

Gây u thực nghiệm trên chuột bằng DMBA (7,12 Dimethyl benz[A] anthracene)

Đỗ Thị Thảo*, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Cúc,
Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Trang

¹*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 28 tháng 11 năm 2008

Tóm tắt. Ung thư vú là loại bệnh ung thư phổ biến ở phụ nữ. Các nguyên nhân gây ung thư vú thường là các tác nhân từ môi trường như một số loại hoá chất, tia UV, khẩu phần ăn uống... DMBA (7,12 dimethyl benz[a] anthracene) là một hoá chất mang cấu trúc hydrocacbon vòng thơm (Polycyclic aromatic hydrocarbon - PAH) có khả năng gây đột biến gen và là một yếu tố gây ung thư vú. Vì vậy, DMBA thường được sử dụng rộng rãi trên thế giới để gây ung thư vú cho động vật thí nghiệm đạt hiệu quả cao. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chuột cái BALB/c được uống DMBA ở 3 liều thí nghiệm khác nhau là 0,5 mg/con/lần/tuần; 1mg/con/lần/tuần và 2mg/con/lần/tuần trong 6 tuần liên tục. Kết quả cho thấy, chuột thí nghiệm bị giảm khả năng tăng trọng so với đối chứng với sai khác có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, có tới 21/30 (70%) chuột thí nghiệm xuất hiện khối u ở tuyến vú. Liều DMBA được sử dụng là 1mg/con/lần/tuần sẽ cho hiệu quả gây u tuyến vú cao nhất.

Từ khóa: BALB/c, yếu tố gây ung thư, DMBA, u tuyến vú, gen gây ung thư, tiền gen gây ung thư.

1. Mở đầu

Với 7,6 triệu người chết và khoảng 12 triệu người khác mắc bệnh trong năm 2007, ung thư đang dần vượt qua bệnh tim mạch để trở thành mối đe dọa hàng đầu cho con người [1]. Nếu ở nam giới bệnh ung thư phổi là phổ biến thì ở phụ nữ bệnh ung thư vú lại là chủ yếu. Ngoài yếu tố di truyền thì nguyên nhân quan trọng khác gây bệnh ung thư vú phải kể đến là khẩu phần ăn và các tác nhân môi trường [2]...

Một nhóm quan trọng trong tác nhân môi trường gây ung thư vú phải kể đến các chất hoá học có cấu trúc Polycyclic aromatic

hydrocacbon (PAH - các hydratcarbon vòng thơm), các thuốc trừ sâu thuộc nhóm Halogen hữu cơ (DDT) [1]. DMBA (7,12 dimethyl benz[a] anthracene) là một trong những hợp chất gây ung thư có cấu trúc hydratcarbon vòng thơm. Chất này đã được ứng dụng để gây ung thư thực nghiệm trên động vật trong phòng thí nghiệm [3] bằng cách cho uống qua ống thông dạ dày. Nó gây ra sự điều khiển ngược của các thụ cảm (receptor) trong tế bào là aryl hydrocacbon receptor (AhR), làm biến đổi các Proto-oncogene thành oncogene dẫn tới việc hình thành tế bào ung thư nguyên phát [4].

Bằng cách sử dụng mô hình chuột được gây u thực nghiệm bằng hoá chất DMBA, nhiều nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng phòng chống ung thư vú của nhiều chất như

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38361774.
E-mail: thaodo@ibt.ac.vn

Tamoxifen, Resveratrol... [5]. Ngoài tác dụng gây ung thư vú, DMBA cũng được sử dụng để gây ung thư da [6,7]. Tuy nhiên, hiện nay tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào sử dụng DMBA để gây ung thư thực nghiệm đã được công bố. Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng hoá chất này để tạo mô hình ung thư thực nghiệm trên chuột BALB/c. Kết quả nghiên cứu sẽ được trình bày trong báo cáo này.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Động vật thí nghiệm

Thí nghiệm sử dụng chuột cái dòng BALB/c 6 tuần tuổi, khoẻ mạnh, chưa cho thụ tinh lần nào, trọng lượng trung bình là Chuột được nuôi với mật độ 5 con/ lồng tại chuồng nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học và được cung cấp nước uống tự do và thức ăn tiêu chuẩn là thức ăn tổng hợp được mua từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Chuột BALB/c do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp giống, được nhân nuôi, phát triển đàn tại chuồng nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học.

Hoá chất

Hoá chất DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) của hãng Sigma được pha trong dầu vừng với nồng độ 5mg/ml.

2.1. Phương pháp nghiên cứu

Mô hình gây u trên chuột

Phương pháp gây u bằng hoá chất DMBA dựa trên phương pháp của Boston University Institutional Animal Care and US Committee [2]. 40 chuột BALB/c được chia làm 4 lô thí nghiệm (mỗi lô 10 chuột).

- Lô 1: Chuột uống 0,1 ml DMBA/con/lần/tuần (tương ứng 0,5 mg/con/lần/tuần) bằng ống thông dạ dày trong 6 tuần liên tục.

- Lô 2: Chuột uống 0,2 ml DMBA/con/lần/tuần (tương ứng 1 mg/con/lần/tuần) bằng ống thông dạ dày trong 6 tuần liên tục.

- Lô 3: Chuột uống 0,4 ml DMBA/con/lần/tuần (tương ứng 2 mg/con/lần/tuần) bằng ống thông dạ dày trong 6 tuần liên tục.

- Lô 4 (lô đối chứng): Chuột uống dung dịch sinh lý bằng ống thông dạ dày

Để kiểm tra tốc độ tăng trọng, toàn bộ chuột thí nghiệm được kiểm tra trọng lượng vào một ngày cố định trong tuần, liên tục trong 24 tuần kể từ khi bắt đầu thí nghiệm.

Sau khi cho chuột uống DMBA lần cuối cùng, mỗi tuần kiểm tra chuột 2 lần bằng cách sờ nắn hai bên bụng chuột để xác định ngày đầu tiên hình thành khối u, vị trí, kích thước khối u.

Sau 24 tuần kể từ khi bắt đầu cho chuột uống DMBA, hoặc khi chuột chết tiến hành mổ chuột, tách các khối u, đo kích thước và cân khối lượng u.

Thể tích khối u được tính bằng mm^3 theo công thức: $V = 1/2 \times a \times b^2$ (a: chiều dài khối u, b: chiều rộng khối u) [8].

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thống kê được xử lý bằng hệ thống Student *t*-test.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Mức độ tăng trọng và tỉ lệ sống sót của chuột thí nghiệm

Đối với quá trình gây u thực nghiệm, bên cạnh nhiều yếu tố đánh giá về thể trạng, việc theo dõi mức độ tăng trọng cũng như tỉ lệ sống/chết của chuột ở các lô thí nghiệm là cần thiết. Các kết quả nghiên cứu về mức độ tăng trọng kể từ khi cho chuột uống DMBA đến khi giết chuột vào các thời điểm 6, 12, 18, 24, 30 tuần tuổi cũng như tỉ lệ sống/chết của chuột trong báo cáo này được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tốc độ tăng trọng của chuột thí nghiệm (gram) và tỉ lệ chuột sống/chết ở từng lô thí nghiệm (n = 10 chuột)

Tuần tuổi chuột		tuần 6	tuần 12	tuần 18	tuần 24	tuần 30
Lô TN						
Lô 1	Tăng trọng (gram)	0,11± 0,003	0,05± 0,004	0,1± 0,007	0,08± 0,005	0,03± 0,002
	Số chuột chết	0	0	0	0	0
Lô 2	Tăng trọng (gram)	0,12± 0,005	giảm cân	0,08± 0,002	0,05± 0,002	0,02± 0,001
	Số chuột chết	0	1	0	0	0
Lô 3	Tăng trọng (gram)	0,12± 0,002	giảm cân	0,06± 0,005	0,05± 0,004	0,01± 0,006
	Số chuột chết	0	2	0	0	0
Lô 4	Tăng trọng (gram)	0,12± 0,006	0,14± 0,001	0,15± 0,003	0,16± 0,003	0,11± 0,005
	Số chuột chết	0	0	0	0	0

(Ghi chú : P < 0,05)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy mức độ tăng trọng của chuột trong các lô thí nghiệm 1, 2, 3 giảm so với lô đối chứng 4 (với mức độ tin cậy P<0,05). Trong thời gian cho chuột uống DMBA (từ 6 đến 12 tuần tuổi), chuột ở lô 1 không có hiện tượng giảm cân nhưng mức độ tăng trọng cũng thấp hơn nhiều so với lô đối chứng. Chuột ở lô 2 (uống 1mg DMBA/con) và lô 3 (uống 2 mg DMBA/ con) có hiện tượng giảm cân biểu hiện ở mức độ tăng trọng âm (-0,02 g/ngày ở lô 2 và -0,04 g/ngày ở lô 3). Trong các giai đoạn sau của thí nghiệm (từ tuần 12 trở đi), mức độ tăng trọng của chuột ở hai lô này có tăng song vẫn thấp hơn so với lô thứ nhất và thấp hơn nhiều so với lô đối chứng. Sự sai khác này là có ý nghĩa ở mức thống kê P<0,05.

Hơn nữa, trong thời gian 6 tuần sử dụng DMBA trên chuột, lô 2 có 1 chuột bị chết và lô 3 có 2 chuột bị chết trong khi lô 1 (liều DMBA thấp - 0,5 mg/con) và lô 4 (lô đối chứng) không thấy có chuột chết. Có thể thấy rằng, DMBA đã gây độc và gây chết chuột, liều sử dụng càng cao, chuột càng dễ bị chết.

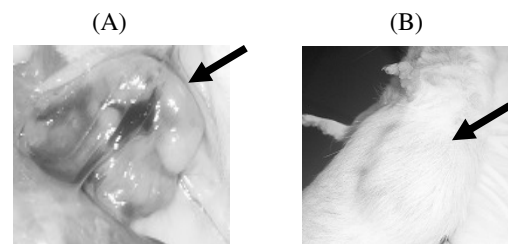
Như vậy, có thể thấy rằng việc sử dụng DMBA để gây u có ảnh hưởng rất nhiều tới mức độ tăng trọng và tỉ lệ sống sót của chuột thí nghiệm. Chuột uống DMBA liều càng cao mức độ tăng trọng càng giảm, tỉ lệ chuột bị chết cũng tăng lên đáng kể.

3.2. Thời gian bắt đầu xuất hiện khối u ở chuột

Chuột thí nghiệm liên tục được theo dõi sự xuất hiện của các khối u bằng biện pháp sờ nắn và kiểm tra trực quan bằng mắt thường hai lần mỗi tuần và vào các thời điểm 6, 12, 18, 24, 30 tuần tuổi sau khi cho uống DMBA để xác định thời gian khối u bắt đầu xuất hiện cũng như vị trí, kích thước của khối u. Sau 240 tuần thí nghiệm, toàn bộ chuột được mổ để kiểm tra sự xuất hiện các khối u bên trong cơ thể. Các khối u sẽ được tách ra và tiến hành phân lập tế bào để làm tiêu bản. Các kết quả lập tiêu bản tế bào ung thư từ các khối u thực nghiệm này cũng như những chỉ tiêu đánh giá sẽ được trình bày trong một báo cáo khác của chúng tôi.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chuột ở lô 3 bắt đầu xuất hiện khối u sùi ở cổ vào tuần thứ 12 kể từ khi cho chuột uống DMBA, đến tuần thứ 14 tiếp tục xuất hiện khối u nhỏ ở tuyến vú chân trước trái. Chuột ở lô 2 cũng xuất hiện khối u sùi sớm nhất vào tuần thứ 14 tại vị trí bụng. Đến tuần 17 chuột ở lô 2 bắt đầu thấy khối u nhỏ xuất hiện tại tuyến vú chân sau trái. Tất cả chuột ở lô thí nghiệm thứ 2 và lô 3 đều xuất hiện u vào tuần thứ 20 kể từ khi cho uống DMBA. Ở lô 1, chuột bắt đầu xuất hiện khối u muộn hơn - vào tuần thứ 18 kể từ khi cho chuột uống DMBA.

Như vậy, liều DMBA được sử dụng càng cao thì thời gian xuất hiện khối u càng sớm. Cũng có thể nhận thấy rằng các khối u sùi thể hiện sớm hơn và được phát hiện sớm hơn so với các khối u cục tuyến vú dưới nách các chân trước và sau của chuột thí nghiệm.



Hình 1. (A) Tuyến vú chuột bị u; (B) Khối u ở phần trước tuyến vú bên trái.

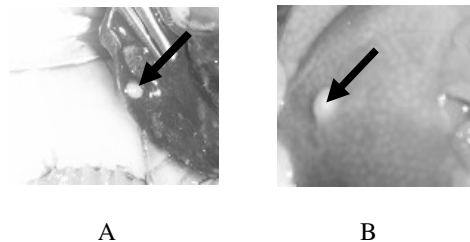
DMBA là hoá chất thường được sử dụng để gây ung thư vú thực nghiệm. Vì thế, để đánh giá khả năng gây u của DMBA cần xác định tỉ lệ chuột xuất hiện u tuyến vú, kích thước khối u cũng như sự xuất hiện các khối u ở các cơ quan nội tạng khác nhau của các lô thí nghiệm. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy trong 3 lô thí nghiệm mặc dù ở lô 3 chuột xuất hiện u sớm nhất song trong thời gian cho chuột uống DMBA trước khi chuột xuất hiện các khối u có 2 con chuột bị chết, 8 chuột còn lại sau đó có 7 chuột xuất hiện khối u tuyến vú còn 1 chuột chỉ thấy xuất hiện một số khối u sùi ở bề mặt da. Ở lô 2, trong quá trình gây u bằng DMBA chỉ có 1 chuột chết và 9 chuột còn lại cũng đều xuất hiện khối u trong đó có 8 chuột có u tuyến vú vào 26 tuần tuổi. Riêng ở lô 1 mặc dù không có chuột chết song vào tuần tuổi 30 chỉ có 6/10 chuột xuất hiện khối u tuyến vú và 2/10 chuột không xuất hiện khối u nào. Trong khi lô đối chứng là lô 4 không thấy xuất hiện các khối u trên chuột.

Bảng 2. Kết quả tạo khối u tuyến vú và u nội tạng trên chuột bằng hoá chất DMBA

Lô TNo	Số chuột TNo	U các loại khác nhau			Vị trí u	U tuyến vú			
		Ts	Tc	Tb		Ts	Tc	Tb	Tv
Lô 1	10	8/10	14	14/10 = 1,4	tuyến vú, phổi	6/10	7	7/10 = 0,7	1955,7 ± 0,03
Lô 2	10	9/9	21	21/9 = 2,33	tuyến vú, phổi, gan	8/9	12	12/9 = 1,33	1973,5 ± 0,01
Lô 3	10	8/8	15	15/8 = 1,88	tuyến vú, phổi, gan	7/8	9	9/8 = 1,13	1981,2 ± 0,03
Lô 4	10	0	0	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: Chỉ số Ts: Số chuột có u/ số chuột sống sót
Chỉ số Tc: Tổng số khối u các loại
Chỉ số Tv: Thể tích trung bình khối u tuyến vú (mm³)
Hệ số Tb: Hệ số trung bình số lượng khối u/1 chuột



Hình 2. (A) U nội tạng xuất hiện ở phổi do tác động của DMBA; (B) U nội tạng xuất hiện ở gan do tác động của DMBA.

Mặt khác kết quả bảng 2 cũng cho thấy chuột ở lô 2 có tỉ lệ khối u tuyến vú/chuột là 1,33 u/con cũng cao hơn lô 1 (0,7 u/con) và lô 3 (1,13 khối u/ con). Như vậy, cho chuột uống DMBA liều cao có ảnh hưởng rất nhiều đến chuột, có thể khiến chuột chết trong thời gian thí nghiệm, ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Qua số lượng khối u trung bình/chuột cũng như kích thước bình quân của u tuyến vú chúng tôi nhận thấy liều DMBA 1 mg/con và 2 mg/con thì số lượng số lượng u xuất hiện cao hơn cũng như kích thước khối u cũng lớn hơn lô 1 (uống DMBA liều 0,5 mg/con/lần) ở mức ý nghĩa thống kê $P=0,05$.

4. Kết luận

Việc sử dụng DMBA để gây ung thư vú trên chuột cho thấy hiệu quả gây ung thư cao 70% (21/30). Phương pháp gây u thực nghiệm bằng DMBA sẽ cho hiệu quả cao nhất khi chuột được uống DMBA với liều 1 mg/con/lần/tuần (88,9%) và ở liều này tỉ lệ chuột chết trong quá trình gây u thấp. Khi sử dụng DMBA để gây u trên chuột, khối u sùi đầu tiên xuất hiện ở tuần thứ 12 kể từ khi bắt đầu uống DMBA. Bên cạnh các khối u tuyến vú, trong cơ thể chuột thí nghiệm còn xuất hiện nhiều loại u nội tạng khác như u phổi, gan. Như vậy, dùng DMBA gây u tuyến vú nói riêng và u thực nghiệm nói chung cho chuột là mô hình hoàn toàn phù hợp để thử nghiệm *in vivo* các hoạt chất phòng chống ung thư tiềm năng.

Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Trung tâm hỗ trợ nghiên cứu Châu Á.

Tài liệu tham khảo

- [1] http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Global_Cancer_Facts_and_Figurs_2007.asp
- [2] N. Currier, S.E. Solomon, E.G. Demicco, D.L.F. Chang, M. Farago, H. Ying, I. Dominguez, Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicologic Pathology* 33 (2005) 726.
- [3] K.L. Murphy, J.M. Rosen, Mutant p53 and genomic instability in a transgenic mouse model of breast cancer *Oncogene* 19 (2000) 1045.
- [4] Z. Walaszek, M. Hanausek, T. J. Slaga, Combined Natural Source Inhibitors in Skin Cancer Prevention, *Cellscience Review* 1(3) (2005).
- [5] T. Whitsett, M. Carpenter, C. A. Lamartiniere, Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats, *Journal of Carcinogenesis* 5 (2006) 15.
- [6] J. Murphy, R. E.Morales, J. Scott, T. S. Kupper, IL-1 α , Innate Immunity, and skin Carcinogenesis: The effect of constitutive Expression of IL-1 α in Epidermis on chemical Carcinogenesis, *The Journal of Immunology* 170 (2003) 5697.
- [7] J.J. Gills, E. H. Jeffery, N.V. Matusheski, R. C. Moon, D.D. Lantvit, J.M. Pezzuto, Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion, *Cancer Letters* 236 (2006) 72.
- [8] M. Iigo, A. Hoshi, H. Kadosawa, M. Fujigaki, Antitumor Activity and Metabolism of a New Anthracycline-containing Fluorine (ME2303) in Lewis Lung Carcinoma-bearing Mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 (1991) 1317.

Experimental tumorization on mice by DMBA (7,12 Dimethyl Benz[A] Anthracen)

Thao Thi Do, Phuong Thi Do, Cuc Thi Nguyen,
Nga Thi Nguyen, Trang Thi Nguyen

*Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Breast tumor is a widespread cancer in women. Cancer causes are usually the environmental factors such as chemical carcinogens, UV ray, dietary constituents etc. DMBA (7,12 dimethyl benz[a] anthracene) which possess Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) structure is a gene mutant cause and a breast cancer inducer as well. Nowadays, DMBA is widely used in many research laboratories to induce cancer in mammary gland on mice with high effectiveness. In this study, female BALB/c mice were gavaged with 3 doses of DMBA that are 0.5 mg/mouse/time; 1 mg/mouse/time and 2 mg/mouse/time in continuous 6 weeks. The results showed that the experimented mice gavaged with high doses of DMBA lost much weight compared with the control group that gavaged with PBS. In summary, there is 70.0% (21/30) of the experimental mice that got mammary tumors. The best effective dose of DMBA for inducing mammary cancer in mice is 1 mg/mouse/time.

Keywords: BALB/c, carcinogen, DMBA, mammary tumor, oncogen, proto-oncogen.