

Hiệu quả ức chế các đặc tính ung thư của PLX4720 trên dòng tế bào melanoma A375M.

Nguyễn Đình Thăng*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 7 tháng 4 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 5 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 6 năm 2016

Tóm tắt: Đột biến BRAF^{V600E} do gốc aspartic acid bị thay thế bởi gốc valine xuất hiện rất thường xuyên (trên 60%) trong các trường hợp ung thư tế bào hắc sắc tố - melanoma. Vì vậy BRAF được xem như là một trong những phân tử đích phục vụ cho nghiên cứu cơ chế phát sinh melanoma cũng như phát triển thuốc. Gần đây, nhiều loại thuốc đã được sản xuất và thử nghiệm với mục đích là điều hòa biểu hiện bất thường của phân tử BRAF. Trong số này PLX4720 là một trong số các loại thuốc mới nhất được thử nghiệm và đem lại một số tín hiệu lạc quan trong việc điều trị. Tuy nhiên vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về tác dụng của chúng trên các dòng tế bào melanoma khác nhau. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung khảo sát khả năng ức chế các đặc tính ung thư của PLX4720 trên dòng tế bào melanoma A375M. Kết quả nghiên cứu cho thấy PLX4720 có khả năng ức chế mạnh sự tăng sinh, khả năng hình thành khối u và khả năng di căn của dòng tế bào này.

Keywords: Ung thư tế bào hắc tố, A375M, BRAF, PLX4720.

1. Giới thiệu

Ung thư hắc sắc tố (melanoma) mặc dù chỉ chiếm tỉ lệ khoảng 10% nhưng nó là nguyên nhân gây ra tới hơn 80% trường hợp bệnh nhân tử vong do ung thư da [1, 2]. Ở Việt Nam, theo số liệu thống kê của Viện da liễu Quốc gia thì cách đây hơn 10 năm không có nhiều trường hợp bệnh nhân mắc phải bệnh này, tuy nhiên, từ năm 2007 đến nay số lượng bệnh nhân đã và đang tăng lên rất nhanh. Ở Mỹ, số liệu thống kê năm 2010 cho thấy có mỗi năm có khoảng 69.000 trường hợp bệnh nhân ung thư hắc sắc tố ở giai đoạn di căn, và gần 50.000 trường hợp ở những giai đoạn sớm được phát hiện [3, 4].

Với thực tế như vậy nhưng vì những khó khăn trong việc nghiên cứu cơ chế di căn của tế bào mà cho đến nay vẫn chưa có loại thuốc nào thực sự có hiệu quả cho việc điều trị [3 -5].

Các kết quả nghiên cứu ở mức độ phân tử trên thế giới trong những năm gần đây đã phát hiện ra sự biểu hiện bất thường của một số phân tử đóng vai trò quyết định trong việc phát sinh và phát triển ung thư da. Đột biến BRAF^{V600E} do gốc aspartic acid bị thay thế bởi gốc valine xuất hiện rất thường xuyên (trên 60%) trong các trường hợp ung thư melanoma [6, 7]. Vì vậy BRAF được xem như là một trong những phân tử đích phục vụ cho nghiên cứu cơ chế phát sinh của melanoma cũng như phát triển thuốc [6, 7].

Từ những kết quả thực nghiệm này, một số thuốc điều trị đã được sản xuất và được thử

*ĐT.: 84-1228214176

Email: ndthang@hus.edu.vn

nghiệm với mục đích là điều hòa biểu hiện của các phân tử có biểu hiện bất thường đó. Trong số này PLX4302 là một trong những loại thuốc mới nhất được thử nghiệm. PLX4302 có khả năng ức chế sự đột biến của phân tử B-Raf, và đem lại một số tín hiệu lạc quan trong việc điều trị ung thư tế bào hắc sắc tố - melanoma. Các kết quả thí nghiệm trong điều trị melanoma ở mức độ *invitro* và *invivo* và đều cho kết quả rất khả quan [8, 9]. Gần đây, sau nhiều năm nghiên cứu và thử nghiệm, PLX4302 đã được FDA (Mỹ, 2011) và Health (Canada, 2012) chứng nhận có thể sử dụng trong lâm sàng để điều trị bệnh nhân melanoma có mang đột biến B-RAF^{V600E} giai đoạn cuối [10, 11]. Gần đây, một dạng đồng phân khác của PLX4302 là PLX4720, (có tên theo IUPAC là: N-(3-(5-chloro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-3-carbonyl)-2,4-difluorophenyl)propane-1-sulfonamide), cũng đang được thử nghiệm. Các kết quả ban đầu cũng cho thấy PLX4720 cũng có tác dụng khá tương tự như PLX4302 [12, 13].

Tuy nhiên để có thể được sử dụng rộng rãi hơn hay sử dụng kết hợp với PLX4302 cần có nhiều thí nghiệm *invitro* trên nhiều dòng tế bào khác nhau nhằm đánh giá chính xác khả năng của dạng đồng phân này. Vì thực tế cho thấy hiệu quả điều trị của bất kỳ loại thuốc nào cũng phụ thuộc rất nhiều không chỉ vào dạng ung thư mà còn vào loại tế bào ung thư đích. Trong trường hợp ung thư melanoma cũng không có ngoại lệ. Vì vậy nghiên cứu tác dụng của thuốc lên từng loại tế bào cụ thể cũng góp phần quan trọng trong việc đánh giá đúng mức hiệu quả của một loại thuốc nào đó và xa hơn là tìm ra những phân tử đích khác nhau nhằm tăng cao khả năng điều trị bệnh. Đã có những nghiên cứu về hiệu quả tác dụng của PLX4720 lên các dòng tế bào melanoma như WM35, WM146, WM1205Lu [12 - 14]..., tuy nhiên vẫn chưa có nghiên cứu nào về tác dụng của nó lên dòng tế bào A375M. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung khảo sát tác dụng ức chế một số đặc tính ung thư của PLX4720 trên dòng tế bào melanoma A375M.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nuôi cấy tế bào: Phương pháp nuôi cấy dựa theo phương pháp nuôi cấy được mô tả trong bài báo của Thang ND và cộng sự [15]. Tế bào ung thư hắc sắc tố A375M nhận được từ phòng thí nghiệm y sinh, khoa Khoa học sự sống, trường Đại học Chubu, Nhật bản. Tế bào được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco's ModiWed Eagle's Medium) chứa 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % penicillin/Streptomycin, và ủ ở nhiệt độ 37 °C trong tủ ôn nhiệt có cung cấp 5 % CO₂.

2.2. Thí nghiệm khảo sát sự tăng sinh của tế bào: Phương pháp thí nghiệm dựa theo phương pháp đã được mô tả trong bài báo của Yajima và cộng sự [16]. Tế bào được nuôi cấy trên đĩa-6-giếng trong 24 giờ. Sau đó dung dịch thuốc (5µM) được thêm vào môi trường nuôi cấy và tế bào tiếp tục được nuôi cấy trong 72 giờ. Tiếp theo tế bào được xử lý với dung dịch formalin 10% trong 1 giờ và nhuộm màu bằng dung dịch tím tinh thể (CV) 0.1 % trong 1 giờ. Sau đó tế bào đã được nhuộm tím tinh thể được hòa tan trong dung dịch sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.1% và tiến hành đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595nm bằng máy so màu UV-VIS.

3.3. Thí nghiệm kiểm tra năng lực hình thành cụm tế bào của tế bào (cụm tế bào formation assay): Sau khi tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ trong môi trường có chứa hoặc không chứa thuốc, lấy ra 2.5×10^4 tế bào cho vào 2ml môi trường DMEM chứa 0.36 % agarose (dung dịch agarose mềm). Đổ nhẹ nhàng hỗn hợp agarose này lên bề mặt agar cứng. (Agar cứng được tạo ra bằng cách hòa tan agar vào trong môi trường DMEM để có nồng độ agar 0.72%, dung dịch này sẽ đông cứng lại ở nhiệt độ 37°C). Tiếp theo tế bào được nuôi trong 3 tuần. Sau đó các cụm tế bào hình thành trên bề mặt phân cách agar-agarose và trong agarose sẽ được đếm dưới kính hiển vi.

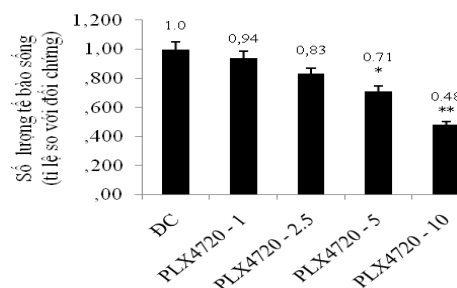
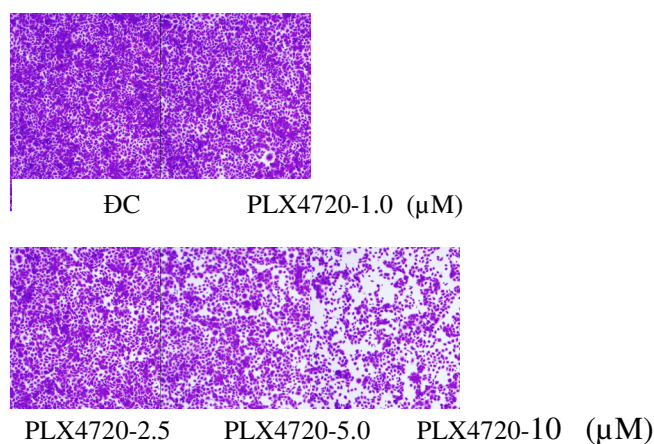
2.3. Thí nghiệm khảo sát tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào: Phương pháp thí nghiệm dựa theo phương pháp đã được mô tả trong bài báo của Jiang và cộng sự [18]. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM 10% FBS

với sự có hoặc không có mặt của thuốc (5 μ M) trên đĩa-6-giếng cho tới khi số lượng tế bào sản sinh ra bao phủ toàn bộ bề mặt đĩa. Dùng đầu tip của pipet vạch lên trên bề mặt đĩa một đường ngăn cách, tiếp tục nuôi tế bào trong 22 giờ tiếp theo. Tiến hành đo khoảng cách mà tế bào đã di chuyển xâm lấn.

2.4. Thí nghiệm khảo sát khả năng di căn xâm lấn của tế bào: Phương pháp thí nghiệm dựa theo phương pháp đã được mô tả trong bài báo của Thang ND và cộng sự [17]. Sau 10 giờ nuôi cấy trong môi trường DMEM thiếu dưỡng chất (chỉ chứa 0.5% FBS), tế bào được chuyển sang nuôi trong môi trường DMEM chứa 10% FBS với sự có hoặc không có mặt của thuốc (5 μ M) và tiếp tục được nuôi trong 72 giờ. Lấy 2x10⁵ tế bào có trong 300 μ L môi trường DMEM chứa 0.5% FBS rồi cho vào giếng Boyden (khoảng trên) với kích thước lỗ đáy giếng là 8 μ m (đáy giếng được phủ một lớp một lớp mỏng matrigel). Sau đó giếng Boyden được đặt vào đĩa-24-giếng (khoảng dưới), mỗi

giếng chứa 600 μ l môi trường DMEM 0.5% FBS có thêm các yếu tố phát triển. Hệ Boyden này được ủ trong tủ ổn nhiệt 37°C trong vòng 12 giờ. Sau đó các tế bào di chuyển qua lỗ giếng Boyden và xuấn hiện ở mặt phía dưới của giếng sẽ được nhuộm màu bằng hematoxylin-eosin hoặc bằng tinh thể tím và đếm số lượng dưới kính hiển vi.

3.5. Thí nghiệm khảo sát khả năng hình thành khối u của tế bào: Phương pháp này nhằm đánh giá khả năng phát triển khối u của tế bào invitro, và được mô tả chi tiết trong bài báo của Thang ND và cộng sự [17]. Sau khi tế bào được nuôi trong môi trường RPMI trong 24 giờ có hoặc không có mặt của thuốc (5 μ M), lấy ra 2.5x10⁴ tế bào và trộn với 2 ml dung dịch agar mềm 0.36% trong môi trường RPMI. Đổ nhẹ lên bề mặt của agar cứng (chứa 0.72% agar trong môi trường RPMI) và tiếp tục nuôi cấy trong vòng 3 tuần. Các khối tế bào được hình thành có đường kính lớn hơn 50 μ m sẽ được đếm dưới kính hiển vi soi ngược.



Hình 1. Ảnh hưởng độc tính của PLX4720 lên tế bào ung thư A375M.

* và **, khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$ và 0.01) so với đối chứng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. PLX4720 gây độc tế bào ung thư A375M.

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư A375M của PLX4720 ở các nồng độ khác nhau, từ 1.0, 2.5, 5.0 và 10.0 μ M. Kết quả ở hình 1 cho thấy rõ sự

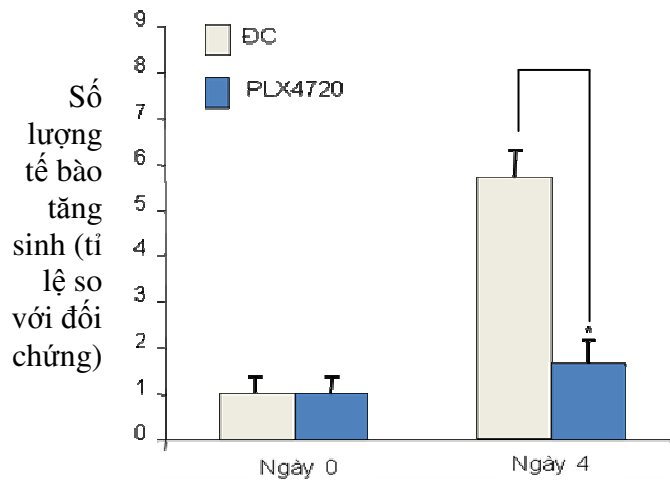
ảnh hưởng của PLX4720 lên sự chết của tế bào phụ thuộc vào nồng độ sử dụng. Ở nồng độ 10.0 μ M, PLX4720 có khả năng gây chết 50% tế bào sau 24h. Ở các nồng độ thấp hơn độc tính của PLX4720 cũng thấp hơn, ở nồng độ 1 μ M hầu như không ảnh hưởng, ở nồng độ 5 μ M có sự ảnh hưởng rõ. Dựa vào kết quả thí nghiệm này,

chúng tôi chọn PLX4720 ở nồng độ $5\mu\text{M}$ cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

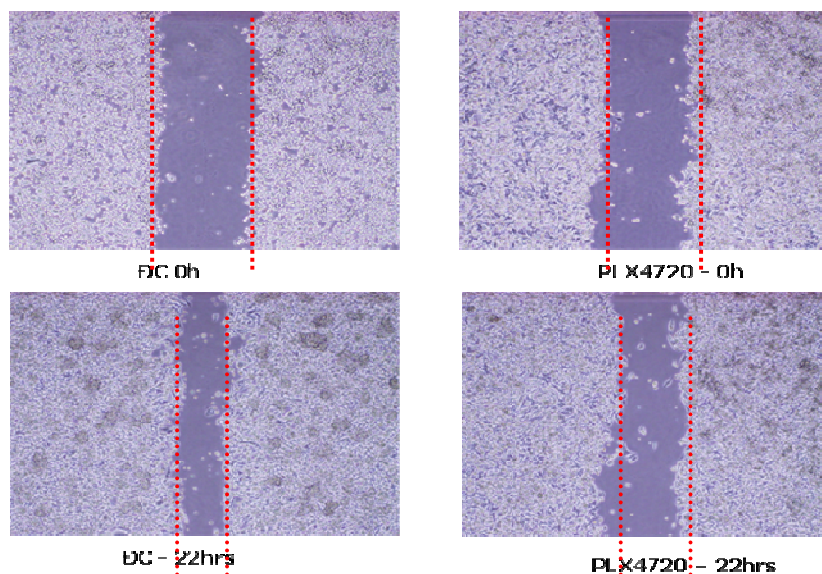
3.2. PLX4720 ức chế khả năng tăng sinh của tế bào ung thư A375M.

Kết quả khảo sát sự tăng sinh của tế bào A375M được trình bày ở trong hình 2. Sau 4 ngày nuôi cấy, số lượng tế bào tăng lên gấp 5.92 lần đối với trường hợp đối chứng, trong

khí đó đối với trường hợp tế bào được nuôi cấy trong môi trường có sự hiện diện của $5\mu\text{M}$ PLX4720, số lượng tế bào chỉ tăng lên 1.88 lần. Xử lý thông kê số liệu cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong sự tăng sinh của tế bào giữa trường hợp đối chứng và trường hợp có xử lý bằng PLX4720. Các kết quả này cho thấy PLX4720 có khả năng ức chế mạnh sự tăng sinh của tế bào ung thư A375M.



Hình 2. PLX4720 ức chế khả năng tăng sinh của tế bào melanoma A375M.
*, khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$) so với đối chứng.



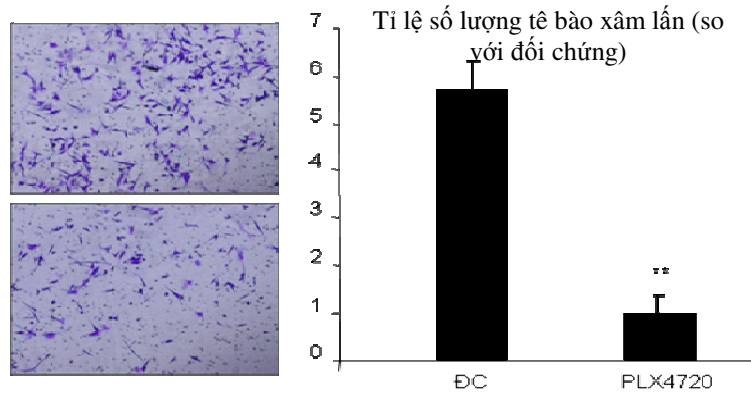
Hình 3. Tác động của PLX4720 lên tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào A375M.

3.3. PLX4720 làm giảm tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào ung thư A375M.

Tiếp theo chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của PLX4720 lên tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào. Kết quả khảo sát được biểu diễn như trong hình 3. Phân tích kết quả cho thấy sau 22h, PLX4720 làm giảm tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào A375M khoảng 1,7 lần. Xử lý thống kê số liệu cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong tốc độ di chuyển xâm lấn của tế bào đối chứng và tế bào được xử lý trong môi trường có PLX4720. Các kết quả này cho thấy PLX4720 có khả năng ức chế mạnh sự di căn của tế bào ung thư.

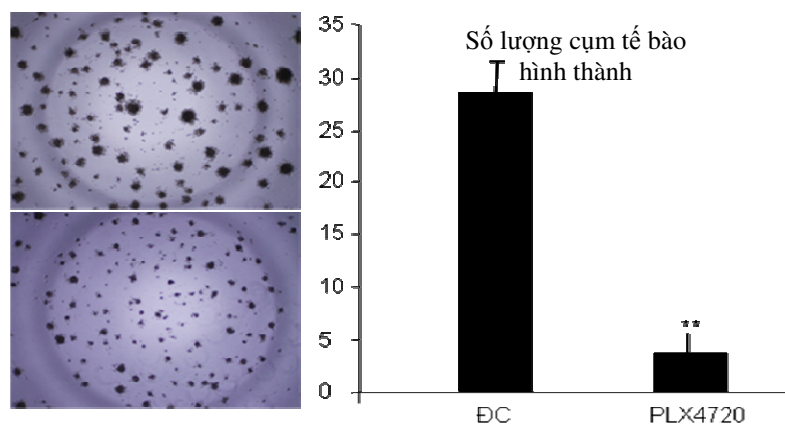
3.4. PLX4720 ức chế di căn của tế bào thông qua ức chế khả năng di chuyển xâm lấn.

Tiếp đến chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của PLX4720 lên khả năng di chuyển xâm lấn của tế bào. Kết quả thí nghiệm được trình bày như ở trong hình 4 cho thấy PLX4720 làm giảm khả năng di chuyển xâm lấn của tế bào A375M 5.7 lần. Như chúng ta đã biết, khả năng di chuyển xâm lấn của tế bào là một trong những đặc tính quan trọng nhất của tế bào thể hiện khả năng di căn của ung thư [19 - 21]. Với kết quả đạt được chứng tỏ rằng PLX4720 có tác dụng rất lớn trong việc ức chế hoặc làm chậm sự phát triển của ung thư trong các giai đoạn cuối.



Hình 4. Ảnh hưởng của PLX4720 lên khả năng di chuyển xâm lấn của tế bào A375M.

** , khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.01$) so với đối chứng.



Hình 5. Ảnh hưởng của PLX4720 lên khả năng hình thành khối u *in-vitro* của tế bào A375M.

** , khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.01$) so với đối chứng.

3.5. PLX4720 ức chế khả năng tạo cụm tế bào của tế bào ung thư A375M.

Cùng với khả năng di chuyển xâm lấn, khả năng hình thành khối u cũng là một đặc tính rất quan trọng khác của ung thư di căn [19 – 21]. Khi các tế bào ung thư theo dòng máu tới các mô cơ quan cách xa mô khởi phát, thì khả năng hình thành cụm tế bào giúp chúng tạo thành những khối u thứ phát.

Vì vậy chúng tôi cũng tiến đã tiến hành khảo sát hiệu quả ức chế khả năng hình thành cụm tế bào của tế bào ung thư A375M, các cụm tế bào có kích thước lớn hơn 100 μ m được đếm dưới kính hiển vi. Kết quả thí nghiệm được trình bày như trong hình 5 cho thấy PLX4720 làm giảm khả năng hình thành cụm tế bào của tế bào A375M 6.88 lần. Phân tích thống kê số liệu cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về khả năng hình thành cụm tế bào của tế bào A375M.

4. Kết luận

Ung thư di căn là nguyên nhân dẫn tới tử vong của bệnh nhân. Khả năng di chuyển xâm lấn và khả năng hình thành khối u của tế bào là những đặc tính quan trọng nhất trong việc đánh giá khả năng di căn của tế bào ung thư [19 – 21]. Các kết quả thí nghiệm *invitro* cho thấy PLX4720 có nhiều đặc tính giống như dạng đồng phân của nó là PLX4302 trong việc ức chế các đặc tính ung thư của tế bào. Dưới tác dụng của thuốc PLX4720 có thể sẽ làm cho tế bào ung thư A375M trải qua những biến đổi trong hệ gene, làm kích hoạt hay ức chế các con đường truyền tín hiệu nội-ngoại bào [12, 13], sự thay đổi về mức độ biểu hiện của các phân tử liên quan và kết quả là dẫn tới sự suy yếu khả năng di căn của tế bào thông qua sự làm giảm khả năng di chuyển xâm lấn, khả năng hình thành khối u cũng như khả năng tăng sinh của tế bào [19 – 21]. Với những kết quả đạt được cho thấy có sự phù hợp với một số kết quả nghiên cứu của các nhóm nghiên cứu khác trên thế giới [8, 9, 13, 14] và điều này cho phép chúng tôi tiếp tục đặt ra những mục tiêu nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của PLX4720 này trên khả

năng điều trị không chỉ riêng ung thư da dạng melanoma mà đối với các loại ung thư khác trong tương lai.

Lời cảm ơn

Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài mã số TN-13-21 của trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hussein MR. Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas: emerging clues. *J Clin Pathol.* 2005; 58:453–456.
- [2] Kato M, Kumasaka YM, Takeda K, Iida M, et al. L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. *Toxicol In Vitro.* 2011; 25: 623–629.
- [3] Kato M, Ohgami N, et al. Protective effect of hyperpigmented skin on UV-mediated cutaneous cancer development. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1244–1249.
- [4] Yajima I, Kumasaka M, Thang ND, Yanagishita T, Kallenberg D, et al. Zinc finger protein 28 as a novel melanoma-related molecule. *J Dermatol Sci.* 2009; 55(1):68-70.
- [5] Kumasaka YM, Yajima I, et al. A novel mouse model for de novo melanoma. *Cancer Res.* 2010;70:24–29.
- [6] Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010; 468(7326):973-977.
- [7] Flaherty K. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *ASCO Annual Meeting Abstract, J Clin Oncol.* 2009; 27:15s.
- [8] Smalley KS. PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010; 11(6):699-706.
- [9] Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.* 2008; 6(5): 751–759.

- [10] FDA Approves Zelboraf (Vemurafenib) and Companion Diagnostic for BRAF Mutation-Positive Metastatic Melanoma, a Deadly Form of Skin Cancer. Genentech. 2011; Retrieved 2011-08-17.
- [11] Notice of Decision for ZELBORAF, 2012.
- [12] Shao Y, Aplin AE. BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ.* 2012; 19(12):2029-2039.
- [13] Basile KJ, et al. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene.* 2012; 31(19):2471-2479.
- [14] Nucera C, Nehsa MA, et al. Targeting BRAFV600E with PLX4720 Displays Potent Antimigratory and Anti-invasive Activity in Preclinical Models of Human Thyroid Cancer. *The Oncologist.* 2011; 16(3): 296-309.
- [15] Thang ND, Yajima I, Tsuzuki T, Watanabe D, Kato M. et al. A Novel Hairless Mouse Model for Malignant Melanoma. *J. Dermatol. Sci.* 2012; 65: 207–212.
- [16] Yajima I, Uemura N, Thang ND, Kato M, et al. Barium inhibits arsenic-mediated cell death in human squamous carcinoma cells. *Arch Toxicol.* 2012; 86(6):961-73.
- [17] Thang ND, Yajima I, Watanabe D, Kato M, et al. Barium Promotes Anchorage-Independent Growth and Invasion of Human HaCaT Keratinocytes via Activation of c-SRC Kinase. *PloS ONE.* 2011; 6(10): e25636.
- [18] Jiang XP, Zhang DX, Teng M, Zhang Q, Zhang JP, Huang YS. Downregulation of CD9 in keratinocyte contributes to cell migration via upregulation of matrix metalloproteinase-9. *PLoS One.* 2013; 8(10):e77806. doi: 10.1371/journal.pone.0077806.
- [19] Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblow DN, Nelson JA, et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol.* 2003; 160: 753-767.
- [20] Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia.* 2005; 7: 824–837.
- [21] Takino T, Tsuge H, Ozawa T, Sato H. MT1-MMP promotes cell growth and ERK activation through c-Src and paxillin in three-dimensional collagen matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396: 1042–1047.

Study the Inhibition Effect of PLX4720 on Metastatic Ability of Melanoma A375M Cell Line

Nguyen Dinh Thang

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Abstract: BRAF^{V600E} mutation is due to the fact that the aspartic acid residue is replaced by the valine residue and it appears very frequently (over 60%) in the case of melanoma, an aggressive skin cancer type. Therefore, BRAF is considered as one of the potential target molecule for studying of mechanism of melanoma progression and drug development. Recently, many drugs have been produced and tried in regulating of abnormal expression of BRAF^{V600E} molecule in melanoma. Among these, PLX4720, one of newest drugs, has been studied and showed some optimistic signals in treatment of BRAF-mutation-related melanoma. However, this is still a very limit study focusing on effects of this drug on different melanoma cell lines. Thus, in this research, we have concentrated in investigating of the effects of PLX4720 in cancer characteristics of A375M melanoma cell lines. Our results showed that PLX4720 is capable of strongly inhibiting the proliferation, of forming tumor and of having metastasis of this cell line.

Từ khóa: Ung thư tế bào hắc tố, A375M, BRAF, PLX4720.