



DOI:10.22144/ctujos.2024.359

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ TẾ BÀO UNG THƯ *in vitro* CỦA VI KHUẨN NỘI SINH *Kosakonia* sp. ZO-Rh4

Tạ Lâm Tài<sup>1</sup>, Trần Chí Linh<sup>2</sup>, Dương Minh Tuệ<sup>3</sup>, Kaeko Kamei<sup>3</sup> và Đái Thị Xuân Trang<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Y, trường Đại học Nam Cần Thơ

<sup>3</sup>Học viện Công nghệ Kyoto

<sup>4</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dtxtrang@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 03/05/2024

Sửa bài (Revised): 27/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 04/08/2024

**Title:** Studying the *in vitro* anticancer properties of *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 endophytic bacterial

**Author(s):** Tạ Lâm Tài<sup>1</sup>, Trần Chí Linh<sup>2</sup>, Dương Minh Tuệ<sup>3</sup>, Kaeko Kamei<sup>3</sup> and Đái Thị Xuân Trang<sup>4\*</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1,4</sup>Can Tho University;

<sup>2</sup>Nam Can Tho Univeristy; <sup>3</sup>Kyoto Insitute of Technology

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng ức chế tế bào ung thư của dịch ngoại bào và cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 trên các dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư đại trực tràng (HT29) và ung thư gan (HepG2, HUH7); dòng tế bào thận bình thường Hek 2.9.3 được sử dụng để đối chiếu. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có kết quả gây độc mạnh hơn dịch ngoại bào từ 1,37 đến 1,7 lần. Mẫu thử gây độc mạnh nhất trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng (HT29) với IC<sub>50</sub> được ghi nhận là 14,86 µg/mL đối với cao chiết và 23,55 µg/mL đối với dịch ngoại bào. Kết quả trong nghiên cứu này bước đầu mở ra một hướng mới cho nghiên cứu nguồn hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học từ vi khuẩn nội sinh thực vật.

**Từ khóa:** Cao chiết, dịch ngoại bào, NCI Hoa Kỳ, *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, tế bào ung thư

### ABSTRACT

The study was conducted to determine the anticancer cell activity of cell-free supernatant and ethyl acetate extract from endophytic bacteria *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 on cervical cancer (HeLa), colorectal cancer (HT29) and liver cancer (HepG2, HUH7) cell lines; the normal kidney cell line Hek 2.9.3 was used as a control. The results showed that the extract from the cell-free supernatant of *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 had a stronger toxicity than the cell-free supernatant by 1,37 to 1,7 times. The sample was more toxic to the colorectal cancer cell line (HT29) with IC<sub>50</sub> recorded as 14,86 µg/mL for the extract and 23,55 µg/mL for the cell-free supernatant. This study's initial results opened a new direction for research on natural sources of biologically active compounds from plant endophytic bacteria.

**Keywords:** Extract, extraceuller fuiled, USA NCI, *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, cancer cell

## 1. GIỚI THIỆU

Ung thư là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người (Paolo et al., 2001). Hiện nay, tỷ lệ người bị mắc ung thư ngày càng gia tăng và trẻ hóa, trở thành một trong những vấn đề sức khỏe nghiêm trọng hàng đầu trên toàn thế giới với hơn 19 triệu ca mắc mới và khoảng 10 triệu ca tử vong năm 2020. Theo thống kê của GLOBOCAN, trên 185 quốc gia và vùng lãnh thổ, số ca mắc mới được dự đoán tăng gấp 1,5 lần trong 20 năm tới (Huong et al., 2020; Thúy et al., 2021). Tế bào ung thư là tế bào tăng sinh liên tục và không có sự kiểm soát tự nhiên. Sự phát sinh ung thư có thể được gây ra bởi đột biến di truyền hoặc do môi trường tác động, dẫn đến sự ức chế phản ứng của tế bào đối với các cơ chế kiểm soát sự tăng trưởng bình thường và làm phát triển nhanh chóng các dòng tế bào tạo ra khối u (Langie et al., 2015). Điều trị ung thư liên quan đến việc gây ra apoptosis và ức chế tăng sinh tế bào khối u (Kuno et al., 2012). Các tế bào ung thư biểu hiện sáu thay đổi quan trọng trong sinh lý của chúng: khả năng tự cung cấp các tín hiệu tăng trưởng, không nhạy cảm với các tín hiệu ức chế tăng trưởng, khả năng kháng apoptosis, khả năng tăng sinh không giới hạn, hình thành mạch kéo dài và di căn. Một trong những phương pháp điều trị ung thư hiện có là hóa trị, thường là lựa chọn điều trị chính. Tuy nhiên, hóa trị có thể dẫn đến tổn thương các tế bào và mô khỏe mạnh hoặc phát triển tình trạng kháng thuốc (Raguz et al., 2008; Hanahan et al., 2011). Liệu pháp gene cũng đang được các nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm, các nhà khoa học dự kiến trong tương lai liệu pháp gene sẽ là một trong những giải pháp tích cực. Các liệu pháp này còn được gọi là liệu pháp gene therapy và thường được sử dụng trong các trường hợp đặc hiệu, điển hình là *in vivo* gene therapy, *ex vivo* gene therapy và oncolytic viruses. Những nhược điểm của việc dùng liệu pháp gene có thể gây ra cũng đáng quan ngại, một số nhược điểm đang được nghiên cứu khắc phục là đột biến DNA và phản ứng miễn dịch. Mặc dù gene therapy có tiềm năng lớn trong điều trị ung thư, nhưng nó không phải là một phương pháp hoàn hảo và cần được nghiên cứu và kiểm soát cẩn thận (Trúc, 2013; Cancer Information and Support Network, [CISN], 2013, National Heart, Lung and Institute, [NHI], 2022).

Ở các quốc gia có khí hậu nhiệt đới, đa dạng sinh học mang lại nguồn tài nguyên quý giá để nghiên cứu và sàng lọc các nguồn hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học (Nghia et al., 2023). Tuy nhiên, việc biến đổi khí hậu và khai thác quá mức đã dẫn

đến ngày càng nhiều loài thực vật có dược tính tốt bị thu hẹp và suy giảm số lượng đáng kể (Lân et al., 2022). Khai thác quá mức tài nguyên thiên nhiên đã làm suy thoái môi trường, ảnh hưởng tiêu cực gây ra suy giảm tài nguyên và làm mất cân bằng hệ sinh thái. Vi khuẩn nội sinh có sự tương tác đối với hệ sinh thái, chúng đóng vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng, phân hủy hữu cơ và duy trì cân bằng sinh học, nghiên cứu vi khuẩn nội sinh giúp hiểu rõ hơn về tác động của khai thác tài nguyên thiên nhiên lên vi khuẩn và hệ sinh thái. Vì vậy, việc cân nhắc bền vững trong khai thác tài nguyên và nghiên cứu vi khuẩn nội sinh là cần thiết để bảo vệ môi trường và duy trì sự đa dạng sinh học (Viện Chiến lược, chính sách tài nguyên và môi trường, [ISPONRE], 2011). Vi khuẩn nội sinh là vi khuẩn sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, thân, lá, quả của thực vật chủ. Vi khuẩn nội sinh không gây hại cho vật chủ, thậm chí một số nhóm vi khuẩn nội sinh còn có khả năng hỗ trợ thực vật chủ sinh trưởng và phát triển (Hiệp et al., 2011; Tường et al., 2022). *Kosakonia* sp. thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí, có khả năng kích thích sự phát triển ở thực vật thông qua việc sản sinh IAA và nitrogenase. Ngoài ra, vi khuẩn *Kosakonia* sp. còn có khả năng sản sinh gallic acid, tannase enzyme, tannin, hợp chất phenolic,... (Matthias et al., 2018; Janet et al., 2020; Ishita et al., 2023).

Coley et al. (1909) đã sử dụng vi khuẩn và các chất chuyển hóa của chúng để điều trị ung thư; dịch nuôi cấy *Streptococcus pyogenes* và *Serratia marcescens* được dùng để điều trị cho những bệnh nhân có khối u không thể cắt bỏ. Hỗn hợp này ngày nay được gọi là 'độc tố Coley', đã được sử dụng cho khoảng 1200 bệnh nhân mắc bệnh ác tính. Ung thư đã thoái triển ở 52 trường hợp, bao gồm cả việc chữa khỏi hoàn toàn 30 bệnh nhân, đã được quan sát thấy. Cơ chế của phản ứng này hiện đã được công nhận một phần. Nhiễm trùng do vi khuẩn có thể kích hoạt đại thực bào và tế bào lympho, gây ra sản xuất chất gây độc tế bào, đặc biệt là yếu tố hoại tử khối u  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Patyar et al., 2010). Hiện nay, protein và peptide của vi khuẩn đóng vai trò quan trọng như các tác nhân chống tăng sinh. Một số trong số này đã được sử dụng trong điều trị ung thư, một số khác đang trong các thử nghiệm lâm sàng trên người hoặc được nghiên cứu trong ống nghiệm.

Với những mong muốn nghiên cứu phát triển các sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư từ dược liệu có nguồn gốc tự nhiên, tối ưu hóa thời gian chuẩn bị nguồn nguyên liệu, ít chịu tác động của việc khai thác và tác động của môi trường, bài báo này trình

bày kết quả ức chế tế bào ung thư từ các mẫu thử của vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, được phân lập từ củ gừng *Zingiber officinale* tại vùng đồng bằng Sông Cửu Long, được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Phát triển Dược liệu, khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn này nằm trong đề tài nghiên cứu “Sàng lọc, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh ở cây dược liệu, ứng dụng hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan hội chứng chuyển hóa” mã số B2023-TCT-02.

Các dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư đại trực tràng (HT29), ung thư gan (HepG2, HUH7) và dòng tế bào thường ở thận (Hek 2.9.3), được cung cấp bởi Viện Công nghệ Kyoto.

### 2.2. Hóa chất và thiết bị

Agar (Robika Hải Long; Vietnam), CCK-8 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., USA), D-glucose (Xilong, China), DMEM high glucose (Dulbecco’s modified Eagle’s medium; FUJIFILM – Wako, Japan), ethyl acetate (Chemsol, Vietnam), EMEM (Eagle’s minimal essential medium; FUJIFILM – Wako, Japan), PDB (Potato dextrose broth; Hemadia, India). Cân phân tích (Ohaus, USA), máy cô quay chân không (Heidolph, Germany), máy ly tâm lạnh (Mikro 12-24, Hettich, Germany), máy ly tâm lạnh tốc độ cao Himac CF7D2 (Hitachi, Japan), máy sấy thăng hoa (DC – 801, Yamato, Japan), microplate reader SH-1200 lab (Corona electric, Japan), tủ an toàn sinh học Class II type A2 (Panasonic, Japan), tủ cấy vi sinh vật (China), tủ lạnh (Sharp, Thailand).

### 2.3. Phương pháp điều chế dịch ngoại bào và cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4

Phương pháp điều chế cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 được thực hiện theo phương pháp điều chế cao chiết lỏng- lỏng của tác giả Nguyễn Kim Phi Phụng et al. (2007) có hiệu chỉnh phù hợp với điều kiện vật mẫu là vi khuẩn. Vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 được nuôi tăng sinh trong môi trường PDB (Potato dextrose broth), ở 30°C, trên máy lắc ngang 200 vòng/phút trong 24 giờ. 1 mL dịch nuôi tăng sinh ở trên được cho vào 50 mL môi trường PDB mới, điều chỉnh mật số vi khuẩn đạt OD<sub>600</sub> = 0,5, sau đó vi khuẩn được tiếp tục nuôi ở điều kiện nhiệt độ 30°C, trên máy lắc ngang 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau 72 giờ, dịch nuôi

tăng sinh được ly tâm ở 13,000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch được thu và loại bỏ phần kết tủa. Phần dịch sau ly tâm sau đó được loại nước bằng phương pháp đông khô được gọi là dịch ngoại bào sử dụng trong nghiên cứu này.

Phần dịch thu được sau khi ly tâm, được cho vào phễu chiết (bình lắng gạn) dung môi ethyl acetate được thêm vào tỷ lệ giữa phần dịch và dung môi là 1:1. Sau đó phễu được tiến hành lắc, huyền phù và phần dịch không hòa tan được loại bỏ. Dịch lỏng phía trên được thu và tiến hành cô quay chân không dưới dung môi, thu được cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4. Cao chiết được trữ ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

### 2.4. Phương pháp gây độc tế bào

Phương pháp đánh giá khả năng gây độc tế bào, được thực hiện theo mô tả của Tim năm 1983, có hiệu chỉnh theo điều kiện phòng thí nghiệm (Isabel et al., 2022; Nghia et al., 2023).

#### Chuẩn bị tế bào thử nghiệm

Các dòng tế bào thử nghiệm trữ trong nitrogen lỏng được phục hồi bằng cách nuôi trong môi trường chuyên biệt thích hợp, có bổ sung 10% huyết thanh bò (FBS) và 1% penicillin-streptomycin (PS), được nuôi tăng sinh ở điều kiện nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 2-3 lần nuôi cấy chuyên trong điều kiện nêu trên, tế bào được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### Chuẩn bị mẫu thử vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4

Mẫu thử được pha trong DMSO 5% nồng độ mẫu thử lúc này là 4000 µg/mL, cao chiết được tiếp tục pha loãng bằng môi trường chuyên biệt của tế bào, để được các nồng độ khảo sát 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 600 và 800 µg/mL.

#### Khảo sát khả năng gây độc trên dòng tế bào thường ở thận (Hek 2.9.3)

Thí nghiệm xác định mức độ gây độc tế bào của dịch ngoại bào và cao chiết từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, trên dòng tế bào thận bình thường Hek 2.9.3 được thực hiện như sau: dòng tế bào thận Hek 2.9.3 sau khi được phục hồi và rửa với dung dịch đệm phosphate buffer saline (PBS), tế bào được ủ 2-3 phút với 1 mL trypsin. Tiếp tục, 5 mL môi trường Eagle’s minimal essential medium (EMEM) được bổ sung, hỗn hợp được chuyển sang falcol, sau đó được ly tâm lạnh 800 vòng/ phút trong 3 phút. Phần tế bào thu được sau ly tâm, được thêm vào 1 mL môi trường EMEM mới. Điều chỉnh mật số tế bào đạt

$10^5$  tế bào/mL. Gieo (seed) 100  $\mu$ L môi trường chứa tế bào ( $10^5$  tế bào/mL) vào mỗi giếng ủ 24 giờ trong điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau khi được ủ 24 giờ, môi trường nuôi cấy bị loại bỏ, tế bào được rửa bằng PBS. Sau khi được rửa bằng PBS, mỗi giếng chứa tế bào được thêm vào 100  $\mu$ L môi trường mới chứa cao chiết ở các nồng độ khảo sát, và được ủ 48 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ và thêm 110  $\mu$ L hỗn hợp CCK-8 và môi trường (tỷ lệ 1:10), tiếp tục được ủ 3 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Số lượng tế bào sống tỷ lệ thuận với cường độ màu hồng của formazan được đo ở bước sóng 450 nm, ở thời điểm 0 và 3 giờ sau khi cho CCK-8 vào.

*Khảo sát khả năng gây độc trên các dòng tế bào ung thư*

Khả năng gây độc của dịch ngoại bào và cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 trên các dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư đại trực tràng (HT29), ung thư gan (HepG2, HUH7) được thực hiện theo quy trình tương tự như đối với dòng tế bào thận Hek 2.9.3 nêu trên. Dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) được nuôi trong môi trường EMEM như đối với tế bào thận Hek 2.9.3; các dòng tế bào ung thư đại trực tràng (HT29), ung thư gan (HepG2, HUH7) được nuôi trong môi trường Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM). Cao chiết vi khuẩn được sử dụng trong thí nghiệm này được chuẩn bị tương tự như trên, ở các nồng độ khảo sát là 3,125  $\mu$ g/mL; 6,25  $\mu$ g/mL; 12,5  $\mu$ g/mL; 25  $\mu$ g/mL; 50  $\mu$ g/mL; 100  $\mu$ g/mL; 200  $\mu$ g/mL; 400  $\mu$ g/mL.

Theo Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI Hoa Kỳ), cao chiết có hoạt tính kháng ung thư dựa vào 3 tiêu chí (1) IC<sub>50</sub> < 30  $\mu$ g/ml; (2) Chỉ số chọn lọc (SI)>5 (IC<sub>50</sub> của tế bào thường/ IC<sub>50</sub> tế bào ung thư) (Paolo *et al.*, 2001; Isabel *et al.*, 2022); (3) Khả năng

sống sót (cell survival) của tế bào được đánh giá thông qua chỉ số % (CS %), nồng độ nào cho giá trị CS  $\leq$  50% thì được đánh giá là có hoạt tính ức chế tế bào ung thư (Thoa *et al.*, 2020).

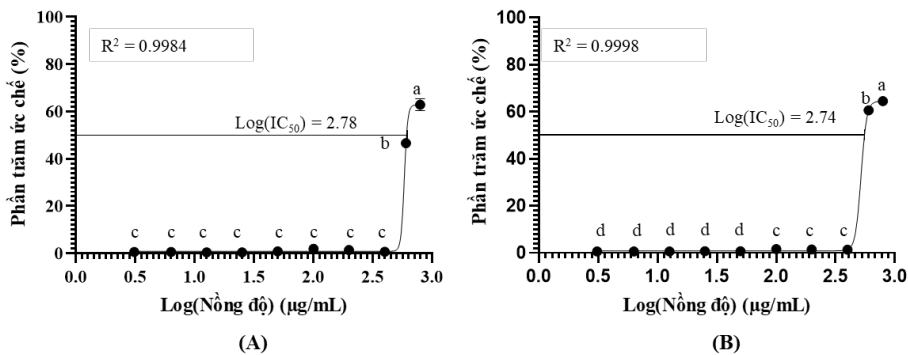
**2.5. Phương pháp thống kê và mô tả số liệu**

Kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng biểu đồ phân tích hồi quy phi tuyến tính khớp đường cong bằng phần mềm Graphpad Prism 8.0. Số liệu được trình bày dưới dạng log(nồng độ sử dụng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

**3. KẾT QUẢ**

**3.1. Khảo sát độc tính của mẫu thử trên dòng tế bào thận bình thường Hek 2.9.3**

Ảnh hưởng của hai loại mẫu thử từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đối với tế bào Hek 2.9.3 được trình bày trong Hình 1. Kết quả cho thấy từ nồng độ khảo sát 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL tế bào phát triển gần như bình thường. Nghĩa là, sự thay đổi nồng độ mẫu thử từ 3,125 đến 400  $\mu$ g/mL, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với nhau. Nồng độ cao chiết 600  $\mu$ g/mL và 800  $\mu$ g/mL có khả năng ức chế dòng tế bào thận bình thường Hek 2.9.3. Dựa vào đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ cao chiết và hiệu quả ức chế dòng tế bào (Hình 1), suy ra được phương trình  $\text{Log}(IC_{50}) = 2,78$  tương đương với  $IC_{50} = 608,14$   $\mu$ g/mL ở cao chiết và phương trình  $\text{Log}(IC_{50}) = 2,74$  tương đương với  $IC_{50} = 554,63$   $\mu$ g/mL ở dịch ngoại bào. Xác định IC<sub>50</sub> của mẫu thử trên dòng tế bào thận bình thường là cơ sở để xác định trị số SI trong đánh giá khả năng gây độc của dịch ngoại bào và cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4. Chỉ số SI là tiêu chuẩn đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của mẫu thử theo quy ước của NCI Hoa Kỳ (Isabel *et al.*, 2022).



**Hình 1. Khả năng gây độc của vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 trên dòng tế bào thận bình thường**

\*Ghi chú: A: Cao chiết; B: dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4. Số liệu được trình bày theo dạng cơ số log(nồng độ). Các chữ cái khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với nhau trong cùng một biểu đồ.

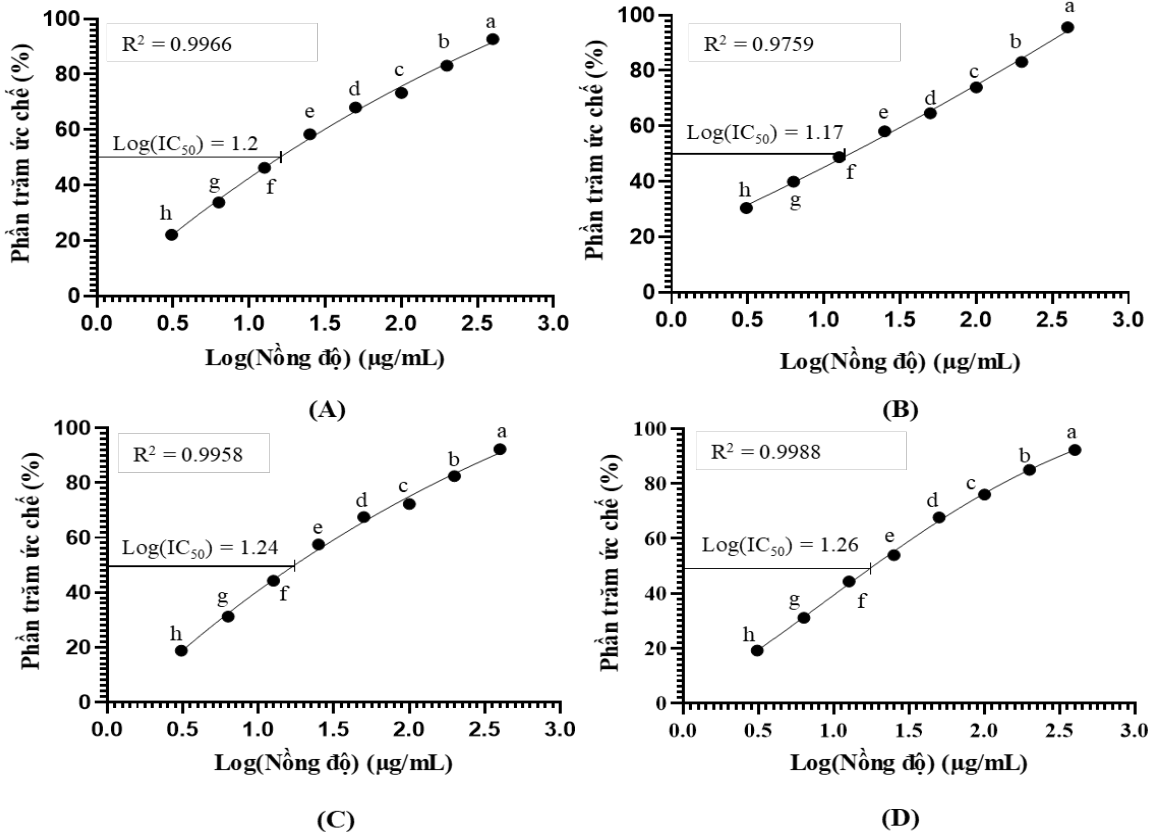
**3.2. Khả năng ức chế tế bào ung thư của cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4**

Khả năng gây độc của cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (Hình 2A), ung thư đại trực tràng HT29 (Hình 2B), ung thư gan HepG2 (Hình 2C) và HUH7 (Hình 2D) cho thấy cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đều có khả năng gây độc đối với tất cả các dòng khảo sát.

Đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (Hình 2A), kết quả cho thấy từ nồng độ cao chiết khảo sát 3,125 µg/mL đã có khả năng ức chế được 22,15±0,6%; khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung HeLa tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê khi tăng nồng độ cao chiết, và đạt hiệu quả cao nhất là 92,73±0,24% ở nồng độ 400 µg/mL.

Cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có khả năng gây độc đối với tế bào ung thư đại trực tràng HT29 mạnh hơn tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, cụ thể ở nồng độ cao chiết 3,125 µg/mL đã cho kết quả ức chế 30,45±0,45%, ở nồng độ 400 µg/ml cao chiết đã ức chế 95,61±0,11%. Khả năng ức chế dòng tế bào HT29 của cao chiết cũng tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê khi tăng nồng độ cao chiết từ 3,125 đến 400 µg/mL.

Đối với dòng tế bào HepG2, khả năng ức chế của tế bào tăng dần tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, điều này diễn ra tương tự ở dòng tế bào HUH7. Ở nồng độ cao chiết 3,125 µg/mL, dòng tế bào là HepG2 và HUH7 có khả năng ức chế lần lượt là 18,82 µg/ml và 19,2 µg/ml). Khả năng ức chế dòng tế bào Hep G2 và HUH7 của cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 tương đương nhau ở nồng độ 400 µg/mL (khoảng 92%).



**Hình 2. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế các tế bào ung thư từ cao chiết vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4**

\*Ghi chú: A. Tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, B. Tế bào ung thư đại trực tràng HT29, C. Tế bào ung thư gan HepG2, D. Tế bào ung thư gan HUH7. Số liệu được trình bày theo dạng cơ số log(nồng độ). Các chữ cái khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với nhau trong cùng một biểu đồ.

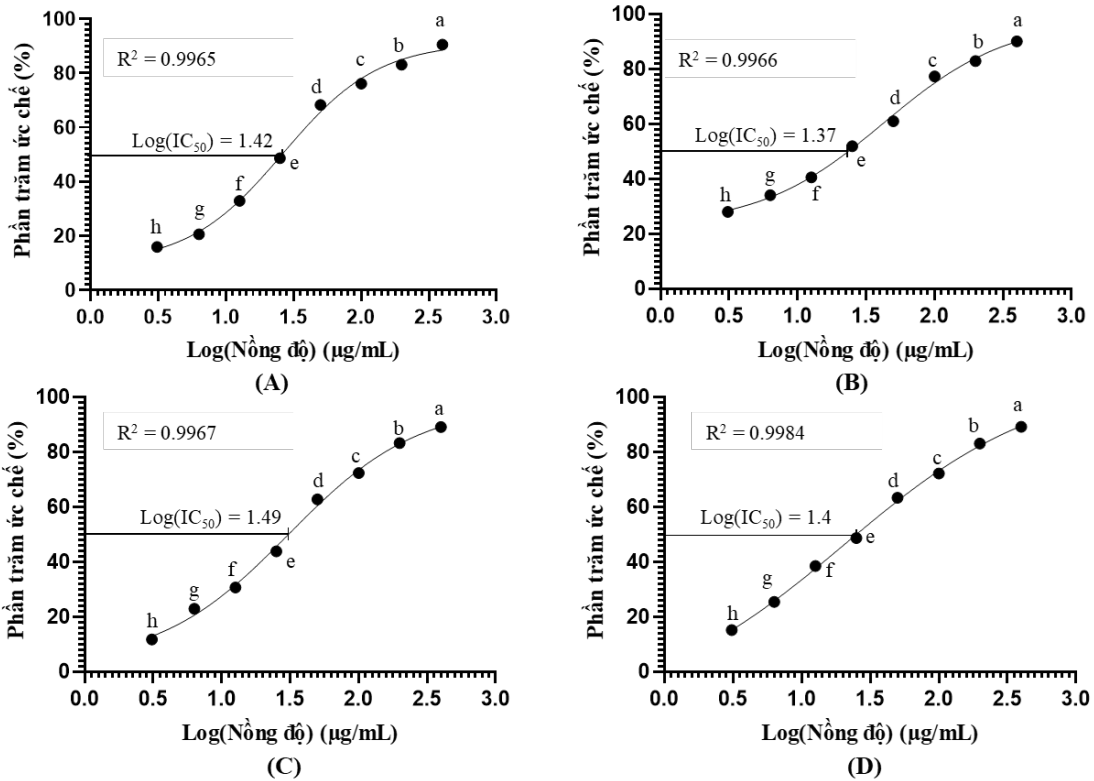
**3.3. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào của dịch ngoại bào vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4**

Tương tự với cao chiết, dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 cũng gây độc trên 4 dòng tế bào ung thư được khảo sát với chỉ số IC<sub>50</sub> từ 23,55 µg/mL đến 29,65 µg/mL.

Dịch ngoại bào có khả năng gây độc mạnh nhất đối với dòng tế bào HT29 (Hình 3B), với chỉ số IC<sub>50</sub> được ghi nhận là 23,55 µg/mL, hệ số SI là 23,55, điều này cho kết quả tương tự với khảo sát ở mẫu thử là cao chiết ethyl acetate. Ở 2 dòng tế bào ung thư gan HepG2 và HUH7 (Hình 3C và 3D), dịch ngoại

bào cho kết quả gây độc tốt với chỉ số IC<sub>50</sub> lần lượt là 29,65 µg/mL và 25,18 µg/mL, hệ số chọn lọc ghi nhận được là 18,71 đối với dòng tế bào HepG2 và 22,03 đối với dòng tế bào HUH7. Dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (Hình 3A), dịch ngoại bào cũng mang lại hiệu quả gây độc cao, chỉ số IC<sub>50</sub> được ghi nhận trong thí nghiệm này là 26 µg/mL, hệ số chọn lọc được xác định là 21,33.

Dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 mang lại hiệu quả cao trong việc gây độc các tế bào ung thư được chọn. Trong đó, dịch ngoại bào gây độc mạnh nhất ở dòng tế bào ung thư đại trực tràng HT29, tương đồng với kết quả thí nghiệm ở các nghiệm thức dùng cao chiết.



**Hình 3. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế các tế bào ung thư từ dịch ngoại bào tăng sinh của vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4**

\*Ghi chú: A. Tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, B. Tế bào ung thư đại trực tràng HT29, C. Tế bào ung thư gan HepG2, D. Tế bào ung thư gan HUH7. Số liệu được trình bày theo dạng cơ số log(nồng độ). Các chữ cái khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với nhau trong cùng một biểu đồ.

**3.4. So sánh hiệu quả gây độc của cao chiết và dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4**

Hiệu quả gây độc của 2 mẫu thử từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đối với các dòng tế bào ung thư được so sánh dựa vào các chỉ số IC<sub>50</sub>, SI và

CS%, được trình bày trong Bảng 1. Theo NCI quy định, cao chiết có hoạt tính ức chế tế bào ung thư khi IC<sub>50</sub><30 µg/mL, CS%≤50 µg/mL.

Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy rằng, vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có khả năng gây độc mạnh nhất ở dòng tế bào ung thư đại trực tràng

HT29. Thấp nhất là các dòng tế bào ung thư gan HepG2 và HUH7.

Cao chiết có hiệu quả gây độc tế bào ung thư mạnh hơn so với dịch ngoại bào. Đối với dòng tế bào HT29 cao chiết cho thấy hiệu quả gây độc mạnh hơn dịch ngoại bào 1,58 lần (so sánh ở chỉ số IC<sub>50</sub>).

Tương tự ở dòng tế bào HeLa, cao chiết cho thấy hiệu quả hơn dịch ngoại bào 1,64 lần, dòng tế bào HepG2 là 1,7 lần và HUH7 là 1,37 lần. Điều này cho thấy rằng cao chiết có khả năng ức chế tế bào ung thư tốt hơn dịch ngoại bào, tăng khả năng kháng khối u của các dòng tế bào ung thư.

**Bảng 1. Hiệu quả gây độc các dòng tế bào ung thư của cao chiết vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4.**

Dòng tế bào	Mẫu thử	Phương trình Log(IC <sub>50</sub> )	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	CS%(µg/mL)
HeLa	Cao chiết	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,2 (R <sup>2</sup> = 0,9966)	15,89	38,28	<25
	Dịch ngoại bào	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,42 (R <sup>2</sup> = 0,9965)	26	38,28	<30
HT29	Cao chiết	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,17 (R <sup>2</sup> = 0,9759)	14,86	40,93	<25
	Dịch ngoại bào	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,37 (R <sup>2</sup> = 0,9966)	23,55	23,55	<30
HepG2	Cao chiết	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,24 (R <sup>2</sup> = 0,9958)	17,42	18,32	<25
	Dịch ngoại bào	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,49 (R <sup>2</sup> = 0,9967)	29,65	18,71	<30
HUH7	Cao chiết	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,26 (R <sup>2</sup> = 0,9988)	18,32	33,19	<25
	Dịch ngoại bào	Log(IC <sub>50</sub> ) = 1,4 (R <sup>2</sup> = 0,9984)	22,03	25,47	<30

\* Ghi chú: Theo NCI, chất thử nghiệm có hoạt tính khi IC<sub>50</sub> < 30 µg/mL, SI > 5, CS% < 50

#### 4. THẢO LUẬN

Vi khuẩn nội sinh là nhóm vi sinh vật đa dạng nhưng chưa được nghiên cứu nhiều, có mối quan hệ cộng sinh với thực vật và là nguồn cung cấp các hoạt chất sinh học đầy kỳ vọng (Ranghu, 2012). Nhiều loài thực vật đã được nghiên cứu đa dạng vi sinh vật nội sinh trong các cơ quan (Shiva et al., 2015). Các thí nghiệm gây độc tế bào đánh giá khả năng tồn tại của tế bào có thể được phân loại theo các cơ chế khác nhau như đánh giá sự mất tính toàn vẹn của màng, hoạt động trao đổi chất màng, mất cấu trúc lớp đơn và bất giữ tế bào trong các giai đoạn khác nhau của chu trình tế bào. Trong nghiên cứu này, mục tiêu cần đạt được là xác định được độc tính của các mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 trên các dòng tế bào, thu thập số liệu đồng thời ghi nhận các chỉ số IC<sub>50</sub>, SI và CS%, tham chiếu với khung quy chuẩn của NCI Hoa Kỳ, từ đó xác định khả năng ức chế tế bào ung thư của các mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4.

Nghiên cứu này đã cung cấp thông tin về việc các mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đã không gây độc trên dòng tế bào thận bình thường Hek 2.9.3, ở các nồng độ khảo sát từ 3.125 đến 400 µg/mL. Mặc dù nhóm nghiên cứu, đã mở rộng khảo sát lên đến nồng độ 800 µg/mL, nhưng cần đến 608,14 µg/mL đối với cao chiết và 554,63 µg/mL đối với dịch ngoại bào. Nhóm nghiên cứu đã so sánh kết quả về khảo sát sự gây độc của mẫu thử trên nhóm tế bào Hek 2.9.3 với các nghiên cứu về dược liệu, cao chiết. Nghiên cứu của Trịnh Thị Diệu Thường et al. (2019) cho thấy chỉ số IC<sub>50</sub> gây độc của các bài thuốc dân gian tại tỉnh Sóc Trăng có nồng độ từ 1,7 µg/mL đến 210 µg/mL. Salar et al.,

2011 đã công bố rằng không ghi nhận được IC<sub>50</sub> của chiết xuất *Zingiber officinale* đối với dòng tế bào Hek 2.9.3 trong nồng độ thử nghiệm từ 0,913 µg/mL đến 500 µg/mL. Sự khác biệt diễn ra ở đây là mẫu thử của các nghiên cứu trước đây là thuốc và thực vật, còn trong nghiên cứu này là vi khuẩn nội sinh từ củ *Zingiber officinale*. Điều quan trọng là nồng độ mà nhóm nghiên cứu nhắm đến là 3,125 đến 400 µg/mL, hoàn toàn không gây độc trên dòng tế bào Hek 2.9.3 ở cả cao chiết và dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4

Đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (Hình 2A và Hình 3A), theo công bố từ nghiên cứu của Jamal et al. (2016), cao chiết từ *Zingiber officinale* được ghi nhận chỉ số IC<sub>50</sub> là 37,45 µg/mL, sau 48 giờ thí nghiệm với cao chiết. Trong nghiên cứu này, chỉ số IC<sub>50</sub> được ghi nhận được là 15,89 µg/mL đối với cao chiết và 26 µg/mL đối với dịch ngoại bào. Mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 được phân lập từ củ *Zingiber officinale*, có chỉ số IC<sub>50</sub> thấp hơn so với việc dùng chiết xuất từ *Zingiber officinale* đã được công bố từ các nghiên cứu trước. Tuy nhiên, vào năm 2020, Nguyễn Văn Sơn et al. đã công bố sự ảnh hưởng của hai hợp chất 6,8-prenylacacetin và 8-prenylacacetin trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa với IC<sub>50</sub> lần lượt gần bằng 7 µg/mL và 2 µg/mL, cho thấy cả hai hợp chất đều có chỉ số IC<sub>50</sub> thấp hơn mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 (cao chiết: 2,27 lần và 7,9 lần; dịch ngoại bào: 3,71 lần và 13 lần). Tương tự ở dòng tế bào Hek 2.9.3, sự khác biệt diễn ra ở đây là sử dụng hợp chất sẽ có hiệu quả cao hơn sử dụng các chiết xuất tổng hợp, khi phân tích về mối quan hệ hoạt động cấu trúc các hợp chất sẽ có tính

liên kết chuyên biệt hơn so với việc sử dụng các chiết xuất tổng hợp, quá trình thâm thấu qua màng tế bào hoặc do tính tương thích của cấu trúc hợp chất và cấu trúc tế bào HeLa có sự kết nối tốt hơn.

Theo công bố của Arezoo et al. (2020), nghiên cứu ghi nhận chủng vi khuẩn *Pseudomonas* có sự gây độc trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng HT29, cụ thể ở mẫu thử exopolysaccharides (EPS) A chỉ số IC<sub>50</sub> được công bố là 44,8 µg/mL và 12,7 µg/mL ở mẫu thử EPS B. Parisa et al. (2019), đã công bố rằng vi khuẩn *Lacticaseibacillus paracasei* ức chế 50% tế bào ung thư đại trực tràng ở nồng độ 12,5 µg/mL trong 48 giờ khảo sát với mẫu thử. Quan sát hình 2B và 3B cho thấy mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 cho ra kết quả gần bằng với công bố của Arezoo và Lc. *Paracasei*, ghi nhận được kết quả IC<sub>50</sub> ở mẫu thử cao chiết là 14,86 µg/mL và dịch ngoại bào là 23,55 µg/mL. Trong thảo luận này, hiệu quả gây độc của mẫu thử từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 thấp hơn so với mẫu EPS B của vi khuẩn *Pseudomonas* và vi khuẩn Lc. *Paracasei*. Tuy nhiên, mẫu thử từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 vẫn đáp ứng được yêu cầu của NCI Hoa Kỳ về khả năng gây độc tế bào ung thư của cao chiết với chỉ số IC<sub>50</sub> < 30 µg/mL.

Vào năm 2018, Mohsen et al. đã thực hiện thí nghiệm gây độc trên tế bào ung thư gan HepG2 bằng 20 dòng vi khuẩn được thu thập từ bọt biển tại vùng biển Địa Trung Hải và biển Đỏ, chỉ số IC<sub>50</sub> được ghi nhận dao động từ 309 µg/mL đến 724 µg/mL. Năm 2019, Gayathri et al. đã công bố kết quả nghiên cứu tác dụng chống ung thư của *Bacillus pumilis* AMK1, trên dòng tế bào ung thư gan HepG2. Chỉ số IC<sub>50</sub> của cao chiết từ AMK1 đối với HepG2 được ghi nhận là 42,98 µg/mL. Đến năm 2022, Trần Thị Thùy Linh et al. đã công bố khả năng ức chế của hai hợp chất liriodenine và lysicamine trên dòng tế bào ung thư HepG2, chỉ số IC<sub>50</sub> được xác định lần lượt là 18,12±0,21 µg/mL và 34,48±1,21 µg/mL. Mẫu thử từ vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 cũng đã mang lại kết quả gây độc trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 đáng được quan tâm (Hình 2C, 3C), chỉ số IC<sub>50</sub> giữa mẫu thử và HepG2 được xác định và công bố là 17,42 µg/mL đối với cao chiết, 29,65 µg/mL đối với dịch ngoại bào, kết quả có phần khả quan hơn các nghiên cứu trước đó. Trong đó, cao chiết từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 cho hiệu quả ức chế tế bào ung thư gan HepG2 cao nhất.

Thongchai et al. (2017) đã tiến hành thí nghiệm xác định khả năng gây độc của chủng vi khuẩn *Streptomyces* sp. BO-07 trên dòng tế bào ung thư gan HUH7, chỉ số IC<sub>50</sub> được xác định là 88,26

µg/mL. Đến năm 2018, San et al. đã công bố kết quả ảnh hưởng của nấm *Antroliia cinnamomea* và *Zingiber officinale* trên dòng tế bào HUH7, kết quả được ghi nhận là IC<sub>50</sub> của nấm *Antroliia cinnamomea* và *Zingiber officinale* được ghi nhận lần lượt là 245,4 µg/mL và 50,33 µg/mL. Các nghiên cứu này đã phản ánh được hiệu quả gây độc dòng tế bào ung thư gan HUH7 của vi sinh vật. Nghiên cứu cũng xác định được IC<sub>50</sub> của mẫu thử vi khuẩn *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, trên dòng tế bào HUH7 là 18,32 µg/mL ở cao chiết và 25,18 µg/mL ở dịch ngoại bào, kết quả này cho thấy *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có phần gây độc trên dòng HUH7 cao hơn các nghiên cứu trên.

Trong nghiên cứu này, các mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có tác động gây độc tế bào ung thư theo cơ chế chết tương tự chu trình apoptosis. Mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, khởi đầu là sự thâm thấu qua màng tế bào ung thư, làm cho nồng độ oxy trong tế bào ung thư thấp hoặc tổn thương DNA của tế bào ung thư. Mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 gây cản trở quá trình vận chuyển dinh dưỡng của tế bào ung thư, hạn chế sự sản sinh tế bào ung thư và ngăn chặn sự truyền tín hiệu. Vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 đã làm vỡ và gây chết tế bào ung thư.

Đây chỉ là nghiên cứu trên tế bào người trên thực nghiệm phụ thuộc vào độ nhạy và độ chính xác của kỹ thuật được sử dụng phương pháp quang phổ. Vì thế, việc phát hiện các hoạt động ức chế của các mẫu thử từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 còn hạn chế nhất định cần tiến hành trên lâm sàng để có thêm bằng chứng chính xác. Một trong những nhược điểm của phương pháp đo quang phổ xác định IC<sub>50</sub> này là hoạt động ức chế của các mẫu thử đã thay đổi rất nhanh khi đi từ nồng độ cao đến thấp.

Có thể thấy, các nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên được tách chiết tinh khiết, cho kết quả ức chế tế bào ung thư rất cao. Kiến nghị nên nghiên cứu tách chiết, tổng hợp và tinh sạch các hợp chất thiên nhiên có trong vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4, nghiên cứu thêm về các khả năng chống ung thư của các chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 trên mô hình *in vivo*.

## 5. KẾT LUẬN

Mẫu thử cao chiết và dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 phân lập từ củ gừng (*Zingiber officinale*), có khả năng ức chế *in vitro* đối với các dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư đại trực tràng (HT29) và ung thư gan (HepG2, HUH7). Đáp ứng các yêu cầu của của NCI Hoa Kỳ



với  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI > 5$  và  $CS\% \leq 50$ . Cao chiết từ vi khuẩn nội sinh *Kosakonia* sp. ZO-Rh4 có khả năng gây độc cao hơn dịch ngoại bào 1.37 – 1.70 lần (so sánh  $IC_{50}$ ). Cả hai mẫu thử đều gây độc mạnh nhất trên tế bào ung thư đại trực tràng (HT29), với  $IC_{50}$  là 14,86  $\mu\text{g/mL}$  ở cao chiết và 23,55  $\mu\text{g/mL}$  ở dịch ngoại bào. Kết quả này mở ra một hướng nghiên cứu về nguồn hợp chất thiên nhiên có khả năng kháng ung thư tiềm năng, bổ sung thêm các

nguồn hợp chất đang được sử dụng bằng con đường tổng hợp, hoặc từ thực vật hiện nay.

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu thông qua đề tài với mã số B2023-TCT-02; Viện Công nghệ Kyoto (Kyoto Institute of Technology-KIT), Nhật Bản đã cung cấp các dòng tế bào, hóa chất, thiết bị cho các thử nghiệm tế bào.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arezoo T., Azadeh A., & Mehrafarin F. The anti-tumor activity of exopolysaccharides from *Pseudomonas* strains against HT-29 colorectal cancer cell line. (2020). *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 1072-1076. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.268>
- Cancer Information and Support Network. (2013). *The promise of gene therapy*. [https://cisncancer.org/research/new\\_treatments/gene\\_therapy/promise.html](https://cisncancer.org/research/new_treatments/gene_therapy/promise.html)
- Coley, W. B (1909). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and *Bacillus prodigiosus*). *Proceeding of the royal society of medicine*, 3, 1–48.
- Gayathri, K., Madan, K. A., & Nagabhishek, S. Natesh. (2020). Anticancer Effect of Marine Sponge-Associated *Bacillus pumilus* AMK1 Derived Dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in Human Liver Cancer Cell Line Through Apoptosis and G2/M Phase Arrest. *International journal of peptide research and therapeutics*, 26, 445–457.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Hiệp, L, T, H., & Điệp, C. N. (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cúc xuyên chi (*Wedelia trilobata* L. Hitchc.) bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 18a, 168 – 176.
- Hương, T. T. T. Con đường ngăn cản CTLA-4 và PD-1 trong liệu pháp miễn dịch chống ung thư. (2020). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 225(8), 196-202.
- Isabel, C., Pedro, V., Ana, I. O., Maria, A. C., & Claudia, P. (2022). *In vitro* cytotoxic activity of african plants: A review. *Molecules*, 27(15), 1 – 18. [10.3390/molecules27154989](https://doi.org/10.3390/molecules27154989)
- Ishita. S., & Pradeep, K. M. (2023). *Paraburkholderia tropica* PKI7 and *Kosakonia arachidis* PKI8: Two newly reported tannase producing bacteria isolated from forest soil and study of their tannase producing potentiality. *Notulae Scientia Biologicae*, 15(1), 2 -11. <https://doi.org/10.15835/nsb15111379>
- Jacques, F., Isabelle, S., Rajesh, D., Sultan, E., Colin, M., Marise, R., Donald, M. P., David, F., & Freddie, B. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 59-86. [10.1002/ijc.29210](https://doi.org/10.1002/ijc.29210)
- Janet, J. R., Juan, A. C. M., & Claudia, G. B. *Kosakonia*. (2020). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 12, 213 – 231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00012-5>
- Kuno, T., Tsukamoto, T., Hara, A., & Tanaka, T. (2012). Cancer chemoprevention through the induction apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*, 3, 156–173. [10.4236/jbpc.2012.32018](https://doi.org/10.4236/jbpc.2012.32018)
- Lân, C. K., Mai, P. T. T., & Vân, L. T. T. (2022). Thực trạng và một số kiến nghị bảo vệ môi trường tác các nước OECD. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Hòa Bình*, 3, 36 – 43.
- Linh, T. T. T., Quỳnh, T. N. N., Huyền, T. T., Tuyền, L. B., Tuyền, N. T. K., & Khanh, N. T. (2022). Khả năng ức chế protein điều hòa quá trình đường phân và apoptosis của TP53 trong con đường tăng sinh tế bào ung thư của các hợp chất từ cây *Goniothalamus elegans* Ast (Annonaceae). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 228(01), 219-226.
- Matthias, B., Sascha, P., Yvonne, B., Beatrice, B., Mario, D., Boyke, B., Jorg, O., Cathrin, S., Jochen, R., Glyaine, V. T. T., & Silke, R. (2018). Comparative genomics reveal a flagellar system, a type VI secretion system and plant growth-promoting gene clusters unique to the endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01997>
- Mohsen, S. Askerl., Osama, H. E. S., Manal, G. M., Shaymaa, M. Y., Sahar, S. M., Manal, S. S., Mohamed, S. E. A., Salma, M. A., & Mostafa, M. A. E. (2018). Production of exopolysaccharides from novel marine bacteria and anticancer activity against hepatocellular carcinoma cells (HepG2). *National Research*

- Centre, 42(30), 1-9.  
<https://doi.org/10.1186/s42269-018-0032-3>
- National Heart, Lung, and Blood Institute. (2022). *Genetic therapies benefit and risks*.  
<https://www.nhlbi.nih.gov/health/genetic-therapies/benefits-risks>
- Nghia, L. T., Tue, D. M., Thao, D. T. P., & Kaeko, K. (2023). Sphaerocoryne affinis fruit extract causes DNA damage leading to inhibited cell proliferation and activated apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 1(7), 1-15.  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2723074/v1>
- Paolo, B., Gloria, G., & Bernt, L. (2001). Cancer risk in a population-based cohort of patients hospitalized for psoriasis in Sweden. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6), 1531–1537.  
<https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01520.x>
- Parisa, M., Farzaneh, T., & Maryam, B. T. (2019). Cell-bound Exopolysaccharide Extract from Indigenous Probiotic Bacteria Induce Apoptosis in HT-29 cell-line. *Iranian Journal of Pathology*, 14(1), 41-51. 10.30699/IJP.14.1.41
- Patyar, S., Joshi, R., Prasad, B., D. S., Prakash, A., Medhi, B., Das, B. K. (2010). Bacteria in cancer therapy: A novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.*, 17, 21.
- Trúc, P. C. (2013). Điều trị ung thư bằng liệu pháp gen. *Tạp chí Khoa học và Sức khỏe*, 321, 22-27.
- Phụng, N. K. P. (2007). Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. *Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh*.
- Raghu, J. (2012). Endophytic bacterial association and plant secondary metabolite production. Bangalore, India: University of Agricultural Sciences.
- Raguz, S., & Yagüe, E. (2008). Resistance to chemotherapy: New treatments and novel insights into an old problem. *British Journal of Cancer*, 99, 387–391.
- Sabine, A. S. L., Gudrun, K., Daniel, D., Fahd, A. M., Rabeah, A. T., Amedeo, A., Amaya, A., William, H. B., Dustin, B., Gunnar, B., Amelia, K. C., Tao, C., Annamaria, C., Firouz, D., Stefano, F., Laetitia, G., Roslida, A. H., Lisbeth, E. K., Luc, L., Adela, L. C. S., Lorenzo, M., Chiara, M., Carmel, M., Ann-Karin, O., Sofia, P., Jayadev, R., Emilio, R., Rabindra, R., Elizabeth, R., Patricia, O. W., Hosni, K. S., A.Ivana, S., Neetu, S., Monica, V., Frederik, J. V. S., Mahara, V., Jordan, W., Luoping, Z., Nikvan, L., M. K. V., Andrew, R. (2015). Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36(1), 61–88.  
[doi.org/10.1093/carcin/bgv031](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv031)
- Salar, A. F., Abdul, R. A. L., & Batool, A. A. K. (2011). Potentiate the anticancer effect of Methotrexate by *Zingiber officinale* Roscoe extract. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*, 2(2), 67-78.
- San, Y. Chen., Ying, R. L., Ying, R. L., Ming, C. H., Ming, C. H., Hany, A. Omar., Hany, A. Omar., Yen, N. T., Yen, N. T., Ching, Y. Lin., Ching, Y. L., Jui, H. H., & Jui, H. H. (2018). Enhancing the Anticancer Activity of *Antrodia cinnamomea* in Hepatocellular Carcinoma Cells via Cocultivation with *Ginger*: The Impact on Cancer Cell Survival Pathways. *Pharmacology of Anti-Cancer Drugs*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00780>
- Shiva, K. M., Mohana, B., & Thara, S. K. J. Isolation and identification of endophytic fungi from *Urginea indica*, a medicinal plant from diverse regions of South India. (2015). *International Journal of Latest Research Science and Technology*, 4(1), 75–80.
- Son, N. V., Cường, N. V., Ân, N. H., & Huỳnh, N. T. (2020). Tổng hợp toàn phần 6,8-prenylacacetin, 8 –prenylacacetin và hoạt tính ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư HeLa ở người. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh*, 44, 38-44.
- Thắng, L. T., Trúc, P. N. A., Chương., N. H., Hà., T. N. N., Nhi, T. T. P., Nhung, L. T., & Việt, H. (2023). Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu chiết xuất từ loài *Praxelis Clematidea* R. M. King & H. Robinson. *Tạp chí Y dược học quân sự*, 1, 17-26.  
<https://doi.org/10.56535/jmpm.v48i1.229>
- Thoa, H. K., Trúc, P. T., Nguyễn, P. V., Anh, P. T., Thường, N. Q., & Nhi, L. T. K. (2020). Sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số mẫu tinh dầu sả chanh trồng ở Tuyên Quang. *Tạp chí Y học Cộng đồng*, 4(57), 72 – 75.
- Thongchai, T., Suchanya, C., & Waya, S. P. (2017). Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1330–1346.  
<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1339669>
- Thường, T. T. D., Oanh, N. T. K., Giang, K. L. T., & Bảo, B. C. Kết quả thử nghiệm trên dòng tế bào thận của người Hek-293 của 20 bài thuốc dân gian thu thập tại tỉnh Sóc Trăng. (2019). *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 4(23), 68-74.
- Thúy, N. T., Hương, L. T., & Thanh, N. T. (2021). Tình trạng dinh dưỡng của người bệnh ung thư dạ dày trong quá trình điều trị hóa chất tại bệnh viện K năm 2020 – 2021. *Tạp chí Nghiên cứu Y*

học, 146(10), 140-149.

<https://doi.org/10.52852/tencyh.v146i10.460>

Tim M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. (1983). *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Tường, N. V., Thu, L. T. M., Xuân, L. N. T., Khương, N. Q. (2022). Phân lập, tuyển chọn và

định danh vi khuẩn cố định đạm nội sinh từ cây khóm trồng trên đất phèn Vị Thanh, Hậu Giang. *Khoa học Công nghệ*, 2, 32-41.

Viện Chiến lược. (2011). Chính sách tài nguyên và môi trường. *Tài nguyên, môi trường biển: Vấn đề và một số giải pháp*.

<https://isponre.gov.vn/en/news/policy-dialogues/tai-nguyen-moi-truong-bien-van-de-va-mot-so-giai-phap-859.html>