

Nghiên cứu khả năng kháng oxi hóa và gây độc tế bào ung thư của cao chiết ethanol từ tổ yến nuôi tại Việt Nam

Nguyễn Thị Khoa, Nguyễn Thị Phương

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
khoant@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Tổ yến (yến sào) là loại thực phẩm tăng cường sức khỏe nổi tiếng và có ý nghĩa kinh tế ở nhiều nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Các nghiên cứu trước đây cho thấy tổ yến chiết bằng nước có tác dụng kháng virus, kháng viêm, ngăn ngừa viêm xương khớp và bảo vệ thần kinh. Tuy nhiên, những báo cáo về hoạt tính sinh học của cao chiết tổ yến bằng các dung môi khác vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu xác định một số hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol từ tổ yến nuôi ở Việt Nam. Kết quả phân tích kháng oxi hóa sử dụng (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) (DPPH) cho thấy cao chiết này thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa *in vitro* ở mức độ đáng kể $IC_{50} = (94,74 \pm 2,35) \mu\text{g/mL}$. Đồng thời, cao chiết còn có khả năng gây độc tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 với giá trị IC_{50} lần lượt là $(82,12 \pm 2,42, 98,72 \pm 2,50$ và $53,70 \pm 0,12) \mu\text{g/mL}$. Các kết quả thu được tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về thành phần hoạt chất cũng như hoạt tính kháng oxi hóa và gây độc tế bào ung thư của cao chiết ethanol từ tổ yến trên mô hình *in vivo*.

Nhận 07/07/2022
Được duyệt 03/03/2023
Công bố 30/03/2023

Từ khóa
cao chiết ethanol,
gây độc tế bào,
kháng oxi hóa, tổ yến

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Tổ yến (TY) từ rất lâu đã được xem như loại thực phẩm quý ở nhiều nước và vùng lãnh thổ ở châu Á như Trung Quốc, Đài Loan, Việt Nam, Thái Lan, Malaysia, Indonesia và Philipines [1]. Các báo cáo phân tích thành phần cho thấy glycoprotein trong TY chiếm hơn 60 % với hầu hết các loại axit amin thiết yếu. TY cũng chứa hàm lượng carbohydrate khá cao (khoảng 26 %). Ngoài ra, các nguyên tố khoáng như canxi, natri, kali, magie, mangan, kẽm và sắt cũng có mặt trong TY với hàm lượng đáng kể [1,2]. Với thành phần dinh dưỡng có giá trị và hoạt chất sinh học tiềm năng, nhiều tác dụng dược lí của TY đã được chứng minh trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Trong số các hoạt tính sinh học của TY, hoạt tính kháng oxi hóa là một trong những hoạt tính nổi bật của dịch chiết nước từ TY. Nghiên cứu trước đây cho thấy dịch chiết nước có chứa TY thủy

phân bằng pepsin, pancreatin và dịch mật có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh thông qua phép thử ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) [3]. Ngoài ra, một nghiên cứu khác đã chứng minh chuột uống TY có lượng enzyme superoxide dismutase, insulin, estrogen cao hơn so với chuột đối chứng. Sự trao đổi lipid, glucose, và tính nhạy cảm với insulin cũng được cải thiện đáng kể ở chuột được dùng TY [4]. Tuy nhiên, hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết ethanol từ tổ yến (CY) vẫn chưa được khai thác đầy đủ. Vì vậy, nghiên cứu phân tích hoạt tính này để mở rộng hiểu biết về khả năng kháng oxi hóa trên các loại cao chiết khác nhau.

TY thường được sử dụng trong liệu pháp điều trị bổ sung và thay thế (complementary and alternative medicine, CAM). Kết quả điều tra ở Singapore cho thấy trong số 403 bệnh nhân mắc ung thư có tới 46 % bệnh nhân sử dụng CAM, trong đó phổ biến nhất là sự kết



hợp giữa thuốc Đông y (traditional Chinese medicine), TY và chế độ ăn đặc biệt. Trong số các bệnh nhân sử dụng CAM, hơn một nửa bệnh nhân thu được kết quả khả quan [5]. Ngoài ra, nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng TY làm tăng số lượng tế bào lympho B, do đó có thể tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể chống lại tế bào ung thư [6]. Kết quả này cho thấy TY có thể có lợi trong việc cải thiện sức khỏe của người bị ung thư. Tuy nhiên, những nghiên cứu về khả năng gây độc tế bào ung thư của TY vẫn bị hạn chế. Trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc của CY trên 3 dòng tế bào ung thư bao gồm tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 sẽ được khảo sát. Kết quả của nghiên cứu giúp nâng cao hiểu biết về hoạt tính sinh học mới của TY và tạo nền tảng để xác định các hoạt chất gây độc tế bào ung thư có trong TY.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu nghiên cứu

TY trắng được cung cấp bởi Công ty TNHH Thương mại Dịch vụ Phát triển Phước Tín.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị CY

TY được nghiền nhỏ thành bột, sau đó được ngâm kiệt trong ethanol ở 37 °C trong 15 ngày. CY sau đó được thu nhận bằng phương pháp cô quay. Phần cao được hòa tan trong DMSO để đạt nồng độ 20 mg/mL và lưu trữ ở nhiệt độ -20 °C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2 Phương pháp xác định khả năng kháng oxi hóa
 Phương pháp sử dụng gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) để đánh giá khả năng kháng oxi hóa của CY. Phương pháp dựa trên nguyên tắc gốc tự do DPPH· sẽ nhận H từ chất chống oxi hóa và bị mất màu tím. Quy trình xác định khả năng kháng oxi hóa của CY được thực hiện tương tự như nghiên cứu trước đây [7]. Ascorbic acid (vitamin C) (Sigma-Aldrich, Germany) được sử dụng làm đối chứng dương. CY và vitamin C được pha loãng thành các nồng độ khác nhau để đánh giá khả năng ức chế gốc tự do DPPH·. Mật độ quang học của các mẫu thử nghiệm được đo ở bước sóng $\lambda = 517$ nm bằng máy đo JenWay Genova Plus (Jenway, USA). Khả năng kháng oxi hóa của CY và vitamin C được tính theo tỉ lệ ức chế gốc tự do DPPH· (I %) dựa trên công thức sau:

$$I (\%) = [1 - (A_2 - A_3)/A_1] \times 100$$

A₁: Độ hấp thụ quang học của DPPH· trong ethanol

A₂: Độ hấp thụ quang học của mẫu sau khi phản ứng với DPPH·

A₃: Độ hấp thụ quang học của mẫu thử trong ethanol (không chứa DPPH·)

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC₅₀ thể hiện nồng độ mà tại đó CY hoặc hóa chất ức chế 50 % gốc tự do DPPH· được xác định dựa trên phần mềm Prism.

2.2.3. Phương pháp 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Thử nghiệm dựa trên nguyên tắc MTT bị các enzyme dehydrogenase của ti thể trong các tế bào sống phân cắt tạo thành tinh thể formazan màu tím. Vì vậy, sự thay đổi màu của MTT được sử dụng để đánh giá mức độ sống/chết của tế bào.

Nuôi cấy tế bào: dòng tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 được nuôi trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Himedia, Germany) có bổ sung 10 % huyết thanh thai bò (fetal bovine serum, FBS) (Sigma-Aldrich, Germany) và 100 µg/mL kháng sinh penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Germany) ở 37 °C và 5 % CO₂. Tế bào sau khi đạt mật độ bám trải đến 80 % thì được tách ra khỏi bề mặt nuôi cấy bằng trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Germany) 0,25 %. Sau đó, 100 µL tế bào có mật độ 10⁵ tế bào/mL được cho vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng (corning) và ủ trong tủ ấm (37 °C, 5 % CO₂) trong 24 giờ.

Thử nghiệm MTT: CY và đối chứng dương doxorubicin (Sigma-Aldrich, Germany) được pha loãng thành các nồng độ khác nhau trong môi trường chứa tế bào. Đối chứng âm (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich, Germany) được pha loãng thành các nồng độ tương ứng trong môi trường nuôi cấy. Phương pháp được lặp lại 3 lần tại mỗi nồng độ của cao chiết. Sau khi xử lý với dung dịch MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Germany) sau 48 giờ thử nghiệm, độ hấp thụ quang học ở bước sóng 570 nm của các giếng thử nghiệm được đo bằng máy đọc Elisa (Biotek). Đồ thị thể hiện tỉ lệ số tế bào chết được vẽ bằng phần mềm Prism v6.0. Tỉ lệ tế bào chết (I %) được tính theo công thức sau:

$$I (\%) = [1 - (A - C)/(B - C)] \times 100$$

A: độ hấp thụ quang học của mẫu ở bước sóng 570 nm

B: độ hấp thụ quang học của đối chứng âm ở bước sóng 570 nm

C: độ hấp thụ quang học của đối chứng nền ở bước sóng 570 nm

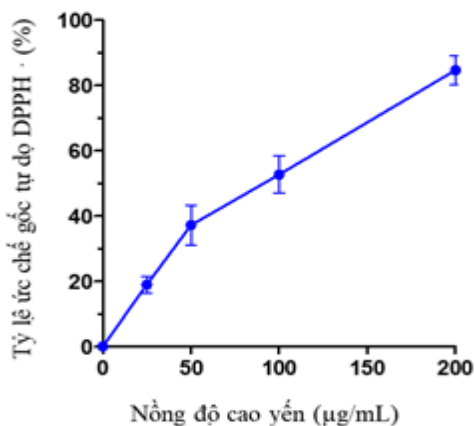
Giá trị trung bình cộng (mean) của 3 thí nghiệm lập và độ lệch chuẩn (SD) được ghi lại để đánh giá thí nghiệm. Giá trị IC_{50} thể hiện nồng độ mà tại đó cao chiết hoặc hóa chất giết được 50 % số tế bào ung thư dựa trên phần mềm Prism.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Hoạt tính kháng oxi hóa CY

Kết quả thử nghiệm bằng phương pháp DPPH cho thấy CY có hoạt tính kháng oxi hóa đáng kể. CY có khả năng ức chế gốc tự do DPPH· khoảng 40 % ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ và trên 80 % ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50} = (94,74 \pm 2,35) \mu\text{g/mL}$) (Hình 1). Kết quả này tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo hoạt tính kháng oxi hóa của CY trên mô hình *in vivo*.

Nồng độ CY được sử dụng trong thí nghiệm là (0, 25, 50, 100 và 200) $\mu\text{g/mL}$. Tỷ lệ bắt giữ gốc tự do (%) được tính theo giá trị trung bình (\pm sai số) của 3 thí nghiệm độc lập.

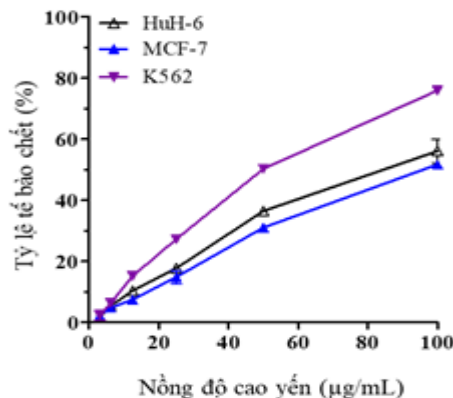


Hình 1 Khả năng ức chế gốc tự do DPPH· của CY.

3.2 Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 của CY

Phân tích tỷ lệ tế bào chết bằng phương pháp MTT cho thấy cao chiết ethanol có khả năng gây độc tương đối mạnh trên cả 3 dòng tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562. Khả năng gây độc phụ thuộc vào nồng độ (Hình 2). Tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, CY gây chết hơn 70 % số lượng tế bào ung thư dòng K562 và hơn 50 % số lượng tế bào dòng HuH-6 và MCF-7. Giá trị IC_{50} thu được đối với 3 dòng HuH-6, MCF-7 và K562 lần lượt là $(82,12 \pm 2,42)$, $(98,72 \pm 2,50)$ và $(53,70 \pm 0,12) \mu\text{g/mL}$ (Bảng 1). Giá trị này cho thấy sự nhạy cảm của 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với cao chiết ethanol khác nhau, trong đó dòng K562 nhạy cảm nhất. Điều này gợi ý rằng những nhân tố ảnh

hưởng tới quá trình chết tế bào ở dòng K562 chịu tác động mạnh từ thành phần có trong CY. Cần có những nghiên cứu sâu hơn về thành phần các chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư, cơ chế gây độc tế bào ung thư cũng như khả năng kháng ung thư có thể có của CY trên mô hình *in vitro* và *in vivo*.



Hình 2 Khả năng gây độc tế bào ung thư gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 của CY.

Nồng độ CY được sử dụng trong thí nghiệm là (0, 6,25, 12,5, 25, 50 và 100) $\mu\text{g/mL}$. Tỷ lệ tế bào chết (%) được tính theo giá trị trung bình (\pm sai số) của 3 thí nghiệm độc lập.

Bảng 1 Giá trị IC_{50} của CY đối với dòng tế bào HuH-6, MCF-7 và K562.

Dòng tế bào ung thư	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (Giá trị trung bình \pm sai số)	
	Cao yến	DOX
HuH-6	$82,12 \pm 2,42$	$1,65 \pm 0,55$
MCF-7	$98,72 \pm 2,50$	$4,16 \pm 0,40$
K562	$53,70 \pm 0,12$	$2,82 \pm 0,25$

Giá trị IC_{50} (nồng độ cao yến gây độc 50 % số lượng tế bào ung thư) được tính theo giá trị trung bình (\pm sai số) của 3 thí nghiệm độc lập. DOX: doxorubicin.

4 Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu đã tách chiết thành công CY từ chim yến nuôi tại Việt Nam. CY thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa và gây độc tế bào ung thư gan gan HuH-6, ung thư vú MCF-7 và ung thư máu K562 *in vitro* đáng kể. Đây là những hoạt tính sinh học chưa được nghiên cứu của CY. Kết quả của nghiên cứu tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về thành phần các chất có trong CY cũng như hoạt tính kháng oxi hóa và gây độc tế bào ung thư trên mô hình *in vivo*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.163/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Dai, Y., Cao, J., Wang, Y., Chen, Y., and Jiang, L. (2021). A comprehensive review of edible bird's nest. *Food Res Int* 140, 1-15.
2. Lee, T.H., Wani, W.A., Lee, C.H., Cheng, K.K., Shreaz, S., Wong, S., Hamdan, N., and Azmi, N.A. (2021). Edible Bird's Nest: The Functional Values of the Prized Animal-Based Bioproduct From Southeast Asia-A Review. *Front Pharmacol* 12, 1-16.
3. Yida, Z., Imam, M.U., and Ismail, M. (2014). In vitro bioaccessibility and antioxidant properties of edible bird's nest following simulated human gastro-intestinal digestion. *BMC Complement Altern Med* 14, 468-475.
4. Yida, Z., Imam, M.U., Ismail, M., Ooi, D.J., Sarega, N., Azmi, N.H., Ismail, N., Chan, K.W., Hou, Z., and Yusuf, N.B. (2015). Edible Bird's Nest Prevents High Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Rats. *J Diabetes Res* 2015, 760535.
5. Shih, V., Chiang, J.Y.L., and Chan, A. (2009). Complementary and alternative medicine (CAM) usage in Singaporean adult cancer patients. *Ann Oncol* 20, 752-757.
6. Zhao, R., Li, G., Kong, X.-j., Huang, X.-y., Li, W., Zeng, Y.-y., and Lai, X.-p. (2016). The improvement effects of edible bird's nest on proliferation and activation of B lymphocyte and its antagonistic effects on immunosuppression induced by cyclophosphamide. *Drug Des Devel Ther* 10, 371-381.
7. Saeed, N., Khan, M.R., and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern. Med.* 12, 1-12.

Antioxidant and cytotoxic activities of the ethanol extract of farmed edible bird's nest in Viet Nam

Khoa Thi Nguyen, Thi-Phuong Nguyen,
NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
khoant@ntt.edu.vn

Abstract Edible bird's nest (EBN) is a well-known tonic food in Asian countries. Previous studies revealed that the aqueous extract of EBN exhibited remarkable pharmacological values such as antiviral, anti-inflammatory activities, osteoarthritic prevention and neural protection. However, the bioactivities of the EBN extracts in other solvents are still under investigation. In this study, we first determined the antioxidant and cytotoxic activities of the ethanol extract of farmed EBN in Viet Nam. The analysis of (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) (DPPH) assay showed that the ethanol extract considerably scavenged free radicals, $IC_{50} = (94.74 \pm 2.35) \mu\text{g/mL}$. In addition, the ethanol extract exhibited significant cytotoxic activities against HuH-6 liver cancer cells, MCF-7 breast cancer cells and K562 leukemia cells with the IC_{50} values of $(82.12 \pm 2.42, 98.72 \pm 2.50$ và $53.70 \pm 0.12) \mu\text{g/mL}$, respectively. These results serve as a basis for further studies on the chemical constituents and the antioxidant and cytotoxic activities of the EBN ethanol extract *in vivo* models.

Keywords antioxidant, cytotoxic, edible bird's nest, ethanol extract