

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN LƯU HẢI ANH

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ
TẾ BÀO UNG THƯ TĂNG SINH, DI CƯ VÀ
XÂM LẤN IN VITRO CỦA PRODIGIOSIN TỪ
CHŨNG *SERRATIA* SP. HVQY-IGR TÁI TỔ HỢP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

HÀ NỘI, 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN LƯU HẢI ANH

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ
TẾ BÀO UNG THƯ TĂNG SINH, DI CƯ VÀ
XÂM LẤN *IN VITRO* CỦA PRODIGIOSIN TỪ
CHŨNG *SERRATIA* SP. HVQY-IGR TÁI TỔ HỢP

LUẬN VĂN THẠC SĨ

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. ĐỖ MINH TRUNG 

2. PGS, TS. ĐỖ THỊ TUYỀN 

HÀ NỘI, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là kết quả nghiên cứu do chính tôi thực hiện cùng với nhóm nghiên cứu tại Học viện Quân y và Viện Sinh học. Toàn bộ quá trình thực hiện đề tài đều được tiến hành một cách trung thực, nghiêm túc và tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu khoa học.

Các số liệu, kết quả và nhận xét được trình bày trong luận văn đều được thu thập và phân tích một cách khách quan, phản ánh đúng thực tế nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cũng thuộc một phần nội dung của đề tài do Học viện Quân y chủ trì và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình khoa học nào trước đây dưới bất kỳ hình thức nào. Những tài liệu, số liệu và kết quả nghiên cứu của các tác giả khác được sử dụng trong luận văn đều đã được trích dẫn đầy đủ, rõ ràng theo đúng quy định.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm trước pháp luật, cũng như trước Hội đồng khoa học, về tính trung thực và độ chính xác của nội dung luận văn. Trong trường hợp phát sinh sai sót hoặc vi phạm, tôi xin chấp nhận mọi hình thức xử lý theo quy định hiện hành.

Hà Nội, ngày 09 tháng 06 năm 2026

Tác giả luận văn



Nguyễn Lưu Hải Anh

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên em xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới TS. Đỗ Minh Trung và PGS.TS Đỗ Thị Tuyên, người thầy, người cô đã tận tình hướng dẫn chỉ bảo và luôn đồng hành cùng em trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện nghiên cứu để em hoàn thành luận văn này.

Em xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng các phòng, ban chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới các thầy cô, anh chị của Phòng Protein-Độc chất-Tế bào, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân Sự, Học viện Quân y và Phòng Công nghệ Enzyme, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi, hỗ trợ cho em trong suốt quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu.

Em xin gửi lời cảm ơn đến Bộ môn Khoa Giải phẫu Bệnh lý, Pháp y - Bệnh viện Quân y 103 đã tạo điều kiện để em được tham gia học tập, tiếp cận thực tế và tích lũy kinh nghiệm chuyên môn phục vụ cho quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn tới gia đình và bạn bè thân thiết, những người luôn ở bên động viên, hỗ trợ và là nguồn động lực lớn giúp em vượt qua khó khăn trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Hà Nội, ngày 09 tháng 06 năm 2026

Tác giả luận văn



Nguyễn Lưu Hải Anh

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ	viii
MỞ ĐẦU	ix
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. PRODIGIOSIN	3
1.1.1. Đặc điểm cấu tạo.....	3
1.1.2. Tính chất lý – hóa và độ ổn định của prodigiosin.....	4
1.1.3. Nguồn cung cấp prodigiosin.....	6
1.1.3.1. Từ chủng vi sinh vật tự nhiên.....	6
1.1.3.2. Từ vi sinh vật biến đổi di truyền	7
1.1.3.3. Tổng hợp prodigiosin	8
1.1.4. Hoạt tính sinh học của prodigiosin.....	11
1.1.4.1. Hoạt tính kháng khuẩn	11
1.1.4.2. Hoạt tính kháng nấm	12
1.1.4.3. Ức chế ký sinh trùng	13
1.1.4.4. Hoạt tính kháng virus.....	13
1.1.4.5. Ức chế miễn dịch	14
1.1.4.6. Chống tạo nở hoa	15
1.1.4.7. Ức chế tế bào ung thư	15
1.1.4.8. Ảnh hưởng của prodigiosin đến di cư và xâm lấn tế bào ung thư ..	20
1.1.5. Ứng dụng của prodigiosin	21
1.1.5.1. Ứng dụng làm mỹ phẩm.....	21
1.1.5.2. Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.....	21
1.1.5.3. Ứng dụng làm chất chống bám bẩn sinh học	22
1.1.5.4. Ứng dụng làm chất nhuộm	22
1.1.5.5. Ứng dụng trong pin mặt trời nhạy quang và đánh dấu nhiên liệu ..	22
1.1.5.6. Ứng dụng của PG trong việc điều trị ung thư	23
1.2. BỆNH UNG THƯ	24
1.2.1. Khái niệm và đặc điểm	24
1.2.1.1. Cơ chế giúp tế bào ung thư thoát khỏi quá trình apoptosis	25
1.2.1.2. Sự tăng sinh, xâm lấn và di căn tế bào ung thư	25

1.2.2. Thực trạng bệnh ung thư	26
1.2.2.1. Ung thư phổi.....	27
1.2.2.2. Ung thư thanh quản.....	27
1.2.2.3. Ung thư gan.....	28
1.2.3. Các phương pháp điều trị ung thư	29
1.2.3.1. Phẫu thuật.....	29
1.2.3.2. Xạ trị liệu.....	29
1.2.3.3. Hóa trị liệu.....	30
1.2.3.4. Liệu pháp điều trị đích	30
1.2.3.5. Liệu pháp miễn dịch.....	30
1.2.3.6. Liệu pháp nội tiết	31
1.2.3.7. Điều trị kết hợp và cá thể hóa	31
1.2.3.8. Một số hợp chất có nguồn gốc tự nhiên mang hoạt tính chống ung thư.....	31
1.2.3.9. Prodigiosin có tác dụng trên nhiều dòng tế bào ung thư in vitro và in vivo.....	32
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	34
2.1.1. Đối tượng.....	34
2.1.2. Hoá chất và vật tư tiêu hao chính	34
2.1.3. Các máy móc thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu.....	34
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.2.1. Nuôi cấy tế bào	34
2.2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của prodigiosin bằng phương pháp MTT	35
2.2.3. Đánh giá hoạt tính ức chế sự di cư và xâm lấn tế bào ung thư của prodigiosin bằng kỹ thuật scratch assay	36
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	37
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	37
3.1.1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư để đánh giá hoạt tính của PG	37
3.1.2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh một số tế bào ung thư của pg bằng kỹ thuật MTT	39
3.1.2.1. Kết quả đánh giá trên tế bào H460.....	39
3.1.2.2. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep-2.....	41
3.1.2.3. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep3B	43
3.1.2.4. Kết quả xác định giá trị IC50	45

3.1.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của PG đến khả năng di cư và xâm lấn của một số dòng tế bào ung thư <i>in vitro</i>	49
3.1.3.1. Kết quả đánh giá trên tế bào H460.....	49
3.1.3.2. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep-2.....	55
3.1.3.3. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep3B	60
3.2. THẢO LUẬN	65
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	71
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	72

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
PG	: Prodigiosin
FBS	: Fetal Bovine Serum: Huyết thanh bào thai bò
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
H460	: Human non-small cell lung cancer cell line – Dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ
Hep-2	: Homo sapiens HeLa contaminant Carcinoma – Dòng tế bào ung thư thanh quản
Hep3B	: Hepatocellular carcinoma 3B – Dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan
PBS	: Phosphate buffer saline
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute – Môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú trong phòng thí nghiệm
OD	: Optical Density – Mật độ quang học
IC ₅₀	: The half maximal inhibitory concentration – Nồng độ ức chế bán tối đa
MAP	: 2-methyl-3-n-amylo-pyrrole
MBC	: 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carbaldehyde
IAP	: Inhibitors Apoptosis Protein – Protein ức chế quá trình apoptosis
DC	: Nhóm đối chứng
ECM	: Extracellular matrix – Chất nền ngoại bào

DANH MỤC CÁC BẢNG

Tên bảng	Nội dung	Trang
Bảng 1.1:	Một số ví dụ về Prodiginine	4
Bảng 3.1:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	39
Bảng 3.2:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	41
Bảng 3.3:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	43
Bảng 3.4:	Tỉ lệ tế bào H460 sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG	45
Bảng 3.5:	Tỉ lệ tế bào Hep-2 sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG	47
Bảng 3.6:	Tỉ lệ tế bào Hep3B sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG	48
Bảng 3.7:	Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào H460 tiếp xúc với PG	53
Bảng 3.8:	Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG	58
Bảng 3.9:	Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep3B tiếp xúc với PG	63

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Tên hình và đồ thị	Nội dung	Trang
Hình 1.1:	Cấu trúc của prodigiosin	3
Hình 1.2:	Các cụm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp PG	9
Hình 1.3:	Quá trình tổng hợp PG	10
Hình 1.4:	Sơ đồ cơ chế kháng khuẩn của PG	12
Hình 1.5:	Các con đường cảm ứng apoptosis	17
Hình 3.1:	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh tế bào ung thư sau 72 giờ	37
Hình 3.2:	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư H460	38
Hình 3.3:	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư Hep-2	38
Hình 3.4:	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư Hep3B	39
Hình 3.5:	Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với DMSO, RPMI và PG ở nồng độ 0,25 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	50
Hình 3.6:	Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,5 – 4 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	51
Hình 3.7:	Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 6 – 10 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	52
Hình 3.8:	Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với DMSO và RPMI tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	55
Hình 3.9:	Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,25 – 2 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	56
Hình 3.10:	Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 4 – 10 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	57
Hình 3.11:	Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với DMSO và RPMI tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	60
Hình 3.12:	Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,25 – 2 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	61
Hình 3.13:	Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ 4 – 10 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ	62
Biểu đồ 3.1:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	40

Biểu đồ 3.2:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	42
Biểu đồ 3.3:	Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau	44
Biểu đồ 3.4:	Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào H460	46
Biểu đồ 3.5:	Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào Hep-2	47
Biểu đồ 3.6:	Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào Hep3B	49
Biểu đồ 3.7:	Kết quả so sánh tỉ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào H460 tiếp xúc với PG	54
Biểu đồ 3.8:	Kết quả so sánh tỉ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG	59
Biểu đồ 3.9:	Kết quả so sánh tỉ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào Hep3B tiếp xúc với PG	64

MỞ ĐẦU

Ngày nay, ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong với số lượng ca mắc mới liên tục tăng lên qua các năm mặc dù đã có nhiều tiến bộ đáng kể trong chẩn đoán và điều trị. Ung thư trở thành một gánh nặng lớn đối với kinh tế – xã hội và hệ thống y tế không chỉ của Việt Nam mà còn của toàn thế giới. Theo ước tính của GLOBOCAN 2022, trên thế giới có khoảng gần 20 triệu ca ung thư mới được chẩn đoán mỗi năm, với gần 10 triệu ca tử vong do ung thư ở tất cả các độ tuổi và giới tính. Tại Việt Nam, tình hình ung thư cũng đang ở mức báo động với khoảng 180.480 ca ung thư mới mỗi năm và khoảng 120.184 ca tử vong do ung thư. Những loại ung thư thường gặp tại Việt Nam bao gồm ung thư gan, phổi, vú, đại trực tràng và dạ dày, với xu hướng mắc và tử vong có chiều hướng gia tăng qua từng năm.

Trong những thập kỷ gần đây, các phương pháp điều trị ung thư chủ yếu bao gồm phẫu thuật, xạ trị, hóa trị và điều trị đích. Mặc dù đã mang lại những kết quả nhất định, các phương pháp này vẫn tồn tại nhiều hạn chế như độc tính cao, tác dụng phụ nghiêm trọng, nguy cơ gây tổn thương lên tế bào bình thường và đặc biệt là hiện tượng kháng thuốc ở nhiều dòng tế bào ung thư.

Trước thực trạng đó, việc tìm kiếm và phát triển các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đang trở thành một hướng nghiên cứu được quan tâm rộng rãi. Nhiều hợp chất sinh học được tách chiết từ tự nhiên đã chứng minh được các hoạt tính có lợi như chống oxy hóa, kháng khuẩn, tăng cường miễn dịch và đặc biệt là tiềm năng chống ung thư. Các nguồn khai thác chủ yếu bao gồm thực vật, động vật và vi sinh vật, trong đó vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn, được đánh giá là nguồn cung cấp hợp chất sinh học phong phú và có tính ứng dụng cao trong lĩnh vực dược phẩm.

Trong số các hợp chất có nguồn gốc vi sinh vật, prodigiosin là một sắc tố tự nhiên màu đỏ đang thu hút sự chú ý trong nghiên cứu y sinh trong những năm gần đây. Prodigiosin được biết đến là một chất chuyển hóa alkaloid thứ cấp có công thức phân tử $C_{20}H_{25}N_3O$, khối lượng phân tử 323.4 Da. Prodigiosin được tổng hợp bởi nhiều loài vi khuẩn khác nhau như *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. và vi khuẩn *Vibrio* sp., trong đó *Serratia marcescens* là loài được nghiên cứu phổ biến nhất do khả năng sinh tổng hợp prodigiosin với sản lượng cao và điều kiện nuôi cấy tương đối đơn giản.

Nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng prodigiosin có tiềm năng lớn trong điều trị ung thư. Hợp chất này có khả năng ức chế đối với nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau, bao gồm cả các dòng tế bào đã kháng thuốc, trong khi ít gây

ảnh hưởng đối với tế bào bình thường. Cơ chế tác động của hợp chất này được cho là liên quan đến việc kích hoạt quá trình apoptosis, gây rối loạn chu kỳ tế bào, làm tổn thương DNA và thay đổi cân bằng pH nội bào (pHi). Một nghiên cứu từ Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ ghi nhận prodigiosin có tác dụng chống ung thư mạnh đối với gần 60 loại tế bào ung thư khác nhau, bao gồm cả tế bào ung thư gan và ít gây độc tính trên tế bào bình thường [1]. Những kết quả này cho thấy prodigiosin có tiềm năng lớn trong ứng dụng và phát triển các phương pháp điều trị ung thư mới trong tương lai.

Tại Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về prodigiosin thu nhận từ vi khuẩn *Serratia marcescens*. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở mức khảo sát ban đầu, chưa đi sâu vào đánh giá cơ chế tác động cũng như hiệu quả trên các mô hình tế bào ung thư cụ thể. Trên cơ sở nghiên cứu đã tạo được một số chủng vi khuẩn tái tổ hợp sinh tổng hợp prodigiosin, trong đó có prodigiosin thu nhận từ dịch lên men chủng vi khuẩn *S. marcescens* sp. HVQY-IGR mang gen mã hoá protein PigC tái tổ hợp. Prodigiosin thu nhận cần được đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh, di cư và xâm lấn trên một số dòng tế bào ung thư và mô hình tế bào nhằm định hướng tạo sản phẩm có hoạt tính kháng tế bào ung thư.

Từ những cơ sở trên, em tiến hành nghiên cứu đề tài: “*Nghiên cứu khả năng ức chế tế bào ung thư tăng sinh, di cư và xâm lấn in vitro của prodigiosin từ chủng Serratia sp. HVQY-IGR tái tổ hợp*”.

Mục tiêu của đề tài :

- Nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư để đánh giá hoạt tính của prodigiosin từ vi khuẩn tái tổ hợp.
- Đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của prodigiosin từ vi khuẩn tái tổ hợp trên mô hình dòng tế bào ung thư in vitro.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

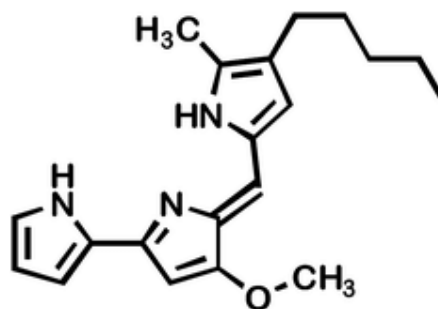
1.1. PRODIGIOSIN

1.1.1. Đặc điểm cấu tạo

Prodigiosin (PG) là một alkaloid chuyển hóa thứ cấp với cấu trúc hóa học tripyrrole độc đáo. Phân tử PG gồm ba vòng pyrrole tạo thành khung pyrrolylpyrromethane, hai trong số các vòng liên kết trực tiếp với nhau và vòng thứ ba được liên kết bằng cầu nối metan (nhóm methoxy C-4), công thức hóa học $C_{20}H_{25}N_3O$. Khối lượng phân tử khoảng 323.44 Da [2, 3]. Cấu tạo hóa học của prodigiosin mang các nhóm chức cụ thể giúp nó thực hiện chức năng sinh học:

- Nhóm methoxy ($-OCH_3$): gắn trên một vòng pyrrole làm tăng tính kỵ nước của prodigiosin và ảnh hưởng đến độ ổn định không gian của phân tử. Nhóm này giúp prodigiosin dễ hòa tan trong các dung môi hữu cơ, cải thiện khả năng gắn vào màng lipid và ty thể, ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học thông qua điều chỉnh ái lực với protein đích [4].

- Chuỗi pentyl ($-C_5H_{11}$): gắn trên vòng C, làm tăng tính kỵ nước. Đặc điểm này cho phép prodigiosin dễ dàng chèn vào lớp phospholipid kép của màng tế bào, tăng thời gian lưu của phân tử trong màng sinh học, hỗ trợ khả năng xuyên màng và tích tụ trong ty thể [5].



Hình 1.1. Cấu trúc của prodigiosin [6].

PG thuộc nhóm hợp chất pyrrolypyrromethene, còn được gọi chung là prodigionine [7]. Các hợp chất trong nhóm này có thể được phân loại thành bốn nhóm cấu trúc chính dựa trên đặc điểm của các nhóm thế và sự hình thành vòng trong phân tử. Nhóm thứ nhất bao gồm các prodigiosin mạch thẳng, trong đó các nhóm thế chủ yếu là alkyl không phân nhánh. Ví dụ điển hình là prodigiosin với

nhóm methyl tại vị trí C-2 và một nhóm thế tại vị trí C-3 của vòng pyrrole C, hoặc undecylprodigiosin với chuỗi bên undecyl gắn tại vị trí C-2. Ba nhóm còn lại là các dẫn xuất có cấu trúc vòng, được hình thành từ sự liên kết nội phân tử giữa các vị trí khác nhau trên khung pyrrole. Cụ thể, butylmetacycloheptylprodigiosin có vòng được tạo thành giữa vị trí C-2 và C-4 trong vòng pyrrole C. Trong khi đó, cycloprodiginine có vòng nối giữa vị trí C-3 và C-4 của vòng pyrrole C, đồng thời mang nhóm methyl tại vị trí C-2. Đối với cyclononylprodigiosin, đây là một dạng prodiginine có cấu trúc vòng lớn (macrocycle), với cầu nối hình thành giữa vị trí C-2 của vòng pyrrole C và vị trí C-10 của vòng pyrrole A, bảng 1.1 [8]. Sự đa dạng về cấu trúc này góp phần tạo nên sự phong phú trong hoạt tính sinh học của các hợp chất thuộc nhóm prodiginine.

Bảng 1.1: Một số ví dụ về Prodiginine [8]

Prodiginine	Khối lượng phân tử	Vi khuẩn sản xuất
Prodigiosin	323.4	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Vibrio gazogenes</i>
Cycloprodigiosin	321.4	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>
Undecylprodigiosin	393.6	<i>Streptomyces coelicolor</i>
2-(<i>p</i> -Hydroxybenzyl) prodigiosin	429.6	<i>P. rubra</i>
Heptylprodigiosin	351.5	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>
Metacycloprodigiosin	391.5	<i>S. coelicolor</i>
Butyl-meta-cycloheptylprodiginine	391.5	<i>S. coelicolor</i> , chủng <i>Streptomyces</i> sp. MC11024
Nonylprodigiosin	363.5	Tổng hợp hóa học
Roseophilin	452.2	<i>Streptomyces griseoviridis</i> 2464-S5
Obatoclax	317.4	Tổng hợp hóa học

1.1.2. Tính chất, đặc điểm của prodigiosin

1.1.2.1. Đặc điểm chung chung

- Độ tan trong dung môi hữu cơ: Prodigiosin là một hợp chất có tính kỵ nước tương đối cao do cấu trúc chứa hệ vòng pyrrole liên hợp và chuỗi alkyl. Vì vậy, PG

tan tốt trong nhiều dung môi hữu cơ như ethanol, methanol, chloroform, dichloromethane và dimethyl sulfoxide (DMSO), nhưng tan rất kém trong nước [9].

- Ảnh hưởng của pH, ánh sáng và nhiệt độ: Độ ổn định của prodigiosin chịu tác động đáng kể bởi các yếu tố môi trường:

+ pH: Prodigiosin là phân tử có khả năng nhận và cho proton nhờ các nhóm pyrrole, do đó khá nhạy với sự thay đổi pH của môi trường. Ở điều kiện acid nhẹ, PG tương đối ổn định, trong khi ở pH kiềm, cấu trúc có thể bị biến đổi, làm giảm hoạt tính sinh học [10].

+ Ánh sáng: PG dễ bị phân hủy dưới ánh sáng, đặc biệt là tia UV, do hệ liên hợp π dễ bị kích thích và phá vỡ. Hiện tượng này dẫn đến giảm cường độ màu và suy giảm hoạt tính sinh học của hợp chất [4].

+ Nhiệt độ: Nhiệt độ cao có thể làm tăng tốc độ phân hủy của prodigiosin, đặc biệt trong môi trường có oxy. Ngược lại, bảo quản ở nhiệt độ thấp (4°C hoặc -20°C) giúp duy trì độ ổn định của hợp chất trong thời gian dài [11].

Ngoài ra, các yếu tố như oxy và các tác nhân oxy hóa cũng có thể ảnh hưởng đến độ bền của prodigiosin thông qua các phản ứng oxy hóa làm biến đổi cấu trúc phân tử.

1.1.2.2. Đặc điểm của chủng *Serratia sp. HVQY-IGR* tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC

Serratia sp. HVQY là chủng vi khuẩn được phân lập và lưu giữ tại Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, có khả năng phát triển tốt trên các môi trường dinh dưỡng thông thường và có khả năng sinh tổng hợp prodigiosin. Để nâng cao hiệu suất sản xuất prodigiosin, các nghiên cứu cải biến di truyền đã được thực hiện nhằm tăng cường biểu hiện các gen tham gia con đường sinh tổng hợp sắc tố. Trên cơ sở đó, chủng *Serratia sp. HVQY-IGR* tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC đã được tạo ra và sử dụng làm nguồn sản xuất prodigiosin trong nghiên cứu này.

Quá trình sinh tổng hợp prodigiosin ở các chủng *Serratia* được điều khiển bởi cụm gen pig (pig cluster), bao gồm nhiều gen tham gia vào quá trình tạo thành các tiền chất trung gian cũng như xúc tác các phản ứng tạo thành sản phẩm cuối cùng. Trong số đó, gen pigC giữ vai trò đặc biệt quan trọng do mã hóa enzyme PigC – enzyme xúc tác bước cuối cùng của con đường sinh tổng hợp prodigiosin. Enzyme PigC sử dụng ATP để xúc tác phản ứng ngưng tụ giữa hai tiền chất là 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carbaldehyde (MBC) và 2-methyl-3-amyl-pyrrole (MAP), tạo

thành phân tử prodigiosin hoàn chỉnh. Đây được xem là bước quyết định trong quá trình hình thành sắc tố đỏ đặc trưng của vi khuẩn.

Do PigC là enzyme tham gia trực tiếp vào phản ứng tạo thành prodigiosin nên mức độ biểu hiện của gen pigC có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất sinh tổng hợp sắc tố. Việc tạo chủng tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC nhằm tăng cường lượng enzyme PigC được tạo thành trong tế bào, qua đó thúc đẩy quá trình chuyển hóa các tiền chất thành prodigiosin và nâng cao sản lượng sắc tố thu được. So với các chủng tự nhiên, chủng tái tổ hợp thường cho khả năng sản xuất prodigiosin ổn định hơn, giảm sự phụ thuộc vào các yếu tố môi trường và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thu nhận hoạt chất phục vụ nghiên cứu.

Ngoài ý nghĩa trong việc nâng cao hiệu suất sản xuất prodigiosin, việc sử dụng chủng tái tổ hợp còn góp phần làm rõ mối liên hệ giữa các gen chức năng trong cụm gen pig với khả năng tổng hợp sắc tố của vi khuẩn. Đây là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu về công nghệ sinh học vi sinh vật, đặc biệt trong định hướng phát triển các hệ thống sản xuất prodigiosin có năng suất cao phục vụ lĩnh vực dược phẩm và y sinh học. Những tiến bộ trong công nghệ ADN tái tổ hợp cho phép tối ưu hóa quá trình biểu hiện các gen mục tiêu, từ đó tạo ra các chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp các hợp chất sinh học với hiệu suất vượt trội so với chủng tự nhiên.

Chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC được lựa chọn trong nghiên cứu này nhằm bảo đảm nguồn prodigiosin có độ ổn định và hàm lượng phù hợp cho các thí nghiệm đánh giá hoạt tính sinh học. Prodigiosin thu nhận từ chủng tái tổ hợp được sử dụng để khảo sát khả năng ức chế tăng sinh, di cư và xâm lấn của các dòng tế bào ung thư người. Việc sử dụng nguồn prodigiosin được sản xuất từ chủng tái tổ hợp không chỉ góp phần nâng cao độ tin cậy của kết quả thực nghiệm mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng các chủng vi sinh vật cải biến di truyền trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học phục vụ nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ung thư trong tương lai.

1.1.3. Nguồn cung cấp prodigiosin

1.1.3.1. Từ chủng vi sinh vật tự nhiên

Prodigiosin là một chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc tự nhiên, được tổng hợp bởi nhiều loài vi khuẩn khác nhau bao gồm *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Serratia rubidaea*, *Vibrio psychroerythrus*, *Alteromonas rubra*, *Vibrio gazogenes*, *Rugamonas rubra*, vi khuẩn Gram dương như *Streptovorticillium rubroreticuli* và *Streptomyces longisporus ruber* [12]. Sự phân bố rộng rãi của các vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp prodigiosin cho thấy

đây là một hợp chất phổ biến trong tự nhiên và có tiềm năng khai thác trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong nghiên cứu y sinh.

Trong các vi khuẩn sản xuất PG, *S. marcescens* là loài được nghiên cứu nhiều nhất, được biết đến là một loại vi khuẩn gram âm, hình que, thuộc họ *Enterobacteriaceae*, nổi bật với khả năng tạo ra sắc tố màu đỏ được gọi là prodigiosin. Kể từ đầu thế kỷ XX, *S. marcescens* đã được dùng như mô hình để nghiên cứu trong các thí nghiệm về sự lan truyền vi sinh vật do đặc tính dễ nhận biết nhờ sắc tố và được xem như một saprophyte ít gây hại trong những nghiên cứu ban đầu.

Tuy nhiên, khả năng sinh tổng hợp prodigiosin của *S. marcescens* không phải lúc nào cũng ổn định. Các chủng được phân lập từ bệnh phẩm người trưởng thành thường không biểu hiện khả năng tạo sắc tố, trong khi prodigiosin chỉ được sản xuất ở một số điều kiện nuôi cấy nhất định, đặc biệt là trong môi trường hiếu khí. Mức độ tổng hợp PG có sự biến thiên đáng kể tùy thuộc vào nhiều yếu tố như đặc điểm chủng, điều kiện nuôi cấy và thời gian sinh trưởng [12]. Ngoài ra, *S. marcescens* khác biệt với các vi khuẩn gram âm khác bởi khả năng thực hiện quá trình thủy phân casein, cho phép chúng tạo ra các metalloproteinase ngoại bào được cho là hoạt động trong các tương tác giữa chất nền ngoại bào.

1.1.3.2. Từ vi sinh vật biến đổi di truyền

Việc ứng dụng vi sinh vật biến đổi di truyền trong sản xuất hợp chất thứ cấp đang là một hướng tiếp cận được quan tâm rộng rãi và chứng minh mang lại nhiều ưu điểm vượt trội. Cách tiếp cận này không chỉ cho phép thiết kế và tái cấu trúc các con đường sinh tổng hợp mới, mà còn góp phần tối ưu hóa hiệu suất tạo sản phẩm thông qua kiểm soát biểu hiện gen và điều kiện nuôi cấy [13].

Trong nghiên cứu về sinh tổng hợp prodigiosin, những công trình tiên phong đã được thực hiện từ khá sớm. Năm 1984, Steven A. Dauenhauer và cộng sự đã thực hiện các nghiên cứu tiên phong về tách dòng các gen liên quan đến quá trình tổng hợp prodigiosin từ *Serratia marcescens* và biểu hiện chúng trên *Escherichia coli*. Cụ thể, các gen này được phân lập từ chủng tự nhiên, sau đó gắn vào vector cosmid pHCT9 và chuyển vào *E. coli* để biểu hiện. Kết quả của nghiên cứu đã đặt nền tảng quan trọng cho việc khai thác và sản xuất prodigiosin thông qua công nghệ DNA tái tổ hợp.

Trong những năm gần đây, *Pseudomonas putida* KT2440 nổi lên như một vật chủ tiềm năng cho quá trình sản xuất các hợp chất tự nhiên, bao gồm cả prodigiosin. Trước hết, đây là chủng vi khuẩn Gram âm không gây bệnh, đã được công nhận an

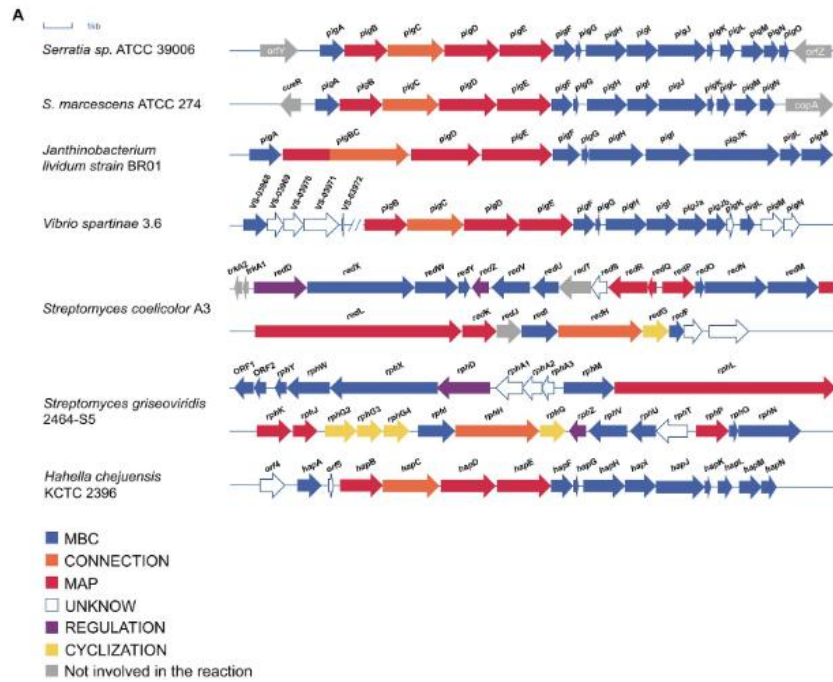
toàn (GRAS – Generally Recognized as Safe) bởi Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA), đồng thời bộ gen của nó đã được giải trình tự hoàn chỉnh. Nhờ đó, *P. putida* KT2440 được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu và sản xuất sinh học ở quy mô công nghiệp [14]. Bên cạnh đó, vi khuẩn này có chứa một Phosphopantetheinyl transferase (PPTase). Enzyme này cần thiết cho biểu hiện chức năng của PKS/NRPS (Polyketide Synthases/Nonribosomal Peptides Synthetases – enzyme tổng hợp polyketide/Tổng hợp peptit độc lập với ribosom) trong quá trình tổng hợp PG. Ngoài ra, với hàm lượng GC tương đối cao (khoảng 61.5%) và mức độ tương đồng di truyền với cụm gen Pig của *S. marcescens*, *P. putida* KT2440 tạo điều kiện thuận lợi giúp cho quá trình biểu hiện protein chính xác và hiệu quả [13].

1.1.3.3. Tổng hợp prodigiosin

Quá trình sinh tổng hợp PG lần đầu tiên được mô tả vào năm 1966 và được chứng minh có nguồn gốc liên quan chặt chẽ đến quá trình chuyển hóa các axit amin [15]. Các nghiên cứu ban đầu cho thấy sắc tố này được tổng hợp bằng sự kết hợp của 2 con đường. Cụ thể, hai tiền chất chính là monopyrrole (MAP) và bipyrrrole (MBC) được tổng hợp độc lập, sau đó trải qua quá trình ngưng tụ để tạo thành cấu trúc hoàn chỉnh của prodigiosin [9].

- Các gen chịu trách nhiệm tổng hợp PG:

Về mặt di truyền, hệ thống gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PG đã được nghiên cứu và làm sáng tỏ qua nhiều công trình khác nhau. Năm 2004, Harris và cộng sự đã tiến hành tách dòng, giải trình tự và biểu hiện các vi sinh vật có khả năng sản xuất PG trong vật chủ khác loài, bao gồm *S. marcescens* ATCC 274 (Sma274) và *Serratia* sp. ATCC 39006 (S39006) [17]. Sau đó, *Hahella chejuensis* KCTC 2396 và *Janthinobacterium lividum* chủng BR01 (JliBR01) lần lượt được giải trình tự bộ gen vào năm 2006 và 2010, góp phần mở rộng kiến thức về sự đa dạng di truyền của con đường sinh tổng hợp hợp chất này. Đến năm 2020, thông qua nghiên cứu hệ gen, một nhánh mới của con đường sinh tổng hợp PG đã được phát hiện ở vi khuẩn biển *Vibrio spartinae* 3.6. Nhìn chung, các vi sinh vật có thể sản xuất prodigiosin được mô tả ở trên đều chứa 13–15 gen liên quan đến sinh tổng hợp PG, trong khi hai loài *Streptomyces*, *Streptomyces coelicolor* A3 và *Streptomyces griseoviridis* 2464-S5, có các cụm gen tương đồng phức tạp hơn [16].



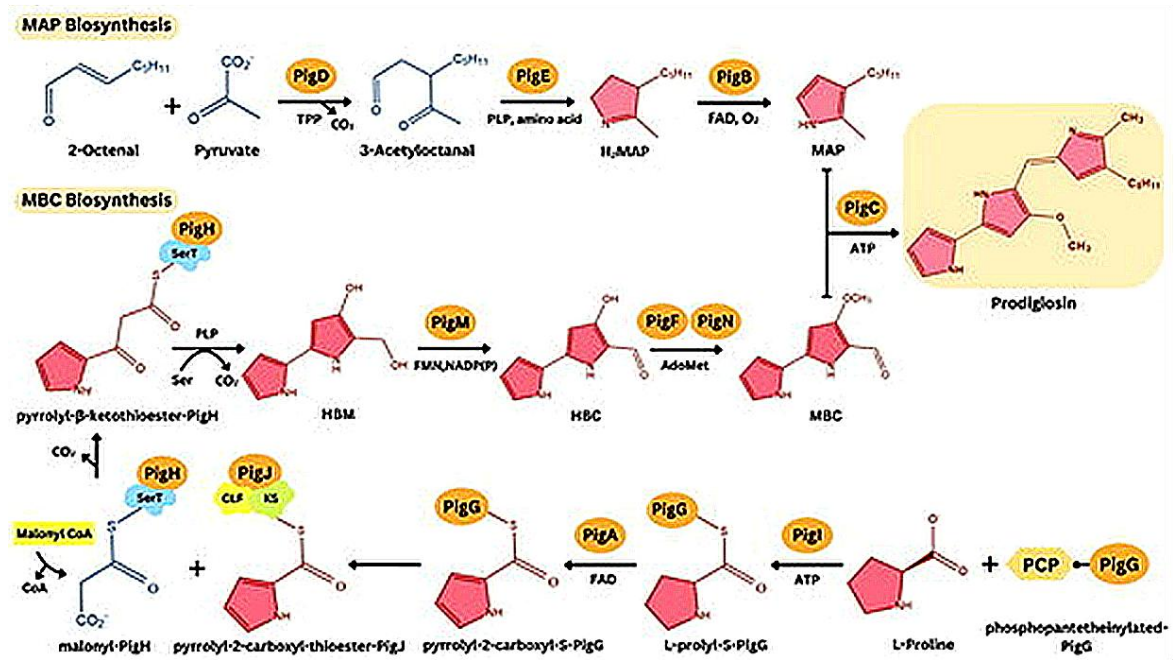
Hình 1.2. Các cụm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp PG [16]

- Quá trình sinh tổng hợp Bipyrrole (MBC):

Con đường tổng hợp này có sự tham gia của 7 gen (*pigA*, *pigF-J*, *pigL* và *pigM*). Quá trình này bắt đầu từ acid amin proline, được chuyển hóa thành pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP dưới sự xúc tác của các enzyme tương ứng như RedM, RedO và RedW. Sau đó, trung gian pyrrole-2-carboxyl-S-PCP được chuyển từ *PigG/RedO* sang vị trí cysteine hoạt động của *PigJ/RedX*, tạo thành pyrrole-2-carboxyl thioester. Tiếp theo, nhóm malonyl tham gia phản ứng khử carboxyl, dẫn đến quá trình ngưng tụ với pyrrole-2-carboxyl thioester, hình thành pyrrolyl- β -ketothioester liên kết với *PigH*. Enzyme *PigH* sau đó xúc tác phản ứng giữa serine và trung gian này để tạo thành hợp chất 4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-methanol (HBM). HBM tiếp tục được oxy hóa bởi *PigM* để tạo thành 4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-carbaldehyde (HBC). Ở giai đoạn cuối, HBC trải qua phản ứng methyl hóa nhóm hydroxyl dưới tác động của methyltransferase *PigF*, cùng với sự tham gia của oxidoreductase *PigN*, để hoàn thiện cấu trúc MBC [18].

- Quá trình sinh tổng hợp monopyrrole (MAP):

Tiền chất ban đầu cho quá trình tổng hợp MAP là 2-octenal, được tạo ra trong quá trình sinh tổng hợp acid béo hoặc từ sự oxy hóa tự phát của các acid béo không bão hòa. Dưới tác động của enzyme *PigD*, 2-octenal được chuyển hóa thành 3-acetyloctanal kèm theo sự giải phóng CO₂. Sau đó, enzyme *PigE* xúc tác quá trình chuyển đổi 3-acetyloctanal thành dạng khử H₂MAP. Ở bước cuối, *PigB* thực hiện phản ứng oxy hóa hai electron để chuyển H₂MAP thành monopyrrole hoàn chỉnh (MAP) [6].



Hình 1.3: Quá trình tổng hợp PG [19].

- Quá trình ngưng tụ Monopyrrole (MAP) và Bipyrrrole (MBC):

Giai đoạn cuối cùng của con đường sinh tổng hợp PG là sự ngưng tụ giữa 2 tiền chất MAP với MBC để tạo thành các sắc tố tripyrrole của prodigiosin. Mặc dù phản ứng ngưng tụ này có thể xảy ra trong điều kiện pH thấp, trong hệ vi khuẩn, quá trình này được xúc tác đặc hiệu bởi enzyme PigC. Enzyme này sử dụng năng lượng từ ATP để thúc đẩy phản ứng ngưng tụ, từ đó hình thành prodigiosin hoàn chỉnh [6].

1.1.3.4. Thu nhận và tinh chế prodigiosin từ chủng *Serratia sp. HVQY-IGR* tái tổ hợp

Prodigiosin sử dụng trong nghiên cứu được thu nhận từ dịch nuôi cấy chủng *Serratia sp. HVQY-IGR* tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC. Sau khi nuôi cấy đạt sinh khối thích hợp, tế bào vi khuẩn được thu hồi bằng ly tâm và tiến hành chiết xuất sắc tố bằng dung môi hữu cơ. Do prodigiosin có tính tan tốt trong các dung môi hữu cơ như methanol, ethanol, acetone, chloroform hoặc ethyl acetate nên quá trình chiết tách thường được thực hiện bằng một trong các dung môi này nhằm thu nhận tối đa lượng sắc tố tạo thành.

Dịch chiết sau đó được cô đặc dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi và thu cao chiết chứa prodigiosin. Để nâng cao độ tinh sạch, sản phẩm tiếp tục được tinh chế bằng các phương pháp sắc ký như sắc ký cột silica gel, sắc ký pha đảo hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các phân đoạn chứa prodigiosin được xác định dựa

trên màu sắc đặc trưng, phổ hấp thụ UV-Vis với cực đại hấp thụ khoảng 535 nm và thời gian lưu đặc hiệu trên hệ thống HPLC.

Độ tinh sạch của prodigiosin thường được đánh giá bằng HPLC thông qua tỷ lệ diện tích pic của prodigiosin so với tổng diện tích các pic xuất hiện trên sắc ký đồ. Sản phẩm prodigiosin sử dụng cho các nghiên cứu hoạt tính sinh học thường đạt độ tinh sạch từ 90–95%, trong khi các nghiên cứu dược học và đánh giá tác dụng trên tế bào thường ưu tiên sử dụng prodigiosin có độ tinh sạch trên 95% nhằm hạn chế ảnh hưởng của các tạp chất đồng chiết.

Trong nghiên cứu này, prodigiosin thu nhận từ chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR tái tổ hợp được tinh chế bằng phương pháp sắc ký và kiểm tra độ tinh sạch bằng HPLC trước khi sử dụng cho các thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế tăng sinh, di cư và xâm lấn của tế bào ung thư in vitro. Việc sử dụng prodigiosin có độ tinh sạch cao giúp bảo đảm tính chính xác của kết quả thực nghiệm và hạn chế sai số do các hợp chất khác có trong dịch chiết vi sinh vật.

1.1.4. Hoạt tính sinh học của prodigiosin

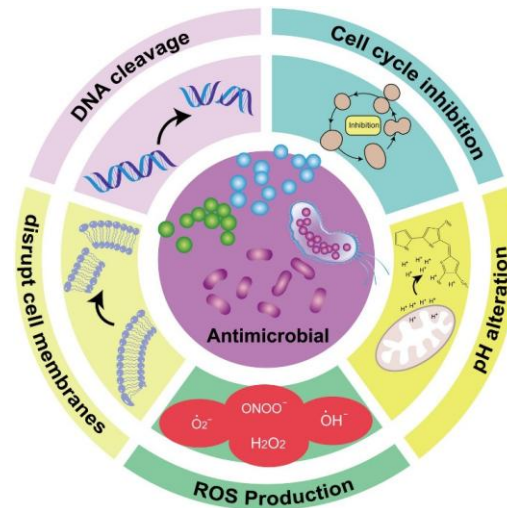
Prodigiosin đã được ghi nhận là một hợp chất sinh học có phổ hoạt tính sinh học đa dạng, bao gồm khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, ức chế miễn dịch và đặc biệt là tác dụng ức chế nhiều dòng tế bào ung thư, kể cả các dòng có hiện tượng kháng thuốc như MDR1, BCRP hoặc MRP2. Ngoài ra, prodigiosin cũng thể hiện hiệu quả trên dòng tế bào bạch cầu tủy mạn tính K562 ở người, trong khi mức độ gây độc đối với tế bào bình thường tương đối thấp [1].

1.1.4.1. Hoạt tính kháng khuẩn

Prodigiosin được đánh giá là một tác nhân kháng khuẩn đầy tiềm năng trong lĩnh vực y sinh học và công nghệ sinh học, đồng thời tham gia vào việc điều hòa cấu trúc và cân bằng của hệ vi sinh vật [20]. Mặc dù vai trò sinh học của PG trong các vi sinh vật sản xuất vẫn chưa được làm rõ hoàn toàn nhưng nó đã được chứng minh khả năng vận chuyển điện tử cao. Cơ chế tác động của prodigiosin liên quan đến khả năng vận chuyển ion H^+/Cl^- , thông qua việc gắn kết và di chuyển ion chloride qua màng, từ đó làm thay đổi cân bằng pH nội bào của vi khuẩn [15]. Sự rối loạn pH này có thể tác động trực tiếp đến hoạt động enzyme và các quá trình chuyển hóa thiết yếu, dẫn đến ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào vi khuẩn.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng prodigiosin có phổ kháng khuẩn tương đối rộng, tác động lên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế thường mạnh hơn đối với vi khuẩn Gram dương, điển hình như

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus avium* và *Streptococcus pyogenes*. Trong khi đó, các vi khuẩn Gram âm như *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* vẫn có khả năng bị ức chế nhưng mức độ thường thấp hơn [20, 21].



Hình 1.4: Sơ đồ cơ chế kháng khuẩn của PG [22]

1.1.4.2. Hoạt tính kháng nấm

Năm 1949, Lack và cộng sự lần đầu tiên nhận thấy prodigiosin có khả năng ức chế đối với sự phát triển của *Coccidioides immitis in vitro* có hiệu quả ở một liều lượng PG nhất định. Trên cơ sở đó, hợp chất đã được đưa vào thử nghiệm lâm sàng trên 14 bệnh nhân mắc bệnh do *Coccidioides immitis* trong thời gian theo dõi kéo dài 4 năm. Trong đó có 5 bệnh nhân ở giai đoạn bệnh nặng, tiên lượng xấu ngay từ khi bắt đầu điều trị, và đã tử vong trong quá trình nghiên cứu. Tuy nhiên, các trường hợp này đã góp phần giúp xác định đường đưa thuốc hiệu quả vào cơ thể là tiêm qua đường tĩnh mạch. Còn đối với 9 bệnh nhân còn lại, kết quả cho thấy 3 người hồi phục hoàn toàn, 3 người có dấu hiệu cải thiện tình trạng bệnh và 3 bệnh nhân không có phản ứng với thuốc. Đáng chú ý, các xét nghiệm sinh hóa không phát hiện dấu hiệu tổn thương chức năng gan và thận, cho thấy prodigiosin có mức độ an toàn tương đối trong điều kiện nghiên cứu [23]. Bên cạnh hoạt tính kháng nấm đối với *Coccidioides immitis*, prodigiosin còn thể hiện khả năng ức chế nhiều vi sinh vật nhân chuẩn khác... cũng như các động vật nguyên sinh ký sinh như *Plasmodium spp.* và *Trypanosoma spp.*. Những đặc tính này cho thấy tiềm năng ứng dụng rộng rãi của prodigiosin trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi sinh vật gây ra.

1.1.4.3. *Ức chế ký sinh trùng*

Những nghiên cứu đầu tiên về tác dụng *in vitro* của prodigiosin trên *Trypanosoma cruzi* đã được ghi nhận từ hơn 65 năm khi hợp chất này được chứng minh có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của ký sinh trùng *in vitro* ở nồng độ thấp, khoảng 3 μm . Tiếp nối các nghiên cứu ban đầu, Azambuja và cộng sự (2004) đã khảo sát sự tương tác giữa *Trypanosoma cruzi* và sinh vật sản xuất prodigiosin, *Serratia marcescens*, qua đó làm rõ vai trò của hợp chất này trong kiểm soát ký sinh trùng. Ngoài ra, tác dụng của PG trong việc điều trị bệnh Chagas đã được phát hiện. Genes và cộng sự (2011) chứng minh prodigiosin có thể kích hoạt quá trình chết theo chương trình (apoptosis) ở *Trypanosoma cruzi* thông qua cơ chế làm rối loạn chức năng ty thể. Không chỉ dừng lại ở *T. cruzi*, prodigiosin còn thể hiện hoạt tính mạnh với ký sinh trùng sốt rét thuộc chi *Plasmodium*, với hiệu quả được ghi nhận trong cả điều kiện *in vitro* và *in vivo* [2]. Tác dụng chống sốt rét của prodigiosin tự nhiên và tổng hợp. Các nghiên cứu dựa trên mô hình định lượng mối quan hệ cấu trúc - hoạt tính sinh học (mô hình QSAR) đã làm rõ hoạt động chống lại *Plasmodium falciparum* chủng D6 (ký sinh trùng sốt rét) của PG. Đáng chú ý, Patil và cộng sự (2011) đã phát hiện prodigiosin có khả năng ức chế sự phát triển của bọ gậy – giai đoạn ấu trùng của các loài muỗi truyền bệnh như *Aedes aegypti* và *Anopheles stephensi*. Điều này cho thấy prodigiosin không chỉ có tiềm năng trong điều trị bệnh mà còn có thể được ứng dụng trong kiểm soát vector truyền bệnh. Ngoài ra, các dẫn xuất prodigiosin được tổng hợp với các nhóm thế alkyl hoặc aryl cũng cho thấy khả năng làm giảm đáng kể mật độ *Plasmodium falciparum* trong các mô hình động vật, đồng thời không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe vật chủ. Những kết quả trên khẳng định tiềm năng ứng dụng rộng rãi của prodigiosin trong cả lĩnh vực điều trị và phòng chống các bệnh ký sinh trùng [2].

1.1.4.4. *Hoạt tính kháng virus*

PG thể hiện hoạt tính kháng virus đáng kể đối với nhiều loại virus khác nhau, bao gồm *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), virus herpes simplex (HSV) và SARS-CoV-2. Cơ chế nền tảng của tác dụng kháng virus này liên quan đến tác động chọn lọc lên các tế bào bị nhiễm virus, ức chế quá trình phiên mã gen và can thiệp vào các quá trình sao chép của virus [24].

Các nghiên cứu *in vitro* đã chỉ ra rằng PG có khả năng tiêu diệt một cách có chọn lọc các tế bào bị nhiễm virus BmNPV, đồng thời làm giảm đáng kể sự nhân lên của virus ở giai đoạn sớm. Hiệu quả này đạt được thông qua việc ức chế phiên mã gen của virus và ngăn cản quá trình hòa màng do virus trung gian, một bước quan trọng trong quá trình virus xâm nhập vào tế bào chủ. Khả năng của PG trong

việc gây độc tính chọn lọc đối với tế bào nhiễm virus mà vẫn bảo tồn các tế bào khỏe mạnh làm nổi bật tiềm năng ứng dụng của hợp chất này trong phát triển các liệu pháp kháng virus [25].

PG cũng được chứng minh có khả năng ức chế đối với Enterovirus 71, cho thấy tiềm năng của PG như một tác nhân kháng virus đối với tác nhân gây bệnh này. Ngoài ra, khả năng can thiệp vào quá trình tổng hợp RNA trên virus của PG đã được ghi nhận, càng củng cố vai trò của PG như một tác nhân kháng virus mạnh [25].

1.1.4.5. Ức chế miễn dịch

Hoạt tính điều hòa miễn dịch của prodigiosin (PG) lần đầu tiên được ghi nhận trong các nghiên cứu của Nakamura và cộng sự. Trong công trình này, các tác giả phát hiện prodigiosin và metacycloprodigiosin được tiết ra trong môi trường nuôi cấy của *Serratia*, đồng thời ghi nhận khả năng ức chế chọn lọc sự tăng sinh của tế bào T so với tế bào B. Ngoài prodigiosin, một số dẫn xuất và hợp chất tương tự như undecylprodigiosin, cPrG, MAMPDM, nonylprodigiosin cũng như các chất tổng hợp như PNU156804, cPrG.HCl và MAMPDM đều cho thấy tác dụng ức chế miễn dịch đáng kể. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy prodigiosin có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào lympho T trong nhiều điều kiện kích thích khác nhau. Cụ thể, PG làm giảm sự tăng sinh của tế bào lách chuột khi được hoạt hóa bởi các tác nhân như concanavalin A, kháng thể anti-CD3/anti-CD28 hoặc các chất hoạt hóa không phụ thuộc thụ thể như phorbol myristate acetate và ionomycin. Điều này cho thấy prodigiosin có thể tác động lên cả hai con đường hoạt hóa tế bào T, bao gồm con đường phụ thuộc thụ thể và không phụ thuộc thụ thể [21].

PG đã được chứng minh là ức chế bệnh ghép chống chủ mà không có dấu hiệu độc tính được thử nghiệm trong các mô hình chuột [21]. Cụ thể, PG ức chế chọn lọc sự tăng sinh tế bào T đồng thời làm giảm biểu hiện chuỗi α của thụ thể interleukin-2 (IL-2R α), dẫn đến sự gián đoạn trực tiếp hiệu IL-2 / IL-2R. Đó là một phần của quy trình kích hoạt tế bào T phụ thuộc. PG còn ức chế quá trình biệt hóa tế bào T thành tế bào T hỗ trợ tiết ra interferon và IL-4 cũng như tế bào lympho T gây độc biểu hiện perforin [26]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu *in vivo* cho thấy prodigiosin hoạt động phối hợp với cyclosporine A hoặc FK 506, hiện đang là thuốc chủ yếu trong chế độ ức chế miễn dịch lâm sàng. Trong tương lai, PG có thể là một chất ức chế miễn dịch đầy hứa hẹn để điều trị các bệnh tự miễn.

1.1.4.6. Chống tảo nở hoa

Hiện tượng tảo nở hoa độc hại (HABs) được xem là một trong những vấn đề môi trường nghiêm trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến hệ sinh thái thủy sinh, sinh vật biển và sức khỏe con người do các độc tố mà chúng sản sinh. Các đợt nở hoa này được thúc đẩy bởi sự dư thừa dinh dưỡng, có thể dẫn đến suy giảm oxy khiến cá chết hàng loạt và làm gián đoạn chuỗi thức ăn ở môi trường biển. HABs còn tác động đến lĩnh vực kinh tế bao gồm thiệt hại trong ngành thủy sản và du lịch do phải đóng cửa bãi biển và các vấn đề về suy giảm chất lượng nước. Vì vậy, việc triển khai các chiến lược giám sát và quản lý hiệu quả là hết sức cần thiết nhằm hạn chế những hậu quả tiêu cực do hiện tượng này gây ra.

PG đã được ghi nhận có khả năng kiểm soát nhiều loài tảo khác nhau mà không gây ảnh hưởng đến các sinh vật khác. Cơ chế tác động của PG liên quan đến việc thúc đẩy hình thành các loại oxy phản ứng (ROS) và gây peroxy hóa lipid, đồng thời ức chế chu trình tế bào của các loài tảo gây hại. Cách tiếp cận có tính chọn lọc này khiến PG trở thành một giải pháp khả thi và hiệu quả trong việc giảm thiểu HABs [27].

1.1.4.7. Ức chế tế bào ung thư

Prodigiosin có khả năng cảm ứng quá trình apoptosis trên nhiều loại tế bào ung thư khác nhau. Đáng chú ý, tác dụng này mang tính chọn lọc cao đối với tế bào ác tính, không phụ thuộc vào tình trạng p53 cũng như hiện tượng kháng đa thuốc, từ đó làm nổi bật tiềm năng của prodigiosin như một tác nhân điều trị ung thư triển vọng. Hiểu cơ chế hoạt động của PG là điều cần thiết để phát triển thuốc. Các nghiên cứu cho thấy prodigiosin có thể điều hòa nhiều con đường tín hiệu quan trọng liên quan đến sự sống còn của tế bào. Cụ thể, hợp chất này có khả năng ức chế con đường Wnt/ β -catenin trong tế bào ung thư vú, đồng thời khôi phục hoạt động phiên mã phụ thuộc p53 ở các tế bào ung thư đại trực tràng thiếu hụt p53 [28]. Tác dụng gây apoptosis của prodigiosin đã được ghi nhận trên nhiều mô hình khác nhau, bao gồm các dòng tế bào ung thư tạo máu, tế bào ung thư dạ dày, ung thư gan và ung thư đại trực tràng, cả trong điều kiện nuôi cấy và trên mô hình xenograft. Đặc biệt, hợp chất này không gây độc tính đáng kể đối với tế bào bình thường. PG nhanh chóng và có khả năng kích hoạt apoptosis trong các dòng tế bào ung thư tạo máu, tế bào ung thư đại trực tràng, dạ dày và không có độc tính rõ rệt đối với các dòng tế bào bình thường. PG cũng kích hoạt sự tái tổ chức của tế bào actin và có thể thúc đẩy sự phân hủy của các vi chất actin, liên quan đến cơ chế chết tế bào [29]. Hơn nữa, prodigiosin có ít độc tính hơn nhiều so với các thuốc chống ung thư khác,

nhưng cần nghiên cứu thêm trước khi sử dụng làm thuốc điều trị lâm sàng. Mặc dù các cơ chế phân tử của hoạt tính gây độc tế bào của PG với tế bào ung thư vẫn chưa được tìm hiểu rõ nhưng các nghiên cứu đã chỉ ra PG có bốn cơ chế gây apoptosis bao gồm phân cắt DNA, điều chỉnh protein kinase được hoạt hóa bằng mitogen, điều chỉnh pH và ức chế chu kỳ tế bào [28].

Các nghiên cứu đã cho thấy PG thể hiện hoạt tính chống ung thư thông qua việc điều biến các con đường truyền tín hiệu quan trọng. Đặc biệt PG có hiệu quả ức chế tế bào khối u và gây apoptosis tế bào [28]. Apoptosis là một cơ chế chết của tế bào trong đó các tế bào tích cực tham gia vào quá trình phá hủy của chính chúng. Quá trình này đặc trưng bởi hình thái và sinh hóa/phân tử. Các tế bào trải qua quá trình apoptosis sẽ co lại và mất các liên kết giữa các tế bào bình thường, sau đó biểu hiện sự ngưng tụ tế bào chất, nhiễm sắc thể và DNA nội bào bị phân mảnh. Trong giai đoạn cuối, các tế bào trở thành nhiều mảnh nhỏ và được loại bỏ bởi đại thực bào [30]. Apoptosis có thể được xảy ra theo con đường nội bào hoặc con đường ngoại bào/thụ thể chết. Hai con đường này đều có sự tham gia của enzyme cysteine protease, được gọi là caspase.

Trong con đường ngoại bào, thụ thể chết (như CD95, FAS, APO-1) và kích hoạt phức hợp tín hiệu gây tử vong (DISC) hoặc thông qua các thụ thể TNF- α /TRAIL và phối tử của phức hệ FAS với thụ thể qua các thụ thể CD95, FAS, APO-1 và kích hoạt phức hợp tín hiệu gây tử vong (DISC) hoặc thông qua các thụ thể TNF- α /TRAIL và phối tử của chúng. Kích hoạt apoptosis được gây ra bởi tín hiệu này kích hoạt enzyme caspase khởi phát (initiator caspase), dẫn đến việc giải phóng cytochrome C ra khỏi ty thể và hình thành apoptosome. Trong bước cuối cùng, các caspase hiệu ứng (executioner/effector-caspases – protease đặc hiệu cysteinyl aspartate) làm suy giảm các chất nền tế bào như lamin (sợi trung gian trong màng nhân) hoặc actin (cytoskeleton) và do đó dẫn đến chết tế bào. Ngoài ra, deoxyribonuclease (CAD) kích hoạt caspase, giúp tách DNA nội bào thành các mảnh nhỏ, đặc trưng cho apoptosis. Hai con đường trên không được coi là hoàn toàn tách biệt vì việc kích hoạt con đường ngoại bào thông qua các chất trung gian nội bào [31].

Trong tế bào, PG có thể khởi phát quá trình apoptosis thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm:

- Con đường axit hóa nội bào:

Prodigiosin hoạt động như một chất vận chuyển anion, có khả năng liên kết giữa các ion như Cl^- và HCO_3^- để tạo thành phức chất lipophilic. Hợp chất này làm rối loạn hoạt động của V-ATPase và điều hòa kênh H^+/Cl^- , dẫn đến giảm pH nội

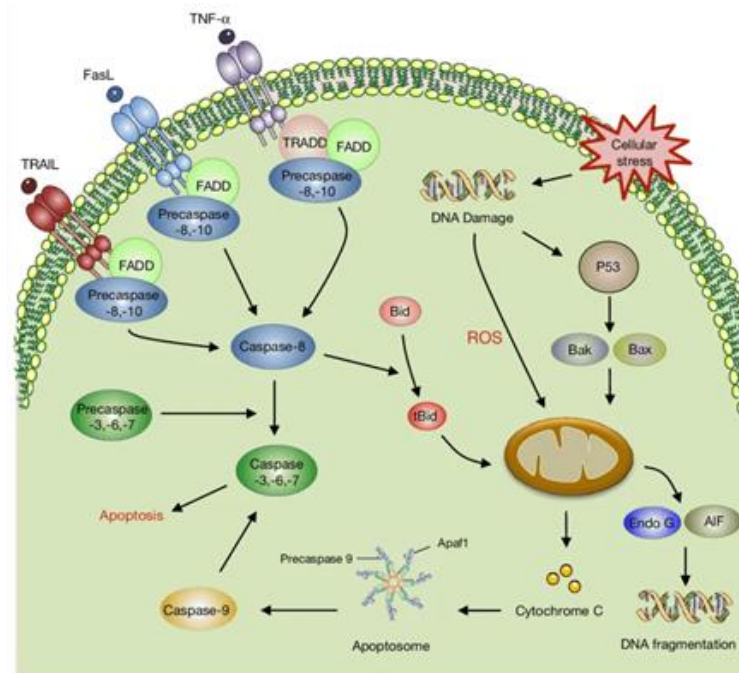
bào tại các bào quan như lysosome, endosome và golgi. Do tế bào ung thư thường có pH nội bào cao hơn bình thường, sự axit hóa này góp phần thúc đẩy quá trình chết theo chương trình apoptosis [32].

- Con đường ức chế chu kỳ tế bào:

Prodigiosin có khả năng gây dừng chu kỳ tế bào, đặc biệt tại điểm kiểm soát G1/S. Cơ chế này liên quan đến sự điều hòa các protein quan trọng như cyclin E, CDK2 và CDK4, từ đó làm gián đoạn quá trình phát triển của tế bào ung thư [21].

- Con đường phân tách DNA:

Prodigiosin có thể gây đứt gãy DNA sợi kép thông qua việc tạo phức với các ion kim loại (đặc biệt là Cu^{2+}), thúc đẩy phản ứng oxy hóa. Ngoài ra, hợp chất này có khả năng xâm nhập vào trong nhân tế bào, liên kết trực tiếp với DNA thông qua cơ chế xen kẽ và ức chế enzyme topoisomerase I. Sự tổn thương DNA kích hoạt các cơ chế đáp ứng như dừng chu kỳ tế bào, sửa chữa DNA hoặc cảm ứng apoptosis [34]. Những phát hiện này có thể giải thích tác dụng của PG đối với các protein điều hòa chu kỳ tế bào và cảm ứng apoptosis đã giải thích ở trên.



Hình 1.5: Các con đường cảm ứng apoptosis [33]

- Con đường kích hoạt các caspase:

Theo Sam và Pourpak (2017), tác dụng chống ung thư của prodigiosin liên quan đến các cơ chế khác nhau, gồm cảm ứng apoptosis phụ thuộc và không phụ thuộc caspase, điều hòa các con đường protein kinase và gây dừng chu kỳ tế bào. Trong đó, kích hoạt hệ caspase được xem là một cơ chế then chốt. Các nghiên cứu đã cho thấy prodigiosin có nguồn gốc từ *Serratia marcescens* có khả năng làm tăng

hoạt tính của caspase-3 trong các dòng tế bào ung thư bạch cầu [35]. Họ caspases là trung gian chính của quá trình apoptosis các tế bào ung thư, và apoptosis được bắt đầu bằng cách kích hoạt một tập hợp các protease cysteine gây chết được gọi là caspase. Bên cạnh đó, các protein thuộc họ IAPs (X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP), chất ức chế tế bào của apoptosis 1 và 2 (cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2 - cIAP 1 và cIAP 2) đại diện cho một họ các chất ức chế caspase nội sinh và cũng đóng vai trò quan trọng gây apoptosis của tế bào ung thư.

Đối với prodigiosin, đáp ứng apoptotic chủ yếu được kích hoạt thông qua con đường nội sinh liên quan đến ty thể. Cụ thể, sự giải phóng cytochrome C từ ty thể vào bào tương dẫn đến hoạt hóa procaspase-9, sau đó kích hoạt các caspase hiệu ứng, đặc biệt là caspase-3, từ đó thúc đẩy quá trình apoptosis. Trong cơ chế này, caspase-8 thường tham gia vào con đường ngoại sinh, caspase-9 thuộc con đường nội sinh, còn caspase-3 đóng vai trò trung tâm trong giai đoạn thực thi. Ngoài ra, prodigiosin còn thúc đẩy sự phân cắt của PARP – một dấu hiệu điển hình của apoptosis tế bào [28].

- Ảnh hưởng của PG đến các yếu tố gây apoptosis:

Các nghiên cứu đã chứng minh PG có tác động đến các chất ức chế protein apoptosis (inhibitors apoptosis protein – IAP) có liên quan đến các cơ chế kháng apoptosis trong các tế bào ung thư khác nhau. Các nghiên cứu đến nay ghi nhận sáu chất đã được tìm thấy trong họ IAP ở người, bao gồm XIAP, cIAP1, cIAP2, survivin, NIAP và BRUCE. Các chất ức chế protein apoptosis (IAP) ban đầu được đặc trưng bởi khả năng liên kết trực tiếp và ức chế các caspase apoptotic. Nghiên cứu về cơ chế ức chế apoptosis do IAP gây ra cho thấy IAP đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình ức chế apoptosis bằng cách ức chế hoạt động của họ caspase, như caspase-3, caspase-7 và caspase-9, nhưng không có tác dụng đối với hoạt động của caspase-1, caspase-6 và caspase-8. Trong đó, họ Bcl-2 có chức năng chống lại apoptotic thông qua tương tác với một số lượng lớn protein. Trong mô hình nghiên cứu PG trên dòng tế bào JEG3 và PC3, Dan Li và cộng sự (2018) đã xác nhận rằng prodigiosin thúc đẩy quá trình apoptosis thông qua việc điều chỉnh làm tăng lượng caspase-3, caspase-9, Bax, P53, AIF, biểu hiện protein PARP và làm giảm biểu hiện protein Bcl-2, XIAP và cIAP1 & cIAP2 [28].

Mặc dù cơ chế PG gây apoptosis không hoàn toàn phụ thuộc vào p53 nhưng PG vẫn có khả năng điều hòa biểu hiện của wt-p53 và protein survivin (thuộc họ IAP) trong mô hình bệnh ung bạch cầu cấp tính (ALL) ở dòng tế bào Molt-4 [35]. Tác dụng sinh học quan trọng nhất của protein p53 là kiểm soát chu kỳ tế bào, làm

dừng pha G1 khi phát hiện tổn thương DNA hoặc sự tổn hại khác có thể hủy hoại hoặc giết chết tế bào. Khi DNA hoặc nhiễm sắc thể bị tổn thương nghiêm trọng, p53 có thể kích hoạt các nhân tố và hóa trị [28]. Sau khi cho tiếp xúc với PG sau 6 giờ, sự gia tăng lượng protein p53 trong các tế bào Molt-4 cao hơn so với nhóm đối chứng, ức chế sự chuyển giai đoạn giữa G1, lượng protein survivin thấp cùng với lượng p53 tích lũy cao có liên quan đến mức độ hoạt hóa caspase-3 và tỉ lệ apoptosis xảy ra cao hơn. Điều này cho thấy PG có lợi thế hơn so với các loại thuốc trị liệu khác cản chức năng của p53 để hoạt hóa các dụng gây độc tế bào [35].

Bên cạnh đó, PG còn điều hòa các protein kiểm soát chu kỳ tế bào. Nhiều nghiên cứu chỉ ra hợp chất này làm tăng biểu hiện của p21 (CDKN1A) – một chất ức chế kinase phụ thuộc cyclin. Sự tăng biểu hiện p21 dẫn đến hiện tượng dừng chu kỳ tế bào, đặc biệt ở pha G1, từ đó ngăn cản quá trình tăng sinh của tế bào ung thư. Đáng chú ý, cơ chế này có thể xảy ra độc lập với p53, điều này có ý nghĩa lớn vì nhiều loại ung thư có đột biến hoặc mất chức năng p53 [36].

Ngoài tác động lên chu kỳ tế bào, prodigiosin còn ảnh hưởng mạnh đến quá trình chuyển hóa năng lượng. Cụ thể, PG có thể làm giảm khả năng hấp thu glucose của tế bào thông qua tương tác với protein vận chuyển GLUT1. Khi thiếu hụt năng lượng, tế bào rơi vào trạng thái “đói năng lượng”, làm tăng tính nhạy cảm với các tín hiệu gây chết. Đây là một cơ chế quan trọng vì tế bào ung thư thường phụ thuộc nhiều vào chuyển hóa glucose (hiệu ứng Warburg) [36].

Prodigiosin cũng can thiệp vào nhiều con đường tín hiệu nội bào liên quan đến tăng sinh và sống sót của tế bào. Một trong số đó là con đường Wnt/ β -catenin – con đường đóng vai trò quan trọng trong điều hòa sự phát triển, biệt hóa và di cư tế bào. PG có khả năng ức chế con đường này thông qua việc cản trở quá trình phosphoryl hóa của các protein như DVL2 và LRP6, đồng thời hoạt hóa GSK3 β . Kết quả là làm giảm biểu hiện của các gen mục tiêu như cyclin D1, từ đó ức chế tăng sinh và thúc đẩy apoptosis [36, 37].

Một cơ chế quan trọng khác của PG là tác động trực tiếp lên DNA. Hợp chất này có thể xen kẽ vào cấu trúc xoắn kép của DNA, từ đó ức chế hoạt động của enzyme topoisomerase I và II – những enzyme cần thiết cho quá trình sao chép và tháo xoắn DNA. Việc ức chế các enzyme này dẫn đến đứt gãy DNA và cản trở quá trình phân chia tế bào. Đồng thời, PG còn làm giảm biểu hiện của RAD51 – một protein quan trọng trong sửa chữa DNA bằng tái tổ hợp tương đồng. Điều này khiến tế bào ung thư không thể phục hồi tổn thương DNA và dễ đi vào apoptosis [39].

PG cũng ảnh hưởng đến con đường mTOR – một con đường trung tâm điều hòa tăng trưởng, chuyển hóa và sống sót của tế bào. Việc ức chế mTOR, thông qua giảm phosphoryl hóa AKT, dẫn đến giảm tăng sinh và tăng apoptosis. Trong một số nghiên cứu, PG khi kết hợp với các phương pháp điều trị khác còn làm gia tăng hiệu quả ức chế mTOR và thúc đẩy chết tế bào mạnh hơn [40].

1.1.4.8. Ảnh hưởng của prodigiosin đến di cư và xâm lấn tế bào ung thư

- Tác động của PG lên bộ xương tế bào:

Bộ xương tế bào (cytoskeleton) gồm các thành phần chính như vi sợi actin (actin filaments) và vi ống (microtubules), đóng vai trò then chốt trong việc duy trì hình thái tế bào, sự bám dính và khả năng di chuyển. Trong tế bào ung thư, sự tái tổ chức của actin và microtubule là yếu tố then chốt giúp hình thành các cấu trúc như lamellipodia và filopodia, từ đó thúc đẩy quá trình di cư.

Prodigiosin đã được ghi nhận có khả năng ảnh hưởng lên hệ cytoskeleton thông qua việc làm rối loạn quá trình trùng hợp và phân bố của actin. Sự phá vỡ mạng lưới actin làm giảm khả năng hình thành các cấu trúc di động ở rìa tế bào, từ đó ức chế khả năng di chuyển. Đồng thời, prodigiosin cũng có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của vi ống, làm gián đoạn quá trình vận chuyển nội bào và phân chia tế bào [4].

- Sự tái cấu trúc hình thái tế bào:

Dưới tác động của prodigiosin, tế bào ung thư thường xuất hiện những thay đổi hình thái rõ rệt như co rút, mất bám dính, giảm diện tích bám và xuất hiện các mảnh vỡ tế bào. Những biến đổi này phản ánh sự rối loạn cấu trúc cytoskeleton và là dấu hiệu đặc trưng của quá trình apoptosis hoặc stress nội bào.

Trong các thí nghiệm *in vitro*, đặc biệt là khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược, các tế bào xử lý bằng prodigiosin thường mất hình dạng kéo dài đặc trưng và trở nên tròn hơn, kèm theo sự giảm mật độ tế bào bám dính. Điều này phù hợp với kết quả giảm khả năng di cư quan sát trong các mô hình scratch assay [11].

- Vai trò của RhoA và các metalloproteinase (MMPs):

RhoA là một protein thuộc họ Rho GTPases, là yếu tố quan trọng trong việc điều hòa động học của cytoskeleton, đặc biệt liên quan đến sự hình thành stress fibers và lực co tế bào. Thông qua việc điều chỉnh sự trùng hợp actin và tương tác với myosin, RhoA kiểm soát khả năng bám dính và xâm lấn của tế bào ung thư.

Các nghiên cứu cho thấy prodigiosin có thể làm thay đổi hoạt tính của RhoA, từ đó làm giảm sự hình thành các cấu trúc actin cần thiết cho di cư. Việc ức chế tín hiệu RhoA dẫn đến giảm khả năng bám dính và di chuyển của tế bào, góp phần hạn chế quá trình xâm lấn [4].

- MMP-2, MMP-9 và phân giải chất nền ngoại bào

Metalloproteinase (MMPs), đặc biệt là MMP-2 và MMP-9, đóng vai trò chủ yếu trong quá trình xâm lấn và di căn thông qua việc phân giải các thành phần của chất nền ngoại bào (ECM), như collagen và gelatin. Sự tăng biểu hiện của các enzyme này thường liên quan đến khả năng di căn cao của tế bào ung thư [41].

Prodigiosin được ghi nhận có thể làm giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của MMP-2 và MMP-9, từ đó hạn chế khả năng phân giải ECM của tế bào ung thư. Điều này góp phần làm giảm khả năng xâm lấn qua màng đáy và mô liên kết.

1.1.5. Ứng dụng của prodigiosin

1.1.5.1. Ứng dụng làm mỹ phẩm

Suryawanshi và các cộng sự đã chỉ ra rằng prodigiosin có tiềm năng ứng dụng như một hoạt chất chống nắng. Prodigiosin có thể làm tăng các yếu tố chống nắng (SPF) của các loại kem chống nắng thương mại. Prodigiosin được sử dụng như một chất hỗ trợ cùng chiết xuất từ lá lô hội và *Cucumis sativus* (dưa chuột) có tác dụng bảo quản trong các sản phẩm chống nắng. Vì vậy, PG có tiềm năng là thành phần cho một loạt sản phẩm mới và đại diện cho một mô hình mới cho các loại kem chống nắng sử dụng các hợp chất có nguồn gốc từ vi sinh vật [21].

Hiện nay, chất tạo màu tổng hợp vẫn phổ biến hơn so với các chất tạo màu tự nhiên do chúng thể hiện độ ổn định cao và cung cấp dải màu sắc đa dạng. Sắc tố vi khuẩn có thể được xem như chất bảo vệ chống tia UV, thông qua việc ức chế sự phát triển của vi sinh vật, giúp hạn chế mùi khó chịu, kéo dài thời gian bảo quản và sử dụng của sản phẩm mỹ phẩm. Mỹ phẩm thường chứa lipid hoặc các hợp chất ưa lipid, do đó tính ưa lipid của PG khiến sắc tố vi khuẩn này trở nên phù hợp cho ứng dụng trong ngành công nghiệp mỹ phẩm [24].

1.1.5.2. Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

Shahla Namazkar và cộng sự (2013) đã tiến hành nghiên cứu PG với ứng dụng làm một chất tạo màu tiềm năng bằng cách sử dụng phương pháp sấy phun - do tính chất của prodigiosin là một sắc tố tự nhiên màu đỏ trong *Serratia marcescens* với một vài hạn chế bao gồm độ nhạy cảm cao, không tan trong nước, và độ ổn định ngắn khi cho tiếp xúc với ánh sáng, pH và nhiệt độ cao.

Để bảo toàn được những hoạt tính sinh học quý giá và tăng khả năng hòa tan trong nước của PG, các tác giả đã áp dụng phương pháp sấy phun. Phương pháp được thực hiện thông qua các kỹ thuật như đóng gói – một kỹ thuật bảo quản các chất bằng cách đưa chúng vào vật liệu phủ [42]. Do đó, PG được đóng gói dưới dạng bột khô có sử dụng maltodextrin và kappa-carrageenan làm chất phủ. Để làm được điều này cần tối ưu hóa các thông số sấy khô dựa trên năng suất đóng gói (EY), độ ẩm, kích thước hạt, cường độ màu của prodigiosin [43].

1.1.5.3. Ứng dụng làm chất chống bám bẩn sinh học

Hiện nay, vấn đề bám bẩn sinh học trong môi trường biển (ví dụ như hà bám) đã trở thành một trở ngại lớn đối với các ngành công nghiệp hàng hải. Các chất chống hà truyền thống chứa kim loại nặng, gây ra hệ lụy nghiêm trọng tới môi trường. Trước những lo ngại này, nhu cầu phát triển các biện pháp chống hà thân thiện với môi trường ngày càng được quan tâm. Hoạt tính chống tạo màng sinh học (anti-biofilm) của PG liên quan đến ức chế sản xuất pyocyanin và polysaccharide ngoại bào *in vitro*, cùng với tính kỵ nước của PG, cho phép phát triển các lớp phủ chống hà có khả năng chống rửa trôi trong nước biển [44].

1.1.5.4. Ứng dụng làm chất nhuộm

Ngành dệt may là một trong những ngành công nghiệp đang phát triển mạnh mẽ trên toàn cầu. Ngành dệt may sử dụng một lượng lớn thuốc nhuộm tổng hợp, do đó nước thải dệt thường rất khó xử lý và thải bỏ, gây ra ảnh hưởng đáng kể lên môi trường và đã trở thành một vấn đề rất nghiêm trọng [45]. Do đó, các sắc tố tự nhiên đang được quan tâm chú ý bởi tính an toàn cao và không gây ô nhiễm môi trường. Alihosseini và cộng sự đã gợi ý có thể sử dụng prodigiosin sắc tố màu đỏ tươi từ *Vibrio* spp. để nhuộm nhiều loại vật liệu bao gồm len, nylon, acrylic và lụa. Ngoài ra, các loại vải nhuộm cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* trong thời gian tiếp xúc 16 giờ [46].

1.1.5.5. Ứng dụng trong pin mặt trời nhạy quang và đánh dấu nhiên liệu

Trong những năm gần đây, các sắc tố do vi khuẩn tạo ra ngày càng được quan tâm với sự phát triển của pin nhiên liệu vi sinh và gần đây là pin mặt trời nhạy quang (DSSCs). PG có khả năng tương tác với ion kim loại để hình thành các hợp chất phối trí, cho phép truyền electron từ trạng thái kích thích quang học của PG sang dải dẫn của các oxit kim loại, từ đó tạo ra dòng điện. Cơ chế này tương tự như ở nhiều sắc tố tự nhiên khác, khiến PG trở thành một lựa chọn phù hợp tự nhiên cho DSSCs [47].

Đánh dấu nhiên liệu là việc tích hợp một chất nhận dạng đặc hiệu (marker) với lượng nhỏ vào các sản phẩm dầu mỡ tại kho phân phối trước khi đưa ra thị trường, nhằm hỗ trợ phát hiện các hành vi làm giả, pha trộn và buôn lậu nhiên liệu. Trong các dung môi không phân cực, phổ quang học của PG cũng sẽ có hình dạng khác nhau. Đặc điểm này đã được khai thác để xây dựng phương pháp đánh dấu các sản phẩm dầu mỡ [48].

1.1.5.6. Ứng dụng của PG trong việc điều trị ung thư

Ung thư hiện là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới và hiện nay thuốc có nguồn gốc tổng hợp là lựa chọn duy nhất cho hóa trị ung thư. Tuy nhiên, hầu hết các loại thuốc tổng hợp không chỉ tiêu diệt tế bào khối u mà còn tiêu diệt cả tế bào bình thường, đồng thời gây ra nhiều tác dụng phụ nghiêm trọng. Các loại thuốc chống ung thư tự nhiên có nguồn gốc từ các sinh vật đã được chứng minh là có tác dụng hơn trong điều trị ung thư [49]. Trong đó, prodigiosin được nghiên cứu và phát triển trong 50 năm vì ban đầu nó được xác định là thuốc chống ung thư với các đặc điểm rõ ràng [28]. Lịch sử của PG và ung thư bắt đầu vào năm 1891 với các nghiên cứu của William B. Coley và vắc-xin mà ông đã phát minh ra. Tiến sĩ Coley đã kết hợp môi trường nuôi cấy của *Streptococcus* sp. và *Bacillus prodigiosus* (bây giờ được gọi là *S. marcescens*), và sau đó khử trùng chúng bằng nhiệt hoặc lọc. Hỗn hợp được gọi là độc tố Coley, một liệu pháp miễn dịch sớm cho các khối u có nguồn gốc trung bì với kết quả khả quan [50]. Cho đến nay, PG đã được thử nghiệm ức chế hơn 60 loại tế bào ung thư với nồng độ ức chế trung bình là 2.1 M [21].

Năm 2006, Anita Khanafari và cộng sự đã chứng minh prodigiosin tạo ra từ *S. marcescens* 2170 trong môi trường nuôi cấy cảm ứng apoptosis trên 4 dòng tế bào ung thư (HL-60, Jurkat, NSO và Ramos) nhưng không ảnh hưởng đến các tế bào bình thường (NIH-3T3 và MDCK). Hơn nữa, prodigiosin có hoạt tính giống nhau trên các dòng ung thư khác SW-620, DLD-1 và HGT-1 (tất cả đều có nguồn gốc từ hệ tiêu hóa) và điều này chứng minh rằng prodigiosin có tiềm năng trở thành một chất chống ung thư mới [6]. Hong và cộng sự (2014) đã chỉ ra rằng PG tác dụng có chọn lọc lên tế bào ung thư mà không gây tổn hại đáng kể đến tế bào bình thường ở nồng độ thấp 100nm – 1µm [51]. Những quan sát này phù hợp với nghiên cứu trước đây được thực hiện bởi Montaner cho thấy PG chỉ gây apoptosis ở các tế bào ung thư tạo máu nhưng không tác dụng lên các tế bào bình thường. PG cũng được chứng minh là hoạt động độc lập trên các tế bào ung thư biểu hiện protein biểu hiện protein vận chuyển đa kháng thuốc [52].

Một điểm đáng chú ý là PG có thể tác động lên trực tiếp tín hiệu p53/p73. Cụ thể, hợp chất này có khả năng phá vỡ tương tác giữa p53 đột biến và p73, từ đó phục hồi con đường tín hiệu liên quan đến apoptosis ở các tế bào ung thư như SW480. Do các tế bào ung thư chứa nhiều loại đột biến p53, các đột biến p53 này có thể tương tác với p73 và ức chế sự hoạt hóa p53. Điều thú vị là PG có khả năng phá vỡ sự tương tác p53/p73 đột biến, kết quả này cho thấy PG có thể được ứng dụng để điều trị ung thư bất kể tình trạng của p53 [51]. Trong khi đó khả năng kháng ung thư đối với hóa trị liệu có thể do số lượng p53 cao đột biến làm suy yếu quá trình apoptosis phụ thuộc p53. Nhiều tác nhân chống ung thư như doxorubicine, etoposide or 5-fluorouracil gây apoptosis thông qua con đường phụ thuộc p53. Do đó, việc xác định các tác nhân hóa trị liệu như PG hoạt động độc lập với con đường p53 có tầm quan trọng lớn và PG có lợi thế hơn các thuốc hóa trị liệu khác [53]. Cơ chế gây apoptosis của PG thông qua 4 con đường khác nhau, điều chỉnh pH nội bào, kích hoạt các caspase, phân tách DNA, ức chế chu kỳ tế bào. Trong nghiên cứu của Dan Li và cộng sự (2018) trên các dòng tế bào JEG3 và PC3, PG đã được chứng minh làm tăng biểu hiện của các yếu tố thúc đẩy apoptosis như caspase-3, caspase-9, Bax, p53, AIF và PARP, đồng thời làm giảm biểu hiện của các protein chống apoptosis như Bcl-2, XIAP, cIAP1 và cIAP2, và quá trình hoạt hóa caspase-9 và caspase-3 kèm theo sự phân giải protein của poly (ADP-ribose)-polymerase. Sự biểu hiện của P53 và Bax/Bcl-2 trong tế bào JEG3 và PC3 cao hơn nhiều so với nhóm đối chứng (nhóm không được tiếp xúc PG). Các tác giả đã xác nhận rằng prodigiosin thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư thông qua việc điều chỉnh tăng caspase-3, caspase-9, Bax, P53, AIF, biểu hiện protein PARP và điều chỉnh giảm biểu hiện protein Bcl-2, XIAP và cIAP1 & cIAP2. Do đó, có thể kết luận rằng prodigiosin HDZK-BYSB107 có thể được coi là một loại thuốc chống ung thư không độc hại trong tương lai gần [28].

Những bằng chứng này là một lợi thế của PG so với các thuốc hóa trị liệu cần đến chức năng của p53 để kích thích tác dụng gây độc tế bào.

1.2. BỆNH UNG THƯ

1.2.1. Khái niệm và đặc điểm

Ung thư là nhóm bệnh lý đặc trưng bởi sự tăng sinh mất kiểm soát của tế bào, dẫn đến hình thành các khối tế bào bất thường có khả năng xâm lấn mô xung quanh hoặc lan rộng đến những cơ quan ở xa thông qua quá trình di căn [54]. Tuy nhiên, không phải mọi khối u đều có bản chất ác tính, nhiều khối u lành chỉ phát triển khu trú và không xâm nhập vào các mô lân cận. Hiện nay, đã ghi nhận hơn

100 loại ung thư khác nhau có thể ảnh hưởng đến con người. Khác với tế bào bình thường, tế bào ung thư sở hữu nhiều đặc tính đặc trưng, trong đó nổi bật là khả năng tăng sinh không giới hạn, xâm lấn mô và di căn. Bên cạnh đó, chúng còn có thể né tránh các cơ chế kiểm soát nội tại của cơ thể, bao gồm tín hiệu ức chế phân bào và quá trình apoptosis – vốn có chức năng loại bỏ các tế bào tổn thương hoặc không còn cần thiết. Một đặc điểm đáng chú ý khác là khả năng “trốn tránh” sự giám sát của hệ miễn dịch. Trong điều kiện sinh lý bình thường, hệ miễn dịch có thể nhận diện và tiêu diệt các tế bào bất thường, nhưng tế bào ung thư có thể phát triển các cơ chế giúp chúng không bị phát hiện và tiêu diệt [55].

1.2.1.1. Cơ chế giúp tế bào ung thư thoát khỏi quá trình apoptosis

Trong tế bào bình thường, tồn tại nhiều hệ thống giám sát nhằm phát hiện các tổn thương DNA hoặc rối loạn chuyển hóa, từ đó kích hoạt các đáp ứng bảo vệ phù hợp. Một trong những thành phần then chốt là gen ức chế khối u TP53, mã hóa protein p53 – được ví như “người bảo vệ bộ gen” do vai trò kiểm soát chu kỳ tế bào và khởi phát apoptosis khi có tổn thương nghiêm trọng. Một trong những gen bị đột biến phổ biến nhất trong ung thư (khoảng 50% trường hợp) là TP53, khiến p53 trở thành một mục tiêu quan trọng trong nghiên cứu và điều trị. Tuy nhiên, tế bào ung thư có thể phát triển nhiều chiến lược để né tránh apoptosis ngay cả khi các tín hiệu gây chết đã được kích hoạt. Những thay đổi này bao gồm: đột biến hoặc bất hoạt các gen mã hóa thụ thể chết như CD95/Fas; bất hoạt gen thông qua methyl hóa vùng promoter; tăng biểu hiện các protein chống apoptosis như Bcl-2, FLIP và các protein thuộc họ IAP (ví dụ survivin); hoặc làm suy giảm chức năng của các yếu tố tiền apoptosis như Bax. Ngoài ra, một giả thuyết được đề xuất là “phản công của khối u” (tumor counterattack), theo đó tế bào ung thư có thể gây chết ngược lại các tế bào miễn dịch, đặc biệt là tế bào lympho T gây độc CD8⁺. Cơ chế này liên quan đến việc tăng biểu hiện phối tử CD95 (Fas ligand) trên bề mặt tế bào ung thư, từ đó kích hoạt apoptosis ở các tế bào miễn dịch tấn công khối u [31].

1.2.1.2. Sự tăng sinh, xâm lấn và di căn tế bào ung thư

Trong phần lớn các trường hợp, nguyên nhân trực tiếp dẫn đến tử vong do ung thư không phải là khối u nguyên phát mà là các tổn thương thứ phát hình thành sau quá trình di căn. Để đạt được khả năng xâm lấn và lan rộng, tế bào ung thư phải trải qua hàng loạt biến đổi sâu sắc về kiểu hình và sinh hóa khi chuyển từ trạng thái tế bào bình thường sang trạng thái ác tính. Những biến đổi này bao gồm rối loạn tín hiệu yếu tố tăng trưởng, thay đổi khả năng bám dính tế bào, biến đổi biểu hiện gen, cũng như sự biến đổi về hình thái và khả năng di động của tế bào [31].

Trong điều kiện sinh lý bình thường, tế bào chỉ tiến hành phân chia khi nhận được tín hiệu kích thích từ môi trường xung quanh, chủ yếu dưới dạng các yếu tố tăng trưởng. Ngược lại, tế bào ung thư có thể tăng sinh độc lập với các tín hiệu này. Không những vậy, chúng còn mất đi khả năng đáp ứng với các tín hiệu ức chế tăng trưởng từ ngoại bào. Ở mô lành, khi tế bào tăng sinh để tái tạo hoặc phát triển mô, chúng chịu sự kiểm soát bởi cơ chế “ức chế tiếp xúc”, trong đó sự tiếp xúc giữa các tế bào sẽ phát tín hiệu dừng phân chia nhằm duy trì cấu trúc và chức năng của mô. Tuy nhiên, ở tế bào ung thư, cơ chế này bị rối loạn, khiến chúng tiếp tục tăng sinh ngay cả khi đã đạt mật độ cao, từ đó dẫn đến sự xâm chiếm và phá hủy các mô xung quanh.

Xâm lấn là quá trình tế bào ung thư vượt qua các hàng rào sinh học như màng đáy và mô liên kết, đòi hỏi sự phối hợp của nhiều yếu tố bao gồm giảm kết dính tế bào, tăng khả năng di động và phân giải các thành phần của chất nền ngoại bào. Mặc dù cơ chế xâm lấn cũng có thể xuất hiện trong các hiện tượng sinh lý như phát triển mô hoặc lành vết thương, nhưng trong ung thư, nó diễn ra một cách mất kiểm soát và liên tục [56]. Các khối u chưa có khả năng xâm lấn thường được gọi là khối u tại chỗ (in situ).

Di căn là giai đoạn tiến triển tiếp theo, trong đó các tế bào ác tính rời khỏi khối u ban đầu (nguyên phát), xâm nhập vào hệ tuần hoàn máu hoặc bạch huyết, rồi lan đến các cơ quan xa và hình thành các khối u thứ phát. Quá trình này, còn gọi là “chuỗi di căn” (metastatic cascade), đóng vai trò then chốt trong việc xác định mức độ ác tính và tiên lượng của bệnh ung thư.

1.2.2. Thực trạng bệnh ung thư

Theo số liệu từ GLOBOCAN 2022 của Tổ chức Nghiên cứu Ung thư Quốc tế, mỗi năm trên toàn cầu ghi nhận khoảng 20 triệu ca ung thư mới và gần 9,7 triệu trường hợp tử vong do bệnh này, khoảng 53 triệu người đang sống trong vòng 5 năm sau chẩn đoán ung thư. Dự báo năm 2050 số ca ung thư sẽ tăng mạnh, khoảng 35 triệu trường hợp mắc mới mỗi năm, trong đó bệnh nhân phần lớn tập trung tại các quốc gia đang phát triển.

Tại Việt Nam, xu hướng gia tăng số ca ung thư cũng tương tự như nhiều quốc gia khác trên thế giới.

Theo số liệu thống kê của GLOBOCAN, số bệnh nhân mắc mới đã tăng đáng kể trong những thập kỷ gần đây, từ khoảng 68.000 ca vào năm 2000 lên đến 126.000 ca vào năm 2010. Đến năm 2022, con số này tiếp tục tăng lên khoảng 180.000, trong đó có 120.000 trường hợp tử vong. Các loại ung thư phổ biến nhất

tại Việt Nam năm 2022 bao gồm ung thư vú (24.563 ca, chiếm 13,6%), ung thư gan (24.502 ca, 13,5%), ung thư phổi (24.426 ca, 13,5%), ung thư đại trực tràng (16.835 ca, 9,3%) và ung thư dạ dày (16.277 ca, 9,0%). Đây cũng là những loại ung thư có tỷ lệ tử vong cao nhất trong cùng giai đoạn [57].

1.2.2.1. Ung thư phổi

Ung thư phổi hiện là một trong những bệnh ung thư phổ biến nhất trên thế giới. Mặc dù đứng thứ hai về số ca mắc mới (sau ung thư vú), đây lại là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trong các loại bệnh ung thư. Theo số liệu từ GLOBOCAN 2022, mỗi năm toàn cầu có khoảng 2,5 triệu bệnh nhân mắc mới và 1,8 triệu trường hợp tử vong do ung thư phổi, chiếm hơn 10% tổng số ca tử vong do ung thư. Tại Việt Nam, bệnh lý này cũng đang là gánh nặng lớn đối với hệ thống y tế với khoảng 26.262 ca mắc mới và 23.797 ca tử vong mỗi năm. Tỷ lệ tử vong so với số ca mắc lên tới khoảng 90,6%, phản ánh mức độ nguy hiểm và tiên lượng xấu của bệnh. Đáng chú ý, ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong do ung thư đứng hàng đầu ở cả hai giới.

Theo World Health Organization, cơ chế hình thành ung thư phổi chủ yếu liên quan đến sự tích lũy các tổn thương DNA trong tế bào biểu mô đường hô hấp. Các yếu tố nguy cơ có thể được chia thành hai nhóm chính: ngoại sinh và nội sinh. Trong đó, hút thuốc lá được xem là nguyên nhân chủ yếu, chiếm khoảng 90% các ca bệnh, bao gồm cả hút thuốc trực tiếp và tiếp xúc thụ động với khói thuốc. Ngoài thuốc lá, các yếu tố khác như ô nhiễm không khí, yếu tố di truyền, các đột biến gen (ví dụ EGFR, KRAS, TP53), cũng như nhiễm một số tác nhân sinh học như virus (HPV, EBV) hoặc vi khuẩn gây viêm mạn tính. Những yếu tố này có thể tác động riêng lẻ hoặc phối hợp, dẫn đến biến đổi di truyền và thúc đẩy quá trình sinh ung thư.

1.2.2.2. Ung thư thanh quản

Ung thư thanh quản là một loại ung thư phát sinh từ các tế bào của thanh quản – phần của đường hô hấp nằm phía trên khí quản và dưới họng. Phần lớn các trường hợp ung thư thanh quản thuộc ung thư biểu mô vảy (squamous cell carcinoma), phát sinh từ lớp niêm mạc phủ bên trong thanh quản. Trên toàn cầu, mỗi năm ước tính có khoảng 184.615 ca mắc mới được chẩn đoán ung thư thanh quản với gần 99.840 trường hợp tử vong, chiếm khoảng 1% tổng số ca tử vong do bệnh ung thư gây ra. Tỷ lệ mắc và tử vong của bệnh cao hơn rõ rệt ở nam giới so với nữ giới, đồng thời tăng dần theo tuổi, thường gặp ở nhóm trên 55 tuổi [58].

Các yếu tố nguy cơ chính của ung thư thanh quản bao gồm hút thuốc lá và sử dụng rượu bia kéo dài, bên cạnh đó, tiếp xúc nghề nghiệp và nhiễm virus cũng đóng vai trò đáng kể trong cơ chế bệnh sinh.

1.2.2.3. Ung thư gan

Ung thư gan là loại có tỷ lệ tử vong cao và phổ biến trên phạm vi toàn cầu. Theo thống kê từ GLOBOCAN 2022, mỗi năm có khoảng hơn 900.000 ca mắc mới và hơn 800.000 ca tử vong do ung thư gan, đưa bệnh này vào nhóm các ung thư gây tử vong hàng đầu. Tiên lượng của ung thư gan thường kém do thường được phát hiện ở giai đoạn muộn và tiến triển nhanh. Ở Việt Nam, ung thư gan là một trong những bệnh ung thư thường gặp nhất và cũng là tác nhân gây tử vong do ung thư đứng hàng đầu, đặc biệt ở nam giới. Tỷ lệ mắc và tử vong cao phản ánh gánh nặng bệnh tật lớn, liên quan chặt chẽ đến đặc điểm dịch tễ và các yếu tố nguy cơ phổ biến trong cộng đồng.

Theo World Health Organization, ung thư gan chủ yếu phát sinh từ sự tích lũy tổn thương DNA kéo dài trong tế bào gan, dẫn đến rối loạn kiểm soát tăng sinh và chuyển dạng ác tính. Các yếu tố nguy cơ của bệnh được chia thành hai nhóm chính là ngoại sinh và nội sinh. Trong đó, nguyên nhân quan trọng nhất là nhiễm virus viêm gan B (HBV) và viêm gan C (HCV) mạn tính, chiếm phần lớn các trường hợp ung thư gan trên toàn cầu. Ngoài ra, các yếu tố khác như gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), xơ gan do rượu, phơi nhiễm aflatoxin trong thực phẩm mốc, cũng như các rối loạn chuyển hóa và yếu tố di truyền đều góp phần làm tăng nguy cơ mắc bệnh.

Trong nghiên cứu này, ba dòng tế bào ung thư người gồm H460, Hep-2 và Hep3B được lựa chọn làm mô hình thực nghiệm để đánh giá khả năng ức chế tăng sinh, di cư và xâm lấn của prodigiosin thu nhận từ chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC.

Việc lựa chọn các dòng tế bào này được thực hiện dựa trên các tiêu chí về tính đại diện sinh học, khả năng nuôi cấy ổn định, mức độ phổ biến trong nghiên cứu ung thư học cũng như ý nghĩa lâm sàng của các loại ung thư tương ứng. Cả ba dòng tế bào đều là các dòng tế bào ung thư người đã được đặc trưng đầy đủ về đặc điểm hình thái, di truyền và sinh học phân tử, đồng thời được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống ung thư của các hợp chất tự nhiên và tổng hợp.

Ngoài việc đại diện cho ba loại ung thư phổ biến ở các cơ quan khác nhau, H460, Hep-2 và Hep3B còn có khả năng sinh trưởng ổn định trong điều kiện nuôi

cấy in vitro và phù hợp với các phương pháp đánh giá được sử dụng trong nghiên cứu như thử nghiệm MTT, thử nghiệm liền vết thương (scratch assay). Điều này giúp bảo đảm tính đồng nhất của mô hình thực nghiệm, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho việc so sánh tác động của prodigiosin trên các loại tế bào ung thư khác nhau.

Việc lựa chọn đồng thời ba dòng tế bào có nguồn gốc từ các mô khác nhau còn cho phép đánh giá phổ tác dụng chống ung thư của prodigiosin trên nhiều loại ung thư người. Kết quả thu được từ nghiên cứu không chỉ phản ánh hiệu quả của prodigiosin trên từng dòng tế bào riêng lẻ mà còn cung cấp cơ sở khoa học ban đầu cho việc định hướng nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng và tiềm năng ứng dụng của hợp chất này trong điều trị ung thư.

1.2.3. Các phương pháp điều trị ung thư

Hiện nay, điều trị ung thư đã có nhiều tiến bộ với sự đa dạng về phương pháp. Có thể chia thành 2 kiểu chính: phương pháp truyền thống (phẫu thuật, hóa trị, xạ trị) và phương pháp mới hiện đại (liệu pháp miễn dịch, liệu pháp hormone, tế bào gốc...).

1.2.3.1. Phẫu thuật

Phẫu thuật là một trong những phương pháp được áp dụng sớm và phổ biến nhất trong điều trị ung thư, với mục tiêu loại bỏ hoàn toàn khối u khỏi cơ thể. Khi ung thư được phát hiện ở giai đoạn đầu, khối u còn khu trú tại vị trí nguyên phát và chưa lan rộng, phẫu thuật có thể mang lại hiệu quả điều trị cao, thậm chí có khả năng chữa khỏi. Phương pháp này đặc biệt hiệu quả ở các giai đoạn sớm (I và II), với tỷ lệ thành công đáng kể. Ngoài vai trò điều trị chính, phẫu thuật còn được sử dụng kết hợp với các phương pháp khác như xạ trị hoặc hóa trị nhằm tối ưu hóa kết quả điều trị và giảm nguy cơ tái phát.

1.2.3.2. Xạ trị liệu

Xạ trị là phương pháp điều trị ung thư sử dụng các nguồn bức xạ năng lượng cao, chẳng hạn như tia X hoặc proton, nhằm phá hủy tế bào ung thư và thu nhỏ kích thước khối u. Phương pháp này thường được chỉ định trong các trường hợp khối u còn khu trú, không thể can thiệp bằng phẫu thuật, hoặc được sử dụng sau phẫu thuật để loại bỏ các tế bào ung thư còn sót lại, giúp giảm nguy cơ tái phát.

Mặc dù mang lại hiệu quả trong kiểm soát bệnh, xạ trị cũng có thể gây ra nhiều tác dụng không mong muốn. Một số biểu hiện thường gặp bao gồm rụng tóc,

tổn thương da và niêm mạc, cảm giác mệt mỏi kéo dài, thay đổi chức năng thần kinh, cũng như ảnh hưởng đến khả năng sinh sản.

1.2.3.3. Hóa trị liệu

Hóa trị là phương pháp điều trị ung thư dựa trên việc sử dụng một hoặc nhiều loại thuốc có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Đây là một trong những trụ cột quan trọng trong các phác đồ điều trị hiện nay. Tùy theo từng trường hợp, hóa trị có thể được sử dụng với mục tiêu điều trị triệt để, kiểm soát tiến triển bệnh hoặc kéo dài thời gian sống cho người bệnh.

Trong thực hành lâm sàng, hóa trị thường được kết hợp với các phương pháp khác như phẫu thuật, xạ trị hoặc các liệu pháp hỗ trợ nhằm nâng cao hiệu quả điều trị. Tuy nhiên, do cơ chế tác động không hoàn toàn chọn lọc, các thuốc hóa trị cũng ảnh hưởng đến những tế bào bình thường có tốc độ phân chia nhanh như tế bào tủy xương, niêm mạc đường tiêu hóa và nang tóc, từ đó gây ra nhiều tác dụng phụ đặc trưng.

1.2.3.4. Liệu pháp điều trị đích

Liệu pháp điều trị đích là một hướng tiếp cận hiện đại trong điều trị ung thư, sử dụng các tác nhân có khả năng tác động chọn lọc lên những phân tử, gen hoặc con đường tín hiệu đặc hiệu liên quan trực tiếp đến sự hình thành và phát triển của tế bào ung thư mà không dùng các phương pháp truyền thống khác. Các thuốc điều trị đích trúng đích thường có tác dụng ức chế thụ thể bề mặt tế bào, các protein truyền tín hiệu nội bào hoặc các yếu tố tham gia tân sinh mạch, từ đó làm giảm sự tăng sinh, thúc đẩy apoptosis và hạn chế khả năng di cư, xâm lấn của tế bào ung thư. So với các phương pháp hóa trị và xạ trị cổ điển, liệu pháp này có tính chọn lọc cao hơn, ít gây tổn thương mô lành, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này phụ thuộc vào đặc điểm sinh học phân tử của từng loại khối u. Ngoài ra, trong quá trình điều trị có thể xuất hiện hiện tượng kháng thuốc, làm giảm hiệu quả lâu dài. Bên cạnh đó, chi phí điều trị thường cao và đòi hỏi theo dõi trong thời gian dài để đạt được kết quả tối ưu.

1.2.3.5. Liệu pháp miễn dịch

Liệu pháp miễn dịch là một hướng điều trị ung thư dựa trên việc tăng cường hoặc kích hoạt hệ miễn dịch của chính cơ thể nhằm nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư, thay vì sử dụng các phương pháp can thiệp truyền thống như phẫu thuật, hóa trị hay xạ trị. Sở dĩ tế bào ung thư có thể tồn tại và phát triển là do chúng có khả năng né tránh sự phát hiện của hệ miễn dịch. Các liệu pháp miễn dịch hiện nay tập

trung vào việc “đánh dấu” hoặc làm lộ diện tế bào ung thư, từ đó giúp hệ miễn dịch dễ dàng nhận biết và loại bỏ chúng hiệu quả hơn.

Mỗi phương pháp điều trị ung thư đều có những mặt hạn chế và ưu điểm riêng. Chính vì vậy, nhiều nghiên cứu đang được triển khai nhằm cải thiện hiệu quả điều trị, giảm tác dụng phụ và tìm kiếm các hợp chất chống ung thư mới an toàn và hiệu quả hơn.

1.2.3.6. Liệu pháp nội tiết

Liệu pháp nội tiết được áp dụng cho các loại ung thư phụ thuộc hormone chẳng hạn như ung thư vú hoặc ung thư tuyến tiền liệt, bằng cách làm giảm nồng độ hormone hoặc ngăn chặn sự tương tác của hormone với thụ thể tương ứng trên tế bào ung thư. Việc can thiệp này giúp kìm hãm hoặc làm chậm sự phát triển của khối u. Mặc dù ít độc tính hơn so với hóa trị, liệu pháp nội tiết thường chỉ có hiệu quả ở những bệnh nhân có biểu hiện thụ thể hormone dương tính.

1.2.3.7. Điều trị kết hợp và cá thể hóa

Trong thực hành lâm sàng hiện đại, việc kết hợp nhiều phương pháp điều trị đang được áp dụng rộng rãi nhằm nâng cao hiệu quả và giảm nguy cơ tái phát, ví dụ như phối hợp phẫu thuật với hóa trị và xạ trị hoặc kết hợp liệu pháp miễn dịch với nhắm trúng đích. Bên cạnh đó, sự phát triển của y học chính xác cho phép lựa chọn phác đồ điều trị dựa trên đặc điểm di truyền và sinh học phân tử của mỗi bệnh nhân, từ đó giúp tối ưu hóa kết quả điều trị cũng như giảm thiểu các tác dụng không mong muốn.

1.2.3.8. Một số hợp chất có nguồn gốc tự nhiên mang hoạt tính chống ung thư

Các hợp chất có nguồn gốc từ vi khuẩn đã và đang đóng góp đáng kể vào quá trình nghiên cứu và phát triển các thuốc chống ung thư. Nhiều hợp chất sinh học được phân lập từ vi khuẩn đã thể hiện khả năng kháng ung thư mạnh mẽ thông qua nhiều cơ chế khác nhau.

Doxorubicin là một kháng sinh anthracycline được phân lập từ vi khuẩn *Streptomyces peucetius*, hiện được sử dụng phổ biến trong điều trị nhiều loại ung thư như ung thư vú, lymphoma và sarcoma. Cơ chế tác dụng của doxorubicin khá đa dạng, trong đó nổi bật là khả năng xen kẽ vào cấu trúc DNA, làm biến dạng chuỗi xoắn kép và ức chế enzyme topoisomerase II, từ đó cản trở quá trình sao chép và phiên mã của tế bào ung thư. Ngoài ra, doxorubicin còn thúc đẩy hình thành các gốc tự do thông qua phản ứng oxy hóa khử, gây tổn thương màng tế bào, protein và DNA, gây ra apoptosis. Tuy nhiên, độc tính trên tim là một hạn chế lớn trong việc

sử dụng hợp chất này [59].

Bleomycin là một glycopeptide kháng sinh được phân lập từ *Streptomyces verticillus*, được sử dụng trong điều trị ung thư đầu cổ, ung thư tinh hoàn và lymphoma Hodgkin. Cơ chế chính của bleomycin là gắn vào DNA và tạo phức với ion kim loại (chủ yếu là Fe^{2+}), từ đó xúc tác tạo ra các gốc tự do gây đứt gãy mạch đơn và mạch kép của DNA. Sự tổn thương DNA dẫn đến gián đoạn chu kỳ tế bào và kích hoạt các con đường apoptosis. Một đặc điểm đáng chú ý là bleomycin gây độc chọn lọc trên tế bào ung thư do các tế bào này có khả năng sửa chữa DNA kém hơn so với tế bào bình thường [60].

Actinomycin D (Dactinomycin) là một kháng sinh peptide được phân lập từ các loài *Streptomyces*, có khả năng gắn vào DNA tại các vị trí giàu cặp base guanine-cytosine. Sự gắn kết này làm ngăn cản hoạt động của RNA polymerase, từ đó ức chế quá trình phiên mã và làm giảm tổng hợp RNA. Kết quả là tế bào không thể tổng hợp protein cần thiết cho sự sống và tăng sinh, dẫn đến apoptosis. Actinomycin D thường được sử dụng để chữa trị các khối u ở trẻ nhỏ như u Wilms và rhabdomyosarcoma [61].

Epothilone là nhóm hợp chất được phân lập từ vi khuẩn myxobacteria, có cơ chế tác dụng tương tự taxane thông qua việc gắn vào tubulin và ổn định vi ống. Điều này làm ngăn cản quá trình khử trùng hợp của vi ống, gây rối loạn phân bào và gây dừng chu kỳ tế bào tại pha G2/M. Cuối cùng, tế bào ung thư bị cảm ứng apoptosis. Một ưu điểm nổi bật của epothilone là khả năng vượt qua cơ chế kháng thuốc liên quan đến P-glycoprotein, do đó có hiệu quả trong các trường hợp ung thư kháng taxane [62].

1.2.3.9. Prodigiosin có tác dụng trên nhiều dòng tế bào ung thư in vitro và in vivo

Năm 1977, hoạt động chống ung thư của PG đã được thử nghiệm *in vivo* ở chuột bởi Fullan và cộng sự, và thấy rằng các khối u được tiêm sắc tố này phát triển ở mức xấp xỉ 2/3 tỷ lệ khối u không được tiếp xúc [50]. Năm 2001, PG được chứng minh có khả năng cảm ứng apoptosis đối với tế bào ung thư dạ dày HGT-1 [29]. Năm 2003, Campas và cộng sự đã ghi nhận prodigiosin có khả năng gây chết theo chương trình tế bào B và T trong bệnh bạch cầu mạn tính. Đây là nghiên cứu đầu tiên cho thấy prodigiosin gây apoptosis ở các tế bào ung thư nguyên phát. Ngoài ra, PG còn thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào ung thư tạo máu khác nhau ở người gồm bệnh bạch cầu lympho cấp dòng T, bạch cầu tủy cấp, các bệnh lý tủy xương và lymphoma Burkitt. Đáng chú ý, prodigiosin còn có hiệu quả trên các dòng tế bào đích bao gồm cả tế bào đa kháng thuốc [63]. Dan Li và cộng sự (2018) đã chứng

minh hoạt tính kháng ung thư in vitro của PG vi khuẩn gây apoptosis trên tế bào JEG3. Còn hoạt tính kháng ung thư in vivo lại chỉ ra rằng prodigiosin ức chế mạnh sự phát triển của các tế bào JEG3 và PC3, khả năng ức chế phụ thuộc vào liều và thời gian [28]. Bên cạnh đó, PG còn thể hiện hoạt tính ức chế miễn dịch và chống ung thư trên các dòng tế bào kháng thuốc như MDR1, BCRP, MRP2, cũng như dòng tế bào bạch cầu mạn tính K562 ở người [1]. Một nghiên cứu của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ cũng chứng minh PG có hoạt tính chống ung thư mạnh trên 57 dòng tế bào ung thư khác nhau, bao gồm cả ung thư gan [64].

Trong bối cảnh các phương pháp điều trị ung thư hiện nay vẫn còn nhiều hạn chế, đặc biệt là về tính chọn lọc và tác dụng phụ, việc tìm kiếm các hợp chất mới hiệu quả hơn là rất cần thiết. Do đó, những kết quả trên đã chứng minh rằng PG cho thấy nhiều tiềm năng và ưu điểm so với một số phương pháp điều trị truyền thống và có thể trở thành tác nhân chống ung thư mới.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng

Prodigiosin được thu nhận từ vi khuẩn *Serratia* sp. HVQY-IGR mang gen mã hoá protein PigC tái tổ hợp được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu.

Dòng tế bào ung thư phổi H460, tế bào ung thư thanh quản Hep-2 và tế bào ung thư gan Hep3B (hãng ATCC, Mỹ) được sử dụng làm mô hình đánh giá hoạt tính prodigiosin.

2.1.2. Hoá chất và vật tư tiêu hao chính

Đệm PBS, MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), Môi trường RPMI, Giemsa, Methanol, DMSO, trypsin, HCl, Isopropanol, FBS (Fetal Bovine Serum, (Sigma, Mỹ), chai nuôi cấy, đĩa 96 giếng, đĩa 24 giếng, đĩa 48 giếng, pipet (Corning, Mỹ)... và các hóa chất vật tư khác được cung cấp từ các hãng có uy tín trên thế giới.

2.1.3. Các máy móc thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu

Phòng sạch, kính hiển vi soi ngược Olympus IX83 (Olympus, Nhật Bản), máy lắc, thiết bị đọc đĩa SpectraMax M2 (Molecular Devices, Mỹ), tủ cấy (Bioair, Mỹ), tủ âm CO₂ (Nuair, Mỹ), bể ổn nhiệt (Shellab, Mỹ), máy ly tâm Eppendorf.v.v..

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

Các dòng tế bào ung thư phổi H460, tế bào ung thư thanh quản Hep-2 và tế bào ung thư gan Hep3B được sử dụng làm mô hình nhằm đánh giá tác dụng ức chế tế bào của prodigiosin. Sau khi giải đông và cấy chuyển, tế bào được nuôi trong môi trường RPMI có bổ sung 10% FBS và 1% penicillin và Streptomycin. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong bình T75 với thể tích môi trường 10 ml, duy trì ở điều kiện 37°C và 5% CO₂. Môi trường nuôi được thay định kỳ cách ngày để đảm bảo điều kiện sinh trưởng tối ưu. Khi tế bào phát triển đạt khoảng 80 – 90% diện tích bề mặt nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tác động của PG lên tế bào được đánh giá dựa trên hai tiêu chí chính. Thứ nhất là sự thay đổi về hình thái và tính toàn vẹn của tế bào, được quan sát bằng kính

hiển vi đảo ngược (Olympus IX83, Nhật Bản). Thứ hai là khả năng tăng sinh của tế bào, được xác định thông qua phép thử MTT bằng cách đo mật độ quang (OD) của các tinh thể formazan hình thành sau phản ứng.

2.2.2. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của prodigiosin bằng phương pháp MTT

Kỹ thuật MTT được sử dụng để xác định khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư của prodigiosin. MTT là một muối tetrazolium màu vàng, có công thức 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, có khả năng chuyển thành màu tím khi enzyme ty thể trong các tế bào sống, succinate-dehydrogenase, cắt vòng tetrazolium. Lượng formazan tạo ra được phân tích bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 595nm. Số lượng formazan tạo ra tỉ lệ thuận với số lượng tế bào sống, tốc độ tăng sinh và hoạt động chuyển hóa của tế bào.

Tế bào H460, Hep-2 và tế bào Hep3B được nuôi cấy trong chai T75 cho đến khi đạt mật độ khoảng 80 – 90% diện tích bề mặt nuôi cấy, tiếp tục cấy chuyển sang 2 đĩa 96 giếng tương ứng với 2 giai đoạn 24 giờ và 48 giờ và nuôi cấy trong môi trường ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi ổn định, cho tế bào tiếp xúc với PG ở các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 µg/ml. Các tế bào ở giếng đối chứng sẽ không cho tiếp xúc với PG và tiếp xúc với DMSO. Sau thời gian 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG, bổ sung 20 µl dung dịch MTT nồng độ 5mg/ml lần lượt vào từng giếng của các đĩa tương ứng với từng giai đoạn. Tiếp tục nuôi tế bào ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ để tinh thể formazan hình thành. Sau 4 giờ, loại bỏ dịch nuôi cấy, hòa tan tinh thể formazan bằng dung dịch acid isopropanol với tỉ lệ HCl : Isopropanol là 1 : 24. Đo số lượng tinh thể formazan bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 595nm. Kết quả được đánh giá bằng số lượng tinh thể formazan và hình thái của tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 6 lần (n = 6) để đảm bảo độ tin cậy.

Nồng độ ức chế bán tối đa (IC₅₀)

Dựa trên kết quả thí nghiệm bằng phương pháp MTT, tỷ lệ phần trăm tế bào sống được xác định bằng cách tính tỷ lệ giá trị đo OD của các giếng có bổ sung prodigiosin (PG) ở mỗi nồng độ khác nhau với nhóm đối chứng (RPMI).

Nồng độ ức chế bán tối đa (IC₅₀) là nồng độ của một chất ức chế (thuốc/hợp chất) cần thiết để ức chế 50% một quá trình sinh học hoặc phản ứng sinh hóa trong điều kiện *in vitro*. Đây là một tham số định lượng được dùng rộng rãi để đánh giá khả năng ức chế mạnh của một chất trong nghiên cứu sinh học tế bào. Giá trị IC₅₀

càng thấp, thì khả năng ức chế của chất càng mạnh (cần ít nồng độ hơn để đạt 50% ức chế tế bào) [65].

Dựa trên mối tương quan giữa tỷ lệ tế bào sống (y , %) và nồng độ PG (x , $\mu\text{g}/\text{m}$), tiến hành xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính dạng: $y = ax + b$.

Từ phương trình hồi quy tuyến tính, nồng độ ức chế bán tối đa (IC_{50}) được xác định theo công thức:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Giá trị a và b được lấy từ phương trình hồi quy tuyến tính thu được. IC_{50} của PG được xác định tại các thời điểm 24 giờ và 48 giờ sau khi tiếp xúc với tế bào trong môi trường nuôi cấy.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính ức chế sự di cư và xâm lấn tế bào ung thư của prodigiosin bằng kỹ thuật scratch assay

Hoạt tính ức chế khả năng di cư và xâm lấn của prodigiosin (PG) đối với tế bào ung thư H460, Hep-2 và tế bào Hep3B được đánh giá theo phương pháp wound-healing (scratch assay) của Pijuan và cộng sự, có điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [5].

Tế bào ung thư H460, Hep-2 và tế bào Hep3B được nuôi cấy đến khi đạt 80 – 90% diện tích bề mặt sẽ tiến hành thí nghiệm. Hút bỏ dung dịch cũ, vẽ tham chiếu dưới đáy plate, dùng đầu tip pipette kéo qua bề mặt đáy giếng các đường thẳng tạo vết rạch theo đường tham chiếu đã vẽ. Rửa nhẹ nhàng bằng PBS 1 – 2 lần để loại bỏ tế bào vỡ hoặc trôi nổi do vết rạch. Bổ sung PG với các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, DMSO (dung dịch pha loãng PG); môi trường nuôi cấy tế bào bình thường không tiếp xúc PG và DMSO làm đối chứng. Quan sát, đo diện tích và chụp ảnh vết rạch tế bào tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ. Sau thời điểm 48 giờ, cố định tế bào và nhuộm Giemsa.

Dựa trên kết quả diện tích đo được của tế bào H460, tế bào Hep-2 và tế bào Hep3B tại các thời điểm khác nhau, tính tỉ lệ diện tích vết rạch di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào 24 giờ và 48 giờ so với thời điểm 0 giờ sau khi tế bào H460, Hep-2 và tế bào Hep3B tiếp xúc với PG. Giá trị thu được phản ánh mức độ tăng sinh, di cư và xâm lấn của tế bào H460, Hep-2, tế bào Hep3B vào vùng trống của vết rạch theo thời gian. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần ($n=2$).

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và được xử lý với phần mềm excel, phần mềm thống kê GraphPad Prism 10.0...

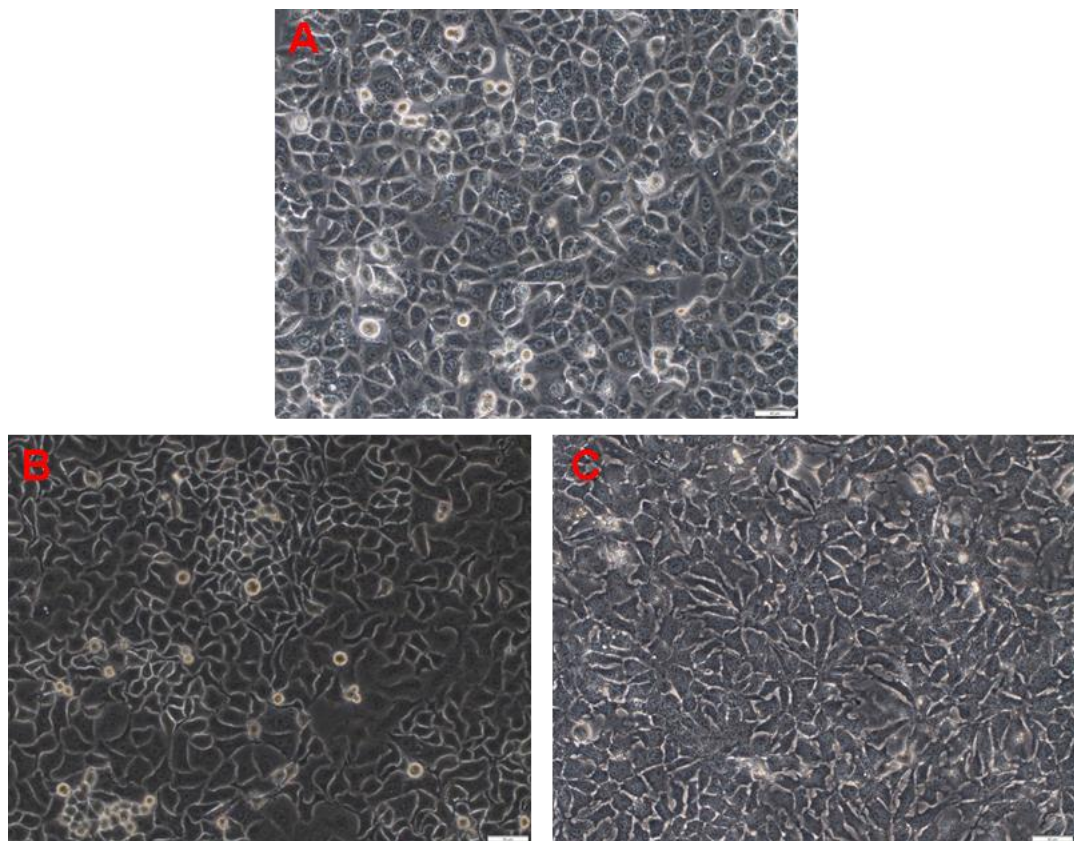
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1.1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư để đánh giá hoạt tính của PG

❖ Kết quả nuôi cấy tế bào ung thư:

Kết quả nuôi cấy cho thấy các dòng tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B đều có khả năng bám dính tốt lên bề mặt nuôi cấy, hình thái tế bào đặc trưng và tốc độ tăng sinh ổn định. Sau 72 giờ nuôi cấy, các tế bào phát triển đạt độ che phủ khoảng trên 80% diện tích bề mặt dụng cụ nuôi cấy tế bào, kết quả nuôi cấy ổn định tạo điều kiện thuận lợi cho việc triển khai các thí nghiệm tiếp theo (Hình 3.1).



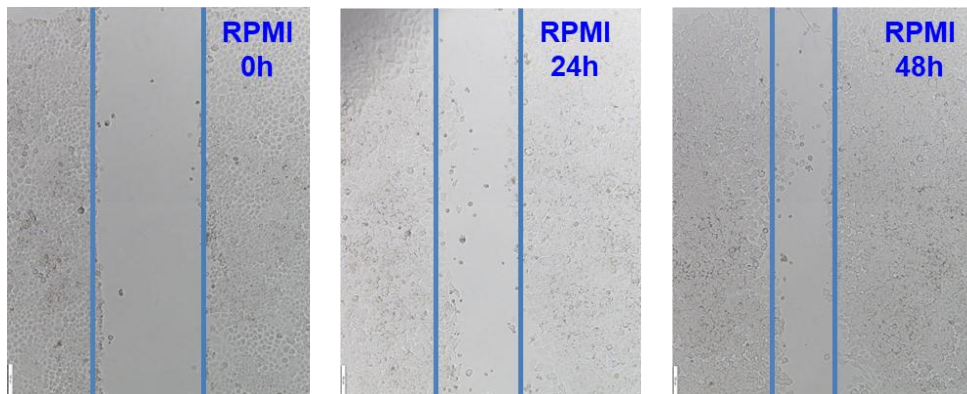
Hình 3.1. Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh tế bào ung thư sau 72 giờ (Hình 3.1 A: tế bào H460, Hình 3.1 B: Tế bào Hep-2, Hình 3.1 C: Tế bào Hep3B).

Quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược cho thấy tế bào H460, Hep-2 và Hep3B có khả năng bám dính tốt trên bề mặt nuôi cấy, phân bố tương đối đồng đều và phát triển thành lớp đơn (monolayer). Tế bào có hình dạng đa giác hoặc hơi tròn,

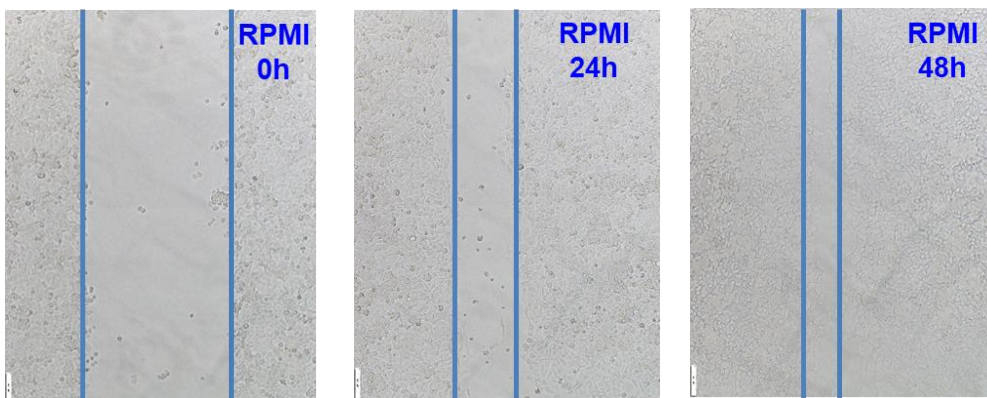
ranh giới tế bào rõ ràng, nhân tế bào bắt màu đậm và nằm trung tâm, kích thước tương đối đồng đều và xu hướng xếp khít với nhau.

❖ **Kết quả tạo mô hình tế bào ung thư để đánh giá hoạt tính PG:**

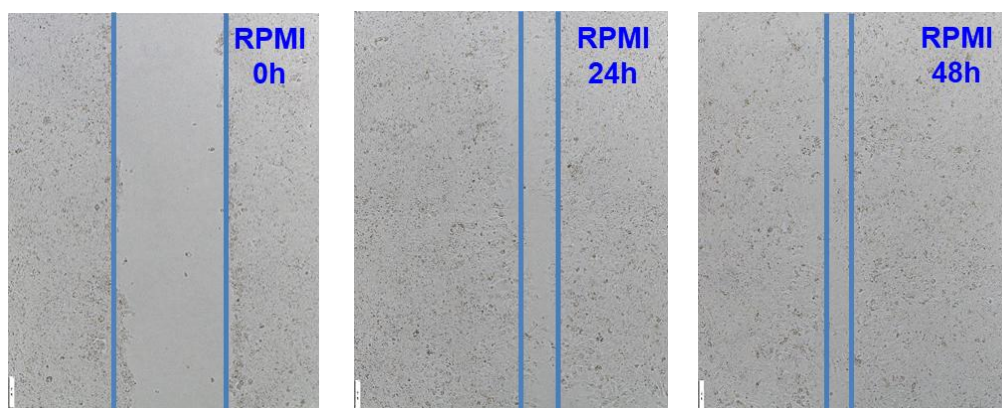
Trên cơ sở kết quả nuôi cấy các dòng tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B đều có khả năng bám dính tốt lên bề mặt nuôi cấy, sau 72 giờ nuôi cấy, các tế bào phát triển đạt độ che phủ khoảng trên 80% diện tích bề mặt dụng cụ nuôi cấy tế bào, tế bào phân bố tương đối đồng đều và phát triển thành lớp đơn. Tiến hành tạo vết rạch tế bào và quan sát theo thời gian. Kết quả sau 24 và 48 giờ theo dõi, ở 24 giờ vết rạch vẫn còn khoảng trống và chưa thấy rõ được sự khác biệt. Ở thời gian 48 giờ sau khi nuôi cấy, cả ba dòng tế bào ung thư chưa che phủ hết diện tích bề mặt dụng cụ nuôi cấy, vẫn còn khoảng trống để đo diện tích đánh giá được thử nghiệm. Nuôi cấy với thời gian dài hơn tế bào có thể sẽ che phủ hết bề mặt dụng cụ nuôi cấy, như vậy sẽ khó đánh giá kết quả. Với kết quả đạt được đủ điều kiện để tạo mô hình đánh giá hoạt tính của PG và thời điểm đọc kết quả có thể kết thúc ở 48 giờ theo dõi. Kết quả được thể hiện ở hình 3.2, 3.3 và 3.4.



Hình 3.2. Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư H460



Hình 3.3. Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư Hep-2



Hình 3.4. Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư Hep3B

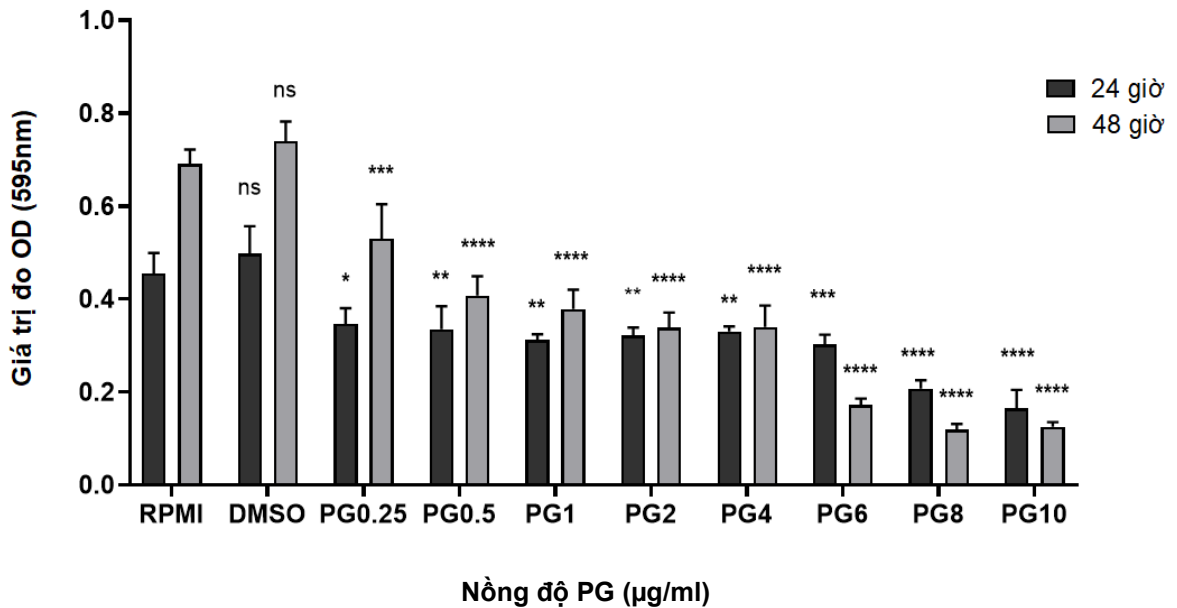
3.1.2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh một số tế bào ung thư của PG bằng kỹ thuật MTT

3.1.2.1. Kết quả đánh giá trên tế bào H460

Tế bào H460 được xử lý với PG ở các nồng độ khác nhau: 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 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 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng. Ứng dụng kỹ thuật đo MTT, sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc, kết quả được thể hiện ở bảng 3.1, biểu đồ 3.1.

Bảng 3.1: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Giá trị đo OD (595nm) (Giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn)	
	24 giờ	48 giờ
10	0,164 \pm 0,040	0,118 \pm 0,002
8	0,207 \pm 0,018	0,124 \pm 0,016
6	0,302 \pm 0,021	0,185 \pm 0,027
4	0,330 \pm 0,011	0,363 \pm 0,029
2	0,325 \pm 0,051	0,338 \pm 0,013
1	0,312 \pm 0,012	0,427 \pm 0,075
0.5	0,334 \pm 0,050	0,413 \pm 0,017
0.25	0,346 \pm 0,034	0,542 \pm 0,025
DMSO	0,497 \pm 0,059	0,700 \pm 0,067
Đối chứng (RPMI)	0,455 \pm 0,044	0,690 \pm 0,015



Biểu đồ 3.1: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau. (**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,0003$; ** $P < 0,0002$; * $P < 0,05$, ns: không có ý nghĩa thống kê so sánh với nhóm đối chứng RPMI)

Sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG, sự sinh trưởng của tế bào H460 đã bị ức chế ở tất cả các nồng độ khi so sánh với nhóm đối chứng và nhóm DMSO. Tác dụng ức chế phụ thuộc vào nồng độ PG.

Từ kết quả số liệu và biểu đồ thu được sau khi bổ sung MTT cho thấy, đối với tế bào tại giếng RPMI (môi trường nuôi cấy), tế bào tăng sinh khá tốt. Ở giếng tiếp xúc tế bào với DMSO (dung dịch pha loãng PG), kết quả cho thấy DMSO không gây chết tế bào và không khác biệt đáng kể so với đối chứng RPMI, chứng tỏ DMSO không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào H460, khẳng định tác dụng ức chế quan sát được là do PG gây ra, chứ không phải do yếu tố ngoại lai từ dung môi.

Khi tăng nồng độ PG, giá trị OD ghi nhận được giảm dần. Tại các nồng độ PG cao như 10 µg/ml, 8 µg/ml, 6 µg/ml, nhiều tế bào bị chết nên MTT tạo ra được một lượng formazan khá ít, vì vậy giá trị đo OD khá thấp, đặc biệt ở thời điểm 48 giờ.

Với các nồng độ PG thấp hơn như 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml cũng có sự ức chế khả năng tăng sinh của tế bào H460 tuy nhiên không hiệu quả mạnh như các nồng độ cao hơn vì vậy số lượng formazan tạo ra tăng lên nhiều so với nồng độ 10 µg/ml. Các nồng độ thấp (0,25 – 0,5 µg/ml) chỉ làm giảm tỷ lệ sống của tế bào.

Tại thời điểm 48 giờ, khả năng ức chế của PG trở nên rõ ràng hơn so với 24 giờ thể hiện ở việc giá trị OD tiếp tục giảm ở hầu hết các nồng độ khảo sát. Ngay cả ở các nồng độ trung bình và thấp, giá trị OD vẫn giảm đáng kể so với đối chứng, chứng tỏ tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư của PG tăng theo thời gian tiếp xúc.

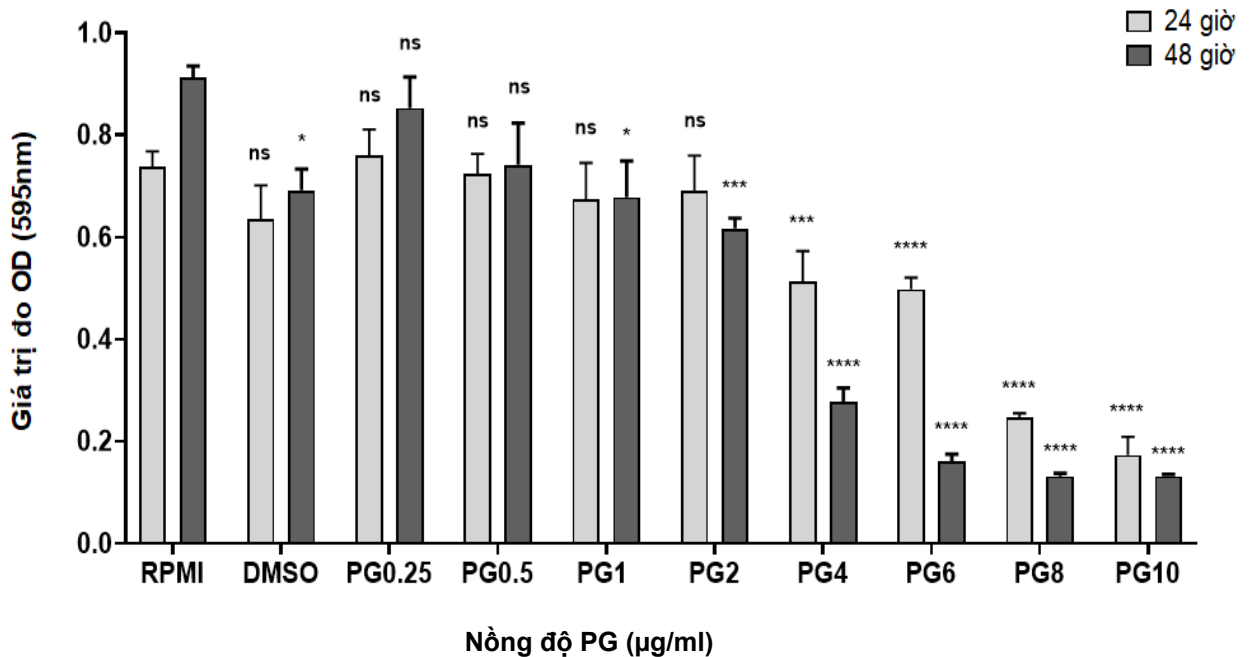
Như vậy nồng độ PG càng cao thì khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào càng tốt. Sau khi bổ sung MTT và đo mật độ quang (OD) của mức độ tạo formazan, kết quả cho thấy PG có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư H460.

3.1.2.2. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep-2

Sau khi ứng dụng kỹ thuật MTT và đo giá trị OD của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2 và Biểu đồ 3.2.

Bảng 3.2: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Giá trị đo OD (595nm) (Giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn)	
	24 giờ	48 giờ
10	0,177 \pm 0,050	0,134 \pm 0,004
8	0,248 \pm 0,012	0,130 \pm 0,002
6	0,506 \pm 0,026	0,166 \pm 0,016
4	0,482 \pm 0,031	0,266 \pm 0,028
2	0,659 \pm 0,055	0,617 \pm 0,029
1	0,711 \pm 0,047	0,718 \pm 0,023
0.5	0,746 \pm 0,014	0,712 \pm 0,090
0.25	0,783 \pm 0,044	0,837 \pm 0,076
DMSO	0,640 \pm 0,093	0,685 \pm 0,057
Đối chứng (RPMI)	0,738 \pm 0,042	0,902 \pm 0,019



Biểu đồ 3.2: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau. (**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,0003$; ** $P < 0,0002$; * $P < 0,05$, ns: không có ý nghĩa thống kê so sánh với nhóm đối chứng RPMI)

Kết quả thí nghiệm MTT thu được cho thấy PG có khả năng ức chế rõ rệt lên khả năng tăng sinh của tế bào ung thư biểu mô thanh quản Hep-2.

Đối với giếng bổ sung dung dịch DMSO không ghi nhận sự giảm OD so với đối chứng ở cả hai thời điểm, chứng tỏ DMSO không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào Hep-2, khẳng định tác dụng ức chế quan sát được là do PG gây ra, chứ không phải do yếu tố ngoại lai từ dung môi.

Tại thời điểm 24 giờ, ở các nồng độ PG cao (6 – 10 µg/ml), giá trị OD giảm mạnh, thấp hơn đáng kể so với đối chứng, điều này cho thấy PG gây ức chế tăng sinh mạnh trên tế bào Hep-2. Khi nồng độ PG giảm xuống thấp hơn (0,25 – 4 µg/ml), giá trị OD tăng dần so với nhóm nồng độ PG cao, phản ánh mức độ ức chế của PG giảm dần theo nồng độ. Đặc biệt, ở nồng độ thấp 0,25 µg/ml, giá trị đo OD tiệm cận với nhóm đối chứng, cho thấy hiệu quả ức chế không còn rõ rệt tại nồng độ này.

Tại thời điểm 48 giờ, khả năng ức chế của PG trở nên rõ ràng hơn so với 24 giờ thể hiện ở việc giá trị OD tiếp tục giảm ở hầu hết các nồng độ khảo sát. Ở các nồng độ cao (6 – 10 µg/ml), OD duy trì ở mức thấp hơn nhiều so với đối chứng,

ngay cả ở các nồng độ trung bình và thấp (0,5 – 4 $\mu\text{g/ml}$), giá trị OD vẫn giảm đáng kể so với đối chứng, chứng tỏ tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư của PG tăng theo thời gian tiếp xúc.

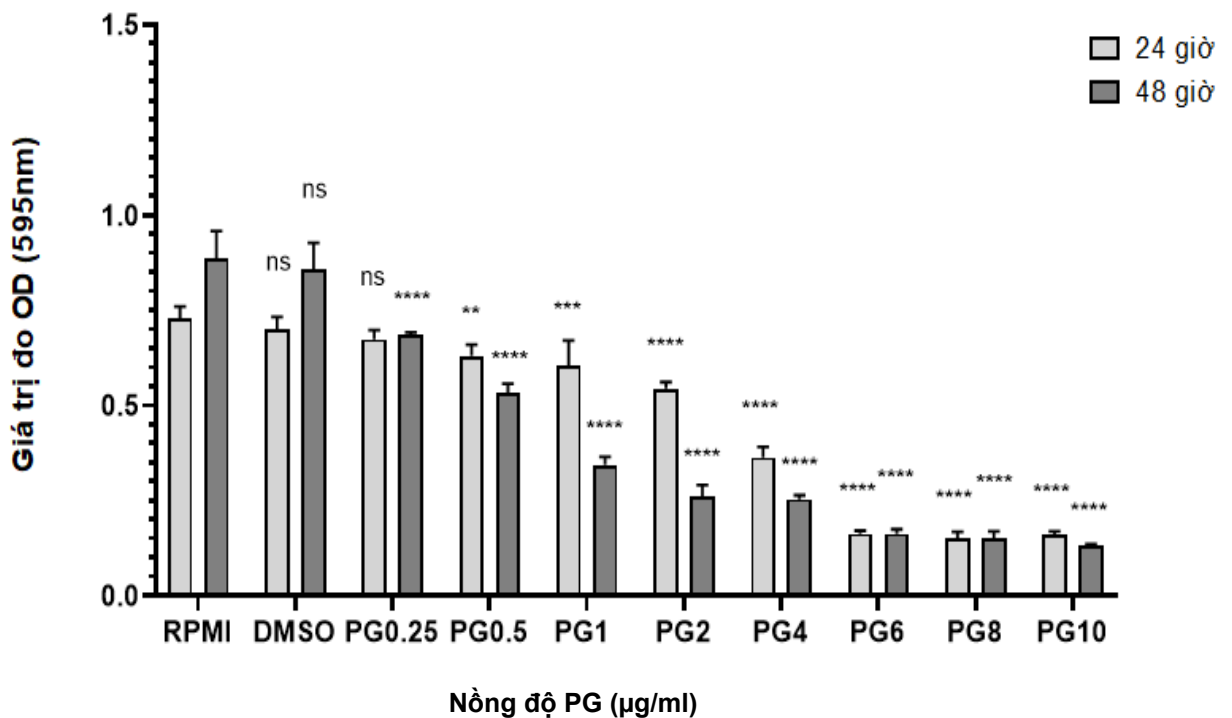
Tóm lại, kết quả này đã chứng minh khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư biểu mô thanh quản Hep-2 của PG và mức độ ức chế phụ thuộc vào thời gian và nồng độ.

3.1.2.3. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep3B

Sau khi ứng dụng kỹ thuật MTT và đo giá trị OD của tế bào Hep3B tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.3 và Biểu đồ 3.3.

Bảng 3.3: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Giá trị đo OD (595nm) (Giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn)	
	24 giờ	48 giờ
10	0,154 \pm 0,005	0,129 \pm 0,004
8	0,143 \pm 0,006	0,144 \pm 0,021
6	0,167 \pm 0,006	0,157 \pm 0,002
4	0,351 \pm 0,023	0,251 \pm 0,014
2	0,538 \pm 0,019	0,267 \pm 0,042
1	0,631 \pm 0,067	0,356 \pm 0,002
0.5	0,626 \pm 0,041	0,547 \pm 0,006
0.25	0,686 \pm 0,014	0,685 \pm 0,011
DMSO	0,693 \pm 0,047	0,834 \pm 0,080
Đối chứng (RPMI)	0,740 \pm 0,035	0,853 \pm 0,061



*Biểu đồ 3.3: Kết quả đo giá trị OD của phản ứng MTT của mẫu tế bào ung thư Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau. (**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,0003$; ** $P < 0,0002$; * $P < 0,05$, ns: không có ý nghĩa thống kê so sánh với nhóm đối chứng RPMI)*

Từ kết quả số liệu và biểu đồ thu được sau khi bổ sung MTT cho thấy, đối với tế bào tại giếng RPMI (môi trường nuôi cấy), tế bào tăng sinh khá tốt, ở giếng tiếp xúc tế bào với DMSO (dung dịch pha loãng PG), kết quả cho thấy DMSO không gây chết tế bào và không khác biệt đáng kể so với đối chứng RPMI.

Giá trị OD giảm dần khi nồng độ PG tăng, đặc biệt rõ rệt ở các nồng độ từ 6-10 µg/ml, nhất là ở thời điểm 48 giờ. Với các nồng độ PG thấp hơn như 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml cũng có sự ức chế khả năng tăng sinh của tế bào Hep3B tuy nhiên không hiệu quả mạnh như các nồng độ cao hơn vì vậy số lượng formazan tạo ra tăng lên nhiều so với nồng độ 10 µg/ml. Các nồng độ thấp (0,25 – 0,5 µg/ml) chỉ làm giảm tỷ lệ sống của tế bào.

Như vậy nồng độ PG càng cao và thời gian tiếp xúc càng lâu thì khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào càng tốt. Kết quả thí nghiệm MTT cho thấy PG có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan Hep3B theo cơ chế phụ thuộc nồng độ và thời gian.

3.1.2.4. Kết quả xác định giá trị IC₅₀

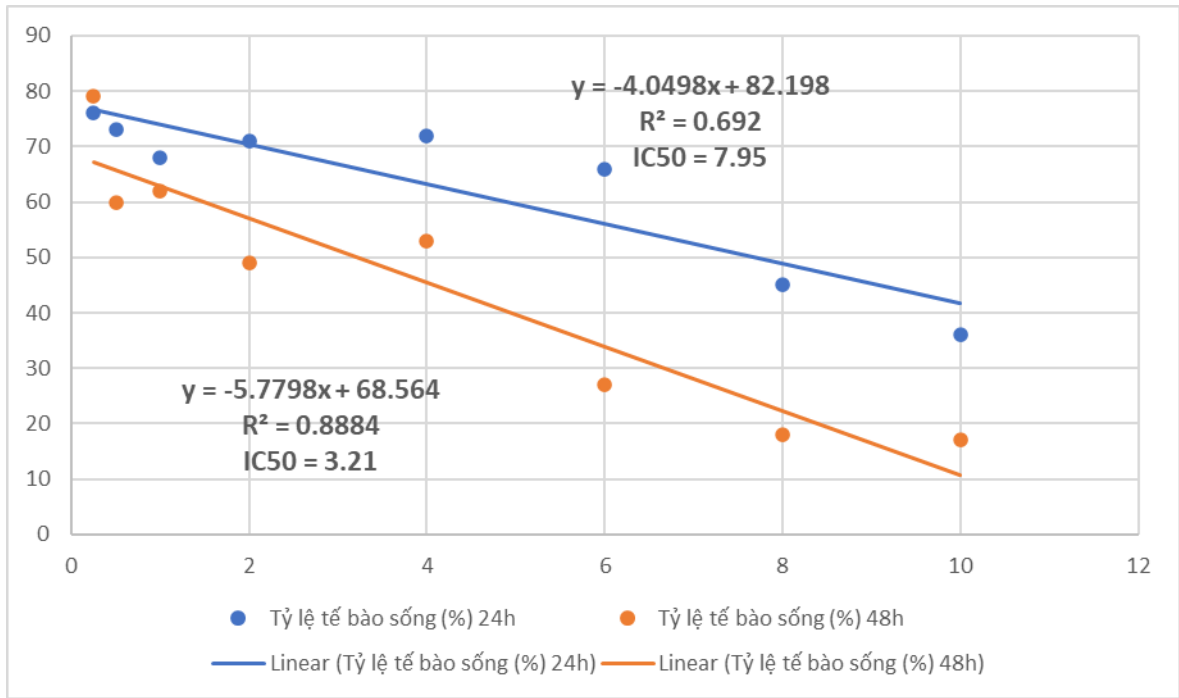
Kết quả xác định đối với tế bào H460:

Sau khi ứng dụng kỹ thuật MTT và đo giá trị OD của tế bào H460 tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 µg/ml, DMSO và đối chứng tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Tính tỉ lệ phần trăm tế bào sống so với nhóm đối chứng, dựa trên mối tương quan giữa tỷ lệ tế bào sống (y, %) và nồng độ PG (x, µg/ml), tiến hành xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4: Tỷ lệ tế bào H460 sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG

Nồng độ PG (µg/ml)	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
	24 giờ	48 giờ
10	36	17
8	45	18
6	66	27
4	72	53
2	71	49
1	68	62
0.5	73	60
0.25	76	79

Dựa trên tỷ lệ tế bào sống trong các nhóm nghiên cứu và nồng độ PG đã sử dụng, lập phương trình hồi quy tuyến tính có dạng $Y = ax + b$. Từ phương trình hồi quy tuyến tính, tính liều ức chế 50% tế bào (IC₅₀) của PG ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ trên dòng tế bào H460 xác định được là: 7,95 µg/ml ở 24 giờ và 3,21 µg/ml ở 48 giờ (Biểu đồ 3.4). So sánh giữa 2 thời điểm này cho thấy PG có tác dụng ức chế mạnh hơn khi thời gian tiếp xúc tăng lên.



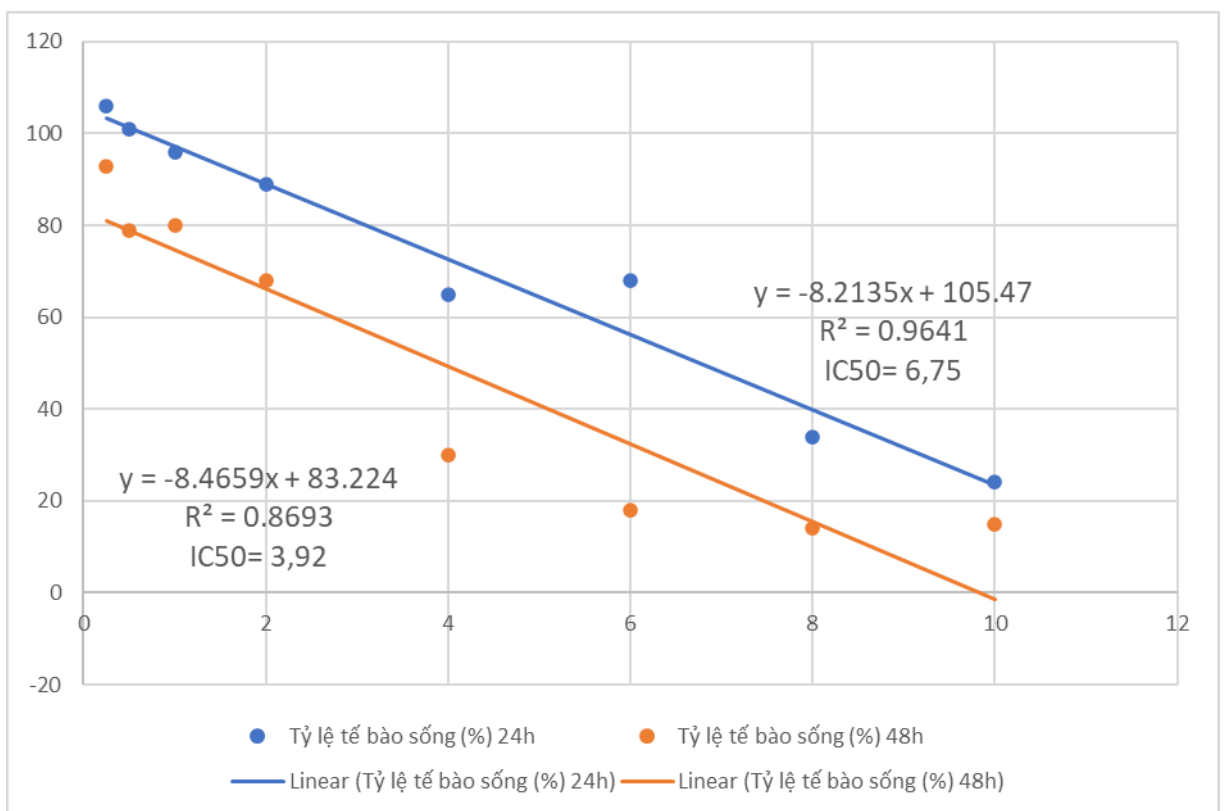
Biểu đồ 3.4: Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào H460

Kết quả xác định đối với tế bào Hep-2

Sau khi ứng dụng kỹ thuật MTT và đo giá trị OD của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 μg/ml, DMSO và đối chứng tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Tính tỉ lệ phần trăm tế bào sống so với nhóm đối chứng, dựa trên mối tương quan giữa tỷ lệ tế bào sống (y, %) và nồng độ PG (x, μg/ml), tiến hành xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.5 và Biểu đồ 3.5.

Bảng 3.5: Tỷ lệ tế bào Hep-2 sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
	24 giờ	48 giờ
10	24	15
8	34	17
6	68	18
4	65	18
2	89	20
1	96	36
0.5	101	41
0.25	106	57



Biểu đồ 3.5: Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào Hep-2

Từ phương trình hồi quy tuyến tính, xác định được IC_{50} của PG trên dòng tế

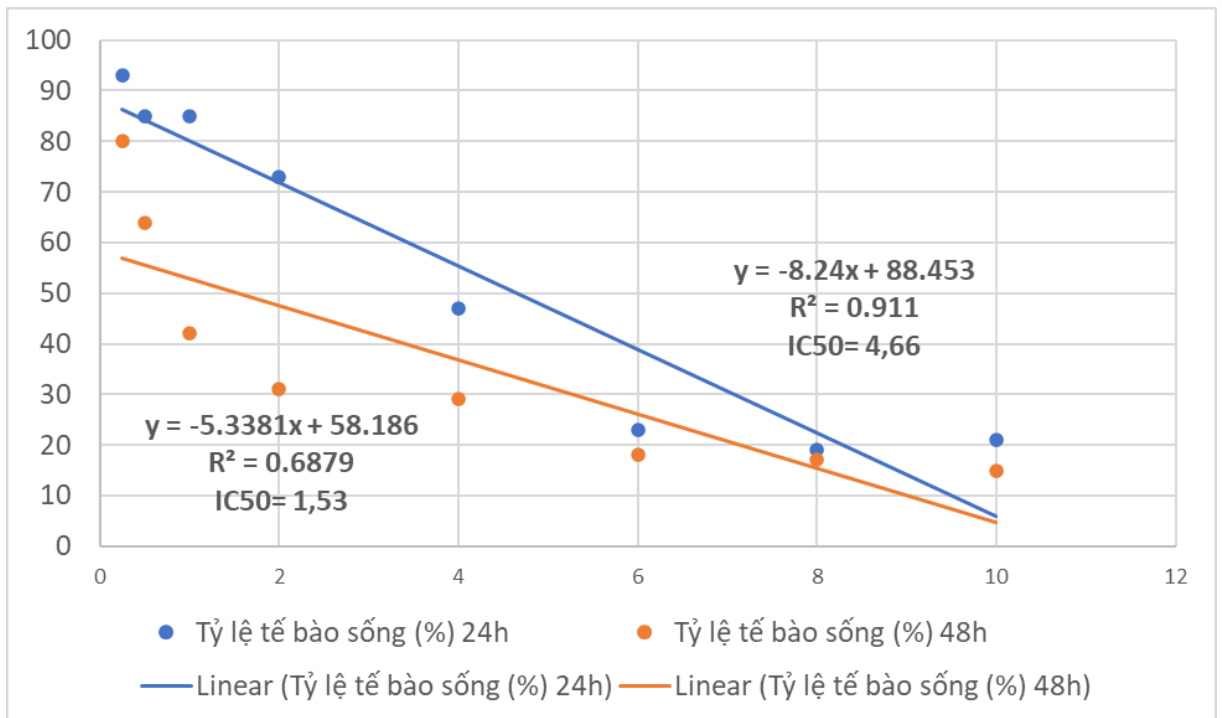
bào ung thư biểu mô thanh quản Hep-2 tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ tương ứng là 6,75 $\mu\text{g/ml}$ và 3,92 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả xác định đối với tế bào Hep3B

Sau khi ứng dụng kỹ thuật MTT và đo giá trị OD của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Tính tỉ lệ phần trăm tế bào sống so với nhóm đối chứng, dựa trên mối tương quan giữa tỷ lệ tế bào sống (y, %) và nồng độ PG (x, $\mu\text{g/ml}$), tiến hành xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.6 và Biểu đồ 3.6.

Bảng 3.6: Tỷ lệ tế bào Hep3B sống sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
	24 giờ	48 giờ
10	21	15
8	19	17
6	23	18
4	47	29
2	73	31
1	85	42
0.5	85	64
0.25	93	80



Biểu đồ 3.6: Phương trình hồi quy tuyến tính sau 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc PG với tế bào Hep3B

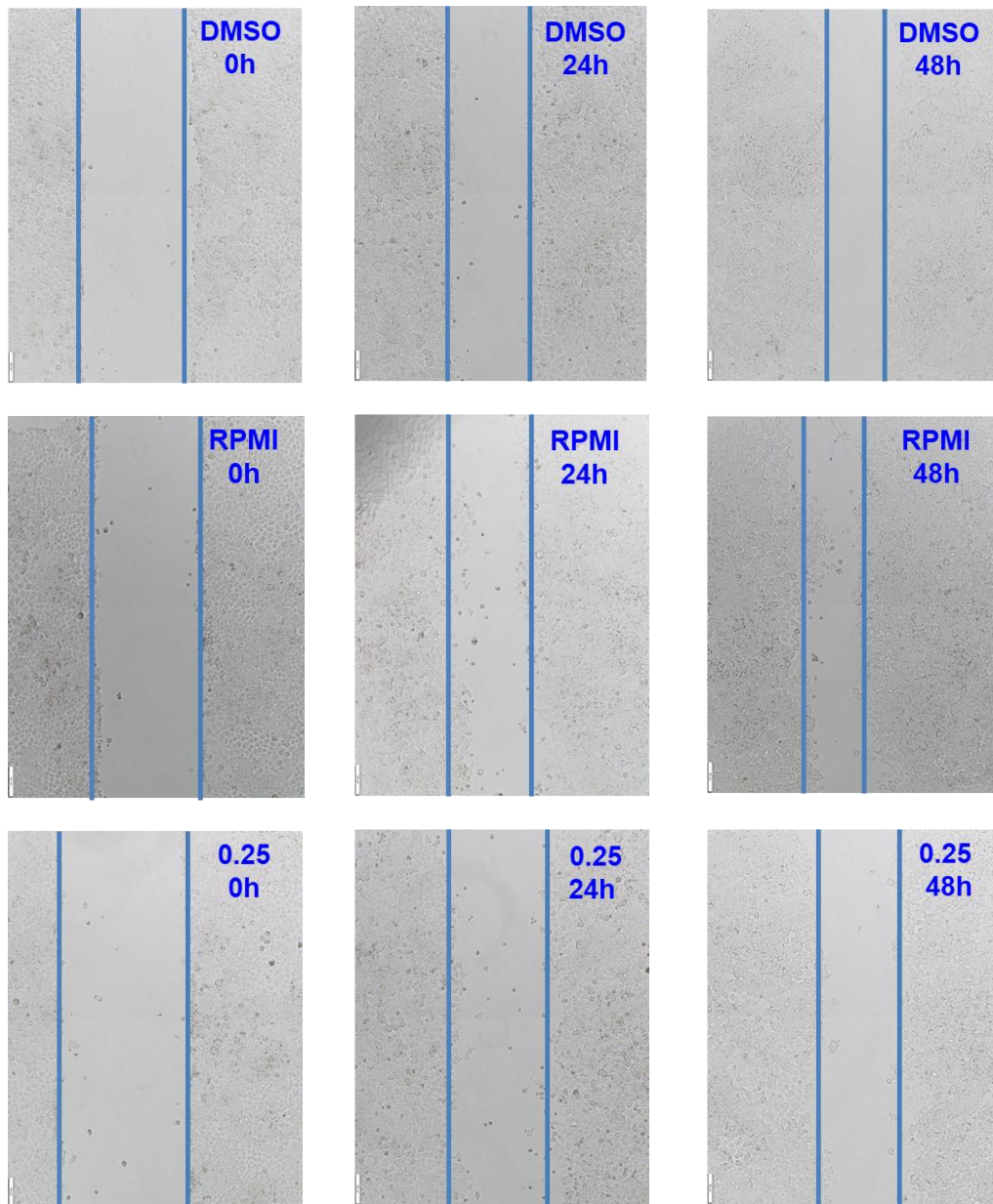
Dựa trên tỷ lệ tế bào sống trong các nhóm nghiên cứu và nồng độ PG đã sử dụng, lập phương trình hồi quy tuyến tính có dạng $Y = ax + b$. Từ phương trình hồi quy tuyến tính, tính liều ức chế 50% tế bào (IC50) của PG ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ trên dòng tế bào Hep3B xác định được là: 4,66 ở 24 giờ và 1,53 ở 48 giờ.

3.1.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của PG đến khả năng di cư và xâm lấn của một số dòng tế bào ung thư *in vitro*

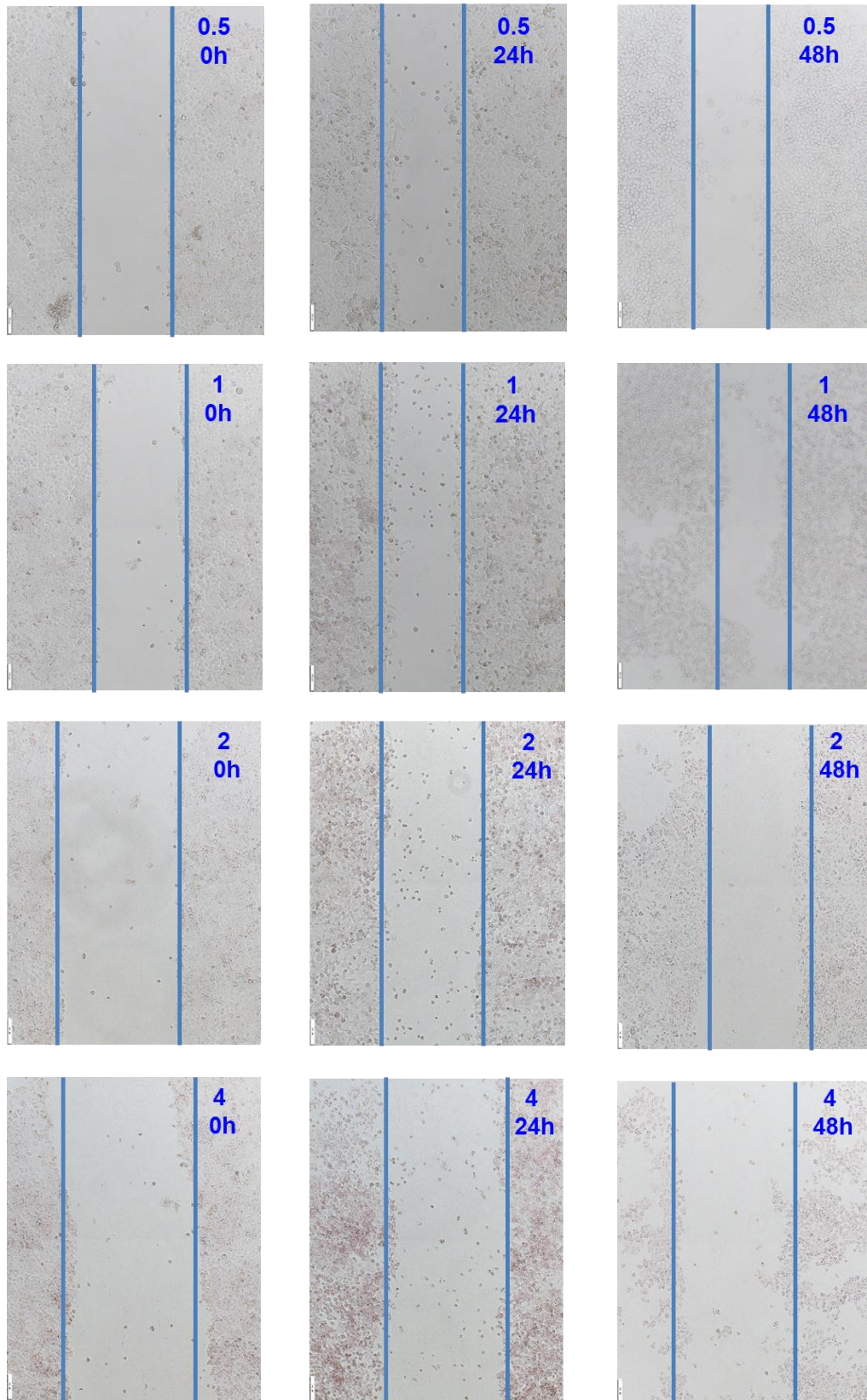
3.1.3.1. Kết quả đánh giá trên tế bào H460

Sau khi tế bào H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ khác nhau (từ 0,25-10 $\mu\text{g/ml}$) so với mẫu tiếp xúc với DMSO (dung dịch pha loãng PG) và nhóm đối chứng (nuôi cấy H460 trong môi trường bình thường không tiếp xúc PG và DMSO). Sau khi ứng dụng phương pháp wound-healing (scratch assay), kết quả xác định diện tích khoảng trống của vết rạch và tỉ lệ diện tích vết rạch với tỉ lệ xâm lấn của tế bào H460 ở thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tiếp xúc với PG, được thể hiện ở bảng 3.7, biểu đồ 3.7 và hình 3.4.

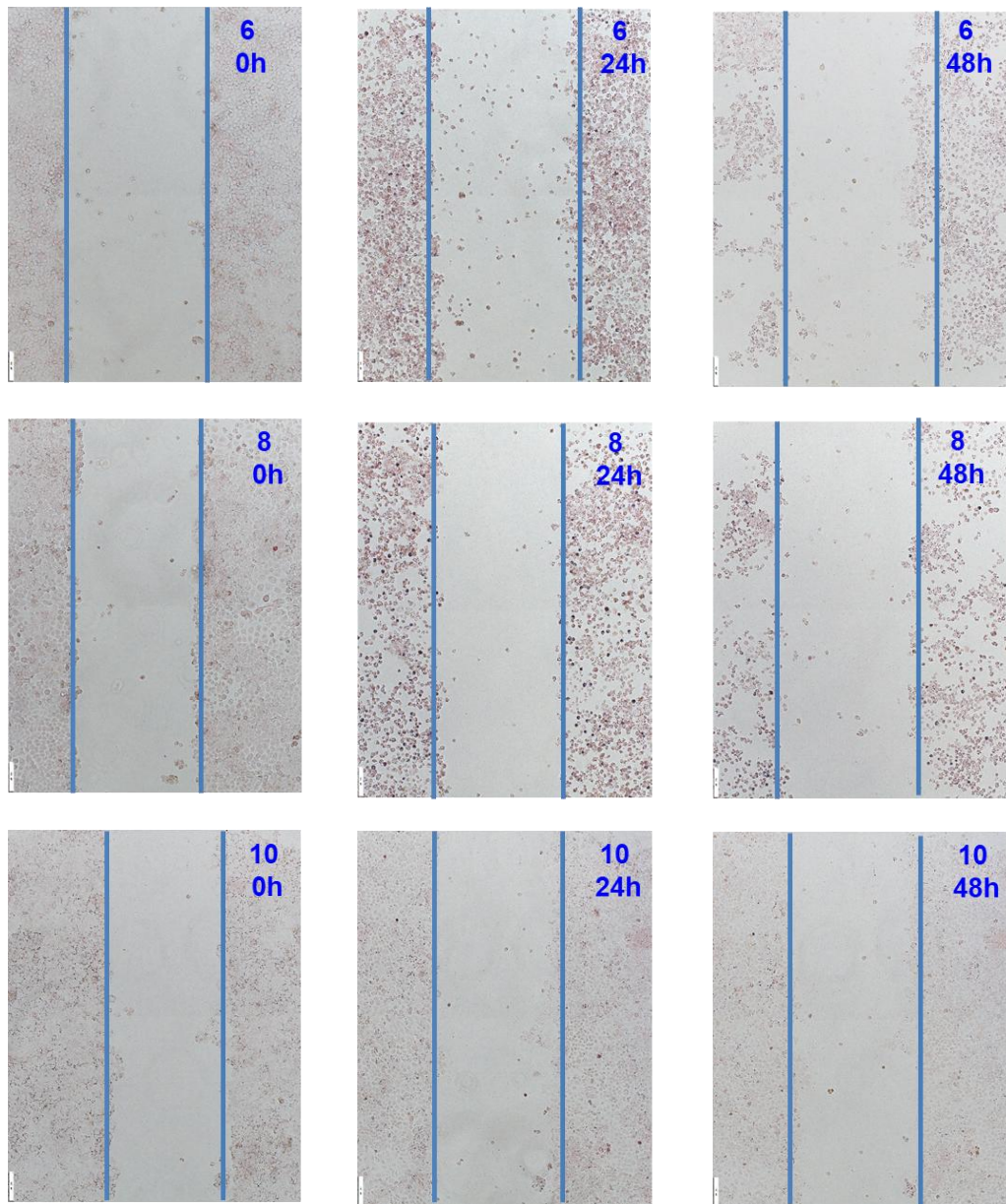
❖ **Kết quả hình ảnh ức chế hoạt tính của PG đến khả năng di cư và xâm lấn của tế bào H460**



Hình 3.5: Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với DMSO, RPMI và PG ở nồng độ 0,25 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (RPMI: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bình thường, DMSO: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO, 0,25: Tế bào được bổ sung PG ở nồng độ 0,25 $\mu\text{g/ml}$)



Hình 3.6: Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,5 – 4 µg/ml tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (0,5 – 4: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 0,5 – 4 µg/ml)

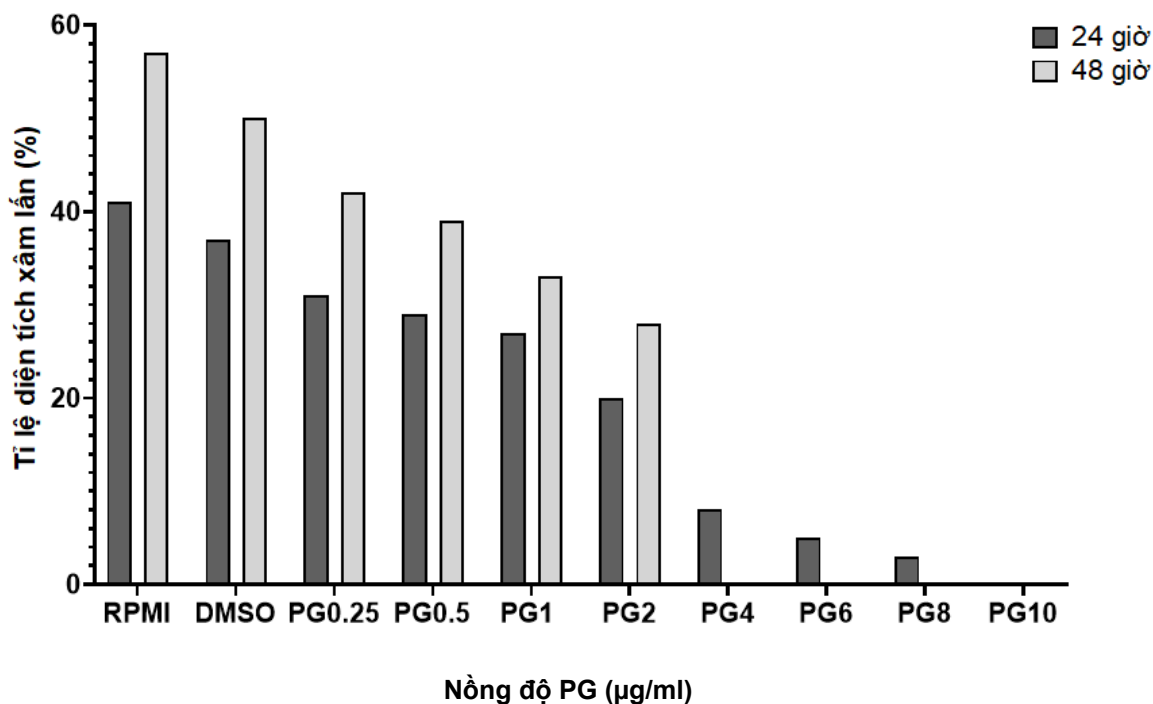


Hình 3.7: Hình ảnh tế bào H460 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 6 – 10 $\mu\text{g/ml}$ tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (6 – 10: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 6 – 10 $\mu\text{g/ml}$)

❖ **Kết quả đo diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào H460 tiếp xúc với PG**

Bảng 3.7: Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào H460 tiếp xúc với PG

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ xâm lấn (%)		
	0 giờ	24 giờ	48 giờ
10	0	0	0
8	0	3	0
6	0	5	0
4	0	8	0
2	0	20	28
1	0	27	33
0.5	0	29	39
0.25	0	31	42
DMSO	0	37	50
Đối chứng (RPMI)	0	41	57



Biểu đồ 3.7: Kết quả so sánh tỉ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào H460 tiếp xúc với PG

Từ kết quả số liệu và biểu đồ và hình ảnh thu được sau thí nghiệm đo diện tích di cư của tế bào H460 sau khi tiếp xúc với PG ở các nồng độ sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ cho thấy PG có tác dụng ức chế rõ rệt quá trình di cư và xâm lấn của tế bào ung thư phổi H460 theo cả nồng độ và thời gian.

Ở nhóm đối chứng (bổ sung RPMI), diện tích xâm lấn của tế bào tăng lên 41% ở 24 giờ và 57% ở 48 giờ phản ánh khả năng di cư mạnh của tế bào ung thư H460.

Đối với giếng bổ sung DMSO, tỉ lệ che phủ vết rạch tương đương hoặc gần với nhóm đối chứng ở cả hai thời điểm, chứng tỏ dung dịch này không ảnh hưởng đến khả năng di cư và xâm lấn của tế bào H460.

Đối với các nồng độ PG thấp, diện tích trống có giảm tuy nhiên đã giảm ít hơn so với nhóm đối chứng ở cả 24 giờ và 48 giờ tương đương với tỉ lệ xâm lấn thấp hơn so với nhóm đối chứng, chứng tỏ PG đã có ức chế 1 phần đến quá trình di cư và xâm lấn của tế bào H460.

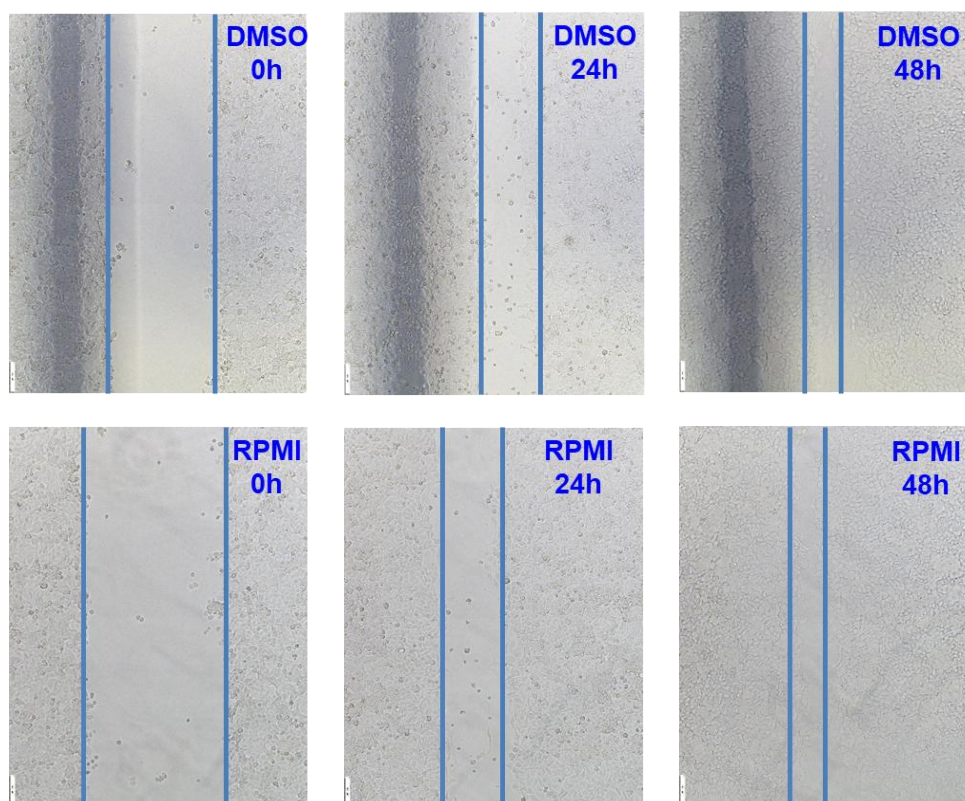
Trong khi đó, ở nhóm nồng độ PG cao, diện tích trống gần như không giảm và còn tăng lên theo thời gian. Cụ thể, đối với nồng độ 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, diện tích trống gần như không thay đổi sau 24 giờ và tăng lên 105% sau 48 giờ, tương ứng với tỉ lệ xâm lấn của tế bào bằng 0% cho thấy tế bào gần như mất khả năng di cư hoặc bị chết trong vùng rìa vết rạch ($P < 0,05$).

Kết quả này chứng tỏ, PG có khả năng ức chế sự di cư và xâm lấn của tế bào và tác dụng ức chế này phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc và nồng độ.

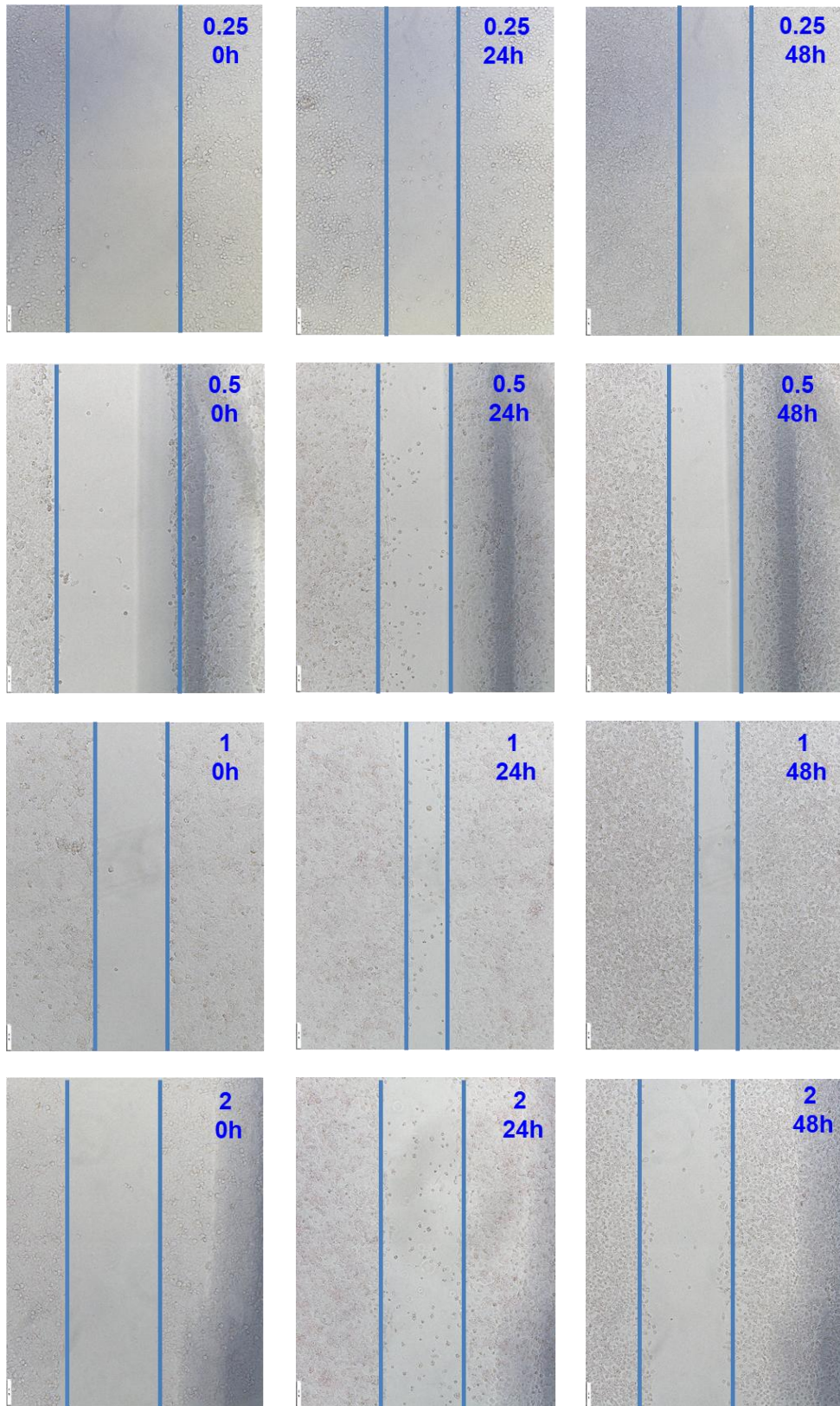
3.1.3.2. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep-2

Sau khi ứng dụng phương pháp wound-healing (scratch assay) và đo diện tích vết rạch và tính tỉ lệ diện tích vết rạch với tỉ lệ xâm lấn của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.8 và Biểu đồ 3.8 và Hình 3.5.

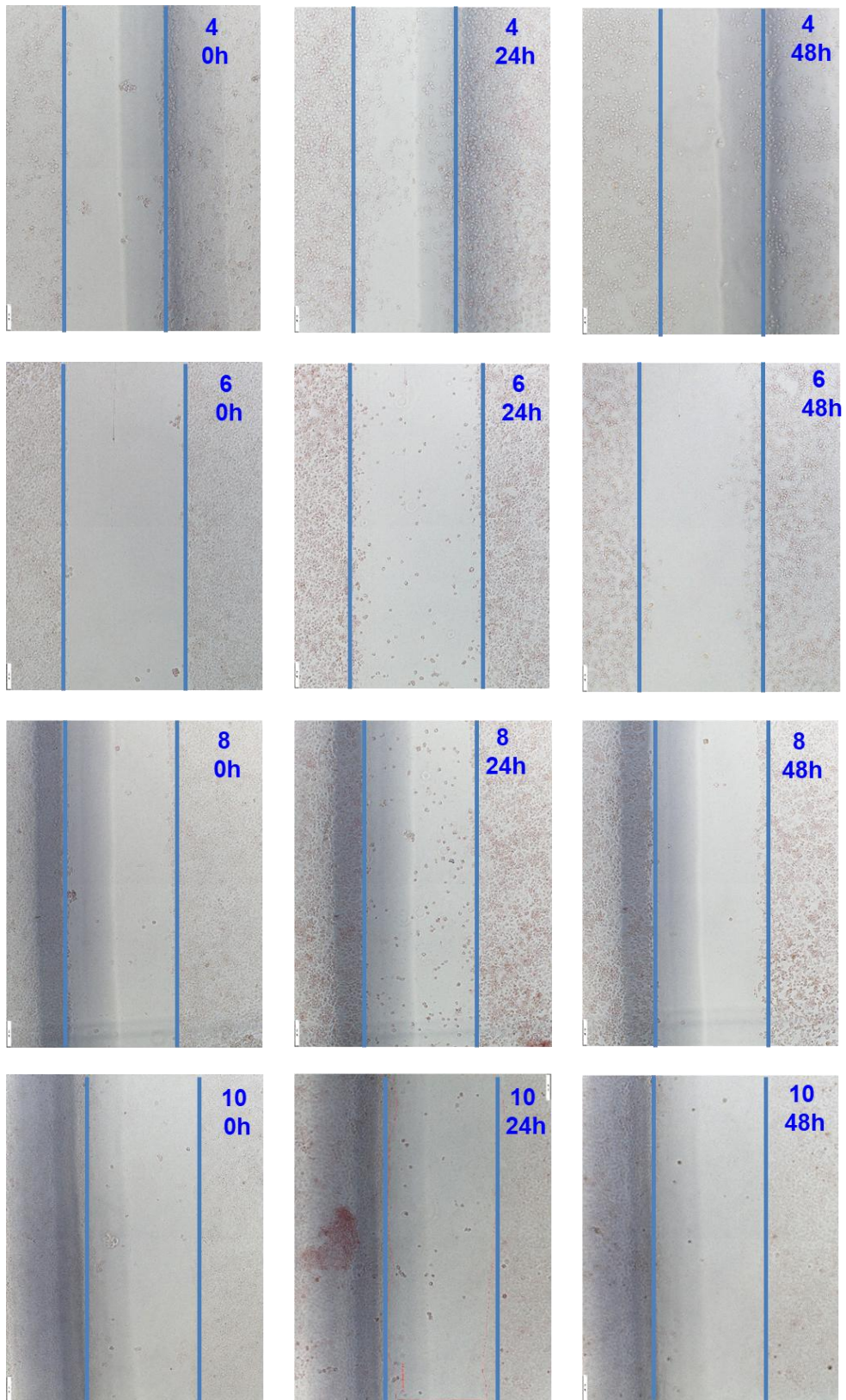
❖ **Kết quả hình ảnh ức chế hoạt tính của PG đến khả năng di cư và xâm lấn của tế bào Hep-2**



Hình 3.8: Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với DMSO và RPMI tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (RPMI: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bình thường, DMSO: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO)



Hình 3.9: Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,25 – 2 µg/ml tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (0,25 – 2: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 0,25 – 2 µg/ml)

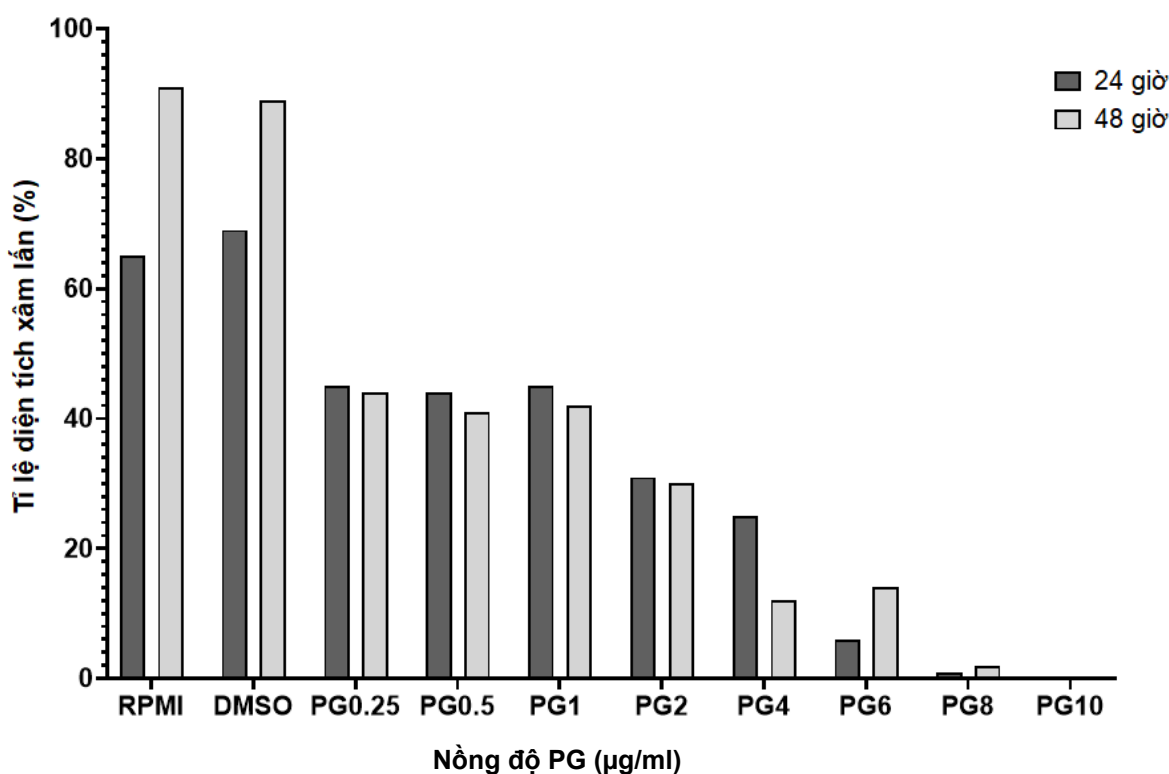


Hình 3.10: Hình ảnh tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG ở các nồng độ 4 – 10 µg/ml tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (4 – 10: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 4 – 10 µg/ml)

❖ **Kết quả đo diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG**

Bảng 3.8: Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ diện tích xâm lấn (%)		
	0 giờ	24 giờ	48 giờ
10	0	0	0
8	0	1	2
6	0	6	14
4	0	25	12
2	0	31	30
1	0	45	42
0.5	0	44	41
0.25	0	45	44
DMSO	0	69	89
Đối chứng (RPMI)	0	65	91



Biểu đồ 3.8: Kết quả so sánh tỉ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào Hep-2 tiếp xúc với PG

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy prodigiosin ức chế rõ rệt khả năng tăng sinh, di cư và xâm lấn của tế bào ung thư Hep-2.

Đối với giếng bổ sung DMSO, tỉ lệ che phủ vết rạch tương đương hoặc gần với nhóm đối chứng ở cả hai thời điểm, chứng tỏ dung dịch này không ảnh hưởng đến khả năng di cư và xâm lấn của tế bào Hep-2, khẳng định tác dụng ức chế quan sát được là do PG gây ra chứ không phải do yếu tố ngoại lai.

Tỉ lệ diện tích xâm lấn ở 24 giờ và 48 giờ ở các nhóm xử lý PG đều thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng (DC) và nhóm dung môi DMSO, chứng tỏ PG làm chậm đáng kể quá trình lấp đầy vết rạch của tế bào Hep-2.

Ở các nồng độ thấp (0,25 – 1 µg/ml), tỉ lệ diện tích xâm lấn giảm đáng kể so với nhóm đối chứng ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Điều này cho thấy ngay cả ở nồng độ thấp, PG vẫn duy trì tác dụng ức chế một phần quá trình di cư và xâm lấn của tế bào Hep-2.

Ở các nồng độ trung bình (2 – 6 µg/ml), PG vẫn thể hiện tác dụng ức chế rõ rệt. Tỉ lệ diện tích xâm lấn giảm dần theo thời gian và nồng độ, với mức dao động khoảng 31 – 6% sau 24 giờ và 30 – 14% sau 48 giờ. Kết quả này cho thấy PG làm

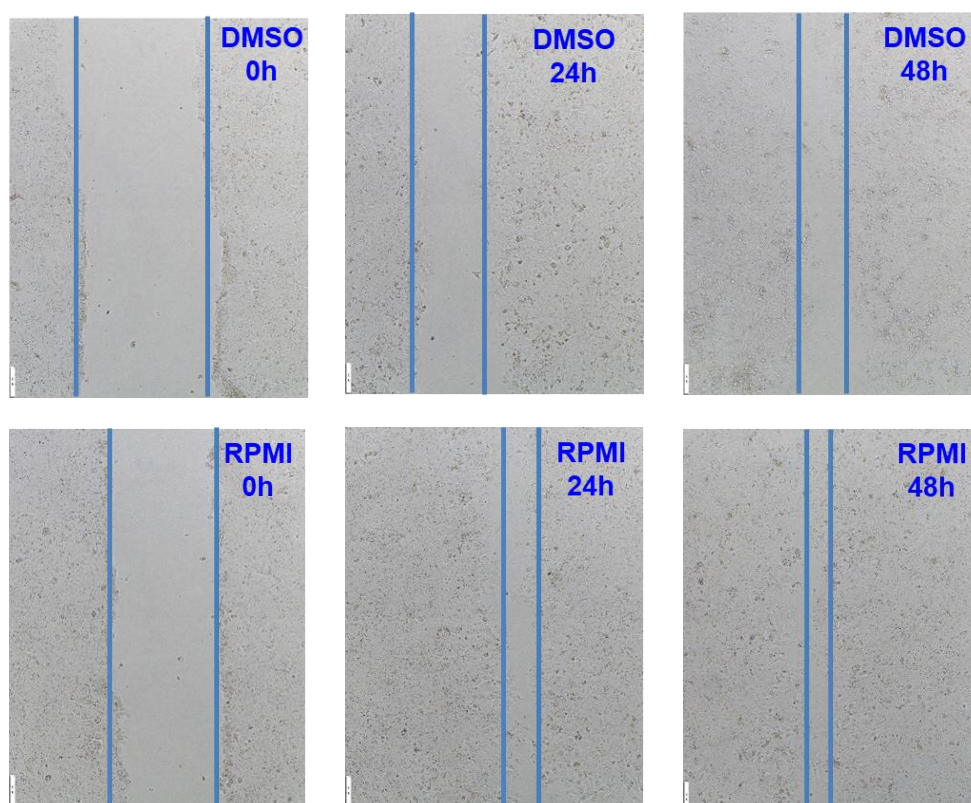
chậm quá trình di cư và xâm lấn và ức chế tế bào ung thư tốt hơn so với nồng độ thấp.

Tại các nồng độ PG cao (10 và 8 $\mu\text{g/ml}$), diện tích vết rạch hầu như không giảm sau 24 giờ và 48 giờ, với tỉ lệ che phủ xấp xỉ 0% hoặc thậm chí giá trị âm nhẹ quy ước về 0%, chứng tỏ PG ức chế gần như hoàn toàn khả năng di cư và xâm lấn của tế bào ($P < 0,05$).

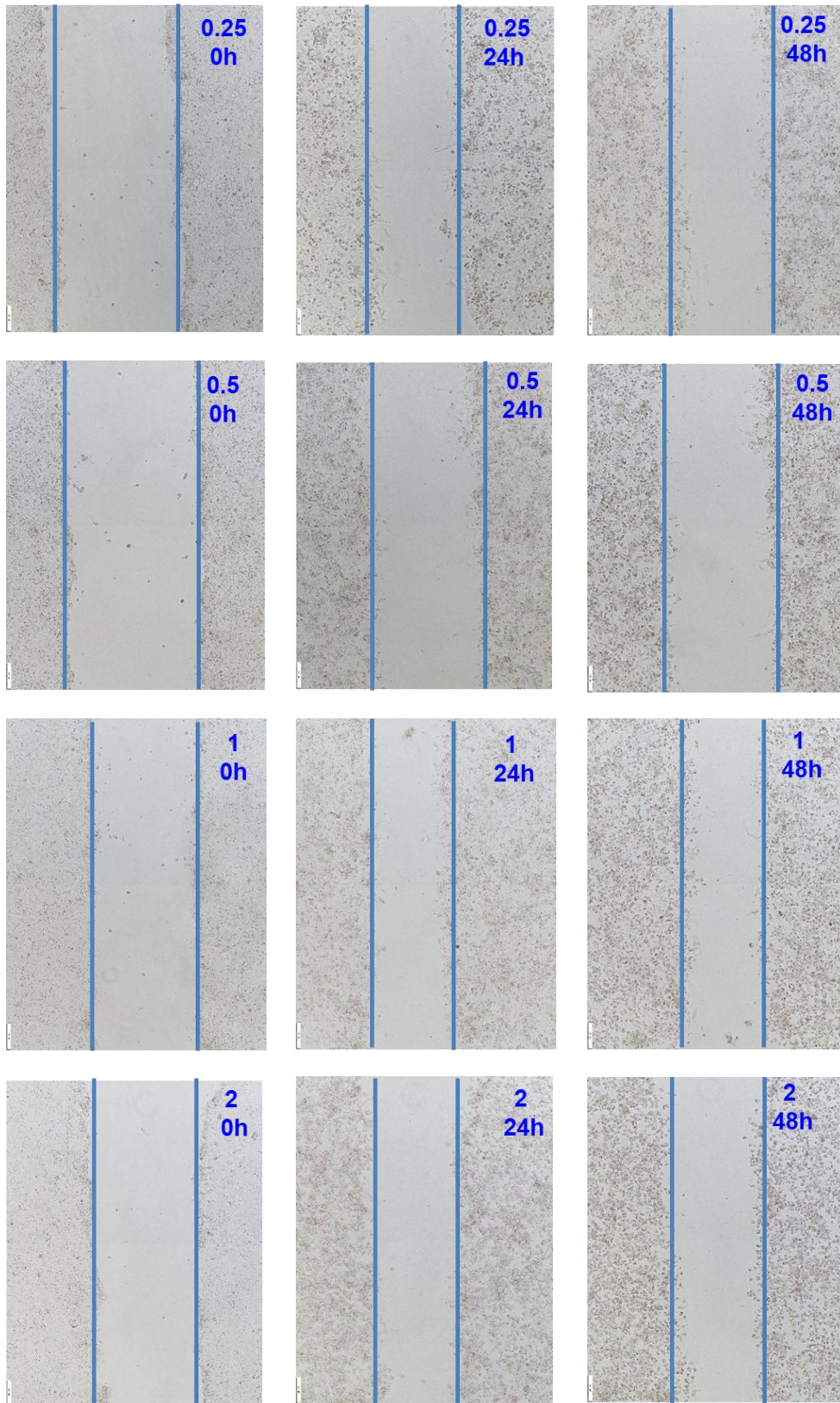
3.1.3.3. Kết quả đánh giá trên tế bào Hep3B

Sau khi ứng dụng phương pháp wound-healing (scratch assay) và đo diện tích vết rạch và tính tỉ lệ diện tích vết rạch với tỉ lệ xâm lấn của tế bào Hep3B tiếp xúc với PG các nồng độ 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, DMSO và đối chứng tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.9 và Biểu đồ 3.9 và Hình 3.6.

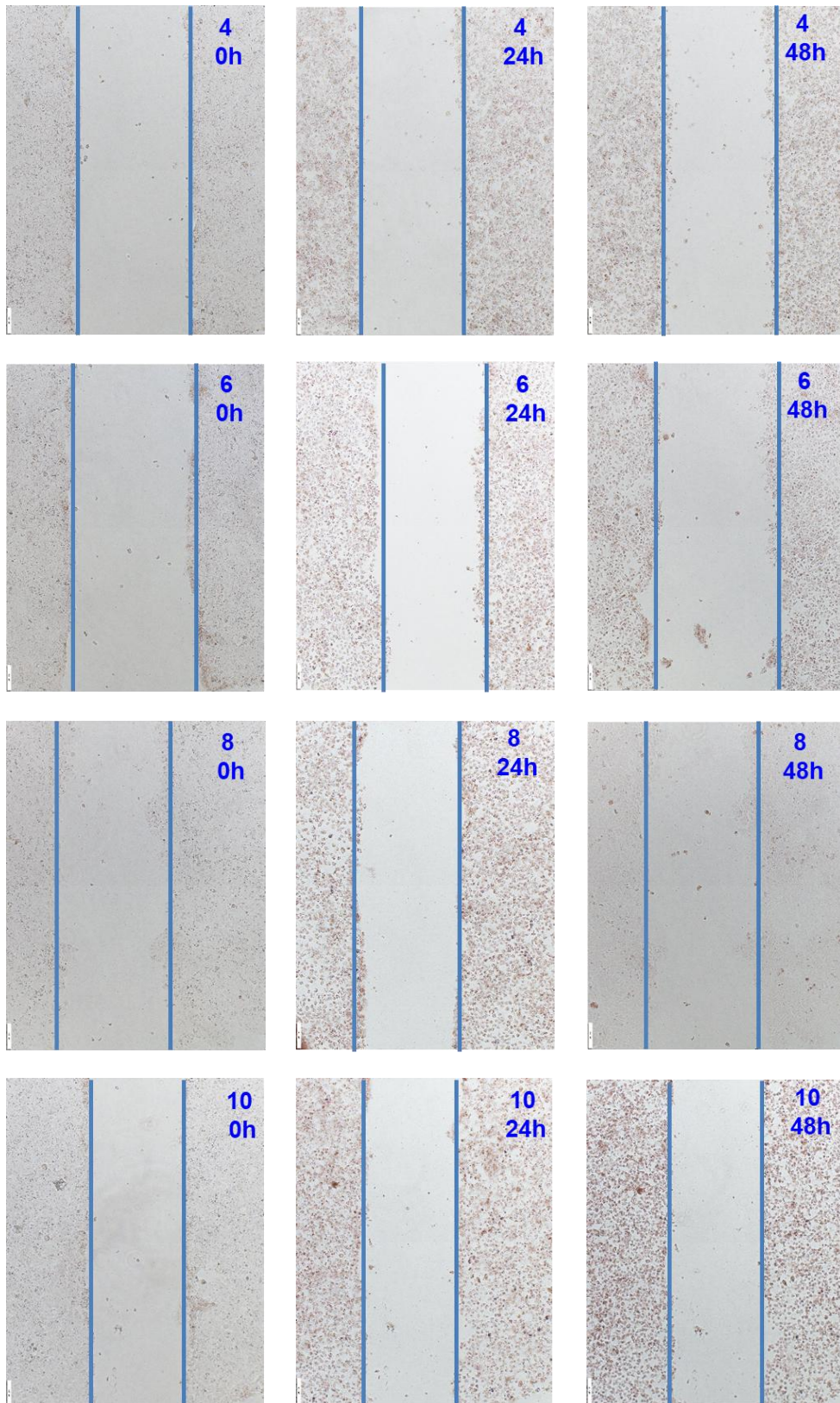
❖ Kết quả hình ảnh ức chế hoạt tính của PG đến khả năng di cư và xâm lấn của tế bào Hep3B



Hình 3.11: Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với DMSO và RPMI tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (RPMI: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bình thường, DMSO: Tế bào được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO)



Hình 3.12: Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ 0,25 – 2 µg/ml tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (0,25 – 2: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 0,25 – 2 µg/ml)

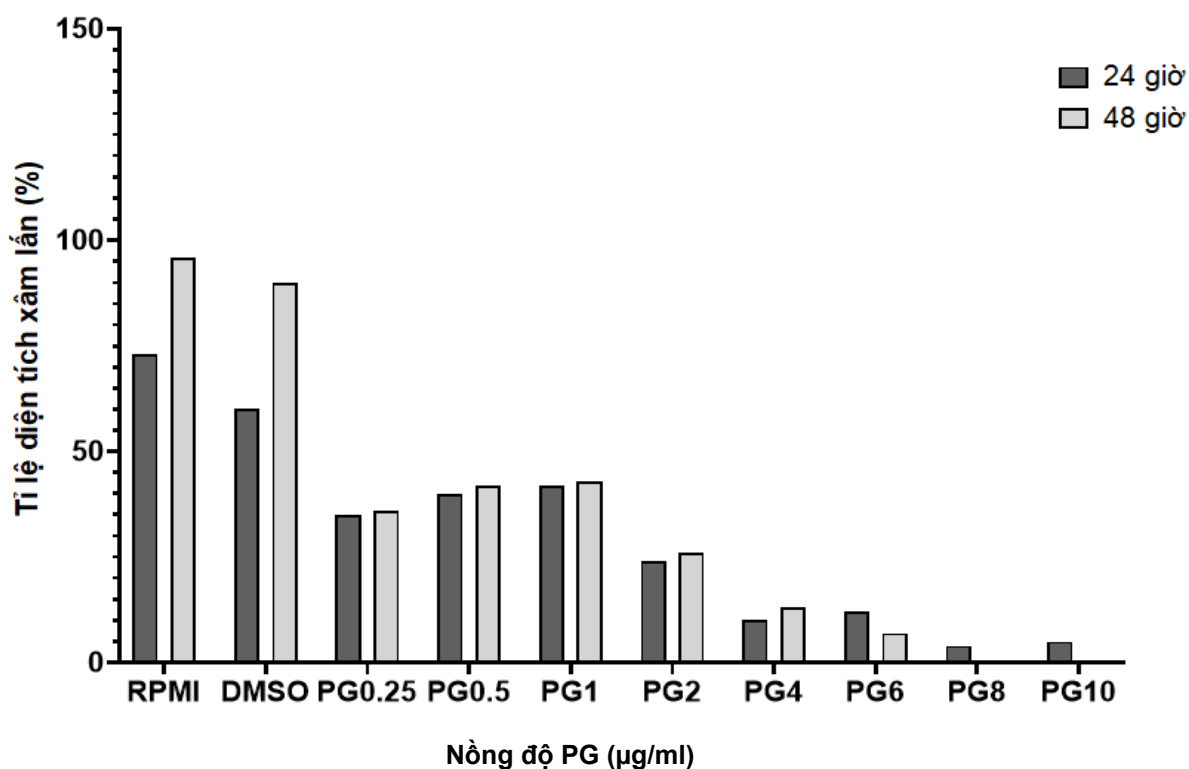


Hình 3.13: Hình ảnh tế bào Hep3B tiếp xúc với PG ở các nồng độ 4 – 10 µg/ml tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ (4 – 10: Tế bào được bổ sung PG ở các nồng độ từ 4 – 10 µg/ml)

❖ **Kết quả đo diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep3B tiếp xúc với PG**

Bảng 3.9: Kết quả đo tỉ lệ diện tích xâm lấn khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ của tế bào Hep3B tiếp xúc với PG

Nồng độ PG ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ diện tích xâm lấn (%)		
	0 giờ	24 giờ	48 giờ
10	0	5	0
8	0	4	0
6	0	12	7
4	0	10	13
2	0	24	26
1	0	42	43
0.5	0	40	42
0.25	0	35	36
DMSO	0	60	90
Đôi chứng (RPMI)	0	73	96



Biểu đồ 3.9: Kết quả so sánh tỷ lệ (%) diện tích di cư và xâm lấn che phủ khoảng trống của vết rạch tế bào sau 0 giờ, 24 giờ và 48 giờ tế bào Hep3B tiếp xúc với PG

Từ kết quả đánh giá khả năng di cư và xâm lấn của tế bào ung thư gan Hep3B bằng thí nghiệm scratch assay sau khi tiếp xúc với PG (0,25–10 µg/ml), sau khi quy ước các giá trị âm về 0%, có thể thấy PG ức chế rõ rệt quá trình che phủ khoảng trống theo hướng phụ thuộc nồng độ và thời gian. Ở nhóm DMSO, tế bào vẫn di cư mạnh, tỷ lệ che phủ tăng từ 60% (24 giờ) lên 90% (48 giờ), gần với nhóm đối chứng là 73% (24 giờ) và 96% (48 giờ), chứng tỏ DMSO không gây ảnh hưởng đáng kể đến khả năng di cư và xâm lấn của Hep3B. Ngược lại, ở các nồng độ PG cao, hiệu quả ức chế thể hiện rất rõ: tại 10 µg/ml và 8 µg/ml, mức che phủ chỉ 5% và 4% sau 24 giờ, và ở 48 giờ các giá trị lần lượt –32% và –3% được hiệu chỉnh về 0%, cho thấy tế bào không có khả năng đóng vết rạch (ức chế gần như hoàn toàn di cư/xâm lấn) khi tiếp xúc PG ở nồng độ cao.

Ở 6 µg/ml, tế bào che phủ 12% (24 giờ) và 7% (48 giờ), vẫn thấp hơn rất nhiều so với ĐC/DMSO, chứng tỏ tác dụng ức chế mạnh vẫn duy trì ở nồng độ này. Khi giảm nồng độ xuống 4 – 0,25 µg/ml, tỷ lệ che phủ tăng dần nhưng vẫn thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng: 4 µg/ml (10 – 13%), 2 µg/ml (24 – 26%), 1 µg/ml (42 – 43%), 0,5 µg/ml (40 – 42%), và 0,25 µg/ml (35 – 36%) ở 24 – 48 giờ.

Nhìn chung, sau khi chuẩn hóa dữ liệu (giá trị âm → 0%), kết quả khẳng định PG ức chế mạnh quá trình di cư và xâm lấn của Hep3B, đặc biệt ở 8 – 10

$\mu\text{g/ml}$ (0% đóng vết rạch tại 48 giờ), còn các nồng độ thấp hơn vẫn làm giảm đáng kể khả năng che phủ khoảng trống so với nhóm đối chứng và DMSO.

3.2. THẢO LUẬN

Hiện nay, ung thư đang là một trong những thách thức lớn đối với nền y tế toàn cầu với gần 20 triệu ca mắc mới và gần 9,7 triệu trường hợp tử vong theo thống kê của GLOBOCAN 2022. Trong tiến trình phát triển của khối u ác tính, xâm lấn và di căn được xem là giai đoạn then chốt quyết định mức độ nguy hiểm của bệnh. Do đó, việc kiểm soát sự tăng sinh và lan rộng của tế bào ung thư đóng vai trò quan trọng trong chiến lược điều trị. Mặc dù thuốc chống ung thư truyền thống đạt được hiệu quả điều trị nhất định, nhưng độ đặc hiệu của chúng kém và tác dụng phụ là không thể tránh khỏi. Trước thực tế đó, xu hướng tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên với hiệu quả cao và độ an toàn tốt hơn ngày càng được chú trọng. Trong số đó, các chất chuyển hóa thứ cấp từ vi sinh vật đang được khai thác rộng rãi như một nguồn tiềm năng cho việc phát triển thuốc chống ung thư và kháng khuẩn. Prodigiosin là sắc tố đỏ thuộc họ prodiginine mang nhiều hoạt tính như kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch,... và đặc biệt là khả năng điều trị ung thư.

❖ Kết quả nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư:

Các dòng tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B đều thích nghi tốt với điều kiện *in vitro*, thể hiện qua khả năng bám dính, tăng sinh ổn định và hình thái tế bào đặc trưng. Sau khi nuôi cấy đến độ phủ thích hợp (khoảng 80 – 90%), các tế bào tạo thành lớp đơn (monolayer) liên tục, đồng đều. Đây là điều kiện để tạo mô hình đánh giá đảm bảo có giới rõ ràng và có thể theo dõi quá trình di chuyển của tế bào theo thời gian.

Việc tạo vết rạch trên lớp tế bào có độ rộng tương đối đồng nhất, không làm bong tróc lớp tế bào xung quanh quá mức. Sau khi loại bỏ tế bào rời bằng PBS, các tế bào còn lại bám chắc và duy trì hình thái ổn định, chứng tỏ tạo được mô hình. Trong điều kiện nuôi cấy bình thường (Không bổ sung PG), các tế bào ở vùng rìa vết rạch bắt đầu di chuyển vào khoảng trống theo thời gian, thể hiện khả năng di cư xâm lấn đặc trưng của tế bào ung thư. Điều này khẳng định mô hình *in vitro* được thiết lập có khả năng phản ánh tương đối chính xác quá trình di chuyển và xâm lấn của tế bào. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jonkman và cộng sự năm 2014 khi khảo sát sự tăng sinh và xâm lấn của tế bào.

Việc lựa chọn các mốc thời gian 24 giờ và 48 giờ để theo dõi sự khép vết rạch là phù hợp và có cơ sở khoa học. Tại thời điểm 24 giờ, quá trình di chuyển của tế bào đã được khởi động rõ rệt, các tế bào bắt đầu lấp đầy một phần khoảng trống,

cho phép đánh giá giai đoạn sớm của quá trình di cư. Đây là thời điểm nhạy để phát hiện những thay đổi ban đầu về khả năng di chuyển của tế bào dưới tác động của các yếu tố nghiên cứu. Trong khi đó, tại mốc 48 giờ, mức độ khép vết xước trở nên rõ ràng hơn, phản ánh tổng hợp cả quá trình di chuyển và tăng sinh của tế bào. Sự khác biệt giữa các nhóm (đối chứng và xử lý) ở thời điểm này thường thể hiện rõ rệt hơn, giúp đánh giá chính xác hiệu quả ức chế di cư và tăng sinh.

Ngoài ra, việc lựa chọn hai mốc thời gian này còn giúp tránh các sai lệch có thể xảy ra nếu thời gian nuôi cấy quá ngắn (chưa đủ để quan sát sự di chuyển) hoặc quá dài (vết xước đã khép hoàn toàn, khó phân tích sự khác biệt giữa các nhóm). Do đó, các mốc 24 giờ và 48 giờ được xem là tối ưu để theo dõi động học của quá trình wound healing trong điều kiện in vitro.

Tổng hợp các kết quả thu được cho thấy việc nuôi cấy các dòng tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B đã được thực hiện thành công, đồng thời mô hình được thiết lập ổn định, có tính lặp lại và phù hợp để đánh giá khả năng di cư, xâm lấn cũng như tác động của các hợp chất nghiên cứu trên tế bào ung thư.

❖ **Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế của PG đối với tế bào ung thư bằng kỹ thuật MTT**

Một cơ chế ức chế tế bào ung thư khác của PG là khả năng tương tác và chèn trực tiếp vào DNA cùng với khả năng ức chế topoisomerase I và topoisomerase II. PG có thể gây cản trở quá trình sinh học quan trọng như phiên mã bằng cách chèn vào giữa các cặp base của DNA, làm cấu trúc xoắn kép của DNA trở nên kém ổn định. Khi đó, các enzyme tháo xoắn như topoisomerase I và II sẽ bị ức chế hoạt động, gây ra sự đứt gãy mạch DNA, kích hoạt đáp ứng tổn thương DNA và các điểm kiểm soát chu kỳ tế bào. Ở giai đoạn đầu, PG mới chỉ ức chế một phần, tuy nhiên khi mức độ tổn thương vượt qua mức tự sửa chữa của tế bào, gây ra apoptosis trên tế bào ung thư [66].

Ngoài tác động lên DNA, PG còn ảnh hưởng đến pH nội bào của tế bào ung thư, trong đó có protein p38-MAPK- protein giúp tế bào phản ứng với những điều kiện bất lợi như rối loạn chức năng ty thể, tổn thương DNA. Sự xuất hiện của PG khiến protein p38-MAPK bị phosphoryl hóa, tế bào ung thư sẽ bị ức chế tăng trưởng, dẫn đến tín hiệu chết tế bào trở nên rõ rệt hơn, gây apoptosis [67].

Hiện nay có nhiều nghiên cứu về ung thư và nghiên cứu về hoạt chất PG kháng tế bào ung thư. PG có thể kích hoạt apoptosis qua ty thể, làm rối loạn cân bằng pH nội bào, ảnh hưởng đến chu kỳ tế bào, tổn thương DNA, ức chế khả năng di cư xâm lấn của tế bào. Cụ thể, PG làm thay đổi tỉ lệ Bax/Bcl-2, kéo theo hoạt hóa caspase, phân mảnh DNA và gây apoptosis và PG không phụ thuộc vào p53. Năm

2018, Yongze Liu và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đánh giá tác dụng của PG kết hợp với fluorouracil (5-FU) trên tế bào ung thư biểu mô vòm họng người CNE2 và tế bào biểu mô vòm họng bình thường NP69. Kết quả cho thấy cả prodigiosin và 5-FU đều có khả năng ức chế quá trình di cư và xâm lấn của tế bào ung thư, tương tự như hiệu quả của các thuốc hóa trị thông thường.

Ở mức độ phân tử, prodigiosin còn khả năng điều hòa biểu hiện của các protein chống apoptosis thuộc họ Bcl-2 như Bcl-2, MCL-1 và Bcl-xL. Đồng thời, PG thúc đẩy hoạt động của các protein gây apoptosis như Bax và Bak. Sự thay đổi cân bằng giữa các protein này dẫn đến hình thành các lỗ trên màng ty thể, tạo điều kiện cho cytochrome c được giải phóng vào bào tương và kích hoạt chuỗi phản ứng caspase, cuối cùng gây chết tế bào.

Nghiên cứu của Montaner và cộng sự đưa ra giả thuyết rằng PG gây ra apoptosis tế bào thông qua sự hoạt hóa phosphoryl hóa p38-MAPK. Trong khi đó, Yamamoto và cộng sự cho rằng cơ chế chống ung thư của PG liên quan đến khả năng hoạt hóa vận chuyển ion H^+ và Cl^- qua màng tế bào, từ đó làm rối loạn hoạt động của enzyme V-ATPase, gây axit hóa nội bào và dẫn đến chết tế bào theo chương trình. Zhang và cộng sự cũng đã nghiên cứu tác dụng ức chế của PG trên dòng tế bào ung thư tuyến tụy H8898. Các xét nghiệm MTT cho thấy IC_{50} của PG đến H8898 là 75 μmol .

Tương tự như các nghiên cứu của Yongze Liu và cộng sự (2018), công trình của Zhang cùng cộng sự, cũng các thí nghiệm trước đây của nhóm nghiên cứu đánh giá hoạt tính của PG đối với dòng tế bào Hep3B nhưng được tách chiết từ chủng *S. marcescens* HVQY. Nghiên cứu chúng tôi tập trung đánh giá tác dụng của prodigiosin trong việc ức chế sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của các tế bào ung thư phổi H460, tế bào ung thư thanh quản Hep-2 và tế bào ung thư gan Hep3B bằng các xét nghiệm MTT, tính IC_{50} và mô hình đánh giá sự di cư và xâm lấn của tế bào ung thư.

Trong thí nghiệm MTT, cả 3 dòng tế bào đều cho kết quả giá trị OD giảm mạnh khi tăng nồng độ và thời gian so với nhóm đối chứng. Kết quả này phù hợp với cơ chế PG làm giảm hoạt động chuyển hóa, ảnh hưởng pH nội bào, gây rối loạn chu trình sống của tế bào, khiến tốc độ tăng sinh giảm trước khi gây ra apoptosis.

Từ phương trình hồi quy tuyến tính, thu được kết quả IC_{50} giảm khi kéo dài thời gian tiếp xúc giữa tế bào và PG ở cả 2 dòng tế bào. Sự khác biệt của giá trị IC_{50} tại cùng một thời điểm của tế bào H460, Hep-2 và Hep3B có thể phản ánh sự khác nhau về mặt sinh học giữa 2 dòng: trạng thái P53/caspase, mức độ chuyển hóa ty thể,... Đối chiếu với nghiên cứu tương tự của Lapenda và cộng sự năm 2020 về tình

sạch PG từ *S. marcescens* cũng ghi nhận độc tính đáng kể trên nhiều dòng ung thư với giá trị IC_{50} là 3,4 $\mu\text{g/ml}$, tiệm cận với giá trị IC_{50} của nghiên cứu này.

❖ **Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự di cư và xâm lấn tế bào ung thư của PG in vitro**

PG còn có khả năng ức chế sự di cư của tế bào ung thư. Ở mức độ phân tử, việc tái cấu trúc bộ xương actin quyết định đến khả năng di chuyển của tế bào ung thư. RhoA là một thành phần quan trọng trong quá trình này, giúp tạo lực kéo, ổn định hình thái cho tế bào ung thư. Tiếp theo, MMP-2 – một enzyme tiêu biểu góp phần phá vỡ hàng rào chất nền ngoại bào và màng đáy, giúp tế bào có thể tiến sâu hơn và xâm lấn vào trong mô. PG có khả năng làm suy yếu RhoA và MMP-2, khiến cho khả năng di chuyển và xâm lấn của tế bào ung thư bị ức chế rõ rệt [39].

Kết quả thí nghiệm chứng tỏ PG có khả năng ức chế sự di cư và xâm lấn của tế bào ung thư. Ở nồng độ thấp và trung bình, tế bào ung thư vẫn sống nhưng khả năng xâm lấn đã giảm so với nhóm đối chứng; ở nồng độ cao, diện tích xâm lấn không tăng, thậm chí còn giảm nhẹ chứng tỏ độc tính của PG đối với tế bào ung thư. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Zhang và cộng sự năm 2005 về khả năng làm giảm RhoA và ức chế MMP-2 – hai yếu tố quan trọng liên quan đến quá trình tái cấu trúc actin và phá hủy ECM khi di cư và xâm lấn của tế bào ung thư. Ngoài ra, PG có thể ảnh hưởng đến các yếu tố điều hòa di cư như bộ xương tế bào (actin), RhoA và các metalloproteinase (MMPs), từ đó làm giảm khả năng xâm lấn của tế bào ung thư [11].

So sánh với nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu về hoạt tính của PG đối với dòng tế bào ung thư Hep3B. Kết quả nghiên cứu cho thấy prodigiosin thu nhận từ chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR tái tổ hợp có khả năng ức chế sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của tế bào ung thư gan Hep3B theo xu hướng phụ thuộc nồng độ và thời gian xử lý. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Minh Trung và cộng sự (2021) về hoạt tính chống ung thư của prodigiosin trên dòng tế bào Hep3B in vitro, qua đó tiếp tục khẳng định tiềm năng ứng dụng của prodigiosin trong điều trị ung thư gan.

Về mặt tương đồng, cả hai nghiên cứu đều ghi nhận prodigiosin có khả năng làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào Hep3B, đồng thời ức chế quá trình di cư và xâm lấn của tế bào ung thư. Xu hướng đáp ứng phụ thuộc nồng độ cũng được quan sát nhất quán, khi hiệu quả ức chế tăng lên theo sự gia tăng nồng độ prodigiosin. Bên cạnh đó, các kết quả đều cho thấy tế bào Hep3B là đối tượng nhạy cảm với tác động của prodigiosin, phản ánh tiềm năng của hợp chất này trong việc kiểm soát sự phát triển và lan rộng của tế bào ung thư gan. Sự tương đồng về xu

hướng tác động giữa các nghiên cứu được thực hiện ở những thời điểm và điều kiện khác nhau góp phần nâng cao độ tin cậy của các kết quả thu được, đồng thời cho thấy hoạt tính chống ung thư của prodigiosin có tính ổn định và khả năng tái lập tốt.

Tuy nhiên, bên cạnh những điểm tương đồng về kết quả, hai nghiên cứu có sự khác biệt đáng kể về cách tiếp cận và phương pháp thực hiện. Nghiên cứu hiện tại sử dụng prodigiosin được thu nhận từ chủng *Serratia* sp. HVQY-IGR tái tổ hợp mang gen mã hóa PigC, trong khi nghiên cứu của Đỗ Minh Trung và cộng sự sử dụng nguồn prodigiosin từ chủng *Serratia* sp. HVQY. Việc khai thác chủng vi khuẩn tái tổ hợp không chỉ tạo ra sự khác biệt về nguồn nguyên liệu mà còn phản ánh hướng tiếp cận mới trong sản xuất hợp chất sinh học có hoạt tính chống ung thư. Do đó, mặc dù cùng đánh giá tác động của prodigiosin trên dòng tế bào Hep3B, nghiên cứu hiện tại không đơn thuần lặp lại nghiên cứu trước mà còn mở rộng phạm vi đánh giá đối với một nguồn prodigiosin mới có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn.

Một số chỉ tiêu định lượng trong nghiên cứu hiện tại cũng có sự khác biệt nhất định so với kết quả đã được công bố. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ nhiều nguyên nhân. Trước hết, nguồn gốc và quy trình thu nhận prodigiosin giữa các nghiên cứu không hoàn toàn giống nhau. Hàm lượng hoạt chất, độ tinh sạch cũng như sự hiện diện của các thành phần tạp chất còn tồn dư sau quá trình chiết tách và tinh chế có thể ảnh hưởng đến mức độ đáp ứng của tế bào. Những yếu tố này có khả năng làm thay đổi giá trị IC_{50} cũng như mức độ ức chế di cư và xâm lấn được ghi nhận.

Ngoài ra, sự khác nhau về phương pháp đánh giá cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả thu được. Trong các thí nghiệm khảo sát khả năng di cư và xâm lấn, các yếu tố như kích thước vết rạch ban đầu trong thử nghiệm wound healing, phương pháp xử lý hình ảnh, cách tính toán diện tích di cư hoặc phương pháp đếm số lượng tế bào xâm lấn cùng với thời gian tiếp xúc đều có thể làm thay đổi giá trị định lượng cuối cùng. Hơn nữa, sai khác sinh học vốn có giữa các lô tế bào hoặc giữa các lần nuôi cấy cũng là nguyên nhân thường gặp dẫn đến sự biến động của kết quả thực nghiệm.

Đáng chú ý, sự không trùng lặp về phương pháp giữa hai nghiên cứu lại là một yếu tố làm tăng giá trị khoa học của các kết quả thu được. Khi cùng một xu hướng tác động của prodigiosin được ghi nhận từ các nguồn vật liệu khác nhau, trong các điều kiện thí nghiệm khác nhau và bằng các phương pháp đánh giá khác nhau, độ tin cậy của bằng chứng về hoạt tính chống ung thư của hợp chất này được

củng cố mạnh mẽ hơn. Điều này cho thấy hiệu quả ức chế tế bào Hep3B của prodigiosin không chỉ phụ thuộc vào một quy trình thực nghiệm cụ thể mà có khả năng được tái lập trong nhiều bối cảnh nghiên cứu khác nhau.

Mặc dù tồn tại một số khác biệt về giá trị định lượng, xu hướng chung giữa nghiên cứu hiện tại và nghiên cứu của Đỗ Minh Trung và cộng sự là tương đồng. Cả hai nghiên cứu đều khẳng định prodigiosin có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào Hep3B, đồng thời làm giảm đáng kể khả năng di cư và xâm lấn của tế bào ung thư gan. Những điểm tương đồng này cho thấy tác dụng chống ung thư của prodigiosin trên dòng tế bào Hep3B có tính ổn định và có thể được tái lập trong các điều kiện nghiên cứu khác nhau. Kết quả thu được không chỉ củng cố cơ sở khoa học cho việc tiếp tục nghiên cứu cơ chế tác động của prodigiosin mà còn mở ra triển vọng ứng dụng hợp chất này trong phát triển các chiến lược hỗ trợ điều trị ung thư gan trong tương lai.

Kết quả cho thấy PG có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B cũng như có hoạt tính tương tự đối với sự di cư và xâm lấn của các tế bào ung thư này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã nuôi cấy tăng sinh và tạo mô hình tế bào ung thư để đánh giá hoạt tính của prodigiosin từ vi khuẩn tái tổ hợp:
 - Tế bào nuôi cấy ổn định, đủ số lượng qua các lần cấy chuyển.
 - Mô hình tế bào tạo được sẽ kết thúc thử nghiệm sau thời gian 48 giờ.
2. Prodigiosin có hoạt tính ức chế sự tăng sinh 3 dòng tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B:
 - Các kết quả của thí nghiệm đều cho thấy PG ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư phụ thuộc vào nồng độ và thời gian thử nghiệm.
 - Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) của dòng tế bào H460: 7,95 µg/ml ở 24 giờ và 3,21 µg/ml ở 48 giờ; dòng tế bào Hep-2: 6,75 µg/ml ở 24 giờ và 3,92 µg/ml ở 48 giờ; dòng tế bào Hep3B: 4,66 µg/ml ở 24 giờ và 1,53 µg/ml ở 48 giờ.
3. Đánh giá được hoạt tính PG ức chế khả năng di cư và xâm lấn của tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B:
 - PG có hoạt tính ức chế sự di cư và xâm lấn của tế bào ung thư H460, Hep-2 và Hep3B theo nồng độ và thời gian thử nghiệm.
 - Sau 48 giờ thử nghiệm, dòng tế bào H460, Hep-2 và Hep3B có diện tích che phủ trên bề mặt đĩa nuôi cấy bị giảm so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

KIẾN NGHỊ

Đề tài đã đánh giá được hoạt tính ức chế tế bào ung thư của prodigiosin trên dòng tế bào H460, Hep-2 và Hep3B. Do điều kiện và thời gian có hạn, để hoàn thiện hơn đề tài cần tiếp tục nghiên cứu tiếp:

- Cần tiếp tục nghiên cứu và đánh giá prodigiosin trên nhiều dòng tế bào ung thư và tế bào bình thường khác.
- Nghiên cứu hoạt tính PG gây đứt gãy DNA, apoptosis và các thử nghiệm khác đánh giá khả năng ức chế sự di cư và xâm lấn trên các dòng tế bào ung thư và thử nghiệm trên mô hình động vật.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

❖ Tiếng Việt:

1. Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Lê Đình Quyền, 2015, Tinh sạch và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của sắc tố đỏ Prodigiosin từ *Serratia marcescens*, *Tạp chí khoa học*, 37(1se), tr. 210-216.
69. Đỗ Minh Trung, Đỗ Quyết, Hồ Anh Sơn, Phạm Thế Tài, Nguyễn Lĩnh Toàn, Đỗ Thị Tuyên, Mai Thị Minh Ngọc, Nguyễn Thị Ngọc Hà, 2021, Nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh, di cư và xâm lấn của prodigiosin trên dòng tế bào ung thư gan Hep3B *in vitro*, *Tạp chí nội khoa Việt Nam*, 21, tr. 41-49.

❖ Tiếng Anh:

2. Yip C.H., Yarkoni O., Ajioka J., Wan K.L., Nathan S., 2019, Recent advancements in high-level synthesis of the promising clinical drug, prodigiosin, *Applied Microbiology Biotechnology*, 103(4), pp. 1667–1680.
3. Shaikh Z., 2016, Biosynthesis of Prodigiosin and Its Applications, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 11(6), pp. 1–28.
4. Pérez-Tomás R. and Viñas M., 2010, New insights on the antitumoral properties of prodiginines, *Current Medicinal Chemistry*, 17(21), pp. 2222–2231.
5. Pijuan J., Barceló C., Moreno D.F., Maiques O., Sisó P., Marti R.M., 2019, In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis, *Front Cell Development Biology*, 7, p. 107.
6. Harris A.K.P., Williamson N.R., Slater H., Cox A., Abbasi S., Foulds I., 2005, Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylopyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*, *Molecular Microbiology*, 56(4), pp. 971–989.
7. Chidambaram K., Lakshmanaperumalsamy P., 2009, An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin, *Electronic journal of biology*, 5(3), pp. 49–61.
8. Ladetto M.F., Gantner M.E., Rodenak-Kladniew B.E., Rodriguez S., Cuestas M.L., Talevi A., Castro G.R., 2025, Promising Prodiginins Biological Activities, *Chemistry & Biodiversity*, 11(8), 2171.
9. Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P.C., 2006, The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines, *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), pp. 887–899.

10. Montaner B., Pérez-Tomás R., 2001, Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells, *Life Science*, 68(17), pp. 2025–2036.
11. Lapenda J.C.L., Alves V.P., Adam M.L., Rodrigues M.D., Nascimento S.C., 2020, Cytotoxic Effect of Prodigiosin, Natural Red Pigment, Isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398, *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), pp. 182–195.
12. Anita K., Mazaheri Assadi M., Fakhr F., 2006, Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*, *OnLine Journal of Biological Sciences*, 6(1), pp. 1-13.
13. Domröse A., Klein A.S., 2015, Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*, *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 972.
14. Loeschke A., Thies S., 2015, *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp. 6197–6214.
15. Herráez R., Mur A., Merlos A., Viñas M., Vinuesa T., 2019, Using prodigiosin against some gram-positive and gram-negative bacteria and *Trypanosoma cruzi*, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 25, p. e20190001.
16. Lu Y., Liu D., Jiang R., Li Z., Gao X., 2024, Prodigiosin: unveiling the crimson wonder – a comprehensive journey from diverse bioactivity to synthesis and yield enhancement, *Frontiers in Microbiology*, 15, Article 1412776.
17. Harris A.K.P., Williamson N.R., Slater H., Cox A., Abbasi S., Foulds I., 2004, The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation, *Microbiology (Reading)*, 150(11), pp. 3547–3560.
18. Sakai-Kawada F.E., Ip C.G., Hagiwara K.A., Awaya J.D., 2019, Biosynthesis and Bioactivity of Prodiginine Analogs in Marine Bacteria, *Pseudoalteromonas: A Mini Review*, *Front in Microbiology*, 10, p. 1715.
19. Huda N., Hassan N., Ali H., Kang Y., 2025, Regulation and molecular biology of prodigiosin by *Serratia marcescens*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 45(8), pp. 1680–1699.
20. Danevčič T., Vezjak M.B., Zorec M., Stopar D., 2016, Prodigiosin - A Multifaceted *Escherichia coli* Antimicrobial Agent, *PLOS ONE*, 11(9), p.9-15.
21. Darshan N., Manonmani H.K., 2015, Prodigiosin and its potential applications, *Journal of Food Science Technology*, 52(9), pp. 5393–5407.

22. Francisco R., Pérez-Tomás R., Giménez-Bonafé P., Soto-Cerrato V., Giménez-Xavier P., Ambrosio S., 2007, Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines, *Eur.J.Pharmacol*, 572(2–3) pp. 111–119.
23. Wier R.H., Egeberg R.O., Lack A.R., Leiby G., 1952, A clinical trial of prodigiosin in disseminated coccidioidomycosis, *The American Journal of the Medical Sciences*, 224(1), pp. 70–76.
24. Guryanov I, Naumenko E., 2024, Bacterial Pigment Prodigiosin as Multifaceted Compound for Medical and Industrial Application, *Applied Microbiology*, 4, pp. 1702–1728.
25. Suryawanshi R.K., Koujah L., Patil C.D., Ames J.M., Agelidis A., Yadavalli T., Patil S.V., Shukla D., 2020, Bacterial Pigment Prodigiosin Demonstrates a Unique Antiherpesvirus Activity That Is Mediated through Inhibition of Prosurvival Signal Transducers,” *Journal of Virology*, 94(13), pp. e00251-20.
26. Han S.B., Park S.H., Jeon Y.J., Kim Y.K., Kim H.M., Yang K.H., 2001, Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin-2R α expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis, *Journal of Pharmacology and Experiment Therapeutics*, 299(2), pp. 415–425.
27. Chen Y., Luo G., Chen S., Zhang D., Xie W., Wang Z., Zheng W., Xu H., 2021, The potential of prodigiosin for control of *Prorocentrum donghaiense* blooms: Algicidal properties and acute toxicity to other marine organisms at various trophic levels, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, p. 112913.
28. Li D., Liu J., 2018, Biological Potential and Mechanism of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Subsp. *lawsoniana* in Human Choriocarcinoma and Prostate Cancer Cell Lines, *International Journal of Molecular Science*, 19(11), pp. 3465.
29. Díaz-Ruiz C., Montaner B., Pérez-Tomás R., 2001, Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1, *Histol Histopathol*, 16(2), pp. 415–421.
30. Moss J.E., Aliprantis A.O., 1999, The Regulation of Apoptosis by Microbial Pathogens, 187, pp. 203–259.
31. Leber M.F. and Efferth T., 2009, Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review), *International Journal of Oncology*, 34(4), pp. 881–895.
32. Nakashima T., Tamura T., Kurachi M., Yamaguchi K., Oda T., 2006, Apoptosis-mediated cytotoxicity of prodigiosin-like red pigment produced by γ -*Proteobacterium* and its multiple bioactivities, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(12), pp. 2289–2295.

33. Iranpour M., Moghadam A.R., Yazdi M., Ande S.R., Alizadeh J., Wiechec E., 2016, Apoptosis, Autophagy and Unfolded Protein Response Pathways in Arbovirus Replication and Pathogenesis, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18.
34. Mapari S.A.S., Nielsen K.F., 2005, Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), pp. 231–238.
35. Sam M.R., Pourpak R.S., 2017, Regulation of p53 and survivin by prodigiosin compound derived from *Serratia marcescens* contribute to caspase-3-dependent apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells, *Human and Experimental Toxicology*, 37(6), pp. 608–617.
36. Soto-Cerrato V., Viñals F., Lambert J.R., Pérez-Tomás R., 2007, The anticancer agent prodigiosin induces p21WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway, *Biochemical Pharmacology*, 74(9), pp. 1340–1349.
37. Wang Z., Li B., Zhou L., 2016, Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), pp. 13150–13155.
38. Liu J., Xiao Q., Xiao J., 2022, Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), p. 3.
39. Zhang J., Shen Y., Liu J., Wei D., 2005, Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion, *Biochemical Pharmacology*, 69(3), pp. 407–414.
40. Espona-Fiedler M., Soto-Cerrato V., Hosseini A., 2012, Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: Prodigiosin vs. obatoclax, *Biochemical pharmacology*, 83, pp. 489–496.
41. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z., 2010, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell*, 141(1), pp. 52–67.
42. Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B., 2011, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, 1, pp. 1806–1815.
43. Namazkar S., Ahmad W.A., 2013, Spray-dried Prodigiosin from *Serratia marcescens* As A colorant, *Biosciences of Biotechnology Research Asia*, 10(1), pp. 69–76.
44. Priya K., Sathianeson S., Balasubramaniam A., Varalakshmi P., Gopal S., Natesan S., 2013, Antifouling Activity of Prodigiosin from Estuarine Isolate of

- Serratia marcescens* CMST 07, *Microbiological Research in Agroecosystem Management*, XVI, pp. 11–21.
45. Krishna J.G, Basheer S., Elyas K., Muthusamy C., 2011, Prodigiosin from Marine Bacterium: Production, Characterization and Application as Dye in Textile Industry, *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7, pp. 155–191.
 46. Alihosseini F., Ju K.S., Lango J., Hammock B.D., Sun G., 2008, Antibacterial Colorants: Characterization of Prodiginines and Their Applications on Textile Materials, *Biotechnology Progress*, 24(3), pp. 742–747.
 47. Montagni T., Enciso P., Marizcurrena J.J., Castro-Sowinski S., Fontana C., Davyt D., Cerdá M.F., 2018, Dye sensitized solar cells based on Antarctic *Hymenobacter* sp. UV11 dyes, *Environmental Sustainability*, 1(1), pp. 89–97.
 48. Yusupova D.V., Gabdrakhmanova L.A., Kurkina M.A., Guryanov I.D., 2009, Identification method of marked oil products. *Russian Federation Patent No. RU, 2368645 C2*.
 49. Anjana S., Rathinamala J.C., Jayashree S., 2014, The role of red pigment prodigiosin from bacteria of earthworm gut as an anticancer agent, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 04, pp. 246–251.
 50. Montaner B., Pérez-Tomás R., 2003, The prodigiosins: a new family of anticancer drugs, *Current Cancer Drug Targets*, 3(1), pp. 57–65.
 51. Hong B., Varun V., 2014, Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53, *American Association for Cancer Research*, 74(4), pp. 1153–1165.
 52. Montaner B., Navarro S., 2000, Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines, *British Journal of Pharmacology*, 131(3), pp. 585–593.
 53. Pérez-Tomás R., Montaner B., 2003, Effects of the proapoptotic drug prodigiosin on cell cycle-related proteins in Jurkat T cells,” *Histology and Histopathology*, 18(2), pp. 379–385.
 54. World Health Organization, 2018, Cancer, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
 55. National Cancer Institute, 2015, What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
 56. Friedl P., Wolf K., 2003, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms, *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), pp. 362–374.
 57. International Agency for Research on Cancer, 2024, Viet Nam fact sheet (GLOBOCAN 2022, Version 1.1). *Global Cancer Observatory*.

58. Huang J., Chan S. C., Ko S., Lok V., Zhang L., Lin X., Lucero-Prisno D.E., Xu W., Zheng Z.J., Elcarte E., Withers M., Wong M.C.S., 2024, Updated disease distributions, risk factors, and trends of laryngeal cancer: a global analysis of cancer registries, *International Journal of Surgery*, 110(2), pp. 810–819.
59. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., 2004, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol Rev*, 56(2), pp. 185–229.
60. Chen J., Stubbe J., 2005, Bleomycins: towards better therapeutics, *Nat Rev Cancer*, 5(2), pp. 102–112.
61. Koba M., Konopa J., 2005, Actinomycin D and its mechanisms of action, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 59, pp. 290–298.
62. Bollag D. M., McQueney P.A., Zhu J., Hensens O. Koupal L. Liesch J., Goetz M., Lazarides E., Woods C.M., 1995, Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action, *Cancer Res*, 55(11), pp. 2325–2333.
63. C Campàs C., Dalmau M., 2003, Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia*, 17(4), pp. 746–750.
64. Liu Y., Zhou H., Ma X., Lin C., Lu L., Liu D., Ma D., Gao X., Qian X.Y., 2018, Prodigiosin Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Nasopharyngeal Cancer Cells, *Cell Physiology Biochemistry*, 48(4), pp. 1556–1562.
65. Aykul S., Martinez-Hackert E., 2016, Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis, *Analytical Biochemistry*, 508, pp. 97–103.
66. Montaner B., Castillo-Avila W., Martinell M., Ollinger R., Aymami J., Giralt E., & Pérez-Tomás R., 2005, DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin, *Toxicological Sciences*, 85(2), pp. 870–879.
67. Montaner B., Pérez-Tomás R., 2002, The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/JNK, *Toxicology Letters*, 129(1–2), pp. 93–98.
68. Jonkman J.E.N., Cathcart J A., Xu, F., Bartolini M.E., Amon J.E., Stevens K.M., Colarusso P., 2014, An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy, *National Library of Medicine*, 8(5), pp. 440-451.