

MITOMYCIN C ỨC CHẾ QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN *IN VITRO* CỦA PHÔI CHUỘT TRINH SẢN GIAI ĐOẠN TIỀN LÀM TỔ

LÊ THÀNH LONG, HOÀNG NGHĨA SON

Viện Sinh học nhiệt đới, tp. Hồ Chí Minh

NGUYỄN VĂN ĐÀM

Công ty Công nghệ sinh học xanh, tp. Hồ Chí Minh

NGUYỄN THỊ THƯƠNG HUYỀN

Trường đại học Sư phạm, tp. Hồ Chí Minh

Mitomycin C là một nhân tố hoá liệu pháp được dùng trong điều trị khối u rắn [2]. Nó được dùng nhiều trong điều trị ung thư như ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư ruột và ung thư vú [3]. Tuy nhiên, việc điều trị ung thư sử dụng Mitomycin C có thể gây ra những tác dụng phụ khác nhất là đối với phụ nữ khi điều trị ung thư vú, nó có thể ảnh hưởng đến quá trình sinh sản nhất là quá trình phát triển của phôi ở phụ nữ mang thai. Để hiểu rõ ảnh hưởng của Mitomycin C, phôi chuột được dùng làm mô hình cho việc đánh giá những tác dụng phụ của Mitomycin C lên quá trình phát triển *in vivo*. Việc sử lý phôi chuột giai đoạn phôi dâu sẽ làm giảm số lượng tế bào trong khối tế bào bên trong (ICM) của phôi nang [9]. Chuột được tiêm Mitomycin C với liều 0,0707 mg/con sẽ làm giảm 50% số lượng trứng trong buồng trứng [8]. Hơn nữa, quá trình xử lý chuột mang thai với Mitomycin C có thể làm số lượng tế bào trong cả ICM và lớp dưỡng bào (trophectoderm), làm giảm khả năng làm tổ của phôi nang và gây ra rất nhiều bất thường trong quá trình phát triển của thai như gây ra sai hỏng thành bụng, sai hỏng vùng xương sườn, giảm khối lượng của thai và gia tăng khối lượng của nhau thai [10].

Tuy nhiên, những nghiên cứu trên tập trung chủ yếu vào quá trình phát triển *in vivo* của phôi giai đoạn phôi nang và phôi giai đoạn sau khi làm tổ, đánh giá về mặt giải phẫu mô phôi mà chưa nghiên cứu sâu vào việc phát triển của giai đoạn phôi tiền làm tổ *in vitro* cũng như tìm hiểu nguyên nhân làm giảm sự phát triển của phôi chuột được xử lý với Mitomycin C. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát sự phát triển

in vitro của phôi chuột trinh sản dưới tác động của Mitomycin C. Những ảnh hưởng của Mitomycin C sẽ được khảo sát từ lúc hoạt hoá trứng chín và phát triển thành phôi ở các giai đoạn 2 tế bào, 4 tế bào cho đến giai đoạn phôi dâu và phôi nang cũng như những biến đổi của tế bào chất và nhân trong các tế bào phôi.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Chuột chủng *Swiss* 8 tuần tuổi, có khối lượng 20 ± 2 g. Chuột được cung cấp bởi Viện Pasteur, thành phố Hồ Chí Minh.

2. Phương pháp

a. Gây siêu bài noãn và thu trứng

Chuột cái được tiêm PMSG (Organon) 10 IU/con. Sau 48 tiếng chuột được tiêm hCG (Organon) 10 IU/con. Sau 14 tiếng, trứng chín được thu từ ống dẫn trứng và được chuẩn bị trong PBS/PVA 0,1%.

b. Xử lý Mitomycin C, hoạt hóa trình sản và nuôi trứng

Trứng sau khi được thu nhận sẽ được xử lý với Mitomycin C (Sigma) ở các nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5, 1, 2 giờ và ở các nồng độ 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$ trong 2 giờ để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý của Mitomycin C trên sự phát triển phôi trình sản. Sau đó, trứng được hoạt hóa trình sản bằng môi trường KSOM chứa ethanol 7% trong vòng 5 phút. Để ức chế sự hình thành thoi vô sắc, trứng sau khi hoạt hóa được nuôi trong môi trường KSOM chứa Cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$)

trong vòng 6 tiếng. Tiếp theo trứng được nuôi trong môi trường KSOM và đánh giá sự phát triển ở các giai đoạn khác nhau.

c. Nhuộm DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes)

Phôi chuột trình sản được cố định trong dung dịch PBS chứa paraformaldehyde 4% trong vòng 30 phút, sau đó được ủ với dung dịch PBS/PVA (0,1%) chứa Triton X100 0,1% qua đêm, phôi được rửa 2 lần với dung dịch PBS/PVA (0,1%) mỗi lần 10 phút. Sau đó, phôi được nhuộm với DAPI (2 µg/ml) trong 30 phút. Sau đó phôi được rửa 2 lần trong PBS/PVA (0,1%) mỗi lần 10 phút. Phôi được cố định và quan sát trong phổ cho DAPI (Olympus).

d. Nhuộm AO-PI (Acridine Orange-Propidium Iodide)

Phôi được nhuộm với thuốc nhuộm Acridine Orange (Sigma) 100 µg/ml và Propidium Iodine (Sigma) 100 µg/ml để xác định sự phân mảnh của tế bào chất và sự phân mảnh của nhân. Phôi được quan sát trong phổ cho PI và AO (Olympus).

e. Xử lý thống kê

Số liệu thu được từ các lô thí nghiệm được phân tích bằng "One way Anova" theo "Tukey's multiple range test". Giá trị *P* nhỏ hơn 0,05 được đánh giá là có ý nghĩa thống kê.

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý MC lên sự phân chia của phôi trình sản

Sự phát triển *in vitro* của phôi từ trứng hoạt hoá trình sản được xử lý với Mitomycin C 10 µg/ml ở các thời gian 0,5, 1, 2 giờ đều giảm (bảng 1). Tỷ lệ phôi phân chia ở 3 lô thí nghiệm đều như nhau (52,38%; 52,54%; 68,33%). Lô xử lý trong 2 giờ là có tỷ lệ phát triển phôi 2 tế bào bằng lô đối chứng (68,33% so với 74,19%). Tuy nhiên, trong quá trình phát triển của phôi từ giai đoạn 2 tế bào đến giai đoạn 4 tế bào, số lượng phôi giảm mạnh, điều đó cho thấy Mitomycin C làm cho phôi trình sản giai đoạn 2 tế bào bị ức chế sự phát triển mạnh (hình 1.B, 1.E, 1.H). Tỷ lệ phôi bị ức chế sự phát triển càng tăng khi thời gian xử lý trứng chín với Mitomycin C càng lâu. Tỷ lệ phôi đầu hình thành ở các lô thí nghiệm cũng bị giảm mạnh. Hầu hết không có phôi nào

phát triển đến giai đoạn phôi nang. Tất cả các phôi đều bị dừng sự phát triển ở giai đoạn phôi dâu (hình 1.C, 1.F, 1.I). Chúng không hình thành được khoang phôi (blastocoel) và bị thoái hóa. Trong khi đó, phôi trình sản phát triển bình thường đến giai đoạn phôi nang ở nhóm đối chứng (hình 1.K, 1.L, 1.M).

2. Ảnh hưởng của nồng độ Mitomycin C lên sự phân chia của phôi trình sản

Trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý Mitomycin C lên sự phát triển của phôi trình sản, thời gian xử lý 2 giờ cho kết quả ức chế sự phát triển phôi 2 cao nhất, nên kết quả này được sử dụng trong việc đánh giá tác động của nồng độ Mitomycin C lên sự phát triển *in vitro* của phôi trình sản. Trứng chín được xử lý với Mitomycin C ở các nồng độ khác nhau sau khi được hoạt hoá trình sản đều bị ức chế sự phát triển ở giai đoạn phôi 2 tế bào (bảng 2). Tỷ lệ ức chế sự phát triển giữa các nồng độ 10, 20, 30, 40 µg/ml không khác nhau về mặt thống kê ($P < 0,05$). Nồng độ 50 µg/ml, Mitomycin C ức chế sự phát triển của phôi trình sản nhiều nhất, không qua phôi nào có thể vượt qua quá trình ức chế sự phát triển phôi ở giai đoạn này. Không có bất cứ phôi trình sản nào có thể phát triển đến giai đoạn phôi dâu cũng như phôi nang. Kết quả trên cho thấy, trứng chuột bị xử lý Mitomycin C nồng độ 50 µg/ml trong 2 giờ sẽ làm phôi bị ức chế hoàn toàn trong quá trình phát triển phôi sau hoạt hóa.

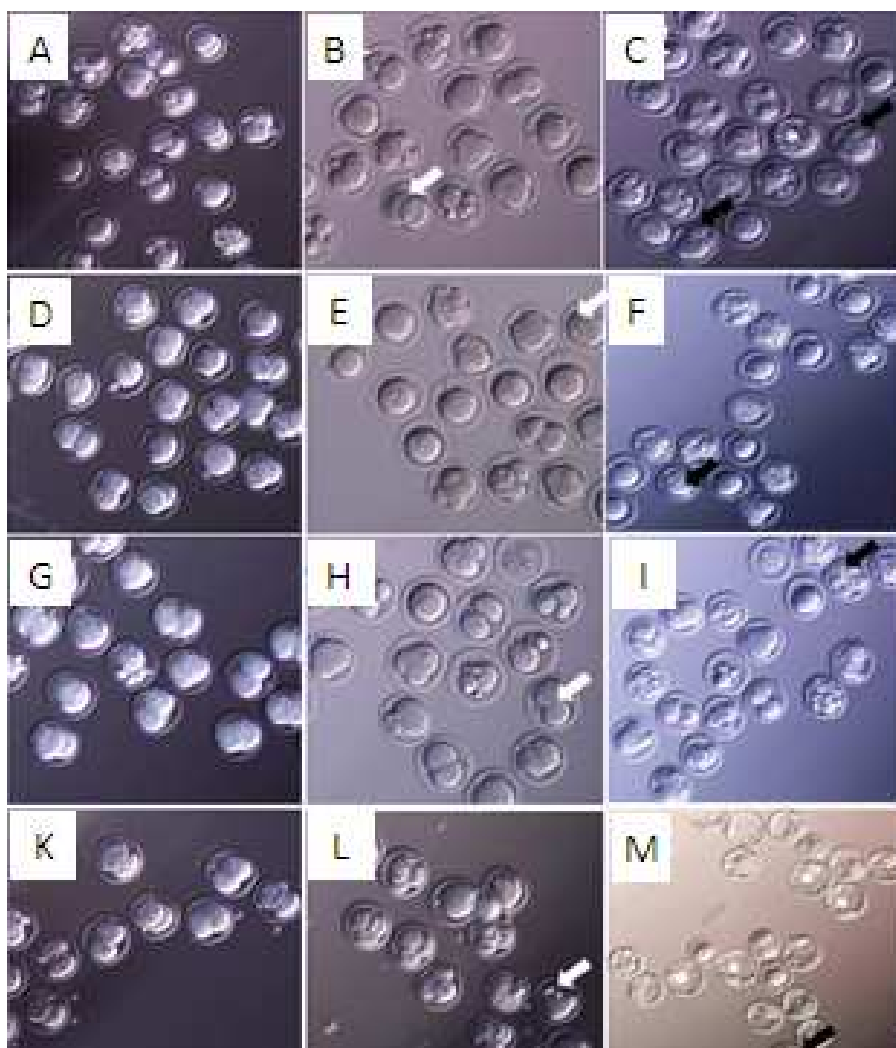
3. Mitomycin C làm chậm quá trình phân chia đầu tiên của tế bào phôi chuột trình sản

Mitomycin C không chỉ làm giảm quá trình phát triển của phôi chuột trình sản, mà nó còn làm chậm quá trình phân chia tế bào đầu tiên của phôi. Bình thường phôi chuột sẽ hoàn tất phân chia lần đầu tiên sau khi được hoạt hoá 24 giờ [7]. Tuy nhiên, trứng chín ở tất cả các nhóm xử lý Mitomycin C theo thời gian sau khi hoạt hoá thành phôi đều mất 48 giờ để hoàn tất quá trình phân chia lần đầu tiên (Bảng 3). Điều đó cho thấy, Mitomycin C không chỉ ảnh hưởng đến quá trình alkyl hoá DNA của phôi, mà nó còn làm chậm động lực phân chia của tế bào phôi liên quan đến thoi vô sắc, nó ảnh hưởng đến một số protein trong quá trình phân bào. Quá trình làm chậm phân chia diễn ra chủ yếu ở prometaphase hoặc metaphase II [5].

Tác động của thời gian lên sự phát triển *in vitro* phôi trình sản

Thời gian xử lí (giờ)	Số trứng hoạt hoá	Số phôi phát triển			
		Phôi 2 tế bào (%)	Phôi 4 tế bào (%)	Phôi dâu (%)	Phôi nang (%)
0,5	63	33(52,38) ^a	19(30,15) ^a	14(22,22)	1(1,59)
1	59	31(52,54) ^a	15(25,42) ^b	6(10,17)	0(0)
2	60	41(68,33) ^{ab}	5(8,33) ^c	1(1,67)	0(0)
Đối chứng	62	46(74,19) ^b	44(70,96) ^d	43(69,35)	34(54,84)

Ghi chú: a, b, c, d. khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).



Hình 1. Sự phát triển của phôi chuột trình sản. Phôi trình sản tại các thời điểm 2 tế bào, 4 tế bào và giai đoạn phôi nang ở các thời gian xử lí Mitomycin C 10 µg/ml trong 0,5 giờ (A-C), 1,0 giờ (D-F), 2,0 giờ (G-I). K-M: sự phát triển của phôi trình sản không xử lí Mitomycin C (nhóm đối chứng) ở các giai đoạn 2 tế bào, 4 tế bào và phôi nang. Quá trình làm giảm sự phát triển của phôi giai đoạn 2 tế bào (mũi tên trắng) và giai đoạn phôi dâu (mũi tên đen) diễn ra ở tất cả các lô thí nghiệm và lô đối chứng. Dấu sao trắng (C) cho thấy phôi nang ở lô phôi xử lí Mitomycin C trong 0,5 giờ và ở lô đối chứng (M) không xử lí Mitomycin C.

Bảng 2

Tác động của nồng độ Mitomycin C lên sự phát triển *in vitro* phôi trình sản

Nồng độ Mitomycin C ($\mu\text{g/ml}$)	Số trứng hoạt hoá	Số phôi phát triển			
		Phôi 2 tế bào (%)	Phôi 4 tế bào (%)	Phôi đầu (%)	Phôi nang (%)
10	60	41(68,33) ^a	5(8,33) ^a	0	0
20	61	38(62,23) ^a	4(6,56) ^a	0	0
30	66	38(57,58) ^a	4(6,06) ^a	0	0
40	78	59(75,64) ^a	3(3,85) ^a	0	0
50	91	31(34,07) ^b	0(0) ^b	0	0

Ghi chú: a, b: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).

4. Sự phân ly bất thường của nhiễm sắc thể

Những phôi được xử lý với Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5 giờ chưa đi vào quá trình apoptosis có quá trình phân chia nhiễm sắc thể bất thường. Trong quá trình phát triển thành phôi 4 tế bào, nhiễm sắc thể trước khi phân chia hình thành cấu trúc giống metaphase II, (hình 2A). Sự phân chia số lượng nhiễm sắc thể về hai cực tế bào phôi không đều và một số nhiễm sắc thể không di chuyển về hai cực tế bào (hình 2B, 2C). Điều đó cho thấy Mitomycin C không chỉ là tác nhân alkyl hoá DNA [11] mà nó còn có thể alkyl hoá protein. Sự bất thường trong phân ly nhiễm sắc thể là nguyên nhân dẫn tới hầu hết các phôi xử lý với Mitomycin C bị ức chế và không thể phát triển được đến giai đoạn phôi nang.

5. Mitomycin C cảm ứng quá trình apoptosis ở phôi trình sản

Các lô thí nghiệm đều có phôi biểu hiện các đặc điểm hình thái của quá trình apoptosis như tế bào chất phôi phân mảnh, nhân phân mảnh và nhiễm sắc chất cô đặc lại, màng nhân biến mất và phôi sẽ bắt màu cả Acrindine Orange và

Propodium Iodide trong quá trình apoptosis muộn [1]. Phôi xử lý 10 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C trong 0,5 giờ bị phân mảnh sau 48 tiếng hoạt hoá (hình 3A). Phương pháp nhuộm AO-PI cho thấy phôi đang trong quá trình apoptosis, phân tế bào chất phôi phân mảnh bắt màu cả Acrindine orange và Propidium Iodide (hình 3D).

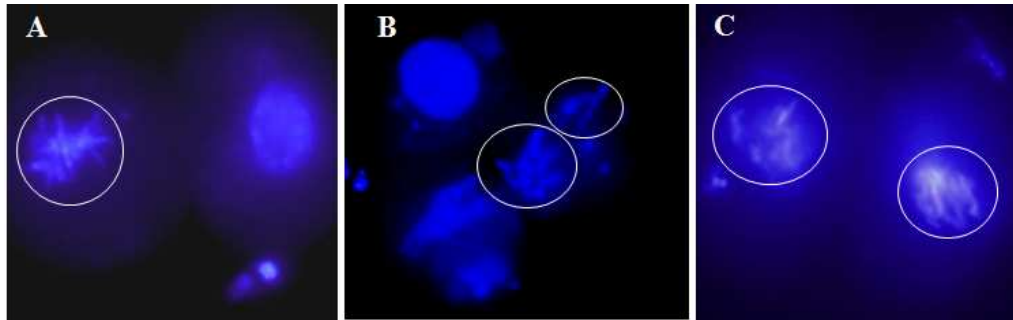
Để xác định những biến đổi của nhân trong quá trình apoptosis, phương pháp nhuộm đơn DAPI được sử dụng để đánh hình thái của nhân và nhiễm sắc chất trong nhân [6]. Phôi apoptosis ở lô xử lý với Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5 giờ cho thấy nhiễm sắc chất cô đặc lại, nhân phân mảnh và tách nhóm, màng nhân bắt đầu đứt gãy (hình 3B) [4]. Phôi apoptosis được xử lý với Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 1 giờ cũng cho thấy nhân phân mảnh và nhiễm sắc chất đặc lại, màng nhân đứt gãy hoàn toàn (mũi tên trắng), hình dạng nhân trở nên cong hơn do quá trình tách nhóm của các phần nhiễm sắc chất cô đặc (hình 3C) [4]. Hiện tượng nhân phân mảnh diễn ra nhiều nhất ở lô phôi được xử lý Mitomycin C trong vòng 2 giờ, phôi xuất hiện rất nhiều thể apoptosis (hình 3E).

Bảng 3

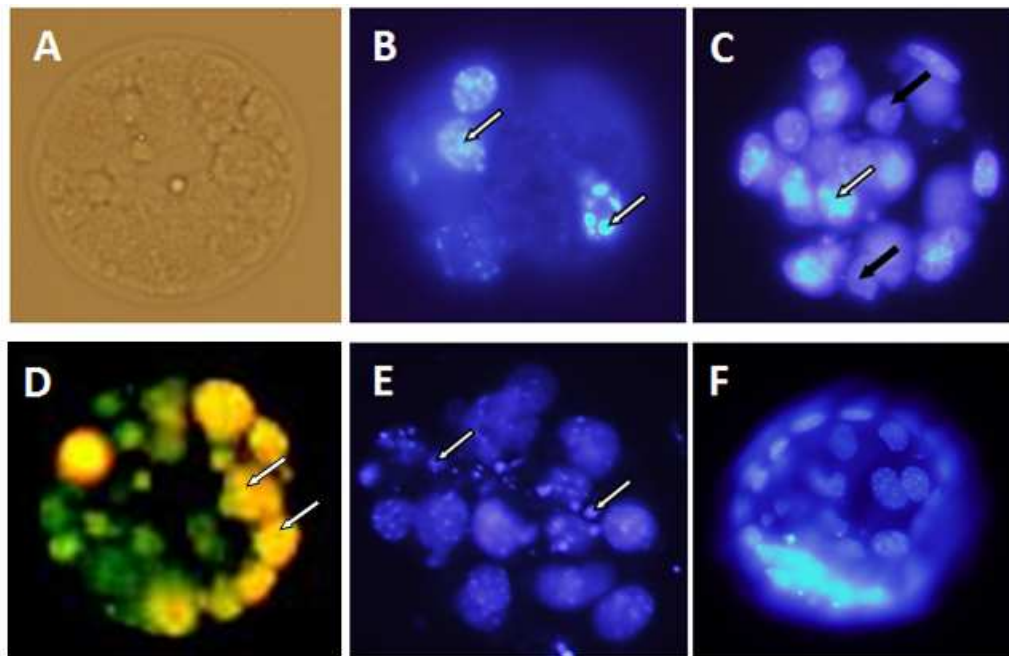
Mitomycin C làm chậm sự phân chia đầu tiên theo thời gian xử lý

Thời gian xử lý Mitomycin C (giờ)	Số trứng xử lý	Số phôi phân chia (2 tế bào)	
		24h	48h
0,5	63	5	32 ^a
1	59	1	30 ^a
2	60	0	40 ^{ab}
Đối chứng	62	46 ^b	

Ghi chú: a, b: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$)



Hình 2. Sự bất thường trong quá trình phân chia nhiễm sắc thể. Cấu trúc giống metaphase II hình thành ở phôi xử lý Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5 giờ (A) (vòng tròn trắng). Nhiễm sắc thể phân chia không đồng đều về hai cực tế bào phôi (B, C) (vòng tròn trắng).



Hình 3. Phôi apoptosis nhuộm với DAPI và AO-PI. Tế bào chất của phôi được xử lý Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5 giờ phân mảnh sau 48 tiếng hoạt hoá (A). Mũi tên trắng (D) cho thấy tế bào chất phân phôi phân mảnh đang trong quá trình apoptosis. Hình thái nhân của phôi apoptosis ở lô xử lý Mytomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 0,5, 1 và 2 giờ có nhiễm sắc chất đang trong quá trình cô đặc và nhân phân mảnh (mũi tên trắng) (B, C, E). Tế bào phôi có nhân bình thường (mũi tên đen) bên cạnh tế bào chứa nhân phân mảnh (C). Hình thái nhân phôi nang trình sản phát triển bình thường ở lô không xử lý Mitomycin C (F) không có sự phân mảnh hay nhiễm sắc chất cô đặc

Điều đó cho thấy, thời gian xử lý trứng chín với Mytomycin C càng lâu, quá trình apoptosis diễn ra càng mạnh, thể apoptosis xuất hiện càng nhiều. Trong khi đó, lô phôi trình sản không xử lý với Mitomycin C phát triển bình thường đến giai đoạn phôi nang (hình 3F), hình thái nhiễm sắc chất và nhân bình thường.

III. KẾT LUẬN

1. Mitomycin C làm chậm quá trình phân chia đầu tiên của phôi chuột trình sản.
2. Mitomycin C làm giảm quá trình phát triển *in vitro* của phôi chuột trình sản thông qua những tác động gây apoptosis và những sai hỏng trong quá trình phân chia nhiễm sắc thể của phôi chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Antti Saraste**, 1999: Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz, Urban & Vogel.
2. **Crooks S. T., Bradner W.T.**, 1976: Cancer Treat. Rev., 3: 121:139.
3. **Danshiitsoodol N., de Pinho C. A., Matoba Y., Kumagai T., Sugiyama M.**, 2006: J. Molec Biol., 360(2): 398-408.
4. **Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon B. V.**, 1994: Cancer, 73: 2013-2026.
5. **Marta Sikora-Polaczek, Anna Hupalowska, Zbigniew Polanski, Jacek Z. Kubiak and Maria A. Ciemerych**, 2006: Biology of Reproduction, 74: 734-743.
6. **Steve M Nguyen, Christopher J. Lieven and Leonard A. Levin**, 2006: J. Neurosci Methods, 161(2): 281-284.
7. **Taesaeng Choi, Fugaku Aoki, Makoto Mori, Masakane Yamashita, Yoshitaka Nagahama and Kaoru Kohmoto**, 1991: Development, 113: 789-795.
8. **Takizawa K., Yokoo I., Shima Y., Inou Y., Sato M., Iguchi T., Takeda Y.**, 1989: Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 41(6): 715-722.
9. **Tam P. P.**, 1988: Teratology, 37(3): 205-212.
10. **Tetsuji Nagao, Yoshiaki Saitoh, Shinsuke Yoshimura**, 2000: Teratology, 61: 248-261.
11. **Tomasz, Maria**, 1995: Chemistry and Biology, 2(9): 575-579.

MITOMYCIN C INHIBITS MOUSE PARTHENOGENIC EMBRYO DEVELOPMENT IN PREIMPLANTATION STAGE

LE THANH LONG, NGUYEN VAN DAM,
NGUYEN THI THUY HUYEN, NGUYEN THI THUONG HUYEN

SUMMARY

To investigate effects of Mitomycin C on mouse parthenogenic embryo *in vitro* development, we examined mouse parthenogenic *in vitro* development treated by Mitomycin C. Matured oocytes collected from oviduct were treated in KSOM medium supplemented Mitomycin C 10 µg/ml for 0.5, 1, 2 hours and KSOM medium supplemented Mitomycin C 10, 20, 30, 40 and 50 µg/ml for 2 hours. Results demonstrated that Mitomycin C degraded parthenogenic embryo *in vitro* development from all groups. Most of embryos could not reach to blastocyst stage and prevented by first block on developing from 2-cell embryo stage to 4-cell embryo stage. 4-cell embryo development rates following Mitomycin C treatment times of 0.5, 1, 2 hours were 30.15%, 25.42% and 8.33%, all of them were lower than control group (70.96%).

4-cell embryo development rates following Mitomycin C treatment concentrations of 10 µg/ml (8.33%), 20 µg/ml (6.56%), 30 µg/ml (6.06), 40 µg/ml (3.85) and 50 µg/ml (0%) were very low, especially no embryo could reached to 4-cell embryo stage in 50 µg/ml group. In the other hand, Mitomycin C elongated the time of cell division from one-cell embryo stage to 2-cell embryo stage. All most Mitomycin C treated embryos divided into 2-cell embryo after 48 hours but in control group, parthenogenic embryo divided after 24 hours. This result showed that Mitomycin C not only effects on DNA but also effects on some proteins concerning to cell division. Blocked embryos showed apoptotic morphologies such as cytoplasm fragment, chromatin condensation and nucleus fragment. Mitomycin C also produced abnormalities of chromosome division in embryos. DAPI - stained embryos showed that number of dividing chromosome were not unequal in mitosis. In control group, Mitomycin C - untreated mouse parthenogenic embryos could reach to blastocyst and had normal morphologies of cytoplasm and nucleus. Thus, Mitomycin C degraded mouse parthenogenic *in vitro* development in preimplantation, produced abnormalities and driven embryos to apoptosis.

Key words: Apoptosis, embryo blocking, Mitomycin C, first cell division, nucleus fragment, cytoplasmic fragment, parthenogenesis.

Ngày nhận bài: 3-10-2010