# Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư của tỏi đen (black garlic) trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư đại tràng người

# Study anti-cancer of black garlic on nude mice bearing human colon carcinoma tumors

**Phạm Xuân Phong** *Viện Y học Cổ truyền Quân đội*

**Tóm tắt**

*Mục tiêu*: Đánh giá tác dụng chống ung thư của tỏi đen trên chuột mang khối ung thư đại tràng (UTĐTT) người. *Đối tượng và phương pháp:* Chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối UTĐTT dòng HT-29 được uống dự phòng hoặc điều tri bằng tỏi đen với liều 1g hoặc 10g/kg thể trọng hàng ngày. *Kết quả:* Với liều 10g/kg, tỏi đen có tác dụng ức chế phát triển khối u ở nhóm chuôt được điều trị và kéo dài thời gian sống rõ rệt ở nhóm chuột mang u được uống tỏi đen dự phòng (p<0,05). *Kết luận:* Tỏi đen có tác dụng kéo dài thời gian sống và ức chế tốc độ phát triển khối u trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối UTĐTT người.

*Từ khóa:* Tỏi đen, HT-29, dự phòng, điều tri ung thư.

**Summary**

*Objective:* To investigate the anticancer effects of black garlic on human colon cancer of HT-29 cell line. *Subject and method:* Nude mice bearing human colon adenocarcinoma cells were preventive or treated with different doses of 1g/kg or 10g/kg body weith daily of black garlic. *Result:* At dose of 10g/kg daily, the black garlic inhibited the development tumors in treated group and significantly prolong alive time in nude mice bearing cancer tumors with preventive black garlic drinkıng (p<0.05). *Conclusion:* Black garlic could prolong live time and inhibited tumor grow in nude mice model of human colon cancer.

*Keywords:* Black garlic, HT-29, prevention, cancer treatment.

**Phản biện khoa học**. PGS.TS. TRỊNH TUẤN DŨNG

## 1. Đặt vấn đề

Một số công bố gần đây về thành phần hóa học trong tỏi đen Việt Nam cho thấy sản phẩm tỏi sau khi lên men có hàm lượng một số nhóm chức đã thay đổi, trong đó: Hàm lượng lavonid toàn phần, thiosufat toàn phần, polyphenol toàn phần tăng từ 1,5- 2,5 lần so với tỏi tươi trước khi lên men. Định lượng S- Allyl-L-Cystein một hợp chất có tác dung sinh học chính của tỏi có hàm lượng tăng 6 lần so với tỏi tươi trước khi lên men [1, 2]. Ngoài ra, trong thành phần hóa học của tỏi đen sau khi lên men hàm lượng một số acid amin tự do tăng rõ rệt so với trước khi lên men như: Acid aspartic, threonin, methiolin, arginin...

Cơ chế kháng ung thư của tỏi các nghiên cứu gần đây cho thấy trong tỏi chứa nhiều thành phần DATS - đây là chất có khả năng gây chết tế bào ung thư theo cơ chế gây apoptosis. Trên dòng tế bào ung thư đại tràng (UTĐTT) người dòng HT-29, DATS tác dụng ức chế rõ rệt thông qua cơ chế đổi chỗ protein xuyên màng tế bào, hoạt hóa caspase-3 và caspase-9, ức chế phân bào ở thời kỳ G2/M [3, 5].

Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm đánh giá hiệu quả của tỏi đen trong dự phòng và điều trị ung thư trên chuột thiếu hut miễn dịch mang khối UTĐTT người.

## 2. Đối tượng và phương pháp

### *2.1. Đối tượng*

Chuôt thiếu hụt miễn dịch nude mice BALB/c.

Tế bào UTĐTT người dòng HT-29 (ATCC, Hoa Kỳ). Đây là một dòng ung thư biểu mô tuyến của đại tràng được phân lập từ một bệnh nhân (BN) nữ da trắng, có biểu hiện về một số oncogen như: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -.

### *2.2. Thiết bị và hóa chất*

Mẫu bột phun sấy cao khô (TĐ) chứa 50% tỏi đen (black garlic) đạt tiêu chuẩn cơ sở (số lô 010313) do Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc - Hoc viện Quân y cung cấp.

Môi trường nuôi cấy tế bào: Môi trường nuôi cấy tế bào McCoy's 5a Medium Modified (Catalog No. 30-2007, ATCC), bổ sung 10% dung dịch huyết thanh bào thai bê (FBS), dung dịch penicillin/ streptomycin, dung dịch PBS, dung dịch Trypsin-EDTA (ATCC, Hoa Kỳ).

### *2.3. Phương pháp*

*2.3.1. Nuôi cấy và tăng sinh tế bào*

Nuôi cấy tế bào UTĐTT người dòng HT - 29 nuôi cấy trong môi trường McCoy's 5a Medium Modified bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin. Nuôi cấy tăng sinh tế bào trong chai có diên tích đáy chai 75 $cm^2$, đặt trong tủ vô trùng, duy trì nhiệt độ 37°C và $CO_2$ 5%.

Thay môi trường nuôi cấy 3 ngày/lần. Khi tế bào đạt mật độ 80% diện tích bề mặt chai, tách khỏi chai nuôi bằng Trypsin EDTA 0,05% và cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới. Khi số lương tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mât đô tế bào đat mật độ $10^7$ tế bào/ml.

*2.3.2. Ghép tế bào UTĐTT người HT- 29 lên chuột nude*

Thu hoach tế bào ung thư (như trên), đạt mât độ $10^7$ tế bào/ml.

Chuột nude được cố định và tiêm dịch chứa tế bào vào dưới da đùi phải. Quá trình thao tác được thực hiên trong điều kiên vô trùng tuyệt đối.

**Hình 1.** Ghép tế bào ung thư vào dưới da đùi chuôt.

*2.3.3. Theo dõi và xác đinh sự hình thành khối ung thư trên chuôt.*

Khối u đươc đánh giá theo dõi sự phát triển tai vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần mỗi tuần, bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK.

Khối u đươc đo theo hai kích thước dài x rộng bằng thước chính xác NSK (Nhật Bản), 2 lần/tuần.

Kích thước u được tính theo công thức:

$$V=D \times R^2 \times 0,5$$

V: Thể tích khối u; D: Chiều dài khối u; R: Chiều rộng khối u.

### *2.4. Phân nhóm và cách sử dụng tỏi đen*

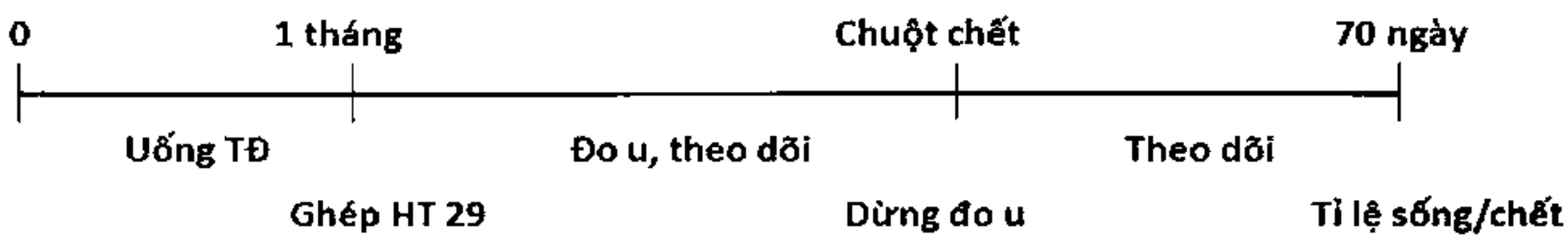
*2.4.1. Đánh giá tác dụng dự phòng ung thư của tỏi đen*

Chuột đươc chia thành các nhóm và uống viên nang tỏi đen như sau:

Nhóm chứng: 10 chuột nude, hàng ngày được cho uống nước cất tương ứng với thể tích 0,1ml/10 g thể trọng, liên tục trong 4 tuần.

Nhóm dự phòng 1: 10 chuột nude, hàng ngày được cho uống nước hòa tan bột của viên nang tỏi đen với liều tương ứng 1g/kg thể trọng/ngày, được pha với thể tích 0,1ml/10g thể trọng. Chuột được uống trong 4 tuần.

Nhóm dự phòng 2: 10 chuột nude, hàng ngày được cho uống nước hòa tan bột của viên nang tỏi đen với liều tương ứng 10g/kg thể trọng/ngày, được pha với thể tích 0,1ml/10g thể trọng. Chuôt được uống trong 4 tuần.




Sơ đồ sử dụng tỏi đen trong dự phòng ung thư đại tràng

Sau khi uống liên tục 4 tuần, chuôt nude đươc ghép tế bào UTĐTT HT-29 với $10^6$ tế bào/con, và chuột đươc theo dõi tỷ lệ mọc khối u, tốc đô phát triển khối u, thời gian sống thêm của các nhóm.

*2.4.2. Đánh giá tác dụng điều trị ung thư của tỏi đen*

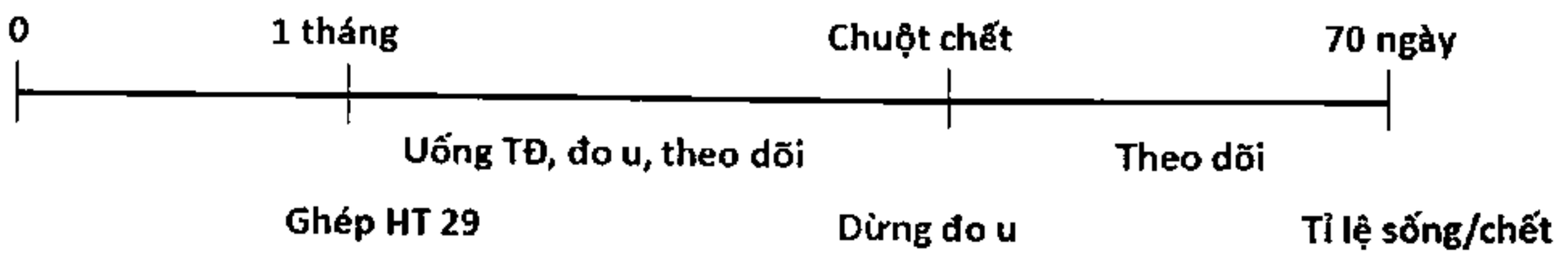
Chuột nude được ghép tế bào UTĐTT dòng HT-29 với $10^6$ tế bào/con, khi khối u phát triển có kích thước trung bình 70-75 $mm^3$, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm và uống tỏi đen như sau:

Nhóm chứng: 10 chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối UTĐT, hàng ngày được cho uống nước cất tương ứng với thể tích 0,1ml/10g thể trọng, liên tục trong 4 tuần.

Nhóm điều tri 1: 10 chuột nude mang khối UTĐT, hàng ngày được cho uống nước hòa tan bột của viên nang tỏi đen với liều tương ứng 1g/kg thể trong/ngày, được pha với thể tích 0,1ml/10g thể trọng. Chuôt đươc uống liên tục trong 4 tuần.

Nhóm điều tri 2: 10 chuôt nude mang khối UTĐT, hàng ngày được cho uống nước hòa tan bôt của viên nang tỏi đen với liều tương ứng 10g/kg thể trọng/ngày, đươc pha với thể tích 0,1ml/10g thể trọng. Chuột được uống liên tuc trong 4 tuần.

Theo dõi tốc độ phát triển khối u, thời gian sống, tỷ lệ sống chết của các nhóm.




Sơ đồ sử dụng tỏi đen trong điều tri ung thư đại tràng

### *2.5. Các chỉ tiêu theo dõi*

Tỷ lệ mọc khối u, kích thước khối u, thời gian sống trung bình. Thí nghiệm dừng ở thời điểm 70 ngày khi số lượng chuôt nhóm chứng chết vươt quá 50%.

### *2.6. Xử lý số liệu*

Các số liệu đươc phân tích bằng thuật toán non-parametric Mann-Whitney U-test, so sánh 2 số trung bình, bằng các phần mềm Statview, version 4.57. Khác biêt so sánh giữa các nhóm có ý nghĩa khi $p<0,05$.

## 3. Kết quả

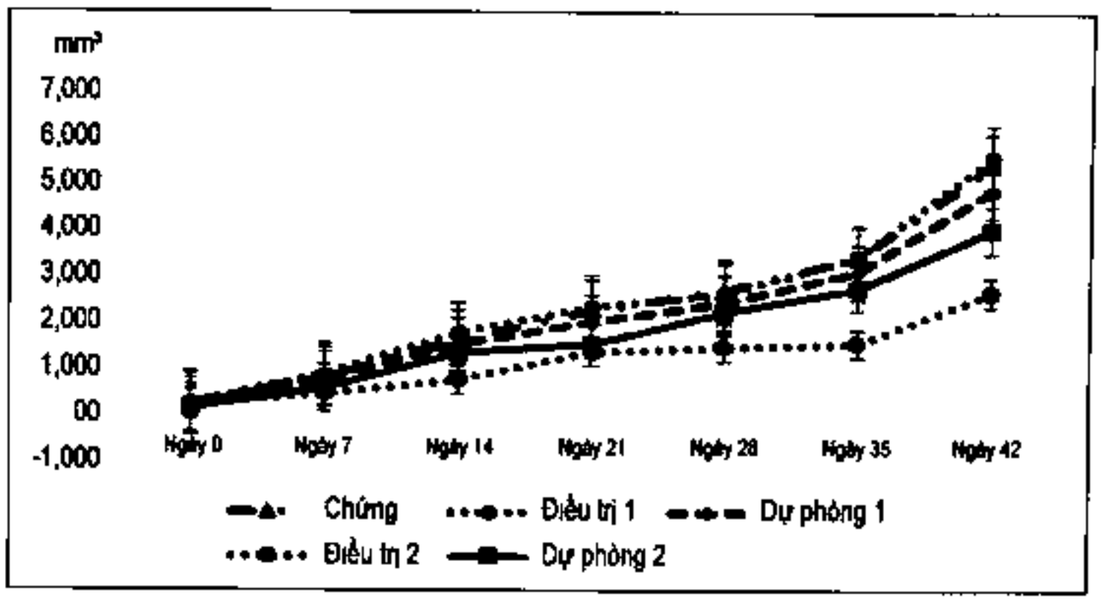
### *3.1. Tỷ lệ xuất hiện khối u đại tràng trên các nhóm chuột*

**Bảng 1. Tỷ lệ chuột có khối u HT- 29 của các nhóm chuột**

| | Số lượng (con) | Tỷ lệ (%) |
|---|---|---|
| Chứng (1) | 10 | 100 |
| Dự phòng 1 (2) | 10 | 100 |
| Dự phòng 2 (3) | 10 | 100 |
| Điều trị 1 (4) | 10 | 100 |
| Điều trị 2 (5) | 10 | 100 |

*Nhận xét:* Trong số chuột đươc ghép tế bào ung thư, các nhóm đều xuất hiện u, đat 100%. Không phát hiện thấy chuột không moc khối UTĐTT sau khi được uống tỏi đen dự phòng liên tục 1 tháng.

### *3.2. Kích thước khối u của các nhóm chuột*




**Hình 2.** Kích thước khối u đại tràng của các nhóm chuột.

*Nhận xét:* Kết quả cho thấy nhóm chuôt mang khối UTĐTT người đươc điều trị bằng tỏi đen với liều 10 g/kg/ngày có kích thước khối u nhỏ hơn rõ rệt so với nhóm chứng và các nhóm còn lại tính từ thời điểm ngày thứ 28 sau khi uống tỏi đen ($p<0,05$). Kích thước khối u của các nhóm chuôt vẫn tăng dần theo thời gian, đến ngày 42 thì có 1 chuột nhóm chứng chết. Từ ngày thứ 42, không có sự khác biệt về kích thước trung bình khối ung thư của các nhóm chuôt ($p>0,05$)

### *3.3. Thời gian sống trung bình của các nhóm chuột*

**Bảng 2. Thời gian sống trung bình của các nhóm chuột đến ngày 42**

| Thời gian sống (ngày) | Chứng (1) | Dự phòng 1 (2) | Dự phòng 2 (3) | Điều trị 1 (4) | Điều trị 2 (5) | p |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $\overline{X}$ | 60,5 | 65,2 | 68,2 | 64,2 | 65,7 | $p_{1-3}<0,05$ |
| SD | 7,9 | 6,8 | 3,6 | 7,8 | 6,7 | |

Thời gian sống trung bình của chuột đươc dự phòng bằng tỏi đen liều cao 10g/kg/ngày dài hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p<0,05$).

Thời gian sống trung bình của chuôt mang khối UTĐTT được điều trị bằng tỏi đen có xu hướng kéo dài hơn so với nhóm không được điều trị. Tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê.

## 4. Bàn luận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, uống tỏi đen để điều trị với liều 10g/kg/ngày kéo dài một tháng đối với chuột nude có tác dụng kìm hãm sự phát triển khối UTĐTT người về kích thước khối u. Đồng thời, uống dự phòng tỏi đen với liều 10 g/kg/ngày, kéo dài đáng kể thời gian sống của nhóm chuôt này so với nhóm chứng.

Các kết quả nghiên cứu *in vitro* trên dòng UTĐTT người đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế gây ung thư và hiệu quả điều trị gây chết tế bào bởi các sản phẩm chiết xuất từ tỏi. Trên tế bào UTĐTT người dòng HT-29, dẫn xuất DATS có tác dụng rất tốt, gây ức chế rõ rệt sư tăng sinh tế bào ung thư này. Bằng các thử nghiệm MTT, phân tích tế bào (flow cytometry) và semi-RT-PCR, Huang và cộng sự (2011) cho thấy có rất nhiều nhóm gen tăng hoặc giảm

biểu hiện sau khi tế bào được ủ với DATS. Mức độ tăng/giảm các biểu hiện gen này cũng liên quan tới liều và thời gian tiếp xúc của tế bào với dẫn xuất của tỏi [10]. Tương tự, Altonsy (2011) cũng khẳng đinh DATS gây chết tế bào ung thư bằng cơ chế apoptosis. Thử nghiệm cũng được tiến hành trên dòng tế bào UTĐTT người. Qua đó, tác giả khẳng định tác dung ức chế UTĐTT người HT-29 của DATS thông qua đổi chỗ protein xuyên màng tế bào, hoat hóa caspase-3 và caspase-9, hạn chế phân bào ở thời kỳ G2/M [3, 5].

Không chỉ có tác dụng *in vitro*, các hợp chất chiết từ tỏi cũng có tác dụng kháng ung thư, hạn chế sự di căn của ung thư; cũng như có tác dụng dự phòng và giảm nguy cơ mắc ung thư [9]. Dữ liệu thiết lập từ quần thể khu vực phía nam Châu Âu của Galeone C. và CS (2006) cho thấy mối liên quan nghịch giữa nhóm có tần suất sử dụng tỏi cao nhất và nhóm có tần suất sử dung tỏi thấp nhất với nguy cơ một số bệnh ung thư phổ biến [9]. Các phân tích tỷ suất chênh (odds ratio) cho các loại ung thư thường gặp liên quan đến việc sử dụng tỏi tương ứng là 0,61 cho ung thư miệng, vòm họng; 0,43 cho ung thư thực quản; 0,74 đối với UTĐTT; 0,56 đối với ung thư thanh quản, 0,90 cho ung thư vú; 0,78 cho ung thư buồng trứng; 0,81 đối với ung thư tuyến tiền liệt và 0,69 đối với ung thư thân [9].

## 5. Kết luận

Nghiên cứu tác dung dự phòng và điều trị của tỏi đen trên mô hình chuột thiếu hut miễn dịch mang khối UTĐTT người dòng HT-29 chúng tôi thu đươc kết quả sau: Nhóm chuôt mang khối UTĐTT người được điều trị bằng tỏi đen với liều 10 g/kg/ngày có kích thước khối u nhỏ hơn rõ rêt với nhóm chứng không đươc điều tri và so với các nhóm uống toi đen dự phòng ($p<0,05$). Thời gian sống thêm của chuột mang khối UTĐTT uống dự phòng tỏi đen 10g/kg/ngày kéo dài hơn rõ rệt so với nhóm chứng ($p<0,05$).

## Tài liệu tham khảo


1. Nguyễn Minh Chính, Nguyễn Văn Long, Đào Văn Đôn, Nguyễn Duy Thức (2011) *Nghiên cứu thành phần hoá học của tỏi Lý sơn (Allium saltivum L.)*. Tạp chí Y Dược học Quân sự, 21(2), tr. 91-95.
2. Vũ Bình Dương, Nguyễn Văn Long (2013) *Đánh giá tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen Lý Sơn trên đông vât thực nghiêm*. Tạp chí dược học, số 447, tr.24-28.
3. Altonsy MO, Andrews SC (2011) *Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29)*. Nutr Cancer 63(7): 1104-1113.
4. Danan Wang, Yonghui Feng, Jun Liu, Jianzhong Yan, Meiru Wang, Jin-ichi Sasaki, Changlong Lu (2010) *Black Garlic (Allium sativum) Extracts Enhance the Immune System*. Med. Aro. Plant. Sci Bio 4: 37-40.
5. Delshad AA, Heshmati M, Ghaini MH (2010) *Garlic Extract Can Induce Apoptotic Cell Death in The Human Colon Adenocarcinoma HT-29 Cell Line*. Iranian Journal of Pathology 5(3): 126-131.
6. El-Bayoumy K, Sinha R, Pinto JT, Rivlin RS (2006) *Cancer chemoprevention by garlic and garlic-containing sulfur and selenium compounds*. J Nutr 136(3 Suppl): 864-869.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010) *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer 127(12): 2893-2917.
8. Fleischauer AT, Arab L (2001) *Garlic and Cancer: A Critical Review of the Epidemiologic Literature*. J. Nutr 131: 1032-1040.
9. Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, Vecchia CL (2006) *Onion and garlic use and human cancer*. Am J Clin Nutr 84: 1027-1032.
10. Huang YS, Xie N, Su Q, Su J, Huang C, Liao QJ. (2011) *Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes*. Mol Med Report 4(3): 553-559.