

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ DỊCH CHIẾT THẢO DƯỢC LÊN HỆ THỐNG ENZYME P450 VÀ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN CYP1B1 Ở DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ

Đỗ Thị Tuyên, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Đỗ Khắc Hiếu, Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn Thị Ngọc Dao

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Gốc tự do thường được tạo ra trong quá trình chuyển hóa các chất ở tế bào, cơ thể. Nhưng vì một lý do nào đó như rối loạn về chuyển hóa do độc hóa chất, các gốc tự do được tạo ra quá nhiều sẽ tác động lên các đại phân tử như prôtein, nucleoprotein, hemoglobin, làm thay đổi hoạt độ và hủy hoại các tế bào. Để hạn chế và ngăn chặn tác động độc hại của các gốc tự do, người ta phải sử dụng các chất chống oxy hóa với mục đích bất hoạt các gốc tự do, bảo vệ cơ thể. Với mục đích nhằm tăng cường sự hiểu biết về cơ chế chuyển hóa của một số chất tự nhiên chống oxy hóa, tìm hiểu cơ chế tác dụng của hệ thống enzyme oxy hóa khử nhất là hệ thống P450 khử độc của cơ thể, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của các dịch chiết tự nhiên có tác dụng chống oxy hóa lên hệ thống enzyme P450 trên mô hình tế bào *in vitro*. Qua các kết quả thu được chúng tôi nhận thấy trên mô hình tế bào nuôi cấy *in vitro* các dịch chiết rễ nhàu, quả nhàu, quả bứa và silymarin với nồng độ 50 µg/ml và 10 µg/ml có tác dụng làm tăng hoạt độ P450 (thông qua tăng hoạt độ aniline hydroxylase) so với tế bào đối chứng. Riêng dịch chiết lá neem không có tác dụng hoặc làm giảm mạnh hoạt độ P450 so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó hàm lượng P450, P420 giảm hầu như ở cả hai loại tế bào LU và SP2/0 riêng silymarin thì hàm lượng P450 và P420 tăng mạnh. Đồng thời, chúng tôi phát hiện điểm đột biến A1358G dẫn đến thay đổi amino acid Asn453Ser trên trình tự gen CYP1B1 ở tế bào ung thư phổi.

Từ khóa: CYP3A4, CYP1B1, CYP1A1, CYP1A2, điểm đột biến

MỞ ĐẦU

P450 là một đại gia đình enzyme xúc tác cho quá trình oxy hóa của sự chuyển hóa các chất ngoại sinh gồm các thuốc, chất độc và tác nhân gây ung thư cũng như các chất nội sinh gồm các steroid, acid béo, vitamin bão hòa và nội tiết tố (Nelson *et al.*, 1993). Các P450 chính liên quan đến quá trình khử độc và hoạt động của một số thể tiền ung thư của môi trường, gồm CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2E1, 3A4, 3A5 và 4B1 ở người (Inoue *et al.*, 2000). Trong đó, CYP1A1 và CYP1B1 đã được chứng minh có biểu hiện chiếm ưu thế trong các bộ phận ngoại gan, xúc tác hoạt độ của một số cảm thụ quan để thực hiện phản ứng trao đổi chất đó chính là nguyên nhân cuối cùng gây hư hại DNA ở tế bào (Shimada *et al.*, 1996).

Trên thế giới, đã có một số công trình nghiên cứu về ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa từ thực vật lên hệ thống gen P450 đặc biệt là hệ gen trong họ CYP1 như resveratrol (3,5,4'-trans-trihydroxystilbene), một chất chống oxy hóa diphenolic trong thực vật và thức ăn, có khả năng

chữa trị và ngăn ngừa hóa học ung thư (Mollerup *et al.*, 2001).

Indole-3-carbinol (I3C) một hỗn hợp các alkanoid thực vật có trong cải súp lơ xanh và một vài loại rau trong họ cải, là một chất điều hòa khối u ở một số mô hình động vật. I3C cảm ứng tổng hợp các enzyme ở pha I trong một số loài hoặc mô bao gồm CYP1A1/2, CYP1B1/2 và CYP3A1/2 (Larsen-Su, Williams, 2001). Bên cạnh đó, một số chất chống oxy hóa khác như β -carotene, vitamin C, allicin từ tỏi hay một số chất từ dược liệu đều được các tác giả chứng minh có tác dụng lên hệ thống P450 (Teyssier *et al.*, 1999; Obach, 2000; Zou, 2002; Liu *et al.*, 2003). Nhiều tài liệu trên thế giới cũng như trong nước đã chứng minh, các hoạt chất có trong các dịch chiết thảo dược trên là cơ chất của hệ thống enzyme P450. Trong bài báo này, chúng tôi sẽ đi sâu vào tìm hiểu ảnh hưởng của các dịch chiết từ hạt cóc gai (silymarin), quả nhàu, lá neem và quả bứa lên hệ thống enzyme P450 và các enzyme chống oxy hóa trên mô hình tế bào *in vitro* giúp cho các nhà khoa học làm cơ sở để từ đó đưa ra phương hướng sử dụng nguồn dược liệu quý trên, trong việc phòng và

chống bệnh ung thư.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

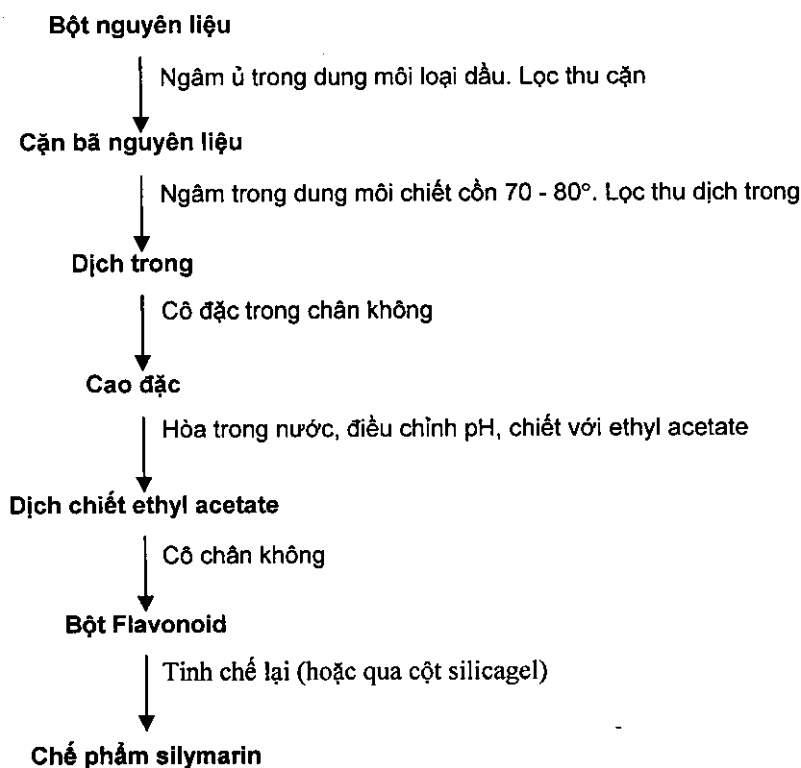
Nguyên liệu thực vật

Các dịch chiết từ quả nhàu (*Morinda citrifolia*), **quả bứa** (*Garcinia cambodgiensis*), **lá neem** (*Azadirachta indica*) và **rễ nhàu**

100 g bột thực vật được trộn đều với 200 ml cồn 40°, ủ kín 1 h, trong bình có nắp đậy. Sau 3 h, dịch ứ

được cho từ từ lên lớp bông trong bình ngấm kiệt dung tích 800 ml. Cuối cùng, giấy lọc tròn được phủ lên giấy lọc, để vài viên bi thủy tinh. Sau đó, cho cồn 40° vào từ từ, ngập bi thủy tinh khoảng 3 cm. Đậy nắp để một ngày đêm. Hôm sau cho nhỏ giọt chậm và cho cồn 40° luôn giữ ở mức ngập bi thủy tinh 3 cm. Khi nhận được 700 ml dịch chiết thì ngừng. Hiệu suất thu hồi cao từ dịch chiết bốc hơi cách thủy lần lượt là 19,5% (quả nhàu); 11,7% (rễ nhàu); 18,7% (quả bứa); 10,6% (lá neem).

Tách chiết silymarin từ hạt cúc gai (Hình 1).



Hình 1. Quy trình chiết xuất silymarin.

Hóa chất

Hóa chất được mua từ nhiều hãng khác nhau: Enzyme cắt giới hạn, T4 ligase, *Taq* polymerase, vector pTZ57R/T (Fermentas, Litva); PCR Master Mix (In vitrogen, Mỹ); kit tinh sạch plasmid, kit tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Mỹ); cao nấm men, peptone (Sigma, Mỹ). Aniline, NADPH, vitamin PP (Nicotine amide), Dithionit, Pheno... Tất cả các hóa

chất sử dụng đều có độ tinh sạch (PA).

Các môi trường nuôi cấy tế bào MEME (Gibco, Hoa Kỳ), huyết thanh bò FBS, trypsin, EDTA (Atlanta Biological, Hoa Kỳ);

Cặp mồi đặc hiệu của CYP1B1 có trình tự sau: P1: 5'- TAA GAA TTT TGC TCA CTT GC -3'; P2: 5'- TTT ACT CCT CAT CTC CGA AG -3'. Chạy PCR: 95°C/4'; 35 chu kỳ (94°C/1', 51°C/1'',

72°C/1'); 72°C/20'; 4°C/∞.

Phương pháp

Các phương pháp sinh học phân tử như tách chiết DNA tổng số; Phản ứng khuếch đại; Cắt DNA bằng enzyme giới hạn; Gắn dính DNA; Biến nạp; Giải trình tự DNA theo Sambrook, Russell (2001).

Các phương pháp hóa sinh

Hoạt độ aniline hydroxylase được xác định theo phương pháp của Imai và đồng tác giả (1974).

Hàm lượng P450 được xác định theo phương pháp của Omura và Sato (1964) dựa vào quang phổ chênh lệch CO. P450 ở dạng kết hợp với CO có đỉnh hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 450$ nm. Hàm lượng P450 được tính toán dựa vào hệ số $\xi_{450/490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào ung thư phổi người LU (Human lung carcinoma) được tách dòng tại Trường Đại học Y Illinois, Hoa Kỳ. Tế bào được nuôi trong môi trường MEME (Minimum Essential Medium with Earles salts and L-glutamine) có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò FBS với nồng độ tế bào ban đầu $2,5 \times 10^6$ tế bào/75 cm² ở các điều kiện 5% CO₂ và 37°C. Môi trường được thay sau mỗi 5 ngày, làm bong rời tế bào bằng 0,05% trypsin-EDTA. Dung dịch tế bào để thử hoạt chất có nồng độ 50×10^3 tế bào/ml. Hoạt chất được đưa vào sau 24 h và nuôi tiếp 72 h thì lấy tế bào đem phân tích enzyme và gen.

Dòng tế bào ung thư tủy chuột SP2/0 Ag14 (Mouse myeloma) được mua từ Ngân hàng Tế bào Hoa Kỳ ATCC mã số CRL 1581. Nồng độ tế bào bắt đầu nuôi trong chai là $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Môi trường nuôi cấy MEME được bổ sung 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS, ở các điều kiện 5% CO₂ và 37°C, thay môi trường sau mỗi 3 ngày. Dung dịch tế bào để thử hoạt chất có nồng độ 50×10^3 tế bào/ml. Hoạt chất được đưa vào sau 24 h và nuôi tiếp 48 h thì lấy tế bào đem phân tích enzyme.

Loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, sau đó tráng qua bằng FBS, trypsin hóa bằng trypsin EDTA trong 1 - 3 phút ở 37°C; thêm 5 ml môi trường nuôi cấy để dừng tác động của trypsin. Đếm mật độ tế bào để xác định tỷ lệ cấy chuyển phù hợp. Cấy tế bào sau khi ly tâm 5 phút với 900 - 1000 vòng/phút để loại trypsin được hòa trong lượng môi trường cần thiết để có mật độ phù hợp cho sự phát triển của tế bào. Đưa vào tủ

ấm CO₂ để tế bào tiếp tục phát triển trong 72 h. Các mẫu thí nghiệm được bổ sung các dịch chiết thảo dược với nồng độ 10, 50 và 100 µg/ml. Mẫu đối chứng CoT là tế bào ung thư không có chất thử được nuôi song song với mẫu thí nghiệm. Các tế bào được nuôi cấy lặp lại ba lần để đảm bảo tính chính xác.

Sau 72 h cấy chuyển, sau khi ly tâm 7 phút với 1100 vòng/phút, rửa tế bào được hòa vào đệm 100 mM TrisHCl, 250 mM sucrose pH 7,4; siêu âm 1 phút vì tần số 20 Hz. Dịch phá tế bào được dùng để xác định các chỉ tiêu.

Phần mềm phân tích

Các số liệu được xử lý thống kê đầy đủ, tính trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ đồ thị theo chương trình excel.

So sánh hai số trung bình giữa các nhóm bằng nghiệm pháp t- Test (kiểm định cho 2 nhóm độc lập).

Chương trình DNASTar được sử dụng để phân tích trình tự nucleotide và amino acid; tìm OFR và so sánh trình tự.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hoạt độ P450 aniline hydroxylase (AH) dưới tác dụng của các dịch chiết thảo dược

Hoạt độ AH ở tế bào nuôi cấy

Nói chung hoạt độ aniline hydroxylase ở cả hai dòng tế bào nuôi cấy (LU và SP2/0) có bổ sung dịch chiết thảo dược đều có cùng một kiểu đồ thị (Hình 2). Các dịch chiết từ quả nhàu và rễ nhàu với nồng độ 50 µg/ml có tác dụng làm tăng hoạt độ AH gấp 1,4 - 2,7 lần so với tế bào đối chứng.

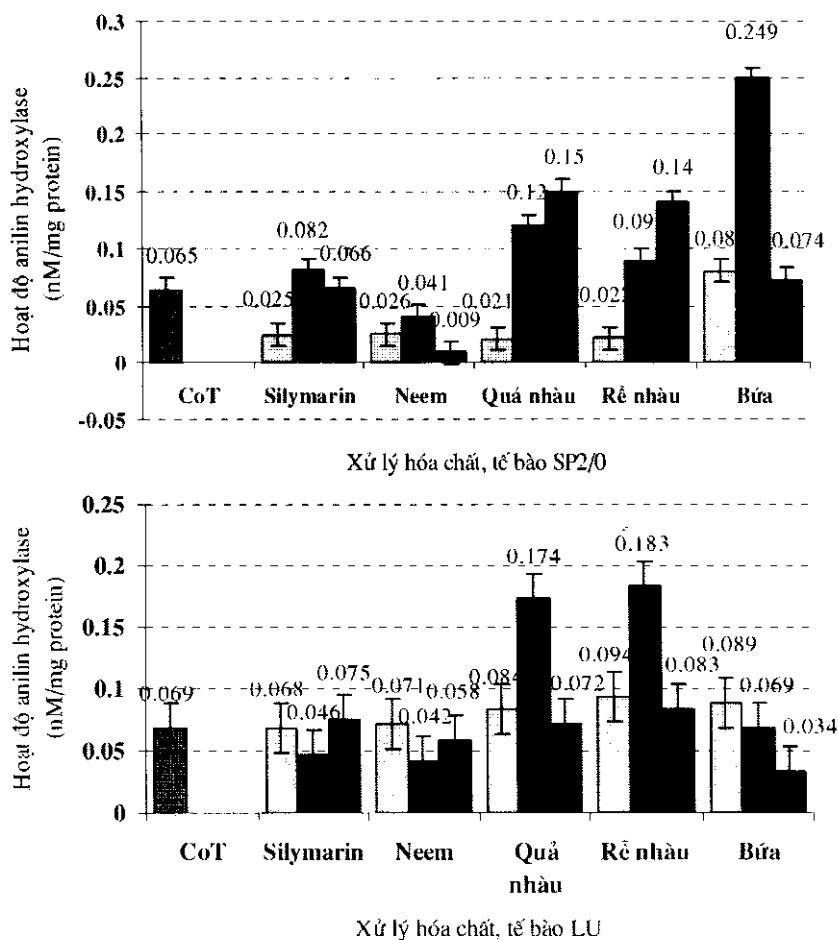
Còn với nồng độ 10 µg/ml, dịch chiết quả nhàu và rễ nhàu làm tăng hoạt độ AH lên gấp đôi ở tế bào nuôi cấy SP2/0, nhưng không có tác dụng đối với tế bào LU. Dịch chiết quả nhàu và rễ nhàu với nồng độ 100 µg/ml làm tăng hoạt độ AH khoảng 1/3 ở tế bào LU và giảm khoảng 2/3 ở tế bào SP2/0. Dịch chiết quả bứa với nồng độ 50 µg/ml làm tăng mạnh hoạt độ AH lên 4 lần đối với tế bào SP2/0 và tăng nhẹ với các nồng độ khác đối với cả hai loại tế bào.

Dịch chiết lá neem và silymarin đều không có tác dụng hoặc làm giảm mạnh hoạt độ AH. Đối với silymarin, hoạt độ AH có dấu hiệu tăng nhẹ so với nhóm đối chứng ở cả hai loại tế bào nuôi cấy SP2/0

và LU, riêng ở nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ ở tế bào nuôi cấy SP2/0 tăng 26%.

Sau khi chiết ethanol 40°, từ các dịch chiết thảo dược này chúng tôi đã thu được cao chiết khá tinh sạch (kết quả được kiểm tra trên cột HPLC). Dịch chiết từ lá neem, quả bứa và quả nhàu Việt Nam đã làm ức chế tế bào ung thư phát triển (kết quả thể hiện trên kính hiển vi). Bên cạnh đó các dịch chiết này đều là những flavonoid liên quan đến nhiều phản ứng enzyme, giúp cho cơ thể điều hòa các quá trình chuyển hóa, làm chậm sự già và nhiều đột

biến có hại. Việc nghiên cứu và ứng dụng các chế phẩm flavonoid trên thế giới ngày càng phát triển. Ở Việt Nam, đã có những ứng dụng kết quả nghiên cứu vào thực tiễn, sản xuất một số thuốc chữa bệnh có hiệu quả. Từ quả nhàu Việt Nam người ta đã sản xuất ra cao nhàu chữa các bệnh tiểu đường, tim mạch hay cao huyết áp và được bán rộng rãi trên thị trường. Từ lá neem Việt Nam đã sản xuất ra các chế phẩm như dầu neem, trà neem để tăng cường sức khỏe cho con người (Nguyễn Thượng Dong *et al.*, 2004).



Hình 2. Hoạt độ aniline hydroxylase ở tế bào nuôi cấy SP2/0 và LU dưới tác dụng của các dịch chiết thảo dược. ■: 10 $\mu\text{g/ml}$; ■: 50 $\mu\text{g/ml}$; ■: 100 $\mu\text{g/ml}$; ■: mẫu đối chứng không có chất thử.

Hàm lượng P450 dưới tác dụng của các dịch chiết thảo dược

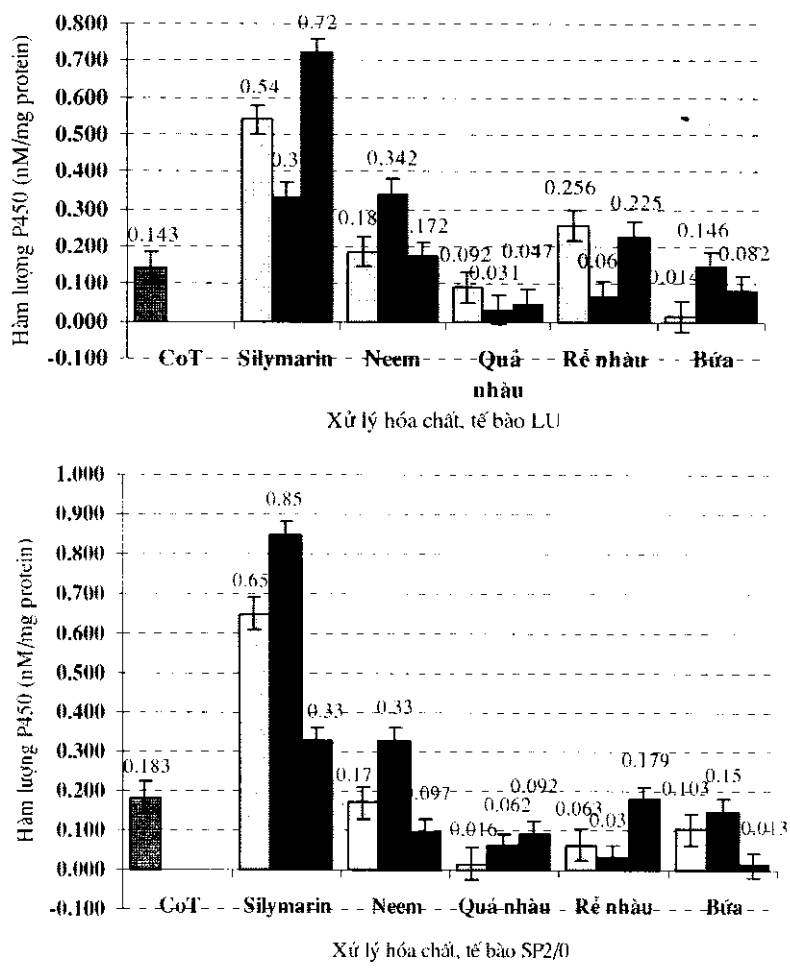
Hàm lượng P450 ở tế bào nuôi cấy

Silymarin có tác dụng làm tăng hàm lượng P450

ở cả hai loại tế bào nuôi cấy lên 2 - 5 lần so với tế bào đối chứng (Hình 3). Dịch chiết lá neem có dấu hiệu làm tăng hàm lượng P450 ở tế bào nuôi cấy lên 2 - 2,5 lần với nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ và không có tác dụng (tế bào LU) hoặc làm giảm nhẹ (tế bào SP2/0)

với nồng độ cao hơn (100 µg/ml) hoặc thấp hơn (10 µg/ml). Dịch chiết rễ nhàu cũng có khả năng làm tăng hàm lượng P450 (58 - 80%) với nồng độ 10 và 100 µg/ml ở tế bào nuôi cấy LU. Các dịch chiết quả

nhàu và quả bứa đều không có tác dụng làm tăng hàm lượng P450. Với nhiều nồng độ khác nhau, các dịch chiết này còn làm giảm hàm lượng P450 xuống còn khoảng 10% so với tế bào đối chứng (Hình 3).



Hình 3. Hàm lượng của P450 ở tế bào nuôi cấy SP2/0 và LU dưới tác dụng của các dịch chiết thảo dược. ■: 10 µg/ml; ■: 50 µg/ml; ■: 100 µg/ml, ■: mẫu đối chứng không có chất thử.

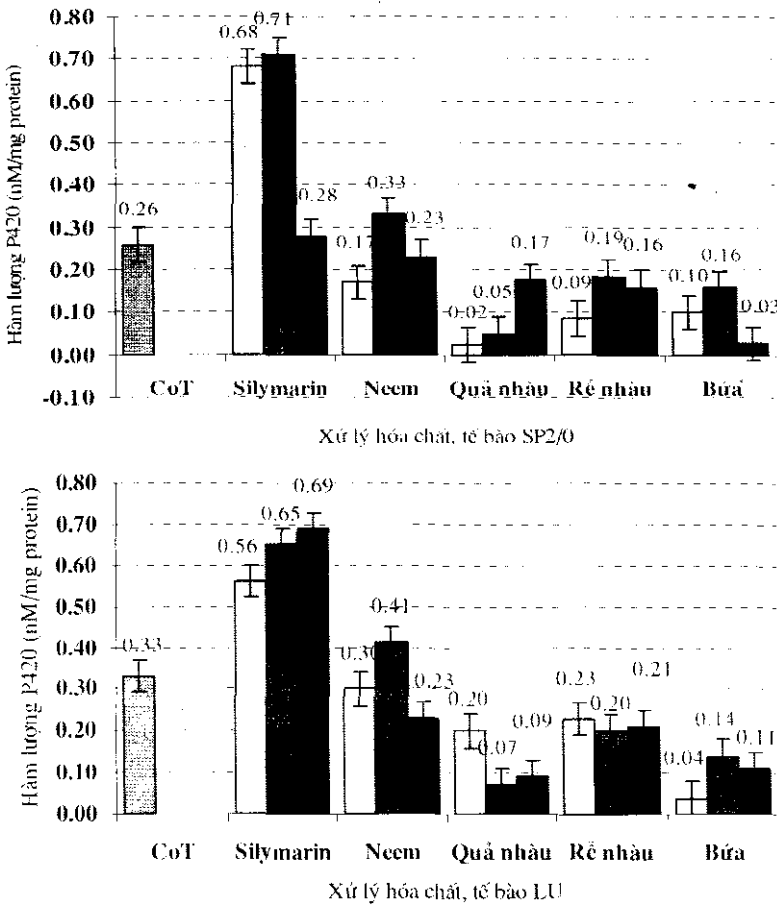
Hàm lượng P420 ở tế bào nuôi cấy

Silymarin có tác dụng làm tăng hàm lượng P420 ở cả hai loại tế bào nuôi cấy SP2/0 và LU lên 2 - 2,7 lần (Hình 4). Lá neem có tác dụng không thống nhất, với nồng độ trung bình 50 µg/ml làm tăng hàm lượng P420, nhưng với nồng độ cao hơn (100 µg/ml) hoặc thấp hơn (10 µg/ml) lại có tác dụng làm giảm hàm lượng P420. Các dịch chiết quả nhàu, rễ nhàu và quả bứa đều có tác dụng làm giảm hàm lượng P420, đa phần giảm 1/3 thậm chí chỉ còn khoảng

10% so với tế bào đối chứng.

Do phản ứng định lượng P420 và P450 dựa vào xác định trạng thái oxy hóa-khử của nguyên tử sắt heme cho nên hàm lượng P420 ở các nhóm nghiên cứu giảm xuống do giảm hàm lượng hemoprotein khác, kể cả hemoglobin. Như vậy là các dịch chiết thảo dược đã ảnh hưởng lên hàm lượng P450 thông qua việc giảm hàm lượng P420. Vì P450 là một protein chứa heme nên về nguyên nhân giảm các loại cytochrome có thể là do giảm

tổng hợp protein nói chung hoặc có thể chỉ giảm tổng hợp hem hoặc vì một lý do nào đó hem không gắn được vào phân tử enzyme để tạo thành phân tử P450 hoàn chỉnh.

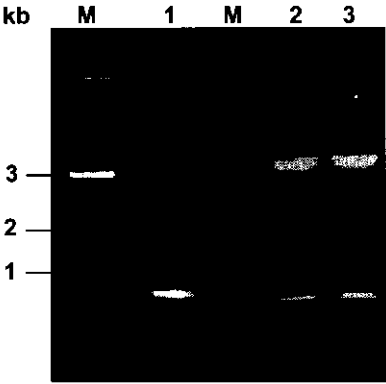


Hình 4. Hàm lượng P420 ở tế bào nuôi cấy SP2/0 và LU dưới tác dụng của các dịch chiết thảo dược. ■: 10 µg/ml; ■: 50 µg/ml; □: 100 µg/ml; ▨: mẫu đối chứng không có chất thử.

Phân tích đột biến gen CYP1B1

Hiện nay, việc nghiên cứu các chất chống oxy hóa từ thực vật giúp cho cơ thể loại bỏ và ngăn chặn ung thư khởi phát. Watterberg (1997) cho rằng các chất chống oxy hóa chính là các chất ức chế có khả năng ngăn ngừa sự hoạt động của tác nhân gây ung thư, tăng cường quá trình khử độc. Một số nghiên cứu gần đây đã chứng minh cả hai enzyme CYP1B1 và CYP1A1 đều xúc tác hoạt độ của các tác nhân gây ung thư phổi. Shimada và đồng tác giả (1999) cũng chỉ ra rằng sự đa hình gen CYP1B1 ở người là nguyên nhân gây nên sự biến đổi các chức năng xúc tác của các tiền ung thư và các steroid hormone gây nên ung thư vú và ung thư phổi ở người.

Như vậy, gen CYP1B1 có liên quan rất chặt chẽ với bệnh ung thư phổi. Đó là lý do tại sao chúng tôi chọn dòng tế bào ung thư phổi để phân tích trình tự gen CYP1B1. Các kết quả về ảnh hưởng của các dịch chiết tự nhiên chống oxy hóa này lên hoạt độ các enzyme chống oxy hóa mà chúng tôi đã công bố trên một số bài báo (Đỗ Thị Tuyên *et al.*, 2003; 2004; 2006) và đặc biệt là lên hệ thống enzyme P450 đã thu được các kết quả khá khả quan về khả năng giải độc, loại bỏ các gốc tự do... trên mô hình *in vitro*. Điều này gợi ý cho chúng tôi việc nghiên cứu sự đa hình gen CYP1B1 sẽ giúp cho các nhà khoa học làm cơ sở để từ đó đưa ra phương hướng sử dụng nguồn dược liệu quý trên, trong việc phòng và chống bệnh ung thư nói chung và bệnh ung thư phổi nói riêng.



Hình 5. Điện di đồ: Sản phẩm PCR với khuôn DNA tách chiết từ tế bào ung thư phổi LU (giếng 1); sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp với hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII* (giếng 2 - 3); M: DNA marker.

Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector pTZ57R/T, sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Các dòng plasmid tái tổ hợp được chọn lọc và cắt bằng enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII*. Sản phẩm cắt kiểm tra trên gel 0,8% agarose (Hình 5) có hai băng DNA, kích thước khoảng 2800 bp tương ứng với vector pTZ57R/T và băng còn lại có kích thước khoảng 700 bp tương ứng với DNA ngoại lai.

Trình tự nucleotide được xác định theo nguyên lý Sanger và so sánh với trình tự gen CYP1B1 người (AY393998) bằng phần mềm DNASTar. Trình tự CYP1B1 của tế bào ung thư phổi LU có một đột biến A $\rightarrow$ G ở vị trí 1358 dẫn đến thay đổi amino acid

Asn $\rightarrow$ Ser ở vị trí 453 trên trình tự protein CYP1B1. Đây là một đột biến đặc biệt xảy ra ở exon 3 có sự chuyển dịch A thành G tại vị trí 1358 dẫn tới amino acid Asn 453 thành Ser (Hình 5). Kết quả này phù hợp với công bố của nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới. Inoue và đồng tác giả (2000) đã phân tích tần số đa hình m3 (Asn453Ser) ở người da trắng (Caucasian) là 24%. Trong khi CYP1B1 đóng một vai trò quan trọng trong việc điều khiển một số bệnh ung thư nhất là ung thư phổi, nên việc phân tích trình tự gen P450 là một hướng đi rất đúng để tìm nguyên nhân và đề ra biện pháp phòng ngừa bệnh ung thư hiệu quả.

Thực tế một số nghiên cứu gần đây đã nhận dạng ít nhất bốn đa hình gen CYP1A1: T6235C (m1) ở vùng mã hóa biên 3', A4889G (m2) ở exon E7, T5639C ở vùng biên 3' (m3), và C4887A (m4) ở exon E7 có liên quan đến tốc độ phản ứng khác nhau của CYP1A1 (Inoue *et al.*, 2000). Còn gen CYP1B1 cũng có ít nhất ba đa hình gen C488G, G701T, C1299G và A1358G (Asn453Ser). Như vậy, chúng tôi đã phát ra kiểu đa hình A1358G (Asn453Ser) ở gen CYP1B1 trong tế bào ung thư phổi LU.

Murray và đồng tác giả (1997) khi nghiên cứu các bệnh ung thư ác tính như ung thư ngực và ung thư phổi bằng hóa mô miễn dịch đã phát hiện ra CYP1B1 biểu hiện rất mạnh, còn ở các tế bào mô bình thường tương ứng thì không phát hiện thấy. Các kết quả này là cơ sở cho sự phát triển các phương pháp mới để chẩn đoán ung thư dựa trên sự nhận dạng CYP1B1 trong các tế bào và nghiên cứu phát triển các thuốc chống ung thư.

YPDVQTRVQAELDQVVGRDRLPCMGDQPNLPYVLAFLYEAMRFSSEFVPVT	LU
YPDVQTRVQAELDQVVGRDRLPCMGDQPNLPYVLAFLYEAMRFSSEFVPVT	CYP1B1E3
IPHATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPKWPNPENFDPARFLDK	LU
IPHATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPKWPNPENFDPARFLDK	CYP1B1E3
DGLISKDLTSRVMIFS VGKRRRCIGEELSKMQLFLFISILAHQCDFRANPN	LU
DGLINKDLTSRVMIFS VGKRRRCIGEELSKMQLFLFISILAHQCDFRANPN	CYP1B1E3
EPAKMNF SYGLTIKPKSFKVNVTLRESMELLDSAVQNLQAKETCQ	LU
EPAKMNF SYGLTIKPKSFKVNVTLRESMELLDSAVQNLQAKETCQ	CYP1B1E3

Hình 6. Trình tự amino acid của gen CYP1B1 ở tế bào ung phổi được so sánh với trình tự không đột biến.

KẾT LUẬN

Trên mô hình tế bào nuôi cấy *in vitro* các dịch chiết rễ nhàu, quả nhàu với nồng độ 50 µg/ml có tác dụng làm tăng hoạt tính aniline hydroxylase gấp 1,4-2,7 lần so với tế bào đối chứng. Dịch chiết lá neem không có tác dụng hoặc làm giảm mạnh hoạt tính aniline hydroxylase. Silymarin có dấu hiệu tăng nhẹ so với nhóm đối chứng, dịch chiết quả bứa với nồng độ 50 µg/ml làm tăng mạnh hoạt tính aniline hydroxylase lên 4 lần đối với tế bào SP2/0 và tăng nhẹ với các nồng độ khác đối với cả hai loại tế bào. Hàm lượng P450, P420 giảm hầu như ở cả hai loại tế bào LU và SP2/0 riêng silymarin thì hàm lượng P450 và P420 tăng mạnh ở cả ba nồng độ. Phát hiện điểm đột biến A1358G dẫn đến thay đổi amino acid Asn453Ser trên trình tự gen CYP1B1 ở tế bào ung thư phổi LU. Kết quả này làm cơ sở cho các nhà khoa học để từ đó đưa ra phương hướng sử dụng nguồn dược liệu quý trên, trong việc phòng và chống bệnh ung thư nói chung và bệnh ung thư phổi nói riêng.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài cấp nhà nước KC04-17 do PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Thị Tuyên, Đào Thị Mai Anh, Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2003) Nghiên cứu ảnh hưởng của silymarin lên hệ thống enzym cytochrom P450 ở gan thỏ trắng thuần chủng Newzealand. *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Hà Nội* 2003: 472- 475.
- Đỗ Thị Tuyên, Đào Thị Mai Anh, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004) Ảnh hưởng của silymarin lên hoạt tính microsomal cytochrome P450 ở gan thỏ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(1): 57-64.
- Đỗ Thị Tuyên, Đỗ Khắc Hiếu, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2006) Tác dụng của silymarin lên hoạt tính của CYP3A4 trên mô hình tế bào *in vitro*. *Tạp chí Dược liệu* 6: 212-215.
- Imai Y, Sato R (1974) A gel-electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome P450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 60(1): 8-14.
- Inoue K, Asao T, Shimada T (2000) Ethnic-related differences in the frequency distribution of genetic polymorphisms in the CYP1A1 and CYP1B1 genes in Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 49: 285-295.
- Larsen-Su SA, Williams DE (2001) Transplacental exposure to indole-3-carbinol induces sex- specific expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the liver of fischer 344 neonatal rats. *Toxicol Sci* 64: 162-168.
- Liu C, Russell RM, Wang XD (2003) Exposing ferrets to cigarette smoke and a pharmacological dose of β-carotene supplementation enhance *in vitro* retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J Nutr* 133: 173-179.
- Mollerup S, Ovrebø S, Haugen A (2001) Lung carcinogenesis: resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAH in human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer* 92(1): 18-25.
- Murray GI, Taylor MC, McFadgen M, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57(14): 3026-3031.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gohor O, Okuda K, Nebert DW (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1: 21-51.
- Nguyễn Thượng Dong, Nguyễn Kim Phượng, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Trang Thủy, Nguyễn Quang Khuân, Nguyễn Thế Hùng, Nguyễn Văn Khang (2004) Nghiên cứu sơ bộ thành phần hóa học và tác dụng dược lý của lá neem. *Tạp chí Dược liệu* 9: 14-20.
- Obach RS (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* 294(1): 88-95.
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2379.
- Rendic S, Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab Rev* 29: 413-580.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 56: 2979-2984.

Shimada T, Watanabe J, Kawajiki J, Sutter TR, Guengerich FP, Gillam EMJ, Inoue K (1999) Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 20: 1607-1613.

Teyssier C, Guenot L, Suschetet M, Siess MH (1999) Metabolism of diallyl disulfide by human liver microsomal cytochromes P450 and flavin-containing

monooxygenases. *J Drug Metab Dispos* 27(7): 835-841.

Wattenberg LW (1997) An overview of chemoprevention: current status and future prospects. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 133-141.

Zou L, Harkey MR, Henderson GL (2002) Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci* 71(13): 1579-1589.

IN VITRO EFFECT OF NATURAL EXTRACTS ON THE CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P450 AND IDENTIFYING OF MUTATIONS IN CYP1B1 SEQUENCE OF LUNG CANCER CELLS

Do Thi Tuyen, Quyen Dinh Thi, Nguyen Sy Le Thanh, Do Khac Hieu, Le Thi Lan Oanh, Nguyen Thi Ngoc Dao*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Major P450 enzymes involved in the detoxication and activation of a number of environmental procarcinogens including CYP3A4, CYP1B1, CYP1A1, CYP1A2... Therefore, a potential mechanism by which natural extracts protect cell against tumorigenesis by enhancing the catalytic activity of bioactivating CYP enzymes. In addition to catalyzing toxicant bioactivation, CYP enzymes also metabolize clinically useful therapeutic agents. Hence, it is important to examine the interaction between natural extracts compound and P450 enzymes not only because this herbal medicine may confer chemoprotection in chemical carcinogenesis but also because the concomitant ingestion of natural extracts compound and conventional drugs may result in herb-drug interaction. In the present study, we investigated the *in vitro* effect of natural extracts on the catalytic activity of CYP. Our results indicate that natural extracts inhibits CYP content and increases activity. Moreover, the occurrence of genetic polymorphisms in the CYP1B1 genes was determined. One type of CYP1B1 polymorphism has been investigated in lung cancer cells, namely m3-type which corresponds to nucleotide changes at A1358G leading to an Asn453Ser exchange was studied.

Keywords: CYP3A4, CYP1B1, CYP1A1, CYP1A2, polymorphism

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7563159; E-mail: nndao@ibt.ac.vn