

TẠO KHỐI UNG THƯ VÚ NGƯỜI TRÊN CHUỘT NUDE

Hồ Anh Sơn;
Nguyễn Lĩnh Toàn*
Bùi Khắc Cường*;
Nguyễn Văn Ba**

TÓM TẮT

Trên chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude), chúng tôi đã ghép thành công tế bào ung thư (TBUT) vú người dòng BT 474 và tạo khối ung thư phát triển bằng kỹ thuật ghép dị loài (xenograft). Sau 10 ngày ghép, chuột hình thành khối u 10^6 TBUT BT 474. Kích thước khối u đạt bình 300 mm³ sau 4 tuần ghép tế bào. Phân tích giải phẫu bệnh lý chứng minh khối u mới tạo thành trên chuột có các tế bào đa diện, tăng sản, nhân quái, nhân chia, hình ảnh của ung thư biểu mô.

* Từ khóa: Ung thư vú; Ghép dị loài; Chuột thiếu hụt miễn dịch.

ESTABLISHMENT OF HUMAN BREAST CANCER IN NUDE MICE

SUMMARY

On nude mice, we have implanted human breast cancer cells into subcutaneous thigh by xenograft method. After implanted, mice developed tumor after 10 days of injection BT 474 cell line with 10^6 cells/mouse. The mean size of tumors were 300 mm³ after transplanted 4 weeks. The tumor histologic analysis indicated that the tumors contained the hyperchromasia, nuclear enlargement with atypia, the epithelial carcinoma.

* Key words: Breast cancer; Xenograft; Nude mice.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng chuột thiếu hụt miễn dịch là một bước đột phá trong nghiên cứu ung thư, cho phép nghiên cứu ung thư người trên cơ thể động vật. Bắt đầu được Flanagan tạo ra từ năm 1966, chuột BALB/c nude có biểu hiện bên ngoài khác biệt: không có lông, suy giảm hoặc mất chức năng tuyến ức. Chuột nude có một gen bị đột biến đồng hợp tử (homozygous), gen này quy định sự phát triển của lông và tuyến ức. Do đó, với gen bị đột biến, chuột nude bị suy giảm chức năng tuyến ức hoặc

thậm chí không có tuyến ức, không có lông và hệ thống đáp ứng miễn dịch tế bào bị hạn chế do suy giảm mạnh số lượng tế bào lympho T.

Để có thể ứng dụng các kỹ thuật, vật liệu mới trong điều trị ung thư, cần phải có mô hình bệnh lý áp dụng cho thử nghiệm tiền lâm sàng. Các mô hình ung thư trước đây được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài. Hạn chế của mô hình là khối u không mang đặc tính sinh học giống như khối u trên người, có hạn chế lớn trong nghiên cứu cơ chế bệnh lý và áp dụng thử nghiệm

* Học viện Quân y

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

điều trị cho các loại ung thư người. Do vậy, khối ung thư được tạo ra trên chuột nude mang đặc tính sinh học tương tự như khối ung thư người là một bước tiến quan trọng phục vụ nghiên cứu tiền lâm sàng. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Tạo được khối ung thư người trên chuột nude.*

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.

* *Chuột thiếu hụt miễn dịch và điều kiện nuôi:*

10 chuột nhắt 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). Nuôi chuột 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 tự động điều khiển bật lúc 7 giờ, tắt lúc 19 giờ, thức ăn (Zeigler, Hoa Kỳ) và tiết trùng nước uống trước khi sử dụng. Mỗi lồng chuột được để trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh.

* *TBUT:*

Dòng TBUT vú người BT 474 do công ty ATCC (American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Hoa Kỳ) cung cấp.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Nuôi cấy và ghép TBUT vào chuột:

Nuôi cấy TBUT vú người trong môi trường Hybri-Care Medium (mã No. 46-X), bổ sung fetal bovine serum 10%, 1% penicillin và

streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB Đức), 1,5 mcg insulin/ml môi trường. Mỗi chai nuôi cấy diện tích 75 cm^2 được cấy chứa 10^6 tế bào. Tế bào được nuôi cấy tăng sinh và thay môi trường 3 lần/tuần ở điều kiện nhiệt độ 37°C , CO_2 5%. Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích, tiến hành cấy chuyển sang chai mới. Trước ghép, rửa tế bào 2 lần bằng dung dịch PBS 1X, sau đó tách ra bằng dung dịch Trypsin-EDTA 1X. Hút dung dịch TBUT đã chuẩn bị vào bơm tiêm 1 ml với số lượng 10^7 /ml. Cố định chuột nude và tiêm 0,1 ml vào dưới da đùi phải (10^6 tế bào/chuột). Quá trình thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

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

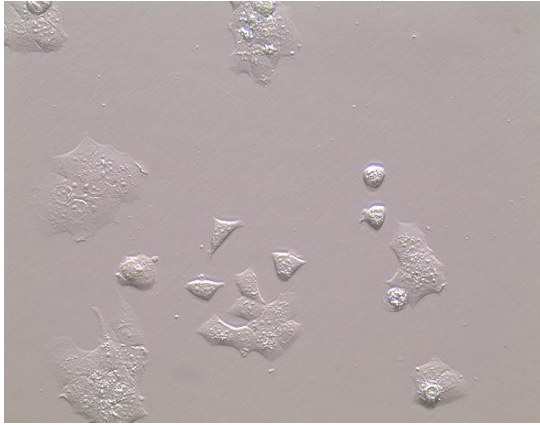
Đánh giá theo dõi sự phát triển khối u tại vị trí tiêm 2 lần/tuần. Bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK. Sau 4 tuần, giết chuột, bóc lộ khối u, bóc tách và đo kích thước trực tiếp khối u hình thành và phát triển sau ghép.

- Phân tích mô bệnh học khối ung thư hình thành trên chuột:

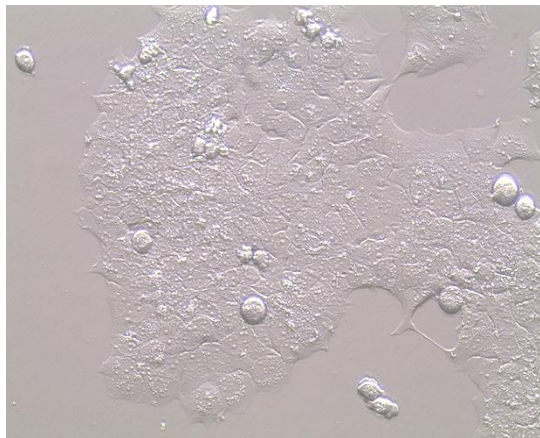
Sau khi bóc tách, bảo quản khối u trong dung dịch formalin 10% trong 24 - 48 giờ. Tiếp theo, đúc khối paraffin vào khối u, cắt lát dày $5 \mu\text{m}$, nhuộm HE và đọc phân tích kết quả mô ung thư hình thành dưới kính hiển vi quang học. Phân tích những đặc điểm về hình thái học tế bào, cấu trúc mô hình thành, mạch máu, xâm lấn... Kỹ thuật tiến hành tại Khoa Giải phẫu Bệnh lý, Bệnh viện 103 (Học viện Quân y).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nuôi cấy, tăng sinh TBUT vú người dòng BT 474.



Hình 1: TBUT vú khi mới gieo.



Hình 2: TBUT vú phát triển tốt trong môi trường nuôi.

Nuôi tăng sinh TBUT vú người dòng BT 474 trong chai 75 cm², số lượng 10⁶ tế bào. Theo dõi tế bào phát triển khi đạt khoảng 80% diện tích đáy chai sẽ được 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 TBUT 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.

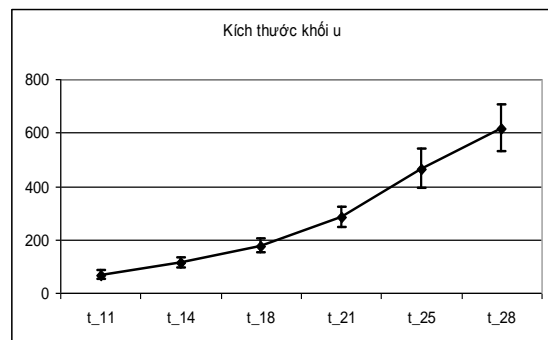
2. Kích thước khối ung thư vú trên chuột nude.

Tiêm 0,1 ml dung dịch TBUT 10⁷/ml vào dưới da đùi sau bên phải mỗi chuột. Sau khi tiêm TBUT khoảng 10 ngày, khối u phát triển ngay tại chỗ tiêm, đường kính khối u đạt khoảng 5 mm. Sau 4 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.

Bảng 1: Kích thước khối ung thư vú trên đùi chuột.

| NGÀY SAU GHÉP | KÍCH THƯỚC KHỐI U (mm ³ , n = 10) | S E |
|---------------|----------------------------------------------|------|
| t - 11 | 67,4 | 15,9 |
| t - 14 | 113,4 | 17,6 |
| t - 18 | 177,4 | 27,7 |
| t - 21 | 282,4 | 38,1 |
| t - 25 | 466,1 | 72,7 |
| t - 28 | 617,2 | 87,8 |

Kết quả: sau 10 ngày sau ghép tế bào, 10/10 (100%) chuột hình thành khối u, kích thước khối u đạt 67,4 ± 5,9 mm³. Sau 4 tuần, các khối u phát triển đạt kích thước trung bình 617,2 ± 87,8 mm³.



Hình 3: Tốc độ phát triển khối ung thư vú theo thời gian.

Sau khi khối ung thư xuất hiện vào thời điểm 10 ngày sau ghép, khối này phát triển liên tục theo thời gian đến khi kết thúc thí nghiệm. Tốc độ phát triển đều đặn từ lúc phát hiện đến khi kết thúc.

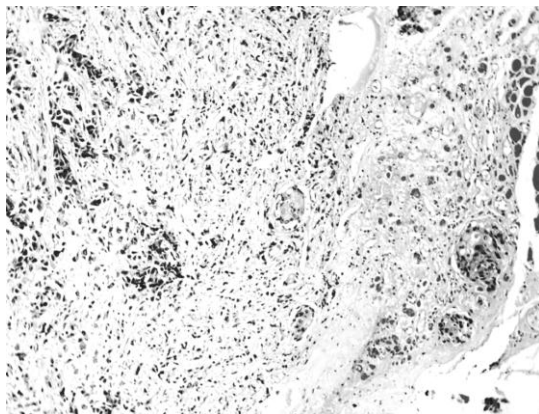
3. Hình ảnh đại thể và vi thể khối u.

Sau ghép, kiểm tra vị trí tiêm TBUT 2 lần/tuần, liên tục cho tới khi khối u phát triển, kết thúc kiểm tra, làm giải phẫu bệnh lý sau khi ghép tế bào khoảng 4 tuần.

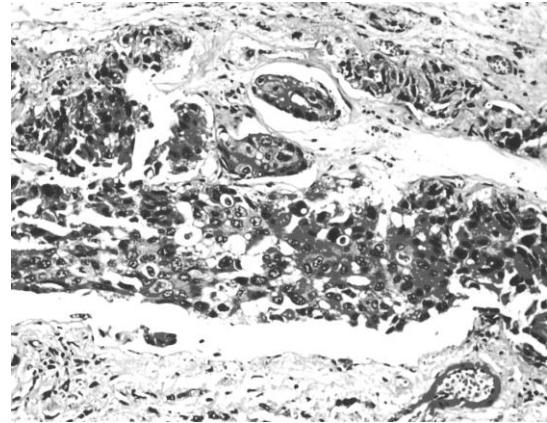


Hình 4: Khối ung thư vú trên đùi chuột sau ghép 28 ngày.

Khối ung thư vú trên đùi chuột có thể đạt đường kính 12 mm, tương ứng với khoảng 600 mm³ thể tích.



Hình 5: Hình ảnh mô bệnh học khối ung thư vú người trên đùi chuột (10X).



Hình 6: Hình ảnh mô bệnh học khối ung thư vú người trên đùi chuột (40X).

Hình ảnh mô bệnh học cho thấy cấu trúc u nằm trong mô cơ vân. U có cấu trúc của các dải tế bào biểu mô nằm trên mô đệm xơ. Các tế bào u lớn, ranh giới tế bào không rõ, nhân tế bào lớn nhỏ, nhiễm sắc thể thô đậm, có hình nhân chia. Có nơi tế bào u xâm nhập lòng mạch.

BÀN LUẬN

Thực tế, phát triển các mô hình ung thư phục vụ nghiên cứu và thử nghiệm điều trị tại Việt Nam còn nhiều hạn chế. Có thể thấy, việc xây dựng mô hình mới chỉ dừng ở mức độ tế bào hoặc ung thư động vật (như sarcoma 180) của Nguyễn Đình Tảo (1994) [2], Nguyễn Thị Quý (2004) [1]. Do vậy, việc đánh giá và lượng hóa hiệu quả của các phương pháp phát hiện và điều trị ung thư cho người còn nhiều hạn chế. Trước yêu cầu thực tế cần đánh giá hiệu lực điều trị của các sản phẩm có khả năng ức chế phát triển của khối u, cần thiết phải có mô hình tạo khối ung thư người mang đặc tính sinh học, bản chất là TBUT của người được ghép và phát triển trên cơ thể động vật sống.

Đề tài đã lựa chọn TBUT và chuột nude làm mô hình tạo khối ung thư vú. Dòng TBUT vú người BT 474 (mã đăng ký: HBT-20) do công ty ATCC (American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA) cung cấp. Tế bào này có nguồn gốc tế bào biểu mô tuyến khối ung thư vú của một phụ nữ 60 tuổi, da trắng do E. Lasfargues và W.G. Coutinho phân lập. Dòng tế bào này được nuôi cấy, tăng sinh và phát triển tốt trong môi trường nuôi cấy tại Việt Nam, phục vụ cho thử nghiệm in vitro cũng như in vivo nhằm tạo khối ung thư vú người trên chuột nude. Chuột nude được nhập khẩu và chăm nuôi trong điều kiện môi trường đảm bảo phát triển bình thường, đồng thời, không gây bệnh cho chuột, do đã kiểm soát toàn bộ các yếu tố đưa vào môi trường nuôi như độ ẩm, không khí, vô khuẩn, nước và thức ăn...

Đề tài đã tạo thành công khối ung thư vú người trên chuột nude. 100% chuột sau ghép tế bào đã hình thành khối ung thư tại vị trí ghép. Các hình ảnh mô bệnh học cho thấy hình ảnh điển hình của ung thư biểu mô, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới với tỷ lệ thành công cao (91 - 100%) khi ghép TBUT người vào cơ thể chuột nude [5, 6, 8].

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu ghép tạo khối ung thư trên 10 chuột nude, chúng tôi rút ra kết luận: Đã tạo thành công khối ung thư bằng ghép TBUT vú người dòng BT 474 trên chuột nude bằng kỹ thuật ghép dị loài xenograft.

Tỷ lệ tạo thành công khối ung thư trên chuột 100%. Kích thước khối ung thư điển hình phát triển đạt 600 mm³ sau 4 tuần ghép tế bào với hình ảnh mô bệnh học. Kết quả nghiên cứu này đã xây dựng thành công mô hình ung thư vú người trên động vật thiếu hụt miễn dịch, đáp ứng tốt trong điều kiện thực tế nghiên cứu về ung thư tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Quỳnh, Trần Công Yên, Nguyễn Bích Thu, Phạm Kim Mãn. Áp dụng phương pháp SRB thử tác dụng của cây cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance) đến sự tăng sinh của một số dòng TBUT in vitro). Tạp chí Sinh học. 2001, 23, 3a, pp.220-226.
2. Nguyễn Đình Tảo. Nghiên cứu tác dụng của phylamin tới thay đổi hình thái, cấu trúc và chức năng đại thực bào trong ung thư thực nghiệm sarcom 180. Luận án Phó Tiến sỹ Y học. Học viện Quân y. Hà Nội. 1994.
3. Fogh J, Giovanella BC. The Nude mouse in experimental and clinical research (Vol.2). Academic Press. 1982.
4. Fu XY, Besterman J M, Monosov J M, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. Proc Natl Acad Sci. 1991, 88, pp.9345-9349.
5. Houchens DP, Ovejera AA, Sylva M. Riblet SM, Slagel DE. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. Euro J Can Clin Onco. 1983, 19, pp.799-805.
6. Illert BB, Otto C, Braendlein S, Thiede A, Timmermann W. Optimization of a metastasizing human gastric cancer model in nude mice. Microsurgery. 2003, 5, pp.508-512.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012