

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÁC CÂY THUỐC VIỆT NAM TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ CỔ TỬ CUNG HeLa

Thiard Franck ⁽¹⁾, Tất Tố Trinh ⁽¹⁾, Nguyễn Thụy Vy ⁽¹⁾, Nguyễn Hoài Nghĩa ⁽¹⁾, Nguyễn Diệu Liên Hoa ⁽¹⁾, Nguyễn Kim Phi Phụng ⁽¹⁾, Nguyễn Ngọc Hạnh ⁽²⁾

Hồ Huỳnh Thùy Dương ⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Viện Công nghệ Hóa Học tại Tp. HCM

1. TỔNG QUAN

Việt Nam là một nước nhiệt đới gió mùa, với nguồn dược liệu phong phú. Tuy nhiên, chỉ có một số rất ít các dược liệu này được chứng minh hiệu quả trên cơ sở khoa học [2,9]. Hướng tới mục tiêu sàng lọc và nghiên cứu cơ chế chống ung thư của các cây thuốc Việt Nam, trong phạm vi của nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu nhận mẫu cây và chiết tách trên nhiều loại dung môi khác nhau, thu được 30 cao chiết. Sau đó, chúng tôi tiến hành sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Cao chiết có hoạt tính ức chế tế bào mạnh nhất sẽ được nghiên cứu sâu hơn nhằm xác định cơ chế gây độc tế bào của nó.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu cây thuốc

Các cây thuốc sử dụng trong nghiên cứu này được thu nhận từ 8 tỉnh thành của Việt Nam. Các cây thuốc này được PGS. Lê Công Kiệt (Khoa Sinh, Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, Tp. HCM) định danh. Sau khi thu nhận, các mẫu cây được cắt nhỏ, phơi khô và chiết với các dung môi như ở bảng 1. Dịch chiết sau đó được cô chân không và bảo quản ở 4⁰C.

2.2. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy tế bào động vật như môi trường E'MEM (Eagle's minimum essential medium), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), AO (acridine orange), EB (ethidium bromide), proteinase K, RNase A, trypsin, amphotericin B, penicillin, streptomycin được mua từ Sigma (St. Louis, MO). Huyết thanh được mua từ Biowest (Pháp). Các dụng cụ dùng trong nuôi cấy tế bào như bình Roux, đĩa nuôi cấy 24 và 96 giếng được mua từ Nunc (Roskilde, Đan Mạch).

2.3. Nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa do Viện Ung Thư Quốc Gia Hoa Kỳ (NCI – Frederick, MD, USA) cung cấp. Tế bào được nuôi trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamine (200mM), HEPES (1M), amphotericin B (0.1%), penicillin-streptomycin 200X và 10% (v/v) FBS và ủ ở 37⁰C, 5% CO₂.

2.4. Phương pháp MTT [3]

Dùng để đánh giá khả năng gây độc tế bào của tác nhân nghiên cứu. Phương pháp này dựa trên hoạt động của enzyme dehydrogenase của ty thể trong các tế bào sống. Tế bào được nuôi trong đĩa 96 giếng. Sau khi ủ 24 giờ, tế bào được xử lý với thuốc ở những nồng độ khác nhau trong 48 giờ. Sau đó, dung dịch MTT 0,5 mg/ml và isopropanol:HCl (1:1) lần lượt được thêm vào. Số lượng tinh thể formazan tạo thành được đánh giá bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 570 nm, sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong dịch nuôi cấy.

2.5. Những phân tích dựa trên hình thái tế bào:

2.5.1. Quan sát dưới kính hiển vi soi ngược: Tế bào HeLa được ủ với cao chiết eter dầu từ cây trau trấu ở nồng độ 0,1 và 1 µg/ml trong vòng 24 giờ và được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (Olympus CKX41) ở độ phóng đại 400X.

2.5.2. Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang: Tế bào được nuôi trong đĩa nuôi cấy có đường kính 3 cm, sau giai đoạn ủ với thuốc, loại bỏ dịch môi trường, đặt phiến kính mỏng trực tiếp lên lớp tế bào bám, nhuộm mẫu với 100 µl dung dịch nhuộm gồm AO (100 µg/ml) và EB (100 µg/ml) trong hai phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu sau đó được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Olympus BX41) ở độ phóng đại 400X.

2.5.3. Quan sát hiện tượng phân mảnh ADN: 5×10^6 tế bào đã qua giai đoạn cảm ứng thuốc, được ly giải trong 600 µl dung dịch ly giải (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 0.2%) trong 10 phút trên đá. Sau đó, dịch ly giải được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút. Thu nhận dịch nổi, ủ với 1 mg/ml RNase A ở 37 °C trong 2 giờ. Mẫu được tách chiết hai lần với phenol:chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) và một lần với chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Sau khi rửa với ethanol, ADN được phân tích trên gel agarose 2% bằng phương pháp điện di ở 50 V trong 1 giờ.

2.5.4. Trình bày kết quả: Thí nghiệm sàng lọc được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

3.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu nhận 19 cây thuốc và tiến hành tách chiết bằng những dung môi như trình bày ở bảng 1. Chúng tôi khảo sát hoạt tính gây độc tế bào (I%) của 30 cao chiết ở nồng độ thử nghiệm là 100 µg/ml trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa bằng phương pháp MTT. Kết quả cho thấy có 7 cao chiết có phần trăm ức chế sự tăng trưởng tế bào trên 50% (bảng 1), đó là cao chiết acetate ethyl từ cây còng nước ($98,3 \pm 5,13$), hai cao chiết chloroform và toluen từ rễ cây dứa cạn ($75,9 \pm 9,16$ và $66,3 \pm 8,39$), hai cao chiết acetone và ether dầu từ vỏ cây vàng nhựa ($92,0 \pm 3,46$ và $82,6 \pm 21,4$), một cao chiết eter dầu từ lá sơn vé ($88,0 \pm 9,20$) và một cao chiết ether dầu từ vỏ cây trau trấu ($96,3 \pm 2,31$). Kết quả trên cho thấy phần lớn các cây có hoạt tính mạnh (*Calophyllum dongnaiense*, *Garcinia ferrea*, *Garcinia merguensis* Wight và *Mammea siamensis* (Miq.) T. Anderson) đều thuộc họ Clusiaceae, chứng tỏ đây là họ cây rất có triển vọng trong các nghiên cứu về hoạt tính kháng ung thư. Theo Masataka Itoigawa (2001), 4-phenylcoumarins được chiết từ các cây thuộc giống *Calophyllum* có hoạt tính ức chế chuyên biệt enzyme reverse transcriptase của HIV-I, được định hướng phát triển thành thuốc chống AIDS và ung thư. Những cây thuộc giống *Garcinia* cũng được nghiên cứu rất nhiều [7,8], đại diện là cây măng cụt (*Garcinia mangostana*). Theo Primchanien Moongkarndi (2004), cao chiết methanol từ cây măng cụt có hoạt tính kháng phân bào, cảm ứng quá trình apoptosis và chống oxy hóa rất mạnh trên dòng tế bào ung thư vú SKBR3.

Bảng 1. Thông tin các cây thuốc sử dụng trong nghiên cứu [1, 4, 5, 11]

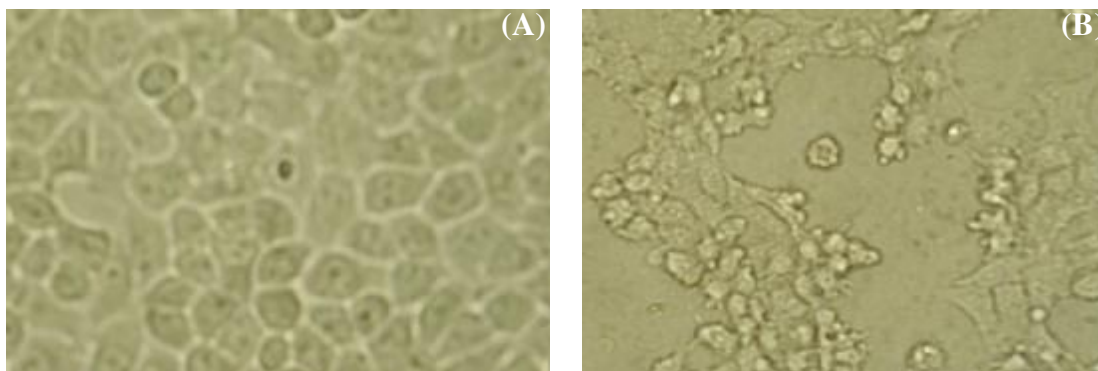
Họ	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Bộ phận sử dụng	Nơi thu nhận	Dung môi tách chiết	Công dụng dân gian	I (%) tại 100 µg/ml
Amaryllidaceae	<i>Crinum latifolium</i> L.	Trinh nữ hoàng cung	Hoa	Đồng Nai	Eter dầu	Trị viêm thấp khớp, mụn nhọt, ung thư	$-3,92 \pm 5,46$
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Rau má	Toàn cây	Tp. HCM	Cồn tuyệt đối	Trị sốt, tiêu chảy, viêm họng, mụn	$7,95 \pm 7,86$

						nhọt	
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	Dừa cạn	Rễ	Phú Yên	Chloroform	Trị tiểu đường, cao huyết áp, ung thư	75,9 ± 9,16
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	Dừa cạn	Rễ	Phú Yên	Toluene	Trị tiểu đường, cao huyết áp, ung thư	66,3 ± 8,39
Araliaceae	<i>Polyscias serrata</i> Balf.	Đình lăng răng	Lá	Đồng Nai	Chloroform	Trị sốt rét, tăng co bóp tử cung, lợi tiểu, an thần	9,74 ± 4,04
Araliaceae	<i>Polyscias serrata</i> Balf.	Đình lăng răng	Lá	Đồng Nai	Eter dầu	Trị sốt rét, tăng co bóp tử cung, lợi tiểu, an thần	26,6 ± 8,08
Araliaceae	<i>Polyscias serrata</i> Balf.	Đình lăng răng	Lá	Đồng Nai	Methanol	Trị sốt rét, tăng co bóp tử cung, lợi tiểu, an thần	2,38 ± 5,74
Asteraceae	<i>Cosmos caudatus</i> HBK	Sao nhái hương	Lá	Tp. HCM	Cồn tuyệt đối	Kháng nấm, trị đầy hơi, khó tiêu, đau dạ dày	9,60 ± 5,58
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt non	Phú Yên	Cồn 95 độ	Kháng khuẩn, virus, ung thư	-7,43 ± 17,6
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt non	Phú Yên	Chloroform	Kháng khuẩn, virus, ung thư	-3,38 ± 12,9
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt non	Phú Yên	Xăng dung môi	Kháng khuẩn, virus, ung thư	7,00 ± 8,49
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt già	Phú Yên	Cồn 95 độ	Kháng khuẩn, virus, ung thư	6,72 ± 17,1
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt già	Phú Yên	Chloroform	Kháng khuẩn, virus, ung thư	2,96 ± 6,55
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Khổ qua	Vỏ hạt già	Phú Yên	Xăng dung môi	Kháng khuẩn, virus, ung thư	-2,42 ± 9,43
Cucurbitaceae	<i>Momordica conchinchinensis</i> (Lour.) Spreng.	Gấc	Nhân hạt gấc	Phú Yên	BuOH	Chữa bệnh khô mắt, cao huyết áp, rối loạn thần kinh, lợi tiểu, tê thấp	-3,63 ± 18,8
Fabaceae	<i>Entada pursaetha</i>	Bàm bám	hạt	Tây Ninh	Cồn tuyệt	Dùng làm	22,5 ± 12,3

	DC	nam			đôi	thuốc bỏ	
Fabaceae	<i>Gleditschia australis</i> Hemsl. Ex Forbes et Hemsl.	Bồ kết	Trái	Dak Lak	Cồn 50%	Lợi tiểu, trị ho, kháng virus	5,50 ± 0,71
Clusiaceae	<i>Callophyllum dongnaiense</i> Pierre	Cồng nước	Vỏ cây	Đồng Nai	AcOEt	Trị loét, ung nhọt	98,3 ± 5,13
Clusiaceae	<i>Callophyllum inophyllum</i> L.	Mù u	Vỏ cây	Bình Định	Ether dầu	Trị viêm thấp khớp, viêm dây thần kinh, cổ tử cung, bệnh phong.	23,8 ± 7,88
Clusiaceae	<i>Garcinia cochinchinensis</i> (Lour.) Choisy	Bứa nam	Vỏ cây	Đồng Nai	AcOEt	Trị loét, bệnh hậu sản	-1,50 ± 6,27
Clusiaceae	<i>Garcinia ferrea</i> Pierre	Vàng nhựa	Vỏ cây	Kiên Giang	Acetone	Trị bong gân	92,0 ± 3,46
Clusiaceae	<i>Garcinia ferrea</i> Pierre	Vàng nhựa	Vỏ cây	Kiên Giang	AcOEt	Trị bong gân	11,5 ± 9,15
Clusiaceae	<i>Garcinia ferrea</i> Pierre	Vàng nhựa	Vỏ cây	Kiên Giang	Ether dầu	Trị bong gân	82,6 ± 21,4
Clusiaceae	<i>Garcinia merguensis</i> Wight.	Son vé	Lá	Tp. HCM	AcOEt	Trị bệnh phù, nề	20,9 ± 5,64
Clusiaceae	<i>Garcinia merguensis</i> Wight	Son vé	Lá	Tp. HCM	Ether dầu	Trị bệnh phù, nề	88,0 ± 9,20
Clusiaceae	<i>Mammea siamensis</i> (Miq.) T. Anderson	Trau trấu	Vỏ cây	Đồng Nai	Ether dầu	Thuốc bỏ tim, giảm sốt, kích thích ăn uống	96,3 ± 2,31
Rubiaceae	<i>Hedyotis auricularia</i> L.	An điền tai	Toàn cây (bỏ rễ)	Bình Phước	Ethanol tổng	Trị bệnh dịch tả, lỵ, viêm	5,27 ± 3,61
Rubiaceae	<i>Hedyotis biflora</i> (L.) Lam.	An điền 2 hoa	Toàn cây (bỏ rễ)	Bình Phước	Ethanol tổng	Trị suy nhược thần kinh	-5,10 ± 7,53

Mặc dù cây trau trấu đã được sử dụng như là vị thuốc cổ truyền ở Thái Lan, nhưng ở Việt Nam, những nghiên cứu trên loại cây này vẫn còn rất hạn chế. Theo Sanan Subhadhirasakul (2005), cao chiết chloroform của cây trau trấu có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhưng vẫn chưa có tài liệu nào chứng minh về hoạt tính kháng phân bào của loài cây này. Ngoài ra, với 7 cao chiết có phần trăm ức chế sự tăng trưởng tế bào trên 50% ở nồng độ thử nghiệm 100 µg/ml, chúng tôi tiếp tục tiến hành khảo sát hoạt tính gây độc ở nồng độ 20 µg/ml, kết quả cho thấy chỉ có cao chiết eter dầu từ vỏ cây trau trấu có phần trăm ức chế sự tăng trưởng tế bào mạnh nhất là 93,1 ± 2,31; chúng tỏ cao chiết này có hoạt tính gây độc rất mạnh trên dòng tế bào HeLa. Do đó, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu sâu hơn cơ chế tác động của cao chiết này.

Tế bào HeLa được xử lý với cao chiết PEE ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ. Sau thời gian xử lý, tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược và kính hiển vi phát huỳnh quang.

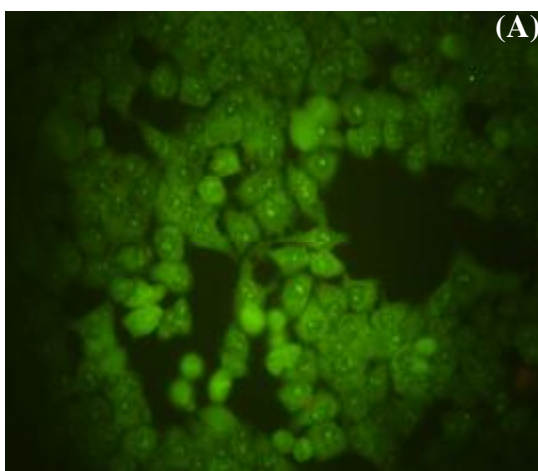


Hình 1: Tế bào HeLa được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (400X).

(A). Tế bào không xử lí.

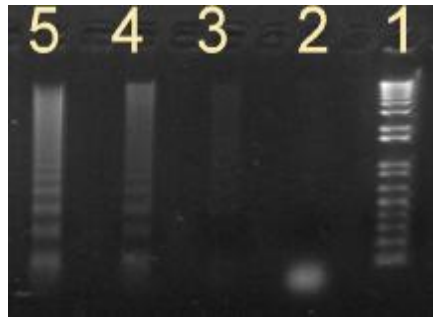
(B). Tế bào được xử lí với cao chiết PEE tại nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ.

So với mẫu tế bào không xử lí, tế bào xử lí với trau trấu tại 1 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ có sự thay đổi hình thái khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (hình 1). Các tế bào trong quần thể không còn giữ được hình dạng đa giác đặc trưng mà trở nên tròn và co lại thành cụm. Điều này chứng tỏ cao chiết PEE có ảnh hưởng trực tiếp đến khung sườn của tế bào. Sau đó, chúng tôi tiến hành nhuộm hai quần thể tế bào này đồng thời với hai loại thuốc nhuộm: AO và EB và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, các tế bào có cảm ứng với thuốc bắt màu xanh sáng và đậm trong nhân so với quần thể tế bào không xử lí với thuốc. Điều này chứng tỏ quần thể tế bào này đang bị cảm ứng apoptosis ở giai đoạn đầu, màng vẫn còn nguyên vẹn, nhiễm sắc chất cô đặc mạnh, nên chỉ bắt màu chủ yếu của thuốc nhuộm AO (hình 2A.). Ngoài ra, trong quần thể này, chúng tôi còn thấy được hiện tượng nảy chồi trên màng sinh chất ở một số tế bào đi vào giai đoạn muộn của quá trình apoptosis (hình 2A.)



Tế bào có màng blebbing – Đặc trưng của tế bào apoptosis giai đoạn cuối

Các tế bào apoptosis còn được đặc trưng bởi sự phân cắt đặc hiệu ADN bộ gene thành những phân mảnh có kích thước là bội số của 180 cặp base. Đặc điểm này biểu hiện ở giai đoạn muộn của tế bào apoptosis. Sự phân mảnh ADN của các tế bào được xử lý với cao chiết PEE ở nồng độ 1, 5 và 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%. Kết quả cho thấy ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ chưa xuất hiện những phân mảnh ADN. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, chứng tỏ quần thể tế bào này đang trải qua giai đoạn sớm của quá trình apoptosis. Ở nồng độ 5 và 10 $\mu\text{g/ml}$ sau 24 giờ cảm ứng, hiện tượng phân mảnh ADN xuất hiện rất rõ (hình 3). Điều này cho thấy khi nồng độ thuốc tăng dần thì tốc độ khởi phát và diễn tiến của quá trình apoptosis cũng tăng theo.



Hình 3. Kết quả khảo sát hiện tượng phân mảnh ADN ở tế bào HeLa

- (1) Thang chuẩn 1 Kb
- (2) Tế bào không xử lý với thuốc
- (3), (4), (5) Tế bào được xử lý với cao chiết PEE ở nồng độ 1, 5, và 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ

4.KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, chúng tôi nhận thấy cao chiết PEE từ cây trau trấu (*Mammea siamensis* (Miq.) T. Anderson) có hoạt tính gây độc tế bào cao thông qua khả năng cảm ứng

apoptosis trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa ở nồng độ rất thấp. Do đó, cây tra trấu hứa hẹn đem đến những tiềm năng trong điều trị ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Campbell, M. J., Hamilton, B., Shoemaker, M., Tagliaferri, M., Cohen, I., Tripathy, D. *Antiproliferative activity of Chinese medicinal herbs on breast cancer cells in vitro*. *Anticancer Res.* 22 (6C): 3843-3852 (2002).
- [2]. Cragg, G. M., Newman, D. J. *Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources*. *Cancer Invest.*, 17(2), 153-63 (1999).
- [3]. Denizot, F., Lang, R. *Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. *J Immunol Methods.*; 89(2), 271-277 (1986).
- [4]. Đỗ Tất Lợi. *Cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y Học, Hà Nội, (2001).
- [5]. Hsu B. *The use of herbs as anticancer agents*. *J Chin Med.* 8(4), 301-306 (1980).
- [6]. Itoigawa, M. Ito, C. Tan, H. Kuchide, M. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, H. *Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from Calophyllum inophyllum*. *Cancer Lett.* Aug 10; 169 (1):15-9 (2001).
- [7]. Moongkarndi P, Kosem N., Kaslungka S., Luanratan O., Pongpan N., Neungton N. *Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by Garcinia mangostana (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line*. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 161–166,(2004).
- [8]. Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ito T, Ohguchi K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. *Cytotoxic benzophenone derivatives from Garcinia species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukemia cell lines*. *Biol Pharm Bull.* Apr; 26(4):569-71 (2003).
- [9]. Pezzuto, J. M. *Plant-derived anticancer agents*. *Biochem Pharmacol.*, 53(2), 121-33 (1997).
- [10]. Subhadhirasakul, S. and Pechpongs, P. *A terpenoid and two steroids from the flowers of Mammea siamensis*. *J. Sci. Technol.*, 27(Suppl. 2) : 555-561 (2005)
- [11]. Võ Văn Chi. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y Học. Tp. HCM (1996).