ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH CỦA CHỦNG VIRUS VACCINE SỞI TRÊN TẾ BÀO UNG THƯ BUỒNG TRỨNG

Ngô Thu Hằng[1], Hoàng Văn Tổng[1,2], Đặng Thành Chung[1], Hồ Anh Sơn[1,2]
Từ Quang[4], Bùi Khắc Cường[1,3], Nguyễn Lĩnh Toàn[1*]

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá khả năng gây chết tế bào theo chương trình của chủng virus vaccine sởi (Measles vaccine - MeV) trên dòng tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR3). ***Đối tượng và phương pháp:*** Tế bào OVCAR3 được lây nhiễm chủng MeV ở thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ, sau đó được phân tích dòng chảy tế bào (flow cytometry) trên hệ thống FACS Lyric để xác định tỷ lệ tế bào chết theo chương trình. ***Kết quả:*** Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình ở các nhóm nhiễm MeV ở tất cả các nồng độ pha loãng (MOI từ 1 - 1/4) đều cao hơn có nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,001$). ***Kết luận:*** Chủng MeV gây chết tế bào OVCAR3 theo chương trình *in vitro.*

* Từ khóa: Ung thư buồng trứng; Virus vaccine sởi, Sự chết tế bào; FACS Lyric.

Evaluating the Apoptosis of Ovarian Cancer Cells Induced by Vaccine Strain of Measles Virus

Summary

Objectives: *To evaluate the capability of apoptotic induction of measles virus vaccine (MeV) strain on ovarian cancer cells (OVCAR3).* ***Materials and methods:*** *OVCAR3 cells were infected with the vaccine strain of MeV virus at 24, 48, and 96 hours and were analyzed by flow cytometry on the FACS Lyric system to evaluate the apoptosis.* ***Results:*** *The proportion of apoptotic cell death in the groups treated with MeV virus at all diluted concentrations (MOI from 1 to 1/4) was significantly higher compared to the control group ($p < 0.001$).* ***Conclusion:*** *Vaccine strain of Measles virus induces apoptosis of ovarian cancer cell line OVCAR3.*

** Keywords: Ovarian cancer squamous-cell carcinoma; Measles virus; Apoptosis; FACS Lyric.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của chương trình GLOBOCAN 2018, mỗi năm trên toàn thế giới có khoảng > 18 triệu trường hợp mắc mới và 9,6 triệu người chết vì ung thư. Trong số các ca ung thư mắc mới,

[1]*Bộ môn Sinh lý bệnh,* ***Học viện Quân y***
[2]*Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự,* ***Học viện Quân y***
[3]*Trung tâm Nghiên cứu Động vật thực nghiệm,* ***Học viện Quân y***
[4]*Bộ môn - Khoa Tai Mũi Họng, Bệnh viện Quân y 103,* ***Học viện Quân y***
Tác giả phản hồi: Nguyễn Lĩnh Toàn (toannl@vmmu.edu.vn)
Ngày nhận bài: 20/4/2021
Ngày bài báo được đăng: 02/6/2021

ung thư buồng trứng chiếm 1,6% (295.414 ca) và tỷ lệ tử vong chiếm 1,9% (184.799 ca) tổng số các ca tử vong do ung thư [1]. Mặc dù đã có các biện pháp điều trị tích cực như phẫu thuật, sau đó là kết hợp hóa chất, nhưng phần lớn bệnh nhân đều tái phát bệnh. Ung thư buồng trứng đáp ứng khá tốt với hóa chất, song tỷ lệ kháng lại các hóa chất này khá cao khi bệnh tái phát. Các loại hóa chất khác được điều trị thay thế, kể cả sử dụng thuốc điều trị đích (bevacizumab), nhưng thời gian sống trung bình của nhóm bệnh nhân này thường không quá 12 tháng. Các hướng điều trị mới hiệu quả hơn cần được áp dụng để nâng cao hiệu quả điều trị ung thư buồng trứng.

Trị liệu bằng virus ly giải tế bào ung thư (Oncolytic virus - OLV) dựa trên cơ chế các OLV có khả năng xâm nhập đặc hiệu vào tế bào ung thư của khối u, nhân lên, giải phóng và gây ly giải tế bào ung thư; kích thích tế bào ung thư chết theo chương trình; kích thích đáp ứng miễn dịch chống ung thư [2]. Nhiều nghiên cứu cho thấy MeV là một OLV an toàn, có khả năng phân giải tế bào ung thư *in vitro*, *in vivo* và đang tiến hành các thử nghiệm lâm sàng trên người [3].

Trên thế giới đã có một số thử nghiệm đánh giá tác dụng kháng ung thư buồng trứng của MeV cho kết quả khả quan [3, 4, 5, 6]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng gây chết tế bào ung thư buồng trứng theo chương trình của MeV. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm: *Đánh giá khả năng gây chết tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR3) theo chương trình của MeV bằng phương pháp Flow cytometry trên hệ thống Facs Lyric.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

- Tế bào ung thư biểu mô buồng trứng người OVCAR3 (ATCC® HTB-161™) (công ty ATCC, Mỹ) được bảo quản tại Labo Nghiên cứu ung thư, Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

- Chủng MeV: Là sản phẩm của Đề tài KC.10.27/16-20, được bảo quản và duy trì tại Phòng thí nghiệm Nghiên cứu ung thư, Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

2. Phương pháp nghiên cứu

** Thiết kế nghiên cứu:* Mô tả cắt ngang và nghiên cứu thực nghiệm.

** Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:*

- Kỹ thuật nuôi cấy các dòng tế bào ung thư: Tế bào OVCAR3 được nuôi cấy trên chai nuôi cấy tế bào có bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin, nhiệt độ 37^{o}C, CO_2 5%. Thu tế bào OVCAR3 bằng trypsin EDTA, sau đó ly tâm để loại bỏ môi trường thu tế bào.

- Phương pháp Flow cytometry đánh giá tỷ lệ tế bào chết theo chương trình: Để kiểm tra tỷ lệ tế bào chết theo chương trình, chúng tôi sử dụng kháng thể anti-annexin V gắn chất phát huỳnh quang là fluorescein isothiocyanate (FITC) và chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là 7-Amino Actinomycin D (7-AAD).

** Quy trình chuẩn bị mẫu tế bào OVCAR3 nhiễm MeV và chạy flow cytometry:*

- Tế bào OVCAR3 được nuôi cấy, tăng sinh, thu hoạch theo quy trình.

- Chuẩn độ để được dung dịch tế bào có nồng độ 10^5 tế bào/ml. Cho các phiến 6 giếng đã gieo tế bào OVCAR3 vào tủ ấm 37^{0}C, 5% CO_2.

- Sau 24 giờ, kiểm tra phiến 6 giếng nuôi cấy tế bào OVCAR3 dưới kính hiển vi, kết quả tế bào bám đáy tốt. Thay môi trường nuôi cấy với từng nhóm như sau:

+ Nhóm chứng: 3 ml môi trường nuôi cấy mới.

+ Nhóm nhiễm MeV: Môi trường nuôi cấy có bổ sung MeV liều MOI = 1, 1/2, 1/4.

Cho các phiến 6 giếng đã nhiễm virus vào tủ ấm 37^0C, 5% CO_2, kiểm tra tế bào hằng ngày. Mỗi nhóm được lặp lại 3 giếng.

- Tại thời điểm sau nhiễm MeV 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ, tiến hành các bước thu tế bào OVCAR3 ở các nhóm. Tế bào được xử lý và nhuộm theo quy trình của bộ kít Fluorescein isothiocyanate, Annexin V Apoptosis Detection kit (BD).

- Đánh giá tỷ lệ tế bào chết theo chương trình trên hệ thống FACS Lyric (BD).

** Chỉ tiêu đánh giá:*

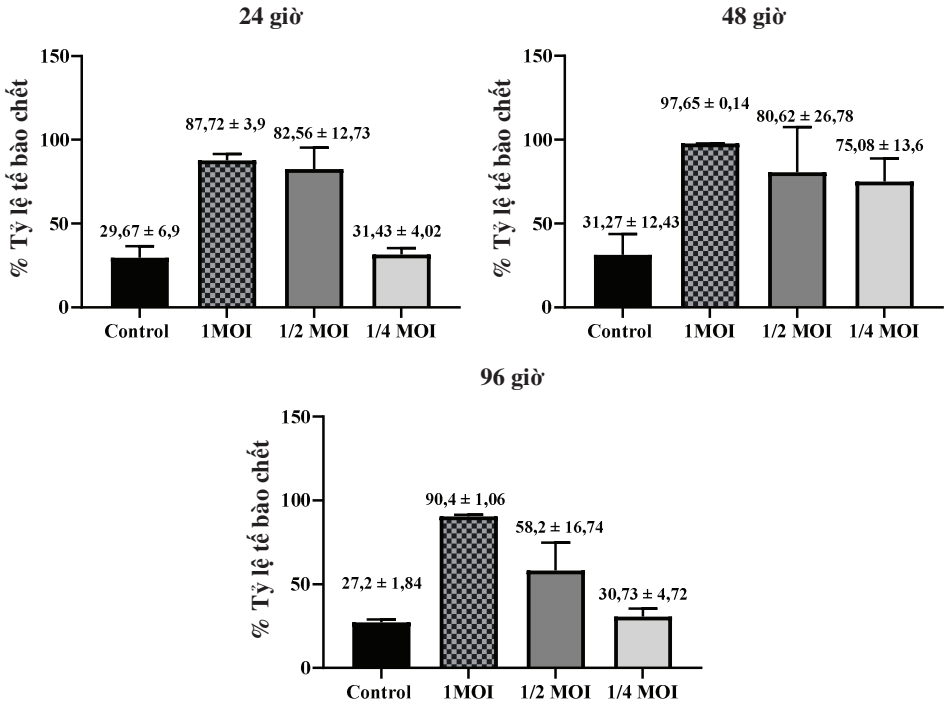
- Tỷ lệ tế bào chết, chết theo chương trình, chết theo chương trình giai đoạn sớm ở các nhóm được nhiễm virus MeV so với nhóm chứng không điều trị, các nhóm nhiễm MeV ở các nồng độ khác nhau.

- Tiến hành thí nghiệm tại Labo Sinh học phân tử, Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

** Xử lý thống kê:* Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0 và GraphPad Prism 6. So sánh trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test, so sánh trung bình của 3 nhóm bằng phân tích phương sai ANOVA. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tỷ lệ tế bào chết ở các nhóm nghiên cứu

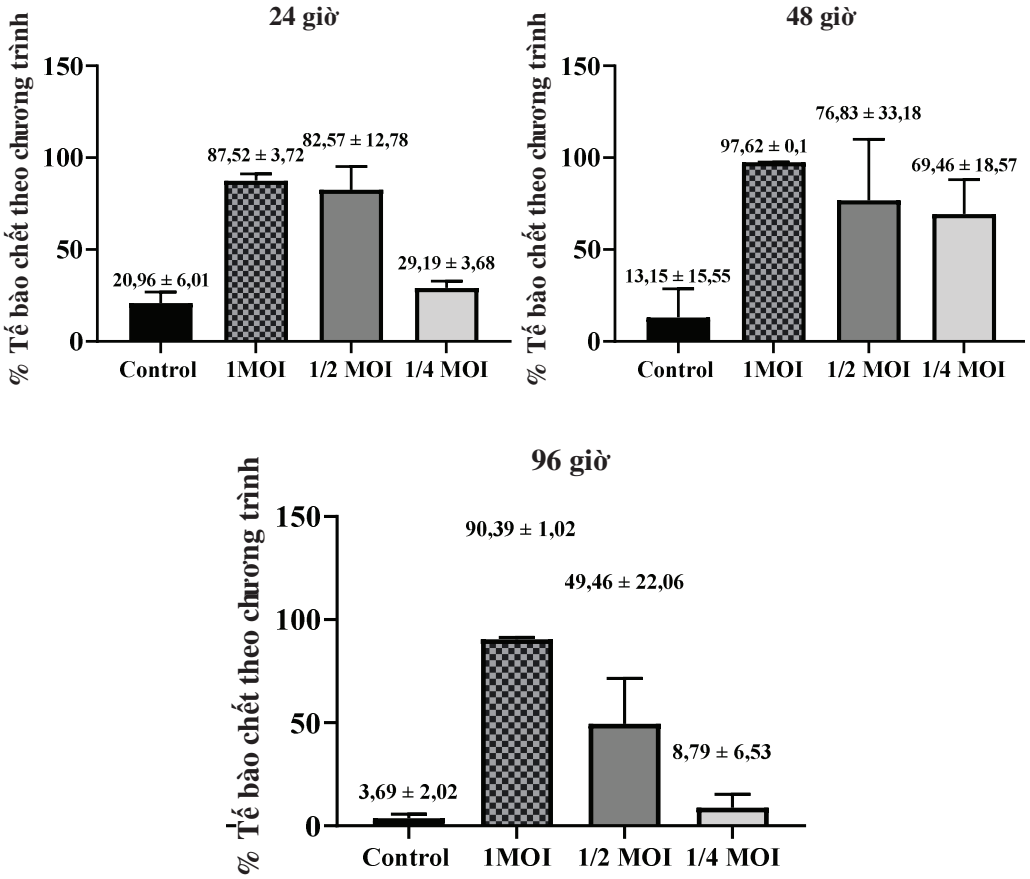


Biểu đồ 1: Tỷ lệ tế bào chết ở các nhóm nghiên cứu.

Tỷ lệ tế bào chết ở nhóm chứng thấp hơn ở 3 nhóm nhiễm MeV ở cả 3 thời điểm. Tỷ lệ tế bào chết ở nhóm nhiễm MeV nồng độ MOI = 1 và 1/2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,001$) ở thời điểm 24 giờ và 96 giờ. Tại thời điểm 48 giờ, tỷ lệ tế bào chết ở nhóm nhiễm MeV ở cả 3 nồng độ MOI = 1, 1/2 và 1/4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,01$).

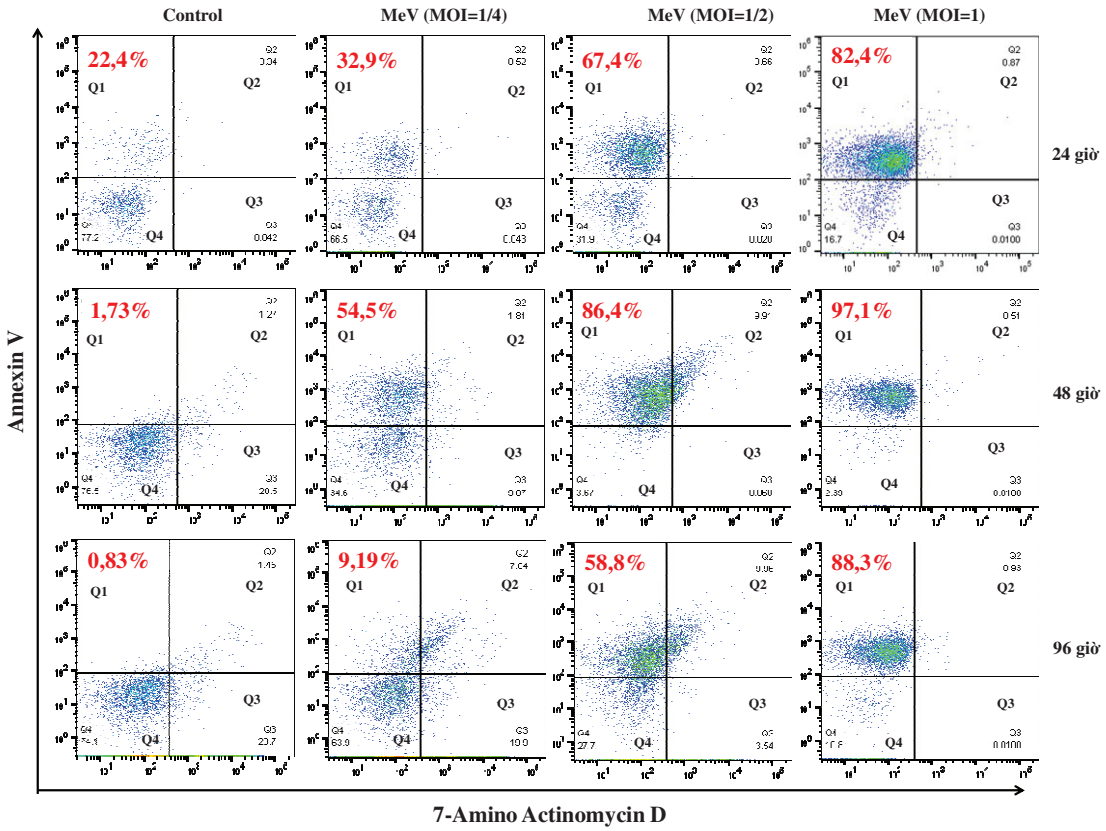
Nồng độ MeV càng cao, tỷ lệ tế bào chết càng cao, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ ở thời điểm 24 giờ và $p < 0,01$ ở thời điểm 96 giờ.

2. Tỷ lệ tế bào OVCAR3 chết theo chương trình sau nhiễm MeV



Biểu đồ 2: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình ở các nhóm nghiên cứu.

Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình ở tất cả các nhóm nhiễm MeV đều cao hơn nhóm chứng. Ở thời điểm 24 giờ và 96 giờ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm nhiễm MeV nồng độ 1 MOI và 1/2 MOI so với nhóm chứng ($p < 0,001$). Tại thời điểm 48 giờ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa cả 3 nhóm nồng độ MeV với nhóm chứng ($p < 0,01$).



Biểu đồ 3: Kết quả chạy flow cytometry tế bào OVCAR3 ở thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ sau nhiễm MeV.

Q1: Vùng tế bào chết theo chương trình giai đoạn sớm

Q2: Vùng tế bào chết theo chương trình giai đoạn muộn

Q3: Vùng tế bào hoại tử

Q4: Vùng tế bào sống

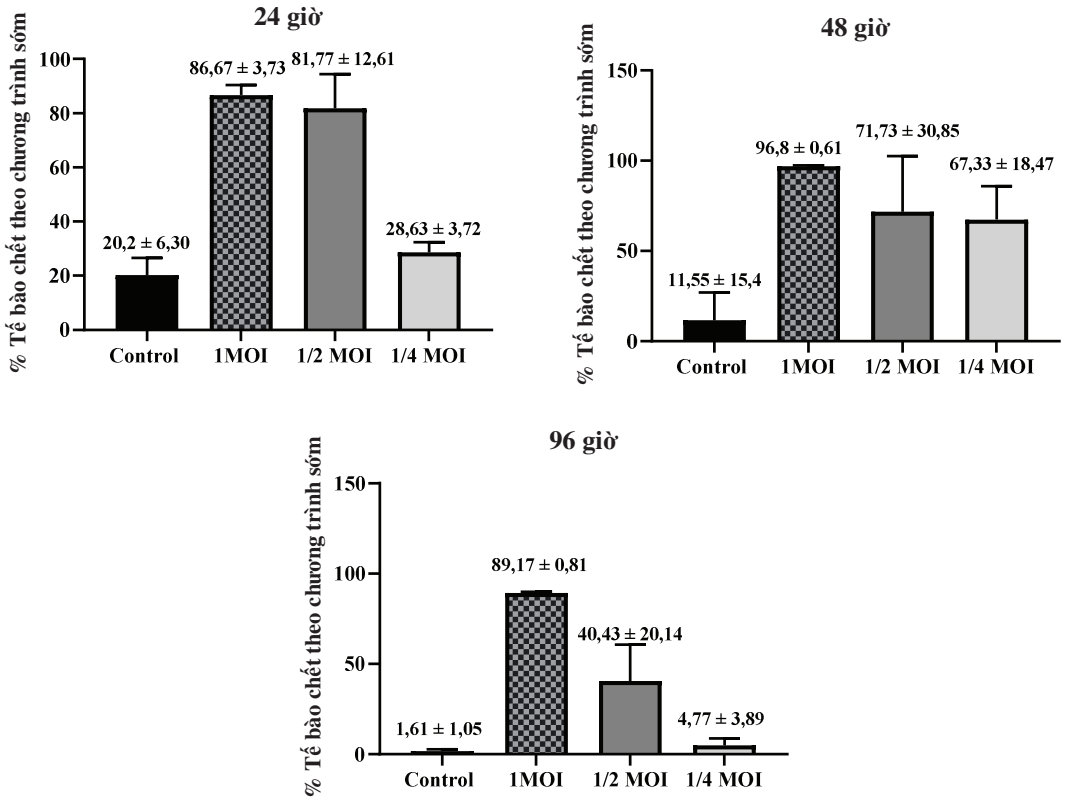
Tại 3 thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ đều cho kết quả: Nồng độ MeV càng cao, tỷ lệ tế bào chết theo chương trình càng cao, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ ở thời điểm 24 giờ giữa nhóm 1 MOI và 1/4 MOI và $p = 0,003$ ở thời điểm 48 giờ giữa cả 3 nhóm nồng độ. Sự khác biệt tại thời điểm 96 giờ không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3. Tỷ lệ tế bào OVCAR3 chết theo chương trình sớm ở các thời điểm sau nhiễm MeV

Kết quả chạy Flow cytometry ở 3 thời điểm ở cho thấy: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình sớm ở tất cả các nhóm nhiễm MeV đều cao hơn nhóm chứng *(biểu đồ 3, biểu đồ 4)*. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (thời điểm 24 giờ: $p_{MeV\ 1\ MOI\text{-}control} < 0,0001$, $p_{MeV\ 1/2\ MOI\text{-}control} < 0,0001$; thời điểm 48 giờ: $p_{MeV\ 1\ MOI\text{-}control} = 0,001$, $p_{MeV\ 1/2\ MOI\text{-}control} = 0,005$, $p_{MeV\ 1/4\ MOI\text{-}control} = 0,008$; thời điểm 96 giờ: $p_{MeV\ 1\ MOI\text{-}control} < 0,0001$, $p_{MeV\ 1/2\ MOI\text{-}control} = 0,002$).

Ở nhóm chứng, tỷ lệ chết theo chương trình sớm giảm dần theo thời gian, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Ở nhóm nhiễm MeV, tỷ lệ chết theo chương trình sớm đạt cao nhất tại thời điểm 48 giờ. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,001 ở nồng độ 1 MOI và p < 0,05 ở nồng độ 1/4 MOI *(biểu đồ 4)*.

So sánh tỷ lệ tế bào chết theo chương trình sớm ở 3 nồng độ pha loãng MeV thấy: Nồng độ MeV càng cao, tỷ lệ tế bào chết theo chương trình sớm càng cao, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (thời điểm 24 giờ: $p_{MeV\ 1\ MOI-1/4\ MOI} < 0,0001$; thời điểm 96 giờ: $p_{MeV\ 1\ MOI-1/2\ MOI} = < 0,0001$, $p_{MeV\ 1\ MOI-1/4\ MOI} < 0,0001$, $p_{MeV\ 1/2\ MOI-1/4\ MOI} = 0,003$).



Biểu đồ 4: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình sớm ở các nhóm nghiên cứu.

BÀN LUẬN

Chết theo chương trình là cơ chế cần thiết cho sự phát triển bình thường của các sinh vật đa bào. Trong quá trình này, tế bào chết để đáp ứng tích cực với một loạt các kích thích có kiểm soát. Chính điều này làm cho quá trình chết theo chương trình khác biệt với một dạng chết khác là hoại tử, trong đó tế bào chết không kiểm soát dẫn đến sự phân hủy tế bào, hay gặp trong phản ứng viêm và có thể dẫn tới các vấn đề sức khỏe nghiêm trọng [7].

Những năm gần đây, các nhà khoa học bắt đầu nghiên cứu cơ chế phân tử của quá trình chết theo chương trình và ứng dụng trong điều trị lâm sàng. Ung thư là một bệnh đặc trưng bởi thiếu hụt quá

trình chết theo chương trình. Các tế bào ung thư thường có một số đột biến cho phép chúng bỏ qua các tín hiệu điều chỉnh sự phát triển và tăng sinh của tế bào. Ở trạng thái bình thường, khi các tế bào bị hư hại hoặc tổn thương sẽ trải qua quá trình chết theo chương trình, nhưng trong trường hợp đột biến tế bào ung thư, các tế bào khối u này có thể bỏ qua các tín hiệu điều chỉnh, từ đó ngăn chặn các tế bào không bị chết theo chương trình, gây ra hiện tượng tăng sinh tế bào không kiểm soát được. Đây chính là một trong những cơ chế quan trọng để hình thành và phát triển khối u. Vì thế, hiểu được quá trình chết theo chương trình ở bệnh ung thư sẽ giúp phát triển các phương pháp điều trị căn bệnh này [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy (flow cytometry) để kiểm tra tỷ lệ tế bào chết theo chương trình và tế bào hoại tử, chúng tôi sử dụng kháng thể anti-annexin V gắn chất phát huỳnh quang là FITC và chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là 7-AAD. Kết quả cho thấy MeV có khả năng ly giải tế bào OVCAR3 *in vitro* qua trung gian kích hoạt con đường tế bào chết theo chương trình ở tất cả các thời điểm nghiên cứu (bắt đầu ở thời điểm 24 giờ, tăng cao nhất ở thời điểm 48 giờ và giảm ở thời điểm 96 giờ). Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình ở nhóm chứng thấp hơn cả 3 nhóm nhiễm MeV ở các nồng độ khác nhau ở cả 3 thời điểm trên ($p < 0,05$). Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình giai đoạn sớm ở nhóm chứng giảm dần theo thời gian, còn ở cả 3 nhóm nhiễm MeV đều có xu hướng tăng, cao nhất ở thời điểm 48 giờ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (biểu đồ 2, biểu đồ 3, biểu đồ 4). Điều này cho thấy, quá trình chết theo chương trình sớm diễn ra ở các nhóm nhiễm MeV từ thời điểm 24 giờ, diễn ra mạnh mẽ ở thời điểm 48 giờ và giảm dần ở thời điểm 96 giờ.

Một số tác giả cũng chọn thời điểm khảo sát như chúng tôi là ngày 1 - 4, kết quả cũng cho thấy tác dụng gây chết theo chương trình của MeV trên nhiều dòng tế bào ung thư người khác nhau như ung thư buồng trứng [4], ung thư đại trực tràng [8].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khẳng định ở cả 3 thời điểm nghiên cứu, nồng độ MeV cao làm tăng tế bào chết theo chương trình so với nhóm nồng độ thấp hơn. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm MOI = 1, 1/2 và 1/4 ($p < 0,0001$).

Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với một nghiên cứu khác của chúng tôi *in vitro* về tăng cường khả năng ly giải tế bào ung thư khi sử dụng MeV điều trị tế bào ung thư buồng trứng. Đây là cơ sở để chúng tôi tiến hành các thử nghiệm tiếp theo *in vivo*.

KẾT LUẬN

Kết quả đánh giá khả năng gây chết tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR3) theo chương trình của MeV *in vitro* trên hệ thống Facs Lyric cho thấy: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình ở các nhóm nhiễm chủng MeV ở tất cả các nồng độ pha loãng (MOI từ 1 - 1/4) đều cao hơn có nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,001$). Chủng MeV có tác dụng gây chết tế bào ung thư buồng trứng OVCAR3 theo chương trình *in vitro.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68(6): 394-424.

2. Msaouel P, et al. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. Expert Opin Biol Ther 2013; 13(4):483-502.

3. Son HA, et al. Combination of vaccine-strain measles and mumps viruses enhances oncolytic activity against human solid malignancies. Cancer Invest 2018; 36(2): 106-117.

4. Galanis E, et al., Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. Cancer Res 2015; 75(1):22-30.

5. Galanis E. Therapeutic potential of oncolytic measles virus: Promises and challenges. Clin Pharmacol Ther 2010; 88(5):620-625.

6. Galanis E, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. Cancer Res 2010; 70(3):875-882.

7. Dash P. Apoptosis. Basic Medical Sciences. www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash.

8. Boisgerault N, et al. Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. Biomed Res Int 2013: 387362.