

Nghiên cứu khả năng kháng u của cây lược vàng (*Callisia fragrans* (Lindl.) Woods) ✓

Nguyễn Thị Minh Hằng*, Tô Hải Tùng, Nguyễn Thị Tú Oanh
Cao Thị Huệ, Lê Nguyễn Thành, Nguyễn Văn Hùng
Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
*E-mail: hanghoa.hctm@yahoo.com

Summary

The rich ecdysteroid preparation (CF) from *Callisia fragrans* (Lindl., Woods.) was evaluated in vivo for antitumor activity on the Lewis lung carcinoma cell lines (LLC) in BALB/c mice. CF inhibited the volume of cancerous cells by 27.02% at the dose of 1000 mg/kgP/day in comparison with the control group. At this dose, CF obviously reduced leukemia, but showed no effects on the function enzymes of the liver and kidney in the tested tumorous mice.

Keywords: *Callisia fragrans* (Lindl.) Woods, antitumor, ecdysteroid.

Đặt vấn đề

Cây lược vàng, còn gọi là cây lan vòi, có tên khoa học là *Callisia fragrans* (Lindl.) Woods thuộc họ Thái lải (Commelinaceae), vốn có nguồn gốc từ Trung Mỹ, sau đó được di thực đến nhiều nơi khác. Hiện nay, loài cây này mọc hoang hoặc được trồng nhiều ở Nga, Việt Nam, Australia... Cây lược vàng được du nhập vào Việt Nam từ năm 2004 và được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam trong việc hỗ trợ và chữa trị nhiều bệnh nan y như ung thư, viêm nhiễm, bỏng, lao phổi, bệnh tim mạch, tiểu đường và viêm răng miệng. Thời gian gần đây có rất nhiều thông tin về tác dụng chữa bệnh hiệu quả của cây lược vàng [1-3]. Tuy nhiên, phần lớn các thông tin đều là truyền miệng chưa được chứng minh rõ ràng bằng nghiên cứu khoa học. Điều này đã tạo nên những mối quan tâm nhất định về tác dụng chữa bệnh cũng như khả năng ảnh hưởng đến sức khỏe con người của cây lược vàng. Năm 2013, các nhóm nghiên cứu của Viện Hóa sinh biển đã cho biết thành phần chính của cây lược vàng là các hợp chất ecdysteroid [4]. Tổng quan các tài liệu trên thế giới cho biết ecdysteroid là lớp chất có nhiều hoạt tính sinh học thú vị như tăng khả năng miễn dịch, chống loãng xương, tăng khả năng đồng hóa (trao đổi chất), tăng khả năng thích ứng (cân bằng trao đổi chất), chống tiểu đường, giảm cholesterol trong máu, bảo vệ gan và thần kinh [4].

Nhằm nghiên cứu về khả năng chống ung thư của cây lược vàng để tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng và khai thác loài cây này trong công cuộc hỗ trợ phòng chống và điều trị bệnh ung thư, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng

kháng u của chế phẩm giàu ecdysteroid (CF) được điều chế từ cây lược vàng.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu thực vật

Cây lược vàng được thu hái vào tháng 11/2015 tại huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên. Thu hái toàn bộ cây bao gồm lá, thân và chồi nhánh. Cây lược vàng sau khi thu hái được chế biến thành dạng bột khô.

Điều chế chế phẩm giàu ecdysteroid

2 kg bột lược vàng khô được ngâm chiết bằng 10 L ethanol 80% trong vòng 24 giờ. Quá trình ngâm chiết được lặp lại 2 lần. Gộp chung dịch của 3 lần ngâm chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm xuống còn khoảng 1 L dịch cô đặc. Chiết phân bố dịch chiết cô đặc bằng ethyl acetat (3 lần, 500 mL/lần) thu lấy phần dịch nước bên dưới. Phần dịch nước này được cất loại hết dung môi hữu cơ và được phân tách bằng các phương pháp sắc ký cột để thu được 9 g chế phẩm giàu ecdysteroid (ký hiệu CF).

Vật liệu nghiên cứu

Động vật: Chuột BALB/c khỏe mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, không phân biệt giống, không mắc bệnh, có trọng lượng 22-25 g, được nuôi tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học. Chuột được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do.

Tế bào: Dòng tế bào gây ung thư LLC (Lewis lung carcinoma) có khả năng di căn được sử dụng để gây ung thư cho chuột.

Phương pháp nghiên cứu

Gây u cho chuột bằng đồng tế bào LLC

Tế bào LLC được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò và 1% kháng sinh ở 37°C và 5% CO₂. Khi tế bào mọc hết tiến hành thu hoạch và tiêm vào bắp đùi chuột nồng độ 2 x 10⁶ tế bào/con (là nồng độ gây u cho chuột thí nghiệm). Sau khi tiêm tế bào LLC, cho chuột uống hoạt chất CF [9].

Xác định khả năng ức chế khối u của hoạt chất CF trên mô hình chuột bị gây u bằng đồng tế bào LLC

15 chuột BALB/c khỏe mạnh, có độ tuổi từ 8-9 tuần tuổi, có khối lượng từ 22 - 25 g, được chia làm 3 lô (5 chuột/lô).

Lô 1: (đối chứng bệnh lý) tiêm LLC, sau 7 ngày có u thì uống nước với thể tích 0,2-0,3 ml/con/ngày là dung môi pha chế phẩm CF trong thời gian 4 tuần.

Lô 2: (đối chứng tham khảo) tiêm LLC, sau 7 ngày có u thì tiêm doxorubicin liều 5 mg/kg/ngày, 2 lần/tuần trong thời gian 4 tuần.

Lô 3: (thử mẫu) tiêm LLC, sau 7 ngày có u thì uống chế phẩm CF liều 1000 mg/kg thể trọng/ngày trong thời gian 4 tuần.

Với bố trí thí nghiệm như trên, có thể nghiên cứu được khả năng kháng u ung thư của chế phẩm CF thông qua việc ức chế khối u phát triển. Kết quả được so sánh với chất tham khảo doxorubicin và đối chứng bệnh lý của thí nghiệm.

Theo dõi chuột hàng ngày, cân khối lượng và đo kích thước khối u sơ cấp tại vị trí tiêm 7 ngày/lần theo phương pháp của Iigo [10], Eun-Ok Lee [7, 11] để xác định khả năng ức chế khối u của chế phẩm CF. Thể tích khối u được tính theo công thức của Iigo [10].

$$V = a \times b^2/2$$

Trong đó: V: thể tích khối u

a: chiều dài khối u

b: đường kính khối u

Đánh giá tác dụng của chế phẩm CF thông qua kiểm tra một số chỉ tiêu sinh hóa máu

Sau thời gian cho uống chế phẩm CF (những con chuột không chết) sẽ được lấy máu để làm các xét nghiệm sinh hoá máu gồm các chỉ tiêu: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin..., serum glutamic oxaloacetic transaminase (AST), serum glutamic pyruvic transaminase (ALT) để đánh giá chức năng gan, thận theo phương pháp của Bergmeyer.

Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm CF đối với các biến đổi giải phẫu bệnh lý ở gan, thận, lách, phổi chuột gây u thực nghiệm

Sau quá trình thí nghiệm hoặc khi động vật chết sẽ được mổ để kiểm tra trực quan u di căn và đánh giá mức độ chống khối u di căn của CF (nếu khối u di căn).

Xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: $M \pm SEM$ (Standard error of the mean - sai số chuẩn của giá trị trung bình) và xử lý thống kê Student's *t*-test, *F*-test. Kết quả thử nghiệm đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi $p < 0,05$ là sai khác có ý nghĩa, nếu $p > 0,05$ thì sai khác không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và bàn luận

Theo nhiều báo cáo, đồng tế bào LLC (Lewis Lung Carcinoma) là đồng tế bào ung thư phổi, hiện được sử dụng làm tác nhân gây u thực nghiệm trên chuột ở nhiều phòng thí nghiệm với hiệu quả cao. Vì vậy, chúng tôi cũng sử dụng tế bào LLC (tỉ lệ 2x10⁶ tb/chuột/lần) để gây u trên dòng chuột thuần chủng BALB/c và thu được hiệu quả gây u thực nghiệm rất cao: 95 - 100% [9].

Thí nghiệm này đã sử dụng tế bào LLC để gây u thực nghiệm nhằm đánh giá khả năng ức chế sự phát triển ung thư *in vivo* của chế phẩm CF. Kết quả thu được như sau:

Trọng lượng chuột thí nghiệm

Bảng 1: Trọng lượng chuột thí nghiệm (g/con)

Lô TN0	Trọng lượng chuột thí nghiệm (g/con)					
	0 ngày	7 ngày	14 ngày	21 ngày	28 ngày	35 ngày
Đối chứng	28,54 ±1,02	29,20 ±3,85	27,70 ±3,87	28,98 ±4,47	27,50 ±3,16	26,89 ±2,72
Doxorubicin	28,00 ±2,05	28,17 ±2,02	28,40 ±2,51	28,00 ±1,98	28,57 ±2,45	29,02 ±2,08
CF: 1 g/kg	28,07 ±0,93	28,83 ±1,53	27,93 ±2,57	28,43 ±2,21	28,73 ±2,04	28,97 ±2,53

Kết quả trong bảng 1 cho thấy chuột ở lô đối chứng bệnh lý có sự suy giảm về khối lượng, trong khi hai lô chuột thí nghiệm uống CF và đối chứng

tham khảo, chuột không bị giảm khối lượng. Tuy nhiên, sự sai khác về khối lượng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Khả năng ức chế sự phát triển khối u của chế phẩm CF

Kết quả nghiên cứu về sự phát triển của khối u được trình bày ở bảng 2-4.

Bảng 2: Quá trình phát triển của khối u sau khi tiêm tế bào LLC (mm³)

Lô TNo	Thể tích của khối u (mm ³)				
	7 ngày	14 ngày	21 ngày	28 ngày	35 ngày
Đối chứng	256,93 ± 63,54	1268,80 ± 129,96	3312,46 ± 401,10	5236,43 ± 598,41	6142,40 ± 601,40
Doxorubicin	256,65 ± 46,25	300,94 ± 51,95	734,26 ± 69,42	1172,51 ± 108,23	1225,86 ± 215,64
CF: 1 g/kg	256,69 ± 74,85	855,84 ± 19,93	2309,37 ± 294,44	3602,17 ± 585,77	4482,84 ± 513,07

Bảng 2 cho thấy: sau 35 ngày tiêm LLC ở lô được uống chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày thể tích khối u tại vị trí tiêm tế bào LLC là 4249,40 mm³. Trong khi đó, lô đối chứng không được sử dụng CF thể tích khối u là 6142,40 mm³. Như vậy, thể tích khối u ở lô được sử dụng CF là nhỏ hơn so với lô đối chứng và sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đối chứng doxorubicin thể tích khối u là 1225,86 mm³, nhỏ hơn so với lô đối chứng và sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3: Phần trăm ức chế khối u phát triển của chế phẩm CF (%)

Lô	7 ngày	14 ngày	21 ngày	28 ngày	35 ngày
Đối chứng	0	0	0	0	0
Doxorubicin	0,11	76,28	77,83	77,61	80,04
CF: 1 g/kg	0,10	33,38	30,28	31,21	27,02

Bảng 3 cho thấy, sau 35 ngày tiêm tế bào LLC và 28 ngày cho uống chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày thì thể tích khối u đã giảm 27,02% so với lô đối chứng. Chất đối chứng tham khảo doxorubicin ức chế tới 76,59% thể tích khối u so với đối chứng.

Sau 35 ngày kể từ khi tiêm tế bào LLC (28 ngày cho uống chất nghiên cứu) hoặc trong quá trình thí nghiệm nếu chuột bị chết, chúng tôi mổ chuột để kiểm tra trực quan nội tạng, bóc tách u tại vị trí tiêm tế bào LLC và cân trọng lượng u. Kết quả cho thấy: Tại thời điểm 28 ngày tiêm LLC ở lô đối chứng bị chết 2 con, lô uống CF chưa có con nào bị chết. Trong khoảng từ ngày thứ 29 đến ngày thứ 32, lô uống chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày chết 02 con. Kết quả xác định trọng lượng u tại vị trí tiêm sau thời gian thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: Khối lượng u tại các thời điểm thí nghiệm (g/con)

Lô TNo	Khối lượng u (g/con)	
	28 ngày	35 ngày
Đối chứng	8,75	8,70 ± 1,23
Doxorubicin		3,26 ± 0,67
CF: 1000 mg/kg		7,34 ± 1,06

Tác dụng của chế phẩm CF đến một số chỉ tiêu huyết học và sinh hoá máu

Kết quả nghiên cứu tác dụng của chế phẩm CF đến một số chỉ tiêu huyết học và sinh hoá máu được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Kết quả phân tích huyết học và hóa sinh máu

Các chỉ tiêu	Kết quả phân tích huyết học và hóa sinh máu		
	Đối chứng bệnh lý	Đối chứng tham khảo	CF: 1000 mg
Hồng cầu ($\times 10^9/L$)	9,42 ± 1,08	10,24 ± 1,21	9,45 ± 0,34
Bạch cầu ($10^9/L$)	36,20 ± 0,75	9,65 ± 1,05	27,99 ± 2,38
Tiểu cầu ($10^9/L$)	671,0 ± 86,24	671,15 ± 43,46	649,33 ± 60,29
Hemoglobin (g/L)	147,00 ± 2,56	148,01 ± 2,64	147,33 ± 6,03
Hematocrit (L/L)	0,430 ± 0,047	0,430 ± 0,032	0,430 ± 0,025
-MCV (fL)	46,60 ± 2,86	44,06 ± 2,12	48,80 ± 0,46
-MCH (pg)	16,17 ± 2,14	14,39 ± 1,35	16,97 ± 0,57
-MCHC (g/L)	344,00 ± 8,00	345,12 ± 5,38	351,67 ± 13,65
AST (U/L)	526,31 ± 48,51	321,06 ± 12,92	516,7 ± 30,01
ALT (U/L)	75,80 ± 3,45	45,55 ± 3,02	58,46 ± 2,03

Kết quả bảng 5 cho thấy:

- Khi chuột bị u và được sử dụng chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày chỉ tiêu bạch cầu đã giảm và có sự sai khác so với đối chứng bệnh lý ($p < 0,05$).

- Chỉ số hồng cầu, tiểu cầu và hemoglobin giữa lô được uống chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày và lô đối chứng là không có sự sai khác.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

- Chỉ số Hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu (MCV), số lượng hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (MCHC), nồng độ hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (MCH) giữa lô uống CF liều 1000 mg/kg/ngày và lô đối chứng bệnh lý là không có sự sai khác là không có sự sai khác giữa lô uống CF liều 1000 mg/kg/ngày với lô đối chứng bệnh lý ($p > 0,05$).

- Chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày không ảnh hưởng đến enzym AST, ALT trên chuột bị gây u.

Kết quả kiểm tra giải phẫu các cơ quan nội tạng

Sau khi lấy máu để làm các xét nghiệm sinh hóa, toàn bộ chuột thí nghiệm được giết mổ để kiểm tra trực quan các nội quan. Kết quả mổ kiểm tra trực quan nội tạng được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: Ảnh hưởng của CF trên mô bệnh học của gan, thận, lách, phổi chuột thí nghiệm

Mô	Đối chứng	Doxorubicin	CF liều 1000 mg/kg/ngày
Gan	Màu nâu hồng, mô đồng nhất	Màu nâu hồng, mô gan đều	Màu nâu hồng, mô gan đều
Thận	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau
Lách	Màu nâu đậm, mô đồng nhất	Màu nâu đậm, mô đồng nhất	Màu nâu đậm, mô đồng nhất
Phổi	2 con phổi đậm màu có nhiều vết đen.	Màu hồng nhạt, hai bên đều nhau	Màu hồng nhạt, hai bên đều nhau

Bảng 6 cho thấy: Các lô thí nghiệm không có nội quan bị di căn từ khối u sơ cấp ban đầu. Các cơ quan nội tạng khác nhau là dạ dày, gan, lách, thận, tuyến vú... đều không thấy xuất hiện u. Lô đối chứng cũng không có hiện tượng u di căn.

Kết luận

Chế phẩm giàu ecdysteroid từ cây lược vàng (CF) ức chế khoảng 27,02% thể tích của khối u so với lô đối chứng ở mức liều 1000 mg/kg/ngày, trong khi chất đối chứng tham khảo doxorubicin ức chế 76,59% thể tích khối u so với lô đối chứng. Chế phẩm CF liều 1000 mg/kg/ngày đã làm giảm bạch cầu so với lô đối chứng, không ảnh hưởng đến enzym chức năng gan và thận của chuột gây u so với lô đối chứng. Tuy nhiên, đây mới chỉ là những kết quả nghiên cứu ban đầu, cần phải tiến hành các nghiên cứu sâu hơn mới có thể đưa ra kết luận chính xác về khả năng chữa ung thư của cây lược vàng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài mã số VAST.UDCN.03/14-17.

Tài liệu tham khảo

1. Kim Quốc Hoa (2011), *Cây lược vàng quý như vàng*, NXB Thanh Niên.
2. Kim Quốc Hoa (2013), *Cây lược vàng quý hơn*

vàng, NXB Thanh Niên, quyển I.

3. Kim Quốc Hoa (2015), *Cây lược vàng quý hơn vàng*, NXB Thanh Niên, quyển II.

4. Laurence Dinan (2009), "The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: What use are they", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 72(3), p. 126-141.

5. Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Phương (2008), "Gây u thực nghiệm trên chuột bằng dòng tế bào ung thư Lewis lung carcinoma", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 6(4A), 619-624.

6. Igo M., Hoshi A., Kadosawa H., Fujigaki M. (1991), "Antitumor activity and metabolism of a new anthracycline-containing fluorine (ME2303) in Lewis lung carcinoma-bearing mice", *J. Cancer Res.*, 82, 1317-1321.

7. Eun-Ok Lee, Hyo-Jung Lee, Hwa-Soo Hwang, Kyoo-Seok Ahn, Chanhee Chae, Kyung-Sun Kang, Junxuan Lu and Sung-Hoon Kim (2006), "Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities", *Carcinogenesis*, 27(10), 2059-2069.

8. Hyo Jeong Lee, Hyo Jung Lee, Eun Ok Lee, Jae Ho Lee, Kuen Sung Lee, Kwan Hyun Kim, Sung-Hoon Kim and Junxuan Lu (2009), "In vivo anti-cancer activity of Korean *Angelica gigas* and its major pyranocoumarin decursin", *The American J. of Chinese Medicine*, 37(1), 127-142.

(Ngày nhận bài: 09/08/2016 - Ngày duyệt đăng: 03/10/2016)