

Đặc điểm thực vật học và tác dụng gây độc tế bào của cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor. Boraginaceae)

Nguyễn Linh Tuyền, Bùi Hoàng Minh, Bùi Nguyễn Biên Thùy, Nguyễn Hà Mỹ Vân

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
nltuyen@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Cho đến nay, đã có khoảng 20 báo cáo trong và ngoài nước nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lí của cây Xạ đen *Celastrus hindsii*, trong đó nhiều nghiên cứu chỉ ra hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư khác nhau của loài cây này. Tuy nhiên, các nghiên cứu về cây Xạ đen *Ehretia asperula* còn rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin khoa học về đặc điểm hình thái và hoạt tính sơ bộ, làm tiền đề cho các nghiên cứu về sau. Lá Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) thu hái tháng 12/2020 tại Hòa Bình và được nghiên cứu về đặc điểm thực vật học bằng phương pháp quan sát, mô tả, phân tích so sánh với tài liệu tham khảo; khảo sát hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp MTT trên dòng tế bào MDA-MB-231. Kết quả chứng minh cao cồn lá Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) có tác dụng gây độc tế bào với IC_{50} trung bình = $(114,55 \pm 2,24) \mu\text{g/mL}$; về đặc điểm hình thái cho thấy, một số đặc điểm đặc trưng như nách lá có lớp lông mỏng, và trên vi phẫu thân, rễ, lá có nhiều tinh thể canxi oxalat hình cầu gai. Những kết quả trên làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về loài Xạ đen.

Nhận 31/05/2022
Được duyệt 30/09/2022
Công bố 16/10/2022

Từ khóa

Ehretia asperula, thực vật, ung thư

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor. – *E. hanceana* Hemsl) là một vị thuốc của người Mường ở tỉnh Hòa Bình dùng để thông kinh, lợi tiểu, chữa ung nhọt, lở loét... Nhưng hiện nay, ở nước ta, việc sử dụng cây Xạ đen để chữa bệnh ung thư ngày càng phổ biến, đến mức có nơi còn gọi cây này là “cây ung thư” và được mua bán tràn lan mà không có sự kiểm soát cũng như tiêu chuẩn để so sánh, đánh giá [1-4]. Trên thực tế, chỉ có loài Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) là đã được nghiên cứu tỉ mỉ và được chứng minh về hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư khác nhau. Điều này dẫn đến sự ngộ nhận và nhầm lẫn trong việc sử dụng các loài Xạ đen để trị bệnh. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) còn rất hạn chế, chỉ có

một vài tài liệu được công bố; thành phần hóa học và tác dụng dược lí của cây vẫn còn rất mơ hồ, thậm chí có nghiên cứu nhầm lẫn và đánh đồng cả 2 loài này [5-7]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thêm các thông tin khoa học về loài Xạ đen ở Hòa Bình (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.), làm cơ sở trong việc ứng dụng và phát triển loài cây này làm thuốc, tránh nhầm lẫn trong điều trị và nghiên cứu về sau [8-10].

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu là lá Xạ đen thu hái vào tháng 12/2020 tại tỉnh Hòa Bình. Mẫu được định danh thông qua khảo sát



thực vật học và so sánh với các tài liệu chuyên ngành tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, ĐH Nguyễn Tất Thành. Dược liệu được sấy khô sau đó xay nhỏ thành bột có kích cỡ phù hợp với từng thí nghiệm.

2.2 Dung môi, hóa chất, trang thiết bị

Cồn 96 %, cloroform, methanol, ethyl acetat, diethyl eter, acetone, n-hexan, acid acetic, acid formic, acid sulfuric, amoni hydroxyd (Trung Quốc).

Trang thiết bị thường quy trong phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Nghiên cứu đặc điểm hình thái

Thu hái các bộ phận của mẫu, mô tả phân tính bằng mắt thường, kính lúp, kính hiển vi, đối chiếu mẫu với khóa phân loại, hình ảnh và mô tả trong các tài liệu tham khảo để xác định tên loài [11].

2.3.2 Nghiên cứu đặc điểm vi học

Chọn mẫu có tính đại diện, không quá già cũng không quá non. Quan sát tiêu bản vi phẫu: sử dụng phương pháp cắt lát mỏng bằng tay và nhuộm kép carmin-lục iod. Sau đó quan sát bằng kính hiển vi ở các khoảng cách 4X, 10X, 40X và chụp ảnh để vẽ sơ đồ minh họa hình dạng tổng quát của tiết diện vi phẫu [12].

2.3.3 Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào

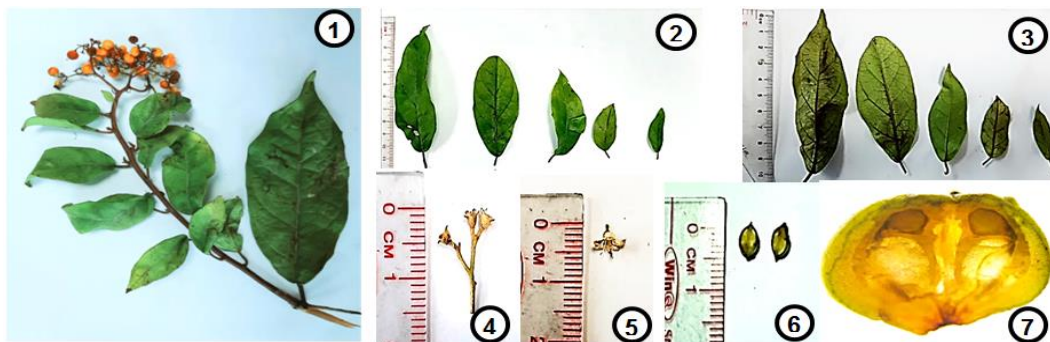
Phương pháp MTT được sử dụng để sàng lọc hoạt tính kháng ung thư in vitro của các cao lá Xạ đen trên dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231. Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào hoạt tính enzym succinat dehydrogenase (SDH) của ti thể chỉ có trong tế bào sống. SDH chuyển MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) thành tinh thể formazan tan trong dung môi hữu cơ như isopropanol tạo dung dịch màu tím được đo mật độ quang OD ở 570 nm sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong mẫu nuôi cấy. Theo đó, sau khi tế bào được ủ với mẫu thử trong 72 giờ, tiến

hành loại bỏ môi trường nuôi cấy. Rửa tế bào bằng dung dịch PBS, thêm dung dịch MTT 0,5 mg/mL và ủ ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 3 giờ. Hòa tan tinh thể formazan tạo thành trong dung dịch isopropanol acid hóa và đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm bằng máy đọc microplate [13]. IC₅₀ của mẫu tính theo % tế bào sống, xử lý số liệu bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

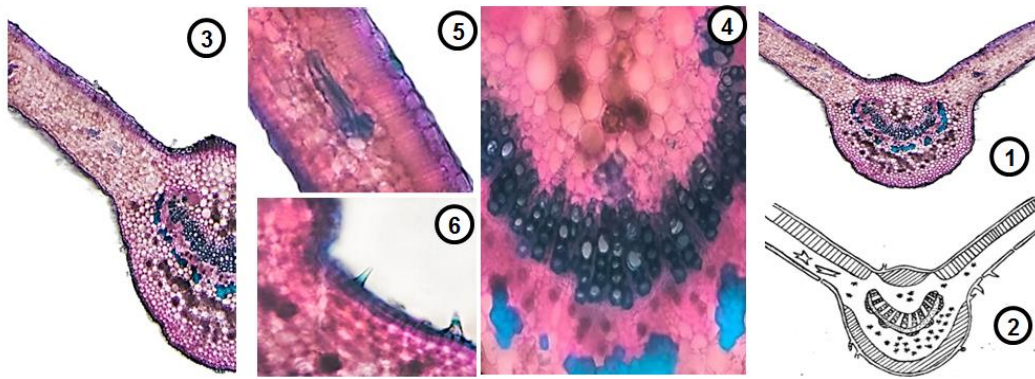
3 Kết quả và bàn luận

3.1 Đặc điểm hình thái

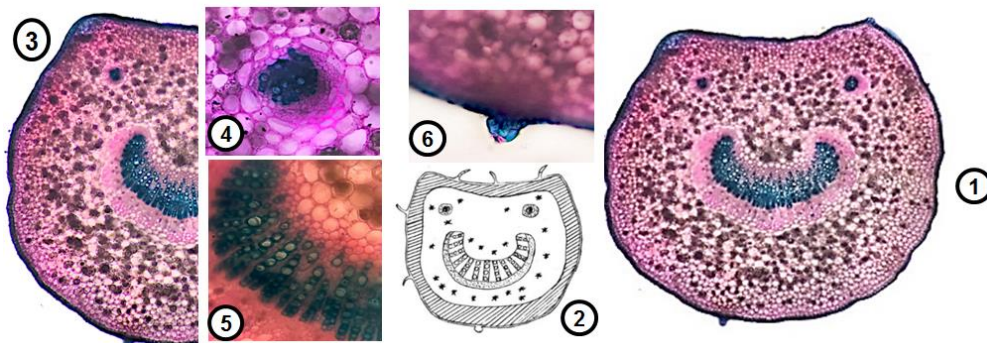
Cây dây leo thân gỗ, mọc thành bụi, dài từ (3-5) m. Thân có tiết diện tròn, màu nâu hoặc nâu xám, chắc, không có lông tơ. Thân non có màu nâu hoặc màu nâu nhạt, khi còn non thì có lông. Không có mù trắng. Lá đơn, mọc cách, hình thoi hoặc hơi trái xoan. Phiến lá nguyên và rộng, hình elip hoặc hình elip thuôn dài, kích thước (3-12) cm × (2-6) cm, có một lớp lông mỏng trong nách gân lá, gốc lá tròn, ngọn lá thường tù hoặc nhọn. Cuống lá dài (0,6-1,5) cm, có nốt sần. Hoa lưỡng tính. Cụm hoa xim hai ngã, có màu nâu nhạt, nằm trên ngọn cành, phẳng ở đỉnh, rộng (4-6) cm, hầu như không có lông tơ. Hoa cánh dính, đều, mẫu 4 và 5, có cuống nhỏ kích thước (1,5-3) mm. Lá bắc thẳng hoặc hình mác, có kích thước (3-10) mm, đôi khi cong. Đài hoa màu nâu, kích thước (1,5-2,5) mm, có lông. Tràng hoa màu trắng, dạng phễu, kích thước (3,5-4) mm, có móng rộng khoảng 5mm. Phiến hoa hình trứng hoặc tam giác, dài (2-2,5) mm, hơi dài hơn ống tràng. Chỉ nhị dài (3,5-4) mm, đường kính khoảng 1 mm. Bao phấn dính đáy, dài khoảng 1 mm. Hạt phấn hình cầu, nhiều lỗ, màu vàng nhạt. Bầu trên, có 1 vòi nhụy, dính noãn đáy, dài (3-4) mm. Quả hạch màu đỏ hoặc cam, đường kính (3-4) mm. Quả bế tụ, vỏ quả trong phân chia lúc trưởng thành thành 4 nhân cứng, mỗi nhân cứng đựng 1 hạt.



Hình 1 Mẫu cây *Ehretia Asperula* (1: Cây trên mặt đất, 2: Mặt trên của lá, 3: Mặt dưới của lá, 4: Cụm hoa, 5: Tràng hoa, 6: Lóp cắt ngang, 7: Quả bế tụ)



Hình 2 Vi phẫu lá *Ehretia Asperula* (1: Tổng quát, 2: Sơ đồ, 3: Mặt cắt một nửa, 4: Chi tiết vùng trung trụ, 5: Thể cứng, 6: Lông che chở)



Hình 3 Vi phẫu cuống lá *Ehretia Asperula* (1: Tổng quát, 2: Sơ đồ, 3: Mặt cắt một nửa, 4: Bó libe-gỗ, 5: Chi tiết vùng trung trụ, 6: Lông tiết)

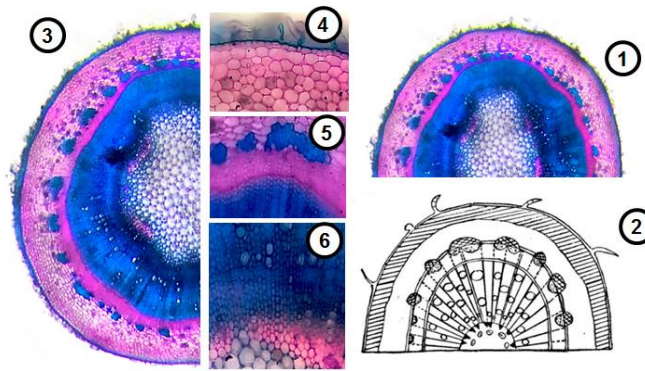
2.2. Đặc điểm vi học lá

Lá: gân giữa có mặt dưới lồi nhiều, mặt trên lõm 2 bên, hơi nhô cao ở giữa; gồm các mô sau: biểu bì trên và biểu bì dưới có lớp cutin mỏng và phẳng, rải rác có lỗ khí. Lông che chở và lông tiết có nhiều trên cả 2 lớp biểu bì, Mô dày góc gồm (3-5) lớp tế bào. Mô mềm đạo gồm nhiều lớp tế bào màng mỏng, chứa nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai và tế bào tiết. Có 2 bó gân phụ, kích thước nhỏ, gỗ 1 nằm ở trên, libe 1 nằm ở dưới. Libe và gỗ xếp thành hình vòng cung ở giữa, gỗ xếp ở trên và libe ở dưới. Phiến lá có cấu tạo dị thể không đối xứng. Phần tiếp giáp mô mềm giậu và mô mềm khuyết là những tế bào tiết, tinh thể calci oxalat hình cầu gai và thể cứng.

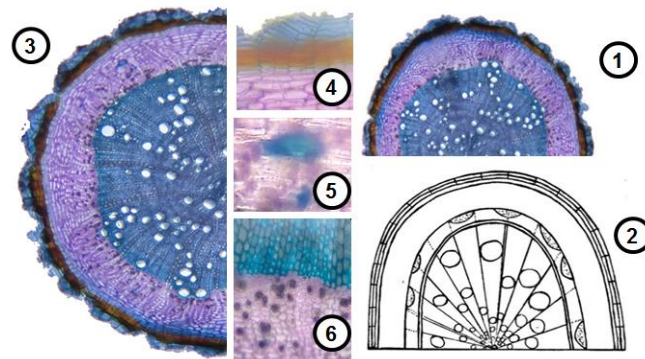
Cuống lá: biểu bì với lớp cutin mỏng và phẳng, rải rác có lỗ khí. Lông che chở và lông tiết có hình dạng và cấu tạo tương tự như ở thân. Hạ bì liên tục ở biểu bì trên, gián đoạn ở biểu bì dưới, là (1-2) lớp tế bào nhỏ hơn tế bào mô dày, xếp chứa những khuyết nhỏ. Mô dày góc gồm (4-6) lớp tế bào. Mô mềm gồm những tế bào

không đều, giữa các tế bào có đạo nhỏ; vài tế bào chứa rất nhiều tinh thể calci oxalat dạng cát. Libe-gỗ ở giữa xếp thành một hình cung liên tục, gỗ xếp ở trên và libe ở dưới; ở hai góc có thêm 2 bó libe.

Thân: biểu bì có một lớp tế bào, sắp xếp sát nhau, rải rác có lông che chở đơn bào, đa bào và có lông tiết, mô dày góc sắp xếp lộn xộn. Mô mềm vỏ là mô mềm khuyết, xếp chứa những đạo nhỏ. Nội bì đai Caspary rõ, trụ bì hóa mô cứng tạo thành tầng cụm úp lên đầu bó libe gỗ. Hệ thống dẫn cấu tạo cấp 2 theo kiểu hậu thể gián đoạn, vùng mô nằm giữa hai khu vực có mạch gỗ kế tiếp gọi là khoảng gian bó. Libe xếp vòng bao quanh gỗ, rải rác có những tế bào chứa đầy tinh thể calci oxalat dạng cát. Gỗ 2 sắp xếp thành dây xuyên tâm; mô mềm gỗ là những tế bào có vách tấm chất gỗ; tia tủy gồm (1-2) dây tế bào. Mạch gỗ 1 phân hóa li tâm. Libe trong là những cụm nhỏ, phía dưới có những cụm sợi mô cứng. Mô mềm tủy xếp chứa những đạo hay khuyết nhỏ.



Hình 4 Vi phẫu thân *Ehretia Asperula* (1: Tổng quát, 2: Sơ đồ, 3: Mặt cắt một nửa, 4: Lông che chở và lông tiết, 5: Trụ bì hoá mô cứng, 6: Chi tiết vùng trung trụ)



Hình 5 Vi phẫu rễ *Ehretia Asperula* (1: Tổng quát, 2: Sơ đồ, 3: Mặt cắt một nửa, 4: Bần, 5: Thể cứng, 6: Tinh thể Calci oxalat)

Rễ: Vùng vỏ: Bần hình chữ nhật đẹp theo hướng tiếp tuyến; các lớp phía ngoài thường bị rách tua tua. Mô mềm vỏ gồm (3-4) lớp tế bào không đều, giữa các tế bào có đạo, rải rác có vài khuyết nhỏ; rất nhiều tế bào chứa đầy tinh thể calci oxalat dạng cát. Nội bì khung Caspary rõ. Vùng trung trụ: Trụ bì hình đa giác, thường đẹp theo hướng tiếp tuyến, Libe thành vòng quanh gỗ, rất nhiều tế bào chứa đầy tinh thể calci oxalat dạng cát. Gỗ 2 chiếm tâm; mạch gỗ rất nhiều, rải rác khắp cùng;

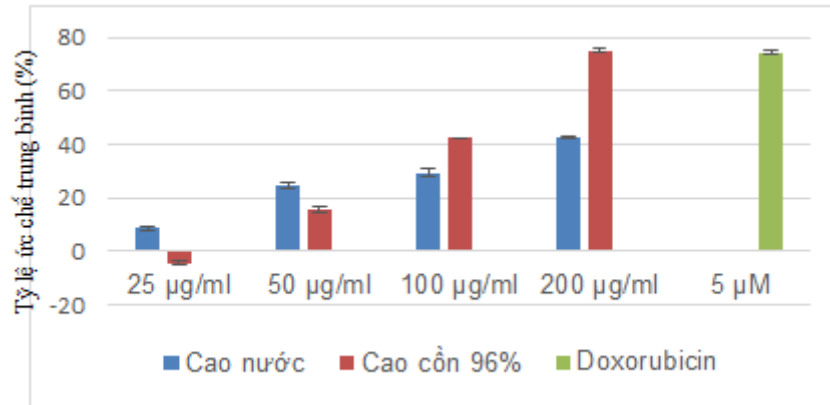
mô mềm gỗ là những tế bào vách mỏng; tia tuỷ rõ, hẹp, gồm (1-2) dãy tế bào. Gỗ 1 không phân biệt được hay xếp thành bó dưới gốc tia tuỷ, mỗi bó có (3-4) mạch phân hóa hướng tâm.

2.3 Hoạt tính kháng ung thư trên dòng tế bào MDA-MB-231.

Hoạt tính kháng ung thư của lá Xạ đen được thử nghiệm trên cao nước và cao cồn 96 %, kết quả IC₅₀ được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 6.

Bảng 1 Kết quả hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 của các mẫu thử

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	% ức chế trung bình so với mẫu chứng âm	Sai số	IC ₅₀ trung bình (µg/mL)
Cao nước	25	8,83	0,86	> 200
	50	24,45	1,20	
	100	29,53	1,36	
	200	42,79	0,63	
Cao cồn 96 %	25	-4,28	0,84	114,55 ± 2,24
	50	15,77	0,82	
	100	42,49	0,22	
	200	75,21	0,63	



Hình 6 Khả năng gây độc tế bào của mẫu, chứng dương trên tế bào MDA-MB-231

Các cao chiết cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) thể hiện hoạt tính độc tế bào tương đối yếu trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, sự ức chế rõ rệt chỉ ở nồng độ lớn hơn 100 mg/mL. Cao cồn có hoạt tính độc tế bào mạnh hơn cao nước và tác dụng tỉ lệ thuận vào nồng độ (chứng dương: doxorubicin $IC_{50} = 1,60 \pm 0,01$).

3 Kết luận và kiến nghị

Việc định danh đúng loài là yêu cầu tiên quyết trong các nghiên cứu về dược liệu. Tuy nhiên, việc thu mua dược liệu Xạ đen ở Việt Nam thường gặp phải nhầm lẫn vì đây là tên chung chỉ các loài *Celastrus hindsii*, *Ehretia asperula*, *Ehretia dentata*. Đề tài đã tiến hành khảo sát đặc điểm thực vật học, so sánh với các khóa phân loại thực vật và xác định mẫu là Xạ đen loài *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. Các mô tả và hình ảnh về

đặc điểm hình thái, vi phẫu được ghi nhận làm cơ sở cho các nghiên cứu về các loài Xạ đen nhằm tránh sai sót trong khâu thu hái nguyên liệu.

Kết quả khảo sát hoạt tính độc tế bào của lá Xạ đen cho thấy cao cồn có nhiều tiềm năng hơn trong chiết xuất, phân lập các hợp chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư. Tuy nhiên, vì giá IC_{50} của cao cồn còn tương đối cao ($114,55 \pm 2,24$) µg/mL, nghiên cứu tiếp theo sẽ tách thành các phân đoạn khác nhau bằng kỹ thuật lọc phân bố lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần nhằm tăng sự phân hóa và chọn lọc trong các nghiên cứu phân lập sau này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.92/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

- Nguyễn Thị Thu Thủy (2017). “Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng diệt tế bào ung thư của lá Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor)”, *Luận văn Thạc sĩ*, tr. 13.
- Govaerts, R. (2001). World Checklist of Seed Plants Database in ACCESS E-F: 1-50919. [Cited as *Ehretia asperula*.]
- Tram, P. T. M., Suong, N. K., & Tien, L. T. T. (2021). effects of plant growth regulators and sugars on *Ehretia asperula* Zoll. et Mor. *Cell Culture. Indian Journal of Agricultural Research*, 55(4), pp.410-415.
- Ramezani, M., Amiri, M. S., Zibae, E., Boghrati, Z., Ayati, Z., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2020). A review on the phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology of *Borago* species. *Current Pharmaceutical Design*, 26(1), 110-128.

5. Li, L. I., Peng, Y., Yao, X., Xu, L., Wulan, T., Liu, Y., ... & Xiao, P. (2010). Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Ehretia* Linn. *Chinese Herbal Medicines*, 2(2), 106-111.
6. Kim Dang Dinh, Nguyet Vu Thi, Anh Ha Xuan, Trang Nguyen Thi Thu, Chuyen Nguyen Hong, Huong Le Mai, Ha Tran Thi Hong, Ho Do Hai, Dat Nguyen Tien (2019). "Cytotoxic phenolic constituents from the leaves of *Ehretia asperula*". *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 14, pp. 196-197.
7. Vũ Thị Nguyệt, Nguyễn Tiến Đạt, Hương Lê. Mai, Trần Thị Hồng Hà, Nguyễn Hồng Chuyên, Nguyễn Thị Hằng, Đặng Đình Kim (2018). "Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các chất chiết từ cây Xạ đen (*Ehretia asperula*)". *Tạp chí Sinh học*, 40, (2), pp.145-152.
8. Miller, J. S. (1989). A Revision of the New World Species of *Ehretia* (Boraginaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76(4), 1050-1076.
9. Moridi Farimani, M., Nazarianpoor, E., Rustaie, A., & Akhbari, M. (2017). Phytochemical constituents and biological activities of *Cleome iberica* DC. *Natural Product Research*, 31(11), 1329-1332.
10. Nguyễn Huy Cường (2018). "Nghiên cứu thành phần hóa học và thăm dò hoạt tính sinh học cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth. & Hook.) và cây Cùm rùm răng (*Ehretia dentata* Courch.)". *Luận án tiến sĩ*.
11. Zhu Ge-ling, Harald Riedl, Rudolf Kamelin (1995). Boraginaceae. *Flora of China*, Vol 16, pp 329-427.
12. Bộ môn Dược liệu (2015). *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*. Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh, tr 1-17.
13. Denizot F., Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to this tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89 (2), pp.271-277.

Characteristics and cytotoxic effects of *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. Boraginaceae

Nguyen Linh Tuyen, Bui Hoang Minh, Bui Nguyen Bien Thuy, Nguyen Ha My Van

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

nltuyen@ntt.edu.vn

Abstract Up to now, there have been more than 20 reports studying the chemical composition and pharmacological effects of *Celastrus hindsii*, in which many studies have shown the activity against cancer cell lines of this species. However, studies on *Ehretia asperula* are very limited. Therefore, this study was conducted to provide scientific information on preliminary morphological and activity characteristics, as a premise for future studies. In this research, *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. leaves were collected in December 2020 in Hoa Binh and studied for their botanical characteristics by methods of observation, description, analysis and comparison with the reference materials; while its cytotoxic activity was investigated using MTT method on the cell line MDA-MB-231. The results showed that *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. leaf tincture showed cytotoxic effects with mean $IC_{50} = (114.55 \pm 2.24) \mu\text{g/mL}$ and morphological results showed some characteristic features such as axillary leaves with a thin layer of hairs, and that on the microsection of stems, roots and leaves there are many spherical calcium oxalate crystals. These results serve as a premise for the following studies on *Ehretia asperula*.

Keywords *Ehretia asperula*, botanical characteristics, cancer