

experimentally obese mice treated with alcohol fractions than those treated with other fractions. Particularly, body weight was reduced by 8.7% and blood cholesterol, triglycerid by 0.5mmol/l, and 0.3mmol/l, respectively (in comparison with the normal diet fed mice). Note-worthy was the hypoglycemic effects of the alcohol fractions were obviously better (1.8mmol/l).

Tài liệu tham khảo

1. Tạ Văn Bình, Những nguyên lý, nền tảng bệnh đái tháo đường - tăng glucose máu, NXB Y học, Hà Nội (2007)
2. Võ Văn Chí, Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội (1999)
3. Nguyễn Thị Hà, Hóa học lipid, Hóa sinh, NXB Y học, Hà Nội (2001)
4. Nguyễn Đức Hoan, Một số hiểu biết về bệnh béo phì và điều trị béo phì, Công trình nghiên cứu Y học Quân Sự, Học viện Quân y, (2002) số 4: 51-63.
5. Nguyễn Công Khẩn, Thừa cân-béo phì và một số yếu tố liên quan ở người trưởng thành Việt Nam từ 25 đến 64 tuổi, Chiến lược quốc gia về dinh dưỡng giai đoạn 2001-2010, NXB Y học, Hà Nội (2007)
6. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Khoa học Kỹ thuật (2000)
7. Trần Thị Chi Mai, Nghiên cứu tác dụng của

polyphenol chè xanh (*Camellia sinensis*) trên các chỉ số lipid và trạng thái chống oxy hóa trong máu chuột công trạng đái tháo đường thực nghiệm. *Luận án Tiến sĩ Y học* (2007)

8. Deurenberg Y.M., Chew S.K., Lin F.P., and Deurenberg P., Relationships between indices of obesity and its co-morbidities among Chinese, Malays and Indians in Singapore and their influence on cardiovascular risk factors in body composition. *PhD thesis* (2000)

9. Fujioka K., Greenway F., Sheard J., Ying Y., The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome. *J. Medicinal Food*, (2006) 9(1): 49-54.

10. Klein G., Kim J., Himmeldirk K., Cao Y., and Chen X., Antidiabetes and Anti-obesity Activity of *Lagerstroemia speciosa*. *Evid Based Complement Alternat Med* (2007) 4(4): 401-407

11. Srinivasan K., Viswanad B., Kaul C.L., Ramarao P., Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol. Res* (2005) 52: 313-320.

12. Suzuki Y., Unno T., Ushitani M., Hayashi K., Kakuda T., Antiobesity activity of extracts from *Lagerstroemia speciosa* L, leaves on female KK-Ay mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (1999) 45 (6): 791-795.

Nghiên cứu khả năng ức chế sự phát triển một số dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro* của các phân đoạn tách chiết từ mô sẹo cây cúc áo hoa vàng (*Spilanthes acmella* (L) Murr.)

Nguyễn Thị Nga¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Nguyễn Thị Trang¹,
Đỗ Thị Phương¹, Mai Sỹ Tuấn², Mai Thị Hằng²,
Đào Thị Hải Lý², Đỗ Thị Thảo¹

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

²Khoa Sinh học, Trường đại học Sư phạm Hà Nội

Mở đầu

Trong những năm gần đây, nhiều loài thực vật thường sử dụng trong các bài thuốc dân gian đã được nghiên cứu và trở thành nguồn

nguyên liệu quý cho ngành dược phẩm. Trong đó, cúc áo hoa vàng (*Spilanthes acmella* (L.) Mur.) hay còn gọi là củồng trầm, cúc lác... cũng được nghiên cứu nhiều trên phương diện là loại

dược liệu có khả năng chữa bệnh về răng lợi. Bên cạnh đó, đây là một vị thuốc có tác dụng diệt khuẩn, chữa thấp khớp, chống muỗi [3, 7]. Một số thành phần của cây được bổ sung vào mỹ phẩm nhằm mục đích sắp xếp lại và tăng cường mạng lưới collagen để chống nhăn và chống lão hóa [2, 6]. Tuy nhiên trong quá trình thu thập dược liệu nói chung và cây cúc áo hoa vàng nói riêng thì hàm lượng các chất có hoạt tính trong thảo dược bị phụ thuộc nhiều vào địa điểm và thời gian thu mẫu. Vì thế, phương pháp nuôi cấy mô thực vật đã giải quyết được vấn đề trên, giúp chủ động trong việc tạo nguồn dược liệu có giá trị. Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành nuôi cấy mô cây cúc áo hoa vàng để có được nguồn nguyên liệu ổn định cho nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết từ mô nuôi cấy này vẫn giữ được khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa và diệt muỗi tương tự cây tự nhiên. Đồng thời, dịch chiết thô tách chiết từ mô sẹo cây cúc áo hoa vàng cũng cho thấy hoạt tính với tế bào ung thư phổi nuôi cấy *in vitro*. Kết quả này đã thúc đẩy chúng tôi nghiên cứu sâu hơn về khả năng chống ung thư của các phân đoạn tách chiết từ dịch chiết thô của mô sẹo cây cúc áo hoa vàng trong một số dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết và phân đoạn dịch chiết thô của mô sẹo cây cúc áo hoa vàng

- **Thu cận chiết:** Mô sẹo được làm khô đến khối lượng không đổi, lấy 150g nghiền nhỏ và ngâm nhiều lần với methanol ở nhiệt độ phòng đến khi dịch chiết nhạt màu, sau đó đem cất dịch chiết để loại dung môi dưới áp suất giảm nhằm thu cận chiết. Cận chiết này được chiết lần lượt bằng dung môi có độ phân cực tăng dần (ethyl acetat, methanol). Các dịch chiết được làm khan bằng Na_2SO_4 , lọc rồi cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, cận được sấy khô và cân đến khối lượng không đổi.

- **Phương pháp phân đoạn và tách chất:** Phân đoạn và tách chất bằng sắc ký cột, sử dụng silicagel Merck 60, cỡ hạt 70 - 230 mesh (0,040 - 0,063 nm) và 230-400 mesh (0,063 đến 0,200 nm), các cột sắc ký có độ dài (d) và đường kính (ϕ) từ lớn đến nhỏ để phân lập được các hợp chất có độ tinh khiết cao nhất: (ϕ : 4,0cm, d: 80cm; ϕ : 2,5cm, d: 70cm; ϕ : 2,0cm, d: 50cm), rửa giải cột bằng hệ dung môi clorofom- methanol có tỷ lệ tăng dần từ 0-100%.

Dịch rửa giải thoát ra từ cột được thu ở những khoảng cách nhỏ (5-10ml/phần đoạn).

- **Kiểm tra các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng** để nhôm tráng sẵn Kieselgel 60F₂₅₄ độ dày 0,2 mm (hãng Merck) với các hệ dung môi: n-Hexan : EtOAc (2 : 1), cloroform : methanol (7:1), cloroform: methanol (5: 1). Bản sắc ký lớp mỏng được soi dưới đèn tử ngoại ở 254 nm rồi phun thuốc thử vanilin - H_2SO_4 5% và sấy ở trên 100°C hoặc dùng thuốc thử I_2 để hiện vết trên bản mỏng, phát hiện các hợp chất. Các phân đoạn giống nhau được dồn lại rồi đem cất loại dung môi thu chất rắn bằng máy cất quay chân không.

Phương pháp nuôi cấy tế bào

Các dòng tế bào LƯ-1 (ung thư phổi ở người), MCF7 (ung thư vú ở người), HepG2 (ung thư gan ở người), LNCaP (ung thư tiền liệt tuyến ở người) và Vero được mua từ ngân hàng tế bào ATCC.

Các loại tế bào được nuôi cấy trong môi trường thích hợp với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 1,5 g/L sodium bicarbonat, 4,5 g/L glucose, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvat, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO).

Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 .

Phương pháp thử độc tế bào

Phép thử độc tính được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991)^[4, 5]. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất, nhuộm bằng sulforhodamine B (SRB) và đo hàm lượng protein tổng số ở bước sóng 515 nm bằng máy Microplate Reader (BioRad). Nồng độ các chất ở các giếng thí nghiệm: Chất E5, E7, M2: 50 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$; 12,5 $\mu\text{g/ml}$; 6,25 $\mu\text{g/ml}$; 3,125 $\mu\text{g/ml}$.

Dữ liệu sau đó được phân tích bằng Excel và giá trị IC_{50} sẽ được xác định nhờ phần mềm TableCurve. Giá trị IC_{50} là giá trị cho thấy nồng độ chất ức chế được 50% sự phát triển và tăng sinh của tế bào ung thư *in vitro*.

Chất đối chứng: DMSO 10% là dung môi pha chất được sử dụng như đối chứng âm. Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương

Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết và phân đoạn chất từ mô sẹo cây cúc áo hoa vàng

Sau khi ngâm chiết và làm khô thu được 5,5g cận ethyl acetat chiếm 3,67% và 20g cận methanol chiếm 13,33% lượng mẫu mô sẹo khô ban đầu.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Tiến hành chạy sắc ký cột để tách chất từ hai căn chiết này với hệ dung môi rửa giải là cloroform : methanol theo tỉ lệ tăng dần độ phân cực. Thu hứng các phân đoạn, thử sắc ký bản mỏng để gộp các phân đoạn có R_f giống nhau.

Từ căn chiết ethyl acetat thu được các mẫu E5 và E7. Mẫu E5 có khối lượng 37,5mg chiếm 0,68% căn chiết, là mẫu thu được khi chạy sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải cloroform: methanol (100:0). Chạy sắc ký bản mỏng với hệ dung môi Hexan : EtOAc (2 : 1) mẫu E5 có $R_f = 0,5$. Mẫu E7 có khối lượng 70,5mg chiếm 1,28% căn chiết, là mẫu thu được khi chạy sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải cloroform: methanol (95:5). Sắc ký bản

mỏng mẫu E7 với hệ dung môi cloroform : Methanol (7 : 1) thu được giá trị $R_f = 0,48$.

Từ căn methanol tách được mẫu M2 với khối lượng 1,8 mg chiếm 0,009% căn chiết. M2 thu được khi chạy sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải cloroform: methanol (9:1). Chạy sắc ký bản mỏng mẫu này với hệ dung môi cloroform – methanol (5 : 1) thu được giá trị $R_f = 0,34$.

Kết quả thử tính độc tế bào

Các mẫu E5, E7 (là các phân đoạn tách từ căn chiết ethyl acetat) và M2 (được tách từ căn methanol) được chúng tôi thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư LU-1, HepG2, MCF-7 và LNCaP. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) của các mẫu thí nghiệm trên các dòng tế bào ung thư người khác nhau

Mẫu thí nghiệm	Giá trị IC_{50} trên các dòng tế bào				
	LU-1	HepG2	MCF7	LNCaP	Vero
E5	15,66 ± 0,02	44,08 ± 0,05	20,14 ± 0,02	12,81 ± 0,01	35,47 ± 0,04
E7	16,67 ± 0,01	41,07 ± 0,02	19,07 ± 0,03	16,07 ± 0,01	39,86 ± 0,02
M2	20,34 ± 0,04	56,39 ± 0,01	29,27 ± 0,03	15,32 ± 0,02	34,28 ± 0,01
Elipticine (ĐC dương)	1,01 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,28 ± 0,02	1,32 ± 0,04	1,24 ± 0,01

Kết quả ở bảng 1 cho thấy các phân đoạn ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư khác nhau là khác nhau, trong đó khả năng ức chế với dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến là cao nhất với IC_{50} từ 12,81 $\mu\text{g/ml}$ đến 16,07 $\mu\text{g/ml}$, sau đó đến dòng tế bào LU-1 ($IC_{50} = 15,66 \mu\text{g/ml} - 20,34 \mu\text{g/ml}$), MCF7 ($IC_{50} = 19,07 \mu\text{g/ml} - 29,27 \mu\text{g/ml}$) và thấp nhất ở dòng tế bào ung thư gan HepG2 ($IC_{50} > 40 \mu\text{g/ml}$).

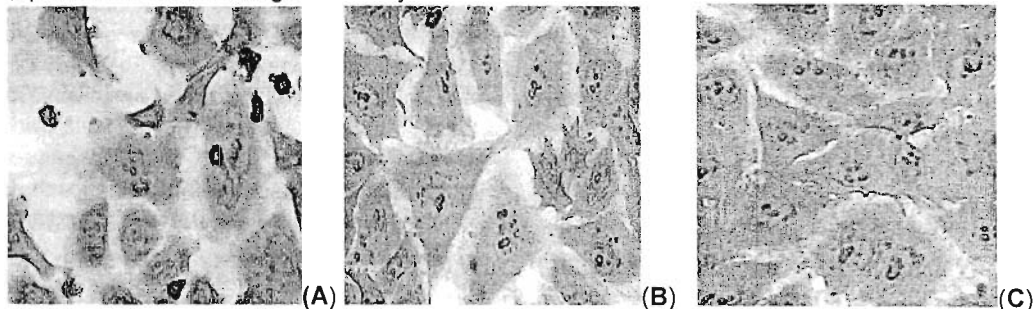
Với từng phân đoạn chúng tôi nhận thấy:

Phân đoạn E5 thể hiện hoạt tính tốt nhất trên hai dòng tế bào là LNCaP và LU-1 với giá trị $IC_{50} = 12,81 \mu\text{g/ml}$ và $15,66 \mu\text{g/ml}$. Ở hai dòng tế bào còn lại, phân đoạn này thể hiện hoạt tính ở giá trị IC_{50} từ 20,14 – 44,08 $\mu\text{g/ml}$ ($>20 \mu\text{g/ml}$) nên được xem là không có hoạt tính diệt hay ức chế sự phát triển của hai dòng tế bào này.

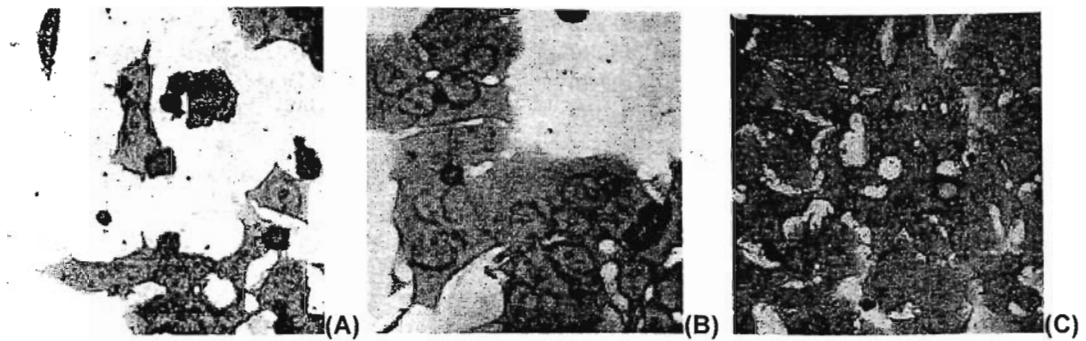
Phân đoạn E7 thể hiện hoạt tính tương đối đồng đều trên hai dòng tế bào LU-1 và LNCaP ($IC_{50} = 16,07-16,67 \mu\text{g/ml}$), thấp hơn ở dòng tế bào MCF7 ($IC_{50} = 19,07 \mu\text{g/ml}$) và không có hoạt tính trên dòng tế bào ung thư gan HepG2.

Trong khi đó, phân đoạn M2 thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến (với $IC_{50} = 15,32 \mu\text{g/ml}$) và không thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư phát triển ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$) trên các dòng ung thư còn lại.

Bên cạnh các dòng tế bào ung thư, độc tính của các phân đoạn trên dòng tế bào thường Vero cũng được đánh giá. Theo đó chúng tôi nhận thấy giá trị IC_{50} của các phân đoạn trên dòng tế bào này đều cao hơn 20 $\mu\text{g/ml}$, do đó có thể kết luận chúng ít độc với tế bào thường.



Hình 1: (A) Tác động của mẫu E5 lên dòng tế bào LU-1 ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$;
(B) Tác động của mẫu E5 lên dòng tế bào LU-1 ở nồng độ 12,5 $\mu\text{g/ml}$;
(C) Tác động của mẫu E5 lên dòng tế bào LU-1 ở nồng độ 6,25 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 2: (A) Tác động của mẫu M2 lên dòng tế bào MCF7 ở nồng độ 25 µg/ml; (B) Tác động của mẫu M2 lên dòng tế bào MCF7 ở nồng độ 12,5 µg/ml; (C) Tác động của mẫu M2 lên dòng tế bào MCF7 ở nồng độ 6,25 µg/ml.

Kết luận

Bằng phương pháp thử độc tế bào, các phân đoạn E5, E7, M2 được tách từ dịch chiết thô của mô sẹo cây cúc áo hoa vàng đã cho thấy hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư tiền liệt tuyến ($IC_{50} = 12,81 \mu\text{g/ml} - 16,07 \mu\text{g/ml}$) nhưng ít độc với tế bào thường Vero ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$). Ngoài ra, phân đoạn E5, E7 còn có hoạt tính với dòng tế bào ung thư phổi LU-1 ($IC_{50} = 15,66 \mu\text{g/ml}$ và $IC_{50} = 16,67 \mu\text{g/ml}$ một cách tương ứng); phân đoạn E7 có hoạt tính với dòng tế bào ung thư vú MCF7 ($IC_{50} = 19,07 \mu\text{g/ml}$).

Như vậy, các phân đoạn tách từ dịch thô của mô sẹo cây cúc áo hoa vàng đã cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung thư phát triển tương tự như hoạt tính đã được báo cáo đối với cây thu hái từ tự nhiên.

Summary

Spilanthes acmella (L) Murr. is a medicinal herb widely used in folk medicine for toothache, rheumatism and nowadays as an effective antioxidant. The extracts from callus of *Spilanthes acmella* (L.) Murr showed the same antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities on the lung cancer as those from the natural herb. By chemical methods and the cytotoxic assays, E5, E7, M2 fractions proved inhibitive actions on human hormone-dependent prostate carcinoma cells (LNCaP) with the IC_{50} ranging from 12.81 µg/ml to 16.07 µg/ml, but rather toxic to the normal cells (Vero). Besides, E5 and E7 fractions showed cytotoxic activities on LU-1 cells (human lung carcinoma) with $IC_{50} = 15.66 \mu\text{g/ml}$ and $IC_{50} = 16.67 \mu\text{g/ml}$, respectively. The

E7 fractions also inhibited the growth of MCF-7 cells (human breast cancer) with the $IC_{50} = 19.07 \mu\text{g/ml}$.

Correspondent Authors: thaodo@ibt.ac.vn or hailybio@gmail.com

Tài liệu tham khảo

- Bunyapraphatsara, N.; Chochechareunporn, O. Tradition medicinal plants; Prachachon: Bangkok (1999).
- Demarne, F.; Passaro, G. Use of an *Acmella oleracea* extract for its botox-like effect in an antiwrinkle cosmetic composition. FR Pat. 286513; *Chem. Abstr.* 143(2005), 138654.
- D.K. Saraf and V.K. Dixit *Spilanthes acmella* Murr. : Study on Its Extract Spilanthal as Larvicidal Compound, *Asian J. Exp. Sci.*, (2003) Vol. 16, No. 1&2, 2002, 9-19
- Houghton P., Fang R., Techatanawat I., Steventon G., Lee C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity, *Methods*, (2007) 42(4): 377-387.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Campbell H, Mayo J, Boyd M, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen use a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* (1991) 83 (11): 757 – 766
- Schubnel, L. A different approach to lifting efficacy based on a natural active ingredient. *SOFW J.* (2007) 133: 34-39.
- Supaluk Prachayasittikul, Saowapa Suphapong, Apilak Worachartcheewan, Ratana Lawung, Somsak Ruchirawat, and Virapong Prachayasittikul Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, (2009) 14: 850-867.