

## NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG GIẢM ĐAU CỦA $\omega$ -CONOTOXIN MVIIA Ở DẠNG PROTEIN DUNG HỢP VỚI THIOREDOXIN

Đoàn Việt Bình, Bùi Thị Huyền, Nguyễn Thị Kim Dung,  
 Lê Thị Bích Thảo, Nguyễn Bích Nhi\*, Phan Văn Chi

Viện Công nghệ sinh học, (\*)nbnhi1956@gmail.com

**TÓM TẮT:** Omega-conotoxin MVIIA là một loại peptide nhỏ được tách chiết từ bầu độc của loài ốc cối *Conus magus*, có tác dụng khóa chọn lọc các kênh ion  $Ca^{2+}$  thuộc typ N, do đó có khả năng sử dụng làm thuốc giảm đau rất tốt. Omega-conotoxin MVIIA được biểu hiện trước tiên ở dạng protein dung hợp với thioredoxin (Trx-CTX) tại phòng Hóa sinh protein - Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Omega-conotoxin MVIIA ở dạng protein dung hợp có thể được sản xuất với khối lượng lớn và được tinh chế theo một quy trình không phức tạp, vì vậy sẽ rất thuận lợi nếu được dùng làm thuốc. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về độc tính cấp và tác dụng giảm đau của Trx-CTX do Viện Công nghệ sinh học tạo ra để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo nhằm sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Kết quả cho thấy, Trx-CTX có độc tính cấp  $LD_{50}$  bằng 775  $\mu$ g/g. Trx-CTX, có hoạt tính giảm đau tốt. Với liều tiêm 6  $\mu$ g/g trong thí nghiệm trên mô hình bản nóng có tác dụng giảm đau cho chuột nhất tốt hơn 18 lần morphin. Những kết quả này sẽ rất có ý nghĩa trong các nghiên cứu tiếp theo với mục đích sử dụng Trx-CTX làm thuốc chữa bệnh cho người.

*Từ khóa:* conotoxin, độc tính cấp, hoạt tính giảm đau,  $LD_{50}$ , omega-conotoxin MVIIA.

### MỞ ĐẦU

Conotoxin là độc tố của hơn 500 loài ốc cối ăn thịt thuộc giống *Conus*, họ Conidae mà ốc sử dụng để bắt mồi, cạnh tranh và tự vệ. Conotoxin có thành phần là hỗn hợp các độc tố protein/peptide, enzyme hoặc các phân tử có khối lượng thấp. Đa số các loại conotoxin đã được nghiên cứu thường có đích tác dụng là các thụ thể trên màng tế bào hay là các kênh ion liên quan đến mô cơ hoặc mô thần kinh [7]. Tùy theo cấu trúc và được tính của các loại conotoxin khác nhau mà người ta xếp chúng vào các siêu họ như A, M, O, P, S, T, I... [14]. Trong các siêu họ trên, siêu họ O lớn nhất bao gồm những họ  $\mu$ O-,  $\delta$ -,  $\omega$ -,  $\kappa$ - và  $\gamma$ -conotoxin là độc tố có khả năng chặn các kênh can xi, kali hay natri [3].

Omega-conotoxin MVIIA là một loại peptide nhỏ được tách chiết từ bầu độc của loài ốc cối *C. magus*, có tác dụng khóa chọn lọc các kênh ion  $Ca^{2+}$  thuộc typ N [8, 10, 11]. Kênh  $Ca^{2+}$  typ N có tiểu đơn vị là  $\alpha_{1B}$  (Cav2.2), thường tập trung với số lượng lớn tại tận cùng trước khớp thần kinh và các sợi thần kinh. Kênh  $Ca^{2+}$  typ N rất hấp dẫn các nhà nghiên cứu trong việc tìm ra các loại thuốc giảm đau mới hoạt động trên cơ chế tác động lên kênh  $Ca^{2+}$  để ngăn chặn việc truyền tín hiệu báo các kích thích gây đau về hệ thần kinh

trung ương. Nhiều loại thuốc giảm đau hoạt động theo cơ chế này đã được sản xuất ở dạng tái tổ hợp hoặc tổng hợp hóa học và đã được chứng minh có tác dụng làm giảm đau rất tốt, nhất là đối với các chứng đau dai dẳng như đau do ung thư và AIDS [2, 13].

Omega-conotoxin MVIIA có cấu trúc gồm 25 amino acid, trong đó có 6 gốc Cysteine tạo thành ba cầu nối disulfide trong phân tử giữa các vị trí 1-16, 8-20 và 15-25 [1]. Omega-conotoxin MVIIA có nhiều dược tính quý, có khả năng chữa các bệnh đau mãn tính, đau sau khi mổ, đau do thần kinh bị tổn thương, đột quỵ, nhồi máu cơ tim... [7, 14]. Omega-conotoxin MVIIA là conotoxin đầu tiên được phép sử dụng làm thuốc giảm đau ở Mỹ và châu Âu với cái tên Prialt<sup>®</sup> hay Ziconotid<sup>®</sup>. Omega-conotoxin MVIIA đã được tách dòng, biểu hiện trước tiên ở dạng protein dung hợp với thioredoxin (Trx-CTX), sau đó được tinh chế thành công ( $\omega$ -CTX) tại phòng Hóa sinh protein, Viện Công nghệ sinh học. Omega-conotoxin MVIIA ở dạng protein dung hợp có thể được sản xuất với khối lượng lớn và được tinh chế theo một quy trình không phức tạp [4, 5], vì vậy, sẽ rất thuận lợi nếu được dùng làm thuốc.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về độc tính cấp và tác dụng

giảm đau của Trx-CTX do Viện Công nghệ sinh học tạo ra để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo nhằm sử dụng làm thuốc chữa bệnh.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Trx-CTX được tạo ra tại phòng Hóa sinh protein, Viện Công nghệ sinh học. Morphin hydrochlorid của Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương Vidipha.

Chuột thí nghiệm là chuột nhắt trắng dòng Swiss, con đực, 1 tháng tuổi, trọng lượng trung bình là 20 g/con, do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, được nuôi bằng thức ăn viên có thành phần protein 23%, chất béo 5%, carbohydrate 45-55%, xơ 5%.

Máy đo bản nóng có chế độ đặt nhiệt độ ở  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Đồng hồ bấm giây hãng Healthcare.

### Phương pháp

#### Xác định độc tính cấp

Độ độc tính cấp (Lethal Dose 50%, LD<sub>50</sub>) của Trx-CTX tái tổ hợp được xác định theo phương pháp của Behrens và Karber [6]. Chuột được chia thành 2 lô, mỗi lô gồm 10 con: Lô thí nghiệm được tiêm Trx-CTX tái tổ hợp vào xoang bụng với các liều tăng dần, bắt đầu từ 10, 50, 100, 200, 400, 700 và 1400 µg/g; lô đối chứng được tiêm vào xoang bụng lượng nước cất 2 lần với thể tích bằng với thể tích tiêm cho lô thí nghiệm. Sau đó theo dõi số tỷ lệ chuột chết trong 24 giờ.

#### Xác định tác dụng giảm đau

Tác dụng giảm đau của Trx-CTX được xác định bằng phép thử trên bản nóng theo phương pháp của Mogil et al. (1999) [9] và được tiến hành như sau:

Lựa chọn chuột thí nghiệm: Trước khi tiến hành thí nghiệm, tất cả chuột được cho chạy thử trên bản nóng  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  để kiểm tra khả năng chịu nóng ban đầu qua theo dõi thời gian liếm chân sau từ thời điểm đặt chuột lên bản nóng bằng đồng hồ bấm giây. Chỉ những con chuột có thời gian liếm chân sau dưới 30 giây mới được sử dụng cho thí nghiệm.

Chuột được lựa chọn tiếp đó được chia

thành 6 lô, mỗi lô gồm 10 con. Chuột ở tất cả các lô được tiêm vào xoang bụng 100 µl/con như sau: Lô thứ nhất tiêm dung dịch nước muối sinh lý. Lô thứ hai, ba và bốn tiêm morphin với các liều tương ứng là 0,4 µg/g, 5 µg/g và 15 µg/g. Lô năm và sáu tiêm Trx-CTX với các liều là 3 µg/g và 6 µg/g.

Trước và sau khi tiêm 15, 30, 60 và 120 phút, chuột ở tất cả các lô được đặt lên máy đo bản nóng đặt ở chế độ nhiệt độ  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  để đo thời gian chịu nóng của chuột. Thời gian này được tính từ lúc thả chuột vào cho đến khi chuột liếm chân sau. Nếu khoảng thời gian này kéo dài hơn 60 giây thì bắt chuột ra để tránh thương tổn cho chuột.

Các kết quả thí nghiệm được tính toán và xử lý xác suất thống kê bằng phần mềm Excell.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Độc tính cấp của Trx-CTX

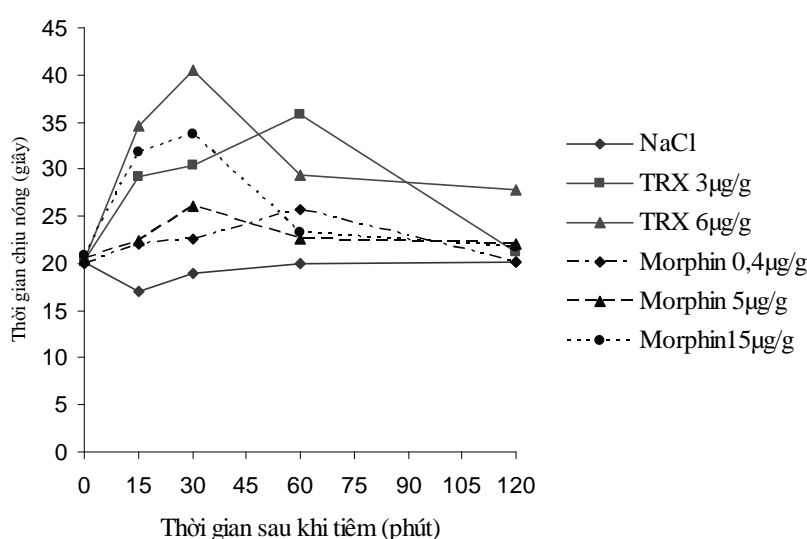
Kết quả thí nghiệm cho thấy, với liều tiêm Trx-CTX ít hơn 200 µg/g thể trọng không có chuột bị chết. Lô chuột tiêm 400 µg/g có số chuột chết bằng 10%. Lô chuột tiêm 700 µg/g có 50% số chuột bị chết. Lô chuột tiêm 1400 µg/g thì tất cả chuột đều bị chết. Như vậy, LD<sub>50</sub> của Trx-CTX được tính bằng phương pháp của Behrens và Karber là 775 µg/g.

### Tác dụng giảm đau của Trx-CTX

Thời gian chịu nóng của chuột được chỉ ra ở bảng 1 và hình 1. Tất cả các lô chuột tiêm các liều morphin khác nhau đều có thời gian chịu nóng sau khi tiêm cao hơn lô chuột đối chứng tiêm nước muối sinh lý với  $p < 0,01$  cho hai lô tiêm 0,4 µg/g, 5 µg/g và  $p < 0,001$  cho lô tiêm 15 µg/g. Hai lô tiêm Trx-CTX cũng có thời gian chịu nóng sau khi tiêm cao hơn so với lô đối chứng với  $p < 0,001$ . Chuột tiêm Trx-CTX với liều 3 µg/g có thời gian chịu nóng sau khi tiêm lớn hơn so với chuột tiêm morphin với liều 0,4 µg/g và 5 µg/g với  $p < 0,05$ . Chuột tiêm liều 3 µg/g cũng có thời gian chịu nóng không khác biệt so với liều tiêm morphin 15 µg/g ( $p > 0,05$ ). Chuột tiêm Trx-CTX với liều cao gấp đôi (6 µg/g) có thời gian chịu nóng cao hơn so với tất cả các lô chuột tiêm morphin liều 0,4 µg/g, 5 µg/g, 15 µg/g với  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ .

Bảng 1. Thời gian chịu nóng của chuột tiêm morphin và Trx-CTX

S TT	Lô thí nghiệm	Thời gian chịu nóng (giây)				
		0 phút	Sau 15 phút	Sau 30 phút	Sau 60 phút	Sau 120 phút
1	Tiêm muối sinh lý	20,17 ± 1,31	17,05 ± 1,12	18,94 ± 1,24	20,00 ± 1,30	20,11 ± 1,32
2	0,4 µg/g morphin	20,00 ± 1,65	22,00 ± 1,82	22,55 ± 1,87	25,66 ± 2,19	20,22 ± 1,76
3	5 µg/g morphin	20,44 ± 1,03	22,44 ± 2,73	26,00 ± 3,3	22,55 ± 2,38	22 ± 1,22
4	15 µg/g morphin	20,83 ± 1,02	31,83 ± 2,75	33,67 ± 6,78	23,33 ± 4,33	21,66 ± 1,47
5	3 µg/g Trx-CTX	20,33 ± 1,68	29,11 ± 5,16	30,33 ± 6,20	35,77 ± 5,38	21,22 ± 2,99
6	6 µg/g Trx-CTX	20,33 ± 1,32	34,66 ± 2,17	40,54 ± 2,64	29,33 ± 1,81	27,77 ± 1,84



Hình 1. Thời gian chịu nóng của chuột tiêm morphin và Trx-CTX

Morphine là một thuốc giảm đau thông dụng, có tác dụng chọn lọc và trực tiếp lên các tế bào thần kinh trung ương gây ức chế cảm giác đau một cách đặc hiệu. Morphine thường được dùng để giảm các cơn đau cấp dữ dội như đau do chấn thương, do ung thư, đau sau phẫu thuật.... Trong thí nghiệm, có 3 liều tiêm morphin từ thấp đến cao đã được sử dụng và tất cả đều có tác dụng giảm đau với mức độ khác nhau. Liều tiêm cao nhất có tác dụng giảm đau tốt nhất, biểu hiện ở số thời gian chịu nóng cao hơn so với hai liều còn lại. Hai liều tiêm Trx-CTX cũng đã chứng minh có tác dụng giảm đau với mức độ khác nhau. Theo quy trình biểu hiện thì  $\omega$ -conotoxin MVIIA ( $\omega$ -CTX) chiếm tỷ lệ khoảng 1/7 trong Trx-CTX [5]. Do đó, liều tiêm Trx-CTX thấp hơn (3 µg/g) được coi là tương đương với liều 0,4 µg/g  $\omega$ -CTX. Liều này tương đương về mặt khối lượng với liều tiêm morphin thấp nhất (0,4 µg/g). Tương tự, liều tiêm 6 µg/g tương đương với liều 0,8 µg/g  $\omega$ -CTX và bằng

khoảng 1/18 liều tiêm morphin lớn nhất. Trong thí nghiệm, liều tiêm 3 µg/g Trx-CTX có tác dụng giảm đau cho chuột tốt hơn tiêm morphin hai liều thấp là 0,4 và 5 µg/g ( $p < 0,05$ ). Liều tiêm 6 µg/g Trx-CTX giảm đau tốt hơn tất cả các liều tiêm morphin từ thấp đến cao với  $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  và  $p < 0,05$ . Điều đó chứng tỏ Trx-CTX hay  $\omega$ -conotoxin MVIIA, tái tổ hợp ở dạng protein dung hợp, cũng có hoạt tính giảm đau rất tốt.

Morphine là một loại thuốc giảm đau tốt nhưng lại hay gây ra các tác dụng phụ khó chịu cho người bệnh và nếu phải sử dụng lâu dài sẽ gây nghiện thuốc. Vì vậy, luôn cần thiết phải nghiên cứu tìm ra các loại thuốc giảm đau mới, đặc biệt là các thuốc chữa các bệnh đau trường diễn. Trong hàng chục năm trở lại đây, các nhà khoa học trên thế giới đã tập trung nghiên cứu các loại thuốc giảm đau có đích tác dụng là các thụ thể hoặc các kênh ion của tế bào thần kinh. Kênh  $Ca^{2+}$  typ N có rất nhiều tại phần thân các

tế bào của hạch rễ thần kinh cột sống và não bộ [12]. Nơi đây tập trung các tế bào thần kinh hướng tâm, tiếp nhận và truyền các kích thích từ ngoại vi lên hệ thần kinh trung ương. Do đó, ngoài việc giữ các chức năng sinh lý bình thường, kênh  $Ca^{2+}$  typ N cũng liên quan đến nhiều quá trình bệnh lý như: đau nửa đầu bẩm sinh, động kinh, đau đầu mãn tính, đau thắt ngực...[12]. Tác động lên kênh  $Ca^{2+}$  để khóa dòng  $Ca^{2+}$  từ ngoài vào trong tế bào sẽ ngắt quá trình truyền các tín hiệu thần kinh và kích thích đau sẽ được điều tiết.

Nhiều loại conotoxin của các loài ốc cối khác nhau hoạt động trên các nguyên lý khác nhau đã chứng tỏ có tác dụng giảm đau tốt hơn morphin mà lại không gây nghiện. Tuy nhiên, việc tách chiết trực tiếp các conotoxin có hoạt tính được lý từ bầu độc của ốc cối thường có hiệu suất thấp, độ tinh sạch không cao do sự đa dạng về thành phần protein/peptide trong nọc và hàm lượng mỗi loại lại rất nhỏ. Vì vậy, các peptide độc hầu hết được tạo ra ở dạng tái tổ hợp hoặc tổng hợp hóa học.  $\Omega$ -conotoxin MVIIA của loài ốc cối *C. magus* là một trong những peptide có hoạt tính giảm đau rất tốt.  $\Omega$ -conotoxin MVIIA cũng đã được tổng hợp bằng con đường hóa học và được sử dụng làm thuốc giảm đau ở Mỹ và châu Âu với cái tên Prialt® hay Ziconotid®. Tuy nhiên, trong quá trình sử dụng, bên cạnh những ưu điểm, thuốc này cũng bộc lộ những hạn chế như phải tiêm thuốc trực tiếp vào màng cứng tủy sống và tỷ lệ giữa  $LD_{50}$  với liều tác dụng và rất thấp, chỉ là từ 1,5-2,1, do đó mức độ an toàn không cao [12].  $\Omega$ -conotoxin MVIIA cũng được tạo ra ở dạng tái tổ hợp. Tuy nhiên, việc tinh sạch  $\omega$ -conotoxin MVIIA rất phức tạp và do đó hạn chế hiệu quả của quá trình sản xuất.  $\Omega$ -conotoxin MVIIA dạng dung hợp với Thioredoxin (Trx) do Viện Công nghệ sinh học sản xuất (Trx-CTX), có hoạt tính giảm đau tốt, tỷ lệ giữa  $LD_{50}$  với các liều có tác dụng giảm đau lại rất cao (với liều 3  $\mu\text{g/g}$  là gấp 258 lần và với liều 6  $\mu\text{g/g}$  là 129 lần). Những kết quả này sẽ rất có ý nghĩa trong các nghiên cứu tiếp theo với mục đích sử dụng Trx-CTX làm thuốc chữa bệnh cho người.

## KẾT LUẬN

$\omega$ -conotoxin MVIIA do Viện Công nghệ

sinh học tạo ra ở dạng protein dung hợp với thioredoxin (Trx-CTX) có độc tính cấp  $LD_{50}$  bằng 775  $\mu\text{g/g}$ .

$\Omega$ -conotoxin MVIIA ở dạng protein dung hợp với liều tiêm 6  $\mu\text{g/g}$  trong thí nghiệm trên mô hình bản nóng có tác dụng giảm đau cho chuột nhất tốt hơn 18 lần morphin.

**Lời cảm ơn:** Công trình được tài trợ bởi đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2011-2012): “Nghiên cứu tạo conotoxin tái tổ hợp và thử nghiệm hoạt tính giảm đau”, thuộc hướng Công nghệ sinh học, mã số: VAST03.02/11-12.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adams D. J., Alewood P. F., Craik D. J., Roger D. D., Lewis R. J., 1999. Conotoxins and Their Potential Pharmaceutical Applications. *Drug Develop. Res.*, 46 (3-4): 219-234.
2. Becker S., H. Terlau, 2008. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 79:1-9.
3. Bingham J. P., E. Mitsunaga, Bergeron Z. L., 2010. Drugs from slugs-Past, present and future perspectives of  $\omega$ -conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, 183: 1-18.
4. Bùi Thị Huyền, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi, 2008. Tạo dòng và xác định trình tự gen mã hóa  $\omega$ -conotoxin MVIIA(CTX). *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 6(4A): 663-669.
5. Bùi Thị Huyền, Lê Thị Bích Thảo, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi, 2010. Biểu hiện và tinh chế  $\omega$ -conotoxin MVIIA (CTX MVIIA) ở *E. coli*. *Tạp chí Sinh học*, 32(2): 89-93.
6. Đỗ Trung Đàm, 1996. Phương pháp xác định độc tính của thuốc. *Nxb. Y học, Hà Nội*: 7-10.
7. Layer R. T., J. M. McIntosh, 2006. Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. *Mar Drugs*, 4: 119-142.
8. Lewis R. J., Nielsen K. J., Craik D. J., Loughnan M. L., Adams D. A., Sharpe I. A., Luchian T., Adams D. J., Bond T.,

- Thomas L., Jones A., Matheson J. L., Drinkwater R., Andrews P. R., Alewood P. F., 2000. Novel  $\omega$ -conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.*, 275: 35335-35344.
9. Mogil J. S., Wilson S. G., Bon K., Lee S. E., Chung K., Raber P., Pieper J. O., Hain H. S., Belknap J. K., Hubert L., Elmer G. I., Chung J. M., Devor M., 1999. Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, 80(1-2): 67-82.
10. Olivera B. M., 1997. *Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Mol Biol Cell*, 8: 2101-2109.
11. Olivera B. M., 2000. Omega-Conotoxin MVIIA: From Marine Snail Venom to Analgesic Drug. *Drugs from the Sea*: 74-85.
12. Snutch T. P., 2005. Targeting Chronic and Neuropathic Pain: The N-type Calcium Channel Comes of Age. *NeuroRX*, 2: 662-670.
13. Staats P. S., Yearwood T., Charapata S.G., Presley R. W., Wallace M. S., Byas-Smith M., Fisher R., Bryce D. A., Mangieri E. A., Luther R. R., Mayo M., McGuire D., Ellis D., 2004. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: arandomized controlled trial. *Jama*, 291: 63-70.
14. Wang C. Z., Chi C. W., 2004. *Conus* Peptides-A Rich Pharmaceutical Treasure, *Acta Bioch Bioph Sin*, 36(11): 713-723.

## RESEARCH ON ACUTE TOXICITY AND ANALGESIC ACTIVITY OF A FUSION PROTEIN OF $\omega$ -CONOTOXIN MVIIA AND THIOREDIXIN

Doan Viet Binh, Bui Thi Huyen, Nguyen Thi Kim Dung,  
Le Thi Bich Thao, Nguyen Bich Nhi, Phan Van Chi

Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

Omega-conotoxin MVIIA ( $\omega$ -CTX) a neurotoxin isolated from the venom of Cone snail *Conus magus*, is a potent and selective blocker of the N-type voltage-sensitive calcium channel in neurons. Thereby it can inhibit the function of calcium channel and neurotransmitter receptors, blocks the pain signal propagation to the brain or directly targets nociceptive neurotransmission.

$\omega$ -CTX has been cloned, expressed in the fusion form with thioredoxin (Trx-CTX) in *E. coli* in the institute of biotechnology, Ha noi and finally purified. Trx-CTX could be produced in large amount, whereas the synthesis of  $\omega$ -CTX is difficult due to the long synthetic process and low yield.

In this paper we present our study on analgesic activity and acute toxicity of Trx-CTX with the aim to test the possibility of the Trx-CTX for medical applications. The experiments were carried out in male mice of Swiss race weighing 20 g. The analgesic activity of Trx-CTX was measured in hot-plate assay. Its acute toxicity ( $LD_{50}$ ) was determined by the method described by Behrens and Karber. The results showed that Omega-conotoxin MVIIA in the fusion form with thioredoxin possess an analgesic activity 18 times better than morphin hydrochloride and its  $LD_{50}$  is detected at the dose of 775  $\mu$ g Trx-CTX/g mouse body weight. Trx-CTX could be used for medicinal purpose.

*Keywords:* conotoxin, acute toxicity, analgesic activity,  $LD_{50}$ , omega-conotoxin MVIIA.

Ngày nhận bài: 29-11-2011