

# NGHIÊN CỨU TẠO KHỐI UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT NGƯỜI TRÊN CHUỘT THIẾU HỤT MIỄN DỊCH “NUDE MICE” BẰNG KỸ THUẬT GHÉP DỊ LOÀI

*Nguyễn Đình Bảng\**; *Hồ Anh Sơn\*\**

*Bùi Khắc Cường\*\**; *Nguyễn Linh Toàn\*\**

## TÓM TẮT

Tạo khối ung thư người trên động vật thiếu hụt miễn dịch “nude animal” có vai trò quan trọng trong xây dựng mô hình nghiên cứu ung thư. Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật ghép dị loài (xenografts) đã ghép thành công tế bào ung thư tuyến tiền liệt người dòng PC-3 (CRL-1435) và tạo khối ung thư phát triển trên chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice”. Kết quả 20/20 (100%) chuột hình thành khối u sau 1 tuần ghép  $10^6$  tế bào ung thư PC-3. Kích thước khối u phát triển đạt đường kính trung bình  $7,4 \pm 0,62$  cm sau 3 tuần ghép tế bào. Phân tích mô bệnh học chứng minh khối u mới tạo thành trên chuột có hình ảnh tế bào tăng sản, nhân quái, nhân chia, hình thành các mạch máu và ống tuyến không điển hình có nguồn gốc từ tế bào ung thư tuyến tiền liệt người.

\* Từ khóa: PC-3; Ung thư tuyến tiền liệt; Nude mice; Ghép dị loài.

## ESTABLISHMENT OF HUMAN PROSTATE CANCER ANIMAL MODEL ON NUDE MICE BY XENOGRAFTS METHOD

### SUMMARY

*The transplantation of human cancer cells into nude animal is play an important role in oncogenic researches. In this study we have sucessfully transplanted human prostate cancer cells into subcutaneous thigh of athymic mice by xenografts method. Results showed that 20/20 (100%) mice developed tumor after 1 week of injection PC-3 cell line with  $10^6$  cells/mouse. The medium size of tumors were  $7.4 \pm 0.6$  cm in width after 3 weeks of transplantation. The tumor histologic analysis indicated that tumors contained the proliferative atypical glands and veins, hyperchromasia and nuclear enlargement with atypia which developed from human prostate cancer cells.*

\* *Key words: PC-3; Human prostate cancer; Nude mice; Xenografts.*

---

\* Công ty Dược Danapha - Manosome Đà Nẵng

\*\* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Chúng ta biết rằng, mô hình ung thư trên động vật có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu bệnh sinh, dự phòng và điều trị ung thư ở người. Vì vậy, cần nghiên cứu quy trình tạo khối ung thư người trên động vật mang đầy đủ các đặc điểm khối u ung thư trên lâm sàng. Trên thế giới, nghiên cứu ung thư phổ biến thực hiện trên mô hình tạo khối ung thư người ở động vật và đã đạt được nhiều thành tựu khoa học có ý nghĩa trong nghiên cứu giai đoạn trước và tiền lâm sàng. Trên thực nghiệm, đã thành công tạo ra một dòng chuột đột biến gây khuyết thiếu tuyến ức (athymic mice), kết quả không tạo ra được tế bào lympho T [2, 8].

Ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) chiếm 10% trong số ung thư ở nam giới. Ở các nước tiên tiến, tỷ lệ này là 15% và là loại ung thư đứng hàng thứ 2 sau ung thư phổi. Tại Hoa Kỳ, UTTTL là loại ung thư thường gặp nhất ở nam giới. Tại Việt Nam, theo ghi nhận về tình hình ung thư ở Hà Nội, năm 1999 có tỷ lệ mắc theo tuổi ở nam giới là 2,2/100.000 dân, đứng thứ 12 trong các loại ung thư ở nam giới [1]. Với mức độ phổ biến như vậy, nhưng những nghiên cứu về UTTTL tại Việt Nam mới chỉ dừng ở mức độ nghiên cứu trên nuôi cấy tế bào và trên lâm sàng mà chưa có được mô hình bệnh lý ung thư trên động vật thực nghiệm. Đây là một hạn chế rất lớn để tiếp cận thành quả nghiên cứu và trị liệu trên thế giới cũng như hạn chế nội lực nghiên cứu và ứng dụng chế phẩm điều trị ung thư trong nước. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành xây dựng mô hình UTTTL của người trên động vật suy giảm miễn dịch, làm tiền đề cho nghiên cứu sâu hơn và ứng dụng tiền lâm sàng về ung thư người.

## VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu và đối tượng nghiên cứu.

\* Chuột thiếu hụt miễn dịch (*nude mouse*) và điều kiện nuôi:

20 chuột nhất đực BALB/c thiếu hụt miễn dịch, không có tế bào lympho T (*nude mice*, Foxn1<sup>nu</sup>), nhập khẩu từ Công ty Charly-River, chi nhánh Đà Loan. Chuột được nuôi trong điều kiện phòng sạch, không khí được lọc và có áp lực dương tính. 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 00, tắt lúc 19 giờ 00. Thức ăn (Zeigler, Hoa Kỳ) và nước uống được tiệt trùng trước khi sử dụng. Để mỗi lồng chuột trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh.

\* Tế bào ung thư và môi trường nuôi tế bào:

Tế bào ung thư là tế bào UTTTL người dòng PC-3 (CRL-1435), của ATCC, Hoa Kỳ. Dùng môi trường Ham's F-12, bổ sung 10% FBS (fetal bovin serum), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB Đức) nuôi tế bào.

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

\* Nuôi cấy và ghép tế bào ung thư vào chuột:

Tế bào UTTTL người dòng PC-3 (mã CRL-1435; công ty ATCC, Hoa Kỳ), nuôi cấy trong môi trường Ham's F-12, bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB Đức). Mỗi chai nuôi cấy diện tích 75 cm<sup>2</sup> cấy chứa 10<sup>6</sup> tế bào. Tế bào nuôi cấy tăng sinh và thay môi trường 2 lần mỗi tuần ở điều kiện nhiệt độ 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> 5%. Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích, tiến hành cấy chuyển sang chai mới. Chuẩn bị tế bào trước ghép, tế bào trước khi tách được rửa hai lần bằng dung dịch PBS 1x, sau đó tách ra bằng dung dịch trypsin-EDTA 1x. Hút dung dịch tế bào ung thư đã chuẩn bị vào bơm tiêm 1 ml với số lượng 10<sup>7</sup>/ml. Cố định nude mice và tiêm 0,1 ml dưới da đùi phải (10<sup>6</sup> tế bào/chuột). Quá trình thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

*\* Theo dõi và xác định hình thành khối ung thư trên chuột:*

Đánh giá theo dõi khối u phát triển tại vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần mỗi tuần bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK. Sau 3 tuần, giết chuột, bóc lộ khối u, bóc tách và đo kích thước trực tiếp khối u hình thành và phát triển sau ghép.

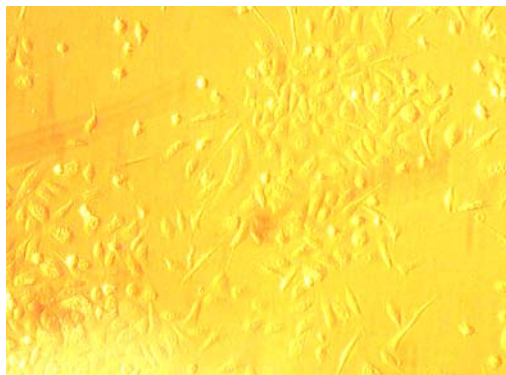
*\* Phân tích giải phẫu bệnh lý khối ung thư hình thành trên chuột:*

Khối u sau khi bóc tách được bảo quản trong dung dịch formalin 10% trong 24 - 48 giờ. Tiếp theo, đúc khối paraffin khối u, cắt lát dày 5 μm, nhuộm HE và đọc phân tích kết quả mô ung thư hình thành dưới kính hiển vi quang học. Phân tích những đặc điểm về hình thái học tế bào, cấu trúc mô hình thành, mạch máu, xâm lấn, di căn... Kỹ thuật được tiến hành tại Khoa Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện 103.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Nuôi cấy, tăng sinh tế bào UTTTL người dòng PC-3.

Tế bào UTTTL người dòng PC-3 được nuôi tăng sinh trong chai 75 cm<sup>2</sup>, số lượng 10<sup>6</sup> tế bào. Theo dõi tế bào phát triển khi đạt khoảng 80% diện tích đáy chai sẽ chuyển sang chai nuôi cấy mới với tỷ lệ 1:3 (hình 1). Sau 2 lần cấy chuyển trên nhiều chai nuôi cấy đạt 10<sup>8</sup> tế bào. Thu hoạch tế bào ung thư bằng cách dùng trypsin-EDTA 1x. Cho 2 - 3 ml môi trường F12-k, lấy 10 μl, đếm số lượng tế bào/ml, sau đó đưa về nồng độ 10<sup>7</sup> tế bào/ml.



*Hình 1: Tế bào ung thư PC-3 phát triển trong môi trường nuôi cấy.*

## **2. Thời gian phát triển UTTTL người trên nude mice.**

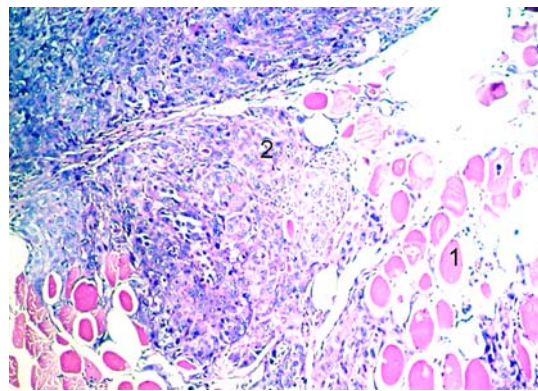
Tiêm 0,1 ml dung dịch tế bào ung thư  $10^7/ml$  vào dưới da đùi sau bên phải mỗi chuột. Sau khi tiêm tế bào UTTTL khoảng một tuần, khối u phát triển ngay tại chỗ tiêm, đường kính khối u khoảng 1,8 - 3,5 mm. Sau 3 tuần, khối u phát triển rõ dưới da đùi sau phải, lồi lên, chắc và di chuyển cùng khối cơ. Khối u to làm thay đổi hình dạng đùi và ảnh hưởng tới quá trình vận động của chuột. Sau 3 tuần theo dõi, bóc tách khối u ra khỏi đùi và đo kích thước trực tiếp khối u. Tách khối u làm 2 phần, một phần làm giải phẫu bệnh lý, phần còn lại bảo quản âm sâu cho đến khi sử dụng.

## **3. Kích thước khối u UTTTL người phát triển trên nude mice sau ghép tế bào.**

Sau ghép tế bào 1 tuần, 20/20 (100%) chuột hình thành khối u, đường kính trung bình  $2,1 \pm 0,15$  mm, giao động từ 1,8 - 3,2 mm. Sau 3 tuần, khối u phát triển kích thước trung bình  $7,4 \pm 0,62$  mm. Đây là kết quả đo trực tiếp khối u sau khi đã bóc lộ và bóc tách ra khỏi khối cơ đùi. Quan sát bằng mắt thường có thể thấy ranh giới của u còn khá rõ ràng, 9/20 (45%) khối u có hình ảnh xâm lấn nhiều vào tổ chức xung quanh.

## **4. Hình ảnh giải phẫu bệnh lý khối u.**

Trên tiêu bản mô bệnh học nhuộm H.E. thấy tế bào ung thư tạo thành các ổ, đám và dải tế bào ung thư điển hình. Tế bào có nhân thô, to nhỏ không đều nhau, tăng sinh, tế bào nhân quái, nhân chia bất thường, ranh giới không rõ, xâm lấn xuống mô cơ vân, mạch máu tăng sinh (*hình 2*).



*Hình 2: Hình ảnh mô bệnh học khối ung thư hình thành sau ghép tuần thứ 3.*

*(Mô ung thư phát triển với các tế bào u to nhỏ không đều, tăng sinh, nhân quái và nhân chia (2), xâm lấn mô xung quanh (1) và tăng sinh mạch máu (nhuộm HE, phóng đại 40 x).*

## **BÀN LUẬN**

### **1. Lựa chọn mô hình động vật ghép ung thư.**

Trong nghiên cứu bệnh sinh và điều trị ung thư, việc phát triển mô hình ung thư người trên động vật thiếu hụt miễn dịch đã có những đóng góp quan trọng làm hiểu rõ hơn cơ chế gây bệnh và đánh giá tác dụng của thuốc trị liệu ung thư. Nhiều nước phát triển đã áp dụng rộng rãi mô hình ghép tế bào ung thư người trên động vật và phổ biến là dùng chuột nhất dòng BALB/c thiếu hụt miễn dịch “nude mice” trong nghiên cứu ung thư [2, 3, 5, 8]. Từ yêu cầu thực tế ở nước ta cũng như để tiếp cận và mở rộng hợp tác nghiên cứu, chúng tôi đã triển khai và ứng dụng thành công mô hình ghép tạo khối ung thư UTTTL người trên chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice”.

### **2. Nuôi cấy tăng sinh tế bào UTTTL và ghép gây ung thư trên chuột.**

Tế bào UTTTL dòng PC-3 nguồn gốc từ ATCC (Hoa Kỳ) được tăng sinh, phát triển, dùng môi trường chuyên dụng F12-K, đảm bảo đúng quy trình, kỹ thuật và hướng dẫn của nhà cung cấp cũng như những kết quả nghiên cứu trước [2, 4]. Kết quả sau 4 lần cấy chuyển tăng sinh đạt số lượng tế bào đủ để ghép cho 20 chuột. Sau 3 tuần ghép tế bào UTTTL dưới da đùi chuột, khối u phát triển đạt kích thước trung bình  $7,4 \pm 6,2$  mm. Kích thước này nhỏ hơn so với Tsuji và CS (2010): kích thước trung bình khối UTTTL > 8 mm sau cùng thời gian. Có sự khác biệt này có thể do trong công trình của Tsuji, nude mice được tiêm số lượng tế bào lớn hơn nhiều lần ( $5 \times 10^6$ ) so với nghiên cứu hiện tại của chúng tôi ( $1 \times 10^6$ ), do vậy khối u phát triển nhanh hơn [7].

### **3. Hình ảnh giải phẫu bệnh lý khối ung thư.**

Hình ảnh mô bệnh học khối u hình thành trên nude mice có tính chất hình thái điển hình của khối ung thư phát triển từ tế bào ung thư như tế bào phát triển tạo thành các ổ, đám và dải xâm lấn. Tế bào u có nhân thô, to nhỏ không đều nhau, tăng sinh mạnh. Đặc biệt, dễ dàng quan sát thấy tế bào có nhân quái, nhân chia bất thường, ranh giới không rõ, xâm lấn xuống mô cơ vân và các mạch máu tăng sinh mạnh. Đây là bằng chứng cho thấy tế bào UTTTL dòng PC-3 phát triển tốt trên cơ thể nude mice và tạo thành khối u xâm lấn mô cơ và xung quanh. Tuy nhiên, để chứng tỏ đặc tính sinh học của tế bào trong khối u này có tương tự như tế bào được ghép ban đầu hay không, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn. Thực nghiệm này cũng cho thấy tỷ lệ phát triển khối u thành công đạt 20/20 (100%) chuột được ghép, phù hợp với nhiều nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới với tỷ lệ thành công rất cao (91 - 100%), khi ghép tế bào UTTTL PC-3 vào cơ thể nude mice [5, 6, 8].

## **KẾT LUẬN**

Kết quả nghiên cứu ghép tạo khối ung thư được tiến hành trên 20 chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice” chúng tôi rút ra kết luận:

Đã ghép thành công tạo khối ung thư bằng ghép tế bào UTTTL người dòng PC-3 trên chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice” bằng kỹ thuật ghép dị loài. Tỷ lệ tạo thành công khối ung thư trên chuột là 20/20 (100%). Kích thước khối ung thư điển hình phát triển đạt  $7,4 \pm 0,62$  mm sau 3 tuần. Giải phẫu bệnh lý chứng minh hình ảnh ung thư điển hình với tế bào u to nhỏ không đều, nhân quai, nhân chia, hình thành các ống tuyến không điển hình, xâm lấn và tăng sinh mạch máu.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh PT, Duc NB. The situation with cancer control in Vietnam. *Jpn J Clin Oncol*. 2002, Mar, 32 Suppl, S92-7.
2. Bastide C, Bagnis C, Mannoni P, Hassoun J, Bladou F. A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Pros Can & Pros Dis*. 2002, 5, pp.311-315.
3. Jacob D, Davis J, Fang B. Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. *Gene Ther Mol Biol*, 2004, 8, pp. 213-219.
4. Liu X, Gao R, Dong Y, Gao L, Zhao Y, Zhao L, Zhao X, Zhang H. Survivin gene silencing sensitizes prostate cancer cells to selenium growth inhibition. *BMC Cancer*. 2010, 10, pp.410-418.
5. Rembrink K *et al*. Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: a clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *Prostate*. 1997, 31, pp.168-174.
6. Stephenson RA *et al*. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1992, 84, pp.951-957.
7. Tsuji T, Du W, Nishioka T, Chen L, Yamamoto D, Chen CY. Phellinus linteus extract sensitizes advanced prostate cancer cells to apoptosis in athymic nude mice. *PLoS One*. 2010, 5, p.9885
8. Waters DJ, Janovitz EB, Chan TCK. Spontaneous metastasis of PC-3 cells in athymic mice after implantation in orthotopic or ectopic microenvironments. *Prostate*. 1995, 26, pp.227-234.