

Nghiên cứu khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*

Lương Hiền Minh¹, Huỳnh Thanh Trang¹, Nguyễn Đức Bách², Phí Thị Cẩm Miện^{2*}

¹Trường THPT Chu Văn An, Hà Nội

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 28/5/2018; ngày chuyển phản biện 31/5/2018; ngày nhận phản biện 27/6/2018; ngày chấp nhận đăng 2/7/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích đánh giá hiệu quả tách thu cao dịch chiết rễ chùm ngây của 7 loại dung môi khác nhau, đồng thời đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người (ung thư vú - MCF7, gan - HepG2, phổi - SK-LU-1, máu - Jurkat và da - SK-Mel-2) của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy, hiệu quả tách chiết của 7 loại dung môi là khác nhau, trong đó sử dụng dung môi ethanol 96% cho hiệu quả tách chiết cao nhất (đạt 19,66%). Ngoài ra, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% cũng cho hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất. Ở nồng độ 500 µg/ml, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế và diệt được 96,38% tế bào ung thư máu, 86,39% tế bào ung thư vú, 74,28% tế bào ung thư da, 73,89% tế bào ung thư phổi và 66,22% tế bào ung thư gan.

Từ khoá: Dịch chiết rễ chùm ngây, dung môi, HepG2, Jurkat, MCF7, SK-LU-1, SK-Mel-2.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Ngày nay, bệnh ung thư đã trở thành một vấn đề nhức nhối của toàn xã hội khi tỷ lệ người mắc bệnh ngày một gia tăng. Theo Tổ chức Y tế thế giới - WHO, tới năm 2020, số ca mắc ung thư trên toàn cầu có thể tăng lên đến 15 triệu ca mới mỗi năm. Tỷ lệ chết do ung thư có thể chiếm 25% tổng số ca tử vong [1]. Theo số liệu công bố tại Hội thảo quốc gia phòng chống ung thư, năm 2010 Việt Nam có 126.300 ca mắc mới.

Chùm ngây (*Moringa oleifera*) là một loại cây được trồng khá phổ biến và có giá trị dinh dưỡng cao. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, dịch chiết lá, thân, rễ chùm ngây có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan [2-6]. Theo báo cáo từ Trung tâm Thông tin sinh học quốc gia của Chính phủ Mỹ, dịch chiết từ lá chùm ngây có thể tiêu diệt 93% tế bào ung thư phổi ở người trong vòng 48 giờ, đồng thời có công dụng ngăn ngừa ung thư di căn [1].

Trên thế giới đã có những nghiên cứu khẳng định khả năng ức chế ung thư của cao chiết từ rễ cây chùm ngây [7]. Ở Việt Nam, cũng đã có một số nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa của dịch chiết chùm ngây. Benzyliso thiocyanate là hợp chất có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của tế bào

ung thư có trong rễ chùm ngây. Hiệu suất quá trình tách chiết các hợp chất thứ cấp, đặc biệt là benzylisothiocyanate phụ thuộc vào loại dung môi sử dụng. Trong nghiên cứu này, nhằm thu được cao chiết chùm ngây có hàm lượng benzylisothiocyanate cao nhất, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tách chiết thu cao chiết rễ chùm ngây bằng 7 loại dung môi khác nhau, đồng thời đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây thu được.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Rễ cây chùm ngây 3-5 năm tuổi.

- 5 dòng tế bào ung thư ở người gồm: MCF7, HepG2, SK-LU-1, Jurkat và SK-Mel-2 được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách, thu cao dịch chiết rễ chùm ngây:

Rễ chùm ngây sau khi thu được rửa sạch, thái nhỏ và xay nhỏ thành bột. Bột rễ chùm ngây được chiết với 7 loại dung môi có độ phân cực khác nhau (nước cất, methanol 80%,

*Tác giả liên hệ: Email: mienbmtvat@gmail.com

Study on the ability to inhibit five cancer cell lines of the moringa root extract in *in vitro* conditions

Hien Minh Luong¹, Thanh Trang Huynh¹,
Duc Bach Nguyen², Thi Cam Mien Phi^{2*}

¹Chu Van An High School, Ha Noi

²Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture

Received 28 May 2018; accepted 2 July 2018

Abstract:

This study was conducted to evaluate the effect of moringa root extraction from seven different solvents and to evaluate the inhibition ability against five human cancer cell lines (breast cancer - MCF7, hepatic cancer - HepG2, lung cancer - SK-LU-1, blood cancer - Jurkat, and skin cancer - SK-Mel-2) *in vitro*. The results showed that the extraction efficiency of 7 different solvents was different, using the 96% ethanol solvent resulted in the highest extracting efficiency (19.66%). In addition, the root extraction using ethanol (96% ethanol) gave significantly higher levels of inhibitory effect on five human cancer cell lines than the root extraction using distilled water. At a concentration of 500 µg/ml, the root extracts with ethanol (96% ethanol) can inhibit and kill 96.38% of leukemia cells, 86.39% of breast cancer cells, 74.28% of skin cancer cells, 73.89% of lung cancer cells, and 66.22% of liver cancer cells.

Keywords: HepG2, Jurkat, MCF7, moringa root extract, SK-LU-1, SK-Mel-2, solvent.

Classification number: 3.4

ethanol 70%, ethanol 96%, n-hexan, aceton 100% và aceton nitril 100%) bằng phương pháp ngâm chiết ở nhiệt độ phòng với cùng một tỷ lệ (50 g bột rễ khô/500 ml dung môi), mỗi ngày được lắc đảo 2 lần. Sau 72h, thu dịch chiết, lọc qua vải màn và giấy lọc Whatman No.1. Dịch chiết được đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới khi khối lượng không đổi thu được cao khô, đem cân cao khô để tính hiệu suất tách chiết.

Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư của dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện *in vitro*:

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD - Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Pha chất thử thành các dải nồng độ thích hợp.

- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

- Cho chất thử đã pha ở các nồng độ vào các giếng của đĩa 96 giếng, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp ở trên vào các giếng.

- Ủ trong tủ ấm 48h. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (180 ml), được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1h, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid - TCA.

- Sau 48h, tế bào được cố định bằng TCA trong 1h, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- 10mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.

- Đọc kết quả OD ở bước sóng 515-540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad).

- Khả năng ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD}(\text{chất thử}) - \text{OD}(\text{ngày 0})] \times 100}{\text{OD}(\text{đối chứng âm}) - \text{OD}(\text{ngày 0})}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10; 2; 0,4; 0,08 mg/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương.

- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

- Theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt (hit compound) khi IC₅₀ ≤ 5µM [8].

Kết quả và thảo luận

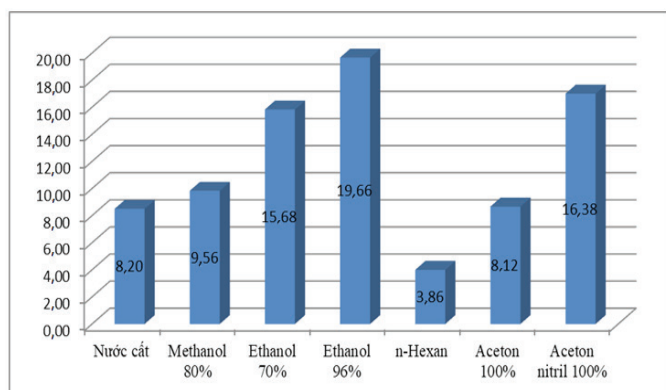
Hiệu suất thu cao dịch chiết rễ chùm ngây bằng 7 dung môi khác nhau

Tiến hành ngâm bột rễ chùm ngây trong 7 loại dung môi có độ phân cực khác nhau trong 72h, lọc sơ bộ qua vải màn và giấy lọc. Dịch chiết sau khi thu được đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới khi khối lượng không đổi. Kết quả thu được ở bảng 1 và hình 1 cho thấy, cùng một phương pháp chiết xuất nhưng hiệu quả chiết xuất khi sử dụng các loại dung môi là khác nhau. Khối lượng cao khô thu được (từ 50 g bột rễ chùm ngây) dao động từ 1,93 g (dung môi n-hexan) đến 9,83 g (dung môi ethanol 96%), tương đương với hiệu suất tách chiết dao động từ 3,86% đến 19,66%. Dung môi ethanol 96% cho hiệu quả tách chiết cao nhất (19,66%) do ethanol hòa tan được các alkaloid, tinh dầu, glycosid và benzyliothiocyanate, tiếp đến là 2 dung môi aceton nitril 100% và ethanol 70%, dung môi n-hexan cho hiệu suất tách chiết thấp nhất (3,86%). Trong 7 loại dung môi sử dụng, chỉ có n-hexan là dung môi không phân cực và cũng là dung môi cho hiệu suất tách chiết thấp nhất (3,86%), do đó có thể sơ bộ kết luận rằng các hoạt chất trong rễ chùm ngây tan chủ yếu trong dung môi phân cực.

Bảng 1. Khối lượng cao khô thu được từ 50 g bột rễ chùm ngây khi sử dụng các loại dung môi khác nhau.

	Loại dung môi					
	Nước cất	Methanol 80%	Ethanol 70%	Ethanol 96%	n-hexan	Aceton 100% Aceton nitril 100%
Khối lượng cao khô (g)	4,10 ^b	4,78 ^c	7,84 ^d	9,83 ^e	1,93 ^a	8,19 ^d

Ghi chú: a, b, c, d, e chỉ sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê $P < 0,05$.



Hình 1. Hiệu suất thu cao khô dịch chiết rễ chùm ngây bằng các loại dung môi khác nhau (%).

Kết quả xác định khả năng ức chế tế bào ung thư của cao chiết rễ chùm ngây trên 5 dòng tế bào ung thư ở người

Trong nghiên cứu này, thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Monks và cộng sự để đánh giá hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây [9]. Để đánh giá về hiệu suất tách chiết, chúng tôi lựa chọn 2 loại cao dịch chiết là cao dịch chiết bằng dung môi

ethanol 96% và cao dịch chiết bằng nước cất (đối chứng) để xác định hiệu quả ức chế sự phát triển của tế bào ung thư của cao chiết. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây.

		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ dịch chiết bằng ethanol 96% (µg/ml)	500	86,39	66,22	73,89	96,38	74,28
	100	62,67	51,96	52,67	72,77	56,98
	20	46,52	37,06	38,20	48,39	39,06
	4	28,97	26,65	25,64	32,27	25,72
	IC ₅₀	>500	>500	>500	>500	>500
		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ dịch chiết bằng nước cất (µg/ml)	500	43,04	31,89	36,24	48,03	35,32
	100	30,86	26,05	22,18	31,80	28,02
	20	22,31	18,20	14,06	20,19	19,97
	4	16,49	16,64	10,52	16,22	11,27
	IC ₅₀	>500	>500	>500	>500	>500
		Hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư (%)				
		MCF7	HepG2	SK-LU-1	Jurkat	SK-Mel-2
Nồng độ Ellipticine (µg/ml)	10	97,31	96,40	92,86	107,34	98,73
	2	75,72	91,45	82,18	90,32	78,91
	0,8	49,92	46,25	49,62	51,16	48,72
	0,4	21,36	23,99	25,09	27,00	22,45
	IC ₅₀	0,45±0,02	0,37±0,04	0,39±0,05	0,30±0,07	0,42±0,03

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% cho hiệu quả ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất. Cụ thể, đối với cao dịch chiết rễ chùm ngây bằng dung môi nước cất, ở nồng độ 500 µg/ml có khả năng ức chế và diệt được 48,03% tế bào ung thư máu và 43,04% tế bào ung thư vú trong điều kiện in vitro, các dòng tế bào ung thư còn lại, dịch chiết rễ chùm ngây đều ức chế được >30%. Trong khi đó, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% ở nồng độ 500 µg/ml có khả năng ức chế và diệt được 96,38% tế bào ung thư máu, 86,39% tế bào ung thư vú, 74,28% tế bào ung thư da, 73,89% tế bào ung thư phổi và 66,22% tế bào ung thư gan. Nồng độ cao chiết giảm thì khả năng ức chế của tế bào ung thư giảm theo. Có thể thấy rằng, cao dịch chiết rễ chùm ngây có hiệu quả ức chế cao nhất đối

với tế bào ung thư máu và thấp nhất đối với tế bào ung thư gan.

Chất đối chứng tham khảo Elippticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm, các kết quả trên là chính xác với $r^2 \geq 0,99$. Các kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, dịch chiết chùm ngây toàn phần từ ethanol và nước cất có khả năng gây độc cho tế bào thấp, do đó cần tiếp tục đánh giá tác dụng kháng ung thư của cao chiết từ các loại dung môi, các phân đoạn, và các hợp chất khác nhau.

Kết luận

- Trong các loại dung môi thí nghiệm, dung môi ethanol 96% cho hiệu suất tách thu cao dịch chiết rễ chùm ngây cao nhất (đạt 19,66%), dung môi n-hexan cho hiệu suất chiết thấp nhất (chỉ đạt 3,86%).

- Cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người cao hơn hẳn so với cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng nước cất ở tất cả các công thức thí nghiệm.

- Trong 5 loại tế bào ung thư ở người, cao dịch chiết rễ chùm ngây có khả năng ức chế mạnh nhất đối với tế bào ung thư máu và kém nhất đối với tế bào ung thư gan. Ở nồng độ 500 $\mu\text{g/ml}$, cao dịch chiết rễ chùm ngây được tách chiết bằng dung môi ethanol 96% có khả năng ức chế 96,38% tế bào ung thư máu, trong khi đó con số này ở tế bào ung thư gan là 66,22%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Ahmedin Jemal, P. Freddie Bray, M. Melissa, M. Center, M. Jacques Ferlay, P. Elizabeth Ward, P. David Forman (2011), "Global Cancer Statistics", *Cancer Journal for Clinicians*, **61**, pp.69-90.

[2] Phí Thị Cẩm Miện, Trần Văn Thái, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, Đỗ Thị Thảo (2017), "Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết chùm ngây (*Moringa oleifera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng Carbon tetrachloride (CCl_4)", *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, **15(2)**, tr.225-233.

[3] Phan Thị Bích Trâm và Nguyễn Thị Diễm My (2016), "Khảo sát hoạt tính các hợp chất kháng oxy hóa trong lá và thân cây chùm ngây (*Moringa oleifera*)", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **3**, tr.179-184.

[4] Nguyễn Bảo Trân, Trần Quang Vinh, Nguyễn Ngọc Khôi (2011), "Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của lá cây chùm ngây (*Moringa oleifera*)", *Tạp chí Dược học*, **5**, tr.421-425.

[5] S. Mohanraj, B. Sangameswaran, K.C. Santhosh, K.S. Vinoth, N.C. Atul (2013), "Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats", *Drug Invention Today*, **5(3)**, pp.223-228.

[6] N. Muhammad, H. Imtiaz, I. Saima (2013), "Antioxydant Potential of *Moringa oleifera* Leaf Extract for the Stabilisation of Butter at Refrigeration Temperature", *Czech Journal of Food Sciences*, **31(4)**, pp.332-339.

[7] Aliaa Hussein, Mohammad El-Sayed Osman, Khaled A. El-DougDoug, Reham Mostafa, Albaz, AlyFahmy Mohamed (2017), "Comparative Evaluation of Anticancer Potential of *Moringa oleifera*, *Ganoderma lucidum* and Silver Nanoparticles Against Breast and Liver Cancer Cell Lines and Related Pro and Anti Apoptotic Genes Profile", *International Journal of Scientific Research and Management (IJSRM)*, **03**, pp.5242-5252.

[8] J.P. Hughes, et al. (2011), "Principles of early drug discovery", *Br. J. Pharmacol.*, **162(6)**, pp.1239-1249.

[9] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd (1991), "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", *Journal of National Cancer Institute*, **11(83)**, pp.757-766.