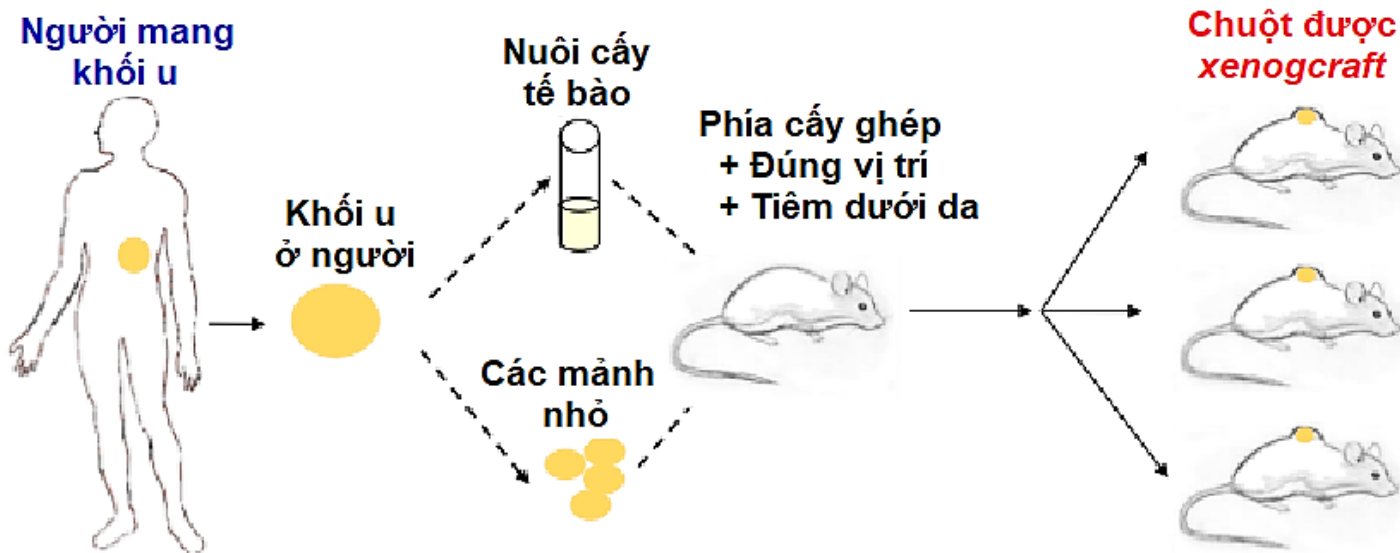


❖ CHUỘT XENOGRAFT

Trước đây, một phương pháp phổ biến trong các thử nghiệm khoa học về thuốc chống ung thư có sử dụng chuột là *Xenograft*. Xenograft (xenos - từ tiếng Hy Lạp có nghĩa là nước ngoài), là một mảnh ghép thu được từ một thành viên của một loài và được cấy ghép cho một thành viên của một loài, chi hoặc họ khác; hay có thể hiểu đơn giản, xenograft là ghép ngoại lai/ ghép dị lai với khối u xenograft là khối u được tạo ra từ những dòng tế bào ung thư của con người cấy ghép vào cơ thể chuột. Việc cấy ghép có thể bao gồm các tế bào sống, mô hoặc cơ quan từ loài này sang loài khác.

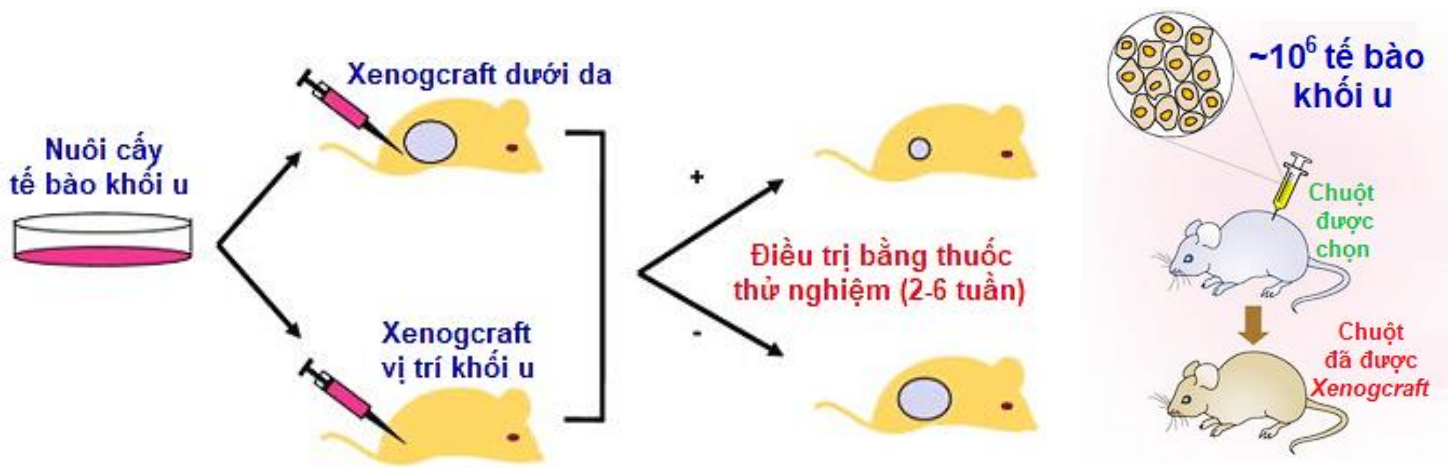


Mô hình khối u xenograft ung thư ở người đóng một vai trò quan trọng trong sàng lọc và đánh giá các loại thuốc chống ung thư mới. Xenograft được sử dụng để trả lời các câu hỏi chính trong lĩnh vực nghiên cứu ung thư khi cần dựa vào việc sử dụng các hệ thống mô hình động vật gần giống với tiến triển khối u ở bệnh nhân người. Xenograft người phát triển ở chuột suy giảm miễn dịch là một mô hình được thiết lập tốt và hữu ích để nghiên cứu sinh học khối u ở người trong một hệ thống mô phỏng tốt hơn khối u nguyên phát so với các tế bào phát triển trong ống nghiệm. Thông thường, các nghiên cứu xenograft sử dụng các dòng tế bào được thụ động cao đã được biến đổi gen và nuôi cấy nhân tạo, dẫn đến lựa chọn vô tính có thể không được quan sát ở bệnh nhân. Hơn nữa, các dòng tế bào này không được nuôi hoặc nhân giống như nuôi cấy tế bào. Thiết lập mô hình khối u xenograft từ mô khối u có nguồn gốc bệnh nhân được cho là bảo tồn các đặc điểm khối u ban đầu như mô học không đồng nhất, chữ ký sinh học lâm sàng, kiểu hình ác tính và kiểu gen, cấu trúc khối u và mạch máu khối u. Dựa trên giả thuyết phổ biến này, xenograft khối u nguyên phát được cho là cung cấp những hiểu biết tiên đoán có liên quan về kết quả lâm sàng khi đánh giá hiệu quả của các liệu pháp điều trị ung thư mới.

Đối với dược phẩm, việc phát triển thuốc thường theo một trình tự được xác định. Các liệu pháp điều trị ung thư tiềm năng được phát hiện thông qua màn hình in vitro hoặc gần đây hơn là do thiết kế thuốc nhắm mục tiêu. Các hợp chất như vậy sau đó được kiểm tra tác dụng trong ống nghiệm bằng cách sử dụng nhiều dòng tế bào ung thư và nếu đủ hứa hẹn, sau đó thử nghiệm in vivo. Thử nghiệm in vivo thường bao gồm một số phân bao gồm phân tích dược lý, dược lực học và độc tính.

Trong mô hình xenograft, các dòng tế bào ung thư được phát triển, thường là dưới da ở chuột suy giảm miễn dịch (ví dụ *SCID*). Khoảng 10^6 các tế bào ác tính được tiêm dưới da vào sườn của chuột. Sau một thời gian ngắn chờ đợi, thuốc chống ung thư tiềm năng được bắt đầu sử dụng cho chuột ở dấu hiệu đầu tiên của sự phát triển khối u, hoặc thậm chí trước khi một khối u xuất hiện. Một

chất được xem là tiềm năng trong các thử nghiệm này nếu nó làm chậm sự phát triển của khối u (tức là làm giảm sự tiến triển).



Các mô hình Xenograft cung cấp một số lợi thế, bao gồm dễ sử dụng, sẵn có và yêu cầu cơ sở vật chất tương đối khiêm tốn. Chắc chắn, nhiều nghiên cứu quan trọng dẫn đến sự thay đổi trong điều trị lâm sàng cũng như hầu hết mọi chất chống ung thư được FDA phê chuẩn đã được thực hiện bằng cách sử dụng các mẫu ung thư đại diện ở người được phát triển dưới dạng xenograft.

❖ CHUỘT BIẾN ĐỔI GEN

Công nghệ tạo ra động vật biến đổi gen đã phá vỡ nền tảng mới trong cộng đồng khoa học và cho phép các nhà khoa học tìm kiếm những cách mới để điều trị bệnh và phát triển các loại thuốc mới. Khả năng đưa thông tin di truyền mới vào dòng mầm của các sinh vật phức tạp đã thay đổi hoàn toàn và tăng cường nghiên cứu tất cả các khía cạnh của các quá trình sinh học. Các mô hình CBDG trong độc học chủ yếu được sử dụng để sàng lọc các loại thuốc gây ung thư và để hiểu các cơ chế của độc tính. Những mô hình chuột này có thể dự đoán một cách đáng tin cậy khả năng gây ung thư của các hợp chất và giảm đáng kể nguy cơ sử dụng các loại thuốc này trong các phòng khám để điều trị bệnh ở người. Sử dụng các thí nghiệm ngắn hạn trên CBDG kết hợp với các nghiên cứu mãn tính 2 năm trên chuột có thể làm tăng độ chính xác tổng thể của việc phát hiện các chất gây ung thư và không gây ung thư.

Một con chuột biến đổi gen (CBDG) là một con chuột đã được thay đổi bộ gen thông qua việc sử dụng các kỹ thuật di truyền. Con CBDG đầu tiên được tạo ra vào năm 1974 tại Viện Công nghệ Massachusetts. Nó được tạo ra thông qua một ống nghiệm được tiêm vi-rút Simian 40 vào phôi nang chuột và nhiễm phôi thai sớm với retrovirus. Các gen sau đó đã được tìm thấy trong mọi tế bào cơ thể của nó. Tuy nhiên, con chuột này không truyền gen cho thế hệ con, do đó tác động và khả năng ứng dụng của thí nghiệm bị hạn chế. Năm 1981, các phòng thí nghiệm của Frank Ruddle từ Đại học Yale đã tiêm DNA tinh khiết vào phôi chuột đơn bào sử dụng các kỹ thuật được phát triển bởi Brinster trong những năm 1960 và 1970, lần đầu tiên cho thấy việc truyền vật liệu di truyền sang các thế hệ tiếp theo đạt hiệu quả. Trong những năm đầu thập niên tám mươi, Palmiter và Brinster đã phát triển và tiên phong trong lĩnh vực biến đổi gen, tinh chỉnh các phương pháp sửa đổi dòng mầm và sử dụng các kỹ thuật này để làm sáng tỏ hoạt động và chức năng của gen theo cách chưa bao giờ được tiếp cận trước đó.

Có 3 phương pháp kỹ thuật cơ bản để sản xuất CBDG là vi tiêm DNA, chuyển gen qua trung gian tế bào phôi và chuyển gen qua trung gian retrovirus. Đầu tiên liên quan đến tiêm trực tiếp của một cấu trúc gen đã chọn (1 gen đơn hoặc một tổ hợp gen) vào nhân của một noãn được thụ tinh, nơi

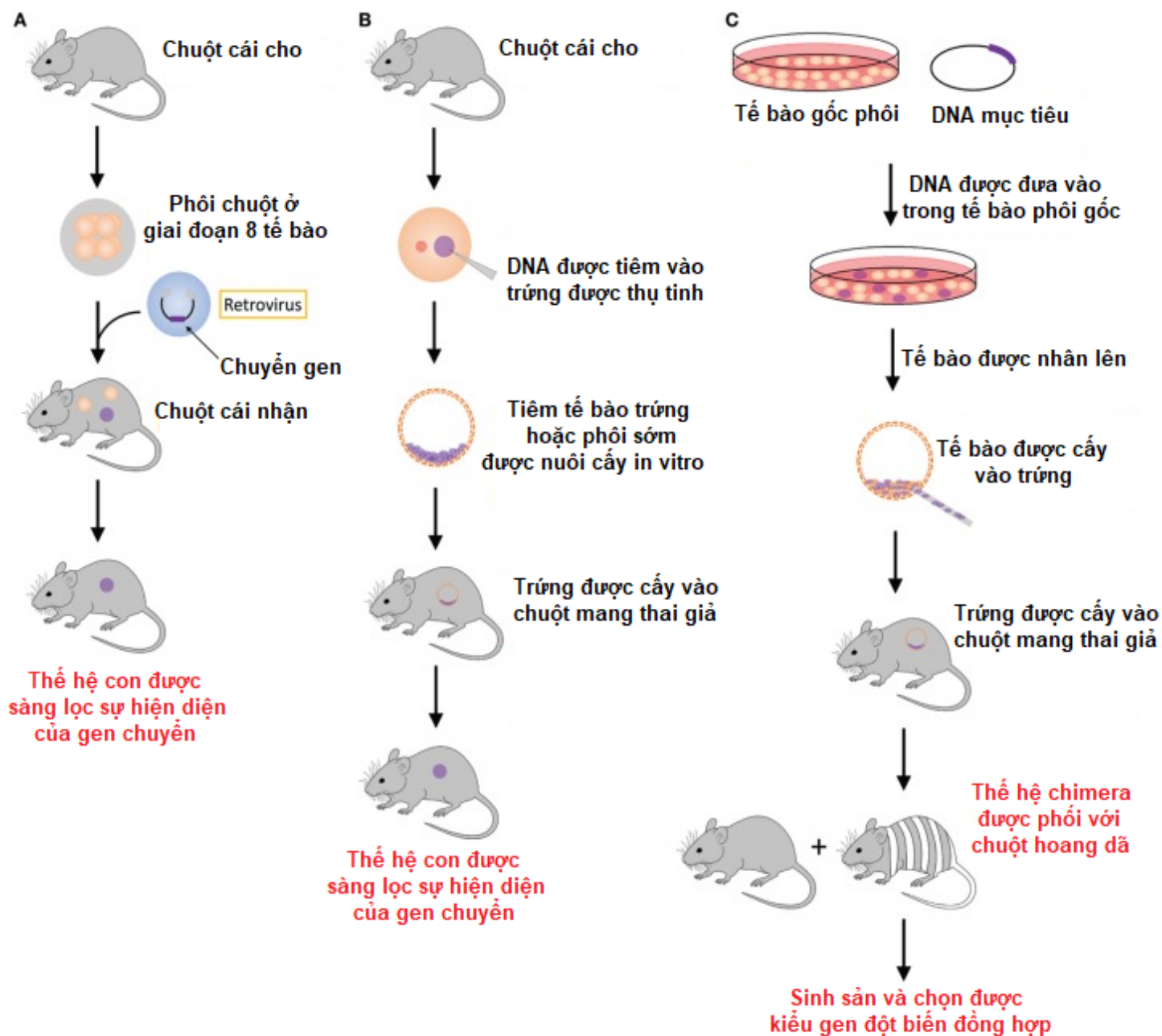
nó sẽ tích hợp ngẫu nhiên vào bộ gen của chuột. Phương pháp này tạo ra một con CBDG biểu hiện quá mức hoặc dưới mức của một số gen nhất định hoặc biểu hiện gen hoàn toàn mới. Tuy nhiên, việc chèn DNA là một quá trình ngẫu nhiên và có khả năng cao là gen được chọn sẽ không tự chèn vào một vị trí trên DNA chủ. Trứng thụ tinh được chuyển vào ống dẫn trứng của chuột mẹ nuôi để làm người nhận.

Cách tiếp cận thứ hai, được tiên phong bởi Oliver Smithies và Mario Capecchi là chuyển gen qua trung gian tế bào phôi. Phương pháp này bao gồm việc chèn trước chuỗi DNA mong muốn bằng cách tái tổ hợp đồng hợp vào nuôi cấy in vitro của tế bào phôi gốc - là các tế bào không biệt lập có khả năng biệt hóa thành bất kỳ loại tế bào nào (tế bào soma và mầm) và do đó tạo ra một sinh vật hoàn chỉnh. Những tế bào này sau đó được kết hợp vào phôi ở giai đoạn phát triển phôi nang. Kết quả là một con chuột chimera. Chuyển gen qua trung gian tế bào phôi gốc được sử dụng để điều khiển một gen duy nhất, trong hầu hết các trường hợp “knockout” (bất hoạt) gen mục tiêu với thao tác di truyền ngày càng tinh tế và phức tạp hơn (ví dụ như nhân hóa 1 loại protein cụ thể hoặc chỉ thay đổi 1 nucleotide).



Một con chuột trong phòng thí nghiệm trong đó một gen ảnh hưởng đến sự phát triển của lông đã bị loại bỏ (trái), được đặt bên cạnh một con chuột thí nghiệm bình thường.

Phương pháp thứ ba là chuyển gen qua trung gian Retrovirus. Để tăng xác suất biểu hiện, chuyển gen được trung gian bằng phương tiện của vật mang hoặc vec tơ, nói chung là virus hoặc plasmid. Đối với phương pháp này, Retrovirus thường được sử dụng làm vectơ để chuyển vật liệu di truyền vào tế bào, tận dụng khả năng lây nhiễm tế bào chủ theo cách này. Thế hệ con có nguồn gốc từ phương pháp này là chimera, tức là không phải tất cả các tế bào đều mang retrovirus. Việc truyền gen chỉ có thể xảy ra nếu retrovirus tích hợp vào một số tế bào mầm.

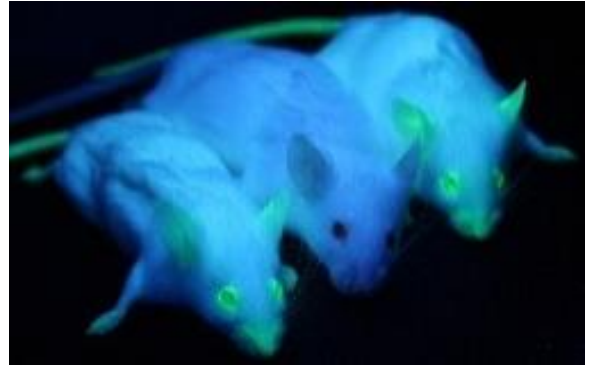


Các chiến lược khác nhau để tạo ra chuột biến đổi gen bao gồm phương pháp retrovirus (A), không được sử dụng thường xuyên; (B) phương pháp chuyển gen chuẩn, trong đó DNA được đưa vào bộ gen theo cách không đặc hiệu; và (C) phương pháp chuyển gen nhắm mục tiêu gen, là cách tiếp cận thường được sử dụng để tạo ra CBDG “knockout” thông thường.

Đối với bất kỳ kỹ thuật nào, tỷ lệ thành công về mặt sinh tồn của chuột có chứa gen chuyển là cực kỳ thấp. Với điều kiện là các thao tác di truyền không dẫn đến phá thai, kết quả là thế hệ đầu tiên (F1) của chuột biểu hiện của gen chuyển. Tùy thuộc vào kỹ thuật được sử dụng, thế hệ F1 có thể tạo ra các chimera. Khi gen chuyển đã tích hợp vào các tế bào mầm, cái gọi là các dòng vi trùng mầm sau đó được lai tạo trong 10 đến 20 thế hệ cho đến khi thu được các con chuột chuyển gen đồng hợp tử và gen chuyển có mặt trong mọi tế bào. Ở giai đoạn này phôi mang gen chuyển có thể được đông lạnh và được lưu trữ cho lần cấy tiếp theo.

Ví dụ cho trường hợp “knockout” (bất hoạt) 1 gen hiện có bằng cách thay thế hoặc phá vỡ nó với 1 mảnh DNA nhân tạo. Con chuột “knockout” đầu tiên được ghi nhận được tạo ra bởi Mario R. Capecchi, Martin Evans và Oliver Smithies vào năm 1989 và họ đã được trao giải thưởng Nobel về Sinh lý học - Y học năm 2007. Trình tự quy trình để tạo ra 1 con chuột “knockout” bao gồm:

1. Các gen bị loại ra được phân lập từ một thư viện gen chuột. Sau đó, một chuỗi DNA mới được thiết kế ngay lập tức rất giống với gen ban đầu và trình tự lân cận ngay của nó, ngoại trừ việc được thay đổi đủ để làm cho gen không thể hoạt động. Thông thường, trình tự mới cũng được thêm vào một gen đánh dấu, một gen mà những con chuột bình thường không có và có khả năng kháng một tác nhân độc hại nào đó (ví dụ neomycin) hoặc tạo ra sự thay đổi có thể quan sát được (ví dụ như màu sắc hoặc huỳnh quang). Ngoài ra, một gen thứ hai, chẳng hạn như Herpes TK (+) cũng được đưa vào cấu trúc để thực hiện lựa chọn hoàn chỉnh.

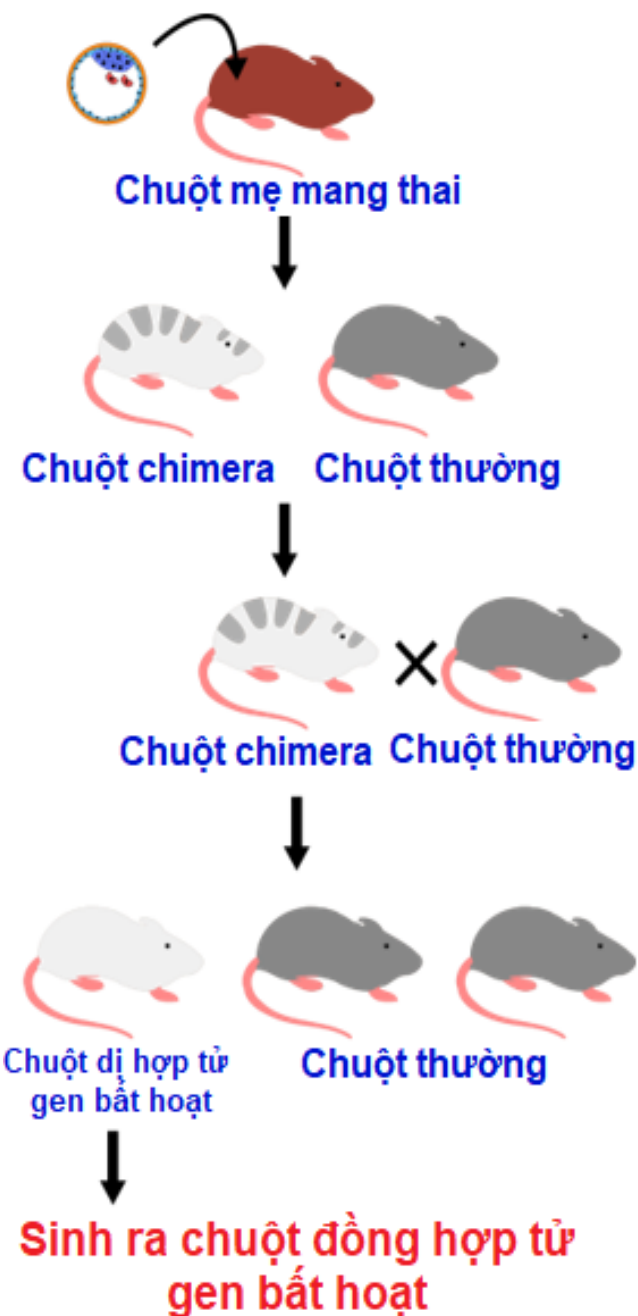
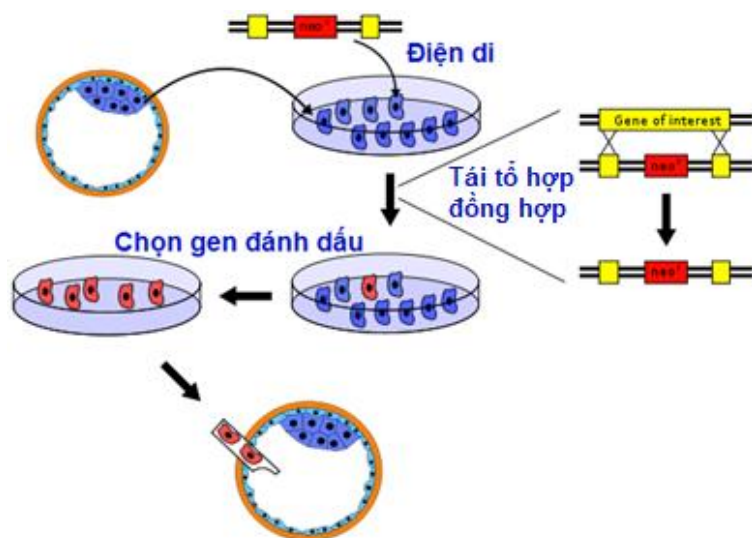


CBEG biểu hiện protein huỳnh quang, phát sáng màu xanh lá cây dưới ánh sáng xanh.
Chuột trung tâm là loại hoang dã.

2. Tế bào gốc phôi được phân lập từ phôi nang chuột (một phôi non) và được nuôi cấy trong ống nghiệm. Trong ví dụ này là tế bào gốc từ một con chuột bạch.

3. Trình tự mới từ bước 1 được đưa vào các tế bào gốc từ bước 2 bằng phương pháp điện di. Theo quá trình tái tổ hợp tự nhiên, một số tế bào gốc được điện hóa sẽ kết hợp trình tự mới với gen bị loại ra khỏi nhiễm sắc thể của chúng thay cho gen ban đầu. Khả năng tái tổ hợp thành công là tương đối thấp, do đó phần lớn các tế bào bị thay đổi sẽ có trình tự mới chỉ trong một trong hai nhiễm sắc thể có liên quan - được cho là dị hợp tử. Các tế bào được biến đổi với một véc-tơ chứa gen kháng neomycin và gen Herpes TK (+) được nuôi cấy trong dung dịch chứa neomycin và Ganciclovir để chọn các biến đổi xảy ra thông qua tái hợp tương đồng. Bất kỳ sự chèn DNA nào xảy ra thông qua việc chèn ngẫu nhiên sẽ tử vì chúng cho kết quả dương tính với cả gen kháng neomycin và gen Herpes TK (+), có sản phẩm gen phản ứng với Ganciclovir để tạo ra độc tố chết người. Hơn nữa, các tế bào không tích hợp bất kỳ thử nghiệm vật liệu di truyền nào âm tính cho cả hai gen và do đó chết do ngộ độc với neomycin.

4. Các tế bào gốc phôi kết hợp gen loại trừ được phân lập từ các tế bào chưa được lọc bằng cách sử dụng gen đánh dấu từ bước 1. Ví dụ, các tế bào chưa được lọc có thể bị tiêu diệt bằng cách sử dụng một tác nhân độc hại mà các tế bào bị thay đổi kháng lại.



5. Các tế bào phôi bị loại ra từ bước 4 được đưa vào phôi nang chuột. Ví dụ này sử dụng phôi nang từ một con chuột xám. Các phôi nang hiện có hai loại tế bào gốc: loại ban đầu (từ chuột xám) và tế bào bị loại ra (từ chuột trắng). Những phôi nang này sau đó được cấy vào tử cung của chuột cái, nơi chúng phát triển. Do đó, những con chuột sơ sinh sẽ là chimera: một số bộ phận của cơ thể chúng là kết quả của các tế bào gốc ban đầu, các bộ phận khác từ các tế bào gốc bị loại ra. Bộ lông của chúng sẽ xuất hiện các mảng màu trắng và xám, với các mảng trắng có nguồn gốc từ các tế bào gốc bị loại ra và các mảng màu xám từ phôi nang người nhận.

6. Một số chuột chimera mới sinh sẽ có các tuyến sinh dục có nguồn gốc từ các tế bào gốc bị loại bỏ, và do đó sẽ tạo ra trứng hoặc tinh trùng có chứa gen bị loại ra. Khi những con chuột chimera này được lai với những con khác thuộc loại hoang dã, một số con của chúng sẽ có một bản sao của gen bị loại trong tất cả các tế bào của chúng. Những con chuột này sẽ có màu trắng hoàn toàn và không phải là chimera, tuy nhiên chúng vẫn dị hợp tử.

7. Khi những con cái dị hợp tử này được giao phối, một số chúng sẽ được thừa hưởng gen loại bỏ từ cả bố

và mẹ; chúng không mang bản sao chức năng của gen không

thay đổi ban đầu (tức là đồng hợp tử với alen đó).

CBDG khác với xenograft ở một số khía cạnh quan trọng có thể rất phù hợp để thử nghiệm hiệu quả của thuốc. Đầu tiên, khối u CBDG xảy ra ở động vật có hệ thống miễn dịch nguyên vẹn và

cơ chế sửa chữa DNA không bị xáo trộn. Thứ hai, do các CBDG dựa vào sự tích lũy các sự kiện di truyền ngẫu nhiên để tiến triển khối u, các mô hình này theo một tiến trình từng bước và tái cấu trúc sự không đồng nhất của khối u rắn ở người. Thứ ba, do ung thư xảy ra tự phát trong các mô hình này, các CBDG có khả năng tái cấu trúc trung thực hơn các tương tác stroma khối u được tìm thấy trong ung thư ở người. Sự khác biệt giữa CBDG và xenograft có liên quan nhất để đánh giá bất kỳ tác nhân mới cụ thể nào hiện chưa rõ ràng, nhưng một số quan sát gần đây chỉ rõ vai trò quan trọng của vi môi trường khối u trong việc bắt đầu, tiến triển và duy trì khối u. Không khó để hiểu tại sao các mô hình xenograft có thể không tóm tắt chính xác khía cạnh này của sinh học ung thư: các tế bào biến đổi hoàn toàn thường được chọn cho xu hướng phát triển nhanh nhất có thể sau khi cấy ghép được tiêm dưới dạng bolus vào một stroma bị biến dạng và không có tổ chức bằng cách cấy ghép ngoài tử cung một số lượng lớn các tế bào lạ. Ngược lại, các tế bào tân sinh của khối u CBDG hình thành theo cách từng bước tương tự như khối u tại chỗ trong một vi môi trường mà khối u đáp ứng thích hợp.

Bảng 1

So sánh các mô hình xenograft và mô hình chuột biến đổi gen (CBDG)

	Xenograft CBDG	
Hệ thống miễn dịch chức năng	Không	Đúng
Cơ chế sửa chữa DNA nguyên vẹn	Không	Đúng
Sự kiện di truyền ngẫu nhiên trong quá trình phát triển khối u	Không	Đúng
Các tương tác stromal khối u	Không	Đúng
Sự thay đổi của khối u xâm nhập	Không	Đúng
Độ trễ khối u	Ngắn	Dài
Dễ đánh giá đáp ứng khối u	Dễ dàng	Khó khăn (hình ảnh)
Cơ sở hạ tầng cần thiết	Nhỏ	Lớn
Sự khác biệt về bộ gen người và chuột	Không có	Đúng