

XÂY DỰNG MÔ HÌNH UNG THƯ PHỔI NGƯỜI

Nguyễn Linh Toàn; Hồ Anh Sơn*; Bùi Khắc Cường**

TÓM TẮT

Bằng kỹ thuật ghép dị loài, đã ghép thành công tế bào ung thư phổi (UTP) người dòng H211 và tạo khối ung thư phát triển trên chuột thiếu hụt miễn dịch "nude mice". Kết quả: 100% chuột hình thành khối u sau 1 tuần ghép 10^6 tế bào ung thư H211. Khối u phát triển đạt kích thước trung bình 300 mm^3 sau 4 tuần ghép tế bào. Phân tích giải phẫu bệnh lý chứng minh khối u mới tạo thành trên chuột có tế bào đa diện, tăng sản, nhân quái, nhân chia, hình ảnh của ung thư biểu mô tế bào vảy.

* Từ khóa: Tế bào ung thư dòng H211; Chuột thiếu hụt miễn dịch; Ghép dị loài.

ESTABLISHMENT OF HUMAN LUNG CANCER MODEL

SUMMARY

By xenograft method, we have successfully implanted human lung squamous carcinoma cells into subcutaneous thigh of athymic mice. Results showed that 10/10 (100%) mice developed tumor after 1 week of injection H211 cell line with 10^6 cells/mouse. The mean size of tumors were 300 mm^3 after transplanted 4 weeks. The tumor histologic analysis indicated that the tumors contained the hyperchromasia, nuclear enlargement with atypia, the squamous carcinoma.

* Key words: H211; Nude mice; Xenograft.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là loại ung thư phổ biến nhất trên toàn cầu, số ca mắc mới mỗi năm tăng trung bình 0,5%. Tỷ lệ mắc UTP rất khác biệt giữa các nước. Ở Mỹ, mỗi năm có khoảng 178.000 trường hợp mắc mới và 160.000 ca tử vong do UTP. Nhìn chung, ở các nước, tỷ lệ mắc UTP ở nam nhiều hơn nữ. Bệnh lý này cũng là nguyên nhân ung thư gây tử vong hàng đầu. Theo báo cáo thống kê ở Mỹ, tỷ lệ UTP sống được 5 năm chỉ 15%. Ở châu Âu, tỷ lệ sống trung bình khoảng 10%, con số này cũng được ghi nhận ở các quốc gia đang phát triển (8,9%).

Đứng trước thách thức về mức độ ác tính, kháng điều trị của UTP, cần có những phương pháp và dược chất mới để điều trị. Để có thể ứng dụng các kỹ thuật, vật liệu mới trong điều trị ung thư, cần có mô hình bệnh lý áp dụng cho thử nghiệm tiền lâm sàng. Trước đây, các mô hình ung thư được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài, nhưng có hạn chế là các khối u không mang đặc tính sinh học giống như khối u trên người, điều này gây hạn chế rất lớn trong nghiên cứu cơ chế bệnh lý và áp dụng thử nghiệm điều trị các loại ung thư người. Do vậy, yêu cầu cấp thiết cần phải có

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Hoàng Văn Lương

mô hình động vật bị ung thư mang những đặc tính sinh học ung thư là nguyên bản của tế bào ung thư người. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành xây dựng mô hình UTP người trên chuột suy giảm miễn dịch, làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn và ứng dụng tiền lâm sàng về UTP người.

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu.

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

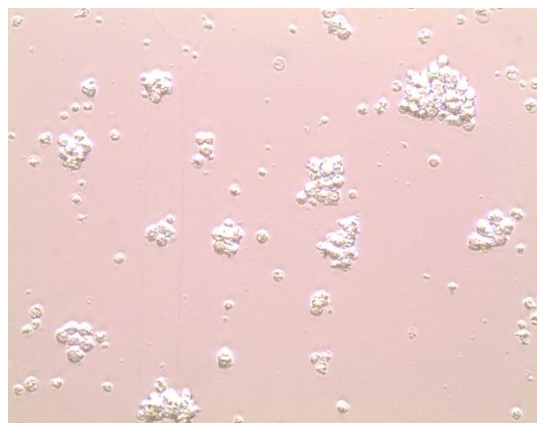
10 chuột nhắt đực BALB/c thiếu hụt miễn dịch, không có tế bào lympho T (*nude mice*, Foxn1^{nu}), nhập khẩu từ Công ty Charlie-River (Hoa Kỳ). Chuột được nuôi trong điều kiện phòng sạch, không khí được lọc và có áp lực dương tính. Duy trì nhiệt độ phòng ở $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 5\%$, ánh sáng được tự động điều khiển bật lúc 7h00, tắt lúc 19h00. Thức ăn (Zeigler, Hoa Kỳ) và nước uống được tiệt trùng trước khi sử dụng. Đặt 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 (*hình 1*).



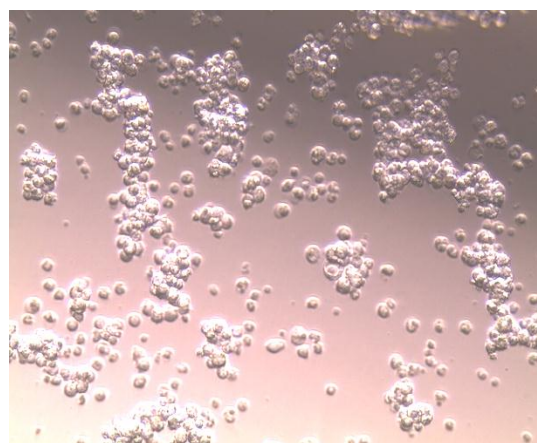
Hình 1: Hệ thống chuồng nuôi chuột lưu thông khí độc lập. Nhiệt độ và độ ẩm được kiểm soát chặt chẽ.

* Tế bào ung thư:

Dòng tế bào UTP người H211 (*hình 2*) do công ty ATCC cung cấp (American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Hoa Kỳ).



Hình 2A: Tế bào UTP người H211 khi mới gieo trong môi trường.



Hình 2B: Tế bào H211 phát triển 40% bề mặt môi trường nuôi sau 1 tuần.

2. Phương pháp nghiên cứu.

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

Nuôi cấy tế bào UTP người H211 (công ty ATCC, Hoa Kỳ) trong môi trường Eagle's Minimum Essential Medium, bổ sung fetal bovine serum 10%, 1% penicillin và streptomycin (invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB Đức),

1,5 mcg insulin/ml môi trường. Diện tích mỗi chai nuôi cấy 75 cm², được cấy chứa 10⁶ tế bào. Nuôi cấy tăng sinh tế bào và thay môi trường 3 lần/tuần ở điều kiện nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích, cấy chuyển sang chai mới. Trước ghép, rửa tế bào 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, số lượng 10⁷/ml. Cốt định chuột, tiêm 0,1 ml vào dưới da đùi phải (10⁶ tế bào/chuột). Thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

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

Đánh giá sự phát triển khối u tại vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần/tuần bằng quan sát, sờ nắn, đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK. Sau 4 tuần, giết chuột, bóc lộ khối u, bóc tách và đo kích thước 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 vòng 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... Tiến hành tại Khoa Giải phẫu Bệnh lý, Bệnh viện 103.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Nuôi cấy, tăng sinh tế bào UTP người dòng H211.

Tế bào UTP người dòng H211 được nuôi tăng sinh trong chai 75 cm², số lượng 10⁶ tế bào. Theo dõi tế bào phát triển, khi đạt khoảng 80% diện tích đáy chai, chuyển sang chai nuôi cấy mới với tỷ lệ 1:3. Sau 2

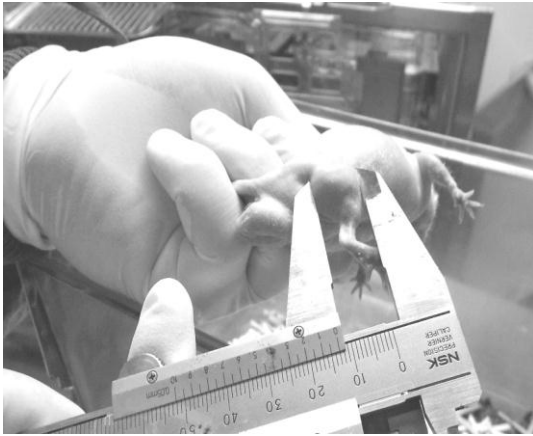
lần cấy chuyển, trên nhiều chai nuôi cấy đạt 10⁸ tế bào. Thu hoạch tế bào ung thư bằng cách dùng Trypsin-EDTA 1X. Cho 2 - 3 ml môi trường nuôi, lấy 10 µl, đếm số lượng tế bào/ml, sau đó đưa về nồng độ 10⁷ tế bào/ml (hình 2A, B).

2. Sự phát triển khối UTP người trên nude mice.

Tiêm 0,1 ml dung dịch tế bào ung thư 10⁷/ml vào dưới da đùi sau bên phải mỗi chuột. Sau khi tiêm tế bào UTP khoảng 1 tuần, có thể nhìn thấy khối u bằng mắt thường. Sau 2 tuần, khối phát triển ngay tại chỗ tiêm, kích thước khối u có thể đo được bằng thước. Sau 4 tuần, khối u phát triển rõ dưới da đùi sau phải, lồi lên, chắc và di chuyển cùng khối cơ (hình 3A, B). Sau 4 tuần theo dõi, bóc tách khối u. Kết quả 14 ngày sau ghép tế bào, 100% chuột hình thành khối u, kích thước khối u đạt 82,2 ± 15,2 mm³. Sau 4 tuần, các khối u phát triển đạt kích thước trung bình 298,9 ± 41,4 mm³.

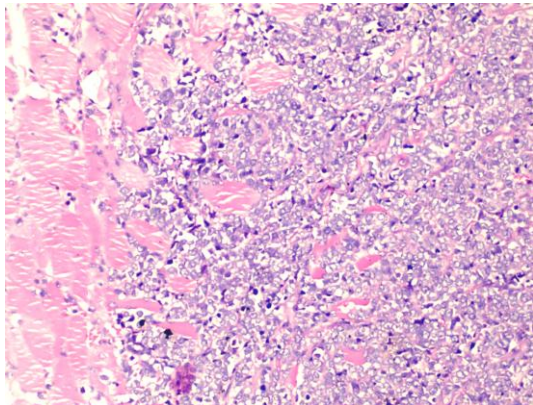


Hình 3A: Khối UTP trên đùi chuột sau ghép 14 ngày.

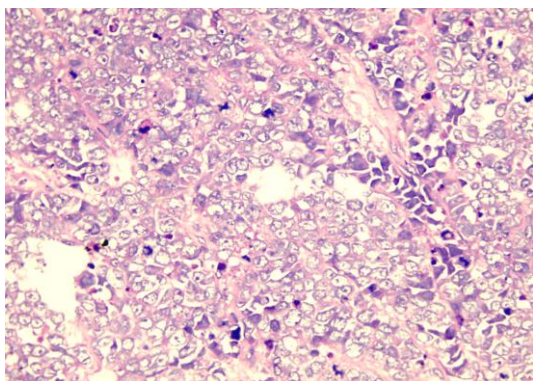


Hình 3B: Khối UTP trên đùi chuột sau ghép 28 ngày.

3. Hình ảnh giải phẫu bệnh lý khối u.



Hình 4A: Tế bào ung thư xâm lấn vào khối cơ đùi (10X).



Hình 4B: Tế bào ung thư hình đa diện sắp xếp thành các đám hoặc các ổ, được ngăn cách bởi vách xơ mỏng (40X).

Hình ảnh giải phẫu bệnh cho thấy, cấu

trúc gồm các tế bào hình đa diện, sắp xếp thành những đám hoặc ổ, ngăn cách bởi vách xơ mỏng. Các tế bào u có bào t_đng hẹp, nhân không đều, tăng sắc, chất nhân thô, một số có hạt nhân rõ, có nhiều nhân chia bất th_đng. u có các vùng bị hoại tử dạng trứng cá. Không thấy hình gai nổi và cầu sùng. U xâm lấn tổ chức cơ vân. Đây là hình ảnh ung th_đ biểu mô tế bào vảy biệt hoá vừa, xâm lấn cơ vân.

Trên thế giới, nhiều quốc gia phát triển đã áp dụng rộng rãi mô hình ghép tế bào ung thư người trên động vật, phổ biến dùng chuột nhất thiếu hụt miễn dịch “nude mice” trong nghiên cứu ung thư [2, 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 UTP người trên chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice”. Tế bào UTP người dòng H211 của công ty ATCC (Hoa Kỳ) được tăng sinh, phát triển dùng môi trường chuyên dụng đảm bảo đúng quy trình kỹ thuật và hướng dẫn của nhà cung cấp tương tự 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 10 chuột. Sau 4 tuần ghép tế bào dưới da đùi chuột, khối u phát triển đạt kích thước trung bình 300 mm³.

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. Thực nghiệm này cũng cho thấy tỷ lệ phát triển khối u thành công đạt 100% chuột được ghép, kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới với tỷ lệ thành công rất cao từ 91 - 100% khi ghép tế bào UTP người vào cơ thể nude mice [3, 6, 7, 8].

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu ghép tạo khối ung thư trên 10 chuột thiếu hụt miễn dịch “nude mice”, chúng tôi rút ra kết luận:

Đã tạo thành công khối ung thư bằng ghép tế bào UTP người dòng H211 trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài “xenograft”. Tỷ lệ tạo thành công khối ung thư trên chuột đạt 100%. Kích thước khối ung thư điển hình phát triển đạt 300 mm³ sau 4 tuần ghép tế bào. Giải phẫu bệnh lý chứng minh hình ảnh ung thư biểu mô điển hình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh PT, Duc NB. The situation with cancer control in Vietnam. *Jpn J Clin Oncol*. 2002, 32 Suppl, pp.92-97.

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. Fu Q, Cash SE, Andersen JJ, Kennedy CR, Oldenburg DG, Zander VB, Foley GR, Shelley CS. CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *Int J Cancer*. 2012, Sep 27, doi: 10.1002/ijc.27873.

4. 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.

5. Knowles BB, et al. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980, 209, pp.497-499.

6. Singh S, Trevino JG, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiock S, Chellappan SP. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2012, Sep 25, 11 (1), p.73.

7. Song HZ, Yi J, Chen J, Chen LB. Nimotuzumab increases chemosensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to docetaxel. *Oncol Res*. 2012, 20 (1), pp.39-47.

8. Xue TC, Chen RX, Han D, Chen J, Xue Q, Gao DM, Sun RX, Tang ZY, Ye SL. Down-regulation of CXCR7 inhibits the growth and lung metastasis of human hepatocellular carcinoma cells with highly metastatic potential. *Exp Ther Med*. 2012, Jan, 3 (1), pp.117-123.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

