

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ  
ĐẠI TRỰC TRÀNG NGƯỜI CỦA ADIPORON *IN VITRO*

Bùi Lan Anh<sup>1,2</sup>, Nhâm Thị Phương Linh<sup>2</sup>  
Phạm Quỳnh Chi<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Mai Ly<sup>2,3</sup>  
Ngô Thu Hằng<sup>1</sup>, Bùi Khắc Cường<sup>1,2</sup>

**Tóm tắt**

**Tổng quan:** Con đường tín hiệu Adiponectin/AMPK thực hiện nhiều chức năng chuyển hóa năng lượng và chi phối một số tín hiệu nội bào có liên quan đến bệnh sinh ung thư. Tác động vào con đường tín hiệu Adiponectin/AMPK có tiềm năng hiệu quả kháng ung thư. **Mục tiêu:** Đánh giá tác dụng kháng ung thư đại trực tràng (UTĐTT) *in vitro* của AdipoRon, một chất chủ vận thụ thể Adiponectin. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu tiến hành theo phương pháp thực nghiệm, sử dụng các phương pháp nuôi cấy tế bào, MTT và qRT-PCR để đánh giá tác dụng của AdipoRon lên tăng sinh tế bào ung thư và biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 1 và AMPK $\alpha$ 2. **Kết quả:** AdipoRon ức chế tế bào HCT116 tăng sinh quan sát trên kính hiển vi và qua thử nghiệm MTT. Đồng thời, AdipoRon thúc đẩy tế bào tăng cường biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 2 với liều điều trị 30  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). **Kết luận:** AdipoRon có khả năng ức chế tế bào UTĐTT người dòng HCT116 tăng sinh và thúc đẩy dòng tế bào này tăng cường biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 2 *in vitro*.

\* Từ khoá: Adiponectin; AMPK; Ung thư đại trực tràng; AdipoRon.

THE ANTICANCER EFFECT OF ADIPORON ON HUMAN  
COLORECTAL CANCER CELLS *IN VITRO*

**Summary**

**Background:** Adiponectin/AMPK signaling pathway Adiponectin plays multiple functions on energy metabolism and contributes to several intracellular

<sup>1</sup>Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu Động vật Thực nghiệm, Học viện Quân y

<sup>3</sup>Bộ môn - Khoa Sinh hóa, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Người phản hồi: Bùi Khắc Cường (buihaccuong@gmail.com)

Ngày nhận bài: 06/9/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 28/9/2022

signaling pathways related to carcinogenesis. Targeting Adiponectin/AMPK signaling pathway has potential anticancer effects. **Objectives:** To evaluate the anticancer effect of AdipoRon, an Adiponectin receptor agonist, on colorectal cancer *in vitro*. **Materials and methods:** The study was conducted by experimental method, using cell culture, MTT, and qRT-PCR methods to evaluate the effect of AdipoRon on cell proliferation and mRNA expression of AMPK $\alpha$ 1 and AMPK $\alpha$ 2. **Results:** AdipoRon inhibited HCT116 cell proliferation observed in microscopy and by MTT assay. Simultaneously, AdipoRon promoted intracellular expression of AMPK $\alpha$ 2 mRNA at a therapeutic dose of 30  $\mu$ M ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** AdipoRon has an ability to inhibit the cell proliferation of human colorectal cancer HCT116 cell line and promote these cells to enhance AMPK $\alpha$ 2 mRNA expression *in vitro*.

\* **Keywords:** Adiponectin; AMPK; Colorectal cancer; AdipoRon.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Globocan năm 2020, UTĐTT đứng thứ 3 với 1.931.590 (10%) ca mắc mới và đứng thứ 2 trên thế giới với 935.173 (9,4%) ca tử vong trên tổng số các loại ung thư. Các phương pháp điều trị thông thường tiêu chuẩn cho UTĐTT là phẫu thuật, hóa trị và xạ trị hoặc kết hợp. Với tỷ lệ chẩn đoán muộn và tái phát cao, hiệu quả điều trị còn hạn chế và nhiều tác dụng phụ, việc nghiên cứu tìm kiếm các phương pháp điều trị thay thế và hiệu quả hơn rất cần thiết. Hiện nay, các phương pháp điều trị nhắm đích cho thấy nhiều tiềm năng như ứng dụng các phương pháp nhắm đích PD-1, EGFR... [1]. Kết quả các nghiên cứu

đều ghi nhận việc điều trị nhắm đích là an toàn và hiệu quả trên một số nhóm bệnh UTĐTT nhất định.

Adiponectin thực hiện nhiều chức năng trao đổi chất liên quan đến chuyển hóa năng lượng. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, sự giảm nồng độ Adiponectin huyết tương liên quan đến tăng nguy cơ phát triển ung thư và Adiponectin chi phối một số con đường tín hiệu nội bào như AMPK, mTOR, PI3K/Akt, MAPK, STAT3, NF- $\kappa$ B... có liên quan đến bệnh sinh ung thư [2]. AMPK được coi như một cảm biến về trạng thái năng lượng tế bào và kiểm soát tăng sinh tế bào. Do đó, tác động vào con đường tín hiệu Adiponectin/AMPK có tiềm năng đem

lại hiệu quả kháng ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng AdipoRon là một loại hoạt chất chủ vận thụ thể Adiponectin phân tử nhỏ, có tác động lên cả hai thụ thể AdipoR1 và AdipoR2 và tạo ra các hiệu ứng sinh học tương tự Adiponectin [3] nhằm: *Khảo sát tác dụng ức chế ung thư của nó trên UTĐTT người in vitro.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

Chất chủ vận Adiponectin: AdipoRon ( $C_{27}H_{28}N_2O_3$ ) là chế phẩm của công ty: Sigma Aldrich. Co (Hoa Kỳ) với tên thương mại: SML0989-5MG; Dòng tế bào UTĐTT ở người: HCT116 (mã ATCC: CCL-247).

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp thực nghiệm.

\* *Kỹ thuật nuôi cấy tế bào:*

Nuôi cấy tế bào được thực hiện với dòng tế bào UTĐTT người: HCT116. Môi trường nuôi cấy tế bào gồm RPMI bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh (Penicillin), tế bào được nuôi trên đĩa nuôi cấy đường kính 10 cm.

\* *Thử nghiệm MTT:*

Trong thử nghiệm MTT, các tế bào chết mất khả năng chuyển hoá muối

Tetrazolium thành sản phẩm có màu Formazan, còn các tế bào sống qua quá trình trao đổi chất tích cực sẽ chuyển MTT (3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) có màu vàng thành sản phẩm Formazan có màu tím không hòa tan nhờ tác dụng của enzyme reductase của ty thể trong tế bào. Formazan sau đó được hòa tan và sản phẩm màu được định lượng bằng đo mật độ quang ở bước sóng gần 570 nm. Mật độ quang đo được tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống có mặt trong các giếng nuôi cấy. Nồng độ AdipoRon được thử nghiệm từ 10 - 50  $\mu$ M trong thử nghiệm MTT trên đĩa 96 giếng sau 72 giờ theo công thức dưới đây nhằm đánh giá đáp ứng điều trị. Hai liều điều trị 10 và 30  $\mu$ M được sử dụng trong các thử nghiệm tiếp theo của nghiên cứu.

$$\%OD = \frac{OD \text{ nhóm điều trị}}{OD \text{ nhóm chứng}} \times 100$$

\* *Phương pháp qRT-PCR:*

Kỹ thuật qRT-PCR sử dụng nguyên lý phản ứng chuỗi trong tổng hợp DNA để định lượng sự biểu hiện theo thời gian thực của các mục tiêu mRNA sau khi chuyển đổi thành cDNA. Tế bào UTĐTT HCT 116 được nuôi trên đĩa 6 cm trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 24 giờ nuôi cấy, tiến hành

điều trị với AdipoRon 10 và 30  $\mu$ M. Sau 24 giờ điều trị, tế bào được thu hoạch, tách chiết mRNA, tổng hợp cDNA và sử dụng phương pháp qRT-PCR để định lượng biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 1, AMPK $\alpha$ 2 và GAPDH với các môi và chu trình nhiệt tương ứng như sau:

Bảng 1: Danh mục tên và trình tự của các đoạn môi.

Tên môi	Trình tự
Hu-AMPK $\alpha$ 1-F	CGGCAAAGTGAAGGTTGGCAAA
Hu-AMPK $\alpha$ 1-R	CAAATAGCTCTCCTCCTGAGAC
Hu-AMPK $\alpha$ 2-F	ATGGGAGGGTGCCACAAAGAAG
Hu-AMPK $\alpha$ 2-R	ACGGGTTGAAGAGATGGAAGCCAG
Hu-GAPDH-F	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA
Hu-GAPDH-R	TGTCATCATATTTGGCAGGTT

Chu trình nhiệt của phản ứng qRT-PCR: Giai đoạn 1: Hoạt hóa (1 chu kỳ): 95 $^{\circ}$ C x 10 phút; Giai đoạn 2: Khuếch đại (45 chu kỳ): 95 $^{\circ}$ C x 15 giây, 55 $^{\circ}$ C x 30 giây, 72 $^{\circ}$ C x 30 giây; Giai đoạn 3: Đường cong nóng chảy (1 chu kỳ, 65 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C gia nhiệt 0,5 $^{\circ}$ C/5 giây). So sánh kết quả biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 1 và AMPK $\alpha$ 2 giữa các nhóm được tiến hành theo công thức Delta Delta Ct sau khi tính toán Delta Ct so với nội chứng GAPDH của từng nhóm.

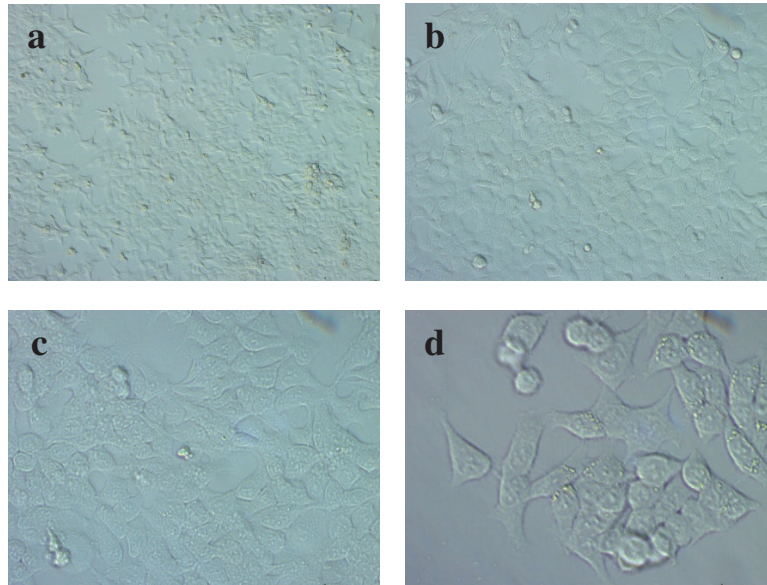
*Xử lý số liệu:* Bằng phần mềm GraphPad Prism 8.4.3. Dữ liệu được kiểm tra bằng phép thử ANOVA một chiều, hai chiều với kiểm định posthoc

của Tukey được thực hiện với các số liệu có so sánh giữa từng cặp nhóm thử nghiệm.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

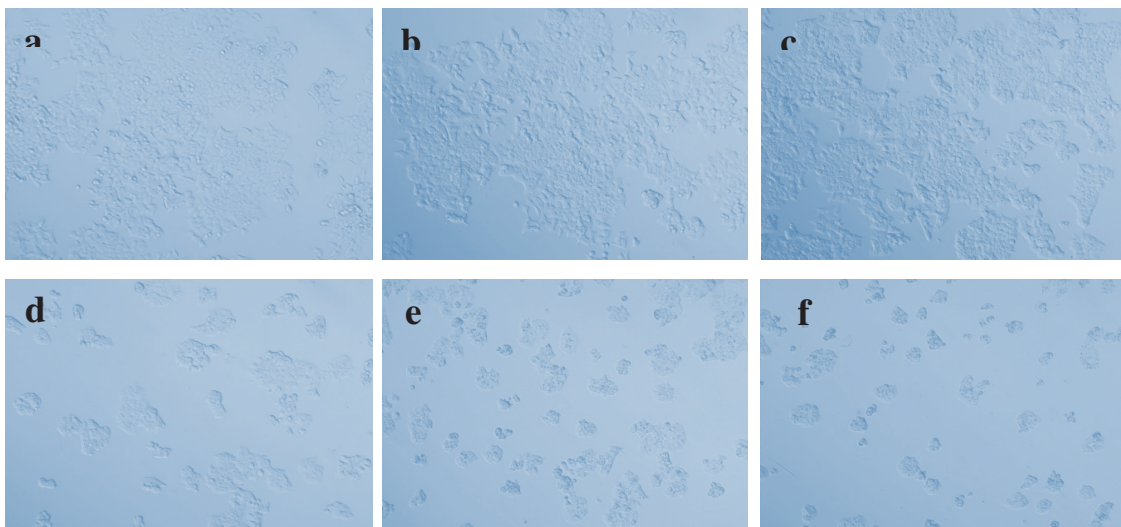
### 1. Nuôi cấy và tăng sinh tế bào HCT116

Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào UTĐTT HCT116 được nuôi cấy trong môi trường RPMI (bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh) và đĩa tế bào được duy trì trong tủ ấm ở nhiệt độ 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ . Kiểm tra và quan sát các đĩa tế bào hằng ngày. Kết quả ở hình 1 cho thấy tế bào HCT116 tăng sinh tốt trong điều kiện nuôi cấy.



Hình 1: Tế bào HCT116 phát triển và bám đáy đĩa nuôi cấy.  
(a): Tế bào dưới vật kính 10X; (b): Tế bào dưới vật kính 20X;  
(c): Tế bào dưới vật kính 40X; (d): Tế bào dưới vật kính 63X.

## 2. AdipoRon ức chế sự tăng sinh của tế bào HCT116 qua thử nghiệm MTT



Hình 2: Sự thay đổi hình thái và mật độ tế bào HCT116 ở nhóm chứng và các nhóm điều trị bằng AdipoRon sau 72 giờ (dưới vật kính 10X).  
Hình ảnh tế bào (a) Nhóm chứng; Hình ảnh tế bào được điều trị bằng AdipoRon ở các nồng độ: (b) 10 μM; (c) 20 μM; (d) 30 μM; (e) 40 μM; (f) 50 μM

Bảng 2: Đáp ứng liều AdipoRon bằng thử nghiệm MTT ở các nhóm điều trị thời điểm 72 giờ.

Đáp ứng liều AdipoRon	Tỷ lệ tế bào sống ( $\bar{X} \pm SD\%$ )	Giá trị p khi so sánh với Nhóm chứng
Nhóm chứng	100,00 $\pm$ 5,47	
Nhóm AdipoRon 10 $\mu$ M	74,73 $\pm$ 4,13	< 0,0001
Nhóm AdipoRon 20 $\mu$ M	59,78 $\pm$ 4,46	
Nhóm AdipoRon 30 $\mu$ M	46,66 $\pm$ 1,83	
Nhóm AdipoRon 40 $\mu$ M	39,11 $\pm$ 2,71	
Nhóm AdipoRon 50 $\mu$ M	31,94 $\pm$ 2,90	

Kết quả cho thấy AdipoRon ức chế tế bào HCT116 tăng sinh ở cả hình ảnh quan sát trên kính hiển vi cũng như qua thử nghiệm MTT; Tỷ lệ tế bào sống giảm dần khi nồng độ điều trị của AdipoRon tăng dần.

Hai nồng độ AdipoRon 10  $\mu$ M và 30  $\mu$ M được lựa chọn để sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

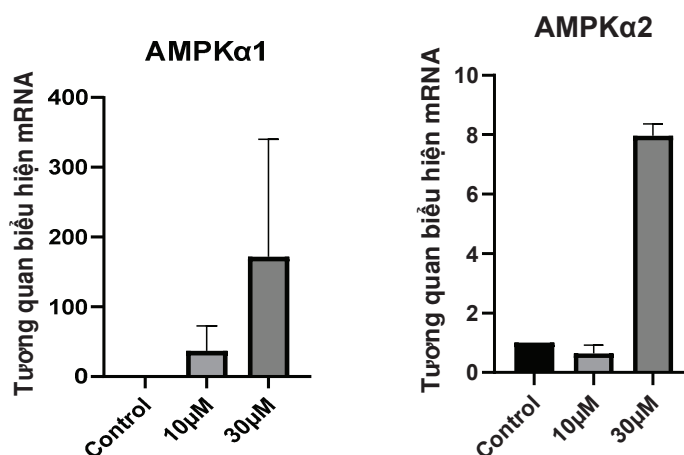
*\* Kết quả tỷ lệ tế bào HCT116 sống sót sau điều trị với AdipoRon ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ:*

Sau khi các tế bào HCT116 điều trị bằng AdipoRon, tiến hành thử nghiệm MTT tại các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Mật độ quang đo được tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống sót có mặt trong các giếng nuôi cấy, từ đó thấy được khả năng ức chế tăng sinh tế bào HCT116 của AdipoRon.

Bảng 3: Kết quả tỷ lệ tế bào HCT116 sống sót ở các nhóm nghiên cứu bằng thử nghiệm MTT sau 24 giờ điều trị.

Đáp ứng liều AdipoRon	Tỷ lệ tế bào sống sau 24 giờ ( $\bar{X} \pm SD\%$ )	Tỷ lệ tế bào sống sau 48 giờ ( $\bar{X} \pm SD\%$ )	Tỷ lệ tế bào sống sau 72 giờ ( $\bar{X} \pm SD\%$ )
Nhóm chứng (1)	100,00 $\pm$ 4,95	100,00 $\pm$ 17,32	100,00 $\pm$ 4,32
Nhóm AdipoRon 10 $\mu$ M (2)	94,57 $\pm$ 8,22	85,76 $\pm$ 17,72	78,60 $\pm$ 5,00
Nhóm AdipoRon 30 $\mu$ M (3)	54,16 $\pm$ 3,49	60,76 $\pm$ 11,66	54,40 $\pm$ 5,00
p	$p_{1-2} = 0,0094$	$p_{1-2} = 0,0002$	$p_{1-2} < 0,0001$
	$p_{1-3} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$
	$p_{2-3} < 0,0001$	$p_{2-3} < 0,0001$	$p_{2-3} < 0,0001$

Tỷ lệ tế bào sống ở nhóm điều trị AdipoRon đều giảm dần theo nồng độ AdipoRon, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nhóm điều trị AdipoRon 10  $\mu$ M và 30  $\mu$ M so với nhóm chứng và giữa hai nhóm điều trị với nhau. Đồng thời, ở nhóm điều trị AdipoRon 10  $\mu$ M cho thấy xu hướng Tỷ lệ tế bào sống sót giảm dần theo thời gian điều trị (Bảng 3)



Hình 3: Kết quả biểu hiện mRNA trên tế bào HCT116 sau điều trị với AdipoRon.

Sau 24 giờ điều trị với AdipoRon cho thấy xu hướng tăng cường biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 1 và AMPK $\alpha$ 2 trên tế bào HCT116. Tuy nhiên, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê đối với biểu hiện của mRNA của AMPK $\alpha$ 2 ở nhóm điều trị 30  $\mu$ M so với nhóm chứng ( $p < 0,0001$ ).

### BÀN LUẬN

Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã xác định Adiponectin là một Adipokine chống ung thư tiềm năng. Do đó, tác động vào con đường tín hiệu Adiponectin được đề xuất như một phương pháp tiếp cận dược lý tiềm năng trong cả phòng ngừa và điều trị ung thư. Tuy nhiên, những hạn chế nội tại của adiponectin như khối lượng phân tử lớn, thời gian bán hủy và độ ổn định ngăn cản trở ứng dụng nó trên lâm sàng. Cho nên những chất chủ vận thụ thể Adiponectin được nghiên cứu nhằm khắc phục các hạn chế khi sử dụng Adiponectin nhưng vẫn đảm bảo đầy đủ các đặc tính dược lý giống như Adiponectin. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy đặc tính chống ung thư trong các mô hình ung thư tiền lâm sàng khác nhau của AdipoRon, một chất chủ vận của thụ thể Adiponectin, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng của AdipoRon trong UTĐTT. A Young Kim và CS (2020) đã nghiên cứu Adiponectin ảnh hưởng đến sự tăng trưởng tế bào ung thư đại tràng. Adiponectin làm giảm sự tăng sinh tế bào HCT116 có phụ thuộc vào liều lượng điều trị nhưng không ức chế sự phát triển của tế bào HEK293 và RPE1. Sự biểu hiện quá mức của Adiponectin làm giảm sự tăng sinh của các tế bào ung thư đại tràng [4].

Nghiên cứu của Huang M. và CS (2018) cho thấy khả năng của Adiponectin ức chế sự tăng sinh và gây ra apoptosis ở tế bào HCT116 UTĐTT [5]. Kết quả trong nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học cho nghiên cứu của chúng tôi về cơ chế hoạt động của AdipoRon - chất chủ vận thụ thể của Adiponectin trên tế bào UTĐTT HCT116.

AMPK (*5'-AMP-Activated Protein Kinase*) là một cảm biến về trạng thái năng lượng tế bào được biểu hiện trong hầu hết các tế bào nhân thực, bao gồm nguyên sinh vật, nấm, thực vật và động vật. AMPK có vai trò chính trong việc điều hòa chuyển hóa lipid và protein của tế bào để đáp ứng với các kích thích như luyện tập thể lực, thay đổi nguồn cung cấp năng lượng, các hormone như leptin và Adiponectin có nguồn gốc từ tế bào mỡ. Do đó, sự hoạt hóa AMPK sẽ dẫn đến bắt giữ chu trình tế bào và ức chế sự phát triển của khối u, cho nên AMPK đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa ung thư [6]. Nghiên cứu của A. Young Kim và CS (2010) đã kiểm tra mức độ phosphoryl hóa AMPK trong tế bào HCT116 khi điều trị, cho thấy Adiponectin làm tăng pAMPK trên tế bào HCT116. Nghiên cứu của WANG Shu-Juan và CS (2020) thông báo AdipoRon ức chế sự tăng sinh của các



dòng tế bào u tủy và tăng cường mức độ biểu hiện p-AMPK của tế bào. Một số nghiên cứu gần đây cũng ghi nhận đặc tính chống ung thư của AdipoRon trong các mô hình ung thư tiền lâm sàng khác nhau, đặc biệt ung thư biểu mô tuyến ống tụy, ung thư vú, ung thư buồng trứng và u tủy [7].

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy AdipoRon có khả năng ức chế tế bào UTĐTT người dòng HCT116 tăng sinh và thúc đẩy dòng tế bào này tăng cường biểu hiện mRNA của AMPK $\alpha$ 2 *in vitro*.

\* Tài trợ: “Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2019.324”.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cercek, A., et al. PD-1 blockade in mismatch repair-deficient, locally advanced. *Rectal Cancer*, 2022; 386(25):2363-2376.

2. Li, G., et al. Mechanisms underlying the anti-proliferative actions of Adiponectin in human breast cancer cells, MCF7-dependency on the

cAMP/protein kinase-A pathway. *Nutr Cancer*, 2011; 63(1):80-8.

3. Okada-Iwabu, M., et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*, 2013; 503(7477):493-9.

4. Kim, K.Y., et al. Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation. *Cancer Res*; 2009; 69(9):4018-26.

5. Huang, M., et al. Adiponectin inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer HCT116 cells. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*; 2018; 34(3):253-259.

6. Wang, Z., et al., AMPK and Cancer in AMP-activated Protein Kinase, M.D. Cordero and B. Viollet, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 203-226.

7. Ramzan, A.A., et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon induces apoptotic cell death and suppresses proliferation in human ovarian cancer cells. *Mol Cell Biochem*; 2019; 461(1-2):37-46.