

NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG KHÁNG UNG THƯ, CHỐNG OXY HÓA CỦA CÂY THUỐC VIỆT NAM BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Mã số : 822004

Người chủ trì : **PGS.TS. HỒ HUỖNH THÙY DƯƠNG**

Cơ quan : Trường ĐH Khoa học Tự Nhiên – ĐHQG Tp HCM

Địa chỉ : 227, Nguyễn Văn Cừ, Q.5, Tp HCM

Điện thoại : 8 304 924

Thành viên tham gia : 09

1. Tóm tắt mục đích, nội dung nghiên cứu

Mục tiêu dài hạn của đề tài là góp phần đánh giá nguồn lợi cây thuốc Việt Nam nhằm có hướng khai thác và bảo tồn hợp lý

Mục tiêu ngắn hạn là xây dựng một hệ thống các phương pháp hiện đại để nghiên cứu hoạt tính kháng phân bào và kháng oxy hoá của cây thuốc Việt Nam và sử dụng các phương pháp này để sàng lọc cây thuốc có hoạt tính mong muốn.

Nội dung nghiên cứu bao gồm

- Xây dựng các phương pháp xác định tác động gây apoptosis của hoạt chất (khảo sát hàm lượng DNA toàn phần và DNA phân tử lượng thấp, kính hiển vi huỳnh quang)
- Xây dựng các quy trình thử nghiệm dựa trên phương pháp flow cytometry để xác định hoạt tính kháng ung thư và giai đoạn tác động của hoạt chất
- Áp dụng các quy trình đã xây dựng để sàng lọc thu nhận hoạt chất từ chất chiết thực vật

2. Kết quả nghiên cứu, ý nghĩa khoa học đạt được

2.1. Kết quả nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu các đặc điểm, cơ chế và hình thành quy trình nhận biết apoptosis bằng các phương pháp

- Thử nghiệm MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- Thử nghiệm Trypan Blue.
- Phương pháp tách chiết DNA toàn phần và điện di (thang DNA – DNA laddering)
- Phương pháp tách chiết DNA phân tử lượng thấp và điện di.
- Phương pháp nhuộm và quan sát tế bào dưới kính hiển vi phát huỳnh quang.
- Phương pháp Flow Cytometry (FC) với các quy trình: (1) khảo sát thể tích tế bào và độ đặc, (2) khảo sát sự nguyên vẹn của màng sinh chất, (3) xác định mức độ

biến tính của bộ nhiễm sắc thể, (4) xác định hàm lượng DNA và RNA, (5) khảo sát trạng thái hoạt động của lysosome, (6) phát hiện hiện tượng sub-diploid.

Các kết quả thu được

- Xác định diễn tiến của quá trình apoptosis dựa trên việc khảo sát động học: tế bào chuyển sang apoptosis khởi đầu bằng sự mất nước làm cô đặc tế bào chất, nhiễm sắc thể cô đặc và bắt đầu sự phân cắt đặc hiệu tại vị trí nối của hai nucleosome. Cuối giai đoạn giữa lysosome vỡ ra, dẫn đến sự biến đổi cấu trúc khung sườn tế bào, làm tế bào mất đi khả năng bám dính, diễn tiến cuối cùng của apoptosis trong *in vitro*, là màng sinh chất bị vỡ.

- Hình thành quy trình cho phép nhận biết và phân biệt tế bào sống, tế bào apoptosis giai đoạn sớm, giữa, muộn và tế bào hoại tử. Quy trình đơn giản gồm: thử nghiệm trypan blue, flow cytometry với FSC-SSC và nhuộm PI (propidium iodide) nhận biết sub-diploid, tách chiết DNA toàn phần nhận biết hiện tượng thang DNA.

2.1.2. Xây dựng quy trình nhận biết tác động kháng phân bào

Các phương pháp sử dụng

- Phương pháp bỏ đói (serum starvation) để đồng bộ hoá dòng tế bào nuôi cấy

- Phương pháp flow Cytometry nhận biết hàm lượng DNA với thuốc nhuộm PI.

Các kết quả thu được

- Tối ưu hoá quy trình bỏ đói tế bào về : (1) nồng độ BSA, (2) thời gian bỏ đói nhằm đồng bộ hoá quần thể tế bào về pha G₀/G₁

- Hình thành quy trình nhận biết tác động kháng phân bào. Độ tin cậy của quy trình được xác định trên ba hoạt chất chuẩn camptothecin, vinblastine và plumbagin.

- Chứng minh được hệ quả của quá trình kháng phân bào là apoptosis. Thời gian chuyển đổi từ kháng phân bào sang apoptosis phụ thuộc vào hiệu quả tác động, thời gian và nồng độ xử lý của tác nhân đối với dòng tế bào ung thư.

2.1.3. Thu nhận hợp chất có khả năng kháng phân bào

Các hợp chất có khả năng kháng phân bào như các hợp chất từ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*), Sen cạn (*Tropaeolum majus*), Khổ qua (*Momordica charantia*), Gấc (*Momordia cochinchinensis*), Trinh nữ Hoàng cung (*Crinum latifolium*), Ôi (*Psidium guajava*) từ Viện Công Nghệ Hóa Học.

2.1.4. Thu nhận, hoạt hóa, nuôi cấy, bảo quản 07 dòng tế bào ung thư

SF-268, MCF-7, NCI-H460, HeLa, EL-4 cơ quan NCI (National Cancer Institute - Hoa Kỳ), HEP-2 và RD (Viện Pasteur Tp HCM)

2.2. Ý nghĩa khoa học

Hai cơ chế quan trọng và phổ biến của các hoạt chất kháng ung thư là khả năng gây kháng phân bào và cảm ứng apoptosis. Vì vậy việc xây dựng quy trình nhận biết

apoptosis và kháng phân bào sẽ giúp hiểu được tác động kháng ung thư của phần lớn các hợp chất thử nghiệm. Hơn thế nữa, việc hiểu rõ diễn tiến và cơ chế của quá trình apoptosis sẽ có ý nghĩa rất lớn trong việc sàng lọc thuốc và điều trị ung thư.

3. Ý nghĩa thực tiễn và hiệu quả ứng dụng trong thực tiễn:

Là một quốc gia nhiệt đới cộng với đường bờ biển dài, Việt Nam có được một nguồn tài nguyên thực vật và sinh vật biển rất phong phú. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về hoạt tính kháng ung thư của các chất chiết tự nhiên từ thực vật và sinh vật biển chưa được chú ý hay nếu có thì chỉ dựa trên các phương pháp cổ truyền với độ tin cậy thấp. Vì vậy, việc xây dựng một quy trình để sàng lọc và nhận biết khả năng kháng ung thư dựa trên tác động kháng phân bào và khả năng cảm ứng apoptosis là rất cần thiết. Quy trình chúng tôi xây dựng không chỉ có độ tin cậy cao mà còn đơn giản để triển khai rộng rãi tại các phòng thí nghiệm nghiên cứu dược liệu.

4. Kết quả đào tạo

Thạc sĩ : 02, trong đó 01 sẽ bảo vệ vào 2006 và 01 bảo vệ vào 2007.

Tiến sĩ : 01, hướng dẫn phụ cho NCS Nguyễn Ngọc Hồng – công nhận năm 2005 - Đề tài : Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của một số cây thuốc hướng tác dụng trên gan, chuyên ngành Hóa sinh học,

5. Sản phẩm khoa học đã hoàn thành

5.1. Các công trình đã hoàn thành và sẽ công bố trong các tạp chí KH

- [1]. 5.2.1. *Xác định hệ quả của tác động kháng phân bào trên dòng tế bào HEP-2*. Nguyễn Thụy Vy, Tất Tố Trinh, Nguyễn Hoài Nghĩa, Lê Chí Thanh, Trương Thị Xuân Liên, Hồ Huỳnh Thùy Dương.
- [2]. 5.2.2. *Khảo sát động học của quá trình apoptosis trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7*. Nguyễn Hoài Nghĩa, Tất Tố Trinh, Nguyễn Thụy Vy, Lê Chí Thanh, Trương Thị Xuân Liên, Hồ Huỳnh Thùy Dương.

5.3. Các báo cáo khoa học tại các hội nghị, hội thảo KH

- [1]. *Some methods for investigate of cytotoxic activities of natural compounds*. Nguyễn Hoài Nghĩa, Trần Khiêm Hùng, Tất Tố Trinh, Lê Chí Thanh, Nguyễn Thụy Vy, Nguyễn Đăng Quân, Trương Thị Xuân Liên, Hồ Huỳnh Thùy Dương. First International Conference on Development of Medical Engineering in Vietnam 2005.
- [2]. *Xác định hàm lượng DNA và RNA bằng kỹ thuật flow cytometry để phát hiện apoptosis*. Nguyễn Hoài Nghĩa và cộng sự. Hội nghị khoa học toàn quốc về CNSH, 12/2005
- [3]. *Nhận biết hiện tượng apoptosis dựa trên mức độ cô đặc nhiễm sắc thể*. Tất Tố Trinh và cộng sự. Hội nghị khoa học toàn quốc về CNSH, 12/2005.

6. Đánh giá và kiến nghị

Đề tài đã cơ bản hoàn thành nhiệm vụ nghiên cứu giai đoạn vừa qua. Nội dung nghiên cứu về tác động kháng oxy hóa của cây thuốc được tiến hành thông qua một đề

tài luận án tiến sĩ hợp tác với trường Đại Học Y Dược TpHCM. Một nội dung mới được bổ sung cho phù hợp với tiến triển của kết quả nghiên cứu thực tế là thu thập thêm một số dòng tế bào ung thư mới. Điều này cho phép xây dựng một quy trình sàng lọc hiệu quả và đúng chuẩn quốc tế hơn. Các kết quả về đào tạo, công trình công bố đảm bảo nội dung đã đăng ký.

Đề nghị được tiếp tục thực hiện giai đoạn kế tiếp của nghiên cứu

INVESTIGATION OF ANTITUMORAL, ANTIOXYDANT EFFECTS OF MEDICINAL PLANTS IN VIET NAM BY SOME MOLECULAR METHODS

ABSTRACT

For long-term purpose the project aims at valorization of medicinal plants resources in Viet Nam for conservation and sustainable use

Short-term purposes concern the establishment of modern methods to investigate antimutagenic and antioxidant activities of medicinal plants in Viet Nam and the use of these methods to screen for bioactive substances

The project includes :

- Setting up methods to determine apoptosis causing effects of natural substances (DNA laddering, electrophoretic analysis of low-weight cellular DNA, fluorescent microscopy)
- Setting up flow cytometry-based methods to determine antimutagenic and cell cycle phase specificity of bioactive substances
- Use of these methods to screen bioactive substances from plant extracts