

Nghiên cứu tác dụng chống ung thư của dẫn xuất indazole C7 trên tế bào ung thư hạ họng

Study on the Anticancer Effects of the Indazole C7 Derivative in Hypopharyngeal Cancer Cells

Nguyễn Thị Kiều Trang^{a*}, Khổng Thị Hoa^a, Lê Thành Đô^b, Nguyễn Thị Ngọc Ánh^c,
Trần Bùi Ngọc Anh^d, Trần Phương Thảo^e
Nguyen Thi Kieu Trang^{a*}, Khong Thi Hoa^a, Le Thanh Do^b, Nguyen Thi Ngoc Anh^c,
Tran Bui Ngoc Anh^d, Tran Phuong Thao^e

^aKhoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình

^aFaculty of Pharmacy, Thai Binh University of Medicine and Pharmacy

^bViện Sáng kiến Sức khỏe toàn cầu, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^bInstitute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

^cSinh viên ngành Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình

^cFaculty of Pharmacy, Thai Binh University of Medicine and Pharmacy

^dSinh viên Khoa Y, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^dFaculty of Medicine, School of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

^eBộ môn Hóa dược, Trường Đại học Dược Hà Nội

^eThe Department of Medicinal Chemistry, Hanoi University of Pharmacy

(Ngày nhận bài: 22/12/2025, ngày phản biện xong: 07/01/2026, ngày chấp nhận đăng: 20/01/2026)

Tóm tắt

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) là một enzym chứa nhân hem, đóng vai trò chủ yếu trong quá trình chuyển hóa tryptophan thành kynurenine. Do chức năng ức chế miễn dịch của enzym IDO1, một số liệu pháp miễn dịch ung thư tập trung vào việc nghiên cứu và phát triển các chất ức chế enzym này nhằm khôi phục lại nồng độ tryptophan và chức năng của tế bào miễn dịch. Dựa trên cấu trúc đã được xác định rõ của vị trí hoạt động của IDO1 và vai trò then chốt của khung indazole đối với hoạt tính ức chế IDO1, chúng tôi đã thiết kế và tổng hợp một nhóm chất ức chế IDO1 mới chứa khung indazole. Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy trong nhóm dẫn xuất này, hợp chất C7 có tiềm năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi làm rõ cơ chế chống ung thư của hợp chất C7 trên tế bào ung thư hạ họng. Kết quả cho thấy C7 thể hiện độc tính trên tế bào ung thư hạ họng FaDu trong khi an toàn với tế bào gốc tủy răng người HDPSK và không có độc tính đối với tế bào ung thư vú MCF7. Về cơ chế phân tử, C7 ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào FaDu thông qua việc ức chế sự biểu hiện của các enzyme kinase phụ thuộc Cyclin và Cyclin - hai loại protein chủ chốt điều hoà chu kỳ tế bào. Ở nồng độ cao, C7 tấn công và gây ra sự đứt gãy DNA không hồi phục dẫn tới quá trình gây chết tế bào theo chương trình. Thêm vào đó, C7 còn ức chế hoạt động di chuyển và xâm lấn của tế bào FaDu. Các kết quả trên cho thấy hợp chất C7 là hợp chất ức chế IDO1 tiềm năng, thể hiện hoạt tính chống khối u mạnh trên tế bào ung thư hạ họng.

Từ khóa: ung thư hạ họng, các chất ức chế IDO1, ức chế chu kỳ tế bào, ức chế sự di căn và xâm lấn tế bào

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Kiều Trang

Email: kieustrangytb@gmail.com

Abstract

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) is a heme-containing enzyme mainly responsible for the metabolism of tryptophan to kynurenine. Due to its immunosuppressive function, the inhibitors of IDO1 have been intensively developed for the re-activation of anti-cancer immune response. Based on the well-known structure of IDO1 active site and a crucial role of indazole moiety for IDO1 inhibition activity, we synthesized a novel group of designed indazole-containing IDO1 inhibitors. *In vitro* experiments demonstrated that among this group of derivatives, compound C7 possesses potential inhibitory effects on cancer cell growth. In the present study, we elucidated the anticancer mechanisms of compound C7 on hypopharyngeal cancer. The results showed that C7 expressed cytotoxic effects on hypopharyngeal cancer cells FaDu while human dental pulp stem cells HDPSC and breast cancer cells MCF7 were tolerant to C7 treatment. At the molecular level, C7 inhibited FaDu cell proliferation by suppressing the expression of Cyclins and Cyclin-dependent kinases (cdk), which are key regulators of cell cycle progression. At higher concentrations, C7 induced irreversible DNA damage, leading to the activation of programmed cell death. In addition, C7 significantly inhibited migration, and invasion of FaDu cells. Collectively, these findings indicate that compound C7 is a promising IDO1 inhibitor and exhibits potent antitumor activity on hypopharyngeal cancer.

Keywords: Hypopharyngeal cancer, indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor, cell cycle arrest, migration and invasion inhibition

1. Giới thiệu

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) là một enzym oxi hoá-khử chứa nhân hem, đóng vai trò quan trọng trong việc khởi phát và xúc tác quá trình chuyển hóa tryptophan thành kynurenine. Sự suy giảm nồng độ tryptophan cùng với sự tích lũy các chất chuyển hóa của tryptophan trong vi môi trường khối u gây ức chế các tế bào T chức năng (effector T cells) và làm tăng cường hoạt tính của tế bào T điều hòa (regulatory T cells), từ đó thúc đẩy tế bào ung thư né tránh sự giám sát của hệ miễn dịch. IDO1 được biểu hiện ở mức cao trong hơn 50% các loại khối u [1]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên quan giữa sự biểu hiện quá mức của IDO1, vốn được cảm ứng bởi phản ứng viêm cục bộ trong khối u, với hiện tượng kháng đa thuốc, tiên lượng xấu và tỷ lệ sống thấp ở nhiều loại ung thư khác nhau [2-4]. Do tác dụng ức chế miễn dịch mạnh mẽ của IDO1, nhiều nghiên cứu đang được triển khai nhằm phát triển các chất ức chế IDO1 tiềm năng để đưa vào thử nghiệm lâm sàng trong điều trị ung thư.

Ung thư hạ họng (UTHH) là một dạng hiếm gặp của ung thư vùng đầu và cổ, có xu hướng di căn hạch cổ sớm. Tỷ lệ mắc mới hàng năm của UTHH chiếm khoảng 0,4% tổng số các ca ung thư mới trên toàn cầu. Tỷ lệ sống còn sau 5 năm của bệnh dao động lớn, từ dưới 25% ở các khối

u kích thước lớn hoặc có di căn hạch nhiều, đến khoảng 60% ở giai đoạn sớm, phụ thuộc chủ yếu vào giai đoạn bệnh tại thời điểm chẩn đoán [5-6]. Tuy nhiên, do đặc điểm giải phẫu phức tạp và tiến triển âm thầm, phần lớn bệnh nhân UTHH được phát hiện ở giai đoạn muộn, khi đã xuất hiện di căn hạch cổ. Mặc dù các phương pháp điều trị ung thư đã có nhiều tiến bộ đáng kể, việc điều trị ung thư hạ họng vẫn là một thách thức lớn đối với nền y học hiện nay.

Indazole là một khung cấu trúc có tiềm năng cao trong điều trị ung thư, nhờ khả năng ức chế sự phát triển tế bào, kích hoạt quá trình apoptosis và can thiệp vào các con đường tín hiệu trong tế bào ung thư, với nhiều dẫn xuất đã cho thấy hoạt tính mạnh trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau [7]. Trong nghiên cứu trước [8], chúng tôi đã thiết kế và tổng hợp nhóm dẫn xuất có cấu trúc indazole dựa trên thông tin về cấu trúc vùng hoạt động của enzyme IDO1. Trong các dẫn xuất tổng hợp được, hợp chất C7 cho thấy tác dụng giảm rõ rệt mức độ biểu hiện của IDO1 và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư với nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào FaDu (IC₅₀) là 2,87±0,21 μM. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đi sâu vào nghiên cứu cơ chế chống ung thư của dẫn xuất C7, làm rõ cơ chế chống ung thư của hợp chất này trên các con đường kiểm soát ung thư khác nhau như sự điều hoà quá trình phân

bào, cơ chế gây chết tế bào theo chương trình liên quan đến sự tổn thương DNA và tác dụng của hợp chất C7 lên quá trình di chuyển và xâm lấn của tế bào UTHH.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất và thuốc thử

Dimethyl sulfoxide (DMSO) và 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) được cung cấp bởi Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ). Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM, MEM, huyết thanh bào thai bò 10%, trypsin ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 0,05% và dung dịch kháng sinh - kháng nấm được cung cấp bởi Welgene (Hàn Quốc). Các kháng thể sơ cấp kháng Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D, Cyclin E, cdk1, cdk2, procaspase-3, bax, bcl2 được cung cấp bởi Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Hoa Kỳ). Các kháng thể cleaved caspase-3 (clv. caspase 3) được mua từ Cell Signaling Technology Inc. (Denver, CA, Hoa Kỳ). Kháng thể cleaved-PARP (clv. PARP) được cung cấp bởi Abcam (Cambridge, MA, Hoa Kỳ). Các kháng thể thứ cấp được mua từ Novus Biologicals (Centennial, CO, Hoa Kỳ).

2.2. Nuôi cấy tế bào

Các dòng tế bào người: tế bào gốc tủy răng HDPC, tế bào ung thư hạ họng FaDu, và tế bào ung thư vú MCF7 được cung cấp bởi Ngân hàng dòng tế bào Hàn Quốc (Seoul, Hàn Quốc). Tế bào HDPC, MCF7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM và tế bào FaDu được nuôi trong môi trường MEM; cả hai môi trường đều được bổ sung 10% FBS và 1% hỗn hợp amoxicillin - streptomycin. Tế bào được gieo với mật độ 2×10^5 tế bào/mL và ủ ở 37°C trong môi trường 5% CO₂ trong 24 giờ để đạt độ che phủ khoảng 80% trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.3. Thử nghiệm MTT

Các tế bào HDPC, MCF7 và FaDu được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế

bào/giếng và ủ trong 16-24 giờ để đạt khoảng 80% độ che phủ đĩa. Sau khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của hợp chất trong 24 giờ, môi trường nuôi cấy được thay bằng 200 μ L dung dịch 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) nồng độ 0,5 mg/mL. Tế bào tiếp tục được ủ trong 3,5-4 giờ ở 37°C cho đến khi xuất hiện tủa formazan màu tím. Môi trường cũ được loại bỏ và thêm 200 μ L DMSO để hòa tan tinh thể formazan. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ).

2.4. Thử nghiệm di chuyển và xâm lấn tế bào

Khả năng di chuyển của tế bào được đánh giá bằng hệ thống buồng Transwell 24 giếng với màng lọc 8,0 μ m (Millipore, Seoul, Hàn Quốc). Đối với thử nghiệm xâm lấn, môi trường nuôi cấy không chứa serum ở buồng trên được bổ sung 2 μ g/mL ECM (chất nền ngoại bào từ khối u sarcoma chuột Engelbreth-Holm-Swarm, Sigma Aldrich) và ủ ở 37°C trong 2 giờ để gel đông đặc. Môi trường hoàn chỉnh được thêm vào buồng dưới để làm chất hóa hướng động. Tế bào sau khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của hợp chất C7 được gieo với mật độ 1×10^5 tế bào/mL, 100 μ L/giếng vào buồng trên. Sau 24 giờ ủ trong tủ nuôi cấy, màng lọc được lấy ra, rửa bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 (PBS). Sau đó, dùng tăm bông để loại bỏ các tế bào không di chuyển hoặc xâm lấn ở mặt trên của màng. Các tế bào đã di chuyển hoặc xâm lấn ở mặt dưới được cố định bằng paraformaldehyde 4% và nhuộm với dung dịch tím tinh thể nồng độ 2% trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Hình ảnh tế bào được ghi nhận bằng kính hiển vi Zeiss Axioscope A1 (Microscope World, Carlsbad, CA, Hoa Kỳ). Sau đó, các tế bào được hòa tan trong dung dịch cetylpyridinium chloride 10% và mật độ quang học được đo ở bước sóng 560 nm bằng máy Multiskan™ FC Microplate Photometer.

2.5. Phân tích Western blotting

Sau khi tế bào FaDu được tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của hợp chất C7, protein tổng số trong tế bào được thu thập để phân tích Western blotting. Tế bào được rửa bằng dung dịch PBS lạnh trước khi ly giải bằng đệm RIPA. Sau ly tâm, nồng độ protein trong dịch nổi được xác định bằng bộ kit BCA (Thermo Scientific). Protein được tách bằng SDS-PAGE và chuyển lên màng PVDF. Màng được ủ với sữa gầy 5% trong PBS chứa Tween-20 trong 1 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C với các kháng thể sơ cấp đặc hiệu. Sau khi rửa 3 lần với PBS, màng được ủ với kháng thể thứ cấp liên hợp enzym HRP trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các dải protein đặc hiệu được phát hiện bằng cơ chất phát quang sau khi tác dụng với enzym HRP và chụp ảnh bằng hệ thống Kodak Digital Science Image Station.

2.6. Thử nghiệm nhuộm miễn dịch huỳnh quang

Tế bào FaDu (1×10^5 tế bào/giếng) được gieo trên lam kính trong đĩa 24 giếng và ủ 24 giờ trước khi tiếp xúc với hợp chất C7 ở các nồng độ khác nhau. Sau đó, tế bào được rửa bằng PBS và cố định bằng paraformaldehyde 4% trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa sạch paraformaldehyde bằng PBS, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng γ H2AX và tubulin qua đêm ở điều kiện 4°C. Các kháng thể sơ cấp không liên kết với protein đặc hiệu trong các

mẫu sẽ được loại bỏ và rửa sạch bằng PBS 3 lần, sau đó các mẫu thử được ủ với kháng thể thứ cấp và DAPI (để nhuộm nhân tế bào) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Các lam kính sau đó được rửa sạch và cố định trên phiến kính và chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Đức).

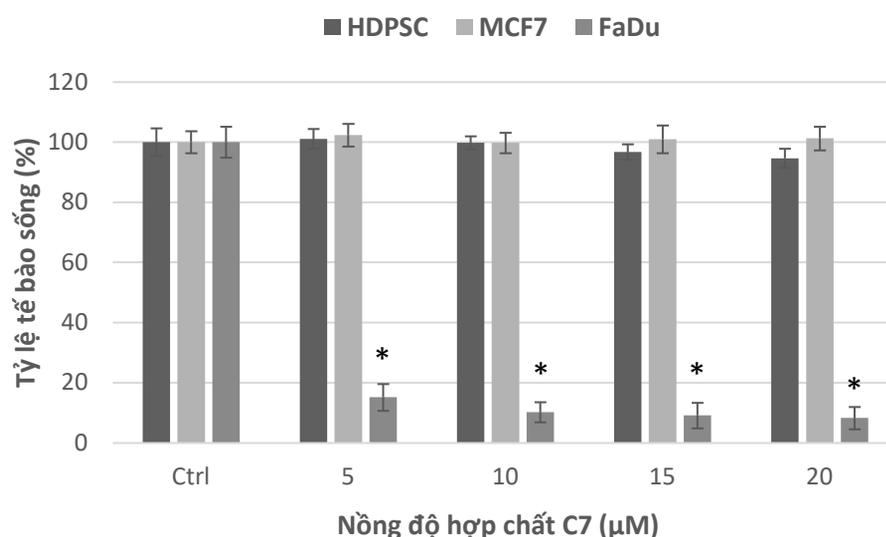
2.7. Phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện độc lập ít nhất ba lần và kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Độc tính của hợp chất C7 trên tế bào ung thư hạ họng

Thử nghiệm MTT được tiến hành nhằm đánh giá độc tính tế bào của hợp chất C7 trên các dòng tế bào người bao gồm: HDPSC, FaDu và MCF7. Kết quả cho thấy hợp chất C7 với các nồng độ dưới 20 μ M không gây ảnh hưởng đáng kể lên tế bào HDPSC và MCF7, thể hiện qua tỷ lệ sống sót của các tế bào này vẫn duy trì trên 85%. Ngược lại, ở nồng độ thấp chỉ 5 μ M, tỷ lệ sống sót của tế bào FaDu giảm xuống dưới 20% so với nhóm đối chứng. Khi nồng độ tăng lên 10, 20 và 30 μ M, số lượng tế bào FaDu sống sót cũng giảm dần. Ở nồng độ 20 μ M, tỷ lệ này chỉ còn dưới 10%. Kết quả này chứng tỏ hợp chất C7 có độc tính cao trên tế bào FaDu, và an toàn với dòng tế bào HDPSC và MCF7.



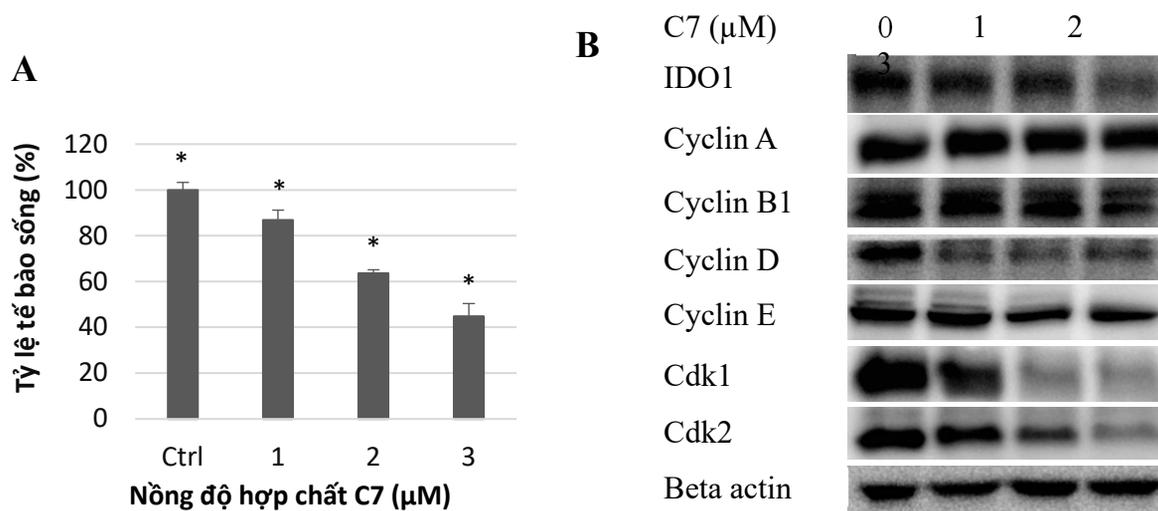
Hình 1. Độc tính của hợp chất C7 trên các dòng tế bào.

Thử nghiệm MTT được tiến hành để xác định tỷ lệ tế bào sống sau khi tiếp xúc với chất thử ở các nồng độ 5, 10, 15, 20 μM so với nhóm chứng (Ctrl) trên các dòng tế bào: HDPSC, MCF7 và FaDu. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ $n = 3$ thí nghiệm độc lập, * $p < 0,05$ so với nhóm chứng (Ctrl).

3.2. Hợp chất C7 ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư hạ hạ thông qua ức chế biểu hiện của các protein kiểm soát quá trình phân bào

Kết quả nghiên cứu trước [8] cho thấy nồng độ của hợp chất C7 cần thiết để ức chế 50% khả năng sống của tế bào FaDu so với đối chứng (IC_{50}) là 2,87 μM [8]. Do đó, chúng tôi lựa chọn khoảng nồng độ tăng dần gần với giá trị IC_{50} , tại đó khả năng sống của tế bào giảm dần phụ thuộc nồng độ nhưng vẫn duy trì trên 40%, qua đó cho phép quan sát rõ ràng nhất mức độ biểu hiện cũng như xu hướng tăng/giảm của các

protein thông qua phân tích Western blotting và miễn dịch huỳnh quang. Các tế bào FaDu được tiếp xúc với hợp chất C7 ở các nồng độ 0, 1, 2, 3 μM trong 24 h cho thấy hợp chất C7 ức chế mạnh sự tăng sinh của tế bào ung thư và có sự phụ thuộc giữa nồng độ hợp chất C7 với khả năng ức chế này, nồng độ C7 càng cao thì sự ức chế sự phát triển tế bào càng mạnh mẽ (Hình 2A). Ở mức độ phân tử, Cyclin và các protein phụ thuộc Cyclin (cdks) là các protein đóng vai trò quan trọng trong việc điều hoà quá trình phân bào, đảm bảo tế bào phân chia chính xác qua các pha G1, S, G2, M. Ở tế bào FaDu, có thể thấy rõ biểu hiện của các protein này tăng rất cao, thúc đẩy sự tăng sinh không kiểm soát và liên tục phân chia. Hợp chất C7 có tác dụng hiệu quả trong việc ức chế biểu hiện của các protein này, đặc biệt là Cyclin D, cdk1 và cdk2, làm gián đoạn sự điều hoà chu kỳ tế bào và ức chế sự phát triển của khối u.



Hình 2. Hợp chất C7 có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào FaDu thông qua ức chế biểu hiện của các protein kiểm soát quá trình phân bào.

Các tế bào FaDu được tiếp xúc với hợp chất C7 ở các nồng độ tăng dần: 0 (nhóm đối chứng), 1, 2 và 3 μM và được ủ trong 24 h trong tủ nuôi cấy tế bào. Sau 24 h, thử nghiệm MTT được thực hiện nhằm xác định tỷ lệ phần trăm tế bào sống sót so với nhóm chứng (Hình 2A). Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ n = 3 thí nghiệm độc lập, *p<0,05 so với nhóm chứng (Ctrl). Bên cạnh đó, các mẫu thử này cũng được sử dụng để chiết xuất các protein tổng số để làm thử nghiệm Western blotting, sử dụng các kháng thể đặc hiệu nhằm xác định mức độ biểu hiện của các protein IDO1, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D, Cyclin E, cdk1 và cdk2. Beta actin được sử dụng làm chuẩn nội.

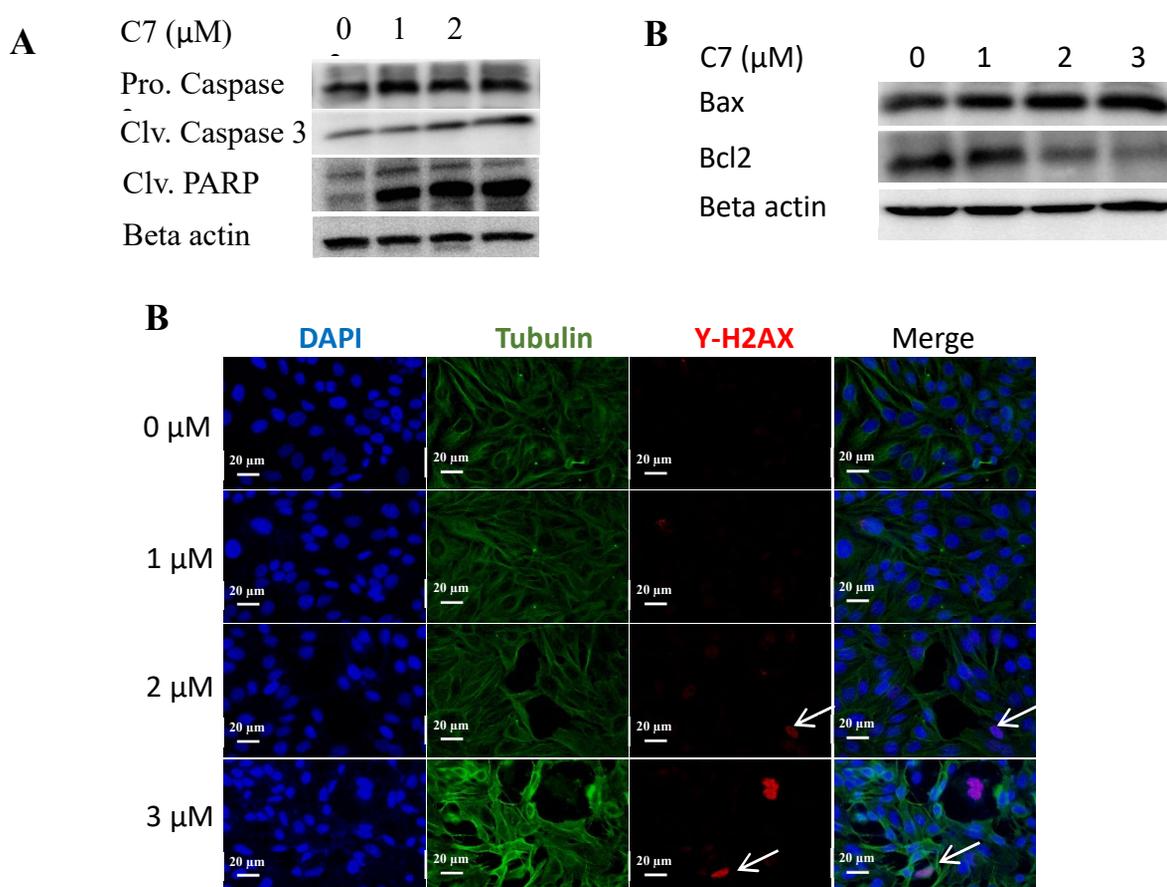
3.3. Hợp chất C7 gây tổn thương DNA không hồi phục và kích hoạt tế bào chết theo chương trình

Nhằm làm rõ cơ chế phân tử liên quan đến sự ức chế tăng sinh tế bào, sự hoạt hoá của các enzyme protease caspase-3, PARP và các protein quan trọng điều hoà quá trình chết theo chương trình bax và bcl2 đã được khảo sát bằng phương pháp Western blotting, đồng thời, mức độ biểu hiện của γH2AX -một dấu hiệu nhận biết sự tổn thương DNA được quan sát thông qua nhuộm miễn dịch huỳnh quang. Kết quả cho thấy

dạng tiền chất của caspase-3 (pro. caspase 3) không thay đổi trong khi dạng hoạt hóa của caspase-3 (clv. caspase-3) và cơ chất của nó là clv. PARP tăng lên rõ rệt. Sự hoạt hóa caspase 3 khiến hoạt tính protease của nó tăng mạnh, phân huỷ hàng loạt các protein quan trọng của tế bào trong đó có PARP, làm bất hoạt khả năng sửa chữa DNA của PARP, khiến tế bào không thể sửa chữa được và chết hoàn toàn. Thêm vào đó, kết quả trên Hình 3B cho thấy có sự gia tăng nhẹ mức độ biểu hiện của bax (protein tiền apoptosis) và sự suy giảm biểu hiện của bcl2 (protein kháng apoptosis) phụ thuộc nồng độ của hợp chất C7. Những thay đổi này phản ánh sự mất cân bằng của các protein điều hòa apoptosis thuộc họ bcl-2, dẫn đến hoạt hóa dòng thác caspase và khởi phát apoptosis qua con đường ty thể [9]. Để làm rõ hơn cơ chế của hợp chất C7 gây chết tế bào FaDu theo chương trình, hình ảnh nhuộm huỳnh quang với γH2AX - một dấu ấn điển hình của tổn thương nhiễm sắc thể cho thấy dạng phosphoryl hoá của protein H2AX này có biểu hiện tăng mạnh, đi kèm với hiện tượng cô đặc và phân mảnh nhân tế bào. Nhuộm tubulin cho thấy sự co rút của bộ khung tế bào, thể hiện qua sự tăng biểu hiện của α -tubulin trong bào tương. Tất cả các đặc điểm trên chứng tỏ hợp chất C7 gây tổn thương DNA vượt quá

khả năng sửa chữa của tế bào FaDu. Khi mức độ tổn thương DNA vượt quá khả năng sửa chữa của tế bào, các tín hiệu đáp ứng tổn thương DNA sẽ kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình nhằm loại bỏ các tế bào bị tổn thương không hồi phục [10]. Như vậy, hợp chất C7 gây chết tế bào

FaDu theo chương trình thông qua tổn thương DNA của tế bào. Bên cạnh tác dụng trực tiếp trên tế bào ung thư, việc ức chế biểu hiện IDO1 (Hình 2B) cho phép hợp chất C7 điều hòa vi môi trường miễn dịch của khối u, qua đó thể hiện tiềm năng cao trong điều trị ung thư hạ họng.



Hình 3. Hợp chất C7 gây tổn thương DNA và gây chết tế bào theo chương trình.

Sau khi tiếp xúc với hợp chất C7 ở các nồng độ 0, 1, 2, 3 μM trong 24 h, các mẫu thử sẽ được chiết protein tổng số để làm thử nghiệm Western blotting với các kháng thể đặc hiệu (Hình 3A&B) hoặc nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng γH2AX , tubulin và DAPI (Hình 3C).

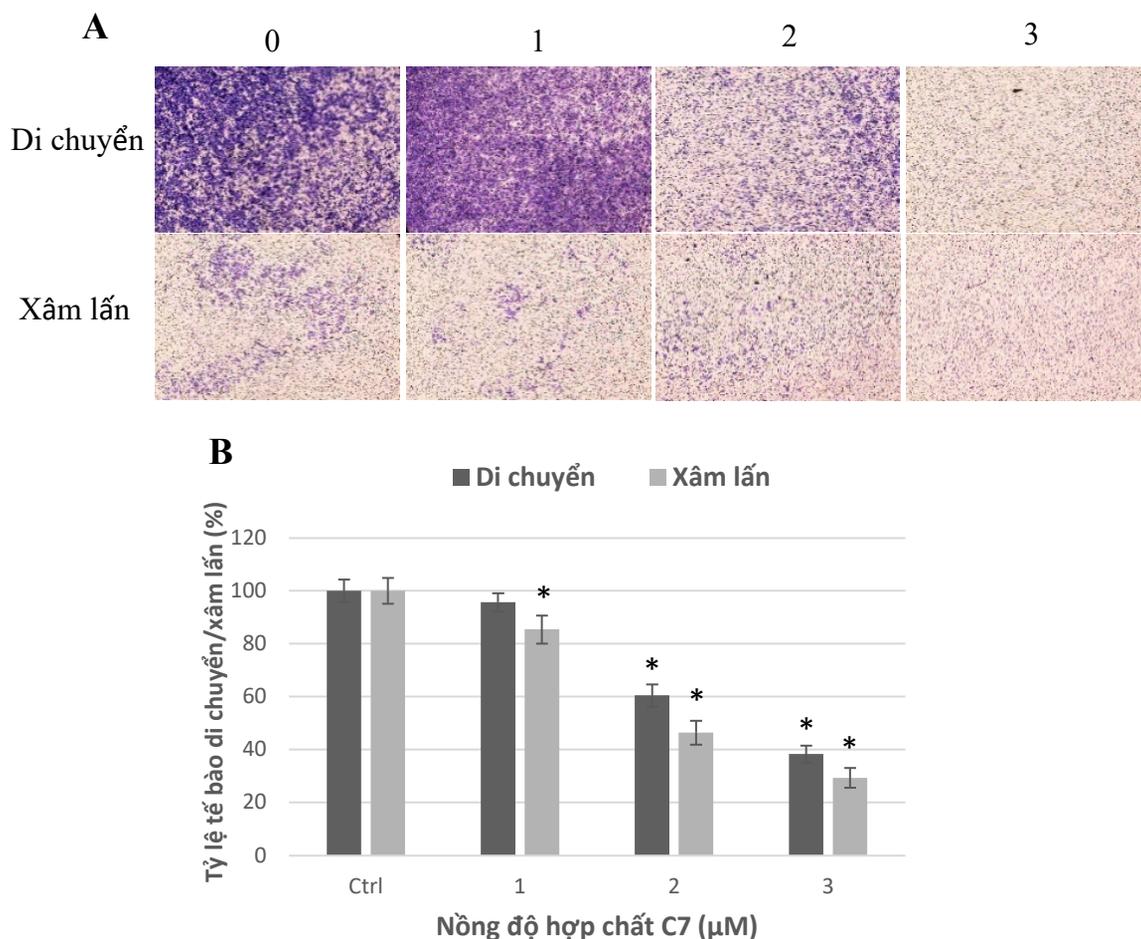
3.4. Hợp chất C7 ức chế quá trình di chuyển và xâm lấn của tế bào ung thư hạ họng

Trong nghiên cứu trước [8], kết quả thử nghiệm cho thấy hợp chất C7 ức chế hiệu quả sự chữa lành vết thương của tế bào FaDu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục đánh giá tác dụng của hợp chất C7 lên quá trình di chuyển và

xâm lấn của các tế bào ung thư thông qua thử nghiệm Transwell. Thử nghiệm này là một thử nghiệm *in vitro* mô phỏng quá trình di chuyển của tế bào ung thư trong điều kiện *in vivo* thông qua lớp màng có kích thước nhỏ (8 μm). Với thử nghiệm xâm lấn, lớp màng sẽ được phủ một lớp nền ngoại bào - một mạng lưới các phân tử như protein, glycoprotein, collagen,... mô phỏng môi trường ung thư trong cơ thể (*in vivo*), giúp đánh giá tiềm năng di căn của khối u. Kết quả cho thấy hợp chất C7 thể hiện tác dụng ức chế hiệu quả cả hai quá trình di chuyển và xâm lấn của tế bào ung thư hạ họng, thể hiện bằng số

lượng các tế bào di chuyển và xâm lấn giảm đi rõ rệt so với nhóm chứng. Mức độ ức chế này phụ thuộc vào nồng độ hợp chất C7 mà tế bào được tiếp xúc, nồng độ này càng cao, khả năng

ức chế càng tăng. Ở nồng độ 3 μM , khả năng di chuyển của tế bào chỉ còn khoảng 40% và khả năng xâm lấn chỉ còn khoảng 30% so với nhóm chứng.



Hình 4. Hợp chất C7 ức chế sự di chuyển và xâm lấn của tế bào ung thư hạ họng.

Các tế bào FaDu được tiếp xúc với hợp chất C7 ở các nồng độ 0,1,2,3 μM trong 24 h, sau đó được dùng vào thử nghiệm Transwell để quan sát mật độ các tế bào di chuyển và xâm lấn (các tế bào được nhuộm màu tím trong Hình 4A). Biểu đồ cột thể hiện số lượng tương đối của các tế bào di cư và xâm lấn ở các nhóm tiếp xúc với chất thử so với nhóm đối chứng, được xác định thông qua việc đo mật độ quang của các mẫu sau khi hòa tan trong dung dịch cetylpyridinium chloride 10% ở bước sóng 560 nm, các cột biểu thị giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 3$) (Hình 4B). Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD) từ $n =$

3 thí nghiệm độc lập, * $p < 0,05$ so với nhóm chứng (Ctrl).

4. Kết luận

Kể từ khi được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2003 cho đến nay, IDO1 đã được chứng minh là yếu tố then chốt trong cơ chế né tránh miễn dịch của khối u và là đích điều trị tiềm năng trong ung thư, đồng thời tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý - bệnh lý như tăng sinh tế bào, apoptosis, stress oxy hóa và viêm [11]. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã thiết kế và tổng hợp một nhóm các dẫn xuất có cấu trúc indazole hướng ức chế IDO1. Trong báo cáo này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tác dụng và cơ chế chống ung thư

của hợp chất C7 trong nhóm dẫn xuất này trên tế bào UTHH FaDu [8]. Kết quả cho thấy, C7 ức chế hiệu quả và chọn lọc sự phát triển của tế bào UTHH, trong khi hợp chất này được dung nạp tốt với các tế bào gốc tuỷ răng người và tế bào ung thư vú, điều này chứng tỏ tác dụng của C7 là chọn lọc và đặc hiệu cho UTHH. Tác dụng này là do hợp chất C7 ức chế hiệu quả sự phân chia tế bào ung thư thông qua ức chế sự biểu hiện của các Cyclin và các kinase phụ thuộc Cyclin bao gồm Cyclin D, cdk1 và cdk2. Thêm vào đó, C7 còn gây cảm ứng chết tế bào theo chương trình trong tế bào UTHH thông qua tấn công vào nhiễm sắc thể nhân, thể hiện bằng tổn thương DNA nghiêm trọng vượt quá khả năng sửa chữa của tế bào, dẫn đến hoạt hóa caspase-3 và PARP (có thể một phần thông qua con đường ty thể) nhằm phân hủy các thành phần nội bào. Ngoài ra, C7 còn ức chế hiệu quả quá trình di chuyển và xâm lấn của tế bào UTHH. Do đó, các hợp chất C7, với tác dụng ức chế đồng thời IDO1 và các protein điều hòa chu kỳ tế bào, không chỉ kìm hãm sự tiến triển của khối u mà còn làm suy giảm tác dụng ức chế miễn dịch do IDO1 gây ra, từ đó góp phần tăng cường khả năng loại bỏ khối u của hệ miễn dịch. Mặc dù nghiên cứu đã cung cấp những bằng chứng ban đầu về tác dụng chống ung thư của hợp chất C7, vẫn còn tồn tại một số hạn chế cần được tiến hành nghiên cứu sâu hơn. Cụ thể, nghiên cứu chưa tiến hành phân tích bằng flow cytometry để định lượng chính xác quá trình apoptosis và phân tích chu kỳ tế bào, cũng như chưa sử dụng chứng dương hay đo hoạt độ enzym để xác nhận cơ chế ức chế IDO1. Bên cạnh đó, các thí nghiệm mới chỉ được thực hiện *in vitro* trên số lượng dòng tế bào còn hạn chế. Do đó, các nghiên cứu *in vivo* trong tương lai là cần thiết nhằm xác nhận, củng cố và mở rộng giá trị của các kết luận được rút ra từ nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., Brücher, B. L., Rammensee, H. G., Opelz, G., & Temess, P. (2009). "IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism". *Cancer immunology, immunotherapy: CII* (58), 153–157. DOI: 10.1007/s00262-008-0513-6.
- [2] Zhai, L., Lauing, K. L., Chang, A. L., Dey, M., Qian, J., Cheng, Y., Lesniak, M. S., & Wainwright, D. A. (2015). "The role of IDO in brain tumor immunotherapy". *Journal of neuro-oncology* (123), 395–403. DOI: 10.1007/s11060-014-1687-8.
- [3] Hosseinalizadeh, H., Mahmoodpour, M., Samadani, A. A., & Roudkenar, M. H. (2022). "The immunosuppressive role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in glioblastoma: mechanism of action and immunotherapeutic strategies". *Medical oncology (Northwood, London, England)* (39), 130. DOI: 10.1007/s12032-022-01724-w.
- [4] Zhang, T., Tan, X. L., Xu, Y., Wang, Z. Z., Xiao, C. H., & Liu, R. (2017). "Expression and Prognostic Value of Indoleamine 2,3-dioxygenase in Pancreatic Cancer". *Chinese medical journal* (130), 710–716. DOI: 10.4103/0366-6999.201613.
- [5] Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; et al. (2024). "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA Cancer J. Clin.* (74), 229–263.
- [6] Escalante, D., Hohman, M.H., Sanders, O., et al. (2025). *Hypopharyngeal Cancer*. Truy cập ngày 10/01/2026, từ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567720/>.
- [7] Singampalli, A., Kumar, P., Bandela, R., Bellapukonda, S. M., Nanduri, S., & Yaddanapudi, V. M. (2025). "Indazole - an emerging privileged scaffold: synthesis and its biological significance". *RSC medicinal chemistry*. DOI: 10.1039/d5md00336a.
- [8] Hoang, V. H., Trang, N. T. K., Minh, T. C., Long, L. T. B., Lan, T. H., Hue, N. T., Tien, L. Q., Nguyen, T. X., Nguyen, Y. T. K., Yoo, H., & Tran, P. T. (2023). "Design, synthesis and evaluation the bioactivities of novel 1,3-dimethyl-6-amino-1H-indazole derivatives as anticancer agents". *Bioorganic & medicinal chemistry* (90), 117377. DOI: 10.1016/j.bmc.2023.117377.
- [9] Vogler, M., Braun, Y., Smith, V.M. et al. (2025). "The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy". *Sig Transduct Target Ther* (10), 91. DOI: 10.1038/s41392-025-02176-0.
- [10] Matt, S., & Hofmann, T. G. (2016). "The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells". *Cellular and molecular life sciences: CMLS* (73), 2829–2850. DOI: 10.1007/s00018-016-2130-4.
- [11] Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., & Van den Eynde, B. J. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase". *Nature medicine* (9), 1269–1274. DOI: 10.1038/nm934.