

TÌM HIỂU HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TĂNG TRƯỞNG DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ CỔ TỬ CUNG HELA CỦA DỊCH CHIẾT MỘT SỐ CÂY THUỐC THU HÁI TẠI NGHỆ AN

Nguyễn Anh Dũng¹, Nguyễn Thị Giang An¹,
Lê Thị Ánh Tuyết², Mikhail Alexandrovic Epinetov³

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính ức chế tăng trưởng trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa của 20 dịch chiết từ 13 cây thuốc dựa trên thử nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Tại cả 3 nồng độ khảo sát, các dịch chiết từ cây dây hương (*Erythrolpalum scandens*), xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum*) và cỏ lười rần trắng (*Hedyotis diffusa*) đều chứng tỏ có hoạt tính ức chế tăng trưởng đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, trong đó dịch chiết của *H. diffusa* thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Đánh giá tác động của các dịch chiết 3 cây thuốc trên lên sự biểu hiện của protein ung thư bcl-2 trong tế bào bằng phương pháp so màu quang hóa học (MediaCybernetics, USA), kết quả thu được cho thấy rằng không có ảnh hưởng đáng kể của các dịch chiết thử nghiệm đối với sự biểu hiện của protein Bcl-2 trong những điều kiện thí nghiệm của nghiên cứu này.

Từ khóa: dịch chiết, cây thuốc, ức chế tăng trưởng, tế bào HeLa.

ABSTRACT:

ANTIPROLIFERATION ACTIVITY ON HeLa HUMAN CERVIX CANCER CELL LINE OF MEDICINAL PLANTS COLLECTED IN NGHEAN PROVINCE

20 extracts were prepared from 13 medicinal plants collected in Nghean province and evaluated for their antiproliferative activities against HeLa human cervix cancer cells by test MTT 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. Among them, three extracts

from *Erythrolpalum scandens*, *Pseuderanthemum palatiferum* and *Hedyotis diffusa* showed inhibitory activity against HeLa cells, in which extracts of *H. diffusa* have demonstrated the strongest activity. Assessing the effects of these three extracts on the expression of BCL-2 protein in cells by *Immunohistochemical Staining Methods* (MediaCybernetics, USA), results showed that no significant influence of the extracts tested for the expression of Bcl-2 protein in the experimental conditions of this study.

Key words: Extract, Medicinal plants, Antiproliferation, HeLa cell

1. MỞ ĐẦU

Nghệ An là một tỉnh miền Trung có vùng đồi núi chiếm $\frac{3}{4}$ diện tích toàn tỉnh, với 2.494 loài thực vật bậc cao đã được ghi nhận tại đây, trong đó có hơn 1.000 loài cây được nhân dân sử dụng làm thuốc (N.N.Thìn, 2004) [3]. Tuy nhiên, chỉ có một số rất ít các dược liệu này được chứng minh hiệu quả trên cơ sở khoa học [3,4]. Nhằm làm sáng tỏ công dụng thực sự của các cây thuốc dân gian, đồng thời cung cấp thêm dẫn liệu hướng tới mục tiêu sàng lọc và nghiên cứu cơ chế chống ung thư của các cây thuốc Việt Nam, trong phạm vi của nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu mẫu một số cây thuốc dân gian được sử dụng tại Nghệ An, chiết tách trên nhiều dung môi khác nhau, thu được 20 dịch chiết. Sau đó, chúng tôi tiến hành sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết ly trích trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung

¹Đại học Vinh; ²Đại học Hồng Đức

³Đại học Tổng hợp quốc gia Astrakhan, Liên bang Nga

HeLa. Dịch chiết có hoạt tính ức chế tế bào mạnh nhất sẽ được nghiên cứu sâu hơn nhằm xác định cơ chế gây độc tế bào của nó.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu cây thuốc:

Các cây thuốc sử dụng trong nghiên cứu này được thu hái ở khu vực miền núi tỉnh Nghệ An, là những cây thuốc được người dân thường sử dụng làm thuốc hoặc được bán ở các nhà thuốc Nam. Các loài này được định danh tại Bộ môn thực vật, Đại học Vinh. Sau khi thu nhận, các mẫu cây được cắt nhỏ, phơi khô và chiết với các dung môi như ở bảng 1. Dịch chiết sau đó được cô chân không và bảo quản ở 4°C.

2. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy tế bào động vật như: Huyết thanh bào thai bê, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), (Công ty Sigma – USA), môi trường RPMI với glutamine, dimethyl sulfoxide (Nga), trypsin, dung dịch Versene (Viện bại liệt và viêm não quốc gia, LB Nga), môi trường DMEM/F12 với Na₂CO₃ (GIBKO, USA), gentamicin sunfat, streptomycin sunfat (Công ty dược phẩm Veropharm, LB Nga).

3. Nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa do Viện ung thư Mỹ (USA) cung cấp. Tế bào đã được nuôi cấy ở điều kiện vô trùng trong tủ nuôi cấy LB-V (Ламинарбокс ЛБ-В, LB Nga), ở 37°C, 5% CO₂, độ ẩm tương đối 95%. Khi nuôi cấy tế bào thì sử dụng môi

trường chuẩn DMEM với sự bổ sung 20% huyết thanh bào thai bê, L-glutamine với nồng độ 100 µg/mL và kháng sinh gentamicin sunfat với nồng độ 40 µg/mL.

4. Đánh giá khả năng gây độc lên tế bào ung thư của các dịch chiết

Sử dụng phương pháp MTT để đánh giá khả năng gây độc tế bào của tác nhân nghiên cứu. Phương pháp này dựa trên hoạt động của enzyme dehydrogenase của ty thể trong các tế bào sống. Tế bào được nuôi trong đĩa 96 giếng. Sau khi ủ 24 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm 100%, tế bào được xử lý với dịch chiết ở những nồng độ khác nhau trong 48 giờ. Đánh giá tác động dịch chiết từ các cây thuốc lên sức sống của các tế bào ung thư bằng phương pháp MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2] -2,5-difeniltetrazoly methyl). Số lượng tinh thể formazan không tan trong nước tạo thành được đánh giá bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 570 nm, sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong dịch nuôi cấy, đây là tiêu chuẩn để đánh giá độc tính của các chất trong dịch nuôi cấy (Mealey và cs, 2002).

Đánh giá tác động của các dịch chiết cây thuốc lên sự biểu hiện của protein ung thư bcl-2 trong tế bào bằng phương pháp so màu quang hóa học.

5. Xử lý số liệu

Thí nghiệm sàng lọc được lặp lại 3 lần, kết quả được tính trung bình cho các lần thí nghiệm ± độ lệch chuẩn.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả tách chiết

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu nhận 13 cây thuốc với các bộ phận khác nhau và tiến hành tách chiết bằng con đường ly trích các hợp chất thiên nhiên theo tài liệu Dược điển Nga (СССР 11, 1989) thu được 20 cao chiết và đối chứng (Bảng 1).

Bảng 1. Những dịch chiết từ các cây thuốc thu hái tại Nghệ An

Số hiệu mẫu	Tên loài	Bộ phận	Số hiệu mẫu	Tên loài	Bộ phận
1	<i>Syzygium jambolana</i>	Lá	11	<i>Stemona tuberosa</i>	Rễ củ
2	<i>Syzygium jambolana</i>	Nụ	12	<i>Pseuderanthemum palatiferum</i>	Lá
3	<i>Syzygium jambolana</i>	Quả	13	<i>Ehretia asperula</i>	Lá
4	<i>Homalomena occulta</i>	Thân rễ	14	<i>Hedyotis diffusa</i>	Lá
5	<i>Erythralium scandens</i>	Thân rễ	15	<i>Psychotria montana</i>	Lá
6	<i>Nelumbo nucifera</i>	Lá	16	<i>Psychotria montana</i>	Thân
7	<i>Nelumbo nucifera</i>	Hoa	17	<i>Symplocos glomerata</i>	Lá
8	<i>Nelumbo nucifera</i>	Hạt	18	<i>Symplocos cochinchinensis</i>	Lá
9	<i>Scoparia dulcis</i>	Lá	19	<i>Sargentodoxa cuneata</i>	Thân
10	Dung dịch đường đậm đặc (Plain Caramel, E150a)	Đối chứng 1	20	Dung dịch đường đậm đặc (Plain Caramel, E150a)	Đối chứng 2

2. Hoạt tính của các dịch chiết lên dòng tế bào HeLa

Chúng tôi khảo sát hoạt tính gây độc tế bào (I%) của 20 cao chiết và đối chứng ở 3 nồng độ thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa bằng phương pháp MTT. Kết quả cho thấy ở cả 3 nồng độ khác nhau, có 3 cao chiết có phần trăm ức chế sự tăng trưởng tế bào có sự khác biệt tin cậy so với đối chứng. Đó là các cao chiết số 5 (*Erythralium scandens*), 12 (*Pseuderanthemum palatiferum*) và 14 (*Hedyotis diffusa*) (Bảng 2). Trong 3 loài này thì *Hedyotis diffusa* (lưỡi rắn trắng) thể hiện là loài có hoạt tính mạnh nhất. Thực tế đây là loài cây thuốc được người dân xem là thảo dược chữa trị ung thư ở Việt nam, được bán nhiều ở các hiệu thuốc nam. Một số nghiên cứu tại Nhật, Trung Quốc và Mỹ về *H.corymbosa* và *H.diffusa* cho thấy dịch chiết của chúng có hoạt tính kháng ung bướu-in vivo đối với tế bào ung thư Sarcoma, kháng protease HIV-1 (Jurgensmeier JM, 1998; Biswanath Dinda, 2007; Jiumao Lin, 2010) [5,7]. Loài *Pseuderanthemum palatiferum* (xuân hoa) được trồng phổ biến trong các nhà dân và được sử dụng hàng ngày làm gia vị và làm thuốc. Riêng loài *Pseuderanthemum palatiferum* (dây hương) thì mọc hoang trong rừng, hiện mới chỉ được biết như là một cây rau rừng có hương vị đặc biệt.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các cao chiết ở các nồng độ khác nhau lên sức sống của dòng tế bào HeLa (% so với đối chứng)

Nồng độ	Số hiệu mẫu										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1%	100 ±30	90 ±27	35* ±10	60* ±12	55* ±18	130 ±15	65* ±16	60* ±10	100 ±20	140 ±20	65* ±25
0,5%	100	80	40*	75	60*	90	70*	80	60*	150	70*

	±25	±10	±20	±25	±20	±10	±15	±10	±15	± 30	±10
0,1%	100	100	100	90	70*	80	100	110	70	100	100
	±20	±25	±15	±15	±10	±10	±20	±15	±30	±15	±10
Nồng độ	Số hiệu mẫu										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Nước muối sinh lý	
1%	40*	150	35*	95	20*	50*	90	70*	75	90	
	±10	±20	±15	±10	±25	±20	±30	±20	±10	±15	
0,5%	44*	140	32*	100	28*	50*	80	75	85	85	
	±15	±30	±15	±20	±10	±15	±10	±30	±15	±10	
0,1%	60*	90	25*	80	90	100	90	100	70	100	
	±20	±25	±15	±15	±20	±25	±10	±20	±15	±15	

Chú thích: * Sự khác biệt tin cậy so với đối chứng.

3. Ảnh hưởng của các dịch chiết 5, 12, 14 lên sự biểu hiện của protein bcl-2

Đánh giá tác động của các dịch chiết cây thuốc lên sự biểu hiện của protein ung thư bcl-2 trong tế bào bằng phương pháp so màu quang hóa học (MediaCybernetics, USA). Đánh giá sự biểu hiện của bcl-2 oncoprotein trong các tế bào đã được thực hiện bằng cách nhuộm mô miễn dịch. Phương pháp nhuộm mô miễn dịch của mẫu thử dựa trên sự gắn kết của kháng thể đơn dòng chính với bcl- 2 oncoprotein và tiếp theo là việc bổ sung các kháng thể thứ cấp đánh dấu bằng huỳnh quang. Số oncoprotein trong mẫu được đo đếm trên kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng phần mềm Image ProPlus 5.0 (MediaCybernetics, USA).

Tiếp tục nghiên cứu vai trò của apoptosis trong cơ chế hoạt động của progestogens, chúng tôi điều tra các biểu hiện của các protein antiapoptotic bcl-2 bằng phương pháp nhuộm mô miễn dịch. Tế bào nuôi cấy HeLa được ủ trong 72 giờ trong sự hiện diện của dịch chiết. Các tế bào đối chứng ủ trong cùng điều kiện, nhưng trong trường hợp không có dịch chiết thử nghiệm. Bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang "Axiostar" đã thu được hình ảnh của các tế bào trong phổ ánh sáng nhìn thấy được và hình ảnh phức hợp khi kích thích kháng thể thứ cấp đánh dấu huỳnh quang bởi bức xạ cực tím UV. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Nhuộm mô miễn dịch bởi kháng thể với Bcl-2 trong dòng tế bào nuôi cấy HeLa

Dịch chiết	Nồng độ (mol/l)	Tỷ lệ tương quan	Diện tích bắt màu
5	1%	0,234±0,09	15,9
	0,5%	0,211±0,18	31,1
	0,1%	0,294±0,07	30,5
12	1%	0,301±0,12	17,1
	0,5%	0,272±0,16	26,8
	0,1%	0,213±0,08	42,1
14	1%	0,182±0,10	3,9
	0,5%	0,231±0,08	10,2
	0,1%	0,215±0,22	29,0

Chú thích: Tỷ lệ tương quan – tỷ lệ số lượng tế bào phát huỳnh quang trên tổng số tế bào trong vùng nhìn thấy, Diện tích bắt màu – Diện tích khu vực tương ứng với các giá trị trên nền huỳnh quang, được tính như một tỷ lệ tương đối so với nền, phản ánh mật độ của các tế bào đơn lớp.

Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào phát huỳnh quang trên tổng số tế bào trong vùng nhìn thấy ở mức ý nghĩa $p < 0,05$, không có sự khác biệt đáng kể đối với các đối chứng trong các mẫu. Điều này cho thấy rằng không có ảnh hưởng đáng kể của các dịch chiết thử nghiệm đối với sự biểu hiện của protein Bcl-2 trong những điều kiện thí nghiệm như trên.

IV. KẾT LUẬN

1. Qua thời gian thí nghiệm bước đầu đánh giá hoạt tính ức chế tăng trưởng trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa của 20 dịch chiết từ 13 cây thuốc thu hái tại Nghệ An, thì dịch chiết của 3 cây thuốc cho kết quả thể hiện rõ hoạt tính ức chế dòng tế bào trên, đó là các dịch chiết từ cây *Erythralum scandens* (dây hương), *Pseuderanthemum palatiferum* (xuân hoa) và *Hedyotis diffusa* (cỏ lười rần trắng), trong đó dịch chiết của *H.diffusa* là thể hiện hoạt tính mạnh nhất.

2. Đánh giá tác động của các dịch chiết 3 cây thuốc trên lên sự biểu hiện của protein ung thư bcl-2 trong tế bào bằng phương pháp so màu quang hóa học (MediaCybernetics, USA), kết quả thu được cho thấy rằng không có ảnh hưởng đáng kể của các dịch chiết thử nghiệm đối với sự biểu hiện của protein Bcl-2 trong những điều kiện thí nghiệm của nghiên cứu này.

Trên đây là những kết quả bước đầu khảo sát hoạt tính của một số cây thuốc đối với dòng tế bào HeLa. Trong tương lai gần, chúng tôi sẽ tiếp tục khảo sát các mẫu dịch

chiết trên với dòng tế bào ung thư vú MCF-7, nguyên bào sợi ở chuột, đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lên sự hoạt động của các enzym apoptosis, xác định hoạt tính chống oxy hóa,... nhằm khẳng định một cách chắc chắn hơn giá trị của các cây thuốc này đối với tiềm năng điều trị ung thư.

Nghiên cứu này được sự tài trợ bởi Quỹ nghiên cứu khoa học cơ bản Nga (The Russian Foundation for Basic Research RFBR), trong khuôn khổ dự án Viet_a năm 2009-2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, 1999. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học. 1468 tr.
2. Đỗ Tất Lợi, 2001. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học Hà Nội, 1247 tr.
4. Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Thị Hạnh, Ngô Trúc Nhã, 2001. *Cây thuốc của đồng bào Thái, Con Công, Nghệ An*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội. 178tr.
5. Thiard Franck, Tất Tố Trinh và nnk, 2008. *Khảo sát hoạt tính ức chế tăng trưởng của các cây thuốc Việt nam trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa*. Tạp chí phát triển KH&CN, tập 11, số 01. Tr. 74-81.
6. Biswanath Dinda, Sudhan Debnath and Yoshihiro Harigaya, 2007. *Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids*. Chem. Pharm. Bull. 55(5). P. 689-728.
7. Epinetov M.A., Nguyen Anh Dung, 2010. *Phytochemical characteristics and application of herb Syzygium jambolana DC. in national medicine in Vietnam*. Proceedings of the International Scientific Conference on Bioresources, Astrakhan. P.76-81.
8. Jiumao Lin et al, 2010: *Hedyotis diffusa Willd extract induces apoptosis via activation*

of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells. International Journal of Oncology, Vol.37, No5, P.1331-1338.

9. Epinetov M.A., Nguyen Anh Dung, 2008: *C so sánh và đặc điểm của hoạt tính urease từ hạt đậu tương (Glycine max L. fabaceae)*

растительного сырья России и Вьетнама. Матер. III Всероссийской конф.-школы с международным участием «Высокореакционные интермедиаты химических реакций».- Астрахань, 2008.- С.28-29.

TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA UREASE TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG (*GLYCINE MAX L. FABACEAE*)

Nguyễn Văn Rư *, Nguyễn Thị Phương Ngọc**

TÓM TẮT

Đã sử dụng các phương pháp tinh sạch sơ bộ enzym urease bằng phương pháp kết tủa phân đoạn amoni sunfat ở 2 nồng độ 65% và 55% bão hoà, và ở 2 nồng độ 25% và 55% bão hoà sau đó đông khô và kết hợp với sắc ký rây phân tử trên gel sephadex G-75. Đã xây dựng được quy trình chiết tách và tinh sạch enzym urease từ đậu tương hiệu quả, loại bỏ được các protein tạp. Tạo được chế phẩm UC1 bằng kết tủa phân đoạn với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có hoạt độ urease (HđU) riêng 120,56 nKat/mg, và chế phẩm UC2 qua đông khô có HđU riêng 113,60 nKat/mg, độ tinh sạch tăng 1,22 lần so với dịch lọc thô. Tinh chế tạo được chế phẩm urease (UR1) có HđU riêng 230,55 nKat/mg với độ tinh sạch 2,33 lần so với dịch thô. Tạo được chế phẩm urease bột đông khô UR2 có hoạt độ urease là 224,89 nKat/mg chế phẩm, độ tinh sạch nâng lên 2,28 lần so với dịch lọc thô. Cũng đã xác định một số đặc điểm của urease UR2 là: bột xốp, trắng ngà, độ tan trong nước $\geq 98\%$, độ ẩm $\leq 6\%$, HđU là 224,89 nKat/mg.

Từ khóa(Keywords): Protein, enzyme, urease, hạt đậu tương (seed of soybean), activity

of urease (HđU), crude urease (UC), refined urease (UR)

SUMMARY:

EXTRACTION, PURIFICATION AND DEFINED CHARACTERISTIC OF UREASE FROM SOYBEAN (*Glycine max L., Fabaceae*)

In this study, we have used the method of preliminary purification of the enzyme urease by the method of fractional ammonium sulfate precipitation at two levels of 65% and 55% saturation, and at two levels of 25% and 55% saturation and then freeze-dried and combined with molecular sieve chromatography on sephadex G-75 gel. Has developed processes for extraction and purification of the enzyme urease from soybean performance, eliminating the protein complex. Create products UC1 by fractional precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is separate urease activity nKat 120.56 / mg, and freeze-dried preparation of UC2 through a particular activity of urease 113.60 nKat / mg, the purity increases 1.22 times that of crude filtrate. Refining create urease preparations (UR1) that the specific urease

* Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Dược HN

** Khoa Sinh hóa Bệnh viện Hữu Nghị