



HỎI - ĐÁP CÔNG NGHỆ

Chiết hợp chất Holothurin A3 có hoạt tính chống ung thư từ Hải sâm

Hỏi: Ung thư là căn bệnh đang phát triển mạnh ở Việt Nam với nhiều nguyên nhân khác nhau, nhưng hệ quả giống nhau là chi phí cho quá trình điều trị rất tốn kém, nhất là các loại thuốc đặc trị. Ngoài các loại hoạt chất có khả năng chống ung thư chiết xuất từ thực vật sống trên cạn (như nghệ với curcumin, dứa cạn với vinblastine và vincristine, thông đỏ với paclitaxel,...) đã được các nhà khoa học Việt nghiên cứu thành công, tài nguyên biển Việt Nam có gì?

Đáp: Ung thư (UT) là căn bệnh nan y, cho tới nay việc chữa trị vẫn còn gặp nhiều khó khăn. Theo các thống kê gần đây, tỷ lệ người mắc bệnh UT ngày càng gia tăng. Năm 2000, trên thế giới ước tính có khoảng 10,3 triệu ca UT, trong đó có khoảng 7 triệu ca tử vong do UT. Tại Việt Nam, theo báo cáo của Viện Nghiên cứu Phòng chống Ung thư Việt Nam, mỗi năm có từ 130.000-160.000 trường hợp mắc mới UT, trong đó có từ 85.000-115.000 người tử vong do căn bệnh này (gấp 7-10 lần số tử vong do tai nạn giao thông). Nếu năm 2000 Việt Nam chỉ ghi nhận hơn 6.900 ca UT phổ ở nam giới thì năm 2010 đã hơn 14.600 ca, dự báo năm 2020 sẽ gần 23.000 ca. Bệnh UT dạ dày cũng ngày càng phổ biến khi năm 2010 ghi nhận khoảng 10.000 ca, gấp đôi số ca mắc được phát hiện trước đó 10 năm. Bệnh UT vú ở nữ giới là hơn 5.500 ca (năm 2000) thì tới năm 2010 đã vọt lên 12.500 ca và dự báo từ 6 năm nữa trở đi sẽ trên 22.600 ca/năm.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, 30%-40% ca UT có thể phòng được, nếu phát hiện sớm có thể điều trị khỏi và giảm được 50% số người tử vong. Chính vì vậy, bên cạnh việc đầu tư nghiên cứu các phương pháp chẩn đoán sớm bệnh UT thì việc tìm kiếm các phương pháp điều trị mới, các thuốc mới là vô cùng cần thiết, đặc biệt là các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên.

Biển vốn chiếm hơn 70% diện tích của Trái đất, là nguồn các hợp chất thiên nhiên quan trọng cho đời sống con người. Các hợp chất có nguồn gốc biển được chú ý là các chất có khả năng kháng u. Nhiều dược chất chống UT có nguồn gốc từ sinh vật biển đã và đang được nghiên cứu để đưa vào sử dụng trong điều trị như hợp chất *Swinhoeiamit A* chiết từ loài sứa biển *Theonella swinhoei*, hợp chất *KRN7000* chiết từ loài sứa biển *Agela mauritianus*, các dược chất chiết từ các loài hải sâm đang ở giai đoạn nghiên cứu để làm thuốc chữa bệnh UT, trong đó hợp chất *Holothurin B* đã được công bố



trong nhiều công trình nghiên cứu của các tác giả Nhật Bản, Đức và Mỹ.

Ngày 25/03/2008, sáng chế "Hợp chất Holothurin A3 có hoạt tính chống ung thư và phương pháp chiết hợp chất này từ loài hải sâm *Holothuria scabra*" của các tác giả Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên đã được cấp bằng bảo hộ độc quyền số 1-0006852.

Trong chương trình nghiên cứu tìm kiếm dược liệu chống UT từ biển, các tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu loài hải sâm *Holothuria scabra* và chiết được hợp chất *holothurin A3*, một hợp chất mới thể hiện hoạt tính mạnh, kháng cả ba dòng tế bào UT người là tế bào carcinom biểu bì người (KB), tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL) và tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2). Phương pháp chiết *Holothurin A3* từ loài hải sâm *Holothuria scabra* theo sáng chế tuy đơn giản song lại cho hiệu suất cao. Sáng chế tạo cơ sở cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo để tạo ra các dược phẩm chứa *Holothurin A3*, cũng như các dẫn xuất của chúng để phòng và chữa bệnh UT dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu biển quý báu, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

Phương pháp chiết hợp chất holothurin A3 từ loài hải sâm *Holothuria scabra* bao gồm các bước sau:

- Rửa sạch muối khỏi hải sâm *Holothuria scabra* bằng nước, sau đó nghiền nhỏ thành bột bằng máy nghiền;
- Chiết bằng siêu âm bột này bằng dung môi là rượu metylic ba lần, mỗi lần 1 giờ;
- Gộp các dịch chiết trong rượu metylic này lại với nhau, cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic (dịch cô A);

- Hòa tan dịch cô A vào nước cất rồi chiết lần lượt bằng cloroform, sau đó là n-butanol;
- Pha nước còn lại được loại muối bằng cách sử dụng cột sắc ký trao đổi ion DIANION HP-20 với dung môi rửa muối là nước cất; rửa giải (một kỹ thuật tách sắc ký) bằng hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 2:8; rửa giải bằng hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 7:3; sau cùng rửa giải bằng rượu metylic, cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm từ phần dịch rửa giải bằng rượu metylic này, thu được dịch cô B;
- Tiến hành sắc ký dịch cô B này trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-8 bằng cách hòa tan dịch cô B này trong dung môi là hỗn hợp rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 6:4, sau đó tiến hành sắc ký với dung môi là hỗn hợp axeton/nước với tỷ lệ thể tích 10:18, lần lượt thu được phân đoạn thứ nhất ký hiệu là D-I, phân đoạn thứ hai ký hiệu là D-II và phân đoạn thứ ba ký hiệu là D-III;
- Cất để loại bỏ dung môi ở phân đoạn D-II dưới áp suất giảm. Kết tinh dịch cô thu được trong dung môi là hỗn hợp rượu metylic/axeton với tỷ lệ thể tích 1:1 để thu được hợp chất *Holothurin A3* dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng.

Ví dụ 1: Chiết hợp chất Holothurin A3 từ loài hải sâm *Holothuria scabra*

Rửa sạch 5 kg hải sâm *Holothuria scabra* bằng nước để loại bỏ muối, sau đó nghiền nhỏ thành bột bằng máy nghiền.

Chiết bột này ba lần bằng máy siêu âm với dung môi là rượu metylic trong bình thủy tinh, mỗi lần 1 giờ.

Gộp các dịch chiết trong rượu metylic này lại với nhau, sau đó cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 75 g dịch cô trong rượu metylic (dịch cô A).

Hòa tan 75 g dịch cô A vào 2 lít nước cất rồi chiết lần lượt bằng 2 lít cloroform, sau đó là 2 lít n-butanol.

Pha nước còn lại được loại muối bằng cách sử dụng cột sắc ký trao đổi ion DIANION HP-20 với dung môi rửa muối là 3 lít nước cất; rửa giải bằng 3 lít hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 2:8; rửa giải bằng 3 lít hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 7:3, và sau cùng rửa giải bằng 3 lít rượu metylic, cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm từ phần dịch rửa giải bằng rượu metylic này để thu được 23 g dịch cô B.

23 g dịch cô B này được tiến hành sắc ký trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-8 bằng cách hòa tan 23 g dịch cô B vào 30 ml dung môi là hỗn hợp rượu metylic/nước với tỷ lệ thể tích 6:4, sau đó tiến hành sắc ký với 3 lít dung môi là hỗn hợp axeton/nước với tỷ lệ thể tích 10:18, lần lượt thu được 4,0 g phân đoạn thứ nhất ký hiệu là D-I, 9,0 g phân đoạn thứ hai ký hiệu là D-II và 10,0 g phân đoạn thứ ba ký hiệu là D-III.

9,0 g phân đoạn D-II thu được này được cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tiến hành kết tinh lại dịch cô thu được trong dung môi là hỗn hợp rượu metylic/axeton với tỷ lệ thể tích 1:1, thu được 2,3 g *holothurin A3* dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất Holothurin A3

Hợp chất *holothurin A3* được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào đối với ba dòng tế bào UT người là tế bào carcinom biểu bì người (KB), tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL) và tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2) *in vitro* như sau:

Các dòng tế bào carcinom biểu bì người (KB), tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL) và tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2) giữ trong nơơ lỏng, được đánh thức và nuôi cấy trong các môi trường dinh dưỡng DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) có bổ sung huyết thanh bò tươi từ 7-10 %. Các tế bào này được nuôi cấy trong các bình nuôi (thời gian từ 18 -24 giờ) cho phát triển đến pha loga (đạt khoảng 60-70% sự phát triển tối đa của tế bào), sau đó thay bằng môi trường DMEM sạch để hoạt hóa tế bào. Hòa tan hợp chất *holothurin A3* thử nghiệm vào dung dịch dimethylsulfosit (DMSO) 100% với tỉ lệ 4-10 mg/ml để sàng lọc sơ bộ (nồng độ cuối nằm trong khoảng 200-500 µg/ml). Các mẫu có dấu hiệu dương tính được pha tiếp nhiều bậc để tính giá trị IC₅₀ (với nồng độ loãng dần lần lượt là 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40 và 20 µg/ml).

Chất đối chứng được sử dụng trong thử nghiệm này là *ellipticine* - chất có hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào carcinom biểu bì người (KB), tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2) và tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL).

Hòa tan chất đối chứng với nồng độ 0,01 mM trong DMSO. Nhỏ 10µl dung dịch chứa hợp chất *holothurin A3* thử nghiệm nêu trên hoặc dung dịch chứa mẫu đối chứng vào từng lỗ trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Xử lý các tế bào đã hoạt hóa bằng trypsin 0,05% để tách các tế bào này ra khỏi đáy bình nuôi cấy.

Sau đó, pha loãng huyền phù tế bào này bằng môi trường nuôi cấy, rửa tế bào, đếm số lượng tế bào và pha tế bào lại vào môi trường sạch để đạt nồng độ 3×10^4 tế bào/ml đối với dòng KB, 4×10^4 tế bào/ml đối với dòng FL và Hep-G2. Bổ sung 190 µl huyền phù tế bào của mỗi loại tế bào vào các lỗ của đĩa 96 lỗ đã có sẵn hợp chất nêu trên, sau đó ủ trong tủ chứa 5% CO₂ thêm trong 3 ngày.

Cố định các tế bào này bằng dung dịch TCA (Trichloacetic) lạnh (30 - 50%) trong thời gian 30 phút; rửa, để khô, nhuộm bằng dung dịch chứa 0,4% SRB (SulfoRhodamine) trong dung dịch axit axetic 1% và rửa lại bằng dung dịch axit axetic 1% để loại màu thừa của thuốc nhuộm. Sau đó, các đĩa được làm khô, hòa tan lại trong dung dịch đệm bazơ và đọc kết quả trên máy ELISA ở bước sóng nằm

trong khoảng từ 495-515 nm. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của *holothurin A3* được nêu trong bảng 1.

Bảng 1: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào in vitro

Hợp chất	Tế bào carcinom biểu bì (KB)	Tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2)	Tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL)
Holothurin A3	IC ₅₀ = 0,57 µg/ml	IC ₅₀ = 0,23 µg/ml	IC ₅₀ = 0,39 µg/ml
Ellipticine	IC ₅₀ = 0,22 µg/ml	IC ₅₀ = 0,30 µg/ml	IC ₅₀ = 0,15 µg/ml

Kết quả hoạt tính ức chế 50% (IC₅₀) thu được cho thấy, hợp chất *holothurin A3* có hoạt tính kháng mạnh cả ba dòng tế bào UT người là tế bào carcinom biểu bì (KB) (IC₅₀ = 0,57 µg/ml); tế bào carcinom tế bào gan người (Hep-G2) (IC₅₀ = 0,23 µg/ml) và tế bào sacom cơ trơn tử cung dạng sợi (FL) (IC₅₀ = 0,39 µg/ml). □

Tim hiểu các công nghệ vui lòng liên hệ Ban biên tập STINFO, địa chỉ 79 Trương Định, Quận 1, TP. HCM, ĐT: 08 3829 7040 (403), email: stinfo@cesti.gov.vn

Giới thiệu kết quả nghiên cứu KH&CN tại TP. HCM

✧ VÂN NGUYỄN

Chọn tạo các dòng biến dị chịu nhiệt cây hoa thu hải đường (*Begonia spp.*) bằng kỹ thuật bức xạ gamma Co-60

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Phạm Cao Khải và ThS. Trần Thị Thanh Quý

Cơ quan chủ trì: Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP. HCM

Năm hoàn thành: 2015

Cơ quan quản lý: Sở Khoa học và Công nghệ TP. HCM



Thu hải đường là một trong những loài hoa kiểng đẹp, đang được ưa chuộng.

Thu hải đường là loại hoa được ưa chuộng bởi vẻ đẹp màu sắc, hình dáng cũng như độ bền. Loài hoa này còn là nguồn thực phẩm và dược phẩm được dùng nhiều ở Philippines, Brazil, Trung Quốc, Indonesia... Nhóm nghiên cứu đã thực hiện chọn tạo các dòng biến dị chịu nhiệt cây hoa thu hải đường (*Begonia spp.*) bằng kỹ thuật bức xạ gamma Co-60. Cụ thể, hoàn thiện quy trình nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật; khảo sát ảnh hưởng của bức xạ gamma Co-60 lên mẫu hạt và chồi *in vitro*; chiếu

xạ tia gamma Co-60 tạo nguồn biến dị; trồng, theo dõi những cá thể đã được xử lý đột biến nhằm chọn lọc và phát triển các dòng biến dị ưu việt.

Kết quả đã xác định được môi trường MS (Murashing & skoog) bổ sung 0,5 mg/l BA (6-benzylaminopurine) và 0,3 mg/l NAA (α-Naphthalene acetic acid) cảm ứng tạo chồi cao nhất đối với giống BY (giống thu hải đường kép hoa vàng) và BW (giống thu hải đường kép hoa trắng); 1,0 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA đối với giống BL (giống thu hải đường

kiểng lá). Liều chiếu xạ thích hợp để tạo nguồn biến dị đối với hạt giống BY là 100Gy và 125Gy, BW là 75Gy và 100Gy. Liều chiếu xạ thích hợp để tạo nguồn biến dị đối với chồi của các giống BY, BW và BL lần lượt là 100Gy và 120Gy, 80Gy và 100Gy, 100Gy và 120Gy. Các biến dị đã được tìm thấy ở các nghiệm thức xử lý chiếu xạ gồm sự biến đổi của hình thái, màu sắc lá, thân và hoa. Thời gian phát nụ sớm và số hoa đạt cao nhất ở liều 100Gy đối với giống BY và 75Gy đối với giống BW.

Các đặc tính sinh trưởng và ra hoa