

TÁC ĐỘNG KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ MÁU K562 CỦA CAO CHIẾT THÔ VÀ PHÂN ĐOẠN TỪ CÂY NGẢI CỨU

Hoàng Thành Chí⁽¹⁾, Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 21/7/2022; Ngày phản biện 24/7/2022; Chấp nhận đăng 25/8/2022

Liên hệ Email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.05.338>

Tóm tắt

Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy (BCMDT) là một bệnh lý ác tính của máu và tủy xương xảy ra ở trẻ em và người lớn. Hiện nay, đã có ít nhất bốn thế hệ thuốc điều trị đã được sản xuất và chứng minh là có hiệu quả điều trị tuy nhiên vấn đề kháng thuốc vẫn chưa được giải quyết triệt để, do đó cần phải tìm kiếm những thuốc mới hoặc phương thức điều trị mới. Ngải cứu còn được gọi là cây thuốc cứu, cây thuốc cao, ngải điệp, có tên khoa học là *Artemisia vulgaris* L. thuộc họ Cúc. Ngải cứu là một vị thuốc thông dụng, mọc hoang ở nhiều nơi tại Việt Nam, ngoài ra còn có ở nhiều nước châu Á, châu Âu khác. Ngải cứu thường được dùng điều trị các vấn đề về tiêu hóa, chữa nôn mửa, thuốc giun, sốt rét... Nghiên cứu này tập trung vào việc đánh giá tác động gây độc tế bào K562 của cao chiết tổng và cao chiết phân đoạn của ngải cứu. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng cao chiết tổng của cây ngải cứu có khả năng ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư máu K562. Cụ thể là sự tác động của cao chiết lên sự tăng sinh của tế bào ung thư máu K562 là phụ thuộc vào thời gian và nồng độ cao chiết. Ngoài ra, cao chiết phân đoạn chloroform của ngải cứu cho thấy có chứa nhiều hợp chất tiềm năng điều trị ung thư máu và cần được tiến hành nghiên cứu thêm.

Từ khóa: *Artemisia vulgaris*, khả năng kháng tế bào, K562, ngải cứu

Abstract

ANTI-LEUKEMIA EFFECT OF AR CRUDE AND FRACTIONS EXTRACTS

Chronic myeloid leukemia is a malignancy of the blood and bone marrow that occurs in children and adults. At least four generations of therapeutic drugs have been produced and proven to be effective, but the problem of drug resistance has not been completely solved, so it is necessary to search for new drugs or new treatment modalities. *Artemisia vulgaris*, belonging to the daisy family, is a common medicine, growing wild in many places in Vietnam, in addition to many other Asian and European countries. *A. vulgaris* is commonly used in the treatment of digestive problems, vomiting, anthelmintics, malaria, etc. This study focused on evaluating the cytotoxic effects of K562 of the total and fractional extracts of *A. vulgaris*. The results of the study demonstrated

that the total extract of A. vulgaris has the ability to inhibit the growth of the leukemia cell line K562. Specifically, the effect of the extract on the proliferation of K562 cells was dependent on the time and concentration of the extract. Also, the chloroform fraction of A. vulgaris has been shown to have many compounds that could be used to treat leukemia, but more research is needed.

1. Đặt vấn đề

Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy (BCMDT) là một bệnh lý ác tính của máu và tủy xương xảy ra ở trẻ em và người lớn. Khoảng 90-95% bệnh nhân mắc BCMDT được phát hiện có sự hiện diện của nhiễm sắc thể Philadelphia. Đây là nhiễm sắc thể số 22 mới được hình thành do chuyển đoạn nhiễm sắc thể số 9 mang gen ABL và nhiễm sắc thể 22 mang gen BCR, gọi là chuyển đoạn t(9,22), kết quả dẫn đến việc hình thành nhiễm sắc thể Philadelphia, chứa gen BCR-ABL. Gen BCR-ABL mã hóa protein thuộc họ tyrosine kinase là BCR-ABL có thể tự hoạt hóa chức năng khởi phát con đường sinh ung thư và dẫn đến sự phát triển của bệnh BCMDT (Chereda và nnk., 2015). Do sự ra đời của imatinib, một chất ức chế tyrosine kinase, bệnh nhân BCMDT hiện được hưởng lợi từ việc điều trị (Hochhaus và nnk., 2017). Tuy nhiên, sau thời gian điều trị thì phát sinh vấn đề kháng imatinib. Hiện nay, đã có ít nhất bốn thế hệ thuốc ức chế tyrosine kinase đã được sản xuất và chứng minh là có hiệu quả điều trị tuy nhiên vấn đề kháng thuốc vẫn chưa được giải quyết triệt để, do đó cần phải tìm kiếm những thuốc mới hoặc phương thức điều trị mới.

Ngải cứu còn được gọi là cây thuốc cứu, cây thuốc cao, ngải điệp, có tên khoa học là *Artemisia vulgaris* L. thuộc họ Cúc. Ngải cứu là một vị thuốc thông dụng, mọc hoang ở nhiều nơi tại Việt Nam, ngoài ra còn có ở nhiều nước châu Á, châu Âu khác. Đông y coi ngải cứu là một vị thuốc có tính hơi ôn, vị cay, dùng làm thuốc chữa đau bụng do hàn, an thai, điều kinh. Ngoài ra, ngải cứu còn được dùng điều trị các vấn đề về tiêu hóa, chữa nôn mửa, thuốc giun, sốt rét (Lợi, 2004). Năm 2013, Sharmila và cộng sự nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư của ngải cứu trên dòng tế bào ung thư gan (HEPG2) với giá trị IC₅₀ khoảng 0,1mg được xác định bằng phương pháp MTT (Sharmila và nnk., 2013). Chiết xuất methanol của các bộ phận trên không từ cây ngải cứu đã được các nhà nghiên cứu ở Thổ Nhĩ Kỳ thử nghiệm để phân tích tác dụng gây độc tế bào đối với một số dòng tế bào ung thư ở người và các dòng tế bào bình thường. Saleh và cộng sự đã đánh giá độc tính của tinh dầu chiết xuất từ chồi và lá của cây ngải cứu về tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Các kết quả đã chứng minh rằng quá trình apoptosis do tinh dầu gây ra ở dòng tế bào bạch cầu HL-60 qua các con đường phụ thuộc caspase, liên quan đến caspase-3, -9 và -8, được bắt đầu bởi Bcl-2/Bax/Bid, dẫn đến giải phóng cytochrome c ra tế bào chất để hoạt hóa caspase. Kết quả của 2 nghiên cứu đều cho thấy khả năng gây độc trên các dòng tế bào ung thư khác nhau. Dựa trên những quan sát này, các tác giả cho rằng ngải cứu có thể là một nguồn đầy hứa hẹn của các chất chống ung thư mới (Erel và nnk., 2011; Saleh và nnk., 2014). Năm 2020, nhóm nghiên cứu Serbia đã chứng minh chiết xuất

methanol của cây ngải cứu có khả năng gây độc tế bào, thực hiện trên dòng tế bào ung thư ruột kết SW-480. Các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng hoạt tính này được gây ra bởi các flavonoid và các hợp chất phenol khác có trong cây (Jakovljević và nnk., 2020).

Nghiên cứu này tập trung vào việc đánh giá tác động gây độc tế bào K562 của cao chiết tổng và cao chiết phân đoạn của Ngải cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị cao chiết

Mẫu cây ngải cứu được thu hái tại vùng Bảy Núi tỉnh An Giang vào tháng 9/2017. Mẫu cây sau khi thu hái được loại bỏ các lá hư hỏng, sâu bệnh và rửa sạch với nước trước khi tiến hành sấy khô ở 40°C trong tủ sấy cho đến khi mẫu lá khô hoàn toàn và có trọng lượng không thay đổi. Tiến hành xay và lọc qua rây để thu được bột khô ngải cứu. Bột được tiến hành ngâm với lượng methanol vừa đủ, lắc liên tục trong 5 ngày. Dịch chiết được thu nhận bằng cách lọc qua giấy lọc whattman sau đó cho bay hơi dung môi với áp suất thấp ở 40°C để thu được cao chiết thô. Cao thô được định lượng và hoà tan trong DMSO (Sigma-Aldrich) với nồng độ cuối là 200mg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45µm và 0,22µm trong điều kiện vô trùng. Chia nhỏ thành từng eppendorf, bảo quản ở tủ -20°C cho tới khi sử dụng (Nguyễn-Kim-Phi-Phụng, 2007).

Để thu cao phân đoạn, dịch chiết methanol thô của ngải cứu được pha với nước và lần lượt chiết lỏng-lỏng với các dung môi theo độ phân cực tăng dần, từ n-hexan tiếp theo là chloroform và sau đó bằng ethyl axetate (EtOAc) và cuối cùng là nước. Sau đó được cô đặc bằng máy cô quay chân không để tạo ra các phân đoạn tương ứng.

2.2. Tế bào và điều kiện nuôi cấy tế bào

Các tế bào K562 được nuôi cấy trong môi trường Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) có bổ sung 10% huyết thanh nhau thai bò (Thermofisher Scientific), 100IU/mL penicilin và 0,1mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) sau đó ủ trong tủ ẩm 5% CO₂ ở 37°C.

2.3. Thử nghiệm đánh giá độc tính tế bào

Tế bào huyền phù được phân phối vào trong các đĩa 6 giếng ở mật độ 10⁵ tế bào/mL có hoặc không có sự hiện diện của cao chiết ở nồng độ khác nhau. Sau thời gian xử lý, tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm trypan blue để đánh giá tác động của các loại cao chiết lên sự tăng sinh của tế bào (Chi và nnk., 2012).

2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần và được phân tích bằng phần mềm Graphpad prism phiên bản 9.0.0. Phân tích hồi quy phi tuyến được thực hiện để xác định nồng độ ngải cứu mà tại đó ức chế 50% quần thể tế bào (IC₅₀). Sự khác biệt đáng kể được xác định bằng giá trị p là 0,05. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình

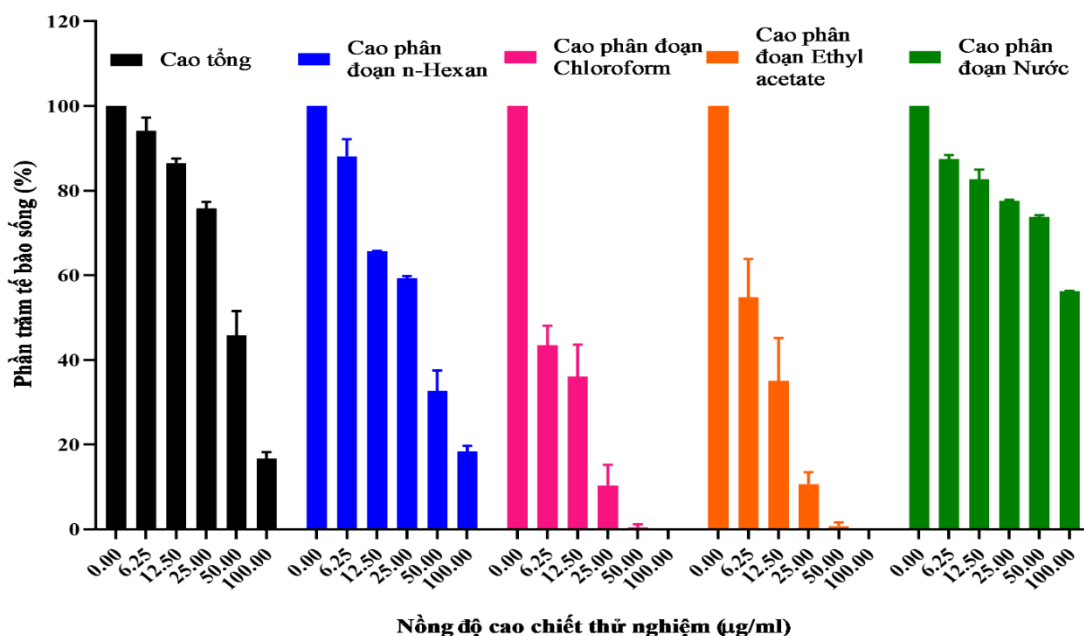
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Tác động của cao chiết thô và cao chiết phân đoạn của ngải cứu trên dòng tế bào K562

Cao chiết tổng và cao chiết phân đoạn từ cây ngải cứu được đánh giá độc tính trên dòng tế bào ung thư máu K562 ở các nồng độ khác nhau.

Kết quả trên hình 1 cho thấy cao chiết tổng ức chế sự phát triển của các tế bào K562 phụ thuộc vào nồng độ cao chiết với giá trị IC₅₀ được ghi nhận như trong bảng 1. Nhìn chung thì khi nồng độ cao chiết càng tăng thì số lượng tế bào sống càng giảm.

Vì dịch chiết thô ngải cứu thường chứa nhiều thành phần chất khác nhau, do đó chúng tôi đã tiến hành chiết lỏng – lỏng phân đoạn cao tổng thành 4 phân đoạn nhỏ hơn tương ứng với độ phân cực dung môi tăng dần bằng cách hòa tan dịch chiết thô trong các dung môi khác nhau, từ không phân cực (n-hexan) đến phân cực thấp (chloroform), phân cực trung bình (ethyl acetate) và phân cực mạnh (nước). Tiếp theo, chúng tôi tiến hành kiểm tra độc tính của các cao chiết phân đoạn đối với sự tăng sinh tế bào K562. Điều thú vị là chúng tôi phát hiện ra rằng phân đoạn chloroform và ethyl acetate đã ngăn chặn rất hiệu quả sự phát triển của tế bào K562, trong khi phân đoạn nước thì không có tác động rõ (Hình 1).



Hình 1. Kết quả đánh giá độc tính cao chiết tổng và cao chiết phân đoạn cây ngải cứu trên tế bào K562

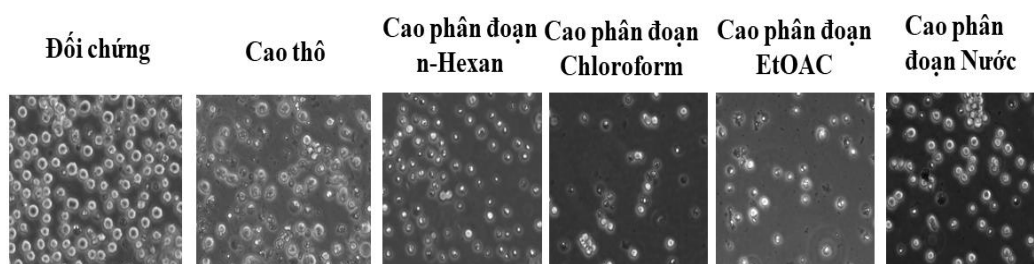
Cao chiết phân đoạn chloroform và phân đoạn ethyl acetate cho kết quả ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào K562 (giá trị IC₅₀ lần lượt là $5,84 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$; $7,48 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$, bảng 1) tốt hơn so với phân đoạn n-hexan và nước. Như vậy, kết quả này cho phép kết luận rằng cao chiết phân đoạn chloroform và phân đoạn ethyl acetate của ngải cứu có chứa nhiều hợp chất tiềm năng điều trị ung thư máu, cần được nghiên cứu thêm.

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ của các cao chiết thử nghiệm trên dòng tế bào K562

	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)
Cao thô	44.27 ± 1.43
Cao phân đoạn n-Hexan	28.50 ± 1.48
Cao phân đoạn Chloroform	5.84 ± 0.64
Cao phân đoạn EtOAc	7.48 ± 0.50
Cao phân đoạn Nước	184.14 ± 23.63

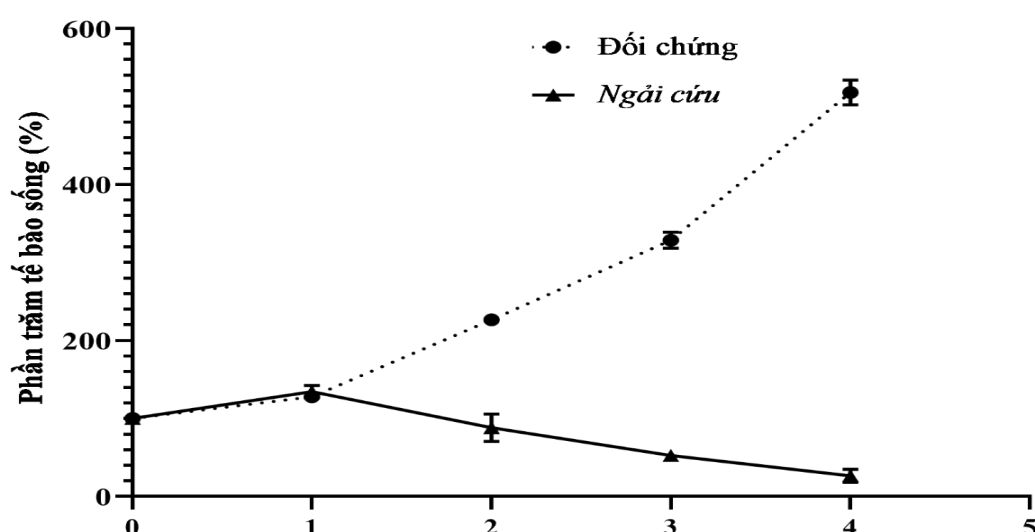
3.2. Sự thay đổi hình thái tế bào dưới tác động của cao chiết ngải cứu

Hình 2 minh họa sự thay đổi về hình thái của tế bào sau 72 giờ ủ với cao chiết tổng và cao chiết phân đoạn của ngải cứu ở nồng độ 100µg/ml. Nhận xét chung, so với tế bào ở giếng đối chứng có thể nhìn rõ nhân và màng tế bào thì ở các nghiệm thức xử lý với cao chiết đều cho thấy tế bào bị co lại và khi nhuộm trypan blue thì quần thể tế bào gần như bắt màu hoàn toàn với thuốc nhuộm thể hiện tế bào đã chết. Riêng ở cao phân đoạn nước thì cụm tế bào còn sống thấy rõ nhân và màng tế bào còn nguyên vẹn rất nhiều.



Hình 2. Kết quả quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi soi ngược khi xử lý tế bào với các cao chiết cây ngải cứu

3.3. Độc tính của cao chiết ngải cứu theo thời gian trên dòng tế bào ung thư máu K562



Hình 3. Phần trăm tế bào TCCY và TCCY-T315I sống theo thời gian dưới tác động của ngải cứu

Dựa trên giá trị IC_{50} ở thí nghiệm trên, chúng tôi tiếp tục đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào K562 của cao chiết ngải cứu theo thời gian. Kết quả được thể hiện qua hình 3 cho thấy, số tế bào sống sau khi ủ với cao chiết ngải cứu giảm dần qua từng ngày và đến ngày thứ 4 thì hầu như không còn tế bào sống. Trong khi ở giếng đối chứng không có cao chiết ngải cứu thì số tế bào sống tăng dần theo ngày và đạt mật độ cao ở ngày thứ 4.

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng cao chiết tổng của cây ngải cứu có khả năng ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư máu K562. Cụ thể là sự tác động của cao chiết lên sự tăng sinh của tế bào ung thư máu K562 là phụ thuộc vào thời gian và nồng độ cao chiết. Ngoài ra, cao chiết phân đoạn chloroform của ngải cứu cho thấy có chứa nhiều hợp chất tiềm năng điều trị ung thư máu và cần được tiến hành nghiên cứu thêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chereda, B., & Melo, J. V. (2015). Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*, 94 Suppl 2, S107-121. doi: 10.1007/s00277-015-2325-z
- [2] Chi, H. T., Ly, B. T., Kano, Y., Tojo, A., Watanabe, T., & Sato, Y. (2012). ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. *Biochem Biophys Res Commun*, 429(1-2), 87-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.087
- [3] Erel, Ş. B., Şenol, S. G., Köse, F. A., & Ballar, P. (2011). In vitro cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turk J Pharm Sci*, 8(3), 247-252.
- [4] Hochhaus, A., Larson, R. A., Guilhot, F., Radich, J. P., Branford, S., Hughes, T. P., . . . Investigators, I. (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376(10), 917-927. doi: 10.1056/NEJMoa1609324
- [5] Jakovljević, M. R., Grujičić, D., Vukajlović, J. T., Marković, A., Milutinović, M., Stanković, M., . . . Milošević-Djordjević, O. (2020). In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra. *South African Journal of Botany*, 132, 117-126.
- [6] Lợi, Đ. T. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*.
- [7] Nguyễn-Kim-Phi-Phụng (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [8] Saleh, A. M., Aljada, A., Rizvi, S. A., Nasr, A., Alaskar, A. S., & Williams, J. D. (2014). In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1-15.
- [9] Sharmila, K., & Padma, P. (2013). Anticancer activity of *Artemisia vulgaris* on hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, 5(3), 479-483.