

HOẠT TÍNH TIỀM NĂNG KHÁNG TẾ BÀO GỐC UNG THƯ NTERA-2 CỦA HOẠT CHẤT MALLOAPELTA B PHÂN LẬP TỪ CÂY BÙM BỤP VIỆT NAM

Đỗ Thị Thảo^{1,2,✉}, Nguyễn Thị Nga¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Đỗ Thị Phương¹, Triệu Hà Phương¹, Phạm Thị Hải Yến², Hoàng Lê Tuấn Anh^{2,3}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu khoa học Miền Trung, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thaodo74@yahoo.com

Ngày nhận bài: 07.11.2019

Ngày nhận đăng: 20.3.2020

TÓM TẮT

Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy tế bào gốc ung thư (CSCs) liên quan trực tiếp đến sự kháng thuốc, di căn, ung thư tái phát và ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả điều trị bệnh ung thư. Vì thế, CSCs được xem là đích hướng tới cho việc nghiên cứu, tìm kiếm các hợp chất có khả năng phòng chữa ung thư hiệu quả hơn. Hoạt chất malloapelta B được phân lập từ lá cây Bùm búp (*Mallotus apelta*) (Lour.) Muel.-Arg, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) của Việt Nam, đã cho thấy khả năng phòng chữa ung thư *in vitro* rất tốt, đặc biệt là khả năng ức chế mạnh sự hoạt hoá của yếu tố NF- κ B (nuclear factor- kappa B). Trong nghiên cứu của chúng tôi, malloapelta B được khảo sát hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 và cho thấy có $IC_{50} = 12,71 \pm 0,76 \mu M$. Malloapelta B cũng lần đầu tiên được ghi nhận có tác động tới chu trình phát triển tế bào NTERA-2 khi làm giảm đáng kể tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 (37,48%), gây tăng số lượng ở pha G2/M (31,12%) so với đối chứng (56,81% và 18,96%, một cách tương ứng). Bên cạnh đó, malloapelta B ở các mức nồng độ 100 và 20 $\mu g/mL$ cũng ức chế NTERA-2 hình thành cụm tế bào và đến sự phát triển khối u tế bào (tumorsphere), hai đặc tính liên quan tới tính tự làm mới của tế bào CSCs. Tuy nhiên, malloapelta B ở các nồng độ nghiên cứu là 2,5 và 5 μM không tác động mạnh và không ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ tế bào có biểu hiện CD44⁺/CD24⁺, là hai marker bề mặt khá phổ biến của tế bào CSCs.

Từ khóa: CD44, CD24, tế bào gốc ung thư CSCs, malloapelta B, NTERA-2

MỞ ĐẦU

Theo Tổ chức y tế thế giới (World Health Organization), Việt Nam nằm trong 50 nước thuộc top 2 của bản đồ ung thư (50 nước cao nhất thuộc top 1). Cụ thể, Việt Nam đang xếp ở vị trí 78/172 quốc gia, vùng lãnh thổ khảo sát với tỉ lệ tử vong 110/100.000 người. Khối u ung thư được định nghĩa là tập hợp không đồng nhất các tế bào khác nhau về đặc điểm sinh học và khả năng tự đổi mới (Reya *et al.*, 2001). Trong nhiều nghiên cứu gần đây, các nhà khoa học đã chỉ ra rằng trong khối u *in vivo* cũng như các dòng tế

bào ung thư có chứa một tập hợp nhỏ được gọi là các tế bào gốc ung thư (CSCs) (Singh *et al.*, 2003; Kondo, 2007) liên quan đến kháng thuốc, di căn, ung thư tái phát và ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả điều trị ung thư (Gil *et al.*, 2008). Cũng như tế bào gốc, tế bào gốc ung thư có các đặc điểm như khả năng tự đổi mới, khả năng biệt hóa đa dạng thành các quần thể tế bào ung thư không đồng nhất trong khối u và chống lại quá trình tự chết (apoptosis) (Clarke *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2008). Ngoài ra, CSCs cũng thể hiện khả năng kháng thuốc, kháng xạ trị mạnh. Các con đường tín hiệu Nocth và Wnt tham gia vào sự tự

làm mới của tế bào gốc ung thư cho thấy liên quan đến hiện tượng kháng xạ trị của bệnh ung thư thần kinh và ung thư vú. Nhiều báo cáo cũng đã ghi nhận sự biểu hiện phổ biến của các marker bề mặt như CD133, CD44, CD24... ở CSCs. Các nhà khoa học cũng đã nhận thấy rằng đa phần các tế bào CSCs là những tế bào có thể nhân nuôi được trong điều kiện không bám dính, không huyết thanh và có khả năng tạo khối tế bào (tumorsphere) *in vitro* (Shackleton M, 2010; Dontu *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005; Calvet *et al.*, 2014). Với những đặc điểm như trên, CSCs hiện đã trở thành đích tiềm năng để điều trị cho bệnh ung thư và được nhiều nhà khoa học quan tâm.

Hoạt chất 1-(5,7-dimetoxy-2,2-dimetyl-2H-cromen-8-yl)-but-2-en-1-one, có tên là malloapelta B (MalB), là một hợp chất có cấu trúc mới, có hàm lượng cao và được phân lập từ lá cây Bùm búp (*Mallotus apelta*) (Lour.) Muel.-Arg, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) của Việt Nam. Đây là một cây thuốc quý, mọc hoang ở nhiều nơi thuộc miền Bắc nước ta. Hoạt chất này đã chứng minh khả năng phòng chữa ung thư *in vitro* rất mạnh. Điển hình là MalB ức chế mạnh sự hoạt hoá của yếu tố NF- κ B (nuclear factor- κ B) với giá trị $IC_{50} = 0,54 \pm 0,05 \mu M$, thấp hơn nhiều so với của chất đối chứng Parthenolide (PTN) với giá trị $IC_{50} = 6,66 \pm 0,07 \mu M$ (Nam *et al.*, 2007). Tuy nhiên, cho đến nay, hoạt chất này chưa được nghiên cứu về khả năng kháng tế bào gốc ung thư cũng như tìm hiểu sâu về hoạt tính. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ báo cáo một số hoạt tính kháng tế bào gốc ung thư NTERA-2 của malloapelta B.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Dòng tế bào gốc ung thư NTERA-2 được cung cấp bởi GS. P Wongtrakoongate, Đại học Mahidol, Thailand; hoạt chất malloapelta B (MalB) được cung cấp bởi TS. Hoàng Lê Tuấn Anh, Viện Nghiên cứu khoa học Miền Trung,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường DMEM, huyết thanh phôi bò (FBS), kháng sinh (antibiotics-antimycotics), trypsin-EDTA được nhập từ Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Human CD44 antibody conjugated with FITC (FITC-CD44) và human CD24 conjugated with PE (PE-CD24) cung cấp bởi Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Các hóa chất khác được cung cấp bởi Sigma Aldrich (St. Louis, MO USA)

Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào NTERA-2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM có thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (fetal bovine serum, FBS). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Phương pháp gây độc tế bào CSCs

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được thực hiện theo phương pháp của Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ (NCI) nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro* (Skehan *et al.*, 1990). Theo đó, tế bào ung thư được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn và tiến hành thử nghiệm với các chất thử ở các nồng độ khác nhau trên đĩa 96 giếng. Đĩa thử nghiệm bao gồm: tế bào + môi trường nuôi cấy + chất thử, được ủ trong tủ ấm CO₂, ở 37°C để tế bào tiếp tục phát triển. Sau 3 ngày, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA 20% và nhuộm bằng sulforhodamine B (SRB) 0,4% trong 1 giờ ở 37°C. Lượng SRB dư được gạn bỏ, rửa 3 lần bằng axit axetic 1% và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Sau đó, sử dụng Tris base (10 mM) để hoà tan lượng SRB đã bám nhuộm các phân tử protein. Hàm lượng màu của SRB được xác định qua phổ hấp phụ ở bước sóng 515 nm. Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine được sử dụng như chất đối chứng dương và thử nghiệm ở các nồng độ 100 $\mu g/mL$, 20 $\mu g/mL$, 4

$\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% sử dụng như chất đối chứng âm.

Phương pháp xác định chu trình tế bào (cell cycle) bằng kỹ thuật Flowcytometry

Tế bào được đưa ra đĩa 6 giếng và nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C , 5% CO_2 . Mẫu thí nghiệm được đưa vào các giếng tế bào và ủ trong tủ ấm 48 h. Giếng tế bào chỉ có DMSO được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 48 h ủ mẫu, tế bào được tách khỏi đáy giếng bằng Trypsin-EDTA và thu vào ống falcon. Tiến hành ly tâm và loại bỏ trypsin. Cặn tế bào được rửa lại 3 lần bằng PBS lạnh. Sau khi cố định tế bào bằng Ethanol 70% trong 2 h, tiến hành ly tâm loại bỏ Ethanol và rửa lại tế bào bằng dung dịch PBS. Cặn tế bào được hòa lại trong 0,45 mL PBS. Thêm vào ống tế bào RNase A (1 mg/mL), ủ trong bể ổn nhiệt 37°C trong 15 phút. 25 μL dung dịch propidium iodide - PI (1 mg/mL) được thêm vào các ống và ủ tiếp ở nhiệt độ phòng 1 giờ trước khi bổ sung thêm 500 μL PBS. Tác động của các mẫu thử đến chu trình tế bào được xác định bằng hệ thống Flow cytometry Novocyte và phần mềm NovoExpress (ACEA Bioscience Inc.).

Phương pháp xác định biểu hiện marker bề mặt

Tế bào được đưa ra đĩa 6 giếng và nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C , 5% CO_2 . Mẫu thí nghiệm được đưa vào các giếng tế bào và ủ trong tủ ấm 48 h. Giếng tế bào chỉ có DMSO được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 48 h ủ mẫu, tế bào được tách khỏi đáy giếng bằng Trypsin-EDTA và thu vào ống falcon. Để xác định mức độ biểu hiện của các marker bề mặt, tế bào được hòa trong môi trường DMEM có chứa 2% FBS sau đó bổ sung thêm kháng thể kháng CD44-FITC và CD24-PE ở 4°C trong 10 phút và tránh ánh sáng. Sự biểu hiện các marker bề mặt trên tế bào được phân tích bằng hệ thống flowcytometry Novocyte và phần mềm NovoExpress (ACEA Bioscience Inc.).

Phương pháp ức chế tạo cụm tế bào (colony assay)

Phương pháp này được sử dụng để đánh giá

khả năng tự làm mới của tế bào trong điều kiện *in vitro* (Cao *et al.*, 2011). Hai trăm tế bào NTERA-2 được đưa vào đĩa nuôi cấy 6 giếng có chứa môi trường DMEM với 10% FBS và 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicine. Sau 7 ngày nuôi cấy, loại bỏ môi trường. Tế bào được cố định và nhuộm trong dung dịch chứa 20% ethanol, 3,7% formaldehyde và 0,2% methyl violet 10B. Sau đó tế bào được quan sát dưới kính hiển vi và đếm các cụm tế bào có trên 70 tế bào. Khả năng tạo cụm dưới tác động của mẫu được so sánh với giếng tế bào đối chứng âm (không có tác động của mẫu).

Phương pháp xác định tác động của tế bào nuôi cấy dạng khối cầu ba chiều (3D)

Để đánh giá tác động của MalB đến sự phát triển tế bào nuôi dưới dạng khối cầu 3D, tế bào được nuôi trong đĩa 96 giếng có bề mặt bám dính thấp với nồng độ tế bào 5000 tế bào/ giếng. Sau 3 ngày nuôi cấy, khi tế bào tập hợp thành một khối tế bào hình cầu có cấu trúc ổn định, mẫu MalB được đưa vào các giếng tế bào với các nồng độ khác nhau và ủ thêm 3 ngày ở tủ ấm 37°C , 5% CO_2 . Hình ảnh khối tế bào được qua sát và chụp bằng kính hiển vi soi ngược Zeiss Vert A1. Sự phát triển của tế bào trong khối u tế bào so với đối chứng được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

Phương pháp phân tích số liệu

Các kết quả nghiên cứu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số (SD), và được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 7. Các sai khác có giá trị $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

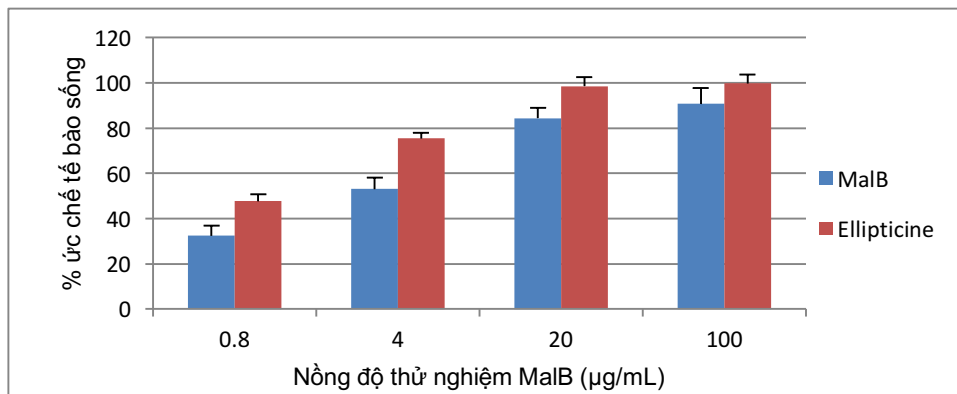
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng gây độc tế bào CSCs của MalB

Thông qua phương pháp SRB như đã trình bày ở trên, khả năng gây độc tế bào CSCs dòng NTERA-2 của hoạt chất MalB được xác định. Kết quả ở Hình 1 cho thấy MalB ức chế được trên 50% sự phát triển của tế bào NTERA-2 ở nồng độ 4, 20 và 100 $\mu\text{g/mL}$. Khi nồng độ mẫu giảm thấp đến 0,8 $\mu\text{g/mL}$ khả năng gây độc tế bào của MalB

giảm chỉ còn khoảng 30%. Thông qua phần mềm Tablecurve 2Dv4, giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế được 50% sự phát triển tế bào) của MalB được xác định và bằng $3,66 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$ (tương ứng với $12,71 \pm 0,76 \mu\text{M}$). Như vậy, trên tế bào CSCs thì hoạt tính của MalB đã giảm đi khá nhiều khi so sánh hoạt tính này trên các dòng tế bào ung thư khác (không phải CSCs) như ung thư tế bào gan

dòng Hep-2 có $IC_{50} = 0,46 \mu\text{g/mL}$; ung thư tế bào cơ RD có $IC_{50} = 0,33 \mu\text{g/mL}$ (Phan *et al.*, 2007). Kết quả này cũng thể hiện rõ sự kháng thuốc mạnh của tế bào CSCs và phù hợp nhiều báo cáo trước đây như doxorubicin, ellipticine đều đã giảm hoạt tính gần ba lần khi so sánh với dòng tế bào ung thư tương ứng ($P < 0,05$) (Phuong *et al.*, 2018).

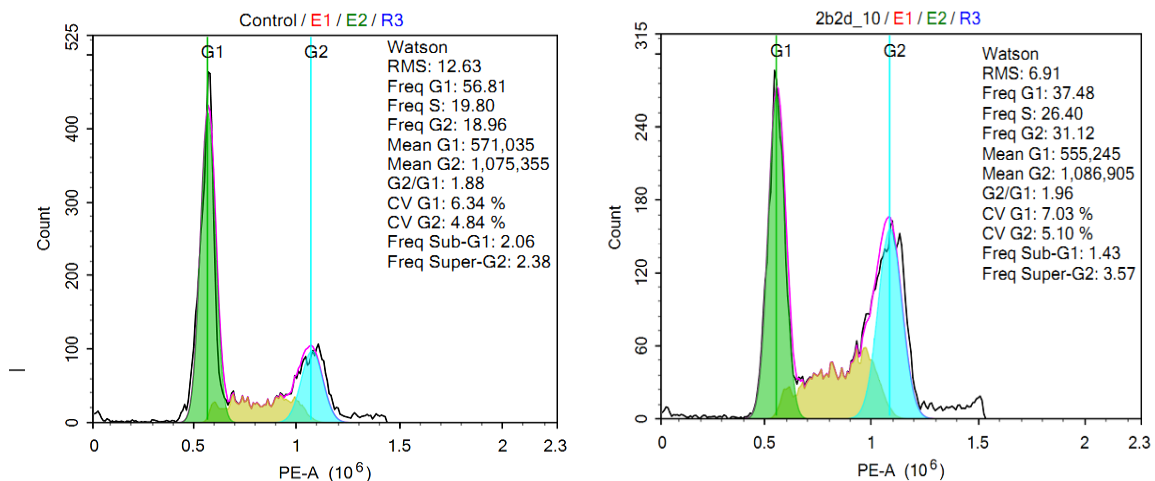


Hình 1. Khả năng ức chế sự phát triển tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 của hoạt chất MalB sau 3 ngày nuôi cấy đạt 32,39% (0,8 µg/mL); đạt 53,06% (4 µg/mL); đạt 84,35% (20 µg/mL); đạt 90,67% (100 µg/mL);

Đánh giá tác động của MalB đến chu trình tế bào

Để xác định tác động của MalB đến chu trình tế bào NTERA-2, các tế bào này được ủ

với hoạt chất ở nồng độ 10 µM sau đó nhuộm với thuốc nhuộm PI trước khi phân tích bằng kỹ thuật phân tích dòng chảy tế bào Flowcytometry. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của hoạt chất MalB ở nồng độ 10 µM đến chu trình tế bào của NTERA-2 ở thời điểm 48 h, sử dụng hệ thống Flowcytometry Novocyte (ACEA Bioscience Inc.) và phần mềm NovoExpress

Qua kết quả ở Hình 2 chúng tôi nhận thấy hoạt chất MalB đã làm giảm đáng kể tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 còn 37,48% khi so với đối chứng không xử lí là 56,81%. Đồng thời số lượng tế bào ở pha G2/M tăng mạnh lên đến 31,12% so với đối chứng âm chỉ có 18,96%. Kết quả này cho thấy hoạt chất MalB đã làm thay đổi đáng kể chu trình tế bào của dòng NTERA-2. Đây là một tác động mới và chưa từng được báo cáo về hoạt tính này của hoạt chất MalB. Tuy nhiên, chúng tôi mới chỉ đánh giá trên tế bào gốc ung thư CSCs mà chưa có sự so sánh với tế bào ung thư thông thường nên khả năng tác động của MalB tới chu trình tế bào sẽ cần tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn để có kết luận cụ thể về hoạt tính hướng đích tế bào CSCs của hoạt chất này.

Tác động của MalB đến đặc tính gốc của tế bào CSCs

Đặc tính gốc của tế bào gốc nói chung, tế bào gốc ung thư CSCs nói riêng được thể hiện thông qua nhiều chỉ thị phân tử (marker) bề mặt tế bào. CD44, một thụ thể axit hyaluronic, là một trong những marker được nhận thấy xuất hiện rất phổ biến trên bề mặt nhiều loại tế bào CSCs như trong ung thư đầu cổ (Han *et al.*, 2014) ung thư vú (Li *et al.*, 2007), ung thư tụy (Li *et al.*, 2014), ung thư phổi (Alamgeer *et al.*, 2013), ung thư gan (Yamashita, Wang, 2013), ung thư ruột kết (Vaiopoulos *et al.*, 2012) v.v. CD44 là một phân tử glycoprotein đa cấu trúc và đa chức năng trên bề mặt tế bào, đóng vai trò quan trọng trong sự kết dính và di chuyển của tế bào, nhưng vai trò nổi bật của CD44 là liên kết với axit hyaluronic trong ma trận ngoại bào. CD44 được phát hiện thấy ở các tế bào gốc tủy xương người (Hematopoietic Stem Cell - HSC), ở tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cell - MSC) và tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ. CD44 được sử dụng rộng rãi khi kết hợp với các marker khác để phân lập CSCs từ các khối u rắn khác nhau. Tuy nhiên, CD44 cũng biểu hiện ở nhiều loại tế bào bình thường. Hiện nay các biến thể của CD44 được đề xuất là một trong những dấu ấn để phát hiện CSCs trong các bệnh ung thư khác nhau. Bên cạnh đó, CD24 lại là một sialoglycoprotein biểu hiện trên bề mặt của hầu hết các tế bào lympho B, cũng có ở tế bào

bach cầu trung tính v.v. Tuy nhiên, marker này biểu hiện mạnh ở nhiều loại tế bào ung thư khác nhau như buồng trứng, vú, tiền liệt tuyến, tụy, lách v.v. và được xem là liên quan mật thiết đến quá trình di căn của tế bào ung thư. Sự đồng biểu hiện của CD44 với các marker khác như CD44, CD29, và CD31 được xem là những dấu ấn quan trọng để phát hiện CSCs (Jaggupilli, Elkord, 2012).

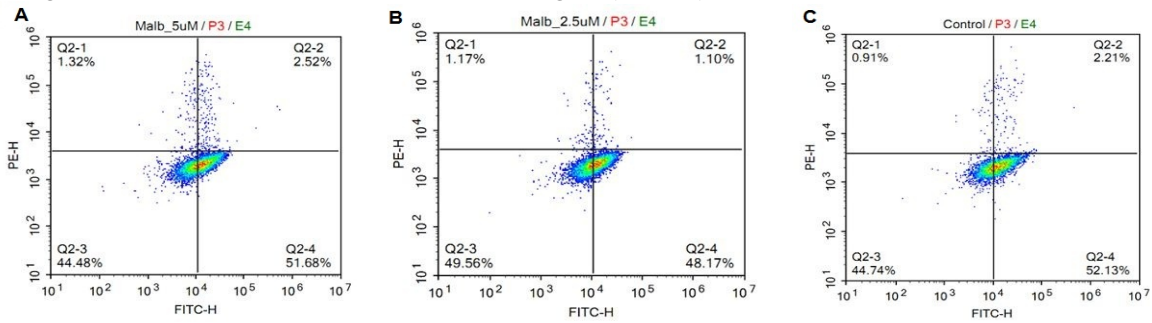
Trong nghiên cứu của chúng tôi, hoạt chất MalB lần đầu tiên được nghiên cứu tác động tới sự biểu hiện của các marker bề mặt tế bào CSCs là CD44 và CD24. Để đảm bảo tế bào không bị chết do tác động gây độc của MalB dẫn đến sai lệch kết quả về biểu hiện marker bề mặt, tế bào NTERA-2 được chúng tôi ủ với mẫu ở nồng độ nghiên cứu là 2,5 và 5 μ M. Sau 48 h ủ mẫu, tế bào NTERA-2 được thu nhận như đã trình bày ở phần phương pháp và được đánh giá sự biểu hiện của 2 marker CD44 và CD24. Kết quả ở Hình 3 cho thấy MalB ở các nồng độ nghiên cứu là 2,5 và 5 μ M không tác động mạnh và không ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ tế bào có biểu hiện CD44⁺/CD24⁺ là 1,10% và 2,52%, một cách tương ứng, so với đối chứng không xử lí mẫu (2,21%). Rất có thể kết quả này thu được do nồng độ mẫu thử nghiệm đã sử dụng khá thấp so với nồng độ gây chết 50% tế bào NTERA-2 của MalB nên chưa gây được tác động rõ rệt đến sự biểu hiện CD44⁺/CD24⁺ trên tế bào CSCs dòng NTERA-2.

Tác động của MalB đến sự phát triển khối cầu 3D (tumorsphere) và tạo cụm (colony) từ tế bào NTERA-2

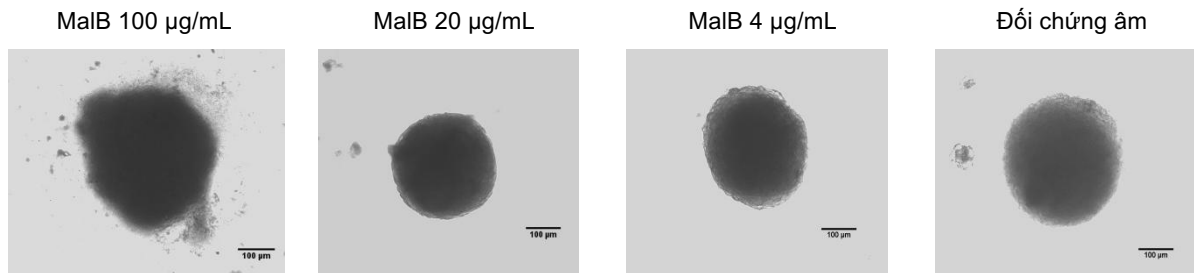
Đặc tính tự làm mới là đặc tính quan trọng của tế bào gốc ung thư. Đây là đặc tính giúp của tế bào gốc ung thư có khả năng tạo thành các khối tế bào (tumorsphere) từ một tế bào ban đầu trong môi trường không huyết thanh và không bám dính. Để đánh giá tác động của MalB đến khả năng tạo khối u 3D của tế bào NTERA-2, chúng tôi tiến hành tạo các khối cầu này trên đĩa 96 giếng có bề mặt bám dính thấp. Cụ thể là tế bào NTERA-2 được nuôi trên bề mặt không bám dính, tạo thành một khối tế bào duy nhất có cấu trúc ổn định sau 3

ngày nuôi cấy và được ủ với hoạt chất MalB ở các nồng độ nghiên cứu khác nhau. Kết quả cho thấy MalB ở nồng độ 100 µg/mL đã gây phân rã và làm mất đi cấu trúc hình cầu đặc của khối tế bào. Đến nồng độ 20 µg/mL, tác động của MalB đến cấu trúc khối tế bào không

rõ như nồng độ 100 µg/mL tuy nhiên hoạt chất cũng đã làm giảm kích thước khối tế bào so với đối chứng. Và ở nồng độ ủ mẫu thấp nhất là 4 µg/mL thì hoạt chất MalB không còn tác động được đến sự phát triển của khối u tế bào (Hình 4).



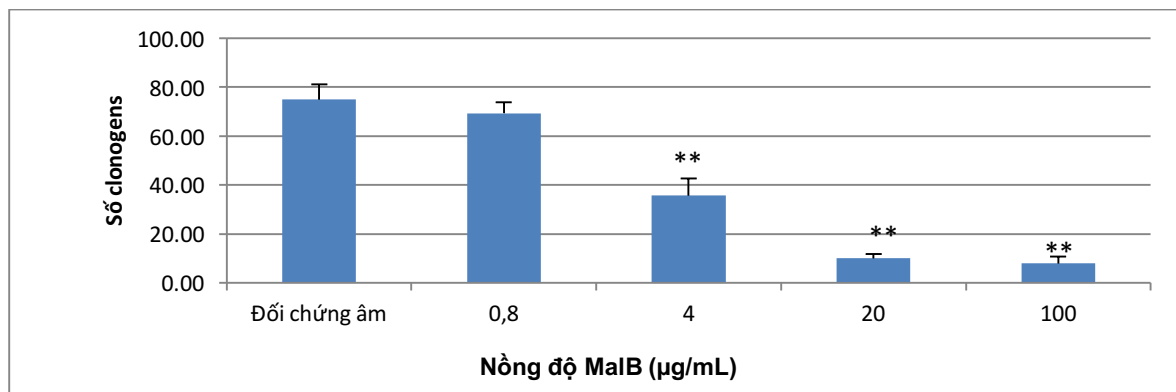
Hình 3. Ảnh hưởng của hoạt chất MalB đến sự biểu hiện marker bề mặt CD44 và CD24 của tế bào NTERA-2 ở thời điểm 48h tại các nồng độ khác nhau 5µM (A), 2,5 µM (B) và đối chứng âm (C). Tế bào được phân tích bằng hệ thống Flowcytometry Novocyte (ACEA Bioscience Inc.) và phần mềm NovoExpress.



Hình 4. Khả năng ức chế sự phát triển khối u tumorsphere từ tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 của hoạt chất MalB sau 3 ngày nuôi cấy ở các nồng độ 100-20-4 µg/mL, chụp bằng hệ thống kính hiển vi soi ngược Zeiss Vert A1, độ phóng đại 100X

Bên cạnh khả năng tạo khối tế bào tumorsphere, một đặc tính cơ bản khác của tế bào gốc ung thư là khả năng tạo dòng hay tạo các cụm tế bào. Thông qua phương pháp tạo dòng (clonogenic), tác động của MalB đến khả năng tạo cụm tế bào hay khả năng tự làm mới của NTERA-2 được xác định. Kết quả ở Hình 5 cho thấy MalB ở các nồng độ 100, 20 và 4 µg/mL đều gây ức chế mạnh và có ý nghĩa đối với sự hình thành các cụm tế bào ($P < 0,01$) của NTERA-2. Theo đó, ở giếng đối chứng không xử lý mẫu, tế bào NTERA-2 đã tạo được $75 \pm$

$6,24$ cụm/giếng, trong khi ở các giếng có ủ với hoạt chất MalB thì chỉ có $8 \pm 2,65$ cụm/giếng, $10 \pm 1,73$ cụm/giếng và $35,67 \pm 7,02$ cụm/giếng, tương ứng với các mức nồng độ 100, 20 và 4 µg/mL. Kết quả cũng cho thấy, ở nồng độ 0,8 µg/mL, hoạt chất MalB không tác động nhiều đến sự hình thành cụm của tế bào NTERA-2. Như vậy ở các mức nồng độ 100 và 20 µg/mL, hoạt chất MalB đã ức chế được sự hình thành cụm tế bào, ức chế sự phát triển khối u tế bào 3D liên quan tới các đặc tính tự làm mới của tế bào CSCs dòng NTERA-2.



Hình 5. Khả năng ức chế sự tạo cụm của tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 của hoạt chất MalB sau 3 ngày nuôi cấy ở các nồng độ 100-20-4 µg/mL; ** $P < 0,01$ so với đối chứng âm

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hoạt chất malloapelta B (MalB) đã ức chế được 50% sự phát triển tế bào gốc ung thư CSCs dòng NTERA-2 ở nồng độ $3,66 \pm 0,22$ µg/mL (tương ứng với $12,71 \pm 0,76$ µM). Như vậy, trên tế bào CSCs thì hoạt tính của MalB đã giảm đi khá nhiều khi so sánh hoạt tính này trên các dòng tế bào ung thư khác (không phải CSCs) và phù hợp với các đặc tính kháng thuốc mạnh của các CSCs. Chúng tôi cũng ghi nhận rằng hoạt chất Mal B đã tác động tới chu trình tế bào NTERA-2 khi làm giảm đáng kể tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 (37,48%), gây tăng mạnh số lượng tế bào ở pha G2/M (31,12%) so với đối chứng. Đây là một tác động mới và chưa từng được báo cáo về hoạt tính này của hoạt chất MalB. Bên cạnh đó, lần đầu tiên, ảnh hưởng mạnh của hoạt chất MalB đến sự hình thành cụm tế bào, đến sự phát triển khối tế bào tumorsphere liên quan tới các đặc tính tự làm mới của tế bào CSCs dòng NTERA-2 đã được ghi nhận ở các mức nồng độ 100 và 20 µg/mL. Tuy nhiên, MalB ở các nồng độ nghiên cứu là 2,5 và 5 µM không tác động mạnh và không ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ tế bào có biểu hiện $CD44^+/CD24^+$, là hai marker bề mặt khá phổ biến của tế bào CSCs.

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 106.02-2017.20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alamgeer M, Peacock CD, Matsui W, Ganju V, Watkins DN (2013) Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. *Respirology* 18: 757-764.
- Calvet CY, André FM, Mir LM (2014) The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One* 9(2):e89644.
- Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, Li J, Zhang Y, Chen L, Qian H, Wu M (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 11(1):71.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006) Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344.
- Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS (2003) Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36:59-72.
- Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM (2008) Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 49(2):193-9.
- Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK (2014) Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 14: 173.

- Jaggupilli A, Elkord E (2012) Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Develop Immunol* 2012:708036.
- Kondo T (2007) Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomark* 27(5):506-11.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037.
- Li L, Hao X, Qin J, Tang W, He F, Smith A, Zhang M, Simeone DM, Qiao XT, Chen ZN, Lawrence TS, Xu L (2014) Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. *Gastroenterology* 146: 1108-1118.
- Nam NH, Ngoc NT, Hanh TTH, Thao NP, Van Thanh N, Cuong NX, Do TT, Huong TT, Thung DC, Van Kiem P (2015) Cytotoxic biscebranoids from the soft coral *Sarcophyton pauciplicatum*. *Chem Pharm Bull* 63(8):636-40.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65(13):5506-11.
- Phan TB, Bui HN, Chau VM, Nguyen HN, Le M H, Phan VK (2007) The synthesis of a novel bibenzopyran relied on electroxydation of malloapelta B by cyclic voltametry. *AJSTD* 24(4): 387-392
- Phuong DT, Nga NT, Cuc NT, Phuong VT, Thảo DT (2018) nghiên cứu phân lập và xác định đặc tính của tế bào gốc ung thư từ dòng tế bào ung thư vú 4T1 nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(3): 415-422.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859): 105-11.
- Shackleton M (2010) Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol* 20(2): 85-92
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63(18):5821-8.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: J Natl Cancer Inst* 82(13):1107-12.
- Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG (2012) Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 30: 363-371.
- Yamashita T, Wang XW (2013) Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest* 123: 1911-1918.

PROMISING ACTIVITY AGAINST NTERA-2 CANCER STEM CELLS OF MALLOAPELTA B COMPOUND ISOLATED FROM THE BUM-BUP PLANT IN VIETNAM

Do Thi Thao^{1,2, ✉}, Nguyen Thi Nga¹, Nguyen Thi Cuc¹, Do Thi Phuong¹, Trieu Ha Phuong¹, Pham Thi Hai Yen², Hoang Le Tuan Anh^{2,3}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Mien Trung Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Recent studies have revealed that cancer stem cells (CSCs) drive tumor growth, metastasis, therapy resistant and recurrence. Therefore, CSCs are considered as new targets for screening of more effective drugs. The compound malloapelta B, which was isolated from the Bum-bup plant (*Mallotus apelta*) (Lour.) Muel.-Arg, Euphorbiaceae) in Vietnam, presented very potent and strong anticancer *in vitro*, especially against the activation of NF- κ B (nuclear factor- κ B). In our research, malloapelta B inhibited the growth of NTERA-2 line, a CSC line, at the value of IC₅₀ =

12.71 ± 0.76 μM. In this study, malloapelta B also had effects on cell cycle of NTERA-2 by significantly reducing the cell number at G0/G1 phase (37.48%), while raising this number of phase G2/M to 31.12% in comparison with those of control (56.81% and 18.6%, respectively). Besides, clonogenic and tumorspheroidal formations are acknowledged as typically renewable characteristics of CSCs. Then, in our studies, malloapelta B significantly prevented NTERA-2 to form clonogens and reduced tumorspheres' sizes at treatments with 20 and 100 μg/mL. However, malloapelta B did not exhibit any obvious effects on the expression level of CD44⁺/CD24⁺, the two typical cell surface markers of CSCs, at 2.5 and 5 μM treatments.

Keywords: *CD44, CD24, cancer stem cells CSCs, malloapelta B, NTERA-2*