



Original Article

## Cytotoxicity Effects of *Zanthoxylum simulans* Hance. Fruit Bark Extract

Dang Thuy Tien<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy<sup>1</sup>, Vu Manh Ha<sup>2</sup>, Bui Thanh Tung<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Phenikaa University, Nguyen Trac, Yen Nghia, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

Received 10 March 2023

Revised 29 April 2023; Accepted 10 June 2023

**Abstract:** *Zanthoxylum simulans* Hance. is known in folklore as a spicy herb, commonly used to treat cold-induced diseases in the body. In this study, we evaluated the cytotoxic effects of *Zanthoxylum simulans* fruit bark extract. Samples of *Zanthoxylum simulans* were extracted with 70% ethanol and subsequently fractionated with n-Hexane, ethyl acetate (EtOAc), and n-butanol (n-BuOH) solvents. To evaluate the cytotoxic effect, we performed SRB (Sulforhodamine B) assay on the three cell lines human liver HepG2, lung SK-LU-1, and cervical carcinoma Hela. The results showed that the EtOH total extract had the strongest cytotoxicity effects on liver cancer cells with an IC<sub>50</sub> of 63.68±3.97 µg/mL, but showed no toxicity to SK-LU-1 lung cancer or Hela cervical cancer cells. The results of cytotoxic effects on HepG2 liver cancer cells of these fractions showed that the n-Hexane and EtOAc fractions exhibited activity with IC<sub>50</sub> values of 17.12±0.94 and 28.45±2.85 µg/mL, respectively, while the n-BuOH and H<sub>2</sub>O fractions showed no activity. Our results showed that *Zanthoxylum simulans* fruit bark extract has a strong cytotoxicity effect on liver cancer cells.

**Keywords:** *Zanthoxylum simulans* Hance., cytotoxicity, SRB, liver cancer cells.

\* Corresponding author.

E-mail address: [tungasia82@yahoo.es](mailto:tungasia82@yahoo.es)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4501>

# Nghiên cứu tác dụng ức chế tế bào ung thư của vỏ quả Xuyên tiêu (*Zanthoxylum simulans* Hance.)

Đặng Thủy Tiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thúy<sup>1</sup>, Vũ Mạnh Hà<sup>2</sup>, Bùi Thanh Tùng<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Đại học Phenikaa, Nguyễn Trác, Yên Nghĩa, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 10 tháng 3 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 29 tháng 4 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 6 năm 2023

**Tóm tắt:** Cây Xuyên tiêu (*Zanthoxylum simulans* Hance.) được biết đến trong dân gian là một loại gia vị ấm nóng, cay và thường dùng chữa các chứng bệnh do lạnh gây ra trong cơ thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của vỏ quả Xuyên tiêu. Mẫu vỏ quả Xuyên tiêu được chiết bằng ethanol 70% và tiến hành chiết phân đoạn lần lượt với n-Hexan, ethyl acetate (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH). Tác dụng ức chế tế bào ung thư được thực hiện bằng phương pháp SRB (Sulforhodamine B) trên 3 dòng tế bào: ung thư gan HepG2, ung thư phổi SK-LU-1 và ung thư cổ tử cung Hela. Kết quả ức chế tế bào ung thư cho thấy cao chiết toàn phần EtOH có tác dụng gây độc tế bào ung thư gan với IC<sub>50</sub> là 63,68±3,97 µg/ml, chưa thể hiện tác dụng độc tính với các dòng tế bào ung thư phổi và cổ tử cung. Kết quả nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào ung thư gan của các phân đoạn cho thấy phân đoạn n-Hexan và phân đoạn EtOAc thể hiện hoạt tính với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 17,12±0,94 và 28,45±2,85 µg/mL nhưng phân đoạn n-BuOH và phân đoạn H<sub>2</sub>O không thể hiện hoạt tính. Kết quả nghiên cứu này cho thấy cao chiết toàn phần EtOH, phân đoạn n-Hexan và EtOAc của vỏ quả Xuyên tiêu có tác dụng ức chế tế bào ung thư gan tốt.

**Từ khóa:** Xuyên tiêu, *Zanthoxylum simulans* Hance., độc tính tế bào, SRB, ung thư gan.

## 1. Mở đầu

Ung thư là bệnh phức tạp do những biến đổi về mặt di truyền như đột biến gene hoặc những thay đổi về mặt biểu sinh của các gene, vùng nhiễm sắc thể liên quan tới các gene sinh ung thư hoặc các gene ức chế ung thư [1]. Các cơ chế phát sinh ung thư đã được nghiên cứu kỹ như sự mất kiểm soát trong chu kỳ phân chia của tế bào hay sự thay đổi của con đường tín hiệu apoptosis và các con đường tín hiệu khác như Notch, EGFR và PI3K [2]. Trong đa số trường hợp ung thư, điều trị bằng hóa chất hay xạ trị là lựa chọn chính [3]. Tuy nhiên, phương pháp điều trị bằng

xạ trị thường gây nhiều tác dụng phụ, chi phí hóa chất tốn kém và tỉ lệ bệnh nhân sống sót sau 5 năm vẫn còn rất hạn chế. Một trong những cách tiếp cận hiện nay được đặc biệt quan tâm là sử dụng cao chiết toàn phần hoặc các hợp chất được chiết xuất từ dược liệu để điều trị ung thư [4]. Dược liệu là nguồn nguyên liệu dễ kiếm, chi phí rẻ, có tác dụng tốt và ít tác dụng không mong muốn.

Cây Xuyên tiêu còn có tên khác như Hoàng lục, Hoa tiêu, có tên khoa học là *Zanthoxylum simulans* Hance. Cây xuyên tiêu thường mọc hoang ở vùng có khí hậu nhiệt đới. Nó được tìm thấy nhiều ở phía đông Trung Quốc, Đài Loan,

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tungasia82@yahoo.es

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4501>

Triều Tiên, Campuchia và Lào. Ở Việt Nam, cây này được tìm thấy ở vùng trung du. Nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Xuyên tiêu cho thấy có chứa các hợp chất chính thuộc nhóm alkaloids, amides, lignans và neolignans, coumarins, peptides, terpenoids, và flavonoids [5-7]. Nghiên cứu tác dụng dược lý cho thấy Xuyên tiêu có nhiều tác dụng quan trọng như chống viêm, kháng khuẩn, diệt ấu trùng, chống vi khuẩn, chống oxy hóa, chống ung thư/chống tăng sinh và độc tính tế bào [5]. Tuy nhiên, qua tìm hiểu các tài liệu thì tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về tác dụng ức chế tế bào ung thư của cây Xuyên tiêu. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư của các phân đoạn dịch chiết vỏ quả Xuyên tiêu.

## 2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Vỏ quả Xuyên tiêu, được giám định tên khoa học là *Zanthoxylum simulans* Hance., thu mua tại Hà Nội vào tháng 12 năm 2022. Mẫu nghiên cứu hiện được lưu giữ tại Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Vỏ quả Xuyên tiêu (500 g) ngâm lạnh với dung môi EtOH 70% ở nhiệt độ phòng, 3 lần (mỗi lần 24 h), với tỷ lệ dược liệu/dung môi 1:10 (kg/L). Lọc loại bã dược liệu, gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 23,7 g cao EtOH 70%. Phân tán trong nước nóng, sau đó chiết lỏng - lỏng tỉ lệ 1:2, mỗi lần 1 lít x 3 lần với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-Hexan, EtOAc và BuOH. Gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 1,2 g cao n-Hexan, 7,6 g cao EtOAc, 4,7 g cao BuOH và 8,1 g cồn nước. Cô quay thu hồi cồn dịch chiết các phân đoạn để tiến hành thử hoạt tính.

### 2.2. Phương pháp đánh giá khả năng độc tính tế bào

Hoạt tính độc tính tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp SRRB (Sulforhodamine B).

Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB) [8]. Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Nghiên cứu này chúng tôi tiến hành trên 3 dòng tế bào ung thư: HepG2: ung thư gan ở người; SK-LU-1: ung thư phổi ở người; Hela: ung thư cổ tử cung ở người. Tiến hành đưa 190  $\mu$ L tế bào vào đĩa 96 giếng để thử nghiệm. Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để có nồng độ ban đầu (stock) là 20 mg/ml. Tiến hành pha loãng mẫu trên đĩa 96 giếng bằng môi trường nuôi cấy tế bào (không có FBS, Fetal Bovine Serum) thành 4 dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Chất thử đã pha loãng ở các nồng độ (10  $\mu$ L) được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (190  $\mu$ L) + DMSO 1% (10  $\mu$ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid (TCA) 20%. Ủ trong tủ âm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng. Thêm dung dịch 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (BioTek). Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày0})}$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 - 2 - 0,4 - 0,08  $\mu$ g/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo. DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0,05%). Giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

### 3. Kết quả

#### Tác dụng độc tính trên các dòng tế bào ung thư

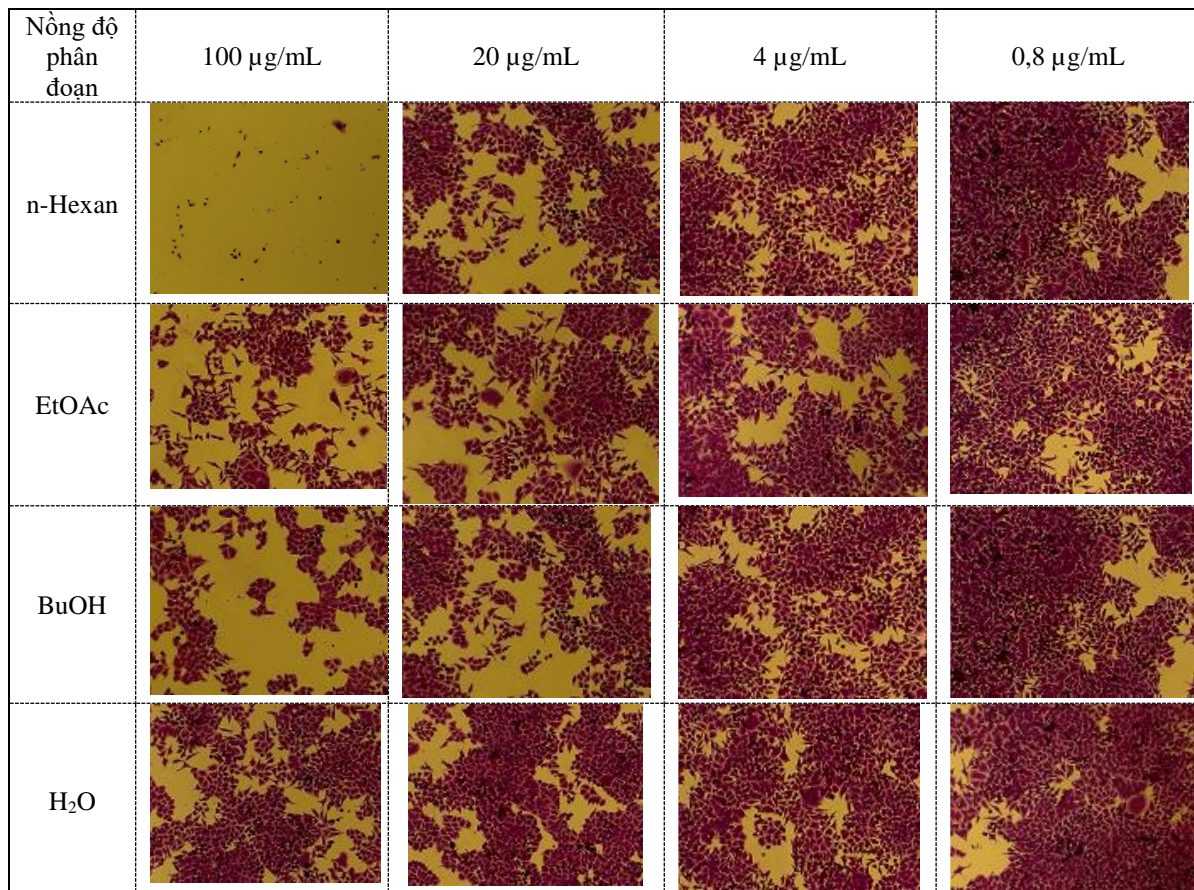
Tác dụng độc tính trên các dòng tế bào ung thư của cao chiết toàn phần vỏ quả Xuyên tiêu được thể hiện thông qua giá trị IC<sub>50</sub> (µg/mL) ở Bảng 1.

Từ Bảng 1, thuốc đối chứng dương Ellipticine cho thấy tác dụng gây độc rõ rệt đối với cả ba dòng tế bào ung thư phổi, gan và cổ tử

cung ở người với IC<sub>50</sub> lần lượt 0,51±0,05; 0,32±0,03 và 0,32±0,04 (µg/mL). Cao chiết toàn phần EtOH chưa thể hiện tác dụng độc tính với các dòng tế bào ung thư phổi và cổ tử cung do có IC<sub>50</sub> >100 µg/mL. Với dòng tế bào ung thư gan, cao chiết toàn phần EtOH thể hiện tác dụng độc tính với IC<sub>50</sub> là 63,68±3,97 µg/mL. Do đó, chúng tôi tiến hành tiếp tục nghiên cứu tác dụng độc tính tế bào của các phân đoạn vỏ quả Xuyên tiêu trên dòng tế bào ung thư gan.

Bảng 1. Tác dụng độc tính của cao chiết toàn phần vỏ quả Xuyên tiêu trên ba dòng tế bào ung thư gan, phổi và cổ tử cung ở người

| Mẫu nghiên cứu  | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |           |           |
|-----------------|--------------------------|-----------|-----------|
|                 | HepG2                    | SK-LU-1   | Hela      |
| EtOH Xuyên tiêu | 63,68±3,97               | >100      | >100      |
| Ellipticine     | 0,32±0,03                | 0,51±0,05 | 0,32±0,04 |



Hình 1. Sự thay đổi mật độ tế bào HepG2 dưới tác dụng của các mẫu nghiên cứu sau 72 h tại các nồng độ khác nhau (VK 10X, zoom 5.6).

Bảng 2. Tác dụng độc tính của phân đoạn cao chiết vỏ quả Xuyên tiêu trên dòng tế bào ung thư gan ở người

| HepG2                    | n-Hexan    | EtOAc      | BuOH | H <sub>2</sub> O |
|--------------------------|------------|------------|------|------------------|
| IC <sub>50</sub> (µg/mL) | 17,12±0,94 | 28,45±2,85 | >100 | >100             |

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy phân đoạn BuOH và phân đoạn H<sub>2</sub>O không thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào nghiên cứu. Hai phân đoạn n-Hexan và phân đoạn EtOAc thể hiện hoạt tính với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 17,12±0,94 và 28,45±2,85 µg/mL.

Trên Hình 1, với phân đoạn n-Hexan và EtOAc, ở những nồng độ thấp như 4 và 0,8 µg/mL mật độ tế bào vẫn còn rất nhiều nhưng khi tăng nồng độ lên 20 µg/mL mật độ tế bào đã giảm, và khi tăng lên và 100µg/mL thì mật độ tế bào giảm rõ rệt. Tuy nhiên, với phân đoạn BuOH và H<sub>2</sub>O, khi nồng độ mẫu thử ở 100 µg/mL thì mật độ tế bào vẫn còn rất dày đặc.

#### 4. Bàn luận

Chúng tôi tiến hành phương pháp SRB để đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của các phân đoạn của cao chiết vỏ quả Xuyên tiêu. Cao chiết toàn phần EtOH cho tác dụng ức chế với dòng tế bào ung thư gan có giá trị IC<sub>50</sub> là 63,68±3,97 µg/mL. Hai phân đoạn n-Hexan và phân đoạn EtOAc thể hiện hoạt tính với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 17,12±0,94 và 28,45±2,85 µg/mL. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đã được thực hiện trước đó. Tác giả Chao Wang chiết các hợp chất acridone alkaloid từ vỏ rễ Xuyên tiêu, đánh giá tác dụng ức chế các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3M, ung thư biểu mô hạch bạch huyết của tuyến tiền liệt (LNCaP) và tác dụng tiêu diệt ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy 5 hợp chất acridone alkaloids bao gồm normelicopidine, normelicopine, melicopine, melicopidine, và melicopicine đều thể hiện tác dụng ức chế tế bào ung thư và chống ký sinh trùng sốt *in vitro* [9]. Trong nghiên cứu sàng lọc các dược liệu có tác dụng ức chế tế bào ung thư của nhóm nghiên cứu Nguyen Bich Thu, kết quả

cho thấy cao chiết methanol của lá và hạt Xuyên tiêu cũng có tác dụng ức chế dòng tế bào ung thư HepG2 với IC<sub>50</sub> lần lượt là 7,1±0,1 và 28,5±4,3 µg/mL. Ngoài ra, nhóm tác giả này còn cho thấy cao chiết lá và hạt Xuyên tiêu có tác dụng ức chế các dòng tế bào ung thư khác như ung thư phổi A549, ung thư gan Huh -7, ung thư biểu mô liên kết HT 1080, ung thư vú MCF-7 [10]. Trong nghiên cứu gần đây của tác giả Yong-Qiang Tian cho thấy hợp chất Chelerythrine trong cây Xuyên tiêu có tác dụng ức chế mạnh hơn tế bào ung thư dạ dày so với chứng dương (Cerdulatinib). Chelerythrine thể hiện ức chế rõ rệt sự bám dính, di cư, xâm lấn và kích thích quá trình chết theo chương trình của các tế bào ung thư dạ dày AGS, giảm đáng kể biểu hiện của các thụ thể estrogen (ER-α36, ER-α66 và ER-β1) và biểu hiện Src, một proto-oncogene [11].

#### 5. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi đã đánh giá được tác dụng gây độc tế bào ung thư của vỏ quả Xuyên tiêu. Cao chiết toàn phần EtOH và hai phân đoạn n-Hexan và EtOAc cho tác dụng mạnh nhất với dòng tế bào ung thư gan với IC<sub>50</sub> lần lượt là 63,68±3,97; 17,12±0,94 và 28,45±2,85 µg/mL. Từ kết quả trên, chúng tôi nhận định rằng, cao chiết toàn phần EtOH và hai phân đoạn n-Hexan và EtOAc của vỏ quả Xuyên tiêu có khả năng gây độc với dòng tế bào ung thư gan HepG2.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội với mã số đề tài: CS.22.02.

**Tài liệu tham khảo**

- [1] X. Meng, J. Zhong, S. Liu, M. Murray, A. M. G. Angulo, A New Hypothesis for the Cancer Mechanism, *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol. 31, 2012, pp. 247.
- [2] M. R. Hassler, G. Egger, Epigenomics of Cancer—emerging New Concepts, *Biochimie*, Vol. 94, No. 11, 2012, pp. 2219.
- [3] M. Nikolaou, A. Pavlopoulou, A. G. Georgakilas, E. Kyrodimos, the Challenge of Drug Resistance In Cancer Treatment: A Current Overview, *Clinical & Experimental Metastasis*, Vol. 35, 2018, pp. 309.
- [4] S. Jain, J. Dwivedi, P. K. Jain, S. Satpathy, A. Patra, Medicinal plants for Treatment of Cancer: A Brief Review, *Pharmacognosy Journal*, Vol. 8, No. 2, 2016.
- [5] J. O. Ombito, Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Zanthoxylum* (Rutaceae): A Review, *The Natural Products Journal*, Vol. 11, No. 1, 2021, pp. 21.
- [6] I. S. Chen, S. J. Wu, Y. L. Leu, I. W. Tsai, T. S. Wu, Alkaloids from Root Bark of *Zanthoxylum Simulans*, *Phytochemistry*, Vol. 42, No. 1, 1996, pp. 217.
- [7] T. Lim, T. Lim, *Zanthoxylum Simulans*, Edible Medicinal and Non-medicinal Plants, Fruits, Vol. 4, 2012, pp. 904.
- [8] E. A. Orellana, A. L. Kasinski, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio-protocol*, Vol. 6, No. 21, 2016, pp. e1984.
- [9] C. Wang, J. Wan, Z. Mei, X. Yang, Acridone Alkaloids with Cytotoxic and Antimalarial Activities From *Zanthoxylum Simullans* Hance, *Pharmacognosy Magazine*, Vol. 10, No. 37, 2014, pp. 73.
- [10] N. B. Thu, T. N. Trung, D. T. Ha, N. M. Khoi, T. V. Hung, T. T. Hien et al., Screening of Vietnamese Medicinal Plants for Cytotoxic Activity, *Natural Product Sciences*, Vol. 16, No. 1, 2010, pp. 43.
- [11] Y. Q. Tian, D. Hu, Y. L. Zhang, J. Zou, G. L. Chen, M. Q. Guo, Inhibitors Targeting Multiple Janus Kinases from *Zanthoxylum Simulans* Mediate Inhibition and Apoptosis Against Gastric Cancer Cells Via the Estrogen Pathway, *Frontiers in Chemistry*, Vol. 10, 2022.