

TỔNG QUAN: ĐA DẠNG CHỦNG *BACILLUS THURINGIENSIS* VÀ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TRONG TIÊU DIỆT TẾ BÀO UNG THƯ Ở VIỆT NAM

MINI-REVIEW: DIVERSITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS AND POTENTIAL OF APPLICATION FOR KILLING CANCER CELL IN VIETNAM

Cáp Kim Cương^{1*}, Lê Thị Mai², Nguyễn Minh Lý²

¹Trường Đại học Quốc gia Kangwon, Hàn Quốc; kimcuong.cap@gmail.com

²Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng; ltmai_smt@ued.udn.vn, nmly@ued.udn.vn

Tóm tắt - Các chủng *Bacillus thuringiensis* được nghiên cứu và ứng dụng từ rất lâu trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là nông nghiệp. Khoảng 20 năm trở lại đây, ngày càng xuất hiện nhiều công bố *Bacillus thuringiensis* tiêu diệt tế bào ung thư nhờ vào đặc tính đặc biệt của các protein Paraspore. Các protein của *Bacillus thuringiensis* hay của vi khuẩn khác có đặc tính không phân giải tế bào máu, không diệt côn trùng nhưng có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Việt Nam có điều kiện tự nhiên có khả năng chứa nguồn gen *Bacillus thuringiensis* phong phú, và hơn 3500 chủng *Bacillus thuringiensis* bản địa đã được phân lập. Trong đó 4 chủng sản sinh Paraspore trong tất cả 19 chủng được ghi nhận chính thức trên thế giới (chiếm 21%). Các số liệu đó cho thấy, tiềm năng ứng dụng *Bacillus thuringiensis* ở Việt Nam trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư là rất lớn. Nếu mở rộng địa điểm nghiên cứu trên khắp cả nước, cơ hội để tìm ra các chủng *Bacillus thuringiensis* sản sinh Paraspore tiêu diệt tế bào ung thư là có cơ sở.

Từ khóa - *Bacillus thuringiensis*; nghiên cứu ung thư; paraspore; vi khuẩn; Việt Nam.

Abstract - *Bacillus thuringiensis* strains have been studied and applied in diverse fields, especially in agriculture. In the past 20 years, there have been many studies on the ability of killing cancer cells of the *Bacillus thuringiensis* thanks to its Paraspore proteins. The *Bacillus thuringiensis* and related bacterial paraspore proteins are non-hemolytic and non-insecticide, yet capable of preferentially killing cancer cells. The natural condition of Vietnam contains rich *Bacillus thuringiensis* genes with more than 3500 local strains being isolated. Four Vietnamese *Bacillus thuringiensis* strains are known to produce Paraspore, accounting for 21% globally recognized strains (19 in total). These figures implies that, isolation of *Bacillus thuringiensis* in Vietnam for cancer cell treatment is very promising. On this basis, it necessitates expanding and establishing more research sites in the whole country to increase the chance to find new *Bacillus thuringiensis* Paraspore producer strains capable of killing cancer cells.

Key words - *Bacillus thuringiensis*; cancer research; paraspore; bacteria; Vietnam.

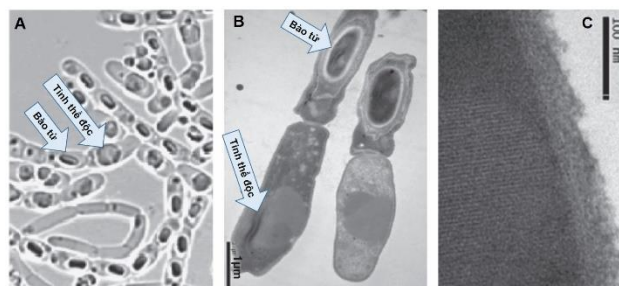
1. Đặt vấn đề

Vi khuẩn là một nhóm lớn của vi sinh vật với đặc trưng năng lực chuyển hóa mạnh mẽ và khả năng sinh sản nhanh chóng đã có những đóng góp to lớn trong tự nhiên và đời sống con người hàng ngàn năm qua. Hiểu biết về vi khuẩn nâng lên mở ra nhiều hướng ứng dụng trong nông nghiệp, thực phẩm, chăn nuôi thú y, nuôi trồng thủy sản, y học, xử lý chất thải...

Bacillus thuringiensis (Bt) là một loài vi khuẩn Gram dương hiếu khí; Sống trong đất, trong nước, lá cây, côn trùng, tuyến trùng...; Có khả năng tạo ra các tinh thể protein độc trong quá trình sinh bào tử [1] (Hình 1). Bt là một thành viên của họ Bacillaceae, thuộc nhóm *Bacillus cereus* bao gồm các loài *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, và *B. weihenstephanensis* [2]. Ứng dụng nổi bật nhất của Bt trong thế kỷ qua là trong lĩnh vực nông nghiệp, chế tạo thuốc trừ sâu sinh học diệt côn trùng gây hại [3]. Tính đến nay các nhà khoa học Việt Nam cũng có khoảng thời gian nghiên cứu và ứng dụng thuốc trừ sâu sinh học Bt hơn 35 năm [4].

Từ năm 1973-1974 đã có công bố về độc tố của vi khuẩn Bt tiêu diệt tế bào ung thư của các nhà khoa học Ấn Độ [6], [7]. Nhưng hướng nghiên cứu này phát triển mạnh mẽ khoảng hơn 20 năm trước, từ các nhà khoa học Nhật Bản [8]. Đặc biệt, những năm gần đây có hàng loạt các bài báo công bố tác dụng chống tế bào ung thư của Bt từ các nhà khoa học trên thế giới. Việt Nam là nước có nguồn gen Bt dồi dào, đặc biệt là một trong số ít các nước trên thế giới có các chủng Bt sản sinh ra Paraspore (PS - một loại

protein có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư đặc hiệu) [8], [9], [10]. Cho đến nay, Việt Nam có 02 bài báo về tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư của các protein sản sinh bởi Bt vào năm 2006 [11] và 2008 [12]. Một số lượng công trình khá khiêm tốn nếu so với nguồn gen của Bt trong tự nhiên, và cũng cho thấy tiềm năng ứng dụng Bt trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư còn rất lớn.



Hình 1. Bào tử và tinh thể độc của Bt chủng LM1212 [5].

(A) KHV quang học, (B) KHV điện tử, (C) mạng lưới của tinh thể độc dưới KHV điện tử

2. Sơ lược về các loại độc tố của *Bacillus thuringiensis*

Bt có hai pha riêng biệt trong quá trình phát triển tế bào: Phân chia tế bào sinh dưỡng (viết tắt: sinh dưỡng) và hình thành bào tử (viết tắt: bào tử) [1]. Trong cả hai pha, Bt sản sinh ra các protein gây độc cho côn trùng, tuyến trùng, động vật nguyên sinh và động vật có vú. Các độc tố Bt xác định mục tiêu cụ thể của chúng thông qua nhận dạng các protein thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào đích [10].

Protein Cry (Crystal protein) là độc tố được biết đến và công bố nhiều nhất từ Bt. Cry gây độc tế bào cho ấu trùng

côn trùng ảnh hưởng đến cây trồng [3]. Hơn nữa, một số độc tố Cry như Cry4A, Cry4B và Cry11A có tác dụng hiệp đồng với độc tố Cyt chống lại các vector ấu trùng gây bệnh ở người [3], [10].

PS là một nhóm nhỏ các Cry nhưng không có cấu trúc tương đồng cao với Cry, không có hoạt tính diệt côn trùng và tế bào bình thường, có thể tiêu diệt nhiều loại tế bào ung thư bằng cách nhận ra các thụ thể màng cụ thể, sau khi đã được hoạt hóa bởi các enzym phân giải thành các phân tử polypeptide nhỏ hơn [8], [9].

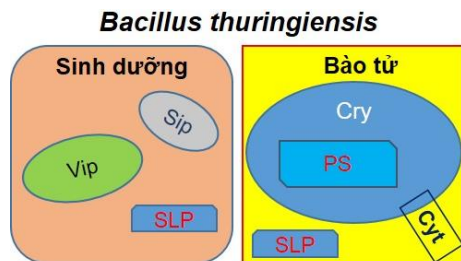
Độc tố Cyt (**C**ytolytic protein) có cấu trúc hầu như khác xa độc tố Cry. Những độc tố này ảnh hưởng chủ yếu đến muỗi là vector của các bệnh ở người [10].

Độc tố Cry, PS và Cyt được biểu hiện trong quá trình hình thành bào tử, có thể tạo thành các tinh thể protein độc [10].

Protein lớp bề mặt (Surface Layer Protein: SLP) được sản sinh bởi hầu hết các vi khuẩn, vi khuẩn cổ và cả Bt. SLP được sản xuất bởi Bt có độc tính chống lại bộ cánh cứng, và có thể tương tác với các thụ thể màng của tế bào ung thư người để tiêu diệt chúng [10], [13]. SLP có thể được biểu hiện trong cả hai pha của quá trình phát triển Bt [10].

Trong giai đoạn sinh dưỡng, Bt cũng tạo ra độc tố Vip (**V** egetative **i** nsecticidal **p** roteins) và độc tố Sip (**S** ecreted **i** nsecticidal **p** roteins) có hoạt tính tiêu diệt côn trùng [10].

Cho đến nay độc tố Bt đã được phân lập và phân loại thành ít nhất 78 họ Cry, 3 họ Cyt, 6 họ PS, 1 họ SLP, 1 họ Sip và 4 họ Vip [10].



Hình 2. Các loại độc tố biểu hiện ở hai pha trong quá trình phát triển của Bt

3. Đa dạng chủng *Bacillus thuringiensis* ở Việt Nam

Về tổng thể, có thể xem xét các số liệu sau để thấy rằng đa dạng chủng Bt của Việt Nam là rất phong phú và còn có thể được phát hiện nhiều hơn nữa. Trong cuốn sách “Cây trồng chuyển gen trong nông nghiệp - Mười năm kinh nghiệm của Ủy ban Kỹ thuật Sinh học phân tử Pháp” của Axel Kahn xuất bản năm 1999, có khoảng 50000 chủng Bt đã được phân lập từ các nguồn khác nhau (đất, thực vật, côn trùng...) và từ nhiều vùng địa lý khác nhau trên thế giới [14]. Riêng Việt Nam, theo số liệu công bố của Ngô Đình Bình, năm 2005 có 1080 chủng Bt đã được phân lập [15], con số đó tăng lên gấp 3,24 lần vào năm 2010 với 3500 chủng được phân lập [4]. Số liệu mới nhất về số chủng Bt ở Việt Nam năm 2015 trong cuốn sách “Đa dạng sinh học toàn cầu - Tập 1: Các quốc gia Châu Á” của T. Pullaiah là 7364 chủng [16].

Việt Nam nằm ở bắc bán cầu cận nhiệt đới, nằm trải dài theo kinh tuyến, có đặc trưng khí hậu cận nhiệt đới với nhiều khu vực khí hậu đa dạng khác nhau [17] có thể chứa

nguồn gen Bt rất dồi dào. Thực tế nhiều kết quả điều tra công bố quần thể Bt trong tự nhiên với sự đa dạng lớn về huyết thanh học và có đặc điểm phân bố cao nhất trong đất, ở phía đông nam Châu Á [11]. Những phát hiện này cho thấy, môi trường tự nhiên ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới khu vực này là nguồn chứa Bt phong phú [11].

Nghiên cứu và công bố quốc tế về bộ sưu tập các chủng Bt của Việt Nam đáng kể nhất thuộc về Ngô Đình Bình hợp tác với các nhà khoa học Nhật Bản và Việt Nam năm 2005. Theo đó, Bt là nhóm đa dạng nhất trong bộ sưu tập vi sinh vật của Việt Nam, với 1080 chủng đã được phân lập (Bảng 1) [15].

Bảng 1. Chủng Bt của Việt Nam và một số nước khác

Nước	Số chủng Bt	Bt trích dẫn ở VCM	Năm thu mẫu
Hàn Quốc	4	Chủng tham khảo	2000
Nhật Bản	5	Chủng tham khảo	2001
Pháp	32	Chủng tham khảo	2000
Mỹ	78	Chủng đại diện	2000-2003
Việt Nam	1080	Phân lập được	1975-2005

(VCM: Vietnam Collection of Microorganism - Bộ Sưu tập Vi sinh vật của Việt Nam - thành lập năm 1993, thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

Cho đến năm 2010, bộ sưu tập Bt của Việt Nam là một trong những bộ sưu tập lớn nhất trên thế giới với hơn 3500 chủng phân lập, trong đó có 114 chủng kháng nguyên chuẩn quốc tế dùng cho sản xuất 78 kit huyết thanh cho phân loại [4]. Qua so sánh với các chủng Bt trên thế giới, các chủng Bt của Việt Nam rất đa dạng về cấu trúc tinh thể độc tố (hình tháp chiếm 63,1%, hình cầu 11,2%, hình khối lập phương 4,8%...), đa dạng về typ huyết thanh, và đặc biệt đa dạng về gen mã hóa protein diệt côn trùng cánh vẩy (Lepidoptera), cánh cứng (Coleoptera), hai cánh (Diptera), diệt tuyến trùng hại cây nông lâm công nghiệp, diệt tế bào ung thư người [4]... Trong đó, gen Cry1 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1E, Cry1F) chiếm 57%, Cry2 chiếm 5%, Cry4 (Cry4A, Cry4B) chiếm 43%, Cry8 chiếm 8%. Ngoài ra, các gen Cyt, gen Vip, gen PS cũng được phát hiện trong khoảng 1- 5% [4].

Đáng chú ý, trong danh sách chính thức của Ủy ban Phân loại và Danh pháp Parasporin (the Committee of Parasporin Classification and Nomenclature), Việt Nam là một trong số ít các quốc gia có đến 04 chủng Bt trong tự nhiên sản sinh 04 loại PS trong tổng số 19 loại PS trên thế giới (chiếm 21%) (Bảng 2) [9], [10].

Như vậy, có thể thấy Bt Việt Nam vừa có số lượng chủng rất lớn, vừa đa dạng cấu trúc tinh thể protein và gen mã hóa protein, vừa phong phú về mặt chức năng. Ngoài ra, Bt còn phân bố gần như khắp nơi trên toàn lãnh thổ Việt Nam. Các nhà khoa học Việt Nam ngày càng có nhiều nghiên cứu, công bố trong nước và quốc tế về phân lập cũng như ứng dụng của Bt ở nhiều tỉnh thành. Có thể kể đến các công trình gần đây như: Chuyển gen Cry3 của Bt vào khoai lang kháng sâu non bộ hà (2012, ở TP. HCM) [18]; Tuyển chọn các chủng Bt ở rừng ngập mặn Cần Giờ

có hoạt tính diệt sâu tơ gây hại cải (2013, ở TP. HCM) [19]; đề xuất gen Cry8Da từ Bt ở các trang trại trồng mía là vật liệu di truyền quan trọng để chuyển gen vào cây mía nhằm kiểm soát bọ hung (2013, ở Hà Nội, Hưng Yên, Hòa Bình) [20]; Tối ưu hóa điều kiện môi trường để Bt sản xuất nội độc tố delta (2014, ở Hà Nội) [21]; So sánh sự suy giảm độc tố Cry của Bt trong tự nhiên và Bt trong thuốc trừ sâu sinh học (2016, ở Hà Nội) [22]; thử nghiệm Ngô có chứa gen Cry1Ab của Bt kháng côn trùng (2016, ở Hưng Yên, Bà Rịa-Vũng Tàu, Sơn La, Đaklak) [23]; Nghiên cứu biểu hiện gen Cry2A của Bt serovar *kurstaki* MSS8.4 diệt ấu trùng ruồi nhà (2017, ở Hà Nội) [24]; Biểu hiện và tinh sạch enzym chitinase từ Bt serovar *kurstaki* MSS1.1 có khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật và diệt côn trùng gây hại (2017, ở Hà Nội) [25]; Phân lập, định danh và xác định độc tính của Bt bản địa chống lại bướm đêm gây hại *Spodoptera litura* (2018, ở Đồng Nai, Bình Dương, Tây Ninh, TP. HCM) [26]; Nghiên cứu tính kháng độc tố Cry1Ab của Bt ở trên quần thể sâu đục thân ngô Châu Á (2019, ở Sơn La, Hòa Bình, Thái Nguyên, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Nghệ An, Thanh Hóa, Đaklak, Đồng Nai, An Giang) [27]; Xác định gen Cry2A trong mẫu vi khuẩn Bt phân lập tại các tỉnh thành khu vực miền Nam Việt Nam (2019, ở Bến Tre, Lâm Đồng, Tây Ninh, TP. HCM) [28]; Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn Bt phục vụ tạo chế phẩm diệt côn trùng bộ hai cánh (Diptera) (2019, ở Hà Nội) [29]...

Phần lớn các nghiên cứu về Bt của Việt Nam tập trung ở mảng ứng dụng trong việc tiêu diệt côn trùng gây hại mà chưa có điều kiện hay chưa chú ý đến việc nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư. Với một số lượng lớn các chủng Bt phong phú, chứa đa dạng nguồn gen lớn, phân bố hầu như rộng khắp đất nước thì triển vọng trong việc tìm ra trong đó các chủng Bt có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư là có cơ sở.

4. Ứng dụng Bt trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư trên thế giới

4.1. Sơ lược nghiên cứu Bt trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư

Bt được phân lập lần đầu tiên ở Nhật Bản năm 1901 từ ấu trùng bị bệnh của tằm *Bombyx mori*. Đặc tính gây bệnh côn trùng của Bt nhờ tính thể protein độc có hoạt tính cao và đặc hiệu. Bt được ứng dụng rộng rãi trong kiểm soát côn trùng gây hại nông nghiệp, ngăn chặn các vectơ gây bệnh cho người [3]...

Càng ngày càng có nhiều nghiên cứu về các chủng Bt đã chỉ ra rằng, các protein Cry không diệt côn trùng phân bố rộng rãi hơn so với các protein Cry diệt côn trùng trong tự nhiên [10]. Thực tế này đã khiến các nhà nghiên cứu tìm hiểu về các hoạt tính sinh học hoặc các mục tiêu tiềm năng của protein Cry không diệt côn trùng. Mizuki và cộng sự, vào năm 1999, công bố độc tố delta-endotoxin từ Bt chống lại các tế bào ung thư bạch cầu, sau khi phân tích sàng lọc quy mô lớn với 1744 chủng Bt [8]. Trong đó, chỉ có 2 chủng Bt sản sinh tính thể độc tiêu diệt tế bào ung thư bạch cầu mà không ảnh hưởng đến tế bào máu bình thường [8], [30]. Kết quả này cho thấy, tỉ lệ chủng Bt sản sinh ra tính thể protein có đặc tính đặc biệt như vậy trên tổng số chủng Bt là rất nhỏ, và đó là nguồn gen rất quý cho việc nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư.

Những kết quả này đã truyền cảm hứng cho các nghiên cứu rộng rãi về các độc tố không diệt côn trùng và tế bào máu nhưng tiêu diệt các tế bào ung thư trên khắp thế giới, dẫn đến việc phân loại một loại protein mới gọi là Parasporin, là 1 dạng delta endotoxin (δ -endotoxins là các độc tố hình thành lỗ và gây chết tế bào) [30]. Trong quá trình hình thành bào tử (spore), vi khuẩn tạo ra các tinh thể protein độc (Crystal protein - do đó có tên là độc tố Cry) còn được gọi là dạng/ thể ký sinh (parasporal bodies), kết quả là hình thành tên Parasporin như ngày nay. Thuật ngữ "Parasporin" được đề xuất chính thức từ năm 2005 cho một họ protein có đặc trưng là: "Các protein của Bt hoặc các vi khuẩn khác sản sinh ra không gây phân giải tế bào máu (non-hemolytic) nhưng có khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư" [9], [31].

Các nghiên cứu sau đó đã phát hiện bổ sung thêm các PS khác: parasporin-2 (PS2), parasporin-3 (PS3), parasporin-4 (PS4), parasporin-5 (PS5) và parasporin-6 (PS6). Đến nay, 19 protein PS được nhóm thành 6 lớp theo hai loại chính: Loại protein có ba miền (domain) (gồm PS1, -3 và -6) và loại protein không có ba miền (gồm PS2, -4 và -5) dựa trên trình tự tương đồng của protein, theo mô tả của Ủy ban Phân loại và Danh pháp Parasporin [9]. Thông tin chi tiết về đặc tính của các PS được liệt kê trong Bảng 2.

Hai công trình công bố lần lượt năm 2014 [32] và 2017 [33] chứng minh các protein có đặc tính như PS (tiêu diệt tế bào ung thư, không gây độc cho tế bào máu) nhưng cũng có tính kháng côn trùng. Đây là một điều rất đặc biệt, khác với những kết quả công bố trước đây về PS. Như vậy, về mặt lý thuyết, Việt Nam có Bt với nguồn gen kháng côn trùng rất đa dạng, nếu có điều kiện sàng lọc quy mô lớn thì vẫn có thể tìm ra các gen mã hóa cho protein kháng côn trùng có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư.

Bt còn sản sinh một loại protein khác có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư vú, có tên là protein lớp bề mặt (Surface Layer Protein: SLP), được công bố lần đầu tiên vào năm 2017 bởi các nhà khoa học Mexico [13]. SLP có khối lượng phân tử vào khoảng 40-170 kDa. Độc tính của SLP vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng về mặt cơ chế hoạt động, tuy nhiên protein thụ thể Cadherin-11 của tế bào ung thư được cho là có liên quan trong việc SLP nhận dạng, tiếp cận và tiêu diệt bào ung thư.

Gần đây, các nhà khoa học công bố thêm các chủng Bt sản sinh Parasporin tiêu diệt các tế bào ung thư (nhưng chưa được Ủy ban Phân loại và Danh pháp Parasporin cập nhật) cho thấy nghiên cứu Bt trong lĩnh vực này ngày càng được chú trọng. Có thể kể đến các công trình như: Poornima và cộng sự công bố một chủng Bt sản sinh PS khác hoàn toàn với các chủng đã biết trước đây (tiền độc tố có khối lượng phân tử rất lớn, khoảng 180 kDa) tiêu diệt loại tế bào ung thư ruột kết HTC-250 (chưa có công bố nào về PS tiêu diệt HTC-250 trước đây) (Ấn Độ, 2010) [34]; Chubicka và cộng sự công bố một chủng Bt sản sinh PS tiêu diệt tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) (Ấn Độ, 2018) [35]; Beena và cộng sự công bố một chủng Bt sản sinh PS tiêu diệt dòng tế bào ung thư bạch cầu (Jurkat) (Ấn Độ, 2019) [36]; Hasan và cộng sự công bố một chủng Bt sản sinh PS tiêu diệt tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) (Bangladesh, 2019) [37]; Elham và cộng sự công bố một

chủng Bt sản sinh PS (gần giống PS2 nhưng polypeptide độc tố sau khi được phân giải có khối lượng phân tử không giống với PS2) tiêu diệt dòng tế bào ung thư ruột và ung thư máu (Iran, 2018) [38]; Lila và cộng sự công bố một chủng Bt sản sinh PS1 tiêu diệt tế bào ung thư biểu mô loại 2 (Hep2 cells) (Algeri, 2019) [39]. Các kết quả đó cho thấy, ngày càng có nhiều phát hiện về các chủng Bt sản sinh PS (có thể giống hoặc khác các PS đã biết) ở các sinh cảnh khác nhau trên thế giới, tác động tiêu diệt nhiều loại tế bào ung thư mới khác, đóng góp quan trọng cho hiểu biết của con người về kho được liệu tự nhiên chống lại ung thư.

4.2. Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của các Parasporin

PS chủ yếu được sản xuất dưới dạng protein tiền chất không hoạt động, sau khi tiếp xúc với tế bào ung thư thì được các enzym kích hoạt bởi quá trình cắt đầu amin -NH₂ (N-terminal), cắt đầu axit -COOH (C-terminal), hoặc cắt ở cả hai đầu (N-terminal và C-terminal) [40], [41].

PS1 không gây chết tế bào bằng việc hình thành lỗ. Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư bắt đầu bằng cách tăng nhanh nồng độ Ca²⁺ nội bào và gây ra chuỗi phản ứng gây chết tế bào theo lập trình (apoptosis) trong các tế bào ung thư thông qua sự kích hoạt các protein liên quan đến apoptosis như Caspase 3 [40], [41].

PS2 gây độc tế bào bằng cách tăng tính thấm màng tế bào của các tế bào ung thư mẫn cảm, thông qua các protein thụ thể liên kết và hình thành oligomer trong các màng lipid của màng dẫn đến sự hình thành lỗ và gây chết tế bào qua apoptosis. Sự oligome hóa xảy ra với sự có mặt của protein màng, lipid kép và cholesterol [40], [41].

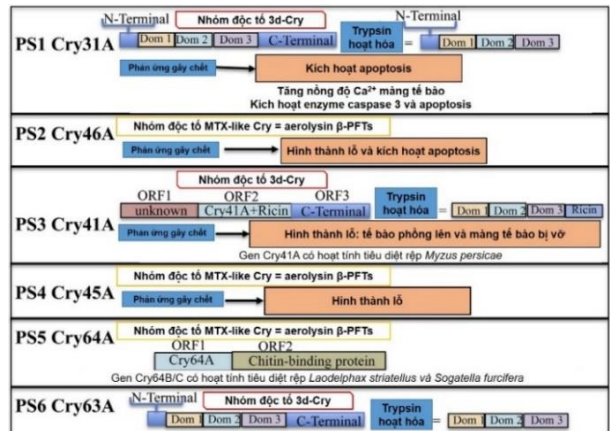
Tương tự, PS2, PS3 cũng hoạt động như một độc tố hình thành lỗ và cuối cùng gây tăng tính thấm màng khiến tế bào căng phồng lên, màng tế bào bị vỡ dẫn đến chết [41], [42]. Gen Cry41A của PS3 còn có hoạt tính tiêu diệt rệp *Myzus persicae* [41].

PS4 không gây ra chuỗi phản ứng gây chết tế bào theo lập trình đối với tế bào HeLa, độc tính của PS4 đối với các tế bào CACO-2 (dòng tế bào ung thư biểu mô đại tràng) thể hiện khi được xử lý cùng với cyclodextrin (một dạng oligomer) thì gây ra sự suy giảm cholesterol. Điều đó cho thấy, khác với các PS khác, PS4 là một độc tố hình thành lỗ đặc biệt, hoạt động độc lập với cholesterol [41], [43].

PS5 và PS6 là hai protein mới được phát hiện và phương thức hoạt động của chúng vẫn chưa được mô tả chính xác trong nghiên cứu thực nghiệm. Bằng các công cụ tin-sinh học, Nasima Aktar và cộng sự đã công bố giả thuyết cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư như sau: Sau khi được kích hoạt, PS5 liên kết với thụ thể trên màng tế bào ung thư, oligome hóa, hình thành lỗ, tăng tính thấm và cuối cùng phân giải tế bào. PS6 khi được kích hoạt liên kết với thụ thể và làm tăng Ca²⁺ nội bào, sau đó hình thành không bào và kết quả làm căng phồng tế bào dẫn đến suy thoái protein liên quan đến apoptosis [44]. Gen Cry64B/C của PS5 có hoạt tính tiêu diệt rệp *Laodelphax striatellus* và *Sogatella furcifera* [41].

Nhìn chung, các PS có độc tính chọn lọc với các tế bào ung thư mà không độc đối với các tế bào bình thường, vì chúng có thể nhận dạng các protein thụ thể đặc hiệu trên bề mặt của tế bào ung thư (mà không có ở tế bào bình thường) rồi gây ra các phản ứng tiếp theo gây chết tế bào liên quan

tới việc tăng nồng độ ion, tăng tính thấm hay kích hoạt chuỗi tín hiệu gây chết tế bào tự nhiên apoptosis [10]. Tuy nhiên, mỗi loại PS có tác dụng lên một hoặc vài dòng tế bào ung thư và việc nghiên cứu cơ chế gây chết đối với một dòng tế bào ung thư cụ thể là một thách thức không nhỏ cần có thời gian để chứng minh.



Hình 3. Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của các Parasporin [41]. (N/C-Terminal: Đầu amin/axit của protein; Dom: Miền (vùng) của protein; 3d-Cry: Độc tố Cry có 3 miền; MTX-like Cry = aerolysin β -PFTs: Các độc tố hình thành lỗ; ORF: chuỗi các codon mã hóa cho protein tương ứng phía dưới)

5. Tình hình ứng dụng *Bacillus thuringiensis* trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư ở Việt Nam

Năm 2006, Ngô Đình Bính cùng các nhà khoa học Nhật Bản và Hàn Quốc đã phân lập được 04 chủng Bt sản sinh PS1 có độc tính đối với tế bào HeLa, trong 100 mẫu đất ở 07 địa điểm của quận Hoàn Kiếm và Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam [11]. Hình thái của 04 mẫu Bt này rất giống với chủng đại diện A1190 tạo ra PS1. Báo cáo này còn chỉ ra một số điểm đáng lưu ý sau: Bt phân bố rộng rãi ở Việt Nam với mức độ cao. Tần suất của Bt trong số các quần thể đất của *Bacillus cereus* là 1,6%, giá trị này thấp hơn so với quan sát ở miền Nam bởi Martin và Travers (1989), cho thấy tiềm năng nguồn Bt ở miền Nam còn lớn hơn nhiều. Nguồn Bt phân lập được có nguồn gốc bản địa, không phải được du nhập từ nơi khác thông qua các sản phẩm thương mại. Kết quả này khiến các nhà khoa học nhận định các Bt sản sinh PS không chỉ phân bố ở Nhật Bản mà còn ở các vùng khác của Châu Á. Tại thời điểm này, Việt Nam là nước thứ hai trên thế giới phát hiện Bt sản sinh PS.

Năm 2008, Ngô Đình Bính cùng các cộng sự Nhật Bản nghiên cứu sâu hơn từ các mẫu thu được ở Hà Nội trước đó, tái khẳng định 04 mẫu Bt sản sinh PS1 ức chế tế bào ung thư HeLa và HepG2 [12]. Như vậy, hiện biết Việt Nam có 04 chủng nguồn (79-25, 92-10, 31-5 và 87-29) sản sinh ra 04 loại protein PS1 tương ứng (PS1Aa4, PS1Aa5, PS1Ab2 và PS1Ac1) (Bảng 2). Trong đó, chủng 87-29 thuộc về lớp PS1Ac - là một lớp PS mới được xác lập thông qua công bố này - có khả năng tiêu diệt cả HeLa và HepG2. Nghiên cứu này cùng với việc Canada phát hiện Bt sản sinh PS1Aa2 [45] đưa tổng số quốc gia nguồn gen quý trên lên con số ba, và các nhà khoa học nhận định vùng phân bố của các gen PS-1A có thể ở khu vực vành đai Thái Bình Dương, chứ không chỉ giới hạn ở Châu Á.

Bảng 2. Danh sách các Parasporin và đặc tính cơ bản

Protein	Chủng Bt	Gen mã hóa	Tiền độc tố (kDa)	Độc tố (kDa)	Enzym hoạt hóa	Tế bào ung thư	EC50 (µg/ml)	Cơ chế hoạt động	Nơi thu mẫu
PS1Aa1	A1190	Cry31Aa1	81	15, 56	Trypsin	HeLa	0,12	Apoptosis	Nhật Bản
PS1Aa2	M15	Cry31Aa2	83	55, 70	Trypsin	Jurkat HepG2	0,02 0,02	ND	Canada
PS1Aa3	B0195	Cry31Aa3	81	56	Trypsin	HeLa	14,7	ND	Nhật Bản
PS1Aa4	79-25	Cry31Aa4	81	ND	Proteinase K	HeLa	ND	ND	Việt Nam
PS1Aa5	92-10	Cry31Aa5	81	ND	Proteinase K	HeLa	ND	ND	Việt Nam
PS1Aa6	M019	Cry31Aa6	70	15, 55	Trypsin	HepG2	0,52	ND	Nhật Bản,
PS1Ab1	B0195	Cry31Ab1	82	56	Trypsin	HeLa	14,7	ND	Nhật Bản
PS1Ab2	31-5	Cry31Ab2	82	ND	Proteinase K	ND	ND	ND	Việt Nam
PS1Ac1	87-29	Cry31Ac1	87	ND	Proteinase K	HeLa, HepG2	ND	ND	Việt Nam
PS1Ac2	B0462	Cry31Ac2	81	15, 60	Proteinase K	HeLa	2	Apoptosis	Nhật Bản
PS1Ad1	64-1-94	Cry31Ad1	73	14, 59	Trypsin	HepG2	0,52	ND	Caribbean
PS2Aa1	A1547	Cry46Aa1	37	30	Proteinase K	HepG2	0,023	Hình thành lỗ	Nhật Bản
PS2Aa2	A1470	Cry31Aa2	30	28	Proteinase K	MOLT-4	0,041	ND	Nhật Bản
PS2Ab1	TK-E6	Cry31Ab1	33	29	Proteinase K	Jurkat	0,545 ng/ml	ND	Nhật Bản
PS3Aa1	A1462	Cry41Aa1	88	64	Proteinase K	HL60	1,32	ND	Nhật Bản
PS3Ab1	A1462	Cry41Ab1	88	64	Proteinase K	HL60	1,25	ND	Nhật Bản
PS4Aa1	A1470	Cry45Aa1	31	28	Proteinase K	CaCo2	0,124	Hình thành lỗ	Nhật Bản
PS5Aa1	A1100	Cry64Aa1	33	30	Proteinase K	TCS	0,046	ND	Nhật Bản
PS6Aa1	M019	Cry63Aa1	85	14, 59	Trypsin	HepG2	2,3	ND	Nhật Bản

Ghi chú: ND: không xác định (Tham khảo có chỉnh sửa tài liệu số [10])

Trong khu vực nhỏ, chỉ với 100 mẫu đất cho kết quả 04 chủng Bt sản sinh 04 loại PS khác nhau. Hơn nữa các nghiên cứu khác cũng chỉ ra nguồn gen Bt bản địa tiềm năng của Việt Nam là rất lớn. Nếu có những khảo sát trên qui mô rộng hơn rất có thể sẽ có những công bố mới có giá trị cho khoa học nói chung và nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư nói riêng.

6. Đề xuất hướng ứng dụng Bacillus thuringiensis trong nghiên cứu tiêu diệt tế bào ung thư ở Việt Nam

Như đề cập phần trên, Việt Nam có số lượng chủng Bt rất lớn, đa dạng nguồn gen mã hóa cho protein độc tố và phân bố hầu như khắp trên cả nước. Phân lập các Bt ở địa phương, kiểm tra PCR với tất cả các cặp mồi đặc hiệu cho gen tiêu diệt tế bào ung thư (các PS, SLP) cũng có thể có phát hiện mới.

Nhiều công bố quốc tế chỉ dừng lại ở mức đưa ra các thông số về độc tố của protein (của Bt) đối với tế bào ung thư mà chưa chứng minh được cơ chế tác dụng cụ thể. Nếu có đủ điều kiện cơ sở vật chất và kinh phí thì có thể tiến hành nghiên cứu chứng minh cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư cụ thể sẽ rất có giá trị cho khoa học và thực tiễn.

Các nghiên cứu in-vivo đối với các PS, SLP còn rất hạn chế. Cho đến nay mới chỉ có một công trình nghiên cứu về PS4 trên chuột, công bố năm 2014 [46]. Do đó, nghiên cứu in-vivo là hướng đi mới, dù có thể rất khó khăn.

7. Kết luận

Điều kiện tự nhiên đã cho Việt Nam nguồn tài nguyên Bt dồi dào được kiểm chứng qua các công bố quốc tế uy tín. Nghiên cứu trong phạm vi hẹp đã cho kết quả Việt Nam có nguồn gen PS bản địa quý chiếm 21% tổng số hiện biết trên thế giới. Cho đến nay, nghiên cứu ứng dụng Bt trong tiêu diệt tế bào ung thư chưa có điều kiện tiến hành rộng rãi ở Việt Nam, nếu mở rộng nghiên cứu trên phạm vi khắp cả nước rất có thể có nhiều công bố mới cho khoa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Leon Rabinovitch et al, Chapter 1: Bacillus thuringiensis Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. Springer International Publishing AG, 2017.

[2] David A Rasko et al, "Genomics of the Bacillus Cereus Group of Organisms", FEMS Microbiology Reviews, 29, 2005, 303-329.

[3] Georgina Sanahuja et al, "Bacillus Thuringiensis: A Century of Research, Development and Commercial Applications" Plant Biotechnology Journal, 9, 2011, 283-300.

[4] Ngô Đình Bình và cộng sự, 35 năm nghiên cứu và phát triển thuốc trừ sâu sinh học Bacillus thuringiensis tại Việt Nam, Hội nghị Khoa Học kỷ niệm 35 năm thành lập Việt Khoa học và Công nghệ Việt Nam 1975 - 2010, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2010, 288-300.

[5] Chao Deng et al, "Division of labour and terminal differentiation in a novel Bacillus thuringiensis strain", The International Society for Microbial Ecology, 9, 2014, 1-11.

- [6] Prasad et al, "Inhibitory activity of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on yoshida ascites sarcoma", *Current Science Association*, 42, 1973, 568-70.
- [7] Prasad and Shethna, "Purification, crystallization and partial characterization of the antitumour and insecticidal protein subunit from the 5-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 363, 1974, 558-66.
- [8] [8] E. Mizuki et al, "Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells", *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1999, 477-486.
- [9] Okumura et al, Parasporin nomenclature 2010, Available online: <http://parasporin.ficp.pref.fukuoka.jp/intro.html> (accessed on 19 June 2020).
- [10] Gretel Mendoza-Almanza et al, "The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells", *Toxins*, 2020;1-22.
- [11] Koichi Yasutake et al, "Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam", *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 2006, 365-372.
- [12] Koichi Yasutake et al, "Identification of Parasporin Genes in Vietnamese Isolates of *Bacillus thuringiensis*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63c, 2008, 139-143.
- [13] Viviana P. Rubio et al, "Identification of a *Bacillus thuringiensis* Surface Layer Protein with Cytotoxic Activity against MDA-MB-231 Breast Cancer Cells", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2017, 36-42.
- [14] Axel Kahn, Transgenic plants in agriculture – Ten years experience of French Biomolecular Engineering Commission, John Libbey Eurotext, 1999.
- [15] Ngo Dinh Binh et al, Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains in the Vietnam *Bacillus thuringiensis* Collection, Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, 2005.
- [16] T. Pullaiah, Global Biodiversity: Volume 1: Selected Countries in Asia, Apple Academic Press, Incorporated, 2019.
- [17] Dang-Quang Nguyen et al, "Variations of surface temperature and rainfall in Vietnam from 1971 to 2010", *International Journal of Climatology*, 34, 2014, 249-264.
- [18] Lê Xuân Thao, Nghiên cứu tạo rẽ tổ khoai lang chuyển gen cry3 kháng sâu non bọ hà (*Cylas formicarius*), Luận văn Thạc sĩ Trường ĐHKH Tự Nhiên TP HCM, 2012.
- [19] Nguyễn Thiện Phú, Trần Thanh Thủy, "Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* Từ rừng ngập mặn cần giờ có hoạt tính diệt sâu", *Tạp chí Khoa học trường ĐHSP TP HCM*, 51, 2013, 49-58.
- [20] Binh Ngo Dinh et al, "Screening, expression and characterization of scarabid crystal protein from a strain (MHB11.3) of *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* in Vietnam", *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2013, 3018-3025.
- [21] Nguyen Thi Hoa et al, "Optimization of fermentation medium compositions from dewatering wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production", *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2, 2014, 219-225.
- [22] Truong Phuc Hung et al, "Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation", *Pest Management Science*, 72, 2016, 2247-2253.
- [23] Liem Nguyen Van, Field Trials of Insect Resistant Maize Expressing Bt Gene in Viet Nam (in Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia), National Institute for Agro-Environmental Sciences, 2016, 24-27.
- [24] Phạm Thùy Dương và cộng sự, "Nghiên cứu biểu hiện gen cry2a diệt ấu trùng ruồi nhà (*Musca domestica*) của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* MSS8.4", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15, 2017, 563-569.
- [25] Trịnh Thị Thu Hà và cộng sự, "Biểu hiện và tinh sạch chitinase từ *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* trong vi khuẩn *Escherichia coli*", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15, 2017, 571-579.
- [26] Ton Bao Linh et al, "Isolation, identification, and toxicity of native *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera litura*", *Agrica*, 7, 2018, 66-73.
- [27] Duc Khanh Le et al, "Baseline susceptibility of Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis* (Guenée)) populations in Vietnam to Cry1Ab insecticidal protein", *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22, 2019, 493-498.
- [28] Trương Phước Thiên Hoàng và cộng sự, "Xác định gen cry2A trong mẫu vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập tại các tỉnh thành khu vực miền Nam Việt Nam", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 18, 2019, 109-116.
- [29] Phạm Thùy Dương, Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ tạo chế phẩm diệt côn trùng bộ hai cánh (Diptera), Luận án Tiến Sĩ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2019.
- [30] Eiichi Mizuki et al, "Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 2000, 625-634.
- [31] Hideki Katayama et al, "Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis*", *The Journal of Biochemistry*, 137, 2005, 17-25.
- [32] Leopoldo Palma et al, "Molecular and Insecticidal Characterization of a Novel Cry-Related Protein from *Bacillus thuringiensis* Toxic against *Myzus persicae*", *Toxins*, 2014, 3144-3156.
- [33] Yonglei Liu et al, "Cry64Ba and Cry64Ca, Two ETX/MTX2-Type *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins Active against Hemipteran Pests", *Applied and Environmental Microbiology*, 84, 2017, 1-11.
- [34] K. Poomima et al, "Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells", *Journal of Applied Microbiology*, 109, 2010, 348-354.
- [35] Thomas Chubicka et al, "A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway", *Journal of Biosciences*, 43, 2018, 407-416.
- [36] V. Beena et al, "Crystal protein of a Novel *Bacillus thuringiensis* strain Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptotic Cell Death in Human Leukemic Cells", *Scientific Reports*, 9, 2019.
- [37] Md Mahmud Hasan et al, "Complete genome and plasmid sequence of a novel *Bacillus* sp. BD59S, a parasporal protein synthesizing bacterium", *3 Biotech*, 318, 2019.
- [38] Elham Moazamian et al, "Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines", *Current Microbiology*, 75, 2018, 1090-1098.
- [39] Lila Aberkane et al, "In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers", *Current Microbiology*, 77, 2019, 405-414.
- [40] Michio Ohba M, and Uemori, "Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*", *Anticancer Research*, 29, 2009, 427-434.
- [41] Mario Soberón et al, "Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93, 2018, 66-78.
- [42] Satoko Yamashita et al, "Typical Three-Domain Cry Proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells", *The Journal of Biochemistry*, 138, 2005, 663-672.
- [43] Shiro Okumura et al, "Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 2011, 1476-1482.
- [44] Nasima Aktar et al, "In silico Studies of Parasporin Proteins: Structural and Functional Insights and Proposed Cancer Cell Killing Mechanism for Parasporin 5 and 6", *Microbial Bioactives*, 2, 2019, 82-90.
- [45] Y-C. Jung et al, "Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells", *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2007, 65-79.
- [46] Shiro Okumura et al, "Toxicity of Parasporin-4 and Health Effects of Pro-parasporin-4 Diet in Mice", *Toxins*, 2014, 2115-2126.