

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA CHẤT ỨC CHẾ PROTEIN KINASE TAK-901 LÊN SỰ KÍCH HOẠT TẾ BÀO UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH

Bùi Khắc Cường^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá tác động của TAK-901 lên sự tăng sinh và chết theo chương trình của tế bào ung thư đại trực tràng (UTĐTT). **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu sử dụng chất ức chế protein kinase TAK-901 và dòng tế bào UTĐTT HCT116. Các thử nghiệm được sử dụng bao gồm thử nghiệm crystal violet và thử nghiệm apoptosis bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. **Kết quả:** Chất ức chế protein kinase TAK-901 có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào ở thử nghiệm crystal violet và kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình ở thử nghiệm apoptosis trên dòng tế bào UTĐTT HCT116. **Kết luận:** Chất ức chế protein kinase TAK-901 có tác dụng ức chế sự tăng sinh và kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình trên dòng tế bào UTĐTT HCT116.

Từ khoá: Protein kinase; TAK-901; Ung thư đại trực tràng.

EVALUATION OF THE EFFECT OF PROTEIN KINASE INHIBITOR TAK-901 ON THE ACTIVATION OF APOPTOSIS IN COLORECTAL CANCER CELLS

Abstract

Objectives: To evaluate the impact of TAK-901 on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells. **Methods:** A study using protein kinase inhibitor TAK-901 and colon cancer cell line HCT116. Experimental assays, including the crystal violet assay and the apoptosis assay, were applied using a flow cytometry system. **Results:** Protein kinase inhibitor TAK-901 inhibited cell proliferation in the crystal violet assay and activated programmed cell death in the apoptosis assay on colorectal cancer cell lines HCT116. **Conclusion:** Protein kinase inhibitor TAK-901 inhibited proliferation and activated programmed cell death on colorectal cancer cell line HCT116.

Keywords: Protein kinase; TAK-901; Colorectal cancer.

¹Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Bùi Khắc Cường (buikhaccuong@gmail.com)

Ngày nhận bài: 20/4/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 07/6/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i6.814>

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là quá trình bệnh lý phát sinh từ đại trực tràng, gây nên bởi sự tăng bất thường các tế bào có khả năng xâm lấn hoặc lan rộng vào các bộ phận hay cơ quan khác của cơ thể. Bệnh lý phát triển theo nhiều giai đoạn, hậu quả từ sự tích lũy tăng dần của đột biến gen, đột biến ngoài gen và các bất thường trong con đường truyền tín hiệu nội bào. Số bệnh nhân (BN) mắc UTĐTT và số ca tử vong do căn bệnh này vẫn tăng theo thời gian, từ 783.000 ca được chẩn đoán và ghi nhận năm 1990, lên đến 1.361.000 vào năm 2012. Năm 2020, có 1.931.590 (10%, đứng thứ 3) ca ung thư đại trực tràng mắc mới với 935.173 (9,4%, đứng thứ 2) ca tử vong trên tổng số các loại ung thư trên thế giới [1]. Tại Việt Nam, theo số liệu ghi nhận tại 6 vùng địa lý giai đoạn 2004 - 2010, UTĐTT đứng hàng thứ 4 ở nam giới và thứ 2 ở nữ giới với tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 19,0 và 14,7/100.000 dân. Mỗi năm có khoảng 8.700 BN mắc mới và 5.900 trường hợp tử vong [2]. Những năm gần đây, đã có nhiều phương pháp điều trị ung thư mới được áp dụng vào điều trị UTĐTT như liệu pháp miễn dịch, điều trị đích, liệu pháp sử dụng hạt nano... Tuy có nhiều kết quả tích cực, nhưng tiên lượng BN mắc UTĐTT giai

đoạn cuối sống > 5 năm là < 20% [3, 4]. Do đó, việc nâng cao hiệu quả điều trị vẫn là vấn đề cấp thiết. Hiện nay, sự phát triển của sinh học phân tử đã cho chúng ta những hiểu biết rõ hơn về các con đường dẫn truyền tín hiệu có liên quan đến cơ chế gây bệnh ung thư. Các loại thuốc có tác động ức chế đến một số nhân tố trên con đường này đã được giới khoa học tạo ra và thử nghiệm nhằm tìm ra phương pháp điều trị ung thư mới và hiệu quả. TAK-901 là một chất có tác dụng ức chế nhiều kinase trong đó Aurora A/B, JAK3... là các protein quan trọng ảnh hưởng đến sự tồn tại của tế bào ung thư. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm: *Đánh giá tác động của TAK-901 lên sự tăng sinh và chết theo chương trình của tế bào UTĐTT.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Đối tượng nghiên cứu**

Chất ức chế protein kinase TAK-901 (Selleckchem, hàm lượng 10 μ M/mL) được thử nghiệm các nồng độ khác nhau bằng các nghiệm pháp để đánh giá tác động tới tế bào UTĐTT HCT116. Dòng tế bào UTĐTT HCT116 ở người được cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection), lưu trữ và bảo quản trong điều kiện lạnh sâu -80°C.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Nuôi cấy tế bào HCT116*: Nuôi cấy tăng sinh tế bào HCT116 trong môi trường DMEM trên đĩa petri 10cm. Hút bỏ hết dịch môi trường cũ, loại bỏ tế bào chết và rửa sạch đĩa bằng dung dịch PBS. Ủ tế bào trong dung dịch Trypsin-EDTA 2 - 3 phút để tế bào co và bong khỏi đáy đĩa nuôi cấy. Kiểm tra tế bào trên kính hiển vi quang học. Tách, rửa tế bào và cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy mới, thay môi trường nuôi cấy sau 2 - 3 ngày. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

* *Thử nghiệm Crystal Violet đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào*: Thử nghiệm này được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế tăng sinh của TAK-901 đối với dòng tế bào bám đáy HCT116 bằng thuốc nhuộm Crystal Violet. Các ion dương của thuốc nhuộm tương tác với các phân tử ion âm của tế bào như DNA, peptidoglycan và lipopolysaccharide, nhờ đó, tế bào sẽ giữ lại màu tím của thuốc nhuộm. Ngoài ra, thử nghiệm này cũng giúp đánh giá khả năng sống sót của tế bào *in vitro* dựa trên khả năng hình thành cụm tế bào từ một tế bào đơn lẻ. Tế bào được chuyển lên đĩa 12 giếng (1mL môi trường DMEM/giếng), mỗi giếng 500 tế bào. Tiếp tục nuôi cấy trong 24 giờ.

Các giếng sau đó được xử lý với TAK-901 (1 mL/giếng) ở các nồng độ 0,000 μ M, 0,125 μ M, 0,250 μ M. Tế bào tiếp tục được nuôi cấy trong 2 tuần, chụp ảnh định kỳ trên kính hiển vi. Sau đó, cần loại bỏ môi trường nuôi cấy và nhuộm với 2mL dung dịch Crystal Violet 1% ủ trong 30 phút. Rửa sạch lại với phosphate buffered-saline (PBS) để loại bỏ hết dung dịch nhuộm. Các giếng được chụp ảnh lại sau khi đã rửa sạch. Hình ảnh sau đó được phân tích bằng phần mềm ImageJ. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm diện tích tế bào bắt màu thuốc nhuộm và cường độ bắt màu thuốc nhuộm của tế bào.

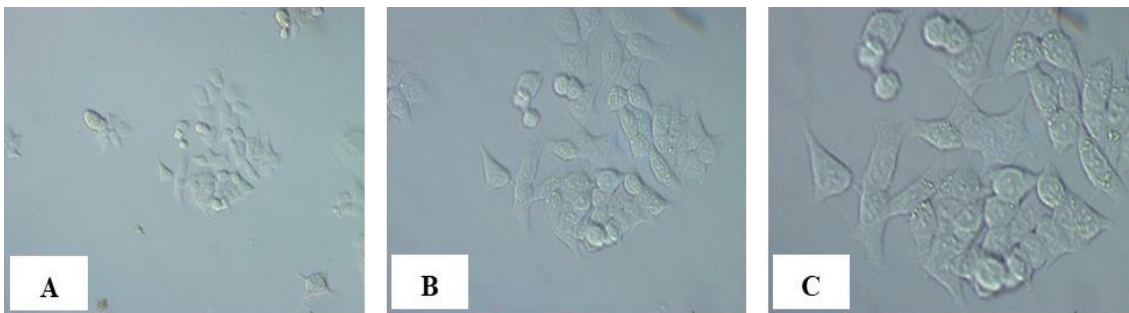
* *Thử nghiệm Apoptosis đánh giá tác động đến chết theo chương trình của tế bào*: Thử nghiệm này được sử dụng dựa trên màng phospholipid, phosphatidylserine (PS) ở các tế bào apoptotic được chuyển vị trí từ trong ra ngoài của màng sinh chất, do đó bộc lộ PS với môi trường tế bào bên ngoài. Annexin V là một protein liên kết phospholipid phụ thuộc Ca^{2+} , có ái lực cao với PS và liên kết với các tế bào có PS bộc lộ ra ngoài. Đồng thời, Annexin V có thể được liên hợp với các fluorochromes như FITC và PE, hoặc với biotin hay được gắn với EGFP (protein huỳnh quang xanh tăng cường). Việc liên hợp này vừa giữ lại

ái lực cao của chúng với PS, vừa cung cấp tín hiệu để phân tích các tế bào đang trải qua quá trình apoptosis. Thuốc nhuộm PI (propidium iodide) là hóa chất nhuộm acide nucleic, tuy nhiên không thể thấm qua màng tế bào toàn vẹn, mà chỉ có thể thấm qua màng của tế bào đã chết hoặc tế bào apoptotic. Dựa trên tính chất này nên trong thử nghiệm FACS Apoptosis, PI được sử dụng như chất chỉ thị huỳnh quang để xác định sự toàn vẹn của màng tế bào.

Tế bào được chuyển lên đĩa 6 giếng (2mL môi trường DMEM/giếng), mỗi giếng 300.000 tế bào và nuôi cấy tiếp 24 giờ. TAK-901 được thêm vào các giếng (2 mL/giếng) ở các nồng độ 0,000 μ M, 0,125 μ M, 0,250 μ M. Các giếng được chụp ảnh tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ sau điều trị. Tế bào được thu lại ở thời điểm 24 giờ ngay sau khi chụp ảnh để chuẩn bị chạy FACS. Các thử nghiệm trong nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả nuôi cấy, tăng sinh tế bào HCT116

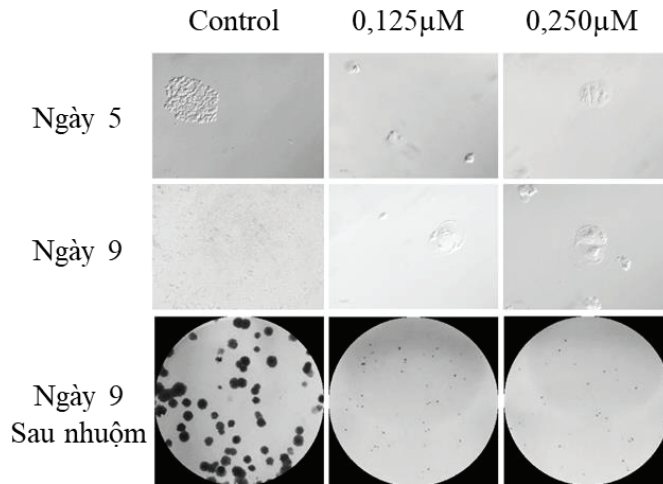


Hình 1. Tế bào quan sát ở các vật kính khác nhau:

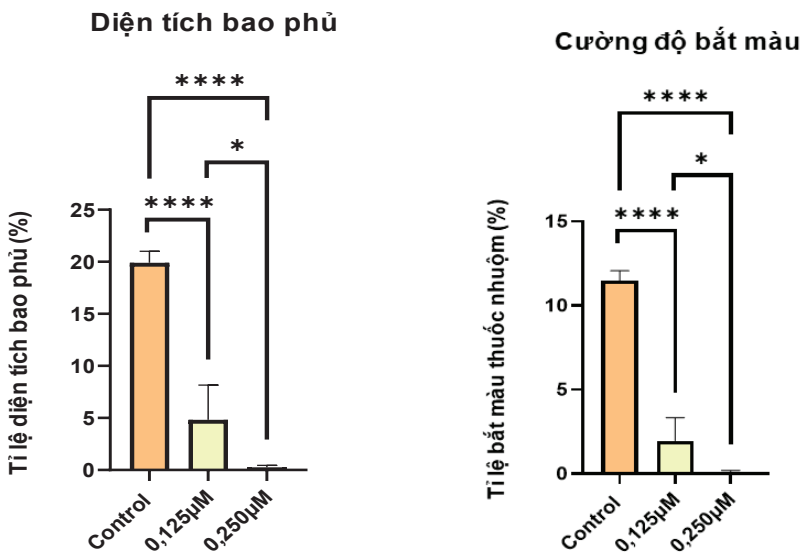
Tế bào HCT116 quan sát ở các vật kính: A. 20X; B. 40X; C. 63X.

Tế bào HCT116 được quan sát bằng kính hiển vi quang học. Tế bào HCT116 là các tế bào biểu mô đại tràng bám đáy, phát triển đơn lớp, có hình dạng từ bầu dục tới đa giác, đường kính tế bào khoảng 20 - 40 μ m. Tăng sinh tế bào HCT116 cho kết quả tốt, số lượng tế bào tăng nhanh, mật độ tế bào lớn, đồng đều trên toàn bộ bề mặt đáy đĩa nuôi cấy.

2. Thử nghiệm Crystal Violet



Hình 2. Kết quả thử nghiệm Crystal Violet đối với các nồng độ thuốc: 0,125µM và 0,25µM ở ngày thứ 5 và thứ 9.



Hình 3. Kết quả phân tích độ bao phủ tế bào và cường độ bắt màu thuốc nhuộm.

Ngày thứ 5 sau xử lý, tế bào ở nhóm chứng phát triển tốt, bắt đầu hình thành các cụm tế bào. Kích thước tế bào ở các nhóm xử lý lớn hơn khoảng 5 - 10 lần ở nhóm chứng. Ở hai nhóm điều trị

với TAK-901 ở hai nồng độ 0,125µM và 0,25µM tế bào ít tăng sinh, mọc đơn lẻ trong vi trường.

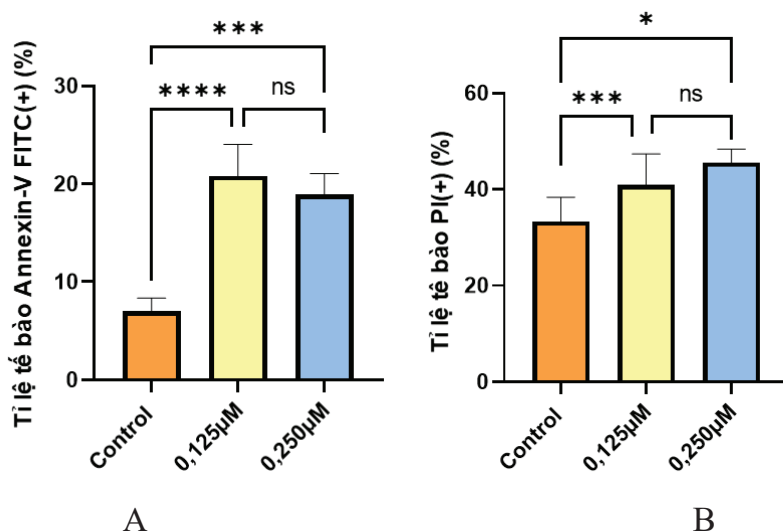
Ngày thứ 9 sau xử lý, ở nhóm chứng hình thành nhiều cụm tế bào lớn,

phân bố khắp bề mặt giếng nuôi cấy. Tế bào bắt màu thuốc nhuộm tốt. Kích thước tế bào ở các nhóm xử lý lớn hơn khoảng 10 - 15 lần ở nhóm chứng. Tế bào tiếp tục có sự gia tăng kích thước so với ngày thứ 5. Ở hai nhóm xử lý, các tế bào hầu như không tăng sinh, nhiều tế bào chết. Một số tế bào có thành bị phá vỡ hoặc kích thước tế bào tăng mạnh.

Có thể thấy rõ sự khác biệt của các giếng tế bào giữa các nồng độ của

thuốc. Ở nhóm không xử lý, các cụm tế bào phát triển to, mật độ dày, nhìn rõ. Ở hai nhóm còn lại, xử lý lần lượt với TAK-901 ở nồng độ 0,125 μ M và 0,25 μ M, các cụm tế bào nhỏ, bám ít thuốc nhuộm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa số lượng tế bào của nhóm đối chứng với các nhóm tế bào được xử lý với TAK-901 ở các nồng độ cũng được ghi nhận dựa trên hai thông số về độ bao phủ tế bào và cường độ bắt màu thuốc nhuộm Crystal Violet của tế bào HCT116.

3. Tác dụng kích hoạt apoptosis của TAK-901 trên dòng tế bào HCT116



Hình 4. Tỷ lệ tế bào HCT116 chết theo chương trình (A) và hoại tử (B) sau xử lý TAK-901 trong thử nghiệm apoptosis. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

Biểu đồ A cho thấy khác biệt về tỷ lệ tế bào chết theo chương trình giữa nhóm chứng và hai nhóm tế bào xử lý với TAK-901 ($p < 0,05$). Biểu đồ B cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tế bào hoại tử giữa nhóm chứng và hai nhóm tế bào xử lý với TAK-901 ($p < 0,05$). Kết quả cho thấy TAK-901 kích hoạt apoptosis trên dòng tế bào HCT116.

BÀN LUẬN

Tế bào HCT116 đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đánh giá hiệu quả kháng ung thư của nhiều hợp chất, thuốc khác nhau. Để đánh giá tác dụng của TAK-901 trên tế bào UTĐTT HCT116, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm Crystal Violet và thử nghiệm apoptosis. Thử nghiệm Crystal Violet được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư HCT116 của TAK-901. Kết quả nghiệm pháp đã chứng minh tác động ức chế của TAK-901 lên khả năng tăng sinh của tế bào HCT116. Ở các nhóm xử lý, tế bào gia tăng kích thước và hầu như không có sự phân chia tế bào. Bên cạnh đó, có thể nhận thấy số lượng tế bào chết gia tăng đáng kể ở các nhóm xử lý. Sự thay đổi về kích thước và khả năng tăng sinh tế bào này tương đồng với các nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của TAK-901 lên các loại tế bào ung thư khác nhau và trên tế bào chuột [5, 6, 7]. Sự suy giảm về độ bao phủ tế bào và cường độ bắt màu thuốc nhuộm cũng phù hợp với sự gia tăng về nồng độ xử lý.

Thử nghiệm apoptosis được sử dụng để đánh giá tác động của TAK-901 đến chết theo chương trình của tế bào UTĐTT HCT116. Quan sát tế bào HCT116 được chuẩn bị để chạy FACS

ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ sau xử lý, kích thước tế bào tăng mạnh, tế bào tách cụm và phát triển riêng lẻ. Ở nồng độ $0,250\mu\text{M}$, kích thước tế bào tăng, tròn hóa, mất hình dạng ban đầu. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra TAK-901 ức chế quá trình phosphoryl hóa tế bào của histone H3 (cơ chất trực tiếp của Aurora B kinase), từ đó khiến cho tế bào ung thư tiến vào con đường tự chết sớm hơn bằng cách tạo thể đa bội (tế bào $> 4n$) và sau đó kích hoạt p53 [6, 8]. Khi Aurora B kinase bị ức chế, các tế bào tiếp tục chu kỳ tế bào mà không có quá trình phân bào và không có bất kỳ điểm kiểm tra chu kỳ tế bào nào được kích hoạt, dẫn đến đa bội hóa. Nó cũng ảnh hưởng đến quá trình sửa chữa DNA tổn thương và kích hoạt quá trình apoptosis [6, 8, 9].

KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh chất ức chế protein kinase TAK-901 có tác dụng ức chế sự tăng sinh và kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình trên dòng tế bào UTĐTT HCT116.

Lời cảm ơn: Tác giả xin cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ cho nghiên cứu này trong đề tài mã số 108.02-2019.324. Tôi xin cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Section of cancer surveillance. *Globocan 2020 - Global Cancer Observatory*. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>.
2. Nguyễn Bá Đức, Bùi Diệu, Trần Văn Thuấn. Tình hình mắc ung thư tại Việt Nam qua số liệu 6 vùng ghi nhận giai đoạn 2004 - 2008. *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*. 2010; 1.
3. Petrelli, F, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017; 3(2):211-219.
4. Society AC. *Survival Rates for Colorectal Cancer*. 2023.
5. Farrell P, et al. Biological characterization of TAK-901, an investigational, novel, multitargeted Aurora B kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12(4):460-470.
6. Murai S, et al. Aurora B inhibitor TAK-901 synergizes with BCL-xL inhibition by inducing active BAX in cancer cells. *Anticancer Res*. 2017; 37(2):437-444.
7. Zhan X, et al. The aurora kinase inhibitor TAK901 inhibits glioblastoma growth by blocking SREBP1-mediated lipid metabolism. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(23).
8. Nair JS, AL Ho, and GK Schwartz. The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle*. 2012; 11(4):807-817.
9. D'Orazi G. p53 Function and dysfunction in human health and diseases. *Biomolecules*. 2023; 13(3).