

## GROWTH INHIBITORY ACTIVITY OF *ELSHOLTZIA CILIATA* (THUNB.) HYLAND EXTRACT ON LIVER CANCER CELLS HEPG2

Le Thi Thanh Huong<sup>1\*</sup>, Mai Van Linh<sup>1</sup>, Pham Ngo Minh Chau<sup>2</sup>

Cao Quoc Khanh<sup>2</sup>, Pham Van Khang<sup>3</sup>, Nguyen Phu Hung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TNU - University of Sciences

<sup>2</sup>Thai Nguyen Specialized High School, <sup>3</sup>TNU - University of Education

| ARTICLE INFO                 | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Received:</b> 22/11/2022  | Liver cancer is the leading cancer causing death in the world. Studies on the anti-cancer potential of many other herbal species are of current interest. <i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyland belongs to the genus <i>Elsholtzia</i> and is commonly used as a spice. It is also used as a remedy for colds and flu. However, its ability to inhibit liver cancer cells has not been studied. In this study, the methods of culture, cytotoxicity analysis, cell cycle and apoptosis are applied to evaluate the anti-cancer ability of <i>Elsholtzia ciliata</i> extract. The results showed that the leaf extract of <i>Elsholtzia ciliata</i> changed cell morphology at concentrations from 100 - 200 µg/mL compared to control. The extract effectively inhibited the proliferation of HepG2, the percentage of viable cells reduced to $41 \pm 10.5\%$ (at concentration of 100 µg/mL) and $20.4 \pm 7.7\%$ (at concentration of 200 µg/mL) compared to the control ( $P < 0.05$ ). The extract stopped the cell cycle at G0/G1 phase ( $62.1 \pm 3.5\%$ vs $51.3 \pm 4.2\%$ , $P < 0.05$ ) and induced cellular apoptosis ( $P < 0.05$ ). This study shows that <i>Elsholtzia ciliata</i> is a potential herb against liver cancer cells. |
| <b>Revised:</b> 26/12/2022   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Published:</b> 30/01/2023 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>KEYWORDS</b>              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Elsholtzia ciliata</i>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Live cancer                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Cell cycle                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Apoptosis                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Anti-cancer                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

## HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TẾ BÀO UNG THƯ GAN HEPG2 CỦA CAO CHIẾT CÂY *ELSHOLTZIA CILIATA* (THUNB.) HYLAND

Lê Thị Thanh Hương<sup>1\*</sup>, Mai Văn Linh<sup>1</sup>, Phạm Ngô Minh Châu<sup>2</sup>

Cao Quốc Khánh<sup>2</sup>, Phạm Văn Khang<sup>3</sup>, Nguyễn Phú Hùng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học - ĐHTH Thái Nguyên, <sup>2</sup>Trường Trung học phổ thông Chuyên Thái Nguyên

<sup>3</sup>Trường Đại học Sư phạm - ĐHTH Thái Nguyên

| THÔNG TIN BÀI BÁO                  | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ngày nhận bài:</b> 22/11/2022   | Ung thư gan là loại ung thư đứng đầu về tỷ lệ gây chết. Các nghiên cứu về tiềm năng chống ung thư từ nhiều loài thảo dược khác nhau đang được quan tâm hiện nay. <i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyland thuộc chi <i>Elsholtzia</i> được sử dụng phổ biến như một loại gia vị và vị thuốc chữa cảm cúm. Tuy nhiên, khả năng ức chế tế bào ung thư gan của nó còn chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, các phương pháp nuôi cấy, phân tích độc tính tế bào, chu kỳ tế bào và apoptosis được áp dụng để đánh giá khả năng kháng ung thư của cao chiết từ cây <i>Elsholtzia ciliata</i> . Kết quả cho thấy, cao chiết từ lá của cây <i>Elsholtzia ciliata</i> đã làm thay đổi hình thái tế bào ở nồng độ từ 100 - 200 µg/mL. Cao chiết đã kìm hãm hiệu quả sự tăng sinh của HepG2, tỷ lệ tế bào sống giảm xuống còn $41 \pm 10,5\%$ (ở nồng độ 100 µg/mL) và $20,4 \pm 7,7\%$ (ở nồng độ 200 µg/mL) so với đối chứng ( $P < 0,05$ ). Cao chiết đã làm dừng chu kỳ tế bào ở pha G0/G1 ( $62,1 \pm 3,5\%$ so với $51,3 \pm 4,2\%$ , $P < 0,05$ ) và gây chết tế bào theo con đường apoptosis ( $P < 0,05$ ). Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, <i>Elsholtzia ciliata</i> là thảo dược tiềm năng chống lại tế bào ung thư gan. |
| <b>Ngày hoàn thiện:</b> 26/12/2022 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Ngày đăng:</b> 30/01/2023       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>TỪ KHÓA</b>                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>Elsholtzia ciliata</i>          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Ung thư gan                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Chu kỳ tế bào                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Apoptosis                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Kháng ung thư                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6963>

\* Corresponding author. Email: [huonglth@tnu.edu.vn](mailto:huonglth@tnu.edu.vn)

## 1. Giới thiệu

Ung thư gan là nguyên nhân gây tử vong đứng đầu trong các bệnh ung thư trên toàn thế giới. Virus viêm gan được xem là nguyên nhân chính của ung thư gan, bên cạnh đó là các yếu tố khác như thực phẩm ô nhiễm, lạm dụng rượu bia [1]. Ở Việt Nam, ung thư gan là loại ung thư có tỷ lệ tử vong cao nhất, chiếm 25% số ca tử vong do ung thư. Trong những năm gần đây, với những nỗ lực trong giảm thiểu ung thư gan của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) thì tỷ lệ ung thư gan đã giảm đáng kể. Tuy nhiên, do sự gia tăng dân số, số lượng bệnh nhân ung thư gan vẫn đang gia tăng [2]. Phẫu thuật cắt bỏ các phần gan bị ung thư là phương pháp điều trị chính, tuy nhiên tỷ lệ tái phát của ung thư gan vẫn được ghi nhận là rất cao (trên 70%) [3]. Sự phát triển của ung thư gan cũng như các loại ung thư khác đều bắt nguồn từ những tổn thương DNA, biến đổi biểu sinh, hoặc rối loạn sự hoạt động của các con đường tín hiệu nội bào, mà điển hình là chu kỳ tế bào và apoptosis, dẫn đến sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào [4], [5]. Do đó, hướng nghiên cứu thuốc chống ung thư tác động lên con đường apoptosis và chu kỳ phân chia của tế bào được quan tâm hiện nay [6]. Khác với thuốc điều trị ung thư tổng hợp đang sử dụng hiện nay, nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, các hợp chất tự nhiên có thể gây độc có chọn lọc đối với các tế bào ung thư nhưng ít độc hơn đối với cơ thể, cũng như cải thiện tình trạng kháng thuốc, không đáp ứng điều trị sau khi sử dụng thuốc [7], [8].

*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland thuộc chi *Elsholtzia*, họ Hoa môi (Lamiaceae), là cây thân thảo phân bố ở Nga (Siberia), Mông Cổ, Triều Tiên, Nhật Bản, Ấn Độ, bán đảo Đông Dương, Trung Quốc, đồng thời du nhập và trồng ở châu Âu và Bắc Mỹ. *Elsholtzia ciliata* yêu cầu thấp về môi trường sinh trưởng, chu kỳ sinh trưởng ngắn, ra hoa từ tháng 7 đến tháng 10, thu hoạch vào mùa hè và thu [9]. Ở Việt Nam, *Elsholtzia ciliata* phân bố rộng rãi ở hầu hết các tỉnh trong cả nước với tên thường gọi khác nhau là cây Khương giới, Kinh giới, Giả tô và Bạch tô, được sử dụng rộng rãi làm gia vị. Ngoài ra, loài thực vật này còn sử dụng như một vị thuốc chữa cảm sốt, cúm, nhức đầu, hoa mắt, viêm họng, đau rát họng, đau họng đỏ, sỏi; chữa thổ huyết, băng huyết, rong huyết, đại tiện ra máu [10]. Có khoảng trên 350 hợp chất đã được xác định từ *Elsholtzia ciliata*. Các flavonoid và terpenoid là thành phần chính làm cho *Elsholtzia ciliata* có khả năng kháng khuẩn, chống viêm và chống oxy hóa. Terpenoid như 3-carene và một số hợp chất thơm như carvacrol thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Một số polysacaride có thể ức chế sự phát triển của các tế bào khối u và cho thấy tác dụng tích cực trong điều hòa miễn dịch [11]. Với đặc tính chống viêm và chống oxy hóa, *Elsholtzia ciliata* có khả năng là một thảo dược tiềm năng trong điều trị các loại ung thư khác nhau. Lauryna Pudziuleviciute và cộng sự đã ghi nhận tinh dầu chiết xuất từ *Elsholtzia ciliata* có khả năng kìm hãm sự phát triển của các dòng tế bào ung thư Panc-1 và MDA-MB231 [8]. Hiện nay, thành phần chính của *Elsholtzia ciliata* đã được nghiên cứu sơ bộ, tuy nhiên, các nghiên cứu cụ thể về dược tính của *Elsholtzia ciliata* trên các dòng tế bào ung thư vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động gây độc của cao chiết *Elsholtzia ciliata* lên hình thái, sự phân chia cũng như chu kỳ tế bào và apoptosis trên dòng tế bào ung thư gan HepG2.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Mẫu vật nghiên cứu và thu dịch chiết

Mẫu cây *Elsholtzia ciliata* được thu tại Đồng Hỷ, Thái Nguyên (Hình 1). Tiêu bản mẫu khô được lưu trữ tại Phòng Thí Nghiệm Y sinh, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên. Mẫu lá làm sạch bằng nước cất và được sấy ở nhiệt độ 40°C cho tới khi khô hoàn toàn. Tiếp theo, mẫu lá sau khi sấy được nghiền trong cối sứ thành dạng bột mịn trước khi tiến hành chiết bằng cồn. Cân 5 gram bột lá và bổ sung 20 mL ethanol 90% vào ống falcon, ủ lắc trong 48h ở nhiệt độ 37°C. Lọc bỏ bã và thu lại dịch chiết, bay hơi cồn trong tủ sấy ở 40°C trong 48h. Hòa tan cao chiết trong dung môi Dimethylsulfoxide (DMSO) >99,5%, (Catalog number: 85190, Thermofisher) và tiến hành lọc dịch qua màng lọc 0,22 µm và lưu trữ ở -20°C.



**Hình 1.** Mẫu cây *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland được sử dụng trong nghiên cứu

## 2.2. Phân tích hình thái và tốc độ phân chia tế bào

Các tế bào HepG2 được nuôi trong 100  $\mu\text{L}$  môi trường RPMI 1640 (Gibco, Thermofisher) trong đĩa 96 giếng với mật độ 10.000 tế bào cho một giếng. Sau 24h, loại bỏ môi trường cũ, thêm một thể tích tương ứng của môi trường mới chứa hàm lượng cao chiết từ 0 - 200  $\mu\text{g/mL}$  và tiếp tục nuôi cấy trong 48h. Tiếp theo, sự thay đổi về kiểu hình của tế bào được quan sát và chụp ảnh bằng phần mềm chuyên dụng của hệ thống kính Ts2 (NIKON).

## 2.3. Sàng lọc MTT

Sau 48h ủ với môi trường có cao chiết, tế bào được xử lý bằng một môi trường thay thế có chứa hóa chất 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Thermofisher) ở nồng độ 0,5 mg/mL và tiếp tục nuôi cấy trong 2h để chuyển hóa cơ chất này thành các tinh thể formazan. Bước tiếp theo, 100  $\mu\text{L}$  dung môi DMSO được bổ sung để thay thế cho môi trường chứa MTT và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sử dụng pipette trộn đều giếng chứa tế bào để làm tan hoàn toàn các tinh thể formazan. Đo độ hấp thụ của các giếng nuôi cấy ở bước sóng 570 nm bằng máy phân tích quang phổ Multiskan Sky Spectrophotometer (Thermofisher).

Tính toán sự thay đổi về mức độ tăng sinh theo công thức: % tăng sinh tế bào so với đối chứng =  $(\text{OD giếng xử lý với dịch chiết} / \text{OD giếng đối chứng}) \times 100$

Giá trị ức chế 50% sự tăng sinh tế bào (IC50) được tính toán bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0 theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

## 2.4. Phân tích sự thay đổi chu kỳ tế bào và apoptosis

Sau 48h hoặc 72h ủ với môi trường chứa cao chiết hoặc không chứa cao chiết (đối chứng), toàn bộ tế bào được rửa bằng dung dịch đệm Phosphat buffered saline (PBS) và được thu lại bằng cách ủ với trypsin (0,5%) trong 3 phút. Trung hòa trypsin bằng môi trường nuôi cấy tế bào. Tế bào được cố định bằng dung dịch ethanol 70% qua đêm trong tủ  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ly tâm thu tế bào ở tốc độ 3.000 rpm/phút trong 3 phút. Nhuộm nhân tế bào bằng dung dịch PBS chứa chất phát huỳnh quang propidium iodide (50  $\mu\text{g/mL}$ ) trong 1h. Tế bào được phân tích chu kỳ và apoptosis bằng hệ thống dòng chảy tế bào BD Accuri C6 Plus. Dữ liệu thu được cho 100.000 sự kiện và được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng đi kèm hệ thống.

## 2.5. Nhuộm nhân tế bào bằng thuốc nhuộm DAPI

Tế bào đối chứng và các tế bào xử lý với cao chiết đều được thu nhận bằng trypsin và rửa bằng PBS 2 lần. Tiếp theo, dung dịch 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermofisher) có nồng độ 10  $\mu\text{g/mL}$  được bổ sung vào ống chứa tế bào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 3000 rpm/phút trong 3 phút, loại bỏ dung dịch chứa DAPI và bổ sung 100  $\mu\text{L}$  PBS. Chuyển 30  $\mu\text{L}$  dung dịch chứa tế bào lên lam kính và quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang với kính lọc

dành cho DAPI. Hình ảnh nhân tế bào được chụp và phân tích bằng phần mềm chuyên dụng đi kèm hệ thống kính T2U.

## 2.6. Phân tích dữ liệu

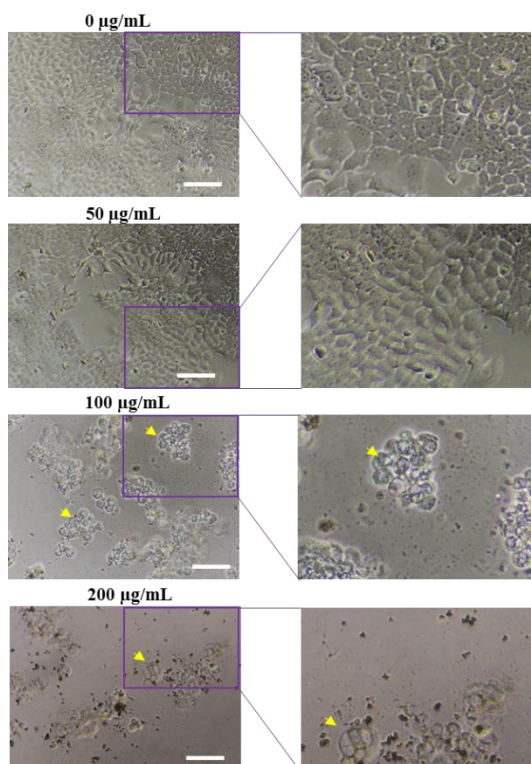
Toàn bộ dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0, kiểm định Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Cao chiết *Elsholtzia ciliata* làm thay đổi hình dạng của tế bào HepG2

Trong nghiên cứu này, để đánh giá tác động của cao chiết *Elsholtzia ciliata* lên hình thái tế bào ung thư gan HepG2, nhóm nghiên cứu tiến hành nuôi cấy các tế bào ung thư gan HepG2 trong môi trường nuôi cấy bám dính (nuôi cấy 2D) thích hợp có bổ sung thêm cao chiết *Elsholtzia ciliata* ở các nồng độ khác nhau từ 0 - 200  $\mu\text{g/mL}$ . Sau 48h nuôi cấy, các tế bào nuôi cấy được quan sát dưới kính hiển vi quang học để đánh giá sự thay đổi hình thái tế bào trong các môi trường có nồng độ cao chiết khác nhau. Hình ảnh các tế bào nuôi cấy được ghi lại trong Hình 2.

Quan sát hình thái các tế bào nuôi cấy trong Hình 2 cho thấy, trong mẫu nuôi cấy ở môi trường không có cao chiết *Elsholtzia ciliata* (nồng độ 0  $\mu\text{g/mL}$ ), các tế bào nuôi cấy HepG2 có hình ovan hoặc thoi liên kết với nhau thành đám tế bào và bao phủ phần lớn bề mặt đĩa nuôi cấy. Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 50  $\mu\text{g/mL}$  cao chiết, các tế bào không có sự thay đổi rõ rệt về hình thái so với các tế bào nuôi cấy trong môi trường đối chứng (0  $\mu\text{g/mL}$ ). Các tế bào nuôi cấy có hình dạng đặc trưng, tế bào chất đồng đều, không quan sát thấy các tế bào có hình dạng bất thường. Như vậy, ở mức nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$  sau 24h tiếp xúc, cao chiết *Elsholtzia ciliata* không có ảnh hưởng rõ rệt đến hình thái của các tế bào nuôi cấy HepG2. Tuy nhiên, một số khoảng trống trên bề mặt đĩa nuôi cấy đã xuất hiện, điều này cho thấy đã có sự giảm đáng kể về tốc độ nhân lên của tế bào.



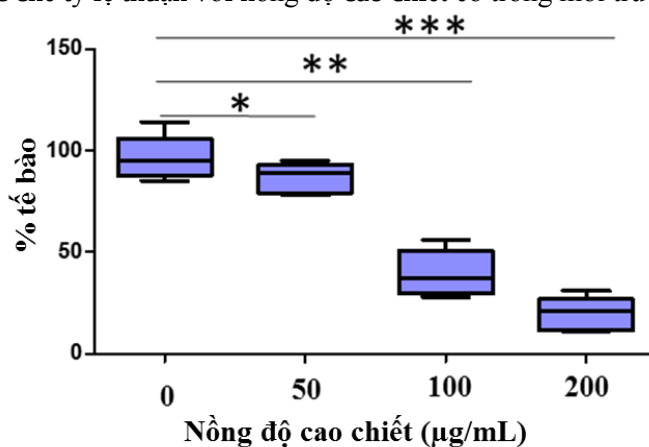
**Hình 2.** Tế bào HepG2 được nuôi cấy với cao chiết *Elsholtzia ciliata* ở nồng độ từ 0 - 200  $\mu\text{g/mL}$ . Mũi tên màu vàng chỉ sự thay đổi về kiểu hình của tế bào. Thang đo 50  $\mu\text{m}$

Trong môi trường bổ sung 100 - 200  $\mu\text{g/mL}$  cao chiết *Elsholtzia ciliata*, các tế bào nuôi cấy có sự thay đổi hình thái so với các tế bào đối chứng. Các tế bào nuôi cấy HepG2 phát triển co cụm thành từng mảng tế bào, có xuất hiện các khoảng trống lớn trên bề mặt môi trường nuôi cấy không có tế bào phát triển. Hơn nữa, có thể quan sát được sự xuất hiện của các tế bào có hình thái giống với các tế bào apoptosis với các đặc điểm đặc trưng như tế bào co nhỏ có hình cầu hoặc gần hình cầu. Một số tế bào quan sát được có kiểu hình đặc trưng của tế bào chết (mũi tên màu vàng). Trên cùng một diện tích nuôi cấy chỉ quan sát thấy rất ít các tế bào nuôi cấy tồn tại so với đối chứng.

Như vậy có thể thấy được, cao chiết từ lá cây *Elsholtzia ciliata* có tác động đến hình thái và khả năng nhân lên của tế bào ung thư gan HepG2 trong môi trường nuôi cấy. Các tế bào nuôi cấy chịu tác động của cao chiết có xu hướng chuyển sang dạng tế bào apoptosis (tế bào chết và nhân cô đặc, tế bào co nhỏ), sau đó chuyển hẳn sang kiểu hình chết. Sự thay đổi hình thái tế bào phụ thuộc vào nồng độ cao chiết có trong môi trường nuôi cấy.

### 3.2. Cao chiết *Elsholtzia ciliata* kìm hãm sự phân chia đối với tế bào HepG2

Cao chiết *Elsholtzia ciliata* có nồng độ từ 0 - 200  $\mu\text{g/mL}$  đã được bổ sung vào các giếng nuôi cấy để đánh giá khả năng kìm hãm sự tăng sinh của loại thảo dược này đối với tế bào ung thư HepG2. Kết quả phân tích MTT được thể hiện trong Hình 3 cho thấy, cao chiết ở nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$  đã làm giảm số lượng tế bào nuôi cấy xuống còn khoảng  $90 \pm 6,8\%$  so với đối chứng, sự khác biệt này là đáng kể ( $P < 0,05$ ). Trong môi trường có bổ sung 100  $\mu\text{g/mL}$  cao chiết *Elsholtzia ciliata*, số lượng tế bào nuôi cấy giảm mạnh, chỉ còn xấp xỉ  $41 \pm 10,5\%$  so với đối chứng. Ở nồng độ 200  $\mu\text{g/mL}$  tỷ lệ tế bào sống còn lại so với đối chứng là  $20,4 \pm 7,7\%$ . Giá trị  $\text{IC}_{50}$  được xác định là 80  $\mu\text{g/mL}$ . Như vậy, cao chiết *Elsholtzia ciliata* có khả năng kìm hãm sự phân chia tế bào HepG2 và mức độ ức chế tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết có trong môi trường nuôi cấy.

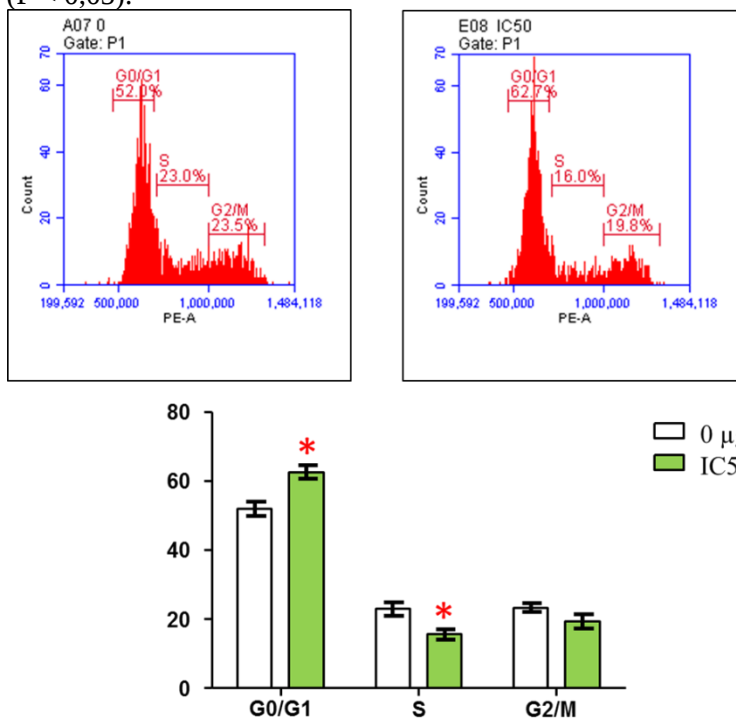


**Hình 3.** Tế bào HepG2 được nuôi cấy với cao chiết *Elsholtzia ciliata* ở nồng độ từ 0 - 200  $\mu\text{g/mL}$  trong 48h.  $n = 5$  cho mỗi nồng độ. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

Các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra, chiết xuất từ cây *Elsholtzia ciliata* có chứa phenol, tinh dầu, flavonoid, steroid và triterpenes [11]. Không chỉ được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để điều trị nhiều chứng bệnh khác nhau, *Elsholtzia ciliata* cũng đã được ghi nhận có khả năng kìm hãm sự phát triển của một số dòng tế bào ung thư khác nhau. Lauryna Pudziuvelyte và cộng sự đã ghi nhận tinh dầu chiết xuất từ *Elsholtzia ciliata* có khả năng kìm hãm sự phát triển của các dòng tế bào ung thư tụy Panc-1, dòng tế bào ung thư vú MDA-MB231 ở các mức độ khác nhau. Tuy nhiên, không ghi nhận bất kỳ tác động kìm hãm nào đối với dòng u nguyên bào thần kinh U87 [8]. Kết quả nghiên cứu này đã bổ sung thêm dữ liệu về khả năng kháng lại tế bào ung thư gan của cây *Elsholtzia ciliata*.

### 3.3. Cao chiết *Elsholtzia ciliata* cảm ứng sự dừng chu kỳ phân chia tế bào

Phân tích tác động của cao chiết *Elsholtzia ciliata* lên chu kỳ tế bào được thực hiện bằng Flow cytometry sau khi xử lý tế bào ở nồng độ IC<sub>50</sub> (80 µg/mL) trong 48h. Kết quả tỷ lệ các pha được so sánh với tỷ lệ các pha của các tế bào không được xử lý với dịch chiết (Hình 4). Kết quả thu được đã cho thấy, các tế bào chịu tác động của cao chiết *Elsholtzia ciliata* trong 48h có tỷ lệ các pha chu kỳ tế bào thay đổi so với đối chứng. Cụ thể, tỷ lệ các tế bào nuôi cấy ở pha G0/G1 đã tăng đáng kể  $62,1 \pm 3,5\%$  so với  $51,3 \pm 4,2\%$  của tế bào đối chứng và có sự giảm đáng kể về tỷ lệ tế bào ở pha S ( $P < 0,05$ ).



**Hình 4.** Ảnh hưởng của cao chiết *Elsholtzia ciliata* lên chu kỳ tế bào. Tế bào HepG2 được nuôi cấy với cao chiết ở nồng độ từ 0 µg/mL (đối chứng) và nồng độ IC<sub>50</sub> (80 µg/mL) trong 48h và được phân tích bằng Flow cytometry.  $n = 3$  cho mỗi nồng độ.  $*P < 0,05$

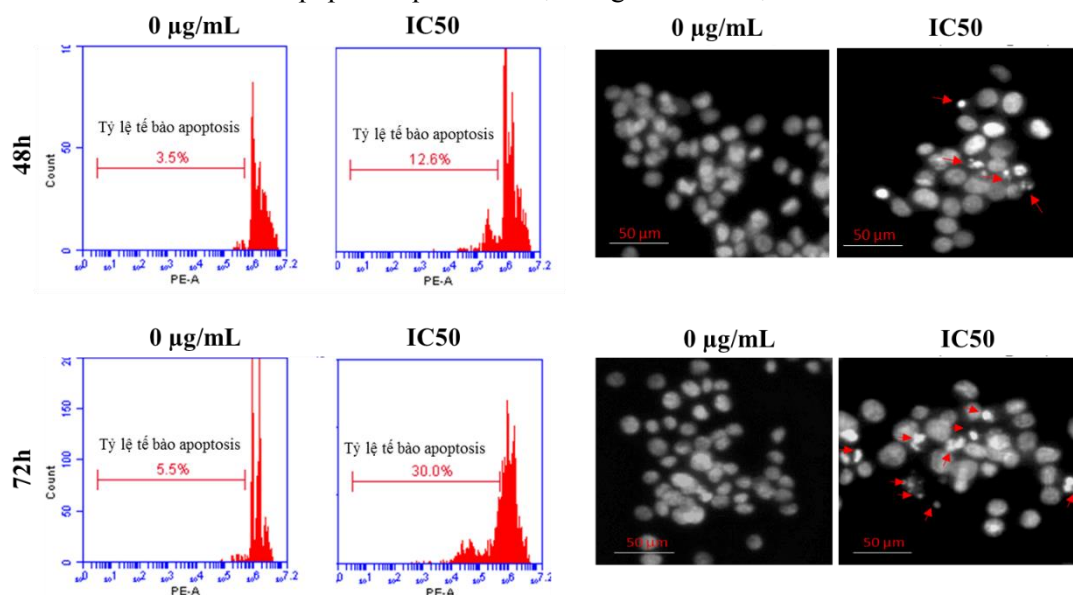
Sự rối loạn chu kỳ phân chia trong các tế bào ung thư đã dẫn tới sự phân chia mất kiểm soát của tế bào. Chính vì vậy, một trong những cơ chế ức chế của các thuốc chống ung thư là khả năng ức chế chu kỳ tế bào [4]. Nhiều hợp chất từ thực vật trong các nghiên cứu khác nhau được chứng minh là có tác động ức chế sự phát triển của tế bào ung thư thông qua cơ chế làm chu kỳ tế bào. Charlette và cộng sự gần đây đã chỉ ra, dịch chiết từ cây *Moringa oleifera* Lam. làm dừng chu kỳ phân bào và làm tăng tỷ lệ tế bào apoptosis đối với tế bào ung thư gan [6]. Bhuyan và nhóm nghiên cứu đã cho thấy, dịch chiết từ lá của cây *Eucalyptus microcorys* F. Muell. làm dừng chu kỳ tế bào tại pha G2/M ở tế bào ung thư tuyến tụy MIA PaCa-2, làm tăng tỷ lệ tế bào ở pha này từ 29% ở mẫu đối chứng lên 34% ở mẫu xử lý với dịch chiết *Eucalyptus microcorys* [12]. Huang và cộng sự đã chứng minh rằng, chiết xuất Dâu tằm (Mulberry extract) làm dừng chu kỳ phân chia tế bào tại pha G2/M [13]. Dữ liệu thu được trong nghiên cứu này của chúng tôi đã cho thấy, dịch chiết của cây *Elsholtzia ciliata* đã gây ra sự tích lũy tế bào ở pha G0/G1 đối với tế bào ung thư gan HepG2.

### 3.4. Cao chiết *Elsholtzia ciliata* làm tăng tỷ lệ chết apoptosis của tế bào HepG2

Các quan sát về hình thái cho thấy, các tế bào HepG2 trong môi trường nuôi cấy chịu tác động của cao chiết *Elsholtzia ciliata* có xu hướng biến đổi hình thái tế bào giống với các tế bào apoptosis. Để khẳng định lại khả năng gây apoptosis, tế bào sau khi được xử lý với nồng độ IC<sub>50</sub>

(80  $\mu\text{g/mL}$ ) trong 48h và 72h được phân tích apoptosis bằng Flow cytometry và nhuộm hình thái nhân với thuốc nhuộm DAPI để phát hiện kiểu nhân apoptosis. Kết quả phân tích được thể hiện trong Hình 5.

Kết quả cho thấy, sau 48h nuôi cấy trong môi trường chứa cao chiết *Elsholtzia ciliata*, tỷ lệ tế bào apoptosis tăng từ 3,5% lên 12,6%. Kết quả nhuộm tế bào nuôi cấy bằng DAPI cho thấy, đối với các tế bào nuôi cấy trong điều kiện không có cao chiết, các tế bào có nhân đặc trưng, chất nhuộm phân bố đồng đều. Đối với các tế bào nuôi cấy trong điều kiện có tiếp xúc với cao chiết, đã quan sát thấy một số tế bào bắt màu mạnh với chất nhuộm nhân DAPI, thể tích vùng bắt màu nhỏ thể hiện vùng nhân tế bào cô đặc và bị phân mảnh. Đây là những đặc trưng quan sát được ở các tế bào đang trải qua quá trình apoptosis. Tỷ lệ tế bào apoptosis tăng từ 5,5% lên 30% cũng như tế bào có kiểu nhân apoptosis quan sát được tăng lên rất rõ rệt.



**Hình 5.** Cao chiết *Elsholtzia ciliata* gây apoptosis ở tế bào HepG2.

Mũi tên màu đỏ chỉ kiểu nhân tế bào apoptosis. Thang đo 50 nm

Apoptosis là một trong những phương thức chủ yếu để cơ thể loại bỏ các tế bào sai hỏng về DNA, đó cũng là cách thức cơ thể chống lại sự phát sinh ung thư thông qua việc loại bỏ các tế bào ung thư [5]. Trong những năm gần đây, việc sàng lọc các thảo dược có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào thông qua cơ chế gây chết tế bào bằng con đường apoptosis được đặc biệt quan tâm vì ít bị các ảnh hưởng không mong muốn so với các hóa chất điều trị ung thư hiện đang được sử dụng [7].

Như vậy, kết quả nghiên cứu này đã khẳng định được kiểu hình biến đổi của các tế bào sau khi tiếp xúc với cao chiết *Elsholtzia ciliata* là các tế bào apoptosis.

#### 4. Kết luận

Cao chiết từ lá cây *Elsholtzia ciliata* làm giảm sự tăng lên về số lượng của tế bào ung thư gan HepG2 trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* thông qua cơ chế ức chế chu kỳ của tế bào, đồng thời gây ra sự chết tế bào theo con đường apoptosis. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng, *Elsholtzia ciliata* là loài cây thuốc phổ biến nhưng có tiềm năng chống lại các tế bào ung thư gan.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 68, pp. 394-424, 2018.

- 
- [2] T. Akinyemiju, S. Abera, M. Ahmed, N. Alam, M. A. Alemayohu, C. Allen *et al.*, "The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015," *JAMA oncology*, vol. 3, pp. 1683-1691, 2017.
- [3] J. Bruix and M. Sherman, "Management of hepatocellular carcinoma: an update," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 53, p. 1020, 2011.
- [4] M. Dickson and G. K. Schwartz, "Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy," *Current oncology*, vol. 16, pp. 36-43, 2009.
- [5] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicologic pathology*, vol. 35, pp. 495-516, 2007.
- [6] C. Tiloke, A. Phulukdaree, R. M. Gengan, and A. A. Chuturgoon, "Moringa oleifera aqueous leaf extract induces cell-cycle arrest and apoptosis in human liver hepatocellular carcinoma cells," *Nutrition and cancer*, vol. 71, pp. 1165-1174, 2019.
- [7] B. A. Carneiro and W. S. El-Deiry, "Targeting apoptosis in cancer therapy," *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 17, pp. 395-417, 2020.
- [8] L. Pudziuvelyte, M. Stankevicius, A. Maruska, V. Petrikaite, O. Ragazinskiene, G. Draksiene *et al.*, "Chemical composition and anticancer activity of Elsholtzia ciliata essential oils and extracts prepared by different methods," *Industrial crops and products*, vol. 107, pp. 90-96, 2017.
- [9] F. Wang, X. Liu, Y. Chen, Y. An, W. Zhao, L. Wang *et al.*, "Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyland: A Review of Phytochemistry and Pharmacology," *Molecules*, vol. 27, p. 6411, 2022.
- [10] D. T. Nguyen, H. Tran, S. Schwaiger, H. Stuppner, and S. Marzocco, "Effect of Non-Volatile Constituents of Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl. from Southern Vietnam on Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Release in Macrophages," *Chemistry & Biodiversity*, vol. 18, p. e2000577, 2021.
- [11] H.-H. Kim, J.-S. Yoo, H.-S. Lee, T. K. Kwon, T.-Y. Shin, and S.-H. Kim, "Elsholtzia ciliata inhibits mast cell-mediated allergic inflammation: role of calcium, p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$  B," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 236, pp. 1070-1077, 2011.
- [12] D. J. Bhuyan, Q. V. Vuong, D. R. Bond, A. C. Chalmers, M. C. Bowyer, and C. J. Scarlett, "Eucalyptus microcorys leaf extract derived HPLC-fraction reduces the viability of MIA PaCa-2 cells by inducing apoptosis and arresting cell cycle," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 105, pp. 449-460, 2018.
- [13] H.-P. Huang, Y.-C. Chang, C.-H. Wu, C.-N. Hung, and C.-J. Wang, "Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun," *Food Chemistry*, vol. 129, pp. 1703-1709, 2011.