

TRẦN THỊ HƯƠNG GIANG

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hương Giang

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA TẾ BÀO GỐC MỠ LÊN KHẢ
NĂNG HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN UNG THƯ VÚ THÔNG
QUA BIẾN ĐỘNG CỦA MỘT SỐ CYTOKINE TRÊN MÔ HÌNH
CHUỘT**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC**

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hương Giang

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA TẾ BÀO GỐC MỠ LÊN KHẢ NĂNG
HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN UNG THƯ VÚ THÔNG QUA BIẾN
ĐỘNG CỦA MỘT SỐ CYTOKINE TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 842 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. TS. Nguyễn Văn Hạnh

2. TS. Lê Thọ Sơn

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 17 tháng 04 năm 2023

Học viên

Trần Thị Hương Giang

LỜI CẢM ƠN

Với tất cả tấm lòng, em xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới **TS. Nguyễn Văn Hạnh** - Trưởng phòng Phòng Công nghệ Phôi, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, **TS. Lê Thọ Sơn** - Giảng viên trường đại học Lâm nghiệp, là những người thầy đã dành cho em những ý tưởng quý báu, cũng như sự hướng dẫn tận tình, tạo mọi điều kiện thuận lợi và động viên em trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị trong Phòng Công nghệ Phôi, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ nhiệt tình và đóng góp những ý kiến quý báu cũng như tận tình chỉ dạy, tạo điều kiện giúp đỡ em thực hiện luận văn này.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban giám đốc, các thầy giáo, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện, hướng dẫn, truyền đạt cho em rất nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những người thân trong gia đình và những người bạn thân thiết đã luôn bên cạnh, động viên và khích lệ em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT..... | i |
| DANH MỤC HÌNH ẢNH | iii |
| DANH MỤC BẢNG..... | iv |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| 1. Mục đích của đề tài (kết quả cần đạt được) | 3 |
| 2. Nội dung chi tiết của đề cương luận văn thạc sĩ | 3 |
| Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 4 |
| 1.1. TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ VÚ | 4 |
| 1.1.1. Ung thư vú ở người | 4 |
| 1.1.2. Dòng tế bào ung thư vú chuột: 4T1 | 4 |
| 1.2. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ | 5 |
| 1.2.1. Tế bào gốc trung mô..... | 5 |
| 1.2.2. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ..... | 8 |
| 1.2.3. Tiềm năng biệt hoá của tế bào gốc mỡ | 10 |
| 1.2.5. Mối liên hệ giữa tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (AMC) và tế bào ung thư vú (BCC)..... | 11 |
| 1.3. TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ CYTOKINE | 14 |
| Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 17 |
| 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU..... | 17 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 17 |
| 2.2.1. Phân lập và đánh giá tế bào gốc trung mô từ mô mỡ chuột..... | 17 |
| 2.2.1.1. Phân lập tế bào | 17 |
| 2.2.1.2. Biệt hoá tế bào | 18 |
| 2.2.1.3. Phân tích tế bào học dòng chảy..... | 18 |
| 2.2.2. Phương pháp tiêm tế bào..... | 19 |
| 2.2.3. Phương pháp thu mẫu máu | 19 |
| 2.2.4. Phương pháp định lượng các cytokine bằng hạt bead | 20 |

| | |
|---|----|
| 2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu..... | 20 |
| Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 21 |
| 3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC MỠ CHUỘT..... | 21 |
| 3.2. KẾT QUẢ THEO DÕI MỨC ĐỘ TĂNG TRỌNG VÀ TỈ LỆ SÓNG SỐT CỦA CHUỘT THÍ NGHIỆM SAU TIÊM TẾ BÀO | 28 |
| 3.3. KẾT QUẢ THEO DÕI HÌNH THÀNH KHỐI U | 30 |
| 3.4. ĐỊNH LƯỢNG CYTOKINE | 33 |
| 3.4.1. Xác định đường chuẩn giữa các phép đo | 33 |
| 3.4.2. Hàm lượng IL-2 trong huyết thanh | 35 |
| 3.4.5. Hàm lượng IL-17A trong huyết thanh | 36 |
| 3.4.6. Hàm lượng IL-6 trong huyết thanh | 37 |
| 3.4.7. Hàm lượng IL-10 trong huyết thanh | 38 |
| 3.4.8. Hàm lượng IL-4 trong huyết thanh | 39 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 41 |
| KẾT LUẬN | 41 |
| KIẾN NGHỊ | 41 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | 42 |
| PHỤ LỤC | 53 |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

| Các chữ viết tắt | Tên đầy đủ | Tên tiếng Việt |
|------------------|--|--|
| AMC | Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell | Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ |
| BCC | Breast cancer cells | Tế bào ung thư vú |
| BM-MSC | Bone marrow-derived MSCs | MSC có nguồn gốc từ tủy xương |
| cDNA | Complementary DNA | DNA bổ sung |
| CSC | Cancer stem cell | Tế bào gốc ung thư vú |
| CXCL5 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 | Chemokine (mô-đun CXC) phối tử 5 |
| CXCL6 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 | Chemokine (mô-đun CXC) phối tử 6 |
| CXCL7 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 7 | Chemokine (mô-đun CXC) phối tử 7 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | Dimethyl sulfoxide |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Axit | Ethylene Diamine Tetraacetic Axit |
| FBS | Fetal Bovine Serum | Huyết thanh thai bò |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor | Yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt - đại thực bào |
| IFN- γ | Interferon- γ | Interferon- γ |
| IL | Interleukin | Interleukin |

| | | |
|---------------|---|---|
| IL-1Ra | Interleukin 1 receptor antagonist | Chất đối kháng thụ thể interleukin 1 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | Nước muối đệm phosphate |
| RNA | Ribonucleic acid | Ribonucleic acid |
| RT-PCR | Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction | Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase phiên mã ngược |
| TNF- α | Tumor necrosis factor α | Yếu tố hoại tử khối u α |
| TME | Tumor microenvironment | Vi môi trường khối u |

DANH MỤC HÌNH ẢNH

| | |
|---|----|
| Hình 1.1. Đặc điểm của MSC | 7 |
| Hình 1.2. MSC- Tương tác tế bào miễn dịch..... | 13 |
| Hình 3.1. Quá trình thu mẫu mô mỡ | 21 |
| Hình 3.2. Hình thái của các AMC được phân lập trong quá trình nuôi cấy ... | 22 |
| Hình 3.3. Tế bào AMC sau 2 ngày ở lần cấy chuyển 4 | 23 |
| Hình 3.4. Tốc độ tăng trưởng của tế bào AMC trong 7 ngày | 24 |
| Hình 3.5. Biểu thị các dấu hiệu bề mặt của tế bào sau khi phân lập..... | 25 |
| Hình 3.6. Biểu thị các dấu hiệu bề mặt của tế bào sau giai đoạn cấy chuyển 2 | 27 |
| Hình 3.7. Tế bào AMC biệt hóa thành mỡ..... | 27 |
| Hình 3.8. Tế bào AMC biệt hóa thành xương..... | 28 |
| Hình 3.9. Hình ảnh khối u chuột tiêm tế bào 4T1..... | 31 |
| Hình 3.10. Hình ảnh chuột không có khối u | 32 |
| Hình 3.11. Đường chuẩn cho IL-6 | 33 |
| Hình 3.12. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-2 trong huyết thanh (pg/ml) | 35 |
| Hình 3.13. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-17A trong huyết thanh (pg/ml) .. | 36 |
| Hình 3.14. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-6 trong huyết thanh (pg/ml) | 37 |
| Hình 3.15. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-10 trong huyết thanh (pg/ml) | 39 |
| Hình 3.16. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-4 trong huyết thanh (pg/ml) | 40 |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 3.1. Phân tích tế bào học dòng chảy của tế bào phân lập từ mô mỡ | 26 |
| Bảng 3.2. Tốc độ tăng trọng của chuột thí nghiệm và tỉ lệ chuột sống/chết ở từng lô thí nghiệm | 29 |
| Bảng 3.3. Kết quả tạo khối u tuyến vú ở chuột thí nghiệm | 32 |
| Bảng 3.4. Kết quả xây dựng đường chuẩn IL-6..... | 34 |

MỞ ĐẦU

Trong ung thư vú, sự tăng sinh tế bào không kiểm soát được dẫn đến hình thành khối u. Sự liên kết giữa các yếu tố nội bào trong tất cả các hệ thống ở động vật có xương sống được thực hiện qua yếu tố trung gian là các cytokine, là những protein bài tiết, cảm ứng, được sản xuất không chỉ bởi các tế bào của hệ thống miễn dịch mà còn bởi các tế bào nội tiết và hệ thần kinh [1]. Loại và số lượng tế bào miễn dịch có trong vi môi trường khối u vú cũng có thể dự đoán kết quả bệnh hoặc cơ hội sống sót cho bệnh nhân ung thư vú [2]. Theo đó, tần suất tế bào miễn dịch thấp hơn đã được chứng minh là có tương quan với bệnh ít nguy cơ hơn và kết quả điều trị tốt hơn ở bệnh nhân ung thư vú và ngược lại. Một tập hợp các tế bào miễn dịch góp phần tác động vào sự di căn ở ung thư vú bằng cách tiết ra các cytokine giúp ngăn chặn các phản ứng miễn dịch, làm tăng yếu tố trao đổi giữa tế bào nội mô-trung mô và kích thích sự hình thành mạch tương ứng [3]. Vai trò của các cytokine cũng như các thụ thể của chúng được tạo ra trong các sinh vật trong các điều kiện sinh lý và bệnh lý càng trở nên rõ ràng. Trong đó vai trò của chúng được xác định có liên quan mật thiết đến sự di căn của ung thư vú [4]. Những thông tin liên quan đến sự biến động của các cytokine được xem xét với mục đích phát triển các phương pháp điều trị mới để chống lại sự di căn của ung thư vú [4].

Trong mô mỡ có thể được chia thành ba loại tế bào chuyên biệt chính: tế bào mỡ trưởng thành, tế bào tiền bào và tế bào gốc có nguồn gốc từ mỡ (AMC). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng có một loại tế bào mỡ đặc biệt tồn tại xung quanh của ung thư vú xâm lấn [5]. Mặt khác, tế bào mỡ và tế bào gốc mô mỡ là những thành phần chính của mô đệm mô vú có các chức năng thiết yếu ở cả trạng thái sinh lý và bệnh lý, bao gồm dự trữ năng lượng và cân bằng nội mô chuyển hóa, kiểm soát các phản ứng viêm và chữa lành vết thương thông qua các yếu tố tiết [6]. AMC và tế bào mỡ có vai trò quan trọng trong sự tiến triển của ung thư; tuy nhiên, do bản chất đa tiềm năng của những tế bào này, chúng cũng có vai trò trong y học tái tạo, khiến chúng trở thành những công cụ đầy hứa hẹn cho kỹ thuật mô. Trong nghiên cứu này sẽ mô tả các cơ chế điều chỉnh AMC và tế bào ung thư thông qua tương tác giữa các tế bào miễn dịch và các loại tế bào khác có trong vi môi trường khối u. AMC là một thành phần quan trọng trong môi trường vi mô khối u ung thư vú và

thông qua tương tác của chúng với hệ thống miễn dịch và đóng vai trò không thể thiếu trong quá trình hình thành khối u, phát triển khối u và di căn [7]. AMC thể hiện khả năng điều hòa miễn dịch và thúc đẩy quá trình chữa lành và tái tạo vết thương trong môi trường điều tiết nội mô. AMC tiết ra nhiều loại interleukin, bao gồm IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 và IL-12 [8].

Gần đây, liệu pháp tế bào gốc được đánh giá là một trong những giải pháp mang lại hy vọng nhất cho bệnh nhân ung thư vú. Việc cấy ghép tế bào gốc được đánh giá là không chỉ giúp ích trong giai đoạn điều trị mà còn có thể tái tạo mô vú cho mục đích thẩm mỹ. Để có nguồn tế bào gốc để cấy ghép, việc phân lập tế bào gốc tự thân được coi là giải pháp tối ưu nhất trong hướng nghiên cứu này. Tuy nhiên, các tế bào gốc mỡ từ những bệnh nhân bị ung thư vú có tiềm năng như thế nào cho đến nay vẫn chưa được công bố. Sử dụng tế bào gốc mô mỡ và một số loại tế bào gốc khác trong việc nghiên cứu cơ chế phân tử của một số bệnh trên người [9], cũng như qua việc tham khảo tài liệu, các công trình nghiên cứu liên quan đến tiểu môi trường ung thư vú, tế bào mỡ, tế bào gốc ung thư vú (CSC), tế bào gốc mỡ và tế bào ung thư vú nhằm cập nhật kiến thức và làm nền tảng cơ sở để định hướng cho nghiên cứu này.

Một số bằng chứng chỉ ra rằng sự di căn của khối u là qua trung gian của tế bào gốc ung thư, chính những tế bào này có thể liên quan trực tiếp đến tái phát sau xạ trị và hóa trị [10]. Trong khi, một hệ thống phân cấp tế bào được hình thành bởi các quần thể AMC và CSC trong đó các CSC ở vú được điều chỉnh bởi các AMC thể hiện aldehyde dehydrogenase thông qua các vòng cytokine bao gồm CXCL 7 và IL-6 [11]. Khi tương tác xảy ra giữa IL-6 do CSC tiết ra và IL-6R/gp130 biểu hiện trên AMC. Đổi lại, sự bài tiết của một số cytokine, bao gồm IL-8, IL-6, CXCL5 và CXCL6, từ cả AMC và CSC được gây ra bởi CXCL7 [11]. Nó được chỉ ra rằng các đặc tính xâm lấn và sự tăng sinh của CSC được thúc đẩy bởi các cytokine này, và IL-6 thúc đẩy AMC di chuyển đến các vị trí khối u trong các mô hình xenograft chuột [12]. Nghiên cứu nuôi cấy trong ống nghiệm của CSC mô phỏng tác động của AMC lên CSC với BMP2, cho thấy trong khi sự phát triển của khối u được kích thích trong cơ thể và *in vitro* AMC đã bị ức chế một phần sau khi con đường tín hiệu BMP2 bị ức chế. Do vậy, việc tế bào AMC kích thích hay ức chế sự hình thành và phát triển khối u vẫn còn là vấn đề gây tranh cãi [13].

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu tác động của tế bào gốc mỡ lên khả năng hình thành và phát triển ung thư vú thông qua biến động của một số cytokine trên mô hình chuột”**, để đánh giá tác động của tế bào gốc mỡ lên quá trình hình thành khối u vú trên mô hình chuột cấy ghép tế bào 4T1 thông qua đánh giá biến động của các cytokine Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-17A (IL-17A), và Interleukin-10 (IL-10).

1. Mục đích của đề tài (kết quả cần đạt được)

Phân tích và đánh giá được sự ảnh hưởng của tế bào gốc mỡ lên sự hình thành và phát triển khối u trên mô hình chuột thí nghiệm.

2. Nội dung chi tiết của đề cương luận văn thạc sĩ

- Nội dung 1: Phân lập, nhân nuôi và đánh giá tế bào AMC từ mô mỡ chuột khoẻ mạnh.
- Nội dung 2: Đánh giá khả năng hình thành khối u ở chuột có tiêm tế bào 4T1 và chuột tiêm tế bào 4T1 cùng tế bào AMC phân lập từ mô mỡ chuột khoẻ mạnh. Định lượng nồng độ và đánh giá biến động của một số cytokine trong máu chuột.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ VÚ

1.1.1. Ung thư vú ở người

Theo thống kê của Tổ chức Ung thư toàn cầu (GLOBOCAN 2020), ở Việt Nam, ung thư vú là một căn bệnh ung thư phổ biến nhất với 21.555 ca mắc mới, chiếm tỷ lệ gần 25,8% trên tổng số ca ung thư và phần lớn bệnh nhân mắc ung thư vú tại Việt Nam được ghi nhận nhiều ở phụ nữ từ 40 tuổi, điều này có nghĩa là sớm hơn 10 năm so với các nước trên thế giới. Ung thư vú ảnh hưởng đến hơn 2,1 triệu phụ nữ trên toàn thế giới mỗi năm và thường được phát hiện ở giai đoạn muộn nên khoảng 85% trong số này sẽ không qua khỏi [14]. Vì vậy, những hiểu biết về các yếu tố thúc đẩy di căn ung thư vú và các yếu tố liên quan là rất quan trọng trong việc phát triển các chiến lược điều trị mới chống lại căn bệnh này. Trong bệnh ung thư vú, các chức năng của vi môi trường khối u (TME) được điều phối bởi các tế bào chuyên biệt thông qua các phản ứng dịch thể [15]. Cấu trúc khối u chứa nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào mỡ, tế bào ung thư, tế bào liên kết... và giữa chúng có mối tác động qua lại, ảnh hưởng lẫn nhau. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong vi môi trường ung thư vú, tế bào mỡ có vai trò là nguồn cung cấp năng lượng (fatty acid, glycerol) cho sự phát triển của tế bào ung thư. Giữa tế bào mỡ và tế bào ung thư có sự tương tác qua lại thông qua các cytokines (adiponectin, IL-6, TNF α ...), hormones (estrogen, insulin, IGF-1...). Việc xác định tác động của tế bào ung thư lên tế bào gốc mỡ và ngược lại sẽ góp phần tìm ra các chỉ thị phân tử (marker) tiềm năng mới phục vụ cho công tác chẩn đoán ung thư vú, đồng thời các đích phân tử tìm được sẽ mở ra cơ hội cho công tác điều trị ung thư vú hiệu quả hơn [16].

1.1.2. Dòng tế bào ung thư vú chuột: 4T1

Ung thư biểu mô tuyến vú 4T1 của chuột ban đầu được phân lập dưới dạng tiểu quần thể 410.4 bắt nguồn từ khối u tuyến vú phát sinh tự phát ở chuột BALB/cF3H. Nó là dòng tế bào khối u có thể dễ dàng được cấy ghép vào tuyến vú để khối u nguyên phát phát triển ở vị trí chính xác về mặt giải phẫu bên cạnh đó là khả năng xâm lấn cao [17]. Khối u 4T1 kháng 6-thioguanine di căn qua đường tạo máu đến gan, phổi, xương và não, làm cho

nó trở thành một mô hình tốt về ung thư vú di căn ở người [17]. Ngoài ra, người ta còn mô tả rằng dòng tế bào này có khả năng sinh miễn dịch kém ở chuột, điều này tương ứng với các đặc điểm của ung thư biểu mô tuyến vú ở người và dẫn đến khả năng sinh khối u cao hơn và khả năng xâm lấn của mô hình ung thư vú này [18].

Để hiểu được cơ chế bệnh sinh của bệnh nhân ung thư, cần phải có các hệ thống mô hình mô phỏng một cách trung thực tình trạng này. Việc áp dụng một dòng tế bào ung thư chuột, chẳng hạn như 4T1, trong mô hình chuột có giá trị lớn đối với các nghiên cứu mô hình bệnh ung thư vú thể ba âm tính (triple-negative breast cancer) tiền lâm sàng. Dòng tế bào 4T1 được sử dụng rộng rãi như một mô hình chung cho bệnh ung thư vú thể ba âm tính ở người (thiếu thụ thể estrogen/thụ thể progesterone và không tạo ra protein HER2), là nguyên nhân gây ra hơn 17 % ca ung thư vú được chẩn đoán trên toàn thế giới mỗi năm [18].

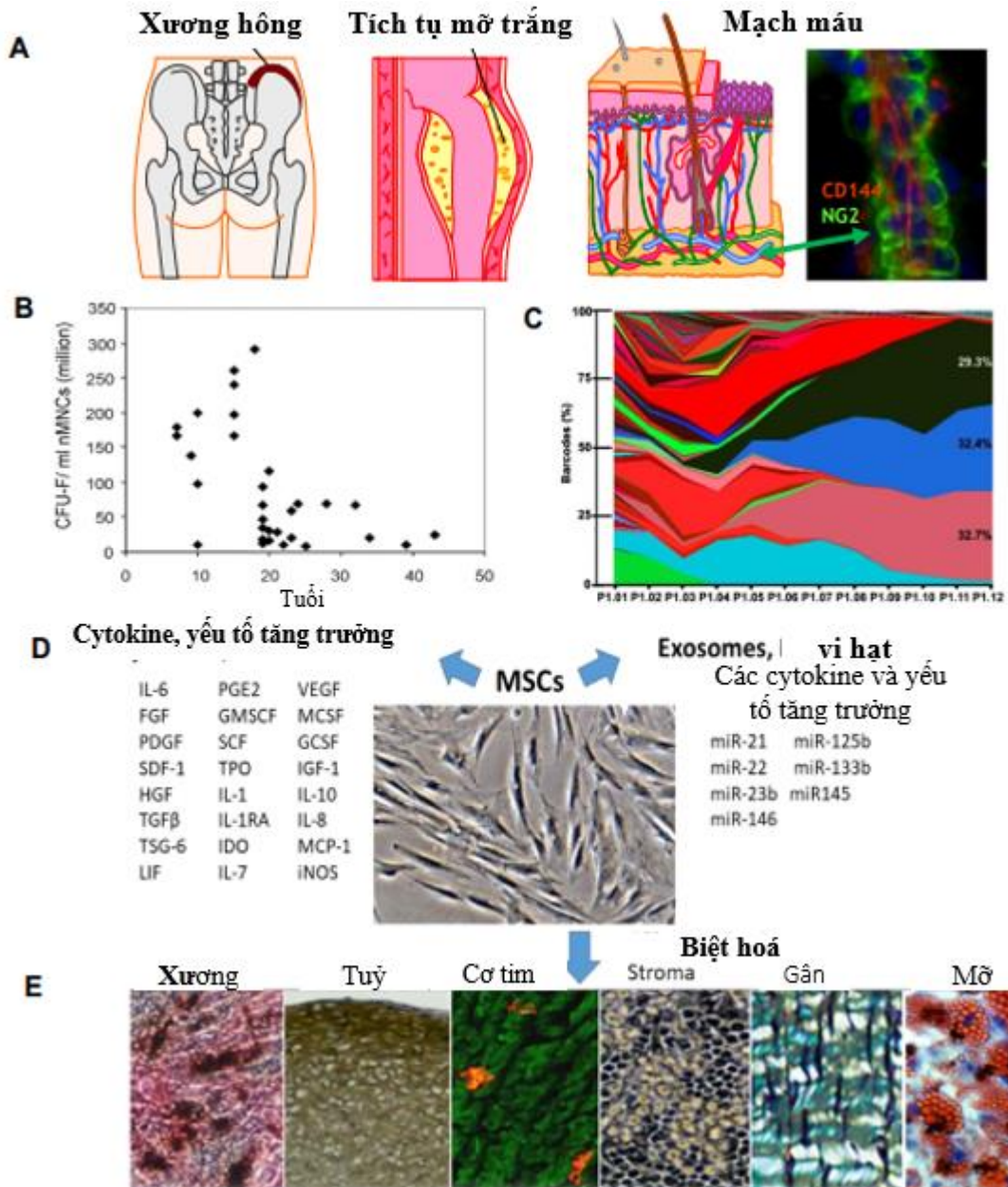
1.2. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ

1.2.1. Tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô (MSC) chứa nhiều tính chất đặc biệt như khả năng tự tái tạo, biệt hoá, sửa chữa mô, điều hoà miễn dịch và tạo mạch. Các đặc tính này đã góp phần thúc đẩy các nghiên cứu tìm kiếm nguồn MSC ưu việt nhằm phục vụ trong liệu pháp tế bào. Những năm qua đã có sự gia tăng đột biến trong nghiên cứu tế bào gốc để điều trị bệnh và hiệu quả của tế bào gốc đã được công nhận trên các lĩnh vực khác nhau bởi các tác dụng của chúng trong liệu pháp tế bào và y học tái tạo như tái tạo cơ tim, da, cải thiện tình trạng bệnh tự miễn hoặc ác tính [19]. MSC có thể được phân lập từ nhiều loại mô, chẳng hạn như dây rốn, polyp nội mạc tử cung, tủy xương, mô mỡ, v.v... Bên cạnh đó, MSC còn sở hữu các đặc điểm riêng biệt như: dễ phân lập và nuôi cấy, tính đàn hồi và sự kích thích tăng trưởng đối với vùng bị tổn thương. Chúng cũng có hoạt tính chống viêm và chống chết theo chương trình ở các mô bị đe dọa cũng như tác dụng điều hoà miễn dịch nhờ chức năng cận tiết, hoạt tính kháng vi sinh vật, tác dụng tiêu diệt vi khuẩn và có thể kích hoạt các tế bào gốc thường trú khác và kích thích tân sinh mạch [20].

MSC có thể dễ dàng được phân lập từ tủy xương và mô mỡ nhưng tất cả các mô đều chứa các tế bào giống MSC như một phần của vi mạch. Ở Hình 1.1B số lượng MSC, được biểu thị ở đây là đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU-F), được phân lập từ tủy xương giảm xuống sau 15 – 20 tuổi và tiếp tục giảm [21]. Số lượng MSC trong tủy xương hạn chế và khó nhân nuôi trong môi trường nuôi cấy để đạt được số lượng cao cho nghiên cứu hoặc sử dụng điều trị [22], nhưng hiệu quả của quá trình cấy chuyên đối với việc sử dụng MSC là không rõ ràng (Hình 1.1C). Các công bố cho thấy MSC có khả năng tạo ra một số lượng lớn các yếu tố tăng trưởng dạng hòa tan hoặc dạng túi tiết các cytokine, cũng như các microRNA, có thể truyền tín hiệu đến các tế bào và mô khác (Hình 1.1D). MSC tăng sinh trong quá trình nuôi cấy có thể biệt hoá thành nhiều dòng tế bào khác nhau trong các điều kiện *in vitro* chuyên biệt. Những điều kiện biệt hóa MSC thành xương và mô mỡ [23] đã được sử dụng rộng rãi, nhưng các điều kiện *in vitro* bổ sung thúc đẩy biểu hiện gen cơ trơn và cơ vân; thay đổi điều kiện môi trường có thể gây ra biểu hiện của gen tim và gan. Một khi đã được biệt hóa, các MSC hầu như thể hiện tất cả các gen đặc trưng của các loại tế bào đã biệt hóa. Hiện tại, các ứng dụng trị liệu nổi bật hơn của MSC tận dụng lợi thế của việc sản xuất các yếu tố của MSC và khả năng đáp ứng của các tế bào tương tác khác, chẳng hạn như các tế bào của hệ thống miễn dịch (Hình 1.1E).

Những đặc tính đa tiềm năng của MSC làm cho chúng trở thành một lựa chọn hấp dẫn để phát triển các ứng dụng lâm sàng. Các nghiên cứu nhằm khám phá vai trò của MSC trong việc biệt hóa, cấy ghép và đáp ứng miễn dịch trong các bệnh khác nhau [24]. MSC phát huy được tiềm năng điều trị của chúng dựa vào khả năng của MSC tiết ra các yếu tố có khả năng kích thích sự sống sót và phục hồi của các tế bào bị tổn thương, khả năng khu trú tại mô bị tổn thương và tạo ra các yếu tố cận tiết có đặc tính chống viêm, qua đó dẫn đến phục hồi chức năng của mô bị tổn thương [25]. Cho đến nay, liệu pháp tế bào sử dụng MSC đã được đánh giá có hiệu quả để điều trị một số rối loạn, bao gồm các bệnh chuyển hóa, thoái hóa và viêm nhiễm, sửa chữa và tái tạo các mô bị hư hỏng hoặc bị mất trong điều trị ung thư [26].



Hình 1.1. Đặc điểm của MSC

(A) Nguồn phân lập MSC. (B) Số lượng MSC theo độ tuổi. (C) Hiệu quả của quá trình cấy chuyển MSC (D) MSC tạo ra các yếu tố tăng trưởng hòa tan hoặc gắn với túi và các cytokine. (E) MSC có thể biệt hoá thành nhiều dòng tế bào trong các điều kiện *in vitro*. (Nguồn: Pittenger và cộng sự, 2019 [27]).

Có nhiều nguồn tế bào gốc khác nhau cho các ứng dụng khác nhau. Tuy nhiên, các nguồn được ưu tiên cho phép các quy trình thu nhận có xâm lấn tối thiểu và nhanh chóng thu được số lượng tế bào dồi dào. Các mô nguồn trưởng thành phổ biến nhất và được sử dụng sớm nhất cho các nghiên cứu thu nhận MSC ở người là tủy xương [28] và phân đoạn mạch mô đệm mô

mỡ [29] và các nguồn này tạo thành nền tảng cho hầu hết dữ liệu trong lĩnh vực này (Hình 1.1A). Việc quyết định sử dụng MSC tự thân từ tủy xương hoặc mô mỡ để phân lập MSC là một quyết định lâm sàng cơ bản, nhưng cả hai đều cho thấy thành công trong việc tạo ra số lượng lớn MSC [23]. Ở người, số lượng MSC có thể phân lập được tìm thấy trong tủy xương cũng giảm theo độ tuổi, cho thấy nhiều yếu tố khác nhau ở những người lớn tuổi ví dụ như mô dễ bị tổn thương hơn so với những người trẻ tuổi [21] (Hình 1.1B).

Nói chung, MSC được phân lập bởi khả năng bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy. Các tế bào có thể được nhân lên trong quá trình nuôi cấy trong khi vẫn duy trì tính đa năng của chúng với đặc trưng là các chỉ thị bề mặt. Tuy nhiên, việc mô tả đặc tính của MSC vẫn còn khó khăn do thiếu các dấu hiệu di động rõ ràng và duy nhất. Do đó, Hiệp hội Quốc tế về Liệu pháp Tế bào đã đề xuất ba tiêu chí tối thiểu để định nghĩa MSC trong nuôi cấy là: (a) khả năng bám dính bề mặt đĩa nuôi, (b) có biểu hiện dương tính với các chỉ thị CD73, CD90 và CD105 và không biểu hiện các chỉ thị CD34, CD45, CD11b hoặc CD14, CD19 hoặc CD79 α và biểu hiện HLA-DR, và (c) khả năng biệt hóa thành ba loại tế bào cơ bản là tế bào mỡ, tế bào sụn và nguyên bào xương [30]. Chỉ thị đặc trưng của MSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy; một số thay đổi này có thể đại diện cho những thay đổi về đặc điểm sinh học của mỗi loại MSC; ví dụ, trong các BM-MSC (MSC có nguồn gốc từ tủy xương) ở chuột, việc không biểu hiện của CD90, CD15 và CD309 liên quan đến sự biến đổi của tế bào sau nhiều lần cấy chuyển [31]. MSC của người phần lớn đã được chứng minh là không có sự biến đổi như vậy [31].

1.2.2. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ

Theo Hall và cộng sự (2010), MSC là ứng cử viên hấp dẫn cho các ứng dụng lâm sàng như kỹ thuật mô, cấy ghép nội tạng và sửa chữa các mô bị tổn thương trong các bệnh tim mạch và bệnh viêm nhiễm, đặc biệt là vì các tế bào này không có mối quan tâm về đạo đức và có thể được phân lập với số lượng thích hợp từ một số nguồn và được nhân lên trong nuôi cấy [32].

Số lượng và mật độ tế bào gốc trong các mô khác nhau như gan, tim, thận, da, tủy xương, mô mỡ, nhau thai, răng, nước ối, màng ối và máu dây rốn cũng như trong nhau thai là khác nhau [33]. Các tế bào BM-MSCs có các đặc

tính đa năng phù hợp với kỹ thuật mô và các ứng dụng y học tái tạo. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, tế bào gốc trưởng thành còn có thể được lấy từ các vị trí khác ngoài tủy xương. Điển hình là mô mỡ đã trở thành một nguồn MSC phong phú cung cấp một nguồn AMC dồi dào, dễ tiếp cận và giảm sự đau đớn cho người bệnh. Mặt khác, nguồn tế bào này không giới hạn tuổi người hiến tặng và quá trình thu nhận tế bào ít tác động nhất lên người hiến [34]. Điều đó giúp cho những nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc mỡ được thuận lợi hơn và không bị vi phạm về vấn đề y đức. Những tế bào này là những tế bào giống như nguyên bào sợi có khả năng biệt hóa đa tiềm năng, được tìm thấy ở các loài khác nhau và được gọi là “tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ - AMC” [34].

Mặc dù tủy xương là nguồn thường được dùng để thu nhận tế bào gốc trung mô nhưng do số lượng cần thiết để ghép tối ưu là 10^9 tế bào/kg bệnh nhân nên tủy xương chưa đủ đáp ứng với yêu cầu này. Khó khăn về hạn chế số lượng khi thu nhận tế bào gốc từ máu ngoại vi hoặc tủy xương [35], trong khi đó số lượng tế bào gốc từ mô mỡ thu nhận được cao gấp 100–500 lần so với tủy xương, điều này cho thấy nguồn AMC trở thành một nguồn hấp dẫn để khai thác ứng dụng trong các mục đích khác nhau [36], do đó mô mỡ là một nguồn thu thay thế thích hợp vì dồi dào về số lượng, dễ dàng thu nhận và ít tác động đến người hiến. Mặc dù AMC có biểu hiện các dấu hiệu bề mặt điển hình của tế bào gốc trung mô (MSC), tuy nhiên các công bố cho thấy có sự khác nhau về tỉ lệ biểu hiện các chỉ thị bề mặt giữa MSC và AMC [36]. Trong các ứng dụng lâm sàng, AMC hầu hết đã được phân lập từ mô mỡ dưới da. Theo đó, tỉ lệ MSC phân lập từ mô mỡ cao hơn 4,28% và tỉ lệ AMC cao hơn 32% so với khi phân lập từ tủy sống [37]. AMC có thể biểu hiện các chỉ thị đánh dấu đặc trưng của MSC như CD90 và các chỉ thị đánh dấu khác như CD34, CD73 và CD105, phù hợp với tiêu chí tối thiểu để được công nhận là MSC của Hiệp hội Trị liệu Tế bào Quốc tế (ISCT) và Hiệp hội Công nghệ Ứng dụng Chất béo Quốc tế (IFATS) [38]. Theo IFATS, AMC ban đầu có thể được xác định bởi đặc trưng dương tính với CD34 và âm tính với các CD45, CD235a và CD31; sau quá trình nuôi cấy AMC có biểu hiện dương tính với các chỉ thị CD73, CD90, CD105, CD44 và âm tính với CD45 và CD31 [38]. Các tác giả chỉ ra rằng các dấu hiệu CD36+/CD106- có thể được sử dụng để phân biệt với tế bào gốc tủy xương [38].

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng AMC của chuột có thể giải phóng nhiều yếu tố tăng trưởng tạo mạch và cytokine/chemokine. Những điều này cho thấy chúng có thể có tiềm năng như một nguồn tế bào hữu ích cho quá trình hình thành mạch điều trị [39]. Nghiên cứu của Fernández-García và cộng sự năm 2015 [40] chỉ ra rằng AMCs cải thiện việc đưa các tế bào gốc và tế bào tiền thân của người hiến tặng vào tủy xương của người nhận, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phục hồi ổn định của những người được cấy ghép bằng các mảnh ghép tạo máu đã truyền. Những kết quả này mở ra triển vọng mới trong việc ứng dụng AMCs trong liệu pháp gen tế bào gốc tạo máu.

1.2.3. Tiềm năng biệt hoá của tế bào gốc mỡ

Trước đây, người ta cho rằng tế bào gốc chỉ có thể biệt hóa thành tế bào trưởng thành của cùng một cơ quan nhưng những bằng chứng gần đây cho thấy chúng cũng có thể biệt hóa thành các loại tế bào khác và thậm chí thành tế bào của ngoại bì, trung bì và nội bì [31]. Điều quan trọng nhất là tạo mạch, bài tiết các peptide điều hòa thần kinh, các yếu tố tăng trưởng và các cytokine có thể có tác dụng điều hòa miễn dịch, tạo mạch, chống viêm và chống chết theo chương trình [41]. Sự biệt hóa *in vitro* của AMC thành nhiều loại tế bào có nguồn gốc trung bì như tế bào gan, tế bào đảo tụy, tế bào thần kinh, tế bào nội mô và tế bào biểu mô và tế bào biểu mô thận đã được báo cáo [31]. Một số nghiên cứu đã mô tả tính linh hoạt của AMC đối với tế bào sụn, xương, mỡ và cơ [31]. Nói chung, các yếu tố gây biệt hoá *in vitro* để AMCs chủ yếu đạt được bằng cách nuôi cấy trong môi trường chọn lọc với các yếu tố cảm ứng đặc hiệu của các dòng tế bào chức năng. Ví dụ, để biệt hoá AMC thành nguyên bào xương và tế bào mỡ, môi trường nuôi cấy tạo xương và tế bào mỡ sử dụng bao gồm DMEM được bổ sung dexamethasone, β -glycerolphosphate và DMEM được bổ sung dexamethasone, isobutylmethylxanthine và indomethacin tương ứng.

Như đã đề cập trước đây, vì BM-MSCs không nhiều, việc thu hoạch tế bào đòi hỏi một quy trình xâm lấn cao và tế bào dễ bị nhiễm khuẩn trong quá trình nuôi cấy. BM-MSCs không phải là dòng tế bào lý tưởng cho bệnh nhân lớn tuổi vì những tế bào này mất đi khả năng biệt hóa đáng kể khi tuổi của người hiến tặng ngày càng tăng [42]. Mô mỡ là nguồn thu dồi dào và dễ lấy từ cơ thể [31]. AMC cho thấy tiềm năng đa năng tuyệt vời và nhiều ưu điểm hơn

BMSCs, và tiềm năng tạo xương của chúng có thể được duy trì khi lão hóa [42]. Do đó, AMC là lựa chọn được ưu tiên hơn cho liệu pháp tế bào và kỹ thuật mô [42].

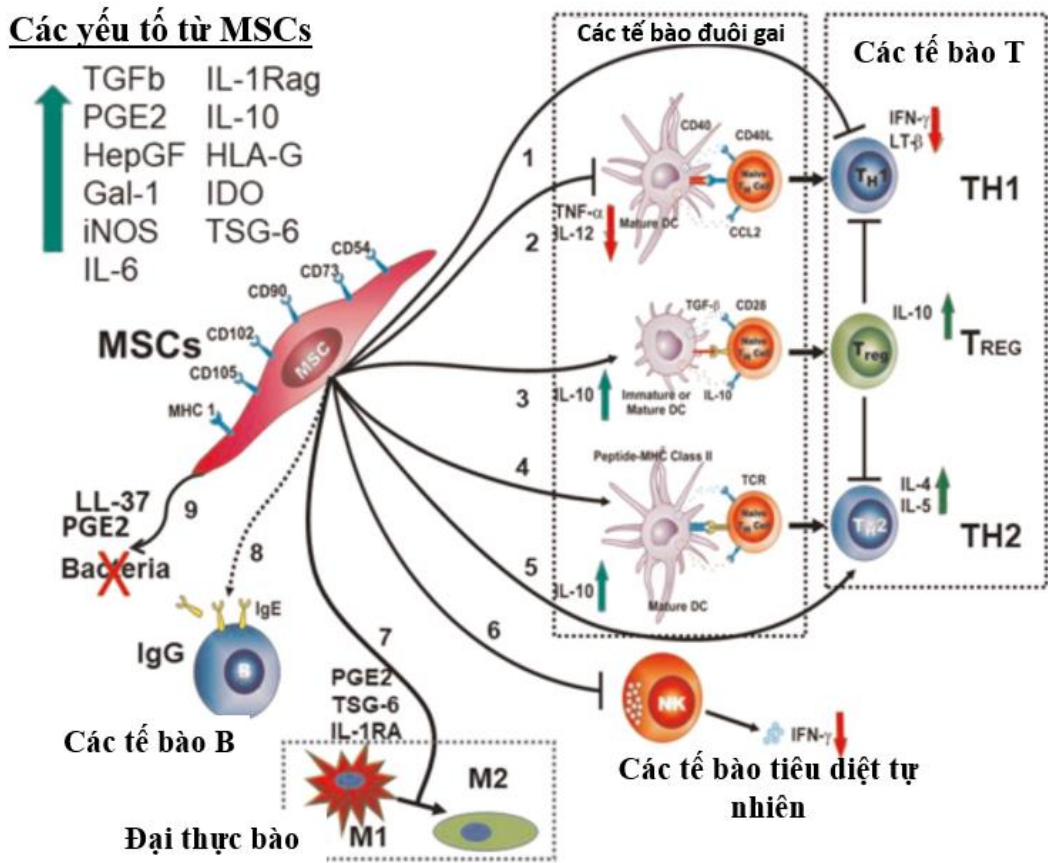
1.2.5. Môi liên hệ giữa tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (AMC) và tế bào ung thư vú (BCC)

Các tế bào T CD4 có thể được chia thành các tập con Th1, Th2, Th17 và Treg trên cơ sở mô hình sản xuất cytokine của chúng. Các cytokine bảo vệ liên quan đến Th1 (IL-2 và IFN- γ có liên quan đến phản ứng miễn dịch tế bào [43]. Các cytokine liên quan đến Th2 (IL-4 và IL-10) có liên quan đến khả năng miễn dịch dịch thể và đặc tính chống viêm [43]. Th17 được xác định là tế bào tuyển dụng bạch cầu trung tính và đại thực bào để tham gia và khuếch đại phản ứng viêm [44].

Tế bào mỡ là thành phần chính, chiếm từ 7–56 % tổng thể tích của vú [5]. Lý do là mỡ liên quan đến béo phì hoặc những thay đổi xảy ra trong mô mỡ béo phì ảnh hưởng đến sự phát triển và tiến triển của ung thư vú. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tế bào mỡ đóng một vai trò quan trọng trong bệnh ung thư vú [5], [36]. Ngoài vai trò là kho dự trữ năng lượng, mô mỡ còn hoạt động như một cơ quan bài tiết, tạo ra các chất trong quá trình trao đổi chất (như axit béo tự do và cholesterol), các yếu tố tăng trưởng, hormone và cytokine được gọi là adipokine [45]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng những yếu tố này do các tế bào mỡ tiết ra có thể thúc đẩy quá trình khởi phát, phát triển và di căn ung thư vú [36]. Ở người, sự xâm nhập của khối u vào mô mỡ xung quanh là một dấu hiệu của sự xâm lấn và có liên quan đến tiên lượng xấu [46]. Điều này dẫn đến việc điều chỉnh lại các chất trung gian gây viêm và các cytokine gây viêm từ cả tế bào thường trú ở mô (tế bào mỡ, tế bào gan, v.v.) cũng như từ các tế bào miễn dịch trong các mô đó [47]. Khi các tế bào mỡ trải qua quá trình phì đại, hệ Secretome của chúng chuyển sang trạng thái viêm nhiều hơn do áp lực cơ học từ việc tăng kích thước và giảm cung cấp oxy. Điều này dẫn đến tăng áp lực lên lưới nội chất (ER) và kích hoạt phản ứng tăng tổng hợp protein, một quá trình đã được chứng minh là hiện tượng tăng cường biểu hiện và bài tiết các cytokine gây viêm, bao gồm interleukin (IL)-6 và yếu tố hoại tử khối u (TNF α) [48].

Vi môi trường ung thư vú có hai thành phần mô chính là mô mỡ và mô ung thư được nuôi bởi hệ thống mạch máu. Do vậy, vi môi trường này có chứa nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào mỡ, tế bào ung thư, tế bào liên kết... và giữa chúng có mối tác động qua lại, ảnh hưởng lẫn nhau. Tế bào mỡ được phát triển từ các tế bào gốc trung mô từ mô mỡ, trong khi các tế bào ung thư vú lại được phát triển từ các tế bào gốc ung thư. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong vi môi trường ung thư vú, tế bào mỡ có vai trò là nguồn cung cấp năng lượng (fatty acid, glycerol) cho sự phát triển của tế bào ung thư vú. Giữa tế bào mỡ và tế bào ung thư vú có sự tương tác qua lại thông qua các cytokines (adiponectin, IL-6, TNF α ...), hormones (estrogen, insulin, IGF-1...). Trong khi đó, sự tác động của tế bào AMC lên BCC mới chỉ được xác định thông qua một vài yếu tố như cytokines (IL-6, TGF- β 1, RANTES) và chemokines (MCP-1/CCL2) [49]. Việc xác định tác động của BCC lên AMC sẽ góp phần tìm ra các chỉ thị phân tử (marker) tiềm năng mới phục vụ cho công tác chẩn đoán ung thư vú, đồng thời các đích phân tử tìm được sẽ mở ra cơ hội cho công tác điều trị ung thư vú hiệu quả hơn.

MSC cũng có thể di chuyển cụ thể đến vị trí khối u, vì sự hình thành khối u là một quá trình viêm mãn tính. Do đó, MSC thường được coi là phương tiện chống ung thư lý tưởng để biểu hiện các tác nhân chống ung thư hoặc các cytokine miễn dịch [50]. Tuy nhiên, cơ chế ảnh hưởng của MSC đối với sự phát triển của khối u vẫn chưa rõ ràng và là một vấn đề tiềm ẩn đối với ứng dụng lâm sàng của chúng. Vai trò điều trị của MSC trong điều trị ung thư cũng tương tự như trong các bệnh khác; các khối u tiết ra các chất hóa học hấp dẫn tương tự cho các mô bị tổn thương, các chất này bắt đầu quá trình di chuyển của MSC đến vị trí đích thông qua con đường truyền tín hiệu CXCL12-CXCR4 [51]. MSC cũng đã được báo cáo là tương tác trực tiếp và gián tiếp với các tế bào ung thư, ảnh hưởng đến sự phát triển của khối u [52]. Hơn nữa, MSC tiết ra nhiều cytokine và các yếu tố tăng trưởng, làm thay đổi các hoạt động của tế bào, ví dụ như sự tăng sinh tế bào (chu kỳ tế bào), sự hình thành mạch, sự sống của tế bào và điều hòa miễn dịch, để ảnh hưởng gián tiếp đến sự phát triển của khối u [53].



Hình 1.2. MSC- Tương tác tế bào miễn dịch

(Nguồn: Aggarwal, S. & Pittenger 2005 [54])

Đối với tương tác giữa tế bào và tế bào, người ta thấy rằng các MSC thường biểu hiện các kháng nguyên loại I tương hợp mô học chính (MHC) trên bề mặt của chúng chứ không phải loại II, nhưng các kháng nguyên loại II được điều hòa bởi các tác nhân gây viêm. Việc tìm kiếm chuyên sâu các yếu tố hòa tan được tiết ra từ MSC khiến chúng có khả năng điều hòa miễn dịch (Hình 1.2) đã xác định được nhiều yếu tố [55] hạn chế phản ứng của tế bào miễn dịch bao gồm yếu tố tăng trưởng biến đổi β, tế bào gan, yếu tố tăng trưởng, prostaglandin E2, IL-10, chất đối kháng thụ thể IL-1, IL-6, kháng nguyên bạch cầu người-G, yếu tố ức chế bạch cầu, indoleamine-2, 3-dioxygenase, oxit nitric, galectins-1 và -9, và TNFα kích thích gen 6 (TSG-6).

Các khối u và môi trường vi mô của chúng tạo ra sự phát triển của MSC thông qua các cơ chế phụ thuộc chủ yếu vào các cytokine gây viêm khác nhau, chemokine, các yếu tố tăng trưởng và các yếu tố khác. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây đã tạo ra những kết quả gây tranh cãi về việc MSC

có thúc đẩy hay ức chế sự phát triển và tiến triển của khối u hay không [56]. Trong mô hình nghiên cứu dựa trên tế bào 4T1 của khối u vú, đã xác định việc tiêm đồng thời MSC với các tế bào 4T1 đã thúc đẩy sự phát triển của khối u, còn việc tiêm MSC ở một vị trí cách xa vị trí cấy tế bào 4T1 đã ngăn chặn sự phát triển của khối u [57]. Đã có báo cáo rằng các MSC thực hiện hoạt động ức chế miễn dịch để ngăn không cho vật chủ tiêu diệt khối u [35]. Ngược lại, một số nhà điều tra tin rằng MSC có khả năng hạn chế sự phát triển của khối u trong một số điều kiện nhất định [58]. Một nghiên cứu khác báo cáo rằng việc tiêm MSC có nguồn gốc từ tủy xương (BM-MS) và tế bào ung thư buồng trứng SKOV-3 vào chuột đã dẫn đến sự chậm phát triển ban đầu của khối u [59].

1.3. TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ CYTOKINE

Cytokine là các phân tử tín hiệu làm trung gian và điều chỉnh khả năng miễn dịch, viêm và tạo máu. Mặc dù có một số hệ thống phân loại cho các cytokine, nhưng một cách phân loại phổ biến gọi các cytokine thúc đẩy quá trình viêm là các cytokine tiền viêm, trong khi các cytokine ngăn chặn hoạt động của các cytokine tiền viêm và giảm viêm được gọi là các cytokine chống viêm [60]. Việc giải phóng các cytokine gây viêm sẽ dẫn đến kích hoạt các tế bào miễn dịch và sản xuất cũng như giải phóng các cytokine tiếp theo [61]. Tuy nhiên, nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng việc giải phóng đồng thời các cytokine tiền viêm và kháng viêm là bắt buộc trong bất kỳ phản ứng miễn dịch nào [62]. Hơn nữa, các quần thể tế bào khác nhau có thể tạo ra cùng một loại cytokine. Tác dụng của các cytokine phụ thuộc vào tế bào được nhắm mục tiêu, khiến chúng có tính đa hướng [63].

Interleukin-6 đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong các bệnh tự miễn dịch, nhiễm trùng do vi khuẩn và tác dụng phụ chuyển hóa [64]. IL-6 tham gia vào quá trình điều chỉnh kích hoạt, tăng trưởng, phân chia tế bào miễn dịch trong quá trình đáp ứng trong cơ thể và miễn dịch. Hơn nữa, IL-6 đã được báo cáo là được biểu hiện mạnh mẽ bởi các AMC và là nhân tố chính trong sự gia tăng, di cư và xâm lấn của một số tế bào ung thư. Trong bối cảnh này, AMC đã được chứng minh là có khả năng tăng cường sự di chuyển của các tế bào ung thư buồng trứng thông qua con đường trung gian IL-6, điều được xác định tương tự với tế bào ung thư vú [6].

Interleukin-17A được coi là một chất trung gian duy nhất có nguồn gốc từ tế bào T CD4⁺ của quá trình hình thành mạch kích thích sự di chuyển của tế bào nội mô mạch máu và điều chỉnh việc sản xuất nhiều yếu tố tiền tạo mạch [65]. Interleukin-17A làm trung gian tác động tiền viêm bằng cách kích thích giải phóng nhiều cytokine khác như IL-6, IL-8 và G-CSF từ các tế bào biểu mô, nội mô và nguyên bào sợi [66]. Việc sản xuất quá mức IL-17A đã được phát hiện ở bệnh ung thư buồng trứng và ở những bệnh nhân mắc bệnh đa u tủy giai đoạn II và III [65]. Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về IL-17 trong ung thư vú.

IL-2 là một cytokine gây viêm, có tác dụng chống khối u [67]. Liên kết hơn nữa của IL-2 với thụ thể của nó, phức hợp IL-2R $\beta\gamma$ hoặc IL-2R $\alpha\beta\gamma$, dẫn đến việc kích hoạt JAK1 và JAK3, kích hoạt việc tuyển dụng và phosphoryl hóa các yếu tố phiên mã STAT, chủ yếu là STAT5, ngoài ra còn có STAT1 và STAT3. Sau đó, ba con đường truyền tín hiệu chính, bao gồm PI3K-AKT, JAK-STAT và MAPK/ERK được kích hoạt [68] để làm trung gian cho sự phát triển, sống sót và biệt hóa của tế bào cũng như sản xuất cytokine (IL-4, IL-6, IL-12). Do đó, trong bệnh ung thư vú, IL-2 có tác dụng chống khối u do tăng tuyển dụng các tế bào NK giải phóng IL-2 và tạo ra chức năng chống apoptotic trong các tế bào T CD8⁺, tác nhân chính của phản ứng chống khối u. IL-2 có thể thúc đẩy hoạt hóa và tăng sinh tế bào T CD8⁺ ở giai đoạn đầu của khối u nhưng có thể làm cạn kiệt tế bào T CD8⁺ ở giai đoạn cuối của khối u [69]. Nhiều tác động của tín hiệu IL-2 trên các loại tế bào khác nhau có trong TME có thể có lợi trong việc phát triển tế bào T và kiểm soát sự phát triển của khối u bằng cách kích hoạt các phản ứng miễn dịch gây độc tế bào chống khối u hiệu quả và tiêu diệt tế bào khối u [70].

Interleukin 4 (IL-4) tác động lên tế bào lympho B, bạch cầu đơn nhân, tế bào đuôi gai và nguyên bào sợi, xác định phản ứng dị ứng và đã được chứng minh là có cả tác dụng chống ung thư và chống viêm. Thụ thể IL-4 biểu hiện rõ rệt trong ung thư vú trong khi IL4R là bắt buộc đối với hoạt động của IL-4 trên tế bào ung thư [71]. Năm 2017, Gaggianesi và cộng sự đã nghiên cứu tác động của việc ngăn chặn IL-4 với chất đối kháng IL4R α IL4DM trong các khối u tuyến vú, báo cáo về sự ức chế sự tăng sinh, xâm lấn

và tăng trưởng của tế bào ung thư đạt được bằng cách điều hòa giảm hoạt động của con đường protein kinase (MAPK) được điều hòa ngược [72].

Bên cạnh IL-4, IL-10 cũng là một cytokine chống viêm. IL-10 là một cytokine điều hòa miễn dịch đa chức năng với cả chức năng ức chế miễn dịch và chống tạo mạch [73]. Nó cũng đóng vai trò chính trong việc điều chỉnh các phản ứng viêm, tiến triển nhiễm trùng, tự miễn dịch, dung nạp cấy ghép và phát sinh khối u [74]. Nồng độ protein IL-10 cao hơn trong huyết thanh của bệnh nhân ung thư vú so với huyết thanh của người khỏe mạnh [75]. Đến năm 2008, trong nghiên cứu của Rao và cộng sự [76] thấy không có sự khác biệt đáng kể trong biểu hiện IL-10 ở huyết thanh giữa bệnh nhân ung thư vú và nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, mức độ biểu hiện IL-10 có liên quan đến khả năng sống sót kém được tìm thấy ở mô khối u vú [77]. Vì vậy, vai trò của IL-10 trong ung thư vú đang gây tranh cãi.

Lĩnh vực nghiên cứu về tế bào gốc khá khó hiểu và có nhiều báo cáo trái ngược nhau bởi vai trò phức tạp của nó trong sự phát triển ung thư. Để đánh giá thêm và có những nhận định về ảnh hưởng của AMC đối với ung thư, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thực hiện việc nghiên cứu tác động của tế bào gốc mỡ lên quá trình hình thành khối u vú trên mô hình chuột cấy ghép tế bào 4T1 thông qua đánh giá biến động của một số cytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, và IL-10.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Dòng tế bào ung thư vú ở chuột 4T1 (ATCC, Mỹ) nhân nuôi tại phòng Thử nghiệm sinh học - viện Công nghệ sinh học.

- Tế bào gốc mỡ được phân lập từ mô mỡ chuột khỏe mạnh, nhân nuôi *in vitro* ở lần cấy chuyển thứ 3 hoặc 4 tại phòng Công nghệ Phôi – viện Công nghệ sinh học.

- Chuột thí nghiệm dòng Balb/c được mua từ Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN. Chuột cái khoảng 8-10 tuần tuổi, khỏe mạnh, trọng lượng của chúng dao động từ 22 - 30 gam.

- Hoá chất được dùng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, Gibco, Merk, Miltanyl.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập và đánh giá tế bào gốc trung mô từ mô mỡ chuột

2.2.1.1. Phân lập tế bào

Thu thập mô mỡ và phân lập các tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ như báo cáo của Yamamoto và cộng sự [78]. Chuột bị giết ở thời điểm 1, 2, 3 tuần sau tiêm để thu mô mỡ và phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ vừa thu bằng phương pháp collagenase. Chuột bị giết theo phương pháp kéo dẫn đốt sống cổ. Sau đó, cố định chuột trên bàn mổ, vô trùng bằng cồn 70%, dùng kéo cắt da dưới bụng. Đưa mô mỡ thu được vào tủ vô trùng và rửa kỹ với dung dịch PBS vô trùng có chứa kháng sinh, rửa lặp lại bằng môi trường rửa (DMEM low glucose, chứa 1% kháng sinh khoảng 3 - 5 lần), cắt nhỏ và ủ trong collagenase Type I (Gibco, Mỹ) ở 37 °C trong khoảng 15 - 40 phút, theo dõi cho đến khi các mảnh mô tan. Sau đó, ly tâm dịch huyền phù để thu lấy các tế bào mỡ rồi rửa lại bằng môi trường rửa, ly tâm thu tế bào và lặp lại bước rửa 3-5 lần. Tế bào được nuôi trong môi trường DMEM có hàm lượng glucose thấp (Sigma, Hoa Kỳ) có 10% FBS (Sigma, Hoa Kỳ) và 1% kháng sinh ở 37 °C, 5% CO₂. Sau khi gieo 24 – 48 giờ, rửa tế bào bằng PBS và thay môi trường nuôi để loại bỏ các tế bào không bám dính. Khi tế bào đạt 80 – 90

% bề mặt đĩa nuôi thì tiến hành cấy chuyển và đây được xác định là lần cấy chuyển đầu tiên. Các bước thực hiện như sau: Loại bỏ môi trường cũ, rửa tế bào bằng dịch đệm PBS. Xử lý tế bào nuôi cấy bằng Trypsin / EDTA 0,25% / 0,02% trong PBS (PAN Biotech, Anh), ủ ở 37 °C, 5% CO₂ trong 5 phút. Thêm thể tích thấp của môi trường DMEM low glucose với lượng tương đương với trypsin cho vào. Dùng pipet hút để làm tan các cụm tế bào. Chuyển tế bào vào ống ly tâm, ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút, thu lại phần tế bào lắng xuống. Thêm 1000 µl môi trường nuôi cấy, gieo tế bào vào đĩa và đưa vào tủ nuôi. Theo dõi khả năng tăng sinh của tế bào trong 7 ngày và đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer, lượng tế bào gieo vào mỗi giếng của đĩa 24 giếng là 50.000 tế bào. Sự phát triển của tế bào được quan sát, đánh giá và kiểm tra thường xuyên để đánh giá hình thái và mật độ tế bào.

2.2.1.2. Biệt hoá tế bào

Trong thử nghiệm biệt hóa *in vitro*, để tạo ra sự biệt hoá tế bào mỡ [79], các AMC từ lần cấy chuyển 3 được gieo với mật độ 1×10^4 tế bào/giếng của đĩa 4 giếng (Nunc, UK) trong môi trường DMEM có bổ sung insulin 10 µg/L, Dexamethasone 1 µM và 0,5 µM IBMX (tất cả từ Sigma). Thay môi trường biệt hoá 3 ngày/lần trong 3 tuần. Sau 3 tuần, cố định tế bào với formalin 10% trong 10 phút sau đó ủ với formalin 37% ít nhất 1 giờ. Tế bào sau cố định sẽ loại dịch, để khô rồi nhuộm với Oil Red O trong 1 giờ (Bio Basic Canada Inc.), rửa lại bằng nước cất 5 lần.

Để tạo ra sự biệt hóa xương, quy trình này tương tự với sự biệt hóa mỡ. Tuy nhiên, môi trường là DMEM chứa 10% FBS, 50 µg axit ascorbic, 10 nM dexamethasone và 10 mM β-glycerophosphate [80]. Thay môi trường ba ngày một lần trong 21 ngày. Sau 21 ngày, cố định tế bào bằng paraformaldehyde 4% ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và sau đó nhuộm với Alizarin red (Bio Basic Canada Inc.) để minh họa cho sự lắng đọng canxi trong 20 phút.

2.2.1.3. Phân tích tế bào học dòng chảy

Các tế bào AMC sau phân lập, tiến hành xác định biểu hiện của các chỉ thị bề mặt bằng cách sử dụng phân loại tế bào được kích hoạt bằng huỳnh quang (máy phân tích tế bào, FACS, BD Biosciatics). Các bước thực hiện gồm: ủ 1×10^6 tế bào với 2 µl CD90-APC, 2 µl CD45-Per CP và 5 µl mỗi

kháng thể CD29-FITC, CD44-PE (Miltenyi Biotec Inc. USA) trong 10 phút ở 2-8 °C trong tối. Rửa lại tế bào 3 lần bằng dung dịch đệm (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA). Sau đó, mẫu tế bào được đem phân tích. Dữ liệu kết quả phân tích bằng phần mềm CellQuest (BD Bioscience).

2.2.2. Phương pháp tiêm tế bào

Gây mê chuột bằng cách sử dụng isoflurane dạng hít 3%. Vùng lông quanh mỡ bụng và bẹn được cắt bớt và da được khử trùng bằng cồn 70%. Với sự hỗ trợ của kẹp vi phẫu, núm vú được nâng lên để lộ phần da ở dưới để đảm bảo phần kim không ở trong cơ. Đưa kim xuyên qua da vào khoảng dưới da để tiêm, kim phải được đưa vào khoảng 5 mm ngoài phần cuối của vát kim. Trong khi tháo kim tiêm, giữ tại vị trí tiêm khoảng 15-30 giây để tế bào tiêm vào không rò rỉ ra khỏi vị trí tiêm. Quan sát và để chuột ổn định khoảng 30 phút đầu sau tiêm.

Mỗi con chuột được tiêm 10^6 tế bào trong 100 μ l PBS 1X. Đối với những con chuột đối chứng được tiêm 100 μ l PBS 1X không chứa tế bào. Mỗi nhóm có 9 con chuột, sau 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần những con chuột này được thu mẫu máu để tiến hành những thí nghiệm tiếp theo. Chúng tôi tiến hành với 3 nhóm thí nghiệm:

- + Lô 1: Chuột tiêm 1 triệu tế bào AMC/con
- + Lô 2: Chuột tiêm 1 triệu tế bào 4T1/con
- + Lô 3: Chuột tiêm hỗn hợp 1 triệu tế bào AMC + 1 triệu tế bào 4T1/con
- + Lô 4: Chuột bình thường

2.2.3. Phương pháp thu mẫu máu

Phương pháp thu mẫu máu tiến hành theo nghiên cứu của Parasuraman và cộng sự năm 2010 [81] về lấy mẫu máu ở động vật nhỏ trong phòng thí nghiệm. Quá trình lấy máu gồm các bước sau: tiến hành gây mê chuột, sau đó sử dụng kim tiêm 1ml để lấy mẫu máu có thể mở ngực hoặc không mở ngực, mẫu máu được thu từ tim, đặc biệt là lấy từ tâm thất, nhẹ nhàng đưa kim vào tránh tình trạng tim bị xẹp. Sau đó, chuyển mẫu máu vào ống chống đông EDTA và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút để thu huyết tương. Bảo quản mẫu huyết tương ở -20 °C cho đến khi phân tích.

2.2.4. Phương pháp định lượng các cytokine bằng hạt bead

Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với bộ kit cytokine Th1/Th2/Th17 của chuột BDCBA (Becton Dickinson, USA), 50 μ L mẫu huyết thanh và 50 μ L hỗn hợp hạt được nạp vào ống Eppendoff đã được ủ trong bóng tối trong 2 giờ. Sau khi thêm 1 mL dung dịch rửa, ly tâm 200g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, hòa tan cặn bằng 300 μ L dung dịch rửa, các cytokine Th1 (IL-2), Th2 (IL-4, IL-6 và IL-10), và Th17 (IL-17A) có trong huyết thanh của chuột đã được kiểm tra bằng máy đo flow cytometry BD Acurri C6 Plus.

Chất chuẩn Cytokine Chuột Th1/Th2/Th17 được đông khô và phải được hoàn nguyên và pha loãng ngay lập tức trước khi trộn với Capture Beads và Thuốc thử phát hiện PE. Với mỗi mẫu thử nghiệm cần phải chạy làm đường chuẩn các cytokine (không lưu trữ hoặc tái sử dụng các tiêu chuẩn hoàn nguyên hoặc pha loãng).

Để chuẩn bị các chất chuẩn và mẫu để phân tích, cần vortex hỗn hợp Capture Beads và thêm 50 μ L vào tất cả các ống xét nghiệm. Thêm 50 μ L dung dịch pha loãng Tiêu chuẩn Cytokine Chuột Th1/Th2/Th17 vào các ống đối chứng. Tiếp theo, thêm 50 μ L của mỗi mẫu chưa biết vào các ống xét nghiệm mẫu được dán nhãn thích hợp rồi thêm 50 μ L thuốc thử phát hiện Th1/Th2/Th17 PE của chuột vào tất cả các ống xét nghiệm. Các ống nghiệm được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trực tiếp. Sau thời gian ủ, 1 mL Wash Buffer được thêm vào mỗi ống nghiệm và ly tâm ở tốc độ 200g trong 5 phút rồi nhẹ nhàng hút loại bỏ phần nổi phía trên mỗi ống nghiệm. Cuối cùng, 300 μ L Wash Buffer được thêm vào mỗi ống xét nghiệm để định chỉ lại các viên hạt.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được thể hiện theo giá trị trung bình (Mean) \pm Sai số tuyệt đối (SEM). Số liệu trung bình được xử lý thống kê bằng tính sai khác theo hàm ANOVA single factor trên Excel với sai số $P < 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC MỠ CHUỘT

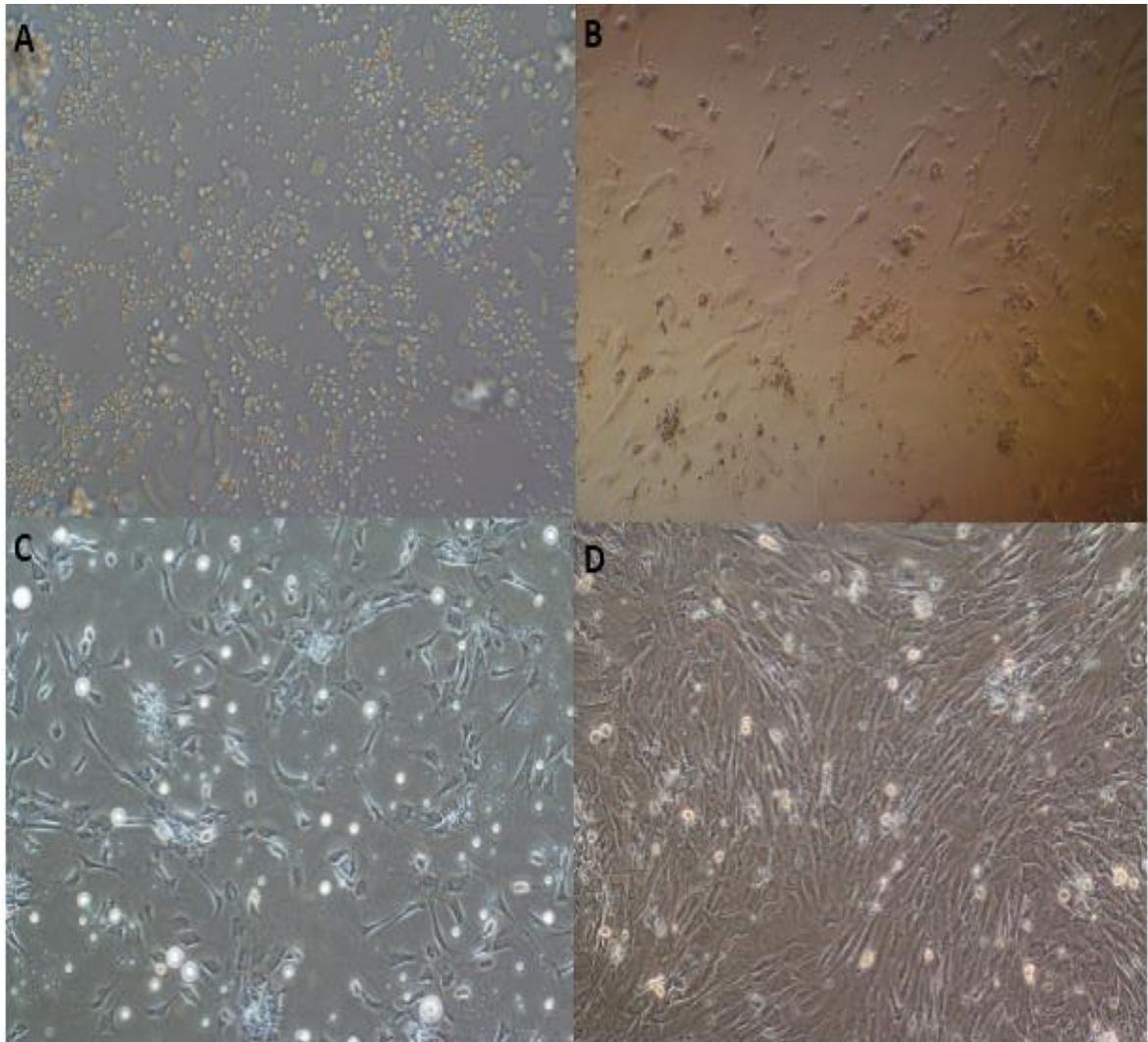
Mô mỡ chuột được thu từ chuột khỏe mạnh, tất cả các bước đều được tiến hành trong điều kiện vô trùng (Hình 3.1). Trọng lượng của mô mỡ và số lượng tế bào nuôi cấy được sử dụng để tính toán mật độ tế bào trong mô mỡ thu được. Số lượng tế bào trên mỗi gam mỡ phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Trong nghiên cứu này, khối lượng mỡ thu được trung bình là $1,44 \pm 0,65$ gam tương ứng với lượng tế bào là $2,37 \pm 0,86 \times 10^6$ tế bào và lượng tế bào trên mỗi gam mô mỡ tính ra là $1,86 \pm 0,92 \times 10^6$ tế bào/gam cao hơn so với trong báo cáo của Luna và cộng sự năm 2014 [82] là $4,2 \pm 1,1 \times 10^5$ tế bào/gam.



Hình 3.1. Quá trình thu mẫu mô mỡ

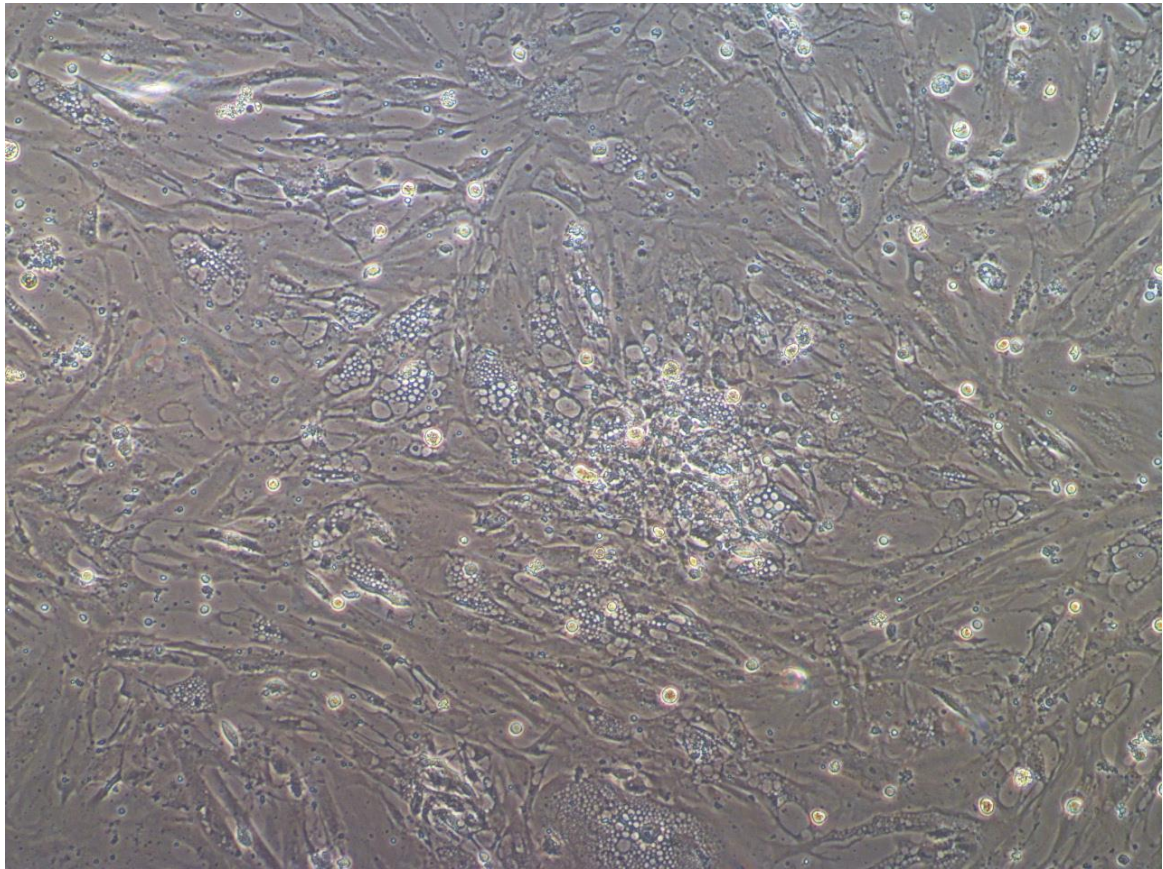
- a) vị trí thu mỡ dưới da. b) mảnh mô mỡ thu được, c) các mảnh mô mỡ được cắt nhuyễn, d) tế bào thu được sau khi ủ với collagenase và ly tâm

Hình thái của AMC sau khi phân lập từ mô mỡ của chuột khoẻ mạnh được thể hiện trong Hình 3.2. Theo quan sát, vào ngày đầu tiên của quá trình nuôi cấy, các tế bào bắt đầu bám vào bề mặt đĩa nuôi, những tế bào lơ lửng trong môi trường, sẽ bị loại sau những lần thay mới môi trường nuôi (Hình 3.2A). Vào ngày thứ 2, các tế bào hình trực chính xuất hiện (Hình 3.2B). Đến ngày thứ 6, các tế bào hình trực chính đạt khoảng 60-80% bề mặt đĩa nuôi (Hình 3.2C). Ba ngày sau giai đoạn 2 (Hình 3.2D), các tế bào bắt đầu phát triển mạnh, lan rộng nhanh chóng, bao phủ bề mặt đĩa nuôi và đồng nhất hơn về hình dạng tế bào nguyên bào sợi (hình thoi, thuôn dài và nhọn ở hai đầu, có kích thước lớn, hạt nhân tròn).



Hình 3.2. Hình thái của các AMC được phân lập trong quá trình nuôi cấy (A) các tế bào sau phân lập 12 giờ, (B) các tế bào sau 2 ngày phân lập, (C) các tế bào vào ngày thứ 6 sau phân lập, (D) tế bào vào ngày thứ 3 của lần cấy chuyển 2 (Vật kính 10x).

Tế bào AMC sau phân lập dần ổn định và tăng sinh mạnh hơn từ lần cấy chuyển 4 (Hình 3.3) và đây cũng là nguồn tế bào được sử dụng để tiêm vào chuột và thực hiện một số nghiên cứu tiếp theo.

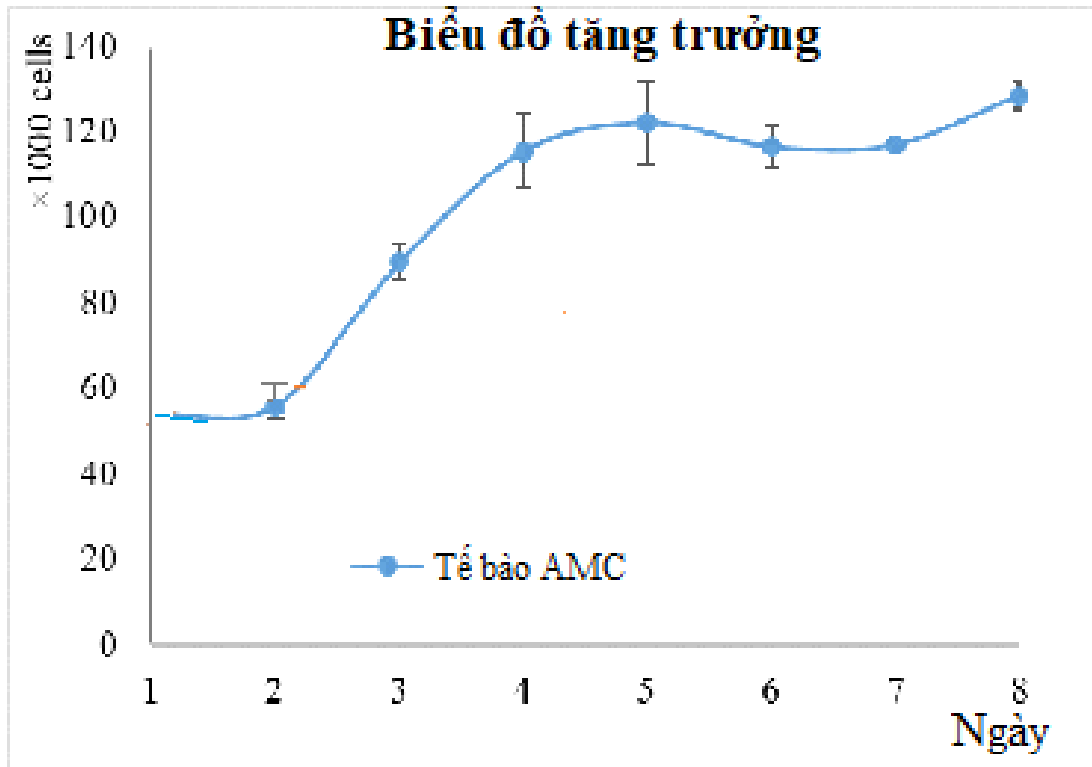


Hình 3.3. Tế bào AMC sau 2 ngày ở lần cấy chuyển 4

Thời gian bám dính tế bào và tốc độ sinh trưởng trong nghiên cứu này tương tự như báo cáo của Phuong và cộng sự năm 2018 [83]. Họ đã thành công trong việc phân lập và nuôi cấy MSC từ mô mỡ bằng phương pháp không sử dụng enzyme. Theo Luna và cộng sự (2014), đối với AMC chuột, tại thời điểm thu mẫu, hình thái và kích thước của tế bào không đồng nhất, tỷ lệ kích thước tế bào lớn/nhỏ có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như giới tính và tuổi của chuột [82].

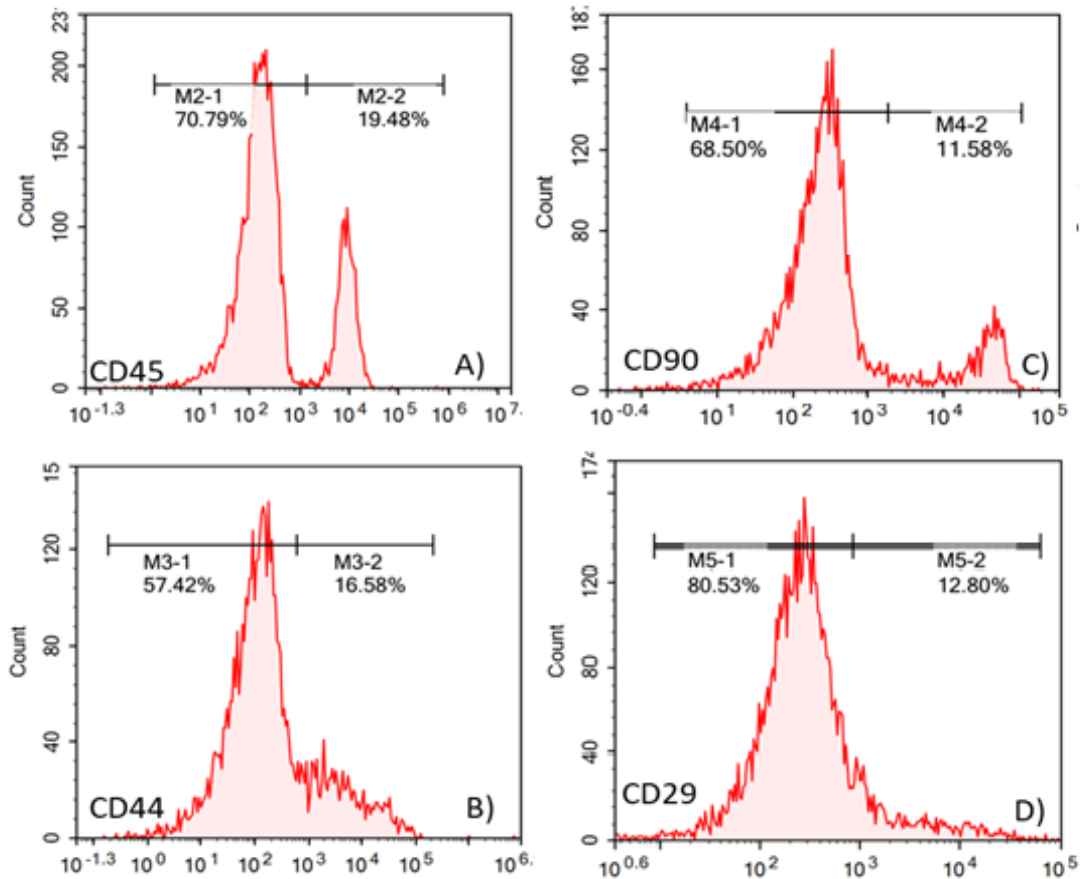
Tốc độ tăng trưởng của tế bào (Hình 3.4) thể hiện đầy đủ các pha sinh trưởng của tế bào, tăng nhanh và cao nhất ở ngày thứ 5 rồi có xu hướng dừng lại. Ngày 1 và ngày 2 tế bào bắt đầu thích nghi với môi trường, số lượng tế bào không tăng nhiều (pha tiềm phát). Đến ngày thứ 3, tế bào bắt đầu phân chia, số lượng tế bào tăng theo lũy thừa (pha Log), tăng nhanh đến ngày thứ 5 và bắt đầu có xu hướng dừng lại. Ở thời điểm này, số lượng tế bào đạt cực đại

gần 120.000 tế bào gấp hơn 2 lần so với lượng tế bào ban đầu (50.000 tế bào), rồi chuyển sang pha cân bằng. Và cuối cùng là pha suy vong, tế bào giảm dần ở ngày thứ 6 do các tế bào bị phân huỷ nhiều, chất dinh dưỡng cạn kiệt.



Hình 3.4. Tốc độ tăng trưởng của tế bào AMC trong 7 ngày

Một trong số đánh giá để chứng minh tế bào phân lập được là tế bào gốc trung mô đó là có biểu hiện với một số chỉ thị bề mặt như CD90, CD73, CD90, CD105, CD44 và âm tính với CD45 và CD31 [38]. Sau khi nuôi cấy, tế bào ở lần cấy chuyển thứ 2 được xử lý và nhuộm huỳnh quang có gắn các marker để chạy flow kiểm tra. Các biểu hiện một số chỉ thị bề mặt của tế bào AMC sau khi phân lập và sau lần cấy chuyển thứ hai được thể hiện trong Bảng 3.1, Hình 3.5 và Hình 3.6 với marker CD29, CD90, CD44 và CD45. Quá trình kiểm tra cho thấy rằng các biểu hiện dương tính của CD29, CD90 và CD44 trong AMC tăng lên ở những lần cấy chuyển sau so với các biểu hiện trong các tế bào tại thời điểm mới phân lập. Ngược lại, với chỉ thị CD45 biểu hiện dương tính giảm mạnh ở thời điểm mới phân lập so với lần cấy chuyển 2, điều đó có nghĩa tế bào AMC âm tính với CD45.



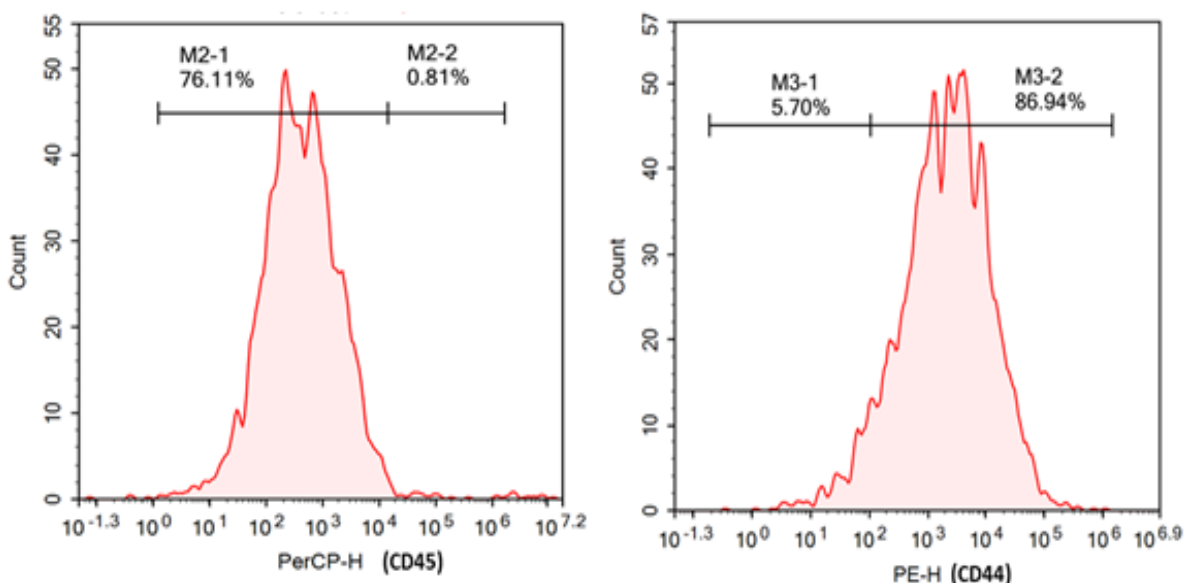
Hình 3.5. Biểu thị các dấu hiệu bề mặt của tế bào sau khi phân lập

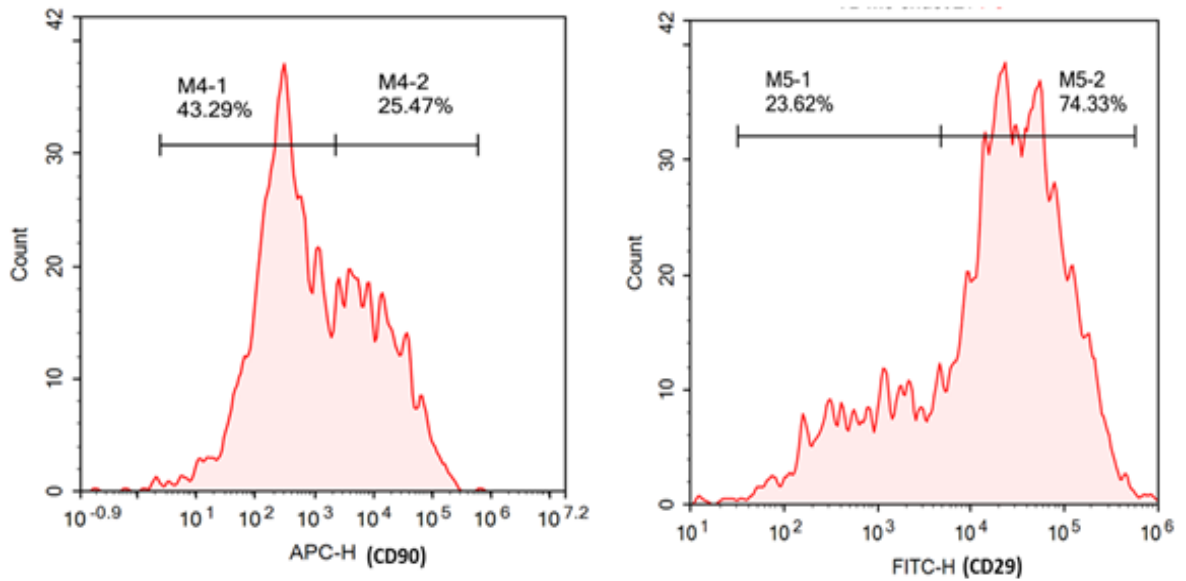
Tỷ lệ tế bào dương tính với dấu hiệu CD45 (dấu hiệu đặc hiệu của tế bào gốc máu) là 19,48% sau khi phân lập và giảm xuống còn 0,81% sau lần cấy chuyển 2, điều này có thể được giải thích rằng do ở thời điểm mới phân lập, có lẫn nhiều các tế bào khác ngoài tế bào gốc mỡ đặc biệt là các tế bào gốc máu nên biểu hiện của CD45 sẽ cao hơn ở giai đoạn này và cao gấp hơn 20 lần so với biểu hiện ở những lần cấy chuyển tiếp, sau khi thay môi trường nuôi hay qua một số lần cấy chuyển, tế bào gốc trung mô mỡ dần ổn định và đồng nhất hơn, lúc này biểu hiện của CD45 giảm dần và đồng nghĩa với việc biểu hiện của các chỉ thị bề mặt của tế bào gốc trung mô tăng lên. Cụ thể, tỷ lệ tế bào dương tính với các dấu hiệu bề mặt biểu thị đối với MSC ở lần cấy chuyển thứ 2 tăng cao: CD44 tăng gấp 5 lần, CD90 tăng gấp đôi và CD29 tăng gần 6 lần so với thời điểm mới phân lập. Tại thời điểm phân lập chỉ có 16,54%, 11,58%, 12,8% số tế bào dương tính với CD44, CD90 và CD29 tương ứng, trong khi tỷ lệ này ở lần cấy chuyển thứ hai lần lượt là 86,94%, 25,47%, 74,33%.

Bảng 3.1. Phân tích tế bào học dòng chảy của tế bào phân lập từ mô mỡ

| Marker chỉ thị | Tế bào sau khi phân lập | Tế bào ở lần cấy chuyển 2 |
|----------------|-------------------------|---------------------------|
| CD45+ | 19,48 % | 0,81 % |
| CD44+ | 16,54 % | 86,94 % |
| CD90+ | 11,58 % | 25,47 % |
| CD29+ | 12,8 % | 74,33 % |

Ở thí nghiệm của Luna và cộng sự [82], tỷ lệ tế bào dương tính với chỉ số CD45 nằm trong khoảng từ $5,6 \pm 0,9\%$ đến $24,5 \pm 2,8\%$ và tỷ lệ phần trăm dương tính với CD90 nằm trong khoảng từ $51,5 \pm 4,2\%$ đến $75,8 \pm 3,7\%$ tùy thuộc vào nhóm và không thay đổi về môi trường. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ tế bào dương tính với CD45 giảm xuống còn 0,81%, thấp hơn so với nghiên cứu của Luna. Tuy nhiên, kết quả biểu hiện của chỉ thị MSC cụ thể trong nghiên cứu này thấp hơn so với một số nghiên cứu khác. Theo Taha và Hedayati [84], các tế bào cho thấy 99% dương tính với CD29 và 98% với CD44, các tế bào không phản ứng với CD31 và chỉ 1% tế bào dương tính với CD11b và CD45. Tương tự như vậy, Maddox và cộng sự cho thấy mức độ biểu hiện của CD44 là 98%, trong khi đó CD90 là 2% ở cây chuyển 3 [85].

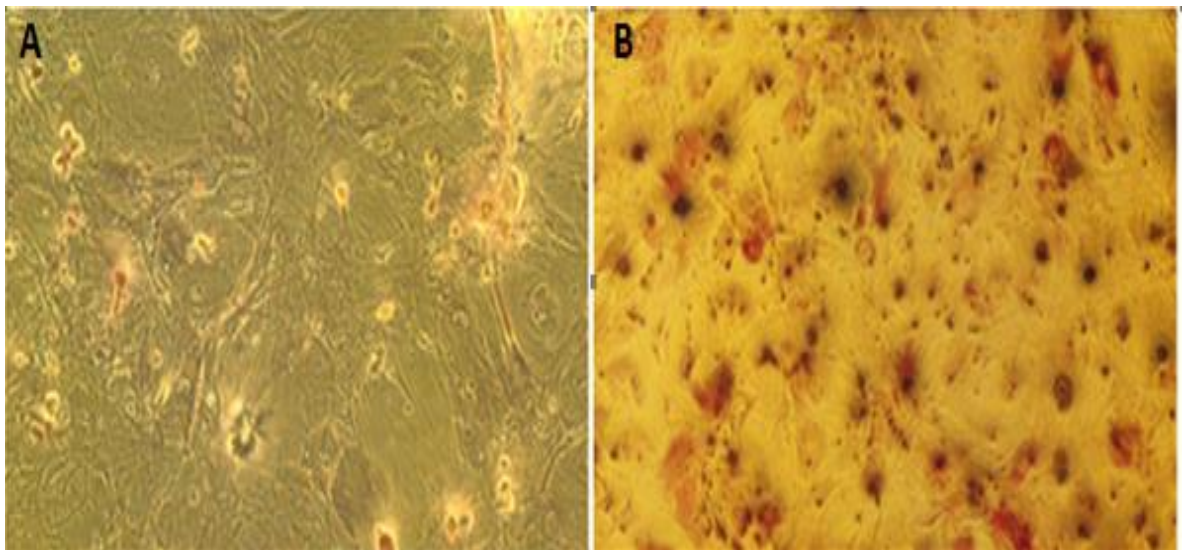




Hình 3.6. Biểu thị các dấu hiệu bề mặt của tế bào sau giai đoạn cấy chuyển 2

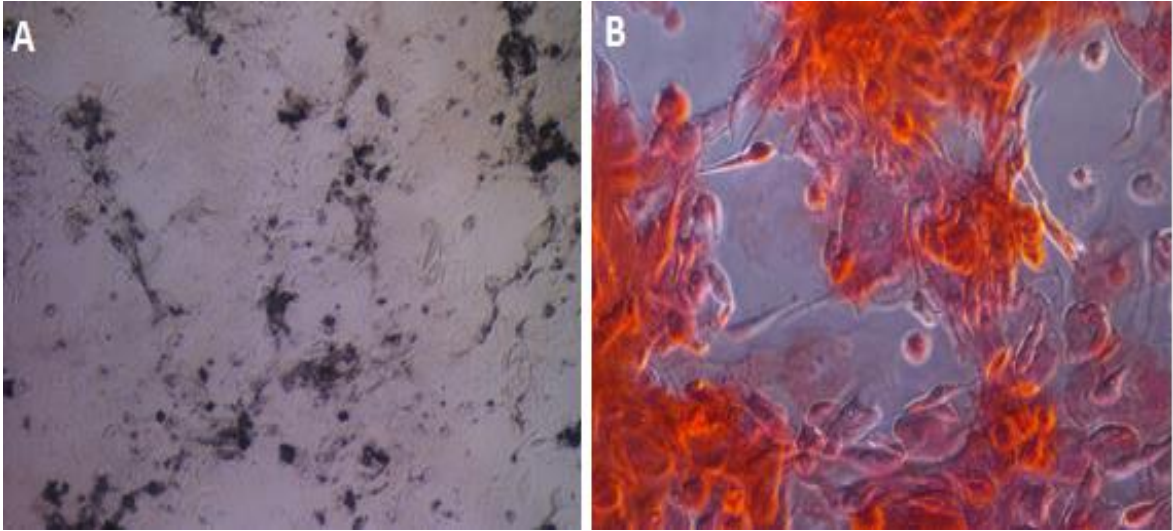
PerCP-H (CD45), PE-H (CD44), APC-H (CD90), FITC-H (CD29).

Vào ngày thứ 21 tiếp xúc với môi trường biệt hóa tạo mỡ, như thể hiện trong Hình 3.7A, các tế bào giống như tế bào mỡ xuất hiện với các không bào giàu lipid, được nhuộm bằng Oil red O (Hình 3.7A). Ngược lại, các tế bào đối chứng giữ nguyên hình thái và không có sự tích tụ lipid trong tế bào chất của chúng (Hình 3.7A và 3.7B). Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với công bố của Thụy và cộng sự [86] và những người khác [83].



Hình 3.7. Tế bào AMC biệt hóa thành mỡ

(A) AMC chuột ở giai đoạn cấy chuyển 2 vào ngày 21 sau khi biệt hoá (kiểm soát âm tính). (B) AMC của chuột được tạo ra trong môi trường biệt hóa sau 21 ngày và được nhuộm bằng Oil red O (Vật kính 20x)



Hình 3.8. Tế bào AMC biệt hóa thành xương

(A) AMC chuột ở giai đoạn cấy chuyển 2 vào ngày 21 sau biệt hoá thành xương trước khi nhuộm. (B) AMC sau biệt hoá thành xương nhuộm bằng Alizarin. (Vật kính 20x)

Cùng với sự biệt hoá tạo mỡ, nghiên cứu tiến hành đồng thời cho AMC biệt hoá tạo xương (Hình 3.8A). Sau 21 ngày nuôi trong môi trường biệt hoá, tế bào khi được nhuộm với Alizarin red, thấy xuất hiện các tinh thể màu và gần như toàn bộ đĩa nuôi bắt màu với Alizarin red (Hình 3.8B), ngược lại với đó là sự không bắt màu của tế bào nuôi trong môi trường không bổ sung các chất kích thích tạo cặn canxi xung quanh tế bào.

3.2. KẾT QUẢ THEO DÕI MỨC ĐỘ TĂNG TRỌNG VÀ TỈ LỆ SỐNG SÓT CỦA CHUỘT THÍ NGHIỆM SAU TIÊM TẾ BÀO

Đối với quá trình đánh giá sự ảnh hưởng của tế bào gốc mỡ lên khả năng hình thành và phát triển ung thư vú qua các lô thí nghiệm, bên cạnh nhiều yếu tố đánh giá về thể trạng thì việc theo dõi mức độ tăng trọng cũng như tỉ lệ sống/chết của chuột là cần thiết. Các kết quả nghiên cứu về mức độ tăng trọng kể từ khi tiêm tế bào vào chuột ở các lô thí nghiệm cho đến các thời điểm 1, 2, 3 tuần sau tiêm cũng như tỉ lệ sống/chết của chuột trong báo cáo này được thể hiện ở bảng 3.2. Sự tăng trọng của chuột thay đổi qua từng tuần và khác nhau ở mỗi nhóm tiêm tế bào khác nhau.

Bảng 3.2. Tốc độ tăng trọng của chuột thí nghiệm và tỉ lệ chuột sống/chết ở từng lô thí nghiệm

| Tuần tuổi chuột | | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 |
|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Lô TN 1 | Tăng trọng (gam) | 1,32 ± 0,61 ^a | 2,16 ± 0,54 ^a | 4,53 ± 0,55 ^b |
| | Số chuột chết | 0 | 0 | 0 |
| Lô 2 | Tăng trọng (gam) | -2,24 ± 2,11 ^a | -0,18 ± 0,57 ^a | 5,04 ± 0,78 ^b |
| | Số chuột chết | 0 | 0 | 0 |
| Lô 3 | Tăng trọng (gam) | 5,07 ± 0,18 ^a | 3,21 ± 0,1 ^b | 3,06 ± 0,12 ^c |
| | Số chuột chết | 0 | 0 | 0 |
| Lô 4 | Tăng trọng (gam) | 5,82 ± 0,4 ^a | 4,57 ± 0,32 ^b | 6,97 ± 0,25 ^c |
| | Số chuột chết | 0 | 0 | 0 |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$)

Trong nghiên cứu tiền lâm sàng, tế bào 4T1 đã được sử dụng để nghiên cứu sự di căn của ung thư vú vì chúng có thể di căn đến phổi, gan, hạch bạch huyết, não và xương [17], mặt khác khối u 4T1 còn gây ra phản ứng bạch cầu với lách to sau khi cấy ghép chính hình vào đệm mỡ ở vú của chuột Balb/c cái [87]. Kết quả ở bảng cho thấy mức độ tăng trọng của chuột ở lô thí nghiệm 1 và 2 tăng còn lô 3 giảm so với lô đối chứng 4 (với mức độ tin cậy $P < 0,05$). Trong thời gian tiêm tế bào AMC ở lô 1 (tại thời điểm sau tiêm 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần) không có hiện tượng giảm cân nhưng mức độ tăng trọng cũng thấp hơn so với lô đối chứng 4. Chuột ở lô 2 là nhóm được tiêm tế bào 4T1 (1 triệu tế bào/con) có hiện tượng giảm cân sau 1 và 2 tuần tiêm ở mức độ tăng trọng âm lần lượt - 2,24 gam và - 0,18 gam, nhưng đến tuần 3 thì cân nặng của chuột tăng lên (5,04 ± 0,78 gam) đáng kể. Ở lô thí nghiệm 3, cân nặng của chuột giảm dần ở tuần 2 (3,21 ± 0,1 gam), tuần 3 (3,06 ± 0,12 gam) so với

tuần 1 ($5,07 \pm 0,18$ gam) và giảm so với lô đối chứng. Sự sai khác này là có ý nghĩa ở mức thống kê với $P < 0,05$. Hơn nữa, ở các thời điểm khác nhau trên mỗi lô thí nghiệm đều không thấy có chuột chết, điều này đồng nghĩa với tỉ lệ sống của chuột là 100 %.

Như vậy, có thể thấy rằng việc tiêm tế bào ung thư 4T1 và tế bào 4T1 cùng với AMC vào chuột có ảnh hưởng tới mức độ tăng trọng và không ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ sống sót của chuột thí nghiệm. Việc tiêm tế bào ung thư 4T1 vào chuột sau đánh giá ở những thời điểm ban đầu mức độ tăng trọng của chuột càng giảm.

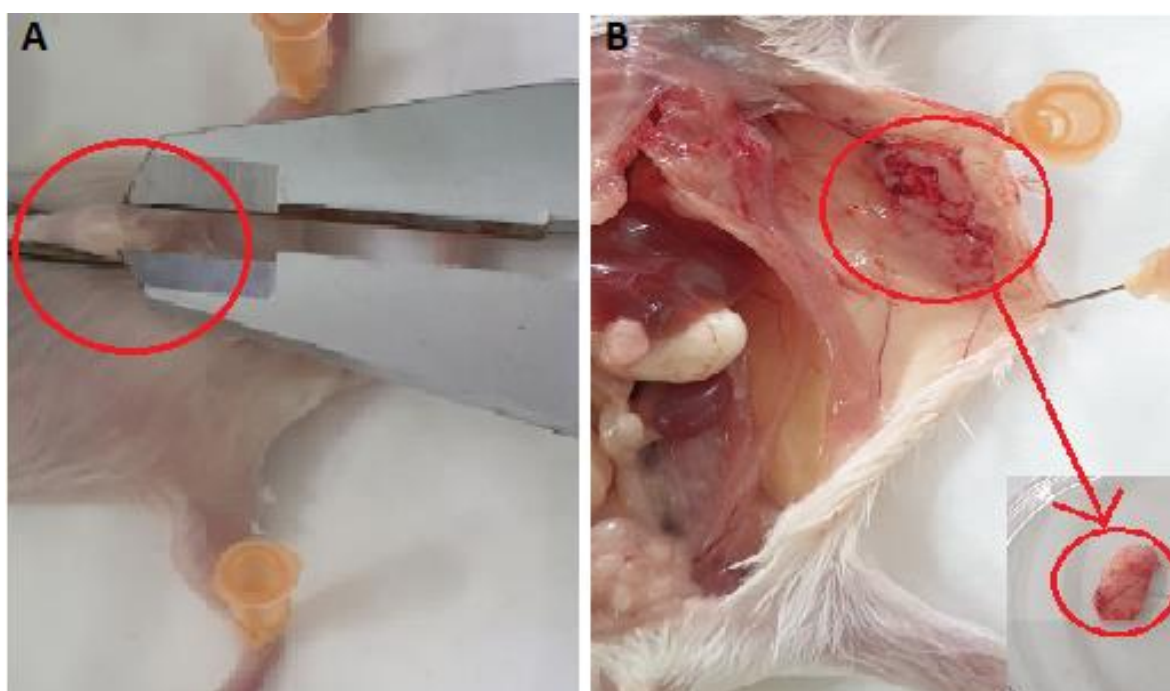
3.3. KẾT QUẢ THEO DÕI HÌNH THÀNH KHỐI U

Trong quá trình theo dõi và đánh giá chuột ở các lô thí nghiệm khác nhau, việc phát hiện các khối u bằng biện pháp sờ nắn và kiểm tra trực quan bằng mắt thường với tần suất mỗi 2 lần 1 tuần để phát hiện sự khác biệt cũng như xác định vị trí xuất hiện khối u và dùng thước kẹp để đo kích thước của khối u tại các thời điểm tuần 1, tuần 2 và tuần 3 sau tiêm. Toàn bộ chuột ở các lô thí nghiệm được mổ ở 1, 2, 3 tuần để kiểm tra sự xuất hiện của khối u. Các khối u sẽ được tách và tiến hành tách RNA, tổng hợp cDNA để chạy qPCR kiểm tra biểu hiện gen, và đánh giá một số chỉ tiêu khác trong những nghiên cứu tiếp theo.

Việc đồng nuôi cấy tế bào ung thư vú với tế bào mỡ làm tăng sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của tế bào ung thư. Tuy nhiên, bản chất của sự tương tác giữa tế bào mỡ trưởng thành và tế bào ung thư vú vẫn chưa rõ ràng [88], [89]. Hơn nữa, việc đồng nuôi cấy các tế bào mỡ với các tế bào ung thư vú làm thay đổi hệ bài tiết của các tế bào mỡ để trở thành tiền sinh khối u nhiều hơn [89].

Kết quả nghiên cứu cho thấy chuột ở lô tiêm tế bào 4T1 xuất hiện khối u ở cả 3 thời điểm sau tiêm, vị trí khối u tại vùng tiêm tế bào (tuyến vú chân sau trái, Hình 3.9 A, B). Các lô thí nghiệm khác (lô 1, 3, 4) không có biểu hiện bất thường hay xuất hiện khối u (Hình 3.10 A, B). Kết quả thể hiện ở bảng 3.3. Ở lô thí nghiệm chuột tiêm tế bào 4T1, có 6/9 con chuột xuất hiện khối u tuyến vú, mỗi tuần có 2 chuột tạo u và 3/9 chuột không xuất hiện u nào. Trong khi lô đối chứng (lô 4) không thấy xuất hiện các khối u ở bất kì vị trí

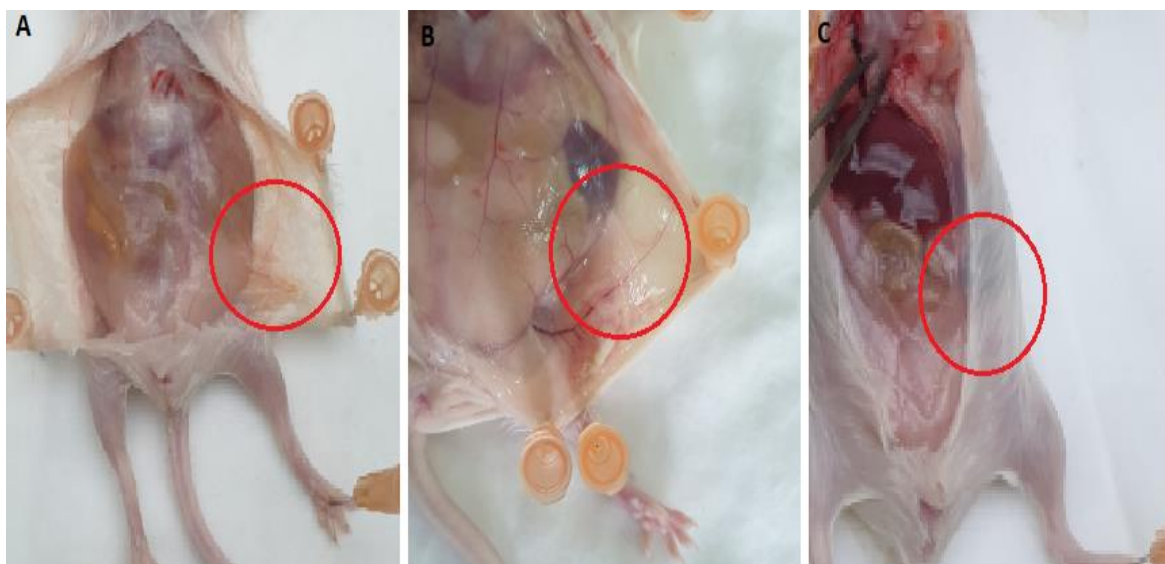
nào trên cơ thể chuột. Có thể do điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, môi trường, chế độ ăn uống) hay một số lý do khác mà số lượng tế bào 4T1 tiêm vào chuột lớn hơn (1 triệu tế bào 4T1/con) và thời gian hình thành khối u trên chuột trong thí nghiệm của chúng tôi có sự khác so với nghiên cứu của Luo và cộng sự vào năm 2020 [90] là khoảng một đến hai tuần sau tiêm tế bào 4T1, chuột hình thành khối u trong ống tuyến vú cụ thể các khối u được sờ thấy trong vòng 10 ngày ở chuột tiêm 100.000 tế bào/con và trong vòng 12 ngày ở chuột tiêm 40.000 tế bào/con [90].



Hình 3.9. Hình ảnh khối u chuột tiêm tế bào 4T1

A) khối u chuột đo dưới thước kẹp. B) khối u sau khi mổ chuột

Theo nghiên cứu của Ong và cộng sự năm 2018 [91], chuột cái BalB/c 6-8 tuần tuổi sau khi ổn định và thích nghi với điều kiện thí nghiệm, chúng được tiêm 5×10^4 tế bào 4T1 trong 100 μ l PBS thì sự phát triển của khối u được đánh giá bằng hình thái học và thể tích khối u đạt 50-100 mm^3 nó tương đương với kết quả tạo khối u ở chuột tiêm 4T1 trong thí nghiệm này sau 3 tuần kể từ thời điểm tiêm là 83,87 mm^3 . Thể tích và khối lượng khối u theo tuần giảm lần lượt từ tuần 1, 2 đến tuần 3. Ở tuần 2, thể tích khối u trung bình là $812,54 \pm 52,6 \text{ mm}^3$ tương ứng với khối lượng trung bình $0,16 \pm 0,04 \text{ gam}$. Điều này thể hiện đồng đều ở cả tuần 1 và tuần 3.



Hình 3.10. Hình ảnh chuột không có khối u

A) chuột đối chứng lô 4, B) chuột tiêm tế bào AMC, C) chuột tiêm tế bào AMC + 4T1

Thể tích khối u chuột được tính theo công thức: $V = 1/2 \cdot a \cdot b^2$, đơn vị mm^3 . Trong đó, a là chiều dài khối u (mm), b là chiều rộng khối u (mm) [91].

Bảng 3.3. Kết quả tạo khối u tuyến vú ở chuột thí nghiệm

| Lô TN | Số chuột TN | U tuyến vú | | | | | | | |
|-------|-------------|---------------|---|------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | | Số chuột có u | Thể tích trung bình khối u tuyến vú (mm^3) | | | Khối lượng trung bình khối u tuyến vú (gam) | | | |
| | | | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 | |
| Lô 1 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lô 2 | 9 | 6/9 | 1034,56 $\pm 78,87^a$ | 812,54 $\pm 52,6^b$ | 83,87 \pm 20,47 ^c | 0,38 \pm 0,19 ^a | 0,16 \pm 0,04 ^a | 0,03 \pm 0,005 ^b | |
| Lô 3 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Lô 4 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng của mỗi đơn vị (thể tích, khối lượng) có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$)

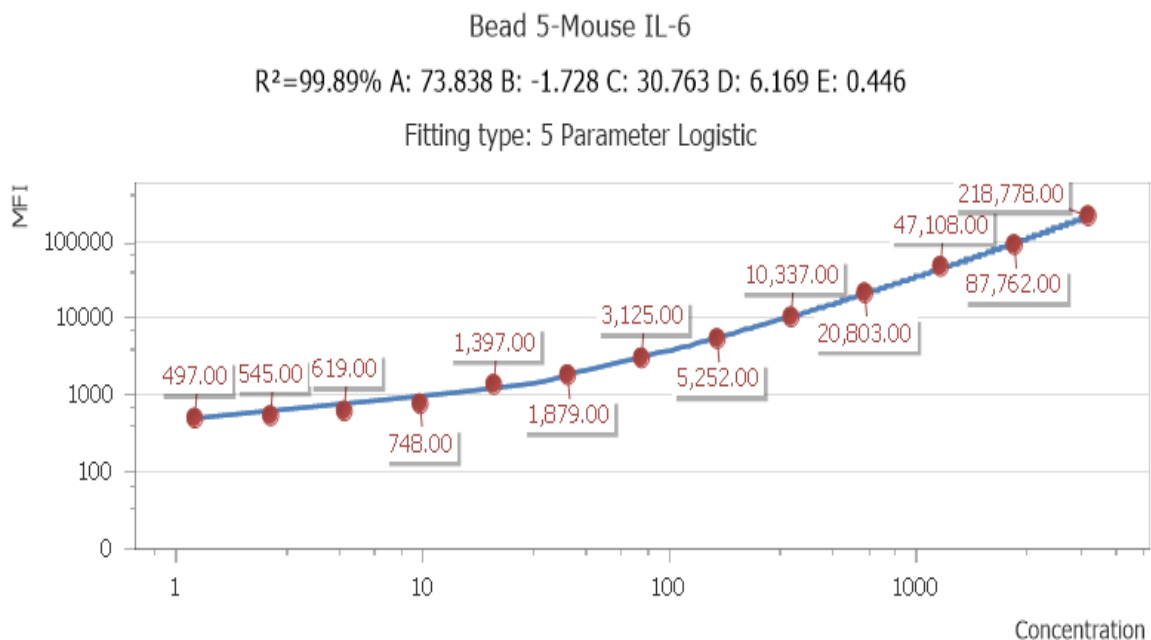
Ngoài ra, kết quả ở bảng 3.3 cũng cho thấy chuột ở lô thí nghiệm 2 đều có thể tích khối u cũng như khối lượng của khối u giảm dần qua từng tuần kể từ sau khi tiêm. Cụ thể, thể tích khối u tuần 1 ($1034,56 \text{ mm}^3$) cao hơn 12 lần so với khối u tuần 3 ($83,87 \text{ mm}^3$). Cùng với đó khối lượng khối u cũng giảm từ tuần 1 đến tuần 3, khối lượng u trung bình tuần 1 là $0,38 \pm 0,19 \text{ g}$ nhưng sang tuần 3 cũng giảm đi nhiều lần còn trung bình khoảng $0,03 \pm 0,005 \text{ g}$. Tuy nhiên, sự tăng trọng này cũng thấp hơn nhiều lần so với trong nghiên cứu của Ong và cộng sự [92], trọng lượng khối u là $2,08 \pm 0,426 \text{ g}$.

Như vậy, việc tiêm tế bào ung thư vú 4T1 vào chuột có ảnh hưởng đến khả năng hình thành khối u của chuột, biểu hiện rõ nhất về kích thước cũng như khối lượng khối u ở tuần đầu tiên sau tiêm và giảm dần ở tuần 2, tuần 3 ở mức ý nghĩa thống kê $P < 0,05$.

3.4. ĐỊNH LƯỢNG CYTOKINE

3.4.1. Xác định đường chuẩn giữa các phép đo

Dựa vào các mẫu chuẩn, trong nghiên cứu này đã xây dựng được đường chuẩn để tiến hành định lượng các Cytokine trong máu chuột. Dưới đây là các kết quả đường chuẩn cho các cytokine được đề cập đến ở trong nghiên cứu.



Hình 3.11. Đường chuẩn cho IL-6

Bảng 3.4. Kết quả xây dựng đường chuẩn IL-6

| Name | Event # | MFI | SD | CV% (MFI) | Nominal CC pg/mL | Fitted CC pg/mL | Recovery % |
|--------|---------|--------|----------|-----------|------------------|-----------------|------------|
| Std015 | 972 | 218778 | 33049.93 | 14.27 | 5000 | 5129.72 | 102.59 |
| Std016 | 946 | 87762 | 14649.57 | 15.55 | 2500 | 2339.89 | 93.60 |
| Std017 | 1062 | 47108 | 8062.93 | 16.67 | 1250 | 1339.80 | 107.18 |
| Std018 | 1009 | 20803 | 3883.30 | 17.61 | 625 | 620.34 | 99.25 |
| Std019 | 1006 | 10337 | 1831.94 | 16.94 | 312.50 | 306.68 | 98.14 |
| Std020 | 966 | 5252 | 895.49 | 17.16 | 156.25 | 146.42 | 93.71 |
| Std021 | 1092 | 3125 | 503.16 | 15.36 | 78.13 | 78.54 | 100.53 |
| Std022 | 1047 | 1879 | 271.32 | 15.19 | 39.06 | 39.65 | 101.52 |
| Std023 | 968 | 1397 | 271.13 | 18.67 | 19.53 | 25.28 | 129.42 |
| Std029 | 962 | 748 | 140.11 | 17.90 | 9.77 | 7.50 | 76.80 |
| Std030 | 862 | 619 | 225.54 | 37.98 | 4.88 | 4.35 | 89.07 |
| Std031 | 779 | 545 | 197.93 | 32.99 | 2.44 | 2.58 | 105.88 |
| Std032 | 1600 | 497 | 203.86 | 42.72 | 1.20 | 1.36 | 113.21 |

Tất cả đường chuẩn được xây dựng dựa trên 13 nồng độ chuẩn cao nhất là 5000 pg/ml pha loãng lần lượt 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312.50 pg/ml, 156.25 pg/ml, 78.13 pg/ml, 39.06 pg/ml, 19.53 pg/ml, 9.77 pg/ml, 4.88 pg/ml đến nồng độ cuối cùng là 1,2 pg/ml. So với các nồng độ pha loãng của đường chuẩn trong bộ kit cytokine Th1/Th2/Th17 của chuột BDCBA chỉ pha loãng đến 20 pg/ml, nhưng nồng độ các cytokine trong máu của chuột thí

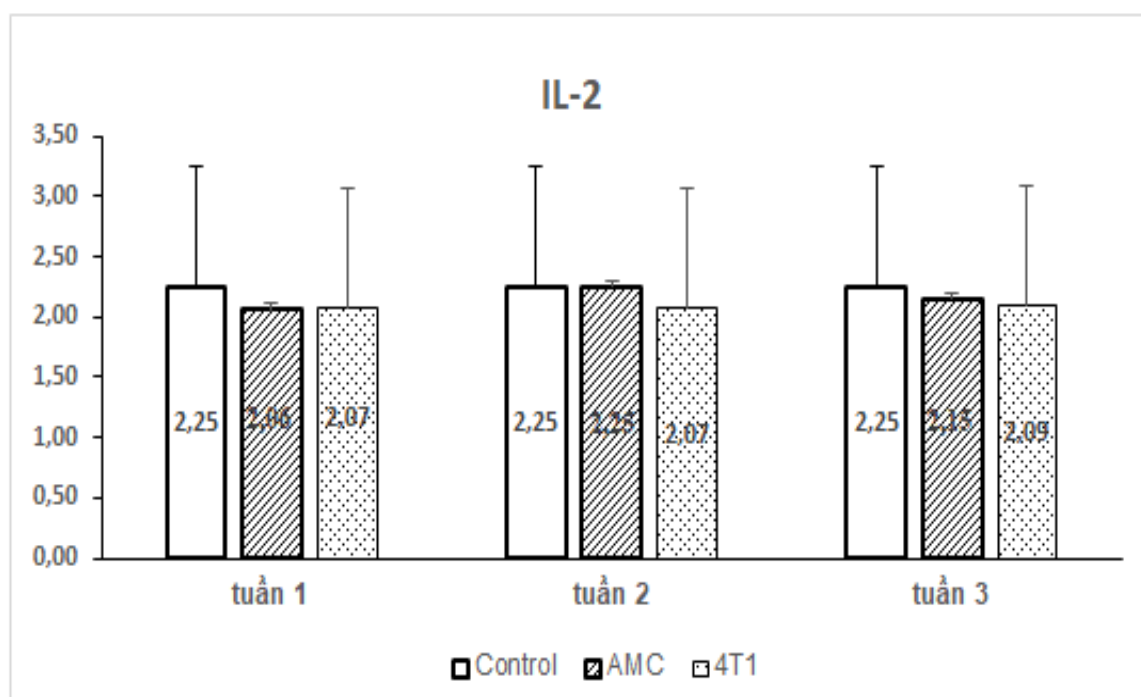
nghiệm khá thấp, nên đường chuẩn được xây dựng cả ở nồng độ thấp hơn (1,2 pg/ml).

Trong đường chuẩn của IL-6 ở Hình 3.8 và các thông số trình bày ở bảng 3.4, kết quả trên thực tế có chênh lệch so với lý thuyết ví dụ nồng độ chuẩn 5000 pg/ml thì kết quả thực là 5129,72 pg/ml với tỉ lệ chênh lệch là 102,59 %, tương tự với những nồng độ pha loãng còn lại.

Tương tự như ở đường chuẩn của IL-6, hệ số tương quan R^2 của các đường chuẩn đa số đều đạt trên 99 % cụ thể giá trị R^2 lần lượt 99,83 %; 99,39 %; 99,65 % tương ứng lần lượt của IL-10, IL-17A, IL-4. Bên cạnh đó cũng có sự chênh lệch về giá trị nồng độ trên lý thuyết và trên thực tế cũng như tỉ lệ chênh lệch. Riêng hệ số tương quan trong đường chuẩn của IL-2 thấp hơn (98,07 %) nhưng không đáng kể, điều đó cho thấy độ tin cậy cao trong các đường chuẩn được xây dựng.

3.4.2. Hàm lượng IL-2 trong huyết thanh

IL-2 kích hoạt các tế bào lympho T gây độc tế bào, rất quan trọng đối với khả năng miễn dịch ung thư. Nồng độ trung bình của IL-2 trong huyết thanh ở bệnh nhân mắc ung thư vú cao hơn so với người bình thường [93].

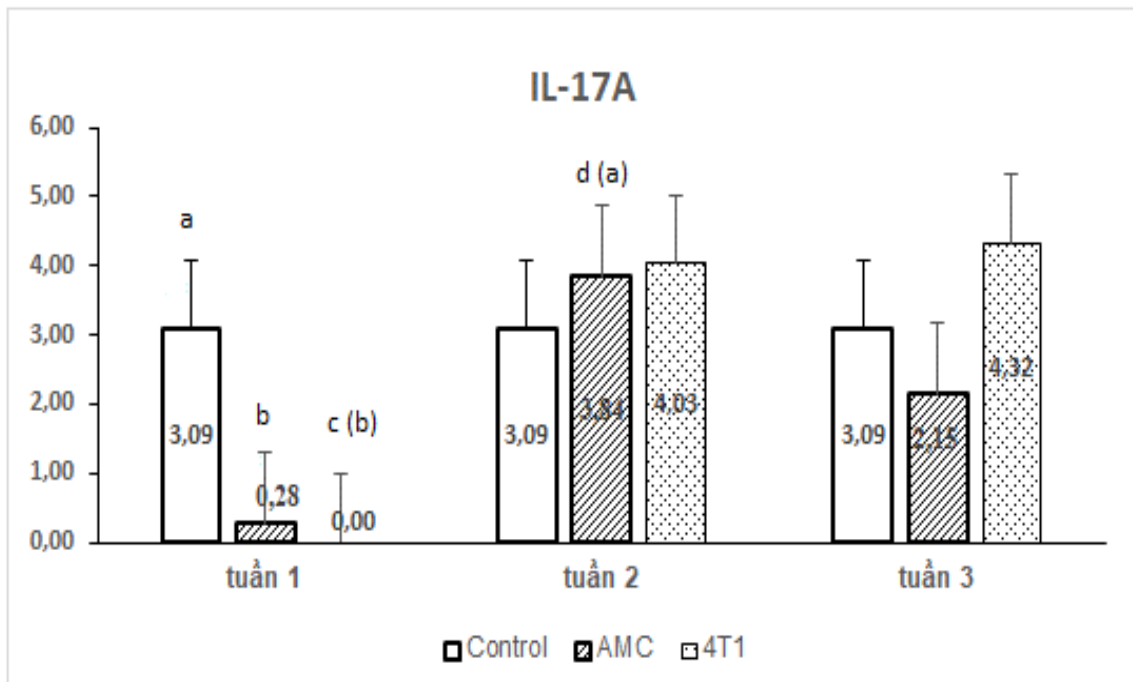


Hình 3.12. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-2 trong huyết thanh (pg/ml)

Trên mô hình nghiên cứu này, kết quả được thể hiện ở Hình 3.14 lại thể hiện sự tương đồng nhau, không có quá nhiều chênh lệch giữa các tuần trong mỗi lô thí nghiệm và giữa các lô thí nghiệm với nhau, đặc biệt là ở lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC và lô tiêm tế bào 4T1 so với lô đối chứng. Như trong lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC, hàm lượng IL-2 ở tuần 1, 2, 3 tương ứng là $2,06 \pm 0,1$; $2,25 \pm 0,13$; $2,15 \pm 0,02$ (pg/ml), tương tự với lô thí nghiệm 2 hàm lượng IL-2 lần lượt từ tuần 1 đến tuần 3 là $2,07 \pm 0,01$; $2,07 \pm 0,05$; $2,09 \pm 0,03$ (pg/ml) và lô đối chứng trung bình là $2,25 \pm 0,07$ pg/ml. Kết quả này cho thấy giữa các lô thí nghiệm không có quá nhiều khác biệt.

3.4.5. Hàm lượng IL-17A trong huyết thanh

IL-17A là một cytokine tiền viêm có liên quan đến tiên lượng xấu trong ung thư vú [94]. Do chuỗi thụ thể IL-17 biểu hiện cao trên các tế bào khối u, IL-17A có tác dụng trực tiếp lên các tế bào này [94].



Hình 3.13. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-17A trong huyết thanh (pg/ml).

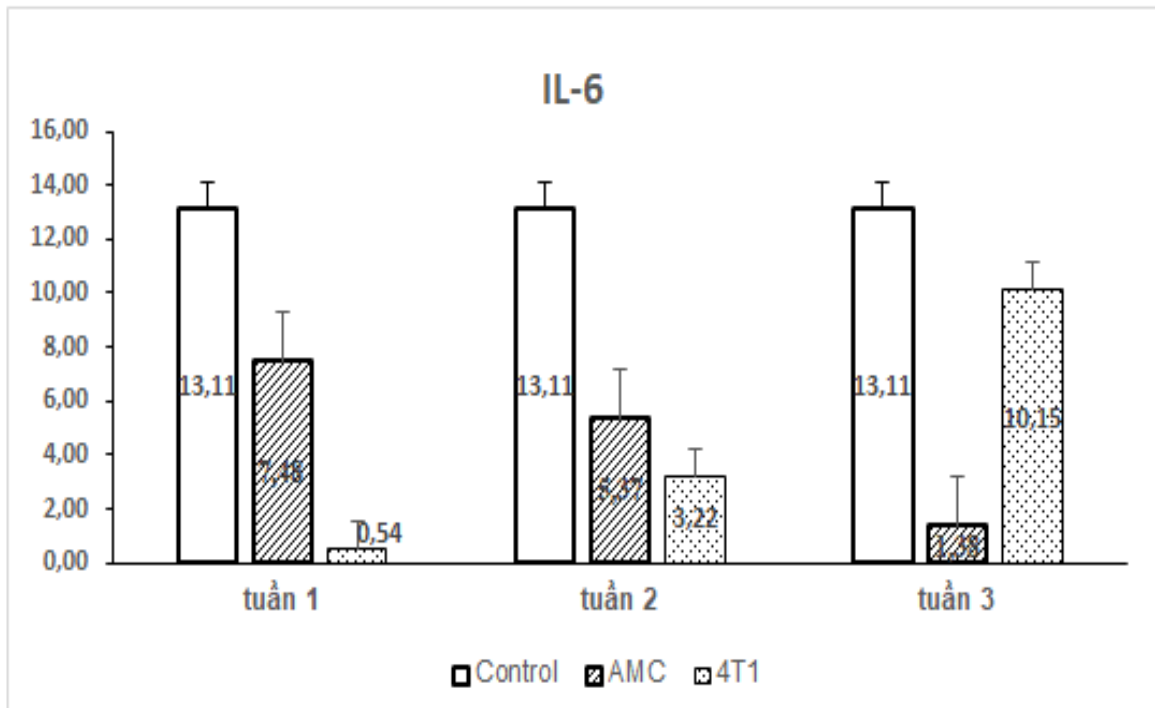
(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt theo thống kê)

Năm 2013, Cochaud và cộng sự [11] đã báo cáo rằng các tế bào sản xuất IL-17A tăng cao trong các khối u vú và IL-17A tăng dương như chủ yếu liên quan đến các khối u âm tính với thụ thể estrogen. Chúng tôi đã tiến hành đánh giá nồng độ IL-17A trong huyết thanh ở chuột tiêm tế bào ung thư vú 4T1 và thấy rằng nồng độ IL-17A tăng lên, rõ nhất ở tuần 2 ($4,03 \pm 0,53$

pg/ml), tuần 3 ($4,32 \pm 0,06$ pg/ml) và không biểu hiện ở tuần 1 (Hình 3.17). Mặt khác so với khối lượng và kích thước khối u, thì nồng độ IL-17A này không tương quan, kết quả của chúng tôi ngược lại với báo cáo của Cochaud và cộng sự [11]. Ở lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC, nồng độ IL-17A biểu hiện cao nhất ở tuần hai với trung bình là 3,84 pg/ml, sang tuần 3 thì thấp hơn với trung bình là 2,15 pg/ml.

3.4.6. Hàm lượng IL-6 trong huyết thanh

IL-6 là một cytokine tiền viêm được giải phóng bởi các tế bào khác nhau trong môi trường vi mô khối u, bao gồm cả tế bào ung thư, và do đó đóng vai trò quan trọng trong việc làm tăng tế bào khối u và khả năng biệt hóa tế bào khối u [12]. Hơn nữa, IL-6 đã được báo cáo là được biểu hiện mạnh mẽ bởi các AMC và là nhân tố chính trong sự gia tăng, di cư và xâm lấn của một số tế bào ung thư [6], nồng độ IL-6 trong huyết thanh tăng thường liên quan đến tiên lượng xấu và tỷ lệ sống sót thấp ở bệnh nhân ung thư vú [13].



Hình 3.14. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-6 trong huyết thanh (pg/ml)

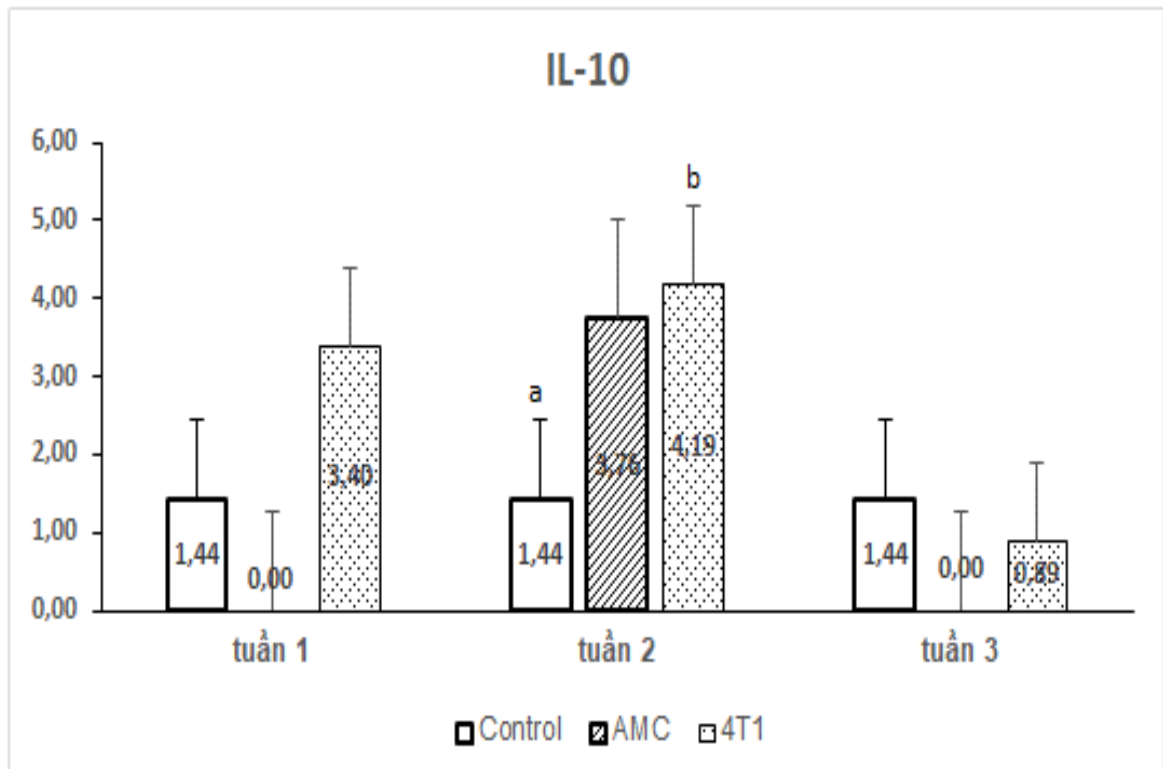
AMC là một thành phần quan trọng trong môi trường vi mô khối u ung thư vú và thông qua tương tác của chúng với hệ thống miễn dịch và bài tiết các yếu tố dinh dưỡng, đóng vai trò không thể thiếu trong quá trình hình thành khối u, phát triển khối u và di căn [7]. AMC thể hiện khả năng điều hòa miễn dịch và thúc đẩy quá trình chữa lành và tái tạo vết thương trong môi

trường điều tiết nội mô. AMC tiết ra nhiều loại interleukin, bao gồm IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 và IL-12 [8].

IL-6 tham gia vào quá trình điều chỉnh kích hoạt, tăng trưởng, phân chia tế bào miễn dịch trong quá trình đáp ứng trong cơ thể và miễn dịch. Hơn nữa, IL-6 đã được báo cáo là được biểu hiện mạnh mẽ bởi các AMC và là nhân tố chính trong sự gia tăng, di cư và xâm lấn của một số tế bào ung thư [6]. Trong bối cảnh này, AMC đã được chứng minh là có khả năng tăng cường sự di chuyển của các tế bào ung thư buồng trứng thông qua con đường trung gian IL-6, điều được xác định tương tự với tế bào ung thư vú [6]. Nồng độ IL-6 trong thí nghiệm này được thể hiện ở Hình 3.18. Ở cả 2 lô thí nghiệm 1 và 2 hàm lượng IL-6 đều thấp hơn so với lô đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt ở các lô đều thể hiện rõ rệt. Cụ thể, nồng độ IL-6 giảm dần từ tuần 1 đến tuần 3 ở lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC, tuần 1 có hàm lượng IL-6 cao nhất (7,48 pg/ml), sau đó giảm dần từ tuần 2 (5,37 pg/ml) đến tuần 3 (1,38 pg/ml), tuần 1 cao gấp hơn 5 lần so với tuần 3, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với lô đối chứng (13,11 pg/ml). Ngược lại, ở lô thí nghiệm tiêm tế bào 4T1, nồng độ IL-6 lại tăng dần, cụ thể $0,54 \pm 0,31$, $3,22 \pm 0,4$ và $10,15 \pm 2,45$ pg/ml tương ứng lần lượt tuần 1, tuần 2, tuần 3. Mặt khác, IL-6 có thể được tiết ra từ tế bào ung thư [12] nên việc tăng nồng độ IL-6 trong lô thí nghiệm 2 đã thể hiện được phần nào sự hình thành khối u ở chuột sau tiêm tế bào 4T1.

3.4.7. Hàm lượng IL-10 trong huyết thanh

IL-10 có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân ngăn chặn sự biệt hóa bạch cầu đơn nhân thành tế bào đuôi gai và chuyển các tế bào đơn nhân thành một phân nhóm tiết IL-10, chống viêm theo vòng phản hồi tích cực [14]. Một vai trò quan trọng đối với việc tăng sản xuất IL-10 qua trung gian MSC đã được chứng minh trong mô hình nhiễm trùng huyết ở chuột trong đó quá trình trung hòa IL-10 đảo ngược tác dụng có lợi của các MSC có nguồn gốc từ tủy xương đối với sự sống còn sau khi gây ra nhiễm trùng huyết thông qua thắt và chọc thủng manh tràng [15]. Trong nghiên cứu của Deng và cộng sự năm 2016, ở giai đoạn đầu sau khi tiêm tế bào 4T1 vào chuột, kích thích tiết IL-10 để chống lại phản ứng viêm [14].



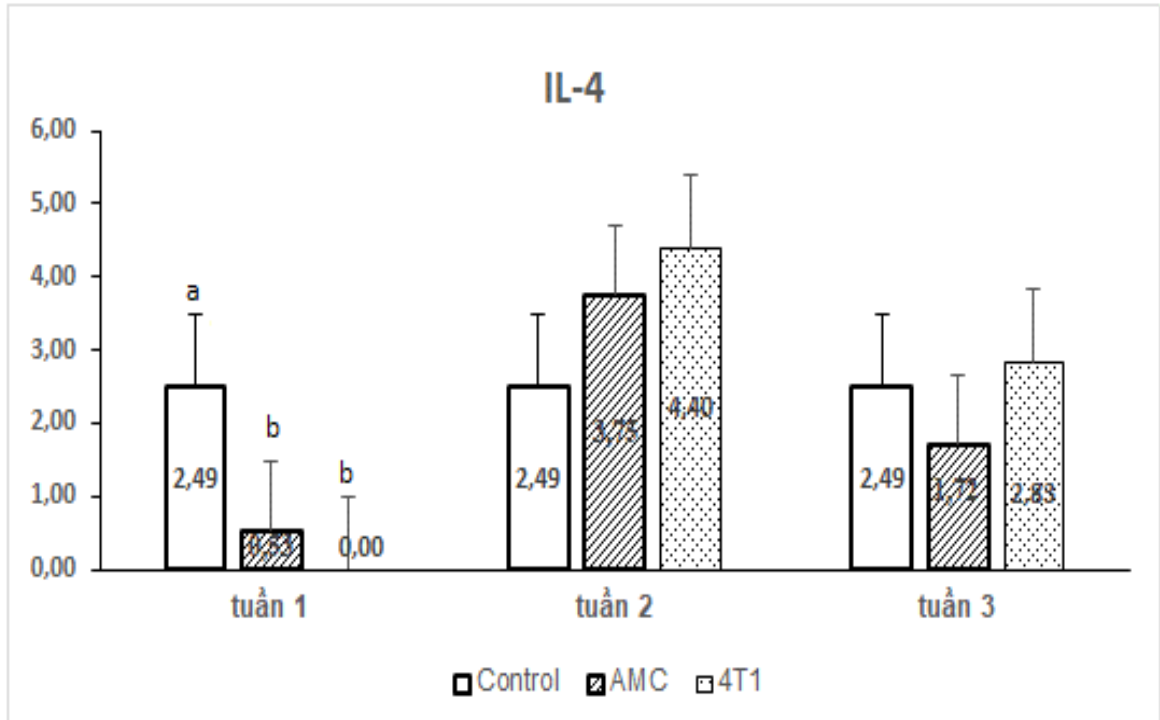
Hình 3.15. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-10 trong huyết thanh (pg/ml)

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt theo thống kê)

Tuy nhiên, với kết quả được thể hiện trên Hình 3.15, hàm lượng IL-10 ở các lô thí nghiệm và giữa các tuần khác nhau có sự thay đổi rõ rệt. Cụ thể, lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC chỉ biểu thị nồng độ IL-10 ở tuần 2 với $3,76 \pm 0,84$ pg/ml và không có biểu hiện ở tuần 1 và 3. Còn ở lô thí nghiệm tiêm tế bào 4T1 có sự chênh lệch rõ ràng giữa 2 tuần đầu (3,4 pg/ml, 4,19 pg/ml lần lượt của tuần 1, tuần 2) so với tuần 3 (0,89 pg/ml), đạt cao nhất ở tuần 2 và hàm lượng IL-10 ở tuần 2 cao gấp hơn 4 lần so với tuần 3 và gần 3 lần so với lô đối chứng.

3.4.8. Hàm lượng IL-4 trong huyết thanh

Tương tự như IL-10, IL-4 cũng là một cytokine chống viêm [43]. Việc tiết IL-4 không ảnh hưởng đến sự phát triển *in vitro* của tế bào ung thư vú, trong khi khả năng hình thành khối u *in vivo* của chúng tương quan nghịch với lượng IL-4 được tiết ra [95]. MSC tạo ra ít nhất 11 yếu tố được biết là có ảnh hưởng đến các tế bào miễn dịch, khi tương tác với tế bào T thì MSC làm tăng IL-4 [27].



Hình 3.16. Biểu đồ biểu thị hàm lượng IL-4 trong huyết thanh (pg/ml)

Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt theo thống kê

Kết quả định lượng IL-4 (Hình 3.16). Ở các lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC và lô tiêm tế bào 4T1, nồng độ IL-4 biểu hiện cao nhất vào tuần 2 và thấp nhất hoặc gần như không biểu hiện ở tuần đầu tiên sau tiêm và có biến động nhẹ so với lô đối chứng 4. Sự chênh lệch trong cùng một tuần giữa lô thí nghiệm tiêm tế bào AMC và lô thí nghiệm tiêm tế bào 4T1 không nhiều. Nồng độ IL-4 của lô thí nghiệm tiêm tế bào 4T1 cao hơn so với lô tiêm tế bào AMC ở tuần 2 và 3. Khác với mức biểu hiện nồng độ của IL-10 (Hình 3.15) giữa lô thí nghiệm 1 và 2 thì biểu hiện của IL-4 rất khó để đánh giá được khả năng kháng viêm của nó.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Phân lập thành công tế bào AMC với khả năng bám dính vào bề mặt đĩa nuôi; có hình dạng tế bào nguyên bào sợi; biểu hiện của CD44, CD90 và CD29 trong AMC và không biểu hiện với CD45 ở lần cấy chuyển thứ 2; có khả năng biệt hoá thành mỡ và thành xương trong môi trường chuyên biệt.
2. Chuột sau tiêm tế bào: không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của chuột; mức độ tăng trọng ở các lô tiêm tế bào tăng nhưng ở mức thấp hơn so với lô đối chứng (lô tiêm tế bào AMC tăng qua các tuần, lô tiêm tế bào 4T1 giảm mạnh ở tuần 1 và 2 sau đó ổn định vào tuần 3, lô tiêm lần hai tế bào giảm dần qua các tuần). Khả năng hình thành khối u chỉ xuất hiện ở chuột trong lô tiêm tế bào 4T1 ở cả 3 thời điểm; thể tích khối u và khối lượng của khối u giảm dần qua từng tuần. Định lượng được nồng độ của một số cytokine trong nhóm chuột tiêm tế bào 4T1 (IL-17A và IL-6 tăng), nhóm tiêm tế bào AMC hàm lượng IL-6 giảm theo từng tuần, những cytokine còn lại có sự thay đổi không đều giữa các tuần trong nhóm.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu tác động của tế bào gốc mỡ lên khả năng hình thành và phát triển ung thư vú bằng cách mở rộng đánh giá thêm các cytokine khác về cả mức độ biểu hiện gen, làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về liệu pháp điều trị ung thư vú.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J., 2015, The role of cytokines in breast cancer development and progression, *J Interferon Cytokine Res*, 35(1), pp.1-16.
2. Goff, S. L., & Danforth, D. N., 2021, The role of immune cells in breast tissue and immunotherapy for the treatment of breast cancer, *Clinical breast cancer*, 21(1), e63-e73.
3. MA, X., WANG, M., & YIN, T., 2019, Myeloid-derived suppressor cells promote metastasis in breast cancer after the stress of operative removal of the primary cancer, *Front Oncol*, 10 (9): 855.
4. Li, J. J., Tsang, J. Y., & Tse, G. M., 2021, Tumor microenvironment in breast cancer - Updates on therapeutic implications and pathologic assessment, *Cancers*, 13(16), 4233.
5. Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S., 2019, Cancer-associated adipocytes: Key players in breast cancer progression, *Journal of hematology & oncology*, 12, 1-15.
6. Brock, C. K., Hebert, K. L., Artiles, M., Wright, M. K., Cheng, T., Windsor, G. O., ... & Burow, M. E., 2021, A role for adipocytes and adipose stem cells in the breast tumor microenvironment and regenerative medicine, *Frontiers in physiology*, 12, 751239.
7. Sabol, R. A., Giacomelli, P., Beighley, A., & Bunnell, B. A., 2019, Adipose stem cells and cancer: concise review, *Stem Cells*, 37(10), 1261-1266.
8. Zhao, Y., Zhang, X., Zhao, H., Wang, J., & Zhang, Q., 2018, CXCL5 secreted from adipose tissue-derived stem cells promotes cancer cell proliferation, *Oncology Letters*, 15(2), 1403-1410.
9. Rogne, M., Chu, D. T., Küntziger, T. M., Mylonakou, M. N., Collas, P., & Tasken, K., 2018, OPA1-anchored PKA phosphorylates perilipin 1 on S522 and S497 in adipocytes differentiated from human adipose stem cells, *Molecular biology of the cell*, 29(12), 1487-1501.

10. Kakarala, M., & Wicha, M. S., 2008, Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17), 2813.
11. Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H., Monville, F., ... & Wicha, M. S., 2011, Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine NetworksMSCs Regulate Breast Cancer Stem Cells, *Cancer research*, 71(2), 614-624.
12. Rivera-Cruz, C. M., Shearer, J. J., Figueiredo Neto, M., & Figueiredo, M. L., 2017, The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche, *Stem cells international*, 2017.
13. Liang, W., Chen, X., Zhang, S., Fang, J., Chen, M., Xu, Y., & Chen, X., 2021, Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 26(1), 1-25.
14. Terceiro, L. E., Edechi, C. A., Ikeogu, N. M., Nickel, B. E., Hombach-Klonisch, ... & Myal, Y., 2021, The breast tumor microenvironment: A key player in metastatic spread, *Cancers*, 13(19), 4798.
15. Danenberg, E., Bardwell, H., Zanutelli, V. R., Provenzano, E., Chin, S. F., Rueda, O. M., ... & Ali, H. R., 2022, Breast tumor microenvironment structures are associated with genomic features and clinical outcome, *Nature genetics*, 54(5), 660-669.
16. Méndez-García, L. A., Nava-Castro, K. E., Ochoa-Mercado, T. D. L., Palacios-Arreola, M. I., Ruiz-Manzano, R. A., Segovia-Mendoza, M., ... & Morales-Montor, J., 2019, Breast cancer metastasis: are cytokines important players during its development and progression?, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(1), 39-55.
17. Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S., 2001, Mouse 4T1 breast tumor model, *Curr Protoc Immunol*, Chapter 20. Unit 20.2.

18. Anders, C. K., & Carey, L. A., 2009, Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer, *Clinical breast cancer*, 9, S73-S81.
19. Casteilla, L., Laharrague, P., Bourin, P., & Sensébé, L., 2009, Les cellules souches d'origine mésenchymateuse: intérêts scientifiques et espoirs thérapeutiques, *Médecine de la Reproduction*, 11(1), 46-54.
20. Wannemuehler, T. J., Manukyan, M. C., Brewster, B. D., Rouch, J., Poynter, J. A., Wang, Y., & Meldrum, D. R., 2012, Advances in mesenchymal stem cell research in sepsis, *Journal of Surgical Research*, 173(1), 113-126.
21. Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A., 2008, Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies, *Mechanisms of ageing and development*, 129(3), 163-173.
22. Selich, A., Daudert, J., Hass, R., Philipp, F., von Kaisenberg, C., Paul, G., ... & Rothe, M., 2016, Massive clonal selection and transiently contributing clones during expansion of mesenchymal stem cell cultures revealed by lentiviral RGB-barcode technology, *Stem Cells Translational Medicine*, 5(5), 591-601.
23. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *science*, 284(5411), 143-147.
24. Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z., 2011, Mesenchymal stem cells, *Cell transplantation*, 20(1), 5-14.
25. Bernardo, M. E., Pagliara, D., & Locatelli, F., 2012, Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine?, *Bone marrow transplantation*, 47(2), 164-171.
26. Lu, C. W., Lo, Y. H., Chen, C. H., Lin, C. Y., Tsai, C. H., ... & Yuan, S. S. F., 2017, VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis, *Cancer letters*, 388, 130-138.

27. Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I., 2019, Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress, *NPJ Regenerative medicine*, 4(1), 22.
28. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I., 1992, Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow, *Bone*, 13(1), 81-88.
29. Zuk, P. A., Zhu, M. I. N., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., ... & Hedrick, M. H., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering*, 7(2), 211-228.
30. Varma, M. J. O., Breuls, R. G., Schouten, T. E., Jurgens, W. J., Bontkes, H. J., Schuurhuis, G. J., ... & Milligen, F. J. V., 2007, Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells, *Stem cells and development*, 16(1), 91-104.
31. Ren, Y., Wu, H., Zhou, X., Wen, J., Jin, M., Cang, M., ... & Ma, Y., 2012, Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells, *Research in veterinary science*, 93(1), 404-411.
32. Hall, M. N., Rosenkrantz, W. S., Hong, J. H., Griffin, C. E., & Mendelsohn, C. M., 2010, Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study, *Vet Ther*, 11(2), E1-14.
33. Wei, G., Schubiger, G., Harder, F., & Müller, A. M., 2000, Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes?, *Stem cells*, 18(6), 409-414.
34. Bianco, P., & Robey, P. G., 2001, Stem cells in tissue engineering, *Nature*, 414(6859), 118-121.
35. Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., & Gorodetsky, R., 2006, Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads, *Bone marrow transplantation*, 37(10), 967-976.
36. Chu, D. T., Nguyen Thi Phuong, T., Tien, N. L. B., Tran, D. K., Nguyen, T. T., Thanh, V. V., ... & Chu-Dinh, T., 2019, The effects of

adipocytes on the regulation of breast cancer in the tumor microenvironment: an update, *Cells*, 8(8), 857.

37. Jang S, Park JS, Jeong HS, 2015, Neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells involves activation of the Wnt5a/JNK signalling, *Stem Cells International*, 2015 1–7.
38. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., ... & Gimble, J. M., 2013, Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT), *Cytotherapy*, 15(6), 641-648.
39. Efimenko, A., Starostina, E., Kalinina, N., & Stolzing, A., 2011, Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning, *Journal of translational medicine*, 9, 1-13.
40. Fernández-García, M., Yañez, R. M., Sánchez-Domínguez, R., Hernando-Rodríguez, M., Peces-Barba, M., Herrera, G., ... & Lamana, M. L., 2015, Mesenchymal stromal cells enhance the engraftment of hematopoietic stem cells in an autologous mouse transplantation model, *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 1-13.
41. Caplan, A. I., 2007, Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine, *Journal of cellular physiology*, 213(2), 341-347.
42. Jing, W., Wu, L., Lin, Y., Liu, L., Tang, W., & Tian, W., 2008, Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration: necessity, possibility, and strategy, *Medical Hypotheses*, 70(3), 540-542.
43. Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Garlet, T. P., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S., 2008, The essential role of IFN- γ in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice, *Microbes and Infection*, 10(5), 489-496.
44. Zhao, L., Zhou, Y., Xu, Y., Sun, Y., Li, L., & Chen, W., 2011, Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2

- cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients, *Journal of clinical periodontology*, 38(6), 509-516.
45. Ailhaud, G., 2006, Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome, *Comptes rendus biologies*, 329(8), 570-577.
46. Yamaguchi, J., Ohtani, H., Nakamura, K., Shimokawa, I., & Kanematsu, T., 2008, Prognostic impact of marginal adipose tissue invasion in ductal carcinoma of the breast, *American journal of clinical pathology*, 130(3), 382-388.
47. Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y., 2017, Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications, *Archives of medical science*, 13(4), 851-863.
48. Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S., 2007, Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease, *Journal of lipid research*, 48(9), 1905-1914.
49. Zhang, F., & Liu, S., 2020, Mechanistic insights of adipocyte metabolism in regulating breast cancer progression, *Pharmacological Research*, 155, 104741.
50. Xu, C., Lin, L., Cao, G., Chen, Q., Shou, P., Huang, Y., ... & Shi, Y., 2014, Interferon- α -secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect in vivo, *Oncogene*, 33(42), 5047-5052.
51. Ratajczak, M. Z., Bujko, K., Mack, A., Kucia, M., & Ratajczak, J., 2018, Cancer from the perspective of stem cells and misappropriated tissue regeneration mechanisms, *Leukemia*, 32(12), 2519-2526.
52. Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., Capilla-Gonzalez, V., 2020, Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 43.
53. Lim, S. K., & Khoo, B. Y., 2021, An overview of mesenchymal stem cells and their potential therapeutic benefits in cancer therapy, *Oncology Letters*, 22(5), 1-14.

54. Aggarwal, S., Pittenger, M. F., 2005, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, 105(4), 1815-1822.
55. Liu, Y., Yin, Z., Zhang, R., Yan, K., Chen, L., Chen, F., ... & Jiang, X., 2014, MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6, *Biochemical and biophysical research communications*, 450(4), 1409-1415.
56. Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C., 2014, The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 1-10.
57. Zheng, H., Zou, W., Shen, J., Xu, L., Wang, S., Fu, Y. X., & Fan, W., 2016, Opposite effects of coinjection and distant injection of mesenchymal stem cells on breast tumor cell growth, *Stem Cells Translational Medicine*, 5(9), 1216-1228.
58. Schweizer, R., Tsuji, W., Gorantla, V. S., Marra, K. G., Rubin, J. P., & Plock, J. A., 2015, The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis, *Stem cells international*, 2015.
59. Zhang, Y., Wang, J., Ren, M., Li, M., Chen, D., Chen, J., ... & Dou, J., 2014, Gene therapy of ovarian cancer using IL-21-secreting human umbilical cord mesenchymal stem cells in nude mice, *Journal of Ovarian Research*, 7, 1-10.
60. Dinarello, C. A., 2000, Proinflammatory cytokines, *Chest*, 118(2), 503-508.
61. Schaper, F., Rose-John, S., 2015, Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade, *Cytokine & growth factor reviews*, 26(5), 475-487.
62. Geginat, J., Larghi, P., Paroni, M., Nizzoli, G., Penatti, A., Pagani, M., ... & Flavell, R. A., 2016, The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer, *Cytokine & growth factor reviews*, 30, 87-93.
63. Charo, I. F., & Ransohoff, R. M., 2006, The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 610-621.

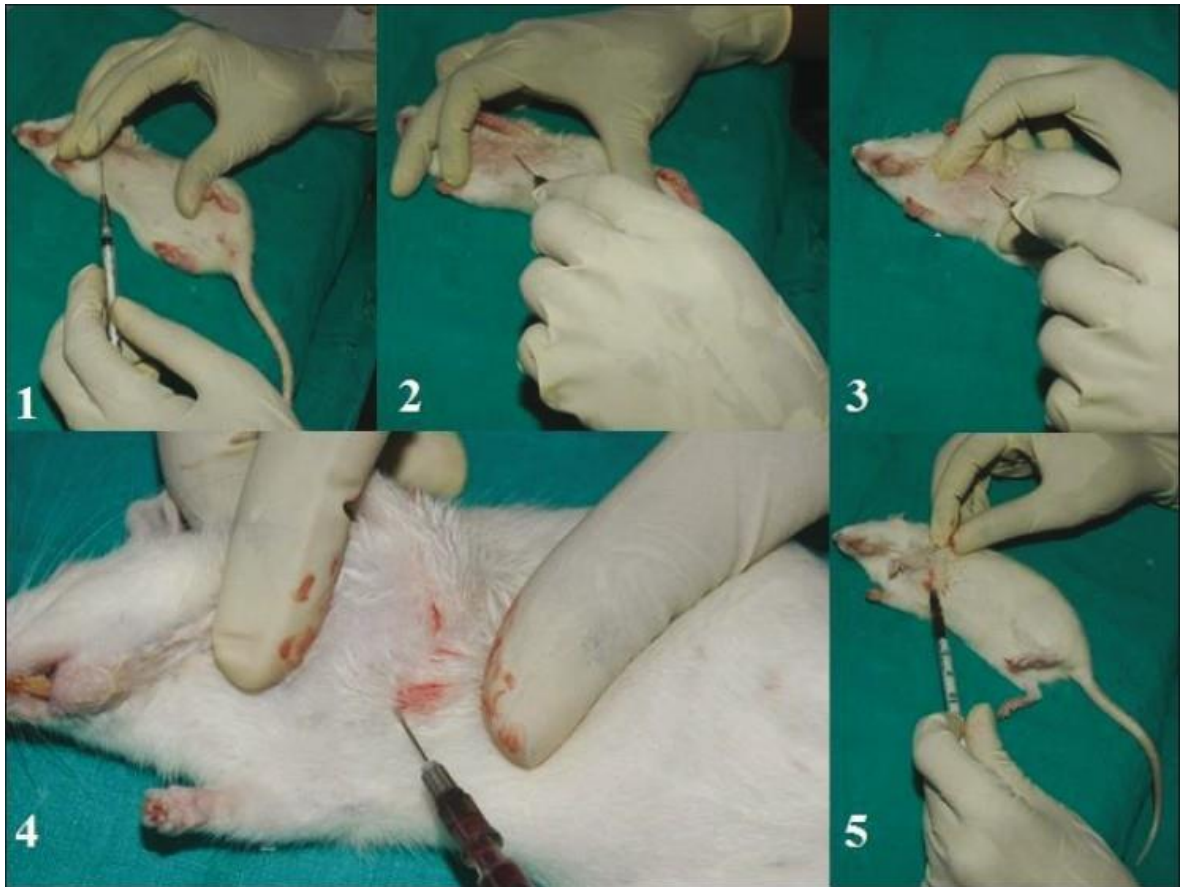
64. Rose-John, S., 2018, Interleukin-6 family cytokines, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(2), a028415.
65. Alexandrakis, M. G., Pappa, C. A., Miyakis, S., Sfiridaki, A., Kafousi, M., Alegakis, A., & Stathopoulos, E. N., 2006, Serum interleukin-17 and its relationship to angiogenic factors in multiple myeloma, *European journal of internal medicine*, 17(6), 412-416..
66. Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., ... & Lebecque, S., 1996, T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines, *The Journal of experimental medicine*, 183(6), 2593-2603.
67. De Rham, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Schneiter, G., Dayer, J. M., & Villard, J., 2007, The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors, *Arthritis research & therapy*, 9, 1-15.
68. Leung, D., Morefield, S., & Willerford, D. M., 2000, Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals in vivo, *The Journal of Immunology*, 164(7), 3527-3534.
69. Liu, Y., Zhou, N., Zhou, L., Wang, J., Zhou, Y., ... & Huang, B., 2021, IL-2 regulates tumor-reactive CD8⁺ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor, *Nature immunology*, 22(3), 358-369.
70. Sim, G. C., & Radvanyi, L., 2014, The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy, *Cytokine & growth factor reviews*, 25(4), 377-390.
71. Balasubramanian, S. P., Azmy, I. A. F., Higham, S. E., Wilson, A. G., Cross, S. S., Cox, A., ... & Reed, M. W., 2006, Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review, *BMC cancer*, 6(1), 1-21.
72. Gaggianesi, M., Turdo, A., Chinnici, A., Lipari, E., Apuzzo, T., Benfante, A., ... & Todaro, M., 2017, IL4 Primes the Dynamics of Breast Cancer Progression via DUSP4 InhibitionIL4 in Breast Cancer Progression, *Cancer research*, 77(12), 3268-3279.

73. Kong, F., Liu, J., Liu, Y., Song, B., Wang, H., & Liu, W., 2010, Association of interleukin-10 gene polymorphisms with breast cancer in a Chinese population, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29, 1-7.
74. Fortis, C., Foppoli, M., Gianotti, L., Galli, L., Citterio, G., Consogno, G., ... & Braga, M., 1996, Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours, *Cancer letters*, 104(1), 1-5.
75. Kozłowski, L., Zakrzewska, I., Tokajuk, P., & Wojtukiewicz, M. Z., 2003, Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients, *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, 48, 82-84.
76. Rao, V. S., Alabi, A., Dyer, C. E., Greenman, J., & Drew, P. J., 2008, IL-10 and IL-12 expression in breast cancer patients and effect of therapy, *Journal of Clinical Oncology*, 26(15_suppl), 14016-14016.
77. Li, Y., Yu, H., Jiao, S., & Yang, J., 2014, Prognostic value of IL-10 expression in tumor tissues of breast cancer patients, *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 30(5), 517-520.
78. Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., ... & Matsunaga, K., 2007, Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue, *Journal of dermatological science*, 48(1), 43-52.
79. Do, T. K., Nguyen, V. H., Nguyen, T. N., Nguyen, V. L., Pham, D. M., Nguyen, T. N., ... & Chu, H. H. (2020). Efficient Isolation and Long-term Red Fluorescent Nanodiamond Labeling of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Effective Differentiation into Hepatocyte-like Cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63.
80. Eftekhari-Vaghefi, S. H., Zahmatkesh, L., Salehinejad, P., Totonchi, S., & Shams-Ara, A. (2015). Evaluation of neurogenic potential of human umbilical cord mesenchymal cells; a time- and concentration-dependent manner. *Iranian biomedical journal*, 19(2), 82.

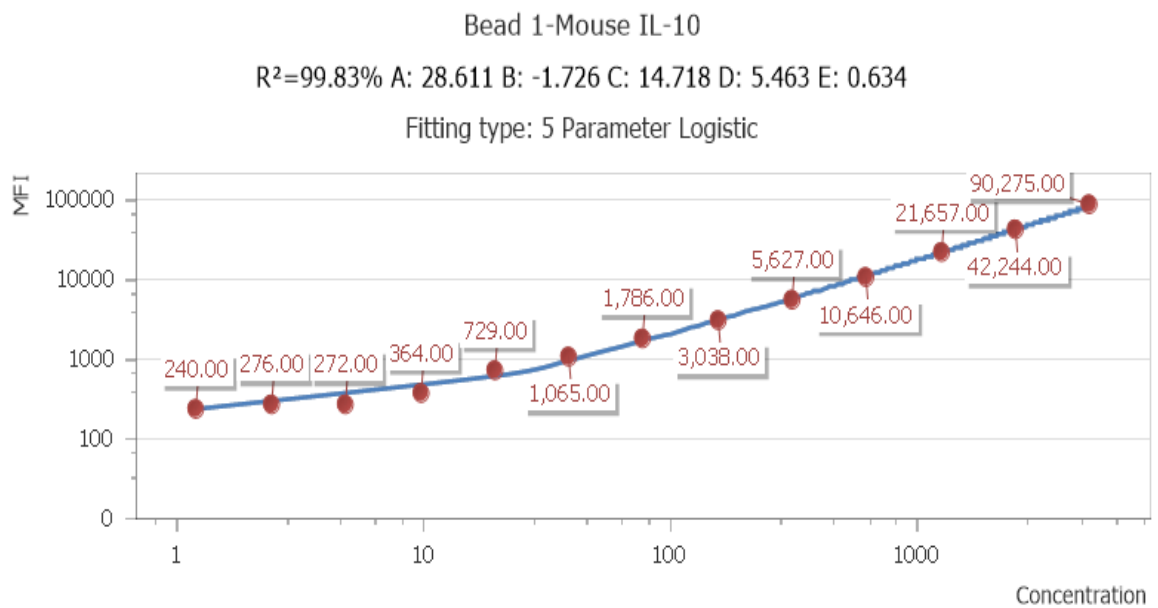
81. Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R., 2010, Blood sample collection in small laboratory animals, *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 1(2), 87.
82. Luna, A. C., Madeira, M. E., Conceição, T. O., Moreira, J. A., Laiso, R. A., & Maria, D. A., 2014, Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice, *BMC research notes*, 7(1), 1-12.
83. Phuong, N. T., & Hung, N. H., 2018, A simple non-enzymatic protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from adipose tissues, *Journal of Science and Technology*, 1(2), 14-17.
84. Taha, M. F., & Hedayati, V., 2010, Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells, *Tissue and Cell*, 42(4), 211-216.
85. Maddox, J. R., Liao, X., Li, F., & Niyibizi, C., 2009, Effects of culturing on the stability of the putative murine adipose derived stem cells markers, *The open stem cell journal*, 1, 54.
86. N. T. Thuy, T. N. Vu, C. T. C. Ha, 2020, Isolation and culture of adipose - derived mesenchymal stem cells from mice(swiss) adipose tissue (In. Vietnamese), *Can Tho Journal of Medicine and Pharmacy*, Vol. 6, No. 2, pp. 372-379.
87. DuPre, S. A., Redelman, D., & Hunter Jr, K. W., 2007, The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci, *International journal of experimental pathology*, 88(5), 351-360.
88. Manabe, Y., Toda, S., Miyazaki, K., & Sugihara, H., 2003, Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer–stromal cell interactions, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 201(2), 221-228.
89. Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., ... & Muller, C., 2011, Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion, *Cancer research*, 71(7), 2455-2465.

90. Luo, X. L., Lin, L., Hu, H., Hu, F. L., Lin, Y., Luo, M. L., ... & He, Y. Q., 2020, Development and characterization of mammary intraductal (MIND) spontaneous metastasis models for triple-negative breast cancer in syngeneic mice, *Scientific reports*, 10(1), 4681.
91. Tigo, M., Hoshi, A., Kadosawa, H., & Fujigaki, M., 1991, Antitumor Activity and Metabolism of a New Anthracycline-containing Fluorine (ME2303) in Lewis Lung Carcinoma-bearing Mice, *Japanese journal of cancer research*, 82(11), 1317-1321.
92. Ong, Y. S., Saiful Yazan, L., Ng, W. K., Abdullah, R., Mustapha, N. M., Sapuan, S., ... & Zakarial Ansar, F. H., 2018, Thymoquinone loaded in nanostructured lipid carrier showed enhanced anticancer activity in 4T1 tumor-bearing mice, *Nanomedicine*, 13(13), 1567-1582.
93. Abbate, I., Correale, M., Gargano, G., Tedone, T., Izzi, G., Catino, A., ... & Cramarossa, A., 1992, Tumor necrosis factor and soluble interleukin-2 receptor: two immunological biomarkers in female neoplasms, *European Journal of Gynaecological Oncology*, 13(1 Suppl), 92-96.
94. Welte, T., & Zhang, X. H. F., 2015, Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease, *Mediators of inflammation*, 2015.
95. Pericle, F., Giovarelli, M., Colombo, M. P., Ferrari, G., Musiani, P., Modesti, A., ... & Forni, G., 1994, An efficient Th2-type memory follows CD8+ lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4, *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 153(12), 5659-5673.

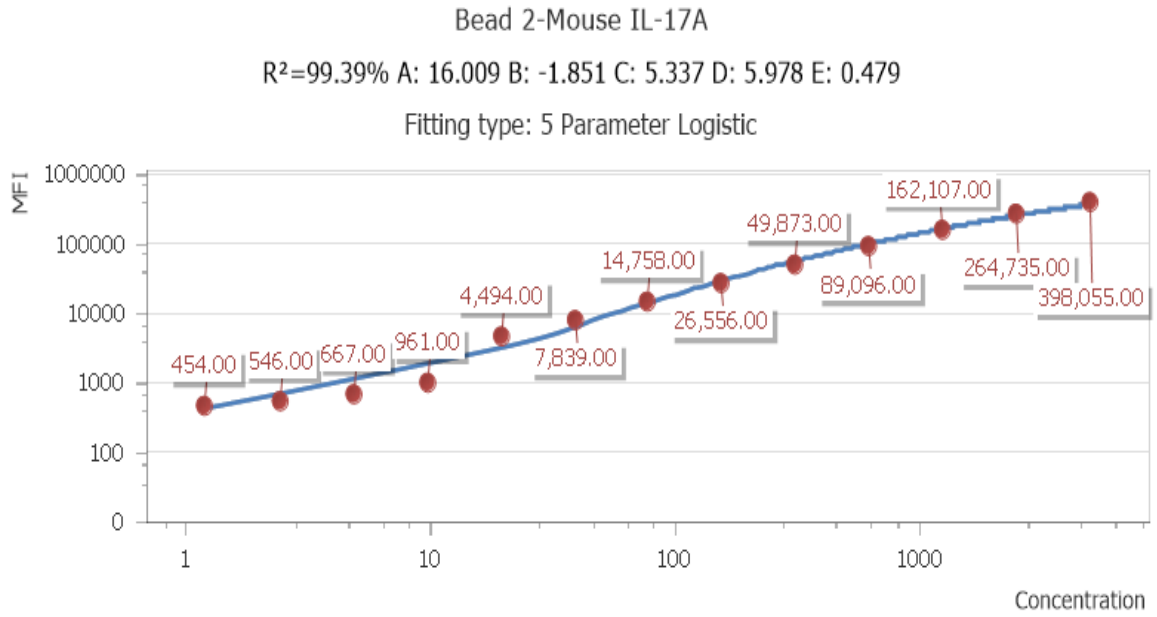
PHỤ LỤC



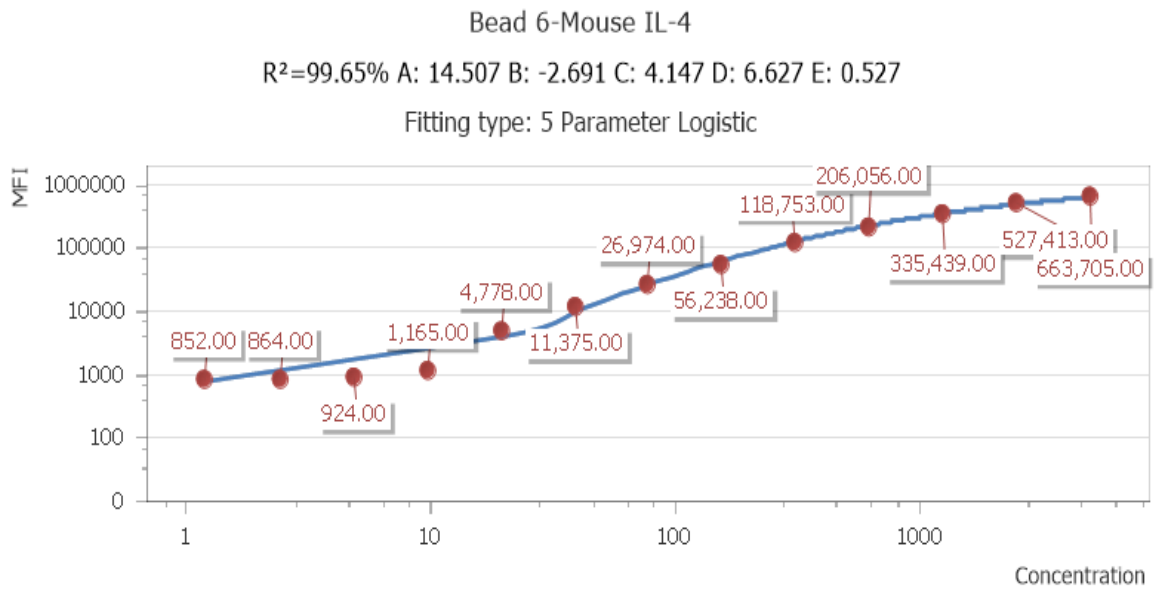
Hình 1. Các bước thu mẫu máu ở tim chuột
(Nguồn: Parasuraman và cộng sự năm 2010)



Hình 2. Đường chuẩn cho IL-10



Hình 3. Đường chuẩn cho IL-17A



Hình 4. Đường chuẩn cho IL-4