ pha loãng 1/4 đến 1/16 khi thử cả hai loại độc tố tả, mật độ tế bào còn khoảng 50% diện tích bề mặt giếng nuôi cấy. Ở nồng độ pha loãng 1/64 cả hai thí nghiệm sử dụng độc tố tinh sạch và thô kết quả thấy số lượng tế bào chết ít hơn nhưng tất cả tế bào có hiện tượng bị co lại (hình 4D). Với mẫu đối chứng tế bào Hepa không cho tiếp xúc với độc tố tả, tế bào Hepa phát triển bình thường không thấy tế bào chết, khi đo phản ứng MTT hệ số OD cao hơn so với mẫu có tiếp xúc độc tố tả (hình 4 – MT). Để đánh giá dung dịch đệm PBS là dung dịch đệm pha loãng mẫu độc tố tả có ảnh hưởng đến tế bào hay không. Kết quả thí nghiệm không ảnh hưởng đến bào, không thấy tế bào chết và tế bào vẫn phát triển nhưng mật độ thưa hơn so với mẫu đối chứng không bổ sung độc tố. Từ kết quả này cho thấy có thể khi bổ sung PBS vào môi trường nuôi cấy làm pha loãng nồng độ môi trường, chính vì vậy nồng độ thành phần môi trường giảm đi nên có hiện tượng mật độ tế bào thưa hơn so với đối chứng.

Kết quả với dòng tế bào H4 sau khi tiếp xúc với độc tố tả: Đối với độc tố tả tinh sạch khi cho tiếp xúc, 24 giờ sau kết quả ở nồng độ pha loãng với tỷ lệ 1/2 (150 µg/ml) cho đến 1/4 (75 µg/ml) tất cả tế bào trong giếng nuôi cấy đều bị chết, tách ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, khác với thử nghiệm với dòng tế bào Hepa tất cả các tế bào bị phá vỡ hoàn toàn (hình 5C) và khi đo kết quả phản ứng MTT hệ số đo OD thấp (hình 6). Đối với độc tố tả thô ở nồng độ pha loãng 1/2 tất cả các tế bào cũng đều bị chết, ở nồng độ pha loãng 1/4, 1/8 tế bào chết ít hơn và khi đo OD phản ứng MTT hệ số tăng dần đều. Ở độ pha loãng 1/16 khi thử cả hai loại độc tố tả, mật độ tế bào còn khoảng 50% diện tích bề mặt giếng nuôi cấy. Ở nồng độ pha loãng 1/64 cả hai thí nghiệm sử

Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn phương pháp thử nghiệm MTT dựa theo nghiên cứu của Mosmann T., 1983 [4] để đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào để đánh giá hoạt tính của độc tố tinh sạch được. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên các tế bào sống và chuyển hóa có ti thể hoạt động sinh ra các enzym enzyme dehydrogenase gây ra phản ứng khử MTT tạo ra các tinh thể formazan có màu tím. Tinh thể formazan tạo thành là sản phẩm của hoạt động trao đổi chất của tế bào. Lượng MTT được chuyển hóa hay lượng tinh thể formazan được tạo ra trong trong thử nghiệm ít, cường độ màu khi đo sẽ thấp đồng nghĩa với tế bào tăng sinh ít hoặc không tăng sinh như vậy hoạt tính của độc tố mạnh làm phá vỡ và ức chế tế bào. Lượng MTT được chuyển hóa hay lượng tinh thể formazan được tạo ra trong trong thử nghiệm nhiều, có nghĩa tế bào vẫn có thể tăng sinh như vậy hoạt tính của độc tố thấp hoặc không có độc tính hay bị mất hoạt tính.

Kết quả trong nghiên cứu này sau khi sử dụng độc tố tả thô, độc tố tả Tách tinh sạch từ môi trường cảm ứng *V.cholerae* sinh độc tố là sản phẩm của kết quả nghiên cứu của công trình đã công bố trước đó [1,2], các độc tố tả này được đồng nhất ở nồng độ ban đầu để thử nghiệm là 300 µg/ml, sau đó pha loãng nồng độ giảm dần rồi dùng để thử hoạt tính.

Đối với dòng tế bào Hepa sau cho tiếp xúc với độc tố tả tinh sạch 24 giờ sau kết quả ở nồng độ pha loãng với tỷ lệ 1/2 (150 µg/ml) cho đến 1/8 (37,5 µg/ml) tất cả tế bào trong giếng nuôi cấy đều bị chết và tách ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, hầu hết các tế bào bị phá vỡ (hình 3C) và khi đo kết quả phản ứng MTT hệ số đo OD thấp (hình 4). Đối với độc tố tả thô là sản phẩm thu được từ dịch nuôi cấy và loại bỏ sinh khối tế bào *V.cholerae* kết quả tương tự như ở nồng độ pha loãng 1/2 của độc tố tả

tinh sạch tất cả các tế bào đều bị chết, ở nồng độ pha loãng 1/4 đến 1/16 khi thử cả hai loại độc tố tả, mật độ tế bào còn khoảng 50% diện tích bề mặt giếng nuôi cấy. Ở nồng độ pha loãng 1/64 cả hai thí nghiệm sử dụng độc tố tinh sạch và thô kết quả thấy số lượng tế bào chết ít hơn nhưng tất cả tế bào có hiện tượng bị co lại (hình 4D). Với mẫu đối chứng tế bào Hepa không cho tiếp xúc với độc tố tả, tế bào Hepa phát triển bình thường không thấy tế bào chết, khi đo phản ứng MTT hệ số OD cao hơn so với mẫu có tiếp xúc độc tố tả (hình 4 – MT). Để đánh giá dung dịch đệm PBS là dung dịch đệm pha loãng mẫu độc tố tả có ảnh hưởng đến tế bào hay không. Kết quả thí nghiệm không ảnh hưởng đến bào, không thấy tế bào chết và tế bào vẫn phát triển nhưng mật độ thưa hơn so với mẫu đối chứng không bổ sung độc tố. Từ kết quả này cho thấy có thể khi bổ sung PBS vào môi trường nuôi cấy làm pha loãng nồng độ môi trường, chính vì vậy nồng độ thành phần môi trường giảm đi nên có hiện tượng mật độ tế bào thưa hơn so với đối chứng.

Kết quả với dòng tế bào H4 sau khi tiếp xúc với độc tố tả: Đối với độc tố tả tinh sạch khi cho tiếp xúc, 24 giờ sau kết quả ở nồng độ pha loãng với tỷ lệ 1/2 (150 µg/ml) cho đến 1/4 (75 µg/ml) tất cả tế bào trong giếng nuôi cấy đều bị chết, tách ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, khác với thử nghiệm với dòng tế bào Hepa tất cả các tế bào bị phá vỡ hoàn toàn (hình 5C) và khi đo kết quả phản ứng MTT hệ số đo OD thấp (hình 6). Đối với độc tố tả thô ở nồng độ pha loãng 1/2 tất cả các tế bào cũng đều bị chết, ở nồng độ pha loãng 1/4, 1/8 tế bào chết ít hơn và khi đo OD phản ứng MTT hệ số tăng dần đều. Ở độ pha loãng 1/16 khi thử cả hai loại độc tố tả, mật độ tế bào còn khoảng 50% diện tích bề mặt giếng nuôi cấy. Ở nồng độ pha loãng 1/64 cả hai thí nghiệm sử

dung độc tố tinh sạch và thô kết quả thấy số lượng tế bào chết ít hơn nhưng tất cả tế bào có hiện tượng bị co lại và khác với thử nghiệm với dòng Hepa các tế bào H4 co lại và tạo thành như những mạng lưới (hình 5D). Kết quả đối với mẫu đối chứng (hình 5A, hình 6-MT) mẫu PBS (hình 5B, hình 6-PBS) kết quả cũng cho tương tự như đối với dòng Hepa. Kết quả sau khi thử nghiệm kéo dài thời gian nuôi cấy sau 48 và 72 giờ sau khi tiếp xúc với độc tố tả, tất cả tế bào được tiếp xúc với độc tố tả từ nồng độ cao cho đến nồng độ pha loãng 1/64 đều bị chết.

Để thử nghiệm độc tố tả có nhiều phương pháp, ngoài phương pháp ELISA, thử trên Thỏ và một số động vật khác, một số công trình nghiên cứu đã công bố có sử dụng các dòng tế bào để thử hoạt tính của độc tố như dòng tế bào thượng thận Y-1 (Y-1 adrenal cells), tế bào CHO (Chinese hamster ovary) ..[5]. Các nghiên cứu này không chỉ đánh giá hoạt tính của độc tố tả mà còn thử một số yếu tố ức chế độc tố tả trên tế bào. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với những nghiên cứu về thử hoạt tính của độc tố là trên tế bào là làm thay đổi hình dạng tế bào, tế bào bị vỡ và chết. Tuy nhiên dòng tế bào chúng tôi sử dụng là dòng tế bào Hepa và H4 có sẵn, khác với các dòng tế bào trên nhưng cũng đã thử được hoạt tính độc tố tả tách chiết, tinh sạch được từ môi trường nuôi cấy.

4. KẾT LUẬN

Đã nuôi cấy tăng sinh được dòng tế bào Hepa-1c1c7 trong môi trường DMEM, tế bào H4lie trong môi trường EMEM, có bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh, nuôi cấy ở 37 °C, 5% CO₂, sau 8 ngày tế bào đạt mật độ 80% diện tích bề mặt dụng cụ nuôi cấy, mật độ cần thiết cho nuôi cấy tăng sinh và thử nghiệm độc tố tả.

Đã thử được hoạt tính độc tố tả tách tinh chế từ môi trường nuôi cấy trên dòng tế bào Hepa-1c1c7 và H4lie, độc tố tả sau

24 giờ được tiếp xúc với tế bào, độc tố có hoạt tính mạnh làm tế bào thay đổi hình dạng tế bào, làm tế bào bị vỡ và chết. Đã kiểm tra khả năng tăng sinh của tế bào sau khi tiếp xúc với độc tố tả bằng kỹ thuật MTT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đỗ Minh Trung, Hoàng Đắc Thăng, Lê Văn Đông và CS (2013).** Nghiên cứu tuyển chọn và nuôi cấy VKT sinh ĐTT in vitro. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*. 38(9), tr: 84-90.
2. **Hoàng Đắc Thăng, Đỗ Minh Trung, Phạm Thế Tài, Lê Văn Đông (2015).** Cảm ứng vi khuẩn tả sinh độc tố in vitro và tách chiết độc tố từ môi trường nuôi cấy. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*. Số 40(2), tr: 32-37.
3. **Phùng Đắc Cam (2003).** *Vibrio cholerae* và bệnh dịch tả. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
4. **Mosmann T (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1-2): 55-63.
5. **Hiroshi Oi, Daisuke Matsuura, Masami Miyake and et al (2002).** Identification in traditional herbal medications and confirmation by synthesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation. *PNAS*. 99(5): 3042-3046.
6. **Shaghayegh Anvari, Shahin Najar Peerayeh, Mehrdad Behmanesh and et al (2012).** Biological Activity of Recombinant Accessory Cholerae Enterotoxin (Ace) on Rabbit Ileal Loops and Antibacterial Assay. *Cell Journal*. 14(3): 209-214.
7. **Kokosharov T (2002).** Enterotoxigenicity of *Salmonella Gallinarum* strains isolated from poultry. *Revue Méd. Vét.* 153(1): 35-39.

SUMMARY**ACTIVITY DESCRIPTION CHOLELA TOXIN EXTRACTION FROM CULTURE MEDIUM OF VIBRIO CHOLERAЕ ON THE CELL LINES HEPА-1C1C7 AND H4-II-E-C3**

Do Minh Trung^{1,*}, Nguyen Minh Phuong³, Pham The Tai¹, Le Van Dong^{1,2}

¹Biomedical & Pharmaceutical Applied Research Centre

²Department of Military Toxicology and Radiation

³Department of Medicine of Arms

Cholera toxin (CT) secreted by *V. cholerae* is the causative agent of cholera and is a major agent involved in severe diarrhoeal diseases. With the aim to create materials and production test kits for detection CT and producing antidote anti CT. Therefore, in this study, after cholera toxin was separated and purified from culture medium of *V. cholerae*, CT was assessed biological activity on two cells line Hepa-1c1c7 (Hepa) and H4-II-e-c3 (H4). Culture and proliferation two cell lines has been successfully gained. The test for active purify CT separated from the culture medium of *V. cholerae* on cell lines Hepa and H4 was performed. 24 hours after the cells was exposed with the CT, the cells change shape, was destroyed and die. The results reflected biological activity of CT and test for the possibility of cell proliferation after exposure with cholera toxin by MTT technique was also performed.

Key words: Cholera toxin, *Vibrio cholerae*, Hepa, H4, GM₁-ELISA.