

XÂY DỰNG MÔ HÌNH TĂNG SINH MẠCH MÁU BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỒNG NUÔI CÂY KHỐI CẦU ĐA BÀO ƯNG THƯ MCF-7 VÀ TẾ BÀO NỘI MÔ TÍNH MẠCH DÂY RÕN

Hoàng Thị Mỹ Nhung*, Nguyễn Lai Thành

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Tăng sinh mạch máu là quá trình sinh trưởng và phân nhánh của các mạch máu mới thông qua sự tăng sinh và di chuyển của các tế bào nội mô từ một mạch máu ban đầu. Tăng sinh mạch có vai quan trọng sự sinh trưởng và chữa lành vết thương của cơ thể ở điều kiện sinh lý bình thường. Tuy nhiên, đối với khối u, sự tăng sinh mạch cũng góp phần thúc đẩy, hỗ trợ sự tăng sinh và di căn của các tế bào ung thư. Chính vì vậy, ức chế tăng sinh mạch máu trong khối u sẽ là một đích điều trị tiềm năng trong tương lai. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển một mô hình tăng sinh mạch máu thông qua đồng nuôi cấy các tế bào ung thư vú MCF-7 và các tế bào nội mô tính mạch dây rốn nhằm nghiên cứu cơ chế tăng sinh mạch cũng như sàng lọc các hợp chất có tiềm năng ức chế hoặc kích thích tăng sinh mạch máu, phục vụ cho sản xuất các nguồn dược phẩm trong tương lai. Các tế bào nội mô được phân lập từ tĩnh mạch dây rốn trẻ sơ sinh sẽ được duy trì ổn định và kiểm tra với CD31 và Dil-Ac-LDL, sau đó nuôi cấy trong cùng một nền đĩa với các tế bào ung thư MCF-7. Kết quả thu được cho thấy có sự biến đổi của các tế bào nội mô theo thời gian đồng nuôi cấy, từ sự thay đổi hình dạng, kéo dài tế bào tới khi hình thành mạng lưới, cấu trúc dạng ống do các tác nhân kích thích sản sinh từ các tế bào ung thư được duy trì ở mật độ cao.

Từ khóa: angiogenesis, MTCS, hUVECs, co-culture

MỞ ĐẦU

Tăng sinh mạch máu là quá trình sinh trưởng và phân nhánh của các mạch máu mới chủ yếu là thông qua sự tăng sinh và di chuyển của các tế bào nội mô từ một mạch máu ban đầu. Đây là quá trình có vai trò sống còn cho sự sinh sản, phát triển và chữa lành các tổn thương của cơ thể [Kozien D *et al.*, 2000; Hanahan D *et al.*, 2011]. Năm 1971, Folkman đưa ra một góc nhìn mới về vai trò của mạch máu trong sự sinh trưởng của khối u dưới dạng một giả thuyết là sự sinh trưởng của khối u phụ thuộc vào tăng sinh mạch máu. Thuyết này cho rằng các tế bào ung thư và các tế bào nội mô mạch máu trong một khối u có thể phối hợp chặt chẽ với nhau và các tế bào nội mô có thể chuyển từ trạng thái nghỉ sang trạng thái hoạt động mạnh bởi sự khuếch tán các tín hiệu hóa học từ các khối u [Folkman J, 2000]. Giả thuyết chỉ cần được dần dần chấp nhận khi các tế bào nội mô được chứng minh là có thể tạo thành các mạch máu *in vitro* tám năm sau đó và phải mất tới 11 năm thì các nhà khoa học mới tìm ra được chất ức chế tăng sinh mạch máu đầu tiên. Giữa những năm 1980, rất nhiều bằng chứng thực nghiệm đã được tập hợp để ủng hộ giả thuyết về sự phụ thuộc của khối u vào tăng sinh mạch máu. Ý tưởng này có thể được khẳng định một cách đơn giản: "Một khi xuất hiện khối u, sự tăng về kích thước của khối tế bào này phải được đi kèm với sự tăng các mạch máu mới hội tụ về phía khối u". Giả thuyết này hiện nay đã được ủng hộ bởi rất nhiều bằng chứng sinh học và dược học, và được chứng minh bởi các bằng chứng di truyền học [Folkman J, 2000; Hanahan D *et al.*, 2011]. Các bằng chứng thực nghiệm và lâm sàng cho thấy quá trình di căn cũng phụ thuộc tăng sinh mạch máu. Để một tế bào khối u có thể di căn thành công, nó phải vượt qua nhiều rào cản cũng như đáp ứng những nhân tố sinh trưởng nhất định. Do đó, các tế bào khối u cần phải tiếp cận được mạch máu của khối u sơ cấp, sống sót qua tuần hoàn, dừng lại ở vị mạch máu của cơ quan đích, thoát khỏi mạch máu đó, sinh trưởng ở cơ quan đích, và kích thích tăng sinh mạch máu. Có thể nói tăng sinh mạch máu đóng vai trò quan trọng ở những bước khởi đầu cũng như kết thúc của quá trình di căn. Và như vậy cũng đồng nghĩa với việc ức chế được sự tăng sinh mạch máu có thể sẽ mang lại hiệu quả điều trị triển vọng cho các bệnh ung thư. Đã có một số chất có khả năng ức chế sự tăng sinh mạch máu như angiostatin, endostatin, platelet factor-4 v.v... được công bố. Năm 2003 James, C. và cộng sự công bố kết quả về việc sử dụng Bevacizumab (Avastin) – một kháng thể đơn dòng kháng nhân tố tăng sinh mạch máu trong điều trị, làm tăng khả năng sống sót của bệnh nhân ung thư thận đã di căn [Los M *et al.*, 2007]. Tuy nhiên, số lượng các loại thuốc thương phẩm được sử dụng để ức chế sự tăng sinh mạch được cấp phép trong điều trị ung thư trên thế giới hiện nay tương đối hạn chế. Hơn nữa, những bệnh được có tác dụng tốt thường lại là những bệnh đơn dòng hay protein tái tổ hợp với giá thành cao. Chính vì vậy, việc xây dựng một mô hình nghiên cứu để nhanh chóng phát hiện và sàng lọc những chế phẩm mới có tiềm năng ức chế sự tăng sinh mạch của khối u còn rất phức tạp hơn rất có ý nghĩa thực tiễn, đặc biệt là ở Việt Nam, khi khả năng kinh tế của hầu hết bệnh nhân ung thư vốn rất thấp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo mô hình tăng sinh mạch máu khối u dựa trên mô hình đồng nuôi cấy các tế bào nội mô tính mạch dây rốn ở người (hUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) với khối cầu đa bào các tế bào ung thư (MCTS - multicellular tumor spheroids) nuôi cấy 3D. Khả năng đồng nuôi cấy hUVEC với MCTS đã mở ra một hướng mới trong nghiên cứu sự tăng sinh mạch máu bao quanh khối u [Timmins NE *et al.*, 2004; Tung YC *et al.*, 2011; Ingthorsson S *et al.*, 2010]. Mô hình này sẽ đáp ứng được yêu cầu thử nghiệm, phát hiện các loại thuốc có tiềm năng ức chế tăng sinh mạch máu, do đó ức chế u phát triển và hạn chế di căn, góp phần phát triển thuốc chống ung thư.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập và nuôi cấy tế bào nội mô tính mạch dây rốn

Chúng tôi tiến hành phân lập tế bào nội mô tính mạch dây rốn theo phương pháp của Crampton và cs. [Nguyen LT *et al.*, 2011; Crampton SP *et al.*, 2007] và đã thành công trong việc thu nhận, duy trì và bảo quản dòng tế bào này. Dung dịch collagenase 2% được bơm vào bên trong tĩnh mạch dây rốn cho tới khi mạch phồng lên. Toàn bộ dây rốn sau đó sẽ được chuyển vào dung dịch PBS 1x và được ủ ở 37°C trong 20 phút. Dung dịch trên sau đó được thu lại, ly tâm, cặn tế bào được giữ lại và hòa tan trong môi trường nuôi cấy M199 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamin 0,2M,

1% VEGF, 1% heparin. Tế bào được duy trì trên nền đĩa nuôi cấy phủ gelatin 0,5% - 1%, trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, thay môi trường 2-3 lần/tuần.

Nuôi cấy 3D khối cầu đa bào ung thư dòng MCF7

Phương pháp tạo khối cầu đa bào ung thư dòng MCF7 đã được thực hiện thành công trong nhóm nghiên cứu [Nguyễn Đ.T *et al.*, 2012]. Đĩa nuôi cấy 96 giếng được phủ một lớp mỏng agarose 1.5%. Nhờ lên phần nắp của đĩa nuôi cấy 96 giếng, ứng với từng giếng, một thể tích 20 µl dung dịch tế bào ung thư để tạo thành các giọt treo. Bỏ xung vào các giếng 200µl môi trường nuôi cấy tế bào sau đó đẩy phần nắp mang các giọt treo lại. Đĩa nuôi cấy 96 giếng có mang các giọt treo trên nắp được giữ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong 24-48 giờ. Sau đó các giọt treo được hạ từ nắp xuống các giếng của đĩa nuôi cấy 96 giếng được phủ agarose. Quan sát và ghi nhận sự phát triển của khối spheroid dưới kính hiển vi soi ngược.

Tạo khối spheroid đồng nuôi cấy với hUVEC trên khối agarose

Các khối spheroid được 7-8 ngày tuổi sẽ được tiến hành đồng nuôi cấy với tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn. Các tế bào nội mô này có số lần cấy chuyển từ 2-4 lần. 10 khối spheroid 7 ngày tuổi sinh trưởng ổn định, có kích thước tương đối đồng đều được lựa chọn để phục vụ cho thí nghiệm. Bổ sung 50 µl dung dịch chứa tế bào nội mô với mật độ 2x10⁴ tế bào/50 µl môi trường DMEM 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 96 giếng có chứa khối spheroid. Theo dõi sự hòa nhập của hUVEC với MCTS-MCF7 dưới kính hiển vi soi ngược.

Tạo mô hình đồng nuôi cấy spheroid với hUVEC nuôi cấy đơn lớp

Sử dụng các spheroid đã xuất hiện lỗi hoại tử để làm nguyên liệu cho mô hình đồng nuôi cấy này. Các bước tiến hành như sau: Thiết kế các đĩa 24 giếng; trong mỗi giếng phủ agarose vào một góc giếng với diện tích bằng ¼ diện tích bề mặt giếng; Bổ sung tế bào nội mô vào mỗi giếng. Tế bào nội mô được nuôi trong các giếng của đĩa 96 giếng qua đêm để bám dính tốt trên bề mặt. Loại bỏ lớp agarose trong mỗi giếng. Thả khối spheroid có lõi hoại tử vào các giếng tại vị trí trước đó có agarose. Theo dõi sự phát triển của các tế bào nội mô theo thời gian.

Hiển vi quang học và hiển vi huỳnh quang

Tế bào nội mô sau khi phân lập sẽ được kiểm tra bằng cách nhuộm với kháng thể kháng CD31 gắn FITC (invitrogen) và với Dil-Ac-LDL (Invitrogen). Trong đó CD31 là cụm kháng nguyên bề mặt đặc trưng của tế bào nội mô, bao gồm cả các tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn, Dil-Ac-LDL (đỏ) - một glycoprotein đặc trưng cần thiết cho sự sinh trưởng được các tế bào nội mô hấp thụ liên tục.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

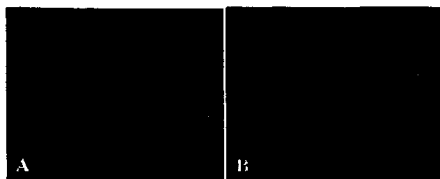
Kết quả phân lập tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn trẻ sơ sinh

Tế bào nội mô phân lập được có hình thái đặc trưng: tế bào ngắn, hình thoi hoặc đa giác (Hình 1A). Các tế bào nội mô đều biểu hiện dương tính với CD31-FITC (xanh lục) và có hấp thụ mạnh Dil-Ac-LDL (đỏ) (Hình 1B). Như vậy các tế bào phân lập được đều biểu hiện đầy đủ các kháng nguyên bề mặt đặc hiệu cũng như các đặc tính sinh trưởng đặc trưng của tế bào nội mô, hoàn toàn thích hợp cho sự phát triển mô hình tăng sinh mạch máu [Folkman J, 2000; Timmins NE *et al.*, 2004; Crampton SP *et al.*, 2007].

Kết quả đồng nuôi cấy MCTS-MCF7 và hUVECs

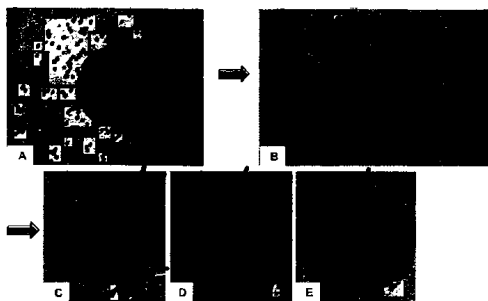
Tại thời điểm khi mới bổ sung các tế bào nội mô vào các giếng có spheroid, các tế bào nội mô phân bố đồng đều trong môi trường và xung quanh khối spheroid (Hình 2A). Tại thời điểm 16 giờ sau khi đồng nuôi cấy, các tế bào nội mô trong giếng bắt đầu tụ tập lại trong môi trường tạo thành những đám nhỏ. Sau đó, một số đám tế bào nội mô tụ tập xung quanh và liên kết với phần viền sinh trưởng của khối spheroid (Hình 2B). Hiện tượng này xảy ra ở tất cả các giếng thí nghiệm. Chúng tôi nhận thấy theo thời gian, các đám tế bào nội mô dần dần hòa nhập vào với các tế bào ung thư của khối spheroid. Nếu ở thời điểm 24 giờ, các tế bào nội mô gần như vẫn ở phía bên ngoài khối spheroid (Hình 2C) thì tại 48 giờ, chúng đã hòa nhập một phần vào khối cầu ung thư (Hình 2D) và tới 72 giờ thì một số đám tế bào nội mô gần như xâm nhập hòa toàn vào bên trong khối (Hình 2E). Hiện tượng trên cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Timmins NE và cs. năm 2004 về gây dựng mô hình tăng sinh mạch máu *in vitro*.

Chúng tôi tiếp tục theo dõi sự phát triển của các tế bào nội mô trong khối cầu đa bào ung thư dòng MCF7 theo thời gian. Một điều thuận lợi cho thí nghiệm này là các tế bào nội mô nhập bào Dil - Ac - LDL nên không cần phải cố định tế bào để nhuộm huỳnh quang và quan sát. Như vậy sẽ đảm bảo được sự theo dõi liên tục quá trình xâm nhập của hUVECs vào khối spheroid. So với thời điểm 16 giờ u (Hình 3B), chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt rõ rệt về sự phân bố của tế bào nội mô trong khoảng 48 - 72 giờ sau khi u (Hình 3C, D, E). Lúc này các tế bào nội mô phân bố tập trung vào bên trong khối cầu và bao quanh phần lõi hoại tử. Điều này là phù hợp với những nghiên cứu về sinh lý khối u. Khi lõi hoại tử xuất hiện, các tế bào ung thư vùng lõi sẽ tiết các chất kích thích sự hình thành mạch máu vào khối u để cung cấp chất dinh dưỡng [Ingthorsson S *et al.*, 2010]. Do vậy việc thu hút các tế bào nội mô tập trung xung quanh lõi hoại tử mà chúng tôi quan sát được phản ánh đúng thực tế tiến triển của các tế bào này (Hình 3C). Mặc dù các tế bào hUVEC tập trung nhiều trong khối spheroid nhưng chúng tôi không quan sát được sự tạo mạch một cách rõ ràng. Có thể do cấu trúc dạng khối hạn chế việc quan sát sự hình thành mạch. Để khắc phục nhược điểm của việc đồng nuôi cấy khối spheroid với hUVEC trên nền agarose như đã đề cập ở phần trên, chúng tôi tiến hành thiết kế lại thí nghiệm bằng cách đồng nuôi cấy khối cầu với hUVEC dạng đơn lớp.



Hình 1. Tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn trẻ sơ sinh sau 3 lần cấy chuyển, nuôi trong môi trường DMEM 10%FBS, mật độ tương đối thấp - 100x (A) Các tế bào dương tính với marker đặc hiệu CD31 (xanh lá cây), tăng cường hấp thụ LDL (đỏ), nhân tế bào được nhuộm bằng Hoechst 33342 - 400x (xanh dương) (B).

Như đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu, các tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn được ủ với DiI - Ac- LDL 24 giờ trước khi tiến hành đồng nuôi cấy. Do các tế bào nội mô có đặc điểm riêng là chúng có khả năng nhập bào các DiI - Ac- LDL trong khi các tế bào MCF7 không có khả năng này. Vì vậy có thể dễ dàng quan sát được sự phát triển của các tế bào nội mô trong khối spheroid dưới kính hiển vi huỳnh quang do khả năng phát quang của DiI - Ac- LDL (Hình 3*).



Hình 2. Sự phân bố của các đám tế bào nội mô trên khối spheroid tại thời điểm khác nhau. Bắt đầu đồng nuôi cấy (A); 16 giờ đồng nuôi cấy (B); 24 giờ (C), 48 giờ (D), 72 giờ (E) sau khi đồng nuôi cấy. (A, B: 100x; C,D,E: 150x).



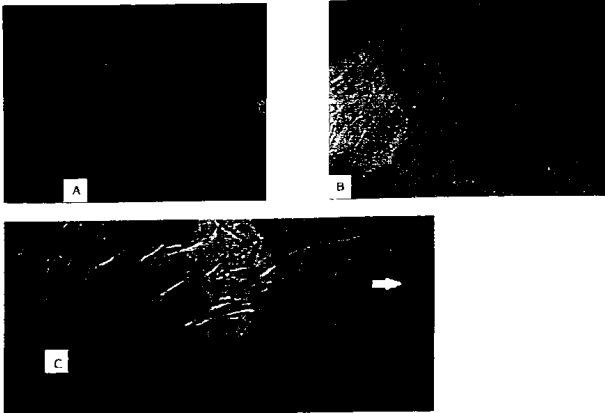
Hình 3. Sự phân bố của HUVEC nuôi cấy đơn lớp (*) và trên khối cầu đa bào ung thư MCF7 sau 20 giờ (A), 72 giờ (B) và 90 giờ (C) đồng nuôi cấy. Các tế bào MCF7 không màu. Các HUVEC chứa DiI - Ac- LDL màu đỏ.

Theo dõi sự phát triển của hUVECs khi đồng nuôi cấy dạng 3D và đơn lớp nội mô

Các tế bào nội mô được thả trên nền nuôi cấy thông thường trong cùng một giếng có các khối spheroid MCF7 sinh trưởng trên nền agarose. Chúng tôi đã quan sát được sự biến đổi hình dạng của các tế bào hUVEC sau khi đồng nuôi cấy. Các tế bào không còn dạng hình sao mà kéo dài và thuận nhọn hai đầu như tế bào sợi. Đây là hình dạng điển hình của các tế bào nội mô lót thành mạch. Các tế bào nội mô dạng sợi tiếp tục vươn dài về phía khối spheroid. Sau 48 giờ ủ hai dạng nuôi cấy 3D (MCF7 spheroid) và 2D (hUVEC), chúng tôi nhận thấy có sự hình thành dạng vi mạch phát triển về khối spheroid. Các tế bào nội mô chia nhánh và tạo dạng các ống mao mạch nhỏ (Hình 4Error! Reference source not found.). Đây chính là hình ảnh điển hình của các mạch mới tăng sinh.

Trong các khối u, các tế bào ung thư ở trung tâm của khối sẽ rơi vào tình trạng thiếu hụt nguồn oxy và dinh dưỡng

nghiệm trong khi khối u đạt một kích thước nhất định khiến chúng phải thay đổi phương thức trao đổi chất, đồng thời sản sinh các nhân tố kích thích hình thành mạch đi tới nhằm vận chuyển các nguồn vật chất cần thiết vào phục vụ cho sự sinh trưởng và phân bào [Timmins NE *et al.*, 2004; Ingthorsson S *et al.*, 2010]. Chính vì vậy mà sự tăng sinh mạch của các tế bào nội mô diễn ra mạnh mẽ sau 24 giờ đồng nuôi cấy, khi chịu tác động từ các chất kích thích tiết ra từ lõi hoại tử của khối u đồng nuôi cấy.



Hình 4. Sự biến đổi hình dạng và tăng sinh của HUVEC khi bắt đầu (A) và sau 48 giờ (B) đồng nuôi cấy. Các tế bào HUVEC biến đổi hình dạng một cách mạnh mẽ và phát triển thành dạng mao mạch về phía MCTS – MCF7 (C). Mũi tên: vị trí khối cầu đa bào ung thư MCF7

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã bước đầu tạo thành công mô hình tăng sinh mạch máu thông qua đồng nuôi cấy khối cầu đa bào ung thư dòng tế bào ung thư vú MCF7 và các tế bào nội mô tĩnh mạch dây rốn trẻ sơ sinh. Các tế bào nội mô sau khi nuôi cùng với khối ung thư 3D đã tăng sinh mạnh, biến đổi hình dạng, tạo thành các ống nhỏ dạng mao mạch và phát triển về phía khối u. Mô hình này sẽ có thể ứng dụng trong việc nghiên cứu sự tăng sinh mạch máu khối u và sàng lọc thuốc chống ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Crampton SP, D. J., Hughes CC . (2007). Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Vis Exp* 3(183): 1pp.
- Folkman, J. (2000). Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92(2): 94-95.
- Hanahan D, W. R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Ingthorsson S, S. V. (2010). Endothelial cells stimulate growth of normal and cancerous breast epithelial cells in 3D culture. *BMC Res Notes* 3(184). 12pp
- Kozien D, G. M ., Hendey B, RayChaudhury A. (2000). A novel in vitro model of tumor angiogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36(9): 555-558.
- Las M, R. J., Voest EE (2007). Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist* 12(4): 443-450.
- Nguyễn Đ.T., N. T., Nguyễn T.Q., Hoàng T.M.N (2012). Tạo mô hình khối cầu đa bào ung thư dòng MCF-7 để sàng lọc thuốc chống ung thư. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50(3C): 407-413.
- Nguyen LT, D. V., Bui VA, Le D, Hoang NM, Tran DP, Hoang T.M.N (2011). Simultaneous isolation of mesenchymal stem cells and endothelial cells from the human umbilical cord vein. *VNU Journal of Science, Natural Sciences and technology* 27(2S): 262-271.
- Timmins NE, D. S., Nielsen LK (2004). Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 7(2): 103-109.
- Tung YC, H. A., Allen SG, Tonsawa YS, Ho M, Takayama S (2011) High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136(3): 473-478.

ESTABLISHMENT OF ANGIOGENESIS MODEL BY CO-CULTIVATION MCF-7 CELLS WITH HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

Nhung-Thi My HOANG*, Thanh-Lai NGUYEN

Department of Biology, VNU University of Science

SUMMARY

Angiogenesis is the process of growth and branching of new blood vessels through the proliferation and migration of endothelial cells from pre-existing vessels. Angiogenesis plays an important role in the development and healing of the body at normal physiological conditions. In tumors, however, angiogenesis contributes to the process which promotes and supports the proliferation and metastasis of cancer cells. Therefore, inhibition of angiogenesis in tumor development would be the potential target for cancer treatment. In this study, we established a model of angiogenesis by co-cultivation of MCF-7 with human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) to investigate the progression and mechanism of angiogenesis, which is exploited to screen for potent angiogenesis inhibitors or stimulating compounds for future pharmaceutical manufacturing purposes. The endothelial cells isolated from human umbilical cord veins were stably maintained and were confirmed by CD31 antibody and Dil-Ac-LDL labeling agent then cells were cultured in the same plate with the MCF-7. The results showed the morphological transformation of endothelial cells following duration of co-culture, from the cell elongation to the network branching formation, including tubular structure. This observed phenomenon could be due to the production of trigger factors secreted from cancer cells MCF-7 that were in necrotic core of the spheroid.

Key words: angiogenesis, MCF-7, hUVECs, co-culture.

*Author for correspondence: Nhung-Thi My HOANG, Tel: 04-35586478, Email. hoangthimynhung@hus.edu.vn