

KHẢO SÁT ĐỘC TÍNH VÀ KHẢ NĂNG BẢO VỆ GAN CỦA CAO CHIẾT METHANOL LÁ MỘT SỐ THỰC VẬT TRÊN DÒNG TẾ BÀO HEPG2

• Trần Thanh Mến^(*), Nguyễn Đình Hải Yến^(*), Đái Thị Xuân Trang^(*)

Tóm tắt

Nghiên cứu tập trung vào việc khảo sát khả năng bảo vệ gan của các cao chiết methanol lá cây Vọng cách (*Premna serratifolia* L.), lá Mơ lông (*Paederia lanuginosa*) và lá Mơ leo (*Paederia scandens*) trên dòng tế bào HepG2. Các thí nghiệm đánh giá độc tính và khả năng bảo vệ gan chống lại sự tổn thương do CCl_4 gây ra của các cao chiết được thực hiện bằng phương pháp xác định mật số tế bào sống sử dụng bộ Kit CCK8. Dòng tế bào gan HepG2 được gây tổn thương bởi CCl_4 (1%) và được bổ sung cao methanol lá cây Vọng cách, lá mơ Mơ lông và lá Mơ leo. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các cao chiết không gây độc tính cho tế bào HepG2 ở nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$. Bên cạnh đó, thí nghiệm còn chứng minh cao chiết methanol lá Vọng cách và lá Mơ lông có hiệu quả trong việc bảo vệ tế bào gan kháng lại độc tính gây ra bởi CCl_4 trên dòng tế bào HepG2.

Từ khóa: Bảo vệ gan, HepG2, *Premna serratifolia* L., *Paederia lanuginosa*, *Paederia scandens*.

1. Đặt vấn đề

Gan là cơ quan nội tạng to nhất trong cơ thể người và thực hiện chức năng chuyển hóa các chất, tiết mật, giải độc và nhiều chức năng quan trọng khác. Có nhiều nguyên nhân làm gan bị tổn thương như ô nhiễm môi trường, lạm dụng thuốc, ăn uống không điều độ, căng thẳng (stress), tiêu thụ quá nhiều rượu bia... Những tác động này làm gan hoạt động quá mức hoặc làm suy yếu chức năng dẫn đến việc tạo ra lượng lớn các gốc tự do, đây cũng là nguyên nhân của nhiều bệnh như bệnh đái tháo đường, Parkinson, bệnh ung thư, nhồi máu cơ tim, viêm loét dạ dày [2]. Vì vậy, việc tìm ra thuốc có hiệu quả trong việc bảo vệ gan mà không gây ra tác dụng phụ là vấn đề đang được các nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu. Theo thống kê có khoảng 80% dân số trên thế giới đang được chữa trị bằng phương pháp y học cổ truyền là chủ yếu, đặc biệt là các loại thuốc được sản xuất từ các chất chiết từ thực vật [8]. Ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, các loài thực vật như Vọng cách (*Premna serratifolia* L.), Mơ lông (*Paederia lanuginosa*) và Mơ leo (*Paederia scandens*) từ lâu đã được biết và sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc chữa các bệnh về tiêu hóa và một số bệnh về gan [1]. Tuy nhiên, chưa có nhiều bằng chứng khoa học chứng minh cho các tác dụng chữa bệnh trên. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu khảo sát độc tính và khả năng bảo vệ gan chống lại sự tổn

thương do CCl_4 gây ra của các cao chiết methanol lá cây Vọng cách, lá Mơ lông và lá Mơ leo.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Mẫu nghiên cứu: lá cây Vọng cách (*Premna serratifolia* L.), lá Mơ lông (*Paederia lanuginosa*) và lá Mơ leo (*Paederia scandens*); mẫu được thu vào tháng 6 năm 2016 tại thành phố Cần Thơ; các mẫu này được ThS. Nguyễn Kim Đua (Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học tự nhiên - Trường Đại học Cần Thơ) định danh tên loài thông qua hình thái thực vật theo bộ sách của Phạm Hoàng Hộ năm 2006 [7]. Mẫu lá sau đó được rửa sạch, cắt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến khi khối lượng không đổi, mẫu vật được ngâm dầm 48 giờ trong methanol. Dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn và được cô quay loại bỏ dung môi, thu được cao chiết tổng của mẫu vật.

Dòng tế bào ung thư gan người HepG2 (Human hepatocellular carcinoma) sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi viện Công Nghệ Kyoto, Nhật Bản. Tế bào HepG2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) có bổ sung thêm 10% FBS, 5% streptomycin và penicillin (1:1, v/v). Tế bào được nuôi trong điều kiện 37°C và 5% CO_2 trong suốt thời gian thử nghiệm.

Carbon tetrachloride (CCl_4) (Sigma, Nhật Bản) được sử dụng là chất gây độc tế bào. CCK8 (Sigma, Nhật Bản) là bộ kit dùng để xác định số lượng tế bào sống trong đó WST-8 là thành phần chính của bộ kit CCK8 sẽ bị chuyển hóa thành sản

^(*) Trường Đại học Cần Thơ.

phẩm có màu cam (formazan) hòa tan được trong môi trường nuôi cấy nhờ vào sự xúc tác của cellular dehydrogenase.

2.2. Thử nghiệm 1: Khảo sát độc tính của cao chiết trên dòng tế bào HepG2

Chuẩn bị tế bào nuôi cấy: Tế bào HepG2 được nuôi trong môi trường DMEM từ 2 đến 3 ngày. Sau đó, tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng với nồng độ 2×10^4 tế bào/mL (mỗi giếng 200 μ L) ủ 24 giờ trong điều kiện 37°C và 5% CO₂.

Chuẩn bị mẫu thử: Các mẫu cao chiết methanol lá được pha với DMSO sau đó được pha loãng trong môi trường DMEM, nồng độ cao chiết được sử dụng cho thí nghiệm này là 500 μ g/mL. DMSO (0,25%) và Silymarin (500 μ g/mL) được sử dụng như là các nghiệm thức đối chứng.

Tiến hành: Tế bào trong các giếng thử khi đã đủ điều kiện (sau khi nuôi cấy 24 giờ) sẽ được rửa sạch bằng PBS và tiến hành thử nghiệm bằng cách thêm vào 200 μ L các mẫu cao chiết hoặc DMSO, hoặc Silymarin đã được pha trong môi trường nuôi cấy DMEM. Tế bào được ủ tiếp với mẫu thử trong 24 giờ, sau đó loại bỏ môi trường nuôi cấy và thêm vào 110 μ L dung dịch CCK8 đã pha trong môi trường DMEM với tỷ lệ là 1:10. Mẫu được ủ tiếp trong 2 giờ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂. Số tế bào sống sẽ được xác định bằng cách đo mật độ quang với bước sóng là 450 nm [10].

2.3. Thử nghiệm 2: Khảo sát khả năng bảo vệ dòng tế bào gan HepG2

Nguyên tắc phương pháp thử: Hoạt tính bảo vệ gan của mẫu thử được đánh giá thông qua khả năng bảo vệ tế bào HepG2 khỏi quá trình chết do CCl₄ gây ra. 200 μ L tế bào HepG2 (2×10^4 tế bào/mL) được nuôi trong đĩa 96 giếng và ủ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ.

Chuẩn bị các mẫu thử: Các mẫu cao chiết methanol lá được chuẩn bị bằng cách pha với DMSO sau đó được pha loãng trong môi trường DMEM. Nồng độ cao chiết được sử dụng cho thí nghiệm này là 500 μ g/mL. CCl₄ (1%) và Silymarin (500 μ g/mL) cũng được pha trong DMEM. Nghiệm thức có Silymarin (500 μ g/mL) và CCl₄ (1%) được sử dụng như là nghiệm thức đối chứng.

Bố trí thí nghiệm: Tế bào HepG2 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng sau 24 giờ sẽ được loại bỏ môi trường và bổ sung 100 μ L dung dịch CCl₄

(1%), 100 μ L các mẫu cao chiết được thêm vào để đánh giá hoạt tính bảo vệ gan. DMEM hoặc Silymarin (100 μ L) được sử dụng như là các nghiệm thức đối chứng. Các lô thử nghiệm được bố trí như sau:

Lô chứng âm: tế bào HepG2 + DMEM.

Lô chứng độc: tế bào HepG2 + CCl₄ (1%).

Lô chứng dương: tế bào HepG2 + CCl₄ (1%) + Silymarin 500 μ g/mL.

Lô thử: tế bào HepG2 + CCl₄ (1%) + Các cao chiết methanol lá 500 μ g/mL.

Sau 24 giờ nuôi cấy, môi trường nuôi được loại bỏ và thêm vào 110 μ L dung dịch CCK8 đã pha trong môi trường DMEM. Mẫu được ủ tiếp trong 2 giờ.

Đọc kết quả: Tỷ lệ tế bào sống sẽ được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm trong nghiên cứu được thực hiện 5 lần lặp lại ngẫu nhiên. Số liệu được trình bày bằng MEAN \pm SEM. Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA bằng phần mềm minitab 16.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát độc tính của các cao chiết trên dòng tế bào HepG2

Bảng 1. Phần trăm tế bào sống trong các lô thử nghiệm

Lô	Tế bào sống (%)
Lô chứng âm: tế bào HepG2 + DMEM	100 ^a \pm 0,0
Lô chứng trắng: tế bào HepG2 + DMSO 0,25%	90,56 ^a \pm 10,11
Lô chứng dương: tế bào HepG2 + Silymarin	97,94 ^a \pm 10,99
Lô thử 1: tế bào HepG2 + cao chiết lá Vọng cách	99,50 ^a \pm 15,27
Lô thử 2: tế bào HepG2 + cao chiết lá Mơ lông	98,95 ^a \pm 3,40
Lô thử 3: tế bào HepG2 + cao chiết lá Mơ leo	102,77 ^a \pm 11,61

Ghi chú: Mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần. Nồng độ của Silymarin, cao chiết lá Vọng cách, lá Mơ lông và lá Mơ leo là 500 μ g/mL. Các số liệu có cùng mẫu tự theo sau (tính theo cột) thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Độc tính của các loại cao chiết methanol được khảo sát dựa theo phần trăm tế bào HepG2 còn sống và được trình bày trong Bảng 1. Từ kết quả thí nghiệm Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ phần trăm tế bào sống ở nghiệm thức tế bào được nuôi cấy trong môi trường có DMSO 0,25% có giảm nhưng không khác biệt có ý nghĩa đối với nghiệm thức môi trường bình thường DMEM, điều này cho thấy DMSO ở nồng độ 0,25% không gây độc tính đối với dòng tế bào HepG2, kết quả thí nghiệm này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ozerkan và cộng sự năm 2015, do đó DMSO 0,25% sẽ được dùng làm dung môi để pha các cao chiết methanol [5]. Ở lô chứng dương (Silymarin) và các lô thử cao methanol lá Vọng cách, Mơ lông và Mơ leo với nồng độ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đều có mật độ tế bào sống khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê đối với lô đối chứng âm (chỉ có môi trường DMEM). Kết luận các lô thử chứa Silymarin, lá Vọng cách, Mơ lông và Mơ leo không gây độc tính đối với các tế bào ung thư gan HepG2 ở nồng độ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2. Khảo sát khả năng bảo vệ gan trên dòng tế bào HepG2 chống lại CCl_4

Bảng 2. Hiệu quả bảo vệ tế bào gan của các cao thử nghiệm

Nghiệm thức	Tế bào sống (%)
Lô chứng âm: tế bào HepG2 + DMEM	100 ^a \pm 0,0
Lô thử 1: tế bào HepG2 + CCl_4 + cao chiết lá Vọng cách	69,69 ^b \pm 5,81
Lô thử 2: tế bào HepG2 + CCl_4 + cao chiết lá Mơ lông	64,70 ^b \pm 5,35
Lô thử 3: tế bào HepG2 + CCl_4 + cao chiết lá Mơ leo	40,89 ^d \pm 12,88
Lô chứng dương: tế bào HepG2 + CCl_4 + Silymarin	54,42 ^c \pm 4,03
Lô chứng độc: tế bào HepG2 + CCl_4 (1%)	35,94 ^d \pm 1,41

Ghi chú: Mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần. Nồng độ của Silymarin, lá Vọng cách, lá Mơ lông và lá Mơ leo là 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nồng độ CCl_4 là 1%. Các số liệu có cùng mẫu tự theo sau (tính theo cột) thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Thí nghiệm khảo sát khả năng bảo vệ tế bào gan của các loại cao chiết được trình bày trong Bảng 2. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy khi tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung CCl_4 (1%) trong 24 giờ thì mật số tế bào giảm (35,94%) so với tế bào được nuôi trong môi trường bình thường DMEM (100%). Kết quả này

chứng minh rằng khi bổ sung CCl_4 ở nồng độ 1% có khả năng gây tổn thương và phá hủy các tế bào gan HepG2. Ở nghiệm thức tế bào được nuôi cấy trong môi trường có CCl_4 và bổ sung cao chiết methanol lá cây Vọng cách, phần trăm tế bào sống cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức môi trường nuôi cấy chỉ có CCl_4 . Cụ thể ở nghiệm thức môi trường có chứa cao chiết methanol lá Vọng cách số tế bào sống đạt 69,69% cao hơn so với môi trường chỉ có CCl_4 là 35,94%. Kết quả thí nghiệm này chứng minh cây Vọng cách có khả năng bảo vệ các tế bào gan HepG2 chống lại sự gây độc của CCl_4 gây ra. Kết quả này còn cao hơn ở nghiệm thức đối chứng có bổ sung Silymarin là 15,27%. Cây Vọng cách đã được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về sự kháng oxy hóa, chống lại tế bào ung thư và khả năng bảo vệ gan *in vivo* [9]. Kết quả trong thí nghiệm này góp phần cho thấy lá cây Vọng cách là loài thực vật có tiềm năng để nghiên cứu và sử dụng trong việc bảo vệ gan ở người. Tương tự như vậy, tế bào HepG2 bị gây độc bởi CCl_4 được bổ sung cao methanol lá Mơ lông có phần trăm tế bào sống đạt 64,70% và cho hiệu quả cao hơn so với nghiệm thức đối chứng sử dụng Silymarin là 10,28%. Phần trăm tế bào sống ở nghiệm thức này thấp hơn ở nghiệm thức bổ sung cao chiết methanol Vọng cách 4,99% nhưng khác biệt giữa 2 nghiệm thức bổ sung cao chiết lá cây Vọng cách và lá Mơ lông không có ý nghĩa thống kê. Mơ lông đã được chứng minh là có chứa polyphenol [3], đây là hợp chất có các hoạt tính sinh học như khả năng kháng oxy hóa, kháng viêm và kháng khuẩn [4]. Trong nghiên cứu này cũng ghi nhận cao chiết methanol lá Mơ leo không có hiệu quả bảo vệ tế bào gan HepG2 bị gây tổn thương bởi CCl_4 . Tuy nhiên trong nghiên cứu của Wei Peng và cộng sự (2015) cho thấy rằng chất glycosid iridoid phân lập từ cây Mơ leo có khả năng làm giảm đáng kể hàm lượng AST, ALT ở chuột bị tổn thương gan [6]. Điều này có thể giải thích là trong nghiên cứu này cao chiết được sử dụng là cao tổng nên có thể nồng độ glycosid iridoid hiện diện trong mẫu thấp và chưa đủ để có tác dụng bảo vệ tế bào gan HepG2.

4. Kết luận

Cao chiết methanol của lá cây Vọng cách, lá Mơ lông và lá Mơ leo không gây độc tính với dòng

tế bào HepG2 ở nồng độ 500 µg/mL. Trong các mẫu cao chiết thí nghiệm, cao chiết lá Mơ leo không có hiệu quả bảo vệ tế bào gan. Cao chiết methanol lá cây Vọng cách và lá Mơ lông có hiệu quả bảo vệ các tế bào gan chống lại sự gây độc của CCl₄ tốt hơn Silymarin.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Giáo sư Kamei Kaeko, Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản đã cung cấp dòng tế bào HepG2 và các hóa chất, phương tiện để thực hiện các thí nghiệm nuôi cấy tế bào./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Võ Văn Chi (2004), *Từ điển thực vật thông dụng*, Tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [2]. Châu Ngọc Hoa (2012), *Bệnh học nội khoa*, NXB Y học.
- [3]. Truong Tuyet Mai, Nghiem Nguyet Thu, Pham Gia Tien and Nguyen Van Chuyen (2007), “Alpha - Glucosidase inhibitory and antioxidant activity of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents”, *Journal Nutrition Science Vitaminol*, (53), p. 267-276.
- [4]. Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Remesy, and Liliana Jimenez (2004), “Polyphenols: food sources and bioavailability^{1,2}”, *American Society for Clinical Nutrition*, (79), p. 727-747.
- [5]. Ozerkan D, Ozsoy N and Yilmaz E (2015), “Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl₄ induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines”, *Cytotechnology*, 67 (6), p. 995-1002.
- [6]. Wei Peng, Xiao-Qian Qiu, Zhi-Heng Shu, QingChun Liu, Mei-Bian Hu, Ting Han, Khalid Rahman, Lu-Ping Qin, Cheng-Jian Zheng (2015), “Hepatoprotective activity of total iridoid Glycosides isolated from *Paederia scandens* (lour.) Merr. var. *tomentosa*”, *Journal of Ethnopharmacology*, (174), p. 317-321.
- [7]. Phạm Hoàng Hộ (2006), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ.
- [8]. Philipson, J.D. and C.W. Wright, (1991), “Can ethenopharmacology contribute to the development of antimalarial agents”, *J. Ethnopharmacolog*, (32), p. 155-165.
- [9]. Thamizh N. Selvam, V. Venkatakrisnan và Preetham Elumalai, (2012), “Antioxidant and tumor cell suppression potential of *Premna serratifolia* linn leaf”, *Toxicology International*, 19 (1), p. 31-34.
- [10]. Asha Tukappa, Ramesh L. Londonkar, Hanumantappa B. Nayaka and Sanjeev Kumar CB (2015), “Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius* L”, *Biological Research*, 48 (1), 15 pages.

EVALUATING TOXICITY AND HEPATOPROTECTIVE ABILITY OF METHANOLIC LEAF EXTRACTS IN HEPG2 CELL LINE

Summary

The study investigated the hepatoprotective ability of some methanolic leaf extracts from *Premna serratifolia*, *Paederia lanuginosa* and *Paederia scandens* in HepG2 cell line. The cytotoxic and hepatoprotective properties of methanolic extracts against damage induced by CCl₄ were evaluated via measuring cell viability by the CCK8 kit. HepG2 cell line was damaged by CCl₄ (1%) and treated with methanolic leaf extracts of *Premna serratifolia*, *Paederia lanuginosa*, *Paederia scandens*. The results showed that these leaf extracts were not poisonous on HepG2 cell at 500 µg/mL. In addition, it found that *Premna serratifolia* and *Paederia lanuginosa* methanolic leaf extracts had potent cytoprotective effects against CCl₄ induced toxicity in HepG2 cell line.

Keywords: Hepatoprotective, HepG2, *Premna serratifolia* L., *Paederia lanuginosa*, *Paederia scandens*.
 Ngày nhận bài: 08/3/2018; Ngày nhận lại: 24/04/2018; Ngày duyệt đăng: 10/08/2018.