

# Một số ảnh hưởng của chất honokiol lên dòng tế bào ung thư phổi A549

Lê Thị Thùy Dương<sup>1\*</sup>, Đào Mai Anh<sup>2</sup>  
Lý Thị Bích Thủy<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mai Phương<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Viện Công nghệ Sinh học  
<sup>2</sup> Trường Đại học Dược Hà Nội

## Summary

Nowadays, most of the chemotherapy drugs target the cell cycle to inhibit the rapid growth of cancer cells and to induce apoptosis. Currently, scientists have a particular interest in finding and improving new antigenic drugs, especially those targeting proteins involved in the motility and adhesiveness of cancer cells like actin. In this study, honokiol extracted from *Magnolia officinalis* of Vietnam, were found to have a high ability to inhibit the growth of A549 lung cancer cells (the  $IC_{50} = 9.06 \mu\text{g/mL}$ ) as determined using MTS method. Moreover, the results of immunofluorescence method showed that Honokiol has a strong effect on cell morphology and actin cytoskeleton. With these results, Honokiol might be considered as potential candidate for cancer chemotherapy.

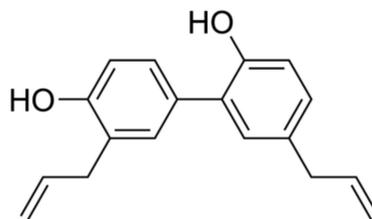
**Keywords:** Cell cycle, cancer cell, honokiol, actin cytoskeleton.

## Đặt vấn đề

Như chúng ta đã biết, đặc điểm của ung thư là sự tăng sinh không kiểm soát của các tế bào ung thư. Đồng thời, đối với ung thư di căn, các tế bào ung thư có thể xâm nhập vào các mô tế bào khác của cơ thể. Quá trình di căn của tế bào ung thư liên quan đến sự xâm lấn vào các mô xung quanh, sự di chuyển vào máu hoặc lympho, sự thoát mạch và tràn ra, rồi sinh trưởng ở vị trí mới. Việc xâm lấn gắn liền với sự di chuyển của tế bào được bắt nguồn bởi hiện tượng polymer hoá sợi actin và sự bám dính tế bào [1]. Do vậy, việc tìm hiểu các chất ảnh hưởng đến khung sợi actin cũng là một trong những cách để hạn chế sự di cư của các tế bào ung thư và hỗ trợ cho điều trị ung thư.

Ở Việt Nam, với nguồn thực vật đa dạng và phong phú, việc tách chiết các chất có hoạt tính sinh học từ tự nhiên là hướng nghiên cứu được nhiều nhà khoa học trong nước quan tâm.

Đặc biệt, những nghiên cứu về các chất có hoạt tính điều trị hoặc hỗ trợ điều trị ung thư đều rất hữu ích và thiết thực góp phần nâng cao hiệu quả khai thác nguồn tài nguyên nước nhà. Nhiều hợp chất tách chiết từ các nguồn dược liệu tự nhiên đã được xác định là có hoạt tính sinh học trong các nghiên cứu thực nghiệm. Trong số những chất này có honokiol (Hon) (hình 1) tách chiết từ loài *Magnolia officinalis* đã được chứng minh có các đặc tính như: Chống oxi hoá, kháng viêm, kháng khuẩn và chống ung thư [2]. Cơ chế chống ung thư của Honokiol cũng được nghiên cứu khá nhiều. Các kết quả chỉ ra rằng hoạt chất này có khả năng kìm hãm sự sinh trưởng và tăng cảm ứng quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư [3, 4, 5, 6].



Hình 1. Cấu trúc hoá học của hợp chất honokiol

Chịu trách nhiệm: Lê Thị Thùy Dương

Email: thuyduongcell@gmail.com

Ngày nhận: 27/4/2021

Ngày phân biện: 30/4/2021

Ngày duyệt bài: 24/5/2021

Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào tìm hiểu về ảnh hưởng của hợp chất này lên khả năng biến đổi hình thái và di động của tế bào ung thư thông qua ảnh hưởng tới hệ khung sợi actin. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là tìm hiểu ảnh hưởng của honokiol lên sự sinh trưởng của tế bào ung thư, hình thái cũng như ảnh hưởng tới hệ khung sợi actin trên đối tượng là tế bào ung thư phổi A549.

### **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

#### **Nguyên liệu, hóa chất, đối tượng nghiên cứu**

Honokiol được tách chiết từ cây hậu phác (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils) và được cung cấp từ Viện Công nghệ Sinh học. Các hóa chất như Phalloidin Alexa Flour 555 (Probe), kit thử độc tính MTS và các hoá chất khác dùng trong nghiên cứu cũng được mua từ các Hãng Sigma, Abcam và Invitrogen.

Đòng tế bào ung thư phổi A549 (American Type Culture Collection) được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học.

#### **Phương pháp nghiên cứu**

##### **Nuôi cấy tế bào**

Tế bào A549 được nuôi trong môi trường DMEM và được bổ sung 10% FBS, 1% penicillin G (100 U/ml) và streptomycin (100 µg/ml). Các tế bào được ủ ở 37°C với nồng độ CO<sub>2</sub> là 5%.

##### **Phân tích ảnh hưởng của honokiol lên sự tăng trưởng của tế bào**

Anh hưởng của honokiol (Hon) lên sự tăng trưởng của tế bào ung thư được phân tích bằng phương pháp MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)).

*Nguyên tắc:* Các enzym dehydrogenase có trong các tế bào sống chuyển hóa MTS thành sản phẩm formazan hòa tan. Số lượng sản phẩm hòa tan này tỷ lệ thuận với số lượng tế bào còn sống và được hấp thụ ở bước sóng 490 nm.

*Cách tiến hành:* Các tế bào A549 được nuôi trong đĩa 96 giếng với mật độ tế bào là 5000 tế bào/giếng và được ủ trong vòng 24 giờ cho bám dính. Sau đó, các tế bào được ủ với chất Hon (dung dịch gốc được pha trong DMSO)

ở các nồng độ 5, 10, 20, 40 và 60 µg/ml sao cho nồng độ DMSO cuối cùng là 0,1%. Các giếng đối chứng được xử lý với 0,1% DMSO. Sau 24 giờ ủ với thuốc, 30 µl dung dịch thuốc thử MTS được cho vào mỗi giếng, tiếp tục ủ trong vòng 2 đến 3 giờ ở 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào. Sản phẩm tạo thành formazan được định lượng trên máy đọc quang phổ (BioTek Synergy® HT microplate reader, USA) ở bước sóng 490 nm.

##### **Phân tích ảnh hưởng của honokiol lên hình thái tế bào và hệ khung sợi actin**

Anh hưởng của Hon lên hình thái tế bào và hệ khung sợi actin được phân tích bằng phương pháp huỳnh quang miễn dịch (immunofluorescence - IF).

*Nguyên tắc:* Huỳnh quang miễn dịch là phương pháp sử dụng kháng thể hoặc kháng nguyên có gắn thuốc nhuộm huỳnh quang để quan sát sự phân bố bên trong tế bào của các phân tử sinh học và mối quan hệ giữa chúng.

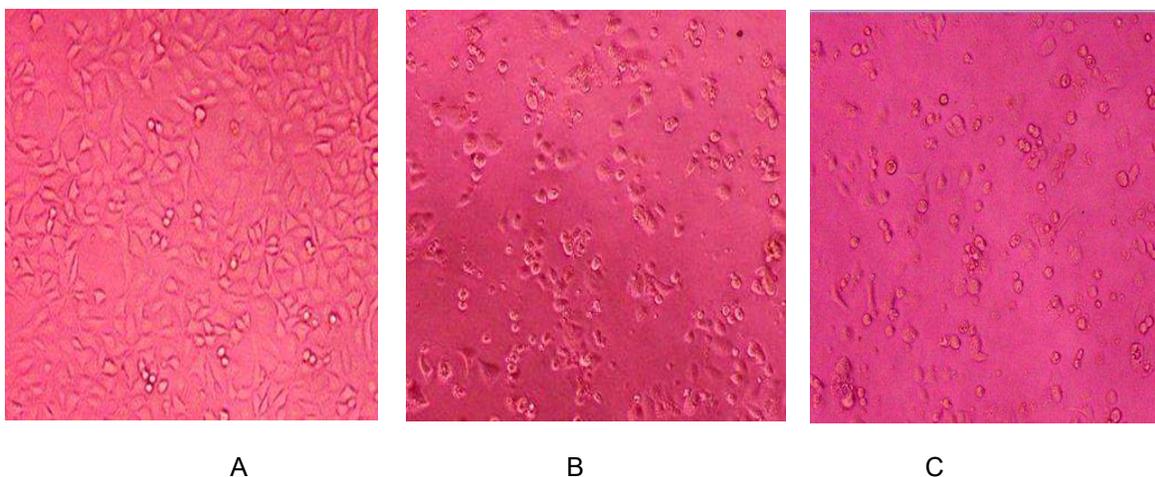
*Cách tiến hành:* Các coverslip được ngâm trong cồn, sau đó đặt vào đĩa 24 giếng và rửa các coverslip bằng PBS 1X vài lần rồi để khô tự nhiên trong box nuôi cấy có chiếu đèn UV. Tra vào mỗi giếng của đĩa 24 giếng đã đặt coverslip khoảng 5.000 tế bào với 500 µl môi trường nuôi cấy, nuôi ổn định trong 24 giờ để tế bào gắn dính, sau đó ủ với chất Hon trong 24 giờ tiếp. Các tế bào sau đó được cố định trong formaldehyd 4%.

Để quan sát ảnh hưởng của các chất lên sợi actin, các tế bào được nhuộm với phalloidin (Alexa Fluor 555). Các hình ảnh huỳnh quang được quan sát dưới kính hiển vi laze quét đồng tụ (ZEISS 510) với vật kính dầu có độ phóng đại 60X.

#### **Kết quả**

##### **Anh hưởng của honokiol lên sự sinh trưởng của tế bào Hela**

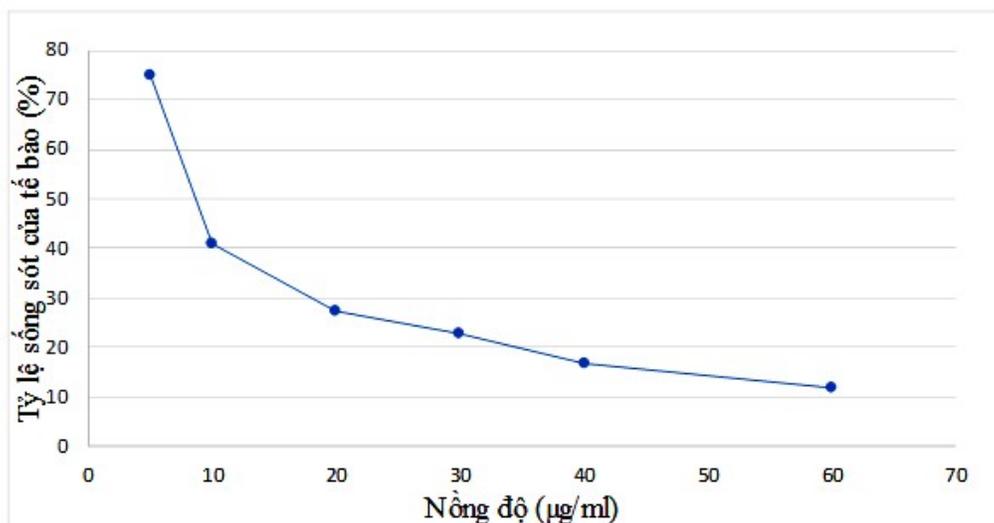
Anh hưởng của honokiol (Hon) lên sự sinh trưởng của tế bào A549 được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau như đã mô tả trong phần phương pháp. Sau 48 giờ ủ thuốc, tế bào được chụp ở kính hiển vi soi ngược Olympus với vật kính 20X. Kết quả được thể hiện trên hình 2.



**Hình 2.** Hình ảnh tế bào A549 sau 48h ủ chất honokiol: Đối chứng (2A), xử lý với nồng độ 10 µg/ml (2B) và 20 µg/ml (2C)

Kết quả của hình 2 cho thấy, chất Hon tác động lên sự phát triển và sinh trưởng của tế bào A549 khá rõ rệt. Ở cả 2 nồng độ 10 và 20 µg/ml, các tế bào đều có sự thay đổi, đặc biệt ở nồng độ 20 µg/ml hầu hết các tế bào đều co tròn, không còn khả năng sống. Để tiếp tục đánh giá

mức độ ảnh hưởng của Hon lên sự sinh trưởng của dòng tế bào A549, chúng tôi sử dụng phương pháp MTS để xác định giá trị IC<sub>50</sub> của hai hoạt chất này, kết quả được trình bày trong hình 3.

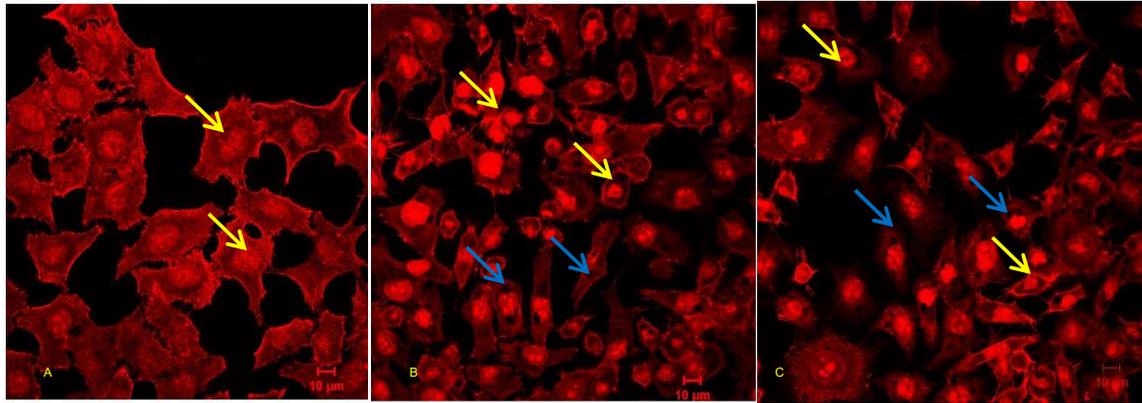


**Hình 3.** Khả năng sống sót của tế bào A549 sau khi xử lý hoạt chất Hon trong 48 giờ

Chúng tôi sử dụng thuật toán thống kê để xác định IC<sub>50</sub> của Hon. Kết quả thu được giá trị là 9,06 µg/ml (Hon). Kết quả này cho thấy rằng Hon có hoạt tính diệt tế bào ung thư A549 khá cao.

#### **Ảnh hưởng của honokiol lên hình thái tế bào, nhân tế bào**

Ảnh hưởng của Hon lên hình thái tế bào A549 được thử nghiệm ở các nồng độ 10 và 20 µg/ml trong 24 giờ. Kết quả được trình bày trong hình 4.



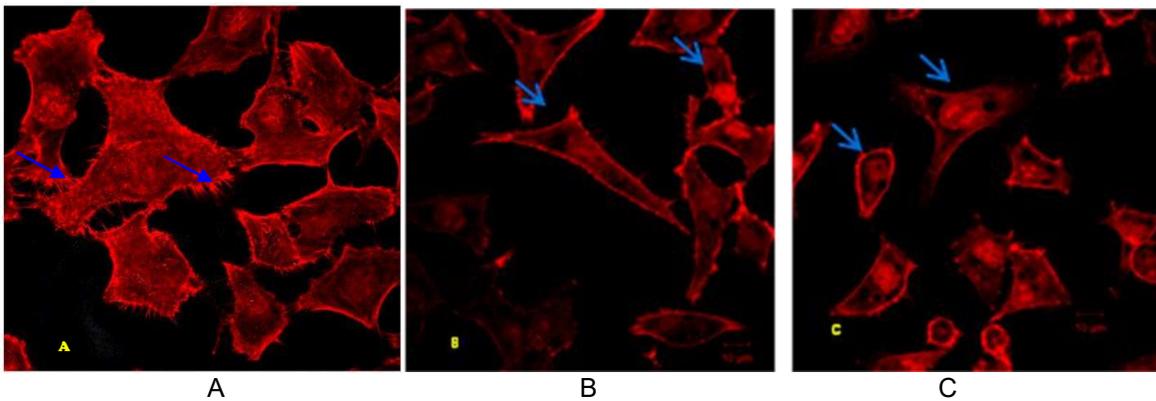
**Hình 4.** Hình ảnh huỳnh quang của tế bào A549 sau khi xử lý Hon tại 24 giờ.  
A: Mẫu đối chứng; B: Mẫu xử lý ở nồng độ 10 µg/ml; C: Mẫu xử lý ở nồng độ 20 µg/ml

Kết quả của hình 4 cho thấy sau 24 giờ xử lý hoạt chất Hon với nồng độ 10 và 20 µg/ml, hình dạng tế bào bị thay đổi hoàn toàn (các mũi tên chỉ màu xanh) (hình 4B và 4C), các tế bào co nhỏ, đặc biệt là hình dạng nhân tế bào co đặc lại (các mũi tên chỉ màu vàng) so với mẫu đối chứng (4A). Như vậy, có thể hoạt chất này đã có một sự tác động rất lớn đến các yếu tố

trong tế bào cũng như trong nhân dẫn đến sự thay đổi về hình dáng tế bào.

#### Ảnh hưởng của honokiol lên khung sợi actin

Sau 24 giờ xử lý tế bào A549 bởi các chất Hon ở nồng độ 10 và 20 µg/ml, ảnh hưởng của những chất này lên khung sợi actin được ghi lại trên hình 5.



**Hình 5.** Ảnh hưởng của Hon lên khung sợi actin của tế bào sau 24 giờ xử lý  
A: Mẫu đối chứng; B: Mẫu xử lý ở nồng độ 10 µg/ml; C: Mẫu xử lý ở nồng độ 20 µg/ml

Kết quả cho thấy, khung sợi actin của các tế bào xử lý Hon cũng bị thay đổi rõ rệt (hình 5B và 5C), các sợi actin không phát triển phân nhánh như các tế bào ở mẫu đối chứng (các mũi tên chỉ màu xanh) (hình 5A), đặc biệt là ở nồng độ 20 µg/ml (hình 5C). Do đó, ngoài sự thay đổi về hình dạng tế bào, hoạt chất Hon cũng có tác động lên khung actin của tế bào, kìm hãm sự phát triển của các sợi actin và có thể dẫn đến sự thay đổi hình dáng khung tế bào.

#### Bàn luận

Ở tế bào nhân thật, khung sợi actin đóng vai trò quan trọng trong việc điều tiết sự vận động và hình thái tế bào. Hệ khung sợi này chịu trách nhiệm trong nhiều hoạt động của tế bào như: Quá trình truyền tín hiệu, vận chuyển nội bào, quá trình bám dính và di chuyển của tế bào. Chính vì vậy, sự thay đổi cấu trúc khung sợi actin dẫn đến sự thay đổi về hình thái, khả năng di động và bám dính của tế bào chính là những

đặc điểm đặc trưng nhất của tế bào ung thư. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng động lực học và tổ chức lại các sợi actin được điều chỉnh bởi nhiều yếu tố như Rho GTPase, PAK (kinase kích hoạt p21), ROCKs, LIMKs và SSH1 [7]. Đồng thời, đã có những minh chứng cho thấy sự polymer hóa sợi actin dẫn đến sự di chuyển của tế bào ung thư [8]. Đây là lý do khiến cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của các chất lên khung sợi actin trở thành một trong những hướng nghiên cứu quan trọng trong việc tìm kiếm các chất tiêu diệt và cản trở sự di căn của tế bào ung thư [9].

Honokiol là hoạt chất được tách chiết từ loài *Magnolia officinalis*. Hoạt chất này đã được chứng minh là có hoạt tính ức chế sự phát triển, di căn của tế bào ung thư. Nhiều cơ chế phân tử của hoạt tính này cũng đã được đề cập tới như: Giảm tốc độ chuyển pha G0/G1 và G2/M thông qua việc kiểm soát cyclin-dependent kinase (CDK) và cyclin protein; ức chế chuyển dịch biểu mô - trung mô bằng cách ức chế biểu hiện các marker trung mô và tăng cường biểu hiện markers biểu mô; ức chế biểu hiện một số matrix - metalloproteinases (thông qua hoạt hóa chuỗi tín hiệu AMPK và KISS1/KISS1R); kích thích khả năng chống tăng sinh mạch (thông qua giảm biểu hiện VEGFR và VEGF).

Trong nghiên cứu này, kết quả thử độc tính cho thấy honokiol thể hiện khả năng ức chế rất mạnh tới sự sinh trưởng của tế bào A549 (IC<sub>50</sub> là 9,06 µg/ml). Đặc biệt, kết quả phân tích bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang cho thấy hình thái và nhân của các tế bào ung thư bị thay đổi hoàn toàn dưới tác động của hợp chất này. Điều này gợi ý cho chúng tôi có thể honokiol cũng có khả năng tác động tới hệ thống khung sợi của tế bào. Kết quả phân tích bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang trên hệ thống khung actin của tế bào đã khẳng định giả thuyết của chúng tôi khi hệ thống khung sợi này có sự suy giảm biểu hiện rõ rệt ở các tế bào ung thư được xử lý với honokiol. Như vậy, honokiol có khả năng ức chế sự phát triển của hệ thống khung sợi actin nhằm kìm hãm sự phát triển cũng như di căn của tế bào ung thư.

### Kết luận

Honokiol ức chế mạnh lên sự sinh trưởng của dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC<sub>50</sub> là 9,06 µg/ml. Tác động này có thể thông qua tác động của honokiol lên hình thái tế bào, đặc biệt là khung sợi actin. Kết quả này cũng giúp khẳng định thêm về tiềm năng của honokiol

trong cuộc chiến chống lại bệnh ung thư trên lâm sàng.

Nghiên cứu này được hoàn thành bởi sự trợ giúp kinh phí từ đề tài với mã số là 24/HĐ-K2ĐT của Bộ Y tế.

### Tài liệu tham khảo

1. Pollard T. D., Borisy G. G. (2003), "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments", *Cell.*, 112, pp. 453-465.
2. Jui-Lung Shen, Kee-Ming Man, Po-Hsun Huang, Wen-Chi Chen, Der-Cherng Chen, Ya-Wen Cheng, Po-Len Liu, Ming-Chih Chou and Yung-Hsiang Chen (2010), "Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders", *Molecules*, 15, pp. 6452-6465.
3. Bai X., Cerimele F., Ushio-Fukai et al. (2003), "Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo", *J. Bio. Chem.*, 278, pp. 35501-35507.
4. Ishitsuka K., Hideshima T., Hamasaki M. et al. (2005), "Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase - dependent and independent apoptosis", *Blood.* , 106, pp. 1794-1800.
5. Huang K. J., Kuo C. H., Chen S. H., Lin C. Y. & Lee Y. R. (2018), "Honokiol inhibits in vitro and in vivo growth of oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis, cell cycle arrest and autophagy", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22 (3), pp. 1894-1908.
6. You Q., Li M., Jiao G. (2009), "Magnolol induces apoptosis via activation of both mitochondrial and death receptor pathways in A375-S2 cells", *Arch. Pharm. Res.* , 32 (12), pp. 1789-1794.
7. Ma X., Dang Y., Shao X., Chen X., Wu F., Li Y. (2019), "Ubiquitination and long non-coding RNAs regulate actin cytoskeleton regulators in cancer progression", *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (12), pp. 2997. Published 2019 Jun 19. doi:10.3390/ijms20122997.
8. Michael F. Olson, Erik Sahai (2009), "The actin cytoskeleton in cancer cell motility", *Clin. Exp. Metastasis.*, 26, pp. 273-287.
9. Jordan M. A., Wilson L. (1998), "Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy", *Current Opinion in Cell Biology.*, 10, pp. 123-130.