

HIỆU QUẢ KHÁNG UNG THƯ CỦA VIRUS VACCIN SỞI TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT THIẾU HỤT MIỄN DỊCH MANG KHỐI UNG THƯ PHỔI NGƯỜI

Nguyễn Thị Mỹ Thành^{1,4}, Ngô Thu Hằng², Lê Duy Cường³
Nguyễn Văn Đô⁴, Nguyễn Lĩnh Toàn^{2,✉}

¹Đại học Y Khoa Vinh

²Học viện Quân y

³Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

⁴Trường Đại học Y Hà Nội

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả kháng ung thư của virus vaccin sởi trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi người (dòng H460). Virus vaccin sởi (MeV) được tách dòng từ vaccin Priorix (Glaxosmith Kline, Anh) và tăng sinh trong phòng thí nghiệm. Chuột thiếu hụt miễn dịch (nude mouse, Hoa Kỳ) 6 - 8 tuần tuổi, số lượng 20 con, được tiêm ghép 106 tế bào H460 (ATCC, Hoa Kỳ) vào dưới da đùi sau để tạo khối ung thư phổi người trên chuột nude. Khi khối u có kích thước khoảng 50 - 70mm³ (sau 10 ngày ghép), chuột được chia thành 2 nhóm (10 con/nhóm), nhóm điều trị được tiêm trực tiếp MeV vào khối u với liều 107 CFU/con, 2 lần/tuần, trong 3 tuần liên tiếp, nhóm chứng tiêm dung dịch PBS. Nhóm chuột mang khối ung thư phổi người H460 được điều trị bằng MeV có thể tích khối u nhỏ hơn, thời gian sống dài hơn và tỉ lệ chuột chết ít hơn so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu cho thấy MeV có hiệu quả kháng ung thư phổi người trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư ghép dị loài.

Từ khóa: Virus vaccin sởi, ung thư phổi, chuột thiếu hụt miễn dịch.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Globocan 2020, Ung thư phổi (Lung cancer) là bệnh ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ hai và là nguyên nhân gây tử vong do ung thư hàng đầu. Ước tính năm 2020 có khoảng 2,2 triệu ca ung thư mới và 1,8 triệu ca tử vong do ung thư phổi. Ung thư phổi một gánh nặng rất lớn cho sức khỏe toàn cầu. Ung thư phổi là loại ung thư có tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong do ung thư cao nhất ở nam giới. Và tỷ mắc cao thứ 3 sau ung thư vú và ung thư đại trực tràng ở nữ giới.¹ Tỷ lệ tử vong do ung thư phổi ở nữ giới chiếm thứ 2 sau ung thư vú.¹ Thách thức lớn nhất trong

điều trị ung thư phổi là do chẩn đoán ở giai đoạn muộn và tính không đồng nhất ở mô bệnh học làm hiệu quả điều trị thấp, tỷ lệ sống trên 5 năm cho tất cả các giai đoạn dưới 20%.³ Virotherapy Oncolytic (OV) là một phương thức điều trị ung thư mới, dựa trên nguyên lý sinh trưởng và phát triển của virus: xâm nhập có chọn lọc vào tế bào ung thư người, sử dụng vật liệu di truyền của tế bào vật chủ để sao chép, nhân lên, ly giải tế bào ung thư người tạo ra các hạt virus mới, tiếp tục xâm nhập và phá hủy các tế bào ung thư tại mô u theo cơ chế tương tự. Mặt khác, kích thích miễn dịch của vật chủ chống lại mô ung thư.^{4,5} Chủng Edmonston của virus vaccin sởi (MeV) được chứng minh có khả năng xâm nhập đặc hiệu vào tế bào ung thư qua thụ thể CD46 và tiếp tục nhân lên trong tế bào ung thư. Sau khi nhân lên trong tế bào ung thư, các tế bào nhiễm

Tác giả liên hệ: Nguyễn Lĩnh Toàn

Học viện Quân y

Email: toannl@vmmu.edu.vn

Ngày nhận: 02/08/2022

Ngày được chấp nhận: 31/08/2022

virus hình thành các hợp bào, sau đó ly giải gây tan tế bào ung thư nhiễm virus. Các virus phát tán, tiếp tục gây nhiễm tế bào ung thư khác và tiêu diệt các tế bào ung thư một cách tự nhiên đồng thời giải phóng các phân tử kháng nguyên ung thư kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại ung thư.^{4,5,6} Tại Việt Nam có các nghiên cứu chứng minh hiệu quả của virus vaccin sởi trên thực nghiệm đối với ung thư đại trực tràng, ung thư đầu mặt cổ nhưng chưa có nghiên cứu nào về tác dụng của MeV đối với ung thư phổi.^{7,8,9} Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục đích: “Đánh giá hiệu quả kháng ung thư phổi người trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư ghép dị loài”.

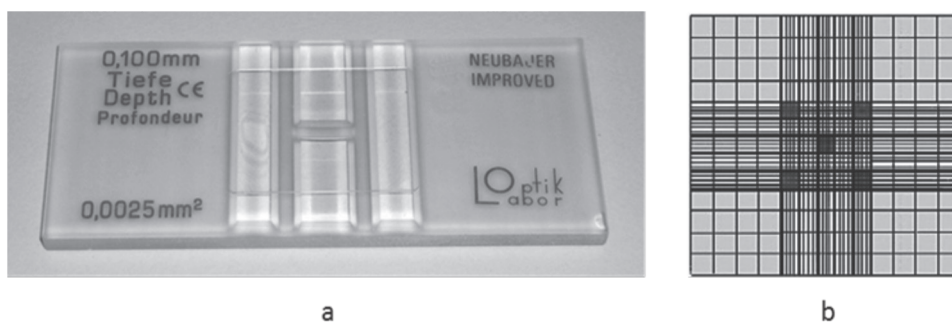
II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tế bào thận khỉ (tế bào Vero): Tế bào Vero

được nuôi cấy bằng môi trường M199, dùng để hoạt hóa và tăng sinh virus sởi.

Tế bào ung thư phổi người dòng H460 (ATCC, Hoa Kỳ): Nuôi cấy, tăng sinh, hoạt hoá tế bào trong phòng thí nghiệm bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1460 (thêm 10% Foetal Bovine Serum, 1% glutamine và 1% Penicillin và Streptomycin), duy trì tế bào ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Tế bào được thay môi trường 2 lần mỗi tuần. Mỗi chai nuôi cấy có diện tích 75 cm². Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích chai nuôi thì tiến hành cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới với tỷ lệ 1:3. Thu hoạch tế bào ung thư H460 trong chai nuôi bằng Trypsin EDTA, sau đó li tâm loại bỏ môi trường thu tế bào. Nồng độ tế bào ung thư H460 sau thu hoạch được quy về nồng độ 10⁷ tế bào/ml bằng cách sử dụng buồng đếm Neubauer (Hình 1) và kính hiển vi quang học.



Hình 1. Hình ảnh buồng đếm Neubauer

(a). Buồng đếm nhìn bằng mắt thường; (b). Buồng đếm nhìn trên kính hiển vi.

Công thức tính mật độ tế bào trong môi trường bằng buồng đếm Neubauer:

$$A = \frac{a.n.10^4}{4}$$

Trong đó:

- A - Số tế bào trong 1 ml;
- a - Số tế bào trong 4 ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 mm²;
- n - Hệ số pha loãng

Virus vaccin sởi sống, giảm độc lực (MeV): MeV có nguồn gốc từ vaccin Priorix (Glaxosmith Kline, Anh), được tăng sinh, hoạt hoá bằng tế bào Vero, thu hoạch MeV, chuẩn độ MeV đạt 10⁷ CFU/ml.

Chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude): 20 chuột nude, 6 - 8 tuần tuổi (Sigma Hoa Kỳ) được nuôi trong phòng sạch, đảm bảo vô khuẩn, độ ẩm, ánh sáng nhịp ngày đêm theo tiêu chuẩn.

2. Phương pháp

Tạo khối ung thư phổi người trên chuột thiếu hụt miễn dịch

Tạo khối ung thư phổi người bằng cách tiêm 0,1 ml dung dịch tế bào H460 nồng độ 10^7 tế bào/ml (10^6 tế bào/chuột) vào dưới da đùi chuột nude. Theo dõi, đo kích thước khối u 2 ngày/1 lần bằng thước kẹp NSK. Khoảng 10 ngày sau tiêm, kích thước khối u phát triển đạt 50 - 70 mm³, 20 chuột mang khối u được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm (10 con/1 nhóm).

Phương pháp điều trị ung thư phổi người trên chuột thiếu hụt miễn dịch

- *Nhóm MeV*: Tiêm MeV trực tiếp vào vùng rìa của khối u, liều điều trị là 0,1ml 10^7 CFU/con, 2 lần /1 tuần, trong 3 tuần.

- *Nhóm chứng*: Tiêm trực tiếp dung dịch PBS 1X vào khối u, liều điều trị 2 lần /1 tuần, trong 3 tuần.

Thực hiện các bước thí nghiệm trên chuột

tuân theo hướng dẫn sử dụng và chăm sóc động vật thí nghiệm.

Phương pháp đánh giá thể tích khối u

Dùng thước kẹp NSK đo kích thước khối u, 2 lần/1tuần.

Công thức tính thể tích khối u:

$$V = (D \times R^2) \times 0,5$$

Trong đó:

- V-thể tích khối u (mm³);
- D-chiều dài của khối u (mm);
- R-chiều rộng của khối u (mm).

3. Xử lý số liệu

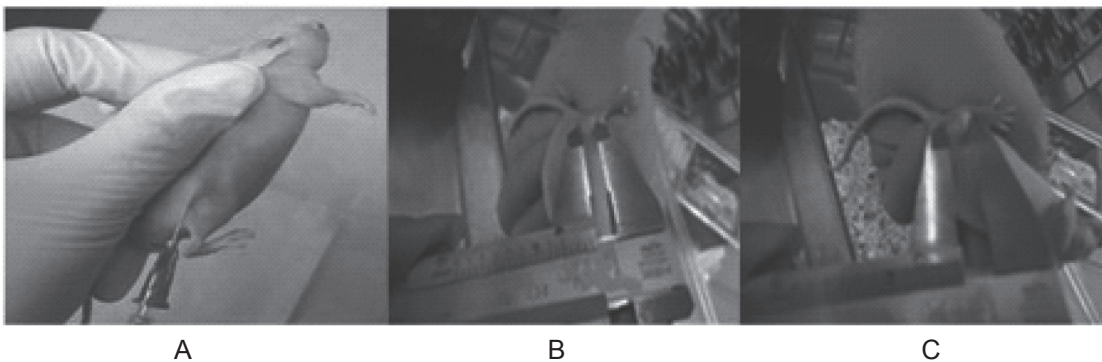
Sử dụng mềm thống kê SPSS.20, dùng phép kiểm định T. Test so sánh 2 giá trị trung bình, phép kiểm định independent-samples median test kiểm định trung vị giữa các nhóm, Kaplan-Meier phân tích thời gian sống, tỉ lệ chuột chết sau điều trị bằng MeV. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả tạo khối ung thư phổi người dòng tế bào H460 trên đùi chuột nude

Bảng 1. Kết quả theo dõi xuất hiện khối ung thư phổi người dòng tế bào H460 trên đùi chuột nude

Số ngày sau tiêm tế bào H460	Ngày thứ 1	Ngày thứ 4	Ngày thứ 7	Ngày thứ 10
Các chỉ số theo dõi	(n = 20)	(n = 20)	(n = 20)	(n = 20)
Số chuột có u (con)	0	12	20	20
Tỷ lệ có u (%)	0	60	100	100



Hình 2. (A) Hình ảnh tiêm tế bào H460 tạo khối ung thư phổi người trên chuột nude; (B, C) đo kích thước khối ung thư trên chuột nude bằng thước kẹp NSK

Ngày thứ tư sau tiêm ghép tế bào H460 có 12/20 (60%) chuột có khối u tại vị trí tiêm tế bào ung thư, ngày thứ 7 có 20/20 (100%) có khối u phát triển, ngày thứ 10 có 20/20 (100%) chuột khối u phát triển to rõ rệt (Bảng 1). Tiến hành đo kích thước khối u (Hình 2), cân trọng lượng chuột và khảo sát toàn bộ các chỉ tiêu

theo dõi chuột. Ngày thứ 10 sau ghép tế bào tạo khối ung thư phổi, thể tích khối u đạt 50 - 70 mm³, chuột được phân chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm điều trị bằng MeV (n = 10 con) và nhóm chứng (n = 10 con). Thời gian điều trị MeV là 3 tuần. Sau đó tiếp tục theo dõi thêm thời gian sống thêm ở mỗi nhóm.

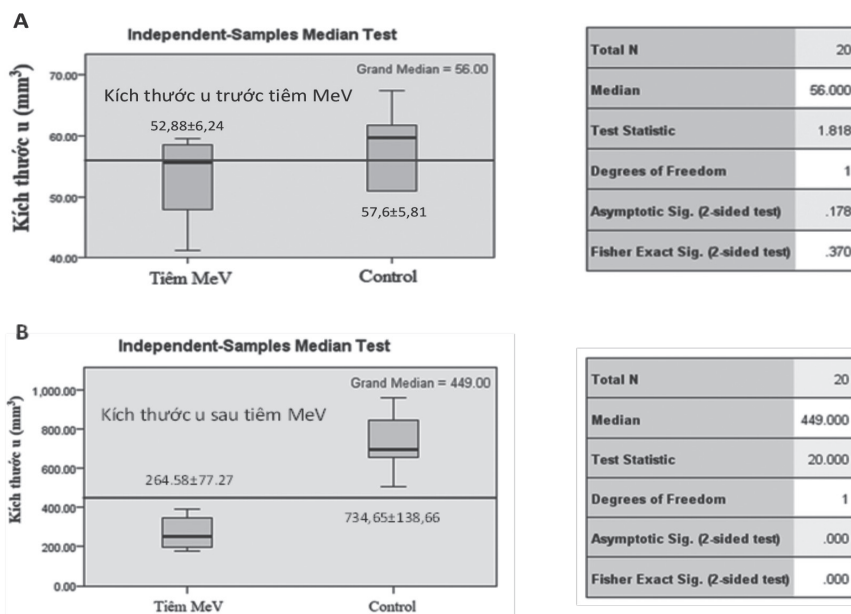
Bảng 2. Kết quả theo dõi sức khỏe chuột trước và sau điều trị MeV

Tiêu chí theo dõi	Trước điều trị		Sau điều trị 4 tuần	
	Mức độ đánh giá		Mức độ đánh giá	
	Bình thường	Kém	Bình thường	Kém
Vận động	20 Con	0	20 Con	0
Đáp ứng với kích thích	20 Con	0	20 Con	0
Phân chuột	20 Con	0	20 Con	0
Da chuột	20 Con	0	20 Con	0

Các tiêu chí đánh giá như vận động, đáp ứng với kích thích, tình trạng phân, da chuột cho thấy 20/20 (100%) đều bình thường, không khác biệt ở thời điểm trước điều trị so với sau khi kết thúc điều trị 3 tuần.

2. Kết quả điều trị ung thư phổi người trên chuột nude bằng MeV

Kết quả kích thước u trước và sau điều trị MeV

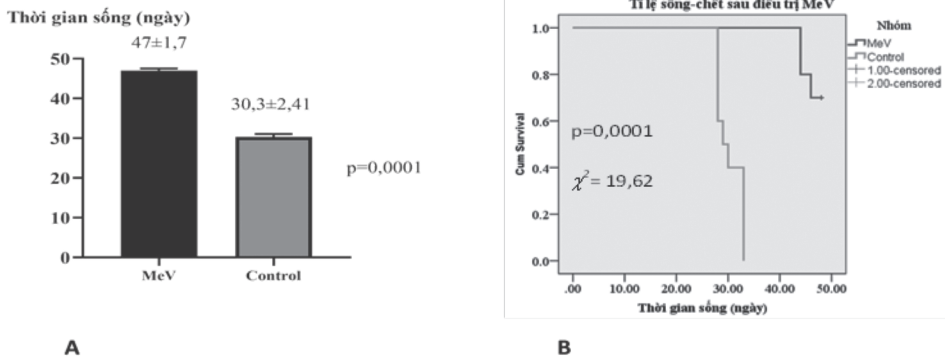


Hình 3. Kết quả thể tích khối u (mm³) trước và sau điều trị MeV

- Trước điều trị bằng MeV thể tích khối u ở 2 nhóm nghiên cứu khác biệt không có ý nghĩa thống kê, ($52,88 \pm 6,24 \text{ mm}^3$ so với $57,6 \pm 5,81 \text{ mm}^3$, $p = 0,178$).

- Sau điều trị ở ngày thứ 28, thể tích khối u ở nhóm điều trị bằng MeV nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng ($264,58 \pm 77,27$ và $734,65 \pm 138,66 \text{ mm}^3$, $p = 0,001$).

Kết quả thời gian sống, tỉ lệ chết của chuột nude sau điều trị MeV



Hình 4 Kết quả thời gian sống và tỉ lệ chết của chuột sau điều trị bằng MeV

Sau thời gian điều trị, thời gian sống trung bình của chuột nude ở nhóm điều trị bằng MeV ($47 \pm 1,7$ ngày) dài hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($30,3 \pm 2,41$ ngày) với $p = 0,0001$ (Hình 4A). Tỉ lệ chuột mang khối

ung thư còn sống ở nhóm tiêm MeV (7/10 con, 70%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (1/10 con, 10%) với $p = 0,0001$, $c^2 = 19,62$ (Hình 4B).

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ mọc u 100% sau 7 ngày ghép tế bào ung thư phổi người dòng H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch, không có chuột nào chết do lỗi kỹ thuật. Xu hướng sử dụng virus trong trị liệu một số loại ung thư ngày càng được quan tâm nhiều hơn. Trong đó MeV một loại virus sống giảm độc lực, có nguồn gốc tách từ vaccin sởi. Chủng MeV đã được sử dụng trong chương trình tiêm chủng mở rộng hơn 50 năm qua, đảm bảo tính an toàn cao. Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của virus vaccin sởi là do MeV xâm nhập vào tế bào ung thư phổi đặc hiệu qua thụ thể CD46. Các tế bào ung thư phổi biểu lộ cao thụ thể CD46 trong khi các tế bào bình thường biểu lộ rất thấp thụ thể CD46, làm cho MeV không lây nhiễm vào các

tế bào bình thường. Sử dụng nhiều loại tế bào biểu lộ thụ thể CD46 từ thấp đến cao, người ta đã xác định khả năng lây nhiễm virus sởi tăng lên theo số lượng thụ cảm thể. Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của MeV: xâm nhập đặc hiệu qua thụ thể CD46 hoặc nectin 4, hình thành các hợp bào và thúc đẩy quá trình chết theo chương trình (apoptosis). Tiêm MeV vào khối u sẽ tạo ra phản ứng miễn dịch mạnh mẽ tại khối u do giải phóng các phân tử tín hiệu nguy hiểm từ quá trình chết tế bào (DAMP) và các phân tử tín hiệu mầm bệnh (PAMP) như ARN sợi đơn của virus sởi hoặc các mảnh vỡ từ tế bào ung thư chết như một nguồn kháng nguyên ung thư kích thích miễn dịch chống lại mô u.^{4,5} Trong nghiên cứu này, để đánh giá hiệu quả của MeV

đối với ung thư phổi người *in vivo*, chúng tôi đã tạo khối ung thư bằng ghép tế bào H460 dưới da đùi chuột nude, phù hợp cho đánh giá hiệu quả kháng ung thư của liệu pháp MeV bằng tiêm trực tiếp khối u, gia tăng khả năng virus tiếp xúc và thâm nhập vào tế bào khối ung thư. Kết quả cho thấy, MeV làm khối u chậm phát triển bắt đầu từ ngày thứ 4 sau tiêm, thể tích khối u ở nhóm điều trị bằng MeV phát triển chậm rõ rệt so với nhóm chứng ($264,58 \pm 77,27$ so với $734,65 \pm 138,66 \text{ mm}^3$) ($p = 0,001$) (Hình 3A). Thời gian sống trung bình của nhóm chuột nude mang khối ung thư người được điều trị bằng MeV là $47 \pm 1,7$ ngày, dài hơn rõ rệt so với nhóm chứng ($30,3 \pm 2,41$ ngày), ($p = 0,0001$). Tỷ lệ chuột còn sống (sau 48 ngày theo dõi) ở nhóm tiêm MeV (70% còn sống) cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p = 0,0001$, $c^2 = 19,62$) so với nhóm chứng (10% còn sống) (Hình 4B).

Khả năng virus nhân lên trong quá trình phát triển, các tế bào ung thư nhiễm MeV có thể tạo thành hợp bào và tan vỡ. Các virus mới giải phóng khỏi tế bào, có thể lây nhiễm các tế bào ung thư khác tạo ra hoạt động kháng ung thư đối với tế bào đích và “bắt kịp” với quá trình tăng sinh của tế bào ung thư. Do đó, hầu hết các khối u được điều trị bằng MeV đã cho thấy giảm và không phát triển kích thước. Kết quả của chúng tôi phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác sử dụng MeV điều trị ung thư như: Lê Duy Cương và cộng sự cũng cho thấy MeV có hiệu quả kháng u tế bào đại tràng người dòng HT-29 trên mô hình chuột nude;^{5,6} Nguyen Linh Toan và cộng sự (2018) cũng chứng minh MeV phối hợp với Nimotuzumab tiêm trực tiếp vào khối u tế bào ung thư thanh quản người (dòng tế bào Hep 2) trên chuột nude có hiệu quả kháng u rất rõ rệt.⁸

Theo nhiều nghiên cứu trước đây, chúng tôi sử dụng liều 10^7 CFU virus và liệu trình điều trị như vậy là cần thiết để đạt được thoái lui khối

u.^{5,6} Hiệu quả kháng ung thư phổi đạt được trong kết quả nghiên cứu này và với lịch sử được sử dụng trong chương trình tiêm chủng mở rộng hơn 50 năm cho thấy virus vaccin sởi là một virus giảm độc lực, an toàn có khả năng dùng điều trị ung thư ở người nói chung và ung thư phổi nói riêng. Đây có thể là một chiến lược có tiềm năng trong điều trị ung thư phổi ở người.

V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh virus vaccin sởi có hiệu quả kháng ung thư phổi người dòng H460 trên mô hình chuột nude mang khối ung thư phổi người. Kết quả cho thấy là sau 3 tuần điều trị bằng MeV và theo dõi đến ngày thứ 48, chuột ung thư phổi có thể tích khối ung thư nhỏ hơn, thời gian sống dài hơn và tỷ lệ chết ít hơn rõ rệt so với nhóm chứng không điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249.
2. Guo ZS, Liu Z, Bartlett DL. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity. *Front Oncol.* (2014) 4: 74. 10.3389/fonc.2014.00074.
3. Fen Wang, Shubin Wang, and Qing Zhou. The Resistance Mechanisms of Lung Cancer Immunotherapy. *Front Oncol.* 2020; 10: 568059. Published online 2020 Oct 20. doi: 10.3389/fonc.2020.568059.
4. Krysko, D.V.; Garg, A.D.; Kaczmarek, A.; Krysko, O.; Agostinis, P.; Vandenabeele, P. Immunogenic cell death and damp in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12, 860-875.
5. Jean-Baptiste Guillerme, Marc Gregoire, Frédéric Tangy; Jean-François Fonteneau.

Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV). *Biology* 2013, 2(2), 587-602; <https://doi.org/10.3390/biology2020587>

6. Vandeborne L, Pantziarka P, Van Nuffel AMT, Bouche G. Repurposing Infectious Diseases Vaccines Against Cancer. *Front Oncol.* 2021 May 13; 11: 688755. doi: 10.3389/fonc.2021.688755. eCollection 2021. PMID: 34055652 Free PMC article. Review.

7. Lê Duy Cường, Hồ Anh Sơn, Ngô Thu Hằng và cộng sự. Tác dụng kháng ung thư của virus vaccine sởi và quai bị dùng phối hợp trên

chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư đại trực tràng người. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, 2018, 3: 38-44.

8. Nguyen Linh Toan, Ngo Thu Hang, Nguyen Kim Luu et al. Combination of Vaccine Strain Measles Virus and Nimotuzumab in the Treatment of Laryngeal Cancer. *Anticancer research*; 2018; 39: 3727-3737.

9. Manish R. Patel, Blake A. Jacobson, Holly Belgum, et al. Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol*; 2014; 9: 1101-1110.

Summary

ANTI-CANCER EFFICACY AGAINST HUMAN LUNG TUMORS ON NUDE MICE MODEL OF MEASLES VACCINE VIRUS

This study aims to evaluate the anti-cancer effect of the measles virus vaccine on immunodeficient mice bearing human lung tumors (H460 cell line). The measles vaccine (MeV) was isolated from the Priorix vaccine (Glaxosmith Kline, UK). Twenty nude mice, USA, aged six to eight week-old, were injected subcutaneously into hind thighs with 10^6 H460 cells (ATCC, USA). When the tumor size reached 50 - 70 mm³ (post-transplant of ten days), the mice were divided randomly into two groups (10 mice/group). The treatment group was injected directly into the tumors by MeV with a dose of 10^7 CFU/mouse twice weekly for three weeks, and the control group was injected into the tumors by PBS. The virus-treated group had a smaller volume of tumors, a longer survival time, and a lower mortality rate than the control group ($p < 0.05$). The results indicated that MeV had anti-cancer efficacy against human lung cancer on immunodeficient mouse model bearing xenograft tumors.

Keywords: Measles virus vaccine, lung cancer, nude mice.