

TỔNG QUAN: LIỆU PHÁP ĐIỀU TRỊ UNG THƯ CỦA PHỨC HỢP ALPHA-LACTALBUMIN VÀ ACID OLEIC

Trần Thị Phượng^{1,2}, Đào Trọng Tuấn³, Nguyễn Thị Bích Thu³, Trần Thị Hiền^{4,5}

¹Khoa Y học Phương Đông, Đại học Kyung Hee, Hàn Quốc;

²Khoa Dược, Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam;

³Khoa Dược, Trường Y Dược, Đại Học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam;

⁴Khoa Ung thư nhiễm trùng, Trường Y, Đại học Lund, Thụy Điển; ⁵Đại học Y Dược Thái Bình, Việt Nam

*Email: hienhup@gmail.com

(Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2023)

Tóm tắt

HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) là một phức hợp lactalbumin-lipid có tác dụng tiêu diệt các các dòng tế bào ung thư có nguồn gốc khác nhau như phổi, gan, não, bàng quang, thận... với tính chọn lọc cao và ít ảnh hưởng đến các tế bào khỏe mạnh. HAMLET được tình cờ phát hiện vào năm 1995, khi nhóm nghiên cứu của giáo sư Catharina Svanborg (Đại học Lund, Thụy Điển) tìm hiểu về phương pháp miễn dịch chống lại bệnh cúm virus mùa đông cho trẻ nhỏ ở Thụy Điển. Nhóm nghiên cứu phát hiện vi khuẩn và virus dưới kính hiển vi bị tiêu diệt chỉ sau vài phút nhỏ HAMLET vào mẫu. Sau đó, nhóm thử HAMLET trên các tế bào ung thư và nhận thấy, các tế bào ung thư bị tiêu diệt chỉ sau 3 giờ ủ với HAMLET. Thành phần protein của HAMLET là alpha-lactalbumin (α -lactalbumin) tạo phức hợp với acid oleic. Ở trạng thái tự nhiên alpha-lactalbumin hoạt động như một cơ chất đặc hiệu trong phức hợp tổng hợp lactose, một chức năng quan trọng cho sự sống của động vật có vú, tuy nhiên alpha-lactalbumin trong sữa được tạo phức với ion calci không có đặc tính tiêu diệt khối u. Đến năm 2000, cấu trúc nguyên lý hoạt động của HAMLET được tìm ra và Giáo sư Catharina Svanborg sau đó tiếp tục các nghiên cứu sâu về cơ chế phân tử tế bào, tiền lâm sàng và lâm sàng của HAMLET và alpha1-oleat (alpha1 là đoạn N-terminal có chứa 39 acid amin của HAMLET). HAMLET và alpha1-oleat đã được chứng minh tác dụng điều trị hiệu quả trên mô hình động vật ung thư bàng quang, ung thư não và ung thư ruột. Trong các nghiên cứu lâm sàng, HAMLET và alpha1-oleat có tác dụng tiêu diệt và giảm khối u rõ ràng trên ung thư bàng quang và ung thư da. Đồng thời, rất ít tác dụng phụ được tìm thấy trên các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng. Những kết quả nghiên cứu gần 30 năm của phức hợp alpha-lactalbumin trong điều trị ung thư đã được FDA phê duyệt ngày 3 tháng 7 năm 2023 cho thuốc ung thư mới.

Từ khóa: HAMLET, Alpha-lactalbumin, Acid oleic, Alpha1-oleat, Ung thư.

Summary

A Review: Alpha Lactalbumin-Oleic Acid Complex, a New Anti-Cancer Therapeutic Drug

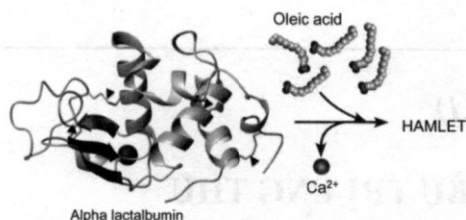
HAMLET is a complex consisting of partially unfolded α -lactalbumin and oleic acid, which kills tumor cells and immature cells but not normal differentiated cells. HAMLET was discovered in 1995 when the research group of Professor Catharina Svanborg (Lund University, Sweden) investigated the new therapeutic drug of immunity against the flu virus for small children in Sweden. The team also found that bacteria and viruses under the microscope were killed after a few minutes by HAMLET treatment. *In vitro* experiments showed that HAMLET displays broad anti-tumor activity. Subsequent therapeutic studies have supported these findings and suggested that HAMLET retains its tumoricidal activity *in vivo*. The component of HAMLET is alpha-lactalbumin (α -lactalbumin) which forms a complex with oleic acid. In 2000, the structure and principle of activity by HAMLET was discovered and Professor Catharina Svanborg subsequently continued studies on the cellular, pre-clinical and clinical mechanisms of HAMLET and alpha1-oleate (alpha1 is the N-terminal of HAMLET and has 39 amino acids). Topical HAMLET administration reduced lesion size in patients with skin papillomas and HAMLET treatment delayed tumor progression and increased survival in a rat glioblastoma xenograft model without evidence of cell death in healthy brain tissue. In patients with bladder cancer, local HAMLET instillations killed tumor cells but not healthy cells in surrounding tissues. In addition, in double blinded Phase I/II interventional clinical trial of non-muscle invasive bladder cancer, all primary end points of safety and efficacy of alpha1-oleate treatment are reached, as evaluated in an interim analysis. Intra-vesical instillations of alpha1-oleate trigger massive shedding of tumor cells and the tumor size is reduced but no drug-related side effects are detected (primary endpoints). Shed cells contain alpha1-oleate, treated tumors show evidence of apoptosis and the expression of cancer-related genes is inhibited (secondary endpoints). The results are especially encouraging for bladder cancer, where therapeutic failures and high recurrence rates create a great, unmet medical need. Alpha1-oleate was approved by the FDA on July 3rd, 2023 for a new cancer drug.

Keywords: HAMLET, Alpha-lactalbumin, Oleic acid, Alpha1-oleate, Cancer.

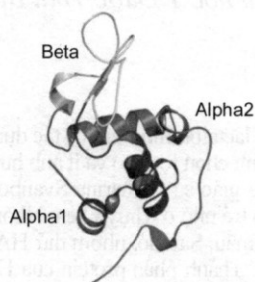
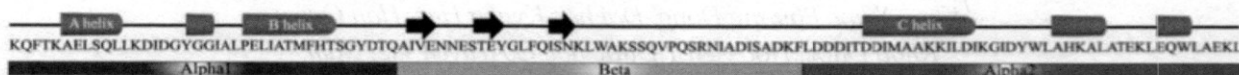
1. Cấu trúc hoá học của HAMLET

Alpha lactalbumin là một protein liên kết mạnh với Ca^{2+} , bao gồm 123 acid amin trong một chuỗi peptit duy nhất có 4 liên kết disulfua. Trọng lượng phân tử alpha lactalbumin là khoảng 14,2 kDa. Alpha-lactalbumin được mở ra một phần để cho phép giải phóng ion calci bên trong và thay thế bằng phân tử acid oleic, lúc này phức

hợp HAMLET được tạo ra [1]. Cấu trúc gập acid oleic bên trong alpha-lactalbumin là yếu tố cần thiết quyết định đến khả năng gây độc tế bào của HAMLET, vì các nghiên cứu về đột biến gen và cấu trúc đã chỉ ra rằng alpha-lactalbumin được mở ra hoàn toàn làm acid oleic bị tách ra khỏi cấu trúc phức hợp do đó không giữ được các đặc tính chức năng của HAMLET [2].



Hình 1. Cấu trúc hoá học của HAMLET [2].



Hình 2. Cấu trúc của α -lactalbumin và các trình tự acid amin của các đoạn alpha1, alpha2 và beta [3].

2. Cơ chế tác dụng của HAMLET trên tế bào ung thư

2.1. Tương tác với màng tế bào: HAMLET làm xáo trộn màng tế bào khối u và đẩy nhanh dòng ion trên màng tế bào dẫn đến kích hoạt các đường truyền tín hiệu xuôi dòng liên quan đến chu trình chết tế bào [4].

2.2. Kích hoạt dòng ion: HAMLET tương tác với bề mặt tế bào khối u và nhanh chóng kích hoạt dòng ion gồm Na^+ và Ca^{2+} và dòng ion K^+ dẫn đến cái chết của tế bào ung thư [4].

2.3. Tác động đến tín hiệu MAPK: HAMLET nhanh chóng kích hoạt dòng ion làm tế bào ung thư chết dẫn đến kích hoạt tín hiệu MAPK p38, một tín hiệu đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu diệt tế bào khối u [4].

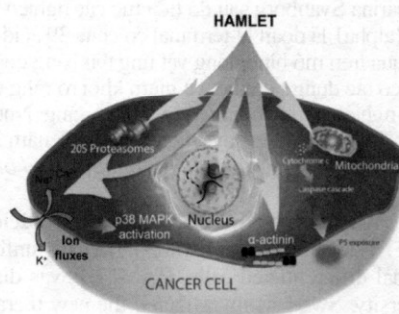
2.4. Tương tác với chromatin: HAMLET đục màng tế bào ung thư và xuyên qua màng tế bào chất, tích tụ trong nhân tế bào khối u. Hơn nữa, HAMLET gây ra sự gián đoạn của quá trình hình thành các nhiễm sắc thể ung thư bằng cách liên kết với các histone trong tế bào ung thư [5].

2.5. Ảnh hưởng đến proteasome: Chết theo chu trình của các tế bào ung thư thường không được kiểm soát và proteasome đóng vai trò giúp các tế bào ung thư chống lại các chu trình chết sinh học bình thường. HAMLET làm giảm hoạt động của proteasome 20S trong các tế bào khối u bằng cách phân hủy hoặc phân mảnh các đoạn proteasome 20S [6].

HAMLET gồm 3 phân đoạn: alpha1, alpha2 và beta. Alpha1 có chứa 39 acid amin và là N-terminal của HAMLET [2]. Alpha1 là một protein tổng hợp và dễ hòa tan trong các dung môi khác nhau. Các nghiên cứu chứng minh tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư của phức hợp alpha1-oleat tương đương HAMLET [2].

2.6. Tác dụng lên ty thể: HAMLET tương tác với ty thể gây sưng và khử cực màng ty thể tế bào ung thư. Ngoài ra, HAMLET gây ra sự giải phóng cytochrom c dẫn đến việc kích hoạt caspase và phosphoryl hóa phosphatidylserin từ bên trong ra ngoài của màng sinh chất tế bào khối u [7].

2.7. Hiệu ứng tế bào: HAMLET tương tác và can thiệp vào chức năng của alpha-actinin ở tế bào ung thư tạo điều kiện cho các tế bào ung thư tách rời khỏi khối u [8].



Hình 3. Cơ chế tác động của HAMLET với tế bào ung thư [9].

3. Các nghiên cứu tiền lâm sàng của HAMLET và alpha1-oleat

3.1. Các nghiên cứu tiền lâm sàng của HAMLET

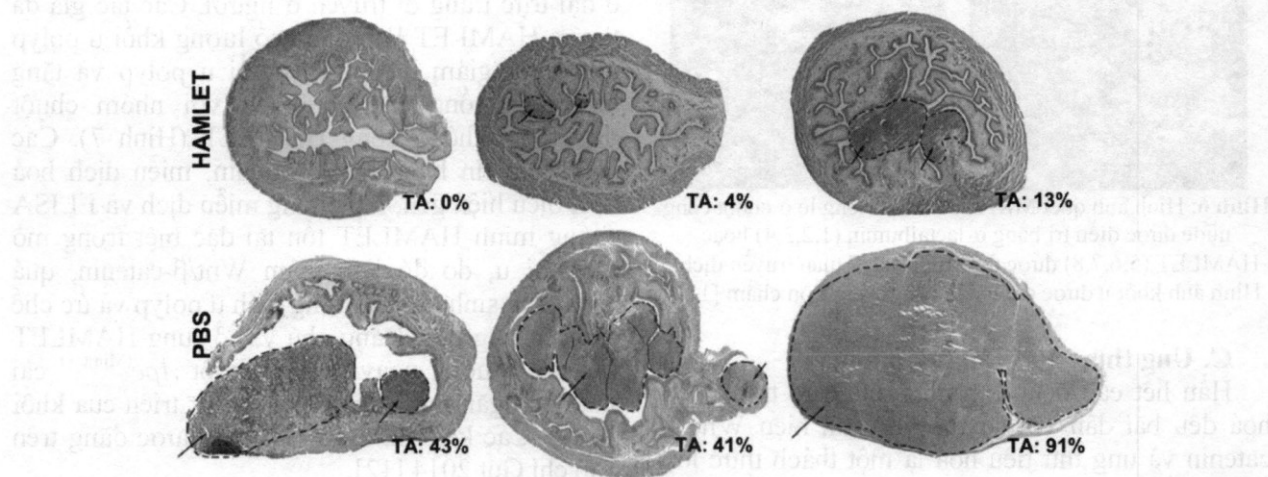
3.1.1. Ung thư bàng quang:

Nghiên cứu đầu tiên của HAMLET trên mô hình ung thư bàng quang chuột được đăng trên tạp chí Journal of urology năm 2010 [10].

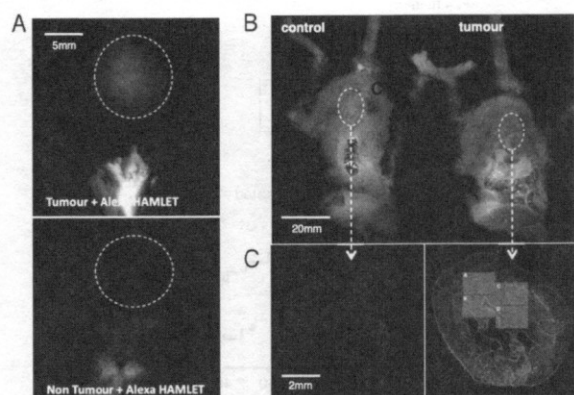
Khối u bàng quang được tạo ra bằng cách tiêm truyền tế bào ung thư biểu mô bàng quang MB49 vào bàng quang của chuột C57BL/6 được xử lý bằng poly-lysine. Các nhóm điều trị được tiêm truyền 5 liều HAMLET thông qua đường tiết niệu và nhóm chứng được truyền α -lactalbumin hoặc đệm phosphate. Kết quả chỉ ra cho thấy HAMLET làm giảm đáng kể kích thước khối u và làm chậm sự phát triển khối u so với nhóm chứng có thống kê (Hình 4). Ngoài ra,

HAMLET được đánh dấu bằng alexa đưa vào bàng quang chuột mang khối u và chuột khỏe mạnh, nhóm nghiên cứu nhận thấy, Alexa-

HAMLET được giữ lại hơn 24 giờ trong bàng quang của chuột mang khối u nhưng không tồn tại trong bàng quang chuột khỏe mạnh (Hình 5).



Hình 4. Sự khác biệt khối u giữa chuột được điều trị bằng HAMLET tại chỗ thông qua tiêm truyền bàng quang và nhóm đối chứng sử dụng muối PBS (TA: tumor area, vùng khối u) [10].



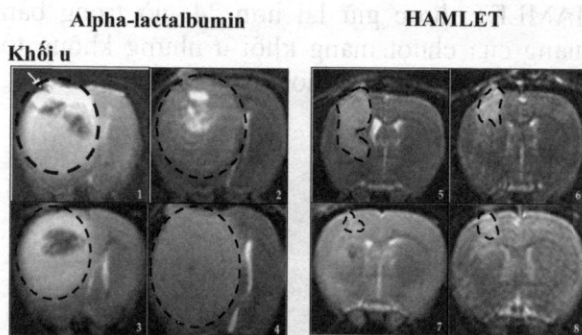
Hình 5. Sự hấp thu Alexa-HAMLET trong bàng quang có khối u và các bộ phận lân cận. **A.** Tín hiệu Alexa ở khu vực bàng quang được phát hiện bằng hình ảnh IVIS toàn thân (vòng tròn chấm) trong chuột mang khối u được tiêm truyền Alexa-HAMLET. Không có tín hiệu Alexa-HAMLET được phát hiện ở chuột khỏe mạnh không mang khối u bàng quang. Hình ảnh được chụp 2 ngày sau tiêm truyền Alexa-HAMLET. **B, C.** Hình ảnh toàn thân cho thấy Alexa-HAMLET trong bàng quang có chứa khối u và trong các phần mô của chuột mang khối u. Tuy nhiên, Alexa-HAMLET không được phát hiện ở bàng quang chuột khỏe mạnh [10].

Những kết quả này nhấn mạnh tác dụng ngăn ngừa khối u và ít ảnh hưởng đến các cơ quan khỏe mạnh khác của HAMLET.

3.1.2. Ung thư não:

Các khối u não ác tính là một thách thức lớn trong điều trị vì không có phương pháp điều trị chọn lọc hoặc hiệu quả. Nhóm nghiên cứu của

Svanborg chứng minh rằng việc sử dụng HAMLET giúp kéo dài thời gian sống sót trong mô hình xenograft u nguyên bào thần kinh đệm ở người (glioblastoma-GBM), bằng cách gây ra quá trình chết theo chu trình của tế bào khối u một cách chọn lọc. Các khối u GBM sinh thiết từ người được phân lập và cấy ghép vào não của chuột cống nude (Han: rnu/rnu Rowett, n = 20). Sau 7 ngày cấy ghép khối u, HAMLET được tiêm truyền vào não chuột cống bằng phương pháp phân phối tăng cường đối lưu nội sọ với tốc độ 8 $\mu\text{l/giờ}$ trong 24 giờ vào vùng khối u; và α -lactalbumin được sử dụng song song làm đối chứng. Kết quả cho thấy, sau 7 tuần, HAMLET làm giảm thể tích khối u nội sọ và trì hoãn sự xuất hiện của các triệu chứng áp lực, căng thẳng ở chuột mang khối u trong khi các con chuột được điều trị bằng α -lactalbumin đều xuất hiện các triệu chứng căng thẳng. Chụp cộng hưởng từ cho thấy sự khác biệt lớn về thể tích khối u (456 so với 63 mm^3) (Hình 6). HAMLET gây ra quá trình chết theo chu trình trong khối u nhưng không gây ra ở mô não nguyên vẹn liền kề và không quan sát thấy tác dụng phụ độc hại nào của HAMLET. Kết quả nhấn mạnh HAMLET là một thuốc tiềm năng mới trong liệu pháp điều trị ung thư não GBM và được đăng trên tạp chí Cancer research năm 2004 [11].

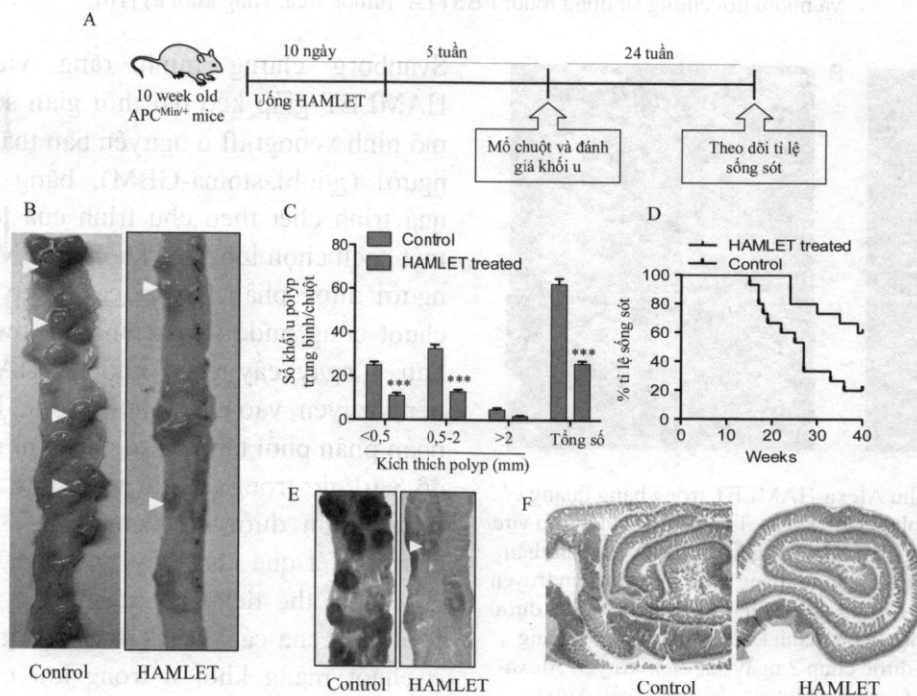


Hình 6. Hình ảnh quét MRI các khối u riêng lẻ ở chuột cống nude được điều trị bằng α -lactalbumin (1,2,3,4) hoặc HAMLET (5,6,7,8) được thực hiện sau 7 tuần truyền dịch. Hình ảnh khối u được đánh dấu bằng vòng tròn chấm [11].

C. Ung thư trực tràng tiêu hoá

Hầu hết các bệnh ung thư ruột/trực tràng tiêu hoá đều bắt đầu với sự thay đổi tín hiệu Wnt/ β -catenin và ung thư tiêu hoá là một thách thức lớn trong điều trị hiện nay. Sử dụng HAMLET đường

uống trong 10 ngày liên tục với chuột đột biến gen $Apc^{(Min)/(+)}$ (*Adenomatous polyposis coli* (*Apc*), chuột mang đột biến gen *Apc* chứa khối u polyp ở ruột), chủng chuột mang đột biến gen ung thư *Apc* ở đại trực tràng di truyền ở người. Các tác giả đã tìm ra HAMLET làm giảm số lượng khối u polyp trên ruột, giảm kích thích khối u polyp và tăng thời gian sống của chuột so với nhóm chuột $Apc^{(Min)/(+)}$ không uống HAMLET (Hình 7). Các phân tích tín hiệu Wnt/ β -catenin, miễn dịch hoá học, biểu hiện gen, mô phỏng miễn dịch và ELISA chứng minh HAMLET tồn tại đặc biệt trong mô có khối u, do đó làm giảm Wnt/ β -catenin, quá trình tăng sinh khối u, bong tách u polyp và ức chế các gen ung thư. Đáng chú ý, bổ sung HAMLET vào nước uống ngay từ khi chuột $Apc^{(Min)/(+)}$ cai sữa còn ngăn ngừa đáng kể sự phát triển của khối u ruột. Các kết quả khoa học này được đăng trên Tạp chí Gut 2014 [12].

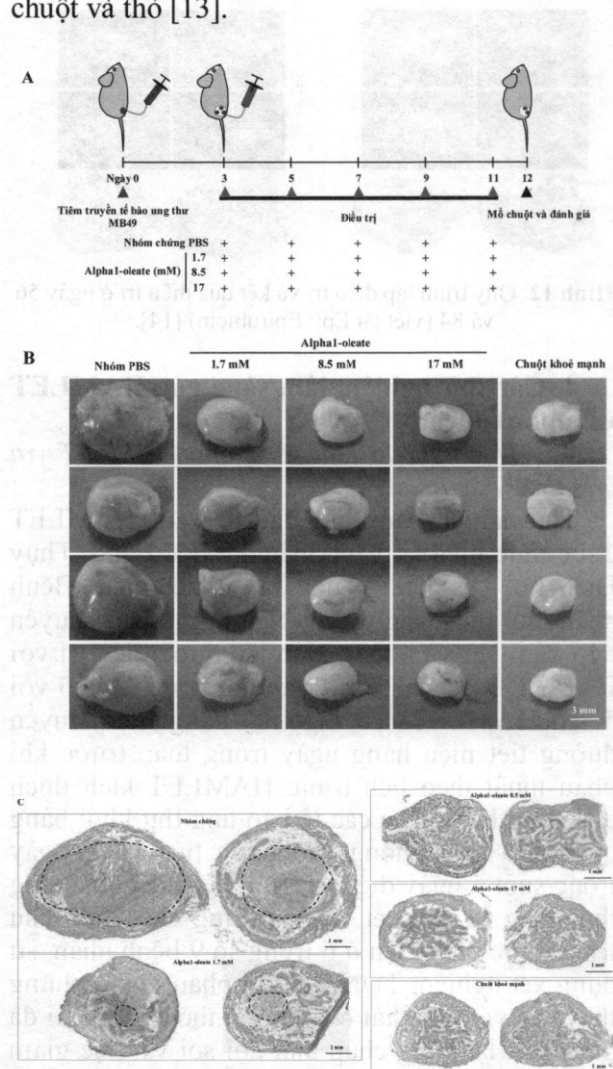


Hình 7. HAMLET làm giảm sự tiến triển của khối u đường ruột và tăng khả năng sống sót của chuột $Apc^{(Min)/(+)}$. **A.** Chuột được điều trị bằng đường uống với 10 mg/ngày HAMLET, hai lần mỗi ngày trong 10 ngày. Chuột được mổ sau 5 tuần điều trị với HAMLET để đếm và đánh giá khối u polyp ở ruột. Một nhóm được tiếp tục theo dõi để đánh giá tỉ lệ sống sót của chuột. **B.** Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi đoạn ruột non cho thấy khối u (đầu mũi tên) ở chuột được điều trị bằng HAMLET và chuột đối chứng (control). **C.** Định lượng hiệu quả điều trị đối với số lượng và kích thước khối u. Tải trọng khối u đường ruột giảm đáng kể ($p < 0,0001$ đối với tổng số lượng khối u) đã được quan sát thấy ở chuột được điều trị bằng HAMLET ($n=10$) so với chuột được điều trị bằng giả dược ($n=10$) (phân tích hai chiều của thử nghiệm phương sai). Các thanh lỗi đại diện cho $\pm$ SEM. **D.** phân tích tỷ lệ sống chuột theo thời gian. Chuột được điều trị bằng HAMLET ($n=15$) cho thấy khả năng sống sót được cải thiện so với chuột được điều trị giả dược ($n=15$). $p = 0,0103$. **E.** Nhuộm xanh methylen toàn bộ các đoạn ruột (đầu mũi tên, khối u). **F.** Các phần cuộn Swiss-roll trong ruột được nhuộm bằng Haematoxylin và eosin cho thấy các polyp nhỏ hơn và ít hơn ở chuột $Apc^{(Min)/(+)}$ được điều trị bằng HAMLET so với ở nhóm chứng [12].

3.2. Các nghiên cứu tiền lâm sàng của α 1-oleat

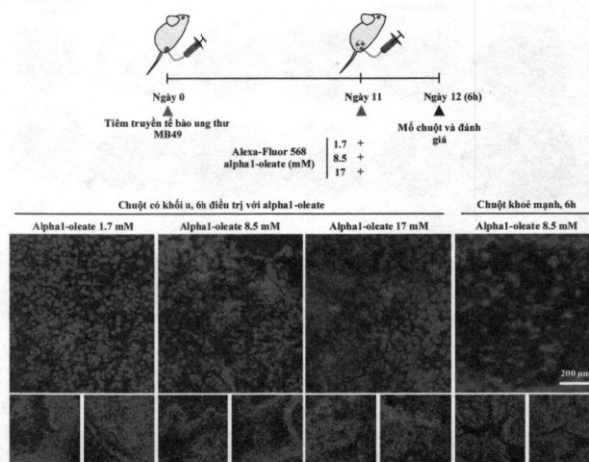
3.2.1. Tác dụng hạn chế và ngăn ngừa khối u bằng quang tăng lên theo liều điều trị của α 1-oleat:

Các thuốc hoá trị liệu liều cao được sử dụng để chống lại sự lây lan của các khối u gây ra nhiều tác dụng phụ nghiêm trọng cho bệnh nhân bởi độc tính cao. Nghiên cứu năm 2020 trên tạp chí International journal of cancer của TS Hiền và cs. cho thấy phức hợp alpha1-oleat với nồng độ 1,7 mM đến 17 mM (liều 17 mM là liều tối đa của alpha1-oleat do độ tan) trên mô hình ung thư bàng quang chuột làm giảm kích thích khối u, trọng lượng bàng quang và kích thước khối u theo liều sử dụng. Ở liều 8,5 mM và liều 17 mM, không phát hiện thấy khối u còn tồn tại trong bàng quang (Hình 8). Đáng chú ý, độc tính đối với mô khoẻ mạnh không được phát hiện kể cả đối với liều cao nhất của alpha1-oleat 17 mM ở chuột và thỏ [13].



Hình 8. Mô hình ung thư bàng quang chuột và sự khác biệt khối u giữa chuột được điều trị bằng alpha1-oleat tại chỗ thông qua tiêm truyền bàng quang và nhóm đối chứng sử dụng muối PBS [13].

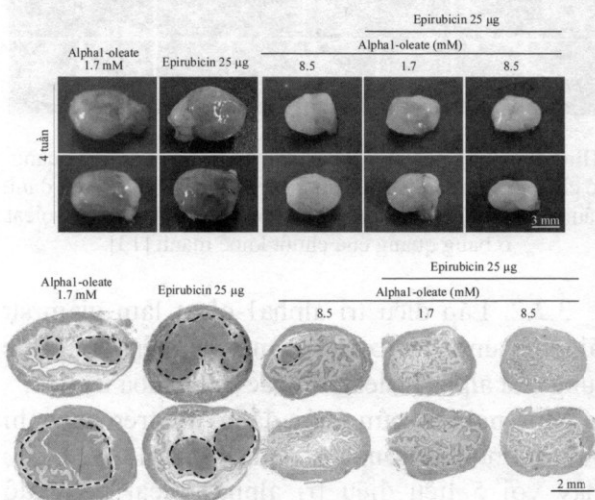
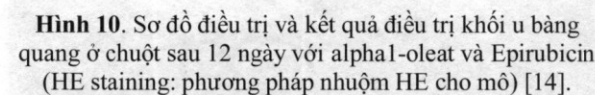
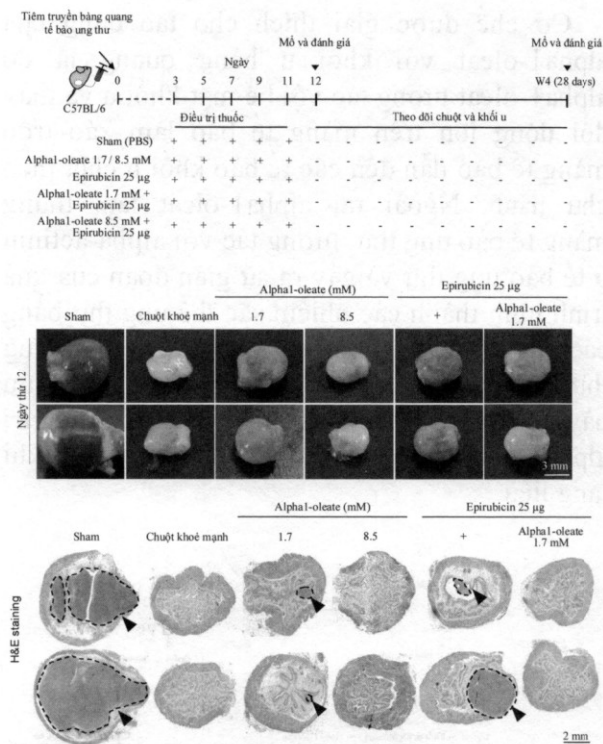
Cơ chế được giải thích cho tác dụng của alpha1-oleat với khối u bàng quang là do alpha1-oleat tương tác với bề mặt khối u và thay đổi dòng ion trên màng tế bào làm xáo trộn màng tế bào dẫn đến các tế bào khối u chết theo chu trình. Ngoài ra, alpha1-oleat làm thủng màng tế bào ung thư, tương tác với alpha-actinin ở tế bào ung thư và gây ra sự gián đoạn của quá trình hình thành các nhiễm sắc thể ung thư bằng cách liên kết với các histone dẫn đến tế bào ung thư tách rời khỏi khối u. Kết quả của nghiên cứu này chứng minh tác dụng tăng theo liều điều trị alpha1-oleat và gây ra độc tính của thuốc khi tăng liều.



Hình 9. Alpha1-oleat được phát hiện trong các bàng quang có chứa khối u sau 6 giờ tiêm truyền alpha1-oleat được đánh dấu bằng alexa ở ngày thứ 11. Không phát hiện alpha1-oleat ở bàng quang của chuột khoẻ mạnh [13].

3.2.2. Lắp điều trị alpha1-oleat làm giảm sự tái phát ung thư bàng quang và hiệp đồng tác dụng của alpha1-oleat với các thuốc hoá trị liệu:

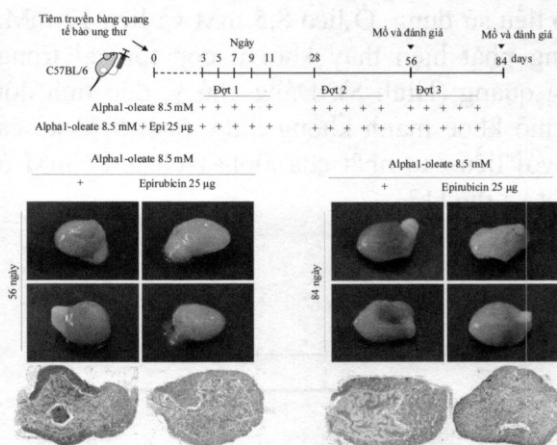
Một nghiên cứu mới đăng tải trên tạp chí International journal of cancer năm 2023 cho thấy với 5 liều điều trị alpha1-oleat nồng độ 1,7 mM từ ngày 3 đến ngày 11 giúp chuột mang khối u bàng quang có thể sống đến 4 tuần và liều 8,5 mM của alpha1-oleat có thể giúp chuột mang khối u sống đến 8 tuần (nhóm chứng PBS mang khối u không sống quá 16 ngày nên không thể theo dõi dài như các nhóm điều trị). Ngoài ra, nhóm nghiên cứu chứng minh được hiệp đồng tác dụng của alpha1-oleat với thuốc hoá trị liệu Mitomycin và Epirubicin liều thấp ở chu kỳ 1 của đợt điều trị (mỗi chu kỳ 5 liều điều trị) (Hình 10) [14].



Hình 11. Khối u bàng quang ở ngày thứ 28 [14]

Ở ngày thứ 28, nhóm sử dụng alpha1-oleat 1,7 mM và thuốc Epirubicin có khối u tái phát trở lại (Hình 11). Tuy nhiên với nhóm phối hợp giữa 2 thuốc, chưa quan sát thấy khối u tái phát trở lại (Hình 11). Với liều 8,5 mM, một khối u nhỏ trong các bàng quang đã được tìm thấy. Dựa trên các nghiên cứu về độc tính và tăng liều ở trên, TS Hien Tran và cs. đã tiến hành điều trị lặp thêm 2 chu kì (chu kì 1: ngày 3-11, chu kì 2: ngày 28-36,

chu kì 3: ngày 56-64, mỗi chu kì 5 liều điều trị). Một kết quả đáng ngạc nhiên cho thấy, các khối u gần như hoàn toàn biến mất và không phát hiện được khối u tái phát ở các nhóm điều trị lặp (Hình 12). Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng không tìm thấy bằng chứng về độc tính trên chuột sử dụng alpha1-oleat 8,5 mM và phối hợp với thuốc hoá trị liệu. Đây là một cơ sở khoa học quan trọng cho thử nghiệm lâm sàng lặp điều trị ở bệnh nhân để giảm nguy cơ tái phát khối u [14].



Hình 12. Quy trình lập điều trị và kết quả điều trị ở ngày 56 và 84 (viết tắt Epi: Epirubicin) [14].

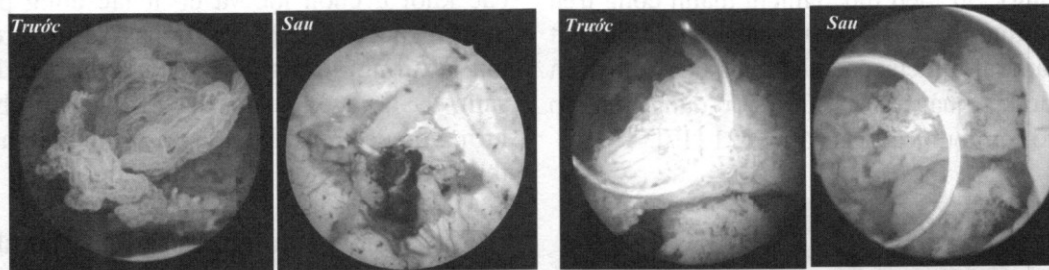
4. Các thử nghiệm lâm sàng của HAMLET và alpha1-oleat

4.1. Thử nghiệm lâm sàng của HAMLET với ung thư bàng quang

Thử nghiệm lâm sàng đầu tiên của HAMLET được thực hiện tại bệnh viện đại học Lund, Thụy Điển bởi các bác sĩ ung bướu tiết niệu. Bệnh nhân ung thư bàng quang biểu mô tế bào chuyển tiếp xâm lấn và không xâm lấn được điều trị với HAMLET. 9 bệnh nhân được điều trị tại chỗ với 5 lần HAMLET (25 mg/mL) bằng tiêm truyền đường tiết niệu hàng ngày trong tuần trước khi phẫu thuật theo lịch trình. HAMLET kích thích quá trình bong tróc các tế bào ung thư khỏi bàng quang và giải phóng vào nước tiểu hàng ngày trong suốt 5 ngày điều trị. Hầu hết các tế bào ung thư bong ra đã chết và phản ứng chết theo chu trình được phát hiện ở 6 trong số 9 bệnh nhân, sử dụng xét nghiệm TUNEL. Khi phẫu thuật, những thay đổi về hình thái của khối u thoát ra ngoài đã được ghi lại bằng chụp ảnh nội soi và việc giảm kích thước khối u hoặc thay đổi đặc tính khối u đã được phát hiện ở 8 trên 9 bệnh nhân. (Hình 13) Nhuộm TUNEL dương tính trong sinh thiết từ khối u nhưng với mô khỏe mạnh lân cận khối u cho kết quả âm tính với xét nghiệm TUNEL.

cho thấy bằng chứng về quá trình chết theo chu trình và không có phản ứng độc hại. Kết quả nhấn mạnh HAMLET có tác dụng trực tiếp và chọn lọc trên mô ung thư bằng quang và việc sử

dụng HAMLET tại chỗ có thể có giá trị trong điều trị ung thư bằng quang. Các kết quả được đăng trên tạp chí International Journal of Cancer năm 2007 [15].



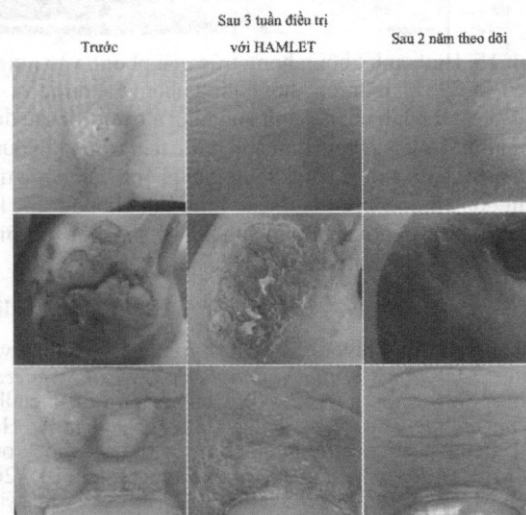
Hình 13. Hình ảnh trước và sau của khối u bằng quang sau khi được điều trị với 5 liều HAMLET ở bệnh nhân [15].

4.2. Thử nghiệm lâm sàng của HAMLET với ung thư da

40 bệnh nhân bị u nhú ở da kháng với thuốc điều trị thông thường được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm: nhóm điều trị với HAMLET tại chỗ và nhóm giả được dùng nước muối hàng ngày trong ba tuần và sự thay đổi trong khối lượng của từng khối u tổn thương đã được ghi lại. Sau giai đoạn đầu tiên của nghiên cứu này, 34 bệnh nhân tiếp tục tham gia vào giai đoạn thứ hai, và tiếp tục được điều trị thêm một đợt 3 tuần và theo dõi trong 2 năm. Kết quả giai đoạn đầu của nghiên cứu, khối lượng khối u đã giảm từ 75% trở lên ở tất cả 20 bệnh nhân trong nhóm HAMLET. Số khối u nhú ở nhóm giả được là 88, trong khi số u nhú quan sát được ở nhóm sử dụng HAMLET là 15 và chỉ tồn tại ở 3 bệnh nhân nhóm HAMLET.

Sau khi các bệnh nhân trong nhóm giả được ban đầu được điều trị bằng HAMLET trong giai đoạn thứ hai của nghiên cứu, các nhà khoa học đã quan sát thấy mức giảm trung bình 82% về thể tích khối u. Sau hai năm theo dõi sau khi kết thúc giai đoạn thứ hai, tất cả các khối u đã được giải quyết hoàn toàn ở 83% bệnh nhân được điều trị bằng HAMLET (Hình 14) và thời gian để tiêu diệt khối u ngắn hơn ở nhóm điều trị HAMLET 2 lần (đợt 1 và đợt 2) so với những bệnh nhân ban đầu ở nhóm giả được sau đó đợt 2 dùng HAMLET ($p < 0,01$). Không có phản ứng bất lợi nào được báo cáo và không có sự khác biệt về kết quả điều trị giữa bệnh nhân có khả năng miễn dịch và bệnh nhân suy giảm miễn dịch. Kết quả được đăng trên tạp chí The New England journal of medicine năm 2004 (đây là tạp chí y khoa uy tín nhất thế giới) [16]. Nghiên cứu phân tử tế bào của phức hợp alpha-lactalbumin-oleat cho thấy HAMLET tiêu diệt tế bào ung thư và ung thư ác tính mang kiểu gen p53 thuận chủng, không có

p53 hay đột biến p53. Gen E6 và E7 của virus HPV typ 16, typ 18 đã được chứng minh là gen giúp các tế bào bị nhiễm virus HPV bất tử bằng cách vô hiệu hóa p53. Tuy nhiên, cơ chế này của HPV đã bị phức hợp alpha lac-acid oleic vô hiệu hoá hoàn toàn dẫn đến bị tiêu diệt bởi phức hợp alpha-lac acid oleic.

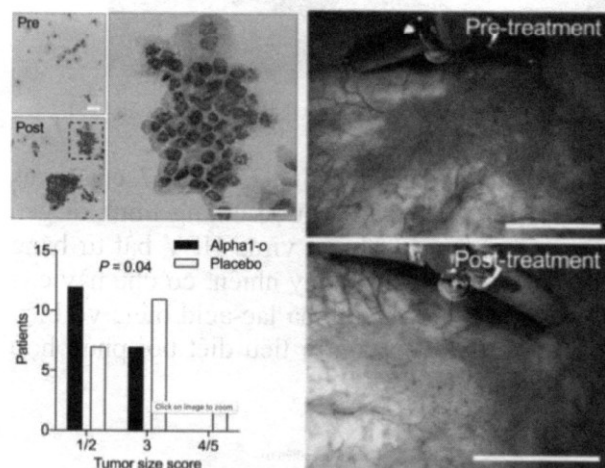


Hình 14. Hình ảnh trước và sau các u nhú trên da của 3 bệnh nhân sau khi được điều trị HAMLET tại chỗ [16].

4.3. Thử nghiệm lâm sàng của alpha1-oleat với ung thư bàng quang

Năm 2019, 40 bệnh nhân bị ung thư bàng quang cũng đã tham gia vào các thử nghiệm lâm sàng với alpha1-oleat ở Prague, Cộng hòa Séc. Kết quả của giai đoạn đầu thử nghiệm cho thấy alpha1-oleat làm bong tróc các tế bào ung thư và giải phóng vào nước tiểu, làm giảm đáng kể kích thước khối u so với trước khi điều trị và so với nhóm giả được không dùng alpha1-oleat (Hình 15). Nhóm nghiên cứu cũng không tìm được bằng chứng về phản ứng

độc hại trong các mẫu mô khỏe mạnh từ những bệnh nhân được điều trị bằng alpha1-oleat, được xác định bằng mô bệnh học hoặc nhuộm TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Sự kiện thử nghiệm thành công trên bệnh nhân ung thư bàng quang ở Praha đã thu hút sự quan tâm rất lớn của các nhà khoa học và truyền thông. Các kết quả nghiên cứu được đăng trên tạp chí Nature communications năm 2021 [17].



Hình 15. Hình ảnh khối u bong tróc giải phóng vào nước tiểu và tỉ lệ kích thước khối u giữa nhóm giả được và alpha1-oleat ở bệnh nhân. Hình ảnh khối u trước và sau điều trị với alpha1-oleat (Pre: Hình ảnh nước tiểu trước khi dùng thuốc, post: hình ảnh tế bào khối u giải phóng vào nước tiểu sau khi dùng thuốc; pre-treatment: hình ảnh khối u trước khi điều trị, post-treatment: hình ảnh khối u sau điều trị với alpha-oleat). [17].

5. Nhận xét

Các bằng chứng khoa học phân tử tế bào, tiền lâm sàng và lâm sàng mạnh mẽ chứng minh HAMLET và alpha1-oleat có khả năng tiêu diệt các khối u chọn lọc và có ít tác dụng phụ. Tác dụng của HAMLET và alpha1-oleat được đánh giá là tương đương trên phân tử tế bào, tiền lâm sàng và lâm sàng. Do HAMLET hạn chế về số lượng nên các nhà khoa học sử dụng alpha1-oleat thay thế và đang tiếp tục được thực hiện trên các bệnh ung thư khác.

Các nghiên cứu trên các mẫu bệnh nhân ung thư bàng quang, ung thư da sau khi điều trị với HAMLET hoặc alpha-oleat cho thấy, HAMLET và alpha1-oleat tương tác với bề mặt khối u và thay đổi dòng ion trên màng tế bào làm xáo trộn màng tế bào dẫn đến các tế bào khối u chết theo chu trình. Đồng thời, HAMLET/alpha1-oleat làm thủng màng tế bào ung thư, tương tác với alpha-actinin ở tế bào ung thư và gây ra sự gián đoạn của quá trình hình thành các nhiễm sắc thể ung thư bằng cách liên kết với các histone dẫn đến tế bào ung thư tách rời khỏi khối u. Cơ chế này đặc biệt được quan sát rất nhanh và rõ ràng ở bệnh nhân ung thư bàng quang sau khi được tiêm truyền thuốc. Các nghiên cứu tiền lâm sàng về lập điều trị để giảm nguy cơ tái phát khối u và thuốc ít gây tác dụng phụ/độc tính trên bệnh nhân có ý nghĩa quan trọng trong điều trị bệnh nhân tái phát ung thư.

Tài liệu tham khảo

- Håkansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H., Svanborg C. (1995), Apoptosis induced by a human milk protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 8064-8068.
- Svensson M., Håkansson A., Mossberg A. K., Linse S., Svanborg C. (2000), Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4221-4226.
- Nadeem A., Ho J.C.S., Tran T.H., Paul S., Granqvist V., Despretz N., Svanborg C. (2019), Beta-sheet-specific interactions with heat shock proteins define a mechanism of delayed tumor cell death in response to HAMLET. *Journal of Molecular Biology*, 431(14), 2612-2627.
- Storm P., Kjaer Klausen T., Trulsson M., Ho CS J., Dosnon M., Westergren T., Svanborg C. (2013), A unifying mechanism for cancer cell death through ion channel activation by HAMLET. *PLoS ONE*, 8(3), e58578.
- Düringer C., Hamiche A., Gustafsson L., Kimura H., Svanborg C. (2003), HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42131-42135.
- Gustafsson L., Aits S., Önerfjord P., Trulsson M., Storm P., Svanborg C. (2009), Changes in proteasome structure and function caused by HAMLET in tumor cells. *PLoS ONE*, 4(4), e5229.
- Hallgren O., Gustafsson L., Irjala H., Selivanova G., Orrenius S., Svanborg C. (2006), HAMLET triggers apoptosis but tumor cell death is independent of caspases, Bcl-2 and p53. *Apoptosis*, 11(2), 221-233.
- Trulsson M., Yu H., Gisselsson L., Chao Y., Urbano A., Aits S., Svanborg C. (2011), HAMLET binding to α -actinin facilitates tumor cell detachment. *PLoS ONE*, 6(3), e17179.
- Ho J.C.S., Nadeem A., Svanborg C. (2017), HAMLET - A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 454-458.
- Mossberg A.-K., Hou Y., Svensson M., Holmqvist B., Svanborg C. (2010), HAMLET treatment delays bladder cancer development. *Journal of Urology*, 183(4), 1590-1597.
- Fischer W., Gustafsson L., Mossberg A. K., Gronli J., Mork S., Bjerkvig R., Svanborg C. (2004), Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Research*, 64(6), 2105-2112.
- Puthia M., Storm P., Nadeem A., Hsiung S., Svanborg C. (2014), Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumour cells). *Gut*, 63(1), 131-142.
- Hien T. T., Ambite I., Butler D., Wan M. L. Y., Tran T. H., Höglund U., Svanborg C. (2020), Bladder cancer therapy without toxicity—A dose-escalation study of alpha1-oleate. *International Journal of Cancer*, 147(9), 2479-2492.
- Hien T. T., Ambite I., Wan M. L. Y., Cavallera M., Esmaceli P., Chaudhuri A., Svanborg C. (2023), Long-term prevention of bladder cancer progression by alpha1-oleate alone or in combination with chemotherapy. *International Journal of Cancer*.
- Mossberg A.-K., Wullt B., Gustafsson L., Månsson W., Ljunggren E., Svanborg C. (2007), Bladder cancers respond to intravesical instillation of (HAMLET human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *International Journal of*

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 11 - 16)

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ HỢP CHẤT CỦA CÂY RAU MƯƠNG

Cao Lý Tấn Thông¹, Nguyễn Thành Triết¹, Nguyễn Diệp Xuân Kỳ²,
Hà Quang Thanh³, Nguyễn Thị Ngọc Đan⁴, Chung Thị Mỹ Duyên^{1,*}

¹Khoa Y học Cổ truyền, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh;

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

³Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh;

⁴Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

*Email:duyenchung.86@gmail.com

(Nhận bài ngày 14 tháng 3 năm 2023)

Tóm tắt

Tám hợp chất gồm β -sitosterol - stigmasterol trong một hỗn hợp (1), acid ursolic (2), acid oleanolic (3), lupeyl myristat (4), urs-12-en-2 α ,3 β ,7 β ,16 α -tetraol (5), daucosterol (6), luteolin (7) đã được phân lập từ các phân đoạn *n*-hexan và ethyl acetat của cây rau muống (*Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Ravens). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phổ khối lượng (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Bài báo lần đầu tiên công bố các hợp chất 4 và 5 được phân lập từ *L. octovalvis*.

Từ khóa: Rau muống, *Ludwigia octovalvis*, Acid ursolic, Acid oleanolic, Lupeyl myristat, Urs-12-en-2 α ,3 β ,7 β ,16 α -tetraol, Luteolin.

Summary

Isolation and Identification of some Compounds from *Ludwigia octovalvis*

Eight compounds were isolated from the *n*-hexane and ethyl acetate fractions of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Ravens including a mixture of β -sitosterol - stigmasterol (1), ursolic acid (2), oleanolic acid (3), lupeyl myristate (4), urs-12-en-2 α ,3 β ,7 β ,16 α -tetraol (5), daucosterol (6), and luteolin (7). The structures of these compounds were elucidated by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Compounds 4 and 5 were isolated from *L. octovalvis* for the first time.

Keywords: *Ludwigia octovalvis*, Ursolic acid, Oleanolic acid, Lupeyl myristat, Urs-12-en-2 α ,3 β ,7 β ,16 α -tetraol, Luteolin.

1. Đặt vấn đề

Rau muống (*Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Ravens), họ Onagraceae, hay còn gọi là cây ớt ruộng, là loài cây thân thảo, có rất nhiều ở các vùng đất ẩm, cây mọc ở khắp nơi từ vùng đồng bằng tới trung du miền núi. Ở cả 3 miền Bắc, Trung và Nam đều có loài cây này. Theo kinh nghiệm dân gian, bộ phận dùng làm thuốc của cây rau muống là toàn cây gồm lá và thân cây. Toàn cây được dùng chữa tiêu chảy, kiết lỵ dưới dạng bột uống với sữa. Nước sắc rau muống chữa đầy hơi chướng bụng, giun đũa. Ở vùng Jashpur (Ấn Độ), nước sắc rễ rau muống được dùng chữa sốt. Ở Malaysia, rau muống có chất nhầy, giã nát đắp ngoài chữa đau đầu, sưng hạch ở cổ, viêm tinh hoàn. Ở Trung Quốc, rau muống được dùng chữa cảm sốt, ho, đau bụng, lở loét miệng, mụn nhọt. Ở Đài Loan, lá hoặc toàn cây rau muống giã nát dùng làm thuốc đắp chữa vết thương. Ở châu Phi, rau muống dùng chữa thấp khớp [1].

Yan J. và Yang X. W. đã phân lập được 13 hợp chất từ *L. octovalvis* bao gồm β -sitosterol, acid oleanolic, acid 2 α -hydroxy ursolic, acid tormentic, daucosterol, maltol, luteolin, quercetin, apigenin, methyl brevifolincarboxylat, acid gallic, 3,4,8,9,10-pentahydroxydibenzo[*b,d*]pyran-6-on, và acid ellagic [2]. Hiện nay, ở nước ta vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của rau muống. Với mong muốn tìm hiểu thành phần hóa học của loài thực vật này, đề tài đã thực hiện việc phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất từ cây rau muống ở Việt Nam. Bài báo này công bố về kết quả phân lập 8 hợp chất trong cây rau muống.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Rau muống (*L. octovalvis*) được thu hái ở Vĩnh Long vào tháng 5/2021. Mẫu dược liệu được định danh bởi ThS. Ngô Thị Minh Huyền, Bộ môn Tài nguyên Dược liệu - Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu tiêu