

DỊCH CHIẾT TỎI LÝ SƠN ỨNG CHẾ PHÁT TRIỂN TẾ BÀO UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT NGƯỜI DÒNG PC-3 TRÊN *IN VITRO*

*Nguyễn Linh Toàn**

TÓM TẮT

Ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) là ung thư phổ biến ở nam giới và có tỷ lệ tử vong tăng cao hàng năm. Đến nay, chưa có thuốc điều trị hiệu quả UTTTL. Nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng: tỏi có khả năng ức chế ung thư phát triển. Trong nghiên cứu này, tác dụng của dịch chiết tỏi Lý Sơn (TLS) đối với nhân lên của tế bào UTTTL người dòng PC-3 được đánh giá bằng thử nghiệm MTT. Kết quả cho thấy, dịch chiết TLS có tác dụng ức chế tế bào ung thư PC-3 phát triển phụ thuộc liều dùng so sánh với chứng. Ở nồng độ 2,5 mg/ml, 5 mg/ml và 10 mg/ml, dịch chiết TLS ức chế rõ rệt tế bào UTTTL người nhân lên so với thuốc vincristine 0,05 µg/ml môi trường ($p < 0,001$).

* Từ khoá: Tỏi; Tỏi Lý Sơn; MTT; Ung thư tuyến tiền liệt.

AQUEOUS EXTRACTION OF LYSON GARLIC INHIBITED HUMAN PROSTATE CARCINOMA CELL LINE PC-3 *IN VITRO*

SUMMARY

Prostate cancer is the most common cancer in men and related death rate increases every year. There is no effective therapy for human prostate cancer. Previous studies reported that garlic extraction suppresses cancer growth. In this study, aqueous extraction of Lyson garlic (AELG) was examined for its antiproliferative on prostate cancer cell line PC-3 by MTT assay in vitro. The results indicated that AELG inhibited the growth of prostate cancer cells in a dose dependent manner, compared to the control. At 2.5 mg/ml, 5 mg/ml and 10 mg/ml concentrations, AELG was significantly inhibited proliferation of human prostate cancer cells compared to vincristin 0.05 µg/ml ($p < 0.001$).

* *Key words: Garlic; Lyson garlic; MTT; Prostate cancer.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tuyến tiền liệt chiếm 10% trong số ung thư ở nam giới. Ở các nước phát triển, tỷ lệ này chiếm khoảng 15% và đây là loại ung thư đứng hàng thứ 2 sau ung thư phổi. Tại Hoa Kỳ, UTTTL là loại ung thư thường gặp nhất ở nam giới. Đây là loại

ung thư có tỷ lệ mắc mới cao nhất và tỷ lệ tử vong đứng hàng thứ 2 trong 10 loại ung thư hay gặp nhất ở nam giới tại Hoa Kỳ năm 2010 [3]. Ở Việt Nam, theo ghi nhận về tình hình ung thư ở Hà Nội năm 1999 có tỷ lệ mắc UTTTL tăng theo tuổi và ở nam giới tỷ lệ này là 2,2/100.000 dân [2].

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

Ung thư nếu được phát hiện sớm, quá trình điều trị và tiên lượng sẽ tốt hơn rất nhiều so

với phát hiện muộn. Việc can thiệp sớm bằng cách loại bỏ khối u đưa lại kết quả tốt,

tuy nhiên biện pháp này có ảnh hưởng đến khả năng tiêu diệt tự chủ và tình dục. Đối với trường hợp phát hiện muộn, đã xâm lấn hoặc di căn xa, việc điều trị phải kết hợp nhiều biện pháp, trong khi hiệu quả còn hạn chế. Sử dụng thuốc chống ung thư hoặc xạ trị rất cần thiết để kiểm soát khối u. Các nhà khoa học đang rất nỗ lực tìm kiếm các phương thuốc mới điều trị ung thư nói chung và UTTTL nói riêng.

Ở nước ta hiện nay có rất nhiều loại dược liệu quý có tác dụng điều trị nhiều bệnh, trong đó có cả ung thư nhưng chưa được nghiên cứu đầy đủ. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm *Đánh giá tác dụng kháng ung thư của dịch chiết TLS trên trên tế bào UTTTL người dòng PC-3 trên môi trường nuôi cấy tế bào.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.

- Dịch chiết TLS: TLS thu hái vào tháng 2 - 2009 tại huyện đảo Lý Sơn (Quảng Ngãi), chiết xuất toàn phần thành cao lỏng hòa tan trong nước, sau đó hòa loãng dịch chiết trong môi trường nuôi cấy tế bào tính theo tỷ lệ (mg/ml) gọi là dịch chiết TLS. Chất lượng cao tối đều đạt tiêu chuẩn cơ sở, sản xuất tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học Quân sự, Học viện Quân y [1].

- Vincristine: vincristine là một alkaloid chống ung thư, tách chiết từ cây dừa cạn *Catharanthus Roseus L.*, có tác động ức chế phân bào mạnh theo cơ chế liên kết đặc hiệu với tubulin. Đây là một protein ống

vi thể, phóng bé tạo thành thoi phân bào cần thiết cho phân chia tế bào. Vincristine là một thuốc nguồn gốc tự nhiên, được sử dụng điều trị nhiều loại ung thư [1].

- Tế bào UTTTL người dòng PC-3 (mã CRL-1435), của công ty ATCC (Hoa Kỳ).

- Môi trường nuôi cấy tế bào F12K bổ sung thêm 10% huyết thanh bào thai bê (FBS) và 1% dung dịch penicillin và streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Đức).

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Nuôi cấy tế bào:*

Nuôi cấy tế bào ung thư PC-3 trên đĩa nuôi cấy 96 giếng (96 well-plate). Số lượng tế bào 5×10^4 tế bào/ml môi trường, mỗi giếng 0,2 ml, phát triển trong môi trường F12K, bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin. Sau 24 giờ nuôi cấy đạt trên 90% bám dính, thay môi trường và bổ sung thuốc nghiên cứu với nồng độ đã tính toán tương ứng vào các giếng tế bào. Thay môi trường tế bào PC3, thuốc nghiên cứu và thuốc chứng hàng ngày vào cùng một thời gian nhất định. Thu hoạch tế bào và làm thử nghiệm độc tế bào và MTT tại những thời điểm sau nuôi cấy 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Nghiên cứu tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học, Học viện Quân y.

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

Nhóm 1: môi trường nuôi cấy bình thường.

Nhóm 2: môi trường nuôi cấy có nồng độ vincristin 0,05 µg/ml.

Nhóm 3: môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 10 mg/ml.

Nhóm 4: môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 5 mg/ml.

Nhóm 5: môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 2,5 mg/ml.

Nhóm 6: môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 1,25 mg/ml.

Nhóm 7: môi trường nuôi cấy có dịch chiết TLS 0,625 mg/ml.

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

** Thử nghiệm Trypan Blue:*

Thử nghiệm Trypan Blue là thử nghiệm đánh giá tác dụng gây độc tế bào trực tiếp của dịch chiết TLS trên dòng tế bào PC-3. Thử nghiệm này cho biết tỷ lệ tế bào chết và tế bào sống sau khi cho tế bào tiếp xúc với thuốc ở những nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy sau thời gian 1 giờ. Tế bào chết sẽ bắt màu xanh của Trypan Blue và phân biệt với những tế bào sống không bắt màu. Kiểm tra ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp nồng độ của dịch chiết TLS: 0,625 mg/ml; 1,25 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; 40 mg/ml.

** Thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide]:* thực hiện theo quy trình mô tả đầu tiên của Mosmann (1983). Nguyên lý của phản ứng là sử dụng chức năng chuyển hóa của ty 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 chuyên dụng. Khi tế bào chết, ty thể không còn khả năng chuyển hóa MTT thành chất màu [6]. Sản phẩm tạo ra từ phản ứng MTT có màu đặc trưng và định

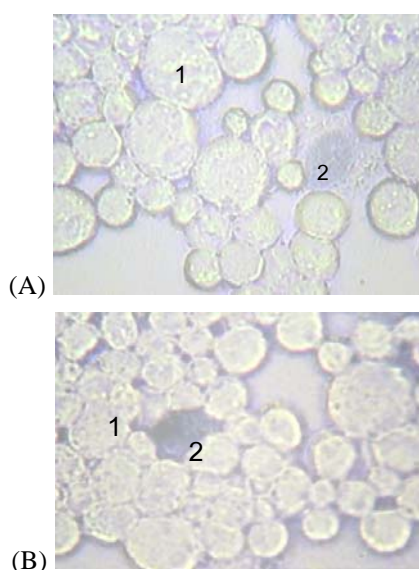
lượng bằng đo mật độ quang với bước sóng hấp thụ đặc trưng bằng máy đọc ELISA ở kính lọc 590 nm. Mật độ quang tạo ra từ phản ứng MTT cho phép xác định tương quan về số lượng tế bào sống/chết có mặt trong giếng nuôi cấy [6]. Thử nghiệm MTT thực hiện trên tất cả nhóm tế bào vào các thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ sau khi thay môi trường nuôi cấy có chứa thuốc nghiên cứu với nồng độ khác nhau như mô tả ở trên.

** Xử lý số liệu:* phân tích thống kê dùng chi bình phương test, sử dụng chương trình phần mềm STAT 7.0 (website: www.stata.com); phân tích số liệu bằng thuật toán parametric Mann-Whitney *U*-test và so sánh đối xứng *t*-test dùng chương trình Statview, version 5.1 (website: www.statview.com).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Ảnh hưởng gây độc tế bào trực tiếp của dịch chiết TLS.

Kết quả thử nghiệm Trypan Blue cho thấy dịch chiết TLS ở những nồng độ khác nhau không gây độc trực tiếp đối với tế bào ung thư PC-3. Biểu hiện, tỷ lệ tế bào chết/tế bào sống giữa giếng nuôi cấy sử dụng dịch chiết TLS không có sự khác biệt so với chứng khi sử dụng môi trường nuôi cấy đơn thuần (hình 1).



Hình 1: Tế bào PC-3 sau thử nghiệm Trypan Blue.

- (A) Nhóm không cho thuốc (chứng);
 (B) Nhóm có dịch chiết TLS 40 mg/ml.
 (1) Tế bào sống (không bắt màu Trypan Blue).
 (2) Tế bào chết (bắt màu Trypan Blue).

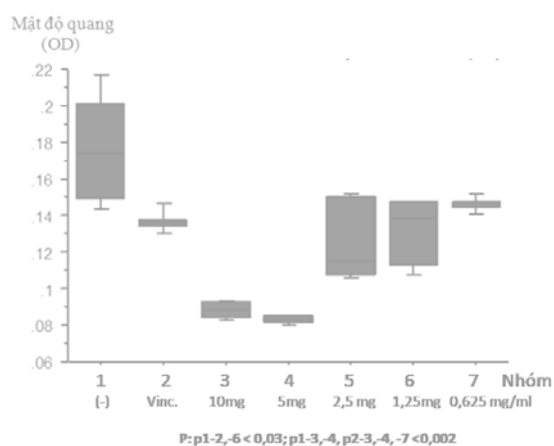
Như vậy, dịch chiết TLS không gây độc tế bào trực tiếp trên dòng tế bào ung thư dòng PC-3. Kết quả này tương tự nghiên cứu cứu công bố gần đây của chúng tôi trên tế bào ung thư người dòng Hep2, đã chứng minh ở nồng độ cao dịch chiết TLS (400 mg/ml) không gây độc tế bào Hep2 trên in vitro [1].

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 hoặc vincristine có số lượng tế bào thừa hơn so với tế bào không dùng thuốc hoặc tòi. Ở nồng độ dịch chiết TLS 10 mg/ml, ức chế tế bào phát triển rõ rệt nhất.

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

Thử nghiệm MTT cho thấy: ở nồng độ dịch chiết TLS càng cao, số lượng tế bào ung thư sống sót càng giảm (mật độ quang chất màu formazal giảm). Tuy nhiên, ở nồng độ TLS 0,625 mg/ml, số lượng tế bào sống giảm chưa rõ rệt so với nhóm chứng ($p = 0,0518$). Nồng độ TLS 1,25 và 2,5 mg/ml và môi trường có vincristin 0,05 $\mu\text{g/ml}$ có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt giữa 3 nhóm này ($p > 0,05$); nhưng ở nồng độ dịch chiết TLS 5 hoặc 10 mg/ml, ức chế rõ rệt tế bào PC-3 phát triển so với chứng và so với vincristin ($p < 0,01$) (hình 2).



Hình 2: Số lượng tế bào PC-3 sống xác định bằng kỹ thuật MTT tại thời điểm 24 giờ. Nhóm dùng dịch chiết TLS nồng độ 5 và 10 mg/ml có số lượng tế bào giảm rõ so với nhóm chứng âm và nhóm sử dụng vincristin.

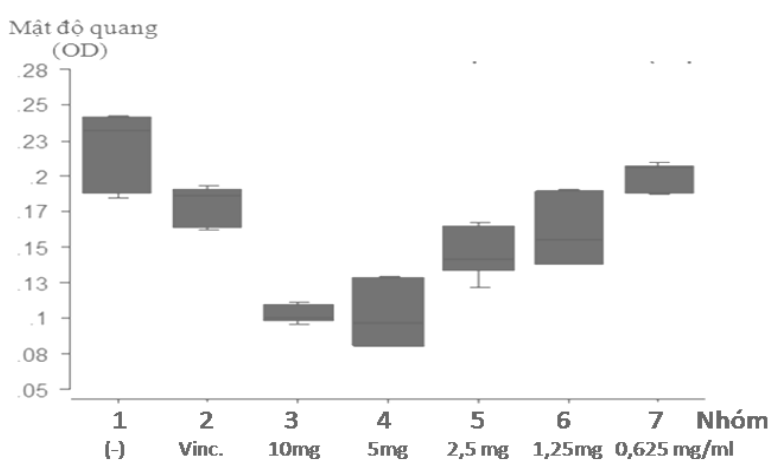
Thử nghiệm MTT cho kết quả mật độ quang càng giảm, số lượng tế bào sống càng thấp, tế bào ung thư PC-3 càng bị ức chế phát triển. Kết quả này tương tự thông báo nghiên cứu gần đây của chúng tôi trên tế bào ung thư thanh quản Hep2 người [1] và của các tác giả khác đánh giá tác dụng của tòi trên tế bào PC-3 [3, 4].

Tại thời điểm 48 giờ, quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy số lượng tế bào

giảm đi rõ rệt ở nhóm dùng dịch chiết TLS và vincristine. Nhất là nhóm tế bào dịch chiết TLS ở nồng độ 5 mg/ml và 10 mg/ml cũng như vincristine so với nhóm chứng.

Thử nghiệm MTT cho thấy: tại thời điểm này, ở tất cả nhóm tế bào có dịch chiết TLS trong môi trường đều ức chế rõ rệt tế bào ung thư PC-3 phát triển ($p < 0,05$). Nồng độ dịch chiết TLS càng cao, số lượng tế bào ung thư sống sót càng giảm ($p < 0,05$), nhất

là ở nồng độ cao 5 - 10 mg/ml, số lượng tế bào sống còn lại giảm rõ rệt so với chứng không dùng thuốc và so với nhóm sử dụng vincristin ($p < 0,001$). So sánh với nồng độ TLS khác nhau thấy, tác dụng của vincristin 0,05 $\mu\text{g/ml}$ mạnh hơn so với nồng độ dịch chiết TLS 0,625 mg/ml ($p < 0,001$), nhưng kém hơn so với nồng độ TLS trên 2,5 mg/ml ($p < 0,01$) (hình 3).



Nhóm so sánh	p
1-2	0,0012
1-3	0,0003
1-4	<0,0001
1-5	0,0003
1-6	0,0044
1-7	0,0390
2-3	0,0002
2-4	<0,0001
2-5	0,0003
2-6	0,1535
2-7	<0,0001

Hình 3: Số lượng tế bào PC-3 sống xác định bằng kỹ thuật MTT tại thời điểm 48 giờ. Nồng độ TLS càng cao, số lượng tế bào ung thư PC-3 càng bị ức chế và số lượng tế bào sống càng giảm ($p < 0,01$).

Theo những nghiên cứu gần đây, dịch chiết tỏi có khả năng ức chế tế bào ung thư chuột di căn và nhân lên [7, 9]. Tác dụng này của tỏi, khả năng thành phần diallyl disulfide trong dịch chiết tỏi ức chế tế bào ung thư tăng sinh, tăng cường điều hòa gen tế bào chết theo chương trình. Diallyl disulfide

đã được chứng minh tạo ra quá trình chết tế bào theo chương trình ở tế bào ung thư vú bằng tăng cường biểu hiện protein Bax và giảm biểu hiện Bcl2 và hoạt hóa caspase trong con đường tín hiệu chết tế bào theo chương trình, cơ chế tương tự như được chứng minh trên tế bào ung thư PC-3 người [4, 7, 9].

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

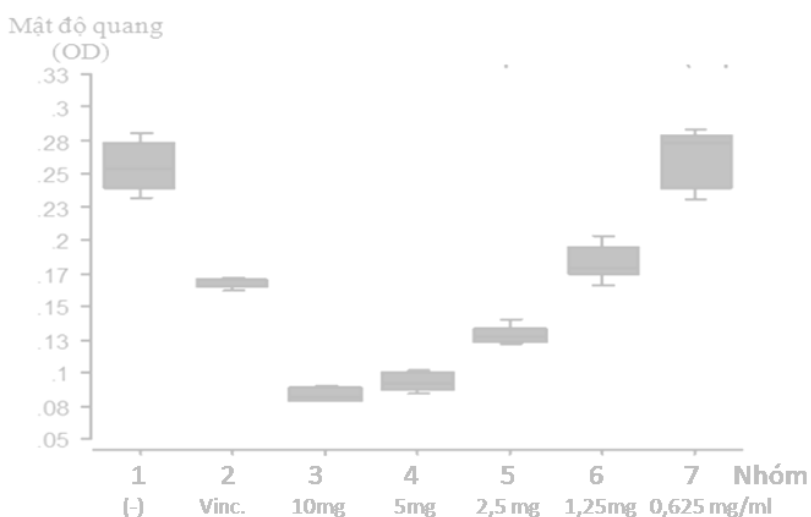
Dưới kính hiển vi quang học cho thấy: thời điểm 72 giờ sau dùng dịch chiết TLS và vincristine, tế bào bị ức chế phát triển rõ rệt. Nhất là những tế bào môi trường có dịch chiết

TLS nồng độ 5 hoặc 10 mg/ml (hình 4). Hình ảnh thừa thớt tế bào bám được vào đáy giếng, nhiều tế bào chết bong và nổi lơ lửng trong môi trường đối với những giếng tế bào môi trường có dịch chiết TLS.



Hình 4: Tế bào ung thư PC-3 sau 72 giờ nuôi cấy khi thử nghiệm MTT.

- (a) tế bào được nuôi cấy trong môi trường thông thường;
- (b) tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ vincristine 0,05 µg/ml;
- (c) tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ dịch chiết TLS 10 mg/ml.



Nhóm so sánh	p
1-2	< 0,0001
1-3	< 0,0001
1-4	< 0,0001
1-5	< 0,0001
1-6	< 0,0001
1-7	0,1469
2-3	< 0,0001
2-4	< 0,0001
2-5	0,0003
2-6	0,0390
2-7	0,0001

Hình 5: Số lượng tế bào PC-3 sống xác định bằng kỹ thuật MTT tại thời điểm 72 giờ. Số lượng tế bào PC-3 giảm rõ rệt dưới tác động của dịch chiết TLS. Nồng độ TLS càng cao, tế bào sống càng giảm ($p < 0,001$). Ở nồng độ TLS $\leq 1,25$ mg/ml, khả năng ức chế tế bào phát triển kém hơn vincristine ($p < 0,05$), nhưng ở nồng độ từ 2,5 đến 10 mg/ml, TLS ức chế tế bào PC-3 rõ rệt so với vincristine ($p < 0,01$).

Thử nghiệm MTT chứng minh sự phát triển của tế bào PC-3 bị ức chế rõ rệt ở nhóm tế bào nuôi cấy với dịch chiết TLS từ 1,25 mg/ml đến 10 mg/ml. Nồng độ dịch chiết TLS càng cao, ức chế càng mạnh sự phát triển của tế bào PC-3 ($p < 0,001$). Hơn nữa, nồng độ dịch chiết TLS từ 2,5 - 10 mg/ml có tác dụng ức chế mạnh hơn so với thuốc vincristine 0,05 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$) (hình 5).

Tỏi vừa là một loại gia vị phổ biến, đồng thời cũng là một loại dược liệu quý. Tỏi Lý Sơn, Việt Nam nổi tiếng về chất lượng từ bao đời nay đang thu hút nhiều người trong và ngoài nước quan tâm, không chỉ là gia vị thơm ngon mà nó còn được dùng làm thuốc phòng chữa nhiều bệnh. Trong lịch sử, tỏi được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh khác nhau như bệnh trĩ, khớp, viêm da, đau bụng, ho, chán ăn... [4, 5] Gần đây, có rất nhiều nghiên cứu cho thấy tỏi có vai trò quan trọng trong điều trị nhiều bệnh khác nhau, trong đó có các bệnh lý nhiễm khuẩn, tim mạch và ung thư [1, 4]. Trong dịch chiết tỏi có hơn 100 loại hợp chất chứa lưu huỳnh có giá trị trong y học, tiêu biểu là N-aceryl-S-allyl cysteine, allyl mercaptan, diallyl disulfide, diallyl sulfide, diallyl sulfoxide, diallyl sulfone, và allyl methyl sulfide... [1, 3, 5, 7, 9]. Các chất này có vai trò quan trọng trong cơ chế kháng ung thư thông qua điều hoà nồng độ glucathion và ức chế cytochrome P450 2E1. Allicin có vai trò quan trọng trong ức chế quá trình nhân lên của tế bào ung thư và điều hoà apoptosis [3, 5].

Scharfenberg và CS (1990) chứng minh ajoene có tác dụng độc tế bào và gây chết tế bào như tế bào ung thư vú, tuyến liệt tuyến đại trực tràng, gan, phổi, tụy, lympho... Hơn nữa, ajoene còn có khả năng tương tác với một số dòng tín hiệu liên quan tới con đường tế bào chết theo chương trình thông qua hoạt hóa các dòng thác phụ thuộc mitochondrial caspase-3, protein p53 và bề gãy protein chống lại tế bào chết BCL2 [3, 4, 8].

Các chất có trong dịch chiết tỏi có thể ức chế trực tiếp quá trình chuyển hoá của tế bào ung thư, ức chế quá trình phát sinh và phát triển của tế bào ung thư, điều biến đáp ứng của hệ miễn dịch qua đại thực bào và lympho T [4].

Những cơ chế trên giải thích tác dụng của dịch chiết tỏi trong đề kháng ung thư nói chung. Kết quả chúng tôi thu được khi nghiên cứu tác dụng của dịch chiết TLS trên tế bào UTTTL người dòng PC-3 phù hợp với những nghiên cứu đã được công bố. Dịch chiết TLS có thể gây chết và/hoặc ức chế phát triển tế bào ung thư PC-3.

KẾT LUẬN

Trên môi trường nuôi cấy tế bào UTTTL dòng PC-3, dịch chiết TLS 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 tế bào phát triển so với nhóm chứng không dùng tỏi ($p < 0,001$). Ở nồng độ dịch chiết TLS 2,5 - 10 mg/ml, tác dụng ức chế tế bào ung thư PC-3 mạnh hơn so với tác dụng của thuốc kháng ung thư vincristin 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bùi Khắc Cường, Hoàng Văn Lương và Nguyễn Lĩnh Toàn*. Tác dụng của dịch chiết tỏi Lý Sơn trên dòng tế bào ung thư Hep2 thực nghiệm. Tạp chí Y Dược học lâm sàng 108. 2011, số 1.
2. *Anh PT, Duc NB*. The situation with cancer control in Vietnam. *Jpn J Clin Oncol*. 2002, 32 Suppl, S92-7.
3. *Arunkumar A, Vijayababu MR, Srinivasan N, Aruldas MM, Arunakaran J*. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Biochem*. 2006, Epub May 12, 288 (1-2), pp.107-13.
4. *Shankar S, Qinghe Chen, Suthakar Ganapathy, Karan P. Singh, and Rakesh K. Srivastava*. Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. *Mol Cancer Ther*. 2008, 7 (8).
5. *Ghulam Rehmani Lakho and Dileep Kumar Rohra*. Targeting apoptosis with compounds from commonly-used medicinal plants: A possible aid in the fight against cancer? *Medical Hypotheses and Research*. 2006, Vol 3. No1.
6. *Mosmann T*. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983,65, pp.55-63.
7. [Hu X](#), [Cao BN](#), [Hu G](#), [He J](#), [Yang DQ](#), [Wan YS](#). Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garlic extract in rat sarcoma cells. [Int J Mol Med](#). 2002, 9 (6), pp.641-643.
8. *Radenkovic M, Brankovic S, Kitic D, Veljkovic S, Ivetic V, Nesić M, Miladinovic B*. Inhibitory effect of aqueous and ethanolic garlic (*Allium sativum* L., Liliaceae) extracts on the rat atria. *Clin Exp Hypertens*. 2010, 32 (5), pp.251-255.
9. *Sundaram, S.G, and Milner, J.A*. Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumour cells in culture. *Cancer Lett*. 1993, 74, pp.85-90.