

# Phân tách và nuôi cấy tế bào ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng thu nhận từ khối u của bệnh nhân

Huỳnh Vũ<sup>1</sup>, Hồ Hữu Đức<sup>2</sup>, Nguyễn Lê Xuân Trường<sup>1,3</sup>, Nguyễn Đăng Quân<sup>1\*</sup>

**Tóm tắt**—Ung thư đại trực tràng là một trong những dạng ung thư phổ biến và gây tử vong hàng đầu hiện nay. Biện pháp điều trị ung thư đại trực tràng chủ yếu là phẫu thuật, tuy nhiên hơn 50% bệnh nhân tái phát và chết vì ung thư di căn. Do vậy, nghiên cứu về cơ chế phân tử của bệnh từ đó phát triển các liệu pháp điều trị hữu hiệu hơn là rất cần thiết, trong đó mô hình tế bào ung thư là đối tượng nghiên cứu không thể thiếu. Tuy nhiên, các dòng tế bào ung thư sau thời gian dài nuôi cấy có thể không còn giữ được các đặc tính như trong cơ thể người bệnh làm ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Để giải quyết vấn đề trên, nghiên cứu được thực hiện nhằm thu nhận và nuôi cấy duy trì tế bào ung thư đại trực tràng sơ cấp từ bệnh nhân Việt Nam làm mô hình nghiên cứu bệnh. Các quần thể tế bào đơn được phân tách từ 40 mẫu mô ung thư đại trực tràng và được nuôi cấy sơ cấp. Có 4/40 mẫu quần thể tế bào ung thư được nuôi cấy thành công trong điều kiện *in vitro*. Các quần thể tế bào ung thư này đã được cấy ghép lên cơ thể chuột SCID suy giảm miễn dịch và đã có 2 quần thể tế bào phát triển thành khối u dị ghép. Tế bào đơn từ khối u dị ghép trên chuột được thu nhận và phân tích sự hiện diện của 2 marker bề mặt huCD133 và huEpcam bằng kỹ thuật flow cytometry. Quần thể tế bào ung thư sơ cấp của người từ khối u dị ghép trên chuột dương tính với marker huCD133 và huEpcam được xác định và thu nhận. Hai quần thể tế bào ung thư đại trực tràng này có thể phát triển tăng sinh mạnh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy tế

bào ung thư đại trực tràng sơ cấp của người có thể được duy trì và tăng sinh trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch để cung cấp nguồn tế bào ung thư cho nghiên cứu.

**Từ khóa**—Ung thư đại trực tràng, tế bào ung thư đại trực tràng sơ cấp, khối u dị ghép trên chuột, CD133, Epcam

## 1. MỞ ĐẦU

Ung thư đại trực tràng là một trong những dạng ung thư phổ biến nhất và gây tử vong hàng đầu hiện nay. Mỗi năm có gần 1 triệu bệnh nhân ung thư đại trực tràng mới được phát hiện và có khoảng 500 ngàn người chết vì bệnh này tại các nước công nghiệp phát triển. Sự phát triển của ung thư đại trực tràng có liên quan đến nhiều yếu tố như di truyền, môi trường sống và lối sống nhất là thói quen ăn uống [4, 8]. Tại Việt Nam, số người mắc mới ung thư một năm ước tính là 125.036 theo Globocan năm 2012 và 126,307 theo số liệu ước tính từ hệ thống ghi nhận ung thư từ 6 tỉnh, thành phố năm 2010. Dự báo vào năm 2020 sẽ có ít nhất 189.344 ca ung thư mắc mới. Trong số ca ung thư, nữ chiếm 43% và nam giới 57%. Bốn loại ung thư phổ biến nhất ở nam giới là ung thư gan, phổi, dạ dày và đại trực tràng, chiếm 66% tổng số ca ung thư mắc mới ở nam giới. Ở nữ giới, bốn loại phổ biến nhất là ung thư vú, phổi, gan, cổ tử cung, chiếm gần 50% tổng số ca ung thư mắc mới ở nữ. Tỷ lệ bệnh nhân ung thư đến khám và điều trị sớm còn thấp, năm 2009 một nghiên cứu tại 5 bệnh viện ung thư cho thấy 28,6% bệnh nhân thuộc tất cả các loại ung thư đến khám vào giai đoạn I và II. Chuyên biệt, 50,5% bệnh nhân ung thư vú, 46,0% bệnh nhân ung thư cổ tử cung, 32,2% bệnh nhân ung thư đại trực tràng đến khám bệnh ở giai đoạn sớm [5].

Bệnh ung thư đại trực tràng thường diễn tiến âm thầm không có các triệu chứng rõ ràng, xảy ra khi

*Ngày nhận bản thảo: 28-03-2017, ngày chấp nhận đăng: 25-07-2018, ngày đăng: 12-09-2018*

Tác giả: Huỳnh Vũ<sup>1</sup>, Hồ Hữu Đức<sup>2</sup>, Nguyễn Lê Xuân Trường<sup>1,3</sup>, Nguyễn Đăng Quân<sup>1\*</sup> - <sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp.HCM, <sup>2</sup>Bệnh viện Thống Nhất, <sup>3</sup>Trung tâm Y khoa Thành phố Hope, Duarte, California – Mỹ.

Email: quanng2009@gmail.com

có những tế bào bất thường phát triển ở niêm mạc đại tràng hay trực tràng tạo thành các polyp. Đa số polyp là lành tính tuy nhiên qua thời gian 1 số polyp có thể phát triển thành ung thư. Biện pháp chủ yếu hiện nay được sử dụng để điều trị ung thư đại trực tràng là phẫu thuật, tuy nhiên hơn 50% bệnh nhân tái phát sau phẫu thuật và chết vì ung thư di căn [1]. Do vậy, phát triển các phương pháp chẩn đoán sớm và các biện pháp điều trị hữu hiệu hơn với bệnh ung thư đại trực tràng là rất cần thiết để giảm thiểu tác hại của bệnh. Nghiên cứu về các con đường truyền tín hiệu và các protein có vai trò quan trọng với sự tăng sinh của tế bào ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng sẽ cung cấp nhiều hiểu biết hơn về sự tiến triển của bệnh và có thể cung cấp nhiều gợi ý quan trọng trong điều trị bệnh ung thư.

Để thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu nêu trên, tế bào ung thư đại trực tràng là đối tượng không thể thiếu. Hiện nay có nhiều dòng tế bào ung thư đại trực tràng được thiết lập và nuôi cấy ổn định lâu dài trên thế giới. Các dòng tế bào này sau thời gian dài nuôi cấy trong môi trường nhân tạo có thể không còn giữ được các đặc tính như tế bào ung thư trong cơ thể bệnh nhân. Sử dụng dòng tế bào ung thư này trong nghiên cứu sẽ dẫn đến những kết quả thiếu chính xác và gây khó khăn khi áp dụng kết quả nghiên cứu vào thực tế lâm sàng [3]. Do đó, rất cần thiết phải có tế bào ung thư đại trực tràng phân lập từ bệnh nhân và được nuôi cấy sơ cấp trong thời gian ngắn để làm đối tượng nghiên cứu. Tuy nhiên, nếu nguồn tế bào sơ cấp không được duy trì lâu trong điều kiện *in vitro* sẽ dẫn đến việc tế bào sử dụng trong các thử nghiệm ở các thời điểm khác nhau có nguồn gốc từ các bệnh nhân khác nhau. Điều này làm sai lệch kết quả nghiên cứu. Để giải quyết vấn đề này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu để duy trì và tăng sinh tế bào ung thư đại trực tràng sơ cấp từ bệnh nhân trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch để tạo nguồn cung cấp tế bào ung thư sơ cấp ổn định và lâu dài.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các mẫu mô bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu được sự cho phép của Hội đồng Y đức Bệnh viện Thống Nhất.

### Phương pháp

*Phương pháp phân tách và nuôi cấy tế bào ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng*

Tế bào ung thư được phân tách từ mẫu khối u bằng bộ kit phân lập tế bào ung thư (Panomics, Dumbarton Circle Fremont, CA, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. Mẫu khối u được loại bỏ các mô thừa, được cắt thành nhiều mảnh nhỏ và được rửa bằng đệm PBS có chứa kháng sinh peniciline/streptomycine. Chuyển mô sang một falcon sạch, cắt nhuyễn, bổ sung 20 mL PBS, ly tâm 1200 rpm 6 phút ở nhiệt độ phòng và loại bỏ dịch nổi. Huyền phù mô trong 10 mL Tumor Cell Digestion Solution và ủ ở 37°C trong 3 h, 10 phút lắc một lần để mô phân rã thành các tế bào đơn. Thêm 10 mL Tumor Cell Suspension Solution và trộn đều bằng pipet. Lọc qua lọc tế bào (cell strainer) kích thước 100  $\mu$ m. Thu huyền phù lọc trong falcon 50 mL. Ly tâm 1200 rpm trong 8 phút và loại bỏ dịch nổi. Huyền phù cặn tế bào trong 20 mL Tumor Cell Suspension Solution và trộn đều để thu được dịch đồng nhất. Chuẩn bị một falcon 50 mL chứa 20 mL Tumor Cell Purification Solution và ly tâm 1200 rpm trong 2 phút ở nhiệt độ phòng. Cần thận cho huyền phù tế bào lên trên lớp Tumor Cell Purification Solution bằng cách cho dịch huyền phù tế bào chảy dọc theo thành falcon. Để falcon thẳng đứng 6 phút ở nhiệt độ phòng. Cần thận đưa đầu tip xuống đáy falcon và hút 6 mL dịch chứa tế bào lắng và chuyển tế bào sang một falcon 50 mL khác. Ly tâm 1200 rpm trong 8 phút, loại dịch nổi, thu cặn tế bào. Huyền phù cặn tế bào trong 5 mL môi trường nuôi cấy chuyên biệt cho tế bào ung thư đại trực tràng (Human Colon Cancer stem cell culture medium, Celprogen, Torrance, CA, USA). Đếm mật độ tế bào và phân dịch huyền phù tế bào vào các giếng của đĩa 6 giếng phủ collagen. Ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 10% CO<sub>2</sub>.

*Phương pháp tạo khối u ở chuột từ tế bào ung thư của người*

Để lưu giữ và tăng sinh tế bào ung thư sơ cấp phân lập được từ khối u của người, tế bào ung thư được tiêm vào chuột SCID suy giảm miễn dịch để tạo khối u *in-vivo*. Tế bào ung thư đại trực tràng của người được nuôi cấy sơ cấp trong 2 tuần để đạt mật độ tế bào cần thiết trước khi được thu nhận dưới dạng tế bào đơn bằng dung dịch

Trypsin/EDTA.  $10^7$  tế bào được huyền phù trong dung dịch PBS vô trùng và được tiêm trực tiếp dưới da (subcutaneous injection) chuột SCID suy yếu miễn dịch (Charles River, Wilmington, MA, Mỹ). Mỗi quần thể tế bào ung thư đại trực tràng của người nuôi cấy sơ cấp được tiêm vào 2 con chuột SCID và đánh giá sự tạo thành khối u dị ghép. 8 tuần kể từ ngày tiêm tế bào ung thư vào chuột, khối u dưới da chuột tạo từ tế bào ung thư người được thu nhận. Khối u được cắt nhỏ, tế bào đơn từ khối u được thu nhận để sử dụng trong các thí nghiệm của đề tài. Bên cạnh đó, các mẫu mô cũng được lưu giữ trong nitrogen lỏng để sử dụng cho lần cấy ghép tiếp theo trên chuột SCID khi cần tăng sinh tế bào ung thư đại trực tràng của người. Quy trình chăm sóc và thao tác với chuột thí nghiệm được thực hiện phù hợp với các hướng dẫn, quy trình, quy định về y đức được chấp thuận bởi Viện chăm sóc và quản lý động vật thí nghiệm tại Đại học Stanford – Mỹ.

*Phương pháp FACS phân tách tế bào ung thư từ khối u ghép ở chuột*

Tế bào ung thư người từ khối u tạo ra trên cơ thể chuột SCID được thu nhận bằng cách phối hợp xử lý cơ học và sinh học. Khối u được rửa sạch trong dung dịch PBS, cắt nhuyễn và được ngâm trong dung dịch collagenase ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 h. Sau đó, hỗn dịch được huyền phù bằng pipette để giải phóng tế bào đơn từ khối u và tế bào đơn được lọc qua màng lọc strainer cell.

Tế bào đơn thu nhận được rửa 2 lần bằng PBS và rửa 1 lần bằng buffer cho phương pháp FACS (PBS có chứa 10% huyết thanh và 0,09% sodium azide). Sau đó, tế bào được nhuộm bằng cách ủ với  $10\mu\text{g}$  kháng thể kháng huCD133-FITC và huEpcam-PE (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ) trong  $200\mu\text{L}$  buffer ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Tế bào sau khi nhuộm với kháng thể sẽ được phân tích và sàng lọc qua máy Flow Cytometry (BD, Franklin Lakes, NJ, Mỹ). Quần thể tế bào dương tính với cả 2 marker hCD133 và hEpcam được thu nhận và nuôi cấy. Đây là các tế bào ung thư (CD133+) dạng biểu mô (Epcam+) của người mọc thành khối u ở chuột suy giảm miễn dịch.

*Phương pháp xác định đường cong tăng trưởng tế bào ung thư*

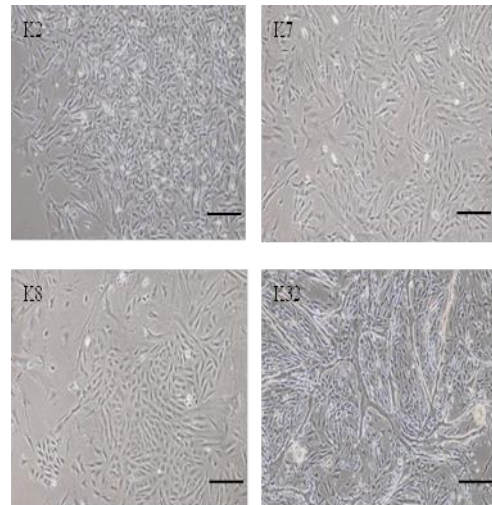
$2 \times 10^4$  tế bào từ mẫu khối u dị ghép dương tính với CD133 và Epcam được thu nhận và nuôi cấy

bằng môi trường DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, Mỹ) 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO, Mỹ) trong các đĩa 6 giếng. Sau mỗi 24 h nuôi cấy, tế bào trong 1 giếng được tách bằng trypsin-EDTA và mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp đếm tế bào trong buồng đếm. Thời gian khảo sát dừng lại sau 96 h nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được xử lý xác suất thống kê bằng phương pháp STDEV.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Phân tách và nuôi cấy sơ cấp tế bào ung thư từ khối u đại trực tràng của người

40 mẫu mô ung thư được phân tách tế bào theo quy trình nêu ở mục phương pháp và nuôi cấy sơ cấp trong môi trường nuôi tế bào gốc ung thư ruột của người (hãng Celprogen) sử dụng đĩa 6 giếng có phủ collagen. Kết quả đã có bốn mẫu K2, K7, K8 và K32 được nuôi cấy sơ cấp thành công. Một số hình ảnh đại diện của các quần thể tế bào mà chúng tôi đã nuôi cấy được thể hiện qua hình 1.



**Hình 1.** Các quần thể tế bào phân tách từ các mẫu mô ung thư đại trực tràng (thang kích thước: 200  $\mu\text{m}$ )

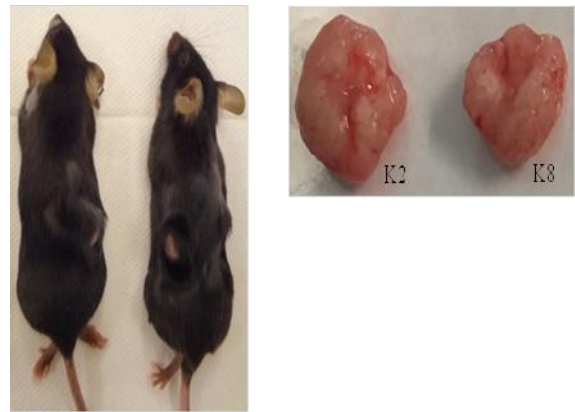
Tỷ lệ nuôi cấy sơ cấp thành công tế bào phân tách từ khối đại trực tràng của nghiên cứu này không cao, 10% số mẫu tế bào phát triển được trong nuôi cấy. Nuôi cấy sơ cấp tế bào ung thư đại trực tràng là một vấn đề khó có thể do các nguyên nhân sau: 1) Đặc thù của mô ruột là môi trường có nhiều vi sinh vật, nên việc nhiễm khuẩn trong nuôi cấy tế bào sơ cấp rất dễ xảy ra và khó kiểm soát; 2)

Để giảm thiểu sự nhiễm khuẩn và nấm trong nuôi cấy, khối mô ung thư và tế bào được rửa tích cực và xử lý với nhiều loại kháng sinh ở nồng độ cao, điều này làm suy yếu tế bào ung thư làm chúng không phát triển được trong môi trường nuôi cấy; 3) Tế bào ung thư đại trực tràng cần rất nhiều vi chất bao gồm các chất kích thích tăng trưởng và điều hoà (growth factor và cytokines) để có thể phát triển, nếu tế bào ung thư thu nhận được không thuộc loại tăng trưởng mạnh sẽ khó phát triển trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo. Môi trường nuôi cấy nhân tạo có thể không cung cấp đầy đủ các thành phần cần thiết như môi trường tự nhiên trong cơ thể. Điều này phần nào được thể hiện qua kết quả nghiên cứu của Dangles-Marie và cộng sự năm 2007, nhóm nghiên cứu công bố rằng 77% (20/26) số mẫu mô ung thư đại trực tràng cấy ghép trên chuột nude phát triển thành khối u, trong khi chỉ có 9,7% (3/31) số mẫu mô ung thư nuôi cấy thành công trong điều kiện *in vitro* [2]. Tỷ lệ thành công trong nuôi cấy sơ cấp tế bào phân tách từ khối u đại trực tràng của chúng tôi tương đương với nghiên cứu của Dangles-Marie và cộng sự [2].

### Tạo khối u dị ghép tế bào ung thư đại trực tràng trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch

Để duy trì tế bào ung thư sơ cấp của người mà không phải nuôi cấy lâu dài trong điều kiện *in vitro* chúng tôi thực hiện cấy ghép tế bào ung thư lên chuột SCID suy giảm miễn dịch. Bốn quần thể tế bào ung thư K2, K7, K8 và K32 được nuôi cấy tăng sinh và thu nhận tế bào đơn.  $10^7$  tế bào của mỗi quần thể được huyền phù trong dung dịch PBS vô trùng và được tiêm trực tiếp dưới da (subcutaneous injection) chuột SCID để các tế bào này hình thành khối u trong cơ thể chuột. Các tế bào ung thư đại trực tràng của người sẽ dựa vào sự nuôi dưỡng của hệ thống *in vivo* trong cơ thể chuột để phát triển thành khối u và sinh trưởng trên giá thể này. Trong 4 quần thể tế bào ung thư cấy ghép vào chuột SCID, 2 chuột được sử dụng ở mỗi nhóm, 2 quần thể K2 và K8 đã phát triển thành khối u trong cơ thể của cả 4 chuột được cấy ghép. Ngược lại, 2 quần thể tế bào K7 và K32 không tạo thành khối u ở các con chuột được cấy ghép. Sau khi khối u phát triển được 8 tuần, chúng tôi tiến hành giải phẫu chuột thu khối u. Hình 2 là hình ảnh chuột SCID suy giảm miễn dịch mang khối u từ tế bào ung thư trực tràng của người (xenograft)

và hình ảnh khối u được phân tách khỏi cơ thể chuột.



**Hình 2.** Chuột suy yếu miễn dịch mang khối u phát triển từ tế bào ung thư đại trực tràng của người và khối u K2 và K8 thu nhận từ chuột

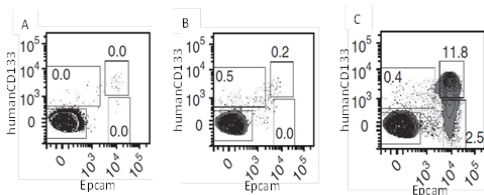
Khối u do quần thể tế bào K2 và K8 phát triển trên cơ thể chuột SCID được thu nhận, rửa sạch trong PBS và được cắt ra thành những mảnh nhỏ có kích thước từ 1–2 mm và lưu giữ trong môi trường huyết thanh FCS 10% DMSO trong nitrogene lỏng để bảo quản nguồn tế bào ung thư phục vụ các bước thí nghiệm tiếp theo. Mặt khác, các mẫu mô từ khối u trên chuột được phân tách bằng phương pháp tách cơ học phối hợp với xử lý bằng dung dịch collagenase để thu nhận các tế bào đơn.

### Phân tách tế bào ung thư của người từ khối u trên cơ thể chuột

Để xác định và phân tách tế bào ung thư đại trực tràng của người trong khối u dị ghép phát triển trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch chúng tôi nhuộm tế bào với kháng thể kháng huCD133 và huEpcam và phân tách bằng kỹ thuật FACS. Epcam (epithelial cell adhesion molecule) là phân tử protein bám dính biểu hiện trên bề mặt tế bào biểu mô, phân tử này biểu hiện ở cả tế bào bình thường và tế bào ung thư. Epcam được chứng minh là biểu hiện mạnh hơn ở tế bào ung thư so với tế bào biểu mô bình thường và sự biểu hiện mạnh của Epcam có liên quan với sức sống và sự tăng sinh của tế bào ung thư có nguồn gốc biểu mô [9, 7]. CD133 đã được xác định là một marker bề mặt của nhiều loại tế bào gốc ung thư khác nhau trong đó có tế bào gốc ung thư đại trực tràng [6]. Như vậy, quần thể tế bào dương tính với 2 marker này là các tế

bào ung thư có nguồn gốc biểu mô của người phát triển trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch.

Kết quả phân tích FACS cho thấy trong hỗn hợp tế bào phân tách từ khối u dị ghép trên chuột có quần thể tế bào biểu hiện đồng thời CD133 và Epcam của người (Hình 3C). Đây là các tế bào có nguồn gốc từ tế bào ung thư của người tiêm vào chuột vì mẫu tế bào chuột nhuộm với 2 kháng thể trên không cho tín hiệu dương tính (Hình 3B). Tỷ lệ tế bào dương tính với huCD133 và huEpcam trong quần thể tế bào phân tách từ khối u dị ghép K2 và K8 trên chuột SCID là tương đương nhau khoảng 11,8 – 12%. Điều này bước đầu cho thấy 2 quần thể tế bào ung thư K2 và K8 có đặc điểm tương tự nhau.



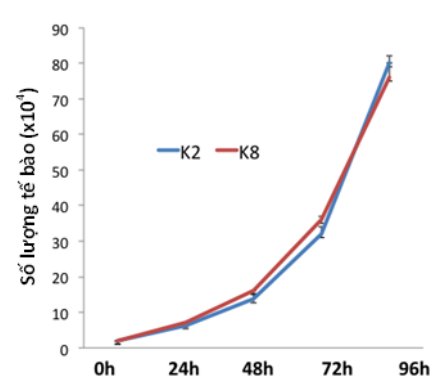
**Hình 3.** Kết quả Flow cytometry phân lập tế bào ung thư người từ khối u trong cơ thể chuột suy yếu miễn dịch. (A) đối chứng tế bào ung thư phân tách từ khối u không nhuộm kháng thể; (B) đối chứng tế bào ruột của chuột nhuộm với kháng thể kháng huCD133 và huEpcam; (C) tế bào ung thư phân tách từ khối u nhuộm với kháng thể kháng huCD133 và huEpcam

Như vậy nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc phân lập, bảo quản và nuôi cấy sơ cấp tế bào ung thư có nguồn gốc từ khối u đại trực tràng của bệnh nhân trên cơ thể chuột suy giảm miễn dịch.

#### Khảo sát sự tăng sinh trong nuôi cấy của tế bào ung thư đại trực tràng phân tách từ khối u dị ghép

Hai quần thể tế bào ung thư đại trực tràng K2 và K8 sau khi được phân tách từ khối u dị ghép trên chuột đã được khảo sát đánh giá khả năng tăng sinh trong nuôi cấy *in vitro*.

Đường cong tăng trưởng của tế bào ung thư K2 và K8 được xác định như theo phương pháp đã được mô tả ở trên. Kết quả khảo sát cho thấy tế bào ung thư tăng trưởng khoẻ mạnh. Dựa vào lượng tế bào ở thời điểm 0h và 96 h, chúng tôi xác định được thời gian nhân đôi của tế bào ung thư trung bình là 18 h. Đến 96 h nuôi cấy, tế bào vẫn đảm bảo mức độ tăng sinh mạnh và chưa đi vào giai đoạn suy tàn (Hình 4). Đây là tế bào ung thư đại trực tràng nuôi cấy sơ cấp phù hợp để ứng dụng trong nghiên cứu.



**Hình 4.** Biểu đồ đường cong tăng trưởng của quần thể tế bào ung thư K2 và K8 phân lập từ mô ung thư đại trực tràng của người

#### 4. KẾT LUẬN

Bốn quần thể tế bào ung thư từ mô ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng của bệnh nhân đã được phân tách và nuôi cấy thành công. Trong 4 quần thể này, 2 quần thể tế bào ung thư được duy trì bằng cách tạo thành khối u *in vivo* trong cơ thể chuột suy giảm miễn dịch. Các đặc điểm của quần thể tế bào ung thư đại trực tràng phân lập đã được xác định bao gồm hình thái tế bào, đường cong tăng trưởng trong nuôi cấy, sự hiện diện của marker ung thư CD133 và marker tế bào biểu mô Epcam. Như vậy, tế bào ung thư đại trực tràng của người có thể duy trì nuôi cấy sơ cấp trên cơ thể chuột phối hợp với nuôi cấy *in vitro*.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện bằng nguồn kinh phí được cung cấp bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D.A. Bastos, S.C. Ribeiro, D. de Freitas, P.M. Hoff. Combination therapy in high-risk stage II or stage III colon cancer: current practice and future prospects. *Ther Adv Med Oncol*, 2, 4, 261–72, 2010.
- [2]. V. Dangles-Marie, M. Pocard, S. Richon, L.B. Weiswald, F. Assayag, P. Saulnier, J.G. Judde, J.L. Janneau, N. Auger, P. Validire, B. Dutrillaux, F. Praz, D. Bellet, M.F. Poupon. Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line Features. *Cancer Res*, 67, 1, 398–407, 2007.
- [3]. J.P. Gillet, S. Varma, M.M. Gottesman, The Clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst.*, 105, 7, 452–458, 2013.
- [4]. M.R. Harshman, W. Aldoori. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. *Can Fam Physician*, 53, 1913–1920, 2007.



- [5]. N.T. K. Tiển, P.L. Tuấn, N.H. Long, T.V. Tiển, S. Bales. Báo cáo chung tổng quan ngành y tế năm 2014: Tăng cường dự phòng và kiểm soát bệnh không lây nhiễm. Nhà xuất bản Y học, tháng 3, 2015.
- [6]. F. Ren, WQ. Sheng, X Du. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 19, 17, 2603–2611, 2013.
- [7]. G. Spizzo, D. Fong, M. Wurm, C. Ensinger, P. Obrist, C. Hofer, G. Mazzoleni, G. Gastl, and P. Went. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* 64, 5, 415–420, 2011.
- [8]. N.K. Thakral, A.R. Ray, D. Bar-Shalom, A.H. Eriksson, D.K. Majumdar. The quest for targeted delivery in colon cancer: mucoadhesive valdecoxib microspheres. *Int J Nanomedicine*, 6:1057–68, 2011.
- [9]. M. Trzpis, P.M.J. McLaughlin, L.M.F.H. de Leij, M.C. Harmsen. Epithelial cell adhesion molecule more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J. Pathol.* 171, 2, 386–395, 2007.

# Separating and culturing colorectal adenocarcinoma cancer cells derived from patients' tumor

Huynh Vu<sup>1</sup>, Ho Huu Duc<sup>2</sup>, Nguyen Le Xuan Truong<sup>1,3</sup>, Nguyen Dang Quan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, <sup>2</sup>Thong Nhat Hospital, <sup>3</sup>City of Hope Medical Center – Duarte – California – USA  
Corresponding author: quanng2009@gmail.com

Received: 28-03-2017, Accepted: 25-07-2017, Published: 12-09-2018

**Abstract**—Colorectal cancer is one of the most prevalent cancers and a leading cause of death nowadays. The main method to treat colorectal cancer is the surgery. However, more than 50 % of patients relapse after surgery and die from metastatic cancer. Therefore, it is important to do research on the molecular mechanism of this disease and consequently develop effective therapies. In these studies, the colorectal cancer cell is the indispensable research model. However, cancer cell lines lose the oncogenic characteristics after prolonged culture compared to those in the body of patients. To solve this problem, the study is aimed to obtain, to primarily culture, and to maintain the colorectal cancer cells from Vietnamese patients serving as cancer research model. Colorectal cancer cells were separated from 40 tumor samples and primarily cultured *in vitro*. 4 of 40 populations of cancer cells were cultured successfully. These cell populations

were grafted into immuno-deficient SCID mice and 2 cell populations developed to xenograft tumors on mice. Then single cell suspensions from xenograft tumors were collected and analyzed the expression of surface markers huCD133 and huEpcam using flow cytometry. The human primary cancer cells from xenograft tumors positive with huCD133 and huEpcam were identified and isolated. These 2 colorectal cancer cell populations could proliferate well in *in-vitro* culture condition. In conclusion, the results showed that the human colorectal cancer primary cells could be maintained and proliferated in immuno-deficient mice which will be a source to supply the cancer cells for the study of cancer.

**Index Terms**—Colorectal cancer, primary colorectal cancer cells, xenograft tumour on mice, CD133, Epcam