

ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA CAO CHIẾT METHANOL CÂY ÍCH MẪU (*LEONURUS JAPONICUS* HOUTT.) LÊN TẾ BÀO UNG THƯ MÁU K562 VÀ KHẢ NĂNG GÂY ĐỘC TRÊN Ế TRÙNG TÔM

INVESTIGATION INTO THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ORIENTAL MOTHERWORT (*LEONURUS JAPONICUS* HOUTT.) METHANOL EXTRACT ON K562 LEUKEMIA CELLS AND THE ARTEMIA ACUTE TOXICITY TEST

Trần Hoàng Hải¹, Nguyễn Thái Thanh Ngân¹, Hoàng Thành Chí¹, Nguyễn Thị Liên Thương¹, Bùi Thị Kim Lý^{1*}

¹*Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một*

*Tác giả liên hệ: lybtk@tdmu.edu.vn

(Nhận bài: 30/3/2020; Chấp nhận đăng: 23/3/2021)

Tóm tắt - Ích Mẫu có tên khoa học là *Leonurus japonicus* Houtt., từ lâu đã được ứng dụng rộng rãi trong điều trị bệnh ở các quốc gia phương Đông, đặc biệt là các bệnh phụ khoa của phái nữ. Ở Việt Nam, Ích Mẫu còn được biết đến với một số tên gọi dân gian khác như Chối đèn và Sung úy. Mặc dù, đã được ứng dụng rất nhiều trong việc phòng ngừa và chữa trị nhiều bệnh khác nhau nhưng vẫn còn rất ít công bố trong nước về độc tính của Ích Mẫu đối với tế bào ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư máu. Do đó, trong nghiên cứu này nhóm tác giả tập trung vào việc đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư máu K562 và độc tính trên ấu trùng tôm của cao chiết methanol chiết xuất từ cây Ích Mẫu. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol cây Ích Mẫu có khả năng ức chế tốt sự phát triển của dòng tế bào ung thư máu K562 với giá trị IC₅₀ là 62,49 ± 9,43 µg/ml. Đồng thời, cao chiết không gây độc cho ấu trùng tôm *Artemia*.

Từ khóa - Ích Mẫu; *Leonurus japonicus* Houtt.; khả năng gây độc tế bào; tế bào ung thư máu K562; *Artemia*

1. Đặt vấn đề

Ích Mẫu trong dân gian còn được biết đến với một số tên gọi khác như: Chối đèn và Sung úy (dành để chỉ hạt). Loài thảo dược này có tên khoa học là *Leonurus japonicus* Houtt., một loài cây thân cỏ thuộc họ hoa môi (*Lamiaceae*), sống từ 1 đến 2 năm, cao hơn 1 mét, thân vuông, lá có phiến chẻ sâu thành 3-5 thùy hẹp, có lông ít nhất là ở mặt dưới. Chùm ở nách lá, dài cao 5-6mm, 5 răng, có lông, vành đỏ cao 15-20 mm, môi trên rộng, môi dưới ngắn hơn môi trên, 3 thùy, tiểu nhụy, 4 quả bẻ to 2mm, có 3 cạnh [1]. Ích Mẫu được phát hiện nhiều ở các nước Đông Á như: Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [1]. Tại Việt Nam, cây mọc hoang ở các bãi sông, ruộng ngô trong các thung lũng và trồng nhiều tại một số tỉnh, thành, trải dài từ Bắc vào Nam như: Lào Cai (Sa Pa), Yên Bái (Yên Bình), Hà Giang (Hoàng Su Phì) cho đến Thành Phố Hồ Chí Minh (Chợ Quán) [1].

Về thành phần hóa học, theo viện dược liệu thì Ích Mẫu Việt Nam có chứa 3 loại alkaloid, trong đó có alkaloid với N bậc 4; 3 flavonoid trong đó có rutin, 1 glucoid có khung steroid, acid amin, tanin, chất đắng, saponin và 0,03% tinh dầu. Cho đến nay, trên thế giới đã phân lập được hơn 280 chất chuyển hóa thứ cấp từ loài cây này [2].

Về hoạt tính sinh học, từ lâu Ích Mẫu đã được xem như một thần dược đối với phái đẹp ở Trung Quốc, có rất nhiều

Abstract - Oriental Motherwort has the scientific name of *Leonurus japonicus* Houtt. in Eastern countries, it is widely used to treat many types of human diseases especially gynecological diseases. In Viet Nam, Oriental Motherwort is also referred to as Choi den and Sung uy. Although it has been extensively used in the prevention and treatment of many diseases, there is still very little publication on the cancer toxicity of this herb. Therefore, this study focuses on the cytotoxicity effects of Oriental Motherwort methanol extract on K562 leukemia human cancer and the Artemia acute toxicity test. The results have shown that, the methanol extract from Oriental Motherwort has a good ability to inhibit the proliferation of K562 cells; the IC₅₀ value is 62.49 ± 9.43 µg/ml. In addition, the Methanol extract shows no negative effect on *Artemia*.

Key words - Oriental Motherwort; *Leonurus japonicus* Houtt.; Cytotoxicity effects; K562 leukemia cells; *Artemia*

nghiên cứu chuyên sâu về các thành phần hóa học cũng như hoạt tính dược lý của Ích Mẫu tại quốc gia này [3]. Các hoạt tính sinh học đã được báo cáo gồm có hoạt động về điều hòa mạch máu [4], hoạt tính đông máu [5], hoạt tính gây độc tế bào [6], hoạt tính tạo mạch [7], hoạt tính kháng khuẩn [8], hoạt động ngưng kết tiểu cầu [9] và tác động lên cơ trơn tử cung [10]. Theo Dược điển Việt Nam V, Ích Mẫu được dùng để điều trị rối loạn kinh nguyệt, kinh đau, kinh bế, khí hư bạch đới, rong kinh, rong huyết, huyết hôi ra không hết, phù thũng, tiểu tiện không lợi [11].

Mặc dù, đã được nghiên cứu rộng rãi trên thế giới, nhưng các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của Ích Mẫu trong nước vẫn còn rất ít, đặc biệt là các công bố đánh giá mức độ gây độc trên các dòng tế bào ung thư máu. Do đó, trong bài báo này nhóm tác giả tập trung nghiên cứu về khả năng gây độc tế bào của cao chiết methanol cây Ích Mẫu trên tế bào ung thư máu dòng K562 và đánh giá tính an toàn khi sử dụng của cao chiết trên mô hình ấu trùng *Artemia*.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu, tế bào

Ích Mẫu phơi khô được thu mua tại Công ty Thảo dược Thanh Bình (Quận Gò Vấp, Thành phố Hồ Chí Minh) vào tháng 7 năm 2020.

¹ Institute of Applied Technology, Thu Dau Mot University (Tran Hoang Hai, Nguyen Thai Thanh Ngan, Hoang Thanh Chi, Nguyen Thi Lien Thuong, Bui Thi Kim Ly)

Tế bào K562 được cung cấp bởi TS. Phạm Thị Kim Trâm (Trung tâm Công nghệ Sinh học, TPHCM).

2.2. Phương pháp thu nhận cao chiết methanol

100 gram Ích Mẫu phơi khô sẽ được xay nhuyễn và ngâm đậm ngập trong dung môi methanol (Merk), ngâm đậm sao cho lượng dung môi ngập qua khỏi bề mặt bột Ích Mẫu đạt được khoảng 200 ml, lắc đều hỗn hợp trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút trong 24 giờ. Lọc lấy phần dịch nổi bên trên qua giấy lọc Whatman, phần bã Ích Mẫu còn lại tiếp tục được bổ sung thêm 200 ml dung môi methanol mới và lặp lại các bước như trên thêm 4 lần. Dịch lọc từ các lần chiết sẽ được gom lại, sau đó cô quay loại bỏ dung môi để thu về cao methanol [12].

2.3. Phương pháp chuẩn bị dịch chiết

Cao chiết methanol Ích Mẫu sẽ được hòa tan trong dung môi Dimethyl sulfoxide (DMSO) để đạt nồng độ gốc là 200 mg/ml. Sau đó, dịch chiết được lọc lần lượt qua các màng lọc 0,45 và 0,22 μm trong tủ cấy vô trùng. Dịch chiết được lưu trữ lạnh ở -20°C và rã đông trước khi sử dụng.

2.4. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư máu K562 được nuôi cấy trong các đĩa có chứa môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (fetal bovine serum) và kháng sinh 5% penicillin/streptomycin. Sau đó, đem nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện được cấp ẩm và nạp CO_2 liên tục ở mức 5%.

2.5. Phương pháp đánh giá độc tính trên tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết methanol cây Ích Mẫu sẽ được xác định theo phương pháp nhuộm Trypan Blue [13]. Các bước cụ thể được tiến hành như sau:

2.5.1. Chuẩn bị tế bào

Theo dõi mật số tế bào trong đĩa nuôi cấy đến khi đạt được hơn 80% không gian nuôi thì tiến hành thu hoạch và ly tâm để loại bỏ dịch nuôi cũ, cũng như các tạp chất hình thành trong quá trình phát triển của tế bào. Hòa cạn tế bào với một lượng môi trường RPMI nhất định, sao cho mật độ tế bào trong dung dịch đạt được 2×10^5 tế bào/ml.

2.5.2. Chuẩn bị dịch chiết

Dịch chiết methanol Ích Mẫu (200 mg/ml) sẽ được pha loãng ra thành các nồng độ khác nhau, sao cho nồng độ cuối cùng trong tổng thể tích dịch thử có giá trị trong khoảng từ 6,25 đến 100 $\mu\text{g/ml}$.

2.5.3. Đánh giá khả năng gây độc tế bào

Tế bào ung thư máu K562 được bổ sung lần lượt vào đĩa 6 giếng, mỗi giếng 1,5 ml dung dịch tế bào và 1,5 ml dịch chiết methanol Ích Mẫu ở các nồng độ khảo sát khác nhau đã được chuẩn bị như trên. Ở giếng đối chứng, bổ sung vào 1,5 ml môi trường nuôi cấy thay vì cao chiết methanol Ích Mẫu, lượng DMSO cũng được thêm vào tương ứng với giá trị cao nhất trong các nồng độ ở các giếng xử lý. Mẫu thử sẽ được lắc đều và ủ trong vòng 48 giờ. Sau khi hoàn tất quá trình ủ, mẫu sẽ được thu hoạch và ly tâm để thu hồi cạn chứa tế bào. Hòa cạn với môi trường RPMI. Trộn đều dịch tế bào với thuốc nhuộm Trypan blue theo tỷ lệ 1:1. Sau đó, nhỏ 10 μl hỗn hợp vừa trộn vào mép lamên để dịch mao dẫn tràn khắp trong buồng đếm. Dựa vào hiện

tượng bắt màu để đếm số lượng sống, chết của tế bào ở vật kính 10. Trong đó, các tế bào sống sẽ không bắt màu của thuốc nhuộm và ngược lại các tế bào chết sẽ bắt màu của thuốc nhuộm. Tính toán tỉ lệ tế bào sống ở giếng xử lý so với đối chứng [13].

2.6. Phương pháp thử nghiệm độc tính trên ấu trùng tôm Artemia

Ấp ấu trùng trong dung dịch nước muối ở nồng độ 10 gram NaCl/1 lít nước trong điều kiện được sục khí oxy liên tục trong 24 giờ dưới ánh sáng. Sau khi trứng nở, chuyển ấu trùng vào các cốc thủy tinh đã được chuẩn bị sẵn từ trước đó, sao cho số lượng ấu trùng trong cốc đạt đúng 30 cá thể/20 ml nước muối.

Pha loãng cao chiết methanol Ích Mẫu (200 mg/ml) trong nước muối nuôi ấu trùng về nồng độ 100 mg/ml. Sau đó, bổ sung lần lượt vào các cốc chứa ấu trùng: 6,25; 12,5; 25; 50 và 100 μL dịch chiết Ích Mẫu. Đồng thời, bổ sung vào cốc đối chứng âm 100 μL DMSO. Trước khi cho dịch chiết cũng như DMSO vào cốc, cần phải hút bỏ một lượng thể tích môi trường tương ứng với thể tích dịch thử sẽ bổ sung vào.

Thường xuyên lắc mẫu để dịch chiết có thể tác động đều lên ấu trùng. Sau 5 giờ, sử dụng thấu kính phóng đại để đếm số lượng ấu trùng chết và tính toán tỷ lệ phần trăm tử vong. Ấu trùng chỉ được coi là chết nếu chúng không di chuyển trong vài giây sau khi dùng vật nhọn chạm vào trong khi quan sát. Nồng độ gây chết 50% nếu có và trung bình sai số chuẩn được tính toán bằng cách sử dụng đường cong hồi quy phi tuyến tính có trong phần mềm thống kê bảng kính Graphpad Prism 7 [14].

2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 7.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tác động của cao chiết methanol Ích Mẫu lên sự tăng sinh của tế bào K562 theo nồng độ

Kết quả khảo sát khả năng gây độc của cao chiết methanol cây Ích Mẫu đối với dòng tế bào ung thư máu K562 được thể hiện cụ thể thông qua Bảng 1 và Hình 1.

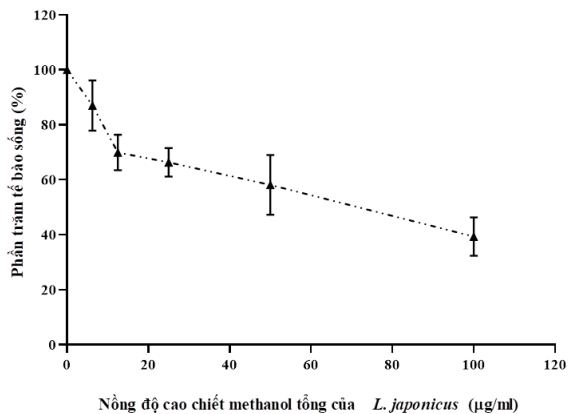
Bảng 1. Tác động của cao chiết Ích Mẫu lên sự tăng sinh của tế bào K562 theo nồng độ

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm tế bào sống (%)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0	100,00	100,00	100,00
6,25	92,93	91,61	76,49
12,5	70,98	75,81	63,01
25	70,49	68,06	60,50
50	69,27	47,42	57,68
100	44,39	31,29	42,32

Từ kết quả ở Bảng 1 cho thấy cao chiết methanol cây Ích Mẫu có tác động gây độc lên sự sống của dòng tế bào ung thư máu K562 theo nồng độ. Giá trị IC_{50} trung bình 3 lần lặp lại sau khi được xử lý thống kê là $62,49 \pm 9,43$ ($\mu\text{g/ml}$).

Hình 1 là biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa nồng

độ cao chiết Ích Mẫu và phần trăm tế bào K562 còn sống sau khi được xử lý bằng phần mềm thống kê từ Bảng 1. Từ Hình 1 có thể suy ra rằng, sự ức chế tăng sinh của tế bào K562 của cao chiết từ cây Ích Mẫu là phụ thuộc vào nồng độ của cao chiết.



Hình 1. Tác động của cao chiết Ích Mẫu lên sự tăng sinh của tế bào K562

3.2. Tác động của cao chiết methanol Ích Mẫu lên sự tăng sinh của tế bào K562 theo thời gian

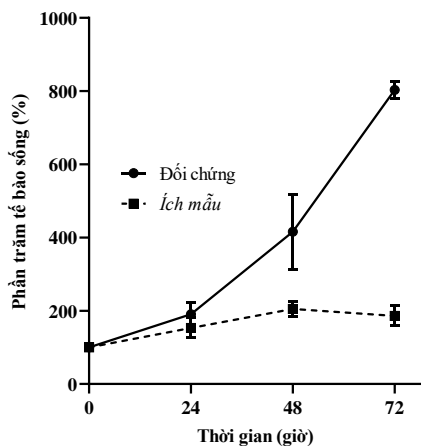
Bên cạnh xác định giá trị IC50 thì việc tìm hiểu tác động của dược liệu lên dòng tế bào ung thư mục tiêu theo mốc thời gian cũng là một chỉ tiêu quan trọng trong việc nghiên cứu thuốc ở giai đoạn tiền lâm sàng. Bảng 2 là kết quả thống kê phản ánh sự khác biệt về phần trăm tế bào ung thư máu K562 còn sống khi có sự hiện diện (mẫu thử) và không có sự hiện diện (mẫu chứng) của cao chiết methanol cây Ích Mẫu ở nồng độ 100 µg/ml theo 4 cột mốc thời gian (0 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ).

Bảng 2. Phần trăm tế bào sống của mẫu chứng và mẫu xử lý cao chiết theo thời gian

Phần trăm tế bào sống (%)			
Mẫu chứng			
Thời gian	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0 giờ	100,00	100,00	100,00
24 giờ	225,64	180,00	165,83
48 giờ	525,64	400,00	322,08
72 giờ	779,48	805,00	824,58
Mẫu cao chiết			
Thời gian	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0 giờ	100,00	100,00	100,00
24 giờ	135,00	184,62	140,00
48 giờ	180,00	220,51	215,00
72 giờ	155,00	207,69	195,00

Nhìn chung, kết quả ở Bảng 2 cho thấy, tác động cao chiết methanol cây Ích Mẫu đối với dòng tế bào ung thư máu K562 trong 24 giờ đầu gần như không có sự khác biệt đáng kể. Ở cột mốc 24 giờ tiếp theo (48 giờ), phần trăm tế bào K562 còn sống giữa mẫu thử và mẫu chứng đã có sự khác biệt rõ rệt; Số lượng tế bào K562 của mẫu chứng cao hơn khoảng 1,5 - 2 lần so với mẫu thử.

Khả năng tăng sinh của dòng tế bào ung thư máu K562 giữa mẫu chứng và mẫu thử có sự khác biệt đáng kể trong 72 giờ khảo sát (Hình 2). Đối với mẫu chứng, số lượng tế bào K562 không ngừng gia tăng qua từng mốc thời gian khảo sát. Ngược lại, số lượng tế bào K562 của mẫu thử chỉ tăng nhẹ trong 48 giờ đầu sau đó bắt đầu suy giảm ở giai đoạn 72 giờ.



Hình 2. Tác động của cao chiết Ích Mẫu lên sự tăng sinh của tế bào K562 theo thời gian

3.3. Tác động của cao chiết methanol Ích Mẫu lên sự sống của ấu trùng tôm

Kết quả khảo sát độc tính của cao chiết methanol cây Ích Mẫu ở liều cao trên ấu trùng tôm được thể hiện thông qua Bảng 3.

Bảng 3. Phần trăm tôm sống của mẫu chứng và mẫu xử lý cao chiết

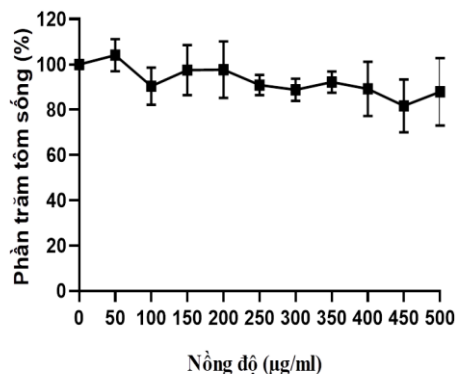
Nồng độ (µg/ml)	Phần trăm tôm sống (%)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0 (DMSO)	100,00	100,00	100,00
50	100,00	100,00	112,27
100	82,76	89,28	99,07
150	93,10	89,29	110,18
200	96,55	85,71	110,65
250	93,10	85,71	93,98
300	86,21	85,71	94,44
350	89,66	89,29	97,69
400	79,31	85,71	102,55
450	79,31	71,43	94,44
500	72,41	89,29	102,08

Kết quả cho thấy, cao chiết methanol cây Ích Mẫu có khả năng gây độc nhẹ cho ấu trùng *Artemia* nhưng ở liều rất cao. Cụ thể, số lượng ấu trùng chỉ chết đi khoảng 30% so với mẫu chứng nhưng phải ở nồng độ 500 µg/ml.

Mặc dù, dãy nồng độ khảo sát tương đối cao nhưng vẫn chưa xác định được nồng độ gây chết 50% số lượng ấu trùng (LC50). Số lượng ấu trùng còn sống so với thời điểm ban đầu luôn duy trì ở mức 70% trở lên sau 3 lần lặp lại.

Từ biểu đồ ở Hình 3 có thể thấy, ấu trùng tôm có chịu sự tác động của cao chiết methanol cây Ích Mẫu. Tuy

nhiên, gần như không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở các nồng độ khảo sát.



Hình 3. Tác động của cao chiết Ích Mẫu lên sự sống của ấu trùng tôm

4. Kết luận

Từ các kết quả khảo sát sơ bộ ở trên nhóm tác giả rút ra kết luận, Ích Mẫu là cao chiết rất có tiềm năng trong ức chế tăng sinh của tế bào ung thư máu và không gây độc trên ấu trùng tôm. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở, định hướng cho những nghiên cứu sâu hơn sau này về cơ chế tác động cần được làm rõ để có thêm cơ sở khoa học và đưa Ích Mẫu ứng dụng vào thực tiễn trong điều trị bệnh ung thư máu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm-Hoàng-Hộ, *Cây cỏ Việt Nam Quyển II*. Nhà xuất bản Trẻ, 1999.
- [2] L.-L. Miao, Q.-M. Zhou, C. Peng, Z.-H. Liu, and L. Xiong, "Leonurus japonicus (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: A comprehensive overview", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 117, Elsevier, 2019, 1-18.
- [3] C. Peng, "Chinese genuine medicinal materials", *Chinese Press of Traditional Chinese Medicine*, Beijing, 2011, 4187-4188.
- [4] F. Peng, L. Xiong, and X.-M. Zhao, "A bicyclic diterpenoid with a new 15, 16-dinorlabdane carbon skeleton from Leonurus japonicus and its coagulant bioactivity", *Molecules*, vol. 18, MDPI, 2013, 13904-13909.
- [5] Q.-m. Zhou, C. Peng, H. Yang, L.-s. Liu, Y.-t. Yang, X.-f. Xie, et al., "Steroids from the aerial parts of Leonurus japonicus", *Phytochemistry Letters*, vol. 12, Elsevier, 2015, 287-290.
- [6] Y.-L. He, J.-Y. Shi, C. Peng, L.-J. Hu, J. Liu, Q.-M. Zhou, et al., "Angiogenic effect of motherwort (Leonurus japonicus) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos", *Fitoterapia*, vol. 128, Elsevier, 2018, 36-42.
- [7] L. Xiong, C. Peng, Q.-M. Zhou, F. Wan, X.-F. Xie, L. Guo, et al., "Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of Leonurus japonicus Houtt", *Molecules*, vol. 18, MDPI, 2013, 963-973.
- [8] L. Xiong, Q.-M. Zhou, C. Peng, X.-F. Xie, L. Guo, X.-H. Li, et al., "Sesquiterpenoids from the herb of Leonurus japonicus", *Molecules*, vol. 18, MDPI, 2013, 5051-5058.
- [9] H. Yang, Q. Zhou, C. Peng, L. Liu, X. Xie, L. Xiong, et al., "Coumarins from Leonurus japonicus and their anti-platelet aggregative activity", *China Journal of Chinese Materia Medica*, vol. 39, 2014, 4356-4359.
- [10] J. Liu, C. Peng, Q.-M. Zhou, L. Guo, Z.-H. Liu, and L. Xiong, "Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of Leonurus japonicus and their opposite effects on uterine smooth muscle", *Phytochemistry*, vol. 145, Elsevier, 2018, 128-136.
- [11] Bộ Y Tế, "Dược-điển-Việt-Nam-V, (Tập 2)". Hà Nội: Nhà xuất bản Y học, 2018.
- [12] Nguyễn-Kim-Phi-Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Tp. HCM: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 2007.
- [13] Nicholas Greco and L. O'Donnel., "Determining cellular viability using Trypan blue. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation", chapter 47, method 47-1, *Bethesda*, Ed., 2019, 565 – 566.
- [14] O. A.-O. Ogbole, P. A. Segun, and A. J. Adeniji, "In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts", *B. M. C. Complement Altern Med*, vol.17, Springer Nature, 2017, 1472-6882.