

Tác dụng ức chế tăng sinh của Adavosertib trên tế bào ung thư biểu mô đường mật

Bùi Khắc Cường^{1,2,3,4}, Nguyễn Như Ngọc^{2,3}, Nguyễn Thị Mai Ly^{5*}

¹Khoa Y học thực nghiệm, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

²Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y

³Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

⁴Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức (VG-CARE)

⁵Bộ môn khoa Sinh hoá, Bệnh viện Quân y 103

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Adavosertib gần đây đã cho thấy tác dụng chống ung thư mạnh đối với nhiều loại ung thư. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá hoạt tính kháng ung thư *in vitro* của Adavosertib - một chất ức chế tyrosine kinase Wee1 - trên dòng tế bào ung thư đường mật ở người TFK1. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là dòng tế bào ung thư đường mật người TFK1. Nghiên cứu sử dụng các thử nghiệm WST-1, thử nghiệm Crystal Violet và thử nghiệm di trú tế bào khảo sát ảnh hưởng của Adavosertib lên tế bào TFK1. **Kết quả:** Adavosertib ức chế tăng sinh tế bào TFK1 phụ thuộc liều, đạt IC₅₀ = 0,859 μ M. Adavosertib đã ức chế sự phát triển của tế bào TFK1 với diện tích của các cụm tế bào trong các nhóm điều trị giảm phụ thuộc vào liều sau hai tuần điều trị. Ở nồng độ 0,125 - 0,500 μ M, Adavosertib không làm giảm khả năng di trú của tế bào TFK1. **Kết luận:** Adavosertib thể hiện hiệu quả ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư đường mật TFK1 *in vitro*.

Từ khóa: Ung thư đường mật, Adavosertib, Chất ức chế Wee1, TFK1.

The anti-proliferative effect of Adavosertib on cholangiocarcinoma cells

Bui Khắc Cường^{1,2,3,4}, Nguyen Nhu Ngọc^{2,3}, Nguyen Thi Mai Ly^{5*}

¹Department of Experimental Medicine, 108 Military Central Hospital

²Laboratory Animal Research Center, Vietnam Military Medical University

³Department of Pathophysiology, Vietnam Military Medical University

⁴Vietnamese-German Centre for Medical Research (VG-CARE)

⁵Department of Biochemistry, Military Hospital 103

Abstract

Background: Adavosertib, a selective Wee1 tyrosine kinase inhibitor, has recently demonstrated potent anticancer activity across multiple tumor types. This study aimed to evaluate the *in vitro* anticancer effects of Adavosertib on the human cholangiocarcinoma cell line TFK1. **Materials and Methods:** The human cholangiocarcinoma TFK1 cell line was treated with varying concentrations of Adavosertib. The study used WST-1 assay, Crystal Violet assay and cell migration assay to evaluate the effect of Adavosertib on TFK1 cells. **Results:** Adavosertib inhibited TFK1 cell proliferation in a dose-dependent manner, with an IC₅₀ of 0.859 μ M. After two weeks of treatment, Adavosertib significantly reduced the area of TFK1 cell clusters in a concentration-dependent fashion. At concentrations ranging from 0.125 to 0.500 μ M, Adavosertib did not impair the migratory ability of TFK1 cells. **Conclusion:** Adavosertib effectively suppressed proliferation of the human cholangiocarcinoma TFK1 cell line *in vitro*.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Adavosertib, Wee1 inhibitor, TFK1.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đường mật là một loại ung thư hiếm gặp, rất xâm lấn có nguồn gốc từ các tế bào biểu mô của ống mật, đứng thứ hai trong các bệnh ung thư nguyên phát ở gan trên thế giới [1]. Trong 40 năm gần đây, các cuộc điều tra dịch tễ học chỉ ra rằng tỷ

lệ mắc bệnh và tử vong của ung thư đường mật có xu hướng tăng lên đáng chú ý trên toàn thế giới, đặc biệt là ở châu Á và châu Mỹ [2]. Ung thư đường mật được chia làm ung thư trong gan và ngoài gan [3]. Các triệu chứng lâm sàng trong giai đoạn đầu của bệnh còn mờ nhạt, không rõ ràng làm cho chẩn đoán khó

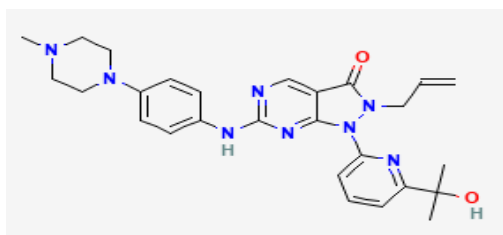
* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Mai Ly. Email: dr.nguyenmaily@gmail.com

Ngày nhận bài: 15/01/2025; Ngày đồng ý đăng: 15/10/2025; Ngày xuất bản: 25/12/2025

DOI: 10.34071/jmp.2025.7.16

khẩn và hầu hết bệnh nhân không có biểu hiện lâm sàng cho đến khi bệnh đã tiến triển đến giai đoạn trung gian hoặc tiến triển, nhưng các lựa chọn điều trị tại thời điểm này rất ít và tiên lượng xấu [1]. Thời gian sống sót sau 5 năm còn thấp, dưới 20% [4, 5]. Điều này đặt ra cần có nhiều nghiên cứu về các thuốc điều trị hiệu quả cho bệnh ung thư đường mật.

Wee1 kinase (hay Wee1) là một tyrosine kinase đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn điểm kiểm soát chu kỳ tế bào G2/M để sửa chữa DNA [6]. Khi tế bào bị tổn thương DNA, Wee1 tham gia vào con đường ATR-Chk1-Wee1 bằng cách kích thích phosphory hóa ức chế tại vị trí Tyr-15 của CDK1, dẫn đến ngăn chặn phức hợp Cyclin B-CDK1 đưa tế bào vào nguyên phân, gây ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2, cho phép thời gian sửa chữa DNA [6]. Ở các tế bào bình thường khi có tổn thương DNA sẽ bị bắt giữ ở điểm kiểm soát G1/S nhờ vai trò của protein p53; tuy nhiên, các tế bào ung thư thường mang biểu hiện bất thường protein p53 khiến điểm kiểm soát G1/S bị thiếu và tế bào bị phụ thuộc vào điểm kiểm soát G2/M để phản ứng với tổn thương DNA [7]. Sự tăng biểu hiện của Wee1 đã được quan sát thấy trong một số loại ung thư [7]. Điều quan trọng, sự tăng biểu hiện của Wee1 có liên quan đến quá trình xâm lấn, di căn của khối u và tiên lượng xấu [8]. Những nghiên cứu này chỉ ra rằng Wee1 có thể đóng một vai trò quan trọng trong sự hình thành khối u và tiến triển của bệnh. Adavosertib ($C_{27}H_{32}N_8O_2$), một chất ức chế phân tử nhỏ của Wee1 kinase, đã được phát triển như một liệu pháp hướng đích và cho thấy hiệu quả chống ung thư tiềm năng trên nhiều dòng tế bào ung thư của con người [7, 8].



Hình 1. Cấu trúc hóa học của Adavosertib (PubChem)

Tuy nhiên, các nghiên cứu về việc sử dụng Adavosertib đơn độc như một tác nhân hướng đích trong ung thư đường mật còn hạn chế [7]. Do vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá hoạt tính kháng ung thư *in vitro* của Adavosertib - một chất ức chế tyrosine kinase Wee1 - trên dòng tế bào ung thư đường mật ở người TFK1.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Dòng tế bào ung thư đường mật ở người TFK1 (ACC-344) có nguồn gốc từ trung tâm Leibniz (Đức) là một dòng tế bào ung thư đường mật được tách ra từ khối u đường mật của một người đàn ông 63 tuổi.

Adavosertib (tên khác AZD1775 hoặc MK-1775) ($C_{27}H_{32}N_8O_2$): là chất ức chế chọn lọc enzyme Wee1 kinase. Chế phẩm có nồng độ gốc 10mM được mua từ công ty Selleckchem (Hoa Kỳ). Chế phẩm được bảo quản ở tủ lạnh -20°C. Trước mỗi thử nghiệm, chế phẩm được rã đông và pha loãng trong môi trường nuôi cấy tế bào.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư TFK1 được nuôi cấy trong điều kiện khuyến cáo của nhà cung cấp: môi trường nuôi cấy RPMI bổ sung 10% FBS và 100U/mL penicillin/streptomycin, tủ nuôi cấy duy trì ở 37°C and 5% CO₂. Tế bào được kiểm tra và thay môi trường 2 - 3 lần/tuần.

Thử nghiệm WST-1

Tế bào TFK1 được gieo ở mật độ 2000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng và được ủ qua đêm trước khi được điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μ M, 0,250 μ M và 0,500 μ M. Nhóm đối chứng (control) được điều trị với môi trường nuôi cấy tế bào. Sau 72 giờ, tế bào được ủ với WST-1 5% ở 37°C, 5% CO₂ trong 2 giờ. Giá trị độ hấp thụ được xác định ở bước sóng 450 nm với bước sóng tham chiếu 620 nm bằng máy đo quang (Tecan, Thụy Sĩ). Tỷ lệ tế bào sống ở nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ tế bào sống (\%)} = \frac{\text{Độ hấp thụ nhóm điều trị}}{\text{Độ hấp thụ nhóm đối chứng}} \times 100\%$$

Thử nghiệm Crystal Violet

Tế bào TFK1 được gieo ở mật độ 700 tế bào/giếng trên đĩa 12 giếng và ủ qua đêm trước khi được điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μ M, 0,250 μ M và 0,500 μ M. Nhóm đối chứng được điều trị với môi trường nuôi cấy tế bào. Quá trình điều trị được kết thúc khi có giếng đạt mật độ tế bào 80% bề mặt.

Sau đó, tế bào được nhuộm với Crystal Violet 1% và rửa 3 lần với PBS. Hình ảnh cụm tế bào sẽ được chụp và phân tích trên phần mềm ImageJ.

Thử nghiệm di trú tế bào

Tế bào được gieo với mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng trong đĩa 12 giếng và ủ trong tủ nuôi cấy tế bào. Khi mật độ tế bào đạt khoảng 80%, vết thương được rạch

bằng đầu micropipet 200 μ l, sau đó rửa nhẹ nhàng tế bào với PBS. Các giếng được điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μ M, 0,250 μ M và 0,500 μ M. Nhóm đối chứng được điều trị với môi trường nuôi cấy tế bào. Vết thương được chụp ảnh tại thời điểm 0, 24 và 72 giờ sau khi điều trị. Sau đó, diện tích vết thương được đo trên phần mềm ImageJ.

Công thức sau được sử dụng để tính toán chỉ số di trú của tế bào:

$$\text{Chỉ số di trú tế bào (\%)} = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \times 100\%$$

Với S_0 và S_t lần lượt là diện tích vết thương tại thời điểm 0 giờ và t giờ sau khi rạch vết thương [8].

Xử lý số liệu

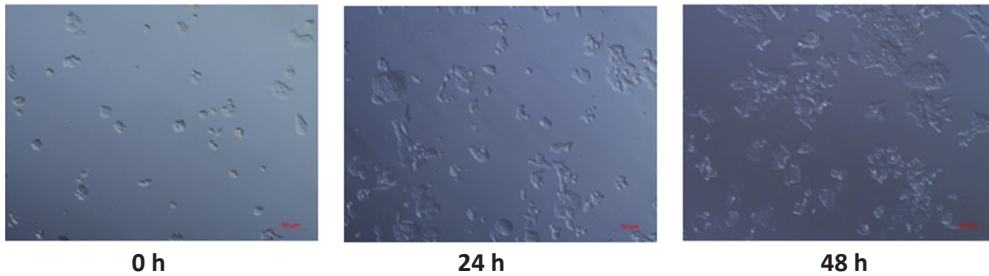
Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. So sánh giữa các nhóm được thực hiện bằng kiểm định one-way ANOVA trong thử

thử nghiệm WST-1 và thử nghiệm Crystal Violet. Kiểm định two-way ANOVA được sử dụng để so sánh giữa các nhóm trong thử nghiệm di trú tế bào. Sự khác biệt của từng nhóm điều trị so với nhóm đối chứng được kiểm tra bằng hậu kiểm Tukey. Giá trị $P < 0.05$ được chấp nhận là tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ

Kết quả nuôi cấy tế bào ung thư đường mật TFK1

Tế bào TFK1 được quan sát bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 10X (Hình 2). Tế bào TFK1 là các tế bào biểu mô tuyến đường mật bám đáy, phát triển đơn lớp với thời gian tăng trưởng tế bào là 34-40h. Tăng sinh tế bào TFK1 cho kết quả tốt, số lượng tế bào tăng nhanh, đồng đều trên toàn bộ bề mặt đáy đĩa nuôi cấy. Tế bào có thể phát triển cả trên môi trường RPMI hoặc DMEM. Điều này cũng phù hợp với đặc điểm tế bào ung thư đường mật.



Hình 2. Sự phát triển tế bào ung thư đường mật ở người TFK1 theo thời gian tại các thời điểm 0, 24 và 48 giờ sau khi gieo tế bào (vật kính 10x).

Thử nghiệm đáp ứng liều WST-1

Thử nghiệm WST-1 đã được chúng tôi tiến hành để đánh giá tác động chống ung thư của Adavosertib

đối với sự phát triển của tế bào TFK1. Sau khi ủ tế bào với Adavosertib ở các nồng độ khác nhau trong 72 giờ, tỉ lệ tế bào TFK1 sống đã giảm đáng kể (Hình 3).

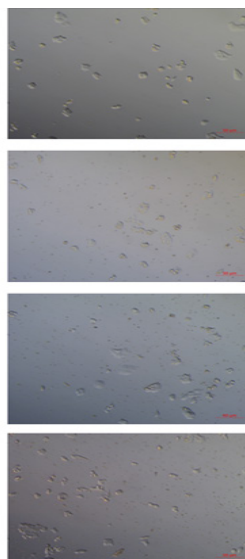
A

control

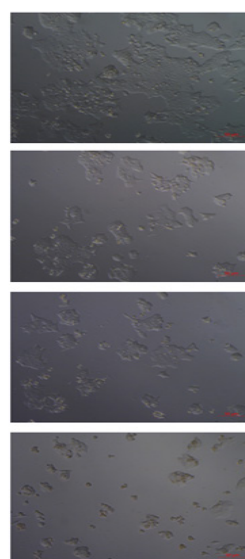
0,125 μ M

0,250 μ M

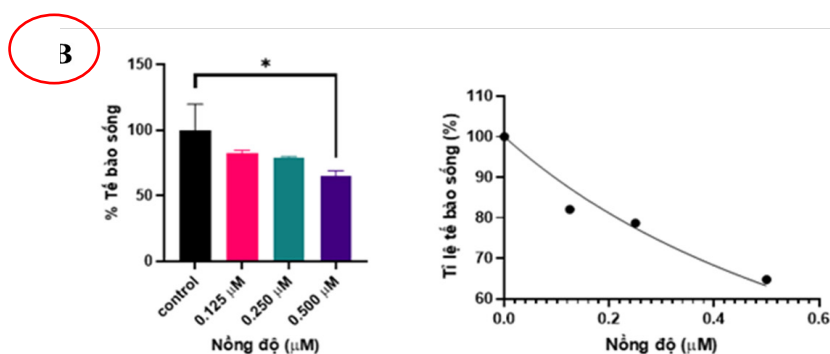
0,500 μ M



0 h



72 h

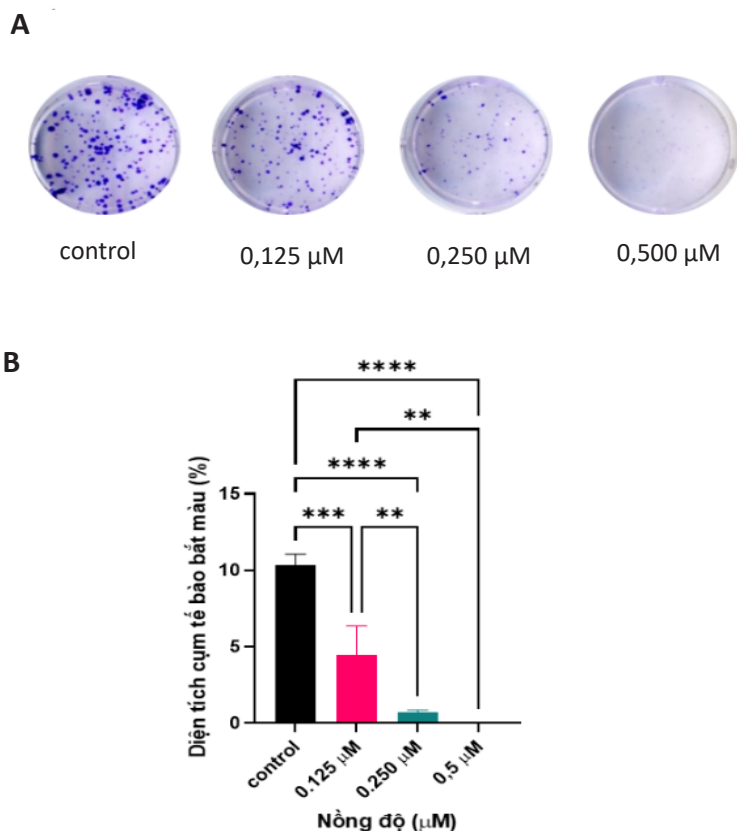


Hình 3. Adavosertib ức chế khả năng tăng sinh của tế bào ung thư đường mật TFK1 trong thử nghiệm WST-1. (A) Hình thái tế bào của nhóm đối chứng (control) và các nhóm điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μM, 0,250 μM và 0,500 μM tại thời điểm 0 giờ và 72 giờ sau điều trị (quan sát dưới vật kính 10x). (B) Đồ thị biểu diễn tỉ lệ tế bào sống và đường cong đáp ứng theo liều của tế bào TFK1 sau 72 giờ điều trị với Adavosertib. Giá trị IC₅₀ = 0,859 μM. (*p < 0,05).

Thử nghiệm Crystal Violet

Để xác định tác động chống ung thư của sự ức chế Wee1 kinase bằng Adavosertib đối với tế bào TFK1, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm Crystal Violet. Kết

quả của chúng tôi cho thấy rằng Adavosertib đã ức chế sự phát triển của tế bào TFK1 với diện tích của các cụm tế bào bắt màu trong các nhóm điều trị giảm phụ thuộc vào liều lượng sau hai tuần điều trị (Hình 4).



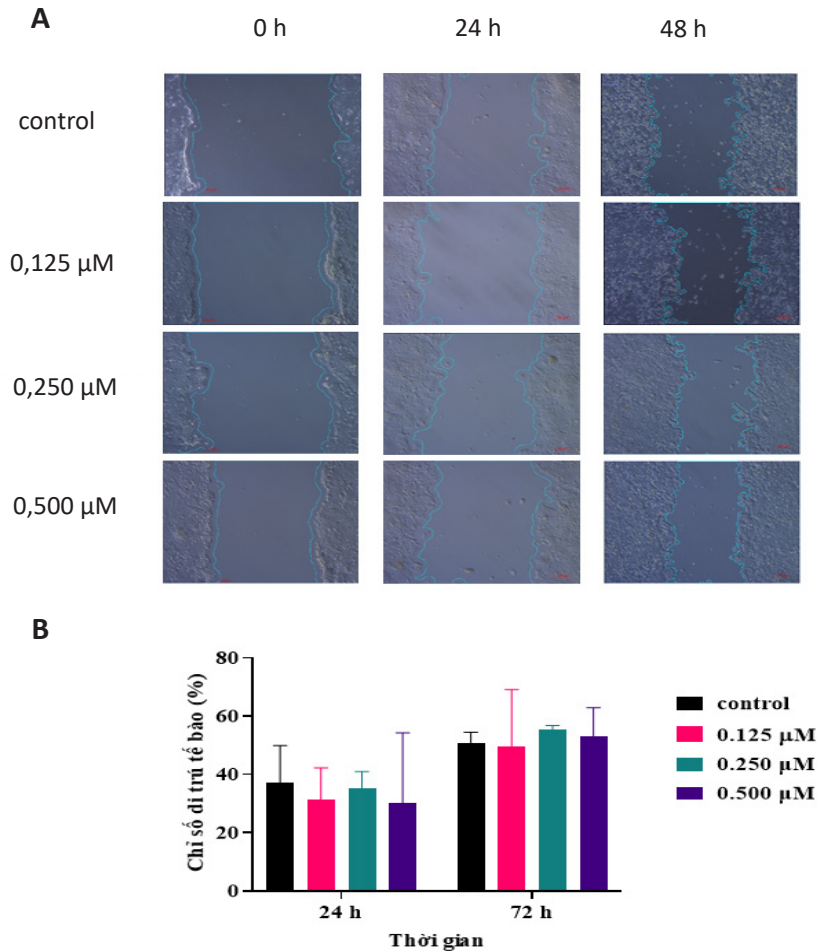
Hình 4. Adavosertib ức chế khả năng tăng sinh của tế bào ung thư đường mật TFK1 trong thử nghiệm Crystal Violet. (A) Hình ảnh cụm tế bào TFK1 bắt màu Crystal Violet ở nhóm đối chứng và các nhóm điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μM, 0,250 μM và 0,500 μM. (B) Biểu đồ thể hiện tỉ lệ diện tích cụm tế bào TFK1 được nhuộm ở nhóm đối chứng và các nhóm điều trị với Adavosertib. (**P < 0,01; ***P < 0,001 và ****P < 0,0001).

Thử nghiệm di trú tế bào

Để xác Adavosertib khả năng ức chế sự di trú của tế bào TFK1, thử nghiệm di trú tế bào (hay thử nghiệm làm lành vết thương) đã được thực hiện để đánh giá khả năng di chuyển của tế bào.

Sau khi điều trị ở các nồng độ khác nhau của thuốc, tốc độ liền vết thương của các nhóm điều trị với Adavosertib được chúng tôi theo dõi thông qua chỉ số di trú tế bào. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chỉ số di trú tế bào giữa

các nhóm điều trị và nhóm chứng. Thử nghiệm cũng chứng tỏ tế bào ung thư đường mật có xu hướng xâm lấn, di căn cao. Ngoài ra, nồng độ thuốc điều trị vẫn còn thấp (nồng độ Adavosertib từ 0,125 μM tới 0,500 μM chỉ ức chế khoảng 20% - 30% sự phát triển của tế bào TFK1 trong cùng thời gian 72 giờ được thể hiện trong thử nghiệm WST-1), do vậy nồng độ Adavosertib từ 0,125 μM tới 0,500 μM chưa cho thấy tác dụng ức chế di trú trên dòng tế bào ung thư đường mật TFK1 (Hình 5).



Hình 5. Adavosertib không tác động lên khả năng di trú của tế bào ung thư đường mật TFK1.

(A) Hình ảnh vết rạch tế bào của nhóm đối chứng và các nhóm điều trị với Adavosertib ở các nồng độ 0,125 μM , 0,250 μM và 0,500 μM (vật kính 4x).

(B) Biểu đồ thể hiện chỉ số di trú tế bào tại thời điểm 24 và 72 giờ sau khi điều trị với Adavosertib.

4. BÀN LUẬN

Ung thư đường mật là một loại ung thư khá hiếm gặp. Tuy nhiên tiên lượng của bệnh nhân thường khá kém, hiệu quả điều trị chưa cao và tỉ lệ sống trên năm năm thường khá thấp. Do đó, nghiên cứu nhằm đích nhằm mục tiêu nâng cao hiệu quả điều trị ung thư đường mật là vấn đề cấp thiết. Trong nghiên cứu

này, chúng tôi khảo sát tác dụng của Adavosertib, một chất ức chế Wee1, trên dòng tế bào ung thư đường mật TFK1, là một dòng tế bào ung thư đường mật thường được sử dụng trong các nghiên cứu *in vitro*. Thông qua thử nghiệm WST-1, chúng tôi nhận thấy tác động của Adavosertib tác động lên dòng tế bào TFK1 phụ thuộc vào nồng độ với $\text{IC}_{50} = 0,859$

μM , kết quả này có cao hơn một số dòng tế bào khác như ung thư thực quản là 0,300 - 0,600 μM trong nghiên cứu của Linlin Yang và cộng sự [9]. Hoặc trong nghiên cứu của Yoo-Young Lee và cộng sự, nồng độ ức chế tế bào ung thư cổ tử cung ở 0,300 μM [10]. Điều này cho thấy sự khó khăn trong điều trị đơn trị liệu với Adavosertib trên dòng tế bào TFK1. Ngoài ra, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm Crystal Violet và cho thấy rằng Adavosertib đã ức chế sự phát triển của tế bào TFK1 với diện tích của các cụm tế bào bắt màu trong các nhóm điều trị giảm rõ rệt sau hai tuần điều trị. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng đánh giá tác dụng của Adavosertib trong ức chế sự di trú của tế bào TFK1. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chỉ số di trú tế bào giữa các nhóm điều trị và nhóm chứng. Thử nghiệm cũng cho thấy tế bào ung thư đường mật có xu hướng xâm lấn và di căn cao. Biểu hiện của Wee1 có xu hướng tăng cao trong một số loại ung thư đã được báo cáo, do đó tác động vào Wee1 có thể là cách tiếp cận nhiều tiềm năng, đặc biệt là thông qua các chất ức chế đặc hiệu có khối lượng phân tử nhỏ như Adavosertib [7]. Sự tăng biểu hiện của Wee1 có liên quan đến quá trình xâm lấn, di căn và tiên lượng xấu, vì vậy các khảo sát *in vitro* có thể cung cấp các dữ liệu bước đầu quan

trọng cho các đánh giá tiếp theo [8]. Những kết quả trên cho thấy ức chế Wee1 có thể đóng một vai trò quan trọng trong ung thư đường mật. Adavosertib, một chất ức chế phân tử nhỏ của Wee1 kinase, đã và đang được phát triển nghiên cứu như một liệu pháp hướng đích nhằm mục tiêu tăng cường hiệu quả điều trị ung thư. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn một số hạn chế như mới chỉ đánh giá tác dụng trên *in vitro*, chưa đi sâu vào nghiên cứu cơ chế phân tử của các tác dụng của thuốc. Do đó, cần triển khai các nghiên cứu sâu hơn để làm rõ vấn đề này.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả của chúng tôi cho thấy rằng liệu pháp điều trị đích sử dụng Adavosertib, một chất ức chế đặc hiệu Wee1 kinase, có tác dụng ức chế khả năng tăng sinh của dòng tế bào ung thư đường mật người TFK1 *in vitro*. Tuy nhiên, chưa ghi nhận tác dụng của Adavosertib lên di trú tế bào ở nồng độ đã thử nghiệm.

Tuyên bố về xung đột lợi ích: Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2019.324.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2014;383(9935):2168-79.
2. Saha SK, Zhu AX, Fuchs CS, Brooks GA. Forty-Year Trends in Cholangiocarcinoma Incidence in the U.S.: Intrahepatic Disease on the Rise. *Oncologist*. 2016;21(5):594-9.
3. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, Evert M, Guido M, Goepfert B, et al. Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2019;39 Suppl 1:7-18.
4. Horgan AM, Amir E, Walter T, Knox JJ. Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1934-40.
5. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg*. 2007;245(5):755-62.
6. Geenen JJJ, Schellens JHM. Molecular Pathways: Targeting the Protein Kinase Wee1 in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(16):4540-4.
7. Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(10):872-81.
8. Bi S, Wei Q, Zhao Z, Chen L, Wang C, Xie S. Wee1 Inhibitor AZD1775 Effectively Inhibits the Malignant Phenotypes of Esophageal Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo. *Front Pharmacol*. 2019;10:864.
9. Yang L, Shen C, Pettit CJ, Li T, Hu AJ, Miller ED, et al. Wee1 Kinase Inhibitor AZD1775 Effectively Sensitizes Esophageal Cancer to Radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2020;26(14):3740-50.
10. Lee YY, Cho YJ, Shin SW, Choi C, Ryu JY, Jeon HK, et al. Anti-Tumor Effects of Wee1 Kinase Inhibitor with Radiotherapy in Human Cervical Cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):15394.