

## NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG UNG THƯ CỦA HẢI MIÊN *HALICLONA* SP. Ở VÙNG BIỂN NHA TRANG - KHÁNH HÒA

Đỗ Thị Việt Phương<sup>1\*</sup>, Nguyễn Quốc Huy<sup>1</sup>, Thân Thị Thanh Trúc<sup>1</sup>, Thân Văn Huỳnh Đức<sup>1</sup>,  
Nguyễn Bảo Nghi<sup>1</sup>, Thái Minh Quang<sup>2</sup>, Trần Thị Vân Anh<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Lệ Thủy<sup>1</sup>,  
Nguyễn Đăng Quân<sup>1</sup>, Phạm Thị Kim Trâm<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Viện Hải Dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Hải miên là một trong những loài sinh vật biển có nhiều tiềm năng trong nghiên cứu về thành phần hóa học có hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành thu thập, định danh, tách chiết phân đoạn các hợp chất có trong hải miên *Haliclona* sp. ở vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa và bước đầu khảo sát hoạt tính gây độc lên các tế bào ung thư của các phân đoạn thu được. Trong bốn phân đoạn n - Hexan, EtOAc, n - BuOH và nước, phân đoạn n-butanol có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gan HepG2 (IC<sub>50</sub> = 8,46 µg/mL), ung thư máu K562 (IC<sub>50</sub> = 8,83 µg/mL), ung thư ruột CaCo2 (IC<sub>50</sub> = 4,17 µg/mL), tế bào ung thư phổi A549 (IC<sub>50</sub> = 10,73 µg/mL). Phân tách hợp chất từ phân đoạn n-butanol bằng phương pháp sắc ký rây phân tử thu được 17 tiểu phân đoạn, trong đó tiểu phân đoạn C17 có hoạt tính gây độc tế bào tốt nhất với IC<sub>50</sub> trên bốn dòng tế bào ung thư khoảng 4,3 đến 7,8 µg/mL. Kết quả thử nghiệm cho thấy *Haliclona* sp. thu nhận ở vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa có hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh và là cơ sở để phát triển hướng phân tích thành phần, phân tách hoạt chất từ loài hải miên tiềm năng này.

*Từ khóa:* Hải miên, *Haliclona* sp., kháng ung thư.

### MỞ ĐẦU

Đại dương là nguồn tài nguyên quan trọng không chỉ cho về nguồn lợi hải sản mà còn là “một tủ thuốc” vô cùng quý báu. Đã có rất nhiều nghiên cứu cho thấy hệ sinh vật biển có chứa nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng ung thư, kháng oxy hóa... Trong đó, hải miên rất được chú ý vì tiềm năng ứng dụng trong phát triển thuốc cho các bệnh phổ biến trên thế giới hiện nay. Hiện nay, có hơn 29000 hợp chất tự nhiên từ biển được công bố, phần lớn được tìm thấy từ hải miên (Carroll *et al.*, 2019). Các hợp chất từ hải miên chủ yếu là các nhóm chất nucleoside không điển hình, terpen, sterol, peptide vòng, alkaloid, acid béo và các dẫn xuất acid amin, trong đó có rất nhiều hoạt chất đã được phát triển thành thuốc (Shakeri and Sahebkar, 2015). *Haliclona* sp. là một trong những loài có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học được ghi nhận. Hoạt chất điển hình được nhắc đến nhiều nhất từ *Haliclona* sp. là Salicylialhamides A và B. Đây là hai alkaloid có tác dụng gây độc trên 60 dòng tế bào ung thư được ghi nhận lần đầu bởi Erickson và đồng tác giả năm 1997 từ loài *Haliclona* sp. thu nhận tại Úc (Erickson *et al.*, 1997). Trong hơn hai thập kỷ, có rất nhiều hợp chất đã được phân lập từ *Haliclona* sp. được thu thập tại các vùng khác nhau trên thế giới. Từ các công bố về thành phần hợp chất được tìm thấy ở *Haliclona* sp. cho thấy hợp chất từ hải miên rất đa dạng và thay đổi tùy theo vùng địa lý, đặc trưng môi trường sống (Shakeri, Sahebkar, 2015; Nanif *et al.*, 2019). Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố nào tại Việt Nam về hợp chất tự nhiên phân lập từ *Haliclona* sp (Thái Minh Quang, 2013). Với các thành phần hợp chất tự nhiên có tiềm năng ứng dụng cao đã được tìm thấy ở các loài *Haliclona* sp. tại các vùng biển trên thế giới, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu thập, định danh và đánh giá hoạt tính kháng ung thư của phân đoạn hải miên *Haliclona* sp. thu nhận ở vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Thu nhận, định danh và xử lý mẫu hải miên

Hải miên được thu thập tại dãy đá Hòn Một, vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa, từ độ sâu 1 đến 12 m. Mẫu sau khi thu thập được lưu trữ trong ethanol 80 - 90%. Định danh mẫu được thực hiện trên cơ sở so sánh hình thái giải phẫu cấu trúc khung xương và trầm xương (Hooper, 2003). Tiêu bản cấu trúc khung xương được thực hiện với các lát cắt bề mặt cơ thể và vuông góc với bề mặt. Tiêu bản được làm khô, cố định trên lam kính và được quan sát dưới kính hiển vi quang học ACCU-SCOPE EXC-350.

Mẫu hải miên *Haliclona* sp. được bảo quản ở -20°C. Mẫu được cân để xác định khối lượng ban đầu, sau đó tiến hành cấp đông ở nhiệt độ -80°C trong khoảng 24 giờ. Tiếp theo, mẫu được đưa vào máy đông khô ở nhiệt độ

-49°C, ở áp suất 0.045mbar trong thời gian 2 - 3 ngày. Sau khi kết thúc quá trình đông khô, mẫu được say thành bột và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

### Thu nhận cao chiết và tách chiết các phân đoạn của hải miên

Ngâm chiết 80 g mẫu hải miên sấy đông khô với 4 L MeOH kết hợp siêu âm ở 25°C, cô thu hồi dung môi thu được 34 g cao toàn phần. Phân tán cao toàn phần trong 500 ml nước cất, chiết phân bố lỏng - lỏng với lần lượt các dung môi n - Hexan (500 mL × 3 lần), EtOAc (500 mL × 3 lần), n - BuOH (500 mL × 4 lần). Cô quay thu hồi dung môi thu được các phân đoạn.

Phân tách cao n-BuOH bằng phương pháp sắc ký rây phân tử sử dụng cột thủy tinh có kích thước  $\Phi 3,2 \times 50$  cm, pha tĩnh là 150 g silica gel 40 - 63  $\mu\text{m}$ , hoạt hóa 110°C/2h và hệ dung môi  $\text{CHCl}_3$  - MeOH. Khối lượng mẫu sử dụng là 7 g, nạp mẫu khô.

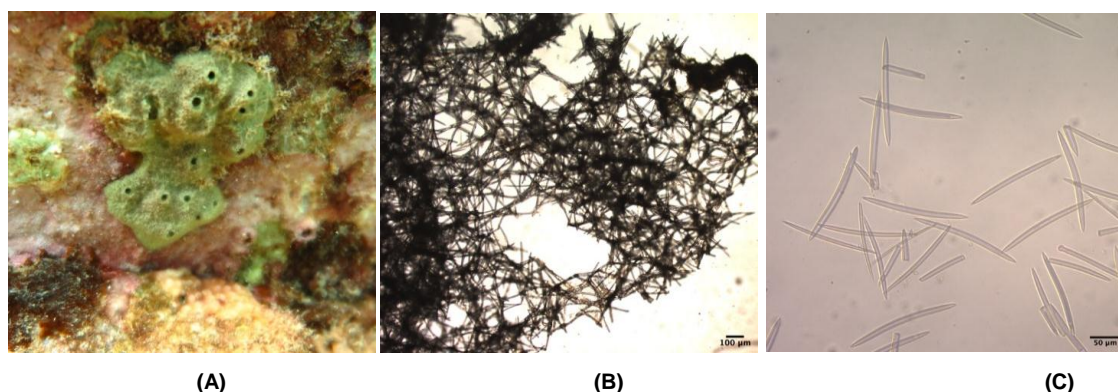
### Đánh giá hoạt tính gây độc lên tế bào ung thư của các cao chiết phân đoạn hải miên

4 dòng tế bào ung thư, bao gồm tế bào ung thư gan HepG2, tế bào ung thư máu K562, tế bào ung thư ruột  $\text{CaCo}_2$ , tế bào ung thư phổi A549 cung cấp bởi Giáo sư Shijin Saito thuộc Đại học Tsukuba - Nhật Bản được sử dụng để kiểm tra hoạt tính ức chế sự tăng trưởng tế bào của dịch chiết hải miên. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI bổ sung 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) và 1% kháng sinh Penicillin + Steptomycin (PS), điều kiện nuôi cấy ở 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Sau 3 - 5 ngày cấy chuyển, khi mật độ tế bào phủ trên 80%, thu hồi tế bào cho việc khảo sát hoạt tính của dịch chiết hải miên. Tế bào với mật độ  $1 \times 10^5$  tế bào/mL được cho vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng và tiếp tục ủ trong vòng 24 giờ, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Các tế bào sẽ được xử lý với các dịch cao chiết hải miên ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ . Tế bào sau khi xử lý được ủ trong khoảng thời gian 48h. Khả năng gây độc lên tế bào ung thư của dịch chiết hải miên được đánh giá bằng phương pháp MTT. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và phân tích thống kê Anova one way bằng phần mềm GraphPad Prism 6 (giá trị  $p < 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Định danh mẫu hải miên

Mẫu hải miên được định danh dựa trên cơ sở so sánh hình thái giải phẫu cấu trúc khung xương và trâm xương (Hooper, 2003). Dựa trên đặc điểm hình thái (Hình 1A), cấu trúc khung xương (Hình 1B) và cấu trúc trâm xương (Hình 1C) xác định mẫu hải miên thu nhận thuộc lớp hải miên Demospongiae Sollas, phân lớp Heteroscleromorpha Cárdenas, bộ Haplosclerida Topsent, họ Chalinidae Gray, giống *Haliclona* Grant, loài *Haliclona* sp. Hệ thống phân loại và khóa phân loại theo Systema Porifera (Hooper van Soest, 2002), Morrow & Cárdenas (2015). Cập nhật chỉnh lý theo WPD (World Porifera Database).



**Hình 1. Đặc điểm hình thái của hải miên *Haliclona* sp.**  
(A) Mẫu hình thái ngoài (B) Cấu trúc khung xương (C) Cấu trúc trâm xương

### Thu nhận cao phân đoạn và tiểu phân đoạn butanol

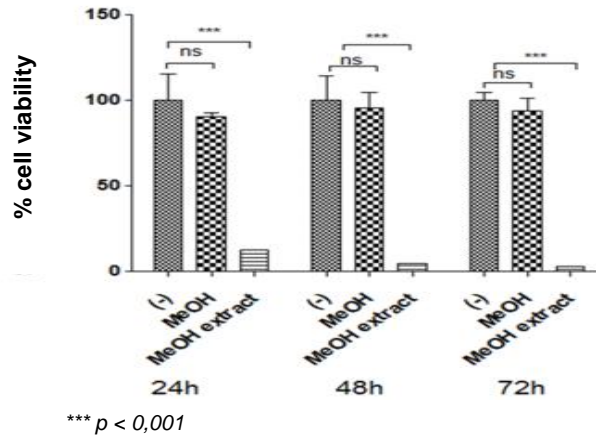
Phương pháp ngâm chiết với dung môi MeOH cho hiệu suất thu hồi 42,50%. Các phân đoạn thu nhận bằng phương pháp phân đoạn dựa theo độ phân cực tăng dần thu được 4 phân đoạn n-Hexan (phân đoạn A, 3,02 g), EtOAc (B, 0,59 g), n-BuOH (C, 7,88 g) và nước (D, 21,32 g). Tổng khối lượng cao phân đoạn thu được là 32,81 g, đạt hiệu suất thu hồi là 96,50%. Cao chiết butanol được phân tách bằng phương pháp sắc ký rây phân tử thu được 17 tiểu phân đoạn với khối lượng cao thu được của mỗi phân đoạn là khoảng 3 mg.

### Hoạt tính gây độc của cao tổng và các phân đoạn hải miên *Haliclona* sp. trên các dòng tế bào ung thư

Cao chiết hải miên được thử hoạt tính gây độc trên tế bào ung thư gan ở 3 mốc thời gian 24h, 48h và 72h. Kết quả từ Hình 2 cho thấy khả năng gây độc tế bào của dịch cao tổng hải miên ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  là rất cao (gây

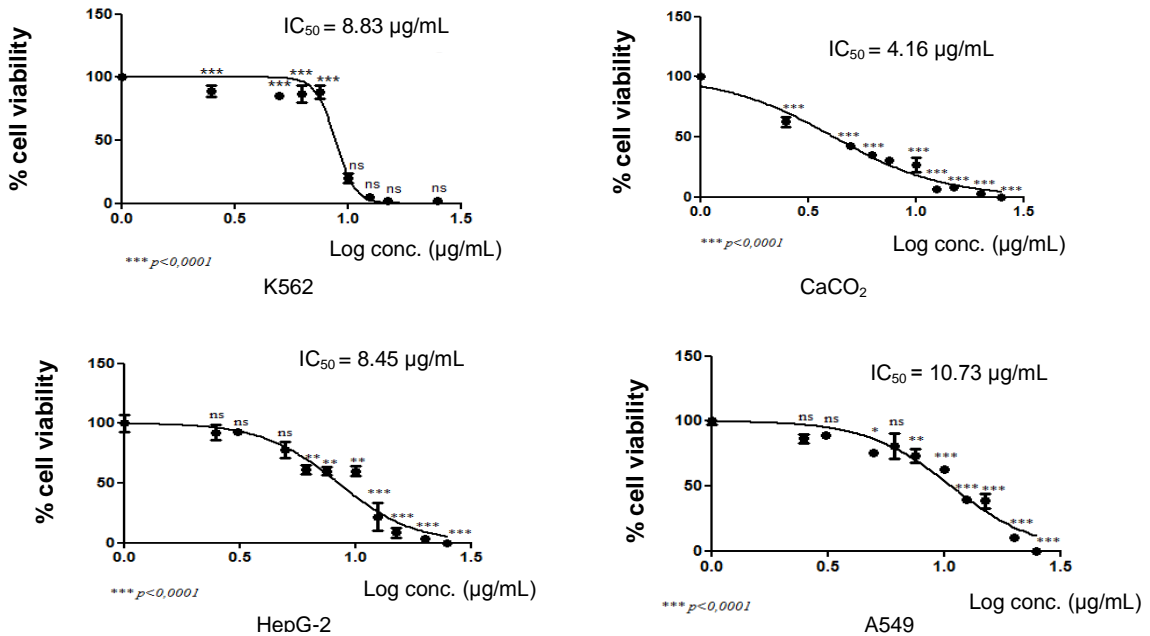
độc hơn 80%) so với chứng âm và tế bào được xử lý methanol. Ở ba thời điểm khảo sát, độc tính lên tế bào của dịch cao tổng hải miên đều cho khác biệt với nhau ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ tế bào sống sót qua ba thời điểm 24h, 48h, 72h lần lượt là 12,3%, 4,5%, 2,8% . So với hai thời điểm 48, 72h khả năng gây độc tế bào ở 24h cho thấy sự khác biệt về thống kê vì thế 48h là mốc thời gian ủ phù hợp để thực hiện các thí nghiệm thử hoạt tính.

Ngoài ra, tỷ lệ tế bào sống sót ở chứng âm (tế bào không xử lý) và tế bào được xử lý methanol không có khác biệt thống kê (ns), cho thấy methanol ở nồng độ pha thuốc không gây ảnh hưởng đến độc tính lên tế bào ung thư của dịch cao tổng hải miên.



Hình 2. Khả năng ức chế sinh trưởng lên tế bào ung thư gan HepG-2 của cao tổng *Haliclona* sp. trong 24h, 48h và 72h

Chứng âm (-): tế bào không xử lý, MeOH: tế bào được xử lý với methanol, MeOH extract: tế bào xử lý với cao tổng pha trong methanol ở nồng độ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . \*\*\*  $p < 0,001$ , ns không khác biệt thống kê (Độ lệch chuẩn SD được tính bằng căn bậc 2 của phương sai).



Hình 3. Giá trị  $IC_{50}$  của cao tổng *Haliclona* sp. trên 4 dòng tế bào ung thư

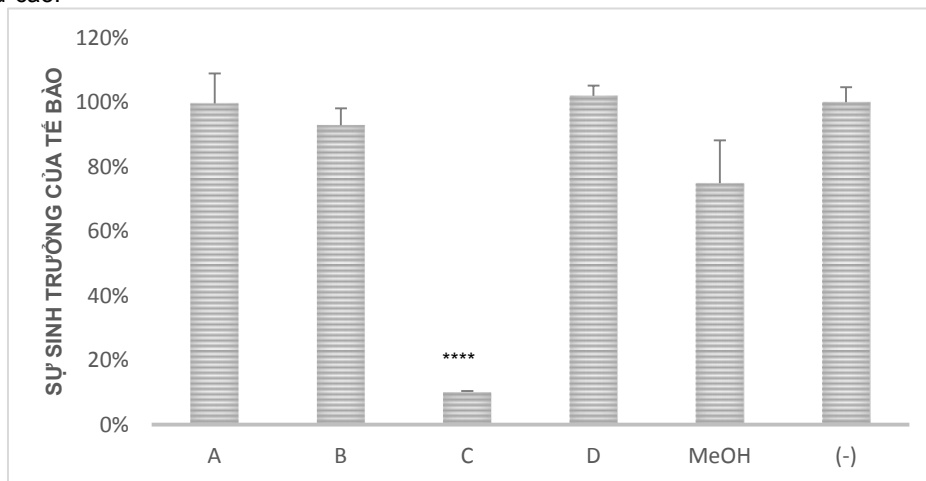
HepG2: Giá trị  $IC_{50}$  của cao tổng trên tế bào ung thư gan, K562: Giá trị  $IC_{50}$  của cao tổng trên tế bào ung thư máu, CaCo2: Giá trị  $IC_{50}$  của cao tổng trên tế bào ung thư ruột, A549: Giá trị  $IC_{50}$  của cao tổng trên tế bào ung thư phổi. \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , ns không khác biệt thống kê (Độ lệch chuẩn SD được tính bằng căn bậc 2 của phương sai).

Cao chiết hải miên ở nồng độ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  với độ pha loãng bậc 2 được xác định giá trị  $IC_{50}$  sau 48h xử lý. Dựa trên giá trị  $IC_{50}$  (Hình 3) của cao chiết hải miên trên 4 dòng tế bào ung thư (4,16 - 10,73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cho thấy cao chiết hải miên *Haliclona* sp. có hoạt tính ức chế tế bào ung thư cao. Kết quả đánh giá khả năng gây độc của các cao chiết

toàn phần cho thấy trong cao chiết có thành phần có khả năng gây độc trên nhiều dòng tế bào ung thư, trong đó mạnh nhất đối với dòng tế bào ung thư ruột CaCo2 (giá trị  $IC_{50} = 4,16 \mu\text{g/mL}$ ).

Cao tổng hải miên được chiết phân bố lỏng - lỏng với lần lượt các dung môi n-Hexan, EtOAc và n-BuOH thu được 4 phân đoạn. Các phân đoạn này được thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư với cùng một nồng độ là  $100 \mu\text{g/mL}$  với thời gian xử lý là 48h.

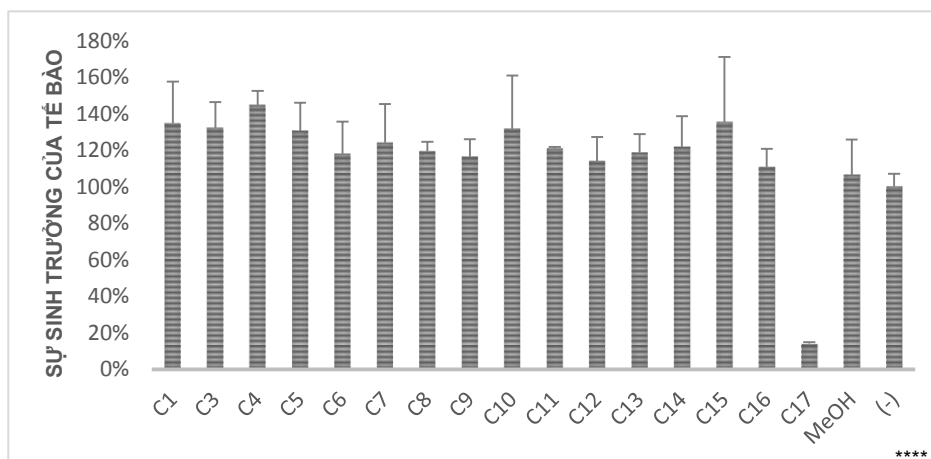
Kết quả từ Hình 4 cho thấy khả năng gây độc tế bào của phân đoạn n-BuOH là rất cao (gây độc hơn 80%) so với chứng âm trong khi khả năng gây độc tế bào của các phân đoạn khác rất thấp (gây độc từ 0% - 7%). Tỷ lệ tế bào sống sót của phân đoạn n-BuOH là 15% cho thấy thành phần các hợp chất trong phân đoạn này có khả năng kháng ung thư cao.



**Hình 4. Khả năng ức chế sinh trưởng lên tế bào ung thư gan HepG-2 của 4 phân đoạn *Haliclona sp.***

A: tế bào được xử lý với phân đoạn n-Hexan, B: tế bào được xử lý với phân đoạn EtOAc, C: tế bào được xử lý với phân đoạn n-BuOH, D: tế bào được xử lý với phân đoạn nước. Nồng độ của các phân đoạn được sử dụng là  $100 \mu\text{g/mL}$ , MeOH: tế bào được xử lý với methanol, (-): tế bào không xử lý. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Độ lệch chuẩn SD được tính bằng căn bậc 2 của phương sai).

Phân đoạn butanol được tiếp tục phân tách trên cột sắc ký silical gel, thu được 17 tiểu phân đoạn được ký hiệu từ C1 đến C17. Các tiểu phân đoạn này được thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư với nồng độ giống nhau là  $100 \mu\text{g/mL}$  trong 48h. Trong đó chỉ có một phân đoạn (ký hiệu C17) có hoạt tính gây độc mạnh lên tế bào ung thư gan HepG2 với tỷ lệ tế bào sống sót là 14% so với tế bào không xử lý. 16 tiểu phân đoạn còn lại không thấy có sự tác động gây độc lên tế bào ung thư.



**Hình 5. Khả năng ức chế sinh trưởng lên tế bào ung thư gan HepG-2 của các tiểu phân đoạn n-Butanol**

C1 - C17: tế bào được xử lý với 17 phân đoạn n-BuOH được ký hiệu từ C1 đến C17 ở nồng độ  $100 \mu\text{g/mL}$ , MeOH: tế bào được xử lý với methanol, (-): tế bào không xử lý. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Độ lệch chuẩn SD được tính bằng căn bậc 2 của phương sai).

Tiểu phân đoạn C17 ở nồng độ  $100 \mu\text{g/mL}$  với độ pha loãng bậc 2 được xác định giá trị  $IC_{50}$  sau 48h xử lý. Giá trị  $IC_{50}$  của tiểu phân đoạn C17 được xác định trên 4 dòng tế bào ung thư với nồng độ từ 4 -  $8 \mu\text{g/mL}$  (Bảng 1) cho thấy khả năng gây độc mạnh lên tế bào ung thư của hoạt chất có trong phân đoạn này.

**Bảng 1. Giá trị IC<sub>50</sub> của tiểu phân đoạn C17 trên 4 dòng tế bào ung thư**

	K562	HepG-2	A549	CaCo-2
Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)	4.39 ± 0.66	4.84 ± 0.01	6.73 ± 1.07	7.89 ± 1.28

Kết quả thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SD (Độ lệch chuẩn SD được tính bằng căn bậc 2 của phương sai).

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu nhận, định danh một loài hải miên thu nhận tại vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa là *Haliclona* sp. chưa được công bố trước đây. Phân tách thành phần hợp chất và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các cao chiết từ *Haliclona* sp. cho thấy phân đoạn n-butanol có hoạt tính gây độc trên cả bốn dòng tế bào ung thư HepG2, K562, A549 và CaCo2; trong đó, tiểu phân đoạn C17 thu nhận từ phân đoạn này bằng phương pháp sắc ký rây phân tử có chứa thành phần hợp chất gây độc tế bào mạnh nhất với giá trị IC<sub>50</sub> = 4,39 - 7,89 µg/mL. Kết quả cho thấy tiềm năng nghiên cứu xác định hoạt chất và cơ chế ức chế tế bào ung thư của hải miên *Haliclona* sp. ở vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa để định hướng phát triển thuốc hỗ trợ điều trị ung thư.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR (2019). Marine natural products. *Nat Prod Rep* 36: 122-173.
- Erickson KL, Beutler JA, Cardellina IJ, Boyd MR (1997). Salicylilalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona* sp. *J Org Chem* 62: 8188-8192.
- Hanif N, Murni A, Tanaka C, Tanaka J (2019). Marine Natural Products from Indonesian Waters. *Mar Drugs* 17(6): 364. Published 2019 Jun 19. doi:10.3390/md17060364.
- Hooper J (2000). Sponguide: Guide to Sponge Collection and Identification.
- Hooper JNA, van Soest RWM (2002). Systema Porifera: A guide to the classification of sponges. Volume 1.
- Hooper JNA (2003). 'Sponguide'. Guide to Sponge Collection and Identification. (Version 2003). Queensland Museum, pp26.
- Morrow C, Cárdenas P (2015). Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Front Zool* 12. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0099-8>
- Shakeri A, Sahebkar A (2015). Anti-Cancer Products from Marine Sponges: Progress and Promise. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 9: 187-8.
- Thai Minh Quang (2013). A Review of The Diversity of Sponges (Porifera) In Vietnam, *The Proceedings of the 2nd international workshop on marine bioresources of Vietnam*. Hanoi-Vietnam.

## EVALUATION OF ANTICANCER ACTIVITY OF MARINE SPONGES *HALICLONA* SP. FROM NHA TRANG - KHANH HOA

Do Thi Viet Phuong<sup>1\*</sup>, Nguyen Quoc Huy<sup>1</sup>, Than Thi Thanh Truc<sup>1</sup>, Than Van Huynh Duc<sup>1</sup>,  
Nguyen Bao Nghi<sup>1</sup>, Thai Minh Quang<sup>2</sup>, Trần Thị Vân Anh<sup>3</sup>, Nguyen Thi Le Thuy<sup>1</sup>,  
Nguyen Đăng Quan<sup>1</sup>, Phạm Thị Kim Tram<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

<sup>2</sup> Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup> University of Medicine and Pharmacy Ho Chi Minh City

## SUMMARY

Sponge is one of the most potential marine species in study of new bioactive compounds. In this study, we have collected, identified and extracted the compounds found in *Haliclona* sp. in Nha Trang - Khanh Hoa coastal area and initially investigated the antitumor activity of the obtained compounds. In the four segments - Hexane, EtOAc, n - BuOH and water, the n-butanol segment has toxic activity on liver cancer cell lines HepG2 (IC<sub>50</sub> = 8.46 µg/mL), blood cancer K562 (IC<sub>50</sub> = 8.83 µg/mL), bowel cancer CaCo2 (IC<sub>50</sub> = 4.17 µg/mL), lung cancer cell A549 (IC<sub>50</sub> = 10.73 µg/mL). Separation of compounds from n-butanol segment by Size exclusion chromatography obtained 17 sub-segments, in which C17 sub-segment has the best cytotoxic activity with IC<sub>50</sub> on four cancer cell lines 4.3 to 7.8 µg/mL. The results show that *Haliclona* sp. acquired in the coastal area of Nha Trang - Khanh Hoa has strong antitumor activity and a potential for developing antitumor drugs.

**Keywords:** Marine sponge, *Haliclona* sp., anticancer.

\* Author for correspondence: Tel: +84-772617222; Email: dtvp2010@gmail.com