

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG NHẮM ĐÍCH *IN VITRO* TẾ BÀO UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG TỪ HỆ VẬN CHUYỂN NANO Tb³⁺ - MONOCLONAL ANTIBODY (RT)

EVALUATION OF POTENTIAL TARGETING *IN VITRO* TO COLORECTAL CANCER CELL
FROM NANO Tb³⁺ - MONOCLONAL ANTIBODY (RT) TRANSPORT SYSTEM

Lê Nhật Minh³, Võ Trọng Nhân³, Đỗ Thị Thảo¹,
Trần Thu Hương², Phùng Thị Kim Huệ^{3,*}

TÓM TẮT

Trên thế giới, ung thư đại trực tràng với tỷ lệ mắc hàng năm là 1,7 triệu người, đây là một vấn đề sức khỏe toàn cầu [1], được đánh giá nhiều thứ hai với khoảng 6,3 triệu người mắc và 860.000 ca tử vong trong năm 2018 [2]. Phương pháp điều trị hiện nay thường để lại nhiều di chứng và tác dụng phụ. Để hạn chế các ảnh hưởng này, đem lại sự dễ chịu cho bệnh nhân thì cần có hệ vận chuyển hướng đích đánh dấu các tế bào ung thư đại trực tràng, phát hiện chúng để khoanh vùng trước khi hóa trị và xạ trị. Nghiên cứu này hướng đến đánh giá hệ vận chuyển (ET) hướng đích thông qua việc RT đánh dấu được tế bào ung thư đại trực tràng, có hiệu suất cao mà không đánh dấu tế bào lành. Nghiên cứu đã sử dụng hệ thống quang phổ hồng ngoại biến đổi fourier Impact 410 NICOLET để xác định hệ vận chuyển có khả năng phát quang, sử dụng kỹ thuật flow cytometry để xác định số lượng tế bào được đánh dấu,... Kết quả đã chỉ ra rằng, trong điều kiện *in vitro*, hệ vận chuyển ET đã đánh dấu được tế bào ung thư đại trực tràng chiếm 26,89% so với đối chứng, trong khi đó chúng không hề đánh dấu tế bào lành. Đây là cơ sở mở ra một hướng nghiên cứu mới về tính hướng đích trong điều trị ung thư đại trực tràng đáp ứng được mục tiêu tìm kiếm vật liệu nano huỳnh quang mới để khống chế căn bệnh nguy hiểm của các nhà khoa học hiện nay.

Từ khóa: lon Tb³⁺, hệ vận chuyển, ung thư đại trực tràng, đánh dấu tế bào ung thư.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a major global health problem with an annual incidence of 1.7 million worldwide [1]. Around 6.3 million people in the world live with colorectal cancer which is the second most diagnosed cancer estimated to have caused around 860,000 deaths in 2018 [2]. Conventional treatments of colon cancer have left several undesired aftereffects. In order to limit these side effects and give relief for the patient, it is necessary to have a targeted transport system highlighting colorectal cancer cells for localization before chemo- and radiotherapy. This study aims to evaluate the target transport (ET) system through RT marking with high-yield on colorectal cancer cells over normal cells. The study used variable infrared spectroscopy system (Fourier Impact 410 NICOLET) to determine the luminescence of transport system, flowcytometry to determine the number of marked cells. The results demonstrated that the ET transport system *in vitro* gave marks on 26.89% of colorectal cancer cells compared to the control, while they did not pinpoint healthy cells. It lays the basis for a new targeting approach in the treatment of colorectal cancer to meet a demand for finding new fluorescence nanomaterials to control the deadly disease nowadays.

Keywords: Tb³⁺, transport system, colorectal cancer, cancer cell marker.

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường THPT chuyên Hùng Vương Gia Lai

*Email: whitelily109@gmail.com

Ngày nhận bài: 18/12/2019

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 11/02/2020

Ngày chấp nhận đăng: 20/02/2020

1. GIỚI THIỆU

Đại trực tràng còn được gọi là ruột kết hay ruột già, nó nằm phía dưới từ 5 đến 6 feet (từ 1,5 đến 1,8m) của hệ thống tiêu hóa. Đoạn cuối từ 8 đến 10 inch (từ 0,2 đến 0,25m) của ruột kết là trực tràng.

Tại Việt Nam, ung thư đại trực tràng hiện đang xếp thứ 5 trong số các loại ung thư phổ biến nhất, đứng sau ung thư gan, ung thư phổi, ung thư dạ dày và ung thư vú. Theo thống kê của WHO, năm 2000, số ca mắc mới ung thư đại trực tràng ở cả 2 giới là 5.400 ca, đến năm 2010 là hơn 13.000 ca và đến năm 2018 đã tăng lên gần 15.000 ca mắc mới, chiếm tỉ lệ 13,4/100.000 dân, gấp gần 3 lần trong vòng 18 năm, trong đó có gần 9.300 ca tử vong [3].

Ung thư trực tràng hình thành từ các u nhỏ do tế bào lành tính, sau đó bị viêm nhiễm, tế bào bị đột biến trở thành những khối u ác tính và phát bệnh. Ở giai đoạn sớm, ung thư đại trực tràng thường không có biểu hiện rõ ràng khiến người bệnh chủ quan, lầm tưởng với nhiều bệnh lý đường tiêu hoá khác, có tới 70 - 80% bệnh nhân ung thư đại trực tràng ở Việt Nam được phát hiện bệnh ở giai đoạn muộn [3].

Để điều trị ung thư đại trực tràng sau khi phát hiện, người bệnh cần được phẫu thuật cắt bỏ khối u rồi sử dụng liệu pháp hóa xạ trị, bên cạnh việc diệt tế bào ung thư thì chúng còn làm tổn hại đến các tế bào bình thường gây ra các tác dụng phụ. Hơn nữa, việc truyền hoá chất hay hoá trị diệt tế bào ung thư bị phát tán sau phẫu thuật lại không xác định được vị trí nên thường tác động trên toàn thân, gây ra nhiều hệ lụy cho người bệnh. Vì vậy, hiệu quả điều trị thường thấp đối với những bệnh nhân có cơ địa yếu.

Việc sử dụng công nghệ nano truyền thống trong điều trị ung thư là cải thiện dược động học và giảm độc tính toàn thân của hóa trị liệu thông qua việc nhắm mục tiêu chọn lọc và đưa các thuốc chống ung thư này đến các khối u [4]. Ưu điểm của chất mang nano là chúng có thể làm tăng chỉ số điều trị tổng thể của thuốc được phân phối thông qua các phương pháp nano trong hóa trị liệu được bọc hoặc kết hợp với bề mặt của hạt nano [4]. Việc cung cấp có chọn lọc các nền tảng trị liệu nano phụ thuộc chủ yếu vào việc nhắm đích thụ động của các khối u thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và duy trì [5]. Việc tổ hợp kháng thể đặc hiệu với vật liệu Tb^{3+} phát quang từ đất hiếm để tạo hệ vận chuyển RT, phát hiện tế bào ung thư đại tràng là một trong những ý tưởng mới nhằm hỗ trợ đắc lực trong việc điều trị căn bệnh ung thư nguy hiểm này.

Theo báo cáo nghiên cứu của M. Le và cs [6] đã chỉ ra rằng, ion Tb^{3+} từ đất hiếm có thể tạo được vật liệu nano ($TbPO_4 \cdot H_2O$) phát quang, có cấu trúc tinh thể dạng hexagonal của Terbium phosphate monohydrate. Phổ huỳnh quang của $TbPO_4 \cdot H_2O$ tại pH = 2, ủ ở 200°C, 24 giờ được bọc lớp Silica gắn nhóm NH_2 được kích thích tại bước sóng 370nm là 570nm. Khi tổ hợp kháng thể kháng CD133 với $TbPO_4 \cdot NH_2$ (đã chức năng hóa bề mặt) và ủ với tế bào ung thư đại trực tràng, phổ huỳnh quang được đo trên hệ iHR55 (Jobin-Yvon) ở bước sóng 355nm cho thấy có sự phát quang mạnh.

Vậy, hệ vận chuyển chứa nano Tb^{3+} với kháng thể đơn dòng kháng CD133 (ET) có khả năng đánh dấu tế bào ung thư đại trực tràng với hiệu suất là bao nhiêu?. Liệu chúng có đánh dấu được tế bào lành hay không?. Là những câu hỏi mà nghiên cứu này đặt ra trong mục tiêu hướng đích *in vitro* từ hệ vận chuyển ET.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Dòng tế bào ung thư đại trực tràng ở người (HT-29); Tế bào lành đại trực tràng ở người (CCD-18Co) được cung cấp bởi GS.TS. Chi-Ying Huang, Đại học Quốc gia Yang-Ming, Đài Loan và TS. P. Wongtrakoongate, Đại học Mahidol, Thái Lan.

- Môi trường DMEM, huyết thanh phôi bò (FBS), kháng sinh (antibiotics-antimycotics), trypsin-EDTA được nhập từ Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Kháng thể Human CD133 monoclonal antibody conjugated with FITC (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Các hóa chất khác được cung cấp bởi Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

- Hệ vận chuyển ET của nhóm tác giả chế tạo trước khi thực hiện nghiên cứu này [6].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp nuôi cấy dòng tế bào *in vitro*** (theo thường qui của Ngân hàng tế bào ATCC (American Type Culture Collection, US)

Tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29), tế bào lành (CCD-18Co) được nuôi cấy trong môi trường DMEM có thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10mM HEPES và 1,0mM sodium pyruvate, bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (fetal bovine serum, FBS). Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 .

- **Đánh dấu tế bào ung thư và tế bào lành từ hệ vận chuyển ET**

+ *Phương pháp nhuộm tế bào*

Để xác định được khả năng phát quang sau khi gắn tổ hợp RT để đánh dấu vào các loại tế bào trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành nhuộm tế bào.

Quy trình: Tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29) được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng với nồng độ 10000 tế bào/giếng và nuôi ổn định trong tủ ấm 37°C, 5% CO_2 trong 24 giờ. Sau đó loại bỏ môi trường và cố định tế bào bằng formaldehyde 10% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Formaldehyde sau đó được loại bỏ và tế bào được rửa lại 3 lần bằng PBS. 10µl mẫu được hòa trong 190µl PBS và được đưa vào mỗi giếng tế bào của đĩa thí nghiệm. Tế bào tiếp tục được ủ ở 4°C trong 1 giờ.

Lượng mẫu không gắn vào tế bào được loại bỏ và rửa lại bằng PBS thêm 3 lần.

Sau đó 100 µl PBS được thêm vào các giếng trước khi tế bào được quan sát ở kính hiển vi huỳnh quang Olympus Scan^R (Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, DE - Viện Hoá học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam).

+ *Phương pháp xác định số lượng tế bào được đánh dấu* (thông qua gắn marker bề mặt CD133 bằng kỹ thuật phân tích dòng chảy tế bào - flowcytometry)

Tế bào ung thư đại trực tràng ở người, tế bào lành được đưa ra đĩa 6 giếng và nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C, 5% CO_2 .

Sau 24h, tế bào được tách khỏi đáy giếng bằng Trypsin-EDTA và thu vào ống falcon.

Tế bào được hòa trong môi trường DMEM có chứa 2% FBS sau đó bổ sung thêm $TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica - NH_2$ hoặc hệ vận chuyển ET, hoặc kháng thể kháng CD133-FITC ở 4°C trong 10 - 15 phút và tránh ánh sáng.

Số lượng tế bào được đánh dấu huỳnh quang/phát quang nhờ gắn kết marker bề mặt CD133 (trên tổng số 10.000 - 12.000 tế bào đếm) được phân tích bằng hệ thống flow cytometry Novocyte (ACEA Bioscience Inc.) và phần mềm NovoExpress.

2.3. Xử lý số liệu

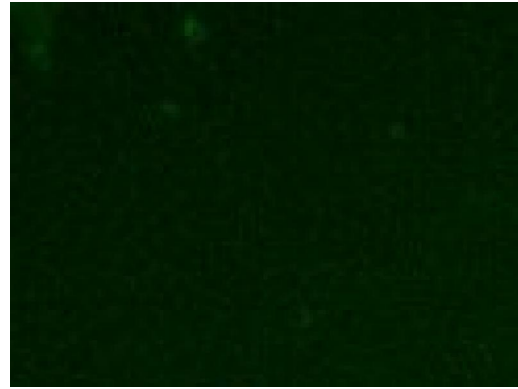
Các số liệu được phân tích, xử lý qua phần mềm Excel 2010 và biểu diễn dưới dạng số trung bình ± độ lệch chuẩn

(SD). Kiểm định giả thuyết về giá trị trung bình của hai mẫu bằng test thống kê. Các thông số được tính toán, xử lý bằng phần mềm PKSolver.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

- Đánh dấu tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29) bằng hệ vận chuyển ET

Tiến hành đánh dấu tế bào ung thư (HT-29) với hệ vận chuyển ET. Kết quả thu được ở hình 1 cho thấy, tế bào HT-29 khi tổ hợp với hệ vận chuyển ET đã được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang nhờ sự phát quang mạnh. Đối chứng âm chưa cho thấy hình ảnh tế bào tương ứng. Mẫu đối chứng là kháng thể CD133-FITC có độ phát quang mạnh. Kết quả thu được trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của M. Le và cs [6].



Đối chứng âm

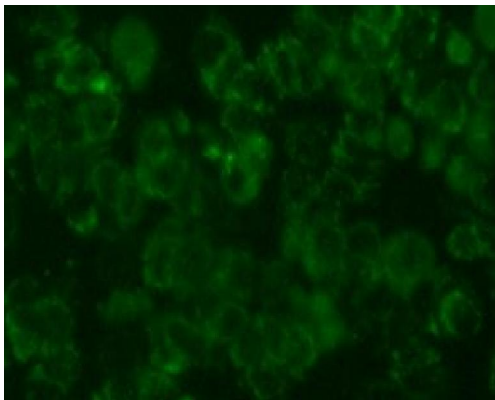
Hình 1. Hình ảnh tế bào HT-29 được nhuộm với các mẫu $TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica-NH_2$; Hệ vận chuyển ET; CD133-FITC và đối chứng không nhuộm trong 1 h và quan sát bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Olympus Scan^R (Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, DE)

- Đánh dấu tế bào lành (CCD-18Co) bằng hệ vận chuyển ET

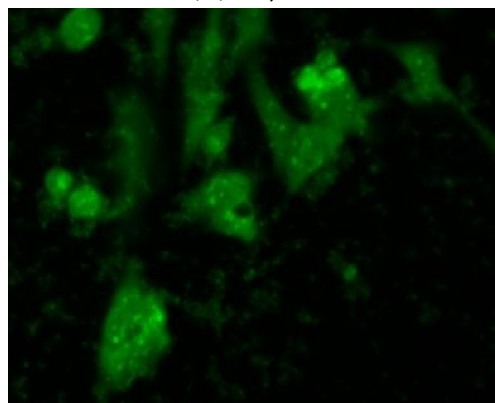
Tiến hành ủ tế bào lành (CCD-18Co) và nhuộm với các vật liệu phát quang, qua quan sát bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Olympus Scan^R cho thấy, hệ vận chuyển ET chưa đánh dấu được tế bào lành thông qua sự phát quang, điều này thể hiện, ET của nghiên cứu này chỉ đánh dấu được tế bào ung thư đại trực tràng. Từ đó cho thấy, chúng có tính hướng đích, chỉ tổ hợp, liên kết với tế bào ung thư mà không làm ảnh hưởng đến tế bào bình thường của cơ thể.



$TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica-NH_2$



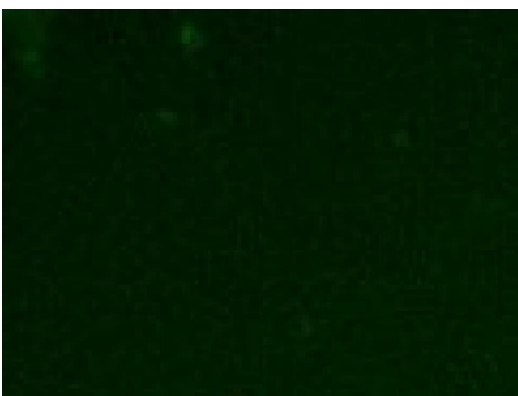
Hệ vận chuyển ET



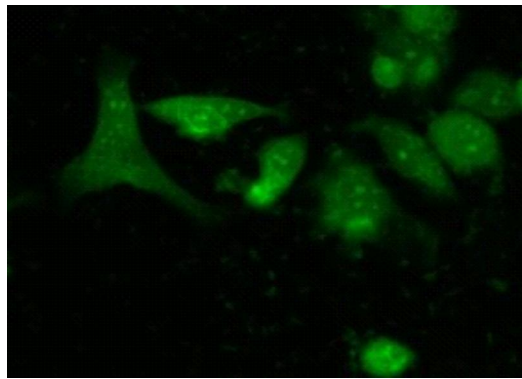
CD133-FITC



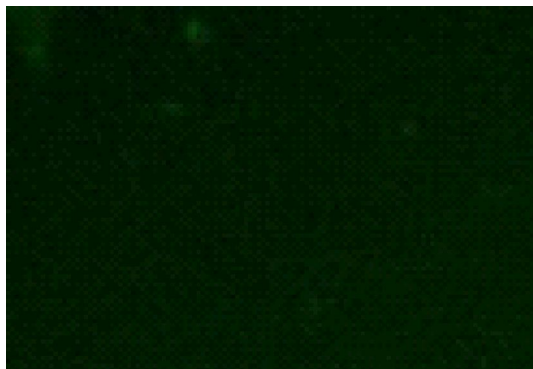
$TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica-NH_2$



Hệ vận chuyển ET



CD133-FITC



Đối chứng âm

Hình 2. Hình ảnh tế bào CCD-18Co được nhuộm với các mẫu $TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica-NH_2$; Hệ vận chuyển ET; CD133-FITC và đối chứng không nhuộm trong 1 h và quan sát bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Olympus Scan^R

- Hiệu suất đánh dấu huỳnh quang các loại tế bào bằng hệ vận chuyển ET

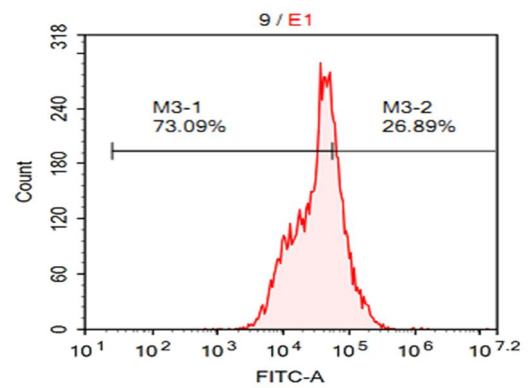
Để đánh giá khả năng đánh dấu tế bào của hệ vận chuyển RT, nghiên cứu này đã sử dụng kỹ thuật phân tích dòng chảy tế bào (Flowcytometry), có sử dụng kháng thể đơn dòng CD133-FITC làm đối chứng. Kết quả thể hiện qua bảng 1 và hình 3.

Bảng 1. Hiệu suất đánh dấu tế bào ung thư đại trực tràng và tế bào lành

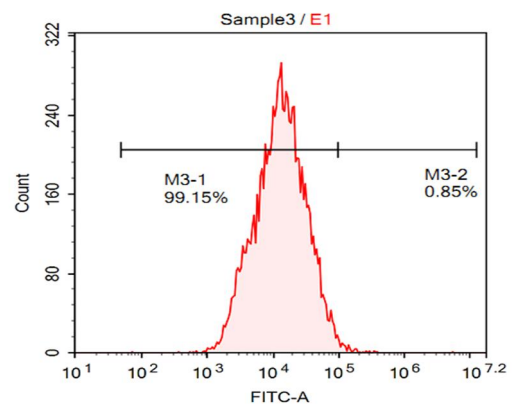
Mẫu vật liệu	Lượng tế bào được phát hiện (gắn marker CD133) (%)	
	Tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29)	Tế bào lành
ET	26,89 ± 1,27	0,85 ± 0,07
$TbPO_4 \cdot H_2O \cdot silica-NH_2$	0,57 ± 0,03	0,54 ± 0,03
CD133-FITC	82,24 ± 1,59	1,17 ± 0,06
Đối chứng không nhuộm	0,31 ± 0,09	0,23 ± 0,07

Kết quả cho thấy, hệ vận chuyển ET đã đánh dấu được 26,89% tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29). Bên cạnh đó, các tổ hợp vật liệu cũng như đối chứng dương là CD133-FITC chưa đánh dấu và phân biệt được tế bào lành. Như vậy, hệ vận chuyển ET đã cho thấy tính hướng đích trong đánh dấu tế bào ung thư. Những kết quả ban đầu này còn cần được tiếp tục nghiên cứu, hoàn thiện về độ bền, độ an toàn, cũng như mở rộng đánh giá trên các loại tế bào ung thư khác và nghiên cứu *in vitro*.

(A) Hệ vận chuyển ET

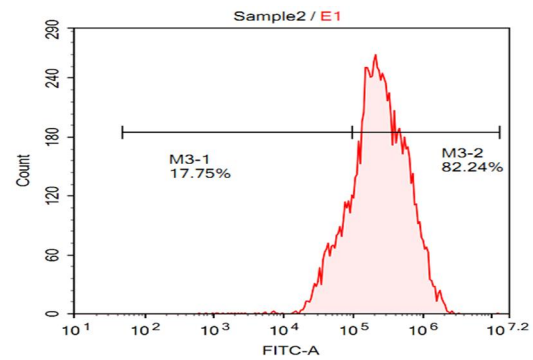


HT-29

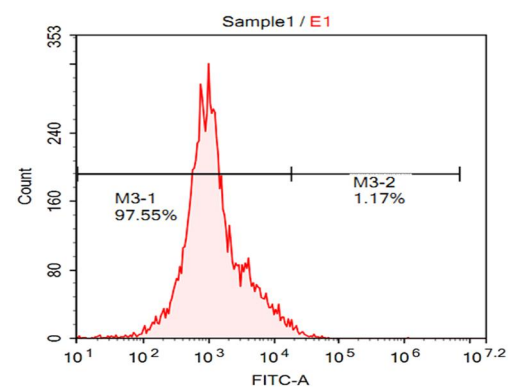


Tế bào lành (CCD-18Co)

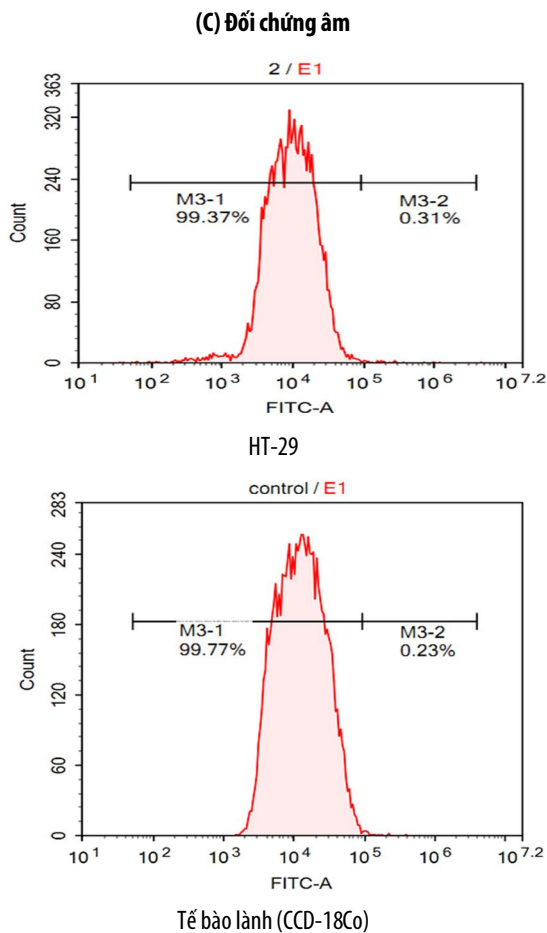
(B) CD133-FITC (ThermoFisher Scientific)



HT-29



Tế bào lành (CCD-18Co)



Hình 3. Phân tích dòng chảy tế bào để xác định số lượng tế bào HT-29 và CCD-18Co được đánh dấu huỳnh quang bằng các vật liệu: (A) Hệ vận chuyển ET (B) CD133-FITC, (C) đối chứng âm

Chen và cộng sự [7] có sử dụng kháng thể kháng EpCAM, một protein xuyên màng và được xem là có vai trò truyền tín hiệu trong quá trình di chuyển, tăng sinh và biệt hóa của tế bào, để tổ hợp với tiểu phần copolymer 3 hợp phần (triblock copolymer-poly(ethylene oxide)-block-poly[2-(disopropylamino) ethyl methacrylate]-block-poly(acrylic acid) (PEO43-b-PDPA76-bPAA17) để vận chuyển thuốc/siRNA ức chế quần thể tế bào biểu hiện EpCAM. Tuy nhiên, tổ hợp này có yếu điểm là không có yếu tố để đánh dấu tế bào ung thư một cách đồng thời do vật liệu mang (carrier) không có tính chất phát quang. Hoặc gần đây nhất, một báo cáo của Lu và cộng sự [8] về việc sử dụng vật liệu nano từ 5 nguyên tố đất hiếm để tăng cường độ nhạy phóng xạ nhằm tăng hiệu quả diệt tế bào ung thư não *in vitro*. Như vậy, việc sử dụng vật liệu nano từ Tb³⁺ tổ hợp kháng thể kháng CD133 tạo hệ vận chuyển ET để phát hiện tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29) cũng có thể là bước tiến đầu tiên để ứng dụng những đặc tính quý của nguyên tố đất hiếm này vào điều trị hướng đích đối với tế bào ung thư.

4. KẾT LUẬN

Hệ vận chuyển ET tổ hợp với tế bào ung thư đại trực tràng (HT-29) phát quang mạnh khi quan sát dưới kính hiển

vi huỳnh quang và phân tích bằng kỹ thuật flow cytometry đã xác định hiệu suất đánh dấu đạt 26,89%; với tế bào lành (CCD-18Co) không bị đánh dấu, cho thấy, trong điều kiện *in vitro*, hệ vận chuyển ET có tính hướng đích tế bào ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Vos, T., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., ... & Aboyans, V., 2017. *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet, vol. 390, no. 10100, pp. 1211-1259, 2017.

[2]. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, 2018. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, vol. 68, no. 6, pp. 394-424.

[3]. T. Pham, L. Bui, G. Kim, D. Hoang, T. Tran, and M. Hoang, 2019. *Cancers in Vietnam-Burden and Control Efforts: A Narrative Scoping Review*. Cancer Control, vol. 26, no. 1, p. 107327481986380.

[4]. H. Maeda, H. Nakamura, and J. Fang, 2013. *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 65, no. 1, pp. 71-79, 2013.

[5]. D. A. Giljohann, D. S. Seferos, A. E. Prigodich, P. C. Patel, and C. A. Mirkin, 2009. *Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates*. Journal of the American Chemical Society, vol. 131, no. 6, pp. 2072-2073.

[6]. M. Le, N. Vo, T. Do, H. Tran, H. Phung, 2019. *Đánh giá khả năng phát hiện tế bào ung thư ruột kết (HT-29) của vật liệu nano chứa ion đất hiếm Tb³⁺*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, số 3.

[7]. J. Chen, Q. Liu, J. Xiao, and J. Du, 2015. *EpCAM-Antibody-Labeled Nontoxic Polymer Vesicles for Cancer Stem Cells-Targeted Delivery of Anticancer Drug and siRNA*. Biomacromolecules, vol. 16, no. 6, pp. 1695-1705.

[8]. V. M. Lu, F. Crawshaw-Williams, B. White, A. Elliot, M. A. Hill, and H. E. Townley, 2019. *Cytotoxicity, dose-enhancement and radiosensitization of glioblastoma cells with rare earth nanoparticles*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, vol. 47, no. 1, pp. 132-143.

AUTHORS INFORMATION

Le Nhat Minh³, Vo Trong Nhan³, Do Thi Thao¹, Tran Thu Huong², Phung Thi Kim Hue³

¹Biotechnology Institute, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology

³Hung Vuong Gifted High School, Gia Lai