

HOẠT TÍNH ỨC CHẾ DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ HEP3B VÀ MCF7 CỦA PRODIGIOSIN IN VITRO

Trần Viết Tiến^{1*}, Nguyễn Linh Toàn¹, Đỗ Thị Tuyên², Đỗ Minh Trung^{1,**}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của PG tái tổng hợp trong phòng thí nghiệm lên dòng tế bào ung thư gan người (Hep3B) và ung thư vú người (MCF7) tại Việt Nam. **Phương pháp:** theo dõi tiến cứu, đánh giá mức độ chết, khả năng duy trì chức năng sống và định liều IC50 trên 2 dòng tế bào Hep3B và MCF7. Sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào, đo mật độ quang của chất chuyển hóa. **Kết quả và kết luận:** Prodigiosin có hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan người Hep3B và ung thư vú người MCF7 trên in vitro ở nồng độ PG từ 6-10 µg/ml, làm tế bào bị chết và thay đổi hình dạng tế bào. Liều IC50 trên tế bào Hep3B là 5,5 và IC50 trên tế bào MCF7 là 6,53 (µg/ml).

Từ khóa: Prodigiosin, Hep3B, MCF7, Tế bào ung thư, MTT.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là một nhóm bệnh phức tạp, khả năng điều trị khởi thấp và có tỷ lệ tử vong cao. Theo số liệu báo cáo về ung thư, năm 2012 thế giới có khoảng 14,1 triệu ca bệnh mới và khoảng 8,2 triệu ca tử vong do ung thư [1]. Dự đoán đến năm 2030 con số đó lên tới 13 triệu người [1]. Vì thế, vấn đề nghiên cứu về ung thư dành được sự quan tâm của y học. Nhất là việc nghiên cứu các giải pháp kéo dài tỷ lệ sống, tăng cao chất lượng cuộc sống sau điều trị, nâng tỷ lệ khỏi cho bệnh nhân và đặc biệt là tìm kiếm hoạt chất mới có hiệu năng trong ức chế và tiêu diệt ung thư.

Hiện nay prodigiosin (PG) được biết đến là một chất có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ở nhiều dòng khác nhau [4]. Đây là một chuyển hóa thứ cấp có màu đỏ, công thức hóa học là $C_{20}H_{25}N_3O$, khối lượng khoảng 323.4 Da. PG chỉ xuất hiện ở sau giai đoạn tăng trưởng của vi khuẩn.

Người ta nhận thấy rằng một số vi khuẩn có khả năng tổng hợp PG với khả năng khác nhau. Vi khuẩn sản xuất PG được biết đến và được nghiên cứu nhiều là *Serratia* và *Streptomyces*. Một số vi khuẩn khác cũng có khả năng này như *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* và *Streptoverticillium* [2]. Nhiều tác giả trên thế giới đã nghiên cứu xây dựng quy trình tái tổng hợp PG bằng cách nuôi cấy chủng *Serratia marcescens*. Các tác giả này đã tổng hợp được PG trong phòng thí nghiệm, thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của hoạt chất này [10], [2], [3].

Trong vấn đề tìm kiếm hoạt chất mới có khả năng ứng dụng trong điều trị ung thư, PG đang được quan tâm. Những năm gần đây nhiều nghiên cứu đã phát hiện tác dụng ức chế sự phân chia và xâm lấn của tế bào ung thư, trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau nhưng không ảnh hưởng tới các tế bào lành [4]. Tuy nhiên, các công trình trên còn chưa nhiều, các dữ liệu khoa học công bố tác dụng của hoạt chất PG lên tế bào gan ung thư còn chưa đầy đủ. Nhất là các nghiên cứu tại Việt Nam thì còn rất hiếm.

Xuất phát từ lý do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của PG tái tổng hợp trong phòng thí nghiệm lên dòng tế bào ung thư gan người (Hep3B) và ung thư vú người (MCF7) tại Việt Nam.*

¹ Học viện Quân y

² Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

* Tác giả thực hiện chính:

Trần Viết Tiến

** Tác giả chịu trách nhiệm khoa học:

Đỗ Minh Trung

Email: dominhtrung@vmmu.edu.vn

Ngày tiếp nhận: 23/11/2018

Ngày phản biện: 26/11/2018

Ngày chấp nhận đăng: 2/3/2019

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng hai dòng tế bào ung thư gan người Hep3B và ung thư vú người MCF7 được cung cấp bởi hãng ATCC (Hoa Kỳ). Các tế bào ung thư này được bảo quản, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tuân thủ quy trình nghiêm ngặt và hoàn toàn vô khuẩn.

Hoạt chất chính sử dụng trong nghiên cứu là Prodigiosin tinh khiết từ dịch lên men vi khuẩn *Serratia marcescens* QY (được phân lập tuyển chọn từ mẫu đất ở Việt Nam). Các mẫu được bảo quản ở -20°C và được rã đông khi thí nghiệm.

Nghiên cứu còn sử dụng một số hóa chất sau: Môi trường RPMI, FBS (Fetal Bovine Serum), Penicillium-Streptomycin, Trypsin-EDTA (Gibco, Mỹ), MTT, DMSO (Sigma, Mỹ), HCl, Isopropanol (Merck, Đức).

Các dụng cụ và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu gồm: Flask T75, Plate 96 giếng, Pipet nhựa 5 ml, 10 ml (Corning, Mỹ) và các hóa chất vật tư khác được cung cấp từ các hãng có uy tín trên thế giới. Kính hiển vi soi ngược Olympus IX83 (Olympus, Nhật Bản), Hệ thống DTX 880 (Beckman Coulter, Mỹ), Tủ cấy (Bioair, Mỹ), Tủ ấm CO_2 (Nuair, Mỹ), Bể ổn nhiệt (Shellab, Mỹ), Máy ly tâm Rotanda 460 (Hettich, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** nghiên cứu được thiết kế tiến cứu, theo dõi sự phát triển của tế bào ung thư trước và sau sử dụng PG.

- Nuôi cấy tăng sinh tế bào

Hai dòng tế bào ung thư được nuôi cấy tăng sinh theo quy trình sau: giải đông hoặc cấy chuyển, sử dụng môi trường RPMI (RPMI bổ sung 10% FBS, 1% Penicillin và Streptomycin - Gibco, Mỹ), nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 . Tế bào được nuôi cấy đến khi đạt được

mật độ khoảng 80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy. Tiếp theo tiến hành cấy chuyển và chia tế bào ra làm nhiều đĩa nuôi cấy mới để tiến hành cho các thí nghiệm tiếp theo.

- Các chỉ tiêu nghiên cứu

+ Mức độ sống của tế bào ung thư: để đánh giá mức độ sống của tế bào ung thư, chúng tôi quan sát trên tiêu bản để đánh giá mức độ phát triển tế bào. Đồng thời, chúng tôi định lượng nồng độ tinh thể formazan do tế bào ung thư sống chuyển hóa tạo ra. Phương pháp tiến hành dựa trên kỹ thuật MTT (theo [5], [1]): tế bào dòng Hep3B và MCF7 được cấy chuyển và nuôi cấy trong đĩa 96 giếng. Sau 24h-48h, thực hiện quan sát tế bào trước khi tiếp xúc với PG. Sau đó, cho tế bào tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 4 $\mu\text{g/ml}$; 6 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$ và 10 $\mu\text{g/ml}$ đối với nhóm tế bào thí nghiệm; ở nhóm đối chứng, tế bào ung thư được thêm dung dịch RPMI hoặc DMSO. Sau 24 giờ và 48 giờ quan sát mức độ tăng sinh tế bào dưới kính hiển vi. Tiếp theo, bổ sung dung dịch MTT 5 mg/ml (Sigma, Mỹ) vào các giếng (cả lô thí nghiệm và lô chứng), để nguyên trong 4 giờ. Các tế bào ung thư sống sẽ sinh ra các dehydrogenase, phản ứng với MTT tạo ra chất formazan. Sau 4 giờ, tách chiết lấy dịch nuôi cấy tế bào, định lượng nồng độ formazan bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 595 nm (trên máy DTX 880 - Beckman Coulter, Hoa Kỳ).

+ Mức độ tổn thương tế bào ung thư: được đánh giá bằng sự toàn vẹn của tế bào. Phương pháp nuôi cấy tế bào ung thư và thử nghiệm PG như trên. Sau khi lấy dịch chiết tế bào, chúng tôi quan sát hình thái tế bào ung thư dưới kính hiển vi soi ngược (Olympus IX83-Olympus, Nhật Bản).

Các thí nghiệm được lặp lại 6 lần ($n=6$).

+ Tính liều ức chế 50% tế bào (IC_{50}): liều ức chế tế bào được tính dựa trên công thức sau:

$$\text{Liều ức chế (\%)} = \frac{\text{Số lượng tế bào ung thư sống nhóm PG}}{\text{Số lượng tế bào ung thư sống nhóm chứng}}$$

Dựa trên tỷ lệ tế bào sống trong các nhóm nghiên cứu và nồng độ PG sử dụng, lập

phương trình hồi quy tuyến tính tính giữa tỷ lệ tế bào sống (Y, %) và nồng độ PG (X,

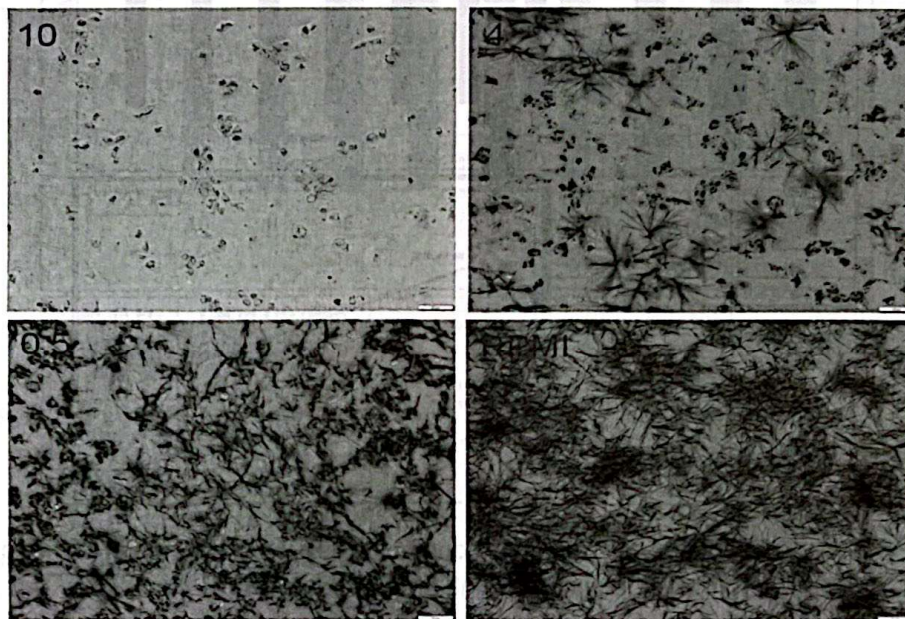
µg/ml). Từ phương trình hồi quy tuyến tính, tính liều ức chế 50% tế bào (IC_{50}) của PG ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ trên các dòng tế bào ung thư theo công thức:

$$IC_{50} = (50 - b)/a$$

Trong đó hệ số a, b lấy từ phương trình hồi quy tuyến tính

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Tác dụng của PG trên dòng tế bào Hep3B được trình bày ở hình 3.1 và biểu đồ 3.1.



Hình 3.1. Hình ảnh tế bào Hep3B - PG sau khi bổ sung MTT sau 4 giờ.

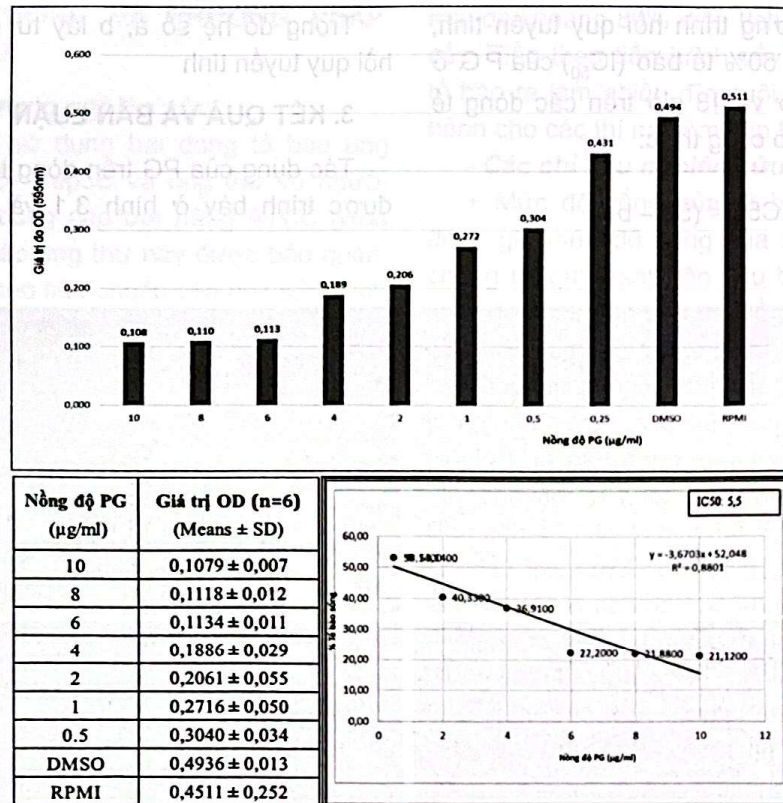
(Nồng độ PG: 10, 4 và 0,5 là hình ảnh tế bào Hep3B ở các giếng có nồng độ PG 10, 4 và 0,5µL/mL, RPMI là hình ảnh tế bào Hep3B ở đối chứng), 200X.

Tác dụng của PG lên dòng tế bào ung thư vú người MCF7 được thể hiện trên hình 3.2 và biểu đồ 3.2

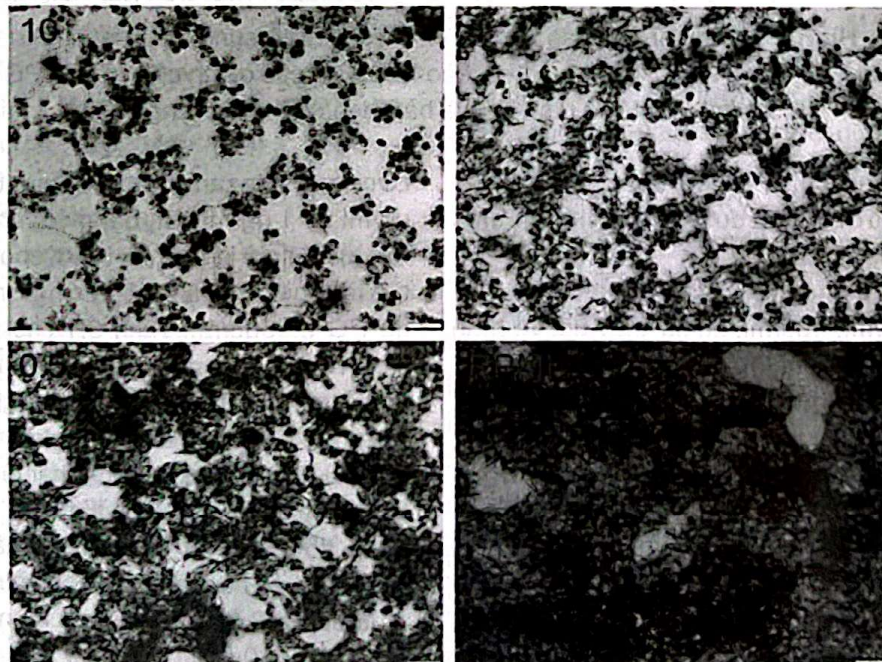
Hình 3.2 cho thấy ở các nồng độ PG cao như 10µg/ml, 8µg/ml, có sự thay đổi về hình dạng tế bào và nhiều tế bào bị chết, mật độ tế bào thưa thớt hơn so với nhóm chứng. Nhiều tế bào bị tổn thương và biến đổi hình dạng. Biểu đồ 3.2 cho thấy lượng formazan được tạo ra rất ít ở dung dịch tế bào có bổ sung PG với nồng độ 10 và 8µg/ml. Ở các nồng độ thấp hơn như 6µg/ml, 4µg/ml, lượng formazan được tạo ra đã tăng lên nhiều hơn so với nồng độ 10 µg/ml. Ở các nồng độ từ 0.5-2 µg/ml tác dụng PG đối với tế bào thấp vì thế mà lượng tinh thể formazan tạo thành rất nhiều.

Lượng formazan ở các nồng độ PG 0,5 µg/ml và 1 µg/ml gần bằng với nhóm chứng. Kết quả tính liều chết IC_{50} cho thấy điểm cắt trên biểu đồ là 6,53, tương ứng với nồng độ PG 6,53µg/ml. Hình 3.1 cho thấy tế bào Hep3B tại giếng cho tiếp xúc với RPMI thì tế bào tăng sinh tốt nhưng ở các giếng có PG với nồng độ từ 0,5 đến 10 µg/ml, tế bào thưa thớt và bị chết nhiều. Hình thái tế bào của tế bào ung thư Hep3B bị thay đổi nhiều theo nồng độ trong đó tổn thương nặng nhất ở dung dịch có nồng độ PG 10µg/ml.

Biểu đồ 3.1 cho thấy tại các nồng độ PG cao như 10µg/ml, 8µg/ml PG tạo ra ít formazan trong khi đó ở các nồng độ thấp hơn như 6µg/ml, 4µg/ml, 2µg/ml lượng formazan được tạo ra đã tăng lên nhiều hơn.

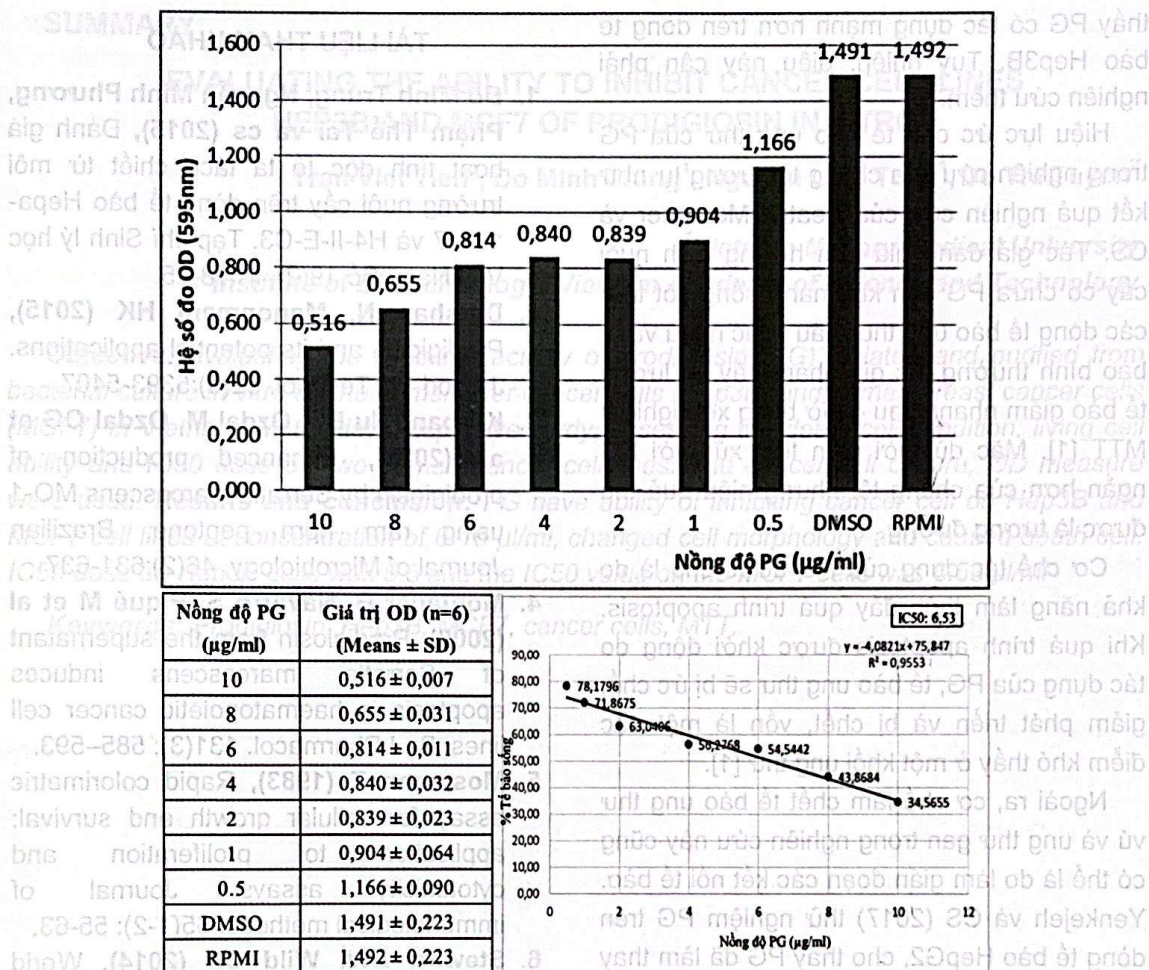


Biểu đồ 3.1. Độ đậm độ OD của formazan tại các dung dịch tiếp xúc PG có nồng độ khác nhau và phương trình hồi quy tuyến tính tính IC₅₀ của tế bào Hep3B



Hình 3.2. Một số hình ảnh tế bào MCF7 tạo tinh thể formazan sau khi bổ sung MTT.

(0,5, 4, 10: hình ảnh tế bào ung thư Hep3B sau khi tiếp xúc với PG ở các nồng độ từ 0,5, 4, 10µg/ml, RPMI: hình ảnh tế bào ung thư Hep3B trong dung dịch nuôi cấy đối chứng).



Biểu đồ 3.2. Độ OD của formazan tại các dung dịch tiếp xúc PG có nồng độ khác nhau và phương trình hồi quy tuyến tính tính IC₅₀ của tế bào ung thư MCF7

Đặc biệt, tại các nồng độ thấp như 1 µg/ml, 0,5 µg/ml PG gần như chưa có tác dụng đối với tế bào ung thư nên độ OD khá cao.

Phương trình tuyến tính liều IC₅₀ cho thấy liều IC₅₀ của G trên tế bào Hep 3B là điểm cắt 5,5, tương ứng với nồng độ 5,5 µg/ml

Từ năm 1952, Wier R.H và CS đã thử nghiệm prodigiosin trên lâm sàng trong điều trị nấm *C.immitis* [7]. Kết quả có sự phục hồi trên 14 bệnh nhân nhiễm nấm [7]. Trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành trên tế bào ung thư nhằm xác định hoạt tính kháng ung thư của hoạt chất này. Kết quả thu nhận được PG có hoạt tính kháng lại hơn 60 dòng tế bào ung thư với nồng độ trung bình 2.1 µM [2]. PG được coi là một trong những gây chết tế bào ung thư

(apoptosis). Hoạt động gây chết tế bào của PG trong nhân tế bào có thể là do tác dụng gây sự phân mảnh DNA [2].

Trong nghiên cứu này, sau khi cho PG tiếp xúc với tế bào ở các nồng độ khác nhau kết quả cho thấy ở 8 nồng độ khác nhau của PG sau khi được thử nghiệm chỉ có nồng độ 10 µg/ml và 8 µg/ml có ảnh hưởng mạnh nhất trên hai dòng tế bào Hep3B và MCF7. PG nồng độ thấp 0,5 µg/ml gần như không có hiệu quả gây chết tế bào, thậm chí, chúng tôi còn nhận thấy ở một số vị trí, tế bào có hiện tượng tăng sinh. Tất cả các nồng độ còn lại, chúng tôi nhận thấy có sự thay đổi nhất định về hình thái tế bào, mức độ tăng sinh tế bào cũng như khả năng sống. So sánh tác dụng trên 2 dòng tế bào ung thư, chúng tôi nhận

thấy PG có tác dụng mạnh hơn trên dòng tế bào Hep3B. Tuy nhiên, điều này cần phải nghiên cứu thêm.

Hiệu lực ức chế tế bào ung thư của PG trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như kết quả nghiên cứu của Beatriz Montaner và CS. Tác giả đánh giá ảnh hưởng dịch nuôi cấy có chứa PG đến khả năng sống sót trên các dòng tế bào ung thư máu khác nhau và tế bào bình thường tác giả nhận thấy số lượng tế bào giảm nhanh sau 4 giờ bằng xét nghiệm MTT [1]. Mặc dù thời gian tiếp xúc với PG ngắn hơn của chúng tôi nhưng hiệu quả thu được là tương đương.

Cơ chế tác dụng của PG được cho là do khả năng làm thúc đẩy quá trình apoptosis. Khi quá trình apoptosis được khởi động do tác dụng của PG, tế bào ung thư sẽ bị ức chế, giảm phát triển và bị chết, vốn là một đặc điểm khó thấy ở một khối ung thư [1].

Ngoài ra, cơ chế làm chết tế bào ung thư vú và ung thư gan trong nghiên cứu này cũng có thể là do làm gián đoạn các kết nối tế bào. Yenkejehe và CS (2017) thử nghiệm PG trên dòng tế bào HepG2, cho thấy PG đã làm thay đổi hình thái của các tế bào thành và làm gián đoạn các kết nối tế bào [8]. Tuy nhiên, các cơ chế này cần phải được nghiên cứu thêm.

5. KẾT LUẬN

Prodigiosin có hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan người Hep3B và ung thư vú người MCF7 trên *in vitro* ở nồng độ PG từ 6-10 $\mu\text{g/ml}$, làm tế bào bị chết và thay đổi hình dạng tế bào. Liều IC50 trên tế bào Hep3B là 5,5 và IC50 trên tế bào MCF7 là 6,53 ($\mu\text{g/ml}$).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài mã số 07.17/CNSHCB do Học viện Quân y chủ trì. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Học viện Quân y, Viện Công nghệ sinh học, Viện Nghiên cứu hệ Gen – Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam đã ủng hộ, tạo điều kiện và tích cực hợp tác trong quá trình nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đỗ Minh Trung, Nguyễn Minh Phương, Phạm Thế Tài và cs (2015)**, Đánh giá hoạt tính độc tố tách chiết từ môi trường nuôi cấy trên dòng tế bào Hepa-1c1c7 và H4-II-E-C3. Tạp chí Sinh lý học Việt Nam. Số 19(2), tr. 18-25.
2. **Darshan N, Manonmani HK (2015)**, Prodigiosin and its potential applications. J Food Sci Technol. 52(9):5393-5407.
3. **Kurbanoglu EB, Ozdal M, Ozdal OG et al (2015)**, Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. Brazilian Journal of Microbiology. 46(2):631-637.
4. **Montaner B, Navarro S, Piqué M et al (2000)**, Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. Br J Pharmacol. 131(3): 585–593.
5. **Mosmann T (1983)**, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 65(1-2): 55-63.
6. **Stewart BW, Wild CP (2014)**, World Cancer Report 2014. The International Agency for Research on Cancer.
7. **Wier ER, Egeberg RO, Lack AR et al (1952)**, A clinical trial of prodigiosin in disseminated Coccidioidomycosis. Am J Med Sci. 224(1): 70–76.
8. **Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T et al (2006)**, The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nature Reviews Microbiolgy. 4(12): 887-899.
9. **Yenkejehe RA, Sam MR, Esmaeillou M (2017)**, Targeting survivin with prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. Human and Experimental Toxicology. 36(4): 402–411.
10. **Zara Shaikh (2016)**, Biosynthesis of Prodigiosin and Its Applications. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 11(6): 1-28.

SUMMARY

EVALUATING THE ABILITY TO INHIBIT CANCER CELL LINES -HEP3B AND MCF7 OF PRODIGIOSIN IN VITRO

Tran Viet Tien¹, Do Minh Trung¹, Nguyen Linh Toan¹, Do Thi Tuyen²

¹Vietnam Military Medical University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Objective: evaluating the inhibiting activity of prodigiosin (PG) isolated and purified from bacterial culture in vitro on the human liver cancer cells (Hep3B) and human breast cancer cells (MCF7) in Vietnam. **Methods:** prospective study, assessing the death cell condition, living cell ability and IC50 dose on two human cancer cell lines. The cancer cell culture, OD measure were used. **Results and conclusion:** PG have ability of inhibiting cancer cell on Hep3B and MCF7 cell lines at concentration of 6-10 $\mu\text{l/ml}$, changed cell morphology and caused death cell. IC50 dose on Hep3B cells was 5.5 and the IC50 value on the MCF7 cells was 6.53 $\mu\text{l/ml}$

Keywords: Prodigiosin, Hep3B, MCF7, cancer cells, MTT.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vấn đề đặt ra đây hiện nay đang là một thách thức đối với y học và nhân loại nói chung. Theo một thống kê ở Việt Nam, có khoảng 1 triệu người mắc bệnh ung thư mỗi năm, trong đó có khoảng 500.000 người chết. Ung thư là một bệnh nguy hiểm, gây tử vong cho nhiều người. Việc tìm kiếm các loại thuốc mới để điều trị ung thư là một nhiệm vụ cấp bách. Prodigiosin là một chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư. Nó được tìm thấy trong một số loài vi khuẩn. Prodigiosin đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư trong ống nghiệm. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng ức chế của Prodigiosin đối với hai dòng tế bào ung thư phổ biến là Hep3B và MCF7.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu
1.3. Đối tượng nghiên cứu
1.4. Phương pháp nghiên cứu
1.5. Kết quả và thảo luận
1.6. Kết luận