

NGHIÊN CỨU TẠO KHỐI UNG THƯ ĐẠI TRÀNG NGƯỜI TRÊN CHUỘT THIỂU HỤT MIỄN DỊCH BẰNG KỸ THUẬT GHÉP DỊ LOÀI

Bùi Khắc Cường[†]; Hồ Anh Sơn*[†]; Nguyễn Linh Toàn**

TÓM TẮT

Mô hình thực nghiệm trên động vật có vai trò quan trọng trong nghiên cứu ung thư. Trong đó, ghép dị loài tạo khối ung thư người trên chuột thiếu hụt miễn dịch là một phương pháp được ứng dụng ở các trung tâm nghiên cứu ung thư trên thế giới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ứng dụng thành công mô hình ghép dị loài tế bào ung thư đại tràng (UTĐT) người dòng HT-29 dưới da đùi phải của chuột thiếu hụt miễn dịch. Kết quả: 20/20 (100%) chuột ghép tế bào UTĐT này phát triển hình thành khối ung thư. Kích thước trung bình của khối ung thư đạt $22,8 \pm 0,93$ mm đường kính sau 4 tuần được ghép tế bào HT-29. Phân tích mô bệnh học cho thấy hình ảnh của một mô ung thư điển hình.

* Từ khóa: Ung thư; Ung thư đại tràng; Ghép dị loài.

ESTABLISHMENT OF HUMAN COLON ADENOCARCINOMA TUMOR MODEL ON NUDE MICE BY XENOGRAFT METHOD

SUMMARY

Experimental animal model plays a key role in cancer researchs. Human tumours created by cancer cell line xenograft method have been used in cancer research centers in the world. In this study, we had succesfully applied the xenograft model to implant the human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) into subcutaneous of the righ thigh of nude mice. The results showed that the human colon adenocarcinoma cells developed tumor in 20/20 (100%) of nude mice. The mean size of tumor was 22.8 ± 0.93 mm diameter within 4 weeks after implantation of HT-29 cells. Histological analysis of tumors indicated a typical carcinoma tissue.

* Key words: Cancer; Colon cancer; Xenograft.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư biểu mô đại tràng là một loại ung thư phổ biến ở hệ tiêu hóa, là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ ba trong các trường hợp tử vong do ung thư ở Hoa Kỳ [1]. Tại thời điểm phát hiện bệnh trên bệnh nhân (BN), một nửa trường hợp đã có di căn xa. Phần lớn UTĐT thuộc loại ung

thư biểu mô tuyến. Nam giới mắc bệnh ung thư này nhiều hơn nữ giới. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (2008), ở Việt Nam, UTĐT đứng hàng thứ tư về cả số ca mắc mới và số ca tử vong.

Để đạt được tiến bộ trong nghiên cứu ung thư nói chung, UTĐT nói riêng, cần thiết phải có các mô hình ung thư *in vivo* phù hợp.

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Lê Văn Sơn

TS. Nguyễn Đặng Dũng

Ở Việt Nam, có khá nhiều mô hình nghiên cứu ung thư trên động vật thực nghiệm, tuy nhiên, các mô hình này còn có nhiều hạn chế, đó là khối ung thư đồng loài trên động vật không phải là khối ung thư của người. Chính vì vậy, nghiên cứu các phương pháp điều trị nhắm đích gặp nhiều khó khăn vì tính đặc hiệu loài và protein đích của tế bào ung thư (TBUT). Trong khi đó, mô hình ghép TBUT người trên động vật thiếu hụt miễn dịch bằng ghép dị loài đã được áp dụng khá phổ biến ở nhiều trung tâm nghiên cứu ung thư lớn trên thế giới [4, 5]. Mô hình này có giá trị cho các nghiên cứu về khám phá các thuốc mới có tác dụng điều trị ung thư như thuốc điều trị nhắm đích, liệu pháp gen trị liệu ung thư hiện nay. Tuy nhiên, mô hình ghép TBUT người trên chuột thiếu hụt miễn dịch mới bắt đầu được ứng dụng ở Học viện Quân y. Đến thời điểm hiện tại, bằng các phương pháp truy cập thông tin khoa học trong nước, chúng tôi chưa thấy bất kỳ công bố nào về ứng dụng mô hình ghép TBUT đại trực tràng người trên động vật thiếu hụt miễn dịch ở nước ta.

Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Tạo khối ung thư người từ tế bào UTĐT người trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

- Tế bào UTĐT người dòng HT-29 (ATCC, Hoa Kỳ). Đây là một dòng TBUT biểu mô tuyến của đại tràng được phân lập từ một BN nữ da trắng, có biểu hiện về một số oncogen như: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -.

- Chuột thiếu hụt miễn dịch (nude mice, Foxn1^{nu/nu}): chuột nhất đực thiếu hụt miễn dịch, là một loại chuột thí nghiệm được tạo

ra bằng cách gây đột biến trên gen Foxn1, dẫn đến không có tuyến ức, do đó, chúng không có tế bào lympho T tham gia đáp ứng miễn dịch. Kiểu hình của chuột này không có lông nên có tên gọi chuột nude. Do thiếu tế bào lympho T nên chúng không có đáp ứng miễn dịch thải ghép [2, 6]. Vì vậy, loài chuột này có thể dung nạp được nhiều loại tế bào từ các loài khác nhau. Chuột thiếu hụt miễn dịch được nhập khẩu từ Công ty Charles-River (Hoa Kỳ).

- Môi trường nuôi cấy và bảo quản tế bào: môi trường nuôi cấy tế bào McCoy's 5a Medium Modified (Catalog No. 30-2007, ATCC), bổ sung 10% dung dịch huyết thanh bào thai bê (FBS), dung dịch penicillin/streptomycin, dung dịch PBS, dung dịch Trypsin-EDTA (ATCC, Hoa Kỳ). Môi trường nuôi cấy đầy đủ thành phần cho thêm 5% DMSO được sử dụng để bảo quản tế bào [1, 4].

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Nuôi cấy tế bào UTĐT người:*

Nuôi cấy tế bào UTĐT người dòng HT - 29 nuôi cấy trong môi trường McCoy's 5a Medium Modified bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin. Nuôi cấy tăng sinh TBUT trong chai có diện tích đáy chai 75 cm², đặt trong tủ vô trùng, duy trì nhiệt độ 37°C và CO₂ 5%.

Thay môi trường nuôi cấy 3 ngày/lần. Khi tế bào đạt mật độ 80% diện tích bề mặt chai, tách khỏi chai nuôi bằng Trypsin EDTA 0,05% và cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới. Khi số lượng tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mật độ tế bào đạt mật độ 10⁷ tế bào/ml. Hỗn dịch tế bào này được sử dụng để ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch.

* *Nuôi chuột thiếu hụt miễn dịch "nude mice":*

20 chuột nhất đực thiếu hụt miễn dịch được nuôi trong phòng vô trùng, duy trì nhiệt độ phòng ở $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 5\%$, ánh sáng tự động điều khiển bật lúc 7 giờ, tắt lúc 19 giờ. Tiệt trùng thức ăn và nước uống trước khi sử dụng. Mỗi lồng chuột được để trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng lọc vi khuẩn bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh.

* Quy trình ghép TBUT người trên chuột thiếu hụt miễn dịch:

TBUT người sau khi thu hoạch đạt mật độ 10^7 tế bào/ml ghép lên chuột thiếu hụt miễn dịch, số lượng huyền dịch tế bào sử dụng để ghép là 0,1 ml/chuột, tương đương 10^6 tế bào. Vị trí ghép dưới da vùng đùi sau bên phải. Sau khi ghép, tiếp tục nuôi chuột trong phòng vô trùng và theo dõi chặt chẽ diễn biến tại vị trí ghép cũng như toàn thân. Khi khối u có thể quan sát bằng mắt thường, tiến hành đo kích thước 3 ngày/lần để theo dõi tốc độ phát triển khối u.

3. Xử lý số liệu.

Sử dụng phần mềm thống kê Statview 5.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tỷ lệ hình thành và kích thước khối u trên chuột.

Sau 1 tuần ghép tế bào, tỷ lệ xuất hiện khối u quan sát được bằng mắt thường là 20/20 (100%). Kích thước khối u thay đổi từ 2 - 5 mm. Sau 3 tuần, khối u phát triển khá nhanh làm thay đổi hình dạng đùi và ảnh hưởng tới quá trình vận động của chuột, đường kính khối u đo được từ 12 - 18 mm. Sau 4 tuần, khối ung thư phát triển đạt kích thước với đường kính từ 15 - 32 mm (hình 1a, b). Tại thời điểm sau 4 tuần, phẫu thuật chuột mang khối ung thư, bóc tách khối u ra

khỏi đùi và làm xét nghiệm mô bệnh học, phân tích hình ảnh mô ung thư.



a



b

Hình 1: Khối u hình thành trên chuột thiếu hụt miễn dịch.

a. Sau 6 ngày; b. Sau 30 ngày

* Đường kính khối ung thư trên chuột: sau 6 ngày ghép là $3,3 \pm 0,26$ mm; sau 30 ngày ghép là $22,8 \pm 0,93$ mm.

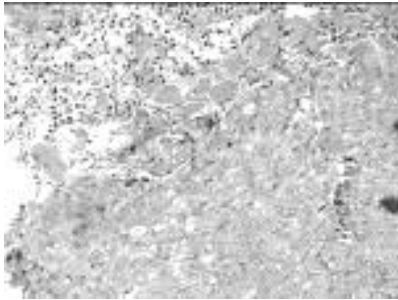
2. Hình ảnh mô bệnh học của khối u hình thành trên chuột.

Khối u sau khi bóc tách ra khỏi đùi chuột, cắt thành mảnh nhỏ, bảo quản ở -80°C , lấy 3 mảnh bảo quản trong dung dịch formalin 10% trong vòng 24 - 48 giờ. Sau đó, đúc mảnh mô ung thư trong khối parafin, cắt lát 5 μm , nhuộm HE để phân tích hình ảnh mô bệnh học mô ung thư hình thành trên chuột.

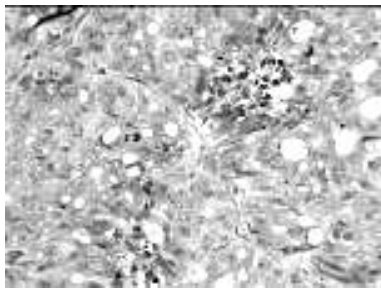
Hình ảnh đại thể: khối u được tạo thành từ nhiều khối u nhỏ, tạo hình ảnh đa cung, các cung liên kết với nhau. Ranh giới tương đối rõ với các mô xung quanh, có thể bóc tách khỏi đùi chuột tương đối dễ dàng.

Hình ảnh vi thể mô ung thư của khối u có cấu trúc gồm tế bào biểu mô trụ tầng

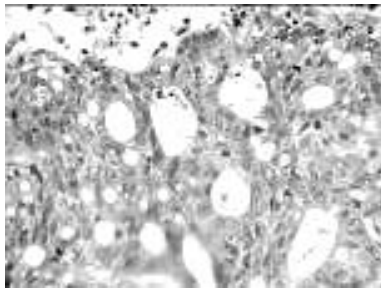
sinh, sắp xếp thành các ống tuyến nhỏ hoặc tập trung thành từng đám. Lót lòng tuyến có vị trí chỉ một hàng tế bào, có vị trí nhiều hàng tế bào. Các tế bào biểu mô tuyến có nhân không đều, tăng sắc, hạt nhân rõ, có nhiều nhân chia bất thường. U có vùng bị hoại tử, mô đệm u xâm nhiễm tế bào viêm. U xâm lấn tổ chức cơ vân (*hình 2a, c*).



a



b



c

Hình 2: Hình ảnh mô bệnh học mô UTĐT phát triển trên chuột sau ghép 30 ngày: hình ảnh TBUT biểu mô tuyến điển hình.

a. Độ phóng đại 40X; b. Độ phóng đại 100X; c. Độ phóng đại 400X.

BÀN LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ thành công trong việc tạo khối ung thư người trên chuột thiếu hụt miễn dịch rất cao, đạt 100% tổng số chuột ghép. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả đã công bố: tỷ lệ thành công trong kỹ thuật ghép dị loài từ 85 - 100% (GG Steel [2] và Kubota T [3]). So với các mô hình ung thư thực nghiệm khác trên động vật, mô hình này có tỷ lệ thành công tương đương hoặc cao hơn. Bên cạnh đó, một ưu điểm nữa của kỹ thuật này là thời gian thực hiện nhanh, trong 1 tuần đã có thể đánh giá hiệu quả tạo khối ung thư trên động vật.

Kỹ thuật này tạo ra các khối u với kích thước tương đối đồng đều, cùng ở một vị trí ngay dưới da. Vì vậy, tạo thuận lợi cho quá trình theo dõi phát triển của khối u hàng ngày bằng các biện pháp không can thiệp. Điều này có ý nghĩa trong nghiên cứu, bởi vì, để đánh giá khối u phát triển trên động vật rất phức tạp, nếu khối u không ở các khu vực ngoại vi sẽ rất khó khăn trong theo dõi. Điều quan trọng là, các khối ung thư phát triển trên loài chuột này được hình thành có nguồn gốc là TBUT đại trực tràng dòng HT-29 của người nên có giá trị lớn trong nghiên cứu điều trị đích, liệu pháp gen và sàng lọc thuốc kháng ung thư mới. Bởi vì, đích cuối cùng là điều trị loại ung thư người có tính đặc hiệu loài và tế bào rất cao. Vì vậy, mục đích nghiên cứu thử nghiệm tác dụng điều trị của các chế phẩm mới trên khối ung thư này sẽ đạt được và tương đồng về đặc điểm di truyền, cấu trúc và chức năng của khối ung thư trên người hơn so với những mô hình ung thư thực nghiệm khác.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu thiết lập và tiến hành trên chuột thiếu hụt miễn dịch, chúng tôi rút ra kết luận:

- Đã xây dựng thành công quy trình tạo khối ung thư người bằng ghép TBUT người trên chuột thiếu hụt miễn dịch qua 3 bước:

+ Nuôi cấy tăng sinh tế bào đạt 10^7 tế bào/ml.

+ Ghép 10^6 tế bào vào dưới da đùi chuột thiếu hụt miễn dịch.

+ Theo dõi khối u hình thành trên chuột 3 ngày/lần, khi đạt kích thước mong muốn sẽ sử dụng cho các mục đích nghiên cứu tương ứng.

- Tỷ lệ tạo thành công khối UTĐT dòng HT-29 của người trên chuột thiếu hụt miễn dịch đạt 100%. Các khối u hình thành trên chuột có thể quan sát được bằng mắt thường, theo dõi khối u phát triển bằng cách đo kích thước trực tiếp. Phân tích mô bệnh học chứng minh hình ảnh của một mô ung thư điển hình.

2. *GG Steel, MJ Peckham.* Human tumour xenografts: A critical appraisal. *Br J Cancer.* 1980, 41, Suppl, IV, pp.133-139.

3. *Kubota T.* Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem.* 1994, 56 (1), pp.4-8.

4. *Lei K, Ye L, Yang Y, Wang GJ, Jiang QY, Jiang Y, Wei YQ, Deng HX.* RNA interference-mediated silencing of focal adhesion kinase inhibits growth of human colon carcinoma xenograft in nude mice. *J Biomed Nanotechnol.* 2010, 6 (3), pp.272-278.

5. *Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL.* Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2002, 8 (9), pp.2985-2991.

6. *Paulsen JE, Elgjo K.* Effect of tumour size on the in vivo growth inhibition of human colon carcinoma cells (HT-29) by colon mitosis inhibitor. *In Vivo.* 2001, 15 (5), pp.397-401.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Cusack JC Jr, Liu R, Xia L, Chao TH, Pien C, Niu W, Palombella VJ, Neuteboom ST, Palladino MA.* NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model. *Clin Cancer Res.* 2006, 12 (22), pp.6758-6764.

Ngày nhận bài: 19/9/2012

Ngày giao phản biện: 10/10/2012

Ngày giao bản thảo in: 16/11/2012

