

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Thị Huyền

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG GÂY ĐỘC CỦA α -MANGOSTIN TỪ VỎ
QUẢ MĂNG CỤT TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ THẦN KINH ĐỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

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



Đỗ Thị Huyền

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG GÂY ĐỘC CỦA α -MANGOSTIN TỪ VỎ
QUẢ MĂNG CỤT TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ THẦN KINH ĐỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. LÊ THỊ THUYỀN DƯƠNG

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Thuy', is placed to the right of the printed name 'TS. LÊ THỊ THUYỀN DƯƠNG'.

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Đỗ Thị Huyền

LỜI CẢM ƠN

Em xin gửi gửi cảm ơn sâu sắc tới TS. Lê Thị Thuỳ Dương người đã định hướng ý tưởng nghiên cứu, nhiệt tình hướng dẫn em các thí nghiệm và chỉ dạy kiến thức chuyên môn giúp em hoàn thành tốt luận văn. Sự động viên và khích lệ của cô đã giúp em có thêm động lực tìm tòi, khám phá và kiên trì với những ý tưởng của mình. Đó là điều may mắn lớn nhất mà em có được trong những bước đầu của con đường nghiên cứu khoa học.

Em xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên thuộc phòng Hoá sinh miễn dịch đã giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện đề tài. Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô, các anh chị Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Vacxin và ADN ứng dụng, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất để em thực hiện đề tài.

Em xin cảm ơn sự giúp đỡ tận tình, tạo tất cả các điều kiện thuận lợi cho em của ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các ban phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ để em hoàn thành luận văn trong thời gian học tập và nghiên cứu tại Học viện.

Cuối cùng, em xin cảm ơn sự giúp đỡ tận tình của bạn bè, sự động viên, tạo điều kiện của những người thân trong gia đình trong suốt quá trình em hoàn thành luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn

Hà Nội, ngày 22 tháng 6 năm 2026

Học viên



Đỗ Thị Huyền

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về ung thư thần kinh	3
1.1.1. Tổng quan về ung thư thần kinh	3
1.1.2. Các đặc trưng sinh học của tế bào ung thư.....	5
1.1.3. Các giai đoạn tiến triển của tế bào ung thư.....	6
1.2. Một số mô hình thử nghiệm thuốc chống ung thư hiện nay	7
1.2.1. Mô hình in vitro	7
1.2.2. Mô hình in vivo.....	7
1.2.3. Mô hình in silico.....	8
1.3. Vỏ quả măng cụt	9
1.3.1. Giới thiệu chung về măng cụt.....	9
1.3.2. Thành phần hoá học trong vỏ quả măng cụt.....	10
1.3.3. Hoạt tính sinh học của các chất từ vỏ quả măng cụt	11
1.3.4. Tác dụng kháng ung thư của α -mangostin	12
1.3.5. Tổng quan về tách chiết và tinh sạch α -mangostin từ vỏ quả măng cụt	13
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.2. Thiết bị và hoá chất	17
2.2.1. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu	17
2.2.2. Hoá chất sử dụng	17
2.3. Phương pháp nghiên cứu	18
2.3.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập α-mangostin từ vỏ quả măng cụt . 18	
2.3.1.1. Quy trình chiết xuất.....	18
2.3.1.2. Phân đoạn dung môi và tinh sạch bằng sắc ký cột	18
2.3.1.3. Đánh giá độ tinh sạch và cấu trúc hoá học của hợp chất thu được	19
2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học	20
2.3.2.1. Phương pháp hoạt hoá và nhân nuôi dòng tế bào U-87MG.....	20

2.3.2.2. Phương pháp thử độc tính tế bào (MTS)	20
2.3.2.3. Phương pháp điện di đơn tế bào	21
2.3.2.4. Phương pháp đánh giá hình thái ty thể	21
2.3.2.5. Phương pháp đánh giá điện thế màng ty thể.....	22
2.3.2.6. Phân tích apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI.....	22
2.3.2.7. Western Blot	23
2.3.2.8. Mô phỏng docking phân tử.....	24
2.3.2.9. Phương pháp phân tích thống kê.....	24
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của α -mangostin	25
3.2. Kết quả khảo sát độc tính của α -mangostin trên mô hình dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87MG.	30
3.3. Kết quả ảnh hưởng của α -mangostin lên DNA nhân tế bào U-87MG.....	33
3.4. Kết quả ảnh hưởng của α -mangostin đến hình thái và điện thế màng ty thể của tế bào U-87MG.	35
3.5. Đánh giá tác dụng gây apoptosis của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG	39
3.6. Kết quả mô phỏng docking phân tử giữa α -mangostin và AKT1, GSK3 β	45
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ.....	53
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	54

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)
GBM	Glioblastoma multiforme
IARC	International Agency for Research on Cancer (Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế)
NF1	Neurofibromatosis type 1
NF2	Neurofibromatosis type 2
GEMMs	Genetically Engineered Mouse models (mô hình chuột biến đổi gen)
PDX	Patient-Derived Xenograft
SOD	Superoxide Dismutase
CAT	Catalase
ATCC	American Type Culture Collection (ngân hàng nuôi cấy tế bào Mỹ)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography - Sắc ký lỏng hiệu năng cao
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Phosphate-buffered saline
BSA	Albumin huyết thanh bò
MMP	Mitochondrial Membrane Potential

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Bản đồ toàn cầu trình bày các loại ung thư phổ biến nhất năm 2022 tại mỗi quốc gia.....	3
Hình 1.2. Các đặc trưng sinh học cơ bản của tế bào ung thư.....	6
Hình 1.3. Sơ đồ tổng quan các mô hình thử nghiệm trong phát triển thuốc chống ung thư.....	9
Hình 2.1. Sơ đồ tổng quan thiết kế nghiên cứu và quy trình thực nghiệm	18
Hình 3.1. Sắc ký phổ HPLC của hợp chất phân lập được.....	26
Hình 3.2. Phổ khối ion hóa điện tử phân giải cao (ESI-MS) của α -mangostin	26
Hình 3.3. Kết quả phổ FTIR của hợp chất thu được.....	27
Hình 3.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất α -mangostin.....	28
Hình 3.5. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất α -mangostin	28
Hình 3.6. Cấu trúc hoá học và các tương tác HMBC chính của hợp chất α -mangostin.....	29
Hình 3.7. Tế bào U-87 MG khi ủ α -mangostin ở các nồng độ khác nhau sau 48 giờ ủ ($10\times$).....	31
Hình 3.8. Ảnh hưởng của α -mangostin lên khả năng sống của tế bào U-87MG....	32
Hình 3.9. Ảnh hưởng của α -mangostin lên khả năng sống của tế bào fibroblast....	32
Hình 3.10. Ảnh hưởng của α -mangostin lên DNA tế bào.....	34
Hình 3.11. Hình thái ty thể và nhân tế bào ở tế bào U87MG được xử lý bằng α -mangostin.....	37
Hình 3.12. Ảnh hưởng của α -mangostin lên điện thế màng ty thể.....	38
Hình 3.13. Định lượng tế bào apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI sau khi xử lý với α -mangostin.....	40
Hình 3.14. α -Mangostin làm thay đổi mức biểu hiện của AKT, GSK3 β , Bax và Bcl-2 trong tế bào U-87MG.....	43
Hình 3.15. Tương tác docking phân tử giữa α -mangostin với AKT1 và GSK3 β	46

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Năng lượng liên kết tự do và các gốc acid amin tham gia tương tác của α -mangostin với các isoform AKT và GSK3 β	47
---	----

MỞ ĐẦU

Ung thư là một trong những thách thức y tế toàn cầu lớn nhất của thế kỷ XXI, với gánh nặng ngày càng gia tăng cả về tỷ lệ mắc lẫn tỷ lệ tử vong. Theo Báo cáo Ung thư Toàn cầu năm 2022 của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), mỗi năm trên thế giới có hàng chục triệu ca mắc mới và hàng triệu ca tử vong liên quan đến ung thư. Trong số các loại ung thư, ung thư não và đặc biệt là u nguyên bào thần kinh đệm (glioblastoma multiforme, GBM) được xem là dạng ác tính nhất, chiếm tỷ lệ cao nhất trong các khối u thần kinh đệm. Bệnh lý này đặc trưng bởi tốc độ phát triển nhanh, khả năng xâm lấn mạnh vào mô não lành và tỷ lệ tái phát rất cao sau điều trị. Dù đã có những tiến bộ trong chẩn đoán hình ảnh, phẫu thuật, xạ trị và hóa trị, tiên lượng sống của bệnh nhân GBM vẫn rất hạn chế. Thời gian sống trung vị chỉ khoảng 14–16 tháng, tỷ lệ sống sau 5 năm dưới 10%. Bởi vậy việc tìm kiếm những loại thuốc/độc chất mới đặc trị kháng u, kháng viêm cũng như hỗ trợ điều trị và phòng bệnh là hết sức cần thiết và cấp bách. Mặc dù trong y học hiện đại đã có những bước phát triển trong việc tổng hợp các loại thuốc điều trị bệnh ung thư nhưng tới nay chưa có thuốc nào được cho là hoàn toàn hiệu quả và an toàn.

Thực vật và các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật từ lâu đã được xem là nguồn cung cấp các tác nhân tiềm năng trong điều trị ung thư, nhờ đặc điểm độc tính thấp, khả năng dung nạp tốt và tác động đa cơ chế lên tế bào ung thư. Nhiều nghiên cứu cho thấy các chất chuyển hóa thứ cấp từ thực vật có thể ức chế sự phát triển của tế bào ung thư thông qua nhiều cơ chế khác nhau như gây tổn thương DNA, cảm ứng apoptosis và điều hòa các trục tín hiệu quan trọng như RAS/ERK, PI3K/Akt hay con đường ty thể. Vốn là một đất nước được thiên nhiên ưu đãi, nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa, Việt Nam có một thảm thực vật vô cùng phong phú và đa dạng với rất nhiều loài thực vật khác nhau. Từ nhiều thế kỷ nay, thực vật không chỉ là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho con người mà còn là những phương thức chữa bệnh hết sức quý giá. Trong bối cảnh các phương pháp điều trị ung thư hiện nay vẫn còn nhiều hạn chế về hiệu quả lâu dài và tác dụng phụ, việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, có khả năng tác động đa cơ chế và độc tính thấp đang trở thành một hướng nghiên cứu đầy triển vọng. Trong số các hợp chất tự nhiên, α -mangostin – một xanthone được tìm thấy chủ yếu trong vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) – đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học nổi bật như kháng viêm, chống oxy hóa và đặc biệt là khả năng gây độc tế bào ung thư. Một số nghiên cứu trên các dòng tế bào ung thư như ung thư vú, đại trực tràng và gan cho thấy hợp chất này có thể tác động lên nhiều đích phân tử, bao gồm stress oxy hóa, chức năng ty thể và các trục tín hiệu nội bào quan trọng. Tuy nhiên, các nghiên cứu này vẫn còn rời rạc và thiếu tính hệ thống. Bên cạnh đó, các nghiên cứu chủ động tách chiết, phân lập hợp chất này từ nguồn nguyên liệu trong nước, đồng thời sử dụng xuyên suốt cho các đánh giá sinh học vẫn còn hạn chế. Điều này đặt ra nhu cầu xây dựng quy trình phân

lập ổn định nhằm đảm bảo tính đồng nhất và độ tin cậy của hợp chất sử dụng trong nghiên cứu. Đồng thời, các nghiên cứu mô phỏng *in silico* nhằm dự đoán tương tác giữa α -mangostin và protein đích cũng còn hạn chế và ít được liên kết trực tiếp với dữ liệu thực nghiệm. Do đó, việc làm sáng tỏ cơ chế tác động của α -mangostin từ hợp chất được phân lập trực tiếp từ nguồn nguyên liệu tự nhiên, không chỉ góp phần bổ sung tri thức về dược lý của các hợp chất tự nhiên mà còn mở ra hướng tiếp cận mới trong phát triển các liệu pháp điều trị ung thư thần kinh đệm. Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài **“Nghiên cứu tác dụng gây độc của α -mangostin từ vỏ quả măng cụt trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm”** với mục tiêu nghiên cứu như sau:

* *Mục tiêu tổng quát:*

Đánh giá tác dụng gây độc tế bào và bước đầu làm rõ cơ chế tác động của α -Mangostin được phân lập từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana*) trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87 MG.

* *Mục tiêu cụ thể:*

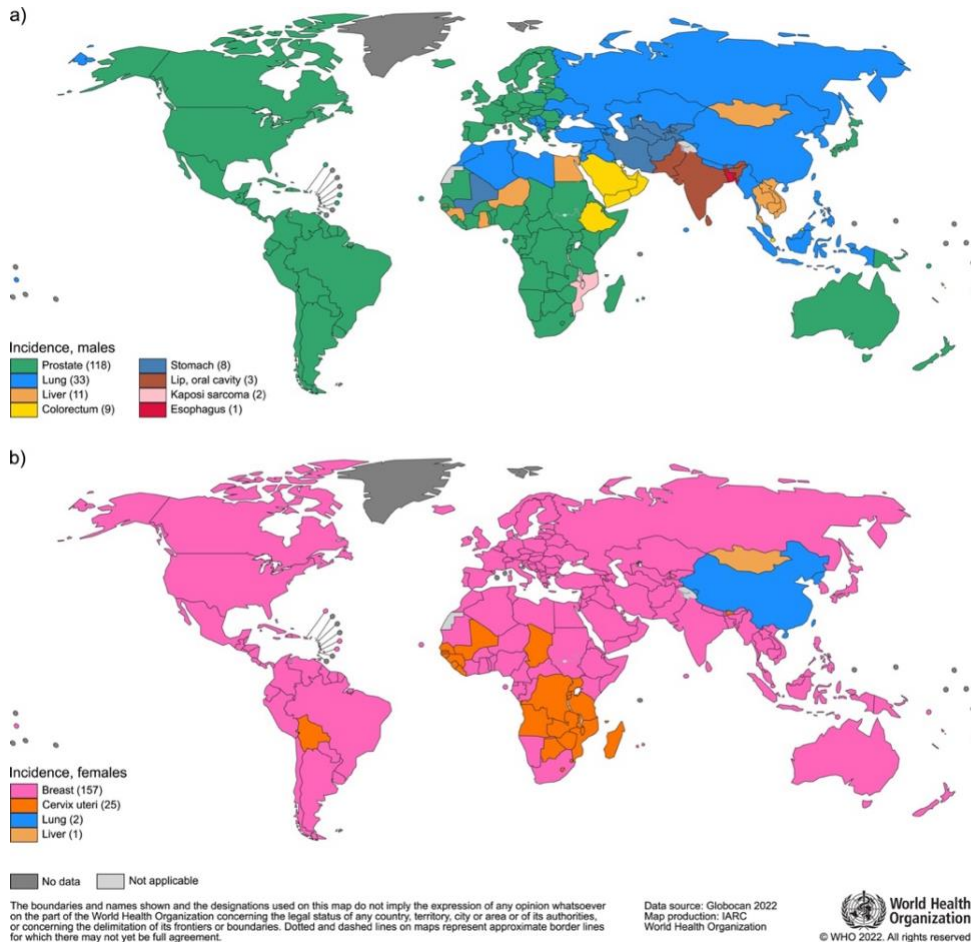
- (i) Phân lập, tinh sạch và xác định cấu trúc của α -mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana*).
- (ii) Đánh giá tác dụng gây độc tế bào và khả năng gây tổn thương DNA của α -mangostin trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87 MG.
- (iii) Phân tích ảnh hưởng của α -mangostin lên hình thái ty thể tế bào, điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi_m$) và các protein liên quan đến quá trình apoptosis cũng như trực tiếp hiệu sống còn AKT/GSK3 β nhằm bước đầu làm rõ cơ chế tác dụng của hợp chất.
- (iv) Khảo sát tương tác phân tử giữa α -mangostin và các protein đích thông qua mô phỏng *in silico*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về ung thư thần kinh

1.1.1. Tổng quan về ung thư thần kinh

Ung thư hiện được xem là một trong những thách thức y tế lớn nhất toàn cầu trong thế kỷ XXI. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC), năm 2022, toàn cầu ghi nhận khoảng 20 triệu ca mắc mới và 9,7 triệu ca tử vong do ung thư. Dự báo đến năm 2050, số ca mắc mới có thể vượt ngưỡng 35 triệu ca mỗi năm, tương ứng với mức tăng hơn 75% so với năm 2022 [1]. Sự gia tăng này chủ yếu bắt nguồn từ quá trình già hóa dân số, sự phát triển kinh tế – xã hội dẫn đến thay đổi lối sống, cùng với sự gia tăng tỷ lệ tiếp xúc với các yếu tố nguy cơ như hút thuốc lá, tiêu thụ rượu bia, chế độ ăn uống không lành mạnh, thừa cân–béo phì và lối sống không lành mạnh [2].



Hình 1.1. Bản đồ toàn cầu trình bày các loại ung thư phổ biến nhất năm 2022 tại mỗi quốc gia

Các loại ung thư phổ biến trên toàn cầu bao gồm: ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư dạ dày và ung thư gan. Trong đó, ung thư vú là loại ung thư có tỷ lệ mắc cao nhất, chiếm khoảng 11,6% tổng số ca mắc mới, trong khi ung thư phổi vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư, với khoảng 1,8 triệu ca tử vong mỗi năm [3]. Mặc dù các loại ung thư phổ biến như ung thư vú,

phổi, gan hay đại trực tràng đang chiếm tỷ trọng lớn trong gánh nặng bệnh tật toàn cầu, vẫn tồn tại một nhóm ung thư tuy ít gặp hơn nhưng lại đặc biệt ác tính và khó điều trị – đó là các loại ung thư có nguồn gốc từ hệ thần kinh. Trong nhóm này, ung thư thần kinh bao gồm các khối u khởi phát từ tế bào thần kinh trung ương hoặc ngoại biên, với các đặc điểm sinh học và lâm sàng riêng biệt, đã và đang trở thành thách thức không nhỏ trong thực hành lâm sàng hiện đại. Tính chất tiến triển nhanh, vị trí giải phẫu phức tạp và khả năng kháng lại nhiều liệu pháp điều trị thông thường khiến ung thư thần kinh, dù ít phổ biến hơn, vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư ở trẻ em và góp phần đáng kể vào gánh nặng ung thư nói chung.

Theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), các khối u thần kinh trung ương được phân loại dựa trên đặc điểm mô học kết hợp với các dấu ấn phân tử. Các khối u thần kinh trung ương bao gồm medulloblastoma, neuroblastoma, u màng não (meningioma) và u bao Schwann (schwannoma). Trong đó, u thần kinh đệm (glioma) là nhóm phổ biến nhất, bao gồm astrocytoma, oligodendroglioma và glioblastoma.

U thần kinh đệm là nhóm khối u nguyên phát phổ biến nhất của hệ thần kinh trung ương, bao gồm astrocytoma, oligodendroglioma và glioblastoma. Theo thống kê toàn cầu, u thần kinh đệm chiếm khoảng 30% tổng số u não nguyên phát và gần 80% các khối u ác tính trong não. Trong đó, glioblastoma (GBM) là dạng ác tính cao nhất (WHO grade IV), với đặc trưng xâm lấn mạnh, tiến triển nhanh và tiên lượng rất kém; thời gian sống trung bình của bệnh nhân thường dưới 15 tháng sau chẩn đoán, ngay cả khi được điều trị tích cực. Về dịch tễ, tỷ lệ mắc glioblastoma trên thế giới dao động khoảng 3–5 ca/100.000 dân mỗi năm và có xu hướng gia tăng, đặc biệt ở nhóm người lớn tuổi [4]. Tại Việt Nam, mặc dù chưa có hệ thống ghi nhận ung thư não toàn diện, các báo cáo lâm sàng cho thấy glioma nói chung và glioblastoma nói riêng chiếm tỷ lệ đáng kể trong các u não được chẩn đoán tại các trung tâm thần kinh lớn, với xu hướng phát hiện ngày càng nhiều trong những năm gần đây.

Mặc dù các phác đồ điều trị hiện nay như phẫu thuật kết hợp xạ trị và hóa trị với temozolomide đã góp phần cải thiện thời gian sống của bệnh nhân glioblastoma, hiệu quả điều trị tổng thể vẫn còn hạn chế. Nguyên nhân chủ yếu xuất phát từ khả năng kháng trị cao của tế bào u, tính dị hợp nội khối u và khả năng xâm lấn mạnh, khiến bệnh dễ tái phát sau điều trị [5]. Bên cạnh đó, các phương pháp điều trị hiện hành thường đi kèm với tác dụng phụ đáng kể. Hóa trị với temozolomide có thể gây ức chế tủy xương, giảm bạch cầu và tiểu cầu, làm tăng nguy cơ nhiễm trùng [6]. Xạ trị có thể dẫn đến tổn thương mô não lành, suy giảm nhận thức và rối loạn chức năng thần kinh. Các liệu pháp nhắm trúng đích như bevacizumab tuy có thể cải thiện triệu chứng tạm thời nhưng cũng liên quan đến tăng nguy cơ huyết khối, tăng huyết áp và rối loạn lành vết thương [7]. Những tác dụng không mong muốn này không chỉ ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị lâu dài mà còn làm suy giảm chất lượng sống của bệnh nhân. Trước những thách thức này, việc tìm

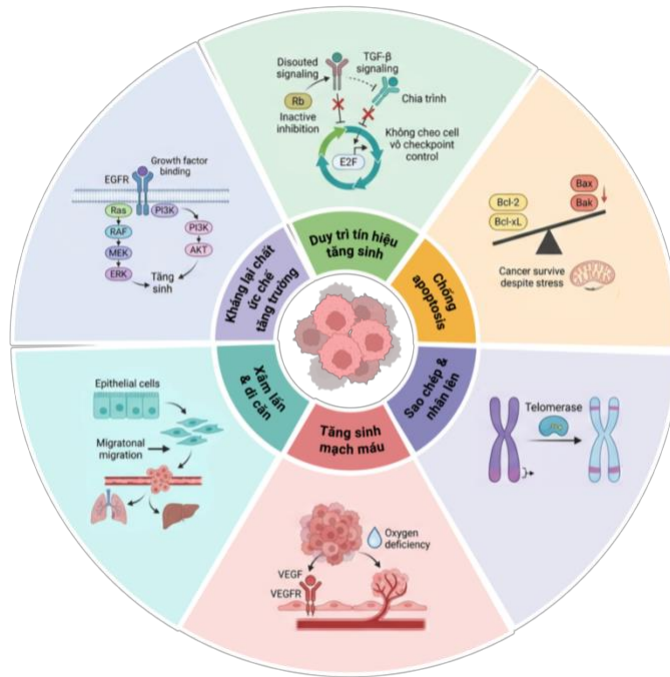
kiểm các tác nhân điều trị mới có hiệu quả cao hơn và độc tính thấp hơn trở thành một hướng nghiên cứu cấp thiết. Trong đó, các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đang được quan tâm do khả năng tác động đa cơ chế lên tế bào ung thư, bao gồm điều hòa tăng sinh, cảm ứng apoptosis và ảnh hưởng đến các trục tín hiệu nội bào. Tuy nhiên, các bằng chứng về hiệu quả cũng như cơ chế tác động của các hợp chất này trên glioblastoma vẫn còn hạn chế, đặt ra nhu cầu cần có thêm các nghiên cứu chuyên sâu trong lĩnh vực này.

1.1.2. Các đặc trưng sinh học của tế bào ung thư

Ung thư là kết quả của sự tích lũy các biến đổi di truyền và biểu sinh, dẫn đến rối loạn kiểm soát tăng trưởng, phân bào và chết theo chương trình của tế bào. Các biến đổi này có thể bắt nguồn từ yếu tố ngoại sinh như hóa chất, bức xạ, vi sinh vật hoặc từ yếu tố nội sinh như lỗi sao chép DNA, stress oxy hóa và viêm mạn tính. Hệ quả là sự thay đổi hoạt tính của các gen sinh ung, gen ức chế khối u và hệ thống sửa chữa DNA, thúc đẩy quá trình chuyển dạng ác tính [8]. Những đặc trưng này hình thành thông qua quá trình chọn lọc tiến hóa ở cấp độ tế bào. Theo Hanahan và Weinberg, tế bào ung thư mang các đặc trưng sinh học cơ bản như Hình 1.2 bao gồm:

- *Duy trì tín hiệu tăng sinh*: thông qua hoạt hóa các con đường như Ras/ERK và PI3K/AKT do tăng biểu hiện yếu tố tăng trưởng hoặc đột biến thụ thể (ví dụ EGFR)[9].
- *Kháng lại các chất ức chế tăng trưởng*: Các cơ chế kiểm soát chu kỳ tế bào như Rb và TGF- β thường bị bất hoạt do đột biến hoặc thay đổi biểu hiện, làm mất kiểm soát phân bào và thúc đẩy tăng sinh không kiểm soát [10].
- *Chống lại quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis)*: Tế bào ung thư làm rối loạn cân bằng giữa các protein thuộc họ Bcl-2, trong đó tăng các protein kháng apoptosis (Bcl-2, Bcl-xL) và giảm các protein tiền apoptosis (Bax, Bak) [11].
- *Đặc tính sao chép và nhân lên*: Tế bào ung thư duy trì chiều dài telomere thông qua hoạt hóa telomerase cho phép phân chia kéo dài và vượt qua giới hạn lão hóa [12].
- *Kích thích tăng sinh mạch máu*: Tình trạng thiếu oxy trong vi môi trường khối u là yếu tố chính thúc đẩy biểu hiện các yếu tố tăng trưởng mạch máu, đặc biệt là VEGF. VEGF sau đó hoạt hóa các thụ thể VEGFR trên tế bào nội mô, dẫn đến tăng sinh, di chuyển và hình thành các mạch máu mới. Quá trình này không chỉ hỗ trợ sự phát triển của khối u mà còn góp phần tạo điều kiện tế bào ung thư xâm nhập vào hệ tuần hoàn và di căn [13].
- *Xâm lấn và di căn*: liên quan đến chuyển đổi biểu mô – trung mô (EMT) và tương tác với vi môi trường khối u, cho phép tế bào lan rộng và hình thành khối u thứ phát [14].

Đối với ung thư hệ thần kinh, bên cạnh các đặc điểm chung, còn ghi nhận các bất thường phân tử đặc trưng như hoạt hóa các gen MYCN, ALK hoặc EGFR [15, 16], góp phần thúc đẩy tăng sinh và kháng apoptosis. Đồng thời, các khối u này thường có khả năng tân sinh mạch mạnh và xu hướng lan rộng theo trục thần kinh hoặc di căn qua đường máu, làm tăng tính ác tính và gây khó khăn trong điều trị.



Hình 1.2. Các đặc trưng sinh học cơ bản của tế bào ung thư

1.1.3. Các giai đoạn tiến triển của tế bào ung thư

Quá trình tiến triển của ung thư không diễn ra một cách đột ngột mà là kết quả của sự tích lũy nhiều biến đổi di truyền và thay đổi sinh học trong tế bào qua từng giai đoạn, từ tế bào bình thường chuyển hóa thành tế bào ác tính có khả năng xâm lấn và di căn.

- *Giai đoạn khởi đầu:* Tế bào bị tổn thương DNA do các tác nhân như hóa chất, bức xạ hoặc yếu tố sinh học, dẫn đến đột biến ở các gen quan trọng như TP53, RAS, RB1. Tế bào chưa tăng sinh bất thường nhưng đã hình thành nền tảng cho quá trình ung thư hóa [9].
- *Giai đoạn thúc đẩy:* Các tế bào đã tổn thương bắt đầu tăng sinh dưới tác động của viêm mạn tính, hormone hoặc chất sinh ung. Quá trình này làm tích lũy thêm đột biến và mất dần kiểm soát chu kỳ tế bào, nhưng vẫn chưa có khả năng xâm lấn.
- *Khi tiến sang giai đoạn tiến triển:* Tế bào tích lũy thêm nhiều biến đổi, dẫn đến rối loạn toàn diện tăng sinh và apoptosis. Đồng thời, các cơ chế như tân sinh mạch, biến đổi chuyển hóa và EMT được hoạt hóa, chuẩn bị cho quá trình xâm lấn [17]. Bên cạnh đó, vi môi trường khối u bị biến đổi theo hướng hỗ trợ sự phát triển và tồn tại của tế bào ung thư
- *Giai đoạn lan nhanh:* Tế bào ung thư tăng sinh nhanh, hình thành khối u rõ rệt. Khối u kích thích viêm và tân sinh mạch, tạo điều kiện cho tăng trưởng và làm tăng tính đa dạng di truyền.
- *Cuối cùng, giai đoạn di căn:* Đây là bước ngoặt quan trọng và nguy hiểm nhất trong tiến trình ung thư. Tế bào ung thư xâm nhập vào hệ tuần hoàn hoặc bạch huyết, di chuyển

đến cơ quan xa và hình thành khối u thứ phát. Quá trình này đòi hỏi khả năng thích nghi với môi trường mới và né tránh hệ miễn dịch, là nguyên nhân chính gây tử vong [18].

1.2. Một số mô hình thử nghiệm thuốc chống ung thư hiện nay

1.2.1. Mô hình *in vitro*

Ở cấp độ cơ bản, mô hình nuôi cấy tế bào hai chiều (2D) là công cụ phổ biến để đánh giá đặc tính sinh học và hiệu quả của các tác nhân điều trị. Trong mô hình này, tế bào được nuôi trên bề mặt phẳng trong môi trường giàu dinh dưỡng và phát triển thành lớp bám dính. Ưu điểm của phương pháp là đơn giản, chi phí thấp, dễ kiểm soát điều kiện và thuận lợi cho các xét nghiệm như đánh giá khả năng sống, apoptosis hoặc tăng sinh [19]. Tuy nhiên, do thiếu cấu trúc không gian và các tương tác với vi môi trường, mô hình 2D chưa phản ánh đầy đủ đặc tính của khối u *in vivo*, dẫn đến sai khác trong đáp ứng thuốc [20]. Để khắc phục hạn chế này, mô hình nuôi cấy ba chiều (3D) được phát triển, cho phép tế bào hình thành các cấu trúc spheroid trong ma trận sinh học. Mô hình này tái hiện tốt hơn tương tác tế bào – tế bào, sự phân bố oxy và khả năng thâm nhập thuốc, từ đó hỗ trợ nghiên cứu cơ chế kháng thuốc hiệu quả hơn [21]. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, chi phí cao và khó chuẩn hóa do tính không đồng nhất của cấu trúc nuôi cấy. Ở mức độ tiên tiến hơn, mô hình organoid được phát triển từ tế bào gốc hoặc tế bào ung thư của bệnh nhân, cho phép tái tạo cấu trúc, chức năng và tính không đồng nhất của mô gốc. Nhờ đó, mô hình này phản ánh sát hơn đặc điểm sinh học và đáp ứng điều trị của khối u, đồng thời mở ra hướng tiếp cận cá thể hóa [22]. Tuy vậy, kỹ thuật nuôi cấy organoid vẫn phức tạp, chi phí cao và chưa thể thay thế hoàn toàn mô hình *in vivo*.

Trong nghiên cứu ung thư, mô hình *in vitro* – đặc biệt là nuôi cấy tế bào ung thư – vẫn đóng vai trò nền tảng trong giai đoạn tiền lâm sàng, giúp sàng lọc nhanh các hợp chất có hoạt tính sinh học và đánh giá độc tính cũng như cơ chế tác động ở cấp độ tế bào. Dù chưa thể tái hiện đầy đủ vi môi trường khối u, mô hình này vẫn là công cụ hiệu quả để phát hiện các tín hiệu sinh học tiềm năng và định hướng cho các nghiên cứu sâu hơn trên mô hình *in vivo*. Trong nghiên cứu này, mô hình *in vitro* được sử dụng như một hệ thống sàng lọc ban đầu nhằm đánh giá nhanh tiềm năng gây độc và cơ chế tác động của α -mangostin trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87MG.

1.2.2. Mô hình *in vivo*

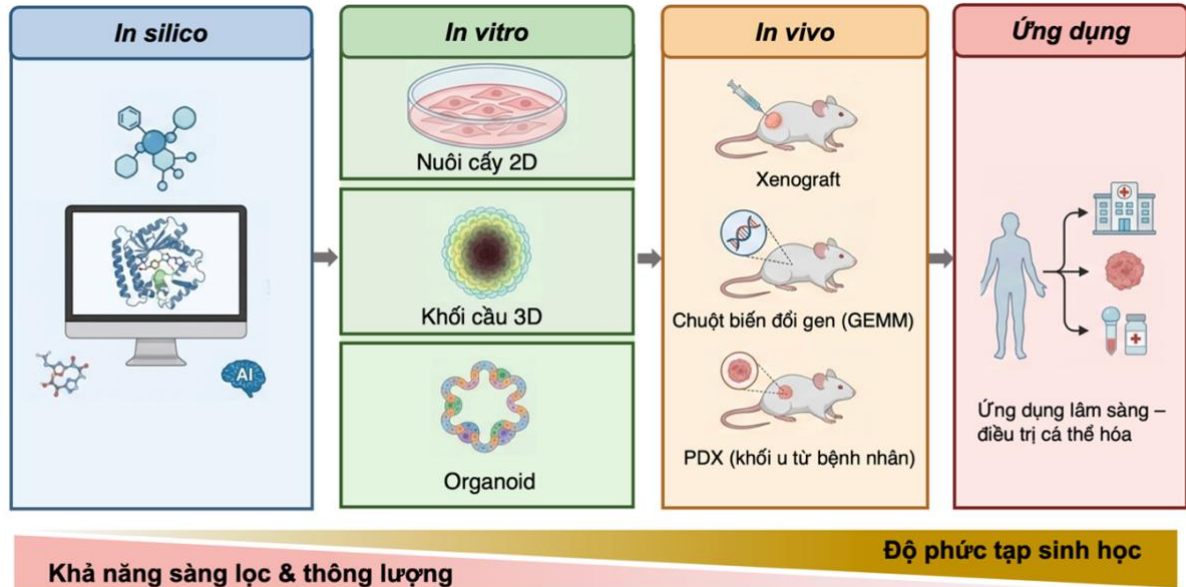
Trong nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư, các mô hình *in vitro* như nuôi cấy tế bào 2D và 3D cung cấp thông tin về tác động trực tiếp của hoạt chất lên tế bào. Tuy nhiên, các mô hình này chưa phản ánh đầy đủ môi trường sinh học phức tạp của khối u trong cơ thể, do đó mô hình *in vivo* trở thành bước cần thiết để đánh giá hiệu quả và độ an toàn trong điều kiện sinh lý thực tế. Chuột thí nghiệm là mô hình *in vivo* phổ biến nhờ chi phí thấp và dễ thao tác. Mô hình xenograft cho phép cấy tế bào ung thư vào chuột suy giảm miễn dịch để đánh giá sự phát triển khối u và đáp ứng thuốc, nhưng hạn

chế ở việc thiếu vai trò của hệ miễn dịch [23]. Các mô hình chuột biến đổi gen (GEMMs) sử dụng công nghệ Cre-loxP hoặc CRISPR/Cas9 giúp mô phỏng quá trình sinh ung trong môi trường miễn dịch hoàn chỉnh, dù phức tạp và tốn thời gian [24, 25]. Ngoài ra, mô hình khối u từ bệnh nhân (PDX) duy trì đặc điểm sinh học và di truyền của khối u bệnh nhân, hỗ trợ nghiên cứu cá thể hóa điều trị [26]. Mặc dù cung cấp thông tin quan trọng về tăng sinh, di căn, dược động học và độc tính, các mô hình *in vivo* vẫn tồn tại hạn chế về khác biệt liên loài, chi phí và vấn đề đạo đức, do đó cần kết hợp với các mô hình *in vitro* để tăng độ tin cậy của nghiên cứu.

1.2.3. Mô hình *in silico*

Mô hình *in silico* sử dụng các phương pháp mô phỏng máy tính để dự đoán tương tác sinh học, đặc tính dược lý và hiệu quả của các hợp chất mà không cần thử nghiệm trực tiếp trên tế bào hay động vật. Đây là công cụ quan trọng trong nghiên cứu ung thư hiện đại, giúp tiết kiệm thời gian, chi phí và giảm phụ thuộc vào các mô hình sinh học truyền thống. Các kỹ thuật phổ biến gồm docking phân tử để dự đoán ái lực và vị trí liên kết, mô phỏng động lực học phân tử để đánh giá sự ổn định cấu trúc theo thời gian và các thuật toán học máy trong dự đoán độc tính, hấp thu và chuyển hóa thuốc. Nhờ đó, *in silico* cho phép sàng lọc nhanh số lượng lớn hợp chất và lựa chọn các ứng viên tiềm năng cho nghiên cứu tiếp theo [27, 28]. Trong nghiên cứu ung thư, mô hình này hỗ trợ phân tích tương tác thuốc–đích, thiết kế thuốc nhắm trúng đích và dự đoán cơ chế kháng thuốc [29]. Tuy nhiên, đây chỉ là công cụ dự đoán và cần được kiểm chứng bằng các mô hình *in vitro* và *in vivo*. Sự phát triển của trí tuệ nhân tạo và tính toán hiệu năng cao đang mở rộng tiềm năng của *in silico*, góp phần thúc đẩy phát triển thuốc cá thể hóa trong tương lai. Việc thiếu sự tích hợp giữa sàng lọc *in silico* và kiểm chứng thực nghiệm, dẫn đến hai xu hướng tách rời: các nghiên cứu tính toán chỉ dừng lại ở mức dự đoán mà không được xác thực sinh học và các nghiên cứu *in vitro* tiến hành thử nghiệm trên số lượng hợp chất hạn chế mà chưa có bước sàng lọc định hướng ban đầu. Điều này làm giảm hiệu quả phát hiện hợp chất tiềm năng cũng như chưa tối ưu hóa được nguồn lực nghiên cứu. Trong bối cảnh các hợp chất tự nhiên ngày càng được quan tâm, các nghiên cứu thường tập trung vào đánh giá hoạt tính sinh học riêng lẻ mà chưa khai thác đầy đủ công cụ *in silico* để dự đoán đích tác động phân tử, cơ chế tương tác và khả năng hiệp đồng. Việc thiếu các phân tích docking, mô phỏng động lực học phân tử hoặc dự đoán ADMET ngay từ đầu khiến quá trình lựa chọn hợp chất cho thí nghiệm *in vitro* kéo dài thời gian và giảm tính định hướng của nghiên cứu. Một khoảng trống quan trọng là chưa có nhiều nghiên cứu tích hợp đa tầng (multi-scale integration), trong đó dữ liệu từ *in silico* (tương tác phân tử, ổn định cấu trúc, dự đoán dược động học) được sử dụng để thiết kế và tối ưu các thí nghiệm *in vitro* (chọn nồng độ, đích protein, pathway phân tích) và tiếp tục xác thực trên mô hình *in vivo*. Sự thiếu liên kết này hạn chế khả năng giải thích cơ chế tác dụng một cách toàn diện, đặc biệt trong các bệnh lý phức tạp như ung

thư não. Do đó, việc xây dựng một chiến lược nghiên cứu kết hợp sàng lọc *in silico* định hướng – kiểm chứng *in vitro* – và xác nhận *in vivo* là cần thiết nhằm thu hẹp khoảng trống giữa dự đoán và thực nghiệm. Cách tiếp cận này không chỉ nâng cao độ tin cậy của kết quả mà còn góp phần phát hiện chính xác hơn các ứng viên tiềm năng, đặc biệt trong nghiên cứu phát triển thuốc nhắm trúng đích và liệu pháp cá thể hóa.



Hình 1.3. Sơ đồ tổng quan các mô hình thử nghiệm trong phát triển thuốc chống ung thư. Hình minh họa quy trình phát triển và đánh giá thuốc chống ung thư thông qua các mô hình nghiên cứu từ *in silico*, *in vitro*, *in vivo* đến ứng dụng lâm sàng.

1.3. Vỏ quả măng cụt

1.3.1. Giới thiệu chung về măng cụt

Cây măng cụt (tên khoa học *Garcinia mangostana* L.), thuộc họ *Clusiaceae*, là một loài cây ăn quả nhiệt đới phổ biến tại các quốc gia Đông Nam Á như Thái Lan, Indonesia, Malaysia và Việt Nam [30]. Tại Việt Nam, măng cụt được trồng chủ yếu ở các tỉnh phía Nam như Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Nai và Cần Thơ – nơi có khí hậu nóng ẩm và đất phù sa thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây. Cây măng cụt có kích thước trung bình, chiều cao dao động từ 6 đến 25 mét, tán lá rậm rạp với các lá mọc đối, hình bầu dục, dày và xanh bóng. Hoa mọc đơn độc hoặc từng cụm, có màu trắng pha đỏ. Quả măng cụt có hình cầu, đường kính khoảng 5–8 cm, vỏ dày màu tím đậm hoặc đỏ nâu khi chín, bao bọc bên trong là các múi thịt màu trắng có vị ngọt thanh, được ưa chuộng trong tiêu dùng vì hương vị đặc trưng và giá trị dinh dưỡng cao [31]. Trong khi phần thịt quả thường được sử dụng làm thực phẩm, thì phần vỏ – chiếm khoảng 60–75% khối lượng quả – lại thường bị loại bỏ. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng chính phần vỏ này chứa hàm lượng cao các hợp chất hoạt tính sinh học, đặc biệt là các dẫn xuất xanthone như α -mangostin, γ -mangostin, và gartanin. Các hợp chất này thể hiện nhiều hoạt tính quý giá như chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, và chống ung thư [32, 33]. Do đó, măng cụt không chỉ là một loại trái cây

nhật đới mà còn là một nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu tiềm năng trong nghiên cứu dược liệu và phát triển thuốc có nguồn gốc thực vật.

1.3.2. Thành phần hoá học trong vỏ quả măng cụt

Vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) từ lâu đã được ghi nhận là nguồn phong phú của các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao. Trong đó, nổi bật nhất là nhóm xanthone, bên cạnh một số nhóm chất khác như flavonoid, tanin, saponin và pectin. Thành phần hóa học đa dạng này đóng vai trò then chốt trong tiềm năng dược lý của vỏ măng cụt, đặc biệt là trong điều trị ung thư. Xanthone là hợp chất có cấu trúc khung cơ bản là 9H-xanthen-9-one (còn gọi là 1,3-dihydroxy-9H-xanthen-9-one). Nhờ khả năng gắn kết linh hoạt với các nhóm thế như hydroxyl, prenyl hoặc methoxy, xanthone tạo thành hàng loạt dẫn xuất khác nhau với hoạt tính sinh học đa dạng. Trong vỏ măng cụt, các xanthone thường mang các chuỗi isoprenyl hoặc geranyl gắn ở các vị trí khác nhau trên khung xanthone, làm tăng tính kỵ nước và khả năng xuyên màng tế bào, từ đó nâng cao khả năng tương tác với cấu trúc sinh học trong tế bào. Các dẫn xuất xanthone chính trong vỏ quả măng cụt bao gồm:

- + α -Mangostin: là hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất, thường từ 60–80% tổng lượng xanthone. Cấu trúc chứa ba nhóm hydroxyl (tại C-1, C-3 và C-6) và hai chuỗi isoprenyl (tại C-2 và C-8). α -Mangostin thể hiện mạnh mẽ các tác dụng kháng ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa và kháng khuẩn. Nó có khả năng cảm ứng apoptosis, ức chế chu kỳ tế bào, và can thiệp vào các con đường tín hiệu như PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B [34].
- + β -Mangostin: giống α -mangostin nhưng có nhóm hydroxyl tại vị trí khác và hoạt tính sinh học yếu hơn một chút; tuy nhiên, sự kết hợp với α -mangostin đôi khi cho hiệu ứng cộng hưởng.
- + γ -Mangostin: có thêm nhóm methoxy tại vị trí C-3, ảnh hưởng đến đặc tính phân cực và khả năng kháng enzyme COX-2, góp phần vào tác dụng chống viêm.
- + Gartanin và 8-deoxygartanin: có nhiều nhóm isoprenyl, cho thấy khả năng ức chế di căn thông qua việc làm bất hoạt metalloproteinase (MMP-2, MMP-9), đồng thời ức chế tăng sinh tế bào ung thư tuyến tiền liệt và ung thư đại trực tràng.
- + Garcinone E: thể hiện hoạt tính mạnh trên một số dòng tế bào ung thư như ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (A549), ung thư buồng trứng (SKOV-3) và ung thư đại trực tràng (HCT116), thông qua việc cảm ứng apoptosis phụ thuộc ty thể và ức chế chu kỳ tế bào tại pha G2/M.

Bên cạnh nhóm xanthone, vỏ măng cụt còn chứa các flavonoid như quercetin, kaempferol và epicatechin – những hợp chất có tác dụng chống oxy hóa mạnh, nhờ khả năng khử gốc tự do, ức chế peroxid hóa lipid và hỗ trợ hệ thống enzym chống oxy hóa nội sinh [32]. Tanin là các polyphenol có trọng lượng phân tử lớn, có khả năng kết tủa protein và tương tác với màng sinh học. Trong y học cổ truyền, tanin từ vỏ măng cụt được ứng dụng trong điều trị tiêu chảy, viêm loét và sát khuẩn tại chỗ. Trong nghiên

cứu hiện đại, tanin cũng cho thấy tác dụng điều hòa miễn dịch và tiềm năng chống ung thư thông qua việc ức chế angiogenesis và gắn kết DNA.

1.3.3. Hoạt tính sinh học của các chất từ vỏ quả măng cụt

Vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) là nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học đa dạng. Trong số đó, các dẫn xuất xanthone – đặc biệt là α -mangostin – đã được chứng minh sở hữu nhiều tác dụng sinh học nổi bật như: chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng ung thư, điều hòa miễn dịch và bảo vệ thần kinh. Các tác dụng này không chỉ được khảo sát trên mô hình *in vitro* và *in vivo* mà còn từng bước được đánh giá trong các hướng nghiên cứu tiền lâm sàng.

- *Hoạt tính chống oxy hoá*: Cơ chế stress oxy hóa là một trong những nguyên nhân quan trọng thúc đẩy quá trình ung thư hóa tế bào. α -mangostin và một số xanthone khác trong vỏ măng cụt thể hiện khả năng quét gốc tự do (ROS) mạnh mẽ thông qua việc cung cấp điện tử từ các nhóm hydroxyl trên khung xanthone [35].

- *Hoạt tính kháng viêm*: Tình trạng viêm mạn tính đóng vai trò trung tâm trong nhiều giai đoạn của quá trình sinh ung thư, từ khởi phát cho đến di căn. α -Mangostin ức chế hoạt hóa NF- κ B, một yếu tố phiên mã điều hòa nhiều gen viêm và gen sinh tồn tế bào ung thư, từ đó làm giảm biểu hiện các cytokine tiền viêm như IL-6, IL-1 β và TNF- α [36].

- *Hoạt tính kháng khuẩn và kháng virus*: Một số xanthone như α -, β - và γ -mangostin thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn Gram dương như *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và một số chủng kháng methicillin (MRSA) [37].

- *Hoạt tính bảo vệ thần kinh*: α -mangostin thể hiện hoạt tính bảo vệ thần kinh thông qua việc ức chế quá trình chết tế bào thần kinh do glutamate, A β (amyloid-beta) hoặc ROS gây ra, đồng thời giảm hoạt hóa vi tế bào thần kinh đệm (microglia) – một nguồn lớn của các cytokine gây viêm trong bệnh thoái hóa thần kinh [38]. Nhờ tác dụng kép: chống viêm thần kinh và chống stress oxy hóa, α -mangostin đang được xem là ứng viên tiềm năng trong điều trị Alzheimer và Parkinson.

- *Hoạt tính kháng ung thư*: Trong số các nhóm hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mạnh, xanthone nổi bật nhờ cấu trúc đa vòng ổn định, khả năng gắn với nhiều đích phân tử khác nhau và phổ tác động rộng đã được ghi nhận có tiềm năng kháng ung thư mạnh mẽ trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau như ung thư gan, đại trực tràng, tuyến tụy, tuyến tiền liệt và thần kinh. Các cơ chế chính góp phần vào hoạt tính kháng ung thư của nhóm xanthone bao gồm: (1) điều hòa chu kỳ tế bào, (2) cảm ứng chết tế bào theo chương trình (apoptosis) và (3) ức chế các con đường tín hiệu sinh ung quan trọng như PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK và NF- κ B.

+ *Điều hoà chu kỳ tế bào*: Một số xanthone đã được chứng minh có khả năng gây ngưng chu kỳ tế bào tại các pha G1 hoặc G2/M tùy theo loại tế bào. Cơ chế này thường liên quan đến việc ức chế biểu hiện của các cyclin (như cyclin D1, cyclin B1), kinase phụ

thuộc cyclin (CDK4/6, CDK1), đồng thời làm tăng biểu hiện của các chất ức chế CDK nội sinh như p21 và p27. Chẳng hạn, γ -mangostin đã cho thấy khả năng ngăn chặn pha G1 và làm giảm tỷ lệ tế bào trong pha S trên các dòng tế bào ung thư ruột kết, qua đó kìm hãm sự tăng sinh của tế bào ung thư [39].

+ Cảm ứng apoptosis qua con đường nội sinh và ngoại sinh: α -mangostin và γ -mangostin từ vỏ măng cụt có khả năng kích hoạt apoptosis thông qua cả hai con đường nội sinh (ty thể) và ngoại sinh (thụ thể chết như Fas, TRAIL-R)[45]. Các hợp chất này làm tăng ROS, gây mất điện thế màng ty thể và giải phóng cytochrome c, từ đó hoạt hóa caspase-9 và caspase-3, dẫn đến các biến đổi đặc trưng của apoptosis [46]. Đồng thời, xanthone điều hòa biểu hiện protein theo hướng tăng Bax/Bad và giảm Bcl-2/survivin, góp phần thúc đẩy chết tế bào.

+ Ức chế các trục tín hiệu tăng sinh: Xanthone từ vỏ măng cụt có khả năng ức chế các con đường sinh ung thư quan trọng như NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR và JAK/STAT3, từ đó giảm viêm, ức chế tăng sinh và cảm ứng apoptosis. Các hợp chất như α -, β -, γ -mangostin và gartanin có thể ức chế trực tiếp hoặc thông qua PTEN đối với trục PI3K/Akt/mTOR, làm giảm phosphoryl hóa Akt/mTOR, gây ngưng chu kỳ tế bào pha G1[40, 41]. Đồng thời, xanthone ức chế hoạt hóa NF- κ B thông qua IKK/I κ B, làm giảm biểu hiện các gen liên quan đến viêm và xâm lấn [58], và ức chế phosphoryl hóa STAT3, từ đó giảm biểu hiện các gen chống apoptosis như Bcl-2 và survivin [42]. Nhờ đó, các hợp chất này không chỉ kìm hãm sự phát triển của khối u mà còn làm tăng độ nhạy của tế bào ung thư với các tác nhân điều trị. Hiệu quả tác động đa đích này cho thấy tiềm năng ứng dụng của xanthone trong các chiến lược điều trị ung thư kết hợp [43].

1.3.4. Tác dụng kháng ung thư của α -mangostin

Từ các hoạt tính sinh học đa dạng của các hợp chất phân lập từ vỏ quả măng cụt, các nghiên cứu gần đây đã tập trung làm rõ vai trò của từng thành phần riêng lẻ, đặc biệt là nhóm xanthone. Trong đó, α -mangostin được xem là hoạt chất trung tâm, đóng góp phần lớn vào các hiệu ứng sinh học nổi bật, nhất là trong lĩnh vực chống ung thư. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng hợp chất này có khả năng ức chế tăng sinh, cảm ứng apoptosis, gây rối loạn chu kỳ tế bào và làm suy giảm chức năng ty thể trên một số dòng tế bào ung thư khác nhau như ung thư vú (MCF-7), đại trực tràng (HT-29, COLO 205), gan (HepG2) [44]. Ở cấp độ phân tử, trên các mô hình tế bào ung thư khác nhau như ung thư vú MCF-7, ung thư đại trực tràng HT-29, α -mangostin được ghi nhận có khả năng tác động lên nhiều cơ chế khác nhau như gia tăng ROS nội bào, suy giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi_m$), hoạt hóa hệ thống caspase, điều hòa các protein liên quan đến apoptosis (Bax, Bcl-2, p53) cũng như ảnh hưởng đến các trục tín hiệu sống còn như PI3K/AKT và NF- κ B [44, 45]. Những bằng chứng này cho thấy α -mangostin không chỉ đơn thuần là một chất gây độc tế bào mà còn có khả năng điều phối các mạng lưới tín hiệu nội bào – một đặc điểm quan trọng của các tác nhân chống ung thư thế hệ mới.

Tuy nhiên, các bằng chứng hiện có vẫn mang tính phân mảnh, chưa hình thành được một bức tranh cơ chế hoàn chỉnh mà chỉ làm rõ một khía cạnh đơn lẻ của tác động sinh học, chẳng hạn như rối loạn chức năng ty thể và apoptosis phụ thuộc ty thể [46], trong khi các nghiên cứu khác lại nhấn mạnh vai trò của stress oxy hóa hoặc tổn thương DNA như những sự kiện riêng biệt [47].

α -Mangostin gây ra sự gia tăng ROS nội bào có thể dẫn đến đứt gãy DNA và hoạt hóa các protein đáp ứng tổn thương như p53, từ đó khuếch đại tín hiệu apoptotic trên dòng tế bào ung thư vú 4T1 [48]. Cơ chế này có sự khác biệt so với các thuốc hóa trị cổ điển như temozolomide – tác nhân gây tổn thương DNA trực tiếp thông qua alkyl hóa – trong khi α -mangostin gây tổn thương DNA như một hệ quả thứ phát của rối loạn nội bào và chương trình chết tế bào được kích hoạt [49]. Mặc dù các tác nhân alkyl hóa như temozolomide đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị glioblastoma, hiệu quả của chúng thường bị giới hạn bởi hiện tượng kháng thuốc, đặc biệt liên quan đến các cơ chế sửa chữa DNA, cũng như các tác dụng phụ đáng kể như ức chế tủy xương và độc tính toàn thân. Bên cạnh đó, phần lớn các thuốc điều trị hiện nay thường tác động theo cơ chế đơn đích, chủ yếu tập trung vào gây tổn thương DNA hoặc ức chế một trục tín hiệu riêng lẻ, trong khi tế bào ung thư – đặc biệt là glioblastoma – lại sở hữu mạng lưới tín hiệu phức tạp. Một trong những trục tín hiệu duy trì sự sống còn của tế bào u là AKT/ GSK3 β , trong đó AKT đóng vai trò điều hòa nhiều quá trình quan trọng như chuyển hóa, tăng sinh, ức chế apoptosis và duy trì ổn định chức năng ty thể. Đặc biệt, AKT có khả năng kiểm soát hoạt tính của GSK3 β thông qua phosphoryl hóa tại Ser9, từ đó duy trì trạng thái bất hoạt của kinase này và góp phần ngăn chặn các tín hiệu tiền apoptosis [50]. Trong khi đó, α -mangostin cũng được ghi nhận có khả năng ức chế xâm lấn và di căn, thông qua việc làm giảm biểu hiện các enzyme phân hủy chất nền ngoại bào như MMP-2, MMP-9 và ức chế hoạt hóa NF- κ B trên các dòng ung thư phổi và đại tràng [51]. Điều này cho thấy α -mangostin không chỉ ảnh hưởng đến sự sống còn của tế bào mà còn tác động đến các đặc tính ác tính quan trọng khác của khối u. Do đó, cần có những nghiên cứu mang tính hệ thống nhằm làm rõ đồng thời các cơ chế tác động của α -mangostin, từ đó xây dựng một bức tranh cơ chế hoàn chỉnh và thống nhất hơn về tiềm năng chống ung thư của hợp chất này, đặc biệt trên mô hình ung thư thần kinh đệm.

1.3.5. Tổng quan về tách chiết và tinh sạch α -mangostin từ vỏ quả măng cụt

Từ những bằng chứng về hoạt tính sinh học nổi bật của α -mangostin, việc thu nhận hợp chất này với độ tinh sạch cao đóng vai trò thiết yếu trong các nghiên cứu về cơ chế và ứng dụng dược lý. Do đó, các phương pháp tách chiết và tinh sạch α -mangostin từ vỏ quả măng cụt đã được quan tâm nghiên cứu rộng rãi, với nhiều hướng tiếp cận khác nhau nhằm tối ưu hiệu suất thu hồi và chất lượng sản phẩm. Về mặt hóa học, α -mangostin là một dẫn xuất xanthone có cấu trúc polyphenol với tính kỵ nước tương đối cao, do đó hòa tan tốt trong các dung môi hữu cơ như ethanol, methanol, chloroform

hoặc ethyl acetate. Đặc điểm này là cơ sở cho việc lựa chọn dung môi chiết phù hợp, đồng thời ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất thu nhận hợp chất [32]. Các phương pháp tách chiết α -mangostin có thể chia thành hai nhóm chính: phương pháp truyền thống và phương pháp hiện đại. Các phương pháp chiết xuất truyền thống như ngâm chiết, chiết hồi lưu hoặc Soxhlet với dung môi hữu cơ vẫn được sử dụng phổ biến, đặc biệt trong các nghiên cứu tại Việt Nam, nhờ ưu điểm đơn giản, dễ triển khai và không đòi hỏi thiết bị phức tạp. Tuy nhiên, các kỹ thuật này thường tiêu tốn lượng lớn dung môi, thời gian chiết kéo dài và có nguy cơ làm suy giảm hoạt tính sinh học của hợp chất do tác động của nhiệt độ cao và thời gian xử lý lâu [52]. Nhằm khắc phục những hạn chế này, nhiều phương pháp chiết hiện đại đã được phát triển như chiết siêu âm (UAE), chiết vi sóng (MAE) và chiết bằng CO₂ siêu tới hạn (SFE). Các kỹ thuật này giúp tăng hiệu suất thu hồi, rút ngắn thời gian chiết và hạn chế sự phân hủy của hợp chất nhờ kiểm soát tốt hơn điều kiện chiết. Đặc biệt, phương pháp CO₂ siêu tới hạn cho phép thu nhận sản phẩm có độ tinh sạch cao và không để lại dư lượng dung môi, tuy nhiên chi phí đầu tư thiết bị lớn và yêu cầu kỹ thuật vận hành phức tạp. Trong bối cảnh đó, chiết siêu âm được xem là một giải pháp phù hợp trong điều kiện phòng thí nghiệm hiện nay, khi vừa cải thiện hiệu quả chiết nhờ cơ chế tạo bọt khí giúp phá vỡ cấu trúc tế bào thực vật, vừa đảm bảo tính đơn giản, tiết kiệm thời gian và dung môi. Do đó, trong nghiên cứu này, phương pháp chiết siêu âm được lựa chọn nhằm nâng cao hiệu quả thu hồi α -mangostin, đồng thời đảm bảo tính khả thi và khả năng ứng dụng trong điều kiện nghiên cứu trong nước.

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã tối ưu hóa quy trình tách chiết α -mangostin từ vỏ quả măng cụt. Pedraza-Chaverri và cộng sự đã tổng hợp rằng ethanol và methanol là dung môi chiết phổ biến, sau đó dịch chiết được phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau nhằm làm giàu α -mangostin trước khi tinh sạch bằng sắc ký [53]. Nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng đã ghi nhận hiệu quả của α -mangostin trong việc ức chế tăng sinh, cảm ứng apoptosis, gây rối loạn chu trình tế bào và phá vỡ chức năng ty thể ở các dòng ung thư như vú (MCF-7), đại trực tràng (HT-29), gan (HepG2) và một số dòng thần kinh như SK-N-SH, SH-SY5Y [64]. Tác động này chủ yếu thông qua việc tăng sản xuất ROS nội bào, làm suy giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\psi_m$), hoạt hóa các caspase và điều hòa sự biểu hiện của các gen quan trọng trong tiến trình apoptosis như Bax, p53, Bcl-2, hay các tín hiệu sống còn như Akt và NF- κ B [59]. Những phát hiện này cho thấy α -mangostin không chỉ đơn thuần là một chất gây độc tế bào mà còn có khả năng điều phối tinh vi các mạng lưới tín hiệu nội bào – yếu tố then chốt trong phát triển thuốc điều trị ung thư hiện đại. Tuy nhiên, trong khi α -mangostin đã được nghiên cứu khá sâu trên các dòng ung thư phổ biến, thì các bằng chứng về tác dụng và cơ chế tác động của nó trên ung thư thần kinh đệm – đặc biệt là dòng tế bào U-87MG – còn hết sức hạn chế. Glioblastoma là dạng ác tính cao nhất trong các u thần kinh đệm, nổi tiếng với khả năng xâm lấn mạnh, kháng điều trị và tái phát nhanh.

Tại Việt Nam, măng cụt là loài cây bản địa được trồng phổ biến ở khu vực Nam Bộ. Vỏ măng cụt chứa nhiều hợp chất polyphenol, trong đó α -mangostin chiếm tỷ lệ cao và đã được nghiên cứu về mặt hóa học, sinh học và tiềm năng dược liệu. Các nghiên cứu trong nước về tách chiết và phân lập α -mangostin từ vỏ quả măng cụt đã bước đầu được triển khai, chủ yếu tập trung vào việc xây dựng quy trình chiết bằng dung môi kết hợp với các kỹ thuật tinh sạch như sắc ký cột silica gel. Nghiên cứu của Nguyễn và cộng sự (2018) đã phân lập thành công α -mangostin từ nguồn nguyên liệu trong nước và xác định cấu trúc bằng các phương pháp phân tích hiện đại như HPLC và NMR và đã xác định hoạt tính kháng khuẩn, khả năng chống oxy hóa [54]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Quỳnh và cộng sự (2024) cũng đã chú trọng tối ưu hóa quy trình chiết xuất thông qua khảo sát các yếu tố công nghệ như nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian chiết nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi [55]. Sau khi phân lập, α -mangostin bước đầu được đánh giá hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa hoặc khảo sát độc tính tế bào trên một số dòng ung thư phổ biến như HepG2 và HeLa.

Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu trong nước hiện nay vẫn dừng lại ở mức chiết xuất, định lượng hoặc sàng lọc hoạt tính sinh học cơ bản, trong khi các nghiên cứu kết hợp giữa phân lập hợp chất tinh khiết và đánh giá cơ chế tác động ở cấp độ phân tử trên các mô hình ung thư chuyên biệt còn hạn chế. Trong bối cảnh nhu cầu phát triển các hoạt chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên ngày càng gia tăng, hướng tiếp cận này không chỉ góp phần giảm phụ thuộc vào nguồn hợp chất thương mại mà còn nâng cao giá trị khai thác của dược liệu bản địa. Do đó, cần thiết có một nghiên cứu mang tính hệ thống, tích hợp từ phân lập, xác định cấu trúc đến đánh giá tác dụng sinh học và phân tích cơ chế ở nhiều cấp độ. Cách tiếp cận này không chỉ góp phần lấp đầy khoảng trống về mặt học thuật mà còn cung cấp bằng chứng toàn diện hơn về tiềm năng của α -mangostin trong điều trị Glioblastoma. Từ những phân tích trên, đề tài: “**Nghiên cứu tác dụng gây độc của α -mangostin từ vỏ quả măng cụt trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm**” sẽ tập trung vào các nội dung nghiên cứu sau:

1. *Phân lập, tinh sạch và xác định cấu trúc của α -mangostin từ vỏ quả măng cụt*: Tiến hành chiết xuất từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana*) bằng dung môi thích hợp, sau đó phân lập và tinh sạch α -mangostin bằng các kỹ thuật sắc ký. Cấu trúc hóa học của hợp chất được xác định thông qua các phương pháp phổ hiện đại như MS, FTIR và NMR (^1H , ^{13}C).

2. *Đánh giá tác dụng gây độc tế bào và khả năng gây tổn thương DNA của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG*: Xử lý dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87MG với các nồng độ khác nhau của α -mangostin và đánh giá khả năng sống của tế bào bằng phương pháp MTS nhằm xác định hoạt tính gây độc tế bào và giá trị IC_{50} của hợp chất. Đồng thời, khảo sát mức độ tổn thương DNA bằng phương pháp Comet assay thông qua các

chỉ số như % Tail DNA và Tail moment nhằm đánh giá khả năng gây đứt gãy DNA của hợp chất.

3. *Phân tích ảnh hưởng của α -mangostin lên hình thái ty thể tế bào, điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi_m$) và các protein liên quan đến apoptosis cũng như trực tín hiệu AKT/GSK3 β :* Quan sát sự thay đổi hình thái ty thể tế bào và điện thế màng ty thể sau xử lý α -mangostin nhằm đánh giá vai trò của rối loạn chức năng ty thể trong cơ chế gây độc tế bào. Đồng thời, xác định sự thay đổi biểu hiện của các protein liên quan đến apoptosis (BAX, BCL-2) và trực tín hiệu sống còn AKT/GSK3 β bằng kỹ thuật Western blot nhằm bước đầu làm rõ cơ chế tác động của hợp chất.

4. *Khảo sát tương tác phân tử giữa α -mangostin và các protein đích thông qua mô phỏng in silico:* Thực hiện mô phỏng docking phân tử nhằm đánh giá khả năng tương tác giữa α -mangostin và các protein đích liên quan như AKT1 và GSK3 β . Phân tích năng lượng liên kết và các tương tác phân tử chính nhằm hỗ trợ giải thích cơ chế tác dụng của hợp chất ở mức độ phân tử.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Dòng tế bào u thần kinh đệm ở người (U-87MG) (ATCC) do phòng Hoá sinh miễn dịch – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.
- Quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) được thu hái vào mùa hè năm 2024 tại tỉnh Tiền Giang, Việt Nam. Vỏ quả măng cụt khô sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Công ty Thanh Bình (số lô: HD167163). Mẫu thực vật được định danh bởi chuyên gia thực vật học dựa trên các đặc điểm hình thái và đối chiếu với các mẫu chuẩn đã được công bố [56]. Tiêu bản thực vật được lưu giữ tại Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số hiệu HN 000082651.

2.2. Thiết bị và hoá chất

2.2.1. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

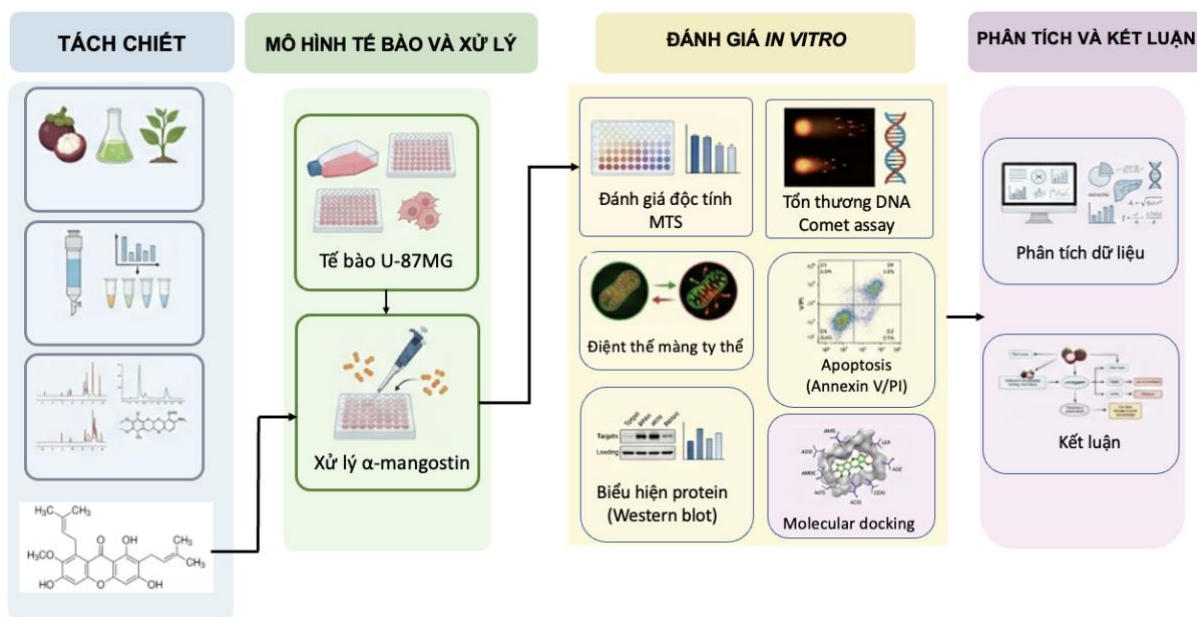
- Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: hệ thống máy cô quay chân không YRE-2000E, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Thermo Nicolet 6700, hệ thống máy AVANCE NEO 600 MHz (Bruker BioSpin, Thụy Sĩ), tủ ấm 5% CO₂ (Panasonic Biomedical), tủ an toàn sinh học (ESCO), máy ly tâm (Eppendorf), kính hiển vi quang học (Olympus), hệ thống đọc ELISA Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific), máy điện di DNA (Clever Scientific), kính hiển vi huỳnh quang (Nikon), máy phân tích tế bào dòng chảy MACSQuant VYB (Miltenyi Biotec), hệ thống điện di protein SDS-PAGE, bộ chuyển màng Western blot (Thermo Fisher), hệ thống chụp ảnh gel và màng lai huỳnh quang Amersham Imager 680 RGB (Cytiva).....
- Các dụng cụ thí nghiệm được sử dụng bao gồm: ống nghiệm thủy tinh, giá đỡ ống nghiệm, thìa khuấy, phễu lọc, giấy lọc (Whatman, Anh), micropipette các dải thể tích; ống ly tâm 1.5 mL và 2.0 mL (Eppendorf, Đức); ống Falcon 15 mL và 50 mL (Corning, Hoa Kỳ); đĩa nuôi cấy tế bào các loại; lam kính và lamén (Đức), màng PVDF (Thermo Fisher) và các vật tư tiêu hao vô trùng khác phục vụ cho quá trình nuôi cấy tế bào và thí nghiệm sinh học phân tử....

2.2.2. Hoá chất sử dụng

- Các dung môi hữu cơ như: methanol, ethanol, chloroform, ethyl acetate, n-hexane và acetone, silica gel và bản mỏng TLC (Merck)....
- Các hoá chất dùng trong đánh giá hoạt tính sinh học như: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Corning, Hoa Kỳ), fetal bovine serum (Corning, Hoa Kỳ), Penicillin–Streptomycin (Capricorn Scientific, Đức), dung dịch đệm phosphate PBS (Corning, Hoa Kỳ), Trypsin-EDTA (Capricorn Scientific), thuốc nhuộm Trypan Blue (Vivacell), dimethyl sulfoxide – DMSO (Merck, Đức), bộ kit đánh giá tăng sinh tế bào CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Hoa Kỳ), thuốc nhuộm nhân DAPI (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), paraformaldehyde (Merck, Đức), thuốc nhuộm ty thể MitoTracker

Orange CMTMRo (Promega, Hoa Kỳ), Rhodamine 6G, bộ kit đánh giá apoptosis Annexin V-FITC/PI, các kháng thể được cung cấp bởi Santa Cruz và Abcam, hóa chất phát hiện tín hiệu Western blot Amersham ECL (Cytiva).

2.3. Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ tổng quan thiết kế nghiên cứu và quy trình thực nghiệm

2.3.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập α -mangostin từ vỏ quả măng cụt

2.3.1.1. Quy trình chiết xuất

Quy trình chiết xuất được tối ưu hóa dựa trên nghiên cứu của Sandar Naing và cộng sự (2023) [57], với một số điều chỉnh về nồng độ và thể tích dung môi nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch của hợp chất. Vỏ quả măng cụt khô (1 kg) được nghiền thành bột mịn, khối lượng bột thu hồi đạt 98% so với ban đầu. Trong mỗi mẻ chiết, 200 g bột khô được cho vào bình tam giác dung tích 2 L, bổ sung 1000 mL ethanol 70% (v/v) (tỷ lệ 1:5, w/v). Hỗn hợp được khuấy từ nhẹ liên tục ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) trong 1 giờ nhằm tăng khả năng tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu thực vật. Sau thời gian chiết, dịch chiết được thu bằng cách ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó lọc qua giấy lọc Whatman để loại bỏ bã thực vật. Phần bã tiếp tục được chiết lại lần thứ hai với 300 mL ethanol 70% trong cùng điều kiện nhằm thu hồi tối đa hoạt chất còn sót lại. Các dịch chiết ethanol được gộp chung và tiến hành cô đặc dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ không vượt quá 45°C để tránh phân hủy hoạt chất.

2.3.1.2. Phân đoạn dung môi và tinh sạch bằng sắc ký cột

Cao chiết ethanol thô được hòa tan hoàn toàn trong nước cất (tỷ lệ vừa đủ để phân tán đồng nhất), sau đó chuyển sang phễu chiết dung tích 2 L để tiến hành phân tách lỏng – lỏng với các dung môi lần lượt là n-hexan, diclometan, etylacetate. Quá trình phân bố được thực hiện 3 lần liên tiếp, mỗi lần sử dụng khoảng 300–350 mL dung môi. Sau

mỗi lần lắc đều và để phân lớp hoàn toàn, thu được các phân đoạn dung môi khác nhau và tiến hành cô quay chân không ở nhiệt độ dưới 45°C.

Phân đoạn cao chiết thu được ở bước trên được tinh sạch bằng sắc ký cột silica gel. Cột sắc ký được làm ướt bằng hệ dung môi n-hexan/acetone. Mẫu được hòa tan trong một lượng nhỏ dung môi ban đầu và nạp lên đầu cột. Hệ dung môi rửa giải được sử dụng theo gradient tăng dần độ phân cực (n-hexan:acetone), bắt đầu từ 9:1 đến 3:1 (v/v). Các phân đoạn thu được được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), sử dụng bản mỏng silica gel F254, quan sát dưới đèn UV (254 nm và 365 nm). Những phân đoạn có vết tương đồng được gộp lại. Phân đoạn chứa hợp chất mục tiêu được cô dung môi và tiến hành kết tinh lại.

Toàn bộ quy trình chiết xuất, phân lập và tinh sạch α -mangostin được thực hiện lặp lại 3 lần trên các lô nguyên liệu độc lập để kiểm tra tính tái lập của quy trình

2.3.1.3. Đánh giá độ tinh sạch và cấu trúc hoá học của hợp chất thu được

Độ tinh sạch của hợp chất phân lập được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Hệ thống sử dụng gồm bơm Alliance 2695 kết hợp đầu dò PDA 2996 (Waters, Hoa Kỳ). Cột sắc ký sử dụng: Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 250 mm, kích thước hạt 4 μ m). Cụ thể: Pha động: acetonitrile:nước (95:5, v/v), chế độ đẳng dòng; tốc độ dòng: 0,7 mL/phút, thời gian chạy: 15 phút, thể tích tiêm mẫu: 5 μ L, bước sóng phát hiện: 243 nm và 320 nm.

Xác định cấu trúc hoá học:

+ *Khối lượng phân tử (ESI-MS)*: Khối lượng phân tử và công thức phân tử của hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ khối ion hóa phun điện tử độ phân giải cao (High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry, HR-ESI-MS) trên hệ máy phù hợp tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phương pháp này cho phép xác định chính xác tỷ lệ khối lượng trên điện tích (m/z) của ion phân tử và các ion đặc trưng, từ đó hỗ trợ xác định công thức phân tử của hợp chất.

+ *Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)*: được ghi nhận trên máy Thermo Nicolet 6700 (Viện Hoá học – VAST) nhằm xác định các nhóm chức đặc trưng trong phân tử thông qua sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại ở các số sóng đặc trưng. Các dải hấp thụ được sử dụng để nhận diện sự hiện diện của các nhóm hydroxyl (-OH), carbonyl (C=O), liên kết đôi C=C thơm và các nhóm chức khác trong cấu trúc α -mangostin.

+ *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$)*: được thực hiện trên hệ máy AVANCE NEO 600 MHz (Bruker BioSpin, Thụy Sĩ) (Viện Hoá học – VAST) trong dung môi thích hợp. Các tín hiệu phổ thu được được so sánh với dữ liệu tham khảo đã công bố nhằm xác nhận cấu trúc hóa học của α -mangostin.

+ *Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*: Độ tinh khiết của hợp chất sau phân lập được đánh giá bằng phương pháp HPLC. Kết quả sắc ký được sử dụng để xác định thời gian

lưu đặc trưng và ước tính độ tinh khiết của α -mangostin thông qua diện tích peak sắc ký.

2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.3.2.1. Phương pháp hoạt hoá và nhân nuôi tế bào

- Tế bào U-87MG và tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) được cất giữ trong Nitơ lạnh, đem rã đông trong tủ ổn nhiệt 37°C. Chuyển dung dịch chứa tế bào vào ống falcon 15 mL đã có chứa môi trường DMEM, ly tâm 1500 vòng trong 5 phút, bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào.

- Phân tán tế bào lắng vào 1 – 2 mL môi trường nuôi cấy thích hợp, mix đều sau đó chuyển sang đĩa petri 100 mm ủ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Kiểm tra hằng ngày, thay môi trường 2 ngày một lần. Khi tế bào mọc kín 75 – 80% bề mặt đĩa thì thu tế bào hoặc tiến hành cấy chuyển tế bào sang đĩa nuôi cấy mới.

- *Phương pháp định lượng tế bào nuôi cấy*

+ Hút 20ul dịch huyền phù có tế bào vào ống eppendorf 1,5 mL, pha loãng với dung dịch Trypan Blue 0,4% theo tỉ lệ 1:1 và trộn đều. Phủ buồng đếm với lamelle và cho 1 giọt huyền phù tế bào vào buồng đếm bằng cách nhỏ sát vị trí tiếp xúc giữa lamelle và buồng đếm.

+ Tiến hành đếm tế bào tại bốn ô đếm nằm ở bốn góc của buồng đếm. Chỉ tính các tế bào có hình dạng tròn, kích thước lớn và hình thái sáng, rõ ràng. Giá trị trung bình được tính dựa trên số lượng tế bào thu được từ bốn ô đếm này.

+ Mật độ tế bào trung bình trong 1 mL môi trường được xác định theo công thức:

$$\text{Số tế bào (tế bào/mL)} = \text{giá trị trung bình} \times 10^4 \times \text{hệ số pha loãng}$$

2.3.2.2. Phương pháp thử độc tính tế bào (MTS)

- *Nguyên lý:* Phương pháp thử độc tính MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] dựa trên khả năng các tế bào sống chuyển hóa muối tetrazolium MTS, với sự hỗ trợ của PMS, thành sản phẩm formazan tan có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 490 nm. Lượng formazan tạo thành tỉ lệ thuận với số lượng tế bào sống, từ đó cho phép đánh giá độc tính tế bào và xác định giá trị IC₅₀ [58].

- *Quy trình thí nghiệm:*

+ Tế bào U-87MG và nguyên bào sợi fibroblast được gieo vào đĩa 96 với mật độ 5.000 tế bào/giếng trong 200 μ L môi trường và ủ ở 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, tế bào được xử lý với α -mangostin ở các nồng độ khác nhau (1–30 μ g/mL) trong 48 giờ.

+ Sau thời gian xử lý, loại bỏ 100 μ L môi trường và bổ sung 20 μ L dung dịch MTS vào mỗi giếng, tiếp tục ủ trong 3 giờ trong điều kiện tránh ánh sáng.

+ Độ hấp thụ quang (OD) được đo tại bước sóng 490 nm bằng máy Microplate Reader. Dữ liệu được xử lý để tính tỷ lệ sống sót của tế bào theo công thức:

$$A (\%) \text{ được tính theo công thức}$$

$$A(\%) = V/V_h \times 100\%$$

V: Chỉ số OD đo được ở trong giếng thí nghiệm

V_h : Chỉ số OD đo được ở trong giếng đối chứng dung môi.

+ Giá trị IC_{50} được xác định từ đường cong hồi quy biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ chất thử và tỷ lệ sống sót của tế bào.

2.3.2.3. Phương pháp điện di đơn tế bào

- *Nguyên lý*: Phương pháp điện di đơn tế bào (Comet assay) dựa trên việc DNA bị đứt gãy mất cấu trúc siêu xoắn, nên khi đặt trong điện trường, các mảnh DNA sẽ di chuyển ra khỏi nhân và tạo hình ảnh giống sao chổi sau khi nhuộm huỳnh quang. Mức độ tổn thương DNA được đánh giá qua các thông số của “đuôi” sao chổi như chiều dài, tỷ lệ DNA và moment đuôi [59].

- *Quy trình thực hiện*:

+ Tế bào sau khi xử lý với α -mangostin (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và đối chứng dương H_2O_2 (250 μM) được thu nhận, ly tâm và huyền phù trong PBS. Tế bào được trộn với agarose 1% và trải lên lam kính đã phủ agarose nền, sau đó làm lạnh để cố định.

+ Lam kính được ủ trong dung dịch ly giải ở 4°C qua đêm, tiếp theo xử lý trong dung dịch kiềm mạnh ($\text{pH} > 13$) trong 60 phút để tách đôi chuỗi DNA và làm lộ rõ các tổn thương như đứt gãy sợi đơn hoặc các vị trí không ổn định trong chuỗi DNA. Sau đó tiến hành điện di trong môi trường kiềm, cho phép các đoạn DNA bị đứt gãy di chuyển tạo thành “đuôi sao chổi”.

+ Sau điện di, lam kính được nhuộm DAPI và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Hình ảnh được phân tích bằng phần mềm CometScore để xác định các thông số như % Tail DNA và Olive Tail Moment, phản ánh mức độ tổn thương DNA.

2.3.2.4. Phương pháp đánh giá hình thái ty thể

- *Nguyên lý*: MitoTracker là thuốc nhuộm huỳnh quang có khả năng tích lũy chọn lọc trong ty thể sống nhờ sự chênh lệch điện thế màng ty thể ($\Delta\psi\text{m}$). Do đó, nhuộm MitoTracker là một công cụ hiệu quả để đánh giá đồng thời chức năng và hình thái ty thể trong các nghiên cứu về stress tế bào và quá trình apoptosis.

- *Quy trình thực hiện*:

+ Hoàn nguyên MitoTracker đông khô trong dimethylsulfoxide khan chất lượng cao (DMSO) đến nồng độ cuối cùng là 1mM. Pha dung dịch thuốc thử ở nồng độ 100nM trong môi trường nuôi cấy tế bào không có huyết thanh.

+ Các tế bào được nuôi cấy trong đĩa 48 giếng đã được xử lý ở các nồng độ thuốc thử khác nhau trong 24 giờ. Loại bỏ môi trường nuôi cấy tế bào sau đó thêm đệm rửa PBS.

+ Cố định tế bào bằng Paraformaldehyde 4% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng (50 μL /giếng), rửa lại bằng PBS 1X x 3 lần.

+ Thêm dung dịch thuốc nhuộm đã pha ở các nồng độ và ủ tế bào ở 37°C trong 15 – 45 phút, loại bỏ môi trường ở tất cả các mẫu và rửa tế bào bằng PBS 1X x 3 lần.

+ Nhuộm nhân bằng DAPI trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (30 μ L/ giếng), rửa lại bằng PBS 1X x 3 lần (bọc giấy bạc để tránh ánh sáng).

+ Quan sát hình ảnh trên kính hiển vi huỳnh quang với bước sóng kích thích 554nm để phát hiện tín hiệu ty thể (phát quang ở bước sóng 578 nm- màu đỏ), và bước sóng kích thích 341 nm để phát hiện DNA nhân (phát quang ở bước sóng 408nm – màu xanh).

2.3.2.5. Phương pháp đánh giá điện thế màng ty thể

- *Nguyên lý*: Rhodamine 6G (Rh6G) là thuốc nhuộm huỳnh quang cationic, thấm màng và tích lũy chọn lọc trong ty thể nhờ điện thế màng ($\Delta\psi_m$). Do đó, cường độ huỳnh quang của Rh6G phản ánh trực tiếp mức $\Delta\psi_m$ và được đo bằng máy huỳnh quang.

- *Quy trình thực hiện*:

+ Nuôi cấy và xử lý tế bào: Nuôi tế bào trong đĩa 96 giếng trong môi trường DMEM hoàn chỉnh. Khi tế bào đạt khoảng 70–80% mật độ, tiến hành xử lý với α -mangostin ở các nồng độ khác nhau trong thời gian 24 giờ.

+ Chuẩn bị thuốc nhuộm Rhodamine 6G: pha dung dịch Rhodamine 6G trong dung dịch đệm PBS hoặc môi trường không có FBS với nồng độ cuối là 20 μ M.

+ Nhuộm tế bào: Loại bỏ môi trường nuôi, rửa nhẹ tế bào bằng PBS 1X, thêm Rhodamine 6G vào mỗi giếng và ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong bóng tối trong khoảng 30 phút. Sau thời gian nhuộm, rửa tế bào 1–2 lần bằng PBS lạnh để loại bỏ phần thuốc nhuộm không gắn. Giữ lại tế bào trong PBS 1X.

+ Đo tín hiệu huỳnh quang: Đọc cường độ huỳnh quang tại bước sóng kích thích ~500 nm và phát xạ ~550–580 nm bằng máy đọc SpectraMax iD5.

2.3.2.6. Phân tích apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI

- *Nguyên lý*: Phương pháp nhuộm Annexin V/PI dựa trên sự thay đổi vị trí phân bố của phosphatidylserine (PS) và tính toàn vẹn màng tế bào trong quá trình apoptosis. PS bình thường nằm ở mặt trong màng tế bào. Khi tế bào vào apoptosis sớm, PS đi ra ngoài và được Annexin V gắn trong điều kiện có Ca²⁺. Propidium iodide (PI) chỉ đi vào tế bào khi màng bị tổn thương (apoptosis muộn hoặc hoại tử). Kết hợp Annexin V và PI giúp phân biệt tế bào sống, apoptosis sớm, apoptosis muộn và hoại tử.

- *Quy trình thực hiện*:

+ Nuôi cấy và xử lý tế bào: Các tế bào được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng với môi trường DMEM hoàn chỉnh ở 37°C, 5%CO₂. Khi mật độ tế bào đạt 70–80%, tiến hành thử nghiệm với α -mangostin ở nồng độ 6 và 10 μ g/ml trong 24 giờ.

+ Thu nhận tế bào: tế bào được thu bằng Trypsin EDTA 0,25%, ly tâm 1500 vòng trong 5 phút. Sau đó loại bỏ dịch nổi, rửa tế bào 2 lần bằng PBS lạnh để loại bỏ phần dư môi trường và chất thử. Huyền phù lại tế bào trong 500 μ L dung dịch đệm liên kết (Annexin V binding buffer) có chứa ion Ca²⁺, điều chỉnh mật độ khoảng 1–2 $\times 10^6$ tế bào/mẫu.

+ Nhuộm Annexin/ PI: Thêm 5 μ L Annexin V-FITC vào hỗn dịch tế bào và Thêm 5 μ L propidium iodide (PI) vào cùng ống phản ứng. Trộn đều nhẹ nhàng và ủ mẫu trong bóng

tối ở nhiệt độ phòng (hoặc 4°C) trong 15 phút. Mẫu nên được phân tích ngay bằng flow cytometry trong vòng 1 giờ sau nhuộm.

+ Phân tích bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy : Thiết lập máy đo dòng chảy tế bào với các kênh phù hợp. Sau đó phân tích dữ liệu bằng phần mềm MACSQuant VYB và biểu đồ dot plot thành 4 vùng:

- + Q1: Annexin V⁻/PI⁺ → hoại tử.
- + Q2: Annexin V⁺/PI⁺ → apoptosis muộn hoặc hoại tử
- + Q3: Annexin V⁺/PI⁻ → apoptosis sớm
- + Q4: Annexin V⁻/PI⁻ → tế bào sống.

2.3.2.7. Western Blot

- *Nguyên lý*: Western blot là kỹ thuật dùng để phát hiện và định lượng protein đặc hiệu trong mẫu sinh học. Nguyên lý dựa trên ba bước: (1) protein được biến tính và tách theo kích thước bằng SDS-PAGE, (2) các protein được chuyển từ gel sang màng nitrocellulose hoặc PVDF nhờ dòng điện, (3) protein đích được nhận diện bằng kháng thể đặc hiệu; tín hiệu được tạo ra nhờ kháng thể thứ cấp gắn enzyme hoặc chất huỳnh quang, cho phép phát hiện và phân tích bằng hệ thống ghi nhận hình ảnh [60].

- *Quy trình thực hiện*:

+ Nuôi cấy và xử lý tế bào: Dòng tế bào U-87MG được nuôi trong môi trường DMEM hoàn chỉnh, ủ ở 37°C, 5%CO₂. Sau khi xử lý α -mangostin ở các nồng độ khác nhau, tế bào được rửa bằng PBS. Sử dụng trypsin EDTA 0,25% để thu tế bào.

+ Ly giải tế bào và định lượng protein:

- Tế bào được ly giải bằng RIPA buffer, ủ trên đá trong thời gian 30 phút. Sau đó mẫu được ly tâm ở 12.000 vòng/ phút 4°C trong 15 phút để thu dịch nổi chứa protein tổng số.
- Nồng độ protein được xác định bằng bộ xét nghiệm protein Pierce Bradford, sử dụng BSA làm đường chuẩn. Nồng độ các mẫu được tính dựa vào đường chuẩn, hiệu chỉnh về cùng nồng độ và sử dụng 30 μ g protein cho mỗi giếng điện di.

+ Điện di SDS-PAGE:

- Mẫu protein được bổ sung đệm xử lý mẫu dye 4X với tỷ lệ mẫu/ dye là 4/1 biến tính ở 100°C trong 10 phút, sau đó để bảo quản ở -20°C trong 1 phút.
- Điện di được tiến hành trong trên gel polyacrylamide 10% trong điều kiện SDS-PAGE ở 100 V trong khoảng 90 phút, đến khi hàng mẫu chạy xuống đáy bản gel. Sau đó bản gel được tách ra khỏi phiến kính để tiến hành các bước sau.

+ Chuyển màng ướt: Sau khi điện di, protein được chuyển sang màng PVDF bằng phương pháp chuyển màng ướt trong buồng chuyển có dung dịch đệm chuyển Tris – glycine ở 20V trong 60 phút.

+ Chặn màng và lai kháng thể:

- Sau khi chuyển màng xong, màng được chặn bằng dung dịch 5% BSA trong TBST trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng nhằm ngăn ngừa bất kháng thể không đặc hiệu.
- Màng sau đó được ủ qua đêm ở 4°C với kháng thể sơ cấp anti- β -actin (1:1000), BAX (1:1000), BC12 (1:1000), GSK3 β (1:1000).
- Màng được rửa 3 lần với TBST (mỗi lần 10 phút), sau đó ủ với kháng thể thứ cấp gắn HRP (1:5000) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ Phát hiện và phân tích:

- Tín hiệu protein được phát hiện bằng cơ chất phát quang ECL, ghi nhận trên hệ thống chụp ảnh hóa phát quang, và cường độ băng tín hiệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ.
- Biểu hiện của các protein được chuẩn hóa theo β -actin và so sánh giữa các nhóm xử lý.

2.3.2.8. Mô phỏng docking phân tử

- Cấu trúc tinh thể của protein AKT1 (PDB ID: [4GV1](#)) và GSK3 β (PDB ID: [1Q5K](#)) được thu thập từ cơ sở dữ liệu RCSB Protein Data Bank, trong khi cấu trúc dự đoán của AKT2 ([AF-P31751](#)) và AKT3 ([AF-Q9Y243](#)) được lấy từ cơ sở dữ liệu AlphaFold Protein Structure Database. Trước khi tiến hành docking, tất cả các cấu trúc protein được xử lý bằng cách loại bỏ các ligand đồng kết tinh và phân tử nước bằng phần mềm PyMOL™ (phiên bản 3.1.6.1), nhằm thu được mô hình receptor phục vụ cho phân tích docking phân tử.

- Vùng gắn kết (binding pocket) của protein được dự đoán bằng công cụ CB-Dock2, trong đó vị trí có giá trị Vina score thấp nhất được lựa chọn để thực hiện docking bằng phần mềm AutoDock 4. Cả protein và ligand α -mangostin (PubChem CID: [5281650](#)) đều được chuẩn bị bằng phần mềm AutoDockTools 1.5.7 trước khi docking.

- Quá trình docking được thực hiện trên phần mềm AutoDock 4, và cấu dạng liên kết có năng lượng thấp nhất được lựa chọn để phân tích tương tác phân tử bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer V25.1.0.24284. Các acid amin tham gia tương tác được so sánh với các vị trí gắn ATP đã được công bố của protein (thu thập từ cơ sở dữ liệu UniProt), nhằm đánh giá khả năng cạnh tranh với ATP của α -mangostin.

2.3.2.9. Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu được xử lý bằng Excel và phần mềm GraphPad Prism 10.3. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình (mean) \pm SD; Sự khác biệt thống kê được phân tích bằng phương pháp phương sai một chiều (ANOVA một chiều). Giá trị $p < 0,05$ là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

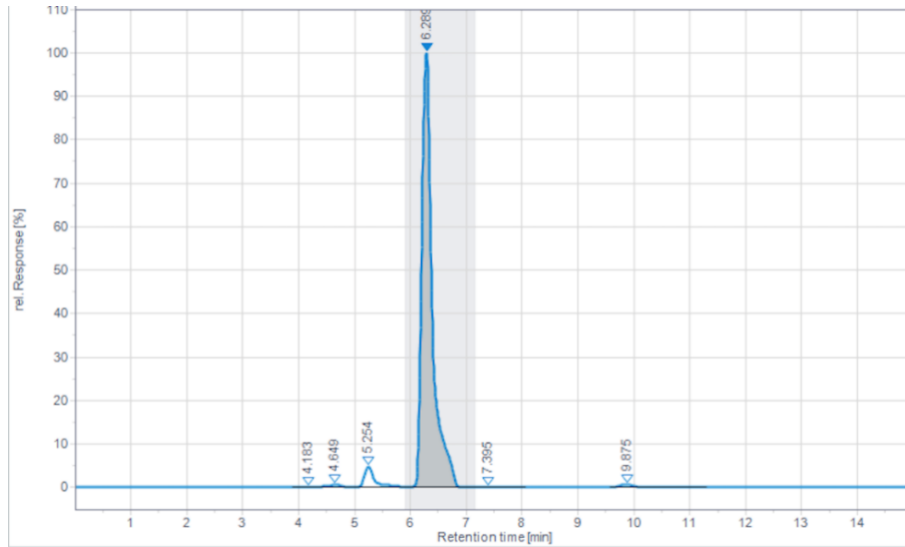
3.1. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của α -mangostin

Quá trình chiết xuất từ 200g nguyên liệu vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana*) khô bằng ethanol thu được $36,0 \pm 0,56$ g cao chiết thô. Việc sử dụng ethanol làm dung môi chiết không chỉ đảm bảo khả năng hòa tan tốt các hợp chất có hoạt tính sinh học thuộc nhóm xanthone mà còn phù hợp với định hướng ứng dụng sinh học do có độc tính thấp và dễ loại bỏ. Cao chiết thu được chứa hỗn hợp phức tạp các hợp chất thứ cấp với độ phân cực khác nhau, do đó cần được phân tách thêm bằng các phương pháp sắc ký. Cao chiết ethanol sau đó được phân tách bằng sắc ký cột silica gel sử dụng hệ dung môi có độ phân cực tăng dần. Nguyên tắc của phương pháp này dựa trên sự khác biệt về ái lực giữa các hợp chất với pha tĩnh silica gel và pha động, cho phép các cấu tử được rửa giải theo thứ tự tăng dần về độ phân cực. Việc lựa chọn hệ dung môi phù hợp đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa khả năng phân tách, đặc biệt đối với các hợp chất có cấu trúc tương tự như các dẫn xuất xanthone.

Trong quá trình phân đoạn, sắc ký lớp mỏng (TLC) được sử dụng như một công cụ theo dõi nhanh và hiệu quả nhằm đánh giá sự phân tách và định hướng thu nhận hợp chất mục tiêu. Kết quả TLC cho thấy sự xuất hiện của một vết đặc trưng với giá trị R_f ổn định trong hệ dung môi lựa chọn, đồng thời thể hiện tín hiệu rõ dưới đèn UV ở các bước sóng thích hợp. Đặc biệt, khi tiến hành chấm đôi chiếu với chất chuẩn α -mangostin, vết của mẫu phân lập cho giá trị R_f trùng khớp và có đặc điểm hiển thị tương đồng, cho thấy sự tương ứng về bản chất hóa học giữa hai mẫu (Phụ lục 1.1). Đây là một bước kiểm chứng nhanh nhưng có ý nghĩa quan trọng, giúp định hướng chính xác việc thu nhận hợp chất trước khi tiến hành các phân tích cấu trúc chuyên sâu. Dựa trên kết quả theo dõi bằng TLC, các phân đoạn có đặc điểm tương đồng được gộp lại và tiếp tục tinh sạch. Việc gộp phân đoạn hợp lý không chỉ giúp giảm thiểu thất thoát hợp chất mà còn nâng cao hiệu quả của các bước tinh sạch tiếp theo. Kết quả cuối cùng thu được hợp chất α -mangostin dưới dạng tinh thể màu vàng nhạt với khối lượng $1,3 \pm 0,16$ g, tương ứng hiệu suất khoảng $0,45 \pm 0,02$ % so với nguyên liệu ban đầu. Hiệu suất này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố đối với các hợp chất xanthone từ vỏ măng cụt, cho thấy quy trình chiết tách và tinh sạch được lựa chọn là hợp lý và hiệu quả. Sau khi phân lập, hợp chất mục tiêu được kiểm tra độ tinh sạch và xác định cấu trúc bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại như HPLC, ESI-MS, FTIR và NMR

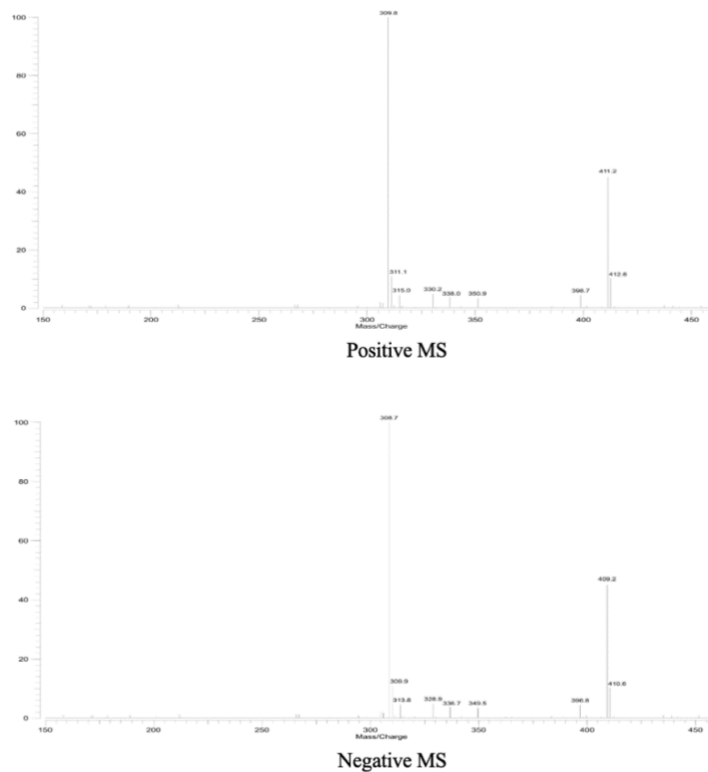
- *Kết quả phân tích HPLC đánh giá độ tinh sạch*: Sắc ký đồ HPLC của hợp chất phân lập được trình bày ở Hình 3.1. Kết quả cho thấy mẫu xuất hiện một pic chính chiếm ưu thế với thời gian lưu (R_t) = 6,289 phút. So sánh với mẫu chuẩn α -mangostin cho thấy thời gian lưu hoàn toàn tương đồng, chứng tỏ hợp chất phân lập có cùng tính chất sắc ký với chất chuẩn. Diện tích peak chính chiếm $\geq 97\%$ tổng diện tích các peak trên sắc ký đồ, cho thấy mẫu có độ tinh sạch cao. Khi so sánh với các nghiên cứu trước đây, α -

mangostin thường được ghi nhận có thời gian lưu trong khoảng 5 – 8 phút khi sử dụng cột C18 và hệ pha động giàu acetonitrile [33].



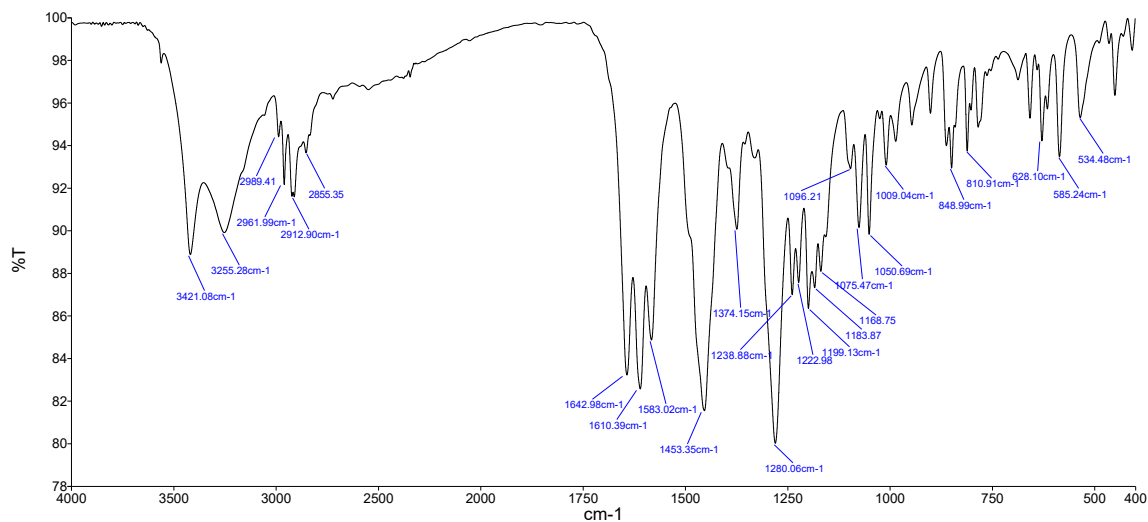
Hình 3.1. Sắc ký phổ HPLC của hợp chất phân lập được

- *Kết quả phổ khối ESI-MS cho thấy:* ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 411,2 và $[M-H]^-$ tại m/z 409,2, hoàn toàn phù hợp với khối lượng phân tử lý thuyết của α -mangostin (410 Da). Dữ liệu này trùng khớp với các công bố trước đó về phân lập α -mangostin từ vỏ quả *Garcinia mangostana* cũng như dữ liệu trong cơ sở dữ liệu PubChem [61]. Điều này cho thấy hợp chất thu được có khối lượng phân tử chính xác và không có sự biến đổi cấu trúc trong quá trình chiết xuất (Hình 3.2).



Hình 3.2. Phổ khối ion hóa điện tử phân giải cao (ESI-MS) của α -mangostin

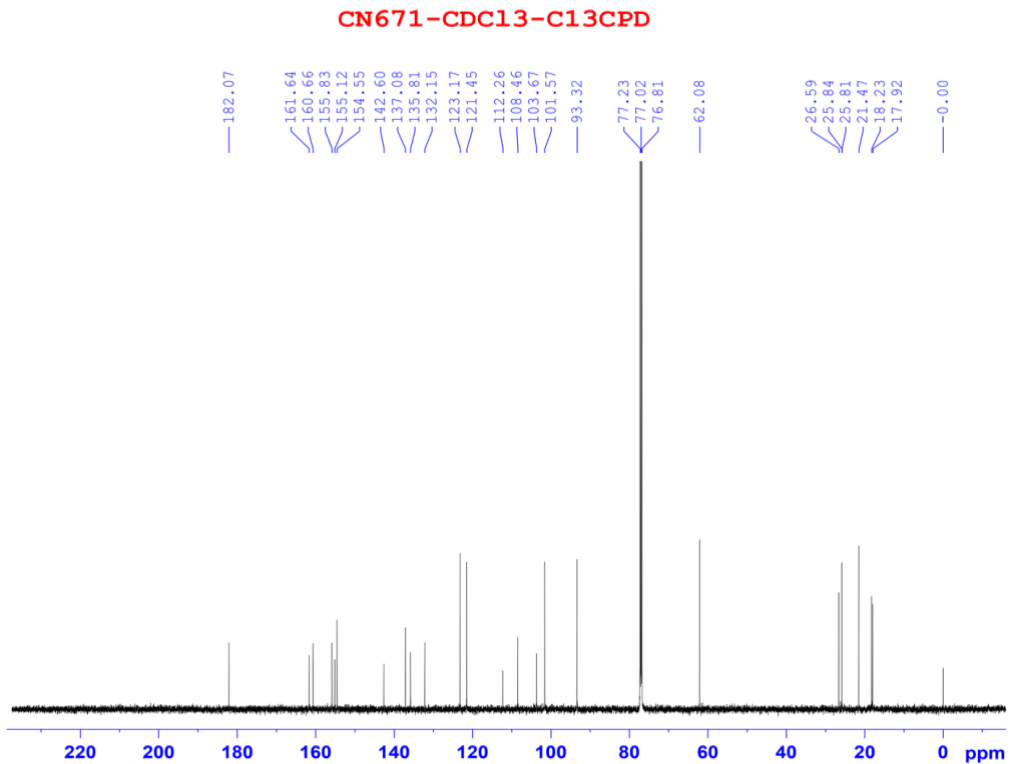
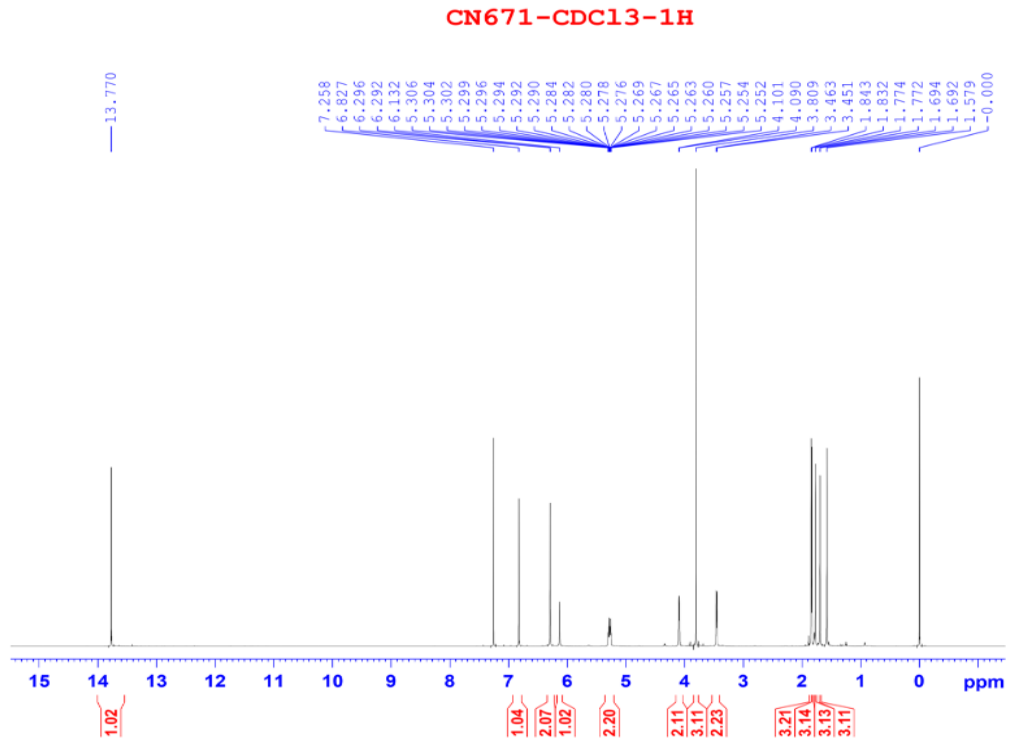
- *Phổ FTIR*: cho thấy các dải hấp thụ đặc trưng tại 3421 cm^{-1} (-OH), 1642 cm^{-1} (C=O trong khung xanthone) và 1238 cm^{-1} (C–O–C). Các tín hiệu này phù hợp với đặc trưng phổ hồng ngoại của các dẫn xuất xanthone đã được công bố [62]. Sự hiện diện của dải hấp thụ carbonyl mạnh trong vùng $1640\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ là đặc trưng của hệ xanthone liên hợp (Hình 3.3).

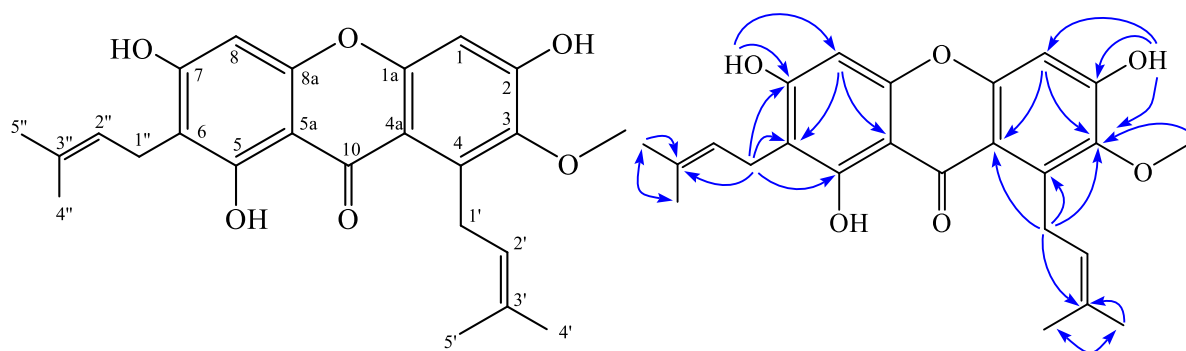


Hình 3.3. Kết quả phổ FTIR của hợp chất thu được

- *Phân tích phổ NMR*: Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 3.4) hợp chất cho thấy cộng hưởng ở vùng trường thấp xuất hiện một tín hiệu singlet tại $\delta\text{H } 13,77\text{ ppm}$, đây là tín hiệu proton đặc trưng của nhóm hydroxy (-OH) và có liên kết nội phân tử với nhóm ketone ($>\text{C}=\text{O}$). Dịch chuyển về phía vùng trường mạnh hơn thấy xuất hiện bốn tín hiệu proton olefin tại $\delta\text{H } 5,28, 6,83, 6,29\text{ ppm}$, bên cạnh đó là hai tín hiệu của các nhóm hydroxy (-OH) tại $\delta\text{H } 6,30$ và $6,13\text{ ppm}$ (xác định được các tín hiệu này của nhóm -OH dựa trên tương tác phổ HMBC (Phụ lục 1.2)). Cộng hưởng trên vùng trường mạnh là tín hiệu của bốn nhóm methyl tại $\delta\text{H } 1,81, 1,77, 1,83$ và $1,69\text{ ppm}$, hai tín hiệu của các nhóm methylene cộng hưởng tại $\delta\text{H } 4,10$ và $3,46\text{ ppm}$ (Hình 3.4).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Hình 3.5) của hợp chất xuất hiện tín hiệu của 24 nguyên tử carbon, kết hợp với phổ HSQC (Phụ lục 1.2) cho thấy hợp chất có một nhóm oxymethyl tại $\delta\text{C } 62,1\text{ ppm}$, mười tín hiệu đặc trưng của hai nhóm isoprenyl tại [$\delta\text{C } 26,6, 121,5, 132,2, 17,9, 25,8$] và [$\delta\text{C } 21,5, 123,2, 132,2, 18,2$ và $25,8$]. Còn lại là 13 tín hiệu của khung chất cộng hưởng trong vùng trường $\delta\text{C } 182,1\text{--}93,3\text{ ppm}$, đồng thời kết hợp với phổ HSQC và HMBC (Phụ lục 1.3) cho dự đoán hợp chất có khung xanthone





Hình 3.6. Cấu trúc hoá học và các tương tác HMBC chính của hợp chất α -mangostin

Nhìn chung, các kết quả từ dữ liệu phổ thu được trong nghiên cứu này với các tài liệu đã công bố cho thấy hợp chất phân lập chính là α -mangostin có độ tinh sạch cao. Kết quả phân tích HPLC cho thấy hợp chất phân lập đạt độ tinh sạch $\geq 97\%$ được xác định dựa trên tỷ lệ diện tích peak của α -mangostin so với tổng diện tích tất cả các peak thu được trên sắc ký đồ tại bước sóng phát hiện phù hợp. Giá trị này nằm trong khoảng tương đương với nhiều nghiên cứu đã công bố trên thế giới và tại Việt Nam, trong đó α -mangostin thường được ghi nhận có độ tinh sạch dao động từ 90–98% sau các bước tinh sạch bằng sắc ký cột silica gel kết hợp với HPLC phân tích [63]. Nghiên cứu của Chen Li-Guo và cộng sự (2008) cũng báo cáo độ tinh sạch α -mangostin đạt khoảng 95–98% khi sử dụng hệ dung môi thích hợp để để tinh sạch và được đánh giá độ tinh sạch bằng HPLC [64].

Đáng chú ý, hiệu suất thu hồi α -mangostin trong nghiên cứu đạt 0,45%, cao hơn so với các phương pháp chiết dung môi truyền thống (0,22–0,26%). Cụ thể, trong nghiên cứu của Tran và cộng sự (2021), nghiên cứu sử dụng phương pháp ngâm lạnh mẫu vỏ măng cụt khô trong dung môi hữu cơ để chiết α -mangostin. Mẫu được để yên trong dung môi trong nhiều giờ, sau đó lọc và cô đặc để thu phần chiết. Hiệu suất thu hồi α -mangostin chỉ đạt 0,26% so với khối lượng nguyên liệu khô [65]. Sự cải thiện khi kết hợp siêu âm và tách chiết trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả của việc tối ưu hóa đồng thời điều kiện chiết và quy trình tinh sạch, góp phần nâng cao khả năng khai thác hợp chất từ nguyên liệu tự nhiên. Không chỉ mang ý nghĩa về mặt kỹ thuật, hiệu suất thu hồi cao còn giúp đảm bảo tính ổn định và khả năng lặp lại của nguồn hợp chất, tạo điều kiện thuận lợi cho các thí nghiệm sinh học tiếp theo, đặc biệt là các nghiên cứu cơ chế ở cấp độ phân tử. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu phân lập α -mangostin từ vỏ măng cụt cũng ghi nhận độ tinh sạch tương tự khi sử dụng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần. Tuy nhiên, hiệu quả phân lập vẫn phụ thuộc đáng kể vào các yếu tố như nguồn nguyên liệu, điều kiện chiết xuất và phương pháp tinh sạch. Do đó, bên cạnh mục tiêu đạt độ tinh sạch cao, nghiên cứu này hướng tới xây dựng một quy trình phân lập có tính ổn định, khả năng lặp lại tốt và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm trong nước. Việc làm chủ quy trình và nguồn nguyên liệu nhằm nâng cao độ

tin cậy của kết quả thực nghiệm và tạo nền tảng cho các nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai.

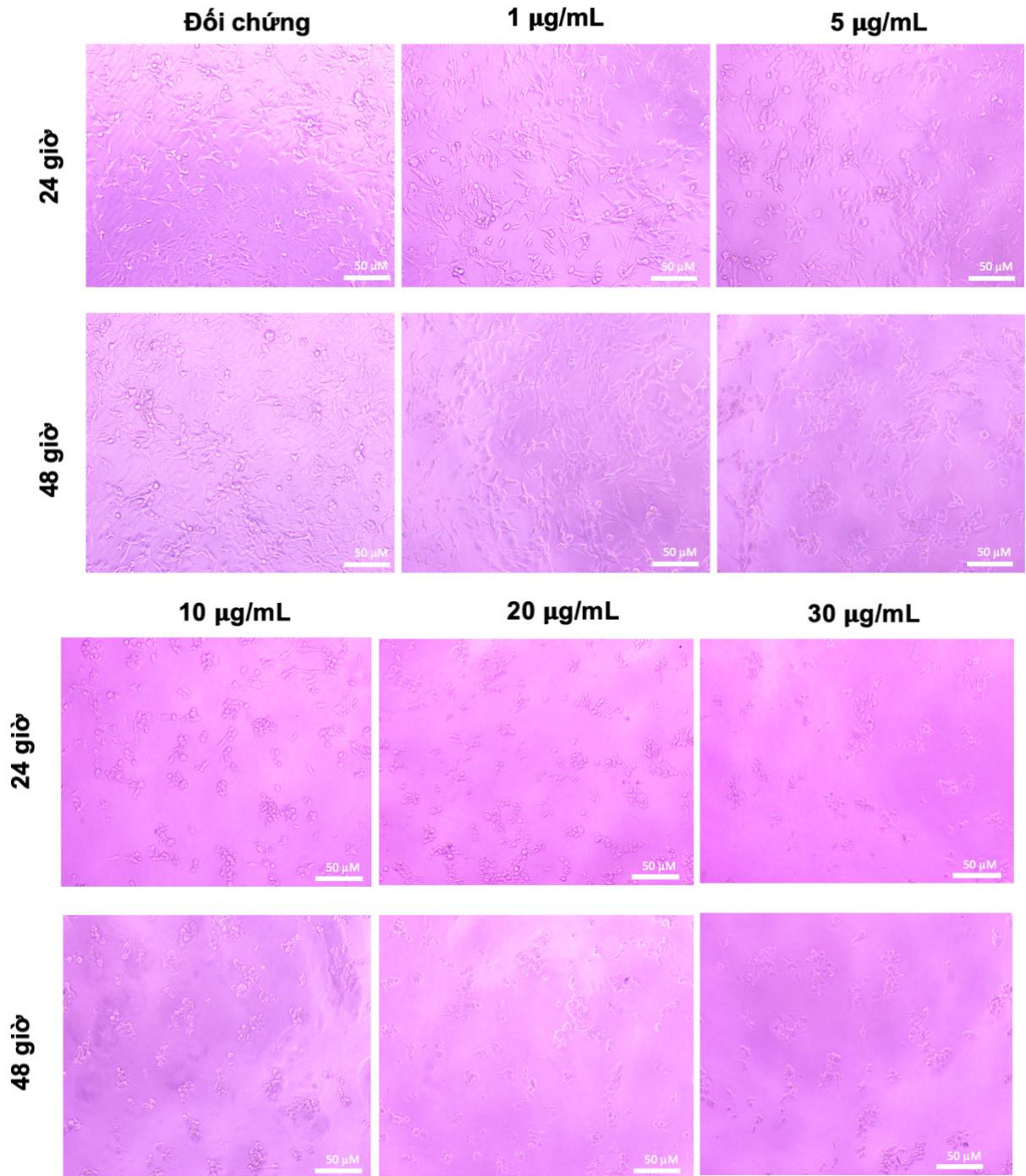
Quan trọng hơn, nghiên cứu này không chỉ dừng lại ở việc phân lập thành công α -mangostin với độ tinh sạch cao, mà còn nằm ở hướng tiếp cận tích hợp giữa hóa học và sinh học. Trong khi phần lớn các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam chủ yếu dừng lại ở việc đánh giá các hoạt tính sinh học cơ bản như chống oxy hóa hoặc kháng khuẩn, thì nghiên cứu này đã mở rộng sang đánh giá tác dụng sinh học trên mô hình tế bào ung thư, đặc biệt là dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm người U-87MG. Một số nghiên cứu trên thế giới đã bước đầu khảo sát tác dụng gây độc tế bào của α -mangostin trên một số dòng ung thư như ung thư vú, gan hoặc đại tràng, tuy nhiên các nghiên cứu chuyên sâu trên glioblastoma vẫn còn hạn chế. Việc ứng dụng hợp chất sau tách chiết vào mô hình *in vitro* trong nghiên cứu này đã cho phép đánh giá sâu hơn về cơ chế tác động ở cấp độ tế bào, bao gồm ảnh hưởng đến khả năng sống sót, tín hiệu nội bào và quá trình apoptosis

3.2. Kết quả khảo sát độc tính của α -mangostin trên mô hình dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87MG.

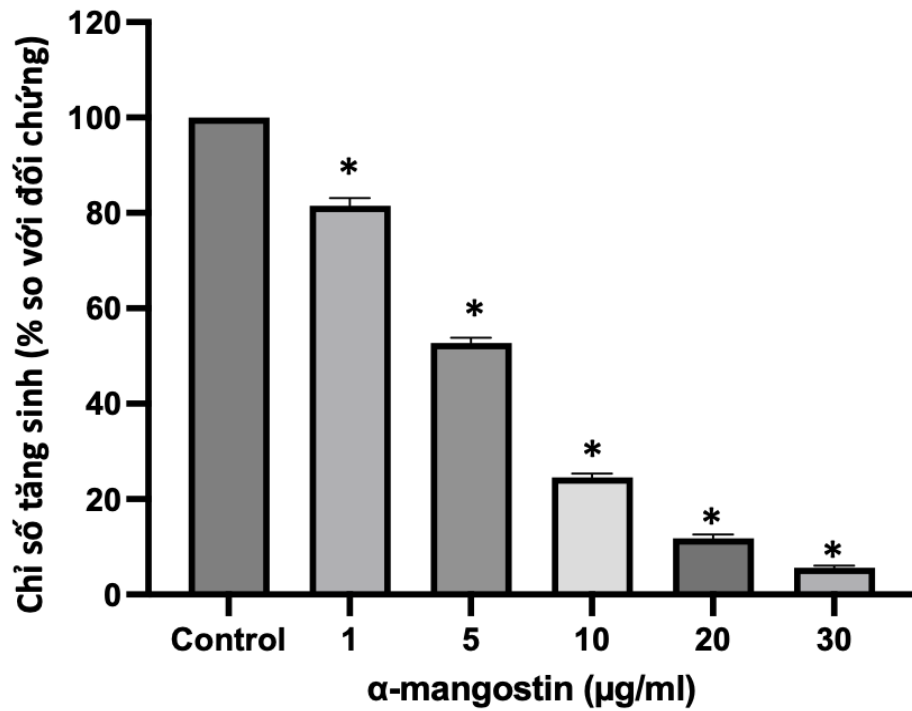
Sau khi xử lý tế bào U-87MG với hoạt chất α -mangostin trong 48 giờ, ghi nhận sự giảm số lượng tế bào phụ thuộc vào nồng độ, đồng thời hình thái tế bào có biểu hiện co lại rõ rệt so với nhóm đối chứng (Hình 3.7). Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng kit MTS tại các nồng độ α -mangostin 1, 5, 10, 20 và 30 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả cho thấy sự suy giảm đáng kể về khả năng sống của tế bào bắt đầu từ nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$, tại đó tỷ lệ sống chỉ còn $53,5 \pm 1,27\%$. Khi tăng nồng độ lên 30 $\mu\text{g/ml}$, tỷ lệ sống giảm mạnh xuống mức $5,1 \pm 1,01\%$, cho thấy α -mangostin có khả năng gây độc tế bào rõ rệt. Đồng thời, xu hướng phụ thuộc nồng độ và thời gian xử lý của α -mangostin lên sự sống của tế bào U-87MG được ghi nhận rõ ràng (Hình 3.8). Giá trị IC_{50} của α -mangostin đối với dòng tế bào U-87MG được xác định là $6,387 \pm 0,329$ $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đó của chúng tôi trên dòng tế bào C6 glioma của chuột, trong đó α -mangostin thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh với IC_{50} khoảng 4,67 $\mu\text{g/mL}$ [66]. Sự tương đồng về hiệu lực giữa hai dòng tế bào glioma có nguồn gốc khác nhau (chuột và người) cho thấy α -mangostin có hoạt tính ổn định trên các mô hình *in vitro* khác nhau. Tuy nhiên, giá trị IC_{50} trên U-87MG cao hơn một chút so với C6, có thể phản ánh sự khác biệt về đặc điểm sinh học giữa hai dòng tế bào. Đáng chú ý, khi đánh giá trên tế bào thường (fibroblast), α -mangostin cho giá trị IC_{50} cao hơn đáng kể, đạt $24,6 \pm 1,45$ $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3.9). Kết quả này cho thấy tế bào fibroblast có mức độ nhạy cảm thấp hơn đối với α -mangostin so với tế bào ung thư U-87MG. Sự khác biệt về giá trị IC_{50} giữa hai dòng tế bào gợi ý rằng α -mangostin có tính chọn lọc nhất định đối với tế bào ung thư, qua đó làm giảm nguy cơ gây độc trên tế bào bình thường. Sự khác biệt về độ nhạy giữa tế bào U-87MG và fibroblast gợi ý rằng α -mangostin có

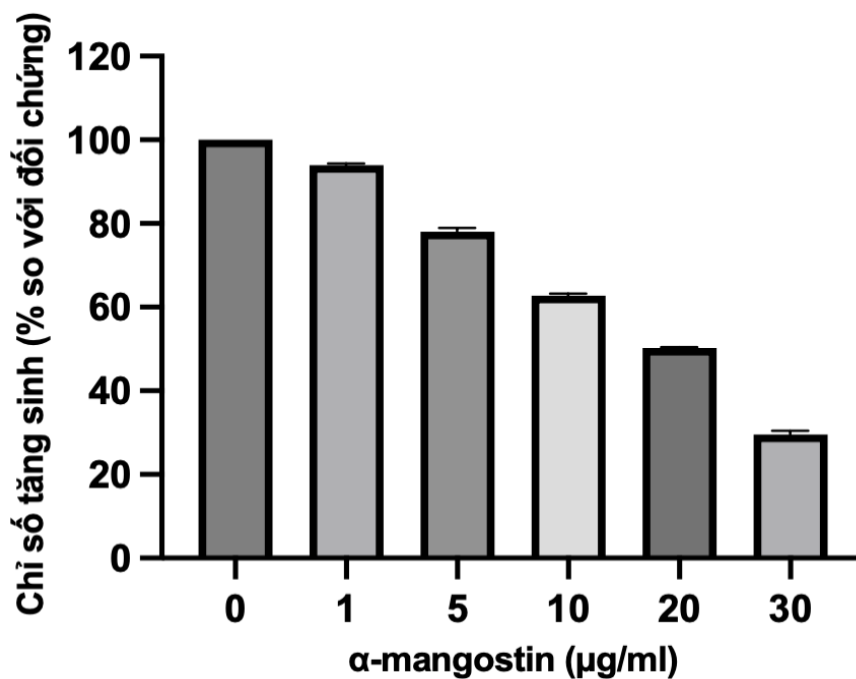
thể ưu tiên tác động lên các tế bào có hoạt tính chuyển hóa và tín hiệu tăng sinh cao, vốn là đặc trưng của tế bào ung thư. Đây là một đặc điểm quan trọng đối với các hợp chất chống ung thư tiềm năng, bởi khả năng duy trì hiệu quả gây độc trên tế bào u đồng thời hạn chế độc tính trên tế bào lành có ý nghĩa lớn trong định hướng phát triển liệu pháp an toàn hơn. So sánh với các nghiên cứu trên thế giới, kết quả thu được trong nghiên cứu này có sự tương đồng đáng kể.



Hình 3.7. Hình ảnh tế bào U-87 MG khi ủ α -mangostin ở các nồng độ khác nhau sau 48 giờ ủ (10 \times). Tế bào được xử lý với α -mangostin ở các nồng độ 0, 1, 5, 10, 20 và 30 $\mu\text{g/mL}$. Hình ảnh được ghi nhận bằng kính hiển vi quang học nhằm đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào theo thời gian và nồng độ. Thanh tỷ lệ = 50 μm .



Hình 3.8. Ảnh hưởng của α -mangostin lên khả năng sống của tế bào U-87MG. Tế bào U87MG được xử lý với các nồng độ tăng dần của α -mangostin (0 – 30 $\mu\text{g/ml}$) trong thời gian 48 giờ. Khả năng sống của tế bào được xác định bằng phương pháp MTS. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ ba thí nghiệm độc lập ($n = 3$). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phép kiểm ANOVA một yếu tố (one-way ANOV; giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê).



Hình 3.9. Ảnh hưởng của α -mangostin lên khả năng sống của tế bào fibroblast. Tế bào được xử lý với các nồng độ tăng dần của α -mangostin trong thời gian 48 giờ. Khả năng sống của tế bào được xác định bằng phương pháp MTS. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) ($n = 3$).

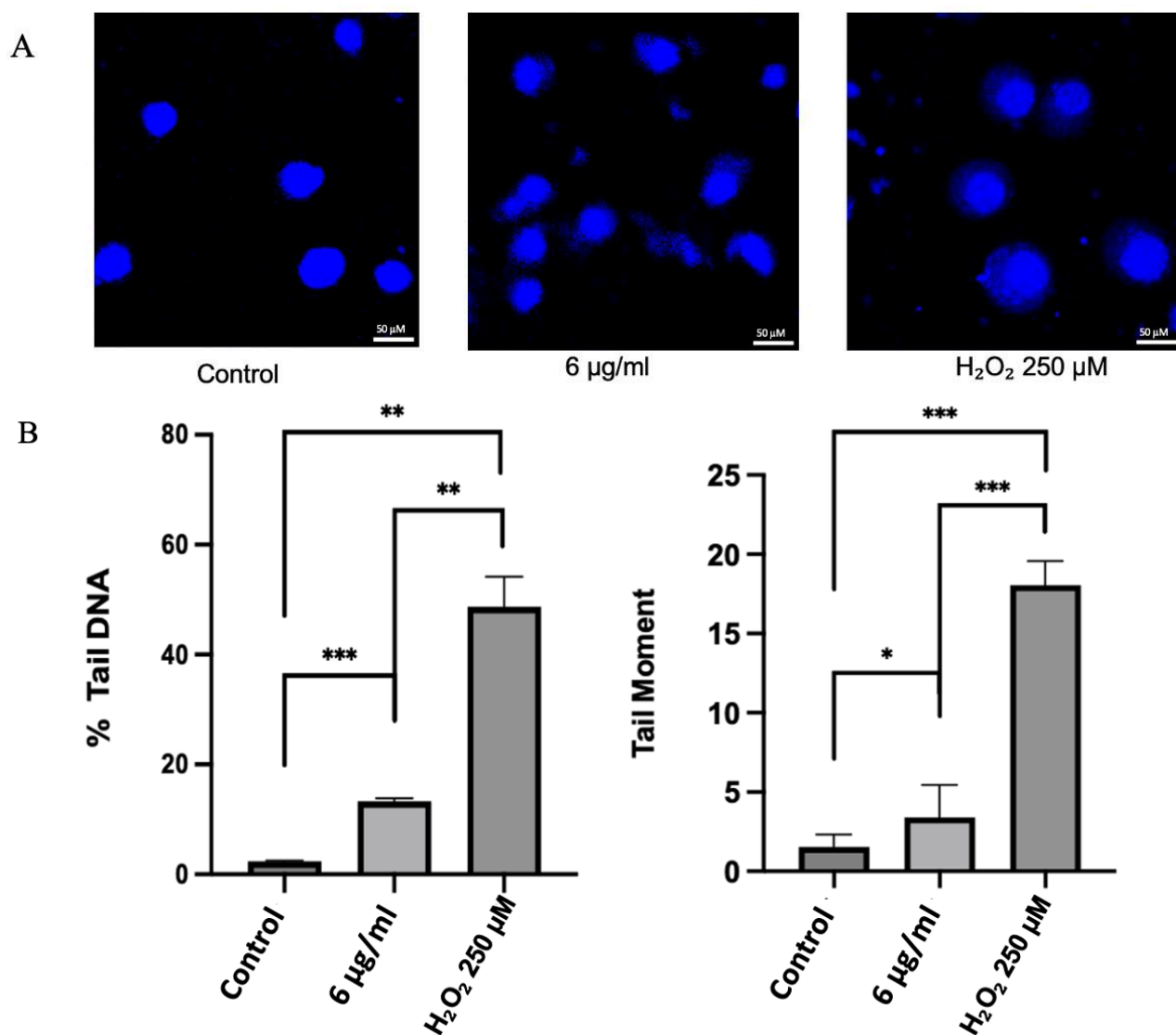
Trong bối cảnh các nghiên cứu đã công bố, α -mangostin trong nghiên cứu này thể hiện mức độ hoạt tính cạnh tranh so với các dẫn xuất cùng nhóm xanthone. Cụ thể, γ -mangostin được báo cáo có IC_{50} khoảng 74 μ M (~30 μ g/mL) trên tế bào U87MG, sau 24 giờ xử lý [67]. Giá trị này phản ánh hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình trong điều kiện xử lý ngắn hạn, đồng thời cho thấy hiệu lực của các dẫn xuất xanthone có thể thay đổi đáng kể tùy thuộc vào cấu trúc hóa học và thời gian tác động. Tuy nhiên một số nghiên cứu đã báo cáo về hoạt tính gây độc tế bào của α -mangostin trên các dòng ung thư khác với giá trị IC_{50} tương tự. Ví dụ, trên dòng MCF-7 (ung thư vú), α -mangostin ức chế sự sống sót tế bào với IC_{50} khoảng 6,12 μ g/mL [68], phản ánh tác động gây độc tính mạnh ngay ở nồng độ thấp. Trên dòng HT-29 (ung thư đại tràng), α -mangostin thể hiện IC_{50} khoảng 8,23 μ g/mL [69], trong khi trên dòng HeLa (ung thư cổ tử cung) hợp chất này ức chế tế bào với IC_{50} khoảng 7–10 μ g/mL tùy thời gian xử lý. Những giá trị IC_{50} trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau đều nằm trong phổ 5 – 10 μ g/mL [46], tương đồng với mức độ gây độc quan sát được trên dòng U-87MG trong nghiên cứu này. Điều này cho thấy α -mangostin duy trì hoạt tính gây độc ổn định trên nhiều loại tế bào ung thư có nguồn gốc khác nhau, phản ánh tính đa mục tiêu sinh học của xanthone tự nhiên. Sự tương đồng trong các giá trị IC_{50} giữa các nghiên cứu cho thấy kết quả thu được không chỉ phù hợp với xu hướng hoạt tính chung của hợp chất mà còn củng cố tính hợp lệ của phương pháp thử nghiệm và mô hình dùng trong nghiên cứu.

3.3. Kết quả ảnh hưởng của α -mangostin lên DNA nhân tế bào U-87MG

Để đánh giá khả năng gây tổn thương DNA nhân của α -mangostin, chúng tôi tiến hành thí nghiệm comet assay trên dòng tế bào U-87MG sau 24 giờ xử lý tại các nồng độ khác nhau. Phương pháp comet assay cho phép quan sát sự phân mảnh DNA ở cấp độ đơn tế bào dựa trên hình thái “đuôi sao chổi” – đặc trưng cho mức độ tổn thương DNA. Ở nhóm chứng âm không xử lý chất, tế bào cho thấy hình ảnh nhân DNA nguyên vẹn, có hình cầu rõ ràng, hầu như không xuất hiện đuôi comet. Điều này chứng tỏ DNA của tế bào ở trạng thái ổn định, không chịu tác động gây tổn thương. Ngược lại, ở nhóm chứng dương, tế bào được xử lý với 250 μ M H_2O_2 – một chất gây tổn thương DNA mạnh – xuất hiện đuôi comet dài và lan tỏa, thể hiện mức độ đứt gãy DNA rõ rệt. Nhóm chứng dương này đóng vai trò kiểm soát chất lượng kỹ thuật và khẳng định điều kiện thí nghiệm đáp ứng yêu cầu phân biệt mẫu có tổn thương DNA. Đối với nhóm tế bào xử lý α -mangostin 6 μ g/ml, đuôi tế bào bắt đầu xuất hiện, cho thấy hợp chất này có khả năng gây đứt gãy DNA. Hình ảnh thu được từ kính hiển vi huỳnh quang cho thấy sự kéo dài của đuôi comet tương ứng với mức độ tổn thương DNA (Hình 3.10A). So với nhóm chứng âm, tế bào xử lý α -mangostin không chỉ có “đuôi” dài hơn mà còn có diện tích vùng lan tỏa lớn hơn, phản ánh mức độ phân mảnh DNA gia tăng.

Phân tích định lượng bằng phần mềm CometCore cho thấy các thông số đặc trưng của tổn thương DNA tăng đáng kể so với đối chứng. Cụ thể, % Tail DNA ở nhóm xử lý

α -mangostin đạt $13,32 \pm 0,49\%$, trong khi nhóm chứng âm chỉ là $2,342 \pm 0,166\%$. Tương tự, Tail moment – thông số tích hợp phản ánh cả chiều dài và cường độ huỳnh quang của đuôi comet đạt $3,4 \pm 0,81\%$ ở nhóm xử lý α -mangostin, cao hơn đáng kể so với nhóm chứng âm ($1,52 \pm 0,34\%$) với $p < 0,05$ (Hình 3.10B).



Hình 3.10. Ảnh hưởng của α -mangostin lên DNA tế bào. (A) Thử nghiệm comet được thực hiện và ghi nhận hình ảnh đại diện ở mỗi nồng độ xử lý. Hình ảnh đại diện của tế bào U87MG được xử lý với α -mangostin (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 giờ) hoặc hydrogen peroxide (H_2O_2 , đối chứng dương, 200 μM , 30 phút). Sự phân mảnh DNA được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (Nikon Eclipse Ti-E, Nhật Bản) sau khi nhuộm DAPI. (B) Phân tích định lượng tỷ lệ % Tail DNA và Tail Moment từ ít nhất 30 tế bào cho mỗi nhóm, sử dụng phần mềm CometScore. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép kiểm Student's t-test (* tương ứng với $p < 0,001$; ** tương ứng với $p < 0,0001$ so với nhóm chứng; $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê).

Các kết quả thu được cho thấy α -mangostin có khả năng gây tổn thương DNA trên tế bào U-87MG theo xu hướng phụ thuộc nồng độ. Sự xuất hiện của đuôi comet

cùng với sự gia tăng của % Tail DNA và Tail moment cho thấy rằng α -mangostin có thể khởi phát các cơ chế dẫn đến apoptosis, đặc biệt thông qua con đường gây stress ty thể hoặc hoạt hóa các protein kiểm soát chu kỳ tế bào. Một số nghiên cứu trên các dòng tế bào ung thư như MCF-7, HL-60 đã ghi nhận α -mangostin gây phân mảnh DNA và kích hoạt các con đường chết tế bào phụ thuộc ty thể [70, 71]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này phần lớn sử dụng các phương pháp như TUNEL assay, trong khi việc đánh giá trực tiếp mức độ tổn thương DNA bằng xét nghiệm điện di đơn tế bào (comet assay) còn hạn chế. Đối với các dòng tế bào ung thư thần kinh đệm, bao gồm U-87MG, hiện chưa có báo cáo đánh giá tác động của α -mangostin lên tổn thương DNA bằng comet assay. Trong khi đó, kết quả của nghiên cứu hiện tại cho thấy α -mangostin gây tổn thương DNA trên tế bào U-87MG theo xu hướng phụ thuộc nồng độ, thể hiện qua sự gia tăng của % Tail DNA và Tail moment. Việc áp dụng comet assay cho phép định lượng trực tiếp mức độ đứt gãy DNA, qua đó cung cấp bằng chứng rõ ràng hơn về cơ chế tác động của α -mangostin. Những dữ liệu này không chỉ củng cố vai trò của hợp chất trong việc cảm ứng apoptosis mà còn cho thấy tổn thương DNA có thể là một thành phần quan trọng trong cơ chế gây độc tế bào của α -mangostin trên glioblastoma. Điều này cho thấy hợp chất không chỉ tác động ở mức độ chức năng tế bào mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến tính toàn vẹn của hệ gen – một đích tác động quan trọng trong kiểm soát sự phát triển khối u. Từ góc độ cơ chế, tổn thương DNA do α -mangostin có thể đóng vai trò như tín hiệu khởi phát đáp ứng stress nội bào, dẫn đến hoạt hóa hệ thống sửa chữa DNA. Khi mức độ tổn thương vượt quá khả năng phục hồi, tế bào sẽ chuyển sang kích hoạt apoptosis.

3.4. Kết quả ảnh hưởng của α -mangostin đến hình thái và điện thế màng ty thể của tế bào U-87MG.

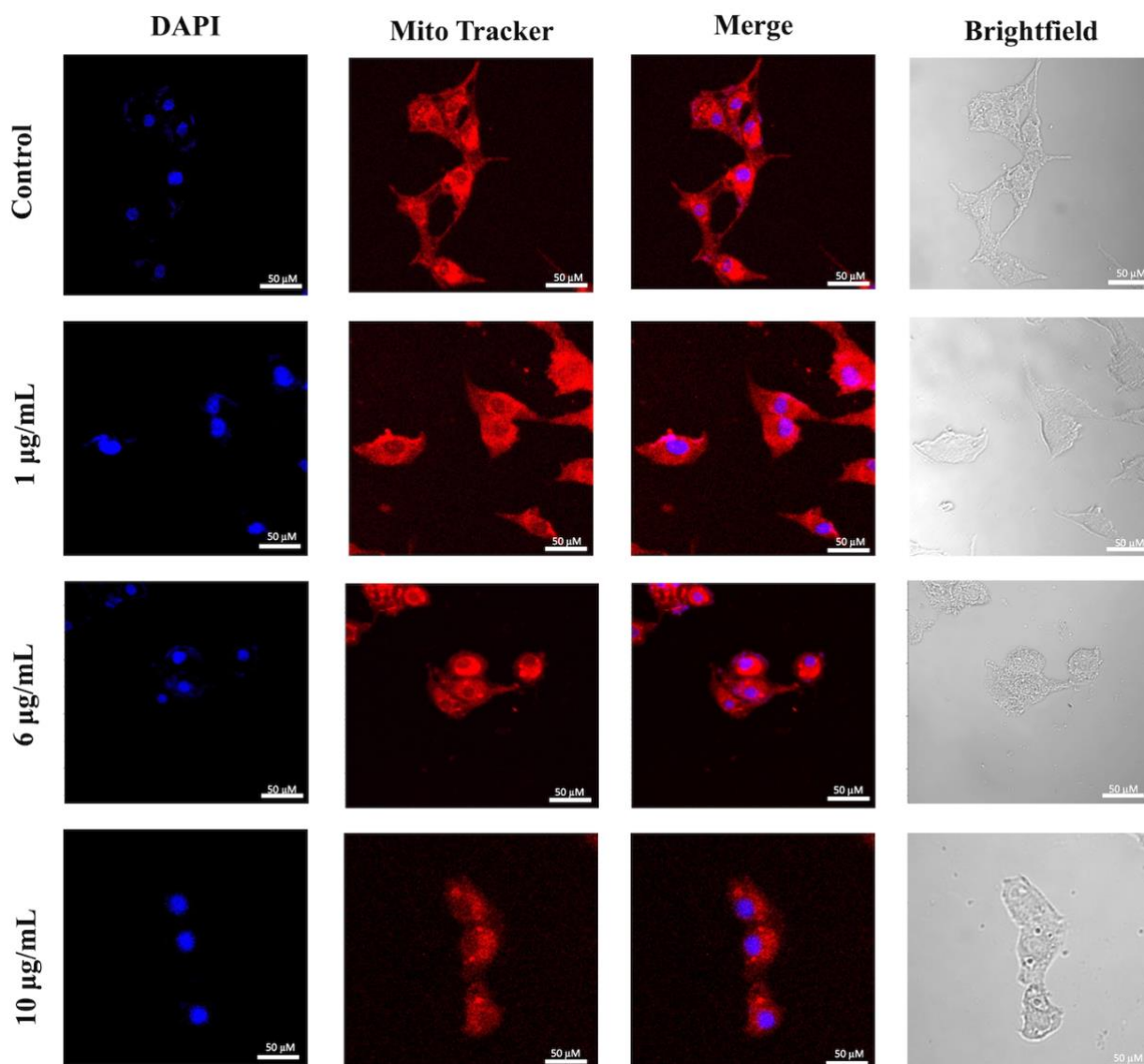
3.4.1. Sự thay đổi hình thái ty thể của tế bào U-87MG dưới tác động của α -mangostin

Để đánh giá tác động của α -mangostin lên hình thái tế bào và cấu trúc ty thể, dòng tế bào U-87MG được xử lý với α -mangostin ở các nồng độ 1, 6 và 10 $\mu\text{g/mL}$ trong 24 giờ. Sau xử lý, tế bào được nhuộm huỳnh quang kép bằng thuốc nhuộm huỳnh quang ty thể MitoTracker Orange CMTMRos (MitoTracker Orange) để quan sát ty thể và thuốc nhuộm nhân - DAPI để đánh dấu nhân tế bào. Quan sát hình ảnh huỳnh quang cho thấy sự thay đổi hình thái tế bào phụ thuộc vào nồng độ (Hình 3.11).

Ở nhóm đối chứng âm, tế bào U-87MG duy trì hình thái đặc trưng của dòng tế bào thần kinh đệm với dạng kéo dài, bám dính tốt trên bề mặt nuôi cấy và phân bố tương đối đồng đều. Nhân tế bào rõ, màng tế bào nguyên vẹn, không ghi nhận hiện tượng co rút hay biến dạng. Song song với đó, tín hiệu huỳnh quang của MitoTracker Orange quan sát được phân bố lan tỏa và đồng đều trong bào tương, phản ánh trạng thái hoạt động bình thường và tính toàn vẹn của hệ thống ty thể trong điều kiện sinh lý. Khi xử lý với α -mangostin ở nồng độ thấp (1 $\mu\text{g/mL}$), hình thái tổng thể của tế bào chưa có sự thay đổi rõ rệt so với đối chứng. Tuy nhiên, đã bắt đầu ghi nhận sự suy giảm nhẹ về

cường độ huỳnh quang của MitoTracker Orange, mặc dù sự phân bố vẫn tương đối đồng đều. Điều này gợi ý rằng α -mangostin có thể gây ra những biến đổi sớm ở mức chức năng ty thể, trước khi xuất hiện các thay đổi hình thái rõ ràng ở cấp độ tế bào. Nói cách khác, ty thể có thể là một trong những đích tác động sớm của hợp chất này. Tại nồng độ trung bình (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), các biến đổi trở nên rõ rệt hơn và thể hiện đồng thời ở cả hai mức độ: hình thái tế bào và chức năng ty thể. Tế bào có xu hướng co lại, giảm khả năng bám dính và xuất hiện nhiều tế bào có hình dạng tròn – đặc trưng của giai đoạn sớm trong quá trình apoptosis. Đồng thời, tín hiệu huỳnh quang của MitoTracker giảm đáng kể về cường độ và bắt đầu mất tính đồng nhất trong phân bố, với nhiều vùng huỳnh quang mờ hoặc gián đoạn. Ở nồng độ cao (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tế bào mất gần như hoàn toàn hình dạng ban đầu, nhiều tế bào trở nên tròn, co rút mạnh hoặc phân mảnh, thậm chí xuất hiện các cấu trúc gợi ý hiện tượng vỡ màng. Đáng chú ý, tín hiệu huỳnh quang của MitoTracker Orange suy giảm mạnh, cho thấy chức năng ty thể bị ảnh hưởng. Việc mất tín hiệu huỳnh quang này thường liên quan trực tiếp đến sự mất điện thế màng ty thể và tăng tính thấm của màng ngoài ty thể, tạo điều kiện cho việc giải phóng các yếu tố tiền apoptosis như cytochrome c vào bào tương. Đây là một bước then chốt trong quá trình kích hoạt chuỗi caspase và dẫn đến chết tế bào theo chương trình.

Nhìn chung, các quan sát cho thấy α -mangostin gây ra sự thay đổi có hệ thống và phụ thuộc nồng độ đối với cả hình thái tế bào và chức năng ty thể trên dòng tế bào U-87MG. Đáng chú ý, sự suy giảm cường độ và thay đổi phân bố tín hiệu huỳnh quang của MitoTracker xảy ra song song, thậm chí có xu hướng xuất hiện sớm hơn so với các biến đổi hình thái rõ rệt của tế bào. Mặc dù các quan sát từ nhuộm MitoTracker Orange cho thấy sự thay đổi rõ rệt về hình thái và sự phân bố của ty thể theo nồng độ α -mangostin, nhưng phương pháp này chủ yếu cung cấp thông tin mang tính định tính về cấu trúc và trạng thái ty thể, chưa phản ánh trực tiếp mức độ thay đổi chức năng của màng ty thể. Do đó, để đánh giá một cách chính xác hơn ảnh hưởng của α -mangostin lên chức năng ty thể, đặc biệt là tính toàn vẹn của điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$), cần sử dụng các phương pháp định lượng chuyên biệt. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành đo điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$) nhằm xác định mức độ rối loạn chức năng ty thể dưới tác động của α -mangostin. Việc kết hợp giữa quan sát hình thái ty thể (thông qua MitoTracker) và dữ liệu định lượng $\Delta\Psi\text{m}$ cho phép cung cấp cái nhìn toàn diện hơn về tác động của hợp chất này lên ty thể, từ thay đổi cấu trúc đến suy giảm chức năng. Đồng thời, đây cũng là cơ sở quan trọng để làm rõ vai trò của ty thể trong cơ chế cảm ứng apoptosis của α -mangostin trên tế bào U-87MG.



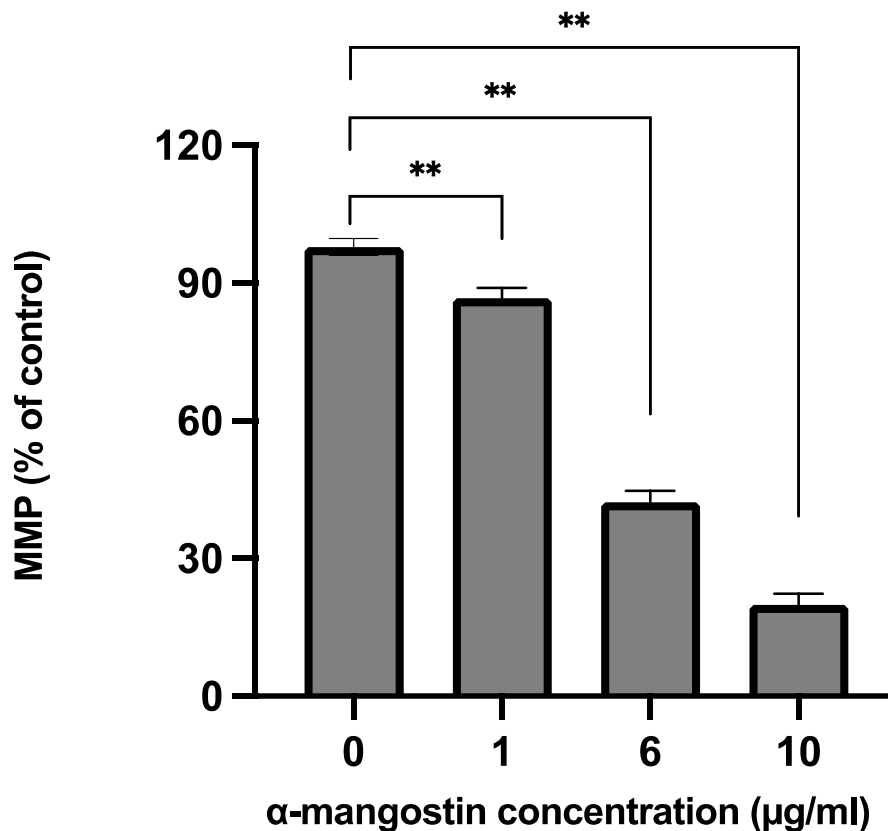
Hình 3.11. Hình thái ty thể và nhân tế bào ở tế bào U87MG được xử lý bằng α -mangostin. Tế bào U87MG được xử lý với α -mangostin ở các nồng độ 1, 6 và 10 $\mu\text{g/mL}$ trong 24 giờ, sau đó nhuộm MitoTracker Orange để quan sát ty thể và nhuộm DAPI để đánh dấu nhân tế bào. Hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang (Nikon Eclipse Ti-E, Nhật Bản) với vật kính 10 \times . Thanh tỷ lệ = 50 μm .

3.4.2. Đánh giá sự thay đổi điện thế màng ty thể

Điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$) là một chỉ số chức năng phản ánh khả năng duy trì gradient điện hóa và hoạt động hô hấp của ty thể. Trong nghiên cứu này, $\Delta\Psi\text{m}$ được đánh giá thông qua nhuộm Rhodamine 6G và đo cường độ huỳnh quang bằng máy microplate reader. Do Rhodamine 6G tích lũy trong ty thể phụ thuộc vào điện thế màng, cường độ huỳnh quang thu được có mối tương quan trực tiếp với mức độ toàn vẹn của $\Delta\Psi\text{m}$. Sự thay đổi $\Delta\Psi\text{m}$ được ghi nhận sau 24 giờ xử lý tế bào U-87MG với α -mangostin ở các nồng độ khác nhau.

Ở nhóm chứng âm, cường độ huỳnh quang duy trì ở mức cao, cho thấy ty thể hoạt động ổn định và điện thế màng được bảo toàn. Khi xử lý với α -mangostin ở nồng

độ 1 $\mu\text{g/mL}$, cường độ huỳnh quang bắt đầu giảm nhẹ, phản ánh sự suy giảm bước đầu của $\Delta\Psi\text{m}$. Mặc dù mức thay đổi chưa rõ rệt, kết quả này cho thấy α -mangostin có thể tác động sớm lên chức năng ty thể, trước khi xuất hiện các biến đổi hình thái rõ ràng ở cấp độ tế bào. Tại nồng độ 6 $\mu\text{g/mL}$, sự suy giảm $\Delta\Psi\text{m}$ trở nên rõ rệt, với cường độ huỳnh quang giảm xuống còn $42,34 \pm 3,01\%$ so với đối chứng. Điều này cho thấy hiện tượng khử cực màng ty thể đã xảy ra, dẫn đến suy giảm khả năng duy trì gradient proton và rối loạn chức năng hô hấp của ty thể. Ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$, $\Delta\Psi\text{m}$ tiếp tục giảm mạnh xuống còn $20,91 \pm 2,12\%$ (Hình 3.12), cho thấy sự suy giảm sâu chức năng màng ty thể và mất khả năng duy trì điện thế màng. Mức suy giảm này thường liên quan đến sự gia tăng tính thấm của màng ngoài ty thể, một bước quan trọng trong việc khởi phát con đường apoptosis nội sinh.



Hình 3.12. Ảnh hưởng của α -mangostin lên điện thế màng ty thể. Điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$) được đánh giá thông qua nhuộm Rhodamine 6G. Trục hoành biểu thị nồng độ α -mangostin ($\mu\text{g/mL}$), trong đó 0 $\mu\text{g/mL}$ là nhóm đối chứng không xử lý, trong khi trục tung biểu thị cường độ huỳnh quang tương đối (Mitochondrial Membrane Potential – MMP) được chuẩn hóa so với đối chứng. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ ba thí nghiệm độc lập ($n = 3$). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) ($p < 0,001$).

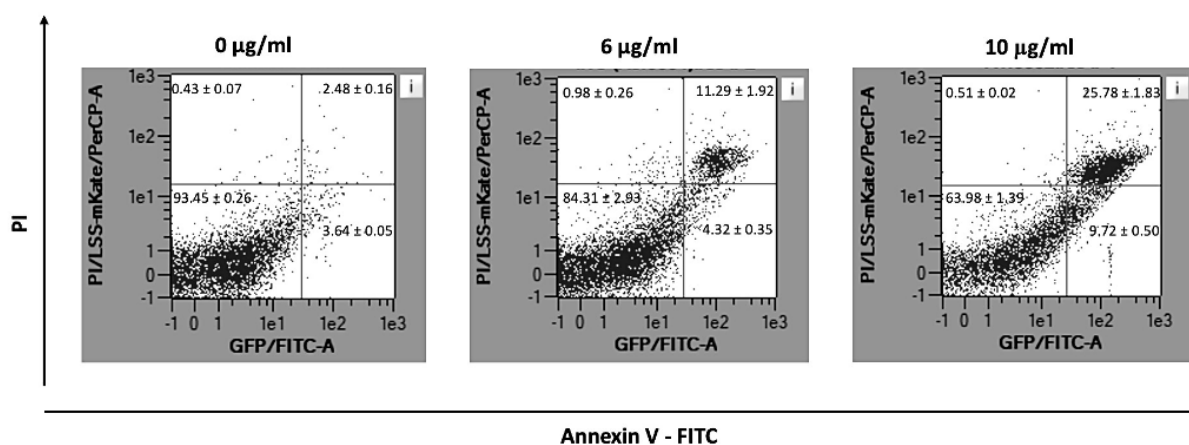
Các dữ liệu định lượng về $\Delta\Psi_m$ phù hợp với những biến đổi hình thái tế bào đã quan sát trước đó, bao gồm hiện tượng co rút, tròn hóa và giảm khả năng bám dính – những đặc trưng điển hình của tế bào đang bước vào apoptosis. Sự tương quan này cho thấy các biến đổi về hình thái không chỉ là biểu hiện bề mặt mà có liên quan trực tiếp đến sự suy giảm chức năng ty thể. Mức độ điện thế màng trong thí nghiệm này được đánh giá độc lập thông qua Rhodamine 6G, phản ánh trực tiếp trạng thái chức năng của màng ty thể, khác với nhuộm MitoTracker ở phần trước chủ yếu cung cấp thông tin về hình thái và sự phân bố của ty thể. Về mặt cơ chế, ty thể được xác định là trung tâm điều hòa apoptosis nội sinh: sự mất ổn định màng ty thể có thể dẫn đến rối loạn điện thế ($\Delta\Psi_m$), giải phóng cytochrome c và kích hoạt caspase khởi đầu con đường apoptotic. Các nghiên cứu trên các dòng ung thư khác như MCF-7 (ung thư vú), COLO 205 (ung thư đại tràng) hay HepG2 (ung thư gan) cũng ghi nhận rằng α -mangostin tác động lên ty thể, làm suy giảm $\Delta\Psi_m$, tăng tỷ lệ Bax/Bcl-2 và kích hoạt caspase-3/-9, từ đó thúc đẩy apoptosis nội sinh [47, 48, 72]. Cơ chế này liên quan đến stress oxy hóa tại ty thể, suy giảm hô hấp và tăng ROS, tạo tín hiệu nội sinh thúc đẩy chết tế bào. Mặc dù cơ chế tác động lên ty thể đã được chứng minh trên một số mô hình tế bào ung thư khác, tuy nhiên chưa có nghiên cứu chuyên sâu trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm (glioblastoma). Kết quả hiện tại cho thấy α -mangostin tác động trực tiếp và mạnh mẽ lên chức năng ty thể, làm mất $\Delta\Psi_m$, suy giảm chức năng sống còn của tế bào và tạo điều kiện khởi phát apoptosis. Việc tập trung đánh giá $\Delta\Psi_m$ không chỉ giúp làm rõ cơ chế phân tử của α -mangostin trên glioblastoma mà còn cung cấp cơ sở giải thích cho các rối loạn cân bằng Bax/Bcl-2 và kích hoạt con đường apoptotic nội sinh.

Sự suy giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi_m$) quan sát được trong nghiên cứu này cho thấy α -mangostin có khả năng gây rối loạn chức năng ty thể có ý nghĩa quan trọng trong con đường apoptosis nội sinh. Theo cơ chế, sự mất ổn định $\Delta\Psi_m$ thường đi kèm với tăng tính thấm màng ngoài ty thể, tạo điều kiện cho việc giải phóng các yếu tố tiền apoptosis và khởi phát chuỗi tín hiệu dẫn đến chết tế bào theo chương trình. Tuy nhiên, sự thay đổi về $\Delta\Psi_m$ mới chỉ phản ánh biến động ở cấp độ chức năng bào quan và chưa đủ để khẳng định một cách trực tiếp quá trình apoptosis đang diễn ra ở cấp độ tế bào. Do đó, để làm rõ liệu các rối loạn chức năng ty thể này có thực sự chuyển hóa thành đáp ứng chết tế bào theo chương trình hay không, cần thiết phải đánh giá các dấu ấn đặc trưng của apoptosis ở cấp độ tế bào. Trong nghiên cứu này, quá trình apoptosis được tiếp tục khảo sát thông qua phương pháp nhuộm Annexin V-FITC/PI kết hợp phân tích bằng flow cytometry, cho phép phân biệt các giai đoạn khác nhau của tế bào trong tiến trình chết theo chương trình.

3.5. Đánh giá tác dụng gây apoptosis của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG

3.5.1. Đánh giá khả năng cảm ứng chết theo chương trình (apoptosis) của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG

Để khảo sát khả năng gây chết theo chương trình của α -mangostin trên dòng tế bào ung thư thần kinh đệm U-87MG, tế bào được xử lý với hợp chất trong 24 giờ, sau đó tiến hành nhuộm Annexin V-FITC/PI và phân tích bằng flow cytometry. Kết quả phân tích cho thấy trong nhóm đối chứng không xử lý (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tỉ lệ tế bào apoptotic ghi nhận ở mức $6.12 \pm 0.17\%$, bao gồm $2.48 \pm 0.16\%$ tế bào apoptotic giai đoạn sớm và $3.64 \pm 0.05\%$ tế bào apoptotic giai đoạn muộn. Điều này cho thấy mức độ apoptosis tự nhiên của tế bào trong điều kiện nuôi cấy bình thường. Khi xử lý tế bào với α -mangostin, số lượng tế bào apoptotic tăng một cách phụ thuộc nồng độ. Ở nồng độ 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tổng tỉ lệ tế bào apoptotic đạt $15.61 \pm 1.95\%$, trong đó tế bào apoptotic giai đoạn sớm chiếm $11.29 \pm 1.92\%$, giai đoạn muộn chiếm $4.32 \pm 0.35\%$. Khi tăng nồng độ lên 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tỉ lệ apoptosis tăng mạnh lên $35.50 \pm 1.90\%$, gồm $25.78 \pm 1.83\%$ apoptotic sớm và $9.72 \pm 0.50\%$ apoptotic muộn (Hình 3.13).



Hình 3.13. Định lượng tế bào apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI sau khi xử lý với α -mangostin. Tế bào U87MG được xử lý với các nồng độ của α -mangostin (0, 6 và 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) trong 24 giờ, sau đó được nhuộm Annexin V-FITC và propidium iodide (PI). Kết quả biểu diễn bằng các biểu đồ dot plot của flow cytometry, trong đó tín hiệu huỳnh quang Annexin V-FITC được thể hiện trên trục hoành và tín hiệu PI trên trục tung. Tỷ lệ tế bào apoptosis (bao gồm apoptosis sớm và apoptosis muộn) được xác định bằng phương pháp đo dòng tế bào (flow cytometry). Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ ba thí nghiệm độc lập ($n = 3$).

Kết quả từ phân tích Annexin V-FITC/PI cho thấy α -mangostin làm tăng apoptosis ở U-87MG theo nồng độ, với tỉ lệ tế bào apoptotic giai đoạn sớm chiếm ưu thế, cho thấy hợp chất này bắt đầu kích hoạt bước khởi đầu của quá trình apoptosis nội sinh. Hiện tượng này hoàn toàn tương thích với các quan sát hình thái tế bào, nơi mà tế bào bắt đầu co tròn, giảm bám dính và mất hình dạng bình thường, cũng như với các kết quả về điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$), khi $\Delta\Psi\text{m}$ giảm rõ rệt theo nồng độ, phản ánh sự suy giảm chức năng hô hấp và mất ổn định ty thể. Sự tương quan này cho thấy α -mangostin tác động lên apoptosis thông qua cơ chế trung gian ty thể và việc gia tăng apoptosis giai đoạn sớm và apoptosis muộn cũng củng cố nhận định rằng ty thể đóng vai trò trung tâm

trong việc khởi phát tín hiệu chết theo chương trình. Các kết quả tăng tỉ lệ tế bào apoptotic theo nồng độ α -mangostin quan sát được thông qua phân tích Annexin V-FITC/PI phù hợp với cơ chế gây chết tế bào đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây, trong đó có nghiên cứu trên dòng YD-15 (ung thư biểu mô vảy lưỡi). Trong nghiên cứu này, Joo và cộng sự (2018) đã chứng minh α -mangostin chiết xuất từ vỏ quả *Garcinia mangostana* không chỉ ức chế sự tăng sinh của tế bào YD-15 mà còn làm tăng rõ rệt tỉ lệ apoptosis theo nồng độ, đồng thời ghi nhận các đặc trưng apoptotic như co tế bào, phân mảnh DNA và biến đổi hình thái nhân. Tác giả cũng ghi nhận sự tăng hoại tử tế bào cùng với sự gia tăng tín hiệu apoptotic sớm và muộn ở các nồng độ α -mangostin sau 24 giờ xử lý, khẳng định hiệu quả gây apoptosis của hợp chất này trên mô hình ung thư biểu mô vòm miệng [73]. So sánh với kết quả trong nghiên cứu trên dòng U-87MG của chúng tôi, α -mangostin cũng gây tăng tỷ lệ apoptosis theo hướng phụ thuộc nồng độ sau 24 giờ xử lý, với sự gia tăng rõ rệt của quần thể tế bào apoptotic, đặc biệt ở giai đoạn sớm. Việc tỷ lệ apoptosis sớm chiếm ưu thế trong nghiên cứu này gợi ý rằng α -mangostin chủ yếu tác động vào các bước khởi phát của quá trình apoptotic trước khi tiến triển sang giai đoạn muộn. Mặc dù nghiên cứu trên dòng tế bào YD-15 không tập trung trực tiếp vào chức năng ty thể, nhưng sự gia tăng apoptosis sớm và muộn ở các nồng độ α -mangostin cao phù hợp với các quan sát về rối loạn chức năng ty thể ($\Delta\Psi_m$ giảm) được ghi nhận trong nghiên cứu này trên U-87MG. Điều này gợi ý rằng dù mô hình ung thư khác nhau, α -mangostin có thể kích hoạt các con đường tín hiệu apoptosis đa dạng nhưng hội tụ vào điểm chung là làm mất ổn định các cơ chế bảo toàn khả năng sống còn của tế bào. Kết quả phân tích apoptosis trên U-87MG không chỉ phù hợp với dữ liệu sinh học phân tử được ghi nhận trong một vài nghiên cứu trước đây, mà còn mở rộng hiểu biết về hiệu ứng dẫn đến apoptosis ở dòng glioblastoma - một mô hình ung thư có tính kháng mạnh và tiên lượng xấu. Sự tương đồng trong mô hình tăng tỉ lệ apoptosis giữa các dòng tế bào này củng cố luận điểm rằng α -mangostin là hợp chất có khả năng kích hoạt apoptosis một cách hiệu quả, bất kể nguồn gốc mô tế bào và cho thấy cơ chế này có thể là một điểm nền tảng để phát triển các liệu pháp về con đường chết nội sinh trong điều trị ung thư.

3.4.2. Sự thay đổi biểu hiện protein liên quan đến quá trình apoptosis và trục tín hiệu AKT/GSK3 β sau xử lý α -mangostin.

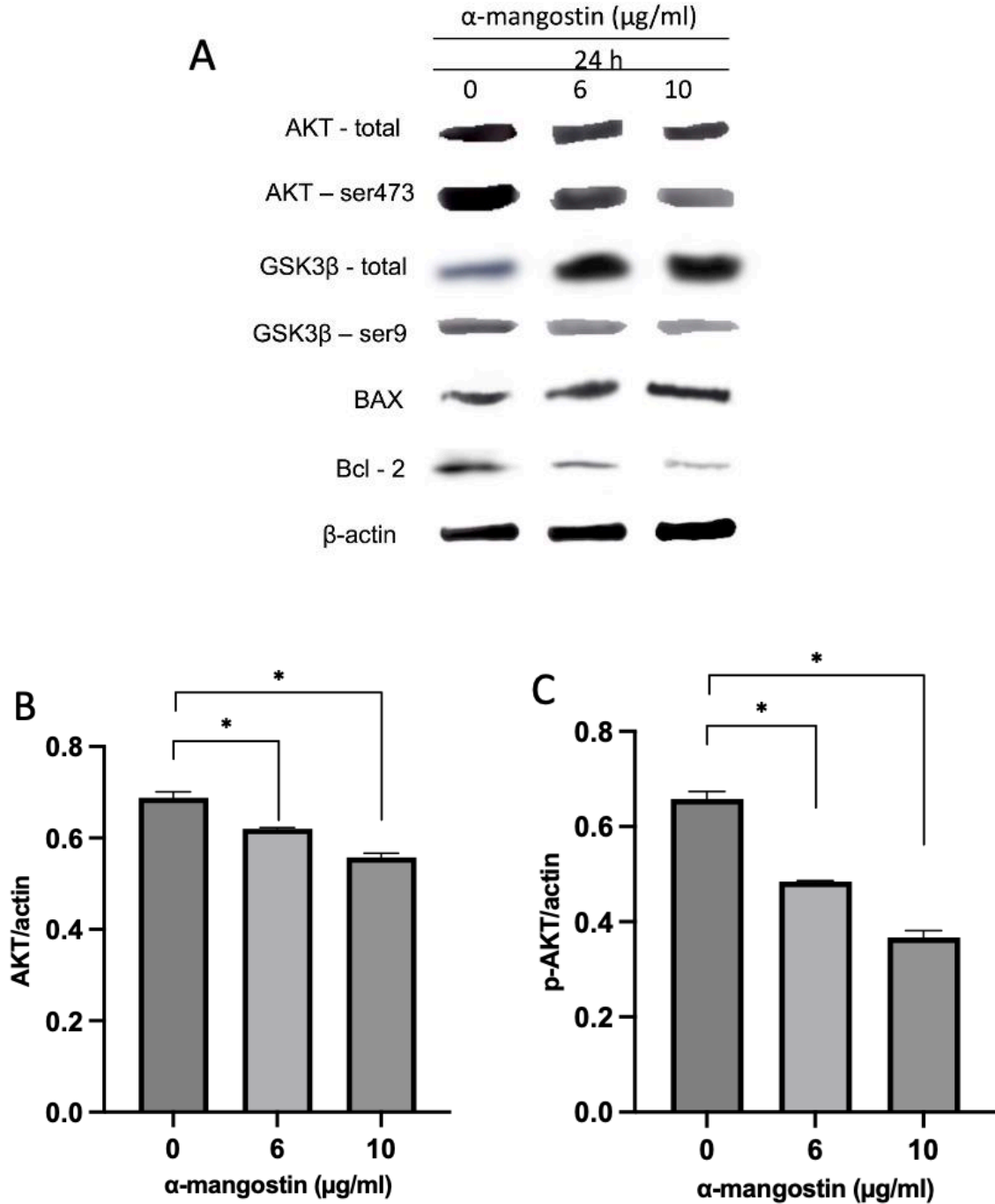
Để làm sáng tỏ cơ chế phân tử liên quan đến tác dụng cảm ứng apoptosis của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Western blot nhằm đánh giá sự biến đổi biểu hiện của các protein chủ chốt trong trục tín hiệu AKT/GSK3 β và nhóm protein điều hòa apoptosis họ BCL-2. Đây là hai hệ thống tín hiệu trung tâm chi phối cân bằng giữa sống còn và chết tế bào, đặc biệt quan trọng trong glioblastoma – loại ung thư có mức độ hoạt hóa AKT cao và khả năng kháng trị nổi bật.

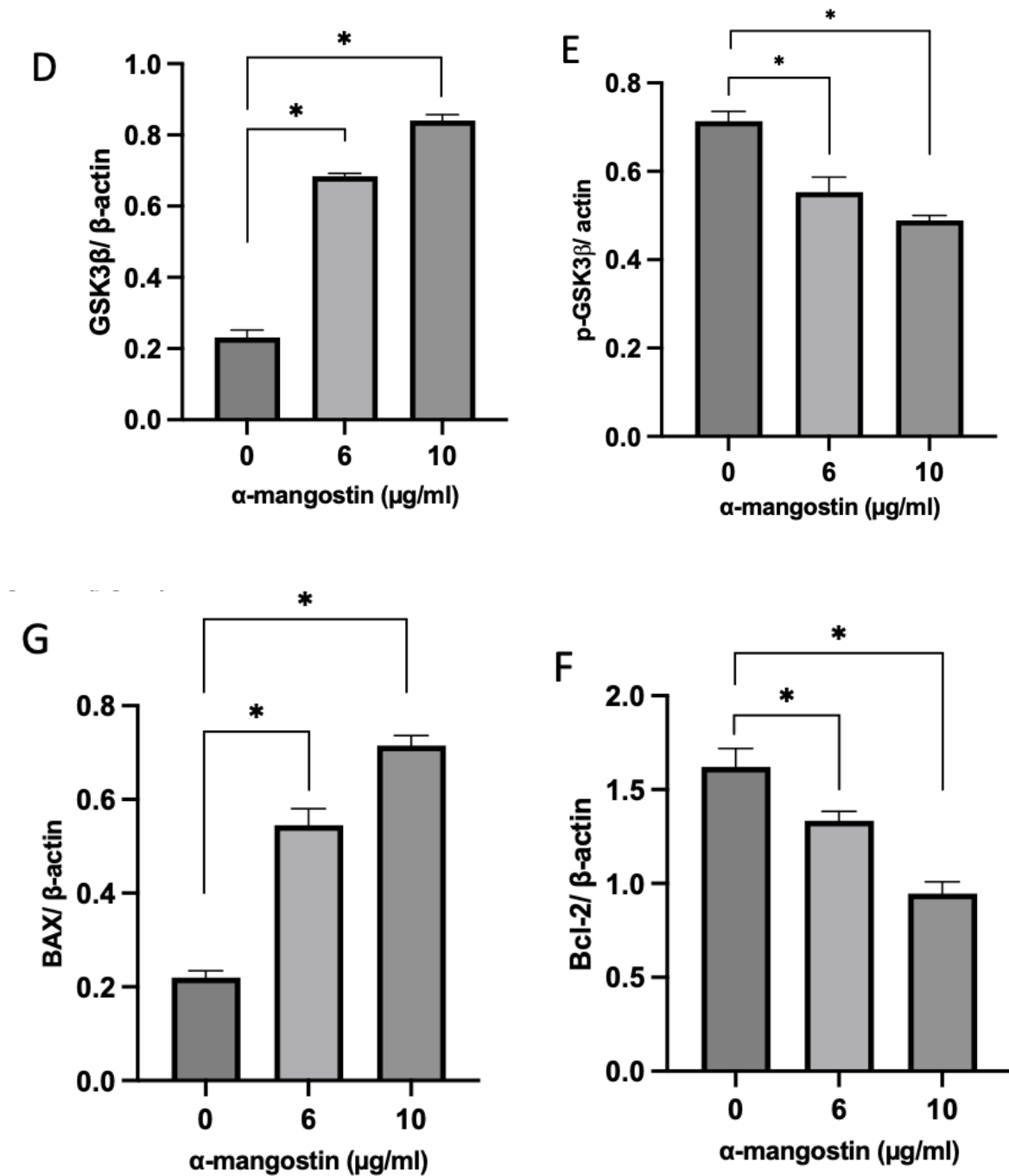
Kết quả Western blot (Hình 3.14A) cho thấy α -mangostin làm giảm đáng kể mức phosphoryl hóa AKT1 tại vị trí Ser473 theo xu hướng phụ thuộc nồng độ, qua đó phản ánh sự ức chế hoạt hóa của kinase này. Trong tế bào ung thư, AKT đóng vai trò như một “nút điều phối sống còn”, thúc đẩy tăng sinh, chuyển hóa và ức chế apoptosis thông qua điều hòa nhiều protein. Do đó, sự suy giảm phosphoryl hóa AKT1 cho thấy α -mangostin đã can thiệp trực tiếp vào trục tín hiệu sống sót then chốt, làm suy yếu khả năng duy trì trạng thái tăng sinh liên tục của tế bào U-87MG. Sự ức chế AKT kéo theo những biến đổi đáng chú ý ở protein đích là GSK3 β . Cụ thể, mức phosphoryl hóa GSK3 β tại Ser9 – vị trí liên quan đến trạng thái bất hoạt – giảm rõ rệt sau xử lý α -mangostin. Điều này đồng nghĩa với việc GSK3 β được giải phóng khỏi sự kìm hãm của AKT và chuyển sang trạng thái hoạt hóa. Về mặt sinh học, GSK3 β hoạt hóa có khả năng ức chế chu kỳ tế bào, điều hòa các yếu tố phiên mã liên quan đến tăng sinh, đồng thời thúc đẩy apoptosis thông qua nhiều cơ chế khác nhau [74]. Như vậy, α -mangostin không chỉ làm gián đoạn tín hiệu sống còn mà còn chủ động chuyển dịch cân bằng nội bào theo hướng tiền apoptotic thông qua việc kích hoạt GSK3 β , tạo ra hiệu ứng điều hòa hai chiều trên trục AKT/GSK3 β .

Song song với các thay đổi của tín hiệu AKT/GSK3 β , α -mangostin cũng gây điều hòa rõ rệt nhóm protein BCL-2 – nhóm protein quan trọng trong việc kiểm soát tính toàn vẹn của ty thể. Kết quả cho thấy nồng độ α -mangostin càng cao thì mức biểu hiện của BCL-2 – protein có chức năng chống apoptosis càng giảm. Ngược lại, BAX – protein tiền apoptotic lại tăng đáng kể theo nồng độ (Hình 13.4G và 13.4F). Sự thay đổi theo hướng tăng tỷ lệ BAX/BCL-2 là một chỉ dấu quan trọng cho việc kích hoạt con đường apoptosis nội sinh qua ty thể [75]. Sự mất cân bằng này làm tăng tính thấm màng ngoài ty thể, dẫn đến giải phóng cytochrome c và các yếu tố tiền apoptotic khác vào bào tương, từ đó kích hoạt dòng thác caspase và các biến đổi hình thái đặc trưng của apoptosis. Đáng chú ý, khi đặt trong mối liên hệ với kết quả suy giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\psi_m$) đã quan sát trước đó, có thể thấy α -mangostin gây rối loạn chức năng ty thể một cách nhất quán ở cả mức độ chức năng và phân tử. Điều này cho thấy ty thể là một trong những đích tác động chính của hợp chất, đồng thời nhấn mạnh vai trò trung tâm của con đường nội sinh trong cơ chế gây chết tế bào của α -mangostin.

Không chỉ dừng lại ở đó, việc đồng thời ức chế AKT và hoạt hóa GSK3 β có thể liên quan đến khả năng làm giảm tính kháng trị của tế bào glioblastoma, do trục tín hiệu này vốn được biết đến là yếu tố góp phần vào sự đề kháng với hóa trị và xạ trị. Vì vậy, tác động đa tầng của α -mangostin lên trục AKT/GSK3 β và hệ thống BCL-2 không chỉ thúc đẩy apoptosis mà còn có thể mở ra hướng tiếp cận mới trong việc tăng độ nhạy điều trị của tế bào ung thư. Các kết quả Western blot đã cung cấp bằng chứng rõ ràng rằng α -mangostin tác động đồng thời lên nhiều mạng lưới tín hiệu quan trọng: ức chế tín hiệu sống còn AKT, giải phóng và hoạt hóa GSK3 β , đồng thời tái lập cân bằng BAX/BCL-

2 theo hướng tiền apoptotic. Sự phối hợp của các cơ chế này tạo nên hiệu ứng hiệp lực mạnh mẽ, thúc đẩy quá trình apoptosis ở tế bào U-87MG và làm nổi bật tiềm năng của α -mangostin như một tác nhân chống ung thư đa đích, đặc biệt trong bối cảnh điều trị glioblastoma.





Hình 3.14. α -Mangostin làm thay đổi mức biểu hiện của AKT, GSK3 β , Bax và Bcl-2 trong tế bào U-87MG. Tế bào U-87MG được xử lý với α -mangostin ở các nồng độ 0, 6 và 10 $\mu\text{g/mL}$ trong 24 giờ.

(A) Hình ảnh Western blot đại diện thể hiện mức biểu hiện của các protein: AKT tổng số, AKT phosphoryl hóa tại vị trí Ser473 (p-AKT Ser473), GSK3 β tổng số, GSK3 β phosphoryl hóa tại vị trí Ser9 (p-GSK3 β Ser9), Bax và Bcl-2. β -actin được sử dụng làm protein nội chuẩn (loading control).

(B–G) Phân tích định lượng mức biểu hiện protein, được chuẩn hóa theo β -actin và biểu diễn tương đối so với nhóm đối chứng. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ ba thí nghiệm độc lập ($n = 3$), với sự khác biệt có

ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$ so với đối chứng. Cường độ các băng protein được định lượng tương đối bằng phần mềm ImageJ.

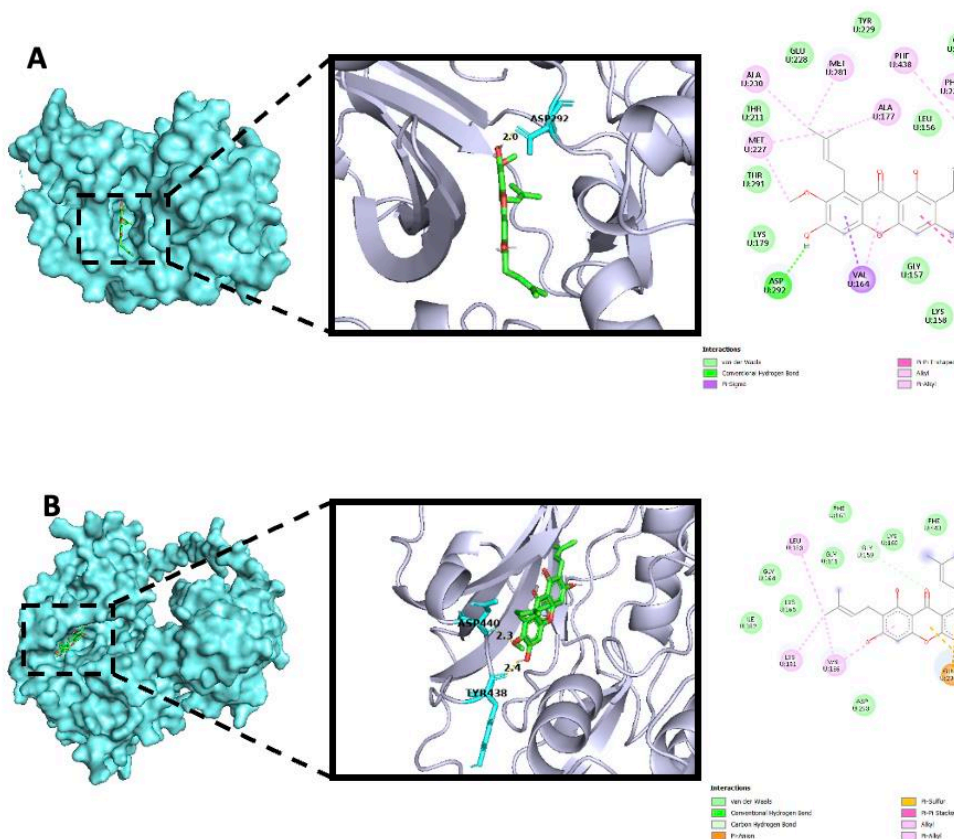
3.6. Kết quả mô phỏng docking phân tử giữa α -mangostin và AKT1, GSK3 β

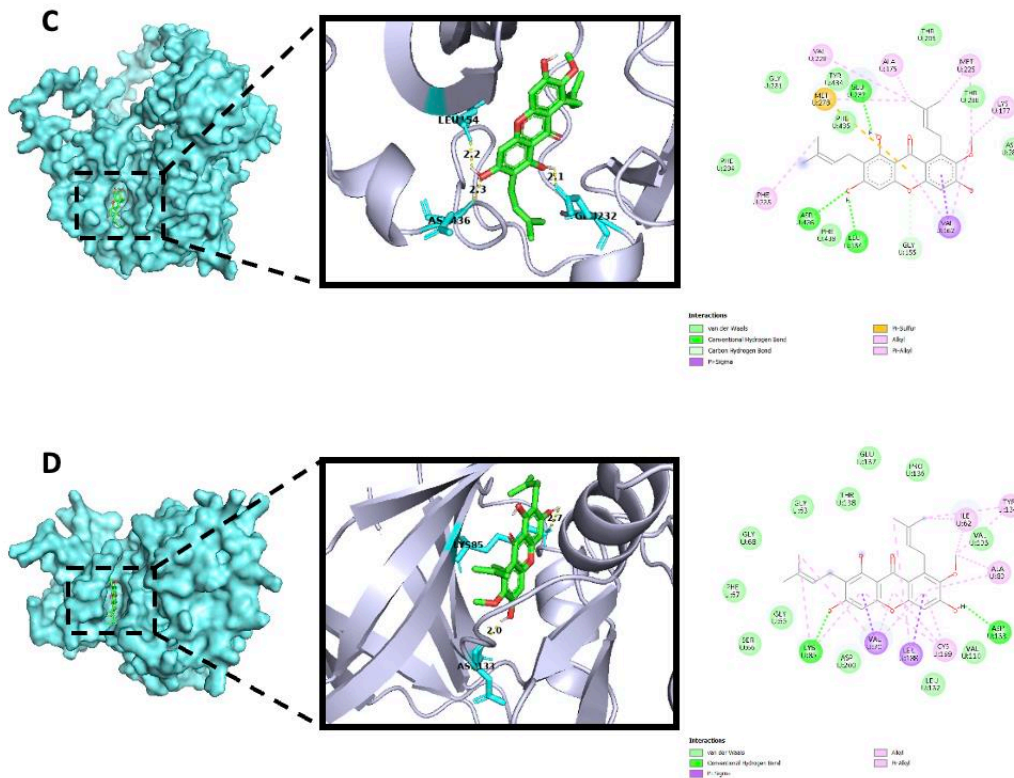
Kết quả docking phân tử cho thấy α -mangostin có khả năng gắn kết với các protein đích AKT1, AKT2, AKT3 và GSK3 β với mức độ ái lực khác nhau. Trong đó, phức hợp AKT1 – α -mangostin thể hiện năng lượng liên kết thấp nhất ($\Delta G = -9,60$ kcal/mol), cho thấy ái lực gắn kết mạnh nhất trong các protein được khảo sát. Phức hợp này được ổn định bởi một liên kết hydro với Asp292, cùng nhiều tương tác kỵ nước quan trọng, bao gồm tương tác π - σ với Val164, tương tác π - π với Phe442, và các tương tác π -alkyl với Val164, Ala177, Met227, Ala230, Phe237 và Met281. Ngoài ra, nhiều tương tác van der Waals với các acid amin lân cận trong hốc gắn cũng góp phần ổn định cấu trúc phức hợp. Đối với AKT2 và AKT3, α -mangostin thể hiện ái lực liên kết ở mức trung bình, với giá trị ΔG lần lượt là $-7,30$ và $-7,34$ kcal/mol. Trong phức hợp với AKT2, α -mangostin hình thành các liên kết hydro với Tyr438 và Asp440, đồng thời xuất hiện các tương tác π -anion với Glu236, π -sulfur với Met282 và π - π với Phe439. Trong khi đó, ở phức hợp AKT3, ligand tạo liên kết hydro với Leu154, Glu232 và Asp436, cùng với các tương tác π - σ , π -sulfur và π -alkyl với các acid amin như Val162, Met278 và Ala175.

Đối với GSK3 β , α -mangostin thể hiện ái lực liên kết tương đối cao ($\Delta G = -8,99$ kcal/mol). Phức hợp này được ổn định bởi hai liên kết hydro với Lys85 và Asp133, bên cạnh các tương tác π - σ , π -alkyl và van der Waals với các residue trong vùng gắn. So sánh với các acid amin thuộc vị trí gắn ATP được báo cáo trong cơ sở dữ liệu UniProt cho thấy α -mangostin có tương tác trực tiếp với một số residue quan trọng, bao gồm Val164 trong AKT1; Gly159, Val166 và Lys181 trong AKT2; Leu154, Gly155, Val162 và Lys177 trong AKT3; và Ile62, Val70 và Lys85 trong GSK3 β . Các kết quả này cho thấy ligand được định vị trong vùng gắn ATP của các kinase khảo sát (Hình 3.15, Bảng 3.1).

Kết quả nghiên cứu cho thấy α -mangostin có khả năng tác động đáng kể lên trực tiếp tín hiệu AKT/GSK3 β – một trong những con đường quan trọng điều hòa sự sống sót và chết theo chương trình của tế bào ung thư. Phân tích docking phân tử đã cung cấp bằng chứng ban đầu về khả năng tương tác trực tiếp của α -mangostin với các kinase thuộc họ AKT và GSK3 β . Giá trị năng lượng liên kết dao động từ $-7,30$ đến $-9,60$ kcal/mol cho thấy các phức hợp ligand – protein được hình thành tương đối ổn định, trong đó ái lực mạnh nhất được ghi nhận với AKT1, tiếp theo là GSK3 β . Điều này gợi ý rằng α -mangostin có xu hướng ưu tiên tương tác với AKT1 – isoform đóng vai trò trung tâm trong điều hòa tín hiệu tăng sinh và chống apoptosis ở nhiều loại ung thư, bao gồm glioblastoma. Phân tích chi tiết các tương tác cho thấy α -mangostin có khả năng hình thành liên kết hydro và tương tác kỵ nước với nhiều acid amin quan trọng nằm trong

vùng gắn ATP của các kinase. Đáng chú ý, các residue như Asp292 (AKT1), Tyr438 và Asp440 (AKT2), Leu154, Glu232 và Asp436 (AKT3), cùng Lys85 và Asp133 (GSK3 β) đều là những vị trí có vai trò chức năng trong hoạt động xúc tác của enzyme. Sự định vị của α -mangostin trong hốc xúc tác và sự chồng lấp với vùng gắn ATP cho thấy hợp chất này có thể cạnh tranh với ATP, từ đó làm gián đoạn quá trình phosphoryl hóa – một bước thiết yếu trong hoạt hóa kinase. Cơ chế ức chế cạnh tranh tại vị trí gắn ATP là một chiến lược phổ biến của nhiều thuốc ức chế kinase trong điều trị ung thư, do đó kết quả này gợi mở tiềm năng của α -mangostin như một tác nhân điều hòa kinase có nguồn gốc tự nhiên. Các dự đoán từ mô hình docking được củng cố bởi kết quả thực nghiệm *in vitro*, khi ghi nhận sự giảm phosphoryl hóa của AKT1 tại vị trí Ser473 – một chỉ dấu quan trọng phản ánh trạng thái hoạt hóa của AKT. Đồng thời, mức phosphoryl hóa ức chế của GSK3 β tại Ser9 cũng giảm, cho thấy sự giải ức chế và tái hoạt hóa của kinase này. Sự điều hòa đồng thời hai protein này phản ánh sự can thiệp của α -mangostin vào trực tiếp tín hiệu AKT/GSK3 β , dẫn đến sự thay đổi cân bằng giữa các tín hiệu sống sót và chết tế bào.





Hình 3.15. Tương tác docking phân tử của α -mangostin với AKT1 (A), AKT2 (B), AKT3 (C) và GSK3 β (D). Mô hình liên kết 3D và sơ đồ tương tác 2D trong vùng hoạt động của các kinase AKT1 (PDB ID: 4GV1), AKT2 (AF-P31751), AKT3 (AF-Q9Y243) và GSK3 β (PDB ID: 1Q5K).

Bảng 3.1. Năng lượng liên kết tự do và các gốc acid amin tham gia tương tác của α -mangostin với các isoform AKT và GSK3 β .

Complex	ΔG (kcal/mol)	Interaction
<i>AKT1 - α-mangostin</i>	-9.60	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrogen bond: Asp292; - π-σ: Val164; - π-π: Phe442; - π-alkyl: Val164, Ala177, Met227, Ala230, Phe237, Met281, Phe438; - van der Waals: Leu156, Gly157, Lys158, Lys179, Thr211, Glu228, Tyr229, Gly233, Glu234, Phe236, Thr291, Tyr437, Asp439.

<i>AKT2 - α-mangostin</i>	-7.30	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrogen bond: Tyr438, Asp440; - C-H: Gly159, Phe439; - π-anion: Glu236; - π-sulfur: Met282; - π-π: Phe439; - π-alkyl: Val166, Lys181, Leu183; - van der Waals: Leu158, Lys160, Gly161, Phe163, Gly164, Lys165, Ile182, Gly235, Phe239, Asp293, Phe443.
<i>AKT3 - α-mangostin</i>	-7.34	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrogen bond: Leu154, Glu232, Asp436; - C-H: Gly155; - π-σ: Val162; - π-sulfur: Met278; - π-alkyl: Ala175, Lys177, Met225, Val228, Phe235, Met278; - van der Waals: Thr209, Gly231, Phe234, Thr288, Asp289, Tyr434, Phe435, Phe439.
<i>GSK3β - α-mangostin</i>	-8.99	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrogen bond: Lys85, Asp133; - π-σ: Val70, Leu188; - π-alkyl: Ile62, Val70, Ala83, Lys85, Tyr134, Leu188, Cys199; - van der Waals: Gly63, Gly65, Ser66, Phe67, Gly68, Val110, Leu132, Val 135, Pro136, Glu137, Thr138, Asp200.

Trong khi glioblastoma vẫn là một trong những khối u ác tính có tiên lượng xấu nhất, việc tìm kiếm các tác nhân mới không chỉ dừng lại ở khả năng gây độc tế bào mà còn phải trả lời được một câu hỏi quan trọng hơn: liệu chúng có thể can thiệp vào những cơ chế nền tảng tạo nên tính kháng trị của khối u hay không. Một trong những trục tín hiệu then chốt duy trì sự sống còn của glioblastoma là PI3K/AKT, vốn thường xuyên bị hoạt hóa quá mức do đột biến hoặc mất chức năng [76]. Chính sự phụ thuộc này khiến AKT trở thành “điểm tựa sinh học” của tế bào u, đồng thời là mục tiêu điều trị tiềm năng. Trong khi đó, α -mangostin - một xanthone tự nhiên phân lập từ *Garcinia mangostana*, đã được chứng minh có hoạt tính chống ung thư trên một số mô hình biểu

mô như ung thư vú, gan và phổi [77, 78]. Tuy nhiên, chưa có bằng chứng về tác động của hợp chất này trên glioblastoma và mối liên hệ trực tiếp với trục tín hiệu sống còn đặc trưng của GBM.

Các kết quả thu được cho thấy α -mangostin không chỉ làm giảm khả năng sống của tế bào U-87MG mà còn gây ra sự thay đổi có hệ thống trong mạng lưới tín hiệu nội bào. Sự giảm phosphoryl hóa AKT tại Ser473 gợi ý rằng hợp chất này làm suy yếu hoạt tính kinase thay vì chỉ đơn thuần ức chế biểu hiện protein. Đáng chú ý là sự thay đổi này kéo theo trạng thái hoạt hóa của GSK3 β – một kinase nằm ở nút giao giữa tín hiệu sống còn và apoptosis. Khi AKT bị ức chế, GSK3 β thoát khỏi trạng thái bị phosphoryl hóa ức chế, từ đó thúc đẩy các tín hiệu tiền apoptosis. Sự chuyển dịch cân bằng này phản ánh một thay đổi sinh học mang tính định hướng, chứ không phải một đáp ứng độc tính ngẫu nhiên. Ở glioblastoma, AKT không đơn thuần là một kinase thúc đẩy tăng sinh, nó là một trung tâm điều phối sinh tồn, kiểm soát đồng thời chuyển hóa glucose, tổng hợp protein, ức chế apoptosis và duy trì tính toàn vẹn ty thể. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự hoạt hóa liên tục của AKT trong GBM có liên quan chặt chẽ đến mất chức năng PTEN và góp phần tạo nên hiện tượng kháng apoptosis đặc trưng [76]. Do đó, việc quan sát thấy α -mangostin làm giảm phosphoryl hóa AKT không chỉ là sự thay đổi protein đơn lẻ, nó phản ánh sự can thiệp vào nút điều hòa trung tâm của tế bào u. Tiếp theo sự thay đổi trạng thái phosphoryl hóa của GSK3 β trong nghiên cứu này đặc biệt đáng quan tâm. Trong điều kiện bình thường của tế bào glioblastoma, AKT hoạt hóa sẽ phosphoryl hóa GSK3 β tại Ser9, giữ enzyme này ở trạng thái bất hoạt. Khi α -mangostin làm giảm hoạt tính AKT, GSK3 β thoát khỏi sự ức chế này và chuyển sang trạng thái hoạt động. GSK3 β hoạt hóa đã được chứng minh có khả năng thúc đẩy apoptosis thông qua nhiều cơ chế, bao gồm tăng biểu hiện BAX, giảm BCL-2 và thúc đẩy quá trình thấm màng ngoài ty thể [79]. Như vậy, sự điều biến trục AKT/GSK3 β trong nghiên cứu này không chỉ là một thay đổi song song, mà là một chuỗi hợp lý về mặt sinh học. Trong nhiều mô hình ung thư, AKT có thể trực tiếp điều hòa các thành phần của màng ty thể, từ đó duy trì điện thế màng và ngăn chặn giải phóng cytochrome c [80]. Khi tín hiệu này bị suy yếu, màng ngoài ty thể trở nên dễ thấm hơn, đặc biệt khi tỷ lệ BAX/BCL-2 tăng lên. Sự gia tăng BAX quan sát được trong nghiên cứu này không chỉ là một dấu ấn apoptosis, mà còn phản ánh sự chuyển dịch cấu trúc màng ty thể về trạng thái dễ bị phá vỡ. Sự giảm $\Delta\Psi_m$ là hệ quả của sự mất cân bằng tín hiệu nội bào, chứ không phải một hiện tượng độc tính ngẫu nhiên. Ngoài ra, trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự tổn thương DNA diễn ra. Apoptosis nội sinh thường đi kèm với sự hoạt hóa nuclelease và gia tăng stress oxy hóa, dẫn đến đứt gãy DNA. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tổn thương DNA xuất hiện cùng với sự thay đổi trục AKT/GSK3 β , cho thấy đây có thể là một phần của tiến trình apoptosis được kiểm soát. Điều này phân biệt α -mangostin với các tác nhân gây độc DNA cổ điển như doxorubicin, vốn tạo ra tổn thương

DNA trực tiếp và mạnh mẽ [81]. Trong nghiên cứu này, tổn thương DNA có thể là kết quả của một chương trình chết tế bào được kích hoạt thông qua điều hòa tín hiệu và ty thể. So với nhiều hợp chất tự nhiên khác được báo cáo có hoạt tính trên glioblastoma, nghiên cứu này làm nổi bật một đặc điểm đáng chú ý: α -mangostin tác động đồng thời lên tín hiệu sống còn, sự cân bằng protein họ BCL-2 và chức năng ty thể trong cùng một hệ thống. Sự tích hợp này phản ánh một cơ chế đa tầng, hạn chế hiện tượng bù trừ tín hiệu – vốn là nguyên nhân khiến nhiều liệu pháp nhắm trúng đích đơn lẻ thất bại trong GBM.

Một khía cạnh quan trọng làm nổi bật tính mới của nghiên cứu là việc kết nối cơ chế này với dữ liệu *in silico*. Trong một số nghiên cứu trước đây về α -mangostin, sự ức chế AKT/GSK3 β được mô tả chủ yếu ở mức hiện tượng, thông qua Western blot hoặc phân tích biểu hiện protein [82], nhưng ít khi được đặt trong bối cảnh tương tác phân tử trực tiếp với kinase. Kết quả docking trong nghiên cứu hiện tại cho thấy α -mangostin có thể gắn vào các góc liên kết ATP của AKT1 và GSK3 β với ái lực đáng kể, hình thành các liên kết hydro với các acid amin quan trọng trong vùng xúc tác. Sự tương đồng giữa dự đoán tính toán và biểu hiện giảm phosphoryl hóa quan sát được trong dữ liệu thực nghiệm *in vitro* đã củng cố giả thuyết về cơ chế tác động trực tiếp của α -mangostin trên mô hình GBM.

Từ góc nhìn tổng thể, nghiên cứu này không chỉ dừng lại ở việc xác nhận hoạt tính gây độc của α -mangostin trên dòng tế bào U-87MG, mà còn nằm ở cách tiếp cận hệ thống nhằm liên kết các mức độ đáp ứng sinh học khác nhau của tế bào ung thư. Thay vì tập trung vào một chỉ dấu đơn lẻ, nghiên cứu đã đồng thời tích hợp các dữ liệu từ nhiều tầng phân tích, bao gồm đánh giá độc tính, biến đổi hình thái tế bào, chức năng ty thể, tổn thương DNA, các chỉ dấu phân tử và dự đoán tương tác ở cấp độ tính toán. Sự kết hợp này cho phép xây dựng một chuỗi bằng chứng có tính liên kết, góp phần làm rõ mối quan hệ giữa hiện tượng sinh học quan sát được và nền tảng cơ chế tiềm ẩn, từ đó hạn chế các diễn giải mang tính rời rạc hoặc suy đoán. Một điểm đáng chú ý khác là việc chủ động phân lập và tinh sạch α -mangostin từ nguồn nguyên liệu trong nước, thay vì phụ thuộc hoàn toàn vào các hợp chất thương mại. Cách tiếp cận này không chỉ đảm bảo tính ổn định và khả năng tái lập của vật liệu nghiên cứu, mà còn góp phần nâng cao giá trị khai thác của dược liệu bản địa trong bối cảnh phát triển các hoạt chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được quan tâm. Việc tối ưu hóa quy trình tách chiết và tinh sạch đồng thời với đánh giá hoạt tính sinh học cũng tạo ra một nền tảng tương đối hoàn chỉnh, từ khâu chuẩn bị nguyên liệu đến phân tích cơ chế tác động. Bên cạnh đó, trong bối cảnh glioblastoma là một mô hình ung thư có tính dị hợp cao và khả năng thích nghi mạnh với các áp lực điều trị, việc tiếp cận nghiên cứu theo hướng đa tầng và đa chỉ dấu như trong nghiên cứu này mang ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Thay vì đánh giá riêng lẻ từng hiện tượng, cách tiếp cận tích hợp cho phép nhận diện các xu hướng

thay đổi mang tính hệ thống, qua đó cung cấp cái nhìn toàn diện hơn về đáp ứng của tế bào ung thư trước tác động của hợp chất. Điều này đặc biệt có giá trị trong việc định hướng các nghiên cứu tiếp theo, nơi mà việc kết hợp nhiều cơ chế tác động có thể là chìa khóa để vượt qua các rào cản kháng trị đặc trưng của glioblastoma. Tuy nhiên, cũng cần nhìn nhận rằng nghiên cứu hiện tại vẫn được thực hiện trên mô hình *in vitro* với một dòng tế bào đại diện, do đó chưa phản ánh đầy đủ tính phức tạp của vi môi trường khối u trong cơ thể sống. Các yếu tố như tương tác với hệ miễn dịch, sự dị hợp nội khối u hay ảnh hưởng của vi môi trường mô đệm vẫn chưa được xem xét. Vì vậy, các nghiên cứu trong tương lai cần mở rộng sang các mô hình khác như đồng nuôi cấy, organoid hoặc mô hình *in vivo*, đồng thời đánh giá thêm tính chọn lọc của α -mangostin trên tế bào thần kinh bình thường để làm rõ hơn tiềm năng ứng dụng lâm sàng. Tổng thể, nghiên cứu này không chỉ cung cấp thêm bằng chứng về hoạt tính sinh học của α -mangostin trên glioblastoma mà còn góp phần định hình một cách tiếp cận nghiên cứu có tính hệ thống và tích hợp. Những kết quả thu được có thể xem là cơ sở ban đầu cho các hướng nghiên cứu sâu hơn nhằm khai thác tiềm năng của các hợp chất tự nhiên trong phát triển các chiến lược điều trị đa cơ chế đối với các khối u có tính kháng trị cao như glioblastoma.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra những kết luận chính như sau

1. Phân lập thành công hợp chất α -mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana*) bằng phương pháp tách chiết và sắc ký thích hợp. Hợp chất thu được có độ tinh khiết cao ($\geq 97\%$) và được xác định cấu trúc thông qua các phương pháp phổ hiện đại (HPLC, ESI-MS, FTIR, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$).
2. α -Mangostin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đáng kể trên dòng tế bào glioblastoma U-87MG theo cơ chế phụ thuộc nồng độ, với giá trị IC_{50} đạt $6,387 \pm 0,329 \mu\text{g/mL}$ sau 48 giờ xử lý. Đồng thời, hợp chất gây tổn thương DNA trên tế bào U-87MG, được thể hiện qua sự gia tăng đáng kể các chỉ số % Tail DNA ($13,32 \pm 0,49\%$) và Tail moment ($3,4 \pm 0,81\%$) so với nhóm đối chứng âm (% Tail DNA: $2,342 \pm 0,166\%$; Tail moment: $1,52 \pm 0,34\%$).
3. α -Mangostin gây rối loạn chức năng ty thể trên tế bào U-87MG, biểu hiện qua sự suy giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi\text{m}$) và thay đổi hình thái ty thể tế bào. Ở mức độ phân tử, α -mangostin làm tăng biểu hiện protein tiền apoptosis BAX và giảm biểu hiện protein kháng apoptosis BCL-2. Đồng thời, hợp chất ức chế trực tiếp hiệu sống còn AKT/GSK3 β thông qua giảm phosphoryl hóa AKT và giảm phosphoryl hóa GSK3 β tại Ser9, qua đó góp phần hoạt hóa GSK3 β . Kết quả Annexin V-FITC/PI cũng cho thấy sự gia tăng rõ rệt tỷ lệ tế bào apoptotic ở cả giai đoạn sớm và muộn.
4. Kết quả mô phỏng *in silico* cho thấy α -mangostin có ái lực liên kết đáng kể với các protein đích AKT1 và GSK3 β , qua đó hỗ trợ giải thích cơ chế tác dụng ở mức độ phân tử và củng cố sự tương quan với các kết quả thực nghiệm *in vitro*.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu đánh giá trên dòng tế bào thần kinh bình thường và trên mô hình động vật – *in vivo* để đánh giá hiệu quả kháng u thần kinh và độ an toàn toàn của α -mangostin.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1. **Huyen Thi Do**, Huyen Thi Trang Nguyen, Nam Phuong Dang, Duong Thi Thuy Le. (2026). α -Mangostin Modulates AKT/GSK3 β Signaling to Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis with Brain-Penetrant Lead Potential against Glioblastoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (under Review).
2. **Huyen Thi Do**, Anh Kim Nguyen, Nhung Huyen Nguyen, Anh Thi Mai Dao, Thuy Thi Bich Ly, Lien Thi Ha Nghiem, Tru Van Nguyen, Linh Khanh Nguyen, Phuong Khanh Pham, Duong Thi Thuy Le “Mitochondrial Dysfunction and Antiproliferative Effects of α -Mangostin Extracted from the Pericarp of the Mangosteen Fruit (*Garcinia mangostana* L.) on Rat C6 Glioma Cells”, *Natural Product Research*. 1–6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2025.2571853>

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2024. **74**(3): p. 229-263.
2. Schwartz, S.M., *Epidemiology of Cancer*. Clin Chem, 2024. **70**(1): p. 140-149.
3. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024. **74**(3): p. 229-263.
4. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019*. Neuro Oncol, 2022. **24**(Suppl 5): p. v1-v95.
5. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
6. Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert, *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(7): p. 2585-97.
7. Chinot, O.L., et al., *Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma*. N Engl J Med, 2014. **370**(8): p. 709-22.
8. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGF β signalling: a complex web in cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(6): p. 415-424.
11. Qian, S., et al., *The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 985363.
12. kumar, N. and G. Sethi, *Telomerase and hallmarks of cancer: An intricate interplay governing cancer cell evolution*. Cancer Letters, 2023. **578**: p. 216459.
13. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
14. Massagué, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 298-306.
15. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.

16. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 98-110.
17. Nieto, M.A., et al., *EMT: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
18. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. **15**(3): p. 178-196.
19. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. *Physiology (Bethesda)*, 2017. **32**(4): p. 266-277.
20. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. *Assay Drug Dev Technol*, 2014. **12**(4): p. 207-18.
21. Friedrich, J., et al., *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(3): p. 309-324.
22. Clevers, H., *Modeling Development and Disease with Organoids*. *Cell*, 2016. **165**(7): p. 1586-1597.
23. Hidalgo, M., et al., *Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(9): p. 998-1013.
24. Dow, Lukas E. and Scott W. Lowe, *Life in the Fast Lane: Mammalian Disease Models in the Genomics Era*. *Cell*, 2012. **148**(6): p. 1099-1109.
25. Platt, Randall J., et al., *CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling*. *Cell*, 2014. **159**(2): p. 440-455.
26. Byrne, A.T., et al., *Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts*. *Nature Reviews Cancer*, 2017. **17**(4): p. 254-268.
27. Sliwoski, G., et al., *Computational Methods in Drug Discovery*. *Pharmacological Reviews*, 2014. **66**(1): p. 334-395.
28. Ekins, S., et al., *Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development*. *Nature Materials*, 2019. **18**(5): p. 435-441.
29. Issa, N.T., et al., *Machine and deep learning approaches for cancer drug repurposing*. *Semin Cancer Biol*, 2021. **68**: p. 132-142.
30. Yao, T.L., et al., *The origin of cultivated mangosteen (*Garcinia mangostana* L. var. *mangostana*): Critical assessments and an evolutionary-ecological perspective*. *Ecol Evol*, 2023. **13**(3): p. e9792.
31. Jung, H.A., et al., *Antioxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen)*. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(6): p. 2077-82.

32. Obolskiy, D., et al., *Garcinia mangostana L.: a phytochemical and pharmacological review*. *Phytother Res*, 2009. **23**(8): p. 1047-65.
33. Pedraza-Chaverri, J., et al., *Medicinal properties of mangosteen (Garcinia mangostana)*. *Food Chem Toxicol*, 2008. **46**(10): p. 3227-39.
34. Shan, T., et al., *Xanthones from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs*. *Curr Mol Med*, 2011. **11**(8): p. 666-77.
35. Suvarnakuta, P., C. Chaweerungrat, and S. Devahastin, *Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthones in mangosteen rind*. *Food Chemistry*, 2011. **125**(1): p. 240-247.
36. Tewtrakul, S., C. Wattanapiromsakul, and W. Mahabusarakam, *Effects of compounds from Garcinia mangostana on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. **121**(3): p. 379-382.
37. Dharmaratne, H.R., et al., *Antibacterial activity of xanthones from Garcinia mangostana (L.) and their structure-activity relationship studies*. *Nat Prod Res*, 2013. **27**(10): p. 938-41.
38. Janhom, P. and P. Dharmasaroja, *Neuroprotective Effects of Alpha-Mangostin on MPP(+)-Induced Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma SH-SY5Y Cells*. *J Toxicol*, 2015. **2015**: p. 919058.
39. Chang, H.-F. and L.-L. Yang, *Gamma-Mangostin, a Micronutrient of Mangosteen Fruit, Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells*. *Molecules*, 2012. **17**(7): p. 8010-8021.
40. Nauman, M.C. and J.J. Johnson, *The purple mangosteen (Garcinia mangostana): Defining the anticancer potential of selected xanthones*. *Pharmacological Research*, 2022. **175**: p. 106032.
41. Lu, M.-Q., et al., *Xanthones from Gentianella acuta (Michx.) Hulten Ameliorate Colorectal Carcinoma via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(3): p. 2279.
42. Majdalawieh, A.F., et al., *α -Mangostin: A Xanthone Derivative in Mangosteen with Potent Anti-Cancer Properties*. *Biomolecules*, 2024. **14**(11).
43. Wang, Y., et al., *STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(42): p. 16975-80.
44. Li, R., B.S. Inbaraj, and B.H. Chen, *Quantification of Xanthone and Anthocyanin in Mangosteen Peel by UPLC-MS/MS and Preparation of Nanoemulsions for*

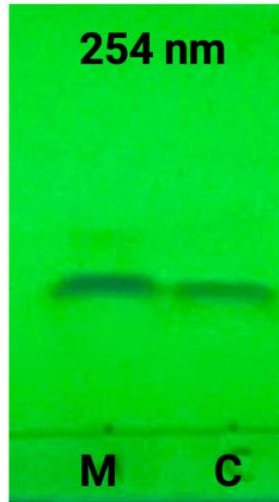
- Studying Their Inhibition Effects on Liver Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(4).
45. Kalick, L.S., et al., *Mangosteen for malignancy prevention and intervention: Current evidence, molecular mechanisms, and future perspectives*. Pharmacological Research, 2023. **188**: p. 106630.
 46. Lee, C.H., et al., *Alpha-mangostin induces apoptosis through activation of reactive oxygen species and ASK1/p38 signaling pathway in cervical cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 47425-47439.
 47. Watanapokasin, R., et al., *Effects of α -mangostin on apoptosis induction of human colon cancer*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(16): p. 2086-95.
 48. Cruz-Gregorio, A., et al., *α -Mangostin induces oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in a triple-negative breast cancer model*. Phytother Res, 2023. **37**(8): p. 3394-3407.
 49. Jezierzański, M., et al., *Temozolomide (TMZ) in the Treatment of Glioblastoma Multiforme-A Literature Review and Clinical Outcomes*. Curr Oncol, 2024. **31**(7): p. 3994-4002.
 50. Romorini, L., et al., *AKT/GSK3 β signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 35660.
 51. Kurniawan, Y.S., et al., *An Update on the Anticancer Activity of Xanthone Derivatives: A Review*. Pharmaceuticals, 2021. **14**(11): p. 1144.
 52. Azwanida, N., *A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation*. Med aromat plants, 2015. **4**(196): p. 2167-0412.
 53. Pedraza-Chaverri, J., et al., *Medicinal properties of mangosteen (Garcinia mangostana)*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(10): p. 3227-39.
 54. Phuong, N.T.M., et al., *Antibiofilm activity of α -mangostin extracted from Garcinia mangostana L. against Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Med, 2017. **10**(12): p. 1154-1160.
 55. Quỳnh, H.T.N., et al., *TỐI ƯU HÓA QUI TRÌNH CHIẾT XUẤT α -MANGOSTIN TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT (GARCINIA MANGOSTANA L.)*. TNU Journal of Science and Technology, 2024. **229**(01): p. 456-464.
 56. Hộ, P.H., *Cây cỏ Việt Nam, tập 1-3*. NXB trẻ, 1999: p. 815-816.
 57. Naing, S., et al., *Garcinia mangostana L. Pericarp Extract and Its Active Compound α -Mangostin as Potential Inhibitors of Immune Checkpoint Programmed Death Ligand-1*. Molecules, 2023. **28**(19).

58. Le, D.T.T., et al., *Honokiol-loaded PLGA-PEG nanoparticles with solubility in water for infusion treatment of solid cancer*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2025. **103**: p. 106436.
59. Le, D.T.T., et al., *Effect of Honokiol on culture time and survival of Alzheimer's disease iPSC-derived neurons*. BioImpacts: BI, 2024. **14**(1).
60. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
61. Information, N.C.f.B., *PubChem compound summary*. 2021, National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD, USA.
62. Ee, G.C., et al., *Xanthones from Garcinia mangostana (Guttiferae)*. Nat Prod Res, 2006. **20**(12): p. 1067-73.
63. Phitaktim, S., et al., *Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from Garcinia mangostana L. and oxacillin against an oxacillin-resistant Staphylococcus saprophyticus*. BMC Microbiology, 2016. **16**(1): p. 195.
64. Chen, L.G., L.L. Yang, and C.C. Wang, *Anti-inflammatory activity of mangostins from Garcinia mangostana*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(2): p. 688-93.
65. Tran, V.A., et al., *Novel α -Mangostin Derivatives from Mangosteen (Garcinia mangostana L.) Peel Extract with Antioxidant and Anticancer Potential*. Journal of Chemistry, 2021. **2021**(1): p. 9985604.
66. Do, H.T., et al., *Antiproliferative effects and mitochondrial dysfunction of α -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (Garcinia mangostana L.) on rat C6 glioma cells*. Natural Product Research, 2025: p. 1-6.
67. Chang, H.F., et al., *Apoptotic effects of γ -mangostin from the fruit hull of Garcinia mangostana on human malignant glioma cells*. Molecules, 2010. **15**(12): p. 8953-66.
68. Herdiana, Y., et al., *Cytotoxicity Enhancement in MCF-7 Breast Cancer Cells with Depolymerized Chitosan Delivery of α -Mangostin*. Polymers (Basel), 2022. **14**(15).
69. Chitchumroonchokchai, C., et al., *Anti-tumorigenicity of dietary α -mangostin in an HT-29 colon cell xenograft model and the tissue distribution of xanthones and their phase II metabolites*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(2): p. 203-11.
70. Matsumoto, K., et al., *Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines*. J Nat Prod, 2003. **66**(8): p. 1124-7.

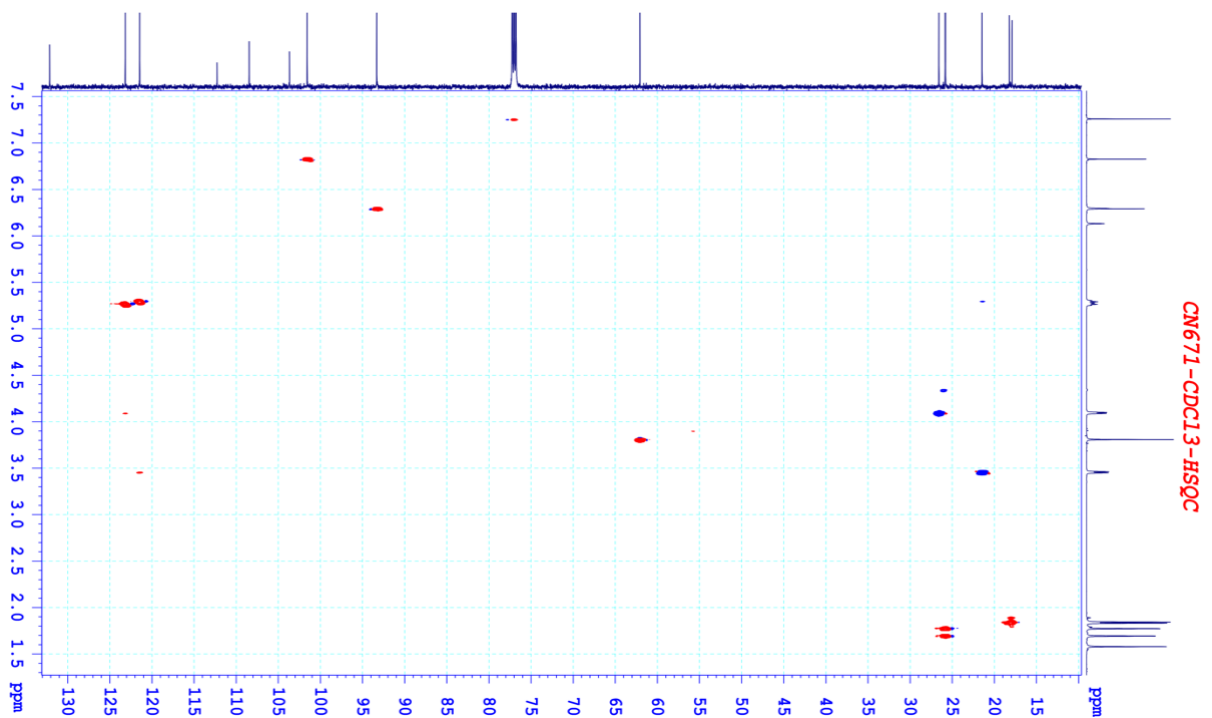
71. Moongkarndi, P., et al., *Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by Garcinia mangostana (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line*. J Ethnopharmacol, 2004. **90**(1): p. 161-6.
72. Hsieh, S.C., et al., *α -Mangostin induces mitochondrial dependent apoptosis in human hepatoma SK-Hep-1 cells through inhibition of p38 MAPK pathway*. Apoptosis, 2013. **18**(12): p. 1548-60.
73. Lee, H.N., et al., *Antitumor and apoptosis-inducing effects of α -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) in YD-15 tongue mucoepidermoid carcinoma cells*. Int J Mol Med, 2016. **37**(4): p. 939-948.
74. Domoto, T., et al., *Glycogen Synthase Kinase 3 β in Cancer Biology and Treatment*. Cells, 2020. **9**(6).
75. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
76. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
77. Nauman, M.C. and J.J. Johnson, *The purple mangosteen (*Garcinia mangostana*): Defining the anticancer potential of selected xanthones*. Pharmacol Res, 2022. **175**: p. 106032.
78. Wang, J.J., B.J. Sanderson, and W. Zhang, *Cytotoxic effect of xanthones from pericarp of the tropical fruit mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) on human melanoma cells*. Food Chem Toxicol, 2011. **49**(9): p. 2385-91.
79. Jope, R.S. and G.V. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(2): p. 95-102.
80. Franke, T.F., et al., *PI3K/Akt and apoptosis: size matters*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 8983-8998.
81. Hussein, G.A., et al., *DNA damage induced by micellar-delivered doxorubicin and ultrasound: comet assay study*. Cancer Lett, 2000. **154**(2): p. 211-6.
82. Zhu, X., et al., *α -Mangostin Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Breast Cancer Cells via Regulating RXR α -AKT Signaling Pathway*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 739658.

PHỤ LỤC

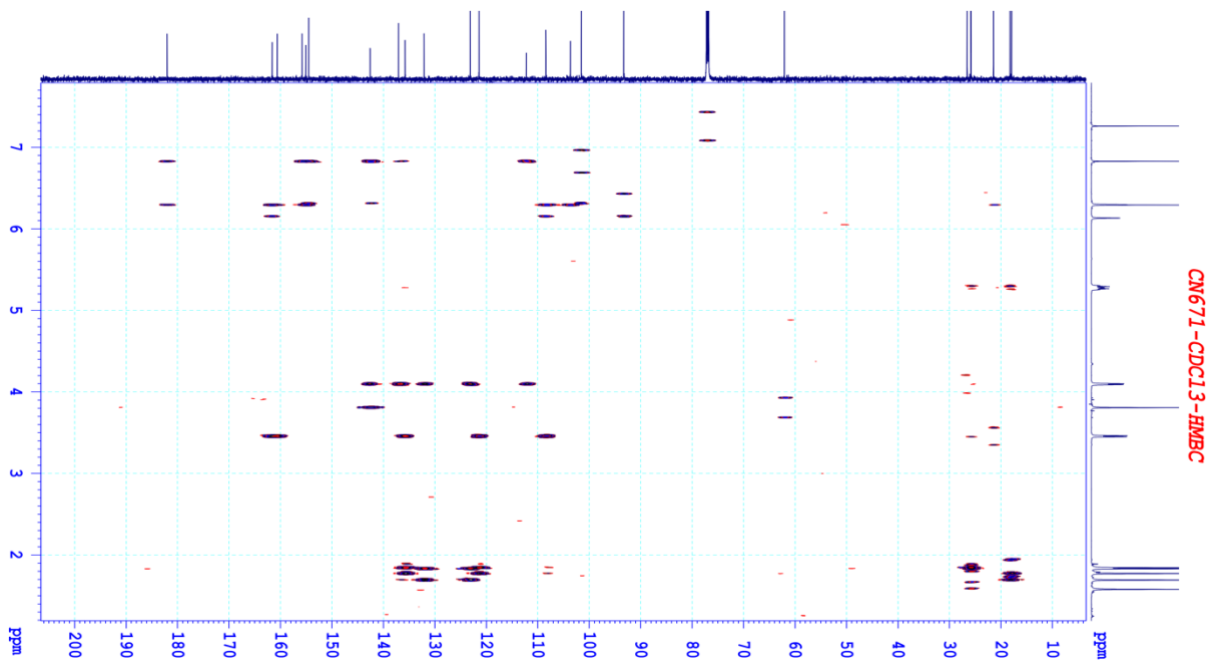
PHỤ LỤC 1. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT ĐƯỢC TÁCH CHIẾT



Phụ lục 1.1. Phân tích TLC đối chiếu giữa mẫu α -mangostin phân lập (M) và α -mangostin chuẩn (C) dưới đèn UV 254 nm



Phụ lục 1.2. Phổ HSQC của hợp chất α -mangostin

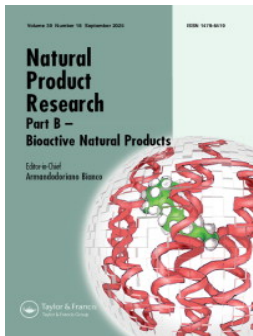


Phụ lục 1.3. Phổ HMBC của hợp chất α -mangostin

Phụ lục 1.4. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất α -mangostin

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$, dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC
1	101,5	101,6	6,83 (1H, s)	
1a	155,0	155,1	-	
2	155,4	155,8	-	
3	142,7	142,6	-	
4	137,0	137,1	-	
4a	112,0	112,3		
5	160,5	160,7	-	
5a	103,5	103,7		
6	108,4	108,5	-	
7	161,5	161,6	-	
8	93,3	93,3	6,29 (1H, s)	
8a	154,4	154,6	-	
10	181,9	182,1	-	
1'	26,5	26,6	4,10 (2H, d, 6,6)	
2'	121,4	121,5	5,28 (1H, m)	
3'	132,1	132,2	-	
4'	17,9	17,9	1,84 (3H, s)	
5'	25,8	25,8	1,77 (3H, d, 1,2)	

1'	21,4	21,5	3,46 (2H, d, 7,2)	
2''	123,0	123,2	5,28 (1H, m)	
3''	132,1	132,2	-	
4''	18,2	18,2	1,83 (3H, s)	
5''	25,7	25,8	1,69 (3H, d, 1,2)	
3-OMe	61,1	62,1	3,81 (3H, s)	
2-OH	-	-	6,30 (1H, s)	1, 2, 3
5-OH	-	-	13,77 (1H, s)	-
7-OH	-		6,13 (1H, s)	6, 7, 8




Antiproliferative effects and mitochondrial dysfunction of α -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) on rat C6 glioma cells

Huyen Thi Do , Anh Kim Nguyen , Nhung Huyen Nguyen , Anh Thi Mai Dao ,
Lien Thi Ha Nghiem , Tru Van Nguyen , Linh Khanh Nguyen , Phuong Khanh
Pham & Duong Thi Thuy Le



To cite this article: Huyen Thi Do , Anh Kim Nguyen , Nhung Huyen Nguyen , Anh Thi Mai Dao ,
Lien Thi Ha Nghiem , Tru Van Nguyen , Linh Khanh Nguyen , Phuong Khanh Pham & Duong Thi
Thuy Le (16 Oct 2025): Antiproliferative effects and mitochondrial dysfunction of α -mangostin
extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) on rat C6 glioma
cells, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2025.2571853](https://doi.org/10.1080/14786419.2025.2571853)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2025.2571853>

 View supplementary material 

 Published online: 16 Oct 2025.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



Antiproliferative effects and mitochondrial dysfunction of α -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) on rat C6 glioma cells

Huyen Thi Do^a, Anh Kim Nguyen^a, Nhung Huyen Nguyen^a, Anh Thi Mai Dao^b, Lien Thi Ha Nghiem^c, Tru Van Nguyen^a, Linh Khanh Nguyen^d, Phuong Khanh Pham^e and Duong Thi Thuy Le^{a,b}

^aInstitute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam; ^bHanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam; ^cInstitute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam; ^dNguyen Sieu High School, Yen Hoa Ward, Hanoi, Vietnam; ^eHanoi – Amsterdam Highschool for the Gifted, Hanoi, Vietnam

ABSTRACT

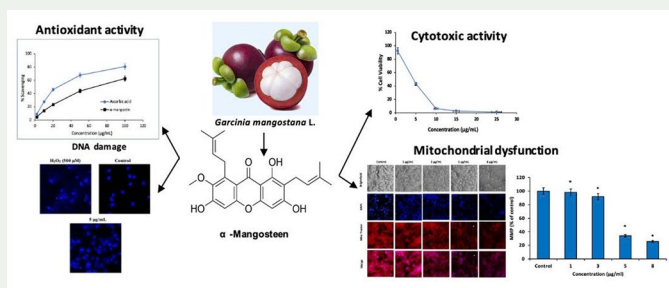
Glioblastoma is a brain tumour with limited therapeutic options, prompting the exploration of novel treatments. This study evaluates the effects of α -mangostin, a xanthone derived from the pericarp of mangostin (*Garcinia mangostana* L.), on C6 glioma cells. α -mangostin was successfully purified with a purity of $\geq 97\%$, and its chemical structure was confirmed. This study evaluated the antioxidant and anticancer activities of α -mangostin isolated from *G. mangostana*. The compound showed moderate antioxidant capacity (DPPH• IC₅₀ = 67.55 \pm 0.91 μ g/mL) and potent cytotoxicity against C6 glioma cells (IC₅₀ = 4.67 μ g/mL). Mitochondrial membrane potential dropped to 34.27 \pm 1.24% and 25.77 \pm 0.98% at 5 and 8 μ g/mL, respectively. DNA fragmentation increased from 2.17 \pm 1.543% (control) to 17.95 \pm 6.277% at 5 μ g/mL. These findings suggest that α -mangostin induces glioma cell death *via* mitochondrial dysfunction and genotoxic stress, supporting its potential as a therapeutic lead for glioblastoma.

ARTICLE HISTORY


Received 7 February 2025
Accepted 4 October 2025

KEYWORDS

α -mangostin; C6 glioma cell; *Garcinia mangostana* L.; DNA fragmentation; mitochondrial membrane potential



CONTACT Duong Thi Thuy Le  lthuyduong@ibt.ac.vn, lenthuyduongibt@gmail.com

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/14786419.2025.2571853>.

© 2025 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM), the most aggressive type of glioma, is characterised by rapid progression, resistance to standard therapies, and poor clinical outcomes, with median survival less than 15 months and a five-year survival rate below 5% (Park et al. 2010). Despite standard therapies, including temozolomide (TMZ), targeted agents, and immunotherapies, treatment resistance remains a major challenge, underscoring the need for novel therapeutic approaches (Hombach-Klonisch et al. 2018).

Natural products are a valuable source of anticancer compounds. *G. mangostana* (mangosteen), widely cultivated in Southeast Asia, contains bioactive xanthenes in its pericarp, notably α -mangostin, which has demonstrated antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and anticancer properties (Gutierrez-Orozco and Failla 2013). Previous studies have reported α -mangostin's cytotoxic effects in several cancer types (Nauman and Johnson 2022), but its impact on glioma cells remains poorly understood.

Given the importance of DNA integrity and mitochondrial function in cancer progression (Zorova et al. 2022) and treatment response, this study investigates the effects of mangosteen pericarp extract on C6 glioma cells, focusing on cell viability, DNA damage, and mitochondrial membrane potential. The findings may provide new insights into the therapeutic potential of mangosteen-derived compounds in glioblastoma management.

2. Results and discussion

2.1. Characterisation of α -mangostin

The compound isolated from *Garcinia mangostana* pericarp was conclusively identified as α -mangostin based on multiple spectroscopic techniques. HPLC analysis confirmed high purity ($\geq 97\%$) with a prominent peak at $R_t = 6.289$ min, consistent with the reference standard (Figure S1, Supplementary Material). ESI-MS revealed molecular ion peaks at m/z 411.2 $[M+H]^+$ (positive mode) and m/z 409.2 $[M-H]^-$ (negative mode), aligning with the theoretical molecular weight of α -mangostin (410 Da) and matching reported data in PubChem (Figure S2, Supplementary Material). FTIR spectra showed characteristic absorption bands, including -OH stretching at 3421.08 cm^{-1} , C=O stretching within the xanthone core at 1642.88 cm^{-1} , and C-O-C stretching near 1238 cm^{-1} , consistent with published FTIR data (Figure S3, Supplementary Material). NMR analysis further confirmed the structural identity, with chemical shifts matching those previously reported (Figure S4, S5 and Table S1, Supplementary Material). ^{13}C -NMR and HSQC spectra displayed 24 carbon signals, including an oxymethyl group at δC 62.1 ppm, two isoprenyl groups, and resonances corresponding to the xanthone backbone. HMBC correlations established the substitution pattern, with an oxymethyl group at C-3, isoprenyl groups at C-4 and C-6, and hydroxyl groups at C-2, C-5, and C-7. The hydroxyl at C-5 was further supported by an intramolecular hydrogen bond with the carbonyl at C-10, consistent with the xanthone scaffold (Figure S6, S7, S8, Supplementary Material). These spectroscopic data collectively corroborated the identification of the compound as α -mangostin of high purity, in agreement with existing literature.

2.2. Antioxidant activity of α -mangostin

The antioxidant activity of α -mangostin was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) assay, showing a dose-dependent radical scavenging effect in the concentration range of 2–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The IC_{50} value was determined to be $67.55 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{mL}$, compared to $28.4 \pm 0.72 \mu\text{g}/\text{mL}$ for the positive control, ascorbic acid (Figure S9, Supplementary Material). Although less potent than ascorbic acid, α -mangostin exhibited notable free radical quenching capacity. This moderate antioxidant activity aligns with previous studies attributing the effect of xanthenes to the presence of phenolic hydroxyl groups. The observed scavenging potential may underlie the cytoprotective effects of α -mangostin in oxidative stress-related models, supporting its potential as a natural antioxidant lead compound.

2.3. Anti-proliferative effects in C6 glioma cells

α -Mangostin exhibited dose-dependent cytotoxicity against C6 glioma cells. MTS assay after 72 h revealed a significant viability reduction from $92.33 \pm 3.25\%$ (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to $6.32 \pm 0.67\%$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), yielding an IC_{50} of $4.67 \pm 0.199 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$). These results demonstrate strong cytotoxicity of α -mangostin in chemoresistant glioma cells. In contrast, the IC_{50} value in fibroblasts was markedly higher ($24.6 \pm 1.45 \mu\text{g}/\text{mL}$), indicating a favourable degree of selectivity towards tumour cells (Figure S10, Supplementary Material). These findings are consistent with previous reports showing that α -mangostin exhibits markedly lower cytotoxicity in normal cell lines compared to cancer cells, further supporting its potential therapeutic selectivity (Markowicz et al. 2019). Compared to β -mangostin and synthetic xanthone analogs studied in other cancer models, α -mangostin shows equal or superior potency (Janhom and Dharmasaroja 2015; Li et al. 2020). The potent cytotoxic activity of α -mangostin observed in this study is consistent with its well-defined chemical structure. The presence of multiple phenolic hydroxyl groups may enhance its antioxidant and redox-modulating properties, while lipophilic prenyl substituents increase membrane permeability and cellular uptake. These features likely contribute to the compound's ability to disrupt mitochondrial function in cancer cells.

2.4. Induction of DNA damage

To investigate the cytotoxic mechanism, DNA fragmentation was assessed using the comet assay. Treatment with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -mangostin resulted in notable comet tail formation, indicating DNA damage. Quantitative analysis showed a significant increase in % tail DNA ($17.95 \pm 6.277\%$) compared to the control ($2.17 \pm 1.543\%$), though less than the H_2O_2 -treated positive control ($59.37 \pm 5.199\%$) ($p < 0.05$) (Figure S11, Supplementary Material). Oxidative stress and interference with DNA repair pathways may contribute to the observed DNA damage, as similarly reported in glioblastoma models (Qu et al. 2023). This adds another layer to its cytotoxic action, complementing mitochondrial disruption.

2.5. Mitochondrial disruption and loss of membrane potential

Given the central role of mitochondria in intrinsic apoptosis, we investigated mitochondrial morphology and membrane potential. MitoTracker™ staining revealed progressive mitochondrial fragmentation beginning at 3 µg/mL, with marked rounding and condensation at 8 µg/mL (Figure S12A, Supplementary Material). These structural alterations were accompanied by a significant, concentration-dependent loss in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), with fluorescence intensity reduced to $34.27 \pm 1.24\%$ and $25.77 \pm 0.98\%$ at 5 and 8 µg/mL, respectively (Figure S12B, Supplementary Material). These findings implicate mitochondrial disruption as a key mediator of α -mangostin-induced cell death. The observed decrease in $\Delta\Psi_m$ aligns with previous reports showing that xanthenes can inhibit complex I or III of the electron transport chain, leading to ROS accumulation and mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Vyas et al. 2016; Wallace 2012). Importantly, the early mitochondrial effects observed here precede overt cytotoxicity, suggesting that mitochondrial destabilisation may be a primary trigger rather than a secondary consequence of apoptosis (Holmuhamedov et al. 2003). The interplay between $\Delta\Psi_m$ collapse and nuclear DNA damage suggests coordinated activation of both intrinsic and genotoxic stress pathways.

The cytotoxic effects of α -mangostin on glioma cells were evaluated through mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation assays. Treatment with α -mangostin resulted in a dose-dependent reduction in cell viability, accompanied by significant mitochondrial membrane depolarisation and morphological changes, indicating the compound's ability to induce apoptosis in glioma cells. The DNA fragmentation observed further supports its pro-apoptotic effects. In contrast to conventional chemotherapeutics such as temozolomide (Hajiahmadi et al. 2023), which primarily act through alkylation of DNA and often encounter resistance, α -mangostin operates through a multifaceted mechanism. It modulates oxidative stress, disrupts mitochondrial integrity, and induces genomic instability, reducing the likelihood of single-pathway resistance. The biological effects of α -mangostin are closely linked to its chemical structure. The phenolic hydroxyl groups act as electron donors, enabling redox cycling and ROS modulation, which contributes to oxidative stress and DNA damage. Meanwhile, the lipophilic prenyl substituents facilitate membrane penetration and mitochondrial accumulation, leading to $\Delta\Psi_m$ collapse and activation. Thus, α -mangostin presents a promising candidate for glioblastoma therapy, either as a monotherapy or in combination with ROS-inducing agents or mitochondrial sensitisers.

3. Experimental

See [Supplementary Material](#).

4. Conclusions

This study shows that α -mangostin from *G. mangostana* pericarp has strong antioxidant and antiproliferative effects on C6 glioma cells. It induces DNA fragmentation

and disrupts mitochondrial membrane potential within 24 h, suggesting mitochondrial involvement in its cytotoxicity. These results highlight α -mangostin's potential as a mitochondria-targeting agent for glioma therapy and its promise in developing plant-derived brain cancer treatments.

Author contributions

CRediT: **Huyen Thi Do**: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing; **Anh Kim Nguyen**: Investigation, Methodology; **Nhung Huyen Nguyen**: Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing; **Anh Thi Mai Dao**: Methodology, Writing – original draft; **Lien Thi Ha Nghiem**: Methodology; **Tru Van Nguyen**: Investigation; **Linh Khanh Nguyen**: Investigation, Methodology; **Phuong Khanh Pham**: Investigation, Methodology; **Duong Thi Thuy Le**: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by grants from Ministry of Science and Technology in Vietnam with project number KC.12.10/21-30.

References

- Gutierrez-Orozco F, Failla ML. 2013. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: a critical review of the current evidence. *Nutrients*. 5(8):3163–3183. <https://doi.org/10.3390/nu5083163>
- Hajiahmadi S et al. 2023. Temozolomide, simvastatin and acetylshikonin combination induces mitochondrial-dependent apoptosis in GBM cells, which is regulated by autophagy. *Biology (Basel)*. 12(2). <https://doi.org/10.3390/biology12020302>
- Holmuhamedov E, Jahangir A, Bienengraeber M, Lewis LD, Terzic A. 2003. Deletion of mtDNA disrupts mitochondrial function and structure, but not biogenesis. *Mitochondrion*. 3(1):13–19. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(03\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00053-9)
- Hombach-Klonisch S et al. 2018. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol Ther*. 184: 13–41. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.017>
- Janhom P, Dharmasaroja P. 2015. Neuroprotective effects of alpha-mangostin on MPP(+)-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Toxicol*. 2015:919011–919058. <https://doi.org/10.1155/2015/919058>
- Li K et al. 2020. Cytotoxic and antiproliferative effects of β -mangostin on Rat C6 glioma cells depend on oxidative stress induction via PI3K/AKT/mTOR pathway inhibition. *Drug Des Devel Ther*. 14:5315–5324. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S278414>
- Markowicz J et al. 2019. Antitumor and anti-nematode activities of α -mangostin. *Eur J Pharmacol*. 863:172678. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172678>
- Nauman MC, Johnson JJ. 2022. The purple mangosteen (*Garcinia mangostana*): defining the anticancer potential of selected xanthenes. *Pharmacol Res*. 175:106032. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106032>

- Park DM, Sathornsumetee S, Rich JN. 2010. Medical oncology: treatment and management of malignant gliomas. *Nat Rev Clin Oncol*. 7(2):75–77. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.221>
- Qu S et al. 2023. Albumin-bound paclitaxel augment temozolomide treatment sensitivity of glioblastoma cells by disrupting DNA damage repair and promoting ferroptosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 42(1):285. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02905-9>
- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. 2016. Mitochondria and cancer. *Cell*. 166(3):555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>
- Wallace DC. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 12(10):685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Zorova LD et al. 2022. Is the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of the $\Delta\Psi$ probe, rhodamine 123. *Int J Mol Sci*. 23.

Supplementary Material

Antiproliferative Effects and Mitochondrial Dysfunction of α -Mangostin Extracted from the Pericarp of the Mangosteen Fruit (*Garcinia mangostana* L.) on Rat C6 Glioma Cells

Huyen Thi Do^a, Anh Kim Nguyen^a, Nhung Huyen Nguyen^a, Anh Thi Mai Dao^b, Lien Thi Ha Nghiem^c, Tru Van Nguyen^a, Linh Khanh Nguyen^d, Phuong Khanh Pham^e, Duong Thi Thuy Le^{*,a,b}

^aInstitute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam; ^bHanoi University of Pharmacy, Vietnam; ^cInstitute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology; ^dNguyen Sieu High School, Yen Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam; ^eHanoi – Amsterdam Highschool for the Gifted;

ABSTRACT

Glioblastoma is a brain tumor with limited therapeutic options, prompting the exploration of novel treatments. This study evaluates the effects of α -mangostin, a xanthone derived from the pericarp of mangostin (*Garcinia mangostana* L), on C6 glioma cells. α -mangostin was successfully purified with a purity of $\geq 97\%$, and its chemical structure was confirmed. This study evaluated the antioxidant and anticancer activities of α -mangostin isolated from *G. mangostana*. The compound showed moderate antioxidant capacity (DPPH• IC₅₀ = 67.55 \pm 0.91 μ g/mL) and potent cytotoxicity against C6 glioma cells (IC₅₀ = 4.67 μ g/mL). Mitochondrial membrane potential dropped to 34.27 \pm 1.24% and 25.77 \pm 0.98% at 5 and 8 μ g/mL, respectively. DNA fragmentation increased from 2.17 \pm 1.543% (control) to 17.95 \pm 6.277% at 5 μ g/mL. These findings suggest that α -mangostin induces glioma cell death via mitochondrial dysfunction and genotoxic stress, supporting its potential as a therapeutic lead for glioblastoma.

Keywords: α -mangostin, C6 glioma cell, *Garcinia mangostana* L., DNA fragmentation, mitochondrial membrane potential

3. Experimental

3.1. Material

G. mangostana fruits were collected in the summer of 2024 from Tien Giang Province, Vietnam. The dried pericarp of mangosteen was purchased from Thanh Binh Company (batch number: HD167163). Species identification was conducted by a botanist based on morphological characteristics and comparison with authenticated reference specimens (Hộ 1999). The specimen has been assigned voucher number HN 000082651 and is currently deposited in the herbarium of the Institute of Ecology and Biological Resources, under the Vietnam Academy of Science and Technology (VAST).

The C6 mouse glioma cell line and fibroblast cell line (PCS-201-012) (American Type Culture Collection) was supplied by the Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology.

All chemicals and equipment used in this study were purchased from well-known suppliers such as Thermo Fisher, Gibco, Promega, etc.

3.2. Extraction and isolation of mangostin pericarp.

Following Sandar Naing et al. (Naing et al. 2023), we optimized the extraction by adjusting solvent concentration and volumes to improve yield and purity. One kg of dried mangosteen pericarp was ground into powder with a recovery efficiency of 98% and 200 g of powder was macerated in 1000 mL of 70% ethanol under gentle agitation at room temperature for 1 hours, then centrifuged and filtered. The extract was centrifuged and filtered, and the plant residue was re-extracted with an additional 300 mL of 70% ethanol under the same conditions. The pooled ethanol extracts were concentrated under reduced pressure, yielding 36.0 g of crude ethanolic extract. The crude extract was suspended in water and partitioned with 1000 mL of n-hexane (in three portions) to separate non-polar constituents. The combined hexane layers were evaporated to dryness under vacuum, resulting in 5.4 g of hexane-soluble fraction. This fraction was further purified by silica gel column chromatography using an n-hexane:acetone gradient system. Selected active fractions were pooled and crystallized to obtain 1.3 g of purified compound.

The purity of the isolated compound was assessed using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Alliance series 2695, detector PDA 2996 from Waters-USA). Chromatographic separation was performed on a Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 × 250 mm, 4 μm particle size) with an isocratic mobile phase of acetonitrile and water (95:5, v/v) over 15 minutes at a flow rate of 0.7 mL/min. The injection volume was 5 μL, and detection was monitored at $\lambda = 243$ and 320 nm. The retention time of α -mangostin was 6.289 minutes, and the compound purity was estimated to be $\geq 97\%$ based on peak area integration. Its molecular weight was determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (Thermo Fisher EASY-Max NG). Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (Thermo Nicolet 6700 FT-IR optical spectrometer) was then employed to characterize functional groups. Finally, nuclear magnetic resonance (NMR) (AVANCE NEO 600 MHz spectrometer, Bruker BioSpin, Switzerland) spectroscopy was performed for structural elucidation.

3.3. DPPH• Radical Scavenging Activity

The free radical scavenging activity of the extract was determined following the method of Blois (Blois 1958) with some modifications. The samples were dissolved in ethanol, and ascorbic acid was used as the positive control. A 190 μL aliquot of 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) in ethanol was mixed with 10 μL of the extract at various concentrations (2, 10, 20, 50, 100 μg/mL). After a 30-minute incubation at room temperature, the absorbance was measured at a wavelength of 517 nm. The radical scavenging capability was expressed as IC₅₀.

3.4. Cytotoxicity Assay

The cytotoxic effect of α -mangostin was evaluated using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS assay). C6 glioma cells and fibroblast cell were cultured in a 96-well plate at a density of 5000 cells/well using a complete medium. After 24 hours of incubation, the cells were treated with α -mangostin at various concentrations (0, 0.5, 5, 10, 15, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37°C for 72 hours. Cell proliferation and viability were assessed using the MTS cytotoxicity assay kit ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). The MTS reagent was added to the treated C6 cell wells and incubated for 3 hours at 37°C. The PMS (phenazine methosulfate) present in the reagent is metabolized by the cells to produce a formazan product that is soluble in cell culture medium, with maximal absorption at a wavelength of 490 nm (measured using a Thermo Science™ Multiskan™ GO spectrophotometer) (Le et al. 2025). The IC₅₀ value (the concentration at which the test compound is capable of causing 50% cell death) is calculated using the following formula.

3.5. Comet assay

To assess cytotoxic or oxidative effects, C6 cells were incubated with α -mangostin at varying concentrations, alongside 500 μM H₂O₂ as a positive control, for 24 hours (Le et al. 2024). To assess DNA damage, after treatment, cells were collected post-treatment and resuspended in 1% agarose gel before being transferred onto a glass slide pre-coated with agarose. The cells were lysed in a lysis solution (2.5M NaCl, 10 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 200 mM NaOH, pH 10) overnight at 4°C. After lysis, the slides were immersed in an alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 1 hour at 4°C, protected from light. The slides were then subjected to cold electrophoresis in 1X TBE buffer for 30 minutes (1 V/cm) and subsequently rinsed with deionized water to neutralize the pH (Olive and Banáth 2006). The DNA in the cell samples was stained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and observed at 50X magnification using a Nikon Ti-E Eclipse fluorescence microscope equipped with a confocal system to evaluate DNA fragmentation. The results were analyzed using CometScore 2.0 software.

3.6. Mitochondrial fluorescence staining

To evaluate the effect of α -mangostin on cellular mitochondria, C6 cells were treated with α -mangostin at concentrations of 0, 1, 3, 5, and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes. Following fixation, C6 cells were stained with mitochondria, and nuclei were observed using a Nikon Ti E Eclipse fluorescence microscope, and the images were analyzed using ImageJ software (Bosch and Calvo 2019) . MitoTracker™ Orange CMTMRos (1 mM) at 37°C for 30 minutes. The cell nuclei were stained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 minutes at room temperature. The samples were washed three times with 1X PBS. Fluorescent images of mitochondria and nuclei were observed using a Nikon Ti-E Eclipse fluorescence microscope, and the images were analyzed using ImageJ software.

3.7. Mitochondrial Membrane Potential Assessment

Mitochondrial membrane potential was analyzed using the fluorescent dye Rhodamine 6G (Audi et al. 2020). C6 cells were cultured in a 96-well plate at a density of 5000 cells/well and treated with α -mangostin at concentrations of 0, 1, 3, 5, and 8 $\mu\text{g/mL}$. After 24 hours, the C6 cells were stained with 20 μM Rhodamine 6G at 37°C for 60 minutes. After being washed three times with 1X PBS, the samples were subjected to fluorescence measurement (excitation: 525 nm; emission: 595 nm) using a SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader.

3.8. Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical differences among group means were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's t-test. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. For statistical analysis, we performed independent experiments at least three times.

References

- Audi SH, Cammarata A, Clough AV, Dash RK, Jacobs ER. 2020. Quantification of mitochondrial membrane potential in the isolated rat lung using rhodamine 6G. *J Appl Physiol* (1985). Apr 1;128:892-906. Epub 20200305.
- Blois MS. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958/04/01;181:1199-1200.
- Bosch A, Calvo M. 2019. Automated Quantitative Analysis of Mitochondrial Morphology. *Methods Mol Biol*.2040:99-115.
- Hộ P-h. 1999. *Cây cỏ Việt nam*: NXB trẻ.
- Le DTT, Nguyen NH, Do HTM, Vu CM, Nguyen PTM, Chu HH. 2025. Honokiol-loaded PLGA-PEG nanoparticles with solubility in water for infusion treatment of solid cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2025/01/01/;103:106436.
- Le DTT, Vu CM, Ly TTB, Nguyen NT, Nguyen PTM, Chu HH. 2024. Effect of Honokiol on culture time and survival of Alzheimer's disease iPSC-derived neurons. *Bioimpacts*.14:27652. Epub 20230805.
- Naing S, Sandech N, Maiuthed A, Chongruchiroj S, Pratuangdejkul J, Lomarat P. 2023. *Garcinia mangostana* L. Pericarp Extract and Its Active Compound α -Mangostin as Potential Inhibitors of Immune Checkpoint Programmed Death Ligand-1. *Molecules*. Oct 9;28. Epub 20231009.
- Olive PL, Banáth JP. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*.1:23-29.

This section contained a list of tables and figures associated with the results of the existing study.

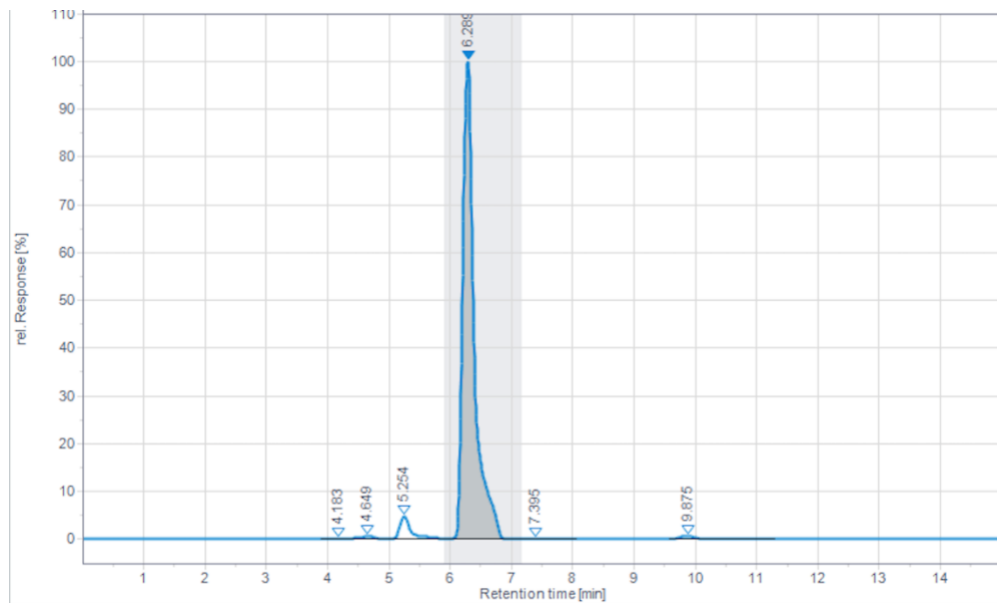
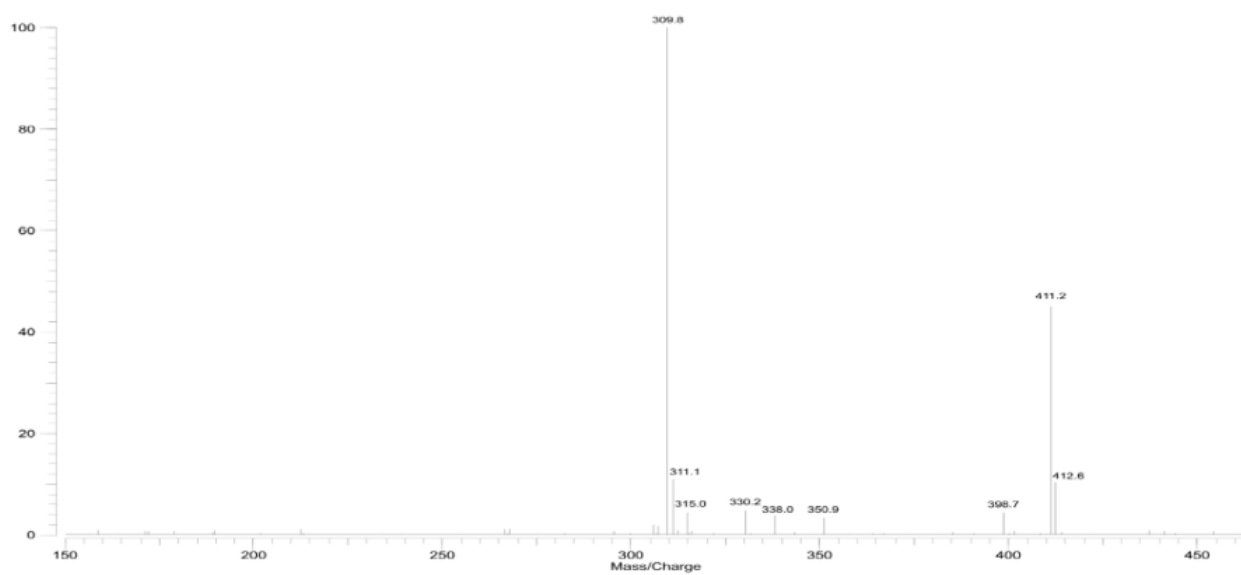
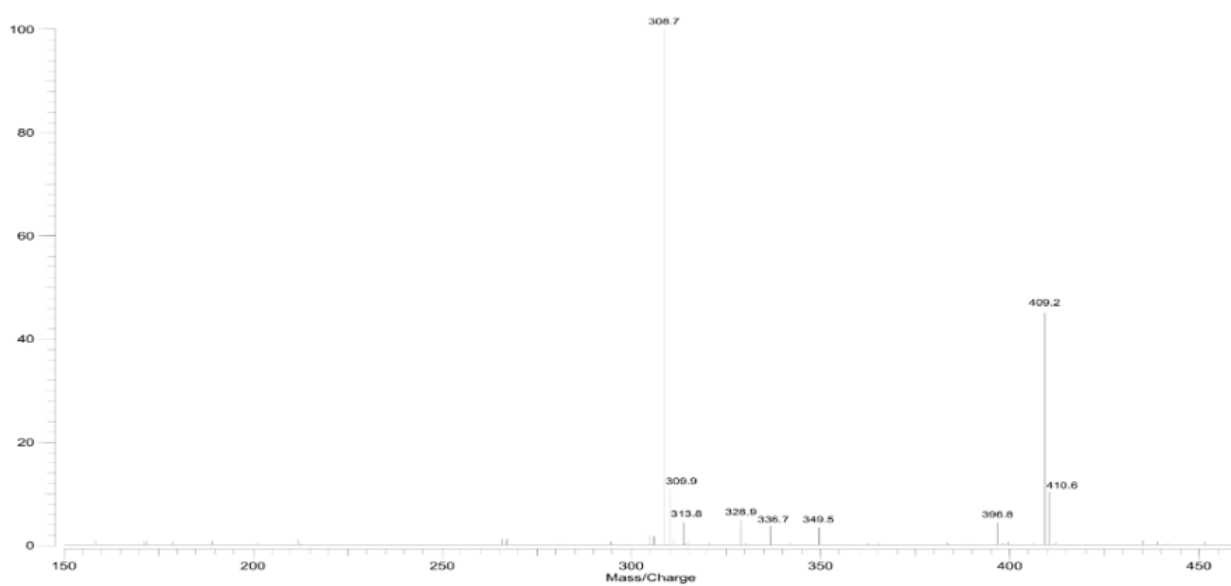


Figure S1. HPLC chromatogram of the isolated compound



Positive MS



Negative MS

Figure S2. High resolution electron ionization mass spectrum of α -mangostin

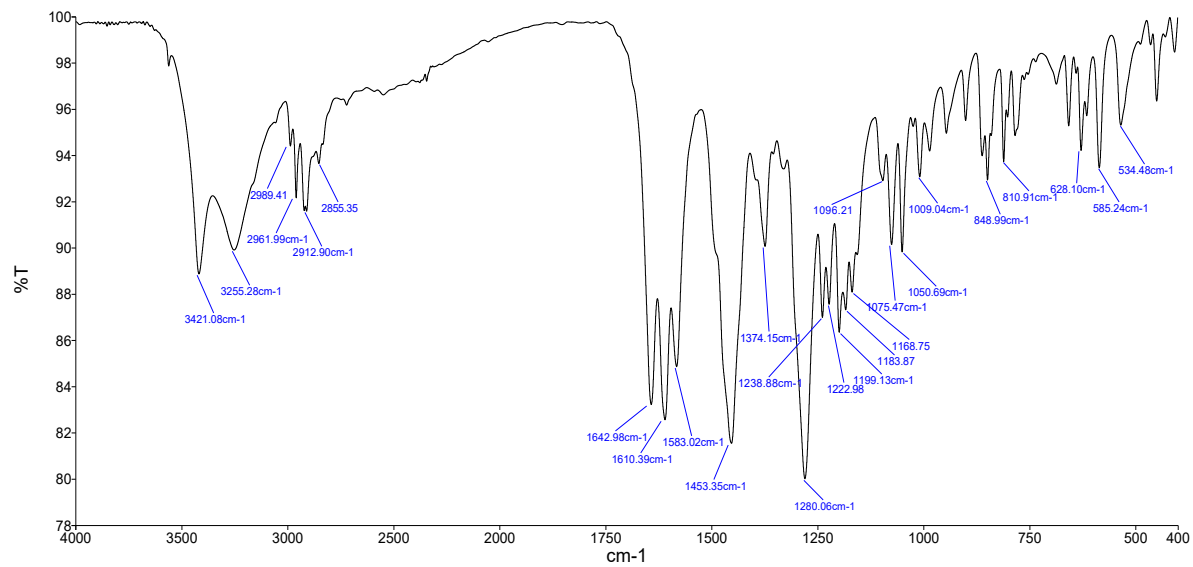


Figure S3. IR spectrum of α -mangostin

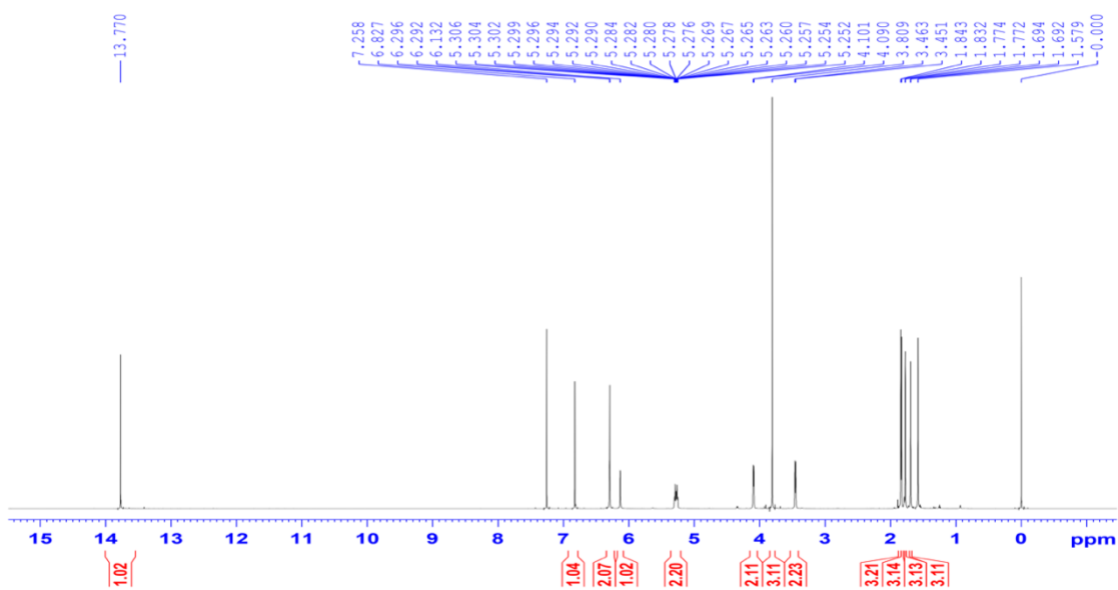


Figure S4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of α -mangostin

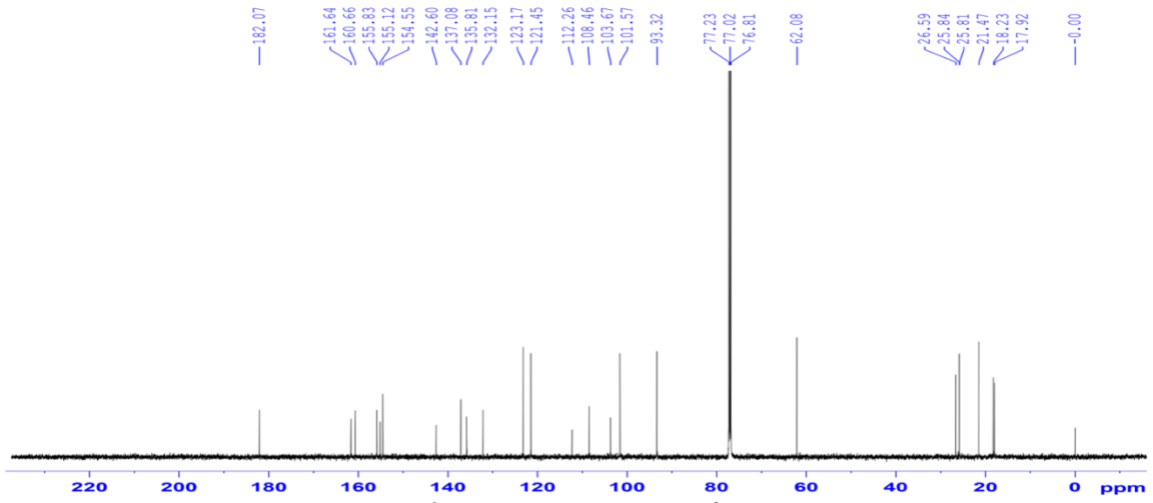


Figure S5. ^{13}C -NMR spectrum of α -mangostin

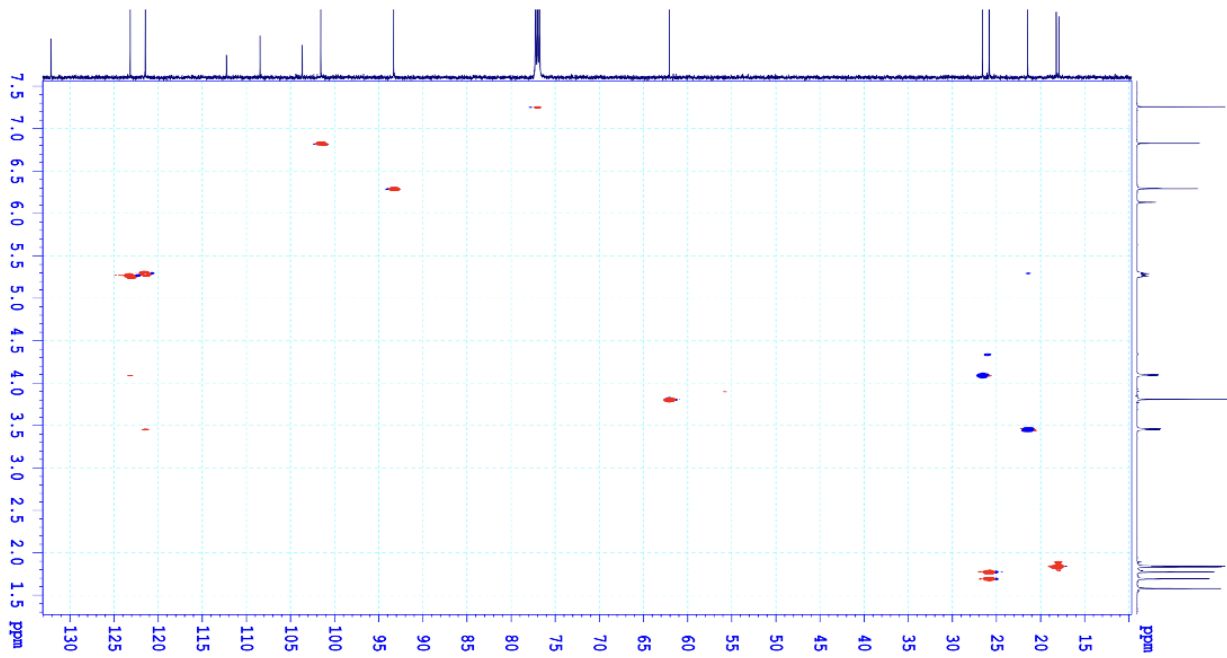


Figure S6. HSQC spectrum of α -mangostin

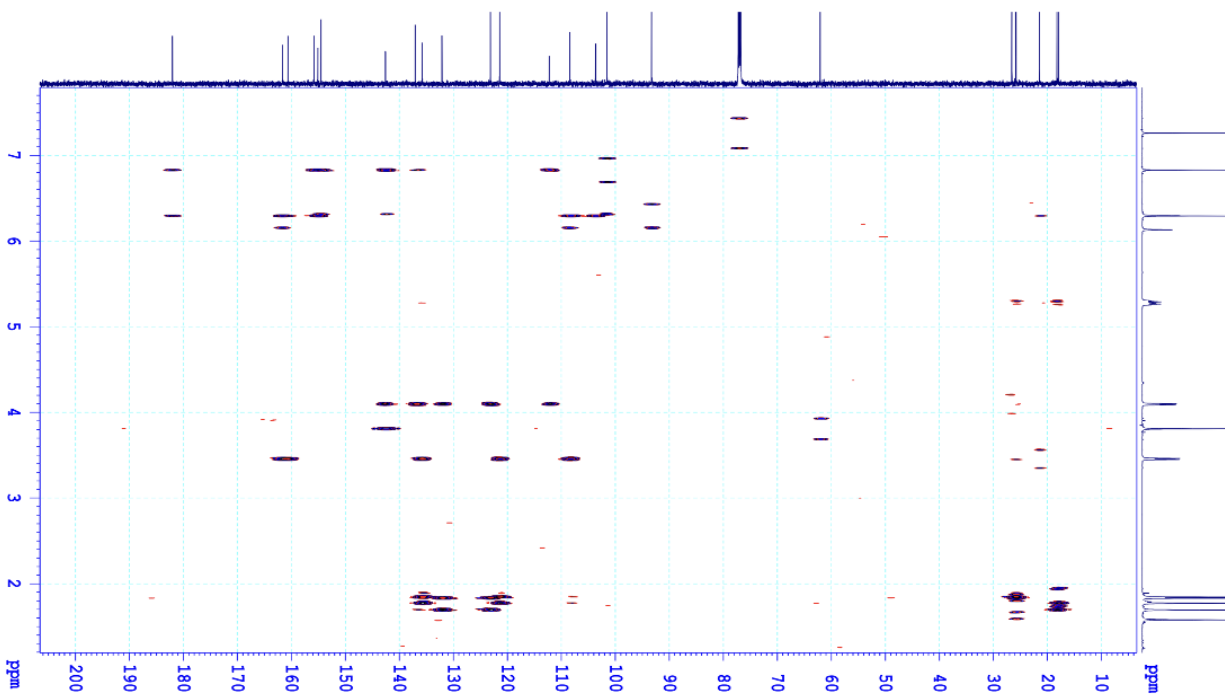


Figure S7. HMBC spectrum of α -mangostin

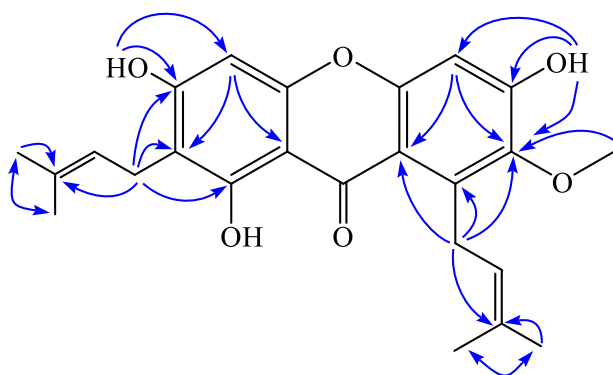


Figure S8. HMBC correlations of α -mangostin

Table S1. Analysis data of ^1H and ^{13}C spectra of isolated α -mangostin

V_i trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$
1	101.5	101.6	6.83 (1H. s)
1a	155.0	155.1	-
2	155.4	155.8	-
3	142.7	142.6	-
4	137.0	137.1	-
4a	112.0	112.3	
5	160.5	160.7	-
5a	103.5	103.7	

6	108.4	108.5	-
7	161.5	161.6	-
8	93.3	93.3	6.29 (1H. s)
8a	154.4	154.6	-
10	181.9	182.1	-
1'	26.5	26.6	4.10 (2H. d. 6.6)
2'	121.4	121.5	5.28 (1H. m)
3'	132.1	132.2	-
4'	17.9	17.9	1.84 (3H. s)
5'	25.8	25.8	1.77 (3H. d. 1.2)
1''	21.4	21.5	3.46 (2H. d. 7.2)
2''	123.0	123.2	5.28 (1H. m)
3''	132.1	132.2	-
4''	18.2	18.2	1.83 (3H. s)
5''	25.7	25.8	1.69 (3H. d. 1.2)
3-OMe	61.1	62.1	3.81 (3H. s)
2-OH	-	-	6.30 (1H. s)
5-OH	-	-	13,77 (1H, s)
7-OH	-	-	6,13 (1H, s)

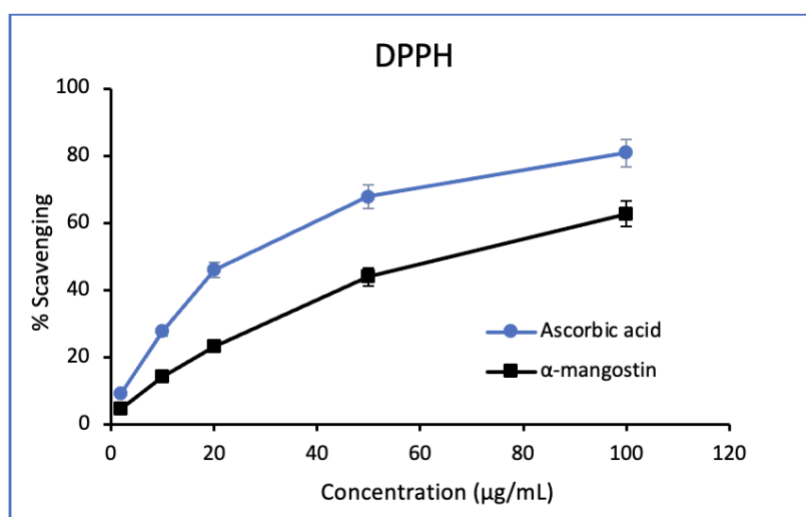


Figure S9. Scavenging effects of α -mangostin and ascorbic acid on DPPH radical

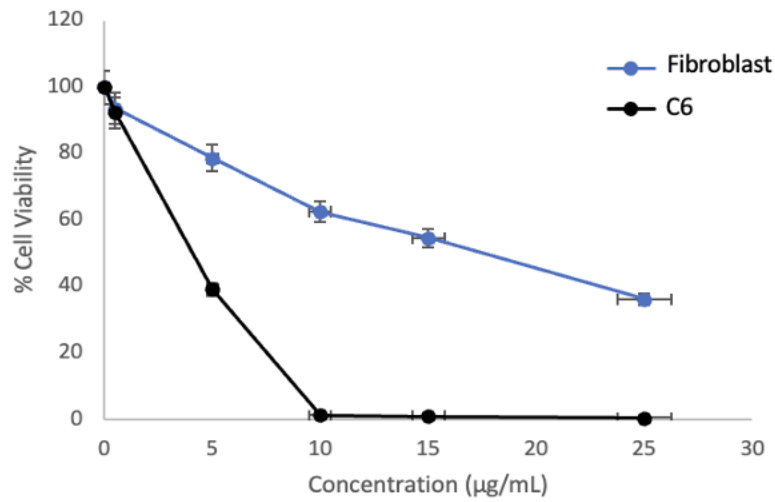


Figure S10. Effect of α -mangostin on cytotoxicity in C6 and fibroblast cells

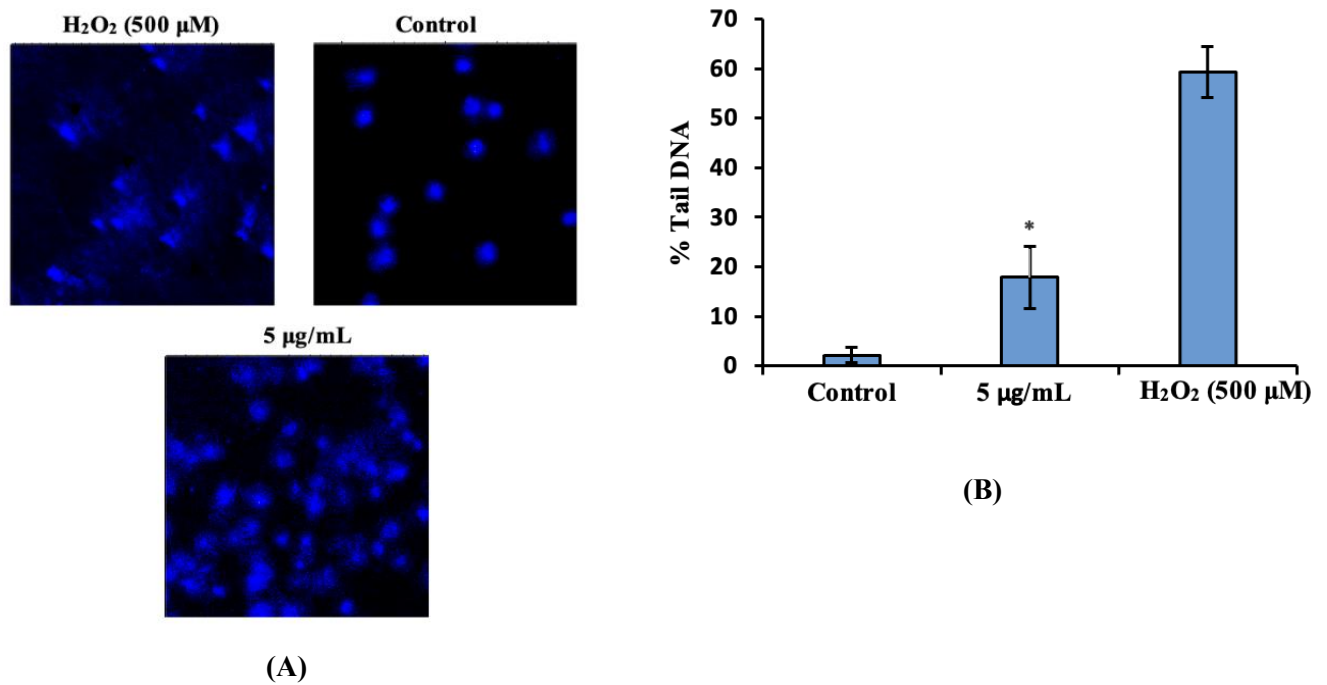


Figure S11. Comet assay results for U87MG cells treated with α -mangostin.

(A) Representative images of single-cell gel electrophoresis (comet assay) showing DNA damage at different α -mangostin concentrations.

(B) Quantification of DNA damage expressed as % Tail DNA at the indicated α -mangostin concentrations. Data are presented as mean \pm SD from three independent experiments, *P < 0.05.

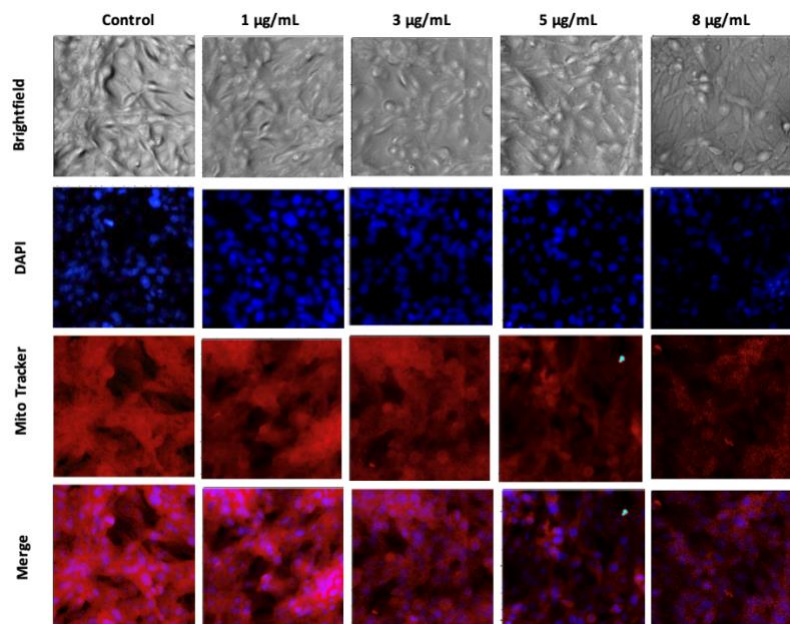


Figure S12A. Effect of α -mangostin on mitochondrial morphology in C6 cells

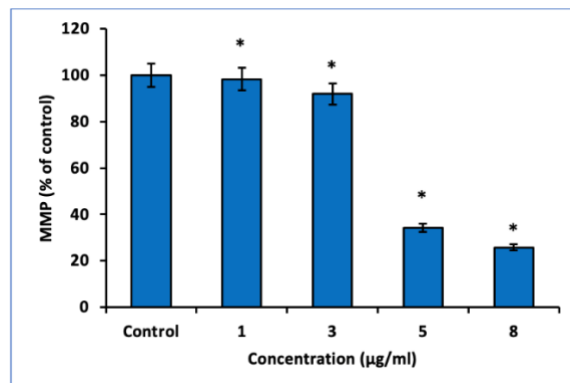


Figure S12B. Effect of α -mangostin on mitochondrial membrane potential in C6 cells (* $P < 0,05$).