

# Đặc điểm mô bệnh học của khối ung thư đại tràng người ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài

## Histological characteristics of human colon cancer tumors inoculated on athymic mice by xenograft method

Nguyễn Linh Toàn<sup>\*</sup>, Phạm Xuân Phong<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Học viện Quân y

<sup>\*\*</sup>Viện Y học cổ truyền Quân đội

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Phân tích đặc điểm hình thái mô bệnh học khối ung thư người được ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch. **Đối tượng và phương pháp:** Khối ung thư đại tràng người dòng HT-29 được ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài. Đặc điểm hình thái mô ung thư đại tràng người tạo thành trên chuột được phân tích bằng phương pháp mô bệnh học. **Kết quả:** Kết quả đã tạo được khối ung thư đại tràng người dòng HT-29 phát triển trên chuột thiếu hụt miễn dịch. Khối u tạo thành trên chuột có hình ảnh ung thư biểu mô tuyến điển hình, tế bào đa diện, tăng sản, nhân quá, nhân chia và xâm lấn mô cơ. **Kết luận:** Kết quả cho thấy hình ảnh điển hình mô ung thư người được hình thành trên chuột thiếu hụt miễn dịch.

**Từ khóa:** HT-29, chuột thiếu hụt miễn dịch, ghép dị loài.

### Summary

**Objective:** To analyse the structural characteristics of human cancer tumors implanted on athymic mice. **Subject and method:** The human colon carcinoma cell line HT29 were inoculated on athymic nude mice by xenograft method. The structural characteristics of tumors were analysed by using the conventional histology method. **Result:** The inoculation of the human colon carcinoma cell line HT29 were successful. The formulated human tumors indicated carcinoma with the hyperchromasia, nuclear enlargement with atypia and invaded the muscle. **Conclusion:** Typical structures of the human tumors could be reproduced on implanted athymic mice.

**Keywords.** HT-29, nude mice, xenograft.

## 1. Đặt vấn đề

Năm 2008, tổng số ca ung thư mắc mới tại Việt Nam là 111.600, trong đó có 55.000 ca là nam giới, nữ chiếm 56.600 ca. Tổng số ca tử vong là 82.000, trong đó nam chiếm 43.700 ca, nữ chiếm 38.300 ca. Số ca mắc ung thư trong 5 năm gần đây là 175.100, nam chiếm 67.300 ca, nữ chiếm 107.800 ca. Một số loại ung thư có số ca mắc mới cao nhất là ung thư gan, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư đại tràng, ung thư vú. Đứng trước thách thức về mức độ ác tính, kháng điều trị của ung thư gan, ngày nay người ta đang phát triển các liệu pháp và dược chất mới điều trị. Để có thể ứng dụng các kỹ thuật, vật liệu mới trong điều trị ung thư, cần phải có mô hình bệnh lý để áp dụng cho các thử nghiệm tiền lâm sàng. Các mô hình ung thư trước đây được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài. 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 cơ chế bệnh lý, và áp dụng các thử nghiệm điều trị cho các loại ung thư người [1-3].

Do vậy, yêu cầu cấp thiết là cần phải có mô hình động vật bị ung thư mang các đặc tính sinh học ung thư là nguyên bản của tế bào ung thư người. Để phục vụ các nghiên cứu tiền lâm sàng ung thư, chúng tôi tiến hành để tài nhằm mục tiêu: *Đánh giá đặc điểm giải phẫu bệnh mô ung thư đại tràng người trên chuột thiếu hụt miễn dịch.*

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Đối tượng

Chuột nhắt BALB/c thiếu hụt miễn dịch, không có tế bào lympho T (nude mice, Foxn1<sup>nu/nu</sup>) được nhập khẩu từ Công ty Charles-River (Hoa Kỳ). Số lượng chuột thí nghiệm 5 con.

Tế bào ung thư đại tràng (UTĐT) người dòng HT-29 (ATCC, Hoa Kỳ).

Môi trường nuôi cấy tế bào: môi trường nuôi cấy tế bào McCoy's 5a Medium Modified (Catalog No. 30-2007, ATCC), bổ sung 10% dung dịch huyết thanh bào

thai bê (FBS), dung dịch penicillin/ streptomycin, dung dịch PBS, dung dịch Trypsin-EDTA (ATCC, Hoa Kỳ).

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Nuôi cấy và ghép tế bào ung thư vào chuột

Nuôi cấy tế bào ung thư đại tràng (UTĐT) người dòng HT-29 trong môi trường McCoy's 5a Medium Modified bổ sung 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. Nuôi cấy tăng sinh TBĐT trong chai có diện tích đáy chai 75 cm<sup>2</sup>, đặt trong tủ vô trùng, duy trì nhiệt độ 37°C và CO<sub>2</sub> 5%. Thay môi trường nuôi cấy 3 ngày/lần. Khi tế bào đạt mật độ 80% diện tích bề mặt chai, tách khỏi chai nuôi bằng Trypsin EDTA 0,05% và cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới. Khi số lượng tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mật độ tế bào đạt mật độ 10<sup>7</sup> tế bào/ml. Cố định chuột nude và tiêm 0,1 ml vào dưới da đùi phải (10<sup>6</sup> tế bào/chuột). Quá trình thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

#### 2.2.2. Theo dõi và xác định sự hình thành khối ung thư trên chuột

Khối u được đánh giá theo dõi sự phát triển tại vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần mỗi tuần, bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK.

Xác định kích thước khối u: khối u được đo theo hai kích thước dài x rộng bằng thước chính xác NSK (Nhật Bản), 2 lần/tuần.

#### 2.2.3. Xác định hình thái vi thể khối ung thư trên chuột

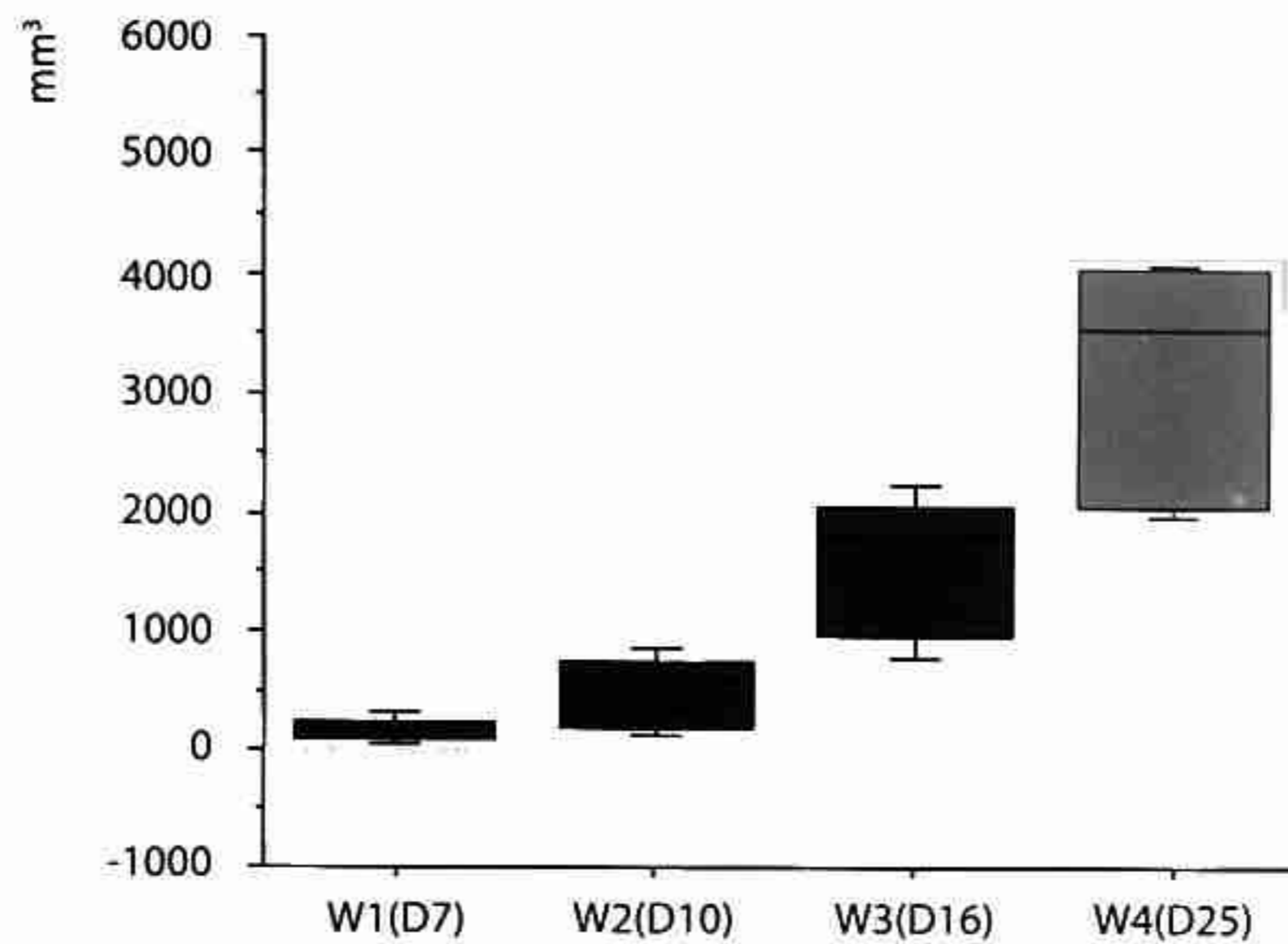
Sau 4 tuần tiến hành giết chuột, bóc tách khối u, bảo quản trong dung dịch Formalin 10% trong vòng 24-48 giờ. Tiếp theo, khối u được đúc khối paraffin, cắt lát dày 5micromet, nhuộm H.E. (Hematoxylin-Eosin) và đọc phân tích kết quả mô ung thư hình thành dưới kính hiển vi quang học. Phân tích những đặc 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.

#### 2.3. Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS15.0.

### 3. Kết quả và bàn luận

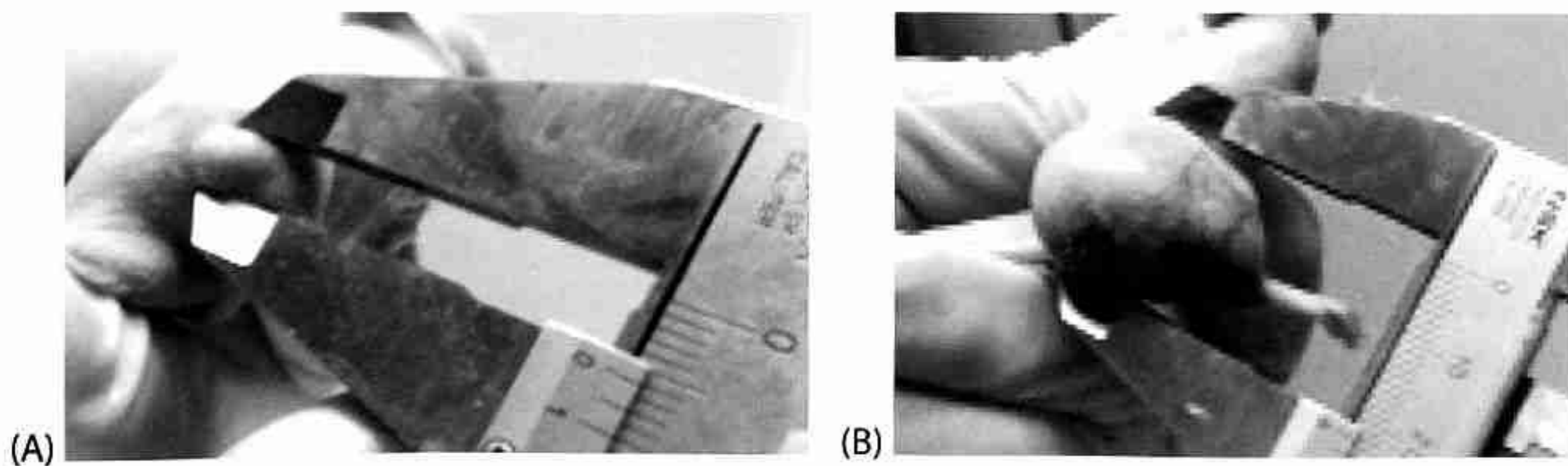
#### 3.1. Hình ảnh đại thể khối ung thư đại tràng người trên chuột nude

Sau 1 tuần ghép tế bào, xuất hiện khối u quan sát được bằng mắt thường. Tỷ lệ hình thành khối u trên chuột là 5/5 (100%). Thể tích khối u trung bình đạt sau 1 tuần (W1(D7)) 180 mm<sup>3</sup>, sau 2 tuần (W2(D10)) đạt trung bình 492,3 mm<sup>3</sup>, sau 3 tuần (W3(D16)) đạt 1576,3 mm<sup>3</sup> và sau 4 tuần (W4(D25)) đạt 3157,2 mm<sup>3</sup>. (Hình 1).



**Hình 1.** Thể tích khối ung thư đại trực tràng người trên chuột (mm<sup>3</sup>) sau 1 tuần (W1(D7)), 2 tuần (W2(D10)) và 1 tháng (W4(D25)).

Tốc độ khối u phát triển nhanh làm thay đổi hình dạng đuôi và ảnh hưởng tới quá trình vận động của chuột.

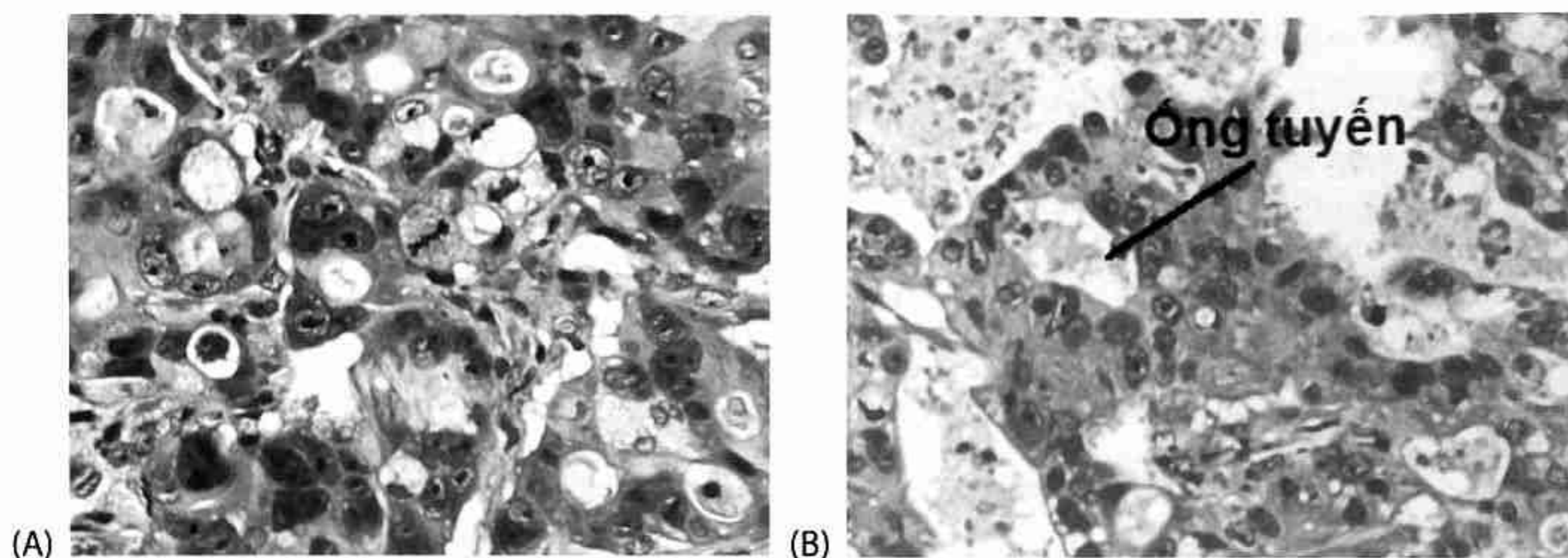


**Hình 2.** Hình ảnh khối ung thư đại tràng người dưới da đuôi chuột. (A) 7 ngày sau ghép tế bào, (B) 4 tuần sau ghép tế bào.

Sau 4 tuần, khối ung thư phát triển đạt kích thước lớn, đường kính có thể trên 20mm. Tại thời điểm sau 4 tuần, phẫu thuật chuột mang khối ung thư, bóc tách khối u ra khỏi đuôi và làm xét nghiệm mô bệnh học, phân tích hình ảnh mô ung thư. (Hình 2).

#### 3.2. Đặc điểm hình thái vi thể mô u hình thành trên chuột thiếu hụt miễn dịch

Khối u sau khi tách ra khỏi đuôi chuột, cắt thành mảnh nhỏ, bảo quản ở -80°C, lấy 3 mảnh bảo quản trong dung dịch formalin 10% trong vòng 24 - 48 giờ. Sau đó, đúc mảnh mô ung thư trong khối parafin, cắt lát 5 μm, nhuộm H.E, để phân tích hình ảnh mô bệnh học mô ung thư hình thành trên chuột.

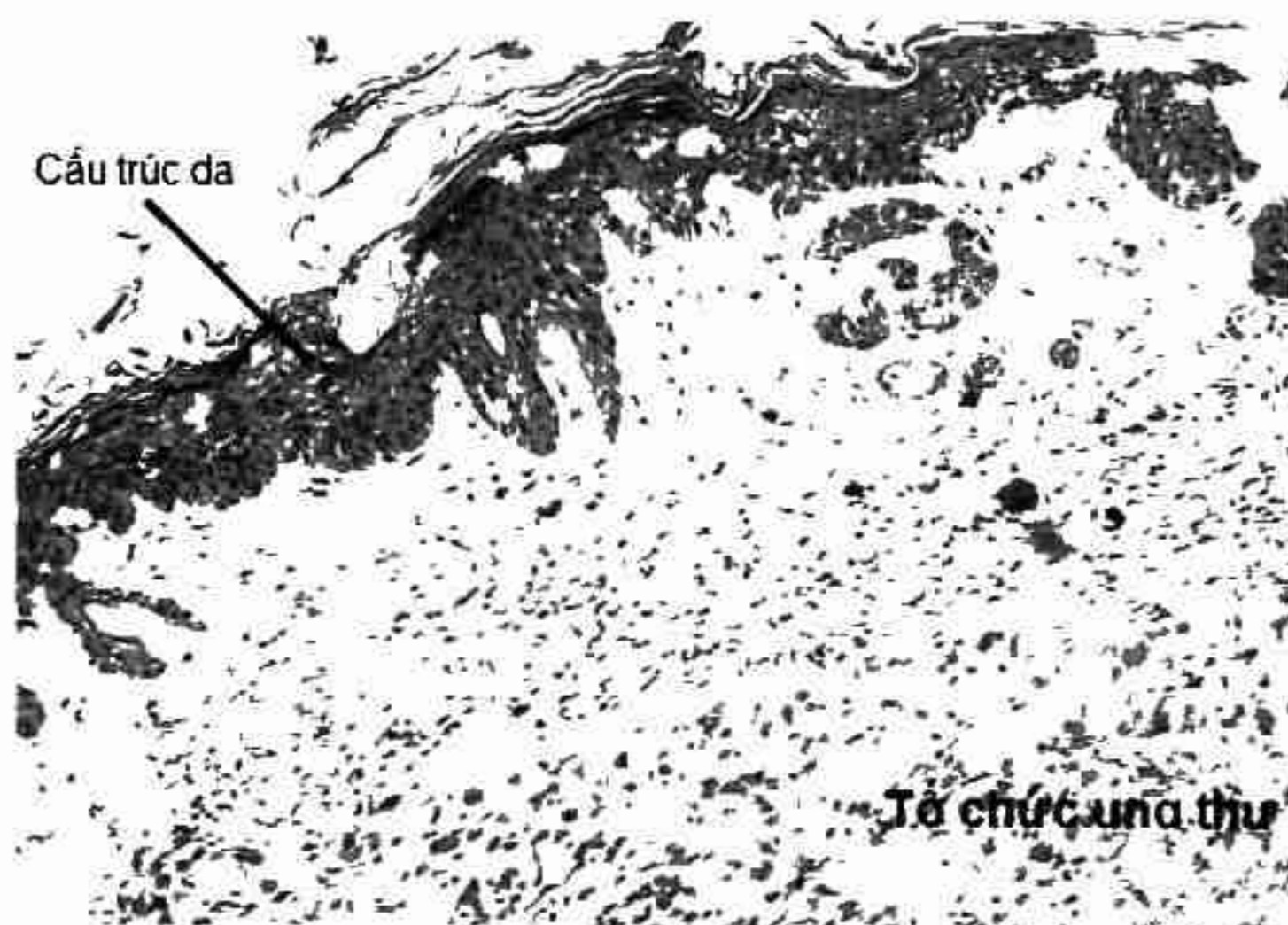


**Hình 3.** Hình ảnh mô bệnh học mô ung thư người trên chuột.

(A) tế bào nhân quái, nhân chia(40X); (B) Hình ảnh ống tuyến không điển hình có chứa chất tiết (20X).

Kết quả cho thấy cấu trúc của mô sinh thiết gồm các tế bào hình đa diện sắp xếp thành các đám hoặc các ổ. Các tế bào u có nhân không đều, tăng sắc, chất nhân thô, có nhiều nhân quái và nhân chia

bất thường (Hình 3A). Nhiều tế bào sắp xếp thành dạng tuyến, có hình ảnh chất tiết bên trong lòng ống. Nhiều đám tế bào xếp thành dải, hình ảnh ống tuyến không điển hình (Hình 3B).

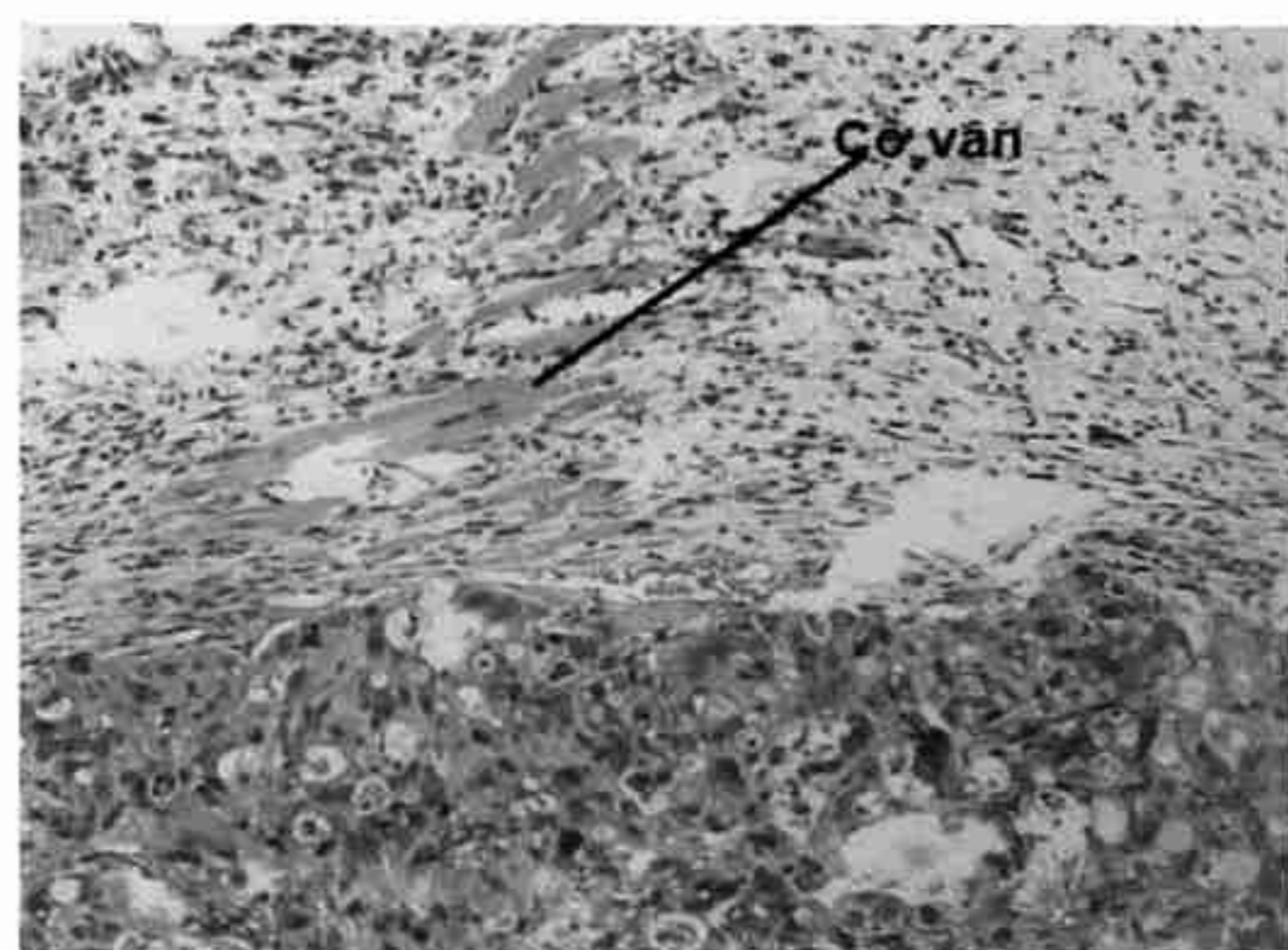


**Hình 4.** Hình ảnh khối u dưới da đùi (10X).

Khi phẫu tích khối u có màng da phủ, hình ảnh giải phẫu bệnh cho thấy cấu trúc da đầy đủ, tiếp theo là tổ chức dưới da và đến cấu trúc u. (Hình 4) Tại một số vị trí, có thể thấy hình ảnh các tế bào ung thư xâm lấn chèn ép vào dây thần kinh đùi chuột.

Hình ảnh thường thấy nhất là hình ảnh khối ung thư xâm lấn cơ đùi chuột. (Hình 5). Do vậy, chuột có kích thước u lớn thường khó vận động, khối u bám chắc vào khối cơ đùi.

Với các khối u lớn, trung tâm khối u thường bị hoại tử dạng bã đậu. Dưới kính hiển vi, là khu vực



**Hình 5.** Hình ảnh khối u xâm lấn cơ vân (20X).

nhiều hình ảnh thoái hóa, hoại tử tế bào ở các giai đoạn khác nhau. Tế bào mất cấu trúc điển hình, còn lại các di tích của nhân và các cấu trúc khác của tế bào. Những đặc điểm này cũng được mô tả bởi các nghiên cứu của các tác giả công bố gần đây trên thế giới [4-7].

**4. Kết luận**

Hình thái vi thể khối ung thư đại tràng dòng HT-29 người ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng phân tích trên tiêu bản nhuộm H.E. cho thấy: Các

tế bào u có nhân không đều, tăng sắc, chất nhân thô, có nhiều nhân quái và nhân chia bất thường. Khối ung thư xâm lấn mô cơ vân. Các tế bào có cấu trúc gồm các tế bào hình đa diện sắp xếp thành các đám hoặc các ổ, hoặc dạng tuyến có chất chế tiết bên trong.

#### Tài liệu tham khảo

1. Cusack JC Jr, Liu R, Xia L, Chao TH, Pien C, Niu W, Palombella VJ, Neuteboom ST, Palladino MA (2006) *NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model*. Clin Cancer Res 12 (22): 6758-6764.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer 127(12): 2893-2917.
3. GG Steel, MJ Peckham (1980) *Human tumour xenografts: A critical appraisal*. Br J Cancer 41 Suppl, IV: 133-139.
4. Kubota T (1994) *Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: The importance of orthotopic transplantation*. J Cell Biochem 56 (1): 4-8.
5. Lei K, Ye L, Yang Y, Wang GJ, Jiang QY, Jiang Y, Wei YQ, Deng HX (2010) *RNA interference-mediated silencing of focal adhesion kinase inhibits growth of human colon carcinoma xenograft in nude mice*. J Biomed Nanotechnol 6 (3): 272-278.
6. Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL (2002) *Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer*. Clin Cancer Res 8 (9): 2985-2991.
7. Paulsen JE, Elgjo K (2001) *Effect of tumour size on the in vivo growth inhibition of human colon carcinoma cells (HT-29) by colon mitosis inhibitor* In Vivo 15 (5): 397-401.