

# XÂY DỰNG QUY TRÌNH SÀNG LỌC NHỮNG HOẠT CHẤT THỰC VẬT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG PHÂN BÀO

Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Lê Xuân Trường, Nguyễn Kim Phi Phụng, Hồ Huỳnh Thùy Dương  
 Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp. HCM  
 (Bài nhận ngày 06 tháng 5 năm 2003, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 24 tháng 7 năm 2003)

**TÓM TẮT:** Chúng tôi xây dựng một quy trình nhằm sàng lọc và xác định hoạt tính kháng phân bào của chất chiết thực vật. Quy trình gồm hai bước: (1) sàng lọc thông qua khảo sát độc tính trên *Artemia salina*, (2) xác định tính kháng phân bào trên các dòng tế bào ung thư người nuôi cấy. Quy trình áp dụng trên hai chất gossypol và plumbagin cho thấy kết quả phù hợp ở hai bước và có thể được sử dụng để phát hiện hiệu quả một số lượng lớn các hoạt chất kháng phân bào.

## Đặt vấn đề

Ung thư là một trong những bệnh phổ biến và có tỷ lệ gây tử vong cao trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Đây là dạng bệnh lý liên quan đến những rối loạn trong quá trình điều hòa sự phân chia tế bào ở các mô trong cơ thể.

Nguyên nhân và cơ chế gây ung thư rất phức tạp và đa dạng nên việc hiểu rõ chúng hiện vẫn là vấn đề nan giải của y học. Do đó việc tìm kiếm những hoạt chất kháng ung thư mới là vấn đề rất được quan tâm trên thế giới hiện nay.

Việt Nam là một nước nhiệt đới có nguồn tài nguyên cây thuốc phong phú, trong đó có thể có nhiều cây thuốc chứa các hoạt chất kháng ung thư. Để có thể khai thác một cách có hiệu quả nguồn tài nguyên cây thuốc này cần phải có một quy trình xác định hoạt tính kháng phân bào *in vitro* của hoạt chất bao gồm những thử nghiệm nhạy và chính xác từ thô đến tinh. Việc xây dựng quy trình này sẽ cho phép tiến hành sàng lọc một lượng lớn hoạt chất thiên nhiên đồng thời đánh giá tương đối chính xác khả năng tác động của chúng lên tế bào ung thư.

Chúng tôi phát triển một quy trình thử nghiệm để xác định hoạt tính kháng phân bào của hoạt chất thiên nhiên qua hai giai đoạn:

- Giai đoạn I: sàng lọc thô độc tính của hoạt chất trên mô hình *Artemia salina*.
- Giai đoạn II: xác định hoạt tính kháng phân bào của hoạt chất trên tế bào ung thư của người nuôi cấy *in vitro*.

## Vật liệu – Phương pháp

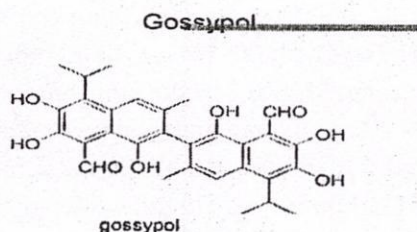
### 1. Vật liệu:

#### 1.1. Hoạt chất:

Trong đề tài này chúng tôi sử dụng hai hoạt chất chiết xuất từ thực vật là gossypol và plumbagin làm đối tượng nghiên cứu.

Gossypol là một sắc tố vàng, loại polyphenol, có độc tính, được chiết xuất từ hạt cây bông *Gossypium hirsutum*, họ *Malvaceae*, có nhiệt độ nóng chảy là 182°C.

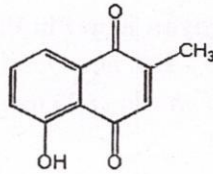
Công thức hóa học:





Plumbagin là tinh thể màu vàng cam, hình kim, nhiệt độ nóng chảy 77 – 78°C, được chiết xuất từ rễ cây bạch hoa xà *Plumbago zeylanica*, họ *Plumbaginaceae*.

Công thức hóa học:



### 1.2. Các dòng tế bào ung thư:

Chúng tôi sử dụng hai dòng tế bào ung thư ở người: dòng tế bào ung thư cơ RD (Rhabdomyosarcoma) và dòng tế bào ung thư biểu bì HEP2 (Epidermoid carcinoma).

### 1.3. Artemia:

Chúng tôi sử dụng trứng artemia (*Artemia salina*) thương phẩm do nhà máy Vĩnh Châu (Bạc Liêu, Việt Nam) sản xuất.

## 2. Phương pháp:

### 2.1. Phương pháp xác định độc tính của hoạt chất trên artemia (Microwell Cytotoxicity Assay): [1]

- Ương trứng artemia: cho trứng vào dung dịch NaCl 3%, sục khí trong vòng 24 đến 48 giờ trứng, sẽ nở thành con artemia.
- Chuyển artemia trong môi trường NaCl 3% vào các giếng của đĩa 96 giếng (15-30 con/giếng).
- Bổ sung hoạt chất ở nhiều nồng độ khác nhau vào các giếng có artemia, đồng thời thực hiện lô đối chứng không có hoạt chất.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.
- Đếm số lượng artemia chết (không di động) trong các giếng bằng kính lúp. Bổ sung vào mỗi giếng 100 µl methanol để giết chết toàn bộ artemia, đếm tổng số artemia có trong giếng. Tính tỷ lệ % số artemia chết trong mỗi giếng qua đó đánh giá được độc tính của hoạt chất.

Số artemia chết trong giếng

$$\text{Tỷ lệ artemia chết(\%)} = \frac{\text{Số artemia chết trong giếng}}{\text{Tổng số artemia}} \times 100\%$$

### 2.2. Xác định hoạt tính kháng phân bào của hoạt chất lên tế bào ung thư nuôi cấy bằng phương pháp MTT (MTT Assay): [2]

Phương pháp MTT dựa trên sự chuyển chất MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) thành MTT-formazan có màu xanh tím bởi enzyme hô hấp ở ti thể của tế bào. Số lượng tế bào sống tỉ lệ thuận với nồng độ formazan, thể hiện qua giá trị mật độ quang (OD<sub>570</sub>) của dung dịch.

- Tế bào được nuôi cấy trong môi trường EMEM có chứa glutamine, penicillin, streptomycin, HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, phenol red, pH 7.2, bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS: Foetal Bovine Serum). Ủ ở 37,5 °C.

- Sau một thời gian nuôi cấy, tế bào được tách bằng trypsin/EDTA và được cấy vào plate 24 giếng; mỗi giếng gồm 100µl dịch huyền phù tế bào và 400µl môi trường.

- Tế bào được ủ ở 37,5°C trong 24 giờ. Sau đó môi trường cũ được thay bằng môi trường chứa gossypol với nồng độ 0,1µg/ml - 20µg/ml hoặc plumbagin với nồng độ 0,1µg/ml - 2µg/ml đối với dòng tế bào RD và 0,1µg/ml - 10µg/ml đối với dòng tế bào HEP2. Lô đối chứng được xử lý với môi trường chứa dung môi hòa tan hoạt chất là DMSO. Các lô được ủ 72 giờ ở 37,5 °C.



- Sau thời gian ủ, môi trường có chứa hoạt chất được thay bằng môi trường chứa 0,5 mg/ml MTT. Sau 4 giờ ở 37,5 °C, môi trường chứa MTT được thay bằng hỗn hợp isopropanol-HCl (0,04M). Đo OD<sub>570</sub> của các lô thí nghiệm và đối chứng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần. Khả năng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư của hoạt chất được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế (\%)} = \frac{\text{OD}_{570} \text{ đối chứng} - \text{OD}_{570} \text{ thí nghiệm}}{\text{OD}_{570} \text{ đối chứng}} \times 100\%$$

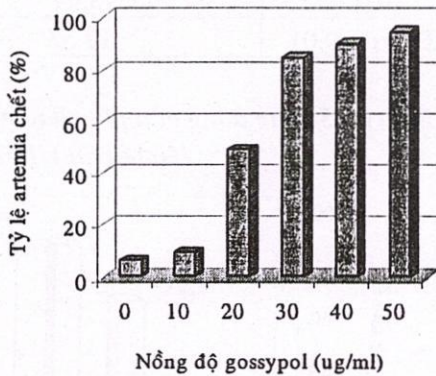
**Kết quả – Biện luận:**

**1. Sàng lọc thô độc tính của hoạt chất trên mô hình artemia (*Artemia salina*):**

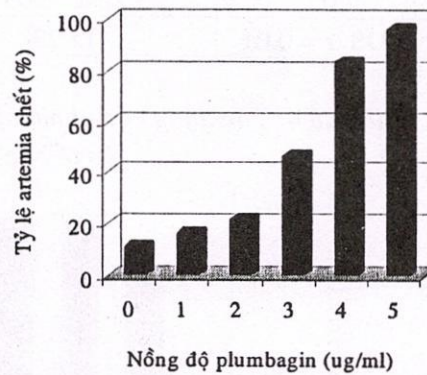
*Bảng 1: Tác động của gossypol và plumbagin lên artemia*

Nồng độ gossypol (µg/ml)	Tỷ lệ artemia chết (%)	Nồng độ plumbagin (µg/ml)	Tỷ lệ artemia chết (%)
0	6.16 ± 6.46 <sup>E</sup>	0	11.37 ± 9.75 <sup>E</sup>
10	9.34 ± 8.78 <sup>E</sup>	1	14.72 ± 11.12 <sup>E</sup>
20	49.22 ± 22.4 <sup>D</sup>	2	21.75 ± 10.21 <sup>D</sup>
30	85.11 ± 14.44 <sup>C</sup>	3	46.90 ± 20.75 <sup>C</sup>
40	90.29 ± 16.67 <sup>B</sup>	4	84.66 ± 13.79 <sup>B</sup>
50	95.09 ± 9.77 <sup>A</sup>	5	97.07 ± 7.07 <sup>A</sup>
LDS α = 0.01	4.76	LDS α = 0.01	4.76

*Biểu đồ 1: Tác động của gossypol lên artemia salina*



*Biểu đồ 2: Tác động của plumbagin lên artemia salina*



**2. Tác động của hoạt chất lên tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*:**

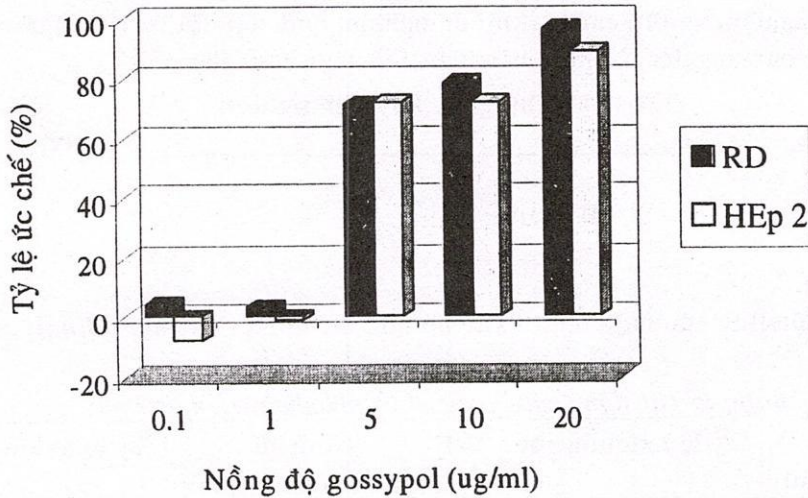
**2.1. Gossypol:**

*Bảng 2: Tác động của gossypol lên hai dòng tế bào RD và Hep2*

Nồng độ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế phân bào (%)	
	RD	HEp2
0.1	4.56 ± 10.52 <sup>C</sup>	-7.94 ± 4.88 <sup>C</sup>
1	3.52 ± 5.06 <sup>C</sup>	-1.28 ± 6.81 <sup>C</sup>
5	71.47 ± 16.86 <sup>B</sup>	72.14 ± 13.48 <sup>B</sup>
10	78.68 ± 19.17 <sup>B</sup>	72.14 ± 10.02 <sup>B</sup>
20	97.21 ± 2.7 <sup>A</sup>	89.1 ± 8.62 <sup>A</sup>
LDS α = 0.01	13.74	10.06



Biểu đồ 3: Tác động của gossypol lên hai dòng tế bào RD và Hep2

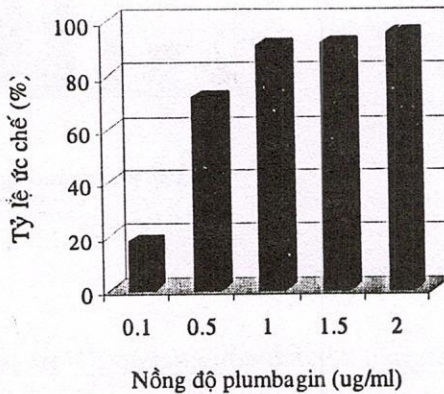


2.2. Plumbagin

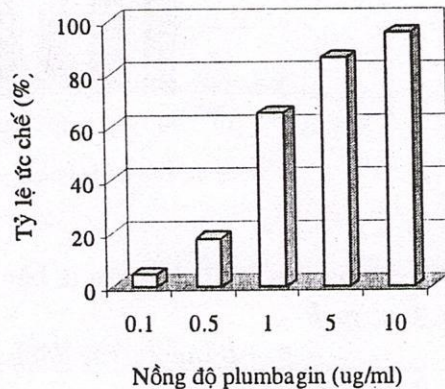
Bảng 4: Tác động của plumbagin lên tế bào RD và HEp2

Nồng độ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế phân bào RD (%)	Nồng độ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế phân bào HEp2 (%)
0.1	17.69 ± 21.27 <sup>C</sup>	0.1	4.36 ± 14.55 <sup>D</sup>
0.5	71.46 ± 10.12 <sup>B</sup>	0.5	17.81 ± 19.49 <sup>C</sup>
1.0	90.75 ± 3.3 <sup>B</sup>	1.0	65.07 ± 9.64 <sup>B</sup>
1.5	91.45 ± 2.11 <sup>A</sup>	5.0	85.38 ± 6.34 <sup>A</sup>
2.0	95.26 ± 3.03 <sup>A</sup>	10.0	94.59 ± 3.94 <sup>A</sup>
LDS α = 0.01	11.73	LDS α = 0.01	12.53

Biểu đồ 4: Tác động của plumbagin lên tế bào RD



Biểu đồ 5: Tác động của plumbagin lên tế bào HEp2



Những kết quả thu được cho thấy cả gossypol và plumbagin đều có tác động trên mô hình artemia (*Artemia salina*) cũng như trên mô hình tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*, điều này phù hợp với kết quả của những nghiên cứu trước đây về hoạt tính của hai hoạt chất này. [3,4]

Trên cả hai mô hình thí nghiệm, kết quả đều cho thấy plumbagin có hoạt tính mạnh hơn gossypol thể hiện qua:

-Trên artemia: nồng độ plumbagin gây chết gần như 100% artemia là 5 µg/ml so với gossypol là 50 µg/ml, vậy plumbagin có độc tính gấp 10 lần gossypol.



-Trên tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*: nồng độ plumbagin ức chế gần như 100% tế bào ung thư là 2  $\mu\text{g/ml}$  với RD và 10  $\mu\text{g/ml}$  với HEp2 so với gossypol là 20  $\mu\text{g/ml}$ , kết quả cũng cho thấy plumbagin có hoạt tính gấp 10 lần gossypol (nhất là với RD)

Như vậy có sự tương ứng cao giữa các kết quả thu được từ phương pháp xác định độc tính trên artemia và phương pháp MTT xác định hoạt tính kháng phân bào trên tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*. Điều đó cho thấy thử nghiệm với *Artemia salina* phản ánh trung thực khả năng kháng phân bào của hoạt chất và có thể sử dụng như một phương pháp sàng lọc ban đầu.

### Kết luận

Quy trình sàng lọc qua hai giai đoạn được xây dựng trong đề tài của chúng tôi có thể ứng dụng rộng rãi nhằm mục đích xác định hoạt tính kháng phân bào của một lượng lớn hoạt chất thực vật, từ đó có thể xác định những hoạt chất có hoạt tính mạnh để tiếp tục tiến hành các nghiên cứu sâu hơn.

## SET UP A SCREENING PROTOCOL FOR ANTIMITOTIC ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS

Nguyen Dang Quan, Nguyen Le Xuan Truong, Nguyen Kim Phi Phung, Ho Huynh Thuy Duong

**ABSTRACT:** We set up a protocol to screen and determine antimitotic activities of plant extracts. The two-step protocol consists of: (1) screening of active substances through cytotoxic effect in *Artemia salina*, (2) antimitotic effect determination on human tumour cell lines. Applied on two plant substances, gossypol and plumbagin, the protocol shows close relationship between results obtained in the two steps and could be used to efficiently detect antimitotic substances.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Soils, P.N., Wright, C.W., Anderson, A.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. (1993) A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* 59, 250-252
2. Xin Lin, Wen Kui Li, Pei gen Xiao. 1999. Effects of Icariside II from *Epimedium koreanum* on tumour cell lines *in vitro*. - *Pharm. Pharmacol. Commun.* 5:701-703
3. Uma Devi, F.E. Solomon, A.C. Sharada. 1999. Plumbagin, a plant naphthoquinon with antitumor and radiomodifying properties. *Pharmaceutical biology*. 3:231-236.
4. <http://www.med.cornell.edu/gradschool/fac/reidenberg.html>.