

ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH CHIẾT TỎI TRÊN TẾ BÀO UNG THƯ VÚ NGƯỜI

BÙI KHẮC CƯỜNG, NGUYỄN LĨNH TOÀN
Học viện Quân y

TÓM TẮT

Tỏi có vai trò trong dự phòng và điều trị ung thư ở người. Tác dụng ức chế phát triển tế bào ung thư tuyến vú người dòng T-47D của dịch chiết tỏi được đánh giá bằng thử nghiệm MTT và phương pháp hình thái vi thể. Kết quả cho thấy, các dịch chiết tỏi từ nồng độ 2,5 đến 10mg/ml thêm vào môi trường nuôi tế bào có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư tuyến vú người mạnh hơn rõ rệt so với môi trường chứa thuốc vincristine (0,05#g/ml) tại các thời điểm quan sát 24, 48 và 72 giờ sau nuôi cấy tế bào ($p < 0,01$).

Từ khoá: Tỏi, MTT, T-47D, ung thư vú

SUMMARY

Garlic have a role in prevention and treatment of human cancers. The potent effectivity antiproliferation of garlic extraction on human breast cancer cells (T-47D) was examined by using MTT assay and micromorphology methods. Results show that garlic extraction solutions from 2.5 to 10 mg/ml addition to cell medium were significantly more inhibition to the breast carcinoma cell growth comparison to those than vincristin solution (0.05) observation at time points of 24, 48, and 72 hours after cell culture ($p < 0.01$).

Keywords: Garlic, MTT, T-47D, breast cancer

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ung thư đối với sức khỏe là vấn đề lớn ngày càng được quan tâm nhiều hơn ở tất cả các nước trên thế giới. Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) mỗi năm trên toàn cầu có khoảng 10 triệu trường hợp mới mắc và 6 triệu người chết vì căn bệnh này. Hiện nay, ở Mỹ cứ 4 trường hợp tử vong thì có 1 trường hợp do ung thư gây ra. Tính riêng ở châu Á, mỗi năm có trên 3 triệu ca ung thư mắc mới và trên 2 triệu người tử vong vì ung thư. Các nghiên cứu hiện nay cho thấy, đến năm 2020 ở châu Á, số ca ung thư mắc mới hàng năm sẽ tăng lên 7,1 triệu ca nếu các chiến lược dự phòng và kiểm soát ung thư hiện nay không thay đổi. Ở Việt Nam, theo kết quả điều tra chỉ trong 2 năm 2005-2006, có tới 93.719 người chết vì ung thư. Trong đó, chủ yếu chết vì ung thư gan, ung thư phổi và ung thư dạ dày. Ngoài ra, trong số chết vì ung thư ở nữ, số

tử vong do ung thư vú chiếm 5,69% (Ngoan le T và cs, 2007).

Ung thư vú là loại ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ ở nhiều nước trên thế giới. Theo số liệu thống kê ung thư toàn cầu năm 2002, ung thư vú đứng thứ hai sau ung thư phổi về số ca mắc và đứng thứ năm về nguyên nhân gây tử vong do ung thư. Tuy nhiên, ung thư vú vẫn là nguyên nhân gây tử vong nhiều nhất ở phụ nữ. Tại Việt Nam, theo một số tài liệu ung thư vú có tỷ lệ mắc chuẩn theo độ tuổi là 20,9/100.000 dân, đứng đầu trong các loại ung thư ở nữ. Tại thành phố Hồ Chí Minh tỷ lệ này là 17,1/100.000 dân đứng hàng thứ hai sau ung thư cổ tử cung. Tỷ lệ tử vong vì ung thư ở nữ thì ung thư vú là một trong 4 ung thư hay gặp nhất chiếm 5,69% (Ngoan le T và cs, 2007).

Tiền lượng của ung thư vú nhìn chung là khả quan. Tỷ lệ sống sau 5 năm ở các nước phát triển trung bình là 73% và ở các nước đang phát triển là 57%. Hiện nay, trên thị trường có khá nhiều loại thuốc điều trị ung thư vú khá hiệu quả. Ở nước ta có nguồn dược liệu rất phong phú, chính vì vậy nghiên cứu để tìm ra các loại dược liệu quý để điều hiệu quả hơn ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng là một lĩnh vực đang được quan tâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng của dịch chiết tỏi trên tế bào ung thư vú người dòng T-47D trên nuôi cấy tế bào.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Dịch chiết tỏi: Tỏi sử dụng trong nghiên cứu này có nguồn gốc từ Lý Sơn gọi là Tỏi Lý Sơn (TLS). Tỏi này được thu hái vào tháng 2 năm 2009 tại huyện đảo Lý Sơn (Quảng Ngãi). Tỏi này được chiết xuất toàn phần thành cao lỏng sau đó hòa loãng trong môi trường nuôi cấy tế bào theo tỷ lệ (mg/ml) gọi là dịch chiết tỏi Lý Sơn. Chất lượng dịch chiết tỏi đều đạt tiêu chuẩn cơ sở, sản xuất tại Trung tâm nghiên cứu ứng dụng Sinh – Y – Dược học Quân sự, Học viện Quân Y.

Thuốc đối chứng: Vincristine là một alkaloid chống ung thư được tách chiết từ cây dứa cạn *Catharanthus Roseus L.* Vincristine có tác dụng ức chế phân bào

manh theo cơ chế liên kết đặc hiệu với tubulin, là protein ống vi thể, phóng bế tạo thành thoi phân bào cần thiết cho sự phân chia tế bào. Đây là thuốc nguồn gốc tự nhiên được sử dụng điều trị nhiều loại ung thư.

Tế bào ung thư vú người dòng T-47D (ATCC, Hoa Kỳ). Môi trường RPMI, FBS, Insulin, Penicillin và Streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)

2. Phương pháp nghiên cứu

* Nuôi cấy tế bào

Tế bào ung thư vú người dòng T-47D được nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng. Số lượng tế bào 5×10^4 tế bào/ml môi trường, mỗi giếng 0,2ml, được phát triển trong môi trường RPMI, chứa 10% FBS, Insuline 5UI/ml, 1% penicillin/streptomycin. Sau 24 giờ nuôi cấy đạt trên 90% bám dính, tế bào được thay môi trường nuôi cấy và cho các thuốc nghiên cứu với những nồng độ tính toán tương ứng vào các giếng nuôi cấy. Tiến hành thay môi trường nuôi cấy và thuốc nghiên cứu hàng ngày vào cùng một thời gian qui định. Thu hoạch tế bào và làm các thử nghiệm tại các thời điểm sau nuôi cấy 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Tế bào sau khi cấy chuyển được chia thành 7 nhóm:

- Nhóm 1 (chứng âm): Môi trường nuôi cấy bình thường.
- Nhóm 2 (chứng dương): Môi trường nuôi cấy có nồng độ Vincristin 0,05 μ g/ml
- Nhóm 3: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 10mg/ml.
- Nhóm 4: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 5mg/ml.
- Nhóm 5: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 2,5mg/ml.
- Nhóm 6: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 1,25mg/ml
- Nhóm 7: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 0,625mg/ml

Toàn bộ quy trình tiến hành thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

* Thử nghiệm Trypan Blue

Trước khi đánh giá tác dụng của dịch chiết TLS tiến hành kiểm tra ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp của dịch chiết TLS trên dòng tế bào T-47D bằng thử nghiệm Trypan Blue. Thử nghiệm này cho biết tỉ lệ tế bào chết và tế bào sống sau khi cho thuốc với các nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy sau thời gian 1 giờ. Các tế bào chết sẽ bắt màu xanh của Trypan Blue và được phân biệt với các tế bào sống không bắt màu. Các nồng độ của dịch chiết TLS được kiểm tra ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp là: 0,625mg/ml, 1,25mg/ml, 2,5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml.

* Thử nghiệm MTT

Thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] được thực hiện theo qui trình mô tả đầu tiên bởi Mosmann (1983). Nguyên lí của phản ứng là sử dụng năng lượng chuyển hóa của ti thể ở tế bào sống có khả năng chuyển hóa chất MTT thành một sản phẩm có màu không tan trong nước nhưng tan trong dung dịch chuyển dụng. Khi tế

bào chết thì ti thể không còn khả năng chuyển hóa MTT thành chất màu. Sản phẩm tạo ra từ phản ứng MTT có màu đặc trưng và có thể định lượng được bằng cách đo mật độ quang với bước sóng hấp thụ đặc trưng bằng máy đọc ELISA ở kính lọc 590nm. Mật độ quang tạo ra từ phản ứng MTT cho phép xác định sự tương quan về số lượng các tế bào sống/chết có mặt trong các giếng nuôi cấy. Thử nghiệm MTT được thực hiện trên tất cả các nhóm tế bào vào các thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ sau khi thay môi trường nuôi cấy có chứa các thuốc nghiên cứu với các nồng độ khác nhau như mô tả ở trên.

3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng thuật toán T-test, so sánh 2 số trung bình, sử dụng phần mềm tính toán chuyên dụng STAVIEW6.0 và STAT7.1.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

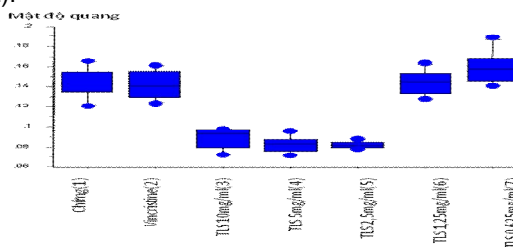
1. Ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp

Kết quả thử nghiệm Trypan Blue cho thấy dịch chiết TLS ở các nồng độ khác nhau và vincristin 0,05 μ g/ml không gây độc trực tiếp đối với tế bào T-47D. Biểu hiện, tỉ lệ tế bào chết và tế bào sống giữa các giếng nuôi cấy sử dụng dịch chiết tỏi và vincristin 0,05 μ g/ml không có sự khác biệt so với chúng.

Dịch chiết TLS không có ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp trên dòng tế bào T-47D.

2. Tác dụng của dịch chiết TLS tại thời điểm sau 24 giờ.

Quan sát dưới kính hiển vi tại thời điểm sau 24 giờ cho thấy những giếng tế bào trong môi trường hòa loãng với dịch chiết TLS từ 2,5-10mg/ml có số lượng tế bào ít hơn so với tế bào không dùng thuốc. Ở nồng độ dịch chiết TLS 10mg/ml cho thấy ức chế tế bào phát triển rõ rệt nhất. Thử nghiệm MTT cho thấy ở nồng độ dịch chiết TLS càng cao thì số lượng tế bào ung thư sống sót càng giảm (mật độ quang chất màu formazal giảm). Tuy nhiên, ở giếng tế bào có nồng độ TLS 0,625-1,25mg/ml và giếng tế bào có vincristin 0,05 μ g/ml số lượng tế bào sống giảm không có ý nghĩa thống kê so với tế bào nuôi bình thường ($p > 0,1$) (Hình 2).



Hình 2: Số lượng tế bào sống tại thời điểm 24 giờ. Nhóm dùng dịch chiết TLS nồng độ 5 và 10mg/ml có số lượng tế bào giảm rõ so với nhóm chứng âm và nhóm sử dụng vincristin.

Kết quả thử nghiệm MTT cho thấy mật độ quang càng giảm thì số lượng tế bào càng thấp.

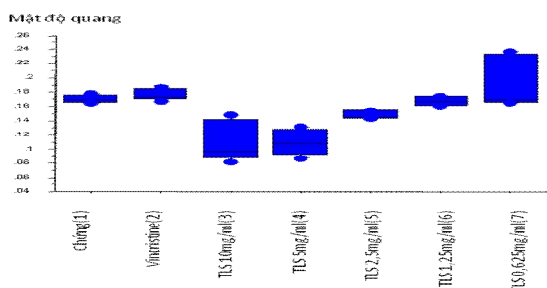
Nhóm so sánh	p
1-2	0,9386
1-3	0,0005
1-4	0,0007

1-5	0,0005
1-6	0,7455
1-7	0,1779
2-3	<0,0001
2-4	<0,0001
2-5	<0,0001
2-6	0,3366
2-7	0,1626

3. Tác dụng của dịch chiết TLS tại thời điểm sau 48 giờ

Tại thời điểm 48 giờ dưới tác động của dịch chiết TLS, quan sát dưới kính hiển vi cho thấy số lượng tế bào giảm đi rõ rệt ở nhóm được dùng dịch chiết TLS ở nồng độ 2,5-10 mg/ml.

Thử nghiệm MTT cho thấy tại thời điểm này ở tất cả các nồng độ dịch chiết TLS từ 2,5-10 mg/ml đều ức chế rõ rệt tế bào ung thư phát triển ($P < 0,01$). Nồng độ dịch chiết TLS càng cao thì số lượng tế bào ung thư sống sót càng giảm. Ở các giếng nuôi có nồng độ dịch chiết TLS 0,625-1,25mg/ml và giếng nuôi có Vincristin 0,05 μ g/ml số lượng tế bào thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với chúng ($P > 0,01$)

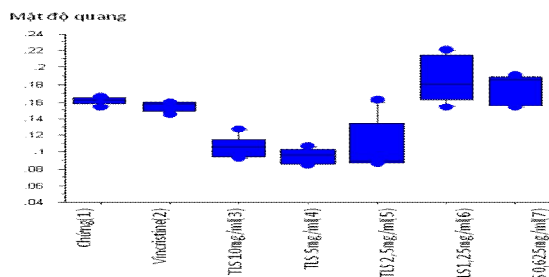


Hình 3: Số lượng tế bào T-47D giảm rõ rệt dưới tác động của dịch chiết TLS tại thời điểm 48 giờ. Nồng độ dịch chiết TLS càng cao tế bào sống càng giảm ($P < 0,01$).

Nhóm so sánh	p
1-2	0,4097
1-3	0,0046
1-4	0,0010
1-5	0,0025
1-6	0,2885
1-7	0,2476
2-3	0,0035
2-4	0,0004
2-5	<0,0001
2-6	0,1711
2-7	0,3970

4. Tác dụng của dịch chiết TLS tại thời điểm sau 72 giờ

Dưới kính hiển vi quang học cho thấy thời điểm 72 giờ sau dùng dịch chiết TLS và Vincristine tế bào bị ức chế phát triển rõ rệt. Nhất là những tế bào môi trường có dịch chiết TLS nồng độ 5 hoặc 10 mg/ml. Hình ảnh thưa thớt các tế bào bám được vào đáy giếng, nhiều tế bào chết bong và nổi lơ lửng trong môi trường.



Hình 5: Số lượng tế bào T-47D giảm rõ rệt dưới tác động của dịch chiết TLS tại thời điểm 72 giờ. Ở nồng độ TLS $\leq 1,25$ mg/ml số lượng tế bào thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Nhưng ở nồng độ từ 2,5 - 10 mg/ml thì ức chế tế bào phát triển ($p < 0,05$). Giếng nuôi có nồng độ Vincristine 0,05 μ g/ml có tác dụng ức chế tế bào phát triển sau 72 giờ ($p = 0,04$).

Nhóm so sánh	p
1-2	0,0407
1-3	0,0003
1-4	<0,0001
1-5	0,0109
1-6	0,0573
1-7	0,0812
2-3	0,0006
2-4	0,0002
2-5	0,0155
2-6	0,0175
2-7	0,0469

Thử nghiệm MTT ở thời điểm 72 giờ cho thấy sự phát triển của tế bào T-47D bị ức chế rõ rệt ở nhóm tế bào nuôi cấy với dịch chiết TLS từ 2,5mg/ml đến 10mg/ml. Nồng độ dịch chiết TLS càng cao thì ức chế càng mạnh tế bào T-47D phát triển ($p < 0,001$). Tuy nhiên, Vincristine 0,05 μ g/ml chỉ có tác dụng ức chế tế bào ung thư phát triển sau 72 giờ ($p = 0,04$) (Hình 5).

Kết quả chúng tôi thu được khi nghiên cứu tác dụng của dịch chiết TLS trên tế bào ung thư tuyến vú người dòng T-47D phù hợp với một số nghiên cứu đã được công bố thời gian gần đây. Theo nghiên cứu của Bianchini and H Vainio (2001) cho thấy, allium trong hành và tỏi có nhiều tác dụng trong phòng và điều trị nhiều bệnh, bao gồm cả ung thư. Báo cáo cũng chỉ ra rằng chúng có tác dụng chống ung thư ở nhiều cơ quan khác nhau như ung thư vú, phổi, dạ dày, đại tràng... Chúng không những ức chế sự phát triển của tế bào ung thư mà còn có vai trò kích hoạt tế bào ung thư chết theo chương trình, ngăn chặn quá trình di căn của tế bào ung thư [1-6]. Các kết quả nghiên cứu tương tự được Hassan HT. (2004) công bố cho thấy, ajoene trong dịch chiết tỏi có tác dụng ức chế tế bào ung thư bạch cầu [4].

KẾT LUẬN

Trên môi trường nuôi cấy tế bào ung thư tuyến vú dòng T-47D dịch chiết tỏi nguồn gốc từ đảo Lý Sơn có tác dụng ức chế tế bào phát triển. Ở thời điểm 48-72 giờ dịch chiết TLS có tác dụng ức chế rõ rệt các tế bào phát triển so với nhóm chứng không dùng tỏi ($p < 0,001$). Ở nồng độ dịch chiết TLS 2,5 - 10mg/ml có

tác dụng ức chế tế bào ung thư T-47D mạnh hơn so với tác dụng của thuốc kháng ung thư Vincristin 0,05 μ g/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fleischauer AT, Arab L: Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3s):1032S-40S.
2. Fleischauer AT, Poole C, Arab L: Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr.* 2000 Oct;72(4):1047-52.
3. Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, La Vecchia C: Onion and garlic

use and human cancer. *Am J Clin Nutr.* 2006 Nov;84(5):1027-32.

4. Hassan H.T: Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. *Leuk Res.* 2004 Jul;28(7):667-71.
5. Kim JY, Kwon O: Garlic intake and cancer risk: an analysis using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jan;89(1):257-64.
6. Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A: Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 2001 Jun;22(6):891-7.