

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ KHÁNG TAMOXIFEN CỦA KHỐI TẾ BÀO UNG THƯ VÚ MCF-7 TRÊN KHUNG NÂNG ĐỠ GELATIN-ALGINATE

Nguyễn Thuần Nho*, Trần Lê Bảo Hà

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học Động vật, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học

Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh

TÓM TẮT

Hiện nay, nuôi cấy ba chiều (3D) trên khung nâng đỡ đã được sử dụng rất nhiều trong các nghiên cứu ung thư do mô tả tốt hơn các tương tác giữa các tế bào tương tự mô khối u *in vivo*. Hơn nữa, các mô hình thử thuốc hiện nay cũng cần mô hình *in vitro* đơn giản và giảm thí nghiệm trên mô hình động vật. Mô hình khung nâng đỡ Gelatin-Alginate đã được chứng minh giúp tế bào bám dính tăng sinh và tạo khối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 trong 21 ngày nuôi cấy. Tế bào tăng sinh tốt chứng tỏ mô hình này phù hợp cho sự phát triển của khối mô ung thư MCF-7. Hiệu quả kháng tamoxifen ở các nồng độ khác nhau đã được đánh giá đối với các dòng MCF-7 phát triển trên đĩa nuôi cấy hai chiều (2D) và trên khung 3D. Giá trị IC50 (50% Inhibitor Concentration - nồng độ ức chế 50%) cho thấy khối trên khung hiệu quả kháng tamoxifen cao hơn so với mẫu trên đĩa nuôi cấy hai chiều. Điều này chứng minh mô hình này cải thiện đặc tính kháng thuốc tamoxifen của khối mô ung thư.

Từ khóa: Nuôi cấy ba chiều, khung nâng đỡ, Gelatin-Alginate, MCF-7, kháng tamoxifen.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, mô hình đang sử dụng trong các thử nghiệm tiền lâm sàng thường là nuôi cấy 2D và các thử nghiệm trên mô hình động vật *in vivo*. Tuy nhiên, các mô hình chưa mô tả chính xác tương tác tế bào với tế bào và tế bào với khung nền ngoại bào (ECM) ở mô hình 2D và tương tác giữa các tế bào đồng loài ở mô hình động vật nên chỉ khoảng 5% thuốc ung thư nhận được chứng nhận của Tổ chức kiểm định thuốc và thực phẩm Mỹ (FDA) (Kunnumakkara *et al.*, 2019). Ngoài ra, giả thuyết "seed and soil" khẳng định vì môi trường vật chủ (soil) phù hợp là điều kiện thuận lợi cho phát triển tối đa của tế bào ung thư (seed) (Paget, 1889). Vì thế, nuôi cấy 3D trên cơ sở sử dụng khung nâng đỡ và yếu tố tế bào đồng loài giúp giải quyết điểm yếu của các mô hình trước đây. Việc nuôi cấy 3D MCF-7 được sử dụng nhiều phương pháp như spheroid hay organ-on-the-chip... Tuy nhiên, tạo spheroid dù đơn giản nhưng khối không duy trì được lâu do thiếu oxy hoặc ngược lại, organ-on-the-chip mô tả được dòng chảy dòng khí trong cơ thể nhưng vấn đề kỹ thuật là điểm hạn chế (Huerta-Reyes, Aguilar-Rojas, 2021). Vì thế, Khung nâng đỡ không những giúp khối tế bào ung thư duy trì lâu hơn do tiếp xúc dinh dưỡng từ môi trường mà còn từ việc đơn giản trong chế tạo và đánh giá.

Khung nâng đỡ rất đa dạng từ những polymer gel đến cấu trúc khỉu bào. Bài báo sử dụng vật liệu sinh học từ polymer do phản ứng tương tự mô, tương thích sinh học và khả năng sinh miễn dịch thấp. Tuy nhiên, nhược điểm của vật liệu này là độ bền cơ tính thấp nên chúng thường được gia cường (cross-linking) bằng carbodiimide (EDC) (Spicer, 2020) Gelatin chứa nhiều đoạn phân tử protein arginine-glycine-aspartic (RGD), những protein này tạo thành ligand có khả năng gắn với các phân tử receptor bám dính, kích thích sự tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc (Kim *et al.*, 2017). Alginate lại là vật liệu không gây đáp ứng miễn dịch, không bị phân hủy bởi các enzyme trong cơ thể và có thể gắn với các chuỗi peptide có thể liên kết với tế bào (chuỗi RGD) thông qua phản ứng gắn nhóm carboxyl của phân tử đường với nhóm amine để tạo liên kết peptide nên việc kết hợp này tạo khung Gelatin-Alginate bền vững trong thời gian dài. Khung nâng đỡ Gelatin-Alginate hỗ trợ tăng sinh cho dòng tế bào ung thư (Jiang *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018).

Tamoxifen là chất điều biến (modulator) chọn lọc của estrogen receptor (ER), giúp thuốc này có thể di chuyển vào trong nhân tác động đến nucleic acid đồng thời tác động đến các yếu tố tăng trưởng của tế bào. Vì thế dòng tế bào MCF-7 có biểu hiện dương tính với ER có thể điều trị bằng thuốc loại thuốc này (Dhiman *et al.*, 2005). Vì thế, để đánh giá khả năng khối kháng lại tamoxifen, MCF-7 sẽ được nuôi cấy tạo khối trong khung nâng đỡ Gelatin-Alginate (Nguyen *et al.*, 2023) và đánh giá tăng sinh qua khả năng giảm lượng đường trong môi trường nuôi cấy và đánh giá hiệu quả của tamoxifen trên mô hình tạo thành.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào MCF-7, và thuốc tamoxifen do Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y Sinh cung cấp. Môi trường nuôi cấy DMEM, kháng sinh, FBS, Gelatin, Alginate (Sigma, Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo khung nâng đỡ Gelatin-Alginate

Việc tạo khung GA đã được xây dựng theo quy trình của Yao với một số điều chỉnh (Yao *et al.*, 2019). Gelatin và Alginate được hòa tan hoàn toàn trong nước cất ở 50°C với tỷ lệ gelatin : alginate = 8:2 trong 3 giờ. Mẫu được đổ khuôn và đông lạnh ở tủ -86°C trong 24 giờ. Sau đó, mẫu đông lạnh được gia cường bằng EDC 0,3%. Sau 24 giờ, các khối GA được khử nước bằng máy đông khô. Sau đó, chiếu xạ 25kGy được sử dụng để khử trùng các mẫu GA đã đóng gói. Mẫu được nhuộm H&E để đánh giá cấu trúc và chụp SEM để quan sát bề mặt của片片 Gelatin-Alginate.

Nuôi cấy tế bào MCF-7

MCF-7 được nuôi trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, kháng sinh peniciline 1 U/mL-streptomycine 0,1 mg/mL ở 37°C, 5% CO₂. Môi trường được thay mới mỗi 4 ngày nuôi cấy.

Tạo khối tế bào MCF-7 trên khung nâng đỡ Gelatin-Alginate

Khi độ hợp dòng đạt 80%, MCF-7 được tách ra và cấy vào trong khung Gelatin-Alginate (3D) với mật độ 2×10^4 tế bào. Sau 4 ngày nuôi cấy tĩnh để ổn định tế bào trên khung nâng đỡ, phức hợp này được chuyển lên hệ thống bioreactor (Biotek, USA) và nuôi cấy trong 24 ngày.

Đánh giá tăng sinh

Sau mỗi 4 ngày nuôi cấy, mẫu được đánh giá tăng sinh bằng 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Mẫu được ủ với MTT để tạo tinh thể formazan và hòa tan tinh thể bằng DMSO/Ethanol để tạo màu xanh tím trong dung dịch. Dung dịch huyền phù được đo mật độ quang OD ở bước sóng 570 nm.

Đánh giá cấu trúc

Mẫu được cố định bằng paraformaldehyde 4 % trong 24 giờ ở 4°C. Sau đó, mẫu được gửi Phòng khám Đa khoa Đại Phước (TP Hồ Chí Minh) để đúc khối Paraffin và cắt ở kích thước 5-6 μm để tiến hành nhuộm bằng Hematoxylin và Eosin. Mẫu ngâm paraformaldehyde 4% cũng được xử lý khử nước và đem đi chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (SEM- Jeol JSM-5300).

Thử thuốc tamoxifen

Các liều thuốc tamoxifen từ 10^{-3} đến 10^{-6} M được thử nghiệm để xác định nồng độ ức chế 50% đối với mẫu ngày 4 và mẫu ngày 14. Ngoài ra, hình ảnh nhuộm mô học cũng ghi nhận sự khác biệt giữa các mốc tác động khác nhau.

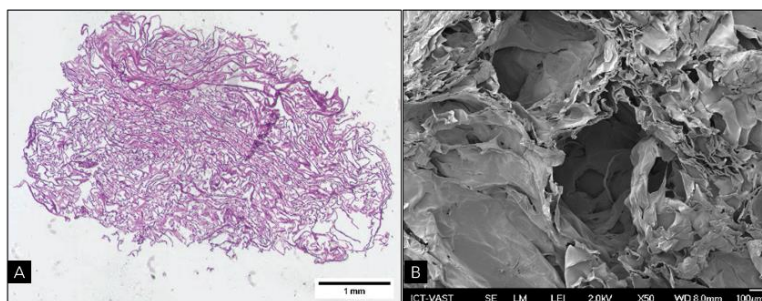
Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả sau khi thu nhận sẽ được phân tích bằng ANOVA one – way (Graphpad Prism 9). Các thí nghiệm được thực hiện được lặp 3 lần và kết quả được xem là có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khung nâng đỡ Gelatin-Alginate và tế bào MCF-7 tạo thành

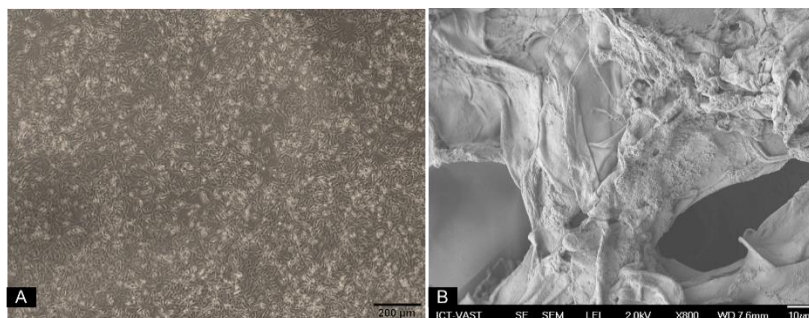
Theo kết quả nhuộm H&E, khung GA là một mạng lưới gồm các sợi màu tím liên kết với nhau với nhiều khoảng trống giữa chúng (Hình 1.A). Nhiều lớp dường như không liên quan có thể được nhìn thấy trong ảnh SEM (Hình 1.B). Kết quả là, miếng bọt biển GA bao gồm rất nhiều vi lỗ có đường kính từ 100 đến 300 μm . Kích thước này cho phép các tế bào bám dính, nhân lên và phát triển; đồng thời, cung cấp đường cho chất dinh dưỡng và oxy đi vào GA xốp. Điều này đảm bảo sự tái phát triển của các động mạch máu cùng với mô mới.



Hình 1. Cấu trúc của khối Gelatin-Alginate

(A) Hình ảnh nhuộm Hematoxylin và Eosin với scale bar 1mm; (B) Hình ảnh chụp SEM với scale bar 100 μm .

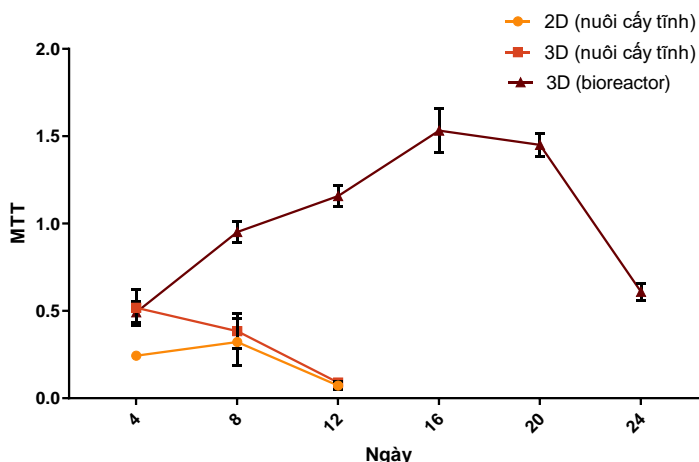
Tế bào MCF-7 có hình dáng dài với nhiều chân bám, điều này chứng tỏ tế bào có sinh trưởng tốt. Thời gian nhân đôi (doubling time) khoảng 48 giờ (Hình 2.A). Kết quả này là tương tự với kết quả của Osborne (Osborne *et al.*, 1987). Việc bám của MCF-7 lên khung GA (Hình 2.B) cũng cho thấy tế bào ung thư MCF-7 có khả năng bám dính trên khung GA.



Hình 2. Kết quả nuôi cấy tế bào MCF-7 đơn lớp trên T-25 (A) và lên khung GA (B) sau 48 giờ

Đánh giá tăng sinh của khối

Ở ngày 4 của quá trình nuôi cấy, mẫu nuôi cấy ba chiều cho thấy tăng sinh mạnh hơn so với mẫu nuôi cấy hai chiều (Hình 3). Wang cũng cho thấy sự tăng sinh tốt hơn ở mẫu 3 chiều (Wang *et al.*, 2017). Tuy nhiên, mẫu này có xu hướng giảm dần ở các ngày sau đó. Kết quả này tương tự với Dhiman với việc duy trì khối trong 5 ngày (Dhiman *et al.*, 2005; Lam-Huyen *et al.*, 2018). Tuy nhiên, khả năng tăng sinh giảm đột ngột ở những ngày sau chứng tỏ những khối MCF-7 không duy trì được lâu, điều kiện nuôi cấy chưa tốt để duy trì khối hoàn chỉnh. Hệ thống bioreactor dòng chảy giúp mô tả dòng chảy mạch máu, đưa chất dinh dưỡng vào sâu trong khối đồng thời loại bỏ chất thải một cách hiệu quả hơn. Rõ ràng, khi có yếu tố dòng chảy, mẫu tăng sinh đều đặn trong suốt 16 ngày. Sau đó, mẫu đạt trạng thái cân bằng trong 4 ngày trước khi nó giảm (Hình 3). Vì thế, việc nuôi bằng bioreactor giúp duy trì khối tốt hơn.

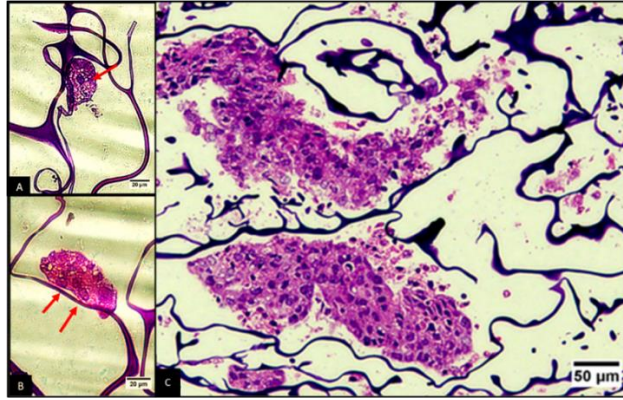


Hình 3. Hiệu quả tăng sinh của khối MCF-7 ở điều kiện nuôi cấy tĩnh và trên bioreactor (thí nghiệm đối chứng: 2D tĩnh)

Cấu trúc khối

Nhân của các tế bào ở mẫu ngày 4 ở điều kiện nuôi tĩnh vẫn đậm màu, màng nhân và hạch nhân rõ nét (Hình 4.A). Các tế bào cũng như các khối đa dạng về kích thước và kiểu hình. Tuy nhiên khi quan sát Hình 4.B, sự xuất hiện dấu hiệu của hiện tượng nhân nhạt màu dần, có những lỗ trống ở trong khối nên cần chuyển đổi sang nuôi cấy lác hoặc bioreactor để các khối này chuyển lại trạng thái ban đầu. Điều này là hoàn toàn phù hợp với kết quả tăng sinh ở trên. Rõ ràng quan sát mẫu ở ngày 16 (Hình 4.C) cho thấy khối lan rất nhanh ở giữa cấu trúc sợi Gelatin-Alginate. Lúc này sợi GA vẫn còn giữ nguyên hình thái mặc dù có tác động từ việc lan của khối tế bào ung thư.

Khối sau 4 ngày nuôi tĩnh mới chuyển lên hệ thống bioreactor để giúp tế bào bám chắc vào khung GA trước khi khởi động hệ thống bioreactor. Sau đó, khối tăng sinh mạnh tới ngày 16 và duy trì đến ngày 20 trước khi giảm. Vì thế, thời điểm khối mới tăng sinh ngày 4 và thời điểm trước pha cân bằng 2 ngày (ngày 14) sẽ được chọn lựa để so sánh hiệu quả thử thuốc.



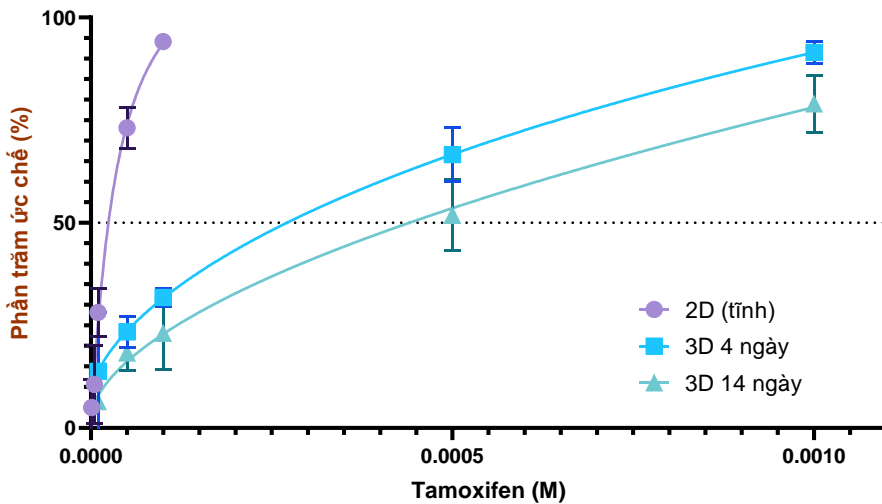
Hình 4. Cấu trúc khối MCF-7 trong khung nâng đỡ GA ở ngày 4 (A và B) và ngày 14 (C)

Kết quả thử thuốc tamoxifen

Nhằm đánh giá thời điểm để đưa thuốc, chúng tôi tiến hành thử nghiệm thuốc ở 2 thời điểm 4 ngày (thời điểm bắt đầu tăng sinh) và thời điểm 14 ngày (thời điểm đạt đỉnh sinh trưởng và chuẩn bị chuyển qua pha cân bằng) và nghiệm đối chứng 2D. IC50 của mẫu 2D là khoảng 3×10^{-5} M trong khi đó mẫu 3D 4 ngày là khoảng 3×10^{-4} M và mẫu 14 ngày $4,5 \times 10^{-4}$ M (Bảng 1 và Hình 5). Từ bảng 1, nồng độ 10-3M gần như các tế bào mẫu 2D bị chết hoàn toàn trong khi đó con số này ở mẫu 3D chỉ khoảng 31% ở mẫu 4 ngày và 23% ở mẫu 14 ngày. Rõ ràng khối 3D có khả năng kháng tamoxifen tốt hơn mẫu 2D. Kết quả này tương tự với Dhiman với mẫu IC50 của mẫu 3D gấp 10 lần so với mẫu 2D. Tuy nhiên nồng độ tamoxifen của Dhiman thấp hơn là do việc sử dụng tamoxifen thời gian dài hơn (Dhiman *et al.*, 2005).

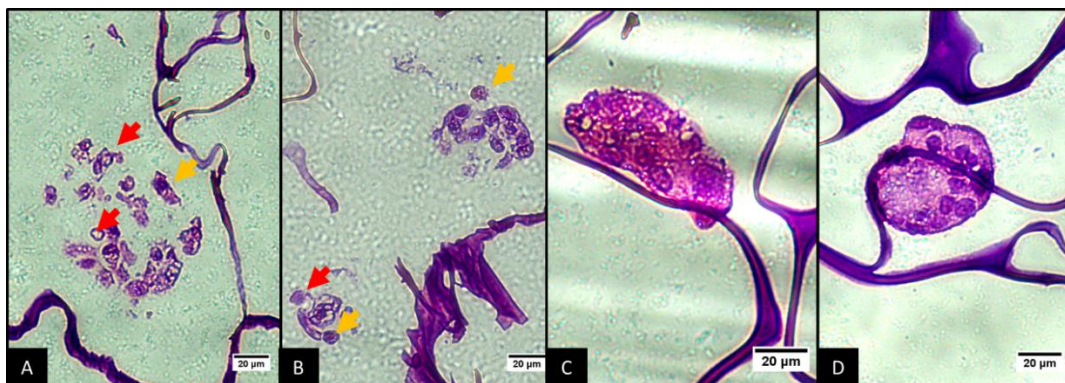
Bảng 1. Đánh giá hàm lượng ức chế IC50 của mẫu MCF-7 2D, 3D 4 ngày và 3D 14 ngày

Tamoxifen	Mẫu 2D MCF-7		Mẫu 3D MCF-7 4 ngày		Mẫu 3D MCF-7 14 ngày		Khác biệt thống kê p<0.5 3D 4 và 14 ngày
Nồng độ (M)	Mean(%)	SD(%)	Mean(%)	SD(%)	Mean(%)	SD(%)	
0.001	100	0	91,51	2,19	78,97	5,68	0,0066 (**)
0.0005	100	0	66,60	5,46	51,80	7,05	0,0013 (**)
0.0001	94,13	0,61	31,79	1,83	23,11	7,17	0,0758 (ns)
0.00005	73,13	4,16	23,42	3,15	18,27	3,49	0,0859 (ns)
0.00001	28,14	4,81	17,97	7,50	8,40	4,34	0,0596 (ns)
0.000005	14,28	3,12	0	0	0	0	0
0.000001	6,65	4,49	0	0	0	0	0



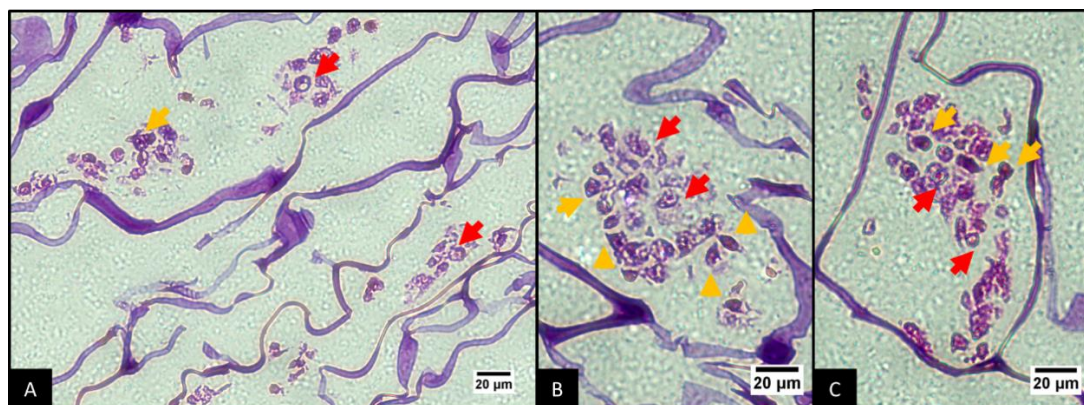
Hình 5. Biểu đồ đường cong ức chế với Tamoxifen ở mẫu ngày 4 và ngày 14

Mẫu nuôi cấy bioreactor ở ngày 14 cao hơn so với mẫu ngày 4. Taylor cho rằng tamoxifen ngăn sự tăng sinh của tế bào ở các pha sớm G_1 hoặc G_0-G_1 vì thế nếu khối có các tế bào ở giai đoạn tăng sinh thì tất nhiên nó sẽ ít bị tác động của thuốc hơn so với mẫu 4 ngày. Receptor ER của tế bào ở giai đoạn G_1 hoặc G_0-G_1 biểu hiện rất nhiều nên với lượng thuốc nhỏ nó sẽ bị tác động, trong khi đó khi ở giai đoạn tăng sinh và biến đổi, tế bào ung thư thay đổi đặc tính biểu hiện và biến đổi linh hoạt hơn phù hợp với điều kiện môi trường nên biểu hiện ER ít hơn nên ít bị tác động của tamoxifen (Taylor *et al.*, 1983).



Hình 6. Khối u khi thử thuốc ở ngày 4 với nồng độ tamoxifen 5×10^5 M

Hình A và B: Khối mô sau thử thuốc 48 giờ; **Hình C và D:** Khối mô không thử thuốc.



Hình 7. Hình ảnh khối u thử thuốc ngày 14 với nồng độ tamoxifen 5×10^5 M

Màu vàng: Các tế bào ung thư bình thường; **Màu đỏ:** Các tế bào ung thư bị chết.

Quan sát mẫu H&E ngày 4 và 14, các khối gần như bị vỡ ra rất nhiều so với mẫu đối chứng ở cùng thời điểm (Hình 6). Tamoxifen có tác dụng phá hủy gần như hoàn toàn khối u ở nồng độ $5 \cdot 10^5$ M vì thế hiện tượng kháng vẫn chưa quan sát thấy rõ. Vì thế, các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi sẽ phân tích cấu trúc ở các mốc sử dụng liều thấp hơn để nhận định khả năng kháng thuốc tamoxifen của khối 1 cách rõ ràng hơn.

KẾT LUẬN

Tạo thành công khối cấu trúc ung thư MCF-7 trong khung Gelatin-Alginate duy trì bằng hệ thống bioreactor khoảng 24 ngày. Khối được thử thuốc Tamoxifen ở 2 mốc 4 và 14 ngày nuôi cấy và kết quả cho thấy mẫu có khả năng kháng thuốc cao hơn 10 lần so với mẫu 2D. Mẫu 14 ngày nuôi cấy có khả năng chống tamoxifen cao hơn các mẫu còn lại. Từ cơ sở đó, việc thử thuốc sẽ tiến hành đối với các mốc thời gian khác nhau nhằm đánh giá toàn diện hơn tác động của thuốc ở các thời điểm khác nhau của khối cũng như so sánh mô hình này với mô hình *in vivo* để đủ cơ sở tiệm cận với việc tương đương với khối mô ung thư *in vivo*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dhiman HK, Ray AR, Panda AK (2005) Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 26: (9) 979-986.

Huerta-Reyes M, Aguilar-Rojas A (2021) Three-dimensional models to study breast cancer. *Inter J Oncol* 58: (3) 331-343.

Jiang T, Munguia-Lopez JG, Flores-Torres S, Grant J, Vijayakumar S, Leon-Rodriguez AD, Kinsella JM (2017) Directing the self-assembly of tumour spheroids by bioprinting cellular heterogeneous models within alginate/gelatin hydrogels. *Sci Rep* 7: (1) 4575.

- Kim AY, Kim Y, Lee SH, Yoon Y, Kim W-H, Kweon O-K (2017) Effect of gelatin on osteogenic cell sheet formation using canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 26: (1) 115-123.
- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Sailo BL, Roy NK, Thakur KK, Banik K, Shakibaei M, Gupta SC, Aggarwal BB (2019) Cancer drug development: The missing links. *Exper Biol Med* 244: (8) 663-689.
- Lam-Huyen NT, Truong NS, TP T (2018) Anti-cancer Effect of Xao Tam Phan Paramignya trimera Methanol Root Extract on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 in 3D Model. *Adv Exper Med Biol*.
- Nguyen NT, Doan VN, Tran HLB (2018) Generating *in vitro* solid tumor models on gelatin-alginate scaffolds. *Vietnam J Sci, Technol Engin* 60: (4) 25-30.
- Nguyen NT, Doan VN, Tran HLB (2023) Role of Co-culture with fibroblasts and dynamic culture systems in 3-dimensional MCF-7 tumor model maturation. *Trend Sci* 20: (2) 3892-3892.
- Osborne CK, Hobbs K, Trent JM (1987) Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 9: 111-121.
- Paget S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133: (3421) 571-573.
- Spicer CD (2020) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chem* 11: (2) 184-219.
- Taylor IW, Hodson PJ, Green MD, Sutherland RL (1983) Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 43: (9) 4007-4010.
- Wang H, Qian J, Zhang Y, Xu W, Xiao J, Suo A (2017) Growth of MCF-7 breast cancer cells and efficacy of anti-angiogenic agents in a hydroxyethyl chitosan/glycidyl methacrylate hydrogel. *Cancer Cell Inter* 17: (1) 55.
- Yao B, Hu T, Cui X, Song W, Fu X, Huang SJB (2019) Enzymatically degradable alginate/gelatin bioink promotes cellular behavior and degradation *in vitro* and *in vivo*. 11: (4) 045020.

EVALUATION OF TAMOXIFEN RESISTANCE OF MCF-7 BREAST CANCER CELLS ON GELATIN-ALGINATE SCAFFOLD

Nho Thuan Nguyen*, Ha Le Bao Tran

Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science-VNUHCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science -VNUHCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

Currently, three-dimensional (3D) culture on scaffolds has been widely used in cancer research because it better describes the interactions between cells similar to *in vivo* tumor tissue. Furthermore, current drug testing models also need simple *in vitro* models and reduced experiments on animal models. The Gelatin-Alginate support model has been proven to help cells adhere, proliferate, and form aggregates with the MCF-7 breast cancer cell line in 21 days of culture. Good cell proliferation proves that this model is suitable for the development of MCF-7 cancer tissue. Tamoxifen resistance at different concentrations was evaluated for MCF-7 lines grown on culture plates (2D) and on 3D scaffolds. The IC₅₀ value (50% inhibition concentration) shows that the block on the frame has a higher tamoxifen resistance effect compared to the sample on the 2D culture plate. This proves that this model improves the drug-resistance properties of cancerous tissue.

Keywords: Three-dimensional culture, scaffold, Gelatin-Alginate, MCF-7, tamoxifen resistance.

* Author for correspondence: Tel: 0382908849; Email: ngtnho@hcmus.edu.vn