

HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ MÁU CỦA DỊCH CHIẾT CÂY VỐI THUỐC *SCHIMA WALLICHII* THU HÁI Ở QUẢNG TRỊ

CYTOTOXIC ACTIVITY OF *SCHIMA WALLICHII* EXTRACTS COLLECTED IN QUANG TRI ON HUMAN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CANCER CELLS

Nguyễn Yên Nhi^{1,2}, Trần Thị Thùy Linh³, Lê Tuấn Anh⁴, Võ Thị Lệ Mỹ⁵, Trần Thị Phước May⁵, Phạm Trần Vĩnh Phú⁶, Huỳnh Lôi⁵, Văn Phạm Kim Thương⁵, Trần Mạnh Hùng^{5*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Y Dược Huế

⁴Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung (MISR)

⁵Khoa Y Dược - Đại học Đà Nẵng

⁶Khoa Y, Đại học Đông Á

*Tác giả liên hệ: tmhung@smp.udn.vn

(Nhận bài: 12/7/2022; Chấp nhận đăng: 26/9/2022)

Tóm tắt - Trong quá trình tìm kiếm các thực vật tự nhiên để hỗ trợ điều trị ung thư, nhóm tác giả đã phát hiện ra dịch chiết cồn của Vối thuốc *Schima wallichii* họ Chè Theaceae ở Quảng Trị có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của các dòng tế bào ung thư. Kết quả thí nghiệm cho thấy, các phân đoạn phân cực là ethyl acetate và nước của lá và cành Vối thuốc có khả năng gây độc lên nhiều dòng tế bào ung thư đặc biệt là dòng ung thư máu HL-60 và KG. Hai phân đoạn này tác động lên PARP protein, và kích hoạt hệ enzyme caspase bao gồm hai loại cysteine-aspartic acid protease là caspase-3 và caspase-9 thông qua quá trình biểu hiện protein bằng phương pháp Western Blot. Như vậy, có thể nhận định cả hai phân đoạn này đều chứa những hoạt chất có thể tương tác vào DNA của tế bào ung thư máu thông qua con đường tác động lên enzyme caspase và PARP. Điều này có thể làm định hướng trong các nghiên cứu từ cây Vối thuốc theo hoạt tính dẫn đường để tìm kiếm các hoạt chất chống ung thư.

Từ khóa - *Schima wallichii*; Vối thuốc; gây độc tế bào; ung thư máu; HL-60.

1. Giới thiệu

Bệnh bạch cầu là một loại bệnh ung thư máu, các tế bào bạch cầu bất thường hình thành trong tủy xương và xâm lấn vào các tế bào khỏe mạnh qua đường máu [1, 2]. Y học hiện đại có sự tiến bộ trong điều trị bệnh bạch cầu, tuy nhiên sự tái phát bệnh và kháng thuốc vẫn còn là thử thách lớn, đòi hỏi phải có nhiều phương pháp điều trị hiệu quả hơn [3, 4]. Các chất chống ung thư đang sử dụng hiện nay có cơ chế chủ yếu là gây ra quá trình chết theo lập trình của tế bào (apoptosis) [5]. Trong quá trình apoptosis, các tác nhân gây chết tế bào ung thư có thể gây độc cả các tế bào thường [6, 7]. Do đó, việc tìm ra các hợp chất khác có khả năng điều trị ung thư ít tác dụng phụ đồng thời phải chống lại sự kháng thuốc [7, 8]. Necrosis, con đường tự hủy tế bào theo chương trình khác biệt so với apoptosis, có thể

Abstract - During the anti-cancer screening program from nature, we discovered that the alcohol extract of *Schima wallichii* (Theaceae) in Quang Tri can inhibit the growth and development of cancer cell lines. Experimental results showed that the polar fractions such as ethyl acetate and water of the leaves and branches of the *S. wallichii* were capable of causing toxicity to many cancer cells, especially HL-60 and KG human leukemia cancer cell lines. These two fractions react on the PARP protein, and activate the caspase enzyme system consisting of two types of cysteine-aspartic acid proteases, caspase-3, and caspase-9 through protein expression in HL-60. Based on the results, it is noted that both two sub-fractions contain active substances that can interact with the DNA of leukemia cancer cells through the action of caspases and PARP. The results can help to search for anti-cancer active substances from *S. wallichii* in the future.

Key words - *Schima wallichii*; cytotoxic; acute myeloid leukemia; HL-60.

được kích hoạt trong một số loại tế bào ung thư nhất định trong quá trình sử dụng liệu pháp hóa trị và đảo ngược sự kháng apoptosis trong các tế bào ung thư [9-11]. Trong những năm gần đây, xu hướng sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ tự nhiên để phòng và chữa bệnh trở nên phổ biến [12]. Tìm kiếm các loại thuốc mới có khả năng tiêu diệt nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau, đồng thời giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc là yêu cầu cấp thiết hiện nay. Có nhiều hướng để tìm kiếm các thuốc điều trị ung thư mới nhưng hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên luôn là một nguồn quan trọng [13, 14].

Trong quá trình điều tra thực vật, nhóm tác giả đã phát hiện ra dịch chiết của Vối thuốc *Schima wallichii* thuộc họ Chè Theaceae ở Quảng Trị có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của các dòng tế bào bạch cầu. Vối

¹ VNUHCM - University of Science (Nguyen Yen Nhi)

² Viet Nam National University Ho Chi Minh City (Nguyen Yen Nhi)

³ Hue University of Medicine and Pharmacy (Tran Thi Thuy Linh)

⁴ Mien Trung Institute of Scientific Research (Le Tuan Anh)

⁵ The University of Danang – School of Medicine and Pharmacy (Vo Thi Le My, Tran Thi Phuoc May, Huynh Loi, Van Pham Kim Thuong, Tran Manh Hung)

⁶ Faculty of Medicine - Dong A University (Pham Tran Vinh Phu)

thuốc (còn gọi là Kháo cài, Thù lụ) có tên khoa học khác là *Gordonia wallichii* DC [15, 16]. Trong y học cổ truyền, lá non có vị chát, dùng cho diệt giun, sát trùng, tiêu thũng và chỉ huyết sinh cơ, vỏ Vỏi thuốc dùng để trị ăn uống không tiêu, bệnh giun đũa, viêm ruột và vết thương do côn trùng và rắn cắn [15-17]. Tổng quan tài liệu cho thấy, *S. wallichii* là cây có tác dụng chống oxy hóa rất mạnh [18]. Theo điều tra sơ bộ, dịch chiết cồn và nước của cây này có khả năng gây độc lên nhiều dòng tế bào ung thư, trong đó có hai dòng tế bào ung thư máu là HL-60 và KG. Do đó, bài báo này công bố hoạt tính chống tăng sinh tế bào ung thư máu của dịch chiết Vỏi thuốc *Schima wallichii*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu hái mẫu thực vật

Mẫu cành và lá Vỏi thuốc được thu hái vào tháng 10/2020 tại khu vực miền núi Huyện Lao Bảo, tỉnh Quảng Trị bởi ThS Lê Tuấn Anh, Viện Hàn Lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản hiện đang lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Dược liệu và Kiểm nghiệm, Khoa Y Dược - Đại học Đà Nẵng.

2.2. Chiết xuất dược liệu

Lá và cành Vỏi thuốc (LVT và CVT) khi thu hái về được phơi khô trong bóng râm (2 kg), xay nhỏ và lần lượt được chiết nóng hồi lưu với ethanol 70% (3L × 3 lần). Dung dịch chiết sau đó được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết cồn 70%. Cặn chiết này được hòa tan với nước (3L) rồi chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexane, methylene dichloride, và ethyl acetate thu được các cặn chiết *n*-hexane (Hx), methylene dichloride (MD), ethyl acetate (EtOAc) và phần nước còn lại (W). Theo đó mẫu LVT thu được 4 phân đoạn theo độ phân cực là LVT-Hx, LVT-MD, LVT-EtOAc và LVT-W. Tương tự, mẫu CVT cũng thu được 4 phân đoạn là CVT-Hx, CVT-MD, CVT-EtOAc và CVT-W. Các mẫu phân đoạn này được bảo quản ở 4°C trong tủ lạnh trước khi đem ra sử dụng.

2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống tăng sinh tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào được xác định trên các dòng tế bào ung thư máu HL-60 và KG, các dòng ung thư khác như tụy (MIA PACA-2, PANC-1), phổi (A549), ung thư buồng trứng (OVCAR8, Hela) bằng cách sử dụng bộ kit Dojindo cải tiến, dựa trên phương pháp MTT trước đây [24, 25]. Phương pháp thử hoạt tính chống tăng sinh tế bào được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ xác nhận là phép thử nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc tiêu diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Trong môi trường nuôi cấy có dinh dưỡng (DMEM) hay không có dinh dưỡng (NDM), các tế bào ung thư sống sẽ cung cấp một điện tử trung gian làm chuyển hóa muối tetrazolium thành formazan. Formazan (có màu) sẽ được đo độ hấp thụ cực đại ở bước sóng thích hợp. Các mẫu thử khi cho vào dung dịch sẽ làm giảm số lượng tế bào ung thư, do đó hàm lượng formazan cũng giảm và làm giảm cường độ màu của dung dịch. Dựa vào cường độ màu của dung dịch khi có và không có mẫu thử, ta sẽ tính được khả năng gây độc tế bào ung thư của mẫu thử. Các tế bào sống được nuôi cấy trong phiến 96 giếng với điều kiện 37°C, 5% CO₂. Dịch chiết lá và cành Vỏi thuốc được pha loãng trong DMSO với các nồng độ khác nhau. Nồng độ DMSO cuối

cùng được điều chỉnh nhỏ hơn 0,1% để ngăn ngừa quá trình biệt hoá. Sau 24 giờ, các mẫu thử được thêm vào mỗi giếng, thêm đồng lượng môi trường với DMSO 0,1% vào giếng đối chứng trắng (không có mẫu thử). Sau khi ủ 48 giờ, thuốc thử Dojindo được cho vào từng giếng. 4 giờ sau đó, mang phiến đi đo mật độ quang (OD) ở 450 nm bằng thiết bị đọc vi phiến (Molecular Devices, Mỹ). Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \left[\frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (chứng trắng)}}{\text{OD (chứng âm)} - \text{OD (chứng trắng)}} \times 100 \right]$$

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \% \text{ sống sót}$$

Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Camptothecin (Merck) được sử dụng làm chất đối chứng dương. DMSO là đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) được xác định nhờ vào phần mềm TableCurve 2Dv5.01.

2.4. Phương pháp đánh giá khả năng kích hoạt caspase-3

Caspase-3 là một enzyme thuộc họ caspase (enzyme protease dạng cystein-aspartic) thường tồn tại dưới dạng tiền chất không hoạt động trong tế bào. Khi enzyme này bị hoạt hoá, nó sẽ khởi động quá trình apoptosis bằng việc phân cắt protein (chất nền) mà mục tiêu cụ thể là chuỗi amino DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). Ac-DEVD-AFC là chất nền có gắn chất phát quang, khi vào tế bào bị caspase-3 cắt đứt liên kết với AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) do đó giải phóng phần phát quang AFC và được định lượng được bằng máy đo quang phổ huỳnh quang [26]. Tế bào ung thư được xử lý với dịch chiết cồn lá và cành Vỏi thuốc ở các nồng độ khác nhau, sau khi ủ 12, 24, 48 giờ, các tế bào được thu gom và rửa sạch bằng PBS lạnh rồi mang đi dung giải bằng dung dịch đệm ly giải ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó làm lạnh và thêm vào dung dịch đệm thử nghiệm vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 1 giờ. Cường độ huỳnh quang được đo bằng kích thích ở 370 nm và phát xạ ở 505 nm bằng máy Twinkle LB970 (Berthold Technologies, Đức). Mẫu chỉ chứa tế bào ung thư, không có chất thử được dùng làm nhóm đối chứng. Mức độ cảm ứng enzyme caspase-3 được xác định thông qua tỷ lệ cường độ huỳnh quang của mẫu thử so với mẫu chứng. Kết quả được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 3.03.

2.5. Phương pháp Western Blot

Kỹ thuật lai giữa protein với protein (giữa kháng nguyên với kháng thể) protein kháng nguyên được phát hiện qua phản ứng tạo màu hoặc phát huỳnh quang. Trong Western Blot, một hỗn hợp protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE. Các vạch protein được chuyển lên màng lai và từng vạch protein được phát hiện bằng cách ngâm màng với kháng thể sơ cấp và thứ cấp có gắn enzyme hoặc đánh dấu phóng xạ đặc hiệu cho protein quan tâm. Nếu protein quan tâm được kết hợp bởi kháng thể đánh dấu phóng xạ, vị trí của nó trên các điểm có thể được phát hiện bằng cách chụp màng lên tấm film X-quang. Tế bào được ủ với dịch chiết cồn của lá và cành Vỏi thuốc trong 24 giờ ở 37°C. Các mảnh vỡ tế bào được ngâm trong dung dịch đệm ly giải, có chứa hỗn hợp chất ức chế protease, ly tâm để loại bỏ kết tủa. Phần dịch nổi protein này được mang đi phân tách bằng điện di SDS-PAGE, sau đó được chuyển lên màng lai PVDF (Bio-Rad, Mỹ). Đặt màng vào 5% sữa bột không béo trong dung dịch đệm Tris chứa 0,1% Tween-

20 (TBS-T) ở 4°C qua đêm và ủ với kháng thể sơ cấp ở nhiệt độ phòng. Các màng được rửa 3 lần với TBS-T và thấm các kháng thể thứ cấp có gắn enzym HRP (Horse-radish peroxidase), ủ ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ, rửa lại 3 lần với TBS-T, sau đó hiển thị protein miễn dịch và chụp X-quang. Protein được bình thường hoá bằng cách đây lại cùng một màng với việc phát hiện kháng thể kháng β -actin, màng đã sử dụng ở trên được ngâm trong dung dịch đệm loại bỏ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút [27,28].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Có 8 mẫu dược liệu là phân đoạn dịch chiết từ lá và cành của Vối thuốc bao gồm phân đoạn *n*-hexane, methylene dichloride, ethyl acetate và pha nước còn lại sau chiết xuất (LVT-Hx, LVT-MD, LVT-EtOAc, LVT-W, và CVT-Hx, CVT-MD, CVT-EtOAc, CVT-W, Bảng 1). Các phân đoạn này được pha loãng thành các nồng độ từ thấp đến cao (5-500 $\mu\text{g/mL}$), và được đưa vào các giếng nuôi cấy tế bào ung thư. Như kết quả trình bày ở Bảng 1, mẫu dịch chiết LVT-MD từ lá có khả năng diệt tế bào ung thư tụy PANC-1 với $\text{IC}_{50} = 256,8 \pm 10,4 \mu\text{g/mL}$, đây là một kết quả yếu, phân đoạn này cũng không thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng tế bào ở tất cả các dòng khác. Tương tự, mẫu LVT-Hx cũng không thể hiện được hoạt tính gây độc trên tất cả các dòng tế bào với giá trị $\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{g/mL}$. Tuy nhiên, cũng với mẫu lá Vối thuốc, hai mẫu dịch chiết còn lại là LVT-EtOAc và LVT-W có khả năng gây độc tế bào ung thư tụy (MIA PACA2, PANC-1), ung thư phổi (A549), ung thư tử cung (Hela) với các giá trị $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$. Đối với 2 dòng tế bào ung thư máu là HL-60 và KG, cả 2 phân đoạn này đều cho giá trị IC_{50} trong khoảng 70-86 $\mu\text{g/mL}$. Điều này cho thấy, các hoạt chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tập trung ở 2 phân đoạn có độ phân cực cao hơn, nhất là ở phân đoạn nước, nơi tập trung nhiều các flavonoid chứa các nhóm đường. Đặc biệt, phân đoạn nước của lá cây Vối thuốc cho thấy khả năng diệt tế bào KG mạnh với giá trị IC_{50} là $72,2 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$ (Bảng 1).

Các mẫu phân đoạn từ cành cây Vối thuốc cũng có các kết quả tương tự. Tuy nhiên, ở mẫu cành, phân đoạn CVT-MD đã cho kết quả khả quan với giá trị IC_{50} bằng $72,5 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$ trên dòng HL-60. Mẫu phân đoạn CVT-Hx thể hiện hoạt tính yếu, điều này cũng phù hợp với mẫu lá. Tuy nhiên, CVT-EtOAc và CVT-W lại cho các kết quả tiềm năng. Mẫu CVT-EtOAc ức chế sinh trưởng tất cả các dòng tế bào ung thư, trong đó dòng HL-60 và KG bị ức chế mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là $46,4 \pm 2,5$ và $65,2 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$. Mẫu CVT-W cũng cho thấy, khả năng diệt tế bào ung thư tốt, trong đó $\text{IC}_{50} = 72,5 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ (PANC-1), $\text{IC}_{50} = 50,2 \pm 2,4$ (HL-60) và $\text{IC}_{50} = 50,5 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$ (KG).

Dòng tế bào thận HEK293 (immortalized human embryonic kidney cells) được đưa vào thử nghiệm, đây là dòng tế bào thường, sinh trưởng tốt và không bị ảnh hưởng bởi dịch chiết các phân đoạn từ lá và cành Vối thuốc. Điều này cho thấy, cả 2 dịch chiết này với nồng độ dưới 500 $\mu\text{g/mL}$ đều không gây độc cho tế bào bình thường. Tuy chưa có thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn, nhưng nghiên cứu này cũng góp phần cho thấy các phân đoạn dịch chiết từ Vối đều không gây độc.

Camptothecin làm chất đối chứng dương, chất này được coi là hoạt chất thường dùng để thử nghiệm tiêu diệt các tế bào ung thư. Camptothecin đã ức chế sự tăng sinh của tế bào HL-60 với giá trị IC_{50} là $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ và với tế bào KG là $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ [29].

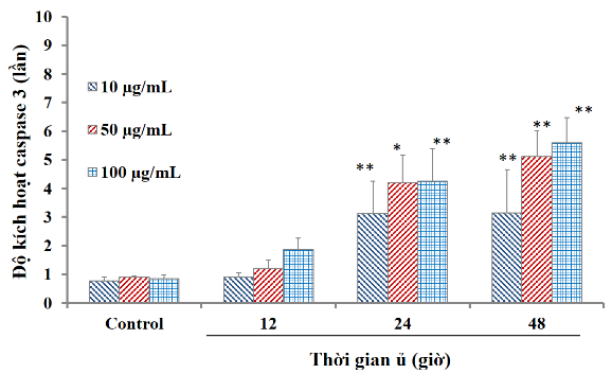
Bảng 1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các phân đoạn cây Vối thuốc

Dịch chiết, phân đoạn	Các dòng tế bào ung thư, $\text{IC}_{50} \mu\text{g/mL}^a$						
	MIA PACA2	PANC-1	A549	Hela	HL-60	KG	HEK293
LVT-Hx	> 300	> 500	-	> 300	> 300	> 300	-
LVT-MD	> 300	$256,8 \pm 10,4$	> 300	> 300	$146,0 \pm 8,5$	> 300	> 300
LVT-EtOAc	$215,5 \pm 6,6$	$218,3 \pm 10,2$	> 300	$130,5 \pm 6,8$	$85,8 \pm 4,5$	$80,5 \pm 4,1$	> 300
LVT-W	$167,8 \pm 10,3$	$90,6 \pm 12,7$	$190,6 \pm 5,6$	$80,4 \pm 4,3$	$86,6 \pm 6,0$	$72,2 \pm 5,0$	-
CVT-Hx	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 500
CVT-MD	> 300	$257,2 \pm 6,0$	$108,7 \pm 8,0$	> 300	$72,5 \pm 4,6$	> 300	-
CVT-EtOAc	$196,1 \pm 12,0$	$231,0 \pm 6,5$	$112,0 \pm 10,2$	$181,5 \pm 9,2$	$46,4 \pm 2,5$	$65,2 \pm 3,2$	-
CVT-W	$117,8 \pm 11,0$	$72,5 \pm 2,8$	$86,2 \pm 10,5$	$67,0 \pm 3,8$	$50,2 \pm 2,4$	$50,5 \pm 3,2$	> 500
Camptothecin ^b	$3,0 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$	

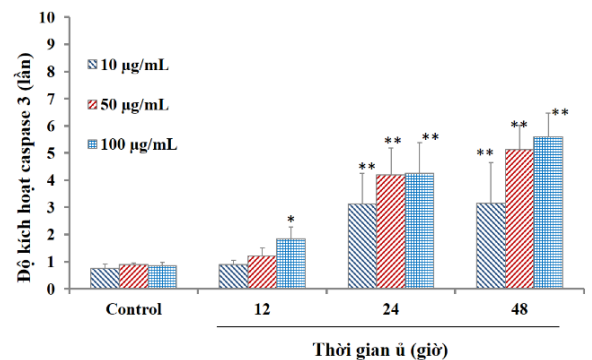
a) Giá trị IC_{50} được tính dựa theo độ lặp lại của 3 lần thử nghiệm, đơn vị đo $\mu\text{g/mL}$; b) Camptothecin được dùng để làm chất đối chứng dương, IC_{50} đo ở đơn vị μM . Giá trị \pm SD được chấp thuận ở mức độ cho phép. (-): Hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính.

3.2. Hoạt tính kích hoạt enzyme caspase-3

(A) CVT-EtOAc



(B) CVT-W



Hình 1. Ảnh hưởng của CVT-EtOAc (A) và CVT-W (B) đến sự hoạt hóa caspase-3 trong tế bào HL-60.

Theo kết quả độc tính tế bào, phân đoạn từ cành Vối thuốc là CVT-EtOAc và CVT-W được lựa chọn để thử

nghiệm trên mô hình kích hoạt caspase-3 và thẩm tách miễn dịch Western Blot trên dòng tế bào HL-60.

Caspase-3 là một enzyme của họ cysteine-aspartic acid protease. Caspase tồn tại dưới dạng proenzyme không hoạt động có nhiệm vụ phân giải protein tại các gốc aspartic để biểu hiện các tiểu đơn vị lớn và nhỏ trong tế bào. Các tiểu đơn vị này khi bị kích hoạt sẽ tạo thành các dimer hóa, là dạng enzyme hoạt động.

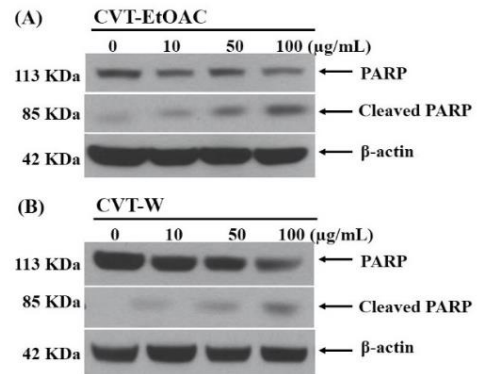
Tế bào HL-60 (1×10^6 /giếng) được ủ với CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ở 37°C với chất nền caspase-3 (Ac-DEVD-AFC) trong 1 giờ. Cường độ huỳnh quang của chất ly giải tế bào được đo để xác định hoạt tính của caspase-3. Mẫu đối chứng âm chứa DMSO 0,1%. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm SD của các kết quả từ ba thí nghiệm độc lập (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Thông thường, sự hoạt hóa tuần tự của các caspase đóng vai trò trung tâm trong quá trình apoptosis. Caspase-3 khi bị hoạt hóa sẽ dẫn đến sự hoạt hóa của caspase khác là caspase-6 và caspase-7, quá trình này phân cắt nhiều cấu trúc protein và điều hòa sự chuyển đổi cấu trúc protein, đây là quá trình quan trọng đối với sự tồn tại và duy trì của tế bào [30]. Trong số các enzyme họ caspase, caspase-3 được xác định là enzyme quan trọng nhất (executioner enzyme), được kích hoạt bằng cả con đường nội sinh và ngoại sinh trong tế bào [30]. Do đó, kích hoạt được enzyme caspase-3 sẽ dẫn tới tế bào chết, đây là cơ chế chính của các hợp chất điều trị ung thư hiện nay. Trong thí nghiệm này, hai mẫu phân đoạn CVT-EtOAc và CVT-W được pha loãng ở dải nồng độ 10, 50 và 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Các nồng độ này được thêm vào tế bào HL-60 sau đó ủ trong 12, 24 và 48 giờ. Sau đó, sự hoạt hóa enzyme caspase-3 được đo theo mức độ của Ac-DEVD-AFC. Kết quả trong Hình 2 cho thấy CVT-EtOAc và CVT-W ở nồng độ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đã biểu hiện khả năng kích hoạt caspase-3, làm tăng mức độ enzyme phân cắt lần lượt là 2–4 lần sau 12 và 24 giờ, và tăng sự phân cắt, hoạt hóa của caspase-3 lên cao hơn 6 lần so với đối chứng âm là mẫu tế bào HL-60 khi không bị hoạt hóa ($p < 0,05$, Hình 2). Những kết quả này cho thấy 2 phân đoạn CVT-EtOAc và CVT-W có thể làm tăng hoạt hóa caspase-3 ở dòng HL-60 lên theo cách phụ thuộc vào nồng độ và thời gian ủ trong môi trường nuôi cấy tế bào.

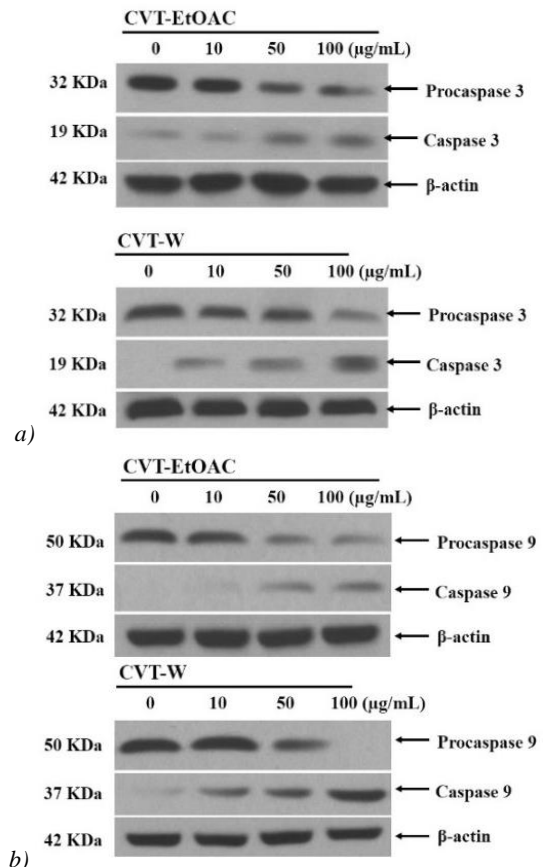
3.3. Hoạt tính thẩm tách miễn dịch Western blot

Để đánh giá thêm liệu CVT-EtOAc và CVT-W có thể gây ra apoptosis ở tế bào HL-60 hay không, nhóm tác giả sử dụng polymerase poly (ADP-ribose) đã phân cắt (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) xử lý với CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), thông qua phương pháp phân tích và biểu hiện protein dùng Western blot. Như thể hiện trong Hình 3, CVT-EtOAc và CVT-W gây ra sự biến đổi của PARP tạo ra dạng phân cắt của PARP (cleaved PARP). PARP là một protein có vai trò quan trọng trong việc giúp các tế bào bị hư hỏng tự sửa chữa. Đối với các tế bào thường, PARP có vai trò tự chỉnh sửa và phục hồi lại các tổn thương khi DNA bị đứt gãy trong quá trình phục hồi hư tổn. Tuy nhiên đối với tế bào ung thư, PARP có vai trò tự sửa chữa DNA bị hư hỏng trong tế bào ung thư khi có tác nhân bên ngoài, điều này cho phép các tế bào ung thư có khả năng kháng lại các tác nhân như thuốc điều trị hoặc hoá chất và tiếp tục phân chia

[31]. Do đó, đối với các dòng tế bào ung thư, các thuốc điều trị bằng cách ức chế hoạt động của protein PARP sẽ làm cho sự phát triển của khối u có thể bị chậm hoặc ngừng lại. Trong thí nghiệm này, CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) đã đóng vai trò ức chế và biến đổi cấu trúc của PARP thành dạng bị đứt ra (cleaved protein), theo đó, PARP sẽ không thực hiện được chức năng sửa chữa của mình để phục hồi hư tổn DNA của các tế bào ung thư. Đây là cơ chế chính của các thuốc chống ung thư theo con đường PARP. Phân tích hàm lượng protein cleaved PARP tạo ra cho thấy, hai phân đoạn CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) biến đổi thành phần protein PARP và cản trở khả năng tự sửa chữa của PARP, gây ra quá trình chết rụng tế bào HL-60 theo cách phụ thuộc vào nồng độ mẫu trong quá trình ủ với tế bào.



Hình 3. Hình ảnh biểu hiện PARP và cleaved PARP của HL-60



Hình 4. Ảnh hưởng của CVT-EtOAc và CVT-W lên biểu hiện protein hoạt hóa caspase-3 (A) và caspase-9 (B) trong tế bào HL-60

Tế bào được ủ với CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) trong 48 giờ. β -actin được sử dụng như một chất kiểm soát; Làn (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) có nghĩa tế bào được xử lý với DMSO 0,1%. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Tác động của CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lên sự hoạt hóa caspase-3 và caspase-9 tiếp tục được kiểm tra thêm ở dòng tế bào ung thư HL-60 (Hình 4). Thông thường, các caspase-3 tồn tại dưới dạng tiền chất không hoạt động có kích thước 32 kDa (procaspase-3) [8, 30]. Khi được kích hoạt, caspase-3 chuyển sang dạng hoạt hoá (activated caspase-3) gây ra sự phân cắt nhiều đoạn DNA của tế bào ung thư, có thể gây chết tế bào bằng cách khởi động con đường apoptosis thông qua việc phân cắt DNA protein thành các chất dị hợp tử. Trong khi caspase-3 được coi là kẻ hành quyết tế bào, caspase-9 cũng tham gia vào quá trình apoptosis của tế bào, enzyme này được mã hóa bởi gen CASP9, là chất khởi đầu quá trình chết của tế bào ung thư [30].

Tế bào được ủ với CVT-EtOAc và CVT-W (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) trong 48 giờ. β -Actin được sử dụng như một chất kiểm soát; Làn (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tế bào được xử lý với DMSO 0,1%. Các thí nghiệm được thực hiện trong ba lần lặp lại.

Trong thí nghiệm, CVT-EtOAc và CVT-W (0–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) đã được thêm vào tế bào HL-60, hỗn hợp dung dịch được ủ trong 48 giờ, sau đó, mức độ của biểu hiện protein apoptotic caspase-3 và caspase-9 được phát hiện trong các tế bào HL-60 bằng phương pháp Western blot. Kết quả trên Hình 4 cho thấy, cả 2 phân đoạn từ lá và cành Vối thuốc CVT-EtOAc và CVT-W (0–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) đều đã kích hoạt procaspase-3 và procaspase-9 thành dạng hoạt động của chúng. Theo đó, khi tăng nồng độ các phân đoạn này lên thì khả năng biểu hiện của các protein enzyme caspase-3 và caspase-9 cũng tăng lên. Điều này có thể đưa ra kết luận là cả 2 phân đoạn này đều gây ra quá trình chết theo dạng apoptosis của tế bào ung thư bạch cầu HL-60.

3.4. Thảo luận

Apoptosis là một dạng tự chết của tế bào (chết theo lập trình) xảy ra trong trường hợp bệnh lý trong các thể sinh vật và góp phần thay thế tế bào, tái tạo mô và loại bỏ các tế bào bị hư hỏng trong điều kiện bình thường [5, 6]. Hầu hết bệnh nhân ung thư là do sự biến đổi bất thường các vật liệu di truyền của tế bào trong quá trình phát triển. Những bất thường có thể do ảnh hưởng của các hóa chất gây ung thư như khói thuốc lá, bức xạ, hóa chất, hoặc các tác nhân lây nhiễm. Về mặt di truyền học, ung thư là một quá trình sai sót ngẫu nhiên trong sao chép DNA hoặc được di truyền, do đó nó có thể hiện diện trong tất cả các tế bào từ khi sinh ra [6-8]. Trên thực tế, sự tương tác phức tạp giữa các chất gây ung thư và hệ gen của vật chủ có thể giải thích cho sự phát triển ung thư ngay tức thời sau khi tế bào tiếp xúc với tác nhân kích thích. Có nhiều kiểu kích hoạt để bắt đầu quá trình apoptosis, trong đó có quá trình kích hoạt hệ enzyme caspase [8, 9, 30]. Các nhà khoa học đã tìm ra một trong những cơ chế quan trọng đó là các enzyme caspase được kích hoạt trước khi thay đổi ti thể [8, 9]. Các nghiên cứu nhận định rằng, sự hoạt hóa enzyme caspase-9 sau đó kích hoạt caspase-3 khởi động quá trình apoptosis. Các enzyme họ caspases còn có thể chia cắt nhiều dạng cấu trúc khác, bao gồm các yếu tố tạo cấu trúc tế bào, protein nhân, và

tiền protein, lamin, actin, và cấu trúc liên hợp ADP-ribose (PARP) [30, 31]. Sự phân cắt của các protein này được kết hợp với sự biến đổi hình thái của tế bào đã được chứng minh nhiều trong quá trình apoptosis [31].

Trên thế giới, có nhiều nghiên cứu ứng dụng dược liệu tự nhiên và các hoạt chất từ thực vật vào tiêu diệt tế bào ung thư và hỗ trợ điều trị các loại ung thư [29]. Hai loại thực vật đầu tiên được nghiên cứu là *Podophyllum peltatum* (Táo ma) và *Catharanthus roseus* (Dừa cạn). Thành phần chính của cây Táo ma là podophyllotoxin. Đây là tiền thân của nhóm hợp chất điều trị ung thư podophyllins. Một số thuốc điều trị ung thư thường được sử dụng hiện nay nằm trong nhóm podophyllins là etoposide và teniposide. Hai thành phần chính của cây Dừa cạn là vinblastine và vincristine được chứng minh có khả năng diệt tế bào ung thư. Một hợp chất quan trọng khác là paclitaxel (Taxol) [29, 32]. Taxol là một hợp chất được tìm thấy vỏ cây *Taxus brevifolia* (cây Thông đỏ). Taxol được sử dụng trong điều trị ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tụy và một vài loại ung thư khác [32].

Trước đây, nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc điều tra các dược liệu ở khu vực Miền Trung Tây Nguyên ứng dụng trong việc gây độc các tế bào ung thư tụy và ung thư máu [24-28]. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã phát hiện ra loài Vối thuốc có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của các dòng tế bào ung thư, trong đó có ung thư máu HL-60 và KG. Các tài liệu cho thấy, dịch chiết Vối thuốc ở Ấn Độ có tác dụng chống oxi hóa rất mạnh trên mô hình *in vitro* [40]. Một số hợp chất được tìm thấy trong Vối thuốc ở Trung Quốc cũng được đánh giá là có hoạt tính dược sinh học như kháng khuẩn, kháng virus, kháng ký sinh trùng sốt rét, kháng ung thư [18, 19]. Tuy nhiên, về thành phần hoá học của Vối thuốc thì còn khá nhiều hạn chế. Loài khác của Vối là Vối răng cưa *S. superba* đã được nghiên cứu nhiều hơn về thành phần hóa học và các hoạt tính sinh học [20-24]. Loài Vối răng cưa có chứa nhiều hợp chất dạng oleanane-type triterpenoid saponins, schisusaponins. Các chất này có tác dụng gây độc lên dòng tế bào ung thư biểu mô (B16 melanoma cells) [20-23]. Các chất này có khả năng ức chế tăng sinh của tế bào HeLa, CNE, HepG-2, và HEP-2 [20-23]. Đến nay, nghiên cứu về Vối thuốc ở Việt Nam còn hạn chế mặc dù đây là nguồn mẫu dồi dào và đáng được quan tâm về mặt ứng dụng dược học.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các phân đoạn ethyl acetate và nước của lá và cành Vối thuốc có khả năng ức chế sự tăng sinh của nhiều dòng tế bào ung thư, đặc biệt là dòng ung thư máu HL-60 và KG (Bảng 1). Hai phân đoạn này có thể chứa nhiều hoạt chất dạng triterpenoids có chứa đường, lignan, flavonoid và các polyphenol. Hai phân đoạn CVT-EtOAc và CVT-W đã được chứng minh là có thể tương tác lên PARP protein thông qua phản ứng Western Blot (Hình 2). Thêm vào đó, hai phân đoạn này cho thấy, khả năng kích hoạt hệ enzyme caspase bao gồm caspase-3 và caspase-9 (Hình 3A, B). Thông qua quá trình biểu hiện protein bằng phương pháp Western Blot, các enzyme này đều đã được kích hoạt từ dạng tiền enzyme procaspase-3 và procaspase-9 thành dạng hoạt động của chúng. Như vậy, có thể khẳng định rằng, cả 2 phân đoạn này đều chứa những

hoạt chất có thể tương tác vào DNA của tế bào ung thư HL-60 thông qua con đường tác động tới caspase và PARP.

4. Kết luận

Từ quá trình sàng lọc và tìm kiếm các cây thuốc có khả năng ức chế sự sinh trưởng của nhiều loại tế bào ung thư, nhóm tác giả đã tìm ra các phân đoạn ethyl acetate và nước chiết xuất từ cây Vối thuốc *S. wallichii* có khả năng tương tác vào PARP và enzyme caspase-3 và caspase-9 của tế bào ung thư máu HL-60. Kết quả này cho thấy phân đoạn phân cực của lá và cành Vối thuốc có thể chứa các hoạt chất tự nhiên tiềm năng cho việc phát triển và tìm kiếm thuốc trong tự nhiên để phòng chống và hỗ trợ điều trị ung thư, trong đó có ung thư máu. Kết quả này cũng làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để phân tích và tách chiết ra các hoạt chất dạng tinh khiết và thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gonzalez-Lugo J.D., Chakraborty S., Verma A., Shastri A., "The evolution of epigenetic therapy in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia", *Semin Hematol.* 58(1), 2021, 56-65.
- Larsson C.A., Cote G., Quintás-Cardama A., "The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome", *Mol Cancer Res.* 11(8), 2013, 815-27.
- Jhanwar S.C., "Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview", *Adv Biol Regul.* 58, 2015, 28-37.
- Saygin C., Carraway H.E., "Current and emerging strategies for management of myelodysplastic syndromes", *Blood Rev.* 48, 2021, 100791.
- De-Long, M.J., "Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann. NY Acad. Sci.* 842, 1988, 82-90.
- Bold R.J., Termuhlen P.M., McConkey D.J., "Apoptosis, cancer and cancer therapy", *Surg. Oncol.* 6, 1997, 133-142.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufman S.H., "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis", *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1999, 383-424.
- Asrorov A.M., Muhtidinov B., Tu B., Mirzaakhmedov S., Wang H., Huang Y., "Advances on delivery of cytotoxic enzymes as anticancer agents", *Molecules*, 27(12), 2022, 3836.
- Park S.S., Jeong H., Andrezza A.C., "Circulating cell-free mitochondrial DNA in brain health and disease: a systematic review and meta-analysis", *World J. Biol. Psychiatry.* 7, 2021, 1-38.
- Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei, X. Wang, "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase", *Cell*, 148, 2012, 213-227.
- Wang Z., Jiang H., Chen S., Du F., Wang X., "The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways", *Cell*, 148, 2012, 228-243.
- Chavda V.P., Ertas Y.N., Walhekar V., Modh D., Doshi A., Shah N., Anand K., Chhabria M., "Advanced computational methodologies used in the discovery of new natural anticancer compounds". *Front Pharmacol.* 12, 2021, 702611.
- Thomford N.E., Senthebane D.A., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi A., Dzobo K., "Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery", *Int. J. Mol. Sci.* 19(6), 2018, 1578.
- Katz L., Baltz R.H., "Natural product discovery: past, present, and future", *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43(2-3), 2016, 155-176.
- Đo Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 2004.
- Nguyễn Đức Minh. *Tính kháng khuẩn của cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 1975.
- Báo cáo về Vối thuốc*, mã số 13953/2017, tại Cục Thông tin KHCNQ.
- Lalhminghlui K., Jagetia G.C., "Evaluation of the free-radical scavenging and antioxidant activities of Chilauni, *Schima wallichii* Korth in vitro", *Future Sci OA.* 4(2), 2018, FSO272.
- Barliana M.I., Suradji E.W., Abdulah R., Diantini A., Hatabu T., Nakajima-Shimada J., Subarnas A., Koyama H., "Antiplasmodial properties of kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*", *Biomed. Rep.* 2(4), 2014, 579-583.
- Dewanjee S., Mandal V., Sahu R., Dua T.K., Manna A., Mandal S.C., "Anti-inflammatory activity of a polyphenolic enriched extract of *Schima wallichii* bark", *Nat. Prod. Res.* 25(7), 2011, 696-703.
- Wu C., Wu H.T., Wang Q., Wang G.H., Yi X., Chen Y.P., Zhou G.X., "Anticandidal potential of stem bark extract from *Schima superba* and the identification of its major anticandidal compound", *Molecules.* 24(8), 2019, 1587.
- Wu C., Zhang R.L., Li H.Y., Hu C., Liu B.L., Li Y.L., Zhou G.X., "Triterpenoid saponins from the root bark of *Schima superba* and their cytotoxic activity on B16 melanoma cell line", *Carbohydr Res.* 413, 2015, 107-114.
- Xu W., Wang H., Zhou G.X., Yao X.S., "Two new 8-O-4'-type lignans from the stem of *Schima superba* and their cell growth inhibitory activities against human cancer cell lines", *J. Asian Nat. Prod Res.* 12(10), 2010, 874-878.
- Hung T. M., Dang N. H., Dat N.T., "Methanol extract from Vietnamese *Caesalpinia sappan* induces apoptosis in HeLa cells", *Biol. Res.* 47(1), 2014, 20.
- Tran M.H., Nguyen M.T., Nguyen H.D., Nguyen T.D., Phuong T.T., "Cytotoxic constituents from the seeds of Vietnamese *Caesalpinia sappan*", *Pharm. Biol.* 53(10), 2015, 1549-1554.
- Hung T.M., Cuong T.D., Kim J.A., Lee J.H., Woo M.H., Min B.S., "In vitro apoptotic effect of cassaine-type diterpene amides from *Erythrophleum fordii* on PC-3 prostate cancer cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24(21), 2014, 4989-4994.
- Tae N., Hung T.M., Kim O., Kim N., Lee S., Na S., Min B.S., Lee J.H., "A cassaine diterpene alkaloid, 3 β -acetyl-nor-erythrophlamide, suppresses VEGF-induced angiogenesis and tumor growth via inhibiting eNOS activation", *Oncotarget*, 8(54), 2017, 92346-92358.
- Vo P.H.T., Nguyen T.D.T., Tran H.T., Nguyen Y.N., Doan M.T., Nguyen P.H., Lien G.T.K., To D.C., Tran M.H., "Cytotoxic components from the leaves of *Erythrophleum fordii* induce human acute leukemia cell apoptosis through caspase-3 activation and PARP cleavage", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 31, 2021, 27673.
- Ghanbari-Movahed M., Kaceli T., Mondal A., Farzaei M.H., Bishayee A., "Recent advances in improved anticancer efficacies of camptothecin nano-formulations: A systematic review", *Biomedicines*, 9(5), 2021, 480.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.E., Green D.R., Martin S.J., "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner", *J. Cell Biol.* 144, 1999, 281-292.
- Piombino C., Cortesi L., "Insights into the possible molecular mechanisms of resistance to PARP inhibitors", *Cancers (Basel)*, 14(11), 2022, 2804.
- Qariq A., Sadia S., Pan K., Ullah I., Mussarat S., Sun F., Abiodun O.O., Batbaatar A., Li Z., Song D., Xiong Q., Ullah R., Khan S., Basnet B.B., Kumar B., Islam R., Adnan M., "A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants", *Phytother Res.* 31(2), 2017, 202-264.