

CHẤT ỨC CHẾ P97 CB5083 KÌM HÃM TẾ BÀO UNG THƯ ĐƯỜNG MẬT TĂNG SINH VÀ DI TRÚ

Bùi Khắc Cường^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu tác dụng kìm hãm tế bào đường mật tăng sinh và di trú của CB5083 trên dòng tế bào ung thư biểu mô đường mật người TFK-1 in vitro.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu sử dụng CB5083 và dòng tế bào ung thư đường mật TFK-1. Tác động của thuốc được đánh giá dựa trên các thí nghiệm bao gồm thử nghiệm tăng sinh tế bào, thử nghiệm Crystal violet và di trú tế bào.

Kết quả: CB5083 ức chế tăng sinh tế bào TFK-1 in vitro đồng thời ngăn chặn quá trình di trú tế bào.

Kết luận: CB5083 ức chế đặc hiệu p97 (protein tham gia vào quá trình sửa chữa DNA tổn thương), có khả năng ngăn chặn quá trình tăng sinh và di trú của tế bào ung thư đường mật in vitro.

Từ khóa: CB5083, chất ức chế P97, ung thư đường mật, sửa chữa tổn thương DNA.

ABSTRACT

Objectives: To study the inhibitory effect of CB5083 on proliferation and migration of human cholangiocarcinoma cell line TFK-1 in vitro.

Subjects and methods: This study used CB5083 and cholangiocarcinoma cell line TFK-1. The effects of the drug were evaluated based on experiments including cell proliferation assay, Crystal violet assay and cell migration assay.

Results: CB5083 inhibited cell proliferation and also suppressed cell migration on TFK-1 cells in vitro

Conclusion: CB5083 specifically inhibits p97 (protein involved in the process of DNA damage repair), potentially suppressed the proliferation and migration of cholangiocarcinoma cells in vitro.

Keywords: CB5083, P97 inhibitor, cholangiocarcinoma, DNA damage repair

Chịu trách nhiệm nội dung: Bùi Khắc Cường, Email: buikhaccuong@gmail.com

Ngày nhận bài: 02/5/2024; mời phản biện khoa học: 5/2024; chấp nhận đăng: 30/5/2024.

¹Học viện Quân y.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư biểu mô đường mật (UTBMĐM) là một loại ung thư hiếm gặp (chiếm khoảng 3% các loại ung thư đường tiêu hóa) [1], có tỉ lệ tử vong cao [2]. Đây là một loại ung thư nguy hiểm, có tiên lượng xấu, với tỉ lệ sống sót sau 5 năm là 15% và giảm xuống còn 2% ở bệnh nhân có di căn [3]. Phương pháp điều trị duy nhất có khả năng chữa khỏi UTBMĐM là phẫu thuật cắt bỏ triệt để. UTBMĐM thường không có triệu chứng ở giai đoạn đầu, do vậy, tỉ lệ cao chẩn đoán xác định bệnh khi khối u tiến triển (tiến triển cục bộ/không thể cắt bỏ hoặc di căn) [4]. UTBMĐM có tỉ lệ tái phát cao trên những bệnh nhân phẫu thuật. Tỉ lệ sống sót sau 5 năm phẫu thuật cắt bỏ khối u chỉ đạt 20-40% (tùy thuộc vào vị trí khối u) [3].

Một số thử nghiệm lâm sàng đã đánh giá hiệu quả của các tác nhân phân tử cụ thể nhắm vào các mục tiêu tiềm năng khác nhau trong UTBMĐM, bao gồm thụ thể yếu tố tăng sinh biểu mô (EGFR) hoặc

thụ thể yếu tố tăng sinh nội mô mạch máu (VEGFR) [5]. Trong đó, CB5083 có thể là một hợp chất tiềm năng trong việc điều trị trúng đích ung thư, là một phân tử nhỏ được phát hiện qua quá trình sàng lọc chất ức chế p97, một protein quan trọng trong quá trình sửa chữa DNA [6]. Việc kìm hãm con đường sửa chữa DNA tổn thương có thể làm tăng khả năng gây chết tế bào ung thư, bởi vì nó làm tăng sự tích tụ các đột biến trong hệ gene của tế bào ung thư đang phân chia nhanh. Điều này dẫn đến hai khả năng: chu trình tế bào sẽ bị chặn lại tại các điểm kiểm soát; tế bào sẽ bị kích hoạt con đường chết theo chu trình [7]. Do vậy, ức chế con đường sửa chữa DNA có thể làm tăng khả năng kìm hãm sự sinh trưởng và kích thích sự chết của tế bào ung thư, đặc biệt, nó còn có thể được kết hợp để điều trị hóa trị hoặc xạ trị. Trong quá trình này, p97 (valosin-containing protein VCP hoặc cell division cycle protein 48 CDC48) là một protein đa chức năng thuộc họ AAA-ATPase tham gia vào quá trình

sửa chữa DNA phụ thuộc Ubiquitin [8]. P97 tạo phức hợp với Ataxin 3 (ATX3) deubiquitinase và E3 ubiquitin ligase RNF8 điều hòa cân bằng protein và sửa chữa DNA trong điều kiện bình thường. Tuy nhiên, trong tế bào ung thư, sự tăng về nồng độ RNF8 trong tế bào có liên hệ với sự mất ổn định của bộ gen, thúc đẩy sự tăng sinh, xâm lấn và di căn của tế bào ung thư. Đồng thời, sự bất hoạt của phức hệ p97-ATX3 làm tăng sự nhạy cảm của tế bào ung thư với xạ trị [9].

Với tiềm năng ức chế p97 của CB5083 trong điều trị ung thư thông qua việc kích hoạt quá trình sửa chữa DNA tổn thương. Chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm nghiên cứu tác dụng kích hoạt tế bào đường mật tăng sinh và di trú của CB5083 trên dòng tế bào ung thư biểu mô đường mật người TFK-1.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: dòng tế bào ung thư biểu mô đường mật TFK-1 (mã: ACC-344) được nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, trong môi trường 90% RPMI 1640 + 10% FBS.

- Vật liệu nghiên cứu: CB5083 (10 mM, Selleckchem) là một chất ức chế p97 sinh khả dụng bằng đường uống, bảo quản ở -30°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thử nghiệm WST-1 (đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào):

Tế bào TFK-1 được gieo trên đĩa 96 giếng với nồng độ 1000 tế bào/giếng trong 24 giờ, 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi, bảo đảm tế bào đã bám đáy, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường mới với các nồng độ CB5083 khác nhau, với dải nồng độ 0 μM, 0,125 μM, 0,250 μM, 0,500 μM trong 3 ngày tiếp theo. Sau đó, ủ với WST-1 trong 1 giờ và đo nồng độ quang ở mỗi giếng để xác định lượng tế bào sống ở mỗi nồng độ giữa các nhóm điều trị so với nhóm chứng (%) theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ sống} = \frac{A_t}{A_o} \times 100$$

Trong đó, A_t: mật độ quang của giếng điều trị;
A_o: mật độ quang của giếng đối chứng.

- Thử nghiệm Crystal violet:

Tỉ lệ tế bào sống sau khi đồng nuôi cấy với các nồng độ khác nhau của thuốc CB5083 được đánh giá bằng thử nghiệm Crystal violet. Tế bào TFK-1 được gieo trên đĩa 12 giếng với nồng độ 300 tế bào/giếng, ủ tại 37°C, 5% CO₂ trong vòng 24 giờ. Sau đó, mỗi giếng sẽ được tiếp xúc với các nồng độ CB5083 khác nhau (0,125 μM, 0,250

μM và 0,500 μM) và nhóm đối chứng. Theo dõi bằng kính hiển vi hàng ngày cho tới khi các cụm tế bào quan sát được bằng mắt thường (khoảng 7-8 ngày), tiến hành nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm Crystal Violet. Cuối cùng, chụp và xử lý hình ảnh bằng ImageJ và đồ thị dựa vào số lượng cụm tế bào và cường độ màu thuốc nhuộm (n = 3).

- Thử nghiệm đánh giá khả năng di trú tế bào:

Đánh giá khả năng di trú của tế bào TFK-1 khi đồng nuôi cấy với các nồng độ khác nhau của CB-5083 bằng cách tạo vết thương. Tế bào TFK-1 nuôi cấy trong đĩa 12 giếng với nồng độ 2,5 x 10⁵ tế bào/giếng, ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Khi mật độ tế bào trong các giếng đạt 80%, tạo một vết rạch ở giữa giếng bằng đầu pipet 200 μl, sau đó, ngay lập tức cho tế bào tiếp xúc với CB5083 chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau (0,125, 0,250 và 0,500 μM) và nhóm đối chứng. Hình ảnh các đĩa được chụp lại ở các mốc thời gian 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ sau khi cho thuốc thử. Diện tích của vùng tổn thương được xử lý bằng phần mềm ImageJ. Chỉ số di trú của tế bào được tính theo công thức:

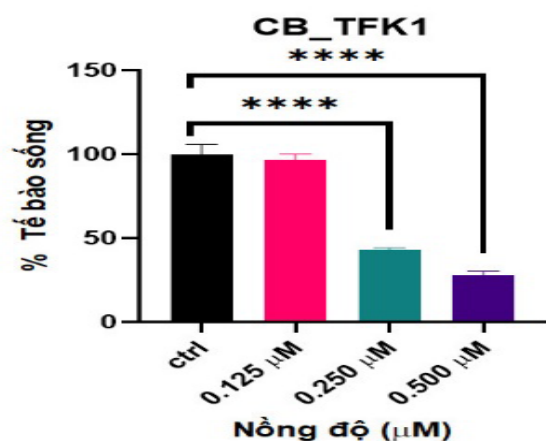
$$\text{Chỉ số di trú (\%)} = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

Trong đó, W_o: diện tích vết rạch tại thời điểm 0 giờ; W_t: diện tích vết rạch tại thời điểm t giờ

- Xử lý số liệu: xử lý hình ảnh bằng phần mềm ImageJ, số liệu gốc xử lý trên phần mềm Excel 2016, phân tích thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9 và vẽ đồ thị. Sử dụng phép kiểm định One-Way ANOVA để kiểm định sự khác nhau của giá trị trung bình khi so sánh nhiều hơn 2 nhóm. Khác biệt có ý nghĩa khi p < 0,05.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

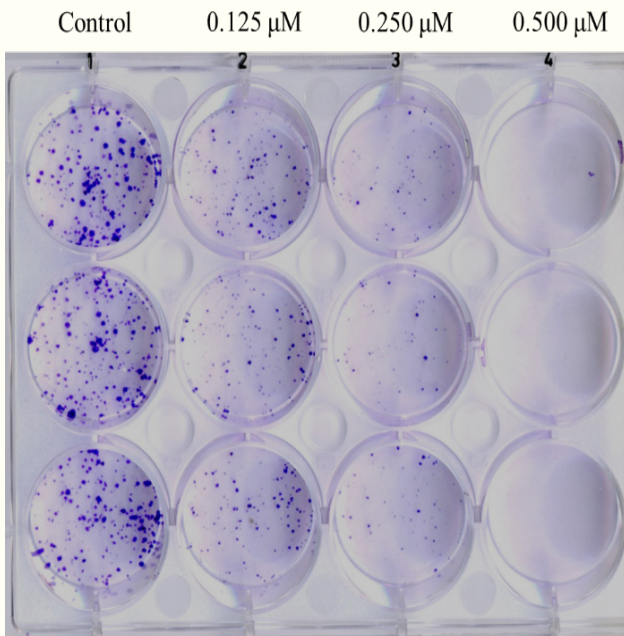
3.1. Kết quả ức chế tăng sinh của CB5083 trên tế bào ung thư đường mật bằng thử nghiệm WST-1



Hình 1. Tỉ lệ tế bào sống sau khi đồng nuôi cấy CB5083 trên dòng tế bào TFK-1.

Tế bào được gieo lên đĩa 96 giếng với nồng độ 1000 tế bào/giếng. Sau 72 giờ kể từ khi cho tế bào tiếp xúc với thuốc ở các nồng độ khác nhau, cơ chất WST-1 được thêm vào để đánh giá sự tăng sinh của tế bào. Sau 72 giờ cho tế bào đồng nuôi cấy với CB5083, tỉ lệ sống ở mỗi giếng có xu hướng giảm rõ rệt khi tăng nồng độ thuốc. Thuốc ở nồng độ 0,25 μM ức chế được khoảng 55% quần thể; ở nồng độ 0,5 μM , tỉ lệ tế bào sống thấp hơn hẳn, bị ức chế 75% quần thể (Hình 1).

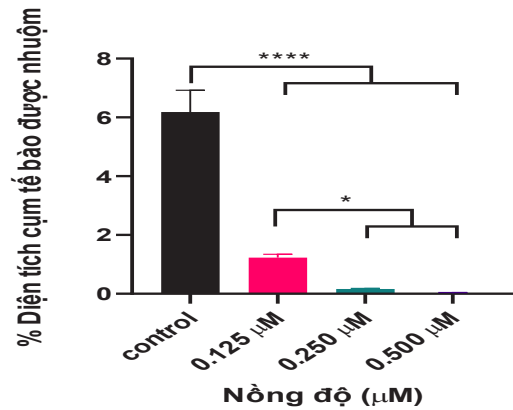
3.2. Kết quả thử nghiệm Crystal violet đánh giá



Hình 2. Hình ảnh cụm tế bào TFK-1 sau 7 ngày đồng nuôi cấy với các nồng độ khác nhau.

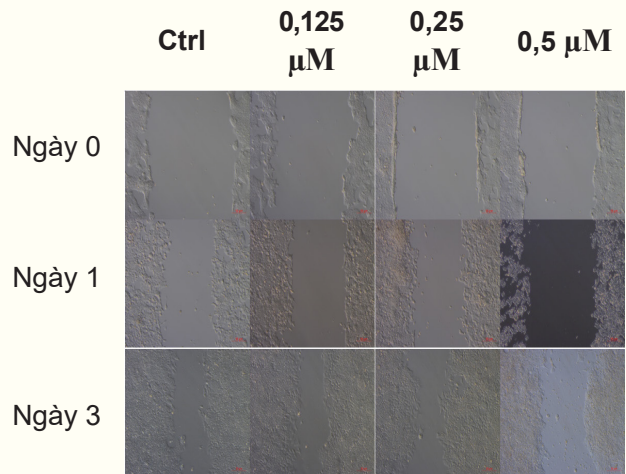
Tế bào được gieo lên đĩa 12 giếng với nồng độ 300 tế bào/giếng. Sau 7 ngày kể từ khi cho tế bào tiếp xúc với thuốc ở các nồng độ khác nhau, tế bào được nhuộm với crystal violet. Kết quả thí nghiệm Crystal violet (Hình 2 và 3) lần lượt cho thấy một cách trực quan qua thống kê mật độ và kích thước các cụm tế bào TFK-1 điều trị với thuốc CB5083 ở các nồng độ 0 μM , 0,125 μM , 0,250 μM và 0,500 μM .

Ở hình 2, sau 7 ngày điều trị, nhóm tiếp xúc với nồng độ thuốc CB5083 cao hơn có sự giảm rõ rệt số lượng các cụm tế bào và kích thước của chúng so với nhóm tiếp xúc với thuốc CB5083 ở nồng độ 0,125 μM và nhóm đối chứng ($p < 0,0001$). Có sự khác biệt giữa nhóm 0,125 μM và các nhóm 0,250 μM và 0,500 μM ($p < 0,05$). Điều này cho thấy, thuốc có khả năng ức chế, nhưng phụ thuộc nồng độ thuốc và sự tạo thành các cụm tế bào UTBMĐM.



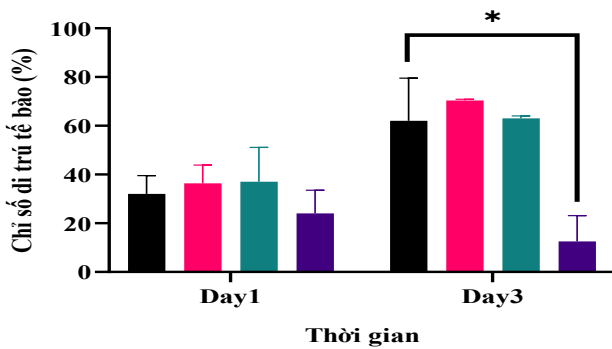
Hình 3. Kết quả thống kê diện tích các cụm tế bào sống được nhuộm màu sau khi điều trị với CB5083 ở các nồng độ khác nhau. (*: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$).

3.3. Kết quả đánh giá khả năng ức chế di trú tế bào của CB5083 trên tế bào TFK-1



Hình 4. Khả năng di trú tế bào TFK-1 bị giảm sau khi đồng nuôi cấy với CB5083 ở các nồng độ khác nhau.

Một đường rạch thẳng giữa giếng được tạo ra sau 48 giờ nuôi cấy (vùng rạch được quan sát tại khu vực trống nằm giữa hiển vi trường) và tế bào tiếp xúc với CB5083 ở các nồng độ khác nhau (hình ảnh ghi lại ở các thời điểm 0 ngày, 1 ngày, 3 ngày kể từ khi điều trị - hình 4). Hình ảnh mô tả trực quan sự liền lại của vết thương sau 1 và 3 ngày điều trị với thuốc thấy diện tích vùng rạch thu nhỏ lại sau 24 giờ và 72 giờ, với tốc độ liền lại nhanh hơn ở nhóm đối chứng và giảm dần khi tăng nồng độ thuốc từ 0,125 μM đến 0,500 μM . Dữ liệu sau đó được phân tích với kiểm định ANOVA, thu được biểu đồ như Hình 5.



Hình 5. Kết quả chỉ số di trú tế bào ở các nồng độ đồng nuôi cấy khác nhau.

- Kết quả thống kê chỉ số di trú tế bào (hình 5) cho thấy, nhóm tế bào đồng nuôi cấy ở nồng độ 0,500 μM có sự giảm rõ rệt (49,5%) so với nhóm đối chứng vào ngày thứ 3 ($p < 0,05$). Tuy nhiên, ở 2 nồng độ thấp hơn thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng.

- Có mối tương quan giữa nồng độ và thời gian đồng nuôi cấy tác động đến chỉ số di trú tế bào sau 1 và 3 ngày kể từ thời điểm tạo vết rạch (*: $p < 0,05$).

4. BÀN LUẬN

Cơ chế tác động của CB5083 lên sự kim hãm tăng sinh ung thư là ức chế p97, một protein quan trọng trong quá trình sửa chữa DNA tổn thương. Ức chế con đường này sẽ làm tế bào trở nên nhạy cảm hơn với tác động của một số loại thuốc điều trị ung thư khác có cơ chế gây đột biến DNA (như Salubrinal). Vì vậy, CB5083 có thể điều trị đồng thời với các loại thuốc trên để làm tăng hiệu quả gây đột biến ở các tế bào ung thư. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng CB5083 đã được sử dụng độc lập, có khả năng ức chế đáng kể sự sinh trưởng và phát triển các cụm tế bào ung thư trên dòng tế bào biểu mô đường mật TFK-1 *in vitro*. Đồng thời, sự di trú của tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm lành vết thương, một kỹ thuật được sử dụng để nghiên cứu sự di chuyển của tế bào và tương tác giữa các tế bào.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tại nồng độ 0,500 μM , chỉ số di trú tế bào giảm đáng kể sau 3 ngày. Bên cạnh đó, CB5083 ức chế sửa chữa DNA làm tăng tích tụ các đột biến có thể kim hãm chu kỳ tế bào tại pha G1, và điều này đã được chứng minh ở bệnh ung thư xương [6] including ubiquitin-proteasome system (UPS và ung thư buồng trứng [10]. Những kết quả này cho thấy rằng, các chất ức chế p97 gây ra sự bất giữ chu kỳ tế bào ở pha G1. Do đó, cần có thêm các thí nghiệm để kiểm tra tác động của CB5083 đối với chu kỳ tế bào, như đếm tế bào dòng chảy cần được thực hiện để xem sự thay đổi sự phân bố quần thể tế bào ở các pha trong chu kỳ tế bào sau khi điều trị với thuốc.

5. KẾT LUẬN

CB5083 ức chế đặc hiệu p97 (protein tham gia vào con đường sửa chữa tổn thương DNA), có tác dụng kim hãm tăng sinh (liều 0,125-0,500 μM) và di trú (liều 0,500 μM) của tế bào ung thư đường mật TFK-1 *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tyson G.L, El-Serag H.B (2011), "Risk factors for cholangiocarcinoma", *Hepatology*, 54(1), 173-184.
2. Yao K.J, Jabbour S, Parekh N, et al. (2016), "Increasing mortality in the United States from cholangiocarcinoma: an analysis of the National Center for Health Statistics Database", *BMC Gastroenterol*, 16, 117.
3. Doherty B, Nambudiri V.E, và Palmer W.C (2017), "Update on the Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma", *Curr Gastroenterol Rep*, 19(1), 2.
4. Adeva J, Sangro B, Salati M, et al. (2019), "Medical treatment for cholangiocarcinoma", *Liver International*, 39(S1), 123-142.
5. Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma | *British Journal of Cancer*. <<https://www.nature.com/articles/6604988>>, accessed: 23/04/2024.
6. Zhou H.J, Wang J, Yao B, et al. (2015), "Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083)", *J Med Chem*, 58(24), 9480-9497.
7. Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. (2008), "DNA repair pathways as targets for cancer therapy", *Nat Rev Cancer*, 8(3), 193-204.
8. Mosbech A, Gibbs-Seymour I, Kagias K, et al. (2012), "DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks", *Nat Struct Mol Biol*, 19(11), 1084-1092.
9. Singh A.N, Oehler J, Torrecilla I, et al. (2019), "The p97-Ataxin 3 complex regulates homeostasis of the DNA damage response E3 ubiquitin ligase RNF8", *The EMBO Journal*, 38(21), e102361.
10. Bastola P, Neums L, Schoenen F.J, et al. (2016), "VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal", *Mol Oncol*, 10(10), 1559-1574. □