

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG UNG THƯ VÚ CỦA DỊCH CHIẾT TỪ LÁ CHANH TÂY (*Citrus Limon L.*)

Nguyễn Thị Thảo Linh*

Trường Đại học Phú Yên

Ngày nhận bài: 06/05/2020; ngày nhận đăng: 04/06/2020

Tóm tắt

Dòng tế bào gốc ung thư vú MCF-7-SC, được phân lập từ các tế bào ung thư vú MCF-7, cho thấy các đặc điểm kháng anoikis. Trong nghiên cứu này, chiết xuất lá chanh tây bằng methanol (MLL) đã được đánh giá về hoạt tính chống ung thư của nó trong tế bào gốc ung thư vú MCF-7-SC kháng anoikis. MLL gây ra sự chết tế bào (apoptosis) trong MCF-7-SC được chứng minh bằng sự gia tăng sự hình thành cơ thể apoptotic, tăng số lượng tế bào G1, tăng tế bào dương tính với Annexin V, tăng tỷ lệ Bax / Bcl-2, kích hoạt protein của caspase-9 và caspase-3, và sự thoái biến của protein poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Tóm lại, nghiên cứu này chứng minh cho thấy rằng lá chanh tây gây độc tính cho tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis và có thể coi nó như một cây thuốc dùng để điều chế thuốc hoặc thực phẩm chức năng chống ung thư mới.

Từ khóa: Kháng anoikis. Apoptosis. Tế bào gốc ung thư. Lá chanh tây

1. Đặt vấn đề

Các biện pháp can thiệp thông thường, chẳng hạn như xạ trị hoặc hóa trị, có thể loại bỏ phần lớn khối u, nhưng các tế bào ung thư ác tính lại có khả năng đặc biệt để sống sót, tự tái tạo và cải thiện khối u ác tính. Gần đây, những tế bào khối u còn sót lại đã được phát hiện có các đặc tính giống như tế bào gốc và được gọi là tế bào gốc ung thư (CSCs) (Siegel R, 2013). Do đó, việc tiêu diệt CSCs trong khối u sẽ là bước đi quan trọng để ngăn chặn sự tiến triển và tái phát bệnh. Mặc dù đã nỗ lực không ngừng để chống lại ung thư trong nhiều thập kỷ, ung thư vú vẫn là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai ở phụ nữ (Reya T, 2001) và tế bào gốc ung thư vú, đặc trưng bởi biểu hiện của dấu hiệu bề mặt CD44^{high} / CD24^{low}, được cho là nguyên nhân chính của sự tiến triển và di căn của ung thư vú (Al-Hajj M, 2003). Dòng tế bào MCF-7-SC được phân loại từ tế bào ung thư vú ở người MCF-7 thông qua việc tích lũy quần thể CD44^{high} / CD24^{low} (Phuc PV, 2010) MCF-7-SC đã được báo cáo có chứa các đặc điểm của CSCs như kháng thuốc và xâm nhập (Tran TA, 2014) và nó đã được nghiên cứu để tìm kiếm mục tiêu cụ thể của tế bào gốc ung thư vú (Tran TA, 2014).

Nổi bật trong số các cơ chế kháng thuốc là độ đặc hiệu rộng của hệ thống vận chuyển họ ATP-binding cassette (ABC), bao gồm bao gồm P-glycoprotein (Chen CJ, 1986), liên quan đến đa kháng thuốc protein (Cole SPC, 1992) và protein kháng ung thư vú (BCRP / MXR / ABCP / ABCG2) (Allen JD, 1999). Biểu hiện quá mức của hệ thống vận chuyển ABC trong các tế bào ung thư có thể dẫn đến sự đa kháng thuốc bằng cách hạn chế sự tích lũy nội bào của các tác nhân gây độc tế bào thông qua việc loại bỏ các tác nhân đó (Seamon JA, 2006). Anoikis là một dạng chết tế bào (apoptosis) trong đó các tế bào tách rời nhau và

* Email: thaolinhh180989@gmail.com

tách ra khỏi môi trường ngoại bào xung quanh. Kháng anoikis được biết đến như một cơ chế dẫn đến sự kháng thuốc. Tuy nhiên, tìm kiếm hóa chất thực vật ức chế sự hoạt động của các tế bào gốc kháng anoikis và cơ chế thật sự của nó vẫn chưa được khám phá đầy đủ.

Trong nhiều năm, apoptosis được cho là cơ chế chính của các tác nhân hóa trị liệu tiêu diệt tế bào. Đây là một hình thức chết tế bào được lập trình bảo tồn cao, điều chỉnh cân bằng nội mô và loại bỏ các tế bào bị hư hỏng và bị nhiễm bệnh. Có hai con đường apoptotic chính tồn tại: con đường bên ngoài được kích hoạt bởi các thụ thể gây chết và con đường bên trong được kích hoạt bởi ty thể (Morselli E, 2009). Những con đường truyền tín hiệu apoptotic này dẫn đến việc kích hoạt các caspase, các cysteine protease tách rời các chất nền khác nhau. Con đường bên trong của apoptosis được kích hoạt bởi các điều kiện khác nhau, bao gồm tổn thương DNA, kích hoạt gây ung thư, kích thích oxy hóa, thiếu oxy và các dạng kích thích khác.

Những năm gần đây, thực vật được xem là nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học quý giá cho người và động vật, do đó nó có tiềm năng lớn để sử dụng trong việc phát hiện ra các loại thuốc mới (Pellegrini NM, 2007). Trái cây có múi có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất (Chun OKY, 2008) vì nó chứa nhiều flavonoid, vitamin C và carotenoids (Xu G, 2008). Có rất nhiều bioflavonoids trong Chanh tây (*Citrus limon*) như hesperidin, rutin và naringin, các chất này kích hoạt các hoạt động của thuốc trong cơ thể (Tripoli E, 2007). Trái cây họ cam quýt, đặc biệt là Chanh tây đã được khoa học chứng minh là có nhiều lợi ích cho sức khỏe cũng như hạn chế nguy cơ mắc bệnh do sự phong phú của vitamin, khoáng chất và các thành phần khác (Peterson OA, 2006). Chanh tây được trồng ở nhiều nơi trên thế giới để sản xuất nước ép chanh và đã được chứng minh là có khả năng chống nấm và chống ung thư (Viuda MM, 2008) (Arias BA, 2005). Trong khi hạt chanh tây và vỏ chanh tây đã được chứng minh về hoạt tính chống oxy hóa và chống ung thư (Im JS, 2014) (Banjerdpongchai R, 2016), (Pagliara V, 2019) thì các nghiên cứu về dược tính của lá chanh tây vẫn còn hạn chế. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là khảo sát các tiềm năng chống ung thư, đặc biệt là ung thư vú, của lá chanh tây. Kết quả cho thấy dịch chiết của lá chanh tây bằng methanol (MLL) ức chế được sự sản sinh của các tế bào MCF-7-SC thông qua việc gây ra sự chết tế bào (apoptosis). Đồng thời, sự ức chế tăng sinh của MCF-7-SC bằng MLL có thể là một cách hữu hiệu để tiêu diệt tế bào gốc kháng anoikis, tác nhân gây nên sự di căn của ung thư vú.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Trích xuất và chuẩn bị mẫu

Lá chanh tây sấy khô (1200 g) được nghiền thành bột, sử dụng máy xay và chiết bằng 80% methanol bằng cách khuấy trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được lọc, cô đặc bằng thiết bị bay hơi quay chân không dưới áp suất giảm ở 40°C và được đông khô để thu được cao chiết methanol thô (27,0 g). Cao chiết được làm lạnh (4°C) trước khi sử dụng. Cao chiết được hòa tan trong DMSO (Dimethyl Sulfoxide) đến nồng độ 100 µg/mL trong các thí nghiệm.

2.2 Nuôi cấy tế bào và thuốc thử

Tế bào gốc ung thư vú MCF-7-SC ở người được chọn từ các tế bào MCF-7 thông qua việc tích lũy quần thể CD44^{high} / CD24^{low} sau khi phân loại tế bào (Phuc PV, 2010). MCF-7-SC được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640. MCF-7 được nuôi cấy trong hỗn hợp môi trường DMEM và F-12K. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bất

hoạt nhiệt (FBS) và 1% kháng sinh. Tất cả các tế bào được duy trì ở 37°C trong tủ ẩm độ ẩm với 5% CO₂. Môi trường RPMI 1640, albumin huyết thanh bò, axit trypsin /ethylenediaminetetraacetic, huyết thanh bò bào thai (FBS) và kháng sinh Antimycotic 100X, F-12K và DMEM được mua từ Invitrogen (Hoa Kỳ). Hoechst 33342, Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), propidium iodide, RNase A, kháng thể kháng-actin đã được mua từ Sigma Công ty (Hoa Kỳ). Cao chiết lá chanh tây bằng methanol đã được hòa tan trong DMSO. Các kháng thể đã được mua từ công ty Cell Signaling (Hoa Kỳ). Các màng polyvinylidene fluoride để làm thí nghiệm western blot được mua từ Millipore (Hoa Kỳ).

2.3 Xét nghiệm kháng anoikis

Để kiểm tra tính kháng anoikis của tế bào, phương pháp lựa chọn các tế bào kháng anoikis được đề cập bởi Su X. et al. (2009) đã được áp dụng. Sau đó, khả năng sống của tế bào được xác định bằng cách ủ các tế bào bằng thuốc nhuộm Trypan Blue 0,4% và đếm bằng dụng cụ buồng đếm.

2.4 Phản ứng sao chép chuỗi polymerase ngược (RT-PCR)

Toàn bộ RNA từ các dòng tế bào được chiết xuất bằng thuốc thử TRIzol (Invitrogen). Sao chép ngược được thực hiện bằng reverse transcription system (Promega, USA). Các môi phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại như sau: ABCG2, forward 5'-CCGCGACAGCTTCCAATGACCT-3', reverse 5'-GCCGAAGAGCTGCTGAGAAGTGA-3'; GAPDH, forward 5'-GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3', reverse 5'-AGTGA TGGCATGGACTGTGG-3'. RT-PCR được thực hiện bằng Taq polymerase (iNtRON Inc., Hàn Quốc). PCR được bắt đầu bằng cách ủ các mẫu ở 95°C trong 1 phút, sau đó là 35 chu kỳ 40 giây denaturation ở 95°C, annealing 40 giây ở 57°C và 1 phút elongation ở 72°C. Các mẫu được phân tích bằng điện di trên Gel agarose 1,2% chứa 0,002% thuốc nhuộm (RedSafe™; Biotechnology Inc., Korea)

2.5 Xét nghiệm khả năng sống của tế bào

Các tế bào được nuôi cấy trong các đĩa 96 giếng trong 200 µL môi trường chứa 10% FBS bất hoạt nhiệt. Sau khi xử lý, 20 µL thuốc thử MTT (5 mg / mL) đã được thêm vào và các tế bào được ủ trong 3 - 4 giờ. Sau đó phần dịch phía trên đã được loại bỏ khỏi giếng và 150 µL của DMSO đã được thêm vào. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong bốn lần. Khả năng sống của tế bào được xác định từ độ hấp thụ ở bước sóng 570nm, được đo bằng đầu đọc vi mạch Sunrise (Áo). Khả năng tồn tại của tế bào được hiển thị dưới dạng phần trăm khả năng sống sót (trung bình ± SD).

2.6 Hình thái

MCF-7-SC (3×10^4 tế bào / mL) được gieo vào các đĩa 6 giếng và được xử lý bằng thuốc thử 24 giờ. Sau 24 giờ, các tế bào được nhuộm 10 µM Hoechst hoặc acridine Orange (AO) sau đó được quan sát dưới kính hiển vi (Olympus, Essex, UK).

2.7 Phân tích tế bào học

Để phân tích phân bố chu kỳ tế bào apoptosis, các tế bào (3×10^4 tế bào / mL) được nuôi cấy trong các tấm 6 giếng và được xử lý bằng MLL trong 24 giờ. Để phân tích chu kỳ tế bào, các tế bào được thu hoạch, rửa bằng PBS, cố định bằng 70% ethanol, được bù nước trong 2 mM EDTA-PBS (Axit Aminopolycarboxylic trong Phosphate-Buffered Saline Solution), được xử lý bằng RNase A (25 µg / mL) và nhuộm màu bằng PI (40 µg / mL). Một bộ phát hiện apoptosis Annexin V-FITC đã được sử dụng để phát hiện sự chuyển dịch

phosphatidylserine từ phía bên trong của màng plasma sang phía bên ngoài theo công thức của nhà sản xuất. Tóm lại, các tế bào được rửa bằng PBS, pha loãng trong đệm liên kết annexin V có chứa annexin V và PI, và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng (RT). Các tế bào đã được xử lý trong vòng 1 giờ. Dữ liệu từ 10.000 ô trên mỗi mẫu được phân tích với Phần mềm Cell-Quest (BD Biosciatics). Mỗi thí nghiệm được lặp đi lặp lại ít nhất ba lần.

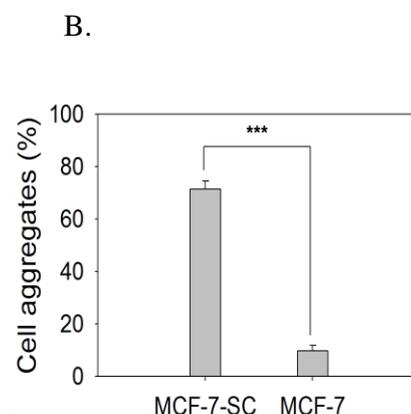
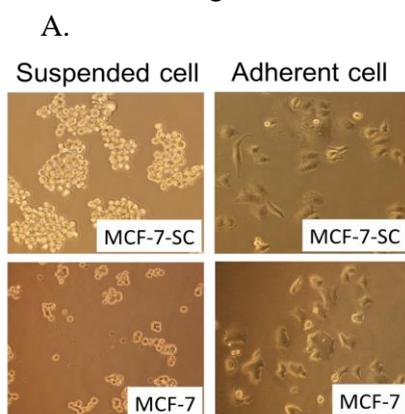
2.8 Western Blot

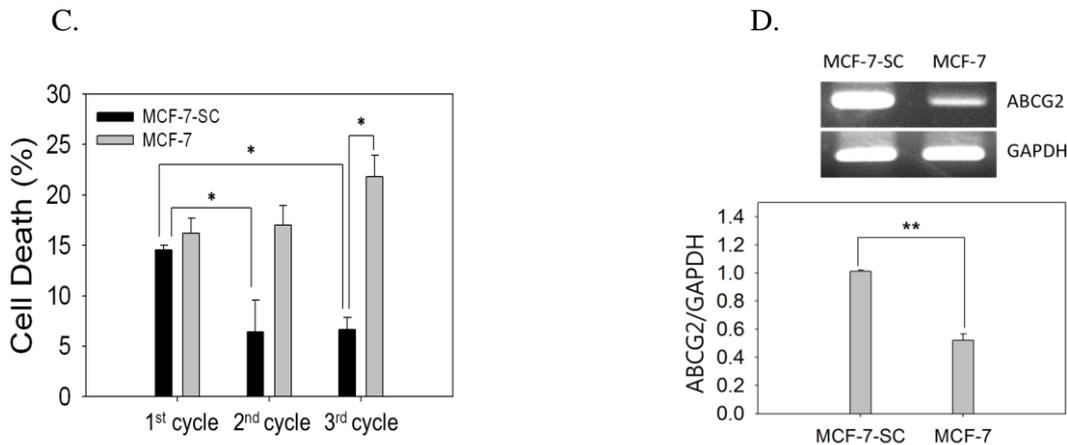
Các tế bào được nuôi cấy và sau đó được xử lý với nồng độ MLL được chỉ định. Sau đó, các tế bào được thu hoạch và ly giải trong bộ đệm RIPA và giữ trên băng trong 30 phút. Xét nghiệm BCA đã được thực hiện và lượng mẫu protein bằng nhau được nạp vào mỗi giếng. Các phần của các lysate được tách ra trên gel SDS-polyacrylamide và được chuyển đến màng PVDF bằng cách sử dụng bộ đệm chuyển glycine. Sau khi ngâm với sữa không béo 5%, các màng được ủ qua đêm với các kháng thể chính và sau đó trong 1 giờ với các kháng thể thứ cấp trong sữa có chứa nước muối Tris-buffered (TBS) và 0,5% Tween 20. Tất cả các kháng thể chính (với ngoại lệ của kháng thể chống -actin) được sử dụng với độ pha loãng 1: 1000. Các kháng thể chính và thứ cấp chống -actin (Phòng thí nghiệm Vector, Hoa Kỳ) đã được sử dụng với độ pha loãng 1: 10.000. Các dải protein được phát hiện bằng WEST-ZOL[®] plus Western Blot Detection System (iNtRON, Hàn Quốc).

3. Kết quả và thảo luận

3.1 MCF-7-SC là tế bào gốc kháng anoikis

Bởi vì một trong những đặc điểm của tế bào gốc đã được báo cáo là kháng anoikis, một dòng tế bào mới, MCF-7-SC, được thử nghiệm khả năng kháng anoikis. MCF-7-SC hình thành những cụm tế bào trôi nổi và bám vào nhau thành nhiều cụm lớn hơn MCF-7 trong đĩa nuôi cấy polyHema (Hình. 1A và B). Phương pháp lựa chọn các tế bào kháng anoikis (Su X, 2009), đã được áp dụng để kiểm tra và loại bỏ những tế bào chết, chỉ để lại nuôi cấy những tế bào kháng anoikis. Tỷ lệ tế bào chết giảm đáng kể xuống còn 6,42 và 6,67% khi MCF-7-SC được thực hiện chọn lọc ở chu kỳ thứ hai và thứ ba (Hình 1C). Phát hiện này cho thấy MCF-7-SC tồn tại tốt hơn tế bào MCF-7 trong môi trường nuôi cấy trôi nổi bằng cách bám vào nhau. Đặc trưng quan trọng nhất của tế bào kháng anoikis là kháng thuốc. Vì thế, chúng tôi đã kiểm tra mức độ mRNA của ABCG2, điều dẫn đến sự kháng thuốc của tế bào (Seamon JA, 2006). Nồng độ mRNA của ABCG2 ở tế bào MCF-7-SC cao gấp 2 lần ở tế bào MCF-7, chỉ ra rằng MCF-7-SC dễ dàng kháng thuốc hơn các tế bào MCF-7 (Hình 1 D). Những kết quả này đã chứng minh rằng dòng tế bào gốc ung thư vú MCF-7-SC có các đặc tính của kháng anoikis.

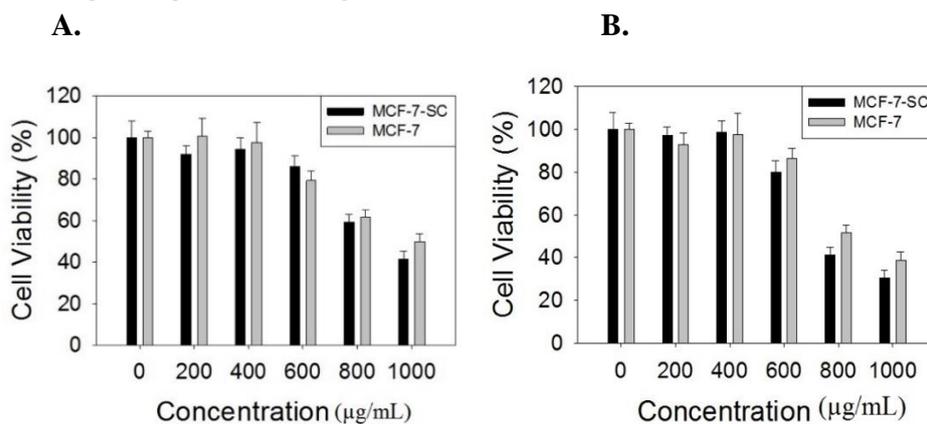




Hình 1. MCF-7-SC tạo thành tập hợp tế bào lớn hơn và có khả năng chống anoikis nhiều hơn MCF-7. (A) Cùng một số lượng tế bào (4×10^4 tế bào / mL) đã được gieo vào các đĩa nuôi cấy bình thường trong 24 giờ sau đó tách ra trong 6 giờ trong các đĩa nuôi cấy polyHema. Hình thái tế bào được kiểm tra dưới kính hiển vi (độ phóng đại, 100X). (B) Số lượng tập hợp tế bào tách ra trong các đĩa nuôi cấy polyHema trong 6 giờ được tính bằng cách sử dụng thiết bị bùồng đếm. (C) Các tế bào được thu thập, cấy vào trong môi trường nuôi cấy đơn lớp và được phép phục hồi trong 24 giờ sau mỗi 48 giờ ủ trên polyHema. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng nhuộm màu Trypan Blue sau mỗi chu kỳ. (D) Mức độ mRNA của ABCG2 được phân tích bằng RT-PCR. Dữ liệu tương ứng với giá trị trung bình \pm SD của ba thí nghiệm độc lập. Ý nghĩa thống kê, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2 MLL ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư vú MCF-7 và MCF-7-SC.

Vì loại bỏ tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis là một phương pháp đầy hứa hẹn để tạo ra các phản ứng lâu dài đối với các phương pháp điều trị ung thư vú, chúng tôi đã khám phá dòng tế bào MCF-7-SC được sắp xếp từ các tế bào MCF-7 ung thư vú bình thường thông qua việc tích lũy quần thể $CD44^{high} / CD24^{low}$ (4), cho đặc tính kháng anoikis. Kết quả MTT cho thấy MLL ức chế sự tăng sinh của cả tế bào ung thư vú MCF-7 và MCF-7-SC trong đó MCF-7-SC nhạy cảm với MLL hơn MCF-7, cho thấy MLL đặc biệt tiêu diệt các mục tiêu là tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis (Hình 2A và 2B).



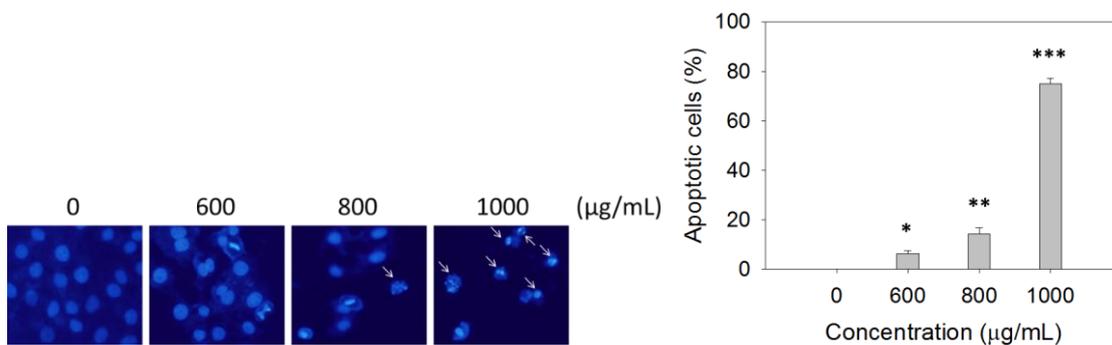
Hình 2. MLL ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư vú.

MCF-7-SC và MCF-7 được nuôi cấy và xử lý với nồng độ MLL được chỉ định trong (A) 24 h and (B) 48 h, và khả năng sống sót được xác định bằng MTT assay. Dữ liệu tương ứng với giá trị trung bình \pm SD của ba thí nghiệm độc lập.

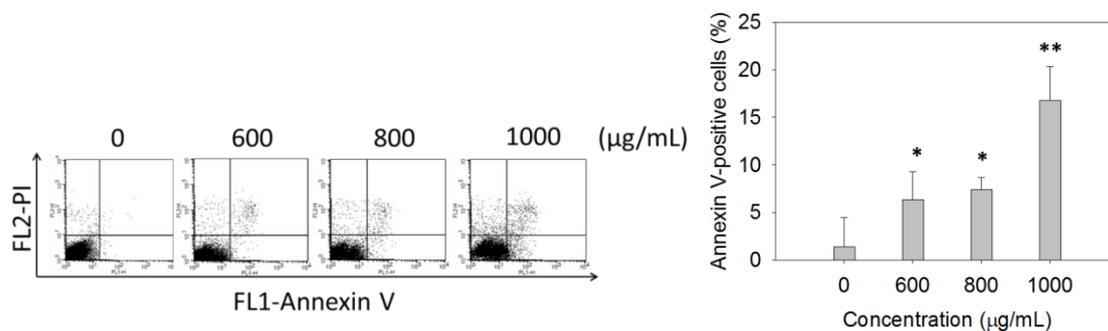
3.3 MLL gây chết tế bào (apoptosis) trong tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis MCF-7-SC

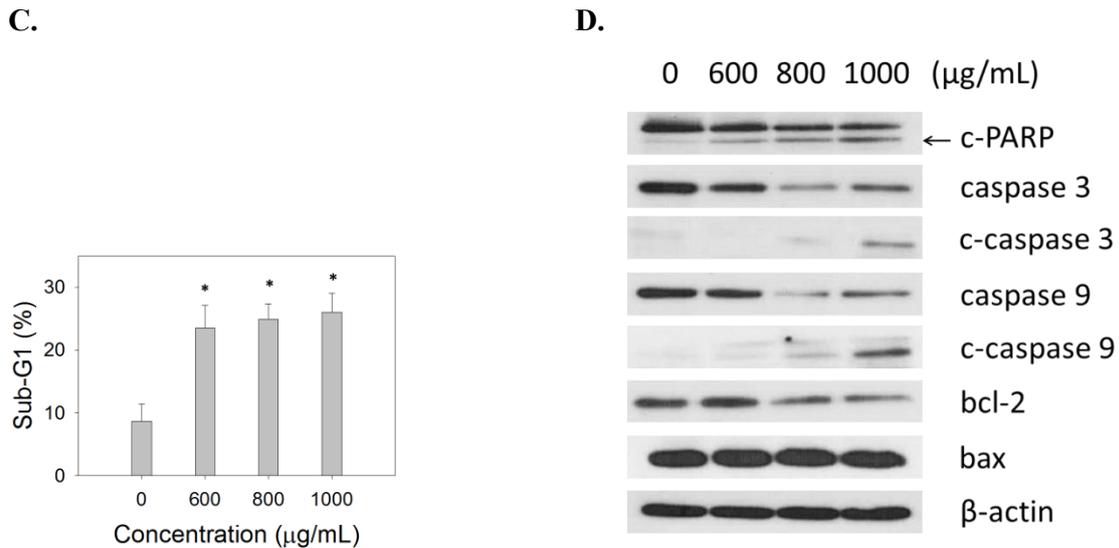
Để xác định xem khả năng sống sót của các tế bào được điều trị bằng MLL giảm có phải là do apoptosis hay không, tôi đã thực hiện nhuộm hạt nhân Hoechst, nhuộm Annexin V / PI và phân tích chu kỳ phân phối tế bào. Nhuộm hạt nhân cho thấy MLL gây ra sự phân mảnh và ngưng tụ của các hạt nhân trong tế bào gốc ung thư vú theo cách phụ thuộc nồng độ (Hình 3A). Phân tích tế bào học thông qua nhuộm màu kép annexin V / PI cho thấy MLL đã tăng tỷ lệ tế bào annexin V-positif / PI âm tính là apoptosis thay vì hoại tử theo kiểu phụ thuộc nồng độ (Hình 3B). Ngoài ra, có sự gia tăng đáng kể trong phân đoạn G1 phụ từ 8,71% đến 26,02% có thể do sự phân mảnh DNA (Hình 3C). Những kết quả này chỉ ra rằng MLL gây ra cái chết tế bào apoptosis thông qua tổn thương DNA. Kết quả của western blot của các protein liên quan đến apoptosis cho thấy MLL gây ra apoptosis trong tế bào gốc ung thư vú bằng cách thay đổi tỷ lệ Bax / Bcl-2 theo hướng có lợi cho apoptosis (Hình 3D). Hơn nữa, mức độ của ba dấu hiệu của apoptosis, caspase 3 bị phân tách, caspase 9 bị phân tách và PARP bị cắt, đã tăng lên (Hình 3D). Nói chung, các kết quả này chỉ ra rằng MLL gây ra apoptosis trong tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis.

A.



B.





Hình 3. MLL gây ra sự chết tế bào apoptosis trong tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis MCF-7-SC. Các tế bào được cấy, ủ trong 24 giờ và sau đó được ủ với nồng độ MLL được chỉ định trong 24 giờ nữa. (A) Các tế bào được xử lý đã được cố định và nhuộm màu bằng 10 µM Hoechst 33342 và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. (B) Các tế bào đã xử lý được thu hoạch và nhuộm màu với PI và / hoặc Annexin V theo hướng dẫn của công ty cung cấp bộ sản phẩm. Các kết quả được hiển thị là đại diện của ba phân tích tế bào học độc lập. (C) Các tế bào đã xử lý được thu hoạch, cố định bằng ethanol lạnh 70%, nhuộm màu PI, được rửa và phân tích bằng phân tích tế bào học dòng chảy. Các kết quả hiển thị là đại diện của ba thí nghiệm riêng biệt. (D) Các tế bào được ly giải sau khi ủ với MLL ở nồng độ được chỉ định trong 24 giờ. Các protein tế bào được phân tách bằng SDS-PAGE và được thử nghiệm với các kháng thể chính thích hợp. Kháng thể β -actin được sử dụng làm chuẩn.

4. Kết luận

Việc tìm ra các tác nhân trị liệu mới để tiêu diệt tế bào gốc ung thư kháng anoikis là rất cần thiết vì hóa trị liệu thông thường hoặc xạ trị không loại bỏ được khối u kháng trị liệu cao này. Mặc dù vẫn cần thêm những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chống lại sự kháng anoikis của MLL, nhưng nghiên cứu này đã chứng minh được rằng MLL ức chế sự phát triển không những của tế bào ung thư vú mà còn của tế bào gốc ung thư vú kháng anoikis thông qua việc gây chết tế bào bằng con đường apoptosis. Từ nghiên cứu này cho thấy việc tìm hiểu và khảo sát hoạt tính chống ung thư ở các loại thực vật mở ra một hướng điều trị mới thay thế cho các phương pháp điều trị ung thư truyền thống, bao gồm hóa trị và xạ trị. Chiến lược kết hợp này sẽ mở ra một liệu pháp mới chống lại các trường hợp ung thư kháng thuốc và kháng trị liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 63, 11–30.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105–111.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988

- Phuc, P.V., Khuong, T.T.T., Dong, L.V., et al (2010). Isolation and characterization of breast cancer stem cells from malignant tumours in Vietnamese women. *Journal of Cell and Animal Biology*, 4, 163–169
- Tran, T.A., Ahn, K.S., Song, Y.W., et al. (2014). Mechanism of 2',3'- dimethoxyflavone-induced apoptosis in breast cancer stem cells: roles of ubiquitination of caspase-8 and LC3. *Arch Biochem Biophys*, 562, 92-102.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Roninson, I.B. et al. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47, 381–389.
- Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C. et al. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 285, 1650–1654.
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., and Schinkel, A.H. (1999) The mouse *Bcrp/Mxr/Abcp* gene amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*, 59, 4237–4241.
- Seamon, J.A., Rugg, C.A., Emanuel, S., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Middleton, S.A. et al. (2006). Role of the ABCG2 drug transporter in the resistance and oral bioavailability of a potent cyclin-dependent kinase/aurora kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther*, 5, 2459–2467.
- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., et al. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1524–1532.
- Pellegrini N.M., Serafini B.O., Colombi D.D., Rio S.T., Salvatore R.A., Bionchi W.O. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.*, 2007, 2812–2819.
- Chun O.K.Y., Chung S.J., Claycombe K.J., Song W.O. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. Adults. *Nutrition*, 2008, 138, 753–760.
- Xu G., Liu D., Chen J., Ye X., Ma Y., Shi J. Juice component and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chem*, 2008, 106, 545–551.
- Tripoli E., Guardia M.L., Giammanco S., Di M.D., Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem*, 2007, 104, 466–479.
- Peterson O.A., Marian O.A., Marian A.E., Leblong P.S. Synthesis of complex carbohydrates in the golgi region as shown by autoradiography after injection of labelled glucose. *J. Cell Biol*, 2006, 21, 143–148.
- Viuda M.M., Ruiz N.Y., Fernandez L.J., Perez A.J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 2008, 19, 1130–1138.
- Arias B.A., Ramon L.L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and their medical use in the mediterranean region. *J. Ethnopharmacol*, 2005, 97, 89–95.
- Im J.S., Kim J-H, Kim M.Y. Evaluation of bioactive components and antioxidant and anticancer properties of citrus wastes generated during bioethanol production. *Natural Product Communications*, 2014, 9, 483-486.
- Banjerdpongchai R., Wudtiwai B., Khaw-On P., Rachakhom W., Duangnil N., Kongtawelert P. Hesperidin from Citrus seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways. *Tumour Biol.*, 2016, 37, 227-37.

- Pagliara V., Nasso R., Di Donato P., Finore I., Poli A., Masullo M., Arcone R. Lemon Peel Polyphenol Extract Reduces Interleukin-6-Induced Cell Migration, Invasiveness, and Matrix Metalloproteinase-9/2 Expression in Human Gastric Adenocarcinoma MKN-28 and AGS Cell Lines. *Biomolecules*, 2019, 9, 833.
- Su, X., Zheng, X., and Ni, J. (2009). Lanthanum citrate induces anoikis of Hela cells. *Cancer Lett*, 285, 200–209

Anti-cancer activity of Methanolic extraction from lemon leaves (*Citrus limon* L.)

Nguyen Thi Thao Linh

Phu Yen University

Email: thaolinh180989@gmail.com

Received: May 06, 2020; Accepted: June 08, 2020

Abstract

Breast cancer stem cell line MCF-7-SC, isolated from MCF-7 breast cancer cells, shows anoikis resistant characteristics. In this study, methanolic extraction from lemon leaves (MLL) was assessed for its anti-cancer activity in anoikis-resistant breast cancer stem cell MCF-7-SC. MLL induced apoptosis in MCF-7-SC as evidenced by an increase of apoptotic body formation, increased sub-G1 cell population, increased Annexin V-positive cells, increased Bax/Bcl-2 ratio, proteolytic activation of caspase-9 and caspase-3, and the degradation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) protein. Therefore, it might be useful as a medicinal plant for alternative novel anticancer drugs and nutraceutical products.

Key words: anoikis, apoptosis, cancer stem cells, lemon leaf