

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thùy Trang

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ GAN CỦA
CÁC CAO CHIẾT TÁCH CHIẾT TỪ CÂY AN XOA
(*HELICTERES HIRSUTA* LOUR.)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - Năm 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thùy Trang

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ GAN CỦA
CÁC CAO CHIẾT TÁCH CHIẾT TỪ CÂY AN XOA
(*HELICTERES HIRSUTA* LOUR.)**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Nguyễn Văn Trữ

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự nghiên cứu và tìm hiểu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Học viên

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến thầy TS. Nguyễn Văn Trữ đã luôn hết lòng dạy dỗ, bảo ban, dìu dắt, động viên, khích lệ cho tôi về chuyên môn cũng như đã tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn. Đó là những góp ý hết sức quý báu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện khóa luận của mình.

Tôi xin cảm ơn các đồng nghiệp Trung tâm Vật lý chất mềm-Vật lý Sinh học và Viện Công nghệ Sinh học đã luôn giúp đỡ và đưa ra những lời khuyên, góp ý bổ ích cho tôi trong suốt quá trình tôi công tác tại trung tâm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tất cả các thầy, cô của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy, tạo điều kiện về cơ sở vật chất, cung cấp cho tôi các kiến thức phong phú, làm nền tảng để tôi có thể hoàn thành được bài luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè những người luôn lắng nghe, sẵn sàng sẻ chia và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu.

Luận văn được tài trợ về mặt kinh phí từ chương trình sau tiến sĩ tạo nguồn lực KHCN cho Viện Hàn lâm KHCNVN. Tên đề tài hỗ trợ sau tiến sĩ: Nghiên cứu ảnh hưởng ở mức độ phân tử của các hợp chất thứ cấp tách chiết từ cây An xoa *Helicteres hirsuta* Lour. lên tế bào ung thư gan.

Học viên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	I
LỜI CẢM ƠN	II
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ CÁI VIẾT TẮT	1
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	2
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	2
MỞ ĐẦU.....	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	7
1.1 Tổng quan về ung thư gan.....	7
1.1.1 Nguyên nhân gây ung thư gan	7
1.1.2 Các yếu tố làm tăng nguy cơ ung thư gan.....	7
1.1.3 Phương pháp điều trị ung thư gan.....	8
1.2 Tổng quan về cây An xoa (<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.).....	9
1.2.1 Đặc điểm hình thái của cây An xoa	9
1.1.2 Thành phần hóa học	10
1.1.3 Phân bố.....	10
1.3 Tình hình nghiên cứu về cây An xoa	11
1.3.3 Các nghiên cứu trên thế giới	11
1.3.4 Các nghiên cứu trong nước	14
1.4 Sử dụng cây An xoa trong điều trị ung thư gan	19
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1 Đối tượng nghiên cứu.....	21
2.1.1 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	21
2.1.2 Hoá chất và thiết bị nghiên cứu	21
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1 Phương pháp thu mẫu	22
2.2.2 Phương pháp xử lý và chiết mẫu dược liệu	23
2.2.3 Phương pháp định danh loài bằng phương pháp sinh học phân tử....	23
2.2.4 Phương pháp sắc ký bản mỏng	25
2.2.5 Phương pháp sàng lọc hoạt tính sinh học hoạt tính gây độc tế bào ...	25
2.2.6 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương	27
2.2.7 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự di căn, xâm lấn	28
2.2.8 Phương pháp western blot.....	28

2.2.9 Phương pháp real-time PCR	29
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1 Kết quả định danh mẫu cây An xoa	30
3.2 Kết quả tách chiết các phân đoạn dịch chiết từ cây An xoa	34
3.2.1 Tách chiết các phân đoạn dịch chiết	34
3.2.2 Kiểm tra thành phần phân đoạn dịch chiết bằng sắc ký bản mỏng....	36
3.3 Kết quả đánh giá tính gây độc tế bào với cao chiết từ cây An xoa (mtt assay)	38
3.3.1 Lựa chọn phân đoạn dịch chiết có khả năng gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2	38
3.3.2 Đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của dịch chiết Dichloromethane trên các dòng ung thư gan khác nhau như Hep-G2, Huh7 và Chang cell.....	40
3.4 Thành phần hóa học của cao chiết từ cây An xoa.....	43
3.5 Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương với cao chiết từ cây An xoa (wound healing assay)	46
3.6 Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn với cao chiết từ cây An xoa (invasion assay)	47
3.7 Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình di căn, xâm lấn của tế bào ung thư khi tế bào ung thư được xử lý với cao chiết từ cây An xoa.....	49
3.8 Thảo luận.....	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ CÁI VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng việt
1	DMSO	Dimethyl sufoxit	Đối chứng âm
2	DCLHH	Dichloromethane <i>Helicteres hirsute</i> Lour	Dịch chiết dichloromethane của cây An xoa
3	EtHH	Etyl axetat <i>Helicteres hirsute</i> Lour	Dịch chiết etyl axetat của cây An xoa
4	FBS	Fetal Brovine serum	Huyết thanh bào thai bê
5	HepG2	human hepatocellular carcinoma	Tế bào ung thư gan ở người
6	HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc lý lỏng hiệu năng cao
7	I%	% Inhibition	Phần trăm ức chế
8	IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối đa 50%
9	MeHH	Methanol <i>Helicteres hirsute</i> Lour	Cao chiết methanol của cây An xoa
10	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium Bromide	Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư
11	HEHH	n-hexan <i>Helicteres hirsute</i> Lour	Dịch chiết n-hexan của cây An xoa
12	OD	Optical Density	Mật độ quang của mẫu
13	TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1 Hoạt tính gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây An xoa	13
Bảng 2.1 Thông tin các môi sử dụng	24
Bảng 2.2 Trình tự các cặp môi sử dụng trong đánh giá biểu hiện các gen liên quan đến quá trình di căn xâm lấn trên tế bào Hep-G2	29
Bảng 3.1 Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen AX. NA.rbcL	31
Bảng 3.2 Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen AX. NA.matK.....	33
Bảng 3.3 Khối lượng và tỷ lệ cao chiết từ cây An xoa	34
Bảng 3.4 Kết quả xác định giá trị IC50 của các phân đoạn dịch chiết và đối chứng Ellipticine	38
Bảng 3.5 Kết quả xác định giá trị IC50 của phân đoạn dịch chiết dichloromethane	41
Bảng 3.6 Thành phần hóa học của các chất trong mẫu cao chiết cây An xoa.	44

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1 Hình ảnh cây An xoa (<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.)	10
Hình 1.2 Sáu hợp chất lignan tách chiết từ cây An xoa Indonesia	11
Hình 1.3 Cấu trúc của hợp chất stigmasterol (A); Cấu trúc của hợp chất lupeol (B); Cấu trúc của hợp chất apigenin (C);Cấu trúc của hợp chất tiliroside (D)19	19
Hình 2.1 Sơ đồ mô tả phương pháp MTT	26
Hình 3.1 Kết quả so sánh trình tự sử dụng môi rbcL.....	31
Hình 3.2 Kết quả so sánh trình tự sử dụng môi matK	32
Hình 3.3 Mẫu An xoa tách chiết.	34
Hình 3.4 Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu cây An xoa.....	36
Hình 3.5 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. Dung môi khai triển: Dichloromethane – n-Hexan (1:1).....	37
Hình 3.6 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. Dung môi khai triển: Dichloromethane – Methanol (95:5)	37
Hình 3.7 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. Dung môi khai triển: Dichloromethane – Methanol (8:2).	37
Hình 3.8 Đồ thị biểu diễn tương quan giữa % tỷ lệ tế bào sống và nồng độ mẫu An xoa dịch chiết dichloromethane (DCLHH).	39
Hình 3.9 Hoạt tính gây độc tế bào Hep-G2 của cao chiết từ cây An xoa và chất sạch	40
Hình 3.10 Hoạt tính gây độc tế bào Huh7 của cao chiết dichlomethane từ cây An xoa.	42
Hình 3.11 Hoạt tính gây độc tế bào Chang cell của cao chiết dichlomethane từ cây An xoa.....	43
Hình 3.12 <i>Helicteres hirsuta</i> và các thành phần hóa học thực vật của nó.....	45
Hình 3.13 Hoạt tính ức chế phục hồi tổn thương của cao chiết dichlomethane từ cây An xoa lên tế bào Hep-G2.....	47
Hình 3.14 Chiết xuất dichlomethane của <i>Helicteres hirsuta</i> ngăn chặn sự xâm lấn của tế bào Hep -G2.....	48
Hình 3.15 Dịch chiết dichloromethane của <i>Helicteres hirsuta</i> điều chỉnh giảm mức độ chuyển đổi tế bào biểu mô thành trung mô (EMT).....	50

MỞ ĐẦU

Ung thư là nguyên nhân gây ra tử vong đứng thứ hai trên thế giới, sau các bệnh về tim mạch. Theo thống kê, riêng trong năm 2018, có tới 18.1 triệu ca mắc mới trong đó có tới 9.6 triệu ca tử vong do ung thư [1]. Ung thư gan là ung thư có tỷ lệ mắc mới cao nhất tại Việt Nam năm 2018 theo Globocan, có 25.335 trường hợp (15,4%); Tỷ lệ ung thư gan mới ở nam là 21,5% và ở nữ là 7,8%.

Ở Việt Nam, theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới [2] số ca mắc mới ung thư tăng rất nhanh ở mức 68.000 ca trong năm 2000 lên 164.671 năm 2018, và dự kiến tăng 190.000 ca trong năm 2020. Trong năm 2018 có tới 114.871 người tử vong vì ung thư, xấp xỉ 315 người chết mỗi ngày. Đặc biệt tỉ lệ tử vong ở các bệnh nhân ung thư tại Việt Nam rất cao lên tới 60% so với tỉ lệ tử vong tại Mỹ chỉ 34.39%. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) năm 2018, ung thư gan là một trong 5 loại ung thư gây tử vong hàng đầu với gần 800.000 ca tử vong mỗi năm. Đáng lưu ý ung thư gan là bệnh ung thư phổ biến nhất ở Việt Nam với tỉ lệ mắc ung thư gan tại Việt Nam xếp vị trí thứ 4/185 quốc gia, vùng lãnh thổ có số liệu về ung thư. Trung bình cứ 100.000 người Việt thì có 23,2 người bị ung thư gan [2].

Phương pháp điều trị ung thư phổ biến hiện nay được áp dụng là hóa trị liệu và xạ trị kết hợp với phẫu thuật. Nhược điểm của tất cả các phương pháp trên là có thể xảy ra tác dụng phụ nguy hiểm không mong muốn, chi phí cao, đôi khi không triệt để. Theo như báo cáo của bộ y tế Việt Nam, chi phí điều trị ung thư trong năm 2012 lên tới 25.78 nghìn tỷ đồng, xấp xỉ 1.2 tỷ đô la mỹ, chiếm tới 0.22 % tổng sản phẩm quốc nội (GDP). Do đó, xu thế mới hiện nay trong điều trị ung thư là tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên mang hoạt tính chống lại các tế bào ung thư để sử dụng. Các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đảm bảo sự an toàn, không gây ra các tác dụng phụ không mong muốn, với chi phí thấp. Hơn nữa, chúng còn có thể được sử dụng như một dạng thực phẩm chức năng, làm tăng cường sức đề kháng của cơ thể, từ đó phòng chống lại các bệnh hiểm nghèo trong đó có ung thư

Cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.) là dạng cây bụi, thân gỗ, nhánh hình trụ, và thường cao từ 1-3 mét. Lá của cây An xoa có hình trái xoan, mặt dưới màu trắng, cả hai mặt phủ đầy lông hình sao. Các lông trên lá thường gây ngứa khi chạm vào. Cây có hoa gồm 5 cánh, có màu tím. Quả An xoa

hình dạng giống con sấu và chứa nhiều hạt, quả khi còn non sẽ có màu xanh, khi quả già sẽ chuyển dần sang màu đen. Cây ra quả trong mùa nắng [3].

Giá trị của cây An xoa đã được thừa nhận ở trong nước cũng như thế giới nhờ khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa,... Tuy nhiên, Các nghiên cứu về cây An xoa ở Việt Nam vẫn chưa được quan tâm nhiều và vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế, chỉ được vận dụng trong các bài thuốc cổ truyền, chưa ứng dụng nhiều trong công nghệ dược phẩm để chữa bệnh. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sâu hơn để đánh giá hoạt tính của các cao chiết tách chiết từ cây An xoa như ức chế sự phục hồi tổn thương của tế bào ung thư (wound healing assay). Bên cạnh đó là đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn của tế bào ung thư gan (invasion assay). Đồng thời chúng tôi sẽ tiến hành đánh giá ảnh hưởng ở mức độ phân tử của cao chiết lên các gen có liên quan đến quá trình di căn, xâm lấn của các dòng tế bào ung thư như Snail, Twist, N-cadherin và E-cadherin ở mức độ biểu hiện gene (mRNA) và mức độ protein nhờ phương pháp western blot và phương pháp real time PCR. Chính vì những tác dụng rất lớn từ loài cây này mà nhóm nghiên cứu quyết định chọn đề tài: “Đánh giá hoạt tính kháng tế bào ung thư gan của các cao chiết tách chiết từ cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.)”

Mục tiêu nghiên cứu:

1, Định danh được mẫu cây An xoa thu hoạch tại Nghệ An bằng chỉ thị phân tử.

2, Đánh giá được hoạt tính sinh học ở mức độ *in vitro* của cao chiết thô với các dung môi chiết khác nhau.

3, Nghiên cứu ảnh hưởng ở mức độ phân tử (biểu hiện của một số gen) của cao chiết lên một số dòng tế bào ung thư gan.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Định danh mẫu cây An xoa thu hoạch tại Nghệ An bằng chỉ thị phân tử.

Nội dung 2: Điều chế các phân đoạn dịch chiết từ cây An xoa.

Nội dung 3: Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết thô lên các dòng tế bào ung thư gan như HepG2, Huh7, và Chang cell.

+ Đánh giá hoạt tính gây độc ở mức độ *in vitro* với một số dòng tế bào ung thư gan như HepG2, Huh7, chang cell của các cao chiết thô từ cây An xoa.

+ Đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương (wound healing assay) lên dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 của các cao chiết thô từ cây An xoa.

+ Đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn (invasion assay) lên dòng tế bào ung thư gan HepG2 của các cao chiết thô từ cây An xoa.

Nội dung 4: Đánh giá mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình di căn, xâm lấn của tế bào ung thư khi tế bào ung thư được xử lý với cao chiết từ cây An xoa.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ GAN

1.1.1 Nguyên nhân gây ung thư gan

Ung thư là nhóm bệnh có liên quan đến sự phát triển bất thường của các tế bào có khả năng xâm lấn hoặc lan sang các bộ phận khác trên cơ thể. Ung thư gan nguyên phát gồm có ung thư biểu mô tế bào gan (Chiếm 75- 85%) và ung thư biểu mô đường mật trong gan (chiếm 10-15%). Trong đó ung thư biểu mô tế bào gan hay gọi là ung thư gan (HCC: Hepatocellular carcinoma) đứng hàng thứ 6 trong các ung thư hay gặp trên thế giới và là nguyên nhân thứ 4 gây tử vong do ung thư trên thế giới trong năm 2018, với khoảng 841.000 trường hợp ung thư gan mới và 782 000 trường hợp tử vong mỗi năm do HCC. Tỷ lệ mắc và tử vong do HCC ở nam giới cao gấp 2-3 lần so với nữ ở hầu hết mọi vùng trên thế giới. Hơn nữa tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), đang gia tăng, người ta ước tính rằng tỷ lệ mắc bệnh đã tăng gần gấp ba lần trong 3 thập kỷ qua, với sự dịch chuyển sang xuất hiện ở lứa tuổi trẻ hơn. Tuy nhiên, ung thư gan lại là ung thư đứng hàng đầu trong các ung thư mới mắc ở cả 2 giới tại Việt Nam năm 2018 theo Globocan, có 25.335 trường hợp (15,4%); Tỷ lệ ung thư gan mới ở nam là 21,5% và ở nữ là 7,8% , đáng nói là tỷ lệ phát hiện ung thư gan và tỷ lệ tử vong gần như tương đương.

Ung thư gan xảy ra khi các tế bào gan phát triển có những thay đổi (đột biến) trong DNA của chúng. Đột biến DNA tạo ra sự thay đổi trong tế bào, khiến các tế bào phát triển ngoài sự kiểm soát và kết quả là hình thành một khối u còn gọi là khối tế bào ung thư.

1.1.2 Các yếu tố làm tăng nguy cơ ung thư gan

Theo thống kê ở Việt nam và các nước Châu Á, cứ ít nhất 1 trong 200 bệnh nhân khi nhiễm viêm gan B sẽ có nguy cơ mắc bệnh ung thư gan tăng theo tỷ lệ mỗi năm (0.5%/năm). Người mang viêm gan B sẽ có nguy cơ mắc ung thư gan cao hơn gấp 100 lần so với những người không nhiễm viêm gan [4], [5]. Ở châu Á, đối với Nam giới dưới 40 tuổi thì không cần phải tham gia tầm soát ung thư, trừ khi cha hoặc mẹ bị ung thư gan. Ở nữ giới, độ tuổi từ 50 tuổi cần phải tham gia tầm soát. Đặc điểm di truyền của viêm gan B là một trong những yếu tố quan trọng. Người bị viêm gan B tít C sẽ có khả năng phát triển thành ung thư gan cao hơn so với người bị viêm gan B tít B [6], [7]. Người bị xơ gan với viêm gan C mãn tính sẽ có khả năng phát triển thành

ung thư gan cao 2% - 8%/năm. Bên cạnh đó thì những người nhiễm viêm gan C nhưng lại không bị xơ gan thì sẽ có nguy cơ thấp hơn. Chính vì thế, những người vừa bị xơ gan và mắc viêm gan C cần thiết phải tham gia chương trình tầm soát [8], [9]. Bệnh nhân nhiễm HIV, viêm gan B hoặc C có bệnh gan phát triển nhanh, khi bệnh phát triển đến giai đoạn xơ gan, thì có khả năng cao phát triển thành ung thư gan. Thống kê cho thấy cứ 25% ca tử vong ở người bị nhiễm HIV sau quá trình điều trị chống HIV là do ung thư gan gây ra [4], [10]. Một nguyên nhân nữa có thể gây ra bệnh ung thư gan là bị Gan nhiễm mỡ, bệnh gây ra do tình trạng bị béo phì và rối loạn quá trình trao đổi chất trong cơ thể gây ra.

Nghiện rượu cũng là một trong những nguyên nhân làm tăng nguy cơ bị ung thư gan. Theo một khảo cho thấy, bệnh gan do thói quen nghiện rượu chiếm 1/3 số ca mắc ung thư gan [11]. Gia tăng nồng độ chất sắt trong cơ thể do di truyền, thiếu men alpha 1-antitrypsin hay bệnh tiểu đường cũng là nguy cơ gây ra ung thư gan [4]. Bên cạnh đó, ăn thức ăn có lẫn chất độc aflatoxin B1, hút thuốc và nhiễm virus AAV2 (adeno-associated virus 2) cũng là các yếu tố có thể làm tăng nguy cơ mắc bệnh ung thư gan [12]. Đặc biệt, chất độc aflatoxin B1 được tạo ra từ nấm *Aspergillus* có trong các loại ngũ cốc, từ bắp, và hạt trũ trong điều kiện nóng ẩm.

1.1.3 Phương pháp điều trị ung thư gan

Ung thư gan có thể được chia làm 5 giai đoạn khác nhau dựa trên chỉ số PS (Performance score), chỉ số Child-Pugh số lượng và tình trạng bứu. Bệnh nhân giai đoạn 1, 2, 3 và 4 có thể được điều trị tận gốc (giai đoạn 1 và giai đoạn 2) hay hỗ trợ (giai đoạn 3 và giai đoạn 4) [12], [13]. Bệnh nhân giai đoạn 5 thì cần được chăm sóc đặc biệt nhằm làm giảm mức độ ảnh hưởng của bệnh và không có phương pháp nào để kéo dài được sự sống ở trong giai đoạn này. Ở giai đoạn đầu (giai đoạn 1 hay 2). Phẫu thuật cắt bỏ là phương pháp điều trị được xem là tối ưu nhất với tỉ lệ sống sót sau 5 năm là 70%. Bệnh nhân có bứu ung thư nằm đơn lẻ, không bị tăng áp lực tĩnh mạch cửa (portal hypertension) thì có thể tiến hành phẫu thuật, ngoài ra gan còn phải hoạt động tốt. Thông thường, tất cả các thùy gan có chứa tế bào ung thư thì cần phải được cắt bỏ [12]. Ghép gan là phương pháp điều trị tốt nhất đối với bệnh nhân có tình trạng bứu phù hợp và không thể cắt bỏ thùy gan [14], [15]. Đối với người không ghép gan được và có một bứu nhỏ hơn 2 cm, thì đốt tế bào

bằng sóng nhiệt sẽ là phương án tối ưu với khả năng sống sót sau 5 năm lên đến 50 - 70% [12]. Ở Giai đoạn giữa (giai đoạn 3), xuất hiện nhiều bướu ác tính, các mạch máu tập trung ở trong tế bào ung thư và khi đó thì các tế bào ung thư sẽ lây lan ra bên ngoài gan. Tuy nhiên, chức năng gan thì vẫn còn, các dấu hiệu của bệnh cũng chưa phát ra ngoài. Hoá trị nội soi qua ống thông động mạch chính là phương pháp tốt nhất kéo dài sự sống từ 26-40 tháng [12]. Giai đoạn gần cuối (giai đoạn 4), thuốc sorafenib ngăn chặn hoạt động của nhiều men kích hoạt nhóm tyrosine giúp tăng khả năng sống sót từ 7,9 – 10,7 tháng. Nó có hiệu quả hầu như với tất cả các loại ung thư gan, đã được chứng minh là có hiệu quả trên những bệnh nhân nhiễm viêm gan B ở châu Á [12].

1.2 TỔNG QUAN VỀ CÂY AN XOA (*HELICTERES HIRSUTA* LOUR.)

1.2.1 Đặc điểm hình thái của cây An xoa

Cây An xoa (hay còn được gọi là cây tổ kén cái, cây râu kén lông, cây râu kén cái, cây dó lông) có tên khoa học là *Helicteres hirsuta* Lour.. thuộc loài thực vật họ Trôm (*Sterculiaceae*). Một số loại cây cùng họ như Tổ kén (tên khoa học: *Helicteres angustifolia* L.), tổ kén không lông (tên khoa học: *Helicteres glabriuscula* wall.), tổ kén lá mác (tên khoa học: *Helicteres lanceolata* DC.), tổ kén tròn (tên khoa học: *Helicteres isora* L.), tổ kén hoa trắng (tên khoa học: *Helicteres viscida* Blume). Cây An xoa là dạng cây bụi, thân gỗ cao từ 1m- 3m, phân nhánh hình trụ, có lông, mọc ở nơi đất ẩm, lá to bằng bàn tay, rộng từ 2,5cm-7,5cm, hình trái xoăn dài 5cm-17cm, gốc cụt hoặc hình tim, đầu thon thành mũi nhọn, mặt dưới của lá màu trắng, cả hai mặt có phủ đầy lông hình sao, mép có răng không đều, gân gốc 5, cuống lá dài từ 0,8 – 4cm, có lá kèm hình dài, có lông dễ rụng. Cụm hoa bao gồm các bông ngắn, đơn hoặc xếp đôi ở nách lá. Hoa thường có màu hồng hay đỏ, cuống hoa có khớp và có lá bắc dễ rụng. Hoa gồm 5 cánh, cuống bộ nhị có vân đỏ, nhị 10, nhị lép bằng chỉ nhị, bầu có nhiều gợn, có 25-30 noãn trong mỗi lá noãn. Quả có hình dạng giống như con sâu, lông khi chạm vào thì rất ngứa. Cây thường ra hoa kết quả từ tháng 7 - tháng 11(Hình 1.1) [16], [17].



Hình 1.1 Hình ảnh cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.)

1.1.2 Thành phần hóa học

Cây An xoa từ lâu đã được biết đến trong thành phần có chứa nhiều enzyme, alcoloid, nhiều hoạt chất flavonoid, và các nguyên tố vi lượng. Alcoloid được coi là hoạt chất có khả năng ngăn chặn các tế bào ung thư, chống lại sự phát triển của các khối u. Không chỉ vậy hoạt chất flavonoid trong cây An xoa còn có khả năng bảo vệ các tế bào miễn dịch, chống oxy hóa rất tốt. Ngoài ra nó còn ngăn chặn hoạt động của các gốc tự do có khả năng gây bệnh cho con người.

1.1.3 Phân bố

Cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.) được phát hiện đầu tiên bởi một tộc người ở Campuchia. Ở Việt Nam, cây An xoa được cộng đồng người Campuchia sử dụng đầu tiên ở Nghệ An để hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến gan, đặc biệt là xơ gan.

Cây An xoa được biết đến với khả năng hỗ trợ điều trị bệnh gan rất hiệu quả. Trên thực tế có nhiều người mắc bệnh gan rất nặng sau đó có những dấu hiệu phục hồi chức năng gan khá tốt nhờ sử dụng cây An xoa trong điều trị bệnh. Đây được coi là một tín hiệu tốt trong việc nghiên cứu và điều trị các bệnh về gan hiện nay.

Nghệ An được xem là nơi đầu tiên biết cách sử dụng loại cây này trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh về gan, đã có nhiều bệnh nhân viêm gan, ung thư gan, xơ gan cổ trướng sau khi sử dụng nước sắc từ cây An xoa đã có tiến triển rất khả quan. Thông tin này được lan truyền khắp nơi và đã được người dân nhiều nơi tin tưởng, sử dụng có hiệu quả.

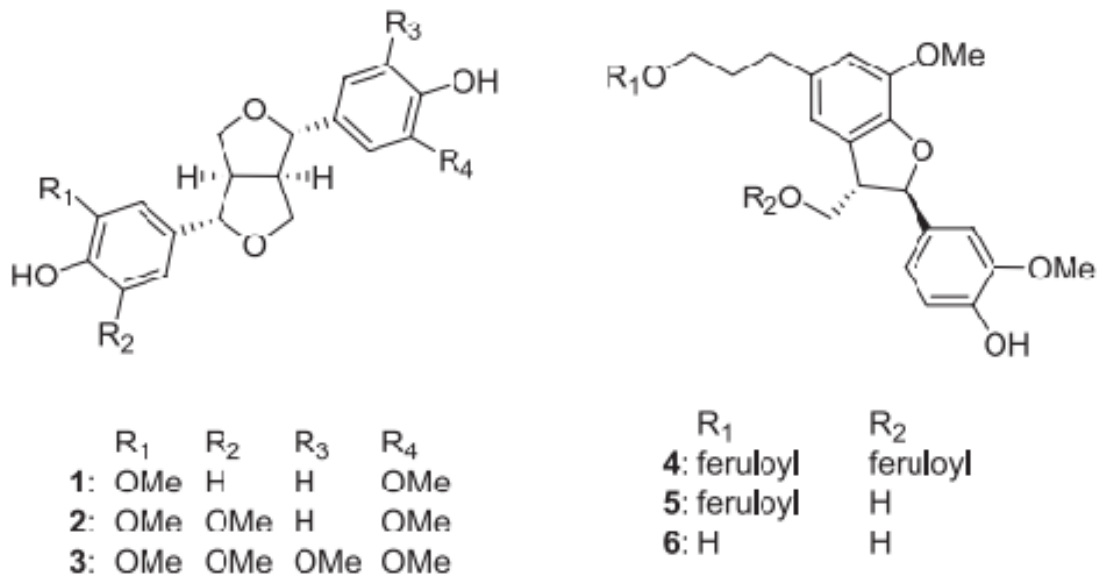
Cây An xoa thường mọc ở những nơi đất ẩm quanh các bờ suối hay trong các khu rừng, phân bố chủ yếu ở Nam Trung Quốc và ở các nước Nam

Á như Việt Nam, Philippine, Lào, Thái Lan, Ấn Độ, Campuchia, Malaysia. Ở nước ta, thường thấy cây trên các đồi cây bụi, ven rừng, rừng thưa và phổ biến từ Bắc tới Nam nhưng phân bố chủ yếu ở tỉnh Nghệ An, Bình Phước, Lâm Đồng và một số tỉnh miền núi phía Bắc.

1.3 TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CÂY AN XOA

1.3.3 Các nghiên cứu trên thế giới

Trên thế giới, một số nước đã sử dụng cây An xoa như một loại thảo dược truyền thống trong điều trị các bệnh liên quan đến gan, phổi và sử dụng như loại thuốc giảm đau [18], [19]. Hợp chất tách chiết từ cây An xoa có nhiều hoạt tính sinh học, có tiềm năng ứng dụng trong đời sống như: hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn, kháng ung thư nhờ hoạt tính chống oxy hóa, và gây độc tế bào... Young - Won Chin và cộng sự sử dụng chloroform để tách chiết các hoạt chất từ cây An xoa thu thập ở Indonexia. Hợp chất thu được có hoạt tính gây độc tế bào cao với dòng tế bào ung thư phổi, ung thư vú và dòng tế bào tĩnh mạch rốn với nồng độ ức chế 50 % sự sinh trưởng tế bào (IC50) dao động từ 0.8- 10.5 $\mu\text{g/ml}$ tùy vào từng loại tế bào và các phân đoạn thu được trong quá trình tách chiết. Sử dụng sắc khí lỏng hiệu năng cao kết hợp khối phổ, nhóm tác giả đã phát hiện ra 6 lignans có trong cây An xoa: (-)-boehmenan, (\pm)-medioresinol, (\pm)-pinoresinol, (\pm)-syringaresinol, (-)-boehmenan H và (\pm)-trans-dihydrodiconiferyl(Hình 1.2) [18].



Hình 1.2 Sáu hợp chất lignan tách chiết từ cây An xoa Indonesia

Trong số 6 lignan được ghi nhận, pinoresinol có hiệu quả gây độc lên các tế bào ung thư cao nhất (giá trị IC50 thấp nhất). Ngoài ra, hoạt chất

pinoresinol cũng ghi nhận hiệu quả cải thiện trí nhớ nhờ khả năng ức chế đặc hiệu enzyme acetylcholinesterase, một enzyme có vai trò quyết định trong một số bệnh về trí nhớ. Ngoài ra, pinoresinol cũng tăng cường các dòng Ca^{2+} đi vào trong các tế bào thần kinh giúp cải thiện khả năng truyền tín hiệu giữa các tế bào thần kinh [20].

Một trong các yếu tố thu hút sự quan tâm mạnh mẽ các nhà khoa học đối với các cây thảo dược sự đa dạng các hợp chất thứ cấp, giúp tìm ra các chất mới mang lại hiệu quả cao hơn, giảm tính kháng thuốc và an toàn hơn so với các thuốc đang sử dụng. Pinoresinol là một trong các chất quan trọng được ghi nhận trong cây An xoa. Nó có cấu trúc hóa học gần tương tự như Estradiol (E2), là một dòng thuốc đầu tiên sử dụng trong điều trị loãng xương thông qua việc thúc đẩy sự tăng sinh và biệt hóa của nguyên bào xương. Tuy nhiên, sử dụng E2 thời gian dài làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú và ung thư nội mạc tử cung [21], [22]. Pinoresinol có tiềm năng lớn thay thế E2 bởi hiệu quả tương đương trong sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Khi tế bào được xử lý với pinoresinol, sự biểu hiện của các gen collagen type I, ALP, osteopontin, các yếu tố phiên mã 2 liên quan đến runt, và protein hình thái xương tăng lên đáng kể so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, protein liên kết các yếu tố đáp ứng cAMP, cAMP được phosphoryl hóa cũng được tăng cường khi xử lý với pinoresinol [23]. Ngoài ra, Pinoresinol cũng được ghi nhận ở một số loài thực vật khác thuộc họ thiên thảo, họ anh thảo và các vi sinh vật [24], [25], [26]. Các nghiên cứu này cũng ghi nhận khả năng giảm nguy cơ gan nhiễm mỡ của pinoresinol. Cơ chế của pinoresinol cũng đã được làm sáng tỏ. Ở đó, Pinoresino làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của các yếu tố di truyền liên quan đến quá trình gan nhiễm mỡ bao gồm protein liên kết với yếu tố điều hòa sterol (SREBP) -1, stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), protein tổng hợp axit béo (FAS) và acetyl-CoA carboxylase (ACC). Cùng với đó, pinoresinol cũng tăng sự phân giải thụ thể X ở gan (liver X receptor- LXR một yếu tố quan trọng kiểm soát quá trình gan nhiễm mỡ) thông qua quá trình ubiquitin hóa .

Ngoài pinoresinol, cây An xoa còn chứa rất nhiều hợp chất thứ cấp khác với các hoạt tính sinh học khác như kháng nấm của medioresinol. Medioresinol gây ra hiện tượng tích lũy gốc oxi hóa tự do nội bào (intracellular reactive oxygen species ROS), dẫn đến việc chết theo chương

trình ở nấm *Candida albicans* tăng lên [27]. Medioresinol còn có hoạt tính kháng khuẩn khi sử dụng riêng rẽ hoặc tăng cường hoạt tính của các kháng sinh khi kết hợp cùng [28]. Bên cạnh một số hợp chất được nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính, còn rất nhiều hợp chất được ghi nhận có mặt ở cây An xoa. Tuy nhiên, những nghiên cứu này mới được công bố về cấu trúc hóa học, mà chưa được nghiên cứu sâu về hoạt tính, cũng như cơ chế giải thích các hoạt tính đó.

Bảng 1.1 Hoạt tính gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây An xoa

Hợp chất	Dòng tế bào			
	Lu 1	LNCaP	MCF-7	HUVEC
(±)- Pinoresinol	0.8	0.5	1.7	1.1
(-)- Boehmenan	10.4	9.5	10.0	9.0
(-)- Boehmenan H	5.3	7.7	10.2	6.2
Paclitaxel ^d	0.002	0.001	0.006	0.008

Khảo sát các đặc tính chống ung thư và kháng khuẩn trong ống nghiệm của các chất chiết xuất từ thân và lá của cây An xoa được khảo sát bởi Phạm Hồng Ngọc Thúy và cộng sự. Thí nghiệm được tiến hành trên hai phân đoạn bao gồm phân đoạn cô đặc saponin và phân đoạn butanol có chứa saponin ở dạng lỏng. Kết quả này chỉ ra rằng các hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được tìm thấy trên các phân đoạn giàu saponin từ thân và lá cây An xoa có khả năng chống lại *S. lugdunensis* (giá trị MIC 0,35 và 0,50 µg/mL, tương ứng) và vi khuẩn *E. coli* (giá trị MIC 2,50 và 5,00 µg/mL). Không chỉ vậy, hoạt tính chống ung thư mạnh trong ống nghiệm đối với các dòng tế bào ung thư như Du145 (Tuyến tiền liệt); MIA PaCa-2 (Tuyến tụy); MCF-7(Vú); H460(Phổi); A2780 (Buồng trứng); A431(Da); SMA (Glioblastoma); SJ-G2, U87, HT29(Đại tràng) và BE2-C (Neuroblastoma) ở liều thấp (giá trị GI50 0,36-11,17 µg/ml) được tìm thấy trong những phân đoạn giàu saponin, hoạt tính chống ung thư tuyến tụy trong ống nghiệm chống lại được các tế bào CFPAC-1, MIA PaCa-2, BxPC-3 và với giá trị IC50 là 1,80-6,43 µg/ml. Nghiên cứu này đã cho thấy phần nào về hoạt tính gây độc tế bào của chất chiết xuất từ thân và lá cây An xoa, từ đó thực hiện các nghiên cứu sâu hơn để phân lập

được các hợp chất có hoạt tính chống ung thư mới từ các chất chiết xuất trong cây An xoa [29].

1.3.4 Các nghiên cứu trong nước

Cây An xoa được sử dụng chủ yếu dựa trên kinh nghiệm dân gian, và các bài thuốc đông y, trong điều trị các bệnh sỏi, cảm cúm, sốt rét, đau, tiêu độc, kiết lị, chữa rắn độc cắn và được sử dụng làm thuốc giảm đau [30]. Tất cả các bộ phận của cây đều được sử dụng làm thuốc. Nguyên liệu được sấy khô trước khi sử dụng để tránh gây ngứa cổ do cây có nhiều lông và tăng khả năng bảo quản lâu dài. Trong vài năm gần đây, việc điều trị kháng ung thư của cây An xoa được lan truyền. Cũng như nhu cầu sử dụng các sản phẩm thảo dược tự nhiên tăng cao, dẫn đến sự khai thác quá mức cây An xoa trong tự nhiên. Các công trình nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng và nhân nhanh giống An xoa đã được tiến hành, nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng. Lê Hồng Ớn và cộng sự đã nghiên cứu nhân giống hom nửa hóa gỗ trên các giá thể khác nhau có kết hợp với chất kích thích sinh trưởng. Kết quả cho thấy, giá thể đất thịt nặng kết hợp với nồng độ chất kích thích sinh trưởng IAA 1.0 % cho hiệu quả cao nhất với tỷ lệ ra rễ đạt 93,11%, số lượng rễ đạt 7,33 rễ/hom và chỉ số ra rễ 23,28, và cao hơn đáng kể so với công thức đối chứng có tỷ lệ ra rễ 50,00 - 66,67% số lượng rễ đạt 4,00-6,89 rễ/hom và chỉ số ra rễ và 11,49-25,96. Kết quả cũng ghi nhận điều kiện tự nhiên ở vườn ươm Đà Lạt (cao 1500 m so với mực nước biển) không phù hợp cho cây An xoa non sinh trưởng [30].

Bên cạnh đó, các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây An xoa cũng đã được tiến hành. Kết hợp kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân 2D và phương pháp sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ phân giải cao (FT-ICR-MS), đã phân loại được cấu trúc của 12 hợp chất thứ cấp từ cây An xoa: 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester (1), 3-O-transcaffeoylebetulinic acid (2), betulonic acid (3), 3b benzoylbetulonic acid (4), lupeol (5), stigmasterol (6), betulonic acid methyl ester (7), 5,8-dihydroxy-7,40-dimethoxyflavone (8), 4-hydroxybenzoic acid (9), isoscutellarein 4'-methyl ether 8-O-b-D glucopyranoside (10), 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (11) và methyl caffeate (12). Trong đó, 5 chất (1,3-5,9) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên 5 dòng tế bào ung thư bao gồm Hela (ung thư cổ tử cung), HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan), SK-LU-1 (ung thư biểu mô phổi), AGS

(ung thư biểu mô dạ dày) và SK-MEL-2 (ung thư khối u ác tính) giá trị IC50 dao động từ 46 đến 100 $\mu\text{g/ml}$ [31]. Cây An xoa cũng ghi nhận có chứa nhiều hợp chất saponin (165.77–1035.33mg escin trong 1 gram trọng lượng mẫu khô) có khả năng chống oxi hóa cao [32]. Hơn nữa, hỗn hợp các saponin này còn có hoạt tính kháng ung thư tuyến tụy mạnh trên các dòng tế bào MIA PaCa-2, CFPAC-1 và BxPC-3 với giá trị IC50 rất nhỏ 1.80–6.43 $\mu\text{g/mL}$ [29]. Đích tác dụng của các saponin là ở pha S của chu kỳ tế bào, đồng thời chúng cũng kích hoạt con đường chết theo chu trình tế bào (apoptosis) [33].

Để nghiên cứu được thành phần hóa học của các hợp chất thứ cấp ở thực vật, dung môi sử dụng trong nghiên cứu có vai trò rất quan trọng, cùng với đó là chất lượng mẫu ban đầu. Phạm và cộng sự đã sử dụng 5 loại dung môi khác nhau để tách chiết các hợp chất thứ cấp từ cây An xoa. Kết quả cho thấy, nước được xem là dung môi thích hợp để chiết xuất các hợp chất phenol, trong khi đó, methanol có hiệu quả tốt hơn để tách chiết các hợp chất flavonoid và các saponin. Các mẫu lá được sấy khô ở điều kiện không khí nóng 80°C hay sấy khô chân không 50°C cho hiệu suất chiết cao nhất và hoạt tính chống oxi hóa tốt nhất. Hàm lượng các hợp chất phenol và flavonoid cũng đã được định lượng trong nghiên cứu. Kết quả trên cũng ghi nhận mối tương quan thuận giữa hàm lượng hợp chất phenol và flavonoid tổng số với khả năng chống oxi hóa của chúng [34]. Hoạt tính chống oxi hóa cũng được xác định với từng đơn chất có mặt trong cây An xoa như methyl gallate, rutin và luteolin. Hàm lượng của các chất này trong cây An xoa chiếm 8.569 ± 0.462 mg/g với methyl gallate, 6.687 ± 0.534 mg/g với rutin, và luteolin dao động từ 49.06 ± 0.46 , 142.89 ± 0.53 , $\mu\text{g/g}$ tùy thuộc vào bộ phận khác nhau của cây như cành, lá 35 36 [35], [36]. Hơn nữa, thực vật được xem là nguồn chứa chất chống oxy hóa tiềm năng, có thể được sử dụng để ngăn chặn và điều trị các bệnh khác nhau. Có tới 40%-60% thuốc điều trị có nguồn gốc từ tự nhiên. Do đó, việc phân tích thành phần hóa học của thực vật để xác định các hợp chất sinh học tiềm năng mới là thực sự cần thiết. *Helicteres hirsute* Lour. là loài thực vật thuộc họ *Sterculiaceae* được trồng rộng rãi ở Đông Nam Á, nó được chứng minh chứa nhiều hợp chất chống oxy hóa mạnh. Nhiều những nghiên cứu đã được thực hiện để phân lập và xác định các hợp chất hoạt tính sinh học quan trọng trong cây An xoa. Theo nghiên cứu của Hong Ngoc Thuy Phạm và cộng sự (2020) công bố rằng lá của An

xoa có hàm lượng phenolic tổng số (TPC: 192,6 mg GAE/g), hàm lượng flavonoid tổng số (TFC: 215,2 mg CE/g); rễ của An xoa cũng có hàm lượng TPC và TFC cao lần lượt đạt 212,6 mg GAE/g và 280,1 CE/g. Kết quả này tiết lộ rằng thành phần phenolic của loài thực vật này có mối tương quan mạnh mẽ tới khả năng chống oxy hóa. Hơn nữa, lá và rễ của An xoa được tìm thấy hàm lượng saponin rất cao (808,0 và 347,5 mg escin EC/g) [37]. Ngoài ra nghiên cứu của Trần Văn Tiến và Võ Thị Mai Hương (2017) công bố về hoạt tính chống oxy hóa của cây An xoa cho thấy cao chiết ethyl acetate thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao nhất với giá trị IC50 đạt 12,469 (gấp 3,61 lần so với đối chứng vitamin C); cao chiết chloroform cho thấy hoạt tính oxy hóa thấp nhất với giá trị IC50 là 39,129 (gấp 11,33 lần so với đối chứng vitamin C). Đây là giá trị chống oxy hóa khá cao của cao chiết An xoa [38].

Mặt khác các dung môi hữu cơ sử dụng trong nghiên cứu tách chiết có độ phân cực khác nhau giúp tách được các nhóm chất khác nhau. Nguyễn Hữu Duyên và Lê Thanh Phước đã thu hái mẫu thân, lá và hoa của cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour. tại Hòn Sơn thuộc xã Lại Sơn, huyện Kiên Hải, Tỉnh Kiên Giang để tiến hành thí nghiệm. Bột khô của cây An xoa được ngâm trong ethanol 96% trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó lọc và cô quay thu được cao ethanol. Cao ethanol được chiết với 4 loại dung môi khác nhau là dichloromethane, methanol, petroleum ether, ethyl acetate và thu được 4 cao phân đoạn tương ứng. Các cao chiết này được sử dụng để khảo sát hoạt tính gây độc trên dòng tế bào Hep-G2 (ung thư gan). Kết quả nghiên cứu hoạt tính gây độc trên tế bào ung thư gan HepG2 ghi nhận cao chiết từ petroleum ether và dichloromethane có hoạt tính gây độc cao nhất. Giá trị IC50 được ghi nhận thứ tự là 28,29 $\mu\text{g/mL}$ và 30,30 $\mu\text{g/mL}$. Nhóm tác giả cũng tiếp tục phân tích xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất trong cao chiết dichloromethane. Cao chiết dichloromethane đã cô lập được 4 hợp chất: stigmasterol (HD09), lupeol (HD02), apigenin (HD08) và tiliroside (HD01) (Hình 1.3). Cấu trúc hóa học các hợp chất được xác định theo phương pháp phổ ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT) [35]. Stigmasterol là chất được sử dụng nhiều trong phòng ngừa khối u và kháng oxy hóa. Ngoài ra, stigmasterol còn có tiềm năng lớn trong việc chữa viêm xương khớp [39]. Lupeol có khả năng tiêu diệt cũng như ngăn chặn sự lan truyền của tế bào ung thư. Hợp chất

lupeol có khả năng gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) [40]. Apigenin có khả năng chống viêm, ngăn ngừa ung thư và chống oxy hóa [41]. Tiliroside là hợp chất tự nhiên có khả năng kháng viêm, kháng oxy hóa, đã được thử nghiệm in vitro và in vivo cho kết quả khá tốt [42].

Theo công bố của Dien Thi Thuy Dung và cộng sự (2018), các thành phần dịch chiết rễ cây An xoa có hoạt tính chống ung thư. Trong đó, phân đoạn dịch chiết rễ ethyl acetate An xoa có hoạt tính gây độc mạnh đối với tế bào KB. Dịch chiết n-hexan và butanol có hoạt tính gây độc nhẹ. Chin và cộng sự (2006) công bố 3 hợp chất polyphenols (lignans) từ thân cây An xoa có hoạt tính gây độc chống lại nhiều dòng tế bào ung thư người bao gồm LNCaP (hormone-dependent human prostate cancer), Lu1 (human lung cancer), MCF-7 (human breast cancer) và HUVEC (human umbilical vein endothelial). Kết quả này gợi ý đặc tính gây độc tế bào ung thư và tế bào thường của rễ cây An xoa, hướng tới tách các chất sạch có hoạt tính chống ung thư. Phân đoạn dịch chiết ethyl acetate sẽ là nguồn đầy hứa hẹn về thành phần phenolic cao và hoạt tính chống ung thư mạnh [43].

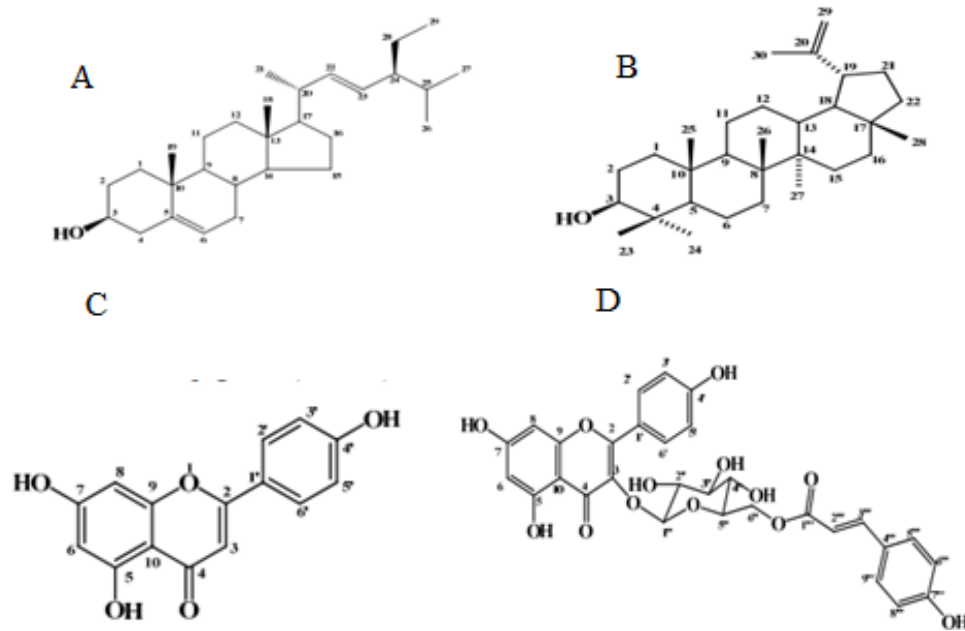
Ngoài hai hoạt tính quan trọng là kháng ung thư và chống oxy hóa, dịch chiết cây An xoa còn có tính kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn là một trong những tác dụng sinh học quan trọng được quan tâm nhiều ở các cây dược liệu. Sự hiện diện của các hợp chất quan trọng trong cây như: flavonoids, saponin, tanin, terpenoids,...có liên quan mật thiết tới các hoạt tính sinh học. Theo nghiên cứu của Hong Ngoc Thuy Pham và cộng sự (2018), hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Kết quả chỉ ra rằng phân đoạn giàu saponin chiết xuất từ lá và rễ cây An xoa có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất kháng *E.coli* với giá trị MIC lần lượt là 2.5 µg/ml và 5.0 µg/ml và kháng loài *S. lugdunensis* với giá trị MIC lần lượt là 0.35 µg/ml và 0.50 µg/ml [44]

Thêm vào đó, nhóm nghiên cứu của Trần Văn Tiến và Võ Thị Mai Hương (2017) đã chứng minh được các cao chiết cây An xoa đều có khả năng kháng tương đối tốt với bốn loại vi sinh vật kiểm định. Hiệu số vòng vô khuẩn *E. coli* đạt ở mức 14,35 – 19,24 mm, ở vi khuẩn *S. aureus* đạt 14,35 – 21,35 mm, ở vi khuẩn *S. typhi* đạt từ 20,35 – 25,05 mm và đối với *S. faecalis* đạt 17,34 – 20,65 mm. Cao chiết của cây An xoa kháng vi khuẩn *S. typhi*

mạnh nhất với kích thước vòng kháng đạt tới 25,05 mm. Như vậy, hoạt tính kháng khuẩn ở các cao chiết An xoa đều khá cao và là cơ sở trong việc chữa trị một số bệnh liên quan đến các vi khuẩn gây bệnh [38].

Theo công bố của Diem Thi Thuy Dung và cộng sự (2018), tất cả các phân đoạn dịch chiết rễ cây An xoa không có hoặc có hoạt tính ức chế yếu đối với vi khuẩn Gram âm và nấm ở nồng độ 128 $\mu\text{g/ml}$. Cao chiết chloroform và ethyl acetate có hoạt tính ức chế thấp và vừa đối với loài *S. aureus*. Phân đoạn butanol và n-hexan chỉ ra hoạt tính ức chế mạnh đối với sự phát triển của *L. fermentum*[43].

Nguyễn Hữu Duyên, Nguyễn Văn Kỳ, Lê Thanh Phước tiến hành khảo sát thành phần hóa học của cây An xoa nhằm giải thích công dụng chữa bệnh của loài thảo dược này, từ khả năng kháng tế bào ung thư gan của các nghiên cứu trước đó cũng như các công dụng chữa các bệnh về gan trong các bài thuốc dân gian Việt Nam của cây an xoa. Bằng kỹ thuật chiết phân bố lỏng-lỏng, nghiên cứu sử dụng 200g cao ethanol (cao tổng) để tiến hành tách phân đoạn, kết quả thu được 20,85g cao dichloromethan. Tiến hành sắc ký cột pha thường nhóm nghiên cứu đã sử dụng 8g cao dichloromethan và phân lập được hai hợp chất HD10d và HD07. Dựa vào số liệu phổ 1D, 2D-NMR, MS và đối chiếu với các tài liệu tham khảo đã nhận danh được hai hợp chất HD10d và HD07 lần lượt là: 7,4'-di-*O*-methyl-8-*O*-sulphat isoscutellarein và α -*p*-hydroxy truxillic acid.



Hình 1.3 Cấu trúc của hợp chất stigmasterol (A); Cấu trúc của hợp chất lupeol (B); Cấu trúc của hợp chất apigenin (C); Cấu trúc của hợp chất tiliroside (D).

1.4 SỬ DỤNG CÂY AN XOA TRONG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ GAN

Cây An xoa có thể điều trị rất nhiều bệnh khác nhau do trong cây có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, chính vì thế cây An xoa được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh, có thể sử dụng được tất cả các bộ phận của cây. Cây An xoa được sử dụng cho những trường hợp người hay mất ngủ, da xanh, đau lưng, nhức mỏi, hay những người tim hay mệt khi sử dụng cây An xoa sức khỏe cũng có thể cải thiện rất tốt [45]. Các bộ phận của cây An xoa được biết đến trong việc chữa các bệnh về gan [16]. Lá có thể chữa trị được một số bệnh thường gặp như sưng lờ, ung nhọt. Phần rễ được tin dùng để làm dịu cơn đau, chữa cảm cúm, đái dầm, kiết lỵ, đậu sởi, và làm thuốc tiêu độc [46]. Hiện nay, cây được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc dân gian trong việc hỗ trợ điều trị ung thư gan.

Ung thư gan được coi là một căn bệnh phổ biến thách thức sức khỏe toàn cầu và tỷ lệ mắc bệnh đang gia tăng trên toàn thế giới [47], [48]. Người ta ước tính rằng, đến năm 2025, hơn một triệu người sẽ bị ảnh hưởng bởi ung thư gan hàng năm. Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là dạng ung thư phổ biến nhất và là khối u ác tính nguyên phát đối với gan. Ung thư biểu mô tế bào gan chiếm ~ 80% các trường hợp và tỷ lệ số người mắc bệnh ngày một tăng cao trong những thập kỷ gần đây [49]. Nguyên nhân chính dẫn đến thất bại điều trị và gây tử vong ở bệnh nhân ung thư gan là do tính chất di căn và tỷ lệ tái

phát cao của bệnh [50]. Chỉ những bệnh nhân bị ung thư biểu mô tế bào gan trong giai đoạn đầu mới có thể nhận được các liệu pháp có khả năng trong việc chữa khỏi bệnh, chẳng hạn như phẫu thuật cắt bỏ và ghép gan. Mặc dù có hướng dẫn cụ thể trong việc giám sát bệnh trình bày trong nhiều hướng dẫn khác nhau, hơn 65% bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan được chẩn đoán ở giai đoạn muộn với các lựa chọn điều trị hạn chế [51]. Do đó, có một nhu cầu cấp thiết là xác định và phát triển các phương pháp điều trị hiệu quả hơn cho ung thư biểu mô tế bào gan [52].

Cây thuốc đã được chú ý trong vài thập kỷ qua vì nhiều hoạt động sinh học bao gồm hoạt động chống ung thư, vì chúng tạo ra nhiều hợp chất độc đáo khác nhau mang lại hiệu quả cao mà vẫn an toàn, ít tác dụng phụ. từ lâu đã được sử dụng ở Việt Nam để điều trị ung thư gan. Nó là một thành viên của chi *Helicteres* thuộc họ thực vật *Steculiaceae* được tìm thấy tại các nước Đông Nam Á [53], [54]. Các nghiên cứu trước đây cũng đã từng chỉ ra rằng triterpenoid, flavonoid và lignan là những thành phần chính của các loài *Helicteres*. Dẫn xuất cucurbitacin phân lập từ *Helicteres angustifolia* có tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư [55], [56]. Trong bài viết này, chúng tôi tập trung khám phá các chất mới từ cây thuốc nam có hoạt tính chống ung thư gan và nghiên cứu sâu hơn về các cơ chế phân tử có thể làm cơ sở cho hoạt tính chống di căn của chúng để xác định các chất chống di căn mới tiềm năng.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu cây An xoa (thân, lá, hoa) được thu hái tại Nghệ An, Việt Nam (*Helicteres hirsuta* Lour.) vào thời gian tháng 10 năm 2020. Mẫu thực vật này được thu hái bởi Tiến sĩ Lê Thị Bích Thủy, Phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học. Mẫu cây được bổ sung chất hút ẩm silicagel trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm. Các mẫu thực vật cũng được sấy khô đến khối lượng không đổi và bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phạm vi nghiên cứu: Các nghiên cứu được thực hiện trên quy mô phòng thí nghiệm tại Trung tâm Vật lý Chất mềm - Vật lý Sinh học thuộc Trung tâm Phát triển Công nghệ cao và viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2 Hoá chất và thiết bị nghiên cứu

2.1.2.1 Hoá chất nghiên cứu

Hóa chất tách chiết các phân đoạn dịch chiết: Methanol (MeOH) (Merck), *n*-Hexan, Ethyl acetat (EtOAc), Dichloromethane (DC), và nước cất.

Hóa chất làm sắc ký bản mỏng: Methanol (MeOH) (Merck), *n*-Hexan, Ethyl acetat (EtOAc), Dichloromethane (DC), Dichloromethane, nước cất,

Hóa chất sàng lọc hoạt tính sinh học hoạt tính gây độc tế bào: MTT (Sigma-Aldrich), môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium piruvat, NaHCO_3 , penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%), dịch kháng sinh PS.

Hóa chất đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương: DMEM, FBS, albumin huyết thanh bò (BSA), fibronectin

Hóa chất đánh giá khả năng ức chế sự di căn, xâm lấn: Trypsin, genlatin, DMEM, albumin huyết thanh bò (BSA), chiết xuất *Helicteres hirsuta*, FBS, fibronectin.

Hóa chất điện di và PCR: Agarose tinh khiết, PCR 2X MasterMix, Ladder 1 kb plus (Thermo Scientific, USA), thuốc nhuộm Redsafe, Loading dye 6x, TAE 1X, nước tinh sạch, TE buffer (pH 8).

Các dòng tế bào trong nghiên cứu được mua từ hãng ATCC.

Các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide), TCA (*Trichloroacetic acid*), Tris base, PBS (phosphate buffered saline), Ellipticine, SRB (Sulforhodamine B), Acetic acid v.v.

2.1.2.2 Thiết bị nghiên cứu

Thiết bị sinh học phân tử: Bể điện di, lò vi sóng, máy PCR, máy soi gel bằng tia UV.

Thiết bị tách chiết các phân đoạn dịch chiết: cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg, hệ thống máy cô quay, dụng cụ thủy tinh: bình cầu dung tích 1000 ml, các loại cốc có mỏ dung tích 25-100 ml, phễu thủy tinh, phễu chiết quả lê, bình định mức.

Thiết bị sắc ký bản mỏng: đèn tử ngoại phát các bức xạ có bước sóng ngắn 254 nm, bước sóng 365 nm, bình triển khai có nắp đậy kín, dụng cụ để phun thuốc thử, tủ sấy, tủ hút, máy sấy, bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ.

Thiết bị sàng lọc hoạt tính sinh học hoạt tính gây độc tế bào: đầu đọc vi bản (BioTek, Winooski, VT, USA), kính hiển vi soi ngược được trang bị máy ảnh kỹ thuật số (Digital Sight DS-L1, Nikon, Nhật Bản); Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ); Máy quang phổ (BioTek); Tủ ấm CO₂, Tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, cân phân tích, máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.

Thiết bị đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương: kính hiển vi soi ngược được trang bị máy ảnh kỹ thuật số (Digital Sight DS-L1, Nikon, Nhật Bản)

Thiết bị đánh giá khả năng ức chế sự di căn, xâm lấn: kính hiển vi soi ngược được trang bị máy ảnh kỹ thuật số (Digital Sight DS-L1, Nikon, Nhật Bản)

2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1 Phương pháp thu mẫu

Thu hái mẫu có đủ thân, lá, hoa cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.) được thu hái bởi Tiến sĩ Lê Thị Bích Thủy, phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học. Mẫu thực vật sau khi thu hái sẽ được rửa sạch, sau đó sẽ phơi khô và cuối cùng xay nhỏ để làm nguyên liệu trong quá trình tiến hành nghiên cứu.

2.2.2 Phương pháp xử lý và chiết mẫu dược liệu

Các bộ phận phía trên của mẫu cây An xoa (thân, lá, hoa) được rửa sạch sau đó đem sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi, đem nghiền nhỏ. Cây An xoa khô được nghiền thành bột mịn (< 1,40 mm). Mẫu được chiết trong methanol tuyệt đối (MeOH) và đặt trong bể siêu âm trong 30 phút ở 40°C (ba lần lặp lại) và tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dịch lọc được cô đặc bằng thiết bị cô quay chân không ở 45°C. Dịch chiết thô được phân chia tiếp trong n-hexan (HE), methanol, dichloromethane (DCM) và etyl axetat (EtOAc). Tất cả các phần được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng tiếp. Các chất chiết xuất được mã hóa lần lượt là HEHH, DCLHH, EtHH, MeHH tương ứng với phân đoạn n-hexan, dichloromethane, ethyl axetat và methanol.

Tính hiệu suất chiết của các dung môi sử dụng bằng công thức:

Hiệu suất chiết (%) = khối lượng phân đoạn dịch chiết thu được / khối lượng khô mẫu sử dụng.

2.2.3 Phương pháp định danh loài bằng phương pháp sinh học phân tử

2.2.3.1 Tách chiết DNA tổng số và tinh sạch

Sử dụng phương pháp CTAB cải tiến để tách chiết DNA toàn phần được tách từ thân tươi và lá của mẫu An xoa [57].

Pha CTAB theo công thức sau: H₂O 73ml, EDTA pH 8.0, 0.5M 2ml, Tris-HCl pH 8.0, 1M 10ml, NaCl 5M 14,34 ml, β-mercaptoethanol 2ml, CTAB 1ml. Đem hỗn hợp ủ ở 65 °C trong 15 phút.

Lấy 100mg mẫu cây An xoa tươi tiến hành nghiền mịn trong cối với nitơ lỏng. Sau đó, cho mỗi mẫu đã nghiền vào từng ống eppendorf 1.5 mL có ghi tên, thêm 1 mL CTAB 1X đã pha. Đem mẫu đi ủ ở 65 °C trong 90 phút (mỗi 10 phút thì tiến hành trộn đều mẫu 1 lần). Tiếp theo, cho thêm 400 μL Chloroform: Isoamylalcohol (24:1), rồi trộn đều. Đem mẫu đi ly tâm 15 phút ở 10000 rpm. Sử dụng ống eppendorf mới thêm 500 μL isopropanol và hút 500 μL phần dung dịch bên trên cho vào, trộn đều và ủ trong 45 phút ở nhiệt độ -20 °C. ly tâm mẫu vừa ủ trong 10 phút 10000 rpm. Loại bỏ dịch nổi giữ phần kết tủa lắng tụ bên dưới. Để rửa sạch tủa, thêm 1 mL cồn 70% vào mỗi ống và tiến ly tâm trong 7 phút ở 10000 rpm, sau đó giữ lại kết tủa và loại bỏ phần dịch nổi phía trên. Sau đó, loại bỏ phần cồn 70% rồi để mẫu dưới quạt

trần trong 1 giờ cho khô và thổi khô tủa trong laminar sạch. Cuối cùng, bổ sung 200 μL H₂O deion và 1 μL enzyme Rnase.

(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.2.3.2 Điện di DNA trên gel agarose

Kiểm tra DNA sau khi được tách chiết và tinh sạch bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Sử dụng thuốc nhuộm Redsafe để nhuộm Gel (Biobasic, UK), và ghi nhận kết quả

2.2.3.3 Khuếch đại DNA bằng phản ứng PCR

Trình tự các cặp mồi được sử dụng để định danh các mẫu là matK và rbcL dựa trên thông tin về trình tự gen trên ngân hàng Gen quốc tế (GenBank). Rồi khuếch đại các đoạn trình tự DNA của cây An xoa(Bảng 2.1).

Điều kiện tối ưu được sử dụng cho các cặp mồi để thực hiện phản ứng khuếch đại các đoạn gen đích như sau: 20 μL tổng thể tích bao gồm: 10 μL MasterMix 2X; 1 μL DNA tổng số; 1 μL primer F; 1 μL primer R và 7 μL H₂O với chu trình nhiệt: chu kỳ biến tính (1 chu kỳ) trong 5 phút ở 94°C; 35 chu kỳ(bao gồm: 94°C/ 45 giây; 55°C/ 50 giây; 72°C/ 1phút) và bước tổng hợp cuối cùng 5 phút ở 72°C. Sau đó sử dụng gel agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR .Các sản phẩm PCR tinh khiết được giải trình tự theo cả hai hướng

Bảng 2.1 Thông tin các mồi sử dụng

Mồi		Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
matK	Mồi xuôi	ACCGTACTTTTATGTTTACGAGC	850
	Mồi ngược	TCCATCTAGAAATGTTAGTTCA	
rbcL	Mồi xuôi	GCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTG	600
	Mồi ngược	TGGTTGTGAGTTCACGTTCT	

2.2.3.4 Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự

Cồn tuyệt đối được sử dụng để tinh sạch sản phẩm PCR. Các đoạn DNA được xác định trình tự trên hệ thống theo nguyên lý của Sanger. Sau khi thu được kết quả giải trình tự, sử dụng công cụ BLAST dùng cho việc định danh loài trên hệ thống ngân hàng gene NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2.4 Phương pháp sắc ký bản mỏng

2.2.4.1 Hoạt hóa bản mỏng

Trước khi sử dụng cho các bản mỏng vào tủ sấy và sấy ở 110°C trong 30 phút. Để nguội rồi bảo quản trong hộp kín. Tiến hành cắt bản mỏng, mỗi bản mỏng có độ dài 5 cm.

2.2.4.2 Chuẩn bị bình khai triển

Sử dụng bình thủy tinh có nắp đậy kín, hình trụ (bình khai triển). Thành bên trong của bình lót giấy lọc xung quanh, rót vào bình với lượng dung môi vừa đủ rồi lắc, để giấy lọc thấm đều dung môi với mục đích bão hòa dung môi trong bình. Khi còn lại một lớp dày từ 5mm đến 10mm lượng dung môi ở đáy bình sau khi thấm đều giấy lọc được gọi là phù hợp

2.2.4.3 Chấm chất phân tích lên bản mỏng

Khối lượng chất đưa lên bản mỏng không quá lớn cũng không quá nhỏ ở dạng dung dịch trong nước, methanol, etc, hay dung môi thích hợp khác (khoảng 0,1-50 mg). Mỗi cây cây An xoa bao gồm cao chiết methanol, n-hexan, dichloromethane, ethyl acetate được chấm trên cùng một bản mỏng với các hệ dung môi khác nhau.

2.2.4.4 Triển khai sắc ký

Đặt bản mỏng sao cho các vết chấm phải ở bên trên bề mặt của lớp dung môi khai triển và gần như thẳng đứng với bình triển khai.

Bình khai triển được đậy kín và để yên. Khi dung môi đã triển khai được một đoạn quy định trên bản mỏng, dùng kẹp lấy bản mỏng ra khỏi bình, làm bay hơi dung môi còn đọng ở trên bản mỏng bằng máy sấy rồi hiện vết

2.2.4.5 Hiện vết trên bản mỏng

Hiện vết bằng cách hiện với thuốc vasalin, axit sulfuric và soi UV ở bước sóng 365nm, bước sóng 254nm.

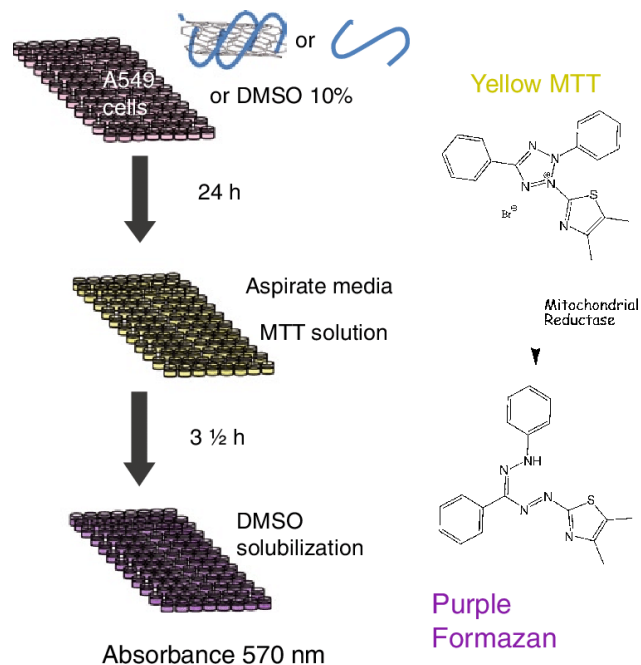
2.2.5 Phương pháp sàng lọc hoạt tính sinh học hoạt tính gây độc tế bào

(MTT assay)

Phương pháp *MTT assay* (Methyl Thiazolyl Tetrazolium *assay*) [58] thử hoạt tính ức chế phát triển tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro* trên các dòng ung thư gan khác nhau như HepG2, huh7, và Chang cell. Các dòng tế bào ung thư gan trên được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 2.5×10^3 tế bào/ giếng. Tế bào được ủ qua đêm để bám dính và ổn định trên đĩa, được xử lý bằng các chất chiết xuất ở nồng độ đã được chỉ định trong 48 giờ, hợp chất cần nghiên cứu

sẽ được bổ sung với các nồng độ khác nhau từ thấp đến cao, và lặp lại 3 lần. DMSO được sử dụng làm đối chứng và thực hiện tương tự. Tiếp theo, 15µl MTT (Sigma-Aldrich) được bổ sung thêm vào các giếng (10% thể tích) và các tế bào được ủ thêm 4 giờ ở 37°C. Sau đó, cẩn thận loại bỏ hết môi trường nuôi cấy. Tế bào được rửa 2 lần với đệm phosphat. Tỷ lệ sống của tế bào được đo bằng xét nghiệm MTT. Các tinh thể Formazan được hòa tan trong 150 µL DMSO. Độ hấp thụ sẽ được đọc ở bước sóng 570nm bằng đầu đọc vi bản (BioTek, Winooski, VT, USA) để xác định sự tăng trưởng [44]. Tỷ lệ phần trăm (%) ức chế tăng trưởng tế bào được xác định trong đó giá trị 100% biểu thị sự ức chế tăng trưởng hoàn toàn, trong khi giá trị lớn hơn 100% biểu thị ức chế tăng trưởng và chết tế bào. Một đường cong với các nồng độ (200–0,1 µg/mL) đã được tạo ra để xác định giá trị ức chế tăng trưởng (IC 50 , nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào) dữ liệu được phân tích và so sánh với nhóm đối chứng. Phần trăm ức chế sự phát triển của các tế bào khi có mặt chất thử được xác định theo công thức :

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu})}{OD(\text{DMSO})}$$



Hình 2.1 Sơ đồ mô tả phương pháp MTT

Từ giá trị Phần trăm ức chế ta xác định được tỷ lệ phần trăm tế bào sống thông qua công thức sau:

$$\% \text{ tỷ lệ tế bào sống} = 100\% - \% \text{ Ức chế}$$

Từ tỷ lệ tế bào sống (%) và nồng độ của mẫu ta sẽ tiến hành dựng đường hồi qui tuyến tính, từ đó tính được IC50. Khi giá trị IC50 càng thấp thì khả năng gây độc tế bào của mẫu thử sẽ càng cao và ngược lại.

Môi trường dùng để nuôi các dòng tế bào ung thư được sử dụng:

- Môi trường MEME (Minineal Essential Medium with Eagle's salts), 7-10% huyết thanh bê tươi và dịch kháng sinh PS (penicillin – streptomycin)

- Môi trường DMEM (Dullbecco's modified Minimum Essential Medium) có bổ sung 10% huyết thanh bê tươi và dịch kháng sinh PS (penicillin – streptomycin).

- Dịch kháng sinh PS: 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin và 2 mM L-glutamine

Các dòng tế bào có nguồn gốc khối u được nuôi cấy trên các môi trường chuyên dùng trong nuôi các dòng tế bào ung thư. Sau đó tiến hành nuôi các tế bào ung thư trong tủ nuôi cấy 37°C, 5% CO₂, môi trường nuôi cấy được thay đổi thường xuyên 2-5 ngày tùy theo sự phát triển của từng dòng tế bào. Dung dịch gốc của dịch chiết được chuẩn bị bằng cách hòa tan dịch chiết dạng bột trong 100% DMSO. Sau đó, pha loãng bằng cách sử dụng môi trường liên quan để thu được các dung dịch làm việc ở nồng độ 100 µg/mL với nồng độ DMSO còn lại là 0,8%. Khi các tế bào ở mức sinh trưởng logarit sau 24 giờ, môi trường không có (đối chứng) và có dịch chiết (100 µL) được thêm vào từng giếng để tạo ra nồng độ cuối cùng là 100 µg/mL (ngày 0) [44].

Quan sát hình thái học, các tế bào được cấy với kích thước $2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng trong các đĩa 6 giếng và được ủ qua đêm để bám dính. Các nồng độ chiết xuất khác nhau được thêm vào từng giếng trong 24 giờ, DMSO được sử dụng làm đối chứng. Hình thái của các tế bào sẽ được quan sát trực tiếp và chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược được trang bị máy ảnh kỹ thuật số (Digital Sight DS-L1, Nikon, Nhật Bản) ở độ phóng đại 200 và 400 lần. Những thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần.

2.2.6 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương

(wound healing assay)

Tế bào ung thư sẽ được cấy trên các đĩa nuôi cấy mô 6 giếng (SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Hàn quốc) với mật độ 2.5×10^5 tế bào/ giếng và nuôi ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, phát triển trong 24 giờ để hợp lưu. Sau đó tế bào đơn lớp được cào bằng đầu pipet vô trùng để tạo một vết thương. Các tế bào

sau đó được rửa 2 lần với DMEM không có huyết thanh để loại bỏ các tế bào nổi và được ủ trong DMEM chứa 2% FBS với 50µg/mL của *Helicteres hirsuta*. Nồng độ chất nghiên cứu được bổ sung theo nồng độ nghiên cứu cho từng giếng và lặp lại 3 lần. DMSO được sử dụng là nhóm đối chứng. Tiến hành chụp kích thước độ rộng của vết thương ở các thời điểm khác nhau 0h, 24h, 48h và 72h sau khi bị thương cho từng giếng, mỗi giếng chụp 5 ảnh. Đo độ rộng của đường và so sánh với đối chứng để đánh giá về khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương của mẫu nghiên cứu. Các thí nghiệm đã lặp đi lặp lại ít nhất ba lần [59].

2.2.7 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn (invasion assay)

Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 24 giếng có sử dụng các chamber bên trong (Corning, New York, NY, USA). Tế bào sau khi được xử lý tách rời bằng trypsin. Các chamber được phủ 1 lớp genlatin 1% trong thí nghiệm invasion assay. Sau đó 1×10^6 tế bào trong 100 µL DMEM chứa 0,2% albumin huyết thanh bò (BSA) được thêm vào bên trên các chamber và được ủ với 50 µg/mL của *Helicteres hirsuta* hoặc DMSO trong 24 giờ. Bên dưới các chamber chứa 400 µL DMEM được bổ sung 2% FBS chứa 0,2% BSA và 10 µg/mL fibronectin, fibronectin một chất hấp dẫn tế bào. DMSO được sử dụng làm chất đối chứng. Tế bào được ủ trong 24h. Sau đó được cố định và nhuộm bằng kit Diff –Quick. Tiến hành chụp ảnh ở 5 khu vực khác nhau cho mỗi chamber. Số lượng tế bào bám vào mặt dưới của bộ lọc trong mỗi buồng được xác định bằng kính hiển vi soi ngược được trang bị máy ảnh kỹ thuật số (Digital Sight DS-L1, Nikon, Nhật Bản). Hoạt tính ức chế di căn hay xâm lấn của chất nghiên cứu được thể hiện qua số tế bào ở mặt dưới của chamber khi so sánh với nhóm đối chứng. Số tế bào được tính bằng giá trị trung bình của 5 khu vực ở mặt dưới của chamber. Các thí nghiệm đã lặp đi lặp lại ít nhất ba lần [60].

2.2.8 Phương pháp western blot

Các tế bào ung thư được cấy vào đĩa 6 giếng trong 12 giờ. Sau đó, các tế bào được xử lý với 50 µg/mL của *Helicteres hirsuta* hoặc DMSO trong 24 giờ. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh và được lọc trong dung dịch đệm ly giải. Nồng độ protein được định lượng bằng kit BCA. Mẫu được tiến hành điện di và chuyển màng. Rửa màng và gắn các kháng thể đặc hiệu cho các protein nghiên cứu như Snail, Twist, Slug, Zeb1, Zeb2, N-cadherin và E-

cadherin qua đêm ở 4°C. Các kháng thể dùng để làm mờ vết rạn da ở phương Tây là N-cadherin (ab76011), α -tubulin (ab7291) và E-cadherin (ab40772A, abcam, UK). Các kháng thể được phát hiện với kháng thể thứ cấp liên hợp peroxidase (ab205718 Abcam, UK) bằng cách sử dụng Bộ chất nền HRP hóa phát quang của Immobilon (MILLIPORE) và máy chụp hình (Image Quant LAS 4000 mini). Các dải được đo bằng MultiGauge 3.0 và mật độ tương đối của chúng được tính toán dựa trên mật độ của các dải α -tubulin trong mỗi mẫu. Các giá trị này được biểu thị dưới dạng đơn vị đo mật độ tương ứng với cường độ tín hiệu [61].

2.2.9 Phương pháp real-time PCR

Các tế bào ung thư được xử lý với các cao chiết trong 24h, tiến hành tách RNA tổng số từ các dòng tế bào ung thư. RNA tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA. RNA tổng số được tách từ các tế bào bằng cách sử dụng thuốc thử TRI (Ambion, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 1 μ g RNA tổng số đã được chuyển đổi thành cDNA bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã reverse GoScript™ (Promega, Madison, USA). Biểu hiện gen tương đối được đo bằng máy real time PCR sử dụng bộ kit SYBR green master (Promega, Madison, USA) [62]. Các cặp mồi đặc hiệu của các gen liên quan đến quá trình di căn, xâm lấn của tế bào ung thư như bảng 2.2

Bảng 2.2 Trình tự các cặp mồi sử dụng trong đánh giá biểu hiện các gen liên quan đến quá trình di căn xâm lấn trên tế bào HepG2

Snail	Mồi xuôi	5'-TCCCGGGCAATTTAACAATG3'
	Mồi ngược	5'TGGGAGACACATCGGTCTGA-3'
Twist	Mồi xuôi	5'-CGGGAGTCCGCAGTCTTA-3'
	Mồi ngược	5'-TGAATCTTGCTCAGCTTG-TC-3'
N-cadherin	Mồi xuôi	5'-CTCCTATGAGTG-GAA-CAGGAACG-3'
	Mồi ngược	5'-TTGGATCAATGTCATAATCAAGTGCTGTA-3'
E-cadherin	Mồi xuôi	5'-CAGAAAGTTTTCCACCAAAG-3'
	Mồi ngược	5'-AAATGTGAGCAATTCTGCTT-3'

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MẪU CÂY AN XOA

Mẫu cây An xoa (thân, lá, hoa) được thu hái tại hiện trường dựa vào các đặc điểm hình thái của mẫu. Sau khi tách chiết và tinh sạch, kiểm tra sản phẩm DNA tổng số bằng cách điện di trên gel agarose nồng độ 1%, DNA tổng số của các mẫu được pha loãng để làm khuôn cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế (Bảng 3.1). Kết quả trên cho thấy các mẫu được khuếch đại thành công bằng cách sử dụng các cặp mồi cho hai vùng mã vạch DNA. Trình tự thu được từ các mẫu này được kiểm tra độ tương đồng với các trình tự có sẵn trên Genbank bằng công cụ BLAST kết quả khi điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy matK và rbcL là các cặp mồi đã rất thành công trong việc nhân bản, khuếch đại các đoạn gen mong muốn từ DNA của mẫu cây An xoa. Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch để sử dụng cho các phản ứng xác định trình tự gen.

Mẫu cây An xoa sau khi được làm sạch tiến hành tách DNA để giải trình tự xác định tên khoa học của cây, kết quả thể hiện dưới đây:

Giải trình tự gen mẫu cây An xoa thu hoạch tại Nghệ An với mồi rbcL (ký hiệu AX. NA.rbcL) có trình tự như sau:

>AX. NA.rbcL

TACATCCTAATAGGGGGCGACCGTACTTGTTCAATTTATCTCTTTCA
ACCTGGATGCCGTGAGGCGGGCCTTGAAAAGTTTTAATATAAGAAACAG
GGATTCGCAGATCCTCTAGACGTAGAGCACGCAGGGCTTTGAACCCAAA
TACATTACCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAACCTTCTTCA
AAAAGGTCTAAAGGGTAAGCTACATAACATATATAT

Sau khi giải trình tự mẫu DNA với mồi rbcL, kết quả giải trình tự mẫu cây An xoa sẽ được so sánh với trình tự đã công bố trên ngân hàng gen thế giới bằng cách sử dụng công cụ NCBI/Blast (Hình 3.1)

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres sp. MP 686 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large...	Helicteres s...	425	425	100%	1e-114	100.00%	560	MN216774.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres isora voucher MA-16 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygen...	Helicteres i...	425	425	100%	1e-114	100.00%	657	MH588541.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres isora isolate SBB-1585 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxyg...	Helicteres i...	425	425	100%	1e-114	100.00%	434	KX344718.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres isora isolate SBB-1310 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxyg...	Helicteres i...	425	425	100%	1e-114	100.00%	577	KX344606.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Luehea paniculata voucher BOLLC121 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/...	Luehea pan...	425	425	100%	1e-114	100.00%	1282	KX640864.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres guazumifolia voucher Eleuterio Gorostiza 2186 (MEXU_US) ribulose...	Helicteres g...	425	425	100%	1e-114	100.00%	577	OP710383.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres isora isolate JD09 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenas...	Helicteres i...	425	425	100%	1e-114	100.00%	562	KF496517.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres eichleri isolate NE874 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxyge...	Helicteres e...	425	425	100%	1e-114	100.00%	709	MT304323.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres sp. HUEFS113956 isolate NE358 ribulose-1,5-bisphosphate carboxy...	Helicteres s...	425	425	100%	1e-114	100.00%	711	MT304319.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres vuaramae isolate NE126 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxyg...	Helicteres v...	425	425	100%	1e-114	100.00%	710	MT304318.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres hirsuta chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxyl...	Helicteres h...	425	425	100%	1e-114	100.00%	531	AB925611.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres baruensis voucher BioBot00628 ribulose-1,5-bisphosphate carboxyl...	Helicteres b...	425	425	100%	1e-114	100.00%	552	JQ594212.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres baruensis chloroplast rbcL gene, partial	Helicteres b...	425	425	100%	1e-114	100.00%	1399	AJ233127.1	

Hình 3.1 Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng mỗi rbcL

Bảng 3.1 Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen AX. NA.rbcL

STT	Mã ngân hàng gen	Tên loài trên genbank	Độ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	MN216774.1	<i>Helicteres</i> sp.	100	100
2	MH588541.1	<i>Helicteres isora</i> L.	100	100
3	KX344718.1	<i>Helicteres isora</i> L.	100	100
4	KX344606.1	<i>Helicteres isora</i> L.	100	100
5	KX640864.1	<i>Luehea paniculata</i> Mart.	100	100
6	OP710383.1	<i>Helicteres guazumifolia</i> Kunth, 1822	100	100
7	KF496517.1	<i>Helicteres isora</i> L.	100	100
8	MT304323.1	<i>Helicteres eichleri</i> K.Schum., 1886	100	100
9	MT304318.1	<i>Helicteres vuaramae</i> Mart., 1839	100	100
10	AB925611.1	<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.	100	100

Kết quả trên cho thấy trình tự mẫu thực vật thu thập có độ tương đồng cao lên tới 100% với loài (Mã số ngân hàng gen: AB925611.1), *Helicteres* sp.(Mã số ngân hàng gen: MN216774.1); *Helicteres isora* L.(Mã số ngân hàng gen: MH588541.1, KX344718.1, KX344606.1, KF496517.1, KF496517.1) đã công bố bằng mã vạch rbcL(bảng 3.1)

Giải trình tự gen mẫu cây An xoa thu hoạch tại nghệ An với mỗi matK (ký hiệu AX.NA.matK) có trình tự như sau:

>AX.NA.matK

GTTCTCTCTCTACGAGTATTGTAATTTGAAGAGTTTTATTACTCCAA
AGAAATCTATTTCTATTTTTAATCCAAGATTATTCTTGTTCCTATATAATT
CTCATGTATGTGAATACGAATCCATTTTCCTTTTTCTCCGTAAGCAGTCT
TCTCATTTACGATCAACATTTTCTGGAGTCTTTCTTGACCGAATTAATTT
CTACGGAAAATAGAGTATCTTGTAGAAGTCT

Sau khi giải trình tự mẫu DNA với mỗi matK, kết quả trình tự mẫu cây An xoa được so sánh với trình tự đã công bố trên ngân hàng gen thế giới bằng cách sử dụng công cụ NCBI/Blast (Hình 3.2)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres hirsuta chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, specime...	Helicteres h...	425	425	100%	1e-114	100.00%	816	AB924985.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres sp. MP 686 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	Helicteres s...	414	414	100%	3e-111	99.13%	842	MN243413.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres angustifolia chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, spe...	Helicteres a...	403	403	100%	6e-108	98.26%	756	AB925159.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres baruensis voucher BioBot00629 maturase K (matK) gene, partial c...	Helicteres b...	403	403	100%	6e-108	98.26%	749	JQ589302.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres baruensis voucher BioBot00628 maturase K (matK) gene, partial c...	Helicteres b...	403	403	100%	6e-108	98.26%	763	JQ589301.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres guazumifolia trnK gene, partial sequence, and maturase K (matK)...	Helicteres g...	403	403	100%	6e-108	98.26%	2474	AY321186.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres vuaramae isolate NE126 maturase K (matK) gene, partial cds; chloro...	Helicteres v...	399	399	99%	8e-107	98.25%	842	MT370661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres eichleri isolate NE874 maturase K (matK) gene, partial cds; chloro...	Helicteres e...	398	398	100%	3e-106	97.83%	842	MT370677.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres isora voucher SUP442 maturase K (matK) gene, complete cds; chl...	Helicteres i...	392	392	100%	1e-104	97.39%	1509	MF076999.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helicteres jamaicensis voucher 0118735367 maturase K (matK) gene, partial...	Helicteres j...	388	388	96%	2e-103	98.20%	703	KJ012633.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mansonia altissima voucher IDRCG048-13_BRLU_NB0594 maturase K (mat...	Mansonia a...	387	387	100%	6e-103	96.96%	720	MN370380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Craigia yunnanensis chloroplast, complete genome	Craigia yun...	387	387	100%	6e-103	96.96%	163166	NC_045284.1

Hình 3.2 Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng mỗi matK

Bảng 3.2 Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen AX. NA.matK

STT	Mã ngân hàng gen	Tên loài trên genbank	Độ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	AB924985.1	<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.	100	100
2	MN243413.1	<i>Helicteres</i> sp. MP 686	100	99,13
3	AB925159.1	<i>Helicteres angustifolia</i> L	100	98.26
4	JQ589302.1	<i>Helicteres baruensis</i> Jacq.	100	98.26
5	JQ589301.1	<i>Helicteres baruensis</i> Jacq.	100	98.26
6	AY321186.1	<i>Helicteres guazumifolia</i> Kunth, 1822	100	98.26
7	MT370661.1	<i>Helicteres vuarame</i> Mart., 1839	99	98.25
8	MT370677.1	<i>Helicteres eichleri</i> K.Schum., 1886	100	97.83
9	MF076999.1	<i>Helicteres isora</i> L.	100	97.39
10	KJ012633.1	<i>Helicteres jamaicensis</i> Jacq.	96	98.20

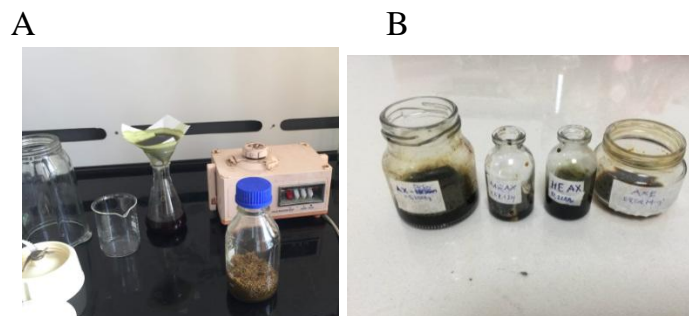
Kết quả này cho thấy trình tự mẫu thực vật thu thập có độ tương đồng cao 100% với loài (Mã số ngân hàng gen: AB924985.1); 99,13% với loài *Helicteres* sp(Mã số ngân hàng gen: MN243413.1), 98.26% với các loài *Helicteres angustifolia*(Mã số ngân hàng gen: AB925159.1), *Helicteres baruensis*(Mã số ngân hàng gen: JQ589302.1, JQ589301.1), *Helicteres guazumifolia*(Mã số ngân hàng gen: AY321186.1); 98.25% với loài *Helicteres vuarame*(Mã số ngân hàng gen: MT370661.1), 97.83% với loài *Helicteres eichleri*(Mã số ngân hàng gen: MT370677.1), 97.39% với loài *Helicteres isora*(Mã số ngân hàng gen: MF076999.1) bằng mã vạch matK (Hình 3.2). Kết quả này tương tự với trình tự mẫu thực vật khi phân tích với mỗi

rbcL .Cho thấy đây là cơ sở đáng tin cậy để khẳng định rằng tên khoa học của cây An xoa được thu hái ở Nghệ An vào tháng 10/2020 thuộc loài *Helicteres hirsuta* , thuộc chi *Helicteres*. Kết quả này phù hợp và bổ sung cho việc phân loại mẫu cây An xoa dựa vào các đặc điểm hình thái.

3.2 KẾT QUẢ TÁCH CHIẾT CÁC PHÂN ĐOẠN DỊCH CHIẾT TỪ CÂY AN XOA

3.2.1 Tách chiết các phân đoạn dịch chiết

Dung môi được lựa chọn là methanol, được sử dụng phổ biến trong việc điều chế các phân đoạn dịch chiết của cây An xoa. Mẫu cây An xoa khô (thân, lá, hoa) được nghiền và ngâm chiết trong methanol. Trước khi ngâm chiết, khối lượng mẫu khô được cân để tính tỷ lệ cao chiết thu được từ mẫu sau khi cô quay chân không loại bỏ dung môi hoàn toàn đến khối lượng không đổi. Tiến hành chiết phân bố lỏng-lỏng cao tổng Methanol với 3 dung môi: Dichloromethane, n-Hexan, Ethyl acetate. Kết quả thể hiện trong Hình 3.3 và Bảng 3.3.



Hình 3.3 Mẫu An xoa tách chiết. (A) xác và cao chiết methanol thu được từ cây An xoa, (B) cao chiết thu được với các dung môi dichloromethane, ethyl acetate, methanol, n-Hexan từ trái qua phải.

Bảng 3.3 Khối lượng và tỷ lệ cao chiết từ cây An xoa

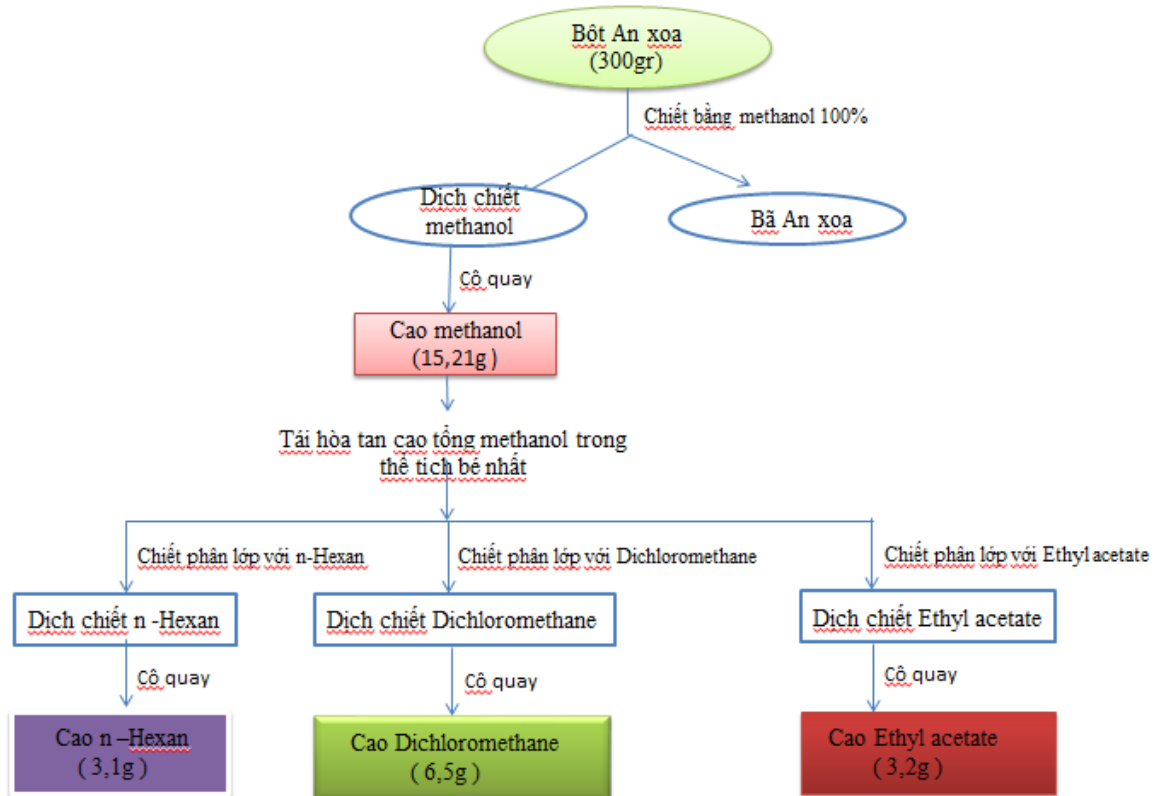
Thứ tự	Tên mẫu	Dung môi	Khối lượng khô (gram)	Khối lượng Cao chiết (gram)	Hiệu suất chiết (%)
1	Cây an xoa	n- Hexan	300	3,1	1,03
2	Cây an xoa	Dichloromethane	300	6,5	2,17
3	Cây an xoa	Ethyl acetate	300	3,2	1,07

Nhóm nghiên cứu đã sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng trong việc điều chế các phân đoạn dịch chiết của cây dược liệu. Tóm tắt quy trình theo sơ đồ Hình 3.4

Quy trình chiết như sau: cây An xoa sau khi sơ chế (300 gram) được cho vào bình thủy tinh. Dung môi chiết methanol 100% được cho vào ngập cây An xoa 2-3 cm [lần 1 là 3V (0,9 L), lần 2-3 là 2V (0,6 L)]. Mẫu cây An xoa được ngâm 3 giờ trong máy siêu âm ở nhiệt độ 55 °C. Sau đó, tiến hành lọc bã cây An xoa qua giấy lọc, chiết kiệt cho đến khi dịch chiết không còn chất. Dịch chiết được gom lại, trộn đều, cô quay dưới áp suất giảm đến kiệt.

Từ 300g bột An xoa, thu được cao chiết methanol có khối lượng 15,21g và chiếm 5,07% khối lượng khô. Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn methanol làm dung môi tách chiết cao chiết ban đầu do dung môi methanol có thể hòa tan được nhiều nhất có thể các hợp chất thứ cấp. Sau đó chiết phân bố lỏng-lỏng cao tổng Methanol với 3 dung môi Dichloromethane, Ethyl acetate, n- Hexan thu được 3 phân đoạn tương ứng như bảng 3.3 và Hình 3.4

Kết quả cho thấy rằng từ cao chiết thô với methanol khi sử dụng các dung môi khác nhau (Ethyl acetate, n- Hexan, Dichloromethane) thì thu được các chất có độ phân cực khác nhau. Mặt khác dựa vào nguyên tắc phân cực của dung môi, các dung môi có độ phân cực khác nhau thì khả năng hòa tan các hợp chất hữu cơ có tính phân cực cũng khác nhau. Dichloromethane là dung môi thu được hàm lượng cao chiết lớn nhất đạt 6,5g (chiếm 2,17%), sau đó là Ethyl acetate với hàm lượng cao chiết đạt 3,2g (chiếm 1,07%), Cuối cùng n- Hexan là dung môi thu được hàm lượng cao chiết thấp nhất đạt 3,1g (chiếm 1,03%) (Bảng 3.3). Dựa vào kết quả nghiên cứu ở trên các cao chiết tiếp tục được sử dụng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

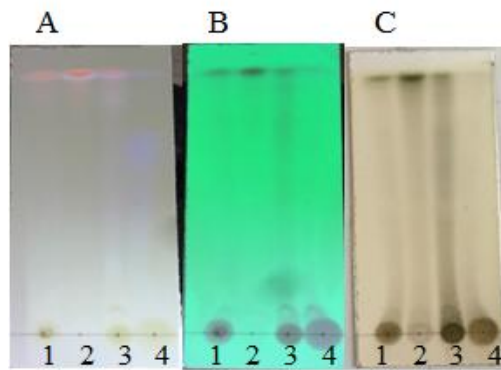


Hình 3.4 Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu cây An xoa

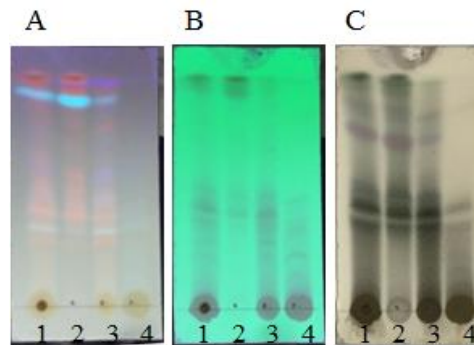
3.2.2 Kiểm tra thành phần phân đoạn dịch chiết bằng sắc ký bản mỏng

Tiến hành làm sắc ký bản mỏng các dịch chiết cây An xoa với các hệ dung môi khác nhau: Hệ 1 = Dichloromethane – n-Hexan (1:1); Hệ 2 = Dichloromethane – Methanol (95:5); Hệ 3 = Dichloromethane – Methanol (8:2). Sau đó phát hiện bằng cách Soi dưới ánh sáng UV 254 nm, bước sóng hiện thị 365 nm, hiện với axit sulfuric, hiện với thuốc vasalin, soi dưới ánh sáng thường.

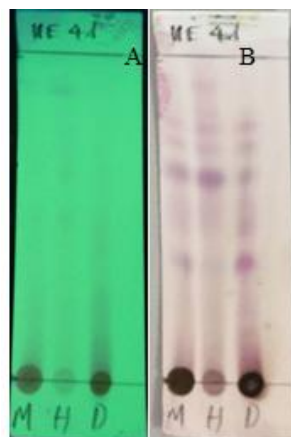
Kết quả qua việc khảo sát 3 hệ dung môi, có thể thấy rằng: Hệ 2 = Dichloromethane – Methanol (95:5) cho thấy kết quả tách tốt nhất với các cao chiết



Hình 3.5 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. (A) bước sóng hiện thị 365 nm, (B) 254 nm, (C) hiện với axit sulfuaric, Dung môi khai triển: Dichloromethane – n-Hexan (1:1), (1) cao methanol, (2) cao n hexan, (3) cao Dichloromethane, (4) cao ethyl acetat



Hình 3.6 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. (A) bước sóng hiện thị 365 nm, (B) 254 nm, (C) hiện với axit sulfuaric, Dung môi khai triển: Dichloromethane – Methanol (95:5), (1) cao methanol, (2) cao n hexan, (3) cao Dichloromethane, (4) cao ethyl acetat



Hình 3.7 Sắc ký bản mỏng cao chiết methanol từ cây An xoa. (A) soi dưới ánh sáng UV 254 nm, (B) hiện với thuốc vanilin. Dung môi khai triển: Dichloromethane – Methanol (8:2).

3.3 KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO VỚI CAO CHIẾT TỪ CÂY AN XOA (MTT ASSAY)

3.3.1 Lựa chọn phân đoạn dịch chiết có khả năng gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2

Để khẳng định hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết của cây An xoa trên các dòng tế bào ung thư khác nhau thì các giá trị ức chế tăng trưởng (IC₅₀), nồng độ của các chiết xuất ức chế 50% sự phát triển của tế bào, đã được xác định.

Các phân đoạn dịch chiết Dichloromethane, n- Hexan, Ethyl acetate được sử dụng để đánh giá khả năng gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2. Kết quả khi xử lý bằng các phân đoạn dịch chiết dichloromethane, n- Hexan, Ethyl acetate với các nồng độ khác nhau 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200 µg/mL của *Helicteres hirsuta* trong 48 giờ và chất chuẩn Ellipticine được sử dụng là đối chứng dương trong thí nghiệm.

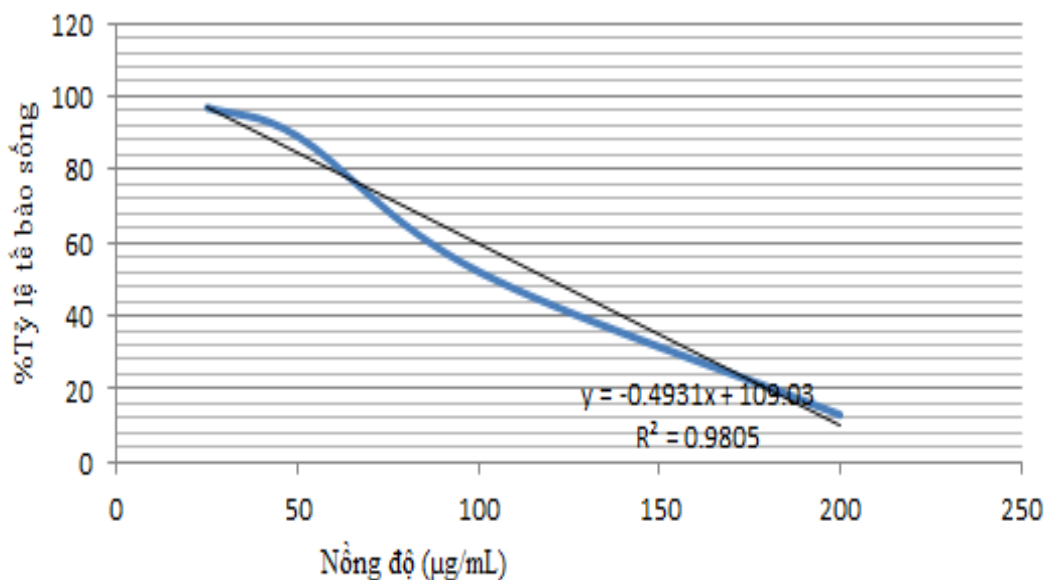
Từ đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ của các mẫu cây An xoa và % tỷ lệ tế bào sống cũng như nồng độ của đối chứng Ellipticine, ta có phương trình tuyến tính hoạt tính dạng $y = ax + b$. Thay $y = 50$ ta được kết quả IC₅₀ như Bảng 3.4

Bảng 3.4 Kết quả xác định giá trị IC₅₀ của các phân đoạn dịch chiết và đối chứng Ellipticine

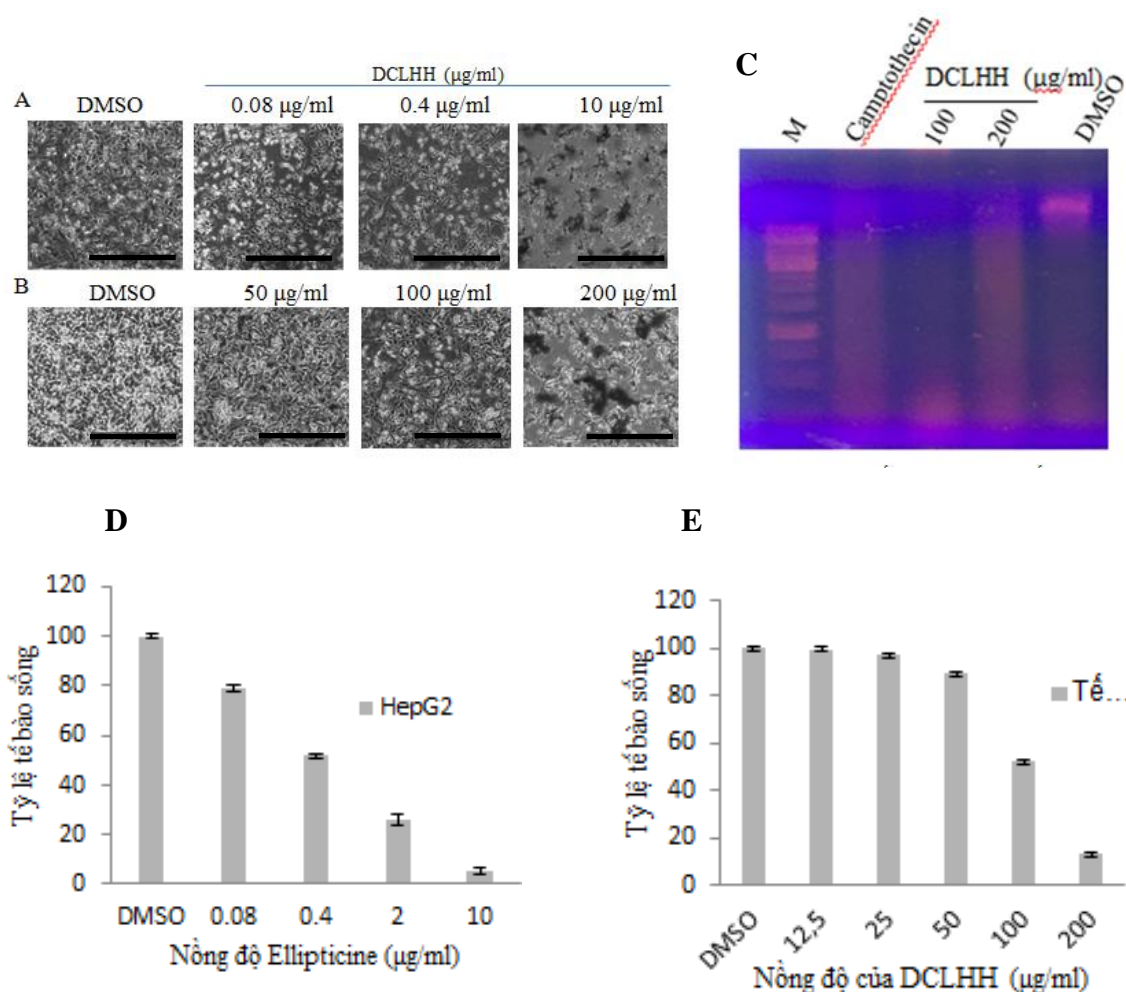
Mẫu	Phương trình hồi quy	IC ₅₀ (µg/ml)
Ellipticine	$y = -24.697x + 102.21$	2,11
DCLHH	$y = -0.4931x + 109.03$	119,71
EtHH	$y = -0.076x + 100.09$	659,08
HEHH	$y = -0.224x + 102.53$	234,51

Kết quả Bảng 3.4 cho thấy khi xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane với các nồng độ khác nhau 12,5-200 µg/mL của *Helicteres hirsute* (DCLHH) trong 48 giờ đã làm giảm khả năng sống sót của tế bào

Hep-G2 phụ thuộc vào các nồng độ khác nhau. Qua đó cho thấy tác động ức chế dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 cao nhất của phân đoạn dịch chiết dichloromethane ở nồng độ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với giá trị IC_{50} là 119,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hình 3.8, Hình 3.9B và 3.9C). Trong khi đó, phân đoạn dịch chiết n-hexan của *Helicteres hirsuta* (HEHH) và phân đoạn dịch chiết etyl axetat của *Helicteres hirsuta* (EtHH) có giá trị IC_{50} lần lượt là 234,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 659,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, do đó 2 phân đoạn dịch chiết n-hexan và etyl axetat có hoạt tính gây độc tế bào HepG2 thấp ở nồng độ và thời gian nghiên cứu. Hơn nữa, các tế bào được xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsute* (DCLHH) cho thấy số lượng tế bào khả dụng ít hơn khi so sánh với đối chứng được xử lý bằng DMSO bằng cách kiểm tra hình thái của các tế bào dưới kính hiển vi (Hình 3.9A). Các kết quả cho thấy, phân đoạn dịch chiết dichloromethane có công dụng chống tăng sinh mạnh mẽ trên tế bào ung thư HepG2. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn cần được tiếp tục để phân lập và xác định các hợp chất có hoạt tính trong dịch chiết cây An xoa cụ thể là phân đoạn dịch chiết dichloromethane và làm rõ hơn cơ chế tác dụng của các hợp chất này.



Hình 3.8 Đồ thị biểu diễn tương quan giữa % tỷ lệ tế bào sống và nồng độ mẫu An xoa phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH).



Hình 3.9 Hoạt tính gây độc tế bào của cao chiết từ cây An xoa và chất sạch. (A) Mật độ và hình thái tế bào HepG2 khi xử lý với chất sạch Ellipticine. (B) Mật độ và hình thái tế bào HepG2 khi xử lý với phân đoạn dịch chiết Dichloromethane. (C) phân đoạn dịch chiết Dichloromethane của gây ra sự phân mảnh DNA được phát hiện bằng điện di trên gel agarose của DNA được phân lập từ quá trình xử lý tế bào HepG2. Tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót khi xử lý với phân đoạn dịch chiết Dichloromethane. (D) Tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót khi xử lý với Ellipticine. (E) Tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót khi xử lý với phân đoạn dịch chiết Dichloromethane của Dữ liệu đại diện cho giá trị trung bình \pm sai số chuẩn của giá trị trung bình, $n = 3$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.2 Đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của dịch chiết Dichloromethane trên các dòng ung thư gan khác nhau như Hep-G2, Huh7 và Chang cell.

Tương tự, để khẳng định chính xác hơn khả năng gây độc tế bào ung thư của phân đoạn dịch chiết dichloromethane thì nhóm nghiên cứu tiếp tục sử dụng phân đoạn dịch chiết dichloromethane để tiến hành trên các dòng ung thư gan khác nhau như Hep-G2, Huh7, Chang cell của cây An xoa ở nồng độ

12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200 µg/mL của *Helicteres hirsuta* dựa trên giá trị tỷ lệ phần trăm tế bào sống. Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/mL; 2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,08 µg/mL được sử dụng làm chất đối chứng tham khảo.

Từ đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ của các mẫu cây An xoa và %tỷ lệ tế bào sống, ta có phương trình tuyến tính hoạt tính dạng $y = ax + b$. Thay $y = 50$ ta được kết quả IC_{50} như Bảng 3.5

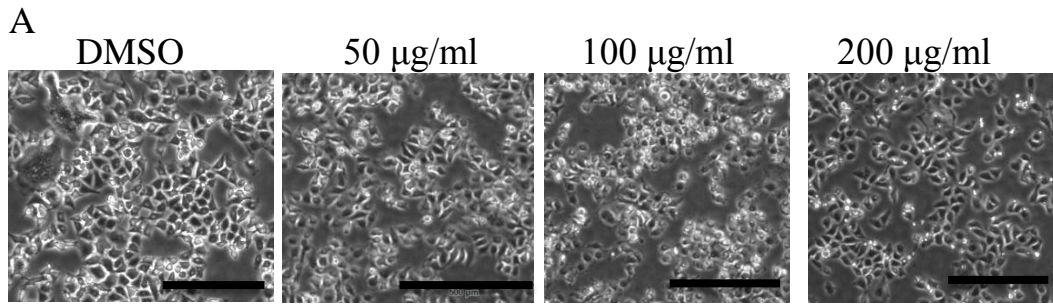
Bảng 3.5. Kết quả xác định giá trị IC_{50} của phân đoạn dịch chiết dichloromethane

Tế bào	Phương trình hồi quy	IC_{50} (µg/ml)
HepG2	$y = -0.4931x + 109.03$	119,71
Huh7	$y = -0.3025x + 99.165$	162,53
Chang cell	$y = -0.1915x + 100.23$	262,29

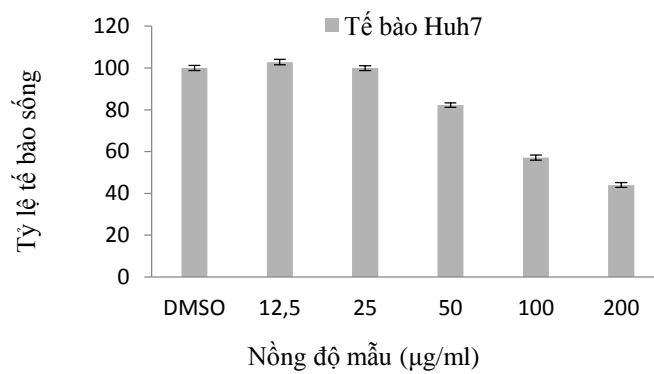
Qua khảo sát cho thấy khi xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane với các nồng độ 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200 µg/mL của *Helicteres hirsuta* lên các dòng tế bào ung thư gan HepG2, Huh7, Chang cell đã làm giảm khả năng sống sót tế bào ung thư. Kết quả này cho thấy khi xử lý tế bào ung thư gan Hep-G2 với phân đoạn dịch chiết Dichloromethane ở nồng độ 100µg/ml và 200 µg/ml làm giảm khả năng sống sót tế bào Hep-G2 lần lượt là 52,14% và 12,97% với giá trị ức chế sinh trưởng IC_{50} là 119,71µg/mL(Hình 3.8, Hình 3.9)

Khả năng ức chế tế bào ung thư cũng được ghi nhận trên tế bào khi tế bào ung thư gan Huh7 được xử lý với phân đoạn dịch chiết dichloromethane nồng độ là 100 µg/ml và 200 µg/ml làm giảm khả năng sống sót tế bào Huh7 lần lượt là 57,14 % và 43,97 %. Giá trị ức chế sinh trưởng IC_{50} ghi nhận IC_{50} 162,53µg/ml (hình 3.10).

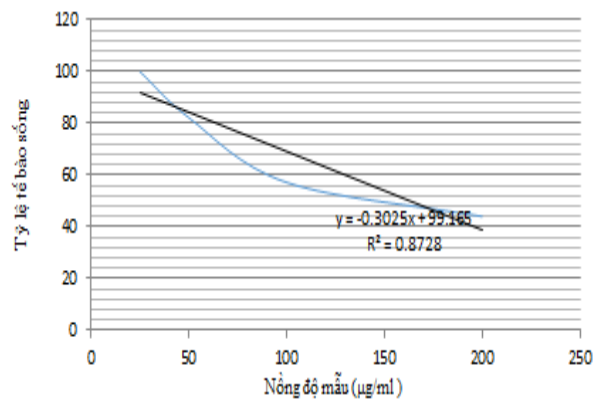
Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan trên dòng tế bào chang cell từ phân đoạn dịch chiết Dichloromethane cũng được ghi nhận. Khi xử lý với phân đoạn dịch chiết Dichloromethane ở nồng độ nghiên cứu 200µg/ml làm ức chế khả năng sinh trưởng của tế bào là 63,97% so với nhóm đối chứng(Hình 3.11).



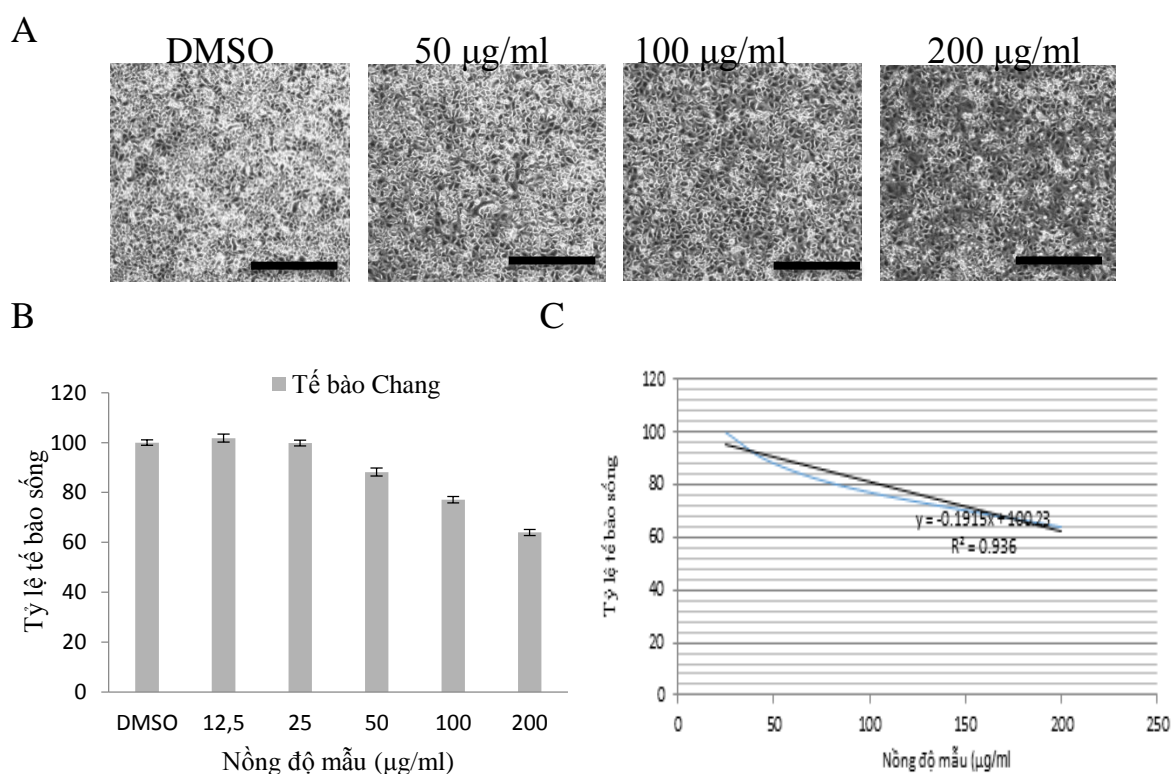
B



C



Hình 3.10 Hoạt tính gây độc tế bào của phân đoạn dịch chiết dichloromethane từ cây An xoa. (A) Mật độ và hình thái tế bào Huh7 khi xử lý với phân đoạn dichloromethane. (B) Tỷ lệ tế bào Huh7 sống sót khi xử lý với phân đoạn Dichloromethane. (C) Đồ thị biểu diễn tương quan giữa % tỷ lệ tế bào sống và nồng độ mẫu An xoa phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) lên dòng tế bào ung thư gan Huh7.



Hình 3.11 Hoạt tính gây độc tế bào của phân đoạn dichloromethane từ cây An xoa. (A) Mật độ và hình thái tế bào Chang cell khi xử lý với phân đoạn dichloromethane. (B) Tỷ lệ tế bào Chang cell sống sót khi xử lý với phân đoạn Dichloromethane. (C) Đồ thị biểu diễn tương quan giữa % tỷ lệ tế bào sống và nồng độ mẫu An xoa phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) lên dòng tế bào ung thư gan Chang cell.

3.4 THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CAO CHIẾT TỪ CÂY AN XOA

Helicteres hirsuta từ lâu đã được sử dụng như một cây thuốc cổ truyền ở Việt Nam để điều trị bệnh ung thư gan. Nó đã được mô tả có chứa nhiều loại hợp chất khác nhau như phenolics, flavonoid và saponin. Các hợp chất này đã được chứng minh là có đặc tính kháng khuẩn, gây độc tế bào trong các dòng tế bào ung thư khác nhau. Để xác định thành phần hóa học từ cao chiết của cây An xoa, kỹ thuật sắc ký khí ghép nối khối phổ đã được sử dụng. Dựa vào các đặc trưng riêng như thời gian lưu, khối lượng phân tử của từng chất được so sánh với thư viện chất chuẩn để xác định các chất trong mẫu nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, kết quả GC-MS cho thấy trong mẫu cao chiết từ cây An xoa có chứa 20 hợp chất hóa học thực vật khác nhau trong chiết xuất methanol của *Helicteres hirsuta* đã được định danh. Thời gian lưu mẫu, tỷ lệ phần trăm các chất trong cao chiết được thể hiện trong bảng 3.6 và hình 3.12.

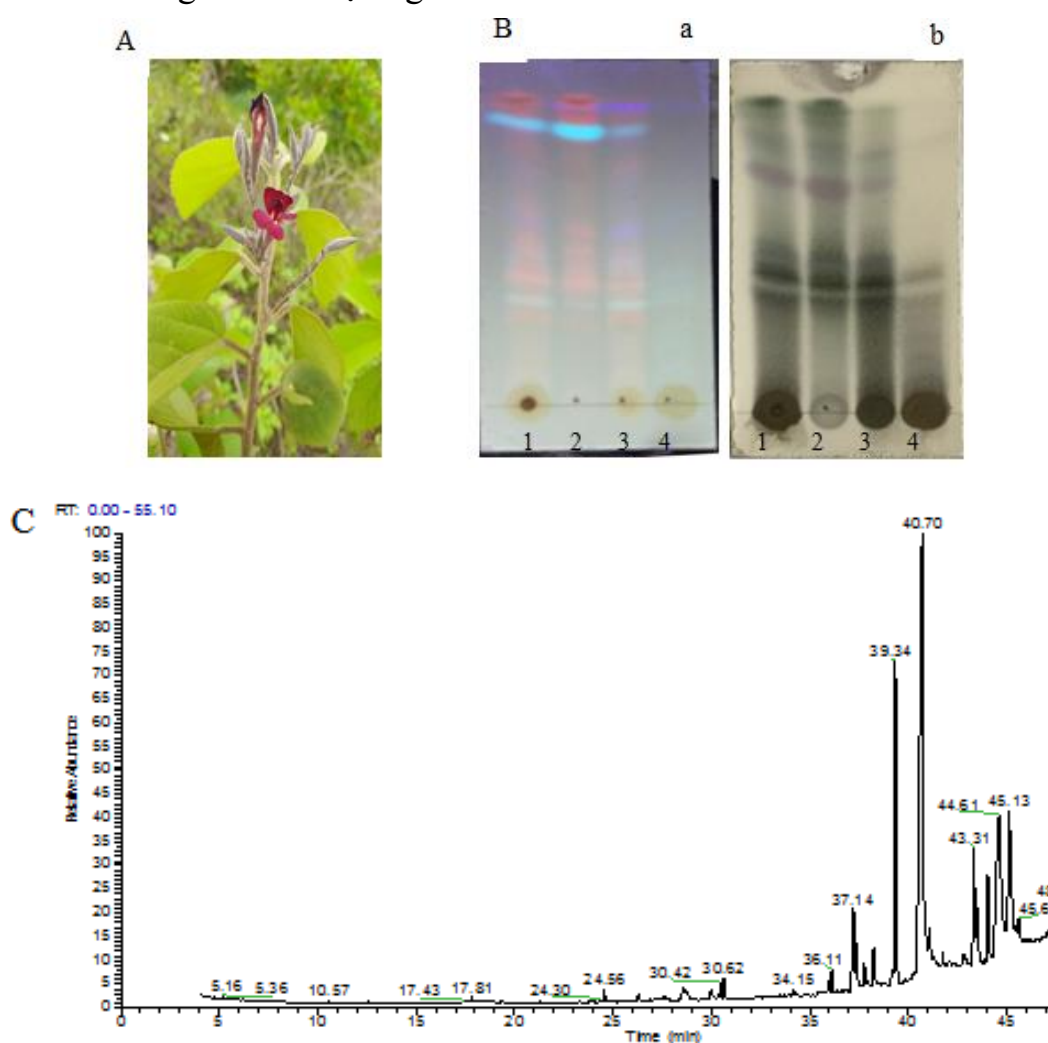
Bảng 3.6 Thành phần hóa học của các chất trong mẫu cao chiết cây An xoa

STT	Thời gian lưu (RT)	Diện tích peak	RI	Tên chất
1	17.81	598324.096	1205	Oxalic acid, isobutyl nonyl ester
2	24.56	1369779.406	1400	Tetradecane
3	28.56	3206439.123	1515	2,4-Di-tert-butylphenol
4	29.99	1557887.556	1557	Acetaminophen
5	30.42	1702033.945	1569	Oleic acid
6	30.62	2067871.155	1575	Hexadecane
7	34.15	1570996.185	1677	Tridecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester
8	36.11	2580335.983	1733	Eicosane
9	37.14	9430583.027	1764	7-Octadecyne, 2-methyl-
10	37.3	9096499.585	1769	2-trans-9-Octadecenylxyethanol
11	37.77	3433384.18	1782	2-Methyl-7-octadecyne
12	38.22	5609909.669	1795	9-Octadecyne
13	39.34	36689041.94	1827	Palmitic acid, methyl ester
14	40.28	373539.254	1855	Dibutyl phthalate
15	40.7	106002596.2	1866	Hexadecanoic acid
16	41.07	2490267.359	1877	Docosane
17	43.31	23383668.73	1942	6,9-Octadecadienoic acid, methyl ester
18	44.04	9923506.041	1963	Stearic acid, methyl ester
19	44.61	43677134.7	1980	6-Octadecenoic acid
20	45.13	27291318.18	1995	Methyl isoheptadecanoate

Hoạt tính sinh học của các thành phần chính có trong dịch chiết đã được ghi nhận ở các nghiên cứu trước đây. Ví dụ, Palmitic acid và methyl ester là hợp chất có khả năng ức chế tế bào Kupffer, đại thực bào thường trú ở gan, điều hòa quá trình viêm bằng cách tiết TNFalpha và NO [63]. Hơn nữa, thành phần này cũng thể hiện tác dụng chống rung [64] cũng như hoạt động như một chất giãn mạch mạnh được giải phóng ở võng mạc và nội mạc tử cung

[65], [66] Agoramoorthy và cộng sự. (2007) cho thấy axit palmitic, một hợp chất chính được phân lập có vai trò là chất kháng khuẩn và kháng nấm [67]. Hơn nữa, Jerah et al. đã chứng minh rằng axit octadecenoic được phân lập có thể ức chế virus sởi và dòng tế bào Vero [68].

DCLHH cho thấy tác dụng gây độc tế bào cao và gây tổn hại DNA đối với các dòng tế bào ung thư. Hợp chất chính của DCLHH được xác định là axit asexadecanoic đã báo cáo hoạt động cảm ứng của quá trình chết theo chương trình và phản ứng phá hủy DNA [69], [70]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các hợp chất riêng lẻ của chiết xuất *Helicteres hirsuta* đối với tế bào ung thư biểu mô tế bào gan cần được nghiên cứu thêm.

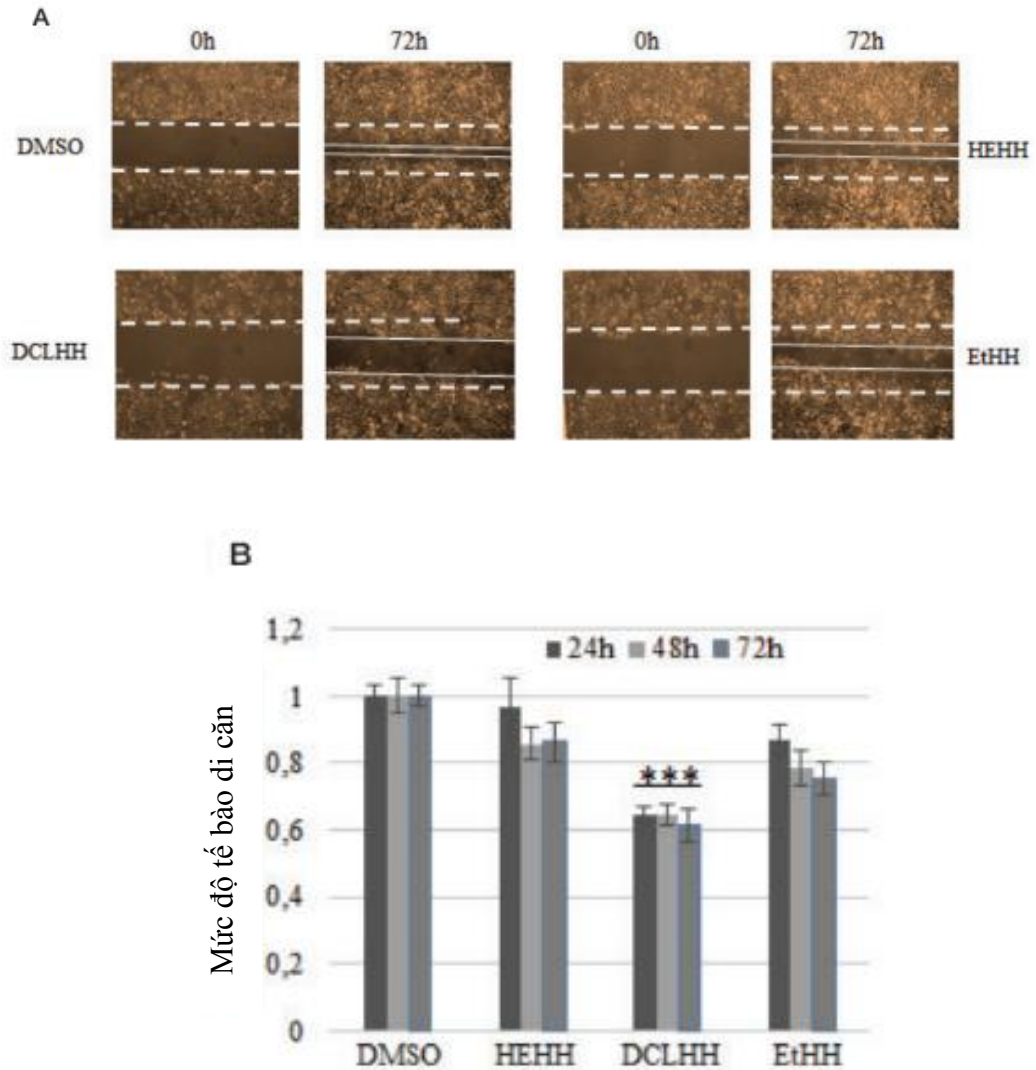


Hình 3.12 và các thành phần hóa học thực vật của nó. (A) , (B) TLC hiện diện của chiết xuất . a: tia cực tím 254nm đèn chiếu sáng, b: hiển thị Vanillin/H₂SO₄. 1: Chiết xuất n-Hexan, 2: Chiết xuất Dichloromethane, 3: Chiết xuất etyl axetat, 4: Chiết xuất methanol. (C) Sắc ký đồ GC-MS của mẫu cao chiết từ cây An xoa trong việc phân tích các thành phần hóa học thực vật của cao chiết methanol .

TLC là kỹ thuật sàng lọc sơ bộ ban đầu và định tính sự có mặt của các chất trong mẫu nghiên cứu. Hình 3.12B cho thấy số lượng hợp chất kỵ nước tập trung chủ yếu ở HEHH và DCLHH (tương ứng điểm 1, 2), là hầu hết các chất có giá trị $R_f > 0,3$. Trong khi đó, hai mẫu EtHH và MeHH (điểm 3, 4) chủ yếu chứa các hợp chất ưa nước ($R_f < 0,3$) được phát hiện bằng thuốc thử Vanillin (Hình 3.12Bb). Ngoài ra, kết quả GC-MS cho thấy, 20 thành phần thực vật chính khác nhau đã được quan sát thấy trong cao chiết methanol của *Helicteres hirsuta*. Thời gian lưu (RT), diện tích peak và chỉ số lưu của chúng được trình bày trong Hình 3.12C và Bảng 3.6. Trong 20 hợp chất được phát hiện đó, có 2 hợp chất hữu cơ dễ bay hơi chính là axit Hexadecanoic và axit Palmitic, methyl este với thời gian lưu lần lượt là 40,70 phút và 39,34 phút. Ba hợp chất axit 6,9-Octadecadienoic, methyl este; axit 6-octadecenoic; methyl isoheptadecanoate (thời gian lưu lần lượt là 43.31, 44.61, 45.13) là các hợp chất có hàm lượng trung bình được phát hiện.

3.5 KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ SỰ PHỤC HỒI TỔN THƯƠNG VỚI CAO CHIẾT TỪ CÂY AN XOA (WOUND HEALING ASSAY)

Để tiếp tục điều tra các khả năng chống ung thư của *Helicteres hirsuta*, thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế sự phục hồi tổn thương của phân đoạn dịch chiết dichloromethane, Ethyl acetate, n-Hexan với tế bào ung thư gan Hep-G2 (wound healing assay) được tiến hành. Trong quá trình thử nghiệm, các tế bào sẽ di chuyển vào khoảng trống và chúng cũng sẽ tăng sinh. Tế bào được xử lý với nồng độ (50 μ g/mL) trong 24h, 48h, 72h của *Helicteres hirsuta* thể hiện trong Hình 3.13 ức chế quá trình phục hồi tổn thương cao hơn nhiều so với điều trị bằng DMSO. Xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) của *H. hirsuta* cho thấy mức độ ức chế cao nhất (sau 24h-48h ức chế khoảng 63% và sau 72h ức chế 59%), sau đó là phân đoạn dịch chiết Ethyl acetate cho thấy mức độ ức chế trung bình (sau 24h ức chế khoảng 86%, sau 48h ức chế 79%, sau 72h ức chế 76%), Cuối cùng n-Hexan cho thấy mức độ ức chế thấp nhất (sau 24h ức chế khoảng 98%, sau 48h - 72h ức chế 85%) khi so sánh với biện pháp kiểm soát được xử lý bằng DMSO. Kết quả chứng minh rằng việc xử lý với nồng độ 50 μ g/mL của phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) của *Helicteres hirsuta* có hoạt tính ức chế sự phục hồi tổn thương của các tế bào Hep-G2



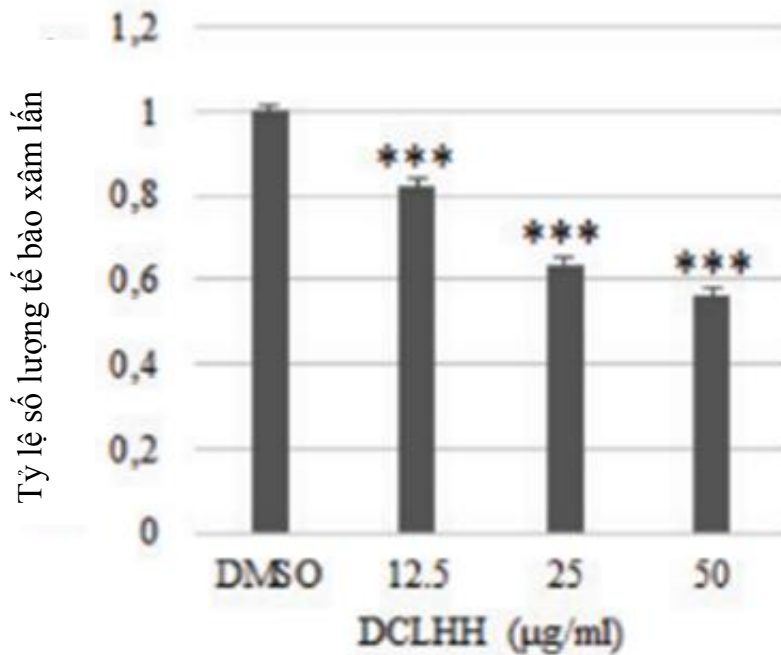
Hình 3.13 Hoạt tính ức chế phục hồi tổn thương của phân đoạn dịch chiết dichloromethane từ cây An xoa. (A) Hình ảnh ức chế phục hồi tổn thương của các tế bào HepG2 được điều trị bằng dịch chiết, n-Hexan, Dichloromethane, Ethyl axetat. (B) Phân tích định lượng các xét nghiệm chữa lành vết thương của tế bào HepG2.

3.6 KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ SỰ XÂM LẤN VỚI CAO CHIẾT TỪ CÂY AN XOA (INVASION ASSAY)

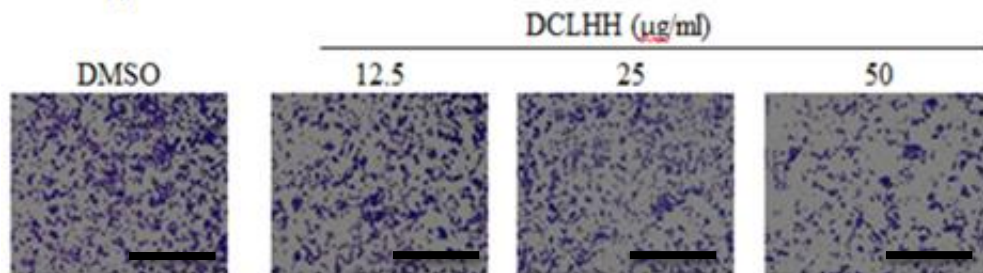
Tiếp tục đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn của dịch chiết *Helicteres hirsuta* trên dòng tế bào Hep-G2 với các nồng độ khác nhau 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL của dịch chiết *Helicteres hirsuta*. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* đã ức chế đáng kể sự xâm lấn tế bào Hep-G2 theo cách phụ thuộc vào nồng độ, khi so sánh với biện pháp kiểm soát được xử lý bằng DMSO (Hình 3.14B). Số lượng tế bào bị xâm lấn giảm 50% khi xử lý với 50 µg/mL phân đoạn dịch chiết

dichloromethane (DCLHH). Phân tích định lượng số lượng tế bào bị xâm lấn dữ liệu chỉ ra rằng sự khác biệt là đáng kể (Hình 3.14A). Ở nồng độ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho thấy mức độ tế bào xâm lấn thấp nhất đạt 59% của phân đoạn dịch chiết dichloromethane so với đối chứng DMSO, tiếp theo ở nồng độ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho thấy mức độ tế bào xâm lấn đạt mức trung bình 62%, cuối cùng mức độ tế bào xâm lấn đạt mức cao nhất được tìm thấy ở nồng độ 12,5%. Kết quả này chứng minh rằng việc xử lý với phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* làm ức chế khả năng xâm lấn của tế bào HepG2.

A



B



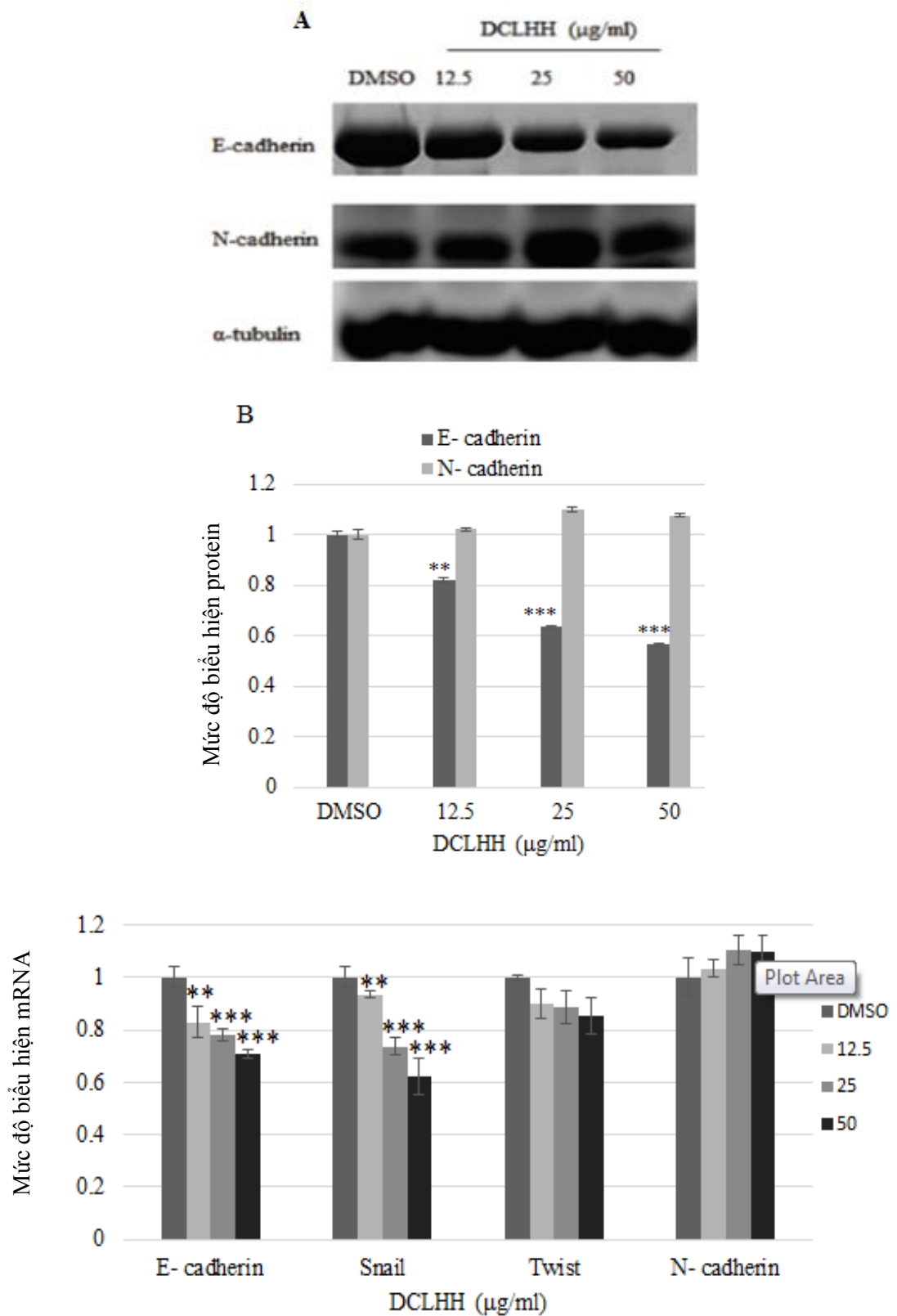
Hình 3.14 Phân đoạn dichloromethane của *Helicteres hirsuta* ngăn chặn sự xâm lấn của tế bào Hep -G2. (A) phân tích định lượng tương đối về số lượng tế bào bị xâm lấn trong mỗi lần điều trị. (B) xét nghiệm xâm lấn các tế bào Hep-G2.

3.7 KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN QUÁ TRÌNH DI CĂN, XÂM LẤN CỦA TẾ BÀO UNG THƯ KHI TẾ BÀO UNG THƯ ĐƯỢC XỬ LÝ VỚI CAO CHIẾT TỪ CÂY AN XOA

EMT đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và di căn ung thư [71]. Do vậy, Sau khi ghi nhận các hoạt tính của phân đoạn dịch chiết dichloromethane của cây An xoa, chúng tôi tiến hành đánh giá sự ảnh hưởng của dịch chiết này lên mức độ biểu hiện của 1 số gen liên quan đến quá trình chuyển đổi tế bào biểu mô thành trung mô EMT. Sự khác nhau về mức độ biểu hiện của một số EMT đã được phân tích, kết quả được thể hiện trong Hình 3.15.

Qua phân tích Western blot để kiểm tra mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến di căn N-cadherin, E-cadherin khi xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) của *Helicteres hirsuta* ở các nồng độ khác nhau 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL. Kết quả này cho thấy liều lượng DCLHH làm giảm biểu hiện của E-cadherin phụ thuộc vào nồng độ (ở nồng độ 12,5µg/mL có mức độ biểu hiện protein là 81%, khi xử lý ở nồng độ 25µg/mL thì mức độ biểu hiện protein là 62%, xử lý ở nồng độ 50µg/mL thì mức độ biểu hiện protein là 58%), nhưng không làm thay đổi đáng kể biểu hiện của N-cadherin ở mức độ protein (ở nồng độ 12,5µg/mL có mức độ biểu hiện protein là 101%, khi xử lý ở nồng độ 25µg/mL thì mức độ biểu hiện protein là 109%, xử lý ở nồng độ 50µg/mL thì mức độ biểu hiện protein là 108%) (Hình 3.15 A, B). Sự biểu hiện quá mức của E-cadherin đã được xác định là yếu tố điều chỉnh chính của sự di căn. Do đó, việc ngăn chặn sự phát triển của E-cadherin đã hỗ trợ hoạt động chống di căn của phân đoạn dịch chiết dichloromethane.

Hơn nữa, các biểu hiện mRNA cũng cho thấy kết quả tương tự, nồng độ DCLHH làm giảm biểu hiện của E-cadherin nhưng không làm thay đổi đáng kể biểu hiện của N-cadherin, của Snail và Twist cũng giảm phụ thuộc vào nồng độ khi xử lý DCLHH (Hình 3.15C). Tóm lại, những kết quả này cho thấy rằng DCLHH có hoạt tính gây độc trên các tế bào HepG2 nhờ khả năng ức chế EMT.



Hình 3.15 Phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* điều chỉnh giảm mức độ chuyển đổi tế bào biểu mô thành trung mô (EMT). (A,B) Phân tích Western blot cho thấy mức độ biểu hiện protein tương đối của cadherin.(C) phân tích định lượng tương đối về mức độ mRNA của N-cadherin, E-cadherin, Snail và Twist trong các tế bào HepG2 được xử lý bằng phân đoạn

dịch chiết dichloromethane của . Dữ liệu đại diện cho giá trị trung bình \pm sai số chuẩn của giá trị trung bình, $n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DMSO được sử dụng làm nhóm đối chứng.

3.8 THẢO LUẬN

Cây An xoa ngày càng được biết đến rộng rãi và được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền để tăng cường sức khỏe. Việc xác định đúng cây giúp Tăng tính an toàn khi sử dụng thuốc, do ko bị lẫn với các cây khác có đặc điểm tương tự. Mã vạch DNA được dùng để nhận dạng loài bằng cách sử dụng matK và rbcL là mã vạch thực vật tiêu chuẩn [72]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng hai dấu mã vạch matK và rbcL để xác định cây An xoa ở cấp độ phân tử. Kết quả cho thấy đã thu nhận thành công 2 chỉ thị mã vạch matK và rbcL từ mẫu thực vật nghiên cứu thuộc loài *Helicteres hirsuta*, thuộc chi *Helicteres*. Trong một số nghiên cứu nhận dạng, matK khó giải trình tự hơn rbcL [72], [73]. Kết quả giải trình tự matK thành công phụ thuộc vào bản chất của thực vật [74]. Mã vạch DNA cũng có thể kết hợp với TLC và HPLC để xác định cây thuốc [75]. Cây An xoa trước đây đã được sử dụng làm cây thuốc truyền thống ở Việt Nam để điều trị ung thư gan. Nó đã được mô tả có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau như phenolics, flavonoid và saponin. Các hợp chất này đã được chứng minh là có đặc tính kháng khuẩn, gây độc tế bào trong các dòng tế bào ung thư khác nhau [76]. Trong nghiên cứu này, kết quả GC-MS đã cho thấy sự hiện diện của 20 hợp chất hóa học thực vật khác nhau trong chiết xuất methanol của *Helicteres hirsuta*. Phân đoạn dịch chiết dichloromethane (DCLHH) cho thấy tác dụng gây độc tế bào cao hơn đối với các dòng tế bào ung thư.

Xét nghiệm độc tính tế bào là một phần quan trọng trong các nghiên cứu tiền lâm sàng sàng lọc các hợp chất mới. Nó cung cấp thông tin quan trọng về các hoạt động sinh học thú vị của một phân tử mới. Xét nghiệm MTT được biết đến là phương pháp phổ biến nhất để đánh giá độc tính tế bào. Trong nghiên cứu này, xét nghiệm MTT được sử dụng để đo lường tác động của dịch chiết *Helicteres hirsuta* đối với khả năng sống của tế bào. Kết quả của xét nghiệm độc tính tế bào chỉ ra rằng dịch chiết từ *Helicteres hirsuta* làm giảm khả năng sống sót của tế bào ung thư hep G2. Đặc biệt, phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* (DCLHH) đã ngăn chặn mạnh mẽ khả năng tồn tại của các dòng tế bào Hep-G2. Tác dụng sinh học của chiết

xuất phụ thuộc vào các thành phần và phân cực của chúng. *Helicteres hirsuta* được mô tả có chứa nhiều loại hợp chất khác nhau như flavonoid và saponin. Các hợp chất này đã được báo cáo là cung cấp một số hoạt tính sinh học bao gồm khả năng gây độc tế bào trong các dòng tế bào ung thư khác nhau [77], đặc tính kháng khuẩn và chất chống oxy hóa [76], [78], [79].

Hợp chất chính của DCLHH được xác định là axit hexadecanoic đã cho thấy hoạt động cảm ứng của quá trình chết theo chương trình và phản ứng phá hủy DNA [80], [70]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các hợp chất riêng lẻ của *Helicteres hirsuta* đối với tế bào ung thư biểu mô tế bào gan cần được nghiên cứu thêm. Trong nghiên cứu này, các thử nghiệm phục hồi tổn thương đã được thực hiện để đánh giá sự di chuyển của tế bào ung thư gan bị ảnh hưởng khi xử lý bằng dịch chiết *Helicteres hirsuta*. Kết quả chỉ ra rằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* ức chế đáng kể quá trình di chuyển của tế bào. Hơn nữa, số lượng tế bào bị xâm lấn giảm sau khi xử lý bằng phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *Helicteres hirsuta* phụ thuộc vào nồng độ xử lý.

Di căn là một quá trình tế bào phức tạp bao gồm sự di cư và xâm lấn của các tế bào ung thư. Trong quá trình này, các tế bào khối u trải qua một loạt các sự kiện để lây lan từ vị trí ban đầu hoặc vị trí chính sang vị trí khác hoặc vị trí thứ cấp. Sự xâm lấn và di cư là nguyên nhân chính gây tử vong ở bệnh nhân ung thư [81]. Di căn là một quá trình phức tạp, liên quan đến nhiều tín hiệu nội bào như sản xuất các loại oxy phản ứng (ROS) [78], [82] và đóng góp của microRNA (miRNA) [79], [83]. Những thay đổi này kích thích quá trình chuyển đổi tế bào biểu mô thành trung mô, dẫn đến sự gia tăng di cư và xâm lấn của các tế bào ung thư [84], [85]. Trong nghiên cứu này, kết quả chỉ ra rằng DCLHH đã ức chế quá trình phục hồi tổn thương. Hơn nữa, phân đoạn dịch chiết này cũng ngăn chặn sự xâm lấn và di cư của các tế bào HepG2 ở liều lượng 50µg/mL ít gây độc tế bào. EMT đóng một vai trò quan trọng trong kiểu hình xâm lấn hoặc di căn ở nhiều loại khối u ác tính thông qua quy định trong biểu hiện của các gen quan trọng. Trong EMT, các dấu hiệu biểu mô được điều chỉnh giảm như E-cadherin và kích hoạt protein trung mô, chẳng hạn như vimentin, fibronectin và N-cadherin [86], [87], [88]. Trong nghiên cứu này, DCLHH làm giảm biểu hiện của N-cadherin ở cả mức độ protein và mRNA, nhưng không ảnh hưởng đáng kể đến biểu hiện của E-cadherin. Ngoài ra, DCLHH làm giảm đáng kể biểu hiện mRNA của các yếu tố phiên mã EMT như Snail and Twist theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Các thí nghiệm tiếp theo cần có các hướng nghiên cứu chi tiết hơn về các hợp chất có tác dụng chống ung thư từ phân đoạn dịch chiết dichloromethane và đánh giá hoạt động chống ung thư tiềm ẩn trong các mô hình ung thư trong cơ thể sống.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

Từ những kết quả nghiên cứu của đề tài, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

1. Đã định danh cây An xoa bằng bằng chỉ phân tử và kết luận tên khoa học của cây An xoa được thu hái ở Nghệ An vào tháng 10/2020 thuộc loài *Helicteres hirsuta*, thuộc chi *Helicteres*.

2. Đánh giá khả năng gây độc tế bào của các phân đoạn dịch chiết cây An xoa trên các dòng ung thư gan khác nhau như Hep-G2, Huh7, Chang cell. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết dichloromethane có tác dụng làm giảm khả năng sống sót của tế bào Hep-G2 cao nhất có ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$ với giá trị IC50 là 119,71 $\mu\text{g/mL}$.

Đánh giá khả năng ức chế phục hồi tổn thương của các phân đoạn dịch chiết của cây An xoa đối với tế bào ung thư gan Hep-G2. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết Dichloromethane cho khả năng ức chế quá trình phục hồi tổn thương cao nhất khi xử lý với nồng độ (50 $\mu\text{g/mL}$) của chiết xuất *Helicteres hirsuta*

Đánh giá khả năng ức chế sự xâm lấn trên dòng tế bào Hep-G2 với nồng độ (50 $\mu\text{g/mL}$) của chiết xuất *Helicteres hirsuta*. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết dichloromethane của *H. hirsute* đã ức chế đáng kể sự xâm lấn tế bào Hep-G2. Số lượng tế bào bị xâm lấn giảm 50% khi xử lý với 50 $\mu\text{g/mL}$ dịch chiết dichloromethane (DCLHH)

3. Mức độ biểu hiện của một số EMT đã được phân tích, kết quả phân đoạn dịch chiết dichloromethane làm giảm biểu hiện của E-cadherin phụ thuộc vào nồng độ, nhưng không làm thay đổi đáng kể biểu hiện của N-cadherin ở cả mức độ protein và mRNA. Hơn nữa, các biểu hiện mRNA của Snail và Twist cũng giảm phụ thuộc vào nồng độ khi xử lý với phân đoạn dịch chiết dichloromethane. Do vậy phân đoạn dịch chiết dichloromethane đã tác động mạnh mẽ ở cả mức độ protein và mRNA.

Kiến nghị:

Trong quá trình nghiên cứu, do điều kiện thí nghiệm và thời gian còn hạn chế, do đó chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

Cần có các hướng nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất có tác dụng kháng ung thư từ phân đoạn dịch chiết Dichloromethane và đánh giá hoạt tính kháng ung thư ở mức độ in vitro. Tiến hành tinh sạch được hợp chất có hoạt tính kháng ung thư trong phân đoạn dịch chiết Dichloromethane của cây An xoa, hướng tới sản xuất các sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, 2018, *International Agency for Research on Cancer Latest global cancer data*(263).
2. WHO, 2018, *Viet Nam Source: Globocan*
3. Anon, 1790, *Helicteres hirsuta Lour., Fl. Cochinch.* Vol. 2: International Plant Names Index, 530.
4. Jordi Bruix and Sherman, 2011, *Management of hepatocellular carcinoma: an update.*Hepatology, **53**(3), p. 1020.
5. R Palmer Beasley, et al., 1981, *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22 707 men in Taiwan.* Lancet, **318**(8256), p. 1129-1133.
6. Man-Fung Yuen, et al., 2009, *Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B.* J Hepatol, **50**(1), p. 80-88.
7. Hwai-I Yang, et al., 2008, *Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma.* J Natl Cancer Inst, **100**(16), p. 1134-1143.
8. Giuliano giustina Giovanna fattovich, et al., 1997, *Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients.* Gastroenterology, **112**, p. 463-472.
9. F Degos, et al., 2000, *Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death.* Gut, **47**(1), p. 131-136.
10. Eric Rosenthal, et al., 2003, *Mortality due to hepatitis C-related liver disease in HIV-infected patients in France (Mortavic 2001 study).* AIDS, **17**(12), p. 1803-1809.
11. Manal M Hassan, et al., 2002, *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus.* Hepatology, **36**(5), p. 1206-1213.
12. JM Llovet, et al., 2016, *Hepatocellular carcinoma Nat Rev Dis Primers 2: 16018:* Nat Rev Dis Primers.
13. RNH Pugh, et al., 1973, *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.* Br J Surg, **60**(8), p. 646-649.
14. Augusto Villanueva, et al., 2013, *Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, **10**(1), p. 34-42.
15. Vincenzo Mazzaferro, et al., 1996, *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis.* N Engl J Med, **334**(11), p. 693-700.
16. Văn Chi Võ, 1997, *Tử điển cây thuốc Việt Nam.*
17. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2017, *Bioactive compound yield and antioxidant capacity of Helicteres hirsuta Lour. stem as affected by various solvents and drying methods.* Technologies, **41**(1), p. e12879.

18. Young-Won Chin, et al., 2006, *Cytotoxic lignans from the stems of Helicteres hirsuta collected in Indonesia*. *Phytother Res*, **20**(1), p. 62-65.
19. A. Libman, et al., 2006, *Medicinal plants: an important asset to health care in a region of Central Laos*. *J Ethnopharmacol*, **106**(3), p. 303-11.
20. J. Yu, et al., 2019, *The effects of pinoresinol on cholinergic dysfunction-induced memory impairments and synaptic plasticity in mice*. *Food Chem Toxicol*, **125**, p. 376-382.
21. R. T. Burkman, 2003, *Hormone replacement therapy. Current controversies*. *Minerva Ginecol*, **55**(2), p. 107-16.
22. B. S. Komm, et al., 2015, *The safety and tolerability profile of therapies for the prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, **8**(6), p. 769-84.
23. X. Jiang, et al., 2019, *Pinoresinol promotes MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation via the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway*. *Mol Med Rep*, **20**(3), p. 2143-2150.
24. S. Y. Kim, et al., 2019, *Reduction of Hepatic Lipogenesis by Loliolide and Pinoresinol from Lysimachia vulgaris via Degrading Liver X Receptors*. *J Agric Food Chem*, **67**(45), p. 12419-12427.
25. S. R. Lee, et al., 2019, *Accelerated degradation of cflip(L) and sensitization of the trail disc-mediated apoptotic cascade by pinoresinol, a lignan isolated from Rubia philippinensis*. *Sci Rep*, **9**(1), p. 13505.
26. M. Shettigar, et al., 2018, *Isolation of the (+)-Pinoresinol-Mineralizing Pseudomonas sp. Strain SG-MS2 and Elucidation of Its Catabolic Pathway*. *Appl Environ Microbiol*, **84**(4).
27. J. H. Hwang, et al., 2012, *(+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in Candida albicans*. *Biochimie*, **94**(8), p. 1784-93.
28. J. H. Hwang, et al., 2013, *Synergistic antibacterial and antibiofilm effect between (+)-medioresinol and antibiotics in vitro*. *Appl Biochem Biotechnol*, **170**(8), p. 1934-41.
29. H. N. T. Pham, et al., 2018, *In vitro antibacterial and anticancer properties of Helicteres hirsuta Lour. leaf and stem extracts and their fractions*. *Mol Biol Rep*, **45**(6), p. 2125-2133.
30. Nguyễn Thành Mến Lê Hồng Ân, Giang Thị Thanh and Phạm Khải Tân Hoàng Thanh Trường, Trần Đăng Hoài, 2019, *Đặc điểm sinh thái, nhân giống hom và sinh trưởng cây uom an xoa (Helicteres hirsuta Lour.) Tại tỉnh lâm đồng*. *Tạp Chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*(16), p. 58–62.
31. D. N. Quang, et al., 2020, *Cytotoxic constituents from Helicteres hirsuta collected in Vietnam*. *Nat Prod Res*, **34**(4), p. 585-589.
32. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2017, *Phytochemical profiles and antioxidant capacity of the crude extracts, aqueous-and saponin-*

- enriched butanol fractions of Helicteres hirsuta Lour. leaves and stems. Chemical Papers*, **71**, p. 2233-2242.
33. H. N. T. Pham, et al., 2020, *In vitro anti-pancreatic cancer activity of HPLC-derived fractions from Helicteres hirsuta Lour. stem. Mol Biol Rep*, **47**(2), p. 897-905.
 34. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2015, *Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of Helicteres hirsuta Lour. leaves. Technologies*, **3**(4), p. 285-301.
 35. Nguyen Minh Nhung, Ho Xuan Anh Vu, and Tran Thi Anh Thi, 2019, *Determination of luteolin from extracts of Helicteres hirsuta by HPLC. Hue university journal of science natural science*, **128**(1B), p. 43-47.
 36. Le Lam Son Le Trung Hieu, et al., 2018, *Determination of methyl gallate and rutin from Helicteres hirsuta by HPLC and using methyl gallate content as a marker for the evaluation of antioxidant capacity. Vietnam J. Chem*, **56**, p. 342-346.
 37. Hong Ngoc Thuy Pham, et al. *Phytochemical profiles and potential health benefits of Helicteres hirsuta Lour. in Proceedings*. 2020. MDPI.
 38. Trần Văn Tiến; Võ Thị Mai Hương, 2017, *Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và hoạt tính chống oxy hoá của dịch chiết cây An xoa (Helicteres hirsuta Lour.)*. Tạp chí khoa học và công nghệ, trường đại học khoa học, đh huế.
 39. Tirtha Ghosh, et al., 2011, *Evaluation of antitumor activity of stigmaterol, a constituent isolated from Bacopa monnieri Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. March*, **11**, p. 41-49.
 40. Kadriya S El Deeb, et al., 2003, *Phytochemical and pharmacological studies of Maytenus forsskaoliana. Saudi Pharmaceutical Journal*, **11**(4), p. 184-191.
 41. D. Patel, S. Shukla, and S. Gupta, 2007, *Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). Int J Oncol*, **30**(1), p. 233-45.
 42. A. Sala, et al., 2003, *Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. Eur J Pharmacol*, **461**(1), p. 53-61.
 43. Diem Thi Thuy Dung, Trinh Huyen Trang, and Van Tan, 2018, *Second metabolites and antioxidant, antimicrobial, anticancer activities of Helicteres hirsuta root extract. Academia Journal of Biology*, **40**(3).
 44. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2018, *In vitro antibacterial and anticancer properties of Helicteres hirsuta Lour. leaf and stem extracts and their fractions. Mol Biol Rep*, **45**(6), p. 2125-2133.
 45. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2017, *Optimum conventional extraction conditions for phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity of Helicteres hirsuta Lour. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, **12**(2), p. 332-347.

46. Nguyễn Hữu Duyên; Lê Thanh Phước, 2016, *Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào Hep-G2 của cây An xoa (Helicteres hirsuta L.)*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ(47), p. 93-97.
47. J. M. Llovet, et al., 2016, *Hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, **2**, p. 16018.
48. A. Villanueva, 2019, *Hepatocellular Carcinoma*. N Engl J Med, **380**(15), p. 1450-1462.
49. A. I. Gomaa, et al., 2008, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. World J Gastroenterol, **14**(27), p. 4300-8.
50. Z. Morise, et al., 2014, *Recent advances in liver resection for hepatocellular carcinoma*. Front Surg, **1**, p. 21.
51. H. R. Rosen, et al., 2017, *Nam 2017 report: A national plan to eliminate hepatitis B and C in the United States by 2030 and the Aasld's response*. Hepatology, **66**(4), p. 1020-1022.
52. M. Colombo and A. Sangiovanni, 2015, *Treatment of hepatocellular carcinoma: beyond international guidelines*. Liver Int, **35 Suppl 1**, p. 129-38.
53. Y. W. Chin, et al., 2006, *Cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves of Premna tomentosa*. Phytochemistry, **67**(12), p. 1243-8.
54. H.N.T. Pham, Q.V. Vuong, M.C. Bowyer & C.J.Scarlett 2017, *Physicochemical Properties, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Crude Extracts and Fractions from Phyllanthus amarus*. Chem. Pap.(71), p. 2233-42.
55. K. Li, et al., 2016, *Functional Characterisation of Anticancer Activity in the Aqueous Extract of Helicteres angustifolia L. Roots*. PLoS One, **11**(3), p. e0152017.
56. W. Chen, et al., 2006, *Pregnane, coumarin and lupane derivatives and cytotoxic constituents from Helicteres angustifolia*. Phytochemistry, **67**(10), p. 1041-7.
57. J. J. Doyle and J. L. Doyle, 1987, *A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue*. Phytochemical Bulletin, **19**, p. 11-15.
58. Tim %J Journal of immunological methods Mosmann, 1983, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. **65**(1-2), p. 55-63.
59. James EN Jonkman, et al., 2014, *An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy*. Cell Adhesion & Migration **8**(5), p. 440-451.
60. Nina Kramer, et al., 2013, *In vitro cell migration and invasion assays*. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, **752**(1), p. 10-24.
61. Lakshmi Pillai-Kastoori, Amy R Schutz-Geschwender, and Jeff A %J Analytical biochemistry Harford, 2020, *A systematic approach to*

- quantitative Western blot analysis*. Analytical Biochemistry, **593**, p. 113608.
62. M Tefvik Dorak, 2007, *Real-time PCR*. Taylor & Francis.
 63. P. Cai, B. S. Kaphalia, and G. A. Ansari, 2005, *Methyl palmitate: inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells*. Toxicology, **210**(2-3), p. 197-204.
 64. H. Fukunishi, et al., 2011, *Role of a mutated residue at the entrance of the substrate access channel in cytochrome p450 engineered for vitamin D(3) hydroxylation activity*. Biochemistry, **50**(39), p. 8302-10.
 65. Y. C. Lee, et al., 2011, *Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension*. Circulation, **124**(10), p. 1160-71.
 66. D. J. Crankshaw, J. M. Walsh, and J. J. Morrison, 2014, *The effects of methyl palmitate, a putative regulator from perivascular fat, on the contractility of pregnant human myometrium*. Life Sci, **116**(1), p. 25-30.
 67. G. Carta, et al., 2017, *Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications*. Front Physiol, **8**, p. 902.
 68. Reagan Entigu Ak Linton, Samuel Lihan Jerah, and Bin Ahmad, 2013, *The effect of combination of octadecanoic acid, methyl ester and ribavirin against measles virus*. International Journal Of Scientific & Technology Research, **2**(10), p. 181-184.
 69. Kant Sangpairoj, et al., 2022, *Hexadecanoic acid-enriched extract of Halymenia durvillei induces apoptotic and autophagic death of human triple-negative breast cancer cells by upregulating ER stress*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **12**(3), p. 132.
 70. Boobalan Bharath, et al., 2021, *Evaluation of the anticancer potential of Hexadecanoic acid from brown algae Turbinaria ornata on HT-29 colon cancer cells*. **1235**, p. 130229.
 71. E. Kang, et al., 2021, *The Post-Translational Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition-Inducing Transcription Factors in Cancer Metastasis*. Int J Mol Sci, **22**(7).
 72. Craig Costion, et al., 2011, *Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras*. PLoS One, **6**(11), p. e26841.
 73. Eunjeong Kang, et al., 2021, *The post-translational regulation of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in cancer metastasis*. Int J Mol Sci, **22**(7), p. 3591.
 74. José A Jurado-Rivera, et al., 2009, *DNA barcoding insect-host plant associations*. Proc Biol Sci **276**(1657), p. 639-648.
 75. Ning Yu, et al., 2018, *Integrated approach for identifying and evaluating the quality of Marsdenia tenacissima in the medicine market*. PLoS ONE, **13**(4), p. e0195240.

76. Hong Ngoc Thuy Pham, et al., 2017, *Effect of extraction solvents and thermal drying methods on bioactive compounds and antioxidant properties of Catharanthus roseus (L.) G. Don (Patricia White cultivar)*. Journal of Food Processing and Preservation, **41**(5), p. e13199.
77. Young-Won Chin, et al., 2006, *Cytotoxic lignans from the stems of Helicteres hirsuta collected in Indonesia*. Phytother Res, **20**(1), p. 62-65.
78. Jia Ma, et al., 2013, *Mitochondrial dysfunction promotes breast cancer cell migration and invasion through HIF1 α accumulation via increased production of reactive oxygen species*. PLoS One **8**(7), p. e69485.
79. Shuya Yang, et al., 2020, *MicroRNA-362-3p inhibits migration and invasion via targeting BCAP31 in cervical cancer*. Front Mol Biosci **7**, p. 107.
80. Kant Sangpairoj, et al., 2022, *Hexadecanoic acid-enriched extract of Halymenia durvillei induces apoptotic and autophagic death of human triple-negative breast cancer cells by upregulating ER stress*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, **12**(3), p. 132.
81. H Dillekås, MS Rogers, and O Straume, 2019, *Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?* Cancer Med 8: 5574–5576.
82. Jingjing Qiao, et al., 2019, *Knockdown of ROS proto-oncogene 1 inhibits migration and invasion in gastric cancer cells by targeting the PI3K/Akt signaling pathway*. Onco Targets Ther, **12**, p. 8569.
83. Heli Gao, et al., 2017, *MicroRNA-222 influences migration and invasion through MIA3 in colorectal cancer*. Cancer Cell Int **17**(1), p. 1-10.
84. Dasom Kim, et al., 2021, *AHA1 regulates cell migration and invasion via the EMT pathway in colorectal adenocarcinomas*. Scientific Reports, **11**(1), p. 19946.
85. Xiaoting Huang, et al., 2021, *CMTM6 promotes migration, invasion, and EMT by interacting with and stabilizing vimentin in hepatocellular carcinoma cells*. J Transl Med, **19**(1), p. 1-15.
86. Eunjeong Kang, et al., 2021, *The post-translational regulation of epithelial–mesenchymal transition-inducing transcription factors in cancer metastasis*. **22**(7), p. 3591.
87. Yi Yang, et al., 2015, *Lichen secondary metabolite, physciosporin, inhibits lung cancer cell motility*. **10**(9), p. e0137889.
88. İsa Taş, et al., 2019, *Physciosporin suppresses the proliferation, motility and tumourigenesis of colorectal cancer cells*. **56**, p. 10-20.