

KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG FLAVONOID, PHENOLIC VÀ KHẢ NĂNG GÂY CHẾT TẾ BÀO UNG THƯ VÚ 4T1 CỦA CAO CHIẾT LÁ TRẦU KHÔNG

NGUYỄN THỊ KIM ANH^{1*}, CAO ĐOÀN HUYỀN¹, NGUYỄN HOÀNG LÂM¹, LÂM HOÀNG ANH THU², HOÀNG THÙY DƯƠNG²

1. Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh

2. Phòng Công nghệ Sinh học, Trung tâm R&D, Khu Công nghệ cao TP. Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: nguyenthikimanh@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v65i05.4964>

Tóm tắt. Ung thư vú là một loại ung thư gây tử vong hàng đầu ở phụ nữ. Các hoạt chất có nguồn gốc thực vật có thể ức chế sự phát triển của tế bào ung thư có thể sử dụng để thay thế hoặc hỗ trợ trong việc điều trị, bên cạnh các biện pháp hóa trị, xạ trị và phẫu thuật. Lá trầu không vốn được sử dụng trong các bài thuốc dân gian ở Việt Nam với nhiều tác dụng điều trị. Trong nghiên cứu này, cao chiết ethanol, hexan và ethyl acetate từ lá trầu sẽ được khảo sát thành phần flavonoid, phenolic và nghiên cứu khả năng gây độc tế bào ung thư vú dòng 4T1. Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoid là 49.71, 37.40, 21.34 mg QE/g và hàm lượng phenolic là 684.23, 368.34, 318.82 GAE/g ở lần lượt các cao ethanol, hexan, ethyl acetate. Ở nồng độ 25 µg/ml cả 2 loại cao chiết ethanol và ethyl acetate đều gây độc mạnh, giết chết hầu hết tế bào ung thư, trong khi đó không có ảnh hưởng gì tới khả năng phát triển của tế bào bình thường fibroblast.

Từ khóa. Flavonoid, phenolic, lá trầu không, tế bào 4T1, tế bào fibroblast, ung thư vú

1 GIỚI THIỆU

Ung thư vú gây tử vong hàng đầu trong các loại ung thư ở phụ nữ [1]. Các phương pháp điều trị phổ biến bao gồm phẫu thuật, hóa trị và xạ trị hiện đang được sử dụng phổ biến đối với bệnh nhân bị ung thư vú. Tuy nhiên, các phương pháp này đều có những hạn chế riêng do những tác dụng không mong muốn, làm ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe của bệnh nhân. Các sản phẩm có nguồn gốc thiên nhiên từ lâu đã là nguồn chữa ung thư tiềm năng. Có ít nhất 25000 loài thực vật và trong số đó hơn một nghìn loài đã được phát hiện có đặc tính chống ung thư rất đáng kể [2]. Trong những năm gần đây, một số cây thuốc đã được sử dụng trong việc điều trị và ngăn ngừa ung thư như một liệu pháp thay thế cho các liệu pháp truyền thống. Những loại cây được sử dụng đều có các chất chống ung thư, chống khối u và chống sự tăng sinh của tế bào ung thư, đồng thời ít tạo ra tác dụng phụ gây độc hơn so với các phương pháp trị liệu truyền thống [3]. Cây trầu không (*Piper betle* L.) là một loại cây có lá được sử dụng phổ biến ở Việt Nam trong tập quán ăn trầu từ xa xưa. Bên cạnh đó, các bài thuốc y học cổ truyền sử dụng lá trầu không có kết quả rất tốt trong việc điều trị các một số bệnh lý răng miệng, giảm đau, sát khuẩn vết thương, mụn nhọt, nấm ngứa và nhiều vấn đề khác. Trên thế giới, một số nghiên cứu cho thấy trầu không còn có tác dụng trong việc điều trị đái tháo đường, chống dị ứng, điều hòa miễn dịch [4,5,6] nhờ vào đặc tính kháng oxy hóa có trong các hoạt chất của lá trầu không [7]. Các chất flavonoid và phenolic acid được cho là có liên quan tới khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư [8, 9]. Các nghiên cứu thành phần hóa học của lá trầu đã chỉ ra rằng lá trầu không có chứa tannins, chavicol, alkaloid, phenyl, propane, đường và một số loại tinh dầu [10].

Các nghiên cứu trên mô hình động vật thí nghiệm cho thấy chiết xuất lá trầu có khả năng chống lại chất gây ung thư có trong thuốc lá [11], ức chế sự phát triển ung thư tiền liệt tuyến [12]. Khả năng gây độc đối với tế bào ung thư, đặc biệt là ung thư vú của lá trầu được trồng tại Việt Nam hiện vẫn chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, cao chiết ethanol và các cao chiết phân đoạn được nghiên cứu về khả năng ức chế tế bào dòng ung thư vú 4T1.

2 VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu nhận và xử lý lá trà không

Lá cây trà không (*Piper betle* L.) được thu mua từ trại cây giống Lái Thiêu, Thuận An, Bình Dương tháng 1 năm 2022. Những lá trà tươi, sạch, không có bất kỳ thiệt hại vật lý hoặc không có dấu hiệu của sâu bệnh sẽ được lựa chọn. Lá được làm sạch dưới nước chảy liên tục, phơi khô nơi thoáng mát và sau đó được sấy bằng máy đông khô Coosafe Canvac (nhiệt độ âm 50°C, điều kiện chân không). Sau khi sấy khô hoàn toàn, lá trà được nghiền thành bột mịn bằng máy xay và lọc qua rây 1mm. Bột lá sẽ được giữ ở -2°C trong vòng 6 tháng để sử dụng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu.

2.2. Chiết xuất lá trà

Để thu được dịch chiết thô ethanol từ lá trà, với tỷ lệ rắn trên dung môi là 1:20 theo phương pháp chiết xuất có hỗ trợ của sóng siêu âm [13], 25g bột lá khô được thêm vào 500ml ethanol ($\geq 99.8\%$). Sau đó, beaker chứa bột lá trà và dung môi sẽ được bọc giấy bạc tránh sáng và được đặt vào máy phá mẫu bằng sóng siêu âm. Thời gian chiết được thực hiện trong 30 phút, chia làm 6 chu kỳ, mỗi chu kỳ 5 phút, biên độ dao động ở đầu dò 70%, nhiệt độ không vượt quá 60°C. Sau quá trình đánh siêu âm hoàn tất, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó phần dịch sẽ được lọc qua giấy lọc và thu được dịch chiết thô ethanol từ lá trà. Dịch chiết ethanol thô này sẽ được cô quay và sấy thăng hoa bằng máy đông khô Coosafe Canvac, thu được cao chiết tổng ethanol.

Đối với dịch chiết phân đoạn hexan, sử dụng dịch chiết ethanol cô quay để tiếp tục chiết lỏng-lỏng bằng bình lỏng theo công thức: 100ml dịch chiết ethanol cô đặc + 100ml hexan + 150ml H₂O, lắc đều rồi để yên trong 10 phút. Sau đó thu 2 phân lớp (1) và (2) ra 2 bình thủy tinh được bọc giấy bạc, đổ dung dịch (2) sau mỗi lần chiết vào lại bình lỏng và tiếp tục chiết lại với 100ml hexan mới, lặp lại quy trình cho đến khi phân lớp hexan (1) gần như trong suốt thì dừng lại. Cô quay dịch chiết hexan và sấy thăng hoa bằng máy đông khô Coosafe Canvac, thu được cao chiết phân đoạn hexan.

Để thu dịch chiết phân đoạn ethyl acetate, phân lớp (2) sau khi chiết xong phân đoạn hexan sẽ tiếp tục tiến hành chiết lỏng-lỏng bằng bình lỏng theo công thức: Phân lớp (2) + 100ml ethyl acetate, lắc đều để yên 10 phút. Thực hiện cách chiết tương tự như cách chiết phân đoạn hexan, lặp lại cho đến khi nào phân lớp ethyl acetate gần như trong suốt thì dừng lại. Cô quay dịch chiết ethyl acetate và sấy thăng hoa bằng máy đông khô Coosafe Canvac, thu được cao chiết phân đoạn ethyl acetate.

Để chuẩn bị dung dịch chứa chiết xuất lá trà từ ba cao ethanol, hexan, ethyl acetate để thử hoạt tính tế bào, ba loại cao chiết sẽ được pha trong DMSO để đạt được dãy nồng độ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/ml.

2.2. Khảo sát hàm lượng Flavonoid và Phenolic

2.2.1. Định lượng Flavonoid

Flavonoid được xác định theo phương pháp của Chang và cộng sự [14]. Xây dựng đường chuẩn bằng cách thêm 0.5 ml quercetin vào mỗi ống nghiệm (theo dãy nồng độ 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 0 µg/ml), thêm 1.5 ml Ethanol (96%) vào mỗi ống nghiệm và đợi 5 phút. Sau đó thêm 0.1 ml AlCl₃ 10% vào mỗi ống nghiệm và đợi 5 phút. Tiếp tục bổ sung 0.1 ml CH₃COOK 1M và 2.8 ml H₂O vào mỗi ống nghiệm. Vortex và ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng rồi đo quang ở bước sóng 415 nm. Đối với mẫu, lặp lại quy trình tương tự như đường chuẩn nhưng thay quercetin bằng mẫu cần đo. Lượng flavonoid tổng được xác định bằng công thức:

$$T = \frac{C \cdot V}{M}$$

Trong đó:

T: hàm lượng Flavonoid tổng (mg QE/g).

C: nồng độ quercetin (mg/ml) được tính bằng cách thay số đo OD mẫu vào phương trình đường chuẩn.

V: thể tích dung dịch cao chiết trong phản ứng (ml).

M: khối lượng của cao chiết trong phản ứng (g).

2.2.2. Định lượng Phenolic

Hàm lượng phenolic được xác định thông qua phương pháp Folin-Ciocalteu [15]. Để xây dựng đường chuẩn, 2 ml acid gallic được đưa vào mỗi ống nghiệm (theo dãy nồng độ 100, 80, 60, 40, 20, 0 µg/ml), sau đó thêm 2 ml thuốc thử Folin 10% vào mỗi ống nghiệm và đợi 3 phút. Tiếp tục bổ sung 750 µl dung dịch Na₂CO₃ 7.5% vào mỗi ống nghiệm và định mức lên 10 ml bằng nước cất. Vortex và ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đo quang ở bước sóng 765 nm. Đối với mẫu, lặp lại quy trình tương tự như đường chuẩn nhưng thay Acid gallic bằng mẫu cần đo. Lượng phenolic tổng được xác định bằng công thức:

$$T = \frac{C \cdot V}{M}$$

Trong đó:

T: hàm lượng Phenolic tổng (mg GAE/g).

C: nồng độ Acid gallic (mg/ml) được tính bằng cách thay số đo OD mẫu vào phương trình đường chuẩn.

V: thể tích dung dịch cao chiết trong phản ứng (ml).

M: khối lượng của cao chiết trong phản ứng (g).

2.3. Nuôi cấy tế bào

Tế bào ung thư dòng thương mại 4T1 là tế bào ung thư vú chuột và tế bào fibroblast là nguyên bào sợi thu được từ mô của chuột. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh (penicillin và streptomycin). Các bình nuôi cấy tế bào được giữ trong tủ nuôi cấy 5% CO₂, 37°C.

Chuyển 225 µl dung dịch có mật độ 10⁴ tế bào/ml vào đĩa 96 giếng, ủ qua đêm để tế bào bám trải bề mặt của giếng. Pha các cao chiết trong 0.1% DMSO để có các nồng độ 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml của từng loại cao chiết ethanol, hexan, methyl acetate. Bổ sung 25 µl của mỗi nồng độ cao chiết vào các giếng đã có tế bào bám trải. Nuôi cấy ở 5% CO₂, 37°C trong 72 giờ.

Tế bào sống và chết được xác định bằng buồng đếm Newbauer với thuốc nhuộm trypan blue. Tỷ lệ tế bào sống được tính theo công thức:

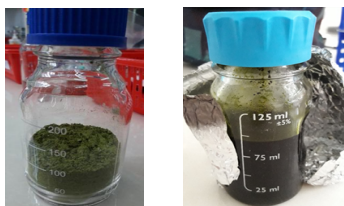
$$\text{Số tế bào/ml} = \text{Trung bình số tế bào đếm được ở 5 ô} \times 10^4 \times N$$

(N là hệ số pha loãng dung dịch tế bào với thuốc nhuộm trypan blue)

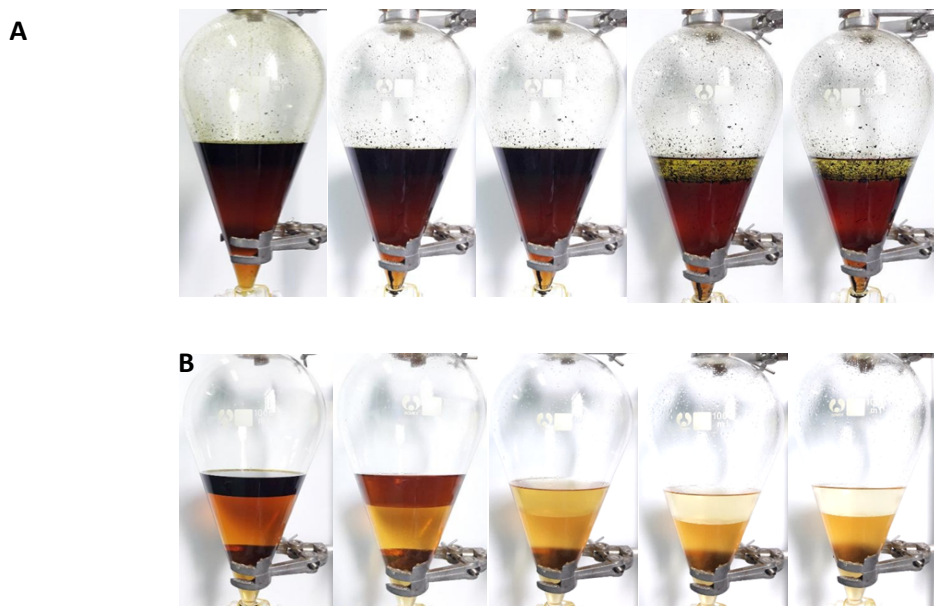
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cao chiết từ lá trà

Cao chiết tổng ethanol được thu từ 15 g bột lá trà chiết trong 300 ml ethanol. Sau khi ly tâm, lọc, cô quay rồi cô đặc trong 3 ngày sẽ thu được 2.97 g cao chiết ethanol cô đặc (Hình 1). Bột lá trà vẫn được tiếp tục chiết với tỷ lệ rắn/ ethanol là 1:20 để thu được 1 L dịch chiết ethanol (chiết từ 50 g bột lá), 1 L này sẽ được cô quay xuống 100 ml để tiến hành chiết phân đoạn. Sau khi thực hiện chiết phân đoạn, phần dịch chiết hexan được thu hồi sẽ được cô quay và cô khô bằng máy đông khô, từ 1 L dịch chiết ethanol (chiết từ 50 g bột lá) sẽ thu được 3.36 g cao chiết phân đoạn hexan cô đặc. Sau khi thực hiện chiết phân đoạn (tiếp nối sau khi chiết hexan), phần dịch chiết ethyl acetate được thu hồi sẽ được cô quay và cô khô bằng máy đông khô, từ 1 L dịch chiết ethanol (chiết từ 50 g bột lá) sẽ thu được 1.63 g cao chiết phân đoạn ethyl acetate cô đặc (Hình 2).



Hình 1. Bột lá trà và dịch chiết ethanol cô đặc

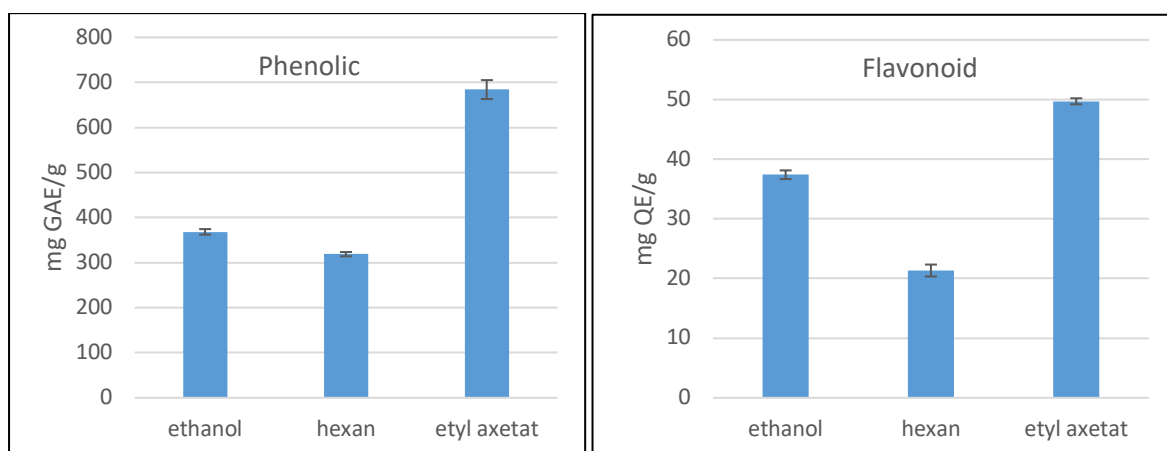


Hình 2. A. Dịch chiết phân đoạn hexan. B. Dịch chiết phân đoạn ethyl acetate

3.2. Hàm lượng phenolic và flavonoid

Hàm lượng phenolic thu được cao nhất từ cao ethyl acetate (là 684.23 GAE/g), tiếp đến là từ cao ethanol (368.34 GAE/g) và thấp nhất là ở cao hexan (318.82 GAE/g) ($P < 0.05$) (Hình 3). Dung môi ethyl acetate có thể là dung môi phù hợp để thu được lượng phenolic từ lá trà. Kết quả từ nghiên cứu khác cũng cho thấy dung môi này thu được hàm lượng phenolic cao nhất so với các dung môi khác sử dụng trong nghiên cứu bao gồm nước, methanol, ethanol, acetone và hexan [9, 16].

Hàm lượng phenolic thu được trong nghiên cứu này thu được từ cao ethanol khi sử dụng sóng siêu âm cao hơn các kết quả của những nghiên cứu khác khi chỉ sử dụng phương pháp chiết ngâm, thậm chí cao hơn so với nghiên cứu sử dụng sóng siêu âm khác. Các kết quả tổng phenolic từ lá trà đã được báo cáo từ nhiều nghiên cứu với phương pháp chiết ngâm cho kết quả hàm lượng phenolic thấp, chỉ dao động từ 31.25-47.48mg CAE/g [17], từ 0.29 - 2.62 mg GAE/g [16], từ 49.89 - 55.35mg GAE/g (có hỗ trợ loại khí oxy bằng xả khí nitrogen) [19]. Trong khi đó khi sử dụng phương pháp chiết sóng siêu âm có tổng phenolic cao: từ 289.63 - 320.65 GAE/g [17], 124.42mg GAE/g [18]. Sóng siêu âm với năng lượng cao có khả năng phá vỡ các cấu trúc của tế bào thực vật, từ đó giải phóng các hợp chất phenolic.



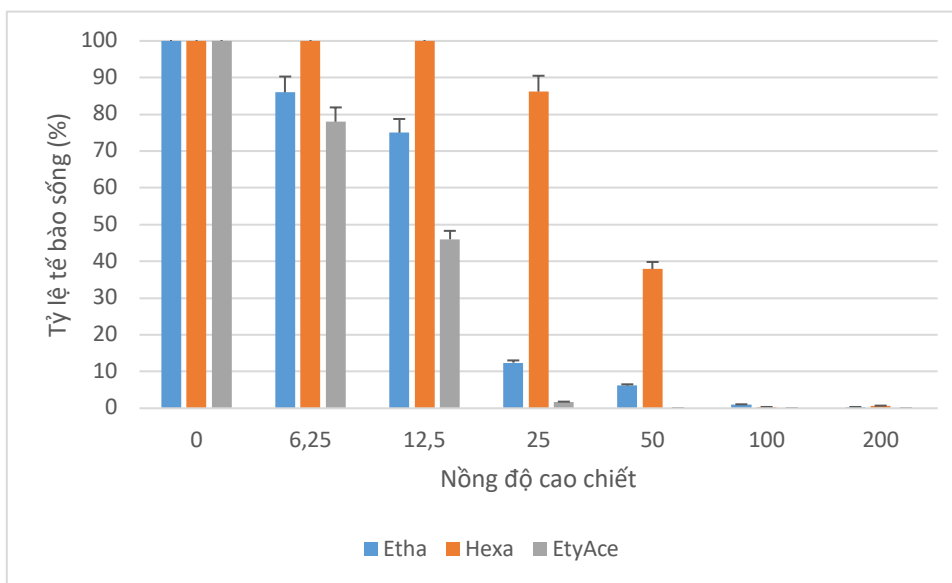
Hình 3: Hàm lượng phenolic (bên trái) và flavonoid (bên phải)

Hàm lượng flavonoid đương lượng quercetin cao nhất trong cao chiết ethyl acetate, tiếp theo là cao chiết ethanol và cuối cùng là hexan ($P < 0.05$). Cao chiết ethyl acetate, ethanol và hexan có hàm lượng flavonoid lần lượt là 49.71, 37.40 và 21.34mg QE/g. Hàm lượng flavonoid cao nhất từ etyl acetate cũng đã được báo cáo trước đó [21], tuy nhiên hàm lượng flavonoid cũng được báo cáo cao nhất từ một số loại dung môi khác như acetone [17], metanol [9, 22]. Như vậy có thể thấy được từ những nghiên cứu này, flavonoid có thể được chiết xuất tốt bằng nhiều loại dung môi, đa số là các loại dung môi có độ phân cực trung bình cho đến độ phân cực mạnh.

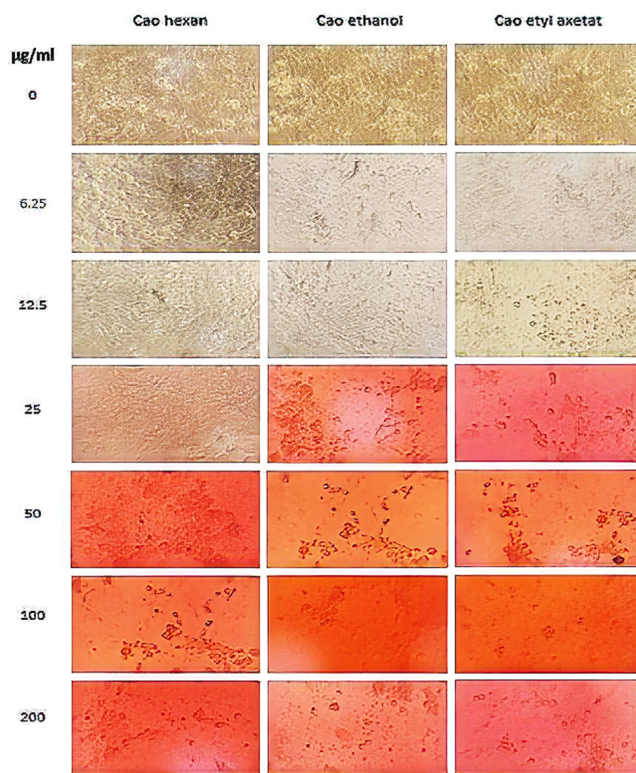
3.3. Xét nghiệm độc tính tế bào của cao tổng và cao phân đoạn từ lá trà

3.3.1. Khả năng ức chế tế bào fibroblast và tế bào 4T1

Sau 72 giờ tế bào 4T1 tiếp xúc với các cao ethanol, hexan, ethyl acetate, từ nồng độ 100 μ g/ml trở đi hầu như không thấy tế bào còn sống. Ở nồng độ cao chiết 50 μ g/ml thì có ít tế bào sống sót khả năng bám trải của những tế bào này rất thấp. Kết quả cho thấy dịch chiết hexan không ức chế tế bào 4T1 tốt bằng ethanol và etyl acetate, có thể do hàm lượng chất có hoạt tính sinh học đối với tế bào ung thư có trong cao chiết này thấp hơn so với hai loại cao chiết ethanol và ethyl acetate. Đối với cao chiết ethanol, ở nồng độ 50 μ g/ml tỷ lệ tế bào sống giảm đáng kể ($P < 0.05$) chỉ còn khoảng 6.21% và ở nồng độ 100 μ g/ml chỉ có khoảng 1% tế bào sống sót. Ở nồng độ 25 μ g/ml quan sát thấy còn ít tế bào sống (khoảng 12.41%), nhưng độ bám trải thấp, cho thấy dịch chiết bắt đầu có khả năng ức chế đáng kể đối với sự phát triển của tế bào ung thư từ nồng độ 12.5 μ g /ml trở đi so với đối chứng ($P < 0.05$). Đối với cao chiết etyl acetate, ở nồng độ 12.5 μ g/ml có độ hợp lưu ở mức trung bình khoảng 50%, khả năng bám trải thấp, ở nồng độ 25 μ g/ml có rất ít tế bào (1.72%) và khả năng bám trải thấp, từ nghiệm thức với nồng độ 50 μ g/ml trở đi không có sự hiện diện ở tế bào sống, chứng tỏ cao chiết đã bắt đầu có khả năng ức chế đáng kể sự phát triển của tế bào ung thư từ nồng độ cao chiết 12.5 μ g/ml trở đi so với đối chứng ($P < 0.05$) (Hình 4, Hình 5). Từ các kết quả trên có thể thấy rằng dịch chiết ethanol và dịch chiết etyl acetate có thể có được hoạt tính kháng tế bào ung thư hiệu quả.

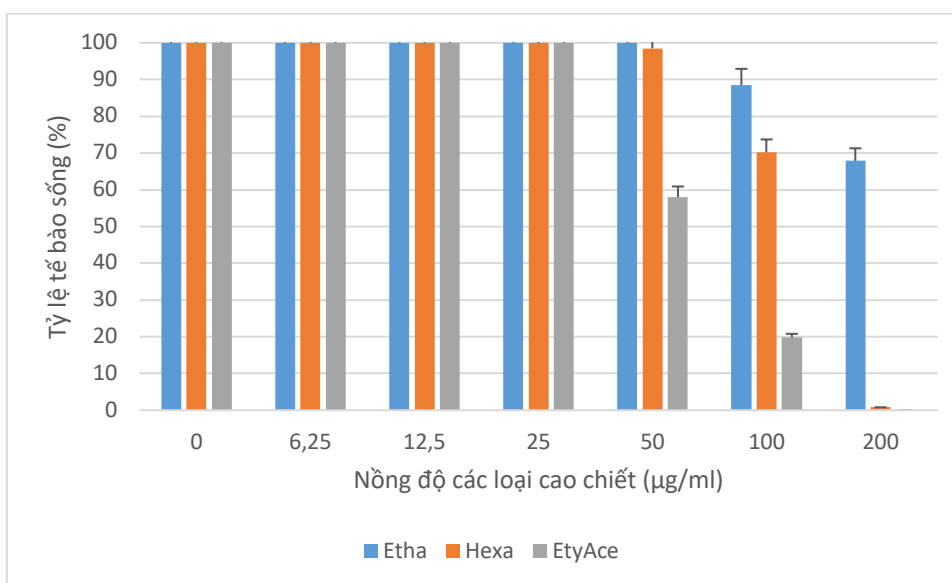


Hình 4 : Tỷ lệ sống của tế bào ung thư 4 T1 sau 72 giờ tiếp xúc với các cao chiết ethanol, hexan, ethyl acetate từ lá trà không

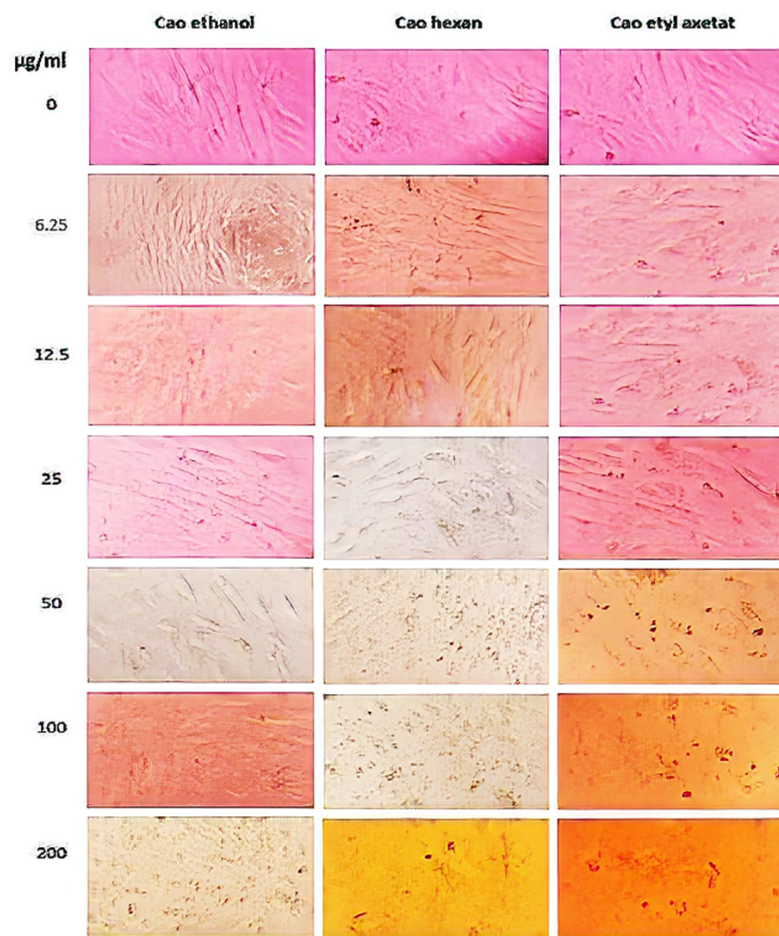


Hình 5. Tế bào 4T1 sau 72 giờ tiếp xúc với các cao chiết từ lá trà không

Thử nghiệm trên tế bào fibroblast, là tế bào bình thường khỏe mạnh, ở nồng độ 50 µg/ml hai loại cao ethanol và hexan không gây độc tế bào khi tỷ lệ tế bào sống đạt tương ứng 100% và 98.5%, trong khi cao ethyl acetate bắt đầu ảnh hưởng đáng kể với khoảng hơn 50% số tế bào còn sống và tới nồng độ 100 µg/ml thì mới gây độc giết chết gần 80% số tế bào so với đối chứng. Cao hexan bắt đầu ảnh hưởng tới tỷ lệ sống của tế bào ở nồng độ 100 µg/ml khi tỷ lệ sống của tế bào giảm xuống còn 70.2% so với đối chứng ($P < 0.05\%$), trong khi cao ethanol tác động tới khả năng sống của tế bào ở nồng độ 200 µg/ml với tỷ lệ sống của tế bào chỉ còn 67.9% so với đối chứng ($P < 0.05\%$).



Hình 6 : Tỷ lệ sống của tế bào fibroblast sau 72 giờ tiếp xúc với các cao chiết ethanol, hexan, ethyl acetate từ lá trà không



Hình 7 : Sự thay đổi của nguyên bào sợi sau 3 ngày ở 3 cao. Độ phóng đại 20x

Hình ảnh tế bào quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 20x cho thấy tế bào fibroblast bám trải tốt khi tiếp xúc với các cao chiết ở nồng độ 25 µg/ml. Tế bào có hiện tượng giảm số lượng và khả năng bám trải bắt đầu xuất hiện ở các nghiệm thức cao chiết ethyl acetate từ 50-200 µg/ml, cao chiết hexan và ethyl acetate đều ở 200 µg/ml (Hình 8). Trong khi đó, ở các nồng độ cao chiết từ 12.5 µg/ml tế bào ung thư đã giảm rất rõ rệt khả năng bám dính và bong lên khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy. Đồng thời hình thái tế bào đã bị biến đổi rõ rệt không còn có cấu trúc và màu sắc hình thoi tươi sáng so với đối chứng (Hình 5).

Từ kết quả thí nghiệm trên tế bào ung thư 4T1 và tế bào bình thường fibroblast có thể thấy ở nồng độ 25 µg/ml cả 2 loại cao chiết ethanol và ethyl acetate đều gây độc mạnh, giết chết hầu hết tế bào ung thư (Hình 5), trong khi đó không có ảnh hưởng gì tới khả năng phát triển của tế bào fibroblast (Hình 6).

Nghiên cứu trên dòng tế bào ung thư MCF-7 cho thấy chiết xuất ethyl acetate ức chế sự tăng sinh tế bào với $IC_{50}=65$ µg/ml [9], trong khi ở nghiên cứu này IC_{50} đối với tế bào 4T1 là 12.5 µg/ml cho thấy hiệu quả diệt tế bào 4T1 rất cao. Sự khác biệt về việc sử dụng sóng siêu âm có thể tăng hàm lượng chất có khả năng gây chết tế bào ung thư, hoặc tác dụng của cao chiết lá trà có thể khác biệt đối với các dòng tế bào ung thư vú khác nhau. Nhiều loại chất có nguồn gốc thực vật trong đó có phenolic và flavonoid được chứng minh có đặc tính chống ung thư trong các mô hình nghiên cứu *in vivo* và *in vitro*. Phenolic có thể làm chết các tế bào ung thư thông qua cơ chế điều chỉnh sự tương tác của yếu tố tăng trưởng với các thụ thể và các tăng tín hiệu tế bào từ đó xác định sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình chết theo lập trình của tế bào [23]. Hoạt tính gây độc tế bào của phenolic ngoài việc thúc đẩy quá trình chết theo lập trình, giảm sự tăng sinh tế bào, còn tác động tới các hoạt động khác của bệnh ung thư như sự hình thành mạch máu, sự biệt hóa và di căn của tế bào ung thư [24]. Flavonoid đóng vai trò quan trọng trong các pha của chu kỳ tế bào dẫn tới các hoạt động chết theo lập trình, tự thực của các tế bào ung thư vú và được coi là hợp chất có tiềm năng trong điều trị ung thư [25, 26]. Hiệu quả diệt tế bào ung thư của các hợp chất phenol [27] và flavonoid từ thực vật đã được báo cáo [28]. Kết quả của nghiên cứu này mới chỉ ở bước đầu khảo sát hàm

lượng của phenolic và flavonoid có trong cao chiết lá trà thu được bằng phương pháp chiết kết hợp sóng siêu âm. Sản phẩm cao chiết tổng ethanol và cao phân đoạn hexan và ethyl acetate ở các nồng độ xác định có thể gây chết tế bào ung thư trong mô hình nghiên cứu *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Các cao chiết được chiết từ bột lá trà cho thấy hàm lượng phenolic và flavonoid thu được cao nhất ở phân đoạn etyl acetate.

Kết quả khảo sát khả năng gây độc tế bào của các cao chiết từ lá trà không đối với tế bào ung thư vú 4T1 và tế bào fibroblast từ chuột cho thấy cao ethanol và ethyl acetate ở nồng độ 25µg/ml có khả năng ức chế tế bào ung thư hiệu quả, trong khi không gây độc đối với tế bào khỏe mạnh. Các chất phenolic và flavonoid được biết đến là có khả năng kháng oxy hóa có trong lá trà có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc ức chế tế bào ung thư và từ đó cho thấy lá trà có thể được sử dụng như một nguồn dược liệu tiềm năng trong liệu pháp điều trị ung thư vú. Các nghiên cứu tiếp theo trên các dòng tế bào ung thư vú khác cần tiếp tục được thực hiện đối với cao chiết lá trà được chiết xuất bằng phương pháp sử dụng các dung môi kết hợp sóng siêu âm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H., J. Ferlay, L. Rebecca, M.P.H. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA. Cancer J. Clin., 2021. 71, doi: 10.3322/caac.21660.
2. Mukherjee A.K., S. Basu, N. Sarkar, A.C. Ghosh, *Advances in cancer therapy with plant based natural products*. Curr Med Chem, 2001. 8(12): p. 1467–1486. doi:10.2174/0929867013372094
3. Gezici S., N. Sekeroglu N., *Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents*. Anticancer Agents Med Chem, 19(1): p. 101-111, 2019. doi: 10.2174/1871520619666181224121004.
4. Arambewela L.S.R., L.D.A.M. Arawwawala, and W.D. Ratnasooriya, *Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of Piper betle leaves in rats*. J. Ethnopharmacol. 2005. 102(2): p. 239–245. doi: 10.1016/j.jep.2005.06.016.
5. Wirotasangthong M., N. Inagaki, H. Tanaka, W. Thanakijcharoenpath, and H. Nagai, *Inhibitory effects of Piper betle on production of allergic mediators by bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells*. Int. Immunopharmacol., 2007. 8(3): p. 453–457. doi: 10.1016/j.intimp.2007.11.005.
6. Singh M., S. Shakya, V. K. Soni, A. Dangi, N. Kumar, and S. M. Bhattacharya, *The n-hexane and chloroform fractions of Piper betle L. trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid Brugia malayi*. Int. Immunopharmacol., 2009. 9(6): p. 716–728. doi: 10.1016/j.intimp.2009.02.012.
7. Dasgupta N. and B. De, *Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro*. Food Chem. 88(2): p. 219–224, 2004. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.036.
8. Widowati W., T. Mozef, C. Risdian, H. Ratnawati, S. Tjahjani, F. Sandra, *The Comparison of Antioxidative and Proliferation Inhibitor Properties of Piper betle L., Catharanthus roseus [L] G.Don, Dendrophloe petandra L., Curcuma manga Val. Extracts on T47D cancer cell line*. International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics, 2011. 1(12): p. 22-28.
9. Abraham N. N., M. S. Kanthimathi, and A. Abdul-Aziz, *“Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase,” BMC Complement. Altern. Med., vol. 12, 2012, doi: 10.1186/1472-6882-12-220.*
10. Shah S.K., G. Garg, *Piper betle: Phytochemical, pharmacological and nutritional value in health management*. International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research, 2016. 38(2): p. 181-189. 2016.
11. Padma P.R., Lalitha V.S., Amonkar A.J., Bhide S.V., *Anticarcinogenic effect of betel leaf extract against tobacco carcinogens*. Cancer Lett. 45(3): 195-202, 1989. doi: 10.1016/0304-3835(89)90077-3.
12. Paranjpe R., S.R. Gundala, N. Lakshminarayana, A. Sagwal, G. Asif, A. Pandey, R. Aneja, *Piper betel leaf extract: anticancer benefits and bio-guided fractionation to identify active principles for prostate cancer management*. Carcinogenesis, 2013. 34(7): p. 1558-66. doi: 10.1093/carcin/bgt066. Epub 2013 Feb 21.
13. Kumar K., S. Srivastav, and V. S. Sharanagat, *Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review*. Ultrasonics Sonochemistry, 2021. 70. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325.

14. Chang C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern, "Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods," *J. Food Drug Anal.*, vol. 10, pp. 178–182, Sep. 2002, doi: 10.38212/2224-6614.2748.
15. Zhou J., Q. Yang, X. Zhu, T. Lin, D. Hao, and J. Xu, "Antioxidant activities of clerodendrum cyrtophyllum turcz leaf extracts and their major components," *PLoS One*, vol. 15, no. 6 June, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0234435.
16. Maisuthisakul P., *Phenolic Antioxidants from Betel Leaf (Piper betel Linn.) Extract Obtained with Different Solvents and Extraction Time*. J. Univ. Thai Chamb. Commer., 2015. 28(2): p. 52–64.
17. Sundang M., S. Nasir, C. Sipaut, and H. Othman, *Antioxidant Activity, Phenolic, Flavonoid and Tannin Content of Piper Betle and Leucosyke Capitella*. Malaysian J. Fundam. Appl. Sci., 2014. 8. doi: 10.11113/mjfas.v8n1.115.
18. Jaiswal S., M. Patel, D. Saxena, and S. Naik, Antioxidant Properties of Piper Betel (L) Leaf Extracts from Six Different Geographical Domain of India. *J. Bioresour. Eng. Technol.*, 2014. 2: p. 12–20.
19. Ali A., C.H. Chong, S.H. Mah, L.C. Abdullah, T.S.Y. Choong, and B.L. Chua, *Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried piper betle extracts*. *Molecules*, 2018. 23(2). doi: 10.3390/molecules23020484.
20. Akter K.N., P. Karmakar, A. Das, S.N. Anonna, S.A. Shoma, and M.M. Sattar, *Evaluation of antibacterial and anthelmintic activities with total phenolic contents of Piper betel leaves*. *Avicenna J Phytomed*, 2014. 4(5): p. 320-329.
21. Chakraborty D. and B. Shah, *Antimicrobial, anti-oxidative and anti-hemolytic activity of Piper betel leaf extracts*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011. 3: p. 192–199.
22. Nguyen L.T.T., T.T. Nguyen, H.N. Nguyen, and Q.T. P. Bui, *Simultaneous determination of active compounds in Piper betle Linn. leaf extract and effect of extracting solvents on bioactivity*. *Eng. Reports*, 2020. 2(10): p. 2–9. doi: 10.1002/eng2.12246.
23. Wahle K.W.J., I. Brown, D. Rotondo, S.D. Heys, *Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. 698: p. 36-51. doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_4.
24. Abotaleb M., A. Liskova, P. Kubatka, D. Büsselberg, *Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer*. *Biomolecules*, 2020. 10(2): p. 221. doi:10.3390/biom10020221.
25. Fantini M, M. Benvenuto, L. Masuelli, G. V. Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti, R. Bei. *In vitro and in vivo antitumoral effects of combination of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment*. *Int J Mol Sci.*, 2012. 16(5): p. 9236-82. Doi: 10.3390/ijms16059236.
26. Huỳnh Ngọc Trung Dung, Nguyễn Trọng Tường. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa, ức chế α -glucosidase và gây độc tế bào ung thư vú (MCF-7), ung thư cổ tử cung (HeLa) của cao chiết từ các loài hoa vạn thọ (*Tagetes erecta* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2020. 56(6B): 128-138. doi:10.22144/ctu.jvn.2020.151.
27. Zhang H.W, J.J. Hu, R.Q. Fu, X. Liu, Y.H. Zhang, J. Li, L. Liu, Y.N. Li, Q. Deng, Q.S. Luo, Q. Ouyang, N. Gao, *Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K γ mediated I3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells*. *Scientific Reports*, 2018. 8: p. 11255.
28. Zhang Z., J. Shi, E.C. Nice, C. Huang, Z. Shi, *The multifaceted role of flavonoids in cancer therapy: leveraging autophagy with a double-edged sword*. *Antioxidants (Basel)*. 10(7): p. 1138. 2021. doi: 10.3390/antiox10071138.

INVESTIGATION OF FLAVONOID, PHENOLIC CONTENTS AND THE ABILITY TO KILL BREAST CANCER CELL 4T1 OF BETEL LEAF EXTRACTS

NGUYEN THI KIM ANH^{1*}, CAO ĐOAN HUYEN¹, NGUYEN HOANG LAM¹, LAM HOANG ANH THU², HOANG THUY DUONG²

1. *Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Hochiminh City*

2. *Biotechnology Laboratory, R&D Center, Saigon Hi-tech Park, Hochiminh City*

*Corresponding author: nguyenthikimanh@iuh.edu.vn

Abstracts. Breast cancer is a leading cause of cancer death in women. Plant-based active ingredients that can inhibit the growth of cancer cells can be used to replace or support treatment, besides chemotherapy, radiation and surgery measures. Betel leaves are used in folk remedies in Vietnam with many therapeutic effects. In this study, the extracts of ethanol, hexane and ethyl acetate from betel leaves will be investigated for their flavonoid, phenolic components and their ability to induce cytotoxicity against breast cancer cell-line 4T1. The results showed that the flavonoid content was 49.71, 37.40, 21.34 mg QE/g and the phenolic

content was 684.23, 368.34, 318.82 GAE/g in ethanol, hexane, and ethyl acetate, respectively. At a concentration of 25 µg/ml, both ethanol and ethyl acetate extracts were highly toxic, killing most cancer cells, while having no effect on the growth ability of normal fibroblast cells.

Keywords. Flavonoids, phenolics, betel leaf, 4T1 cells, fibroblast cells, breast cancer

Ngày nhận bài: 29/12/2022

Ngày chấp nhận đăng: 24/02/2023