

DỊCH CHIẾT ETHANOL TỪ LÁ CÂY ĐÌA ĐUM (*HELICIOPSIS LOBATA* (MERR.) SLEUM) ỨC CHẾ SỰ TĂNG SINH TẾ BÀO VÀ TĂNG CƯỜNG APOPTOSIS Ở HAI DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY AGS VÀ MKN45

Lê Thị Thanh Hương¹, Trần Thu Hiền^{1,2}, Mai Văn Linh¹, Nguyễn Phú Hùng^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học – ĐHTH Thái Nguyên,

²Bệnh viện Nội tiết Trung ương

TÓM TẮT

Cây Đì địa đum (*Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleum), trong dân gian còn gọi là cây Bàn tay ma, được ghi nhận là cây thuốc dùng rộng rãi trong các bài thuốc y học cổ truyền. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng ethanol như một dung môi để chiết các thành phần hòa tan có trong lá của cây *Heliciopsis lobata*. Tiếp theo, dịch chiết được sử dụng để đánh giá tác động của nó lên sự tăng sinh của các tế bào ung thư dạ dày dòng AGS và MKN45 bằng phương pháp MTT. Sự thay đổi hình thái nhân tế bào được phát hiện dựa vào thuốc nhuộm nhân DAPI. Kết quả cho thấy, dịch chiết ethanol từ cây Đì địa đum đã làm giảm mạnh khả năng tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày ở cả hai dòng tế bào AGS và MKN45. Giá trị IC₅₀ của dịch chiết đối với hai dòng AGS và MKN45 tương ứng với 0,467 mg/ml và 0,168 mg/ml. Dịch chiết ethanol của cây Đì địa đum cũng đã làm tăng tỷ lệ tế bào có kiểu hình apoptosis từ 8 – 20% đối với dòng AGS và 7 – 28% đối với dòng tế bào MKN45. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, dịch chiết từ lá của cây Đì địa đum *Heliciopsis lobata* có tiềm năng ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư dạ dày.

Từ khóa: Sinh học; apoptosis; ung thư dạ dày; dịch chiết ethanol; tăng sinh tế bào

Ngày nhận bài: 16/7/2020; Ngày hoàn thiện: 16/9/2020; Ngày đăng: 21/10/2020

THE ETHANOL EXTRACT OF THE LEAVES OF *HELICIOPSIS LOBATA* INHIBITS CELL PROLIFERATION AND ENHANCES APOPTOSIS IN THE TWO GASTROINTESTINAL CANCER CELL LINES AGS AND MKN45

Le Thi Thanh Huong¹, Tran Thu Hien^{1,2}, Mai Van Linh¹, Nguyen Phu Hung^{1*}

¹TNU - University of Sciences,

²National Hospital of Endocrinology

ABSTRACT

Heliciopsis lobata (Merr.) Sleum, also called Ghost hand tree, has been recognized as a widely used medicinal plant in traditional medicine. In this study, we used ethanol as a solvent to extract components contained in the leaves of *Heliciopsis lobata*. The extract was then used to assess its effect on the cell proliferation of AGS and MKN45 gastric cancer cells by MTT assay. Nuclear morphological changes were detected by DAPI staining. The results showed that ethanol extract from *Heliciopsis lobata* leaves significantly reduced the cell proliferation in both AGS and MKN45 cell lines. The IC₅₀ value of the extract for AGS and MKN45 cells corresponded to 0,467 mg/ml and 0,168 mg/ml. The ethanol extract of *Heliciopsis lobata* leaves also increased the proportion of apoptosis-type cells from 8 - 20% for AGS lines and 7 - 28% for MKN45 cell lines. The results of this study showed that the ethanol extract from the *Heliciopsis lobata* leaves has the potential to inhibit the growth of stomach cancer cells.

Keywords: Biology; apoptosis; gastric cancer; ethanol extract; cell proliferation

Received: 16/7/2020; Revised: 16/9/2020; Published: 21/10/2020

* Corresponding author. Email: hungnguyennphu@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây Địa đum (*Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleum, thuộc họ Proteaceae (họ Quắn hoa), được phân bố ở một số tỉnh miền núi phía Bắc và một số tỉnh trung du Bắc bộ. Một số đồng bào dân tộc thiểu số còn gọi Địa đum là cây Bàn tay ma do lá có cấu tạo phân thùy giống hình bàn tay. Địa đum từ lâu đã được đồng bào các dân tộc thiểu số sử dụng trong các bài thuốc khác nhau để chữa trị một số bệnh về gan mật, tiết niệu và một số bệnh do viêm nhiễm như viêm gan, vàng mắt. Bên cạnh đó, Địa đum cũng dùng để hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp hoặc tắm cho phụ nữ sau sinh. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, trong cây Địa đum có chứa một số hợp chất có khả năng ức chế tế bào ung thư như myricetin, myricitrin, hydroquinone và medioresinol [1], [2]. Bên cạnh đó, *Heliciopsis lobata* còn được chỉ ra là có tác dụng chống oxy hóa và có khả năng gây biệt hóa tế bào ung thư. Hai dẫn xuất của arbutin tách chiết từ lá của cây Địa đum là 6'-((E)2-methoxy-5-hydroxycinnamoyl) arbutin và 2'-((E)2, 5-dihydroxycinnamoyl) arbutin (2) cũng đã được chứng minh là có khả năng gây độc cho các tế bào gốc ung thư vú, ức chế khả năng di trú và cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào [3], [4]. Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác động của dịch chiết từ lá của cây Địa đum lên các tế bào ung thư dạ dày. Chính vì vậy, lần đầu tiên, chúng tôi tiến hành phân tích ảnh hưởng ức chế của dịch chiết ethanol của lá cây Địa đum lên sự tăng sinh tế bào ung thư dạ dày cũng như khả năng cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu và chiết dịch từ lá bằng ethanol

Mẫu lá cây Địa đum (*Heliciopsis lobata*) được thu thập tại huyện Võ Nhai, Thái Nguyên, đem rửa sạch, sấy khô ở 50°C trong 48h và nghiền thành bột mịn trước khi tiến hành thu dịch chiết với ethanol (Hình 1).

Dịch chiết của lá cây Địa đum được thu bằng cách bổ sung 30 ml ethanol 95% vào ống

falcon chứa 15 gam bột lá và lắc qua đêm ở tốc độ 200 vòng/phút. Tiến hành lọc dịch bằng giấy lọc Whatman (Merk, Đức). Ethanol được bay hơi hoàn toàn ở nhiệt độ 40°C trong 24h. Phần cô đặc được gọi là cao chiết và được hòa tan trong dung môi DMSO ở nồng độ gốc 200 mg/ml. Dung dịch chứa cao chiết được sử dụng đánh giá tác động trên hai dòng tế bào ung thư dạ dày AGS và MKN45.

2.2. Phân tích sự tăng sinh tế bào

2.2.1. Phương pháp đánh giá kiểu hình tế bào

Hai dòng tế bào ung thư dạ dày AGS và MKN45 (do phòng thí nghiệm Inserm U1053 – Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia Pháp cung cấp) được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen, Mỹ) có bổ sung 10% huyết thanh bò (FBS) và 1% kháng sinh penicillin/streptomycin trên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu 5.10^3 tế bào/giếng. Sau 24h nuôi cấy, môi trường được thay thế bằng môi trường mới có chứa dịch chiết ethanol từ lá cây *Heliciopsis lobata* ở các nồng độ khác nhau: 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 và 2 mg/ml trong 48h ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Quan sát, chụp ảnh và đánh giá kiểu hình tế bào bằng kính hiển vi soi ngược (NIKON, Ts2, Nhật Bản).

2.2.2. Sàng lọc MTT

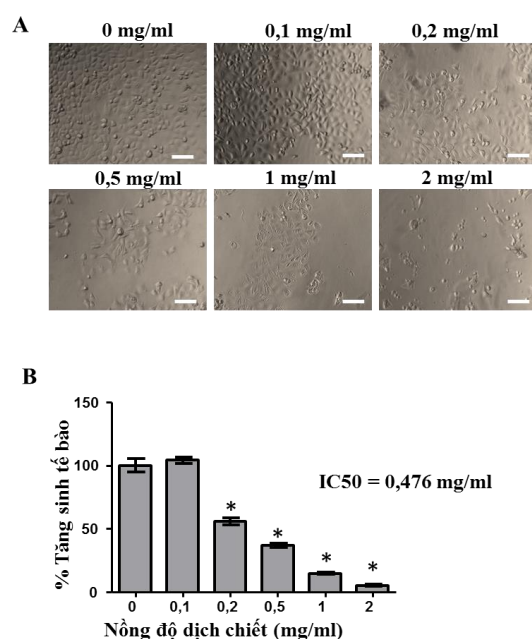
Các tế bào ung thư dạ dày AGS và MKN45 được xử lý với dịch chiết ethanol từ lá cây *Heliciopsis lobata* và nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95%. Sau 48h xử lý, môi trường nuôi cấy cũ được loại bỏ và tiến hành bổ sung môi trường nuôi cấy mới chứa MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) nồng độ 5 mg/ml. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy chứa MTT được loại bỏ và bổ sung 100 µl DMSO để hòa tan các tinh thể kết tinh. Mật độ tế bào được xác định ở bước sóng 570 nm trên máy quang phổ (Multiskan Sky của Thermo Fisher). Mỗi nồng độ lặp lại 4 giếng cho mỗi thí nghiệm. Tỷ lệ tăng sinh của tế bào được tính theo công thức:

$$\% \text{ tăng sinh tế bào} = (\text{OD mẫu xử lý} / \text{OD mẫu đối chứng}) * 100.$$

Giá trị IC₅₀ của dịch chiết ethanol từ cây Địa đum mỗi dòng tế bào dựa trên độ hấp thụ OD (mật độ quang) từ sàng lọc MTT được thực hiện bằng phần mềm chuyên dụng GraphPad Prism 5.0, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Phân tích sự biến đổi kiểu nhân của tế bào bằng thuốc nhuộm nhân DAPI

Tế bào ung thư dạ dày được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 trên đĩa 96 giếng. Sau 48h xử lý với dịch chiết của cây *Heliciopsis lobata*, tế bào được cố định bằng dung dịch ethanol 95% trong 10 phút. Sau khi cố định, ethanol được loại bỏ bằng cách rửa 2 lần với dung dịch đệm PBS 1X. Tiếp theo, bổ sung vào mỗi giếng 100 µl dung dịch nhuộm nhân tế bào DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride) nồng độ 10 µg/ml trong 5 phút. Tế bào được soi trên kính hiển vi huỳnh quang Nikon T2U ở độ phóng đại 200 lần ở kính lọc sắc dành cho kênh màu DAPI.



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào AGS: A) Hình ảnh tế bào chụp dưới kính hiển vi soi ngược ở các nồng độ xử lý với dịch chiết khác nhau và B) Tỷ lệ phần trăm sự tăng sinh tế bào so với đối chứng (100%), * $p \leq 0,05$, $n = 5$. Thang đo: 50 µm

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tác động của dịch chiết lá cây Địa đum lên sự tăng sinh tế bào ung thư

3.1.1. Tác động của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào AGS

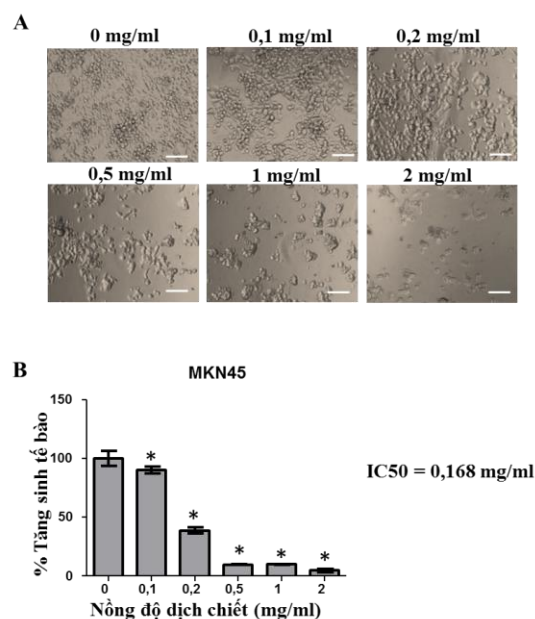
Để đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết cây Địa đum lên sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày AGS và MKN45. Kết quả chỉ ra trong hình 1 cho thấy, sau 48h dịch chiết ethanol từ lá của cây Địa đum được pha loãng trong môi trường nuôi cấy theo các nồng độ khác nhau từ 0,1 – 0,2 – 0,5 - 1 và 2 mg/ml.

Kết quả chỉ ra trong hình 1A cho thấy, mật độ tế bào không có sự thay đổi đáng kể so với đối chứng (0 mg/ml). Tuy nhiên, sự tăng lên của nồng độ dịch chiết đã ảnh hưởng rõ rệt đến mật độ tế bào được quan sát. Hình 1B cho thấy, ngay ở nồng độ 0,2 mg/ml thì mức độ tăng sinh của tế bào đã giảm xấp xỉ 50% so với đối chứng. Ở các nồng độ cao hơn, từ 0,5 - 2 mg/ml, mức độ tăng sinh chỉ còn khoảng 40% - 7% so với đối chứng. Như vậy có thể thấy rằng, dịch chiết ethanol của cây Địa đum đã tác động rõ rệt lên khả năng phân chia, tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày dòng AGS. Sử dụng phần mềm phân tích chuyên dụng GraphPad Prism 5.0, chúng tôi xác định được giá trị IC₅₀ của dịch chiết ethanol từ lá cây Địa đum tác động lên tế bào ung thư dạ dày AGS trong 48h là 0,476 mg/ml (hình 1B). Trước đó, một nghiên cứu của Choi và cộng sự đã đánh giá tác động của dịch chiết ethanol từ lá của cây *Paeonia suffruticosa* đã ức chế sự tăng sinh của tế bào AGS với giá trị IC₅₀ được xác định ở 48h xử lý là 0,22 mg/ml [5]. Trong một nghiên cứu khác, dịch chiết ethanol từ các bộ phận khác nhau của cây *Linum album* thu nhận tại Iran đã có tác động ức chế sự tăng sinh tế bào AGS với giá trị IC₅₀ dao động từ 0,35 – 0,894 mg/ml [6]. Một nghiên cứu trước đó của Wei-Yan và đồng tác giả (2016) đã cho thấy, 5 trong số 7 hợp chất mới thuộc nhóm arbutin tách chiết và tinh sạch từ cây *Heliciopsis lobata* đều có ảnh hưởng ức chế sự tăng tế bào ung thư biểu mô dạ dày MGC-803 với giá trị IC₅₀ > 0,05 mg/ml [4]. Như vậy có thể thấy rằng, dịch chiết

ethanol từ các loài thảo dược khác nhau có mức độ tác động lên sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư dạ dày AGS là không giống nhau và thường có giá trị IC₅₀ lớn hơn so với các chất đã được tinh sạch từ dịch chiết tổng thể.

3.1.2. Tác động của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào MKN45

MKN45 là dòng tế bào ung thư dạ dày thuộc thể phân tán và được sử dụng nhiều các nghiên cứu độc tính của các thuốc hoặc hợp



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào MKN45: A) Hình ảnh tế bào chụp dưới kính hiển vi soi ngược ở các nồng độ xử lý với dịch chiết khác nhau và B) Tỷ lệ phần trăm sự tăng sinh tế bào so với đối chứng (100%), * $p \leq 0,05$, $n = 5$. Thang đo: 50 μ m

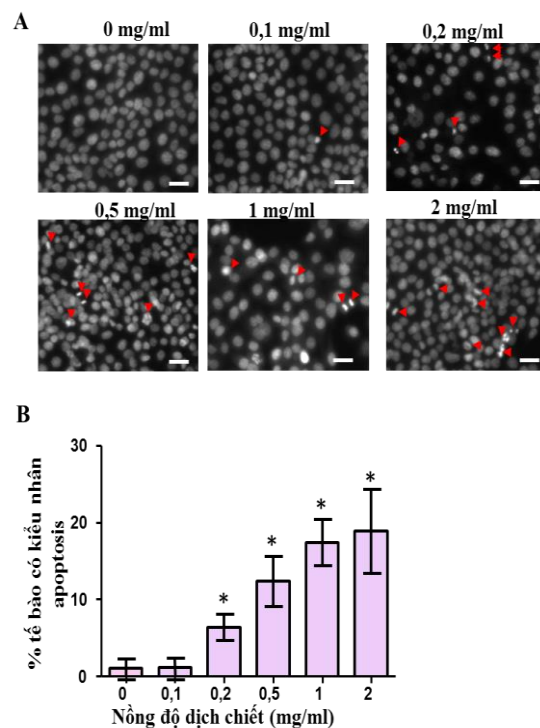
Kết quả chỉ ra trong nghiên cứu này (hình 2) cho thấy, ngay ở nồng độ 0,1 mg/ml, dịch chiết của cây Địa đum đã biểu thị khả năng kìm hãm sự tăng sinh tế bào so với đối chứng. Mức độ kìm hãm sự tăng sinh tăng lên khi nồng độ dịch chiết tăng từ 0,2 - 2 mg/ml. Đáng chú ý, ở các nồng độ từ 0,5 mg/ml xuất hiện hiện tượng tế bào mất khả năng bám dính, co cụm thành đám tế bào. Giá trị ức chế 50% sự tăng sinh tế bào (IC₅₀) được xác định sau 48h xử lý với dịch chiết được xác định là 0,168 mg. Một nghiên cứu gây đây trên dòng tế bào MKN45 cho thấy, dịch chiết ethanol từ

loài *Cyrtopodion scabrum* có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào với giá trị IC₅₀ đạt được là 0,38 mg/ml. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, giá trị IC₅₀ của nó đối với dòng tế bào ung thư gan HepG2 là 0,86 mg/ml [7]. Như vậy có thể thấy rằng, dịch chiết ethanol từ lá của cây Địa đum có tác động ức chế mạnh đối với dòng tế bào MKN45 so với dòng tế bào AGS trong nghiên cứu này và mạnh hơn so với dịch chiết từ loài *Cyrtopodion scabrum* đã được nghiên cứu trước đó.

3.2. Tác động của dịch chiết cây Địa đum lên tỷ lệ tế bào có kiểu hình apoptosis của tế bào ung thư

3.2.1. Tác động của dịch chiết lên tế bào AGS

Để đánh giá tác động của dịch chiết ethanol lên kiểu nhân của hai dòng tế bào ung thư dạ dày AGS và MKN45, sau khi cố định, tế bào đã được nhuộm với thuốc nhuộm DNA của nhân là DAPI. Những thay đổi về kiểu hình nhân tế bào được ghi nhận dưới kính hiển vi huỳnh quang (hình 3).

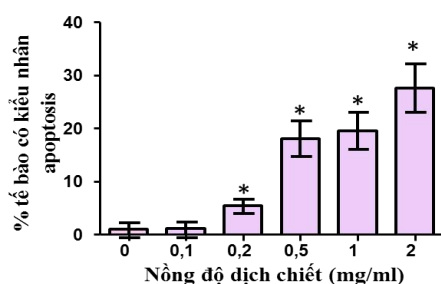
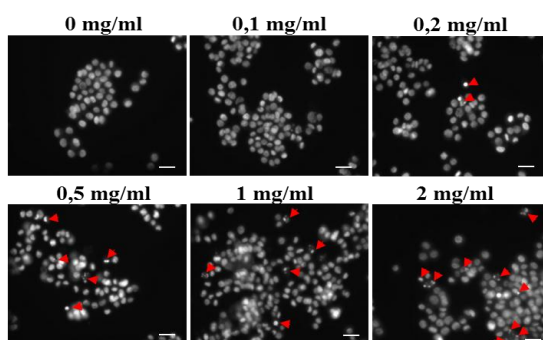


Hình 3. Dịch chiết của lá cây Địa đum tác động lên sự hình thành kiểu nhân của tế bào apoptosis ở dòng tế bào AGS, * $p \leq 0,05$, $n = 5$. Thang đo: 30 μ m

Hình 3A cho thấy, các tế bào có kiểu nhân điển hình của tế bào apoptosis là nhân phân mảnh, bắt màu mạnh với thuốc nhuộm DAPI bắt đầu xuất hiện rõ rệt ở các giếng xử lý với dịch chiết nồng độ từ 0,2 mg/ml. Tỷ lệ tế bào có kiểu hình apoptosis đã tăng mạnh ở các nồng độ cao hơn và đạt xấp xỉ 20% trong tổng số tế bào quan sát ở nồng độ 1 mg/ml. Như vậy có thể thấy rằng, độc tính của dịch chiết đối với tế bào AGS tăng lên khi tăng nồng độ xử lý tăng lên.

Kết quả tương tự cũng được chỉ ra đối với trường hợp của dịch chiết ethanol từ loài *Cyrtopodion scabrum* trên dòng tế bào SW740. Ở nồng độ 1 mg/ml, dịch chiết của loài này đã làm tăng tỷ lệ tế bào apoptosis của tế bào SW740 lên khoảng 15% [7].

3.2.2. Tác động của dịch chiết lên tế bào MKN45



Hình 4. Dịch chiết của lá cây Địa đum tác động lên sự hình thành kiểu nhân của tế bào apoptosis ở dòng tế bào MKN45, * $p \leq 0,05$, $n = 5$. Thang đo: 30 μ m

Đối với dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45, kết quả phân tích sự tăng sinh (hình 3) đã cho thấy rằng, MKN45 nhạy cảm đối với dịch chiết từ lá cây *Heliciopsis lobata* hơn so với

dòng AGS. Những ảnh hưởng của dịch chiết lên mức độ apoptosis của tế bào này cũng đã được đánh giá bằng kỹ thuật nhuộm nhân với thuốc nhuộm DAPI. Kết quả trình bày trong hình 4 cho thấy, tỷ lệ tế bào có kiểu nhân apoptosis đã tăng từ 7 - 28% so với đối chứng khi nồng độ dịch chiết tăng từ 0,2 - 2 mg/ml.

Điều này cho thấy rằng, mức độ gây apoptosis của dịch chiết đối với dòng MKN45 là cao hơn đáng kể so với dòng AGS. Kết quả này cũng có sự tương đồng về mức độ ảnh hưởng của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào ở hai dòng tế bào ung thư AGS và MKN45. Apoptosis là cách thức cơ thể chống lại sự phát sinh ung thư thông qua việc loại bỏ các tế bào có những sai hỏng về hệ gen [8]. Dựa trên đặc điểm này, nhiều loại thuốc kháng ung thư hiện nay đã được phát triển như 5-Fluouracin hay Doxorubicin. Trong những năm gần đây, việc sàng lọc các thảo dược có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào thông qua cơ chế gây chết tế bào bằng con đường apoptosis được đặc biệt quan tâm [9]. Trong dân gian, cây Địa đum đã được biết đến như một vị thuốc quan trọng trong các bài thuốc đối với các bệnh về gan, bệnh đường tiết niệu. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi đã chứng minh được, cây Địa đum còn có tiềm năng chống lại sự tăng sinh của các tế bào ung thư dạ dày cũng như khả năng cảm ứng quá trình apoptosis đối với loại ung thư này.

4. Kết luận

Dịch chiết ethanol từ lá của cây Địa đum (*Heliciopsis lobata*) đã ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư dạ dày ở cả hai dòng tế bào AGS và MKN45 với giá trị IC_{50} tương ứng là 0,467 mg/ml và 0,168 mg/ml. Tỷ lệ tế bào có kiểu nhân apoptosis đã tăng từ 8 - 20% khi xử lý tế bào AGS với dịch chiết của cây Địa đum. Đối với dòng MKN45, tỷ lệ tế bào có kiểu nhân apoptosis tăng từ 7 - 28%. Nghiên cứu này chỉ ra rằng, cây Địa đum là loại thảo dược có tiềm năng chống lại sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. D. Li, M.-S. Liu, Z.-L. Li, S.-L. Kang, and H.-M. Hua, "Studies on chemical constituents of *Heliciopsis lobata* II," *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 33, no. 4, pp. 409-411, Feb. 2008.
- [2]. J. Feng *et al.*, "Myricetin inhibits proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 408, no. 1-2, pp. 163-170, Oct. 2015.
- [3]. X. Man, L. Yang, S. Liu, L. Yang, M. Li, and Q. Fu, "Arbutin promotes MC3T3-E1 mouse osteoblast precursor cell proliferation and differentiation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway," *Mol Med Rep*, vol. 19, no. 6, pp. 4637-4644, Jun. 2019.
- [4]. W.-Y. Qi, N. Ou, X.-D. Wu, and H.-M. Xu, "New arbutin derivatives from the leaves of *Heliciopsis lobata* with cytotoxicity," *Chin J Nat Med*, vol. 14, no. 10, pp. 789-793, Oct. 2016.
- [5]. H. S. Choi, H.-S. Seo, J. H. Kim, J.-Y. Um, Y. C. Shin, and S.-G. Ko, "Ethanol extract of *paeonia suffruticosa* Andrews (PSE) induced AGS human gastric cancer cell apoptosis via fas-dependent apoptosis and MDM2-p53 pathways," *J. Biomed. Sci.*, vol. 19, p. 82, Sep. 2012.
- [6]. E. A. Asl, J. F. Mehrabadi, D. Afshar, H. Noorbazargan, H. Tahmasebi, and A. Rahimi, "Apoptotic Effects of *Linum album* Extracts on AGS Human Gastric Adenocarcinoma Cells and ZNF703 Oncogene Expression," *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 19, no. 10, pp. 2911-2916, Oct. 2018.
- [7]. M. Rashidi *et al.*, "Selective Cytotoxicity and Apoptosis-Induction of *Cyrtopodion scabrum* Extract Against Digestive Cancer Cell Lines," *Int J Cancer Manag*, vol. 10, no. 5, pp. 8633, May 2017.
- [8]. S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol Pathol*, vol. 35, no. 4, pp. 495-516, Jun. 2007.
- [9]. B. A. Carneiro, and W. S. El-Deiry, "Targeting apoptosis in cancer therapy," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 17, pp. 395-417, Mar. 2020.