


NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CỦA TẾ BÀO GỐC UNG THƯ TỪ ĐÒNG TẾ BÀO UNG THƯ VÚ 4T1 NUÔI CẤY *IN VITRO*

Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Cúc, Vũ Thị Thu Phương, Đỗ Thị Thảo 

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

 Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thaodo74@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 29.8.2017

Ngày nhận đăng: 02.7.2018

TÓM TẮT

Ung thư vú là căn bệnh thường gặp ở nữ giới với nguyên nhân chính gây tử vong là sự tái phát bệnh và kháng thuốc. Hiện nay, nhiều nghiên cứu cho thấy ung thư tái phát là do một lượng nhỏ các tế bào có khả năng tự đổi mới và tăng sinh chịu trách nhiệm. Các tế bào này được gọi là tế bào gốc ung thư do có các đặc điểm giống với tế bào gốc. Vì vậy, các tế bào gốc ung thư được sử dụng làm mô hình nghiên cứu phương pháp điều trị mới, cũng như sàng lọc thuốc. Chúng tôi đã sử dụng dòng tế bào ung thư vú 4T1 để phân lập tế bào gốc ung thư bằng phương pháp nuôi không bám dính và không huyết thanh. Các cụm tế bào (clone) được hình thành sau 10 ngày nuôi cấy từ một tế bào ban đầu. Các cụm tế bào này đều cho thấy khả năng tạo khối u thứ cấp (tumorsphere) cao hơn dòng tế bào ung thư ban đầu 4T1. Trong đó, 3 clone là Đ3G5, Đ3C3 và Đ4E7 có hiệu quả tạo tumorsphere cao (tương ứng 31,67%; 36,33% và 35,33%) so với dòng 4T1 ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Ba clone tế bào gốc phân lập được ở trên đều thể hiện khả năng kháng thuốc ellipticine và doxorubicin cao hơn gần ba lần so với dòng tế bào 4T1 ban đầu ($P < 0,05$) với giá trị IC_{50} tương ứng lần lượt là 2,78 - 3,43 $\mu\text{g/ml}$ và 1,77 - 2,58 $\mu\text{g/mL}$. Các dòng tế bào gốc này cũng cho thấy sự biểu hiện mạnh của các gen đặc trưng của tế bào gốc như nanog, Sox2.

Từ khóa: 4T1, clone tế bào, mamosphere, nanog, Sox2, tế bào gốc ung thư vú, tumorsphere

MỞ ĐẦU

Ung thư vú là bệnh ung thư thường gặp nhất ở nữ giới, chiếm 14% trong số các bệnh nhân mắc ung thư mới và chiếm 6,8% ca tử vong vì ung thư trong năm 2014 (National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Factsheets: Breast Cancer). Mặc dù có những tiến bộ trong điều trị cho bệnh nhân ung thư vú, nhưng có đến 70% bệnh nhân bị tái phát bệnh, đây là nguyên nhân gây tử vong do ung thư vú (Colleoni *et al.*, 2004). Trong quá trình nghiên cứu và phân tích khối u, các nhà khoa học đã phát hiện có một quần thể nhỏ tế bào có khả năng khởi phát ung thư với đặc tính tăng sinh và tự đổi mới, những tế bào này được gọi là tế bào gốc ung thư (Cancer stem cells, CSCs) (Dick, 1997; Reya *et al.*, 2001). Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các tế bào gốc ung thư được phát hiện ở các khối u ác tính: Não, tuyến tiền liệt, tụy, gan, ruột kết, đầu và cổ, khối u phổi và da (Colleoni *et al.*, 2004; Aparicio *et al.*, 2007; Glinisky, 2007; Li *et al.*, 2007; Prince *et al.*, 2007; Ceder *et al.*, 2008; Eramo *et al.*, 2008;

Vinogradov, Wei, 2012). Các tế bào gốc ung thư vú lần đầu tiên được xác định bởi Al-Hajj *et al.*, (2003) khi tìm các tế bào ung thư vú ở người vào chuột (SCID) và phát hiện ra rằng chỉ có một số ít các tế bào ung thư vú có khả năng hình thành các khối u mới. Các tế bào này là các tế bào có biểu hiện CD44 và không hoặc biểu hiện CD24 ở mức thấp ($CD44^+/CD24^{-low}$). Các nhà khoa học cũng đã nhận thấy rằng 95% đến 96% các tế bào tách từ khối u vú khởi phát từ các dòng tế bào ung thư có thể nhân nuôi được trong điều kiện không bám dính, không huyết thanh và có khả năng tạo khối tế bào (mamosphere) là các tế bào có $CD44^+/CD24^{-low}$ (Dontu *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005; Calvet *et al.*, 2014). Mặt khác, CSCs được chứng minh là tham gia vào sự tiến triển của khối u, di căn và kháng thuốc, do đó là đích điều trị trong bệnh ung thư. Vì vậy, để thực hiện được các nghiên cứu về tế bào gốc ung thư cũng như sàng lọc tìm kiếm liệu pháp điều trị thì việc phân lập quần thể CSCs rất quan trọng. CSCs có mặt trong cả khối u *in vivo* và một số dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên ở trong khối u,

ti lệ tế bào gốc ung thư rất thấp, chỉ khoảng 0,05 đến 1% khối u (Li *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012a; Yu *et al.*, 2012b) và việc phân lập gặp nhiều khó khăn do bản chất không đồng nhất của tế bào trong khối u, sự khác biệt về gen, về thành phần biểu mô của các mẫu mô bệnh nhân.

Ngược lại, ở một số dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro* sẽ không có bất kỳ tế bào gốc bình thường gây khó khăn cho quá trình phân lập. Hơn nữa, việc phân lập tế bào gốc ung thư từ các dòng tế bào ung thư nuôi cấy sẽ dễ dàng tách rời, phân lập trong điều kiện nuôi bình thường, cho thấy là một nguồn thay thế hấp dẫn để nghiên cứu CSCs. Tuy nhiên, đến nay chỉ một số dòng tế bào được ghi nhận tiềm năng phân lập tế bào gốc ung thư như HT-29, H460, H23, HTB-58, A549, 4T1, SUM 159 (Ho *et al.*, 2007; Fillmore, Kuperwasser, 2008). Vì vậy, trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi sử dụng dòng tế bào 4T1 làm đối tượng để phân lập tế bào

gốc ung thư tiềm năng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào ung thư vú 4T1 được mua từ Ngân hàng tế bào Hoa Kỳ (American Type Culture Collection- ATCC, Manassas, VA, USA)

Môi trường nuôi cấy DMEM, DMEM/F12, huyết thanh phôi bò (FBS), kháng sinh gentamicine, bFGF, EGF, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Ellipticine, Doxorubicin được mua từ Hãng Sigma (St. Louis, MO, USA), Dimethyl sulphoxide (DMSO) được mua từ Hãng Scharlau (Germany). Chai nuôi cấy, đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng, 96 giếng và đĩa nuôi cấy 96 giếng không bám dính được cung cấp bởi Hãng Corning (Oneonta, NY, USA).

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong thí nghiệm RT-PCR.

Gen	Trình tự mỗi	Kích thước đoạn
Nanog Forward	5'-AACCAAAGGATGAAGTGCAAGCGG-3'	190
Reverse	5'-TCCAAGTTGGGTTGGTCCAAGTCT-3'	190
Sox2 Forward	5'-GGTTACCTCTTCCCTCCCCTCCAG-3'	193
Reverse	5'-TCACATGTGCGACAGGGGCAG-3'	193
GAPDH Forward	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	223
Reverse	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	223

PHƯƠNG PHÁP

Nuôi cấy tế bào *in vitro*

Dòng tế bào ung thư 4T1 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra 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 CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Phân lập tế bào gốc dựa trên hiệu quả tạo tumorsphere

Tế bào ung thư vú 4T1 được nuôi trong giếng với tỉ lệ 1 tế bào/giếng trong điều kiện nuôi cấy không bám dính và không có huyết thanh. Thí nghiệm được thực hiện như sau: sử dụng Trypsin-EDTA tách tế bào 4T1 khỏi chai nuôi cấy; Thêm môi trường và trộn đều tế bào để tạo thành hỗn dịch tế bào đồng nhất; Đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer và pha loãng tế bào trong môi trường DMEM/F12 không huyết thanh, được bổ sung nhân

tổ tăng trưởng bFGF 10 ng/mL, EGF 20 ng/mL để đạt được nồng độ 1 tế bào/100 µL môi trường/giếng. Sau 7 đến 10 ngày nuôi cấy, tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược. Chỉ có tế bào gốc ung thư mới có thể sống sót và nhân lên tạo thành khối tế bào trong điều kiện nuôi cấy không bám dính và không có huyết thanh. Tế bào ở những giếng này được thu lại để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo (Shi – cang Yu *et al.*, 2008).

Nuôi cấy tạo khối tế bào thứ cấp (sphere formation assay)

Tế bào 4T1 nuôi trong các giếng của đĩa nuôi cấy có bề mặt không bám dính trong môi trường DMEM/F12 không huyết thanh, được bổ sung nhân tổ tăng trưởng bFGF 10 ng/mL, EGF 20 ng/mL. Môi trường được thay sau 2 - 3 ngày nuôi cấy. Sau 10 ngày, tế bào gốc sẽ hình thành các khối tế bào hình cầu được gọi là tumorspheres. Để tách tế bào ra khỏi khối tumorspheres, khối tế bào được ly tâm 5 phút ở 200 g, sau đó thêm trypsin vào cặn tế bào và ủ trong tủ ấm trong 5 phút. Sau khi thêm 2 ml DMEM/F12, tumorspheres được tách ra bằng cách trộn nhẹ nhàng

và trực tiếp chuyển về điều kiện nuôi cấy tumorspheres (Shi – cang Yu *et al.*, 2008).

Phép thử tạo dòng tế bào (colony assay)

Phương pháp này được sử dụng để đánh giá khả năng tự làm mới của tế bào trong điều kiện *in vitro* (Cao *et al.*, 2011). Hai trăm tế bào được tách từ tumorsphere sau 7 ngày nuôi cấy được đưa vào đĩa nuôi cấy 6 giếng có chứa môi trường DMEM với 10% FBS và 50 µg/ml gentamicine. Sau 7 ngày nuôi cấy, loại bỏ môi trường. Tế bào được cố định và nhuộm trong dung dịch chứa 20% ethanol, 3,7% formaldehyde và 0,2% crystal violet. Khả năng tạo cụm (trên 70 tế bào) được xác định thông qua tỉ lệ cụm hình thành từ tế bào tumorsphere so với tế bào nuôi cấy bám dính.

Xác định khả năng nhân lên của tế bào

Để đánh giá sự nhân lên của tế bào cũng như tác động của các mẫu thử đến sự nhân lên của tế bào, phương pháp MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Mosmann T., 1983) được sử dụng với các bước sau: Tế bào được nuôi trong đĩa 96 giếng; Mẫu thử được thêm vào giếng nuôi cấy với các nồng độ khác nhau; Sau 2 ngày nuôi cấy, 20 µL MTT (5 mg/mL) được thêm vào môi trường nuôi cấy và ủ trong tủ ấm 37°C; Enzyme trong ti thể của những tế bào sống sót sẽ chuyển hóa MTT thành formazan không bị hòa tan trong môi trường nuôi cấy; Sau 4 h, loại bỏ môi trường sau đó thêm 100 µL DMSO để hòa tan formazan hình thành và đọc kết quả bằng hệ thống ELISA microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) ở bước sóng 490 nm để xác định giá trị OD (optical density) của các giếng. Phần trăm ức chế tế bào sống được tính theo công thức: $(1 - (OD_{mẫu thử} / OD_{đối chứng})) \times 100$. Trong đó: $OD_{mẫu thử}$ là mật độ quang của giếng thử mẫu ellipticine, $OD_{đối chứng}$ là mật độ quang của giếng đối chứng âm (DMSO 10%). Giá trị IC_{50} là giá trị cho thấy nồng độ chất ức chế được 50% sự phát triển và tăng sinh của tế bào ung thư *in vitro* được tính toán bằng phần mềm Tablecurve 2Dv4.

Thí nghiệm RT-PCR (reverse transcription-PCR)

RNA tổng số của quần thể tế bào gốc ung thư và từ tế bào 4T1 được phân lập bằng bộ kit RNAeasy

Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA được sao chép ngược bằng SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) cho phản ứng RT-PCR sử dụng bộ mồi đặc hiệu cho các gen Nanog, Sox2 (Bảng 1). Gen nội chuẩn GAPDH cũng được sử dụng làm đối chứng trong thí nghiệm này. Để kiểm tra, cDNA thu được sau khi chạy PCR được điện di trên gel agarose 2%. Hình ảnh điện di được phân tích bằng phần mềm Image J.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

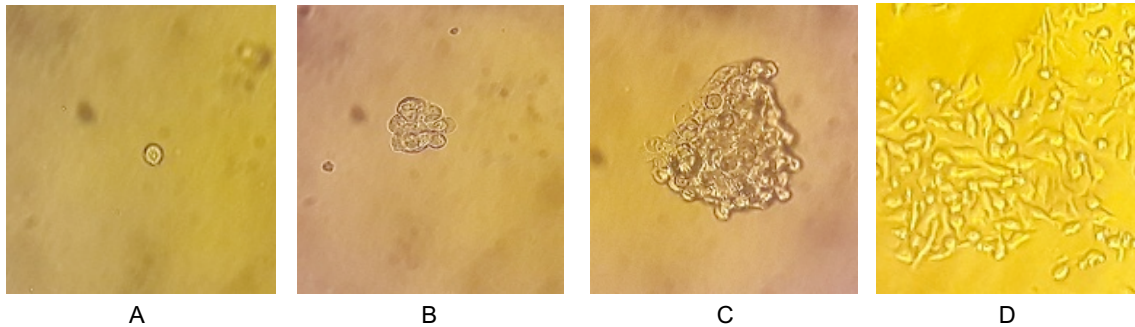
Khả năng tạo khối tế bào hình cầu của dòng tế bào 4T1

Đặc tính của tế bào gốc ung thư là khả năng tạo thành 1 cụm tế bào từ một tế bào ban đầu trong môi trường không huyết thanh và không bám dính. Vì vậy để phân lập được tế bào gốc ung thư, tế bào 4T1 được tách bằng Trypsin-EDTA và pha loãng tới hạn để được nồng độ 1 tế bào/ giếng. Sau 10 ngày nuôi cấy, tế bào được quan sát dưới kính hiển vi, số giếng tế bào nhân lên tạo thành cụm tế bào được ghi nhận. Kết quả ở bảng 2 cho thấy trong tổng số 5 đĩa thí nghiệm có 07/480 giếng (1,458%) có tế bào đơn lẻ phát triển thành cụm tế bào (Hình 1). Cụm tế bào phát triển ở giếng này được gọi là các clone và được đặt tên là Đ1F6, Đ3D3, Đ3G5, Đ4H4, Đ4C3, Đ4E7, Đ5F6.

Đặc tính tự làm mới là đặc tính quan trọng của tế bào gốc ung thư. Trong nhiều nghiên cứu, nuôi cấy tạo tumorsphere là phương pháp quan trọng để phân lập tế bào gốc ung thư đặc biệt là từ các mô ung thư. Theo Bao *et al.*, (2013), tỉ lệ tế bào gốc ung thư chỉ chiếm từ 0,05 - 1% khối u. Tỉ lệ này thường cao hơn khi phân lập từ các dòng tế bào ung thư nuôi cấy. Theo Charafe-Jauffret *et al.*, (2009) có khoảng 2% tế bào SP (side population) được phân lập từ dòng tế bào MCF7. Wang *et al.*, cũng đã phân lập tế bào gốc ung thư từ dòng tế bào 4T1 dựa trên marker bề mặt $CD44^+ / CD24^-$, kết quả cho thấy tỉ lệ tế bào biểu hiện marker $CD44^+ / CD24^-$ đạt trên 6,4%. Theo Kruger *et al.*, (2006) có khoảng 2,21% tế bào gốc ung thư phân lập được từ dòng tế bào 4T1 bằng phương pháp nhuộm Hoechst 33342, cao hơn so với kết quả chúng tôi đạt được bằng phương pháp tạo tumorsphere.

Bảng 2. Kết quả phân lập tế bào gốc ung thư từ dòng 4T1

Đĩa thí nghiệm	01	02	03	04	05
Số giếng có chứa clone	1	0	2	3	3
Tên giếng (clone)	Đ1F6	-	Đ3D3;Đ3G5	Đ4H4;Đ4C3;Đ4E7	Đ5F6



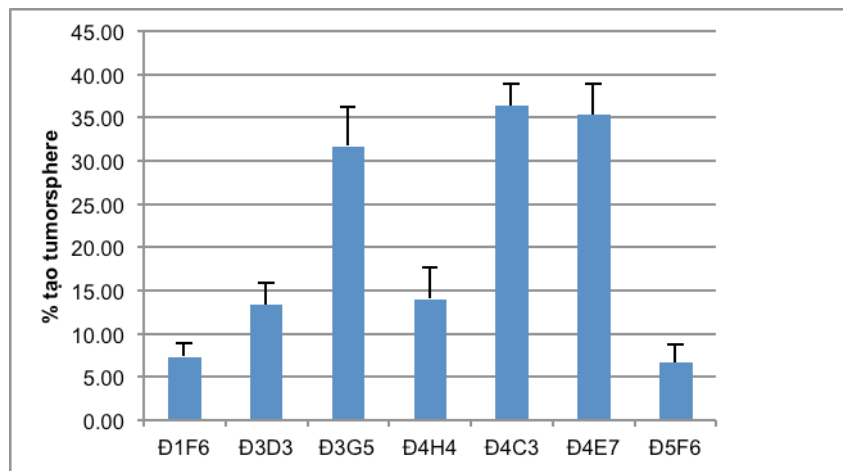
Hình 1. Sự nhân lên của 1 tế bào tạo thành khối tế bào tại các thời điểm khác nhau; A: sau 0 ngày, B: sau 5 ngày, C: sau 10 ngày nuôi cấy, D: tế bào 4T1 nuôi cấy dạng bám đáy (độ phóng đại 40X).

Khả năng hình thành khối tế bào 3D

Khả năng duy trì, tạo thành khối tế bào 3D (tumorsphere) là đặc điểm quan trọng để đánh giá khả năng tự làm mới của tế bào gốc ung thư. Do đó các dòng tế bào (clone) thu ở trên được tiếp tục cấy chuyển, nuôi cấy trong môi trường CSCs trên bề mặt không bám dính. Khả năng tạo khối tế bào 3D của các tế bào trong từng dòng được thể hiện qua hình 2.

Kết quả cho thấy khả năng hình thành khối tế

bào 3D của các dòng đều cao hơn so với dòng tế bào 4T1 ban đầu. Tuy nhiên mức độ hình thành khối tế bào 3D của các dòng có sự sai khác nhau. Cụ thể là dòng Đ1F6, Đ3D3, Đ4H4, Đ5F4 có khả năng hình thành khối tế bào 3D thấp (dưới 15%) trong khi đó các dòng Đ3G5, Đ3C3 và Đ4E7 có hiệu quả tạo khối tế bào 3D cao trên 30% (tương ứng là 31,67%, 36,33% và 35,33%). Vì vậy, 03 dòng Đ3G5, Đ3C3 và Đ4E7 được lựa chọn để tiếp tục nhân lên, tạo lượng tế bào lớn cho các thử nghiệm tiếp theo.



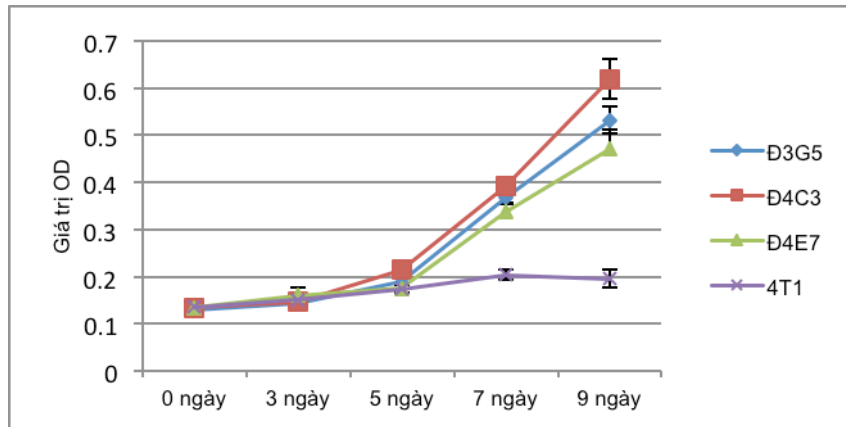
Hình 2. Khả năng hình thành khối tế bào 3D từ 7 clone thu từ thí nghiệm tạo dòng

Xác định sự phát triển của tế bào

Khả năng phát triển của tế bào từ các dòng trên được nghiên cứu và so sánh với sự phát triển của tế bào ung thư vú 4T1. Cụ thể là 1×10^3 tế bào được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng và nuôi trong 9 ngày. Phép thử MTT được sử dụng để xác định sự phát

triển của tế bào qua các thời điểm nghiên cứu.

Kết quả trên hình 3 cho thấy tế bào 4T1 phát triển rất chậm trong môi trường nuôi cấy của tế bào gốc. Tế bào thuộc các dòng Đ3G5, Đ4C3 và Đ4E7 đều phát triển tốt kể từ ngày thứ 05 của quá trình thí nghiệm. Dòng Đ4C3 cho thấy sự nhân lên tốt hơn so với 02 dòng còn lại với $P < 0,05$.

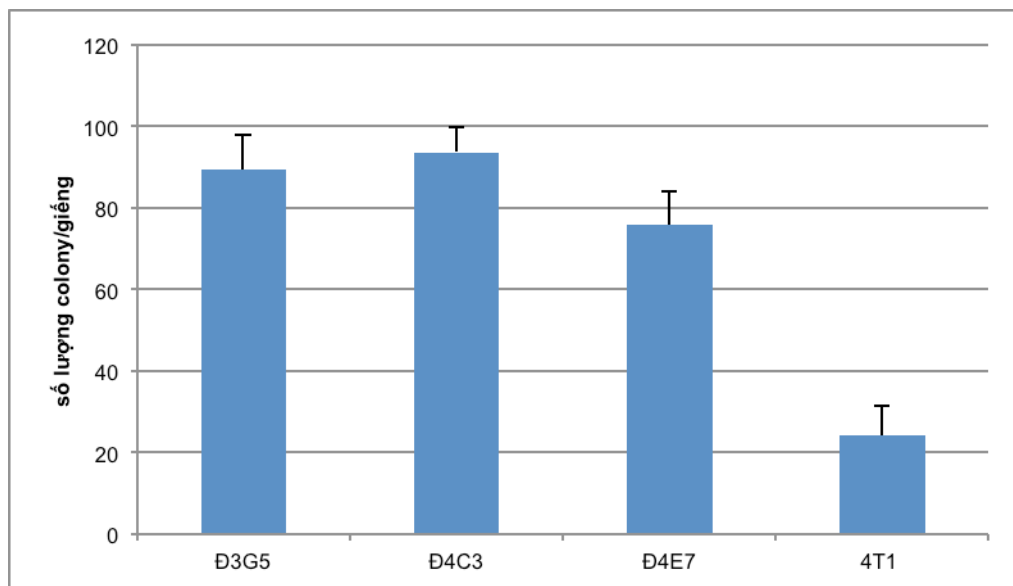


Hình 3. Sự phát triển của tế bào tại các thời điểm khác nhau thông qua giá trị OD.

Xác định khả năng tạo cụm tế bào (colony)

Khả năng tạo cụm của các dòng tế bào nghiên cứu so với tế bào 4T1 ban đầu sau 10 ngày nuôi cấy được thể hiện qua hình 4. Số cụm hình thành ở các giếng chứa tế bào gốc phân lập được là $89,33 \pm 8,50$ (Đ3G5), $93,67 \pm 6,11$ (Đ4C3) và $76,00 \pm 8,19$

(Đ4E7) cao hơn hiệu quả tạo cụm ở các giếng chứa tế bào 4T1 ($24,33 \pm 7,09$ cụm) ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Trong một số nghiên cứu khác trên thế giới, hiệu quả hình thành cụm của tế bào gốc ung thư thường cao hơn so với tế bào ung thư phân lập từ cả mô ung thư cũng như từ các dòng tế bào nuôi cấy (Rao *et al.*, 2013).



Hình 4. Khả năng hình thành clone từ các dòng tế bào gốc ung thư đã thu nhận và từ tế bào ung thư vú 4T1.

Xác định khả năng kháng thuốc

Khả năng kháng thuốc là một trong các đặc điểm của tế bào gốc ung thư. Vì thế, các clone tế bào gốc phân lập được tiến hành xác định tác động của

ellipticine và doxorubicin (Bảng 3). Kết quả cho thấy các tế bào gốc phân lập được đều kháng với ellipticine và doxorubicin so với dòng tế bào 4T1 ban đầu ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Ở nồng độ $10 \mu\text{g/mL}$, cả ellipticine và doxorubicin đều

ức chế mạnh sự phát triển của tế bào. Tuy nhiên, khi nồng độ thuốc thử giảm thấp hơn (2 µg/mL), khả năng gây độc của các thuốc trên đều giảm mạnh ở các dòng tế bào gốc so với tế bào 4T1 ban đầu.

Các nghiên cứu chỉ ra rằng kênh vận chuyển ABC (ATP-binding cassette), với khả năng bơm loại bỏ nhiều loại thuốc gây độc tế bào, có mức độ

biểu hiện cao trên tế bào gốc ung thư. Do đó tế bào gốc ung thư thường có đặc tính kháng thuốc (Chen *et al.*, 2013). Theo Kruger *et al.*, (2006), tế bào gốc ung thư phân lập từ dòng tế bào 4T1 thể hiện rõ tính kháng thuốc với doxorubicin. Trong nghiên cứu này, các clone tế bào phân lập được đã thể hiện rõ sự kháng thuốc.

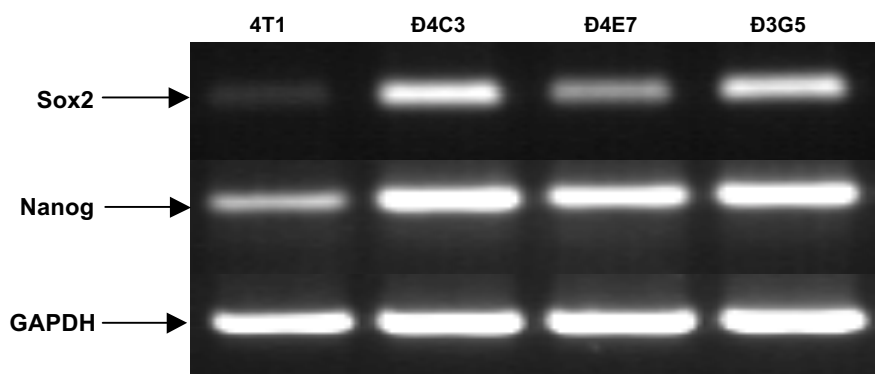
Bảng 3. Giá trị IC₅₀ của ellipticine và doxorubicin trên các clone tế bào gốc ung thư vú và trên tế bào ung thư vú 4T1.

Nồng độ (µg/mL)	% ức chế tế bào phát triển							
	Ellipticine				Doxorubicin			
	Đ3G5	Đ4C3	Đ4E7	4T1	Đ3G5	Đ4C3	Đ4E7	4T1
10	105,32	99,63	88,35	97,68	99,36	93,41	99,57	103,65
2	40,41	35,27	46,78	65,73	50,17	53,78	45,51	73,61
0.4	16,54	23,75	13,25	35,67	15,33	24,38	18,97	45,63
0.08	3,72	11,59	7,42	15,71	5,63	10,27	13,47	10,64
	2,78 ±	3,43 ±	2,71 ±	0,89 ±	2,21 ±	1,77 ±	2,58 ±	0,58 ±
IC₅₀	0,29	0,62	0,18	0,06	0,32	0,16	0,33	0,04

Sự biểu hiện của một số gen xác định đặc tính của tế bào gốc và tế bào gốc ung thư

Các gen Oct4, Nanog, Sox2 đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành, phát triển và di căn của khối u cũng như duy trì đặc tính của tế bào gốc như khả năng tự làm mới, đặc tính đa tiềm năng của tế bào gốc. Sự biểu hiện của những gen này cũng góp phần ngăn chặn sự biệt hóa của tế bào gốc (Anfei *et al.*, 2013). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng Sox2 và Nanog là những dấu ấn quan trọng của tế bào gốc ung thư cũng như quá trình tiến triển của ung thư (Chen *et al.*, 2012). Kết quả RT-PCR (Hình

5) cho thấy sự biểu hiện mạnh của Sox2 và Nanog ở ba quần thể tế bào Đ3G5, Đ4C3 và Đ4E7 khi so sánh với dòng tế bào 4T1. Quần thể tế bào Đ4C3 thể hiện mức độ biểu hiện gen Sox2 mạnh nhất, mức độ biểu hiện gen Sox2 của quần thể này gấp 7,35 lần so với dòng tế bào 4T1. Mức độ biểu hiện gen Sox2 của quần thể Đ4E7 yếu nhất trong 3 quần thể trên, gấp 3,60 lần so với dòng tế bào 4T1. Tương tự như vậy, mức độ biểu hiện gen Nanog ở các quần thể tế bào phân lập được cao hơn so với dòng 4T1 và theo thứ tự là Đ4C3>Đ3G5>Đ4E7. Những kết quả này cho thấy các dòng tế bào phân lập được đã thể hiện rõ đặc tính của tế bào gốc ung thư.



Hình 5. Kết quả RT-PCR các gen mang tính gốc và gen nội chuẩn của các quần thể tế bào nghiên cứu và của dòng tế bào 4T1.

KẾT LUẬN

Ba quần thể tế bào gốc ung thư Đ3G5, Đ4C3 và Đ4E7 đã được phân lập từ dòng tế bào ung thư vú 4T1 trong điều kiện môi trường không huyết thanh và không bám dính. Tỷ lệ hình thành cụm tế bào là 07/480 giếng (1,458%) sau 10 ngày nuôi cấy từ một tế bào ban đầu. Khả năng tạo khối tế bào 3D của các dòng cao hơn dòng tế bào ung thư vú 4T1 ban đầu ($P < 0,05$), trong đó dòng Đ3G5, Đ3C3 và Đ4E7 có hiệu quả tạo khối tế bào 3D cao trên 30% (trung ứng là 31,67%; 36,33% và 35,33%). Các dòng tế bào gốc phân lập được đều thể hiện khả năng kháng thuốc ellipticine và doxorubicin cao hơn gần ba lần so với dòng tế bào 4T1 ban đầu ($P < 0,05$) với giá trị IC_{50} tương ứng lần lượt là 2,78 - 3,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 1,77 - 2,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Các tế bào gốc ung thư phân lập được cũng cho thấy sự biểu hiện mạnh của các gene đặc trưng của tế bào gốc như nanog, Sox2.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu cấp cơ sở, mã số CS16-02 của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aparicio LA, Espinosa JC, Campelo RG, Veiga FG, Prado SD, Gallego GA (2007) Prostate carcinoma and stem cells. *Clin Transl Oncol* 9(2): 66–76.

Calvet CY, André FM, Mir LM (2014) The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One* 9(2): e89644.

Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, Li J, Zhang Y, Chen L, Qian H, Wu M (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 11(1): 71.

Ceder JA, Jansson L, Ehrnström RA, Rönstrand L, Abrahamsson PA (2008) The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *Eur Urol* 53(3): 524–31

Clevers H (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 7: 313–319.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, Gelber RD, Curigiano G, Torrisi R, Luini A, Intra M, Galimberti V, Renne G, Nolè F, Peruzzotti G, Goldhirsch A (2004) Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 10(19): 6622–6628.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003) *In vitro* propagation

and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17(10): 1253–1270.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15: 504–514.

Fillmore CM, Kuperwasser C (2008) Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10(2): R25. doi:10.1186/bcr1982.

Glinsky GV (2007) Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev* 3(1): 79–93.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY (2007) Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 67(10): 4827–4833.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030–1037. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65(13): 5506–5511.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 104: 973–978.

Rao GH, Liu HM, Li BW, Hao JJ, Yang YL, Wang MR, Wang XH, Wang J, Jin HJ, Du L, Chen Q (2013) Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol Sin* 34(6): 793–804.

Vinogradov S, Wei X (2012) Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 7(4): 597–615.

Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Sarkar FH (2012) Pancreatic cancer stem cells: Emerging target for designing novel therapy. *Cancer Lett*

Yu C, Yao Z, Jiang Y, Keller ET (2012a) Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urol Nefrol*: 64(1):19–33.

Yu Y, Ramena G, Elble RC (2012b) The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1528–1541

Shi-cang Yu, Yi-fang Ping, Liang Yi, Zhi-hua Zhou, Jian-hong Chen, Xiao-hong Yao, Lei Gao, Ji Ming Wang, Xiu-wu Bian (2008) Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett* 265: 124–134.

CHARACTERIZATION OF BREAST CANCER STEM CELLS ISOLATED FROM 4T1 CELL LINE CULTURED *IN VITRO*

Do Thi Phuong, Nguyen Thi Nga, Nguyen Thi Cuc, Vu Thi Thu Phuong, Do Thi Thao

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women of which the main causes of death are its relapse and drug resistance. Recently, researchers clarified a small population of cancer cells holding the abilities of self-renewal, unlimited propagation responsible for tumor progression, metastasis, therapy resistance, and tumor recurrence. These cells are termed as cancer stem cells (CSCs), possessing characteristics of stem cells. Thus, cancer stem cells have become to be a potential target for cancerous drug discovery. They can be used in a new research model for establishing novel therapy as well as screening new compounds that target CSCs. In our studies, we isolated cancer stem cells from 4T1 cell line using serum-free medium and non-adherent culture surface. Those CSCs clones were formed after 10 culturing days from 1 initial cell. The clones could initiate subtumorsphere better than 4T1 cells themselves. There were 3 selected clones named as Đ3G5, Đ3C3 and Đ4E7 which had mammosphere formation efficiency over 30% (31.67%, 36.33%, and 35.33%, respectively). These clones showed the significant withstanding against ellipticine and/or doxorubicin stronger than that of 4T1 cells ($P < 0.05$). The IC_{50} values (inhibition of cell growth at 50%) of ellipticine was 0.89 ± 0.07 $\mu\text{g/mL}$ and of doxorubicin was 0.58 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$ toward 4T1 cell growth while those values were 2 - 3 folds higher in our isolated cancer stem cell clones ($P < 0.05$). Those clones also exhibited strong expression of several typical genes of stem cells such as nanog and Sox2.

Keywords: 4T1, cancer stem cell, cell clone, mammosphere, nanog, Sox2, tumorsphere