

Đánh giá hoạt tính độc tế bào của cao chiết từ lá hải kim sa (*Lygodium japonicum*) trên dòng tế bào ung thư MCF-7 và HepG2

Hoàng Anh Trúc, Trần Lê Phương Linh, Nguyễn Kim Oanh,
Trần Hữu Thanh và Bùi Thanh Phong^{*}
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Nghiên cứu điều trị ung thư từ các hợp chất chiết xuất từ dược liệu đã được nghiên cứu từ rất lâu. Lá hải kim sa (*Lygodium japonicum*) được sử dụng trong dân gian để điều trị ung thư nhưng chưa có nghiên cứu khoa học nào nhằm chứng minh hoạt tính này. **Mục tiêu nghiên cứu:** Đề tài này được thực hiện nhằm khảo sát hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ lá hải kim sa. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Lá hải kim sa được chiết xuất bằng ethanol 96% thu được cao toàn phần (cao TP). Một phần cao TP được hòa vào nước và được chiết phân đoạn với các dung môi n-hexane, chloroform, n-butanol thu được các cao chiết tương ứng. Tất cả các cao chiết được xác định khả năng gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư là MCF-7 và HepG2 theo phương pháp Sulforhodamine B. **Kết quả:** Các cao chiết của hải kim sa không thể hiện hoạt tính ức chế tế bào HepG2. Hoạt tính ức chế tế bào MCF-7 của các cao chiết cũng thấp, cao CF có hoạt tính ức chế tế bào MCF cao nhất là $14.55 \pm 4.02\%$ (nồng độ $100 \mu\text{g/mL}$). **Kết luận:** Cao chiết hải kim sa không thể hiện hoạt tính ức chế hai dòng tế bào ung thư là Hep G2 và MCF-7.

Từ khóa: hải kim sa, *Lygodium japonicum*, SRB, HepG2, MCF-7

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là một nhóm bệnh lý ngày càng phổ biến, liên quan đến sự đột biến trong yếu tố di truyền, dẫn đến sự tăng sinh mất kiểm soát của tế bào và có thể gây tử vong [1]. Hiện nay, bệnh nhân được điều trị bằng các phương pháp như phẫu thuật, xạ trị, hóa trị. Phần lớn trong số đó không đặc hiệu đối với tế bào ung thư và gây nên nhiều tác dụng phụ nghiêm trọng. Kể cả khi đã kết thúc điều trị, người bệnh vẫn có thể chịu nhiều biến chứng như mệt mỏi, đau nhức, rối loạn nội tiết, vô sinh và các vấn đề về sức khỏe tình dục, hoặc nguy hiểm hơn, là phù mạch bạch huyết và các biến chứng trên tim mạch [2]. Do đó, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã và đang nỗ lực tìm ra giải pháp mới hỗ trợ điều trị bệnh hiệu quả, hạn chế gây nên nhiều tác dụng phụ không mong muốn, góp phần cải thiện chất lượng sống cho người

bệnh. Nhiều dược liệu được người dân sử dụng chứa các hợp chất tự nhiên được đánh giá là có thể tăng khả năng phòng ngừa ung thư cho cơ thể. Một số hợp chất đã được chiết xuất, nghiên cứu và ứng dụng thành công vào sản xuất các thuốc hỗ trợ hoặc điều trị ung thư, bao gồm paclitaxel từ vỏ các cây thuộc chi *Taxus*, camptothecin từ lá cây *Camptotheca acuminata*, vinca alkaloid từ lá cây *Catharanthus roseus*, roscovitine từ thân rễ của *Raphanus sativus*, cùng với một số alkaloid khác hay các phenolic acid [3].

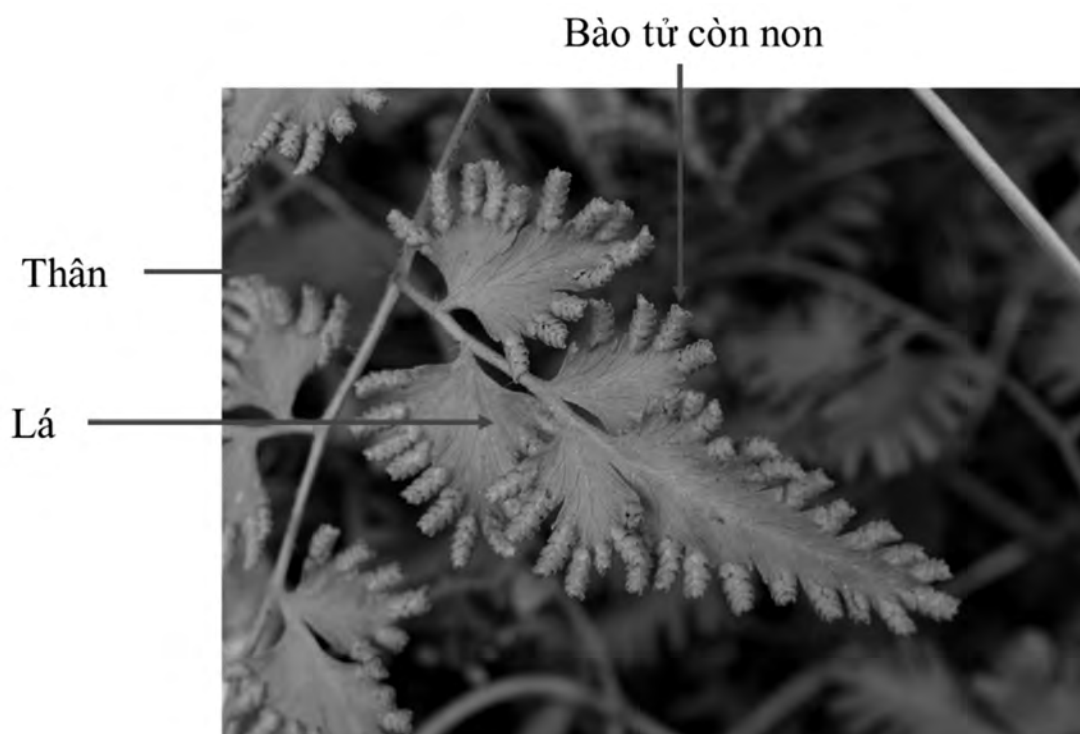
Lygodium japonicum (Thunb) Sw. (hải kim sa) họ Lygodiaceae có nguồn gốc từ các nước Đông Á và hiện nay đã lan rộng một cách khó kiểm soát ra các nước Âu - Mỹ. Là một loài dương xỉ thân rễ, chúng mọc nhiều ở vùng thấp dưới 600 m với sức

Tác giả liên hệ: ThS. Bùi Thanh Phong

Email: phongbui0407@gmail.com

sống và sức lan rộng tốt ở điều kiện thích hợp [4]. Lá hải kim sa chứa polysaccharide, polyphenol, glycoside, đường khử và terpenoid, tuy nhiên, trong rễ có cả flavonoid, quinone, acid phenol, và steroid [5-7]. *L.japonicum* được ứng dụng trong những bài thuốc dân gian có hiệu quả như lợi tiểu, trị nhiễm trùng, kháng viêm, làm tiêu tan sỏi niệu, giải nhiệt và đã được khảo sát hiệu quả bảo vệ gan, kháng virus ở dịch chiết rễ [7]. Các nhóm hợp chất như glycoside, polyphenol, polysaccharide, steroid, đường khử và ter-

penoid trên các loài khác đã cho thấy khả năng gây độc tế bào trên nhiều dòng tế bào ung thư bằng nhiều cơ chế khác nhau [8-10]. Do vậy, đề tài nghiên cứu “Khả năng kháng ung thư của cao chiết từ cây hải kim sa (*Lygodium japonicum*)” được thực hiện nhằm cung cấp thêm dữ liệu hỗ trợ quá trình nghiên cứu khả năng ứng dụng dược liệu này trong ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư. Việc thúc đẩy sử dụng loài thực vật này đồng thời góp phần kiểm soát sự xâm lấn của nó đối với môi trường sống tự nhiên.



Hình 1. Lá hải kim sa

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là lá kèm bào tử cây hải kim sa được thu hái tại tỉnh Long An, Việt Nam. Mẫu lá được phơi khô, xay nhuyễn thành bột nửa thô qua rây 710 μm và chiết xuất.

2.2. Hóa chất

Hóa chất gồm các dung môi ethanol, n-hexan, chloroform, n-butanol từ hãng Fisher (USA); các hóa chất trichloroacetic acid (TCA), sulforhodamin B 0.2%, acid acetic 1%, Tris-base 10mM, Di-methyl sulfoxide (DMSO), Camptothecin (chứng dương) từ hãng Sigma; các dòng tế bào ung thư MCF-7 (ung thư vú) và HepG2 (ung thư gan) do Phòng Sinh

học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

2.3. Trang thiết bị

Thiết bị đạt tiêu chuẩn sử dụng trong phòng thí nghiệm, gồm máy cô quay chân không, máy Vortex, bình chiết, tủ cấy vô trùng, tủ hấp tiệt trùng, micropipette và đầu col 10 μL đến 10 mL đã được hấp khử trùng; đèn cồn, que cấy kim loại, và các thiết bị cơ bản của phòng thí nghiệm.

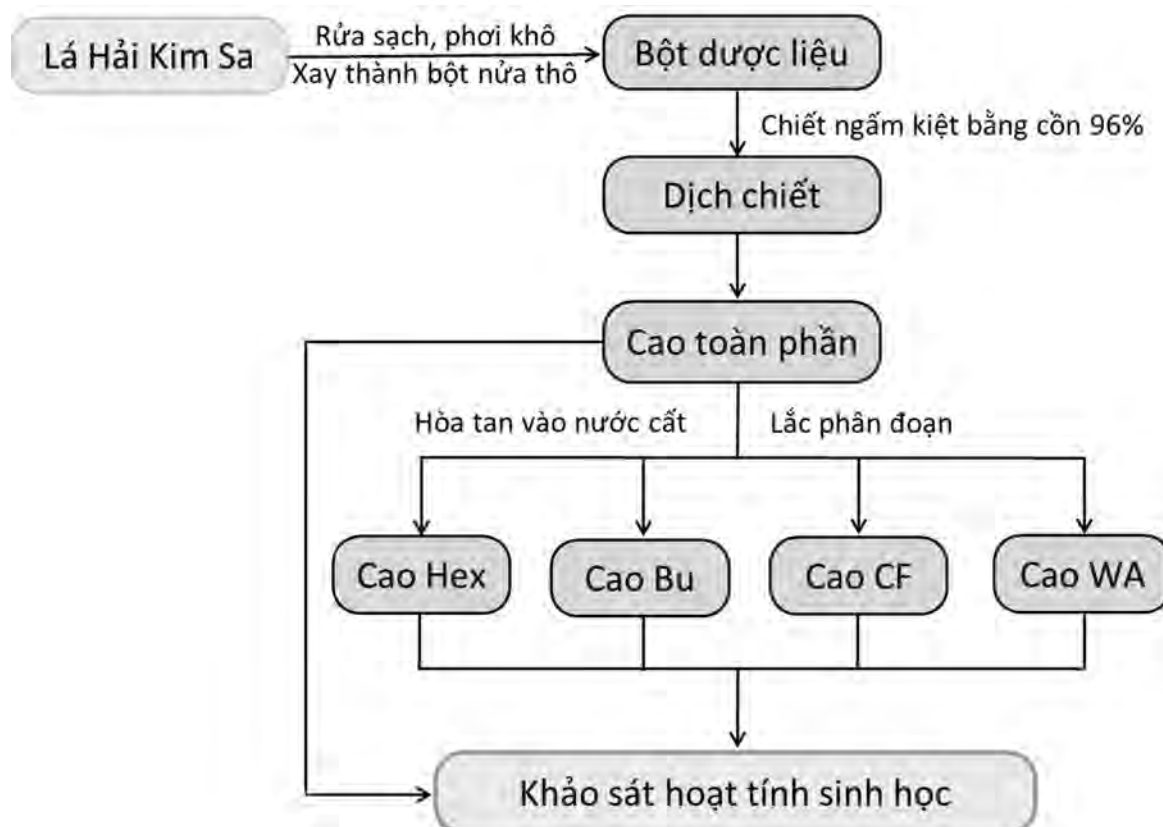
2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Quy trình chiết xuất

Dược liệu được thu hoạch sau đó rửa sạch, cắt nhỏ, phơi khô rồi xay thành bột nửa thô, chiết

ngấm kiệt bằng dung môi ethanol 96% với tỷ lệ được liệu: dung môi là 1:25 (w/v) từ 3-5 ngày thu được dịch chiết. Sau đó, lấy dịch chiết cô đặc lại thu được cao toàn phần. Lấy một lượng cao toàn phần (TP) hòa tan vào nước cất, lần lượt chiết phân đoạn với các dung môi theo độ phân cực

tăng dần là n-hexan, chloroform và n-butanol thu được các cao chiết lần lượt là cao n-hexan (HE), cao chloroform (CF), cao n-butanol (BU), cao nước (WA). Tiến hành cô đặc các cao (độ ẩm dưới 5%) và bảo quản lạnh trước khi sử dụng khảo sát.



Hình 2. Quy trình chiết xuất Lá hải kim sa

2.4.2. Quy trình đánh giá hoạt tính kháng ung thư bằng thử nghiệm SRB

Thử nghiệm SRB (Sulforhodamin B) là phương pháp so màu, xác định độc tính tế bào của một chất thông qua sự thay đổi lượng tế bào so với mẫu chứng theo Nguyễn Thái Hoàng Tâm và cộng sự (2007) [11].

Tế bào ung thư được nuôi cấy đến thế hệ thứ 4, khi đạt độ phủ khoảng 80% thì tiến hành phủ tế bào trên các giếng đĩa với mật độ tế bào/giếng ban đầu là 10^4 tế bào/giếng theo thiết kế (*), ủ 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung môi trường hòa tan cao chiết với nồng độ 100 µg/mL rồi ủ tiếp 48 giờ. Cố định tế bào bằng TCA, làm lạnh (4°C, 1-3 giờ), rửa và để khô ở nhiệt độ phòng 12-24 giờ. Cho vào mỗi giếng dung dịch SRB 0.2%, ủ 5-20 phút, loại bỏ và rửa nhẹ với dung dịch acid acetic

1%, để khô ở nhiệt độ phòng 12-24 giờ. Cho vào mỗi giếng 200 µL tris-base 10 mM, lắc trên máy cho SRB tan hoàn toàn, đo mật độ quang ở bước sóng 492 nm và 620 nm.

(*) Thiết kế khảo sát, gồm có: 1 mẫu chứng dương chứa tế bào với Camptothecin ở nồng độ 0.06 µg/mL với MCF-7, và 0.07 µg/mL với HepG2; 1 mẫu đối chứng (từng loại tế bào với dung môi hòa tan chất thử DMSO 0.25%).

Xử lý kết quả khi có giá trị mật độ quang ở bước sóng 492 nm và 620 nm (kí hiệu OD_{492} và OD_{620}), tính giá trị $OD = OD_{492} - OD_{620}$ (1), tính OD_{492} (hoặc OD_{620}) = $OD_{tb} - OD_{blank}$ (2).

Tính tỷ lệ (%) gây độc tế bào: $\%I = (1 - \frac{OD_{TN}}{OD_C}) \times 100\%$, với: OD_{tb} là giá trị OD của giếng có chứa tế bào, OD_{blank} là giá trị OD của giếng blank, OD_{TN} là giá trị OD

của mẫu thử từ công thức (1) và (2), OD_c là giá trị OD của mẫu chứng từ công thức (1) và (2).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả chiết cao

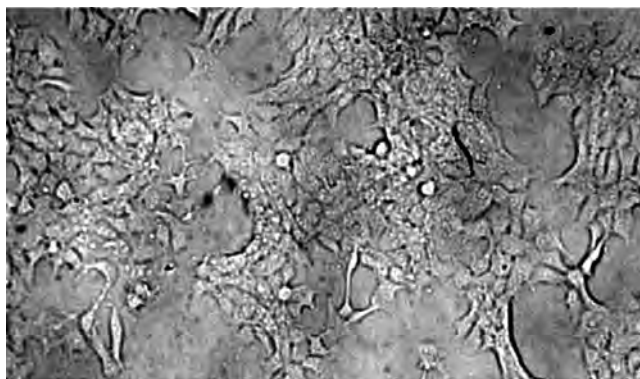
Từ 500g dược liệu chiết với 10 lít cồn 96% thu được 50.83g cao TP. Lấy 18g cao hòa với nước để chiết phân đoạn lần lượt với HE, CF, BU cho ra là 4,88g cao HE; 0.96g cao CF; 2.1g cao BU; 9.8g cao WA. Độ ẩm các cao chiết từ hải kim sa dưới 5%.

3.2. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư vú MCF-7 của các cao chiết lá hải kim sa

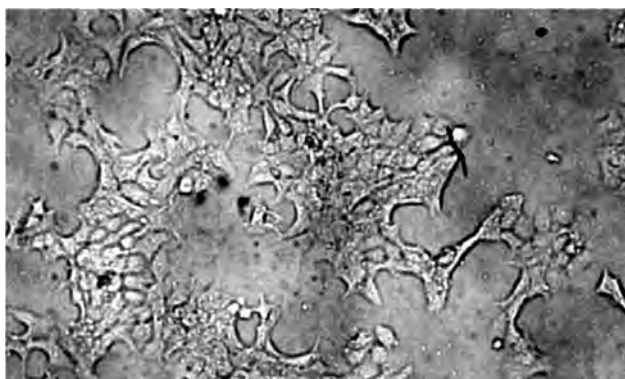
Nhìn chung, tất cả cao chiết từ hải kim sa cho tỷ lệ ức chế dòng tế bào MCF-7 thấp (gần như không

đáng kể). Hoạt tính ức chế tế bào ung thư vú MCF-7 được thể hiện cao nhất ở cao phân đoạn CF ($14.55 \pm 4.02\%$), sau đó là HE, và thấp nhất là cao WA (1.63 ± 1.47). Tuy nhiên, mức độ gây độc của lá hải kim sa là khá yếu so với chứng dương camptothecin ($53.57 \pm 0.33\%$) ở nồng độ $0.05 \mu\text{g/mL}$.

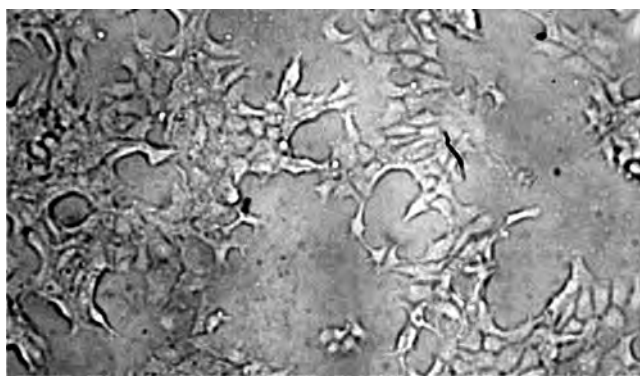
Nhiều nghiên cứu về loài *L.japonicum* cho thấy loài này chứa nhiều hoạt chất có hoạt tính như ức chế tế bào ung thư đại trực tràng [12], đồng thời cao chiết bằng ethanol từ bào tử *L.japonicum* cũng có hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế NF- κ B và p38 [13]. Do đó, sự đánh giá cao chiết từ hải kim sa chỉ đầy đủ khi khảo sát thêm hoạt tính gây độc tế bào ung thư ở nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau.



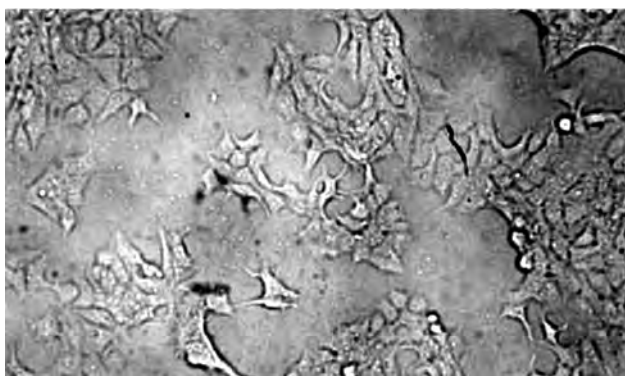
(A)



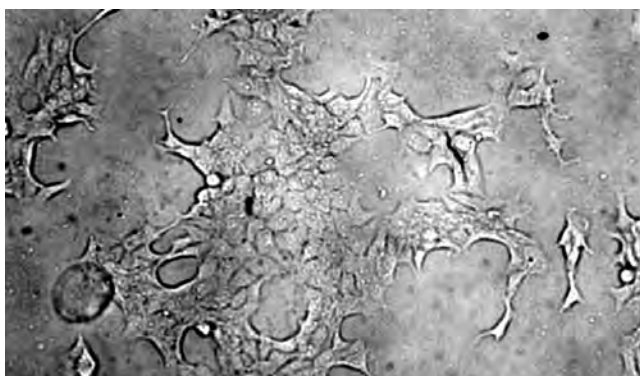
(B)



(C)



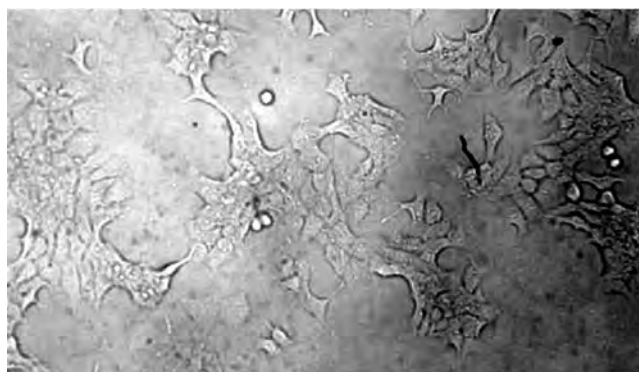
(D)



(E)



(F)



Chú thích:

- (A): Cao toàn phần (TP)
- (B): Cao HE
- (C): Cao CF
- (D): Cao BU
- (E): Cao WA
- (F): Camptothecin 0.05 µg/ml
- (G): DMSO

(G)

Hình 3 (A, B, C, D, E, F, G). Mẫu tế bào ung thư MCF-7 sau quá trình xử lý bằng cao chiết

Bảng 1. Phần trăm gây độc tế bào (%) trên tế bào ung thư vú MCF-7 của các cao chiết lá hải kim sa ở nồng độ 100 µg/mL

Mẫu cao chiết	Hoạt tính gây độc tế bào (%)			Trung Bình (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
TP	9.94	10.56	9.40	9.97 ± 0.58
HE	8.42	8.61	6.37	7.80 ± 1.24
CF	17.20	16.52	9.93	14.55 ± 4.02
BU	2.93	8.38	7.10	6.14 ± 2.85
WA	0.93	3.32	0.65	1.63 ± 1.47

3.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của các cao chiết lá hải kim sa

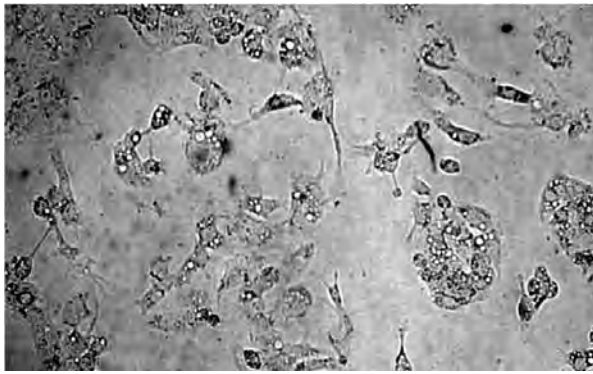
Đối với dòng tế bào HepG2, tất cả cao chiết đều không thể hiện khả năng gây độc tế bào. Có thể thấy rằng các cao chiết có khả năng gây độc trên dòng tế bào MCF-7, nhưng không thể gây độc trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 ở cùng nồng độ.

Ở các loài cùng chi *Lygodium*, dịch chiết cồn và dịch chiết nước của *Lygodium microphyllum* và *Lygodium salicifolium* cũng không thể hiện khả năng gây độc tế bào, trên dòng A549 (tế bào ung

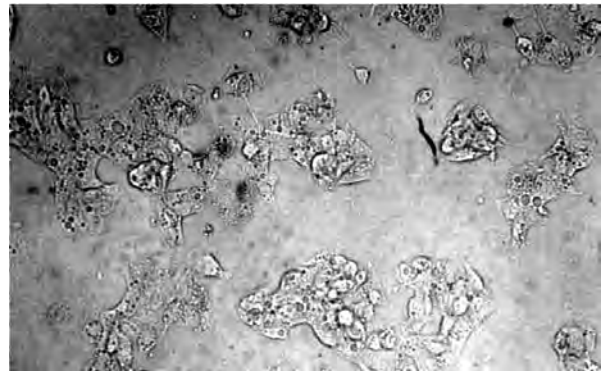
thư biểu mô phổi ở người) [14]. Tuy nhiên, dịch chiết n-hexane của một loài khác là *Lygodium flexuosum*, chứa chủ yếu glycoside, alkaloid và tannin, đã được chứng minh có tác dụng ức chế dòng tế bào ung thư vú PLC/PRF/5 (IC₅₀ là 27 µg/mL) và ung thư gan Hep3B (IC₅₀ là 14.5 µg/mL) rất tốt [15]. Đây là do sự khác nhau về tế bào mục tiêu, thành phần hóa học của dịch chiết giữa các loài cùng chi. Sự khác biệt về điều kiện địa lí, thổ nhưỡng hoặc bộ phận sử dụng cũng là những yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của chúng.

Bảng 2. Phần trăm gây độc tế bào (%) trên tế bào ung thư gan HepG2 của các cao chiết lá hải kim sa ở nồng độ 100 µg/mL

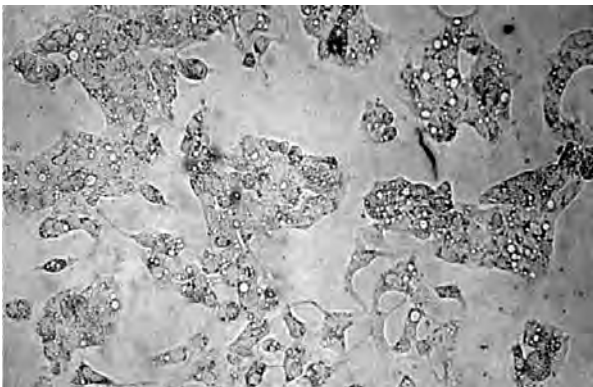
Mẫu cao chiết	Hoạt tính gây độc tế bào (%)			Trung bình (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
TP	-9.82	-12.02	-3.96	-8.60 ± 4.16
HE	-6.25	-11.16	-6.61	-8.01 ± 2.74
CF	-9.82	-16.74	-9.69	-12.08 ± 4.03
BU	-12.95	-18.45	-15.42	-15.61 ± 2.76
WA	-6.25	-9.87	-3.08	-6.40 ± 3.40



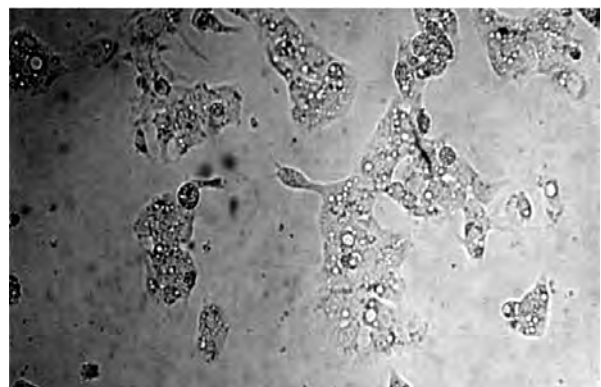
(A)



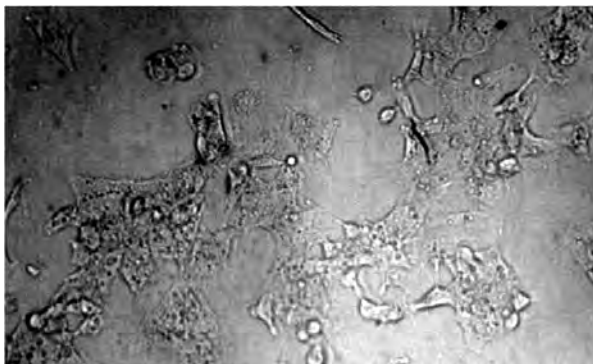
(B)



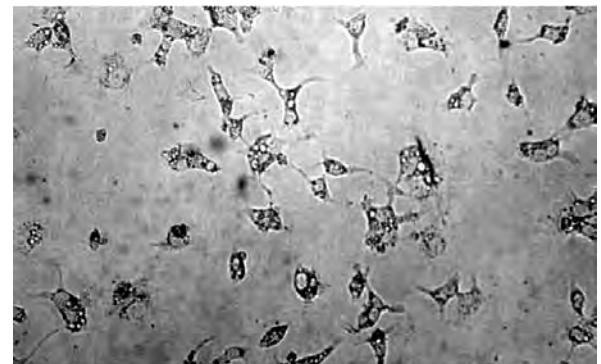
(C)



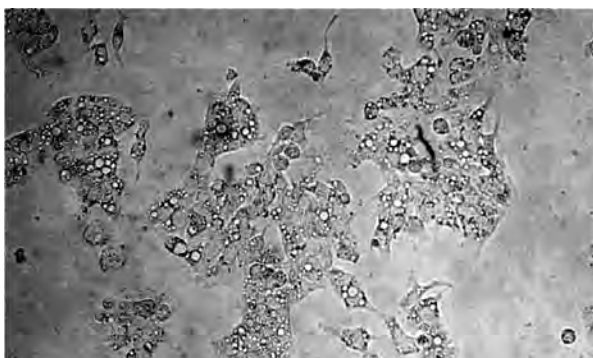
(D)



(E)



(F)



(G)

Chú thích:

(A): Cao toàn phần (TP)

(B): Cao HE

(C): Cao CF

(D): Cao BU

(E): Cao WA

(F): Camptothecin 0.07 µg/ml

(G): DMSO

Hình 4. Mẫu tế bào ung thư HepG2 sau quá trình xử lý bằng cao chiết**4. KẾT LUẬN**

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết lá hải kim sa Cao chiết hải kim sa không thể hiện hoạt tính ức chế

hai dòng tế bào ung thư là HepG2 và MCF-7. Tuy nhiên, có thể tiếp tục khảo sát đối với cao chiết các bộ phận khác của loài này, hoặc với các dòng tế bào khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. A. Weinberg, "How cancer arises," *Sci Am*, vol. 275, no. 3, pp. 62–70, 1996.
- [2] N. Gegechkori, L. Haines and J. Lin, "Long-term and latent side effects of specific cancer types," *Medical Clinics of North America*, vol. 101, no. 6, pp. 1053–1073, Nov. 2017. Doi: 10.1016/j.mcna.2017.06.003.
- [3] P. Garcia-Oliveira *et al.*, "Status and challenges of plant-anticancer compounds in cancer treatment," *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 2, p. 157, Feb. 2021. Doi: 10.3390/ph14020157.
- [4] A. D. Nietes and I. E. Buot Jr., "Japanese climbing fern, *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. : A potential invasive and ecological threat," *The Thailand Natural History Museum Journal*, vol. 16, no. 1, pp. 11–19, Jun. 2022.
- [5] S. Bimala, S. Anjana and B. Anupa, "Assessment of phytochemical content, antioxidant and antibacterial activities of three medicinal plants of Nepal," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 10, no. 45, pp. 829–837, Dec. 2016. Doi: 10.5897/JMPR2016.6269.
- [6] X. Li, A. Zhou and Y. Han, "Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro," *Carbohydr Polym*, vol. 66, no. 1, pp. 34–42, Oct. 2006. Doi: 10.1016/j.carbpol.2006.02.018.
- [7] Z. Guo-Gang, H. Ying-Cui,... and C. Li-Ju, "The Research of *Lygodium*," in *drug discovery research in pharmacognosy*, O. Vallisuta and S. M. Olimat, Eds., InTech, 2012, ch. 5, pp. 77–106. Doi: 10.5772/34250.
- [8] H. Khan, M. Saeedi,...and A. Bishayee, "Glycosides from medicinal plants as potential anticancer agents: Emerging trends towards future drugs," *Curr Med Chem*, vol. 26, no. 13, pp. 2389–2406, Jul. 2019. Doi: 10.2174/0929867325666180403145137.
- [9] R. Ali *et al.*, "New anticancer agents: recent developments in tumor therapy," *Anticancer Res*, vol. 32, no. 7, pp. 2999–3005, Jul. 2012.
- [10] J. M. Pezzuto, "Plant-derived anticancer agents," *Biochem Pharmacol*, vol. 53, no. 2, pp. 121–133, Jan. 1997. Doi: 10.1016/S0006-2952(96)00654-5.
- [11] N. T. Hoàng Tâm, N. Thụy Vy,... và H. H. Thùy Dương, "Chuẩn hóa thử nghiệm Sulforhodamin B (SRB) để xác định tính gây độc tế bào của hợp chất tự nhiên," *Hội nghị khoa học toàn quốc 2007 - Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống - Quy Nhơn*, pp. 809–809, Aug. 2007.
- [12] H. Ge *et al.*, "Traditional Chinese medicines as effective reversals of epithelial-mesenchymal transition induced-metastasis of colorectal cancer: molecular targets and mechanisms," *Front Pharmacol*, vol. 13, p. 842295, 2022.
- [13] Y. Cho, B. R. Kim,... and S. Cho, "Anti-inflammatory effects on murine macrophages of ethanol extracts of *Lygodium japonicum* spores via inhibition of NF- κ B and p38," *Mol Med Rep*, vol. 16, no. 4, pp. 4362–4370, 2017.
- [14] A. Promsong, L. Lanlalin Nasomyon,...and A. Pratakkarn, "A novel anticancer effect of *Licuala longecalculata* Furtado extracts on lung cancer cell line," *Tropical Journal of pharmaceutical research*, vol. 21, no. 8, pp. 1699–1705, Sep. 2022. Doi: 10.4314/tjpr.v21i8.17.
- [15] P. J. Wills and V. V. Asha, "Chemopreventive action of *Lygodium flexuosum* extract in human hepatoma PLC/PRF/5 and Hep 3B cells," *J Ethnopharmacol*, vol. 122, no. 2, pp. 294–303, Mar. 2009. Doi: 10.1016/j.jep.2009.01.006.

Evaluation of the cytotoxic effect of extracts from *Lygodium japonicum* leaves on MCF-7 and HepG2 cancer cell lines

Hoang Anh Truc, Tran Le Phuong Linh,
 Nguyen Kim Oanh, Tran Huu Thanh and Bui Thanh Phong

ABSTRACT

Background: Research on cancer treatment using compounds extracted from medicinal herbs has been studied for a long time. hai kim sa leaves are used in folk medicine to treat cancer, but no scientific studies

have proven this activity. Objectives: This project was conducted to investigate the anti-cancer activity of extracts from hai kim sa leaves. Materials and method: hai kim sa leaves are extracted with ethanol 96% to obtain total ethanolic extract. Part of the total extract was mixed in water and fractionally extracted with the solvents, including n-hexane, chloroform, and n-butanol, to obtain corresponding extracts. According to the Sulforhodamine B method, all extracts were determined for their cytotoxic ability to two cancer cell lines, MCF-7 and HepG2. Results: The extracts of hai kim sa did not show cytotoxic activity on HepG2 cells. The MCF-7 cell cytotoxic activity of the extracts is also low; CF extract has the highest cytotoxic effect on MCF-7 cell lines, accounting for 14.55% at 100 µg/ml. Conclusion: hai kim sa extract did not show cytotoxic activity on two cancer cell lines, HepG2 and MCF-7.

Keywords: hai kim sa, *Lygodium japonicum*, SRB, HepG2, MCF-7

Received: 17/07/2024

Revised: 12/10/2024

Accepted for publication: 22/11/2024