

HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ A549 CỦA RỄ TỰ NHIÊN, RỄ TRỒNG 3 NĂM TUỔI TẠI TỈNH ĐỒNG NAI VÀ MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ XÁO TAM PHÂN (*PARAMIGNYA TRIMERA* (OLIV.) GUILLAUM)

Lê Thị Kim Anh¹, Võ Thị Kiều Quyên², Lê Phương Ngọc Anh¹,
Trần Thị Thúy Quỳnh³, Phạm Đông Phương⁴, Đỗ Thị Hồng Tươi^{5*}

¹Trung tâm Khoa học Công nghệ UMP, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Sở Y tế Thành phố Hồ Chí Minh

³Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Hội Dược học Thành phố Hồ Chí Minh

⁵Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Xáo tam phân đang được dùng điều trị ung thư phổi. Tuy nhiên, nghiên cứu về tác động kháng ung thư phổi của dược liệu còn hạn chế. Đề tài khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 *in vitro* của cao ethanol 96% từ rễ xáo tam phân trồng 3 năm tuổi so với rễ tự nhiên và một số chất phân lập từ dược liệu. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào A549 bằng test MTT sau 72 giờ xử lý tế bào và khảo sát sự biến đổi kiểu nhân tế bào bằng thuốc nhuộm nhân DAPI. Kết quả cho thấy cao ethanol 96% từ rễ xáo tam phân trồng 3 năm tuổi thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A549 sau 72 giờ xử lý yếu hơn loại tự nhiên với IC_{50} lần lượt là $43,48 \pm 1,85 \mu\text{g/ml}$ và $26,26 \pm 2,60 \mu\text{g/ml}$. Ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethyl-suberosin, citrucinin-I, oriciacridon phân lập từ xáo tam phân thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A549 với IC_{50} trong khoảng 67,71 - 96,19 μM . Nhân tế bào A549 không bị biến đổi khi xử lý với mẫu thử trong 48 giờ. Kết luận, cao ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi cùng một số chất phân lập từ dược liệu thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549.

Từ khoá: Xáo tam phân, ung thư phổi, hoạt tính độc tế bào, tế bào A549.

CYTOTOXICITY ACTIVITY AGAINST A549 NON-SMALL CELL IN LUNG CANCER CELLS OF NATURAL ROOTS, 3-YEARS CULTIVATED ROOTS FROM DONG NAI PROVINCE AND SOME COMPOUNDS ISOLATED FROM *PARAMIGNYA TRIMERA* (OLIV.) GUILLAUM

SUMMARY

Paramignya trimera (Oliv.) Guillaum has been used in the treatment of lung cancer. However, the studies on its effect against lung cancer have limited. The present work studied on

Chịu trách nhiệm: Đỗ Thị Hồng Tươi

Email: hongtuoi@ump.edu.vn

Ngày nhận: 24/10/2025

Ngày phản biện: 20/11/2025

Ngày duyệt bài: 08/12/2025

in vitro cytotoxic activity in A549 non-small cell lung cancer cells of 96% ethanol extracts from *P. trimera* roots cultivated (3 years old) compared to those of natural material and some compounds isolated from this medicinal plant. The cytotoxicity against A549 cells was evaluated using the MTT test after 72 hour treatment and the changes in nuclear morphology were detected by DAPI staining. The results showed 96% ethanol extract of 3-year-old cultivated roots of *P. trimera* exhibited a cytotoxicity in A549 cells after 72 hour treatment; this effect was lower than that of the nature material with IC_{50} values of $43.48 \pm 1.85 \mu\text{g/ml}$ and $26.26 \pm 2.60 \mu\text{g/ml}$, respectively. Ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethyl-suberosin, citrusicinin-I, oriciacridon isolated from *P. trimera* showed cytotoxicity in A549 cells with IC_{50} values ranging from 67.71 – 96.19 μM . Nuclear morphology of A549 cells did not change by the treatment with tested samples for 48 hours. In conclusion, 96% ethanol extracts from the roots of *P. trimera* collected naturally and 3-year-old cultivated as well as some compounds isolated from this medicinal plant showed a cytotoxicity against A549 non-small cell lung cancer cells.

Keywords: *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum, lung cancer, cytotoxicity, A549 cell.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới. Ung thư phổi được chia thành hai loại chính: ung thư phổi không tế bào nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ, trong đó khoảng 85% trường hợp mắc bệnh là ung thư phổi không tế bào nhỏ. Phương pháp điều trị thông thường chủ yếu bao gồm phẫu thuật, xạ trị, hóa trị liệu và liệu pháp miễn dịch, tuy nhiên tồn tại một số trở ngại trong việc điều trị. Các loại thuốc chống ung thư được sử dụng trước đây có độc tính tương đối cao không chỉ đối với các tế bào khối u mà còn đối với các tế bào bình thường kèm theo nhiều tác dụng không mong muốn và tình trạng đề kháng thuốc ngày một tăng [1].

Ở Việt Nam, xáo tam phân [*Paramygnia trimera* (Oliv.) Guillaum, Rutaceae] đang được người dân truyền miệng sử dụng điều trị một số loại ung thư, trong đó có ung thư phổi. Nghiên cứu trước đây báo cáo rễ xáo tam phân thể hiện tác động kháng viêm, giảm đau, bảo vệ gan và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro*, trong đó có hoạt tính ức chế ung thư phổi không tế bào nhỏ H460 [2-4]. Báo cáo hoạt tính độc tế bào ung thư của xáo tam

phân chủ yếu về hoạt tính của rễ thu hái từ tự nhiên và một số hợp chất chính phân lập từ dược liệu này như ostruthin, paratrimerin I. Trước tình hình nguồn dược liệu tự nhiên dần cạn kiệt, một số cơ sở ở tỉnh Đồng Nai, Thành phố Hồ Chí Minh đã trồng xáo tam phân và bán rễ xáo tam phân trồng 3 - 5 năm tuổi giúp làm giảm giá thành, chủ động nguồn cung cấp nguyên liệu.

Tuy nhiên, nghiên cứu về hoạt tính độc tế bào ung thư nói chung và ung thư phổi không tế bào nhỏ nói riêng của rễ xáo tam phân trồng so với nguyên liệu tự nhiên còn hạn chế. Do đó, đề tài này khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 của cao chiết ethanol 96% từ rễ xáo tam phân trồng 3 năm tuổi so với rễ tự nhiên cùng một số hợp chất phân lập từ dược liệu này như ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin, citrusicinin-I, oriciacridon và limonin; từ đó góp phần cung cấp cơ sở khoa học về khả năng sử dụng nguồn cây xáo tam phân hay các thành phần hợp chất để ứng dụng trong việc phát triển nghiên cứu phòng ngừa và/hoặc hỗ trợ điều trị ung thư phổi nói chung và ung thư phổi không tế bào nhỏ nói riêng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Mẫu thử

Cao chiết ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên thu hái tại Hòn Hèo, Khánh Hòa vào tháng 3/2015, được định danh bởi Võ Văn Chi và cộng sự; rễ xáo tam phân trồng (3 năm tuổi) được thu hái tại cơ sở trồng dược liệu Quang Minh, tỉnh Đồng Nai vào tháng 3/2017. Dược liệu được xay ở kích thước phù hợp, chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng với ethanol 96% theo tỷ lệ 1 kg:10 lít dung môi; thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để thu cao ethanol 96% toàn phần.

Hiệu suất chiết cao ethanol 96% toàn phần từ rễ xáo tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi lần lượt là 13,30% và 15,06%. Độ ẩm là $4,38 \pm 0,31\%$ và $9,47 \pm 0,25\%$; độ tro toàn phần là $2,09 \pm 0,18\%$ và $4,90 \pm 0,23\%$; độ tro không tan trong acid hydrochloric là $0,032 \pm 0,011\%$ và $0,028 \pm 0,017\%$.

Các hợp chất: ostruthin (520 mg), 8-methoxyostruthin (300 mg), demethylsuberosin (24 mg), citrusicin-I (25 mg), oriciacridon (10 mg) và limonin (24 mg) được phân lập từ 4,5 kg bột rễ xáo tam phân được chiết nóng với ethanol 96% và được lắcc phân bố với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat thu được các phân đoạn được kiểm tra độ tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng, phân tích phổ UV, MS, NMR để xác định cấu trúc bởi TS. Trần Thị Thúy Quỳnh và TS. Phạm Đồng Phương tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.2. Dòng tế bào

Dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 từ ATCC (American type culture collection, Hoa Kỳ), hoạt hóa và lưu tại Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược UMP, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.3. Hóa chất

Môi trường DMEM-F12 (Gibco, Hoa Kỳ), huyết thanh bào thai bê (Gibco, Hoa Kỳ), Penicillin - Streptomycin (Gibco, Hoa Kỳ), trypsin - EDTA (Gibco, Hoa Kỳ), dimethyl sulfoxid (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ), trypan blue (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ), đệm phosphat PBS (Gibco, Hoa Kỳ), L-glutamin (Gibco, Hoa Kỳ), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (Invitrogen, Hoa Kỳ), isopropanol (Merk, Đức), acid hydroclorid (Xilong, Trung Quốc), doxorubicin (Ebewe Pharma, Áo), ethanol 96% (Việt Nam), DAPI [2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride] (Thermo Fisher, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549

Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử được pha trong dimethyl sulfoxid (DMSO) thành dung dịch gốc nồng độ 10 mg/ml (cao chiết) hoặc 10 mM (hợp chất), bảo quản ở -20°C, rã đông và pha loãng trong môi trường nuôi cấy để đạt nồng độ khảo sát, lọc vô trùng qua màng lọc 0,22 μ m trước khi xử lý tế bào.

Nuôi cấy tế bào

Tế bào A549 được nuôi trong môi trường DMEM-F12, bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 IU/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin. Tế bào được nuôi trong bình nuôi cấy 75 cm², ủ ở 37°C, 5% CO₂. Khi tế bào đạt độ phủ khoảng 70 - 80%, loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, rửa tế bào với dung dịch PBS. Thêm trypsin-EDTA, ủ ở 37°C cho đến khi tế bào tách ra khỏi bề mặt bình nuôi cấy. Bổ sung môi trường và hút nhẹ nhàng bằng pipet lên xuống nhiều lần để tách riêng từng tế bào, thu huyền phù tế bào. Cấy chuyển sang bình nuôi cấy mới hoặc đếm số lượng, chia vào đĩa nuôi cấy 96 giếng để khảo sát hoạt tính độc tế bào của mẫu thử.

Xử lý tế bào

Tế bào A549 được chia vào các đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/giếng. Sau khi ủ tế bào 24 giờ ở 37°C, 5% CO₂, thay môi trường và xử lý tế bào với mẫu khảo sát ở các nồng độ khác nhau (6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg/ml đối với cao chiết và 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µM đối với hợp chất) trong 72 giờ. Dung dịch gốc của mẫu thử được pha loãng trong môi trường nuôi cấy để đạt nồng độ mong muốn, nồng độ cuối cùng của DMSO trong môi trường nuôi cấy là 0,5% (tt/tt) (nồng độ không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào). Tiến hành đồng thời với mẫu đối chứng dương doxorubicin ở các nồng độ 0,5 - 10 µM và mẫu chứng dung môi (xử lý tế bào A549 với môi trường nuôi cấy

chứa DMSO 0,5%). Quan sát tế bào mỗi ngày. Kết thúc thời gian xử lý, khảo sát khả năng ức chế tế bào thông qua tỷ lệ tế bào sống bằng test MTT [5].

Test MTT

Loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung môi trường không có huyết thanh chứa 0,5 mg/ml MTT, ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3 giờ. Loại bỏ môi trường có MTT, hòa tinh thể formazan trong 100 µl isopropanol acid hóa. Lắc rung 10 phút ở nhiệt độ phòng. Đo OD ở 570 nm trên máy đọc microplate (BioTek, Hoa Kỳ).

Mỗi điều kiện nuôi cấy (1 nồng độ của mẫu thử) được lặp lại với 3 giếng. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Tính tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào A549 theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế (\%)} \text{ so với mẫu chứng dung môi} = \frac{\text{OD}_{\text{mẫu chứng dung môi}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}}{\text{OD}_{\text{mẫu chứng dung môi}}} \times 100$$

Trong đó: OD_{mẫu chứng dung môi} và OD_{mẫu thử}: độ hấp thu của mẫu chứng dung môi và mẫu thử.

Xác định giá trị IC₅₀ của mẫu thử (nồng độ của mẫu thử có tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của tế bào là 50%) dựa trên phương trình hồi quy biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ và tỷ lệ ức chế bằng phần mềm GraphPad Prism 9 [5].

Trước khi tiến hành thí nghiệm nhuộm nhân tế bào bằng DAPI để khảo sát sự biến đổi kiểu nhân, xác định giá trị IC₅₀ của cao chiết ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi cùng 3 hợp chất gồm ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin ở các nồng độ khác nhau (6,25 - 300 µg/ml đối với cao chiết và 6,25 - 300 µM đối với hợp chất) sau 48 giờ xử lý tế bào với phương pháp thử tương tự.

2.2.2. Khảo sát sự biến đổi kiểu nhân của tế bào bằng thuốc nhuộm nhân DAPI

Tế bào A549 được nuôi cấy trong 96 giếng với mật độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/giếng. Sau khi ủ

tế bào qua đêm ở 37°C, 5% CO₂, thay môi trường và xử lý tế bào với cao chiết ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi cùng 3 hợp chất gồm ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin ở nồng độ IC₅₀ trong 48 giờ (được xác định trước khi tiến hành thí nghiệm nhuộm DAPI). Tiến hành đồng thời với mẫu đối chứng dương doxorubicin 2,5 µM và mẫu chứng dung môi (môi trường nuôi cấy chứa DMSO 0,1%). Sau 48 giờ, loại bỏ môi trường, cố định tế bào trên mặt giếng bằng paraformaldehyd 4% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Hút bỏ dịch, rửa giếng bằng 100 µl PBS. Bổ sung 100 µl PBS-Triton X-100 0,1% vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng 5 phút. Hút bỏ dịch và rửa giếng bằng 100 µl PBS. Bổ sung 30 µl dung dịch nhuộm nhân tế bào DAPI [2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride] ở nồng độ 10 µg/ml (tránh ánh sáng) vào mỗi giếng. Ủ đĩa 15 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch và rửa giếng bằng 100 µl PBS

3 lần. Quan sát và chụp hình mẫu tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang Olympus BX41 ở độ phóng đại 400 lần, kính lọc sắc dành cho kênh màu DAPI [6].

2.2.3. Khảo sát khả năng hoạt hóa quá trình apoptosis của tế bào A549

Tế bào A549 được nuôi cấy trong 96 giếng với mật độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/giếng. Sau khi ủ tế bào qua đêm ở 37°C, 5% CO₂, thay môi trường và xử lý tế bào với cao rễ tự nhiên và cao rễ trồng 3 năm tuổi và ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin ở nồng độ IC₅₀ trong 48 giờ. Tiến hành đồng thời với mẫu đối chứng dương doxorubicin 2,5 μM và mẫu chứng dung môi (môi trường chứa DMSO 0,1%).

Sau 48 giờ ủ ở 37°C, 5% CO₂, loại môi trường, cố định tế bào trên mặt giếng bằng paraformaldehyd 4% trong 10 phút ở nhiệt độ

phòng. Hút bỏ dịch, rửa giếng bằng 100 μl PBS. Bổ sung 100 μl PBS-Triton X-100 0,1% vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng 5 phút. Hút bỏ dịch và rửa giếng bằng 100 μl PBS. Bổ sung 30 μl dung dịch khóa giếng FBS 10%. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Hút bỏ dịch. Bổ sung 30 μl dung dịch kháng thể sơ cấp kháng caspase 3 hoạt hóa tỉ lệ 1:200 (tt/tt) (Cell signaling Technology, Hoa Kỳ). Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dịch và rửa giếng bằng 100 μl PBS 3 lần. Bổ sung 30 μl dung dịch kháng thể thứ cấp tỉ lệ 1:500 (tt/tt) (tránh ánh sáng) (Invitrogen, Hoa Kỳ) có bổ sung DAPI 10 μg/ml. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 giờ. Loại bỏ dịch và rửa giếng bằng 100 μl PBS 3 lần. Quan sát và chụp hình tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 400 lần.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu

3.1.1. Hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549

Kết quả hoạt tính độc tế bào của các mẫu thử được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Kết quả hoạt tính độc tế bào của cao rễ 96% từ rễ xáo tam phân (XTP) tự nhiên và trồng 3 năm tuổi

Mẫu thử	DMSO 0,5%	100 μg/ml	50 μg/ml	25 μg/ml	12,5 μg/ml	6,25 μg/ml
OD_{570 nm} ± SD						
Cao ethanol 96% từ rễ XTP tự nhiên	0,650 ± 0,031	0,048 ± 0,002	0,127 ± 0,004	0,353 ± 0,012	0,471 ± 0,055	0,552 ± 0,030
Cao ethanol 96% từ rễ XTP trồng 3 năm tuổi	0,588 ± 0,010	0,126 ± 0,006	0,259 ± 0,002	0,411 ± 0,017	0,512 ± 0,006	0,558 ± 0,017
Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng (%) ± SD						
Cao ethanol 96% từ rễ XTP tự nhiên		92,66 ± 0,18	80,37 ± 1,38	45,52 ± 3,94	27,22 ± 11,32	15,10 ± 0,67
Cao ethanol 96% từ rễ XTP trồng 3 năm tuổi		78,62 ± 1,24	55,89 ± 0,81	30,12 ± 3,82	12,86 ± 0,89	5,03 ± 3,08

Bảng 2. Kết quả khảo sát hoạt tính độc tế bào A549 của một số hợp chất phân lập từ xác tam phân

Mẫu thử	DMSO 0,5%	100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M
OD_{570 nm} \pm SD						
<i>Ostruthin</i>	0,618 \pm 0,018	0,087 \pm 0,006	0,390 \pm 0,006	0,627 \pm 0,005	0,667 \pm 0,020	0,648 \pm 0,049
<i>8-methoxyostruthin</i>	0,571 \pm 0,010	0,191 \pm 0,013	0,404 \pm 0,010	0,559 \pm 0,032	0,544 \pm 0,041	0,597 \pm 0,021
<i>Citruscinin-I</i>	0,597 \pm 0,012	0,213 \pm 0,024	0,463 \pm 0,018	0,535 \pm 0,024	0,536 \pm 0,016	0,595 \pm 0,012
<i>Oriciacridon</i>	0,618 \pm 0,026	0,057 \pm 0,001	0,521 \pm 0,015	0,647 \pm 0,009	0,631 \pm 0,028	0,633 \pm 0,030
<i>Demethylsuberosin</i>	0,592 \pm 0,006	0,279 \pm 0,007	0,465 \pm 0,018	0,563 \pm 0,023	0,547 \pm 0,010	0,591 \pm 0,017
<i>Limonin</i>	0,582 \pm 0,005	0,605 \pm 0,035	0,587 \pm 0,025	0,565 \pm 0,001	0,529 \pm 0,034	0,529 \pm 0,011
Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng (%) \pm SD						
<i>Ostruthin</i>		85,98 \pm 0,92	36,94 \pm 2,19	-1,46 \pm 3,02	-7,93 \pm 0,83	-4,95 \pm 10,94
<i>8-methoxyostruthin</i>		66,44 \pm 2,83	29,18 \pm 2,43	1,96 \pm 7,25	4,63 \pm 8,97	-4,59 \pm 4,46
<i>Citruscinin-I</i>		64,28 \pm 4,67	22,56 \pm 1,50	10,41 \pm 4,24	10,17 \pm 3,78	0,35 \pm 3,53
<i>Oriciacridon</i>		90,76 \pm 0,44	15,67 \pm 1,24	-4,91 \pm 5,87	-2,21 \pm 1,68	-2,72 \pm 8,88
<i>Demethylsuberosin</i>		52,84 \pm 1,37	21,37 \pm 2,24	4,92 \pm 2,88	7,60 \pm 1,60	0,05 \pm 3,02
<i>Limonin</i>		-3,93 \pm 5,39	-0,86 \pm 4,04	2,92 \pm 0,73	9,14 \pm 5,07	9,05 \pm 1,83

Sau 72 giờ xử lý tế bào, cao ethanol 96% từ rễ xác tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi A549 tỷ lệ thuận với nồng độ. IC₅₀ của cao ethanol 96% từ rễ xác tam phân tự nhiên và trồng lần lượt là 26,26 \pm 2,60 μ g/ml và 43,48 \pm 1,85 μ g/ml. Kết quả cho thấy cao rễ xác tam phân trồng 3 năm tuổi thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi yếu hơn rễ tự nhiên (IC₅₀ cao hơn 1,66 lần).

Hoạt tính độc tế bào ung thư phổi A549 của hợp chất phân lập từ xác tam

phân gồm ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin, citruscinin-I, oriciacridon và limonin được trình bày ở bảng 2.

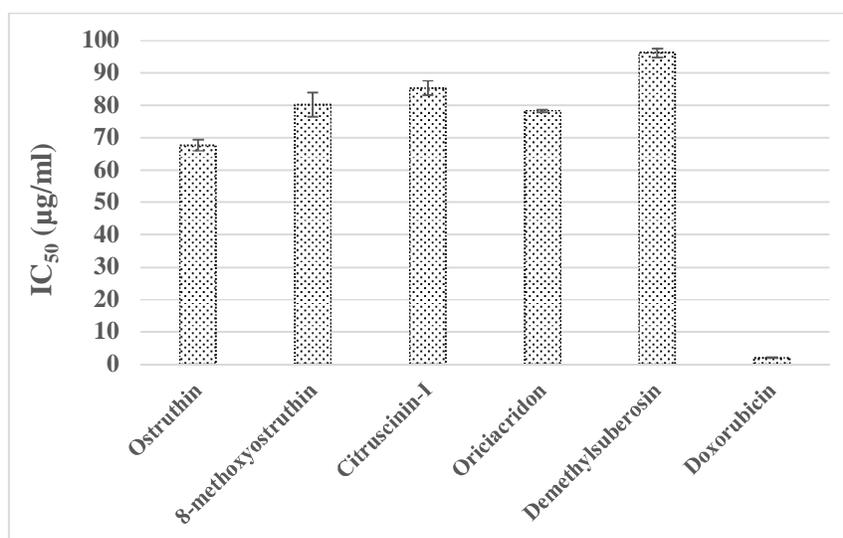
Các hợp chất phân lập từ xác tam phân thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 sau 72 giờ xử lý, làm giảm 50 - 90% tỷ lệ tế bào sống ở nồng độ khảo sát cao nhất (100 μ M) so với mẫu chứng (môi trường nuôi cấy có DMSO 0,5%) và tương tự đối chứng doxorubicin 10 μ M (tỷ lệ tế bào sống giảm 81,83%, bảng 3), ngoại trừ limonin không thể hiện rõ hoạt tính độc tế bào A549.

Bảng 3. Kết quả hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 của doxorubicin

Mẫu chứng	10 μ M	5 μ M	2,5 μ M	1 μ M	0,5 μ M
OD_{570nm} \pm SD					
0,708 \pm 0,005	0,129 \pm 0,003	0,256 \pm 0,027	0,330 \pm 0,012	0,397 \pm 0,009	0,426 \pm 0,029
Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng (%) \pm SD					
	81,83 \pm 0,44	63,82 \pm 3,63	53,36 \pm 2,03	43,99 \pm 1,51	39,90 \pm 4,22

Kết quả cho thấy trong các hợp chất phân lập từ xáo tam phân, ostruthin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A549 tốt hơn so với các hợp chất còn lại. Giá trị IC₅₀ của ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin, citrusicinin-I, oriciacridon

lần lượt là 67,71 \pm 1,74 μ M; 80,20 \pm 3,75 μ M; 96,19 \pm 1,44 μ M; 85,40 \pm 2,22 μ M và 78,32 \pm 0,44 μ M so với đối chứng dương doxorubicin là 2,08 \pm 0,16 μ M. Kết quả cho thấy giá trị IC₅₀ của mẫu đối chứng dương doxorubicin là 2,08 \pm 0,16 μ M.

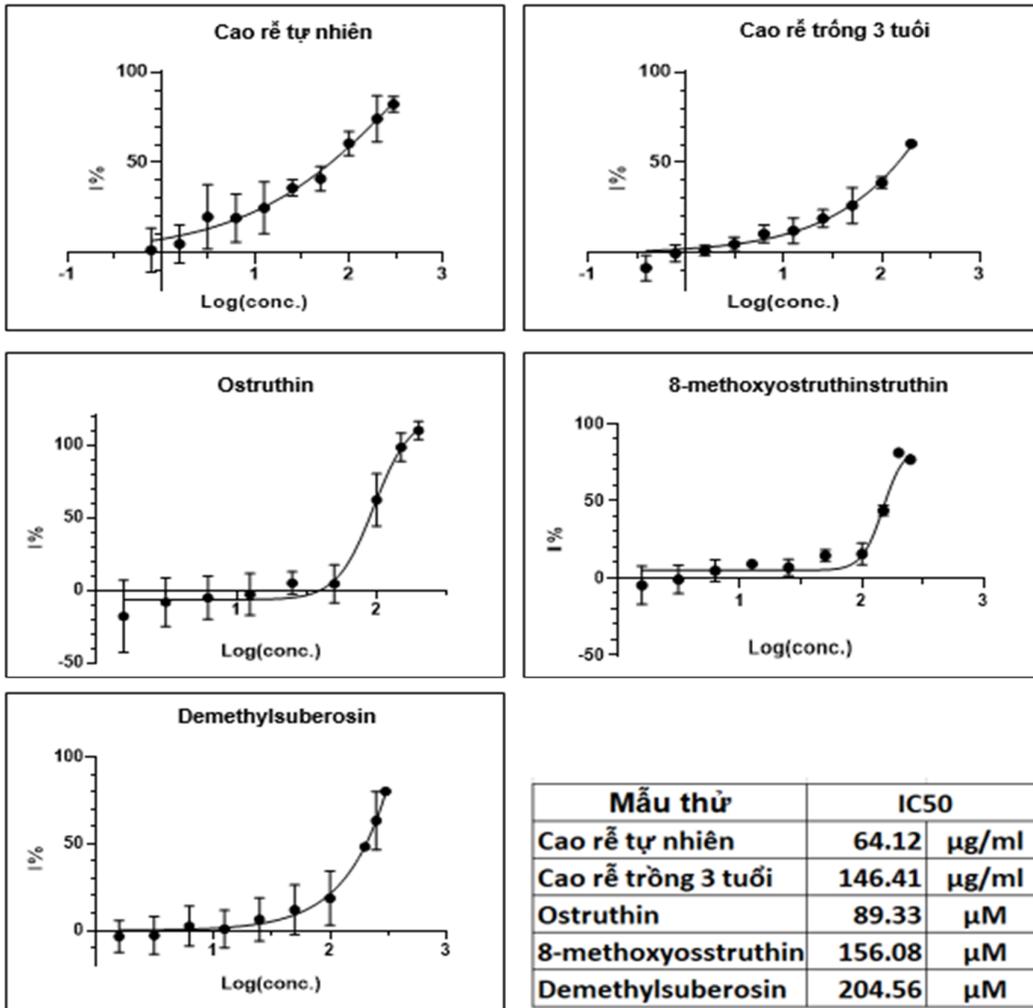


Hình 1. Giá trị IC₅₀ của các hợp chất phân lập từ xáo tam phân và đối chứng doxorubicin

Tác động của cao chiết ethanol 96% của rễ xáo tam phân tự nhiên và rễ trồng 3 năm tuổi và các hợp chất lên kiểu nhân của tế bào A549 trước khi tiến hành nhuộm nhân tế bào bằng

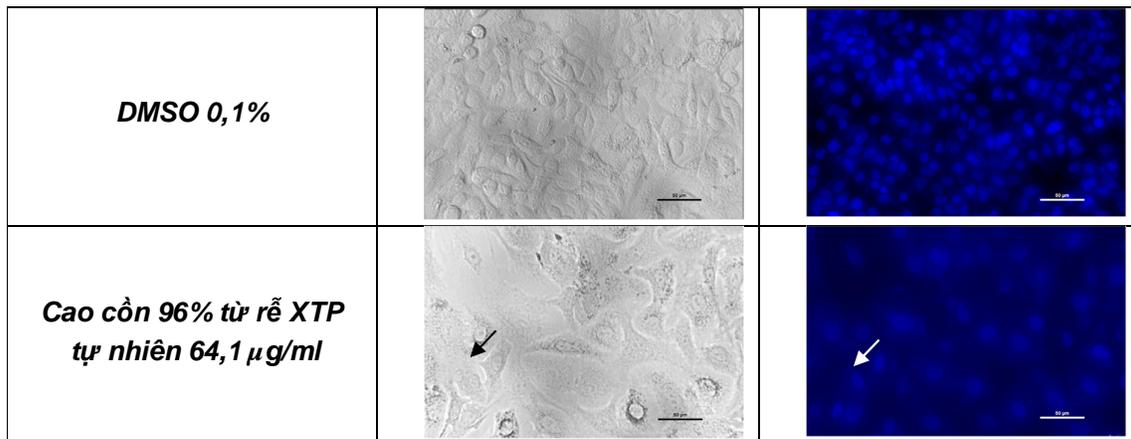
thuốc thử DAPI.

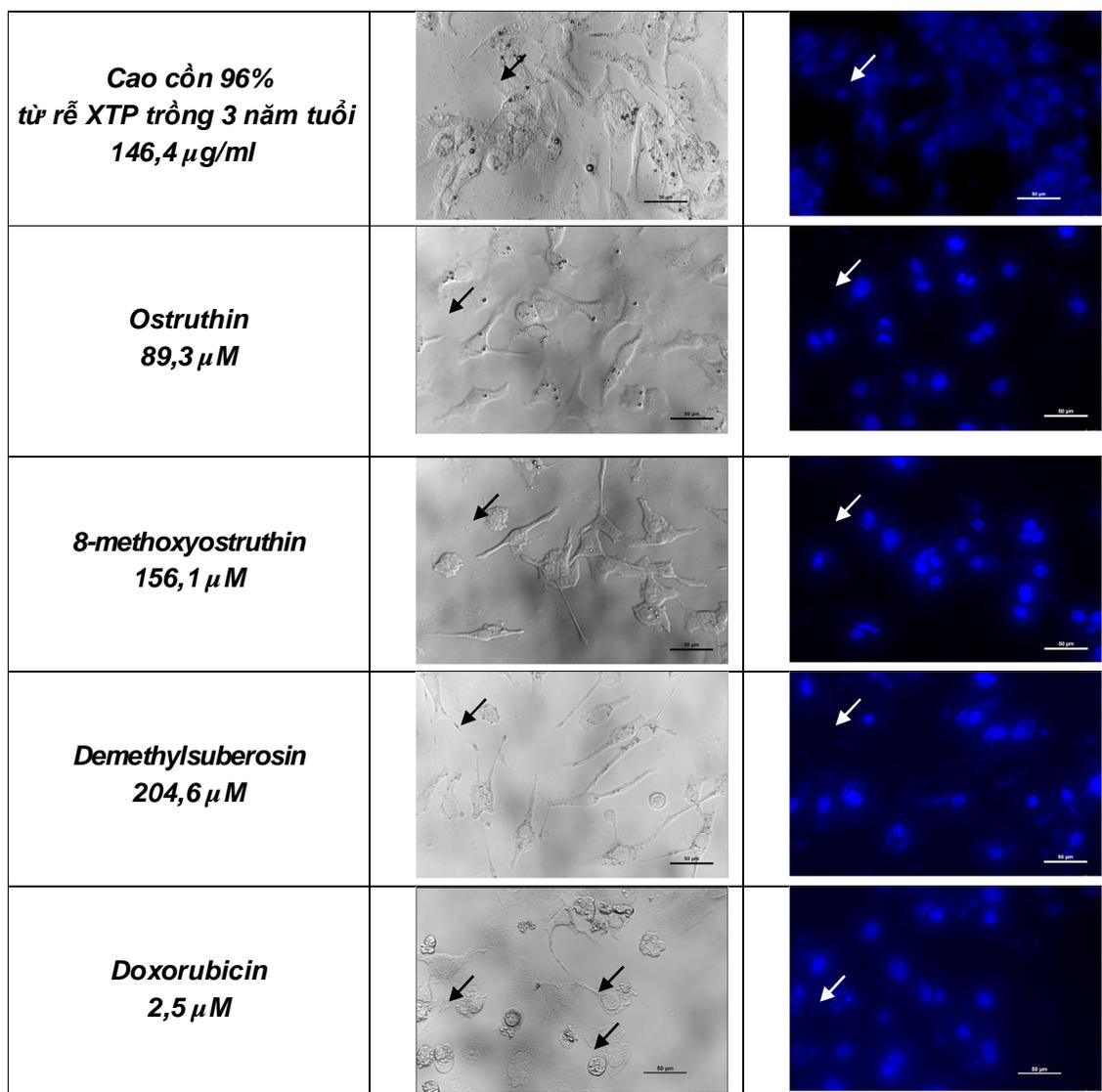
Tác động ức chế tăng trưởng tế bào A549 và giá trị IC₅₀ của mẫu thử sau 48 giờ được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả xác định IC₅₀ của các mẫu thử sau 48 giờ xử lý tế bào

Khảo sát ảnh hưởng của các mẫu thử lên kiểu nhân tế bào A549.



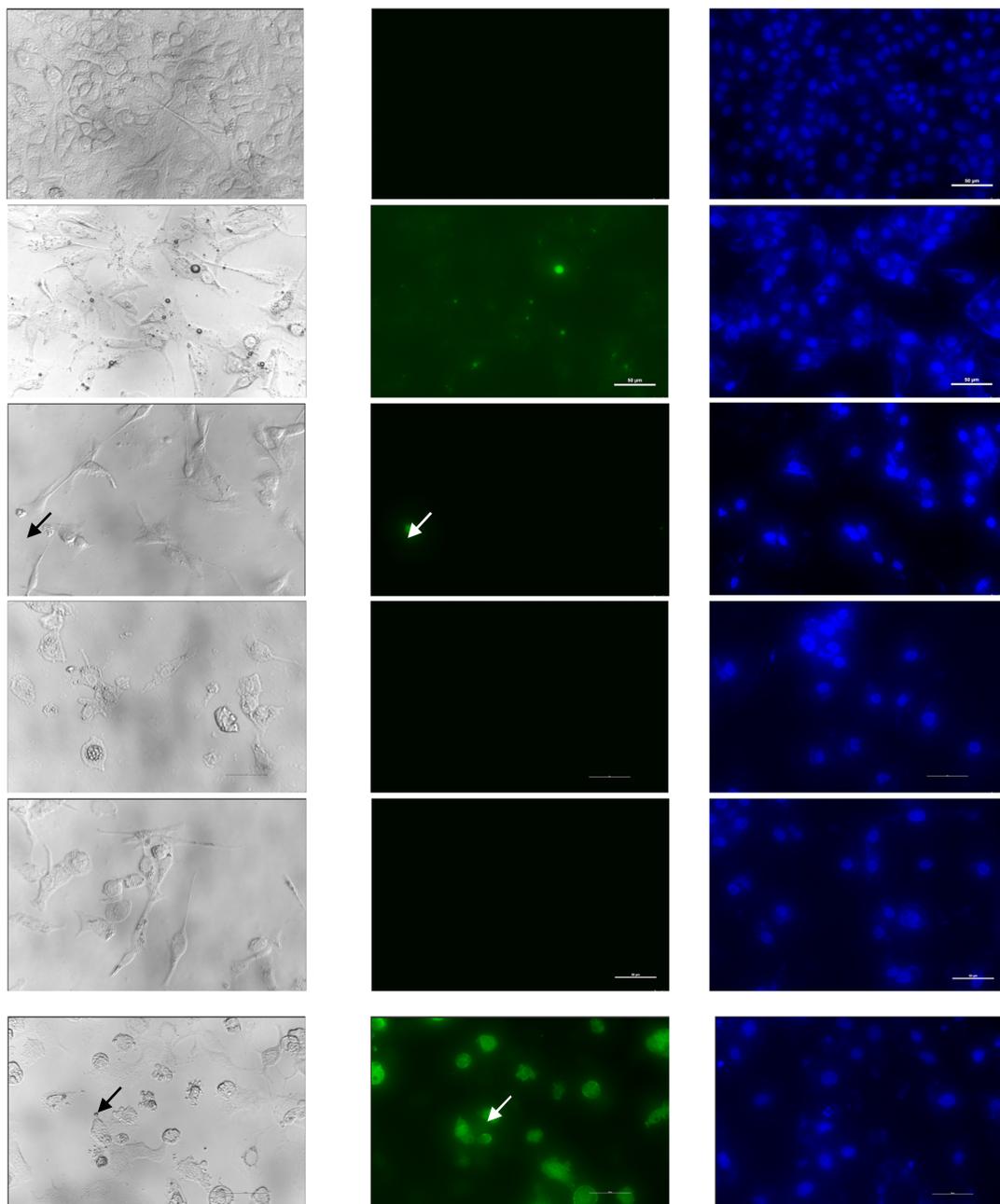


Hình 3. Hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang (trái: ánh sáng trắng, phải: kính lọc sắc dành cho DAPI; mũi tên chỉ tế bào bị biến đổi kiểu nhân)

Do lượng mẫu của hợp chất citrucinin-I và oriciacridon phân lập được ít nên không đủ để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo nên đề tài chỉ khảo sát đối với 2 cao và 3 chất ostruthin, 8-methoxyostruthin và demethylsuberosin. Tế bào được xử lý trong 48 giờ với mẫu thử ở nồng độ tương ứng IC_{50} , sau đó nhuộm nhân tế bào bằng DAPI. Những biến đổi về kiểu nhân tế bào được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh

quang (hình 3). Kết quả cho thấy kiểu nhân tế bào A549 biến đổi khi xử lý với cao rễ xáo tam phân và ostruthin. Đối với các mẫu thử khảo sát, một số tế bào bị chết, màng tế bào bị vỡ, giải phóng các thành phần bên trong tế bào ra trên nền đĩa nuôi trong khi với mẫu đối chứng dương doxorubicin, tế bào co tròn, màng tế bào nhăn, tế bào bị phân thành các thể bóng, có hiện tượng phân mảnh nhân tế bào.

3.1.2. Khả năng hoạt hóa quá trình apoptosis của tế bào A549



Hình 4. Hình ảnh tế bào ung thư phổi A549 dưới kính hiển vi huỳnh quang
Trái: ánh sáng trắng;
Giữa: huỳnh quang caspase 3;
Phải: huỳnh quang DAPI;
Mũi tên chỉ tế bào thay đổi hình thái

Hình ảnh quan sát tế bào A549 dưới kính hiển vi huỳnh quang được trình bày tại hình 4. Kết quả cho thấy mẫu cao rễ xáo tam phân và ostruthin làm thay đổi hình thái tế bào A549 theo hướng hoạt hóa quá trình chết theo chương trình (apoptosis) tương tự đối chứng doxorubicin, cụ thể: tế bào co tròn, màng tế bào nhăn, tế bào bị phân thành các thể bóng, có hiện tượng phân mảnh nhân tế bào; tuy nhiên, khả năng hoạt hóa apoptosis của các mẫu thử yếu hơn doxorubicin (doxorubicin > cao rễ xáo tam phân > ostruthin). Mẫu thử 8-methoxyostruthin và demethylsuberosin chưa thể hiện rõ tác động hoạt hóa quá trình apoptosis (không quan sát thấy hiện tượng thay đổi hình thái tế bào theo hướng biểu hiện đặc trưng của tế bào apoptosis).

3.2. Bàn luận

Kết quả thu được cho thấy các cao chiết ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên cũng như trồng 3 năm tuổi thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A459 sau 72 giờ xử lý với giá trị IC_{50} lần lượt là $26,26 \pm 2,60 \mu\text{g/ml}$ và $43,48 \pm 1,85 \mu\text{g/ml}$. Kết quả này phù hợp với báo cáo trước đây của Nguyễn Văn Tăng và cộng sự (2017) cho thấy cao chiết methanol từ rễ cây xáo tam phân tự nhiên thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ người H460 với giá trị GI_{50} trong khoảng 15 - 32 $\mu\text{g/ml}$ ^[7]. Hoạt tính độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ LU-1 của phân tử nano vàng sử dụng cao nước từ rễ xáo tam phân làm tác nhân khử và ổn định đã được nhóm nghiên cứu của Lê Tự Hải và cộng sự (2024) báo cáo với IC_{50} là 3,99 sau 72 xử lý tế bào^[8]. Báo cáo này lần đầu so sánh hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 của cao ethanol 96% từ rễ xáo tam phân trồng 3 năm tuổi với loại tự nhiên. Kết quả gợi ý dù hoạt tính độc tế bào ung thư

phổi của loại trồng 3 năm tuổi yếu hơn loại tự nhiên (IC_{50} cao hơn 1,66 lần) nhưng có thể xem xét, sử dụng thay thế nguồn rễ tự nhiên ngày càng cạn kiệt với ưu điểm giá thành rẻ và chủ động được nguồn cung cấp nguyên liệu.

Theo báo cáo của Nguyễn Văn Tăng và cộng sự (2017), xáo tam phân chứa các hợp chất thuộc nhóm phenolic, flavonoid và proanthocyanidin, đặc biệt là các hợp chất nhóm coumarin. Những nhóm chất này và dẫn xuất của chúng được báo cáo các hoạt tính sinh học như chống đông máu, kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, kháng vi rút..., được ứng dụng trong phòng ngừa, điều trị và/hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về thần kinh, tim mạch, ung thư và một số bệnh khác^[7]. Kết quả từ đề tài về hoạt tính độc tế bào ung thư phổi của ostruthin – hợp chất chính được phân lập từ xáo tam phân phù hợp với các báo cáo trước đây. Ostruthin được báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ H460 với tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào trên 100% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ và GI_{50} là $30 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$ ^[7]. Theo Võ Trọng Nghĩa (2021), ostruthin làm giảm tỷ lệ sống của tế bào A549 sau 7 giờ xử lý tế bào với IC_{50} là $83,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ và $63,4 \pm 3,1 \mu\text{M}$ khi khảo sát tỷ lệ tế bào sống bằng phương pháp MTT và phương pháp nhuộm tế bào với tím tinh thể^[9]. Hạt nano vàng tổng hợp từ ostruthin đã được Trần Nguyễn Minh An và cộng sự (2020) báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ (NCI-H460) tỷ lệ thuận theo nồng độ mẫu thử với giá trị IC_{50} là 106,83 μM sau thời gian xử lý tế bào trong 48 giờ^[10].

Kết quả hoạt tính độc tế bào ung thư phổi A549 của các hợp chất ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin, citrucinin-I và oriciacridon cho thấy các hợp

chất khác nhau có thể cùng góp phần vào hoạt tính độc tế bào ung thư phổi của xáo tam phân thông qua nhiều cơ chế khác nhau như hoạt hóa quá trình apoptosis tế bào A549 của ostruthin và hiện tượng hoại tử tế bào của các hợp chất khảo sát.

Trịnh Hoàng Dương và cộng sự (2016) báo cáo về xáo tam phân chứa 7-hydroxycoumarin^[3]. Theo Maribel Soto-Núñez và cộng sự (2015), việc xử lý tế bào với 7-hydroxycoumarin ở nồng độ 100 µg/ml trong 4 giờ làm tăng 83% biểu hiện của caspase 3 trên dòng tế bào ung thư biểu mô phổi không tế bào nhỏ A549 so với mẫu chứng âm (xử lý tế bào với dung môi)^[11]. Khi xử lý tế bào A549 với 7-hydroxycoumarin ở nồng độ 1,85 mM trong 24 giờ làm tăng 65% hoạt tính của caspase 3, procaspase-3 được chuyển thành C-3 và poly(ADP-ribose) polymerase bị phân cắt kèm theo sự biến đổi hình thái của tế bào liên quan đến quá trình chết theo chương trình (apoptosis) diễn ra sau khi caspase 3 được hoạt hóa một vài giờ. Độ dẫn calci của tế bào A549 tăng 27% sau khi được xử lý với 7-hydroxy-coumarin trong 3 - 6 giờ. Kết quả gợi ý hoạt tính độc tế bào ung thư phổi của cao rễ xáo tam phân có thể thông qua cơ chế hoạt hóa quá trình apoptosis của tế bào ung thư phổi^[12].

4. KẾT LUẬN

Cao ethanol 96% từ rễ xáo tam phân tự nhiên và trồng 3 năm tuổi thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ A549 *in vitro*, trong đó cao chiết từ nguồn tự nhiên thể hiện hoạt tính mạnh hơn nguồn trồng 3 năm tuổi. Một số chất phân lập từ dược liệu này như ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethyl-suberosin, citrusicinin-I và oriciacridon thể hiện hoạt tính độc tế bào A549; trong đó ostruthin có thể hoạt hóa quá trình apoptosis bên cạnh cơ chế gây hoại tử tế bào tương tự các chất khác.

Các kết quả này cung cấp cơ sở khoa học về khả năng hoạt tính gây độc trên tế bào ung thư phổi A459 của bộ phận rễ từ cây xáo tam phân nuôi trồng và các hợp chất phân lập. Từ đó, gợi ý việc chủ động thay thế sử dụng nguồn cây nuôi trồng và chiết xuất các thành phần hợp chất có hoạt tính trong điều kiện thiếu nguồn nguyên liệu tự nhiên để nghiên cứu ứng dụng điều trị ung thư phổi.

* Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài theo Hợp đồng số 50/2023/HĐ-ĐHYD ngày 20/3/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wen T., Song L. A. - O. X., Hua S. (2021), "Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer", *Cancer Medicine*, pp. 2045 - 7634.

<https://doi.org/10.1002/cam4.3660>.

2. Nguyễn Mạnh Cường, Trần Thu Hương, Phạm Ngọc Khanh, Ninh Thế Sơn, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Thảo (2016), "Tác dụng bảo vệ gan của rễ cây xáo tam phân (*Paramygnia trimera*) trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan bằng paracetamol", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 54(1), tr. 37 - 45.

3. Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly, Nguyễn Thụy Vy, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Diệu Liên Hoa (2016), "Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây xáo tam phân *Paramygnia trimera*", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 32(4), tr. 115 - 123.

4. Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Đỗ Thị Phương (2013), "Nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng bảo vệ gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư của xáo tam phân", *Tạp chí Dược liệu*, 18(1), tr. 14 - 20.

5. Trần Thị Thúy Quỳnh, Nguyễn Hồng Hạnh, Phan Thị Giang Thủy, Phạm Đông Phương, Đỗ Thị Hồng Tươi (2023), "Khảo sát

hoạt tính chống oxy hóa và độc tế bào ung thư gan người HepG2 *in vitro* của các phân đoạn từ rễ, thân xáo tam phân [*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill]”, *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, 56, tr. 1 - 8.

<https://doi.org/10.58490/ctump.2023i56.492>.

6. Thi Thanh Huong Le, Mai Quynh Nguyen, Van Phuong Nguyen, Van Hung Hoang, Phu Hung Nguyen (2023), “Methanol extract of *Ficus pumila* L. inhibits proliferation, induces apoptosis and arrests the cell cycle in HepG2 liver cancer cells”, *Asian Journal of Plant Sciences*, 22, pp. 423 - 433.

DOI: 10.3923/ajps.2023.423.433;

<https://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2023.423.433>

7. Nguyen V. T., Sakoff J. A., Scarlett C. J. (2017), “Physicochemical, antioxidant, and cytotoxic properties of xao tam phan (*Paramignya trimera*) root extract and its fractions”, *Chemistry & Biodiversity*, 14(4).

8. Le Tu Hai, Thi Nguyen Lan Anh, Thi Tran Ngoc Bich, Nguyen Din Van, Vu Duyen Thi, Doan Duong Van, Luong Tinh Thanh, Pham Vuong Van (2024), “Biosynthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Paramignya trimera* roots and its anticancer activity”, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 20(2), pp. 330 - 340.

9. Vo N. T., Kusagawa E., Nakano K., Moriwaki C., Miyake Y., Haruyama S., Fukuhara S., Nguyen N. T., Dang P. H., Nguyen M. T. T., Kataoka T. (2021),

“Biological evaluation of alkyl triphenylphosphonium ostruthin derivatives as potential anti-inflammatory agents targeting the nuclear factor κ B signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells”, *Bio. Chem.*, 1(2), pp. 107 - 121. <https://doi.org/10.3390/biochem102001>.

10. An T. N., Nguyen V., Quang N., Dinh T., Mahboob A. (2020), “Gold nanoparticles from ostruthin: Green synthesis, a stable mechanism, antitumor, and antibacterial activity”, *Revista de Chimie*, 71, pp. 220 - 232.

11. Soto-Núñez M., Díaz-Morales K. A., Cautle-Rodríguez P., Torres-Flores V., López-González J. S., Mandoki-Weitzner J. J., Molina-Guarneros J. A. (2015), “Single-cell microinjection assay indicates that 7-hydroxycoumarin induces rapid activation of caspase-3 in A549 cancer cells”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(5), pp. 1789 - 1795.

DOI: 10.3892/etm.2015.2765.

12. Soto-Núñez M., Díaz-Morales K. A., Cautle-Rodríguez P., Torres-Flores V., López-González J. S., Witzner J. J. M., Molina-Guarneros J. A. (2023), “7-hydroxycoumarin exposure induces prompt activation of caspase-3 in A-549 cancer cells through single cell microinjection”, *Current Overview on Pharmaceutical Science*, vol. 7, pp. 47 - 64. <https://doi.org/10.9734/b>.