

Sàng lọc chất kháng sinh chống ung thư từ xạ khuẩn phân lập ở vườn Quốc gia Cát Bà

Nguyễn Quỳnh Uyên^{1,*}, Lê Phương Chung²,
Đinh Thúy Hằng¹, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên¹

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

²Đại học Nha Trang, số 2 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 3 năm 2011

Tóm tắt. Trong 424 chủng xạ khuẩn phân lập tại Cát Bà, 10 chủng có hoạt tính kháng ít nhất 2 loài vi sinh vật kiểm định đã được sàng lọc. Nghiên cứu hình thái và so sánh trình tự đoạn gen 16S rDNA của 10 chủng này cho phép xếp chúng vào chi *Streptomyces*. Trong số 10 chủng lựa chọn, ba chủng (A1022, A1018 và A1073) đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao (đường kính vòng ức chế > 30 mm) và đã được chọn để nghiên cứu hoạt tính kháng tế bào ung thư người. Cả ba chủng này đều có tác dụng dương tính với ba dòng tế bào ung thư của người sử dụng trong nghiên cứu, gồm ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (Lu) và ung thư cơ vân tim (RD), đặc biệt chủng A1073 có hoạt tính tương đương, thậm chí cao hơn đối chứng dương. Kết quả phân tích bằng HPLC cho thấy chiết xuất thô từ dịch nuôi của 3 chủng A1022, A1018 và A1073 là các hỗn hợp tương ứng gồm 5 chất, 8 chất và 6 chất khác nhau.

Từ khóa: Dòng tế bào ung thư của người, chất kháng sinh, xạ khuẩn, *Streptomyces*.

1. Mở đầu

Ung thư là một nhóm các bệnh liên quan đến việc không kiểm soát được quá trình phân chia tế bào dẫn đến hình thành khối u tại chỗ hoặc di chuyển đến nơi xa (*di căn*). Một trong những nguyên nhân chính gây ung thư là sự sai hỏng của DNA, tạo nên đột biến ở các gen điều khiển quá trình phân bào. Nếu không được chữa trị sớm, hầu hết các loại ung thư có thể gây tử vong, và đây là một trong những nguyên nhân gây tử vong chính tại các nước phát triển [1]. Mặc dù là căn bệnh nan y, trong nhiều trường

hợp ung thư có thể chữa trị nếu được phát hiện và điều trị sớm. Ung thư hiện đang được điều trị bằng một hoặc kết hợp giữa ba liệu pháp: phẫu thuật, xạ trị và hóa trị liệu. Nhiều chất hóa trị liệu dùng trong chữa trị ung thư là các sản phẩm thứ sinh có nguồn gốc vi sinh vật, thường được gọi là chất kháng sinh chống ung thư (anti-tumor/cancer antibiotics) [2].

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật có tiềm năng lớn trong việc sản sinh kháng sinh nói chung và kháng sinh chống ung thư nói riêng [3, 4]. Các nhóm kháng sinh được dùng nhiều trong điều trị ung thư gồm anthracycline, actinomycin và bleomycin. Hiện nay anthracycline được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh ung thư

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-37547694.
E-mail: uyennq@vnu.edu.vn

như ung thư máu, ung thư bạch huyết, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư bàng quang [5]. Lớp kháng sinh anthracycline được sinh tổng hợp bởi *Streptomyces coeruleorubidus* hoặc *S. peucetius* lần đầu tiên công bố phát hiện năm 1963 [6], gồm một số chất như daunomycin, doxorubicin, epirubicin, adriamycin [7]. Các chất kháng sinh chống ung thư tác động lên tế bào ung thư theo nhiều cơ chế khác nhau, như tác động lên màng tế bào, lên quá trình sinh tổng hợp DNA và RNA, qua đó tiêu diệt các tế bào này hay ngăn ngừa không cho chúng phân chia [3, 4, 8]. Ở các tế bào ung thư, màng tế bào bị biến đổi về cấu trúc và đặc tính sinh học, chủ yếu mang điện tích âm do hàm lượng phosphatidylserine và O-glycosylated mucin cao [9-11], do đó là đối tượng chọn lọc của các chất kháng sinh chống ung thư. Một số chất kháng sinh chống ung thư lại có tác động chọn lọc đối với các phân tử DNA bị đột biến trong tế bào ung thư, qua đó ngăn cản quá trình sinh tổng hợp DNA và sự phân chia của tế bào [3, 4].

Mặc dù đã có đến vài trăm biệt dược [12] được phát triển và sử dụng trong các liệu pháp chữa trị ung thư nhưng cuộc đấu tranh với căn bệnh này vẫn không ngừng tiếp diễn. Nhiệm vụ phát hiện và nghiên cứu các loại thuốc mới, đặc biệt là các loại thuốc có nguồn gốc tự nhiên, vẫn luôn được đặt lên vai các nhà khoa học trên thế giới. Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN là nơi sưu tầm và lưu giữ nguồn vi sinh vật lớn của cả nước, trong đó có xạ khuẩn, để sử dụng cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Với mục tiêu tìm kiếm nguồn được chất kháng ung thư ở Việt Nam, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng bộ sưu tập gồm 424 chủng xạ khuẩn phân lập từ vườn Quốc gia Cát Bà (Hải Phòng) lưu giữ tại Viện để sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật, trên cơ sở đó các chủng có hoạt tính kháng sinh cao được dùng để thử hoạt tính kháng đối với ba

đồng tế bào ung thư gồm ung thư gan (**Hep-G2**), ung thư phổi (**Lu**) và ung thư cơ vân tim (**RD**).

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Các chủng xạ khuẩn và điều kiện nuôi cấy

424 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất và lá mục trong Vườn Quốc gia Cát Bà và được lưu giữ trong glycerol ở -80°C.

Trước khi sử dụng trong thí nghiệm sàng lọc, các chủng được hoạt hoá trên môi trường YS (glucose 1%, cao nấm men 0,2%, thạch 1,7%, pH 7) nuôi ở nhiệt độ 30°C trong 3-4 ngày. Đây cũng là điều kiện nuôi cấy để sơ bộ sàng lọc hoạt tính kháng sinh.

Để sàng lọc hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán, các chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường đậu tương dịch thể (tinh bột hòa tan 2%, glucose 1%, bột đậu tương 1,5%, peptone 0,5%, CaCO₃ 0,3%, pH 7) ở 30°C trong 3-4 ngày. Dịch ngoại bào được thu bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút. Đây cũng là môi trường dùng để thu dịch nuôi trong các nghiên cứu liên quan đến hoạt tính sinh kháng sinh.

2.2. Vi sinh vật kiểm định và điều kiện nuôi cấy

Bốn chủng kiểm định dùng cho phép thử hoạt tính kháng sinh gồm *Micrococcus luteus* (vi khuẩn Gram dương), *Escherichia coli* (vi khuẩn Gram âm), *Candida albicans* (nấm men) và *Fusarium oxysporium* (nấm sợi). Các chủng này được nuôi trong các môi trường thích hợp. Cụ thể là *M. luteus* và *E. coli* được nuôi trong môi trường Mueller-Hinton (cao thịt 0,3%, casein thủy phân 1,75%, tinh bột 0,15%, pH 7,4) ở 37°C còn *C. albicans* và *F. oxysporium* được nuôi trong môi trường YM (glucose 1%,

peptone 0,5%, cao nấm men 0,3%, cao malt (0,3%) ở 30°C.

2.3. Sàng lọc các chủng sinh kháng sinh

Sàng lọc sơ cấp được thực hiện bằng phương pháp thổi thạch, tóm tắt như sau: Xạ khuẩn đã mọc tốt trên môi trường thạch đĩa YS (3-5 ngày) được cắt thành thổi đường kính khoảng 5 mm (bằng dụng cụ hình ống) rồi đặt lên đĩa sàng lọc đã được cấy vi sinh vật kiểm định trước đó và tiến hành nuôi trong điều kiện thích hợp trong 2 ngày. Hoạt tính kháng sinh được đánh giá dựa trên độ lớn của vòng ức chế tạo thành quanh các thổi thạch (đường kính đo bằng mm) [13].

Sàng lọc thứ cấp sử dụng phương pháp khuếch tán, tóm tắt như sau: Các giếng nhỏ được đục trên đĩa thạch trước đó đã được cấy vi sinh vật kiểm định. Nhỏ khoảng 25 μ l dịch nuôi cấy xạ khuẩn sau ly tâm vào các giếng, sau đó ủ các đĩa này trong 2 ngày tại các điều kiện thích hợp tương ứng với loại vi sinh vật kiểm định. Hoạt tính kháng sinh được đánh giá bằng đường kính vòng ức chế tạo quanh giếng (đo bằng mm). Các thí nghiệm được lặp lại hai lần, dịch môi trường nuôi cấy chưa bổ sung vi sinh vật được dùng làm đối chứng âm [14].

2.4. Chiết dịch ngoại bào bằng ethyl acetate

Dịch nuôi xạ khuẩn trong môi trường đậu tương dịch thể được ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng để loại tế bào. Bổ sung dung dịch ethyl acetate sao cho đạt tỷ lệ 1:1 (v:v) rồi lắc hỗn hợp liên tục trong 1 giờ [15]. Loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng máy ly tâm loại dung môi. Sản phẩm chiết ở dạng bột.

2.5. Phân tích HPLC

Phân tích được tiến hành trên hệ thống HPLC (Agilent 1200, Mỹ) với DAD detector ở các điều kiện như sau: cột Varian, Microsorb

MV 100C18, 100mm x 4.6 mm, kích thước hạt 3 μ m; pha động 0.15% KH_2PO_4 (pH 3.5) / CH_3CN có gradient (3 min 15%, 6 min 40%, 12 min 40%, 19 min 45%, 22 min 85%, 29 min 85%, 32 min 15%); vận tốc 1,2 ml/phút; nhiệt độ lò cột: 30°C; bước sóng: UV/VIS 190 - 600 nm. Mẫu chất chiết được hòa tan trong DMSO và đưa vào cột (25 μ l) với nồng độ tương đương giữa các mẫu về thể tích dịch nuôi.

2.6. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào

Phương pháp thử màu: Khi có mặt vòng anthraquinone trong cấu trúc hóa học, các anthracycline sẽ thay đổi màu khi pH thay đổi: màu da cam khi ở pH acid, màu tím khi ở pH base. Đặc tính này được sử dụng để sơ bộ sàng lọc các chủng xạ khuẩn sinh anthracyclines [16]. Thử nghiệm được tiến hành như sau: hai giếng nhỏ được đục trên phần đĩa thạch trước đó đã được cấy xạ khuẩn (4-5 ngày). Nhỏ 25 μ l dung dịch HCl (1N) hoặc NaOH (2N) vào giếng. Quan sát màu quanh giếng sau 10-20 phút.

Phép thử độc tính đối với một số dòng tế bào ung thư của người: Thử nghiệm này được tiến hành tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo phương pháp của Skehan và cộng sự (1990) [17] và Likhiwitayawuid và cộng sự (1993) [18], tóm tắt như sau:

Ba dòng tế bào ung thư, gồm ung thư gan (**Hep-G2**), ung thư phổi (**Lu**) và ung thư cơ vân tim (**RD**) được đưa vào đĩa 96 giếng với hàm lượng 2×10^3 tế bào/giếng, sau đó bổ sung mẫu dịch chiết xạ khuẩn hòa tan trong DMSO (với các nồng độ pha loãng theo thang 10). Sau đó các đĩa được nuôi trong tủ CO_2 ở 37°C trong 7 ngày. Vào ngày thứ 3 thay môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào được hiện thị màu bằng SRB (sulforhodamine B) và được

đọc bằng máy đọc ELISA (ELISA reader) ở bước sóng 495 nm.

Hoạt tính gây độc tế bào được tính bằng phần trăm ức chế khi so sánh mật độ quang học của giếng được xử lý với mẫu nghiên cứu và chứng âm (DMSO). Nồng độ ức chế 50% (IC50) được suy ra từ đường cong phát triển tế bào và nồng độ chất thử (phần trăm sống sót so với nồng độ chất thử).

2.7. Các đặc điểm hình thái

Các đặc điểm hình thái của xạ khuẩn được quan sát sau hai tuần nuôi ở các điều kiện như đã mô tả. Các đặc điểm hiển vi như hệ sợi cơ chất, hình thái sợi khí sinh, cấu trúc chuỗi bào tử được quan sát dưới kính hiển vi phân pha (Carl-Zeiss) có nổi máy ảnh và phần mềm chụp ảnh. Atlas hình thái xạ khuẩn [19] và Sổ tay nhận dạng xạ khuẩn [20] được dùng để tham khảo về đặc điểm phân loại.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả sàng lọc xạ khuẩn có hoạt tính kháng sinh

Quá trình sàng lọc để tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng ung thư được tiến hành qua 3 bước, lần lượt gồm (i) sàng lọc sơ bộ tính kháng đối với 4 loài vi sinh vật kiểm định sử dụng phương pháp thổi thạch, (ii) sàng lọc thứ cấp tính kháng với 4 loài vi sinh vật kiểm định như trên sử dụng phương pháp khuếch tán và (iii) sàng lọc trực tiếp tính kháng đối với 3 dòng tế bào ung thư. Nhiều nghiên cứu cho thấy nhiều hoạt chất kháng ung thư được sản sinh từ các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn cao [3], do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng 4 loài

kiểm định đại diện cho các nhóm vi sinh vật lớn (vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương, nấm sợi và nấm men) để làm đối tượng cho hai bước sàng lọc sơ cấp và thứ cấp. Trong bước sàng lọc sơ cấp, 102 chủng đã được lựa chọn từ bộ sưu tập 424 chủng phân lập ở Cát Bà dựa trên tính kháng đối với ít nhất 1 trong 4 vi sinh vật kiểm định. Trong bước sàng lọc thứ cấp tiếp theo với phương pháp khuếch tán có độ chính xác cao hơn, 10 chủng đã được ghi nhận là có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cao (Bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính kháng sinh của 10 chủng xạ khuẩn lựa chọn sau bước sàng lọc sơ cấp và thứ cấp

Ký hiệu chủng	Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (đường kính vòng ức chế, mm)			
	E.	M.	F.	C.
	<i>coli</i>	<i>luteus</i>	<i>oxysporium</i>	<i>albicans</i>
A390	10	10	18	0
A410	24	0	10	0
A427	16	0	12	0
A1018	0	40	10	16
A1022	16	30	10	0
A1041	22	28	6	0
A1043	8	32	6	0
A1073	21	30	10	10
A1393	14	18	14	6
A1470	15	26	12	0

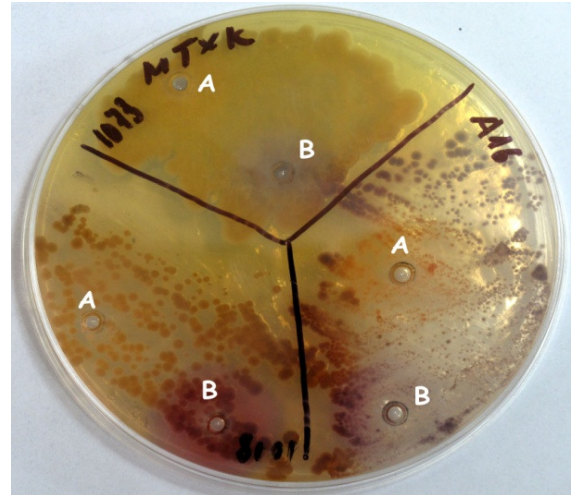
10 chủng được lựa chọn này sẽ là cơ sở để tiến hành bước sàng lọc trực tiếp về tính kháng đối với các dòng tế bào ung thư. Về phân loại, cả 10 chủng đều có các đặc điểm hình thái đặc trưng của *Streptomyces* như khuẩn lạc gồm các sợi khí sinh phát triển mạnh, màu trắng hoặc vàng, cuống sinh bào tử hình xoắn hoặc chuỗi. Kết hợp với so sánh trình tự đoạn gen 16S rDNA (900 bp) của 10 chủng với ngân hàng dữ liệu cho phép xếp chúng vào chi *Streptomyces*.

3.2. Nghiên cứu bước đầu về khả năng gây độc tế bào

3.2.1. Thử nghiệm thay đổi màu phụ thuộc pH

Một trong những nhóm kháng sinh có nguồn gốc từ *Streptomyces* hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư là anthracycline. Với đặc tính đổi màu khi pH môi trường chuyển từ acid sang base, anthracycline có thể được phát hiện trực tiếp trên môi trường nuôi cấy bằng phép thử màu (phần 2.6). Phương pháp này đã được áp dụng đối với 10 chủng xạ khuẩn lựa chọn ở trên để tìm kiếm xạ khuẩn sinh anthracycline. Trong 10 chủng chỉ có 2 chủng A1018 và A1073 là thể hiện dương tính trong phản ứng này, tức là chuyển màu da cam khi có pH acid và màu tím khi có pH base (hình 1).

Có thể thấy rằng mức độ đổi màu của chủng A1018 rõ rệt hơn so với chủng 1073, tuy nhiên ở cả hai chủng đều kém hơn so với chủng đối chứng dương A16 đã được chứng minh có hoạt tính sinh anthracycline (trao đổi cá nhân với GS. Miyadoh, NITE, Nhật Bản).



Hình 1. Sự thay đổi màu sắc theo pH môi trường của các chủng A1018 và A1073. A: giếng có pH acid; B: giếng có pH base. A16 - chủng đối chứng sinh anthracyclin.

Đối chiếu với hoạt tính kháng vi sinh vật (Bảng 1), chúng tôi nhận thấy hai chủng A1018 và A1073 đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao, đặc biệt đối với *M. luteus* (đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram dương), với đường kính vòng ức chế lớn hơn 30 mm. Tương tự, chủng A1022 cũng có hoạt tính kháng khuẩn cao. Do vậy ba chủng này (A1018, A1022 và A1073) được lựa chọn để nghiên cứu hoạt tính kháng tế bào ung thư.

3.2.2. Hoạt tính chống ung thư của các chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao

Thí nghiệm gây độc tính tế bào với 3 dòng tế bào ung thư của người được tiến hành với dịch chiết bằng ethyl acetate dịch nuôi tế bào của 3 chủng A1018, A1022 và A1073. Kết quả cho thấy cả 3 chủng đều có hoạt tính ức chế đối với cả 3 dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (Lu) và ung thư cơ vân tim (RD) (Bảng 2) ở mức độ khác nhau. Thí nghiệm sử dụng đối chứng dương là ellipithine, một trong những chất có khả năng diệt tế bào.

Bảng 2. Kết quả xác định hoạt tính gây độc tế bào của ba chủng A1018, A1022 và A1073

TT	Mẫu	Dòng tế bào			Kết luận
		Hep-G2	Lu	RD	
Phần trăm sống sót (%)					
1	Chứng âm (DMSO)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	Âm tính
2	Chứng dương	1,8 ± 0,5	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	Dương tính
3	A1018	12,3 ± 0,6	7,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	Dương tính với cả 3 dòng
4	A1022	50,1 ± 0,2	25,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0	Dương tính với cả 3 dòng
5	A1073	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	Dương tính với cả 3 dòng
Giá trị IC50 (µg/ml)					
1	Chứng dương	0,310	0,420	0,220	Dương tính
2	A1018	4,170	1,440	2,700	Dương tính với cả 3 dòng
3	A1022	20,000	5,250	0,446	Dương tính với cả 3 dòng
4	A1073	0,510	0,450	0,550	Dương tính với cả 3 dòng

Hoạt tính gây độc tế bào được thể hiện thông qua phần trăm tế bào sống sót và IC50 (trong trường hợp này được hiểu là nồng độ chất ức chế 50% tế bào). Trong ba chủng thí nghiệm, chủng A1073 cho hoạt tính ức chế cao hơn hẳn so với hai chủng còn lại, tương đương thậm chí hơn so với đối chứng dương. Mức độ gây độc của cả 3 chủng biểu hiện cao nhất đối với dòng RD – ung thư cơ vân tim, sau đến dòng Lu – ung thư phổi và cuối cùng là dòng Hep-G2 – ung thư gan. Kết quả thu được cho thấy ba chủng A1018, A1022 và A1073 có tiềm năng cao trong việc sinh kháng sinh chống ung thư. Tuy nhiên, một số dòng tế bào ung thư và

tế bào bình thường khác cần được thử nghiệm thêm để có thể đưa ra kết luận chính xác về hoạt tính gây độc tế bào ở ba chủng xạ khuẩn này.

3.3. Kết quả phân tích HPLC

Các chất ức chế tế bào ung thư ở 3 chủng A1018, A1022 và A1073 được nghiên cứu bước đầu qua sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Dịch nuôi tế bào chiết bằng ethyl acetate, loại dung môi, sau đó hòa tan lại trong DMSO được dùng để phân tích HPLC. Kết quả sắc ký chất chiết thô từ dịch nuôi của ba chủng A1018, A1022 và A1073 được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Tổng kết kết quả phân tích HPLC chất chiết từ dịch nuôi của 3 chủng có hoạt tính diệt tế bào ung thư

Mẫu	Bước sóng phân tích (nm)	Số lượng đỉnh	Thời gian xuất hiện của đỉnh chính (phút)	%
A1018	254,4	27	6.305	9.8890
			16.632	46.4839
			18.076	11.1244
	290,16	14	0.862	15.4892
			6.306	29.6140
			210,8	30
230,16	32	1.079	67.4264	
		0.936	36.1242	
		1.090	51.1499	
A1022	254,4	40	7.190	16.5334
			8.107	30.9796
			290,16	35
	210,8	40	8.107	24.5976
			1.160	34.3541

	230,16	49	0.909	13.1443
			1.081	21.3425
	254,4	48	7.182	18.6807
			7.336	11.7642
			8.099	25.0185
	210,8	50	1.080	32.9418
			7.182	5.4240
A1073			8.099	7.2609
			23.073	5.9238
	230,16	49	1.023	31.0006
			7.182	10.1459
			8.098	8.1295
			23.072	6.0938

Qua phân tích kết quả có thể nhận thấy như sau:

- Với mẫu A1018: có thể gồm 8 chất khác nhau với thời gian (phút) thối ra là 0.862, 0.922, 0.936, 1.079, 1.090, 6.305, 16.632 và 18.076.

- Với mẫu A1022: có thể gồm 5 chất khác nhau với thời gian (phút) thối ra là 0.909, 1.081, 1.160, 7.190 và 8.107.

- Với mẫu A1073: có thể gồm 6 chất khác nhau với thời gian (phút) thối ra là 1.023; 1.080; 7.182; 7.336; 8.099 và 23.073.

Liệu đó là các chất gì và chất nào quyết định hoạt tính kháng tế bào ung thư là các câu hỏi cần được nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu có thể rút ra một số kết luận sau:

- 10 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi sinh vật cao đối với ít nhất 2 trong 4 chủng vi sinh vật kiểm định được sàng lọc từ bộ xạ khuẩn gồm 424 chủng phân lập từ rừng quốc gia Cát Bà (Hải Phòng). Dựa trên các đặc điểm hình thái và so sánh đoạn gen 16S rDNA (900 bp) các chủng này được xếp vào chi *Streptomyces*.

- Ba chủng A1018, A1022 và A1073 đã được lựa chọn để nghiên cứu tác dụng kháng tế bào ung thư người và đều có tác dụng dương tính với cả ba dòng tế bào ung thư là ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (Lu) và ung thư cơ vân tim (RD).

- Hai chủng A1018 và A1073 có phản ứng đặc trưng của các xạ khuẩn sinh anthracycline.

- Sau HPLC, chất chiết từ chủng A1018 tách thành 8 đỉnh, từ chủng A1022 cho 5 đỉnh còn chủng A1073 thì tách thành 6 đỉnh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài QG.09.48. Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN đã tạo điều kiện trong quá trình thực hiện đề tài.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians (2011). PMID 21296855.
- [2] M. K. Ashish, L. L. Donald, Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology* 63 (2004) 457.
- [3] O. Nduka, *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Science, Enfield, USA, 429- 453. 2007.
- [4] O. Carlo, M. Carmen, A. S. Jose, Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine Drugs* 97 (2009) 210.
- [5] D. A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57 (1999) 727.
- [6] R. B. Weiss, The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin. Oncol.* 19 (1992): 670-86.

- [7] J. W. Lown, Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: Current status and recent developments. *Pharmacol. Therapeu.* 60 (1993) 185.
- [8] D. W. Hoskin, A. Ramamoorthy, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778 (2008) 357-75.
- [9] J. Dobrzanska, P. Szachowicz, S. Sulkowski, Figaszewski, Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 276 (2005) 113.
- [10] M. D. Burdick, A. Harris, C. J. Reid, T. Iwamura, M. A. Hollingsworth. Oligosaccharides expressed on MUC1 by pancreatic and colon tumour cell lines, *J.Biol. Chem.* 272 (1997) 24198.
- [11] R. A. Cruciani, J. L. Barker, M. Zasloff, H. C. Chen, O. Colamonici, Antibiotic magainins exert cutolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1991) 3792.
- [12] <http://www.chemocare.com/bio/index.asp>.
- [13] T. Ichikawa, M. Date, T. Ishikura, A. Ozaki, Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16 (1971) 218.
- [14] Y. T. Alex, M. T. Hai, *Screening for Microbial Products*. In *Microbial Biotechnology* (2nd ed.): Principles and Applications, (2006) 3.
- [15] Y. Guoliang, W. Wang, S. Sha, L. Liu, X. Yu, Inhibition and control effects of the ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermented broth against *Botrytis cinerea*. *Af. J. Microbiol. Res.* 4 (2010) 1647.
- [16] G. E. Trease, W. C. Evans, *A textbook of Pharmacognosy*. 14th ed. Bailliere Tindall Ltd, London, 1996, p. 832.
- [17] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer. Inst.* 82 (1990)1107.
- [18] L. Likhivitayawuid, C. K. Angerhofer, H. Chai, J. M. Pezzuto, G. Cordell, N. Ruangrunsi, Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J. Nat. Prod.* 56 (1993)1331.
- [19] V. Gernot, *Morphology of actinomycetes*. In S. Miyadoh, M. Hamada, K. Hotta, T. Kudo, T. Seino *et al.* (eds) *Atlas of Actinomycetes*. Asakura. Tokyo, 1997, 180-191.
- [20] S. Miyadoh, M. Hamada, K. Hotta K, T. Kudo, T. Seino, *Atlas of Actinomycete*. The Society for Actinomycetes Japan, Asakura Co: 2-10 (1997).

Screening for antitumor antibiotics from actinomycetes isolated from Catba National Park

Nguyen Quynh Uyen¹, Le Phuong Chung²,
Dinh Thuy Hang¹, Nguyen Huynh Minh Quyen¹

¹VNU Institute of Microbiology and Biotechnology, 144 Xuan thuy, Hanoi, Vietnam

²Nha Trang University, 2 Nguyen Dinh Chieu, Nha Trang, Khanh Hoa, Vietnam

Among 424 actinomycete strains isolated at Cat Ba island, 10 strains were selected as they showed the antimicrobial activity against at least 2 of the tested microbial species. Morphological characteristics and 16S rDNA sequence comparison supposed that all 10 strains belonged to the genus *Streptomyces*. Three strains (A1022, A1018 and A1073) out of ten strains above showed to possess the highest antimicrobial activity and therefore they were subjected to study on cytotoxic activity against human cancer cell lines. Crude extracts of three strains above exhibited significant cytotoxic activity against hepatocellular carcinoma, lung cancer, and rhabdosarcoma human cell lines, special case was strain A1073 which showed cytotoxicity at an equal level (even little higher) to the positive control. HPLC analyses of ethyl acetate crude extracts of the three strains A1022, A1018 and A1073 revealed relatively high complexity, possessing 5 peaks, 8 peaks and 6 peaks, respectively.

Keywords: Human cancer cell lines, antibiotics, actinomycetes, *Streptomyces*.