

## XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÒNG CHỐNG UNG THƯ CỦA MỘT SỐ CHẤT CHIẾT THỰC VẬT VIỆT NAM BẰNG CÁC PHÉP THỬ SINH HỌC *IN VITRO*

ĐỖ THỊ THẢO, ĐỖ THỊ PHƯƠNG, ĐỖ KIẾC HIẾU

*Viện Công nghệ sinh học*

NGUYỄN VĂN HÙNG

*Viện Hoá học*

Ung thư là căn bệnh gây tỷ lệ tử vong cao thứ hai trên thế giới sau bệnh tim mạch [4]. Sau nhiều nỗ lực tìm kiếm, nhiều hợp chất có nguồn gốc tự nhiên (từ động vật, thực vật, vi sinh...) đã được phát hiện và đang được sử dụng để chữa trị cho các bệnh nhân ung thư, ví dụ như Vinblastine tách từ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), taxol tách từ cây thông đỏ (*Taxus brevifolia*)... [5, 8]. Các hoạt chất như các retinoids, vitamin A, C, D, E... cũng đã được chứng minh có khả năng ngăn ngừa sự hình thành và phát triển của bệnh ung thư [2, 3, 7, 10]. Tuy nhiên, còn có rất nhiều dược liệu khác được sử dụng để chữa trị ung thư mà chưa được nghiên cứu một cách khoa học, chưa xác định được hoạt tính diệt, ức chế hay phòng ngừa tế bào ung thư hình thành và phát triển.

Cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth) và cây lưỡi răn trắng (*Hedyotis diffusa* W.) là hai trong số nhiều loại cây được sử dụng nhiều ở Việt Nam để chữa trị cho bệnh nhân ung thư. Một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy khả năng ức chế tế bào ung thư của hai loại cây này, tuy nhiên, kết quả còn thất thường. Vì thế, việc xác định khả năng phòng chống ung thư của chúng cũng như việc tìm ra hoạt chất thực sự mang hoạt tính phòng chống ung thư của hai cây dược liệu này là cần thiết, tạo cơ sở cho việc sử dụng chúng một cách an toàn và khoa học hơn.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Chất chiết thực vật

Cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth) và cây lưỡi răn trắng (*Hedyotis diffusa* W.) được thu

hái tại vườn cây thuốc nam ở Hà Nội và làm khô ở nhiệt độ phòng. Phần cây khô được nghiền nhỏ rồi chiết với dung môi methanol (MeOH) dưới dạng chiết thô.

Sau khi xác định hoạt tính, chất chiết thô sẽ được tiếp tục phân đoạn hóa học bằng dung môi n-Hexan và phân đoạn nào thể hiện hoạt tính chống tế bào ung thư được phân tách bằng sắc ký cột nhiều lần trên silicagel với hệ dung môi n-hexan/axeton có độ phân cực tăng dần để thu được hoạt chất.

#### 2. Tế bào

Dòng tế bào ung thư gan Hepalcl7, BPcl và TAOBPcl (được sử dụng trong phép thử QR), dòng tế bào KB và MCF7 (sử dụng trong phép thử độc tính) được nuôi trong môi trường nuôi cấy phù hợp có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò FBS, ở điều kiện 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Chúng được cấy chuyển liên tục sau 3-5 ngày.

Các dòng tế bào ung thư nói trên do GS. J. M. Pezzuto thuộc trường đại học Hawaii, Hoa Kỳ cung cấp.

Các hóa chất cần thiết khác đều được mua từ Sigma, GIBCO-BRL và Fisher.

#### 3. Phương pháp xác định khả năng cảm ứng enzym quinone reductaza của hoạt chất nghiên cứu

Khả năng cảm ứng enzym khử độc quinone reductaza của chất nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp của Prochaska và Talalay năm 1992 [11]. Ba dòng tế bào Hepalcl7, BPcl và TAOBPcl được nuôi trong khay 96 giếng, mỗi giếng có 190 µl môi trường bổ sung 10 µl chất

thử pha trong DMSO 10%. Mỗi phép thử được thực hiện trên một bộ gồm 2 khay vi lượng 96 giếng, trong đó: khay 1 để xác định hoạt độ enzym QR; khay 2 để xác định độ độc của chất thử trên tế bào. Tế bào được nuôi tiếp 48 giờ rồi xác định hoạt độ enzym QR. Bromoflavone được sử dụng làm đối chứng dương.

Hoạt độ enzym QR được xác định bằng giá trị CD (Concentration required to Double the specific activity) là lượng chất thử khi thêm vào môi trường đã làm tăng gấp đôi hoạt độ enzym QR khi xét tương quan với tính độc của chất thử thể hiện trên tế bào. Khi một chất (dịch chiết thô hoặc các phân đoạn hóa học) có chỉ số CD < 20 µg/ml và đối với hoạt chất tinh khiết có chỉ số CD < 20 µM thì được xem là có hoạt tính phòng ngừa ung thư thông qua việc cảm ứng enzym khử độc QR.

#### 4. Phương pháp xác định khả năng ức chế enzym aromataza của hoạt chất nghiên cứu

Khả năng ức chế enzym aromataza hoạt động của chất nghiên cứu được xác định nhờ vào việc đo mật độ huỳnh quang của chất huỳnh quang thu được sau phản ứng dealkyl hóa cơ chất huỳnh quang dibenzylfluorescencein (DBF) dưới xúc tác của enzym aromataza. Trong phản ứng này có đòi hỏi sự tham gia của hệ NADPH. Phép thử được thực hiện trên khay 96 giếng. DMSO 10% được sử dụng làm đối chứng âm, narigenin được sử dụng làm đối chứng dương.

Dữ liệu sau đó được phân tích bằng bảng excel và giá trị  $IC_{50}$  sẽ được xác định nhờ phần

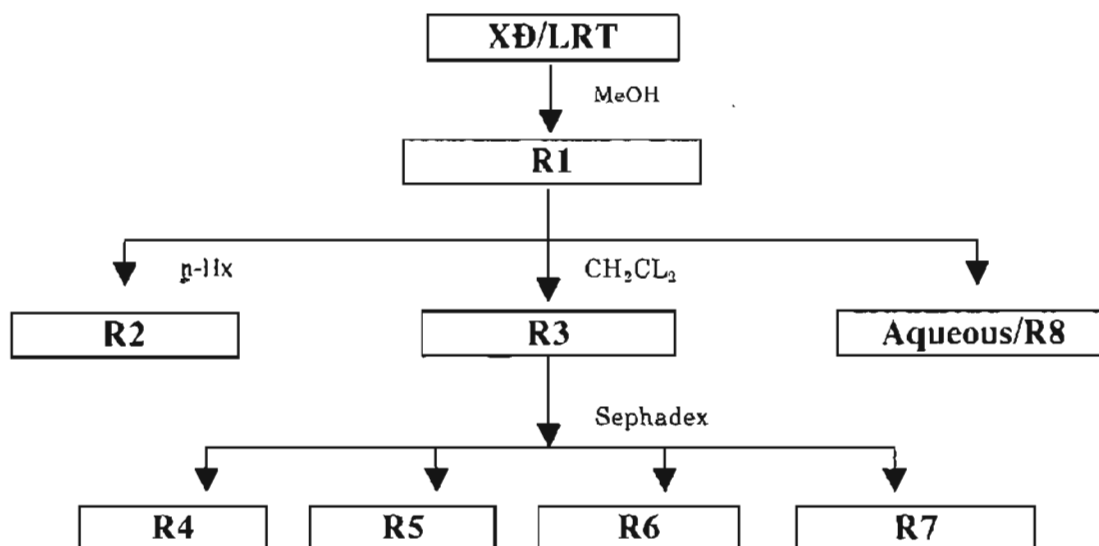
mềm TableCurve. Nếu chất nghiên cứu (với chất chiết thô, hoặc với các phân đoạn hóa học) có giá trị  $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$  hoặc với các hoạt chất tinh khiết có giá trị  $IC_{50} < 20 \mu\text{M}$  thì được xem là có hoạt tính phòng chữa ung thư thông qua việc ức chế hoạt động enzym aromataza.

#### 5. Phương pháp thử độc tính (cytotoxic assay)

Phép thử độc tính thực hiện theo phương pháp của Monks (1991), được Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ NCI (National Cancer Institute) sử dụng làm phương pháp chuẩn để sàng lọc tìm chất chống ung thư từ năm 1991 [9]. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất, nhuộm bằng SRB (sulforhodamine B) và đo hàm lượng ở bước sóng 515 nm bằng máy Microplate Reader (BioRad). Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ nguyên liệu thô ban đầu của hai loài cây xạ đen (XD) và lưỡi rắn trắng (LRT), sau quá trình chiết bằng dung môi methanol, chúng tôi đã thu được một lượng đủ để thực hiện các phép thử sinh học sau này. Bước đầu, chúng tôi kiểm tra hoạt tính phòng, chống ung thư của hai chất chiết thô tách từ cây XD và LRT bằng kiểm tra độc tính (Cytotoxic assay), xác định khả năng cảm ứng enzym khử độc QR trên các dòng tế bào Hepal1c7, BP'c1 và TAOBP'c1, xác định khả năng ức chế enzyme aromataza.



Hình 1. Sơ đồ tách chiết phân đoạn cây xạ đen và lưỡi rắn trắng

Kết quả sàng lọc ban đầu cho thấy, dịch chiết thô của hai dược liệu nghiên cứu đều cho giá trị  $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$  trên tất cả các phép thử sinh học được sử dụng, thể hiện hoạt tính tốt trong diệt và ức chế tế bào ung thư phát triển. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục tiến hành phân đoạn chất chiết thô (R1) của hai loài XD và LRT.

Quá trình tách chiết được thực hiện theo hình 1.

Cắt loại bột methanol, rồi chiết lần lượt với n-hexan (3 lần) và  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 lần thu được) cạn n-hexan (R2), cạn  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (R3) và cạn của dung dịch methanol/nước còn lại (R8). Các phân đoạn R2, R3, R8 tiếp tục được xác định hoạt tính

bằng các phép thử sinh học. Phân đoạn R3 của XD còn thể hiện hoạt tính với tế bào MCF7 với  $IC_{50} = 17,54 < 20 \mu\text{g/ml}$  và khả năng cảm ứng enzym QR với tế bào Hepalcl7, BP<sup>c</sup>1 và TAOBP<sup>c</sup>1 lần lượt là 14,29; 18,73; 15,7 ( $< 20 \mu\text{g/ml}$ ). Phân đoạn R3 của LRT còn thể hiện hoạt tính với tế bào MCF7 với  $IC_{50} = 12,37 < 20 \mu\text{g/ml}$ . Hai phân đoạn còn lại không thấy có hoạt tính.

Do vậy, phân đoạn R3 của hai dược liệu tiếp tục được tách phân đoạn qua sắc kí cột Sephadex thu được 4 phân đoạn R4, R5, R6 và R7 và kiểm tra hoạt tính qua các phép thử sinh học. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Hoạt tính phòng chống ung thư của các phân đoạn hóa học từ cây XD và LRT

Phân đoạn hoá học	Thử độc tính		Cảm ứng enzym QR			Ức chế hoạt động enzym aromataza
	Tế bào KB ( $IC_{50}=\mu\text{g/ml}$ )	Tế bào MCF7 ( $IC_{50}=\mu\text{g/ml}$ )	Tế bào Hepalcl7 ( $CD=\mu\text{g/ml}$ )	Tế bào BP ( $CD=\mu\text{g/ml}$ )	Tế bào TAO ( $CD=\mu\text{g/ml}$ )	
Cây xạ đen	R2	> 20	<b>12,98</b>	> 20	> 20	> 20
	R3	> 20	<b>17,54</b>	<b>14,29</b>	<b>18,73</b>	<b>15,7</b>
	R4	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R5	> 20	> 20	<b>19,87</b>	<b>19,82</b>	> 20
	<b>R6</b>	<b>19,78</b>	<b>19,62</b>	> 20	> 20	> 20
	R7	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R8	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	<b>19,95</b>					
Cây lười rần trắng	R2	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R3	> 20	<b>12,37</b>	> 20	> 20	> 20
	R4	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R5	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R6	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R7	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	R8	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
	<b>0,036</b>					
Đối chứng dương	<b>0,62</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>1,22</b>	<b>1,32</b>	<b>0,036</b>

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

Đối với các phân đoạn của XD: R6 có hoạt tính ức chế tế bào ung thư KB, MCF7 với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 19,78  $\mu\text{g/ml}$ ; 19,62  $\mu\text{g/ml}$  ( $< 20 \mu\text{g/ml}$ ); R5 có hoạt tính cảm ứng enzym khử độc QR với tế bào Hepalcl7 và BP<sup>c</sup>1 với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 19,87  $\mu\text{g/ml}$  và 19,82  $\mu\text{g/ml}$  ( $< 20 \mu\text{g/ml}$ ); R7 có hoạt tính ức chế enzym

aromataza với  $IC_{50}$  là 19,95  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả nghiên cứu trên đã phần nào chứng minh khả năng phòng và chữa trị ung thư của XD.

Các phân đoạn R4, R5, R6 và R7 của LRT đều mất hoạt tính khi thực hiện các phép thử sinh học trên với  $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ . Chỉ có phân đoạn R3 thể hiện hoạt tính ức chế dòng tế bào MCF7 phát triển với  $IC_{50} = 12,37 \mu\text{g/ml}$ .

### III. KẾT LUẬN

Các phép thử sinh học: kiểm tra độc tính (cytotoxic assay), xác định khả năng cảm ứng enzym khử độc Quinone reductaza (QR) trên các dòng tế bào gan Hepalclc7, BPc1 và TAOBPc1, xác định khả năng ức chế enzym aromataza, đã xác định được khả năng phòng chống ung thư của XD: phân đoạn R6 có hoạt tính ức chế tế bào ung thư KB, MCF7 phát triển; phân đoạn R5 có khả năng cảm ứng enzym khử độc QR để loại bỏ các tác nhân gây ung thư; phân đoạn R7 ức chế hoạt động của enzym aromataza là enzym quyết định cho việc hình thành estrogen và kích thích các loại tế bào ung thư phụ thuộc estrogen phát triển.

Hoạt tính phòng chống ung thư của cây lưỡi rắn trắng chỉ thể hiện ở phân đoạn R3 trong phép thử độc tính đối với tế bào ung thư vú MCF7.

*Lời cảm ơn:* Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. J. M. Pezzuto, trường đại học Purdue, Hoa kỳ và cán bộ thuộc phòng Công nghệ Tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học và phòng Hóa Terpene, Viện Hoá học đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chí, 1999: Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nxb. Y học.

2. Benson A. M., Hunkeler M. J., Talalay P., 1980: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 9(77): 5216-5220.
3. Boone C. W., Kelloff G. J., Malone W. E., 1990: Cancer Res, 50: 2-9.
4. UICC/WHO Booklet, 2005: Update Edition.
5. Han R., 1994: Stem Cell, 1(12): 53-63.
6. Kelloff G. J. et al., 1998: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 7: 65-78.
7. Kosmeder J. W., Pezzuto J. M., 2002: International Agency for Research on Cancer, Lyon, France: 343-347.
8. Lee K. H., 1999: Med. Res. Rev., 19(6): 569-596.
9. Monks A. et al., 1991: J. Nat. Cancer Int., 83(11): 757-766.
10. Pezzuto J. M., 1995: Phytochemistry of medicinal Plant. Chapter 2. Plenum Press, New York and London: 19 - 45.
11. Prochaska H. J., Talalay P., 1988: Cancer Res, 48: 4776 -4782.
12. Prochaska H. J., Santamaria A. B., Talalay P., 1992: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 2394-2398.

## DETERMINATION OF ANTICANCER ACTIVITY OF SEVERAL VIETNAMESE PLANT EXTRACTS BY EMPLOYING THE IN VITRO BIOASSAY SYSTEM

DO THI THAO, DO THI PHUONG,  
NGUYEN KHAC HIEU, NGUYEN VAN HUNG

### SUMMARY

*Celastrus hincsi* Benth (XD) and *Hedyotis diffusa* W. (LRT) are the two Vietnamese herbs that are popularly used for cancer treatment. In order to find the anticancer activity of those two plants, we carried out the different *in vitro* bioassays. XD and LRT were firstly extracted and then fractionated to get the R1-R8 fractions. All of those fractions were tested for anticancer activity through *in vitro* bioassay system that includes the cytotoxic assay for toxic activity, the quinone reductase (QR) assay for QR inducing activity, the aromatase assay for inhibition of aromatase activity. In result, we determined the anticancer activity of these two herbs. Fraction R5, R6, R7 of XD are able to induce the activity of QR to detoxify the carcinogens, to be toxic to the growth of the KB and MCF7 cancer cells, and to inhibit the aromatase activity for prevention of estrogen-dependent cancers, respectively. Only the fraction R3 of LRT shows some inhibition activity on MCF7 cells in the cytotoxic assay.

Ngày nhận bài: 19-6-2007