

Nghiên cứu

Thiết lập quy trình nuôi cấy và đánh giá đặc điểm mô học organoid ung thư đại trực tràng

Trần Thu Thủy¹, Phạm Quốc Thắng^{1*}, Nguyễn Minh Phương^{1*}, Lê Hồng Ngân^{1,2}, Bùi Nhật Vy¹, Đặng Trần Quân¹, Lê Minh Triết³, Trần Thanh Sang³, Vũ Tuấn Dũng¹, Hoàng Danh Tấn³, Ngô Quốc Đạt¹

¹Bộ môn Mô phôi - Giải phẫu bệnh, Trường Y, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Y Dược, Trường Đại học Tây Nguyên

³Khoa Ngoại Tiêu hóa, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): Phạm Quốc Thắng; Email: phamquocthang@ump.edu.vn

Nguyễn Minh Phương, Email: nguyenminhphuong@ump.edu.vn

Ngày nhận bài (Received): 02/05/2026; Ngày duyệt đăng (Accepted): 20/06/2026; Ngày xuất bản (Published): 10/08/2026

DOI:10.34071/jmp.2026.S-2.21

Đặt vấn đề: Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là một gánh nặng y tế toàn cầu. Các mô hình nghiên cứu tiền lâm sàng truyền thống thường thất bại trong việc tái tạo cấu trúc không gian và tính đa dạng di truyền của khối u. Organoid là công nghệ nuôi cấy từ tế bào gốc, tái tạo phiên bản thu nhỏ và giúp bảo tồn các đặc điểm mô bệnh học của cơ quan gốc.

Mục tiêu: Thiết lập quy trình nuôi cấy organoid UTĐTT tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về sinh lý, bệnh học cũng như điều trị.

Đối tượng và Phương pháp: Mẫu mô u thu thập sau phẫu thuật tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM sẽ được xử lý và nuôi cấy trên khung giá thể chất nền ngoại bào. Các dòng organoid hình thành sẽ được đánh giá hình thái, cấu trúc qua nhuộm H&E và biểu hiện các dấu ấn miễn dịch CK20, CDX2.

Kết quả: Nghiên cứu đã tạo được organoid UTĐTT sau 2 - 7 ngày, với các hình thái organoid dạng đặc, nang qua các lần cấy chuyền. Kết quả nhuộm H&E và hóa mô miễn dịch cho thấy các dòng organoid tái tạo cấu trúc mô học của ung thư biểu mô tuyến đại tràng, với sự tương đồng biểu hiện của các dấu ấn đặc hiệu CK20 và CDX2.

Kết luận: Nghiên cứu xây dựng thành công quy trình nuôi cấy và tạo ra các dòng organoid UTĐTT, góp phần tạo nền tảng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng về sàng lọc thuốc cá thể hóa và tìm hiểu cơ chế bệnh sinh của UTĐTT.

Từ khóa: Ung thư đại trực tràng; organoid, PDOs; tế bào gốc ung thư; nuôi cấy ngoài cơ thể.

Establishment of culture protocol and histological evaluation of patient-derived colorectal cancer organoid

Tran Thu Thuy¹, Pham Quoc Thang^{1*}, Nguyen Minh Phuong^{1*}, Le Hong Ngan^{1,2}, Bui Nhat Vy¹, Dang Tran Quan¹, Le Minh Triet³, Tran Thanh Sang³, Vu Tuan Dung¹, Hoang Danh Tan³, Ngo Quoc Dat¹

¹Department of Histology – Embryology and Pathology, School of Medicine, University of Medicine and Pharmacy at Hochiminh City

²Faculty of Medicine and Pharmacy, Tay Nguyen University

³Surgical Gastroenterology Department, University Medical Center, Hochiminh City, Vietnam

Background: Colorectal cancer (CRC) remains a significant global health burden. Traditional preclinical research models often fail to recapitulate the complex spatial architecture and genetic heterogeneity of the original tumors. Organoid are a culture technology derived from stem cells, recreating miniature versions and helping to preserve the histopathological characteristics of the original organ.

Objective: Establishing a culture protocol for CRC organoid creates a premise for further studies on physiology, pathology and treatment.

Materials and Methods: Primary tumor tissues will be collected from patients undergoing surgical resection at the University Medical Center Ho Chi Minh City. The samples will be processed and cultured within an Extracellular Matrix (ECM) scaffold. The established organoid will be characterized based on morphology and histological architecture via Hematoxylin & Eosin (H&E) staining and via the expression of CK20 and CDX2 markers through immunohistochemical (IHC) analysis.

Results: The study created CRC organoid after 2 - 7 days, with solid, cystic organoid morphologies across passages. H&E staining and immunohistochemistry results showed that organoid lines reproduced the histological structure of colorectal adenocarcinoma, with similar expression of specific markers CK20 and CDX2.

Conclusion: The study successfully built a culture protocol and created colorectal cancer organoid lines, contributing to laying the foundation for preclinical studies on personalized drug screening and understanding the pathogenesis of CRC.

Keywords: Colorectal cancer; Organoid; Patient-Derived Organoid (PDOs); Cancer stem cells; Ex vivo culture technology.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) đang là một thách thức y tế nghiêm trọng với số ca mắc mới và tử vong ngày càng tăng. Theo GLOBOCAN năm 2022 tại Việt Nam, UTĐTT đứng thứ tư về tỉ lệ mắc mới (> 16.800 ca/năm) và thứ 5 về tỷ lệ tử vong (> 8.400 ca/năm) [1].

Hiện tại, việc nghiên cứu cơ chế bệnh sinh và phát triển liệu pháp mới cho UTĐTT gặp nhiều khó khăn do hạn chế của các mô hình tiền lâm sàng. Các dòng tế bào ung thư 2D truyền thống nuôi cấy trên mặt phẳng không giữ được tính đa dạng di truyền và đặc điểm của khối u gốc, trải qua những biến đổi di truyền sau nhiều lần cấy chuyển, cũng như không tái tạo được vi môi trường phức tạp trong cơ thể [2]. Trong khi đó, mô hình ghép khối u từ bệnh nhân lên động vật dù bảo tồn tốt cấu trúc mô học nhưng lại rất tốn kém, mất thời gian, hiệu suất thấp, hơn nữa không có hệ miễn dịch người, gây khó khăn cho việc sàng lọc thuốc quy mô lớn [3].

Trong bối cảnh đó, công nghệ nuôi cấy organoid nổi lên như một giải pháp tiền lâm sàng đầy hứa hẹn. Organoid được tạo ra từ tế bào gốc trưởng thành hoặc tế bào gốc ung thư phân lập trực tiếp từ mẫu mô sinh thiết hoặc phẫu thuật của bệnh nhân. Chúng có khả năng tự tổ chức thành các cấu trúc ba chiều *in vitro* phức tạp, tái tạo lại cấu trúc vi thể, thành phần tế bào và chức năng của mô gốc. Bên cạnh đó, organoid có thể bảo tồn trung thực các đặc điểm mô bệnh học, tính đa dạng di truyền và phân tử của khối u nguyên phát, đồng thời duy trì sự ổn định này qua nhiều thế hệ nuôi cấy [4-6].

Để giải quyết khoảng trống trong các mô hình nghiên cứu hiện có, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thiết lập quy trình nuôi cấy organoid ung thư đại trực tràng từ bệnh nhân Việt Nam với mục tiêu tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về sinh lý, bệnh học cũng như điều trị. Điều này không chỉ cung cấp một công cụ nghiên cứu phù hợp với đặc điểm di truyền và lâm sàng của người Việt mà còn là cơ sở để phát triển các nghiên cứu cơ bản về y học cá thể hóa.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu Thực nghiệm - mô tả.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu mô khối u nguyên phát (n = 5) được thu thập từ 5 bệnh nhân từ 18 tuổi trở lên được chẩn đoán ung thư đại trực tràng, chưa được điều trị trước đó và trải qua phẫu thuật cắt bỏ khối u tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xử lý mẫu và nuôi cấy organoid

Mẫu mô u được thu thập trong ống Falcon 50 ml có chứa 15 ml Complete DMEM, bảo quản ở 4°C trong 12 giờ sau phẫu thuật. Mẫu được rửa, phân tách bằng phương pháp cơ học và bằng tác dụng của enzyme collagenase type I thu được các tuyến chứa tế bào gốc UTĐTT và các tế bào gốc đơn. Các tuyến/tế bào gốc này được vùi trong khung giá thể chất nền ngoại bào (ECM) và được cung cấp các chất dinh dưỡng, yếu tố tăng trưởng, yếu tố ức chế phù hợp để phát triển thành organoid.

Bảng 1. Quy trình nuôi cấy organoid

Tất cả các bước được thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp 2

Bước	Thực hiện
1	Rửa mô u bằng PBS lạnh 3 lần và AB+Hank 3 lần; cắt thành các mảnh nhỏ ~1 - 3 mm ³
2	Ủ mô u trong DMEM/F12 chứa 50 µg/mL collagenase type I ở 37°C trong 30 phút. Kiểm tra tuyến/tế bào đơn tách ra dưới kính hiển vi.
3	Loại bỏ các mảnh mô lớn. Trung hòa collagenase I bằng AdvDMEM. Ly tâm ở 4°C, tốc độ 2000 vòng trong 5 phút thu cận lắng Rửa cận lắng 3 lần bằng Complete DMEM. Ly tâm trong 3 phút, 2000 vòng, 4°C sau mỗi lần rửa
4	Thêm ECM vào ống nghiệm theo tỉ lệ thể tích ECM/khối cận = 1/1 Nhỏ 40-50 µL/giọt vào đĩa 24 giếng đã được làm ấm Để ECM đông đặc trong 20 phút trong tủ nuôi cấy tế bào (37°C & CO ₂ 5%)

- 5 Phủ môi trường nuôi cấy lên giọt ECM
Ủ đĩa trong tủ nuôi cấy tế bào (37°C & CO₂ 5%)
Kiểm tra organoid hàng ngày. Thay môi trường mỗi 2 - 3 ngày

2.3.2. Cấy chuyển

Khi organoid phát triển lớn, dày (thường sau 7 - 14 ngày), tiến hành cấy chuyển. Việc cấy chuyển được lặp lại sau từng thế hệ. Kí hiệu “P” cho thế hệ cấy chuyển (passing number) và “d” cho số ngày (day). Tỷ lệ chia tách thường dao động 1:2 - 1:4 tùy vào mật độ organoid.

Bảng 2. Quy trình cấy chuyển organoid
Tất cả các bước được thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp 2

Bước	Thực hiện
1	Thu organoid bằng PBS lạnh và ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 2000 vòng và 4°C
2	Phân tách organoid bằng TrypLe 1X, ủ trong 15 phút ở 37°C
3	Trung hòa TrypLe bằng AdvDMEM Ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 2000 vòng và 4°C
4	Thêm ECM vào ống nghiệm theo tỉ lệ thể tích ECM/khối cặn = 3/1 Nhỏ 40-50 µL/giọt vào đĩa 24 giếng đã được làm ấm Để ECM đông đặc trong 20 phút trong tủ nuôi cấy tế bào (37°C & CO ₂ 5%)
5	Phủ môi trường nuôi cấy lên giọt ECM Ủ đĩa trong tủ nuôi cấy tế bào (37°C & CO ₂ 5%) Kiểm tra organoid hàng ngày. Thay môi trường mỗi 2 - 3 ngày

2.3.3. Môi trường nuôi cấy và các dung dịch

Ab+Hanks

HBSS

100 IU/ml Penicilin/Streptomycin

50 µg/ml Gentamycin

Complete DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium

100 IU/ml Penicilin/Streptomycin

50 µg/ml Gentamycin

1% FBS

AdvDMEM

Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12

1X Glutamax supplement

100 IU/ml Penicillin/Streptomycin

50 µg/ml Gentamycin

10% FBS

Bảng 3. Thành phần môi trường nuôi cấy

Thành phần	Đơn vị	Nồng độ
Wnt3a-CM	%	30
Rspo2-CM	%	20
Noggin-CM	%	10
Penicillin/ Streptomycin	IU/mL	100
Gentamycin	µg/mL	100
Amphotericin B	µg/mL	2,5
BSA	%	0,8
Glutamax	X	0,8
B27	X	0,25
Y-27632	µM	10
p38 inhibitor	µM	10
A83-01	µM	0,5
Nicotinamide	mM	10
N-acetyl cystein	mM	1
HGF	ng/mL	5
EGF	ng/mL	20

Lưu ý: Môi trường nuôi cấy nền là Advanced Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (AdDMEM/F12) được bổ sung để đạt được thể tích 100%.

2.3.4. Phân tích đặc tính organoid

Phân tích hình thái học

Chụp ảnh hàng tuần bằng kính hiển vi soi ngược để ghi nhận sự hình thành, tốc độ tăng trưởng và kích thước của organoid theo thời gian và số lần cấy chuyền.

Phân tích đặc điểm mô học

Thu hoạch organoid ở các P ổn định ($P \geq 3$). Cố định organoid bằng dung dịch Formalin 10%, sau đó được nhuộm Hematoxylin & Eosin (H&E).

Phân tích đặc điểm hóa mô miễn dịch

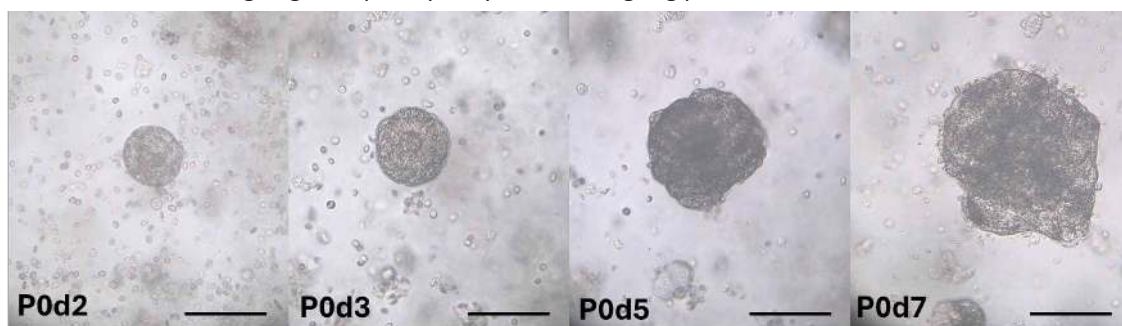
Thu hoạch organoid ở các P ổn định ($P \geq 3$). Cố định organoid bằng dung dịch Formalin 10%, sau đó được nhuộm hóa mô miễn dịch với các dấu ấn CK20 và CDX2.

2.3.5. Đạo đức nghiên cứu

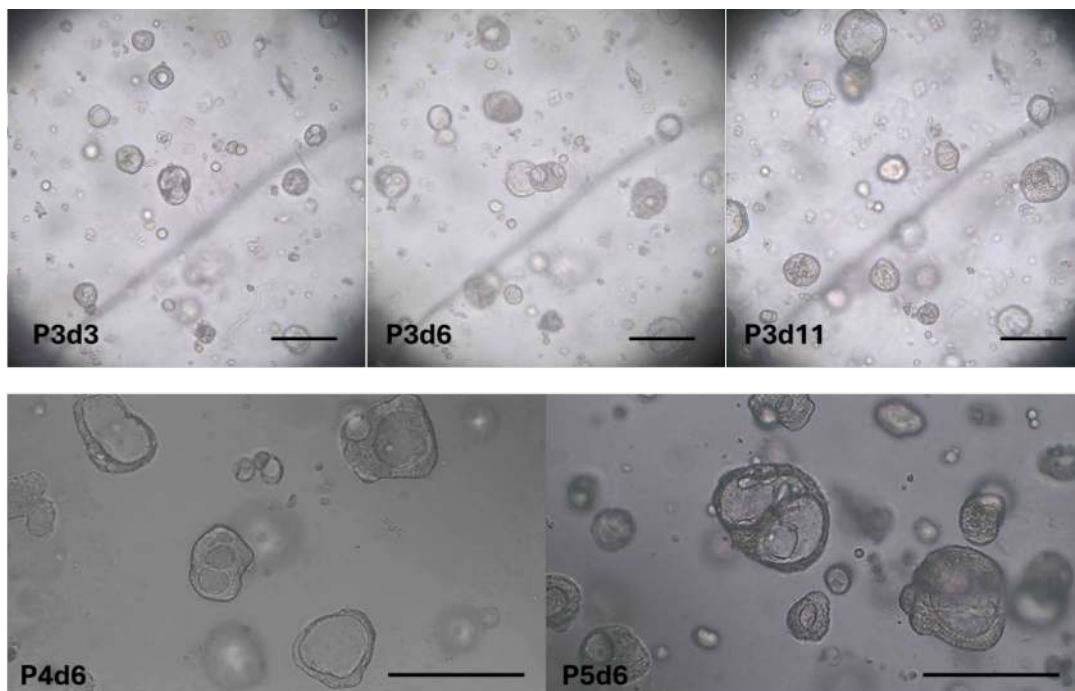
Nghiên cứu được thông qua y đức bởi Hội đồng Y đức trong nghiên cứu y sinh học Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo Quyết định số 4609/DHYD-HĐĐĐ, chấp thuận ngày 11/11/2025.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

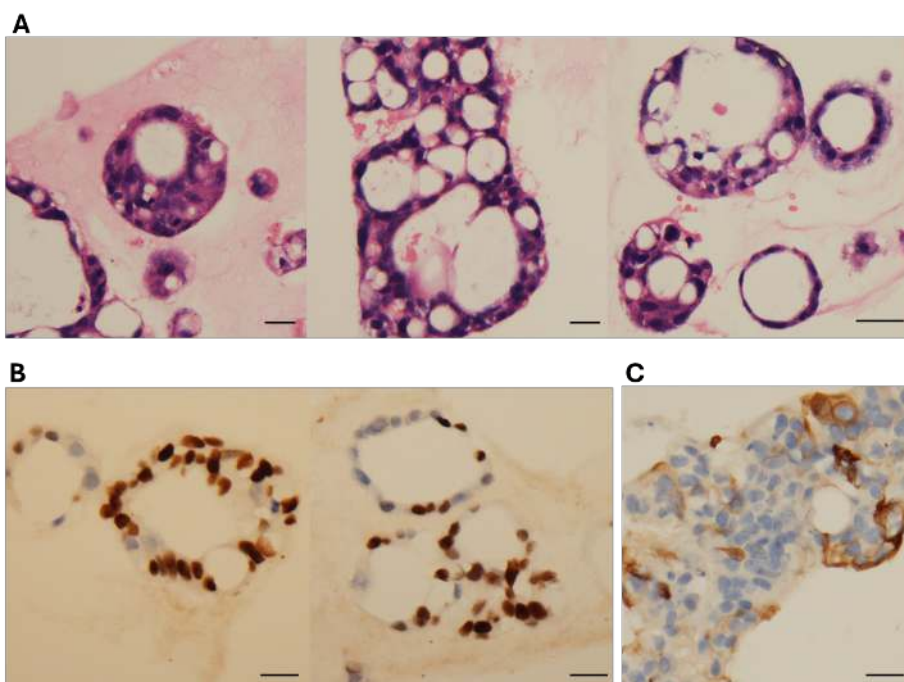
Mẫu mô u ($n = 5$) được thu thập từ 5 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư đại trực tràng, bảo quản ở 4°C và được xử lý trong 2 giờ sau phẫu thuật. 1 mẫu không phát triển, 4 mẫu nuôi cấy được organoid trong đó có 1 mẫu nhiễm 60% số giếng. Kết quả cấy chuyền: 1 mẫu ngừng phát triển ở P3, 2 mẫu ở P5 và 1 mẫu ở P9.



Hình 1. Quá trình phát triển organoid UTĐTT (Scale bar: 100 μ m)



Hình 2. Cấy chuyền qua các thế hệ organoid quan sát dưới kính hiển vi quang học soi ngược. Organoid phân tách thành tế bào đơn lẻ và phát triển thành các organoid sau các lần cấy chuyền. (Scale bar: 100 μ m)



Hình 3. Phân tích đặc tính organoid. **(A)** Nhuộm H&E: Organoid cấu trúc dạng nang, nhân tế bào lớn, dị dạng tăng sắc. **(B)** Nhuộm IHC (CDX2): Nhân tế bào bắt màu nâu thể hiện dương tính với dấu ấn CDX2. **(C)** Nhuộm IHC (CK20): Bào tương bắt màu nâu thể hiện dương tính với dấu ấn CK20. (Scale bar: 20 μ m)

4. BÀN LUẬN

Chúng tôi đã thiết lập được quy trình nuôi cấy organoid UTĐTT từ mẫu mô phẫu thuật của 5 bệnh nhân với tỉ lệ tạo được organoid thành công là 80%, tương đương với tỉ lệ thành công 81- 90% của tác giả Wetering và cộng sự [7]. Để tối ưu hóa khả năng thu được quần thể tế bào gốc ung thư và giảm thiểu rủi ro thất bại do sự chết tế bào, cần sớm tiến hành xử lý mẫu sau phẫu thuật, lý tưởng nhất là ngay sau khi nhận được mẫu và trong vòng 12 giờ với điều kiện bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Quan sát đại thể mẫu không nuôi cấy được organoid, thấy bệnh phẩm nhiều vùng hoại tử, biểu hiện qua cấu trúc mô cứng và mủn bở khi tiến hành cắt lọc. Điều này cho thấy chất lượng khối u ban đầu đóng vai trò quan trọng đối với sự thành công của quy trình. Ở các bệnh phẩm có tỉ lệ hoại tử cao, các thao tác xử lý và rửa lọc cơ học thường quy không thể loại bỏ triệt để quần thể tế bào chết cũng như các mảnh vỡ tổ chức. Những thành phần tồn dư này khi đưa vào giá thể sẽ giải phóng các yếu tố gây độc, làm biến đổi tiêu cực vi môi trường nuôi cấy *in vitro*. Hậu quả là sự ức chế sinh trưởng, làm giảm đáng kể hiệu suất tạo lập organoid ở thể hệ đầu (P0) và gián tiếp làm suy yếu khả năng sống sót, duy trì của dòng tế bào trong dài hạn.

Về cơ chế phân tách mô, nhóm nghiên cứu sử dụng collagenase type I để phá vỡ cấu trúc mô u

giúp thu thập các tế bào đơn lẻ đã cho thấy hiệu quả tương đồng với các protocol trước đây, điển hình như việc sử dụng enzyme collagenase type II trong nghiên cứu của Pleguezuelos và cộng sự [8] hay collagenase XI do Yui Shiro và cộng sự [9] đề xuất. Khi được vùi trong khung giá thể chất nền ngoại bào ECM, các tế bào gốc này thể hiện khả năng tự tổ chức hình thành nên các cấu trúc không gian 3 chiều. Một số quần thể tế bào có tốc độ tăng sinh nhanh đã bắt đầu tạo hình sớm ngay từ ngày thứ 2, trong khi phần lớn quần thể organoid phát triển từ ngày thứ 4 và đạt mức độ hoàn thiện cấu trúc tối ưu sau 7 ngày nuôi cấy.

Để tế bào gốc ung thư có thể sống sót và tự tổ chức, môi trường nuôi cấy cần mô phỏng các tín hiệu từ vùng hốc tuyến, sự kết hợp của hệ thống các yếu tố Wnt3a, R-spondin 2 (Rspo2), Noggin và EGF đóng vai trò nòng cốt (môi trường WENR) [10]. So với các môi trường nuôi cấy tế bào 2D truyền thống, điểm khác biệt lớn nhất của mô hình 3D là sự phụ thuộc vào trục tín hiệu Wnt/ β -catenin khi Wnt kích thích tế bào tăng sinh liên tục [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, Wnt3a và Rspo2 được bổ sung dưới dạng môi trường điều kiện (Conditioned Medium - CM) với nồng độ lần lượt là 30% và 20%. Tỷ lệ này có sự khác biệt với protocol của Pleguezuelos-Manzano và cộng sự [8] với 50% Wnt3a và 20% Rspo1. R-spondin

đóng vai trò là một chất khuếch đại tín hiệu Wnt; việc sử dụng nồng độ 20% Rspo2-CM kết hợp 30% Wnt3a-CM giúp đảm bảo thụ thể Lgr5⁺ trên bề mặt tế bào gốc luôn ở trạng thái kích hoạt, qua đó duy trì khả năng tự làm mới liên tục của tế bào gốc ung thư [11, 12]. Việc sử dụng dạng môi trường điều kiện (CM) tự sản xuất thay vì protein tái tổ hợp tinh sạch giúp tối ưu về mặt chi phí, tuy nhiên nhược điểm là không đồng nhất được nồng độ chất trong các lô sản xuất.

Noggin hoạt động như một chất đối kháng tự nhiên của con đường tín hiệu BMP (Bone Morphogenetic Protein). Trong cơ thể, BMP thúc đẩy tế bào biểu mô ruột biệt hóa và đi vào chu trình chết theo chương trình (apoptosis) khi chúng di chuyển lên đỉnh nhung mao. Bổ sung Noggin-CM giúp ức chế triệt để tín hiệu này, ngăn chặn organoid biệt hóa sớm [10]. Song song đó, EGF ở nồng độ 20 ng/mL đóng vai trò kích hoạt con đường MAPK/ERK, cung cấp tín hiệu phân bào giúp các cụm tế bào nhanh chóng tăng sinh về kích thước, phù hợp với quan sát organoid phát triển mạnh vào ngày thứ 4 đến ngày thứ 7. Nồng độ 20 ng/mL EGF là mức tối ưu hóa với điều kiện của phòng thí nghiệm của chúng tôi đủ để kích thích tăng sinh mà không gây quá ngưỡng tín hiệu, tương đồng với nghiên cứu của Yui [9], thấp hơn so với protocol tiêu chuẩn của Sato là 50 ng/mL [10]. Ngoài ra, chúng tôi điều chỉnh nồng độ kháng sinh Penicilin/Streptomycin 100 IU/mL, tăng so với nồng độ 40 IU/mL của tác giả Yui [9] và nồng độ 25 IU/mL của nhóm tác giả Pleguezuelos [8]. Việc tăng nồng độ kháng sinh do các mẫu bệnh phẩm có tỉ lệ hoại tử cao và để phù hợp với môi trường dịch tế của Việt Nam.

Sự duy trì qua các thế hệ có sự khác biệt, có mẫu dừng lại ở P3 P5, có mẫu duy trì tới P9. Kết quả này còn hạn chế so với thời gian nuôi cấy trên 600 ngày và 50 thế hệ của tác giả Vlachogiannis và cộng sự [13], tuy nhiên tương đồng với thời gian organoid ngừng phát triển sau 3 tháng của tác giả Sato [10]. Sự hao hụt dòng tế bào ở các thế hệ đầu cho thấy giới hạn sinh học nội tại của chính khối u, phản ánh tỉ lệ phân bố thấp của tế bào gốc ung thư, đồng thời cho thấy tế bào u có độ ác tính chưa đủ cao để có thể độc lập sinh trưởng lâu dài trong môi trường *in vitro* khi thiếu vắng sự nâng đỡ của vi môi trường *in vivo*. Nhóm nghiên cứu của Gagliano và cộng sự [14] đã tiến hành giải trình tự toàn bộ exome (WES) trên organoid đại trực tràng ở thế hệ thứ 16. Kết quả xác nhận sự xuất hiện của các đột biến mới và sự lấn át của các tiểu quần thể phát triển nhanh, làm thay đổi bản chất của organoid gốc; do đó chiến lược tiếp theo của chúng tôi là mở rộng số lượng mẫu trong

5 thế hệ ổn định đầu tiên (P3-8), sau đó tiến hành trữ đông làm ngân hàng sinh học organoid (biobank); khi cần đánh giá mẫu sẽ được rã đông và cấy chuyển thêm để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả nhuộm H&E cho thấy organoid UTĐTT tái tạo lại cấu trúc dạng nang với tế bào mang các đặc điểm ác tính như đa hình thái, nhân lớn, dị dạng và tăng sắc (**Hình 3A**). Nhuộm hóa mô miễn dịch organoid với các dấu ấn đặc trưng của ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng cho thấy bào tương một số tế bào bắt màu nâu khi nhuộm với CK20 (**Hình 3C**) và nhân một số tế bào bắt màu nâu khi nhuộm với CDX2 (**Hình 3B**), biểu hiện dương tính xác định organoid có nguồn gốc từ đại trực tràng [15]. Hình ảnh học cho thấy organoid UTĐTT có đặc điểm mô học và hóa mô miễn dịch của carcinom tuyến đại tràng.

Mô hình organoid mang lại những ưu điểm vượt trội so với các mô hình truyền thống, tuy nhiên mô hình này vẫn tồn tại một số giới hạn nhất định. Hạn chế lớn nhất của mô hình organoid hiện tại là sự thiếu hụt vi môi trường khối u hoàn chỉnh: hệ thống mạch máu, các tế bào miễn dịch, các tế bào mô đệm. Do quy trình xử lý và thành phần môi trường nuôi cấy được thiết kế để chọn lọc và duy trì quần thể tế bào biểu mô, các thành phần không phải biểu mô thường bị loại bỏ hoặc không thể tồn tại lâu dài qua các lần cấy chuyển. Điều này khiến mô hình organoid đơn thuần gặp hạn chế khi ứng dụng để đánh giá hiệu quả của liệu pháp miễn dịch – hướng đi đang rất được quan tâm trong điều trị ung thư hiện nay [16,17]. Bên cạnh đó, quá trình nuôi cấy *in vitro* thời gian dài có thể dẫn đến hiện tượng chọn lọc clone (clonal selection bias). Trong môi trường nhân tạo, các tiểu quần thể tế bào có tốc độ tăng sinh nhanh hơn hoặc thích nghi tốt hơn với các yếu tố tăng trưởng có thể phát triển lấn át các clone sinh trưởng chậm; hậu quả là ở các thế hệ cấy chuyển muộn, dòng organoid có thể không còn phản ánh toàn vẹn 100% tỉ lệ các clone tế bào hay tính đa hình như trong khối u nguyên phát [18]. Để phản ánh đúng đáp ứng thuốc của bệnh nhân, các thử nghiệm chỉ nên được thực hiện trên organoid ở thế hệ thấp để tránh sai số từ quá trình tiến hóa *in vitro* [19]. Hơn nữa, việc phụ thuộc vào khung giá thể chất nền ngoại bào ECM có nguồn gốc từ động vật cũng tiềm ẩn nguy cơ về sự không đồng nhất giữa các mẻ sản xuất, ít nhiều ảnh hưởng đến tính lặp lại trong các thử nghiệm sàng lọc thuốc quy mô lớn [20].

Để vượt qua những rào cản này, các định hướng nghiên cứu trong tương lai cần tập trung vào việc phát triển các hệ thống đồng nuôi cấy (co-culture) organoid với tế bào miễn dịch tự thân, nguyên bào

sợi hoặc tế bào nội mô mạch máu. Đồng thời, việc ứng dụng các loại hydrogel tổng hợp sinh học có thể thay thế ECM động vật cũng sẽ là chìa khóa để chuẩn hóa và hoàn thiện mô hình bệnh lý 3D, tiến gần hơn nữa đến hệ thống sinh lý thực tế của người bệnh.

Một giới hạn cần ghi nhận của nghiên cứu này là cỡ mẫu được thực hiện còn tương đối nhỏ. Tuy nhiên, với tính chất của một nghiên cứu bước đầu (pilot study), việc thiết lập thành công mô hình organoid trên 4/5 mẫu bệnh phẩm đã hoàn thành mục tiêu chứng minh tính khả thi của quy trình kỹ thuật. Kết quả này cung cấp bằng chứng thực nghiệm và cơ sở dữ liệu nền tảng quan trọng, tạo tiền đề cho việc mở rộng cỡ mẫu trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm đánh giá sự đa dạng đáp ứng thuốc trên các quần thể bệnh nhân lớn hơn.

5. KẾT LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình nuôi cấy organoid ung thư đại trực tràng từ mô ung thư đại trực tràng của bệnh nhân Việt Nam. Các dòng organoid được tạo ra trong thời gian ngắn không chỉ duy trì khả năng tăng sinh ổn định mà còn tái lập được đặc trưng hình thái, cấu trúc mô bệnh học và sự biểu hiện của các dấu ấn hóa mô miễn dịch đặc hiệu cho ung thư đại trực tràng. Nghiên cứu này cung cấp một mô hình tiền lâm sàng 3D với độ tin cậy cao, là nền tảng phục vụ các nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế bệnh sinh, sàng lọc thuốc và ứng dụng y học cá thể hóa.

6. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 391/2025/HĐ-ĐHYD và quỹ Terry Fox (Terry Fox Foundation - TFF) cho dự án số I1054.

Tuyên bố về xung đột lợi ích

Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích đối với các nghiên cứu, tác giả, và xuất bản bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians*. 2024 May;74(3):229–63. doi:10.3322/caac.21834
2. Young M, Reed KR. Organoids as a Model for Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016 Oct;12(5):281–7. doi:10.1007/s11888-016-0335-4
3. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discovery*. 2014 Sep 1;4(9):998–1013.

doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001

4. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014 Jul 18; 345(6194):1247125. doi:10.1126/science.1247125
5. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020 Jul 1;319(1):C151–65. doi:10.1152/ajpcell.00120.2020
6. Tang XY, Wu S, Wang D, Chu C, Hong Y, Tao M, et al. Human organoids in basic research and clinical applications. *Sig Transduct Target Ther*. 2022 May 24;7(1):168. doi:10.1038/s41392-022-01024-9
7. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell*. 2015 May;161(4):933–45. doi:10.1016/j.cell.2015.03.053
8. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Van Den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *CP in Immunology*. 2020 Sep;130(1):e106. doi:10.1002/cpim.106
9. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med*. 2012 Apr;18(4):618–23. doi:10.1038/nm.2695
10. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1762–72. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050
11. Miao Y, Ha A, De Lau W, Yuki K, Santos AJM, You C, et al. Next-Generation Surrogate Wnts Support Organoid Growth and Deconvolute Frizzled Pleiotropy In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2020 Nov;27(5):840–851.e6. doi:10.1016/j.stem.2020.07.020
12. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 May;459(7244):262–5. doi:10.1038/nature07935
13. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):920–6. doi:10.1126/science.aao2774
14. Gagliano T, Kerschbamer E, Baccarani U, Minisini M, Di Giorgio E, Dalla E, et al. Changes in chromatin accessibility and transcriptional landscape induced by HDAC inhibitors in TP53 mutated patient-derived colon cancer organoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024 Apr;173:116374. doi:10.1016/j.biopha.2024.116374
15. Choi HB, Pyo JS, Son S, Kim K, Kang G. Diagnostic and Prognostic Roles of CDX2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancers. *Diagnostics*. 2022 Mar 20;12(3):757. doi:10.3390/diagnostics12030757
16. Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 2018 Dec;175(7):1972–1988.e16.

doi:10.1016/j.cell.2018.11.021

17. Wang XH, Wang WY, Sun ZJ. Immune organoid for cancer immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2025 Jul 1;15(7):3419–35. doi:10.1016/j.apsb.2025.04.031

18. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD, Alexandrov LB, Behjati S, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature*. 2018 Apr;556(7702):457–62. doi:10.1038/s41586-018-0024-3

19. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2016 Jun;18(6):827–38. doi:10.1016/j.stem.2016.04.003

20. Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, Paşca SP, Kuo CJ, Heilshorn SC. Engineered materials for organoid systems. *Nat Rev Mater*. 2019 Sep;4(9):606–22. doi:10.1038/s41578-019-0129-9