

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY CHẾT TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI
CỦA VIRUS VACCINE SỞI PHỔI HỢP CISPLATIN *IN VITRO***

Ngô Thu Hằng^{1}, Đặng Thùy Linh¹, Nguyễn Văn Tân¹, Cấn Văn Mão¹*

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá tác dụng gây chết tế bào ung thư phổi của virus vaccine sởi (Measle virus vaccine - MeV) phối hợp với Cisplatin trên thực nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Dòng tế bào ung thư phổi người H460 được điều trị bằng MeV với liều 1 MOI phối hợp với Cisplatin liều 15 $\mu\text{mol/L}$. Tế bào được thu thập ở các thời điểm 48, 72 và 96 giờ để làm nghiệm pháp MTT đánh giá tỷ lệ tế bào sống ở các nhóm. **Kết quả:** Tỷ lệ tế bào sống ở nhóm chứng không điều trị cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$) so với các nhóm điều trị MeV hoặc Cisplatin. Nhóm điều trị phối hợp có tỷ lệ tế bào sống thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm điều trị đơn MeV hoặc Cisplatin ($p < 0,01$). **Kết luận:** MeV điều trị phối hợp với Cisplatin làm tăng khả năng gây chết tế bào ung thư phổi H460 tốt hơn so với điều trị đơn trên *in vitro*.

Từ khóa: Ung thư phổi H460; Virus vaccine sởi; Cisplatin; MTT.

**EVALUATION OF THE ABILITY TO CAUSE LUNG CANCER CELL
DEATH OF MEASLES VIRUS VACCINE IN COMBINATION
WITH CISPLATIN *IN VITRO***

Abstract

Objectives: To evaluate the ability to cause lung cancer cell death of the measles virus vaccine (MeV) and Cisplatin in combination with *in vitro*. **Methods:** MeV and Cisplatin were employed to assess the oncolytic effects on lung-cell carcinoma H460. H460 cells treated with MeV and Cisplatin were collected at 48, 72, and 96 hours after treatment to conduct the MTT assay.

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Ngô Thu Hằng (drngohang1986@gmail.com)

Ngày nhận bài: 08/01/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 26/02/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i3.665>

Results: The proportion of living cells in the treated groups was significantly lower than that of the control group ($p < 0.0001$). The proportion of living cells in the group treated with the combination of MeV and Cisplatin was significantly lower than those with a single treatment of MeV or Cisplatin ($p < 0.01$). **Conclusion:** The combination treatment of MeV and Cisplatin enhances oncolytic activity against lung cancer cells *in vitro*.

Keywords: Lung-cell carcinoma; Measles virus vaccine; Cisplatin; MTT assay.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là một trong các loại ung thư ác tính có tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong đều cao ở Việt Nam cũng như nhiều quốc gia trên thế giới. Năm 2020, có trên 2,2 triệu bệnh nhân được chẩn đoán mới và 1,8 triệu người chết vì ung thư phổi trên toàn thế giới [1]. Do điều kiện về môi trường sống ngày càng trở nên ô nhiễm, ung thư phổi được đánh giá là ung thư đứng thứ 2 về tỷ lệ mới mắc và tỷ lệ tử vong với 26.262 ca mới mắc (14,4%) và 23.797 ca tử vong (19,4%) ở Việt Nam [1].

Với sự tiến bộ của y học, hiện nay đã có nhiều phương pháp chẩn đoán sớm dựa trên các kỹ thuật hình ảnh và sinh học phân tử. Các phương pháp điều trị ung thư hiệu quả và tích cực được áp dụng như điều trị đích giúp làm tăng tỷ lệ phát hiện và giảm tỷ lệ tử vong cho bệnh nhân. Tuy vậy, tỷ lệ

sống sót trên 5 năm của ung thư phổi còn thấp. Một trong những liệu pháp có tiềm năng trong điều trị ung thư và đang được đầu tư nghiên cứu là liệu pháp sử dụng virus có khả năng ly giải tế bào ung thư. Đây là liệu pháp dùng các virus có khả năng sử dụng các thụ thể đặc hiệu trên bề mặt của tế bào ung thư như CD46 để xâm nhập vào tế bào ung thư mà rất ít xâm nhập vào các tế bào lành. Trong quá trình nhân lên chúng gây ly giải các tế bào ung thư. Mặt khác, chúng còn kích thích hệ thống miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu của cơ thể chống lại các tế bào khối u và làm tăng quá trình apoptosis của tế bào ung thư [2]. Trong số các virus ly giải tế bào ung thư, MeV được đánh giá là một virus an toàn, có khả năng ức chế, tiêu diệt tế bào ung thư trên các thử nghiệm tại phòng thí nghiệm và lâm sàng [3].

Cisplatin là hợp chất hóa học tạo phức hợp với kim loại platin, có tác dụng và được sử dụng trong điều trị nhiều loại ung thư khác nhau như ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đầu cổ và ung thư bàng quang tiến triển... [4, 5]. Đích tác dụng chủ yếu của Cisplatin là các sợi DNA, gây phá hủy DNA trong quá trình nhân đôi, qua đó gây độc cho tế bào. Ngoài ra, Cisplatin còn tác dụng đến quá trình tổng hợp RNA và protein, kích thích quá trình cảm ứng stress tế bào, kích thích tế bào đi vào quá trình chết theo chương trình [6, 7]. Các nghiên cứu *in vitro* và thử nghiệm lâm sàng đã cho thấy MeV và Cisplatin có tác dụng kháng lại sự phát triển của nhiều loại ung thư khác nhau trong đó có ung thư phổi [8]. Điều trị phối hợp nhiều liệu pháp khác nhau nhằm tăng tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư đã được áp dụng trong nghiên cứu và trong thực hành lâm sàng. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng kháng tế bào ung thư người của chế phẩm chứa virus sởi giảm độc lực phối hợp với Cisplatin *in vitro* và *in vivo*. Chúng tôi giả thiết rằng điều trị phối hợp giữa chế phẩm chứa virus sởi giảm độc lực phối hợp với Cisplatin sẽ mang lại hiệu quả kháng ung thư cao hơn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu

này nhằm: *Đánh giá khả năng gây chết tế bào ung thư phổi người H460 của MeV phối hợp Cisplatin.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng tế bào ung thư phổi người (ATCC® HTB-177-H460) được mua từ Công ty ATCC (Hoa Kỳ) làm mô hình thí nghiệm đánh giá tác dụng phối hợp của MeV và Cisplatin đối với ung thư phổi. Chủng MeV có tác dụng kháng ung thư được lưu trữ tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y. Cisplatin với tên thương mại là Kupunistin với hàm lượng 50 mg/50mL (Hàn Quốc). Bộ kit Cell Proliferation Kit I (MTT) được sử dụng để đánh giá tỷ lệ sống chết của tế bào được cung cấp bởi Công ty Sigma, Hoa Kỳ.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Kỹ thuật nuôi cấy các dòng tế bào ung thư:*

Môi trường RPMI 1640, 10% FBS, 1% Penicillin và Streptomycin (Sigma, Hoa Kỳ) được sử dụng để nuôi cấy tế bào H460. Khi tế bào phát triển đạt đến 70 - 80% diện tích đáy chai nuôi cấy thì tế bào được tách khỏi chai nuôi cấy bằng dung dịch Trypsin EDTA 1X

(Sigma, Hoa Kỳ). Dịch huyền phù tế bào được ly tâm loại bỏ môi trường, thu tế bào và điều chỉnh về nồng độ 10^6 tế bào/mL, lưu trữ trong môi trường nitơ lỏng -196°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

** Nghiệm pháp MTT:*

Tế bào H460 được điều chỉnh để đạt nồng độ 10^4 tế bào/mL bằng môi trường nuôi cấy (tương ứng với 2000 tế bào/giếng) vào các 3 đĩa 96 giếng cho 3 thời điểm điều trị khác nhau là 48, 72 và 96 giờ. Đưa các đĩa vào tủ ấm nhiệt độ 37°C , CO_2 5%. Sau 24 giờ, tiến hành kiểm tra tế bào, khi tế bào bám đáy tốt, tiến hành thay môi trường như sau: Nhóm chứng: 200 μL môi trường nuôi cấy mới ($n = 6$). Nhóm điều trị MeV (nhóm MeV 1 MOI): 200 μL môi trường nuôi cấy mới có bổ sung MeV liều 1 MOI; $n = 6$. Nhóm Cisplatin (Cisplatin 15 μM): 200 μL môi trường nuôi cấy mới có bổ sung Cisplatin nồng độ 15 $\mu\text{mol/L}$ (μM), $n = 6$. Nhóm phối hợp MeV và Cisplatin (nhóm MeV 1 MOI + Cisplatin 15 μM): 200 μL môi trường nuôi cấy mới có bổ sung Cisplatin nồng độ 15 $\mu\text{mol/L}$ và MeV nồng độ 1 MOI, $n = 6$.

Kiểm tra và chụp ảnh tế bào các giếng ở nhóm chứng và các nhóm điều trị hàng ngày bằng kính hiển vi soi ngược. Tới thời điểm 48 giờ, 72 giờ và

96 giờ tế bào được thu thập và chuẩn bị cho thử nghiệm MTT để tính tỷ lệ tế bào sống tại các nhóm nghiên cứu. Loại bỏ hết dịch nuôi cấy tế bào ở các giếng. Bổ sung 100 μL dung dịch nuôi cấy có chứa 10% MTT vào trong mỗi giếng, ủ trong 4 giờ. Sau đó, loại bỏ nhẹ nhàng toàn bộ dịch nổi trong mỗi giếng ở đĩa 96 giếng, cho 100 μL dung dịch M-8910 vào từng giếng. Lắc nhẹ để hòa tan hết các tinh thể MTT. Đo hấp thụ OD ở bước sóng 490 nm trên máy đo quang phổ và tính tỷ lệ tế bào sống theo công thức: % tỷ lệ tế bào sống (%OD) = (OD nhóm điều trị/OD nhóm chứng) x 100.

** Xử lý số liệu:*

Bằng phần mềm SPSS 20.0 và GraphPad Prism 8.4.3. Tiến hành so sánh giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test, so sánh trung bình của 3 nhóm bằng phân tích phương sai anova, khi các biến tuân theo phân phối chuẩn. Với các biến không tuân theo phân phối chuẩn, tiến hành so sánh trung vị của 2 nhóm độc lập bằng kiểm định Mann-Whitney. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Đạo đức nghiên cứu

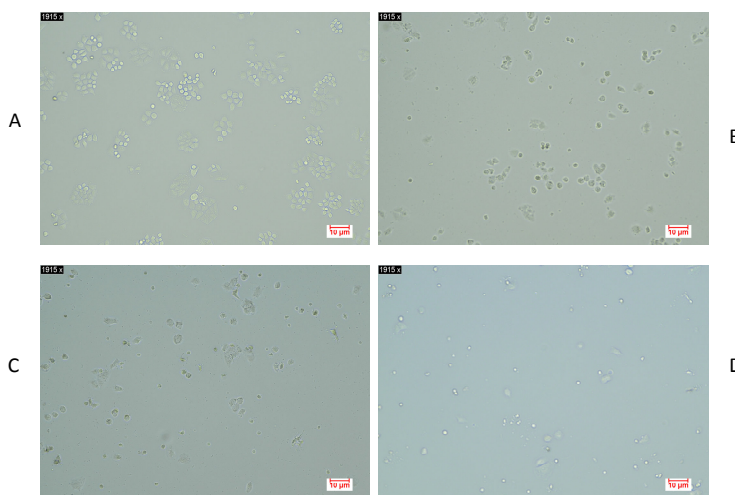
Nghiên cứu tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học. Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Quan sát các giếng ở nhóm chứng và các nhóm điều trị tại các thời điểm 48 giờ thấy: Số lượng tế bào sống ở nhóm chứng nhiều hơn so với 3 nhóm điều trị MeV và Cisplatin. Nhóm điều trị đơn chỉ với virus vacine sởi hoặc chỉ với Cisplatin có số lượng tế bào sống cao hơn so với nhóm phối hợp

(Hình 1). Kết quả này cho thấy MeV và Cisplatin có khả năng gây chết tế bào ung thư phổi H460.

Kết quả ở 2 thời điểm 72 giờ và 96 giờ cũng có xu hướng tương tự như thời điểm 48 giờ. Tuy nhiên, số lượng tế bào sống ở các nhóm được điều trị giảm dần theo thời gian.



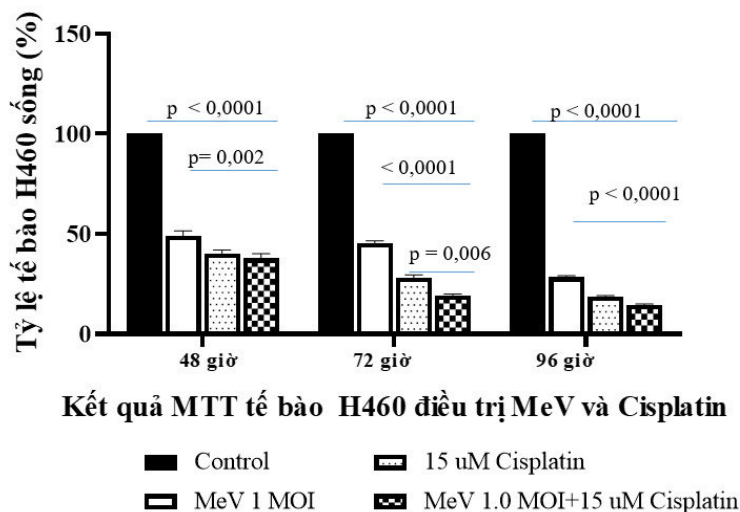
Hình 1. Hình ảnh tế bào ung thư phổi ở các giếng điều trị bằng MeV và Cisplatin thời điểm 48 giờ.

(A): Nhóm Chứng; (B): Nhóm điều trị MeV;

(C): Nhóm điều trị Cisplatin; (D): Nhóm phối hợp MeV + Cisplatin.

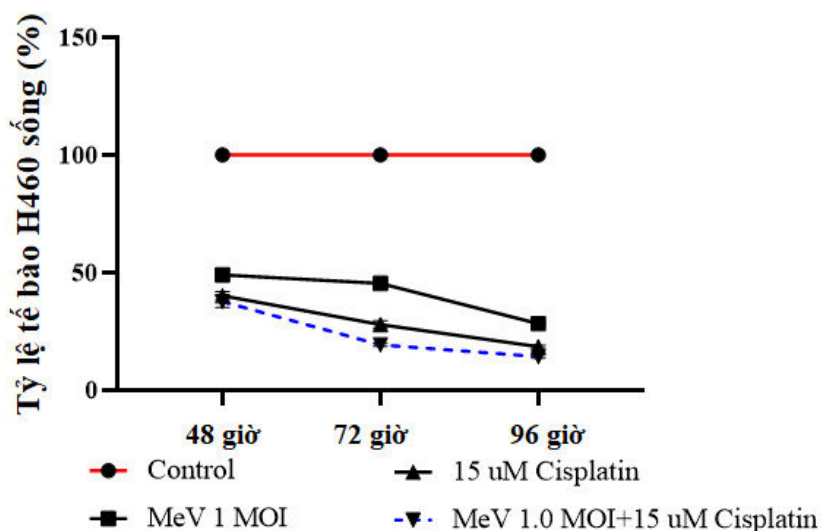
Thời điểm điều trị sau 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ, kết quả thử nghiệm MTT cho thấy tỷ lệ tế bào sống ở nhóm chứng cao hơn rõ rệt với 3 nhóm điều trị MeV, Cisplatin và nhóm phối hợp ($p < 0,0001$) (Hình 2).

Các nhóm điều trị đơn chỉ với MeV liều 1 MOI hoặc chỉ với Cisplatin liều 15µM có tỷ lệ tế bào sống cao hơn so với nhóm điều trị phối hợp đồng thời MeV và Cisplatin. Tại thời điểm 48 giờ $p_{MeV-PH} = 0,002$; ở thời điểm 72 giờ $p_{MeV-KH} < 0,0001$; $p_{Cisplatin-KH} = 0,006$; ở thời điểm 96 giờ $p_{MeV-PH} < 0,0001$; $p_{Cisplatin-PH} = 0,085$ (Hình 2).



Hình 2. Tỷ lệ tế bào sống ở các nhóm điều trị bằng MeV và Cisplatin tại các thời điểm khác nhau.

Phân tích so sánh tỷ lệ tế bào sống theo thời gian ở các nhóm điều trị MeV và Cisplatin cho thấy tỷ lệ tế bào sống giảm dần, với tỷ lệ cao nhất ở thời điểm 48 giờ và thấp nhất ở thời điểm 96 giờ, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở nhóm điều trị MeV và nhóm phối hợp ở hai thời điểm trên ($p < 0,0001$) (Hình 3).



Hình 3. So sánh kết quả MTT ở 3 thời điểm ngày 2, 3, và ngày 4.

BÀN LUẬN

Việc sử dụng các loại virus có khả năng ly giải tế bào ung thư và ít gây hại đến các tế bào lành đang có tiềm năng rất lớn trong việc điều trị các loại ung thư khác nhau. Ở Việt Nam, đã có một số công bố về tác dụng kháng ung thư khi sử dụng MeV kết hợp virus vaccine quai bị hoặc kháng thể đơn dòng trên một số dòng tế bào ung thư máu, ung thư đại tràng, ung thư gan, ung thư phổi, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư ruột [3, 9, 10]. Tuy nhiên, chưa có bất kỳ nghiên cứu nào đánh giá tác dụng tác dụng kháng tế bào ung thư người của chế phẩm chứa virus sợi giảm độc lực phối hợp với Cisplatin *in vitro* và trên chuột thiếu hụt miễn dịch. Nghiên cứu này lần đầu tiên đánh giá tác dụng gây chết tế bào khối ung thư phổi H460 của MeV phối hợp với Cisplatin và cũng là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về sự phối hợp 2 phương pháp điều trị này. Kết quả thử nghiệm MTT của chúng tôi chỉ ra rằng phối hợp MeV và Cisplatin có tác dụng ly giải tế bào ung thư phổi tốt hơn sử dụng đơn độc MeV hoặc Cisplatin. Kết quả nghiên cứu này cho thấy phối hợp giữa các liệu pháp điều trị ung thư khác nhau giúp tăng khả năng ức chế khối u và tiêu diệt tế bào ung thư.

Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy virus sợi xâm nhập vào tế bào đích thông qua ba thụ thể CD46, CD150 và nectin-4, trong đó thụ thể CD46 là thụ thể chính cho sự xâm nhập của virus. Thụ thể CD46 biểu hiện cao ở hầu hết các tế bào ung thư đặc biệt là ung thư biểu mô tế bào vảy so với các tế bào bình thường, do đó virus xâm nhập vào các tế bào ung thư chiếm ưu thế hơn so với các tế bào bình thường. CD46 có vai trò quan trọng trong cơ chế xâm nhập của virus sợi vào tế bào khối u và hình thành hợp bào - hình ảnh điển hình của các tế bào bị nhiễm các virus ly giải tế bào khối u [2]. Bên cạnh sự phá vỡ tế bào, các tế bào nhiễm virus còn hình thành các hợp bào, điều này giúp cho virus tránh được sự tiếp xúc trực tiếp với các kháng thể có thể trung hòa và sự tiêu diệt của hệ miễn dịch. Quan sát quá trình gây nhiễm MeV vào tế bào H460 thấy tế bào ung thư đã co lại, giảm kích thước, tập hợp thành đám và có xu hướng bong ra khỏi bề mặt đĩa chai nuôi cấy vào thời điểm 48 giờ. Tại hai thời điểm 72 giờ và 96 giờ các hợp bào lớn dần, bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tác dụng gây chết của MeV phối hợp Cisplatin tại ba thời điểm

48 giờ, 72 giờ và 96 giờ bằng thử nghiệm MTT. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy MeV và Cisplatin đều có tác dụng gây chết tế bào ung thư phổi H460 với tỷ lệ tế bào sống ở nhóm chứng không điều trị cao hơn rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm điều trị. Trong đó, tỷ lệ tế bào sống ở nhóm điều trị phối hợp với cả hai tác nhân thấp hơn nhóm điều trị đơn chỉ với một tác nhân. Tỷ lệ tế bào sống giảm theo thời gian điều trị. Do vậy, liệu pháp điều trị ung thư sử dụng MeV là một định hướng có tiềm năng trong điều trị ung thư phổi.

Tuy nhiên, nghiên cứu này chưa chỉ ra cơ chế tác dụng cộng gộp của MeV và Cisplatin trong quá trình ức chế sự phát triển của tế bào. Quá trình điều trị phối hợp có thể làm tăng khả năng xâm nhập của cả MeV và Cisplatin vào bên trong tế bào giúp làm tăng cường khả năng ly giải tế bào. Bên cạnh đó, tác dụng của Cisplatin hướng đến các phân tử DNA và RNA của MeV trong quá trình điều trị phối hợp cũng cần được xem xét. Sự tương tác giữa Cisplatin và MeV có thể ảnh hưởng đến khả năng nhân lên của virus và đáp ứng của cơ thể. Do đó, các cơ chế này cần được nghiên cứu sâu hơn ở các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

MeV và Cisplatin thể hiện hoạt tính gây chết tế bào ung thư phổi - H460 *in vitro*. Phối hợp MeV và Cisplatin gây chết tế bào H460 tốt hơn so với điều trị đơn *in vitro*, cho thấy điều trị phối hợp là một liệu pháp tiềm năng trong điều trị ung thư phổi.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này là sản phẩm của Đề tài KH & CN cấp cơ sở: “Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư của MeV phối hợp với Cisplatin trên thực nghiệm”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-249.
2. Msaouel P, Opyrchal M, Domingo Musibay E, et al. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther.* 2013; 13(4):483-502.
3. Son HA, Zhang L, Cuong BK, et al. Combination of vaccine-strain measles and mumps viruses enhances oncolytic activity against human solid malignancies. *Cancer Invest.* 2018; 36(2):106-117.

4. Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *J Clin Oncol*. 2014; 32(27):2940-2950.
5. Zoń A, Bednarek I. Cisplatin in ovarian cancer treatment-known limitations in therapy force new solutions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(8).
6. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*. 2019; 88:102925.
7. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*. 2016; 106:27-36.
8. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010; 70(3):875-882.
9. Zhang LF, Tan DQ, Jeyasekharan AD, et al. Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide range of human hematological cancer cells: Special focus on acute myeloid leukemia. *Cancer Letters*. 2014; 354(2):272-280.
10. Toan NL, Hang NT, Luu NK, et al. Combination of vaccine strain measles virus and nimotuzumab in the treatment of laryngeal cancer. *Anticancer Research*. 2019; 39(7):3727-3737.