

Nghiên cứu tác dụng chống ung thư của dịch chiết tỏi đen *in vitro*

Study anti-cancer effect of black garlic extract *in vitro*

Nguyễn Linh Toàn

Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Tỏi và tỏi đen đã được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch, điều hòa đường huyết và chống ung thư. Tỏi đen chứa một lượng lớn các hợp chất hữu cơ lưu huỳnh như S-allylcysteine (SAC), chất có tác dụng chống ung thư. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá tác dụng chống ung thư của SAC và dịch chiết tỏi đen. **Đối tượng và phương pháp:** Trong nghiên cứu này, khả năng chống ung thư của SAC và dịch chiết tỏi đen được đánh giá trên dòng tế bào ung thư gan người Hep-3B bằng thử nghiệm MTT. **Kết quả:** Nghiên cứu cho thấy tế bào Hep-3B bị ức chế nhân lên rõ rệt ở nồng độ SAC 100mM và dịch chiết tỏi đen ở nồng độ tính theo SAC là 0,25mM, 0,5mM, 1mM ($p < 0,05$). **Kết luận:** SAC và dịch chiết tỏi đen cho thấy có tác dụng kháng ung thư trên dòng tế bào ung thư biểu mô gan người dòng Hep-3B.

Từ khóa: Tỏi đen, SAC, Hep-3B, ung thư gan.

Summary

Objective: Garlic and black garlic have been shown to antioxidant effects, cardiovascular protection, regulating blood sugar and anti-cancer. Black garlic contains high levels of organosulphur compounds, such as water-soluble S-allylcysteine (SAC) which has potential anticancer effect. This study, we evaluate the anti-liver cancer effects of SAC and black garlic extract. **Subject and method:** Anti-liver cancer effects of SAC and black garlic extract were evaluated on Hep-3B cell lines by MTT assay. **Result:** The data indicated that the Hep-3B cancer cells replication were significantly inhibited at 100mM of SAC and 0.25mM, 0.5mM, 1mM of black garlic extract ($p < 0.05$). **Conclusion:** The SAC and black garlic extract have been shown anti-cancer effect on hepatocellular carcinoma of Hep-3B cell lines.

Keywords: Black garlic, SAC, Hep-3B, liver cancer.

1. Đặt vấn đề

Các nghiên cứu gần đây cho thấy ngoài tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch, điều hòa đường huyết, tỏi đen còn có tác dụng chống ung thư [1]. Khi tỏi tươi trải qua một quá trình lên men

chậm, dưới sự kiểm soát chặt chẽ nhiệt độ và độ ẩm, trở thành tỏi đen, có vị ngọt mềm, mùi thơm, có nhiều ưu điểm hơn hẳn so với tỏi thường do nồng độ của S-allyl-L-cysteine (SAC) và một số hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh tăng lên hơn nhiều lần. Theo

Ngày nhận bài: 29/5/2019, ngày chấp nhận đăng: 30/5/2019

Người phản hồi: Nguyễn Linh Toàn, Email: toan_nguyenlinh@yahoo.com - Học viện Quân y

nguyên cứu của Sasaki (2007) khi tiêm dịch chiết tỏi đen vào chuột mang tế bào ung thư người thì tế bào ung thư biến mất hoặc giảm đi 50% trong khi nhóm chứng thì tế bào ung thư tăng lên nhiều hơn và thể trạng chuột yếu đi. Với nghiên cứu tương tự trên nhưng khi Sasaki tiến hành với tỏi thường thì hiệu quả cải thiện của cả hai nhóm đều không thể như tỏi đen. Chính vì vậy, nghiên cứu đã chỉ ra rằng hiệu quả giữa tỏi thường và tỏi đen là rất khác nhau [8]. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn về tỏi đen trong dự phòng và chống ung thư là rất cần thiết để có thể đưa ra thị trường sản phẩm thuốc an toàn, có chất lượng cho bệnh ung thư luôn được quan tâm. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng chống ung thư của tỏi đen và SAC phân lập từ tỏi đen trên dòng tế bào ung thư gan người.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Mẫu tỏi đen (số lô 010313) và SAC phân lập từ dịch chiết tỏi đen theo quy trình đã được công bố [2] do Trung tâm Nghiên cứu sản xuất Thuốc - Học viện Quân y cung cấp.

Dòng tế bào ung thư gan người Hep-3B (ATCC, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Hoạt hóa tế bào và chuẩn bị mẫu nghiên cứu

Tế bào và phương pháp nuôi cấy: Tế bào ung thư gan người Hep-3B được phát triển trong môi trường DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FBS) và 1% penicillin + streptomycin ở điều kiện nhiệt độ 37°C, không khí có 5% CO₂.

Chuẩn bị dịch chiết tỏi đen: Tỏi đen được pha thành dung dịch thử có nồng độ SAC tương ứng: C₁ = 0,0625mM, C₂ = 0,125mM, C₃ = 0,25mM, C₄ = 0,5mM, C₅ = 1,0mM.

Chuẩn bị SAC: Pha các dung dịch thử SAC với nồng độ SAC 50mM hoặc 100mM.

3. Kết quả

2.2.2. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào bằng thử nghiệm Trypan blue

Tế bào được cho vào khay 96 giếng với nồng độ tế bào giống nhau ở tất cả các giếng (đạt 100.000 tế bào/giếng), rồi được ủ với môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% trong 1 đêm. Sau đó, dung dịch nuôi được thay mới có chứa thuốc thử là dịch chiết tỏi đen và SAC ở các nồng độ khác nhau rồi tiếp tục ủ trong 1 giờ. Nhuộm mẫu bằng thuốc thử Trypan blue. Tế bào chết sẽ bắt màu xanh của Trypan blue và phân biệt với tế bào sống. Đếm số lượng tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Các tế bào được chia thành ba nhóm:

Nhóm 1: Môi trường nuôi cấy bình thường.

Nhóm 2: Môi trường nuôi cấy có dịch chiết tỏi đen có các nồng độ tương ứng với nồng độ SAC như trên.

Nhóm 3: Môi trường nuôi cấy có SAC 100mM hoặc 50mM.

2.2.3. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào bằng thử nghiệm MTT

Thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] theo nguyên lý: Ti thể ở tế bào sống có khả năng chuyển hóa chất MTT thành sản phẩm có màu không tan trong nước nhưng tan trong dung dịch hòa tan MTT. Khi tế bào chết thì ti thể không còn khả năng chuyển hóa MTT thành chất màu. Thử nghiệm MTT được thực hiện vào các thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi bổ sung vào môi trường chất nghiên cứu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mật độ quang được đo ở bước sóng 590nm.

Chuẩn bị các mẫu tế bào:

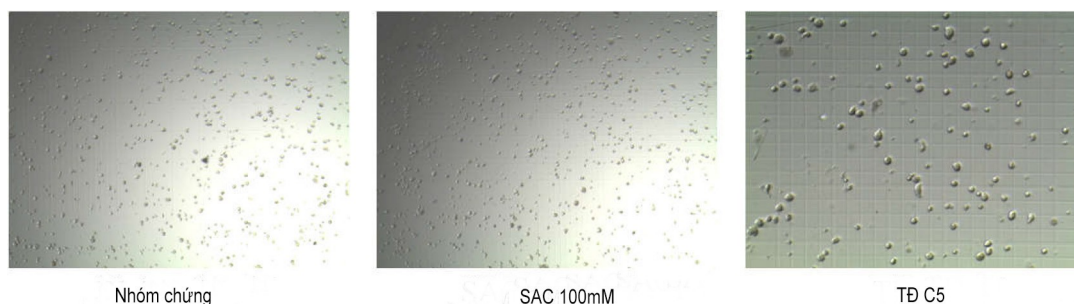
Mẫu trắng: Chỉ có môi trường nuôi cấy thông thường.

Mẫu thử: Cho dịch chiết tỏi đen và SAC ở các nồng độ dự kiến.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Statview 5.01E và STATA 7.0 sử dụng các thuật toán thống kê. So sánh 2 tỷ lệ, so sánh 2 số trung bình. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p<0,05.

3.1. Kết quả thử nghiệm Trypan Blue trên tế bào Hep-3B



Hình 1. Hình ảnh tế bào Hep-3B sau thử nghiệm Trypan Blue (100X: Nhóm chứng và SAC; 200X: TĐ)

Quan sát trên kính hiển vi không phát hiện thấy các tế bào chết bắt màu xanh của Trypan blue tại các nhóm dùng dịch chiết tỏi đen và SAC.

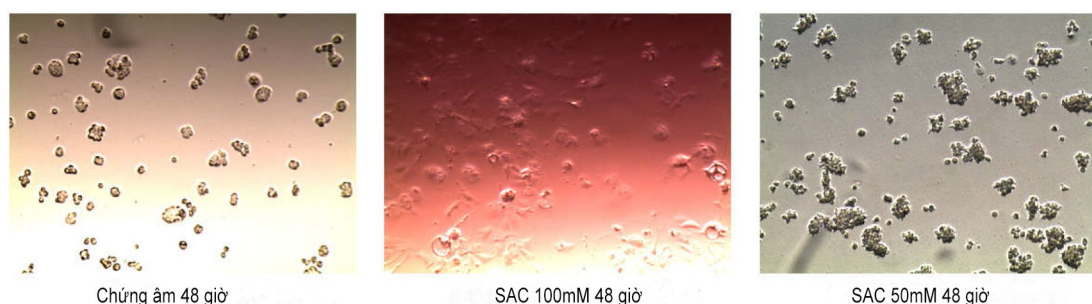
Thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau từ C_1 đến C_5 của chiết tỏi đen và 100mM và 50mM của SAC đều không gây chết tế bào trực tiếp đối với tế bào ung thư tuyến gan người dòng Hep-3B.

3.2. Kết quả thử nghiệm MTT trên tế bào Hep-3B

Bảng 1. Tác dụng của dịch chiết tỏi đen và SAC trên Hep-3B

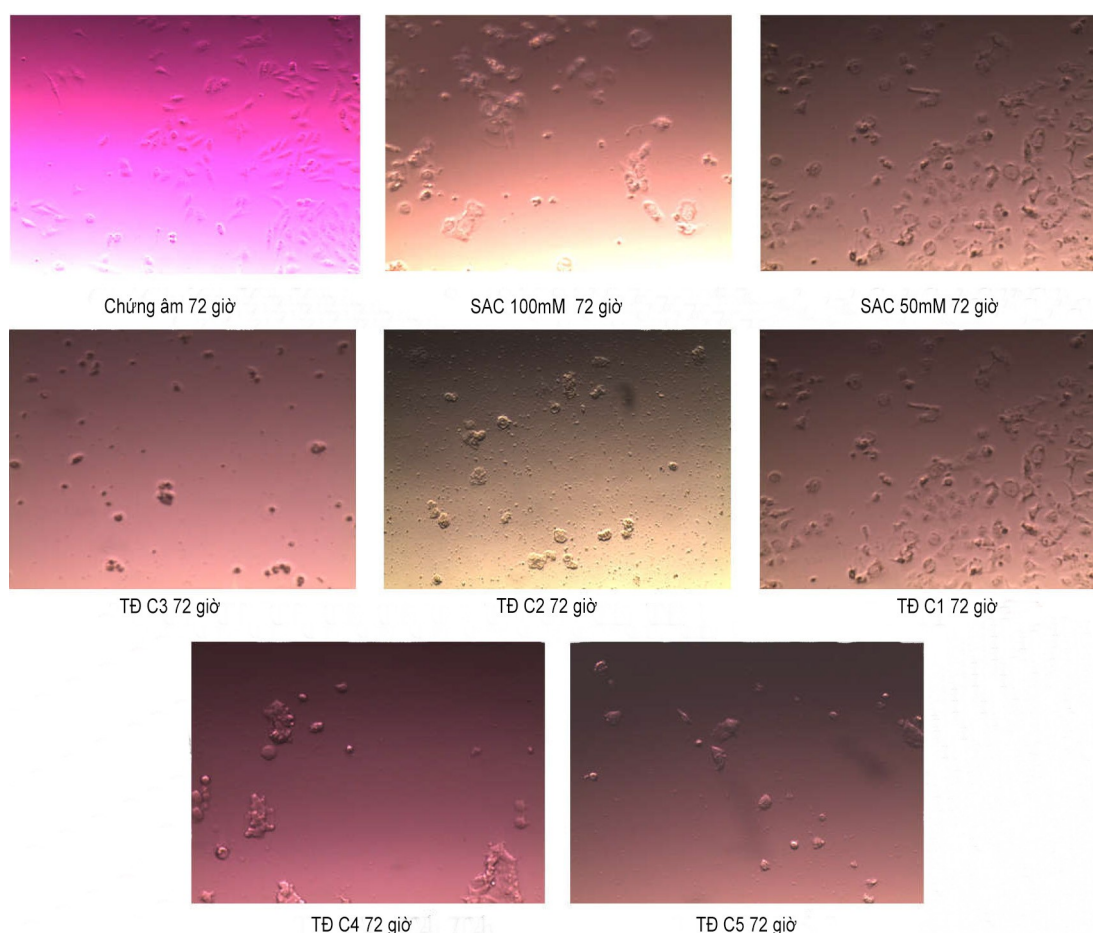
Nhóm		Thời điểm 48 giờ	p	Thời điểm 72 giờ	p
Chứng âm (1)		$0,164 \pm 0,023$		$0,200 \pm 0,027$	
Nhóm dùng SAC	100mM (2)	$0,160 \pm 0,037$	$p_{2-1} > 0,05$	$0,170 \pm 0,037$	$p_{2-1} < 0,05$
	50mM (3)	$0,183 \pm 0,048$	$p_{3-1} > 0,05$	$0,203 \pm 0,020$	$p_{3-1} > 0,05$
Nhóm dùng dịch chiết tỏi đen	C_5 (4)	$0,170 \pm 0,041$	$p_{4-1} > 0,05$	$0,177 \pm 0,010$	$p_{4-1} < 0,05$
	C_4 (5)	$0,165 \pm 0,046$	$p_{5-1} > 0,05$	$0,144 \pm 0,027$	$p_{5-1} < 0,05$
	C_3 (6)	$0,193 \pm 0,030$	$p_{6-1} > 0,05$	$0,157 \pm 0,033$	$p_{6-1} < 0,05$
	C_2 (7)	$0,1919 \pm 0,016$	$p_{7-1} > 0,05$	$0,197 \pm 0,014$	$p_{7-1} > 0,05$
	C_1 (8)	$0,205 \pm 0,057$	$p_{8-1} > 0,05$	$0,201 \pm 0,013$	$p_{8-1} > 0,05$

Tại thời điểm 48 giờ: Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy ở thời điểm này dịch chiết tỏi đen và SAC chưa có tác dụng ức chế Hep-3B. Mật độ tế bào có sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh tế bào Hep3B dưới tác dụng của dịch chiết tỏi đen và SAC sau 48 giờ (200X)

Tại thời điểm sau 72 giờ: Dưới kính hiển vi quang học cho thấy thời điểm 72 giờ sau dùng dịch chiết tỏi đen và SAC tế bào bị ức chế phát triển rõ rệt. Nhất là những tế bào môi trường có dịch chiết tỏi đen nồng độ C_3 , C_4 , C_5 và SAC 100mM ($p < 0,05$) (Hình 3).



Hình 3. Hình ảnh tế bào Hep-3B dưới tác dụng của dịch chiết tỏi đen và SAC sau 72 giờ (200X)

Sau 72 giờ, có thể nhận thấy dưới kính hiển vi, mật độ tế bào bị ảnh hưởng rõ rệt bởi dịch chiết tỏi đen ở nồng độ C₃ đến C₅ và SAC nồng độ 100mM (Hình 3).

4. Bàn luận

Kết quả thử nghiệm Trypan blue cho thấy dịch chiết tỏi đen và SAC ở các nồng độ khác nhau không gây độc trực tiếp đối với tế bào ung thư Hep-3B (Hình 1). Tỷ lệ tế bào chết/tế bào sống giữa các giếng nuôi cấy sử dụng dịch chiết tỏi đen và SAC không có sự khác biệt so với chứng khi sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào ($p > 0,05$).

Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết tỏi Lý Sơn (TLS) đối với sự nhân lên của tế bào ung thư gan cho thấy, dịch chiết TLS có tác dụng ức chế phát triển tế bào ung thư phụ thuộc liều dùng so sánh với chứng. Ở nồng độ 2,5mg/ml, 5mg/ml và 10mg/ml, dịch chiết TLS ức chế rõ rệt tế bào ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) người nhân lên so với thuốc vincristine

0,05 μ g/ml môi trường ($p < 0,001$) [3]. Das và cộng sự (2007) sử dụng các sản phẩm chứa gốc sulfur (như SAC) có nguồn gốc từ tỏi để nghiên cứu cơ chế chống ung thư. Các tác giả nhận thấy có sự tăng phospho hóa p38 MAPK protein, đây là một protein có tác động sinh học qua màng nhân kích thích tới các gen trong nhân nhằm tăng sản xuất các cytokine trong đáp ứng viêm, các yếu tố phát triển hoặc có thể thúc đẩy quá trình chết tế bào [4]. Trong nghiên cứu này cho thấy, dịch chiết tỏi đen và SAC có tác dụng ức chế tế bào ung thư gan Hep-3B (Bảng 2).

Lee và cộng sự (2011) thử nghiệm gốc sulfur trên nuôi cấy tế bào cho thấy tỷ lệ gây tế bào chết phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiếp xúc với chất này. Thông qua định lượng gốc tự do glutaredoxyn (GRX) bằng nhuộm fluorescen đã xác định chất này tăng mạnh trong tế bào ung thư ở nồng độ 50 - 80mcg [6].

Dẫn chất gốc sulfur cũng đã được chứng minh khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư gan bằng cách tăng cường acetyl hóa histone, ức chế enzyme histone deacetylase, gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) hoặc ức chế quá trình hình thành các mạch máu mới thông qua giảm biểu hiện của các gen VEGF-receptor các enzyme MMP-2, MMP-9 có vai trò quan trọng trong tạo điều kiện để khối u xâm lấn ra xung quanh và di căn [5], [7], [9], [10].

5. Kết luận

Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết tỏi đen và SAC trên dòng tế bào ung thư Hep-3B không thấy có tác dụng gây độc tế bào trực tiếp. Ở thời điểm 72 giờ, nhóm tế bào được điều trị bằng S-allyl-L-cysteine (SAC) ở nồng độ 100mM và dịch chiết tỏi đen với nồng độ tính theo SAC là 0,25mM, 0,5mM, 1mM có tác dụng ức chế rõ rệt tế bào ung thư gan người Hep-3B so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Tài liệu tham khảo

1. Vũ Bình Dương, Vũ Xuân Nghĩa, Phạm Xuân Phong (2013) *Nghiên cứu khả năng bảo vệ cơ quan tạo máu của dịch chiết tỏi đen Lý Sơn trên chuột bị chiếu xạ*. Tạp chí dược học, số 446, tr. 12-16.
2. Vũ Bình Dương, Trịnh Nam Trung (2014) *Phân lập S-allyl-L-cystein từ tỏi đen Việt Nam*. Tạp chí dược học, số 455, tr. 28-30.
3. Nguyễn Linh Toàn (2011) *Dịch chiết tỏi lý sơn ức chế phát triển tế bào ung thư tuyến tiền liệt người dòng PC-3 trên in vitro*. Tạp chí Y dược học Quân sự - Năm 2011, số 3, tập 36, tr. 42-49.
4. Das A, Banik NL, Ray SK (2007) *Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells*. Cancer 110(5): 1083-1095.
5. Huang YS, Xie N, Su Q, Su J, Huang C, Liao QJ (2011) *Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HEP-3B human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes*. Mol Med Report 4(3): 553-559.
6. Lee BC, Park BH, Kim SY, Lee YJ (2011) *Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells*. J Cell Biochem 112(1): 118-127.
7. Meyer K, Ueberham E, Gebhardt R (2004) *Influence of organosulphur compounds from garlic on the secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 by cultured HUVEC cells*. Cell Biol Toxicol 20: 253-260.
8. Sasaki J, Lu C, Machiya E, Tanahashi M, Hamada K (2007) *Processed black garlic (Allium sativum) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 1(2): 278-281.
9. Xiao D, Li M, Herman-Antosiewicz A, Antosiewicz J, Xiao H, Lew KL, Zeng Y, Marynowski SW, Singh SV (2006) *Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing Akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGF-R2*. Nutr Cancer 55: 94-107.
10. Chu YL, Ho CT, Chung JG, Rajasekaran R, Sheen LY (2012) [Allicin induces p53-mediated autophagy in Hep G2 human liver cancer cells](#). J Agric Food Chem 60(34): 8363-8371.