

TẠO KHỐI UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ CỦA NGƯỜI TRÊN THỰC NGHIỆM

Nguyễn Thị Mỹ Thành¹, Nguyễn Văn Đô²,
Hồ Anh Sơn³ và Nguyễn Linh Toàn^{3,✉}

¹Đại học Y Khoa Vinh

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Học Viện Quân Y

Mô hình ung thư thực nghiệm không thể thiếu trong nghiên cứu ung thư tiền lâm sàng in vivo để thử nghiệm các thuốc chống ung thư. Nghiên cứu này tạo ra khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người trên cơ thể chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột Nude) bằng dòng tế bào ung thư phổi người H460. Ghép tế bào ung thư phổi người, liều 0.1ml × 10⁷ tế bào/ H460 dưới da đùi chuột Nude. Xác định tỷ lệ mọc u, thể tích khối u, tỷ lệ thoái u, tỷ lệ sống - chết, hình ảnh giải phẫu bệnh lý của khối u. Tỷ lệ mọc u đạt 100%, không có chuột nào chết do lỗi kỹ thuật. Hình ảnh giải phẫu bệnh tương đồng như khối u trên người. Tạo được mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người dòng H460.

Từ khóa: H460, ung thư phổi không tế bào nhỏ, chuột nude.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là một trong những loại ung thư đứng đầu về tỷ lệ mắc và tử vong trên thế giới, cũng như ở Việt Nam. Theo thống kê của Globocan 2020, trên thế giới có khoảng 19.292.789 ca mắc ung thư, trong đó ung thư phổi là 2.206.771 ca chiếm 11,4% tổng các loại ung thư. Tỷ lệ tử vong do ung thư phổi (18%) đứng đầu trong tất cả các loại ung thư.¹ Các phương pháp điều trị hiện nay: Phẫu thuật, xạ trị, hóa chất; các phác đồ đơn hay đa trị liệu đã khai thác tối đa tiềm năng nhưng tỷ lệ tử vong do ung thư phổi vẫn cao nhất trong tất cả các loại ung thư; tỷ lệ sống trên 5 năm thấp (< 15%). Để nghiên cứu các thuốc mới điều trị UTPKTBN, rất cần có các mô hình ung thư phổi trên động vật thực nghiệm để đánh giá hiệu quả kháng ung thư của các

thuốc chống ung thư và các thuốc tăng cường hỗ trợ miễn dịch cho bệnh nhân ung thư. Các mô hình ung thư phổi tạo bởi hóa chất hay ghép tế bào ung thư đồng loài trên chuột không mang tính tương đồng về mặt sinh học như khối u trên người.² Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy và tăng sinh tế bào ung thư phổi người H460 và tạo khối ung thư phổi dòng H460 của người trên chuột thiếu hụt miễn dịch.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ người dòng H460 (ATCC, USA).

- Chuột thiếu hụt miễn dịch (nude mouse), 6-8 tuần tuổi: 10 con chuột, trọng lượng trung bình 25-30g/con.

Vật liệu và phương tiện nghiên cứu

- Môi trường nuôi cấy tế bào RPMI 1640; Bổ sung Penicillin/Streptomycin 1%, Trypsin EDTA, FBS 10% (ATCC, Hoa Kỳ).

Tác giả liên hệ: Nguyễn Linh Toàn

Học viện Quân Y

Email: toanni@vmmu.edu.vn

Ngày nhận: 06/12/2021

Ngày được chấp nhận: 20/12/2021

- Tủ ấm CO₂, kính hiển vi soi ngược, phòng nuôi tế bào, phòng nuôi chuột đúng tiêu chuẩn kĩ thuật. Các dụng cụ và vật tư tiêu hao bảo đảm tăng sinh tế bào, ghép tế bào lên chuột, chăm sóc và theo dõi chuột.

2. Phương pháp

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào ung thư phổi người dòng H460

Các tế bào ung thư phổi người dòng H460 được nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy tế bào đường kính 10cm bằng môi trường nuôi cấy tương ứng là RPMI 1460 có bổ sung 10% FBS và 1% Penicillin và Streptomycin. Tế bào được nuôi cấy tăng sinh và thay môi trường 3 lần mỗi tuần ở điều kiện nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích thì tiến hành cấy chuyển sang chai mới. Trước ghép, tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch PBS 1X, sau đó được tách ra bằng dung dịch Trypsin-EDTA 1X. Dung dịch tế bào ung thư đã chuẩn bị được hút vào bơm tiêm 1ml với số lượng 10⁷/ml. Số lượng tế bào được xác định bằng cách sử dụng buồng đếm Neubauer.

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

Chuột thiếu hụt miễn dịch (nude mice, Foxn1nu): được nuôi trong điều kiện phòng sạch, không khí được lọc và có áp lực dương tính (25 ± 0,5°C, độ ẩm 52 ± 5%), ánh sáng được tự động điều khiển bật lúc 7h00, tắt lúc 19h00. Thức ăn và nước uống được tiệt trùng

trước khi sử dụng. Chuột được chia thành nhóm 5 con mỗi lồng.

Chuột thiếu hụt miễn dịch được nuôi ổn định ít nhất 3 ngày trước lúc tiến hành thí nghiệm. Cố định và tiêm 0,1 ml vào dưới da đùi phải (10⁶ tế bào/chuột). Quá trình thao tác được thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

Chuột được ăn uống theo chế độ ăn bình thường; theo dõi tại chỗ tiêm và toàn thân chuột hàng ngày; đo u và cân trọng lượng 2 lần/tuần x 4 tuần.

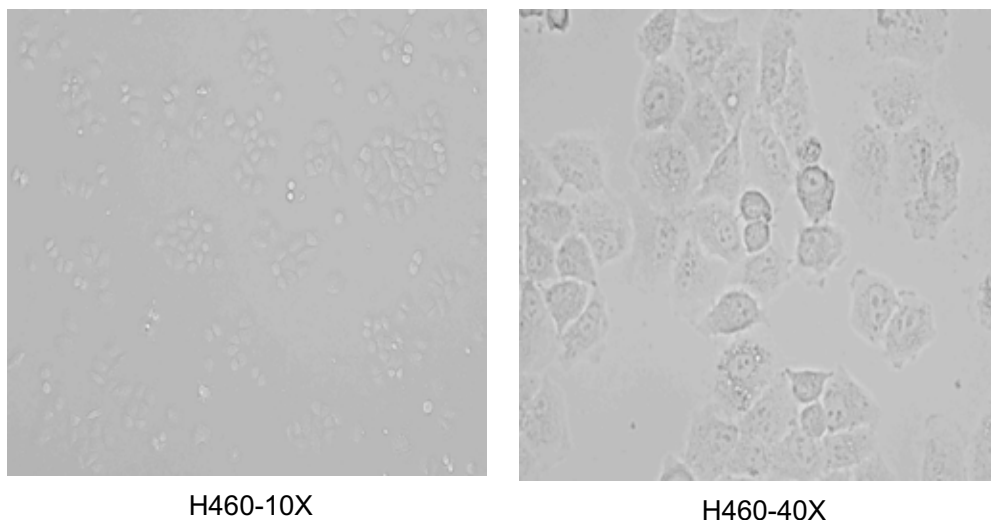
Kích thước khối u: Khối u được đánh giá theo dõi sự phát triển tại vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần mỗi tuần, kích thước u được tính theo công thức: $V = D \times R^2 \times 0,5$ (V: thể tích khối u, D: chiều dài khối u, R: chiều rộng khối u). Trọng lượng chuột: cân hàng tuần bằng cân điện tử có độ chính xác 10⁻³.

Phân tích mô bệnh học khối u 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, khối u được đúc khối paraffin, cắt lát dày 5µm, 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 được tiến hành tại khoa Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện 103, Học viện Quân Y. Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và SPSS 20.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả nuôi cấy tế bào H460



Hình 1. Hình ảnh tế bào ung thư phổi dòng H460 bám dính đáy đĩa nuôi sau 24h hoạt hóa

Sau 24 giờ, tế bào đã bám đều trên bề mặt đáy chai nuôi. Thay môi trường nuôi cấy 2 lần/tuần. Tốc độ tăng sinh gấp đôi của dòng tế bào H460 khoảng 22 - 24h. Theo dõi tế bào phát triển khi đạt khoảng 80% diện tích đáy đĩa sẽ được chuyển sang đĩa nuôi cấy mới với tỉ lệ 1:3. Tế bào ung thư được thu hoạch bằng cách dùng Trypsin-EDTA 1X. Cho 2-3ml môi trường nuôi cấy, lấy 10 μ l nhuộm trypan blu và cho vào

buồng đếm tế bào xác định tỷ lệ tế bào sống. Số lượng tế bào sống lớn hơn hoặc bằng 98% tổng số tế bào trong huyền phù mới sử dụng cho thí nghiệm. Điều chỉnh môi trường để đạt 10⁷ tế bào/ml.

2. Kết quả tạo khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người trên chuột nude

Tình trạng toàn thân chuột trong quá trình thí nghiệm

Bảng 1. Trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu (g)

Ngày Nhóm	Thông số	Ngày 1 (1)	Ngày 8 (2)	Ngày 15 (3)	Ngày 22 (4)	Ngày 29 (5)
	n	10	10	10	10	10
Trọng lượng	X \pm SD	26,37 \pm 5,87	27,51 \pm 6,15	28,0 \pm 5,61	28,87 \pm 5,26	30,57 \pm 6,56
p		P ₁₋₅ < 0,05				

Ghi chú: Trọng lượng chuột ngày 1 là trọng lượng chuột được cân ngay trước lúc tiêm TB H460.

Sau khi tiến hành ghép tế bào ung thư H460, chuột ăn uống, hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, da bình thường, mắt trong, hậu môn khô, không thấy biểu hiện đi lỏng. Sau ghép TB H460

chuột vẫn tăng cân so với trước thí nghiệm (p < 0,05). Toàn bộ số chuột vẫn sống đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Tình trạng tại chỗ tiêm tế bào H460

Ngày thứ 5-7 xuất hiện khối u, ngày thứ 10 (100%) chuột có u. Da trên bề mặt không khác biệt so với vùng da lân cận. Tại thời điểm ngày 26 có vết loét trên bề mặt khối u của 01 chuột, sau đó khối u bị vỡ, chất hoại tử trào ra ngoài khối u.

Hình 2. Khối ung thư phổi người trên chuột Nude ngày thứ 10

Bảng 2. Tỷ lệ chuột thoái u

Chuột	Ngày	N10 (n/ %)	N15 (n/ %)	N20 (n/ %)	N25 (n/ %)	N29 (n/ %)
Tỷ lệ thoái u		0%	0%	0%	0%	0%

Tại thời điểm ngày 26-29, có một chuột bị hoại tử khối u, vỡ và làm thể tích u giảm. Không có chuột nào mất u tự nhiên, không có chuột chết trong quá trình thí nghiệm.

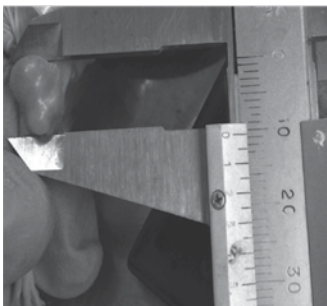
Bảng 3. Thể tích trung bình khối u (mm³)

Ngày	Thông số	N1	N10	N15	N20	N25	N29
	n	0	10	10	10	10	10
Chuột	X ± SD	0	70,55 ± 60	143,75 ± 112,60	835,89 ± 508,35	1508,12 ± 1422,94	3427,63 ± 3350,48

Thể tích trung bình khối u chuột tăng dần đều theo thời gian. Khi ở thời điểm ngày thứ 29, có một khối u vỡ. Quá trình theo dõi kích thước khối u dừng, tiến hành thu thập mẫu để đánh giá hình ảnh giải phẫu bệnh.

3. Hình ảnh đại thể và vi thể khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người H460 trên chuột nude

Hình ảnh đại thể

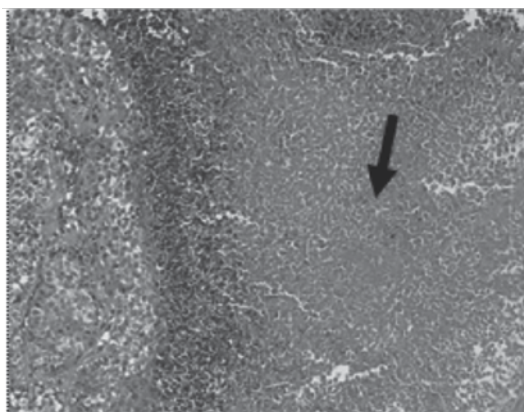


Hình 3. Hình ảnh đại thể khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người H460 trên chuột nude

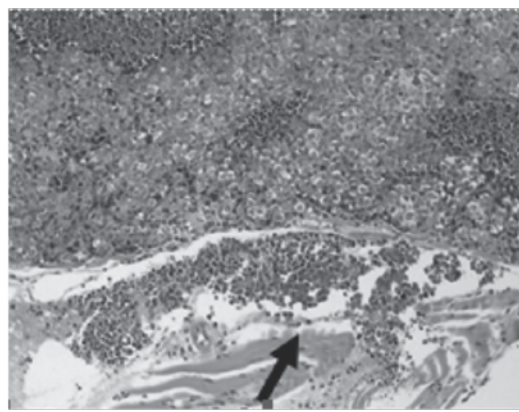
Tại thời điểm 10 ngày sau tiêm TB H460, khối u dưới da có kích thước trung bình khoảng 70 mm³. Khối u có bờ rõ, cứng chắc, di động trong những ngày đầu. Giai đoạn cuối khối u dính vào khối cơ đùi, chuột vận động hạn chế. Da phía trên khối u không có sự thay đổi màu sắc.

Hình ảnh vi thể

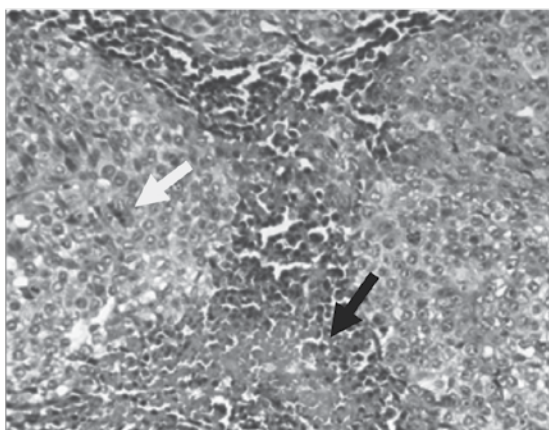
U gồm các đám tế bào biểu mô có nhân không đều, tăng sắc, chất nhân thô, hạt nhân rõ, có nhiều nhân chia bất thường. U có các ổ hoại tử nhỏ nằm giữa các đám tế bào u và ổ hoại tử lớn ở trung tâm. U xâm lấn mô cơ vân.



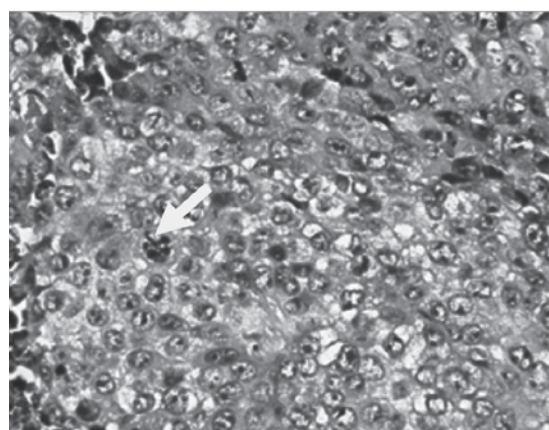
A. H.E 10X



B. H.E 10X



C. H.E 20X



D. H.E 40X

Hình 4. Hình ảnh vi thể khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người H460 trên chuột nude

Phần lớn u bị hoại tử trung tâm (mũi tên đen), dạng hoại tử đồng do tốc độ tế bào u phát triển quá mạnh, nên vùng trung tâm thiếu nuôi dưỡng (hình 4A). Các tế bào u phát triển mạnh xâm lấn vào mô cơ vân (mũi tên đen), bóc tách các bó cơ ra và các tế bào u nằm giữa các bó cơ đó (hình 4B). Độ phóng đại cao hơn thấy rõ vùng hoại tử với mảnh vụn tế bào và các

nhân đồng (mũi tên đen)(hình 4C). Các tế bào u sắp xếp sát nhau, bào tương hẹp, nhân tế bào không đều, tăng sắc mạnh, có hình nhân chia bất thường (mũi tên vàng) hình 4C. Nhìn rõ tính chất của nhân. Các tế bào u sắp xếp sát nhau, bào tương hẹp, nhân tế bào không đều, tăng sắc mạnh, có hình nhân chia bất thường (mũi tên vàng) (hình 4D).

Hình ảnh vi thể khối u đùi chuột cho thấy hình ảnh các tế bào ác tính với nhân quái, nhân chia, có sự phát triển các mạch máu, nhiều không bào trong tế bào ung thư và một số hình ảnh tế bào sắp xếp kiểu trụ tầng giả.

IV. BÀN LUẬN

Mô hình ung thư trên động vật có vai trò quan trọng trong nghiên cứu ung thư ở tiền lâm sàng. Để chứng minh được các hóa chất, sinh phẩm, vật liệu mới có tiềm năng trong điều trị ung thư, cần phải có các mô hình bệnh lý ung thư trên thực nghiệm đặc biệt là trên động vật.^{2,3,4,5} Các mô hình ung thư động vật ở nước ta trước đây chủ yếu được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài, chẳng hạn dùng tế bào ung thư của chuột ghép cho chuột.² Tuy nhiên, hạn chế của mô hình đó là các khối u không mang đặc tính sinh học giống như khối u trên người, điều này tạo nên hạn chế rất lớn trong nghiên cứu. Bên cạnh đó đáp ứng miễn dịch trên chuột bình thường rất khỏe cho nên tỷ lệ mọc u thấp và tỷ lệ u tự thoái triển cao.² Hoặc mô hình sử dụng hóa chất gây ung thư thì động vật thường chết sớm.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã ghép thành công TB H460 trên chuột nude, trong vòng 5-7 ngày sau ghép đã xuất hiện khối u dưới da. Tỷ lệ mọc u đạt 100% và không có chuột chết do lỗi kỹ thuật so với McLemore TL và cs (năm 1987) thì tỷ lệ chuột chết sau ghép là 5%.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả đã công bố: tỷ lệ thành công trong kỹ thuật ghép dị loài từ 85 - 100%.^{3,4,5,6} Bên cạnh đó, một ưu điểm nữa của kỹ thuật này là thời gian thực hiện nhanh, trong 1-1,5 tuần đã có thể đánh giá hiệu quả tạo khối ung thư người trên động vật.

Sử dụng chuột thiếu hụt miễn dịch là một bước đột phá trong nghiên cứu ung thư, đã cho phép nghiên cứu ung thư người trên cơ

thể động vật. Chuột nude có một gen bị đột biến đồng hợp tử (homozygous), gen này qui định sự phát triển của lông và tuyến ức. Do đó, chuột không còn khả năng đào thải mảnh ghép. Do vậy, sử dụng chuột nude để ghép các loại ung thư là mô hình lý tưởng nhất. Trên Thế Giới đã có nhiều dòng tế bào ung thư người được cấy ghép lên chuột thiếu hụt miễn dịch và phát triển tốt, vẫn giữ được những đặc điểm sinh học và hình thái giống các khối u tương tự trên người.^{4,5,6} Ở Việt Nam, Nguyễn Lĩnh Toàn và cộng sự đã ghép thành công mô hình ung thư gan, ung thư tụy, ung thư buồng trứng trên chuột Nude (ghép dị loài).

Kỹ thuật tiêm tế bào ung thư phổi người H460 vào dưới da đùi phải chuột Nude cho phép tạo ra các khối u với kích thước tương đối đồng đều, cùng ở một vị trí ngay dưới da. Vì vậy, tạo thuận lợi cho quá trình theo dõi phát triển, của khối u hàng ngày bằng các biện pháp không can thiệp. Điều này có ý nghĩa trong nghiên cứu; bởi vì để đánh giá khối u phát triển trên động vật rất phức tạp, nếu khối u không ở các khu vực ngoại vi sẽ rất khó khăn trong theo dõi.⁴ Kỹ thuật này cho phép tạo ra khối u tương đồng về mặt mô bệnh học, về các biểu hiện gen cũng như gen tương tự như khối u trên bệnh nhân. Vì thế đây là mô hình lý tưởng cho nghiên cứu liệu pháp nhắm đích, liệu pháp oncolytic virus và các phương pháp điều trị khác.

V. KẾT LUẬN

Đã nuôi cấy và tăng sinh thành công tế bào ung thư phổi không nhỏ của người dòng H460, đủ số lượng tế bào phục vụ ghép tạo khối u trên chuột. Tạo được khối ung thư phổi không tế bào nhỏ người dòng H460 dưới da đùi chuột thiếu hụt miễn dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL 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(3): 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

2. Nguyễn Thái Bằng, Nguyễn Lĩnh Toàn, Hồ Anh Sơn, Ngô Thu Hằng. Nghiên cứu tạo khối ung thư phổi chuột Lewis trên chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y Dược học quân sự.* Số 3.2015.

3. Min-chul Kwon, Anton Berns. Mouse models for lung cancer. *Mol Oncol* v.7(2); 2013. PMC5528410.

4. Liu J, Johnston MR. Experimental animal models for studying lung cancers. *Surg Oncol.*

2002 Dec; 11(4): 217-27. doi: 10.1016/s0960-7404(02)00053.

5. Céspedes MV, Espina C, García-Cabezas MA et al. Orthotopic microinjection of Human Colon Cancer Cells in Nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol.* 2007; 170 (3). Mar.PMC 1864873.

6. Bùi Khắc Cường, Hồ Anh Sơn, Nguyễn Lĩnh Toàn. Nghiên cứu tạo khối ung thư đại tràng người trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài. *Tạp chí Y Dược học quân sự.* 2012; 9: 53-57.

Summary

ESTABLISHMENT OF HUMAN NON SMALL CELL LUNG CANCER ON EXPERIMENTAL MODEL

Human xenograft tumor models established by transplantation of human cancer cell lines into immunodeficient mice are used for preclinical test of new anticancer agents in vivo. This study aimed to create human non-small cell lung cancer on immunodeficient nude mice (Nude mice) by the H460 human cancer cell line. H460 cells were injected into the right flanks of nude mice with $0.1\text{ml} \times 10^7$ cells per mouse. Then, tumor growth rate, tumor volume, tumor regression rate, survival-death rate, and tumor histology, were collected. Results: 100% nude mouse has tumor growth, no death due to technical error. The histological image is similar to the patient tumor. In conclusion, we successfully established human non-small cell lung cancer on the immunodeficient nude mouse.

Keywords: H460, non-small cell lung cancer, nude mice.