

NGHIÊN CỨU TẠO MÔ HÌNH CHUỘT MANG KHỐI U GHÉP BẰNG TẾ BÀO HT29 HYPER-IL-6

Nguyễn Như Ngọc^{1,2}, Nguyễn Thị Mai Ly³, Nguyễn Thanh Toàn²
Nguyễn Lĩnh Toàn^{1,4} và Bùi Khắc Cường^{1,4,✉}

¹Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 175

³Bệnh viện Quân y 103

⁴Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tín hiệu IL-6/STAT3 giữ vai trò quan trọng trong tiến triển ung thư đại trực tràng. Ức chế chọn lọc IL-6 trans-signaling là hướng tiếp cận tiềm năng nhưng còn thiếu mô hình tiền lâm sàng phù hợp để đánh giá. Vì vậy chúng tôi tiến hành xây dựng mô hình chuột mang khối u đại trực tràng biểu hiện tăng cường IL-6, nhằm cung cấp nền tảng khảo sát sinh học con đường tín hiệu IL-6. Mô hình xenograft được thiết lập trên chuột BALB/c “nude” bằng cách tiêm dưới da hông lưng chuột 3x10⁶ tế bào HT29 hyper IL-6; kích thước khối u theo dõi định kỳ 3 ngày/lần. Khi kết thúc, mô được phân tích mô bệnh học (H&E) và IHC (p40, CDX-2). Mô hình tạo được khối u sờ thấy trong 4 ngày, khối u tăng trưởng đều gấp đôi sau 3 ngày. IHC cho thấy âm tính p40 và dương tính CDX-2 xác nhận nguồn gốc biểu mô tuyến đại trực tràng và tính liên quan của mô hình đối với CRC người. Từ đó, nghiên cứu đã tạo thành công mô hình xenograft ở chuột “nude” với khối u đại trực tràng tăng cường biểu hiện IL-6, mô bệnh học và nhuộm hóa mô miễn dịch cho kết quả xác nhận khối u ung thư đại trực tràng điển hình.

Từ khoá: Ung thư đại trực tràng, hyper IL-6, trans-signaling, HT29, xenograft.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng vẫn là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây mắc bệnh và tử vong do ung thư trên toàn cầu, với tỷ lệ mắc đang gia tăng, đặc biệt ở các nền kinh tế đang phát triển.¹ Tình trạng viêm mạn tính đã nổi lên như một yếu tố then chốt góp phần vào khởi phát và tiến triển của ung thư đại trực tràng, trong đó cytokin tiền viêm interleukin-6 (IL-6) được xác định là chất trung gian chủ chốt.^{2,3} IL-6 phát huy tác dụng sinh ung thư chủ yếu thông qua hoạt hóa trục Janus kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), thúc đẩy tăng sinh tế bào, sống còn, tạo mạch và né

tránh miễn dịch.³⁻⁵ Con đường tín hiệu cổ điển thông qua thụ thể IL-6R gắn màng có vai trò điều hòa miễn dịch và cân bằng mô, còn con đường chuyển tín hiệu, được khởi động bởi phức hợp IL-6/sIL-6R gắn với gp130, biểu hiện quá mức được chứng minh có liên quan đến cơ chế bệnh sinh và tiến triển của nhiều bệnh ác tính, có cả ung thư đại trực tràng.^{6,7}

Các mô hình chuột tiền lâm sàng đóng vai trò then chốt trong việc đánh giá hiệu quả và độ an toàn *in vivo* của các tác nhân điều trị mới.⁸ Mô ghép dị loài (*xenograft*) khối u người trên chuột suy giảm miễn dịch đã được sử dụng rộng rãi để mô phỏng các khía cạnh chủ chốt của sự phát triển khối u, tương tác vi môi trường và đáp ứng điều trị. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mô hình *xenograft* được tạo bằng cách tiêm dưới da các tế bào ung thư đại trực tràng HT29 biểu hiện ổn định cao IL-6 vào vùng

Tác giả liên hệ: Bùi Khắc Cường

Học viện Quân y

Email: buikhaccuong@gmail.com

Ngày nhận: 13/12/2025

Ngày được chấp nhận: 11/01/2026

hông lượng của chuột BALB/c “nude”. Mô hình này cho phép khảo sát hành vi khối u phụ thuộc IL-6 trans-signaling *in vivo*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Dòng tế bào ung thư đại trực tràng người HT29 (HTB-38- ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Hoa Kỳ) được lưu trữ tại labo Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y.

Mười chuột cái BALB/c “nude” suy giảm miễn dịch, 6 tuần tuổi, nặng 18 - 22g, được nhập từ BioLASCO Taiwan Co., Ltd. Các chuột này thiếu tế bào lympho T chức năng do đột biến gen Foxn1, phù hợp cho cấy ghép dị loài (*xenograft*) tế bào khối u người mà không bị thải ghép.

2. Phương pháp

Nuôi cấy tế bào

Tế bào được nuôi trong môi trường DMEM, bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FBS) và 1% penicillin-streptomycin. Dòng tế bào ung thư đại trực tràng HT29 được chuyển nạp plasmid Hyper-IL-6 bằng bộ kit Effectene® Transfection (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 24 giờ chuyển nạp, tế bào được chọn lọc với blasticidin 10 µg/mL trong hai tuần.

Khi tế bào phát triển đạt mật độ khoảng 80% diện tích đáy đĩa nuôi thì tách chuyển tế bào sang một đĩa nuôi cấy mới nhằm tăng sinh tế bào. Khi lượng tế bào đủ lớn, tách và đếm tế bào, điều chỉnh về 3×10^7 tế bào/ml MTNC để chuẩn bị cho ghép chuột.

Đánh giá biểu hiện gen chuyển nạp bằng qPCR

Tổng RNA tế bào được tách chiết bằng bộ BioFact™ Total RNA Prep Kit, Hàn Quốc sau đó định lượng nồng độ RNA tổng số bằng NanoDrop. Tạo cDNA bằng cDNA Synthesis Kit của hãng Biotechrabbit, Đức. Gen nội chuẩn

là GAPDH. Mỗi sử dụng như sau: GAPDH, Hyper-IL-6:

GAPDH-F: 5'- ACA TGT TCC AAT ATG ATTCC - 3'

GAPDH-R: 5'- TGG ACT CCA CGA CGT ACTCA - 3'

Hyper-IL6-F: 5'- GGC ACG CCT TGG ACA GAATC - 3'

Hyper-IL-6-R: 5'- GGC GGC TAC ATC TTT GG AATC - 3'

Chu trình nhiệt gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 10 phút, tiếp theo 45 chu kỳ gồm: 95°C trong 15 giây (biến tính), 62°C trong 30 giây (bắt cặp), và 72°C trong 30 giây (kéo dài). Chu trình cuối cùng gồm 95°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây và 95°C trong 30 giây. Tất cả phản ứng được thực hiện trên hệ thống Agilent AriaDx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Singapore). Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) được phần mềm của thiết bị tự động xác định.

Thiết lập mô hình xenograft

Chuột được nuôi trong điều kiện sạch không mầm bệnh (SPF) trong lồng thông khí riêng, được ăn uống tự do. Sau khi chuẩn bị đủ tế bào, tổng cộng 3×10^6 tế bào ung thư đại trực tràng người HT29 Hyper-IL-6 được pha trong 100µL MTNC (DMEM) và tiêm dưới da vào vùng hông lưng mỗi con chuột bằng kim 27G. Theo dõi sức khỏe chuột và quá trình phát triển u hàng ngày, đo kích thước và cân nặng chuột được tiến hành mỗi 3 ngày/ lần.

Mô bệnh học và hóa mô miễn dịch

Mô khối u và các cơ quan được thu tại thời điểm kết thúc (sau 3 tuần), cố định trong formalin đệm trung tính 10%, đúc paraffin và cắt lát dày 3 - 5µm để phân tích mô học. Nhuộm hematoxylin-eosin (H&E) được thực hiện cho mô bệnh học thường quy. Đối với hóa mô miễn dịch, các lát cắt được khử paraffin, tái hydrat hóa và thu hồi kháng nguyên bằng đệm citrat (pH 6,0).

Nhuộm hóa mô miễn dịch được tiến hành bằng các kháng thể đơn dòng đã pha sẵn của Roche (Ventana Medical Systems) nhắm các dấu ấn: CDX-2 (clone EPR2764Y), p40 (clone SP225). Ủ kháng thể sơ cấp được thực hiện trên hệ thống nhuộm tự động Ventana BenchMark XT theo quy trình của nhà sản xuất. Phát hiện được tiến hành bằng bộ ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche), sau đó nhuộm đối màu hematoxylin. Các phiến kính được quan sát dưới kính hiển vi quang học; cường độ và phân bố nhuộm được hai chuyên gia Giải phẫu bệnh quan sát độc lập, làm mù, đánh giá định tính.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm SD. Kiểm định T-test được sử dụng để so sánh giữa các nhóm trong thử nghiệm. Giá trị $p < 0,05$ được chấp nhận là tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

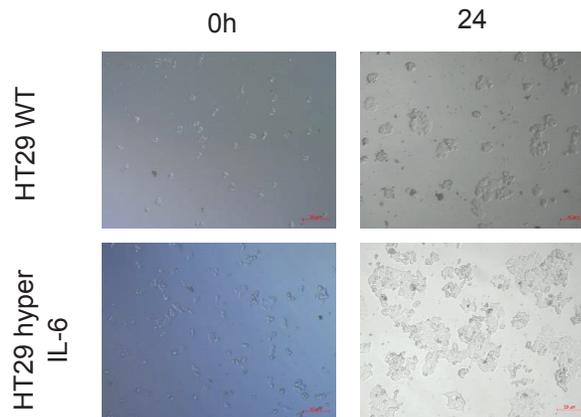
3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội Đồng Y đức của Học viện Quân y theo Quyết định số 424/QĐ-HVQY ngày 08/02/2022. Số liệu nghiên cứu được Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

1. Nuôi cấy tế bào để ghép chuột

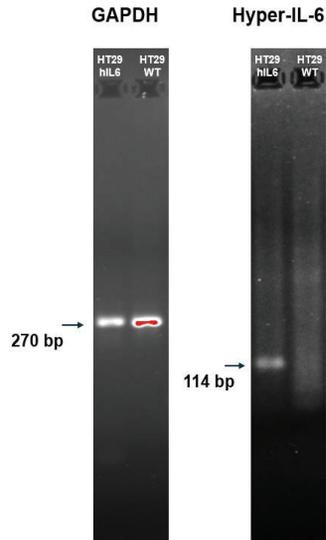
Tế bào HT29 được chuyển nạp plasmid Hyper-IL-6 và sau đó được chọn lọc bằng blasticidin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sau 14 ngày, tất cả tế bào không chuyển nạp bị loại bỏ, trong khi các dòng chuyển nạp vẫn sống và tăng sinh. Tế bào chuyển nạp tăng sinh nhanh trong 24 giờ, khả năng phát triển, lan rộng khắp bề mặt đĩa nuôi cấy nhanh hơn so với dòng HT29 ban đầu (Hình 1). Khi mật độ tế bào biểu hiện hyper IL-6 đạt 80% được tách sang đĩa T75 nhân lên để chuẩn bị ghép chuột.



Hình 1. Ảnh đại diện của tế bào HT29 kiểu hoang dại (WT) và tế bào HT29 Hyper-IL-6. Vật kính 10X, thang tỷ lệ: 50 μm

Để xác nhận sự tích hợp và biểu hiện thành công, RNA total được tách chiết và tạo cDNA, sau đó thực hiện qPCR với cặp mồi đặc hiệu vùng nối (junction) bắc qua IL-6 và siL-6R. Thiết kế này đảm bảo khuếch đại chọn lọc gen

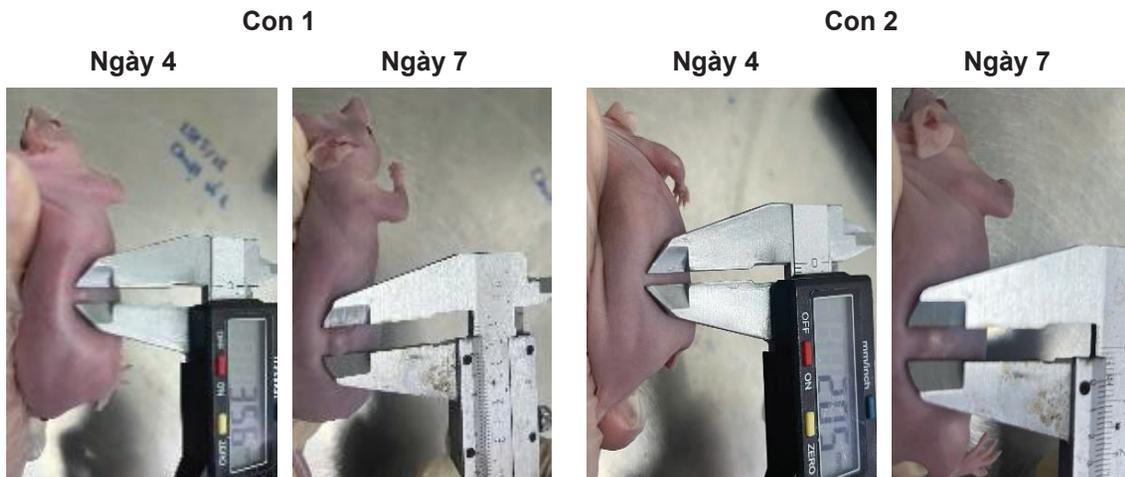
chuyển nạp mà không phát hiện mRNA IL-6 hoặc siL-6R nội sinh. Sản phẩm khuếch đại có kích thước dự kiến được ghi nhận ở các dòng chuyển nạp (114bp) nhưng không thấy ở tế bào HT29 ban đầu (WT) (Hình 2).



Hình 2. Ảnh điện di gel sản phẩm RT-qPCR cho thấy sự biểu hiện Hyper-IL-6 thành công trong các tế bào HT29 đã chuyển nạp. Thiết lập thành công mô hình xenograft ung thư đại trực tràng người

Tiêm dưới da tế bào ung thư đại trực tràng HT29 Hyper-IL-6 vào vùng hông lưng chuột BALB/c “nude” để tạo khối u. Khối u nhìn, sờ

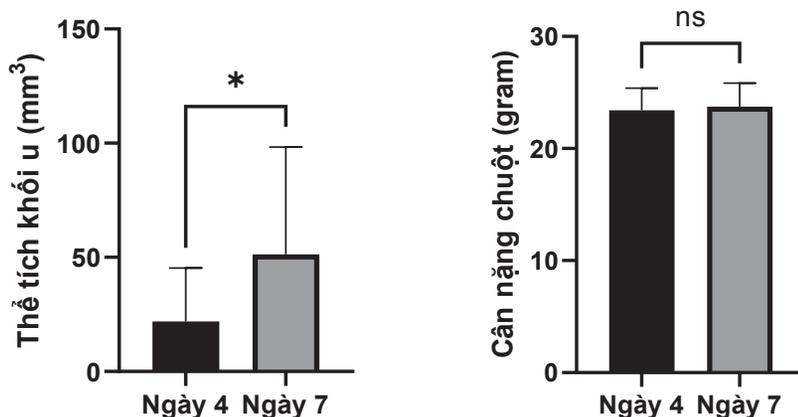
thấy trong vòng 4 ngày. Cả 10 chuột đều hình thành khối u, khối u tăng trưởng nhanh, với kích thước u được đo được mỗi ba ngày (Hình 3).



Hình 3. Hình ảnh hình thành khối u sau khi tiêm dưới da tế bào HT29 hyper IL-6 vào vùng hông lưng của chuột. Kích thước khối u được theo dõi tại các thời điểm ngày 4 và ngày 7

Kích thước u sau 4 ngày có thể tích trung bình 21,89mm³, sau 7 ngày kích thước trung bình tăng lên gấp đôi với 51,34mm³. Sự tăng

lên kích thước khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong khi đó cân nặng của chuột gần như không thay đổi sau 7 ngày (Biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Biểu đồ so sánh thể tích khối u chuột và cân nặng chuột vào ngày 4 và ngày 7 (Kiểm định T-test, ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$)

2. Đặc điểm mô bệnh học khối u chuột

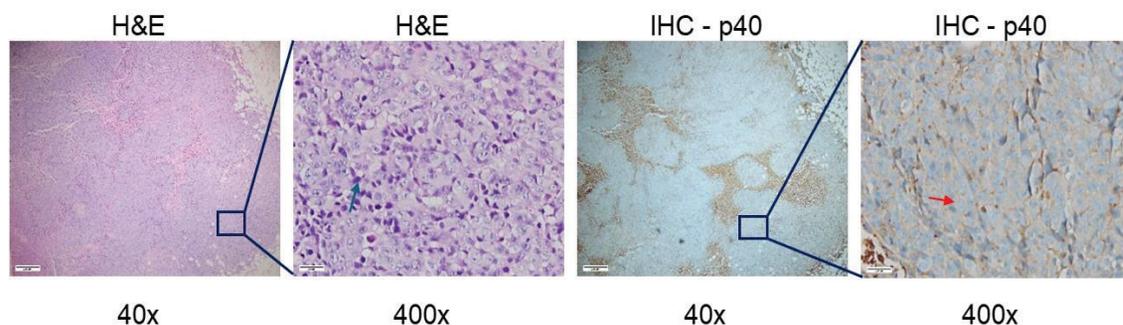
Sau 3 tuần kết thúc nghiên cứu, các khối u được phẫu tích và ngâm trong formalin đậm trung tính 10%, đúc nền parafin và phân tích mô bệnh học.

Hình ảnh đại thể: Các khối u có hình tròn hoặc đa cung gồm nhiều u nhỏ liên kết với nhau, ranh giới rõ ràng, dễ phẫu tích, một số u có hoại tử bề mặt và dính với da.

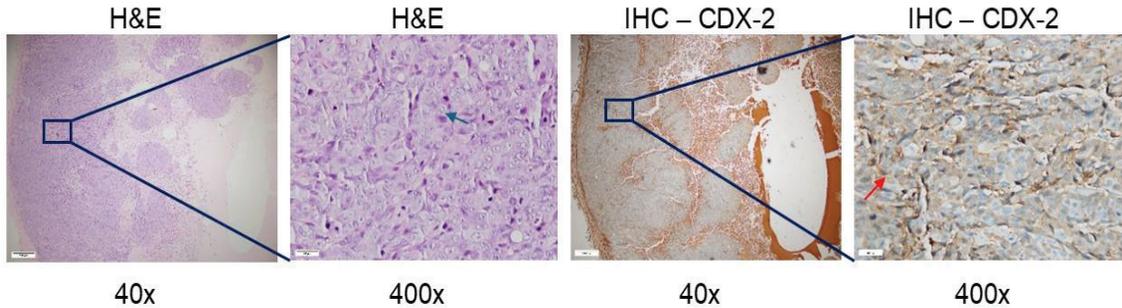
Hình ảnh vi thể: Cấu trúc u gồm các tế bào biểu mô xếp thành đám đặc xâm lấn mô sợi viêm hoại tử, không thấy hình ảnh xâm lấn mạch máu, thần kinh. Tế bào u đa dạng kích thước, đa dạng hình thái, nhân tăng sắc dị

dạng, hạt nhân rõ, tỷ lệ nhân trên bào tương cao và gặp phân bào bất thường rải rác. Tỷ lệ hoại tử u chiếm 60 - 70% ở trung tâm (Hình 4).

Để đánh giá chính xác tính chất khối u, chúng tôi tiến hành nhuộm hoá mô miễn dịch (IHC). Phân tích IHC bao gồm p40 (để phân biệt nguồn gốc biểu mô vảy so với tuyến) và CDX-2 (xác định nguồn gốc đường tiêu hoá). Kết quả cho thấy u âm tính với p40 (Hình 4), trong khi dương tính với CDX-2 (Hình 5). Những biểu hiện này xác nhận nguồn gốc biểu mô đại trực tràng của các khối u cấy ghép dị loài và chứng thực tính phù hợp của mô hình đối với ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở người.



Hình 4. Hình ảnh khối u xenograft nhuộm HE và nhuộm IHC p40 (Độ phóng đại 40X, thang tỷ lệ: 2000 μ m và 400X, thang tỷ lệ: 200 μ m) xác nhận đặc điểm mô bệnh học: khối u âm tính với p40, phù hợp nguồn gốc biểu mô tuyến của các xenograft (mũi tên: nhân dị dạng, âm tính)



Hình 5. Hình ảnh khối u xenograft nhuộm HE và nhuộm IHC CDX-2 (Độ phóng đại 40X, thang tỷ lệ: 2000 μ m và 400X, thang tỷ lệ: 200 μ m)) xác nhận đặc điểm mô bệnh học: dương tính với cả CDX-2, phù hợp nguồn gốc biểu mô đại trực tràng của các xenograft (mũi tên: nhân dị dạng, dương tính)

IV. BÀN LUẬN

Khi quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào HT29 Hyper-IL-6 biểu hiện mức tăng sinh rõ rệt trong 24 giờ đầu, lan rộng và bao phủ bề mặt đĩa nuôi cấy nhanh hơn so với dòng HT29 dạng hoang dại. Điều này phù hợp với cơ chế sinh học đã biết: Hyper-IL-6 là một dạng cytokine tổng hợp phức hợp IL6/sIL6R có khả năng hoạt hóa con đường tín hiệu IL-6 nhanh hơn,⁹ từ đó thúc đẩy tăng sinh, sống sót và chuyển dạng ác tính của tế bào ung thư đại trực tràng. Khi đạt mật độ 80%, các tế bào được tăng sinh mở rộng trong đĩa T75 để chuẩn bị cho bước ghép chuột, đảm bảo số lượng và chất lượng tế bào đồng nhất cho mô hình khối u. Điều này rất quan trọng vì tính nhất quán của tế bào cấy ghép là yếu tố then chốt quyết định độ tin cậy của mô hình xenograft.

Kết quả thu được từ mô hình cấy ghép dị loài sử dụng tế bào HT29 Hyper-IL-6 cho thấy khả năng tạo u mạnh mẽ và ổn định khi tiêm dưới da vào vùng hông lưng của chuột BALB/c "nude". Việc 100% số chuột (10/10) đều hình thành khối u trong vòng 4 ngày chứng tỏ tính sinh u cao của dòng tế bào HT29 trong bối cảnh tăng cường tín hiệu IL-6, phù hợp với đặc tính tăng sinh mạnh và ác tính cao đã được mô tả trong các nghiên cứu trước như nghiên cứu của Kleinegger và cs (2018) bổ sung hyper IL-6

ngoại sinh giúp tế bào ung thư đường mật tăng sinh đáng kể khi so với nhóm đối chứng đồng thời làm hoạt hoá STAT3 liên tục.¹⁰ Thời gian xuất hiện u nhanh và tốc độ tăng trưởng rõ rệt (gấp đôi) theo dõi được mỗi ba ngày nhấn mạnh vai trò thúc đẩy sinh u của IL-6 *trans-signaling*, vốn là trực tín hiệu được chứng minh liên quan chặt chẽ đến tăng sinh, chống apoptosis và tiến triển ung thư đại trực tràng.^{2,6}

Phân tích mô bệnh học bằng nhuộm H&E và hoá mô miễn dịch giúp khẳng định tính chính xác và tính đại diện của mô hình. Biểu hiện âm tính với p40 loại trừ nguồn gốc biểu mô vảy, trong khi dương tính với CDX-2 xác nhận nguồn gốc tuyến đường tiêu hoá - dấu ấn đặc trưng của ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng.¹¹ Việc biểu hiện CDX-2 là một tiêu chí quan trọng củng cố rằng mô hình này phản ánh đúng đặc điểm phân tử của ung thư đại trực tràng ở người, giúp đảm bảo độ tin cậy cho các đánh giá tiếp theo về sinh học khối u hoặc hiệu quả điều trị.

Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng vì chúng chứng minh rằng mô hình HT29 Hyper-IL-6 xenograft không chỉ dễ dàng tạo thành khối u mà còn tái hiện đúng kiểu hình mô bệnh học và dấu ấn phân tử. Điều này làm nổi bật tính giá trị của mô hình như một nền tảng tiền lâm sàng

để nghiên cứu cơ chế hoạt hoá IL-6/STAT3, đánh giá tác động của IL-6 *trans-signaling* trong tiến triển khối u, cũng như thử nghiệm các liệu pháp nhắm vào IL-6/sIL-6R.

Nhìn chung, mô hình u cấy ghép này đáp ứng tốt các yêu cầu về độ ổn định, tính đại diện và khả năng ứng dụng, từ đó cung cấp một công cụ đáng tin cậy cho nghiên cứu ung thư đại trực tràng liên quan IL-6 trong tương lai.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo thành công mô hình *xenograft* ở chuột “nude” với khối u từ tế bào HT29 Hyper-IL-6. Sau 4 ngày sờ thấy u, khối u phát triển quan sát được bằng mắt thường, theo dõi kích thước bằng đo thước tăng gấp đôi sau 3 ngày. Mô bệnh học và nhuộm hóa mô miễn dịch cho kết quả xác nhận khối u ung thư đại trực tràng điển hình.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) trong Dự án mã số VINIF.2021.DA00199.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024-01 2024;74(1):12-49. doi:10.3322/caac.21820
2. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *International Journal of Biological Sciences*. 2012 2012;8(9):1248-1253. doi:10.7150/ijbs.4614
3. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*. 2021-03-01 2021;33(3):127-148. doi:10.1093/intimm/dxaa078
4. Rašková M, Lacina L, Kejík Z, et al. The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis-Overview and

Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2022-11-21 2022;11(22):3698. doi:10.3390/cells11223698

5. Huang B, Lang X, Li X. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. *Front Oncol*. 2022;12:1023177. doi:10.3389/fonc.2022.1023177

6. Lin Y, He Z, Ye J, et al. Progress in Understanding the IL-6/STAT3 Pathway in Colorectal Cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2020-12 2020;Volume 13:13023-13032. doi:10.2147/ott.s278013

7. Rose-John S, Jenkins BJ, Garbers C, et al. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. *Nature Reviews Immunology*. 2023/10// 2023;23(10):666-681. doi:10.1038/s41577-023-00856-y

8. Karnik I, Her Z, Neo SH, et al. Emerging Preclinical Applications of Humanized Mouse Models in the Discovery and Validation of Novel Immunotherapeutics and Their Mechanisms of Action for Improved Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. May 26 2023;15(6)doi:10.3390/pharmaceutics15061600

9. Rakemann T, Niehof M, Kubicka S, et al. The Designer Cytokine Hyper-Interleukin-6 Is a Potent Activator of STAT3-dependent Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(3):1257-1266. doi:10.1074/jbc.274.3.1257

10. Kleinegger F, Hofer E, Wodlej C, et al. Pharmacologic IL-6R α inhibition in cholangiocarcinoma promotes cancer cell growth and survival. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. Feb 1 2019;1865(2):308-321. doi:10.1016/j.bbdis.2018.11.006

11. Kato S, Koshino A, Lasota J, et al. Use of SATB2 and CDX2 Immunohistochemistry to Characterize and Diagnose Colorectal Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Sep 1 2024;32(8):362-370. doi:10.1097/pai.0000000000001216

Summary

DEVELOPMENT OF A *XENOGRAFT* MOUSE MODEL USING HT29 HYPER-IL-6 CELLS

The IL-6/STAT3 signaling pathway plays a critical role in the progression of colorectal cancer (CRC). Selective inhibition of IL-6 *trans-signaling* is a promising therapeutic approach; however, appropriate preclinical models for evaluation remain limited. Therefore, we established a mouse model bearing colorectal tumors with enhanced IL-6 expression, providing a platform to investigate the biological functions of IL-6 signaling. A xenograft model was generated in BALB/c nude mice by subcutaneous injection of 3×10^6 HT29 hyper IL-6 cells into the dorsal flank. Tumor size was monitored every three days. At study endpoint, tumor tissues were analyzed by histopathology (H&E) and immunohistochemistry (p40, CDX-2). Palpable tumors formed within 4 days, with consistent tumor growth and size doubling after 3 days. IHC showed p40 negativity and CDX-2 positivity, confirming colorectal glandular epithelial origin and the model's relevance to human CRC. In conclusion, this study successfully established a nude mouse *xenograft* model with hyper IL-6 colorectal tumors. Histopathological and immunohistochemical findings validated the formation of characteristic colorectal adenocarcinoma tumors.

Keywords: Colorectal cancer, hyper IL-6, *trans-signaling*, HT29, *xenograft*.