

NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ GIỮA TÁC ĐỘNG KHÁNG PHÂN BÀO VÀ CẢM ỨNG APOPTOSIS (CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH) CỦA CÁC CHẤT CHIẾT TỰ NHIÊN TRÊN DÒNG TẾ BÀO HEP-2

Tất Tố Trinh ⁽¹⁾, Nguyễn Thụy Vy ⁽¹⁾, Nguyễn Hoài Nghĩa ⁽¹⁾, Lê Chí Thanh ⁽²⁾,
Trương Thị Xuân Liên ⁽²⁾, Hồ Huỳnh Thủy Dương ⁽¹⁾

(1) Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Viện Pasteur - Thành phố Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 29 tháng 03 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 01 năm 2008)

TÓM TẮT: Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định mối quan hệ giữa tác động kháng phân bào và apoptosis trên dòng tế bào ung thư thanh quản HEP-2 khi được xử lý với các chất chiết thực vật vinblastine, camptothecin và plumbagin. Kết quả khảo sát hàm lượng DNA theo thời gian xử lý cho thấy vinblastine ở nồng độ 0,004 $\mu\text{g/ml}$ sau 26 giờ xử lý thuốc gây kháng phân bào tại pha G_2/M , camptothecin 0,4 $\mu\text{g/ml}$ và plumbagin 10 $\mu\text{g/ml}$ gây kháng phân bào tại pha G_0/G_1 sau 12 giờ xử lý thuốc. Sau pha kháng phân bào, các tế bào HEP-2 được xử lý camptothecin, vinblastine và plumbagin chuyển sang apoptosis. Tốc độ của quá trình này phụ thuộc vào thời gian xử lý và nồng độ cảm ứng của tác nhân.

Từ khoá: Kháng phân bào, apoptosis, chất chiết tự nhiên, HEP-2.

1. TỔNG QUAN

Đặc tính quan trọng và phổ biến của một chất điều trị ung thư là khả năng cảm ứng apoptosis (chết theo chương trình) hoặc gây kháng phân bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định mối liên hệ giữa khả năng cảm ứng apoptosis và kháng phân bào của các chất chiết thực vật trên dòng tế bào ung thư HEP-2.

Dựa trên công trình nghiên cứu của Nguyễn Hoài Nghĩa và cộng sự [4], chu trình phân bào của HEP-2 kéo dài trong 22 giờ, trong đó pha G_0/G_1 kéo dài khoảng 10 giờ, pha S kéo dài khoảng 8 giờ, pha G_2/M kéo dài khoảng 4 giờ. Thông qua đó, chúng tôi lựa chọn thời điểm phân tích mẫu phù hợp để đánh giá tác động của các chất vinblastine, camptothecin và plumbagin trên dòng tế bào ung thư thanh quản HEP-2 bằng flow cytometry.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp nuôi tế bào

Chúng tôi nuôi dòng tế bào HEP-2 trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), Amphotericin B (0,025 $\mu\text{g/ml}$), Penicillin G (100 UI/ml), Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) và huyết thanh (10 %) ở 37°C, 5 % CO_2 .

2.2. Phương pháp đồng bộ hóa tế bào

Tế bào HEP-2 được nuôi cấy trong bình Roux trong môi trường 10% huyết thanh đến khi đạt độ phủ khoảng 70%. Thay môi trường không huyết thanh. Ủ tế bào ở 37°C, 5% CO_2 trong 24 giờ.

2.3. Phương pháp phân tích hàm lượng DNA của tế bào bằng flow cytometry

Thu dịch huyền phù tế bào (106 tế bào/ml). Cố định trong ethanol 70 %, giữ ở -20°C ít nhất 2 giờ. Ly tâm 300 g, 5 phút. Rửa cặn bằng PBS. Huyền phù cặn tế bào trong 1ml dung dịch nhuộm PI gồm PBS 1X, Triton X-100 (0,1 % v/v), RNase A (200 µg/ml), PI (20 µg/ml). Ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút. Phân tích bằng flow cytometry. Ghi nhận giá trị FL2 dưới dạng biểu đồ histogram.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Chúng tôi cảm ứng tế bào HEP-2 đã được đồng bộ hóa về pha G₀/G₁ với vinblastine ở nồng độ 0,004 µg/ml, camptothecin ở nồng độ 0,4 µg/ml và plumbagin ở nồng độ 10 µg/ml. Sau đó, chúng tôi tiến hành phân tích hàm lượng DNA của tế bào bằng flow cytometry để đánh giá tác động của hoạt chất.

3.1. Hệ quả của tác động kháng phân bào của vinblastin trên dòng tế bào HEP-2

Vinblastine là một alkaloid được chiết xuất từ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), được ứng dụng vào điều trị một số bệnh ung thư trên người. Cơ chế hoạt động của vinblastine là ức chế sự hình thành vi ống bằng cách gắn với protein tubulin, làm ngừng chu trình tế bào ở giai đoạn nguyên phân [3].

Qua phân tích trên flow cytometry, chúng tôi nhận thấy quần thể tế bào HEP-2 sau 12, 18 và 26 giờ ủ với vinblastine có khuynh hướng dồn về đỉnh G₂/M với tỉ lệ tăng dần: 29,28; 51,04; 53,77%. Trong khi đó, với mẫu không xử lý thuốc, sau 26 giờ quần thể tế bào HEP-2 tập trung ở đỉnh G₀/G₁ (hình 1, bảng 1). Kết quả cho thấy vinblastine gây kháng phân bào ở pha G₂/M trên dòng tế bào HEP-2 và phù hợp với các nghiên cứu trước đây [3].

Bảng 1. Tỉ lệ (%) tế bào HEP-2 trong pha G₀/G₁, S, G₂/M và apoptosis (sub-G₁) sau 12, 18, 26, 48 giờ cảm ứng với vinblastin ở nồng độ 0,004 µg/ml được xác định bằng flow cytometry

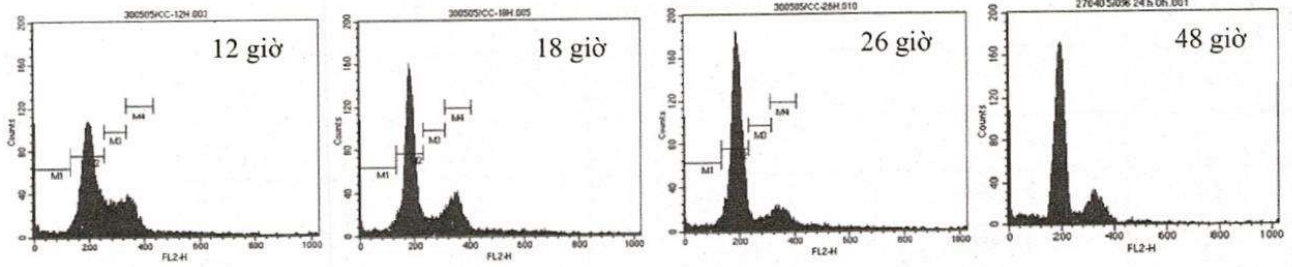
Thời điểm khảo sát (giờ)	% Tế bào ở các pha của chu trình phân bào			
	%sub- G ₁	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
12	9,82	32,44	20,27	29,28
18	9,69	18,72	13,72	51,04
26	22,43	4,09	5,66	53,77
48	34,04	12,94	12,40	18,71

Ở thời điểm 48 giờ, tỉ lệ tế bào ở G₂/M giảm xuống còn 18,71% và ở sub-G₁ tăng lên 34,04 %. Điều này chứng tỏ sau một thời gian bị ngừng phân bào, tế bào sẽ khởi phát quá trình apoptosis. Vậy với vinblastine ở nồng độ 0,004 µg/ml, apoptosis là hệ quả của tác động kháng phân bào tại M.

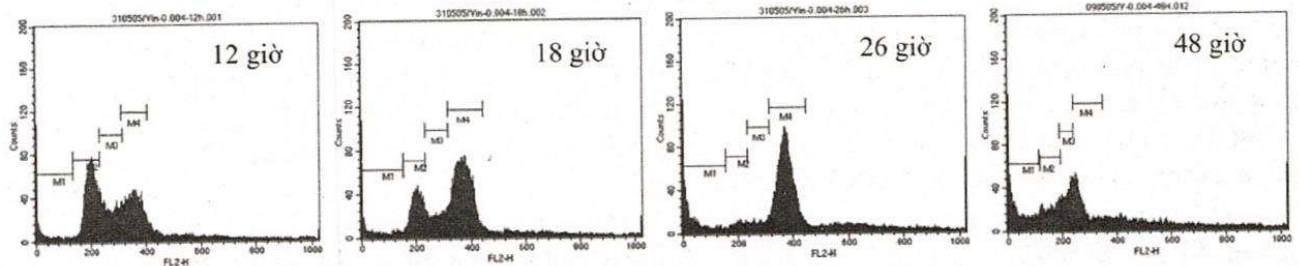
3.2. Hệ quả của tác động kháng phân bào của camptothecin trên dòng tế bào HEP-2

Camptothecin là một alkaloid được chiết xuất từ cây *Camptotheca acuminata* vào năm 1966 nhưng mãi đến năm 1985 thì cơ chế tác động của camptothecin mới được xác định. Enzym topoisomerase I được xem là phân tử mục tiêu của camptothecin. Hiện nay, một số dẫn xuất của camptothecin (Topotecan, Irinotecan) đã được đưa vào điều trị lâm sàng các bệnh ung thư như ung thư vú, buồng trứng, phổi và ruột [1].

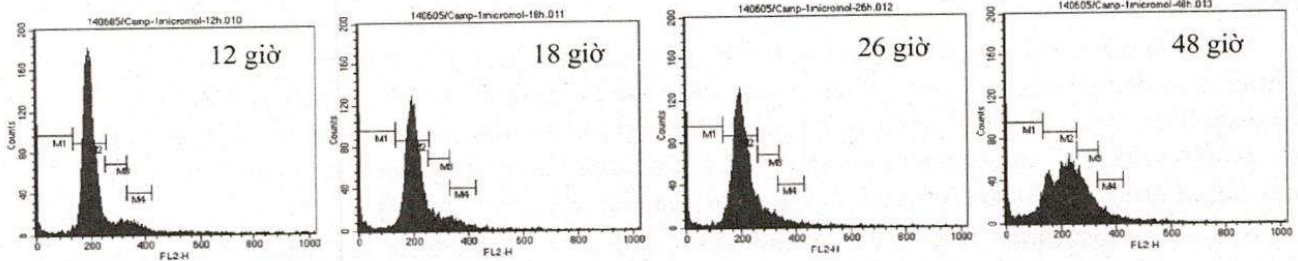
KHÔNG XỬ LÝ



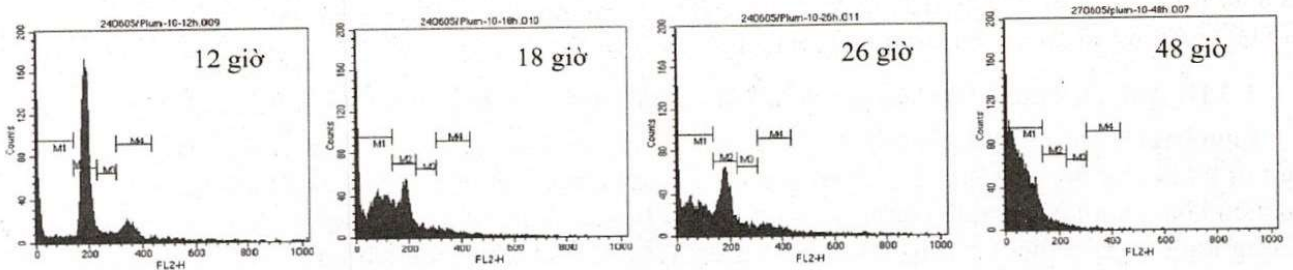
VINBLASTINE 0,004 µg/ml



CAMPTOTHECIN 0,4 µg/ml



PLUMBAGIN 10 µg/ml



Hình 1. Kết quả phân tích hàm lượng DNA của quần thể tế bào HEP-2 không xử lý thuốc, xử lý với vinblastine 0,004 µg/ml, camptothecin 0,4 µg/ml và plumbagin 10 µg/ml bằng flow cytometry. Vùng M2: tế bào ở pha G₀/G₁, M3: tế bào ở giai đoạn S, M4: tế bào ở pha G₂/M có hàm lượng DNA gấp đôi hàm lượng DNA của tế bào ở G₀/G₁, M1: tế bào apoptosis có hàm lượng DNA bị thất thoát, các thể apoptosis, mảnh vỡ tế bào.

Bảng 2. Tỷ lệ (%) tế bào HEP-2 trong pha G₀/G₁, S, G₂/M và apoptosis (sub-G₁) sau 12, 18, 26, 48 giờ cảm ứng với camptothecin ở nồng độ 0,4 µg/ml được xác định bằng flow cytometry

Thời điểm khảo sát (giờ)	% Tế bào ở các pha của chu trình phân bào			
	%sub- G ₁	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
12	7,37	79,41	6,92	4,73
18	20,00	66,00	8,31	4,44
26	11,96	73,13	9,08	3,67
48	20,48	49,73	20,80	5,74

Kết quả phân tích trên flow cytometry cho thấy camptothecin ở nồng độ 0,4 µg/ml làm ngừng phân bào ở pha G₀/G₁. Sau 12 giờ khảo sát, tế bào ở pha G₀/G₁ chiếm tỷ lệ cao nhất trong quần thể, trong khi quần thể tế bào không xử lý thuốc đã đi vào pha S. Tỷ lệ này gần như không đổi ở quần thể tế bào xử lý với camptothecin tại 26 giờ sau đó, nghĩa là tế bào đã không trải qua được giai đoạn sao chép DNA (hình 1, bảng 2).

Enzyme topoisomerase I có chức năng tháo xoắn DNA bằng việc cắt một trong hai mạch và sau đó nối lại chỗ đứt. Trong quá trình sao chép DNA, camptothecin khi liên kết với enzyme topoisomerase I sẽ ức chế quá trình nối, tạo ra sự đứt gãy DNA trên cả hai mạch tại chạc ba sao chép và dẫn đến sự chết của tế bào [1]. Do đó, camptothecin là một tác nhân gây kháng phân bào tại pha S và tại nồng độ thấp hơn sẽ gây dừng phân bào tại pha G₂/M.

Nồng độ camptothecin 0,4 µg/ml sử dụng trong thí nghiệm này có thể cao đối với tế bào HEP-2, dẫn đến sự đứt gãy DNA nhanh chóng và nhiều ngay khi bắt đầu sao chép. Do đó, khi khảo sát hàm lượng DNA bằng flow cytometry, tế bào không dừng phân bào ở S như lý thuyết mà dừng ở G₀/G₁. Camptothecin với nồng độ 1 µM cũng làm ngừng chu trình phân bào của tế bào ung thư ruột HCT116 ở G₁ theo nghiên cứu của Gupta và cộng sự [2].

Sau 48 giờ cảm ứng, tỷ lệ tế bào ở đỉnh sub-G₁ tăng cao, ở G₀/G₁ giảm mạnh so với thời điểm khảo sát lúc 12, 18, 26 giờ (bảng 2). Điều này chứng tỏ sau quá trình dừng phân bào, tế bào sẽ khởi phát con đường apoptosis, DNA bị phân cắt đặc hiệu, làm tỷ lệ tế bào ở sub-G₁ trên biểu đồ histogram tăng. Vậy trên dòng tế bào HEP-2, camptothecin 0,4 µg/ml gây kháng phân bào tại G₀/G₁ và hệ quả cuối cùng là apoptosis.

3.3. Hệ quả của tác động kháng phân bào của plumbagin trên dòng tế bào HEP-2

Plumbagin là một hoạt chất được chiết xuất từ cây bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L.), một vị thuốc thường thấy trong các bài thuốc y học cổ truyền chữa trị ung thư. Plumbagin cho thấy có khả năng kháng nhiều dòng tế bào ung thư trong những phương pháp in vitro và trong những khối u ghép qua Chương trình phát triển Trị liệu của Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI). Tuy nhiên, cơ chế tác động của plumbagin lên mô hình tế bào ung thư in vitro đến nay vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Một số tài liệu cho rằng plumbagin có thể tạo một số các gốc oxy hóa, gây tổn thương tế bào và khởi phát quá trình apoptosis [6].

Bảng 3. Tỷ lệ (%) tế bào HEp-2 trong pha G₀/G₁, S, G₂/M và apoptosis (sub-G₁) sau 12, 18, 26, 48 giờ cảm ứng với plumbagin ở nồng độ 10 µg/ml được xác định bằng flow cytometry

Thời điểm khảo sát (giờ)	% Tế bào ở các giai đoạn của chu trình phân bào			
	%sub- G ₁	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
12	27,73	53,63	5,55	9,75
18	65,04	24,68	4,84	4,19
26	57,39	27,97	5,78	6,73
48	93,28	5,49	1,02	0,34

Phân tích flow cytometry cho thấy plumbagin làm ngừng chu trình phân bào tại pha G₀/G₁. Ở nồng độ khảo sát 10 µg/ml, sau 12 giờ cảm ứng, quần thể tế bào vẫn ở pha G₀/G₁, trong khi tế bào không xử lý thuốc đã đi vào pha S chứng tỏ plumbagin có tác dụng kháng phân bào ở pha G₀/G₁ (hình 1). Ở những thời điểm khảo sát sau đó, quần thể tế bào đi vào quá trình apoptosis với tỷ lệ sub-G₁ tăng dần (bảng 3). Tốc độ cảm ứng apoptosis của plumbagin ở nồng độ 10 µg/ml khá nhanh. Sau 48 giờ khảo sát, gần như toàn bộ quần thể tế bào đã đi vào giai đoạn muộn của quá trình apoptosis (93,28%) với DNA của tế bào bị phân cắt đặc hiệu hoàn toàn.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng kỹ thuật flow cytometry phân tích hàm lượng DNA của tế bào HEp-2 được xử lý với vinblastine 0,004 µg/ml, camptothecin 0,4 µg/ml và plumbagin 10 µg/ml, chúng tôi đã xác định được apoptosis là hệ quả của tác động kháng phân bào của các hoạt chất này. Tế bào HEp-2 sau một thời gian bị ngừng chu trình phân bào sẽ bước vào quá trình apoptosis. Tốc độ apoptosis tùy thuộc từng tác nhân và nồng độ cảm ứng. Như vậy, một hoạt chất có khả năng kháng phân bào dù ở pha nào thì với nồng độ thích hợp sẽ dẫn đến apoptosis, mục tiêu của hóa trị liệu ung thư.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY AND APOPTOSIS INDUCTION OF PLANT-DERIVED AGENTS ON HEp-2 CANCER CELL LINE

Tat To Trinh ⁽¹⁾, Nguyen Thuy Vy ⁽¹⁾, Nguyen Hoai Nghia ⁽¹⁾, Le Chi Thanh ⁽²⁾,
Truong Thi Xuan Lien ⁽²⁾, Ho Huynh Thuy Duong ⁽¹⁾

(1) University of Natural Sciences, VNU-HCM

(2) Pasteur Institute – Ho Chi Minh City

ABSTRACT: We investigated the relationship between anti-proliferative activity and apoptosis induction of plant-derived agents such as vinblastine, camptothecin, and plumbagin on HEp-2 cancer cell line. Analysis of cellular DNA content at different incubation time showed that vinblastine of 0.004 µg/ml caused cell-cycle arrest at G₂/M phase after 26-hour

incubation, camptothecin of 1 $\mu\text{g/ml}$ and plumbagin of 10 $\mu\text{g/ml}$ caused cell-cycle arrest at G_0/G_1 phase after 12-hour incubation. Flow cytometric analysis showed that after specific cell-cycle arrest phases, HEP-2 cells treated with vinblastine, camptothecin, and plumbagin went through apoptotic process. This process depends on drug concentration and incubation time.

Key words: Antiproliferation, HEP-2, medicinal plants, apoptosis

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Carbonero, R.C., Supko, J.G. *Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins*. Clinical Cancer Research 8, 641-661 (2002).
- [2]. Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K.W., O'Connor, P.M., Pommier, Y. *Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells*. Clinical Cancer Research 3, 1653-1660 (1997).
- [3]. Jordan, M.A., Wilson, L., *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Review 4, 253-265 (2004).
- [4]. Nguyen, H.N., Tran, K.H., Tat, T.T., Le, C.T., Nguyen, T.V., Nguyen, D.Q., Truong, T.X.L., Ho, H.T.D. *Some methods for investigation of cytotoxic activities of natural compounds*. First International Conference on Development of Biomedical Engineering in Vietnam 2005.
- [5]. Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Dobrucki, J., Hyun, W.C., Orfao, A., Rabinovitch, P.S. *Current Protocols in Flow Cytometry*, Vol 2. John Wiley & Sons, Inc (1997).
- [6]. Srinivas, P., Gopinath, G., Banerji, A., Dinakar, A., Srinivas G. *Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells*. Molecular Carcinogenesis 40, 201-211 (2004).