**Đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của PEG-curcumin**

Bùi Thanh Tùng\*, Đặng Kim Thu, Nguyễn Thị Thanh Bình, NguyễnThanh Hải

*Khoa Y Dược, ĐH Quốc Gia Hà Nội*

Tác giả liên hệ: \*Bùi Thanh Tùng, Email: tungasia82@gmail.com

**Tóm tắt**

Curcumin đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có tác dụng gây độc với một số dòng tế bào ung thư khác nhau. Tuy nhiên, khả năng ứng dụng trong điều trị ung thư của curcumin còn hạn chế do độ hòa tan trong nước thấp và sinh khả dụng thấp. PEG hóa curcumin (PEG-CUR) là một trong các phương pháp nhằm tăng độ hòa tan và sinh khả dụng của curcumin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng khả năng ức chế trên hai dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư trực tràng HCT116 của PEG-CUR. Kết quả cho thấy tác dụng gây độc tế bào trên HepG2 của PEG-CUR có giá trị IC50 là 4,37 ± 1,08 µg/ml so với curcumin là 28,61 ± 3,25 µg/ml; trên dòng tế bào HCT116, IC50 củaPEG-CUR là 4,55 ± 0,51 µg/ml so với curcumin là 14,49 ± 1,85 µg/ml. Kết quả cho thấy tác dụng ức chế tế bào ung thư của PEG-CUR lớn hơn nhiều so với curcumin tự do trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và HCT116. Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về chống ung thư của PEG-CUR trên *in vivo*.

***Từ khóa***: PEG – CUR; Curcumin; độc tính tế bào; tế bào ung thư; HepG2; HCT116

**Summary**

Curcumin has been shown to possess strong cytotoxicity effect against various cancer cell lines. However, curcumin has not applied as a drug for treatment of cancer yet due to low water-solubility in water and low bioavailability. PEGylation curcumin has been showed to improve the solubility and bioavailability of curcumin. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity *in vitro* of polyethylene glycol (PEG) conjugated curcumin on HepG2 and HCT116 cancer cell lines. Our results showed that PEG-CUR and curcumin had strong cytotoxicity with an IC50 value of 4.37 ± 1.08 µg/ml and 28.61 ± 3.25 μg/mL on HepG2 cells, and 4.55 ± 0.51 µg/ml and 14.49 ± 1.85 µg/ml on HCT116 cells, respectively. Our data showed cytotoxicity effect of PEG-CUR was much greater than curcumin-free in two different HepG2 and HCT116 cancer cell lines. Further studies are needed to evaluate the antitumor efficacy of PEG-CUR *in vivo*.

**Keywords:** PEG-CUR; curcumin; cytotoxicity, cancer cells; HepG2; HCT116

**Đặt vấn đề**

Curcumin, là một hoạt chất chính của củ nghệ (*Curcuma longa*), có nhiều tác dụng như chống oxy hóa, chống viêm, chống vi khuẩn, chống ung thư. Nhiều nghiên cứu về curcumin cho thấy curcumin có tác dụng ức chế sự phát triển ung thư ở các dòng tế bào khác nhau như gan, cổ tử cung, vú, buồng trứng, dạ dày, tụy, ung thư biểu mô miệng, ung thư máu và ung thư tiền liệt tuyến [[1](#_ENREF_1)]. Tác dụng chống ung thư của curcumin có thể liên quan đến khả năng tương tác với nhiều đích tế bào bao gồm nhân tố kappa B (NF-κB), yếu tố phiên mã activator protein -1 (AP-1) và nhiều protein khác [[2](#_ENREF_2)]. Tuy nhiên, curcumin chưa được ứng dụng trong lâm sàng do độ hòa tan thấp trong nước và sinh khả dụng kém. Nhiều kỹ thuật đã làm để tăng tính hòa tan và khả dụng sinh học của curcumin, như liposome, hạt nano gốc lipid, các hạt nano polyme và hydrogel và PEG hóa curcumin [[3](#_ENREF_3)]. PEG hóa curcumin (PEG-CUR) là kỹ thuật tạo liên hợp curcumin với polyethylene glycol bằng liên kết cộng hóa trị. Polyethylene glycol có một số ưu điểm như khả năng tương thích sinh học cao và hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ và dung môi nước [[4](#_ENREF_4)]. PEG-CUR đã được chứng minh không chỉ làm tăng độ hòa tan của curcumin trong nước mà còn làm tăng sinh khả dụng của chúng. Pandey và cộng sự đã tổng hợp PEG-CUR và chứng minh PEG-CUR có độ hòa tan trong nước và sinh khả dụng cao [[5](#_ENREF_5)]. Nhóm tác giả này cho thấy PEG-CUR ức chế mạnh sự tăng sinh tế bào ung thư tuyến tụy, ức chế sự phân bào và hình thành của các tế bào đa nhân bất thường. Ngoài ra Murphy và cộng sự đã chứng minh tác dụng của PEG-CUR ức chế sự phát triển khối u buồng trứng trên chuột nhờ ức chế sự phân bào của tế bào ung thư buồng trứng [[6](#_ENREF_6)]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng ức chế tế bào ung thư trên hai dòng tế bào ung thư gan HepG2 và dòng tế bào ung thư trực tràng HCT116.

**Nguyên liệu và phương pháp**

**Nguyên liệu**

PEG-CUR được bào chế từ đề tài cấp ĐHQGHN, mã số QG 16.25. Dòng tế bào ung thư gan HepG2 và dòng tế bào ung thư trực tràng HCT116 được cung cấp bởi khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

**Phương pháp nghiên cứu**

Tác dụng gây độc tế bào của curcumin, PEG-CUR và Paclitaxel (chứng dương) trên dòng tế bào ung thư tế bào gan HepG2 và dòng tế bào ung thư trực tràng HCT116 được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-YL) 2,5-diphenyltetrazolium bromide). Tiến hành nạp tế bào vào trong các giếng của đĩa 96 giếng với nồng độ 5000 tế bào/ giếng (180 µl môi trường nuôi cấy), sau đó ủ trong 37oC, 5% CO2 qua đêm để các tế bào bám vào các giếng. Các mẫu (curcumin và PEG-CUR) đã được pha loãng trong DMSO. Tất cả các giếng, bao gồm cả mẫu chứng, đều được bổ sung với cùng một tỷ lệ DMSO (trong mỗi giếng là 0,1%) để loại bỏ bất kỳ ảnh hưởng nào có thể xảy ra của DMSO đối với khả năng sống sót và sự tăng sinh của tế bào. Mỗi mẫu được lặp lại ba lần. Khoảng nồng độ các mẫu nằm trong khoảng 0.25-1000 μg/mL. Paclitaxel được sử dụng làm chứng dương với dải nồng độ từ 0,039 -5 μg/mL. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37oC trong môi trường khí gồm 5% CO2 và 95% không khí trong 72 giờ, 20 μL MTT đã được thêm vào mỗi giếng và tế bào được ủ trong 4 giờ. MTT-formazan hình thành và kết tủa được hòa tan với 0,04 N HCl-isopropanol, và lượng formazan được đo ở 570 nm sử dụng máy đọc đĩa microplate. Khả năng tăng sinh tế bào được thể hiện dưới dạng phần trăm của mẫu chứng không điều trị. Phần trăm tăng sinh tế bào được tính theo công thức sau:

$$\% Ức chế tăng\sinh(tế bào)=(1-\frac{độ hấp thụ của mẫu thử}{độ hấp thụ của mẫu chứng}) x100\%$$

Nồng độ ức chế tăng trưởng tế bào 50% (IC50) được tính từ đường cong đáp ứng liều.

**Xử lý số liệu**

 Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test student sử dụng phần mềm SigmaPlot 10 (Systat Software Inc, Mỹ). Số liệu được biểu diễn dưới dạng X ± SD. Sự khác biệt có ý nghĩa khi p<0,05.

**Kết quả và bàn luận**

Kết quả độc tính in vitro của curcumin và PEG – CUR trên dòng tế bào ung thư HepG2 và HCT116 được đánh giá bằng thử nghiệm MTT. Paclitaxel được sử dụng làm chứng dương. Kết quả được trình bày trong bảng 1. Với cùng lượng curcumin thì PEG - CUR gây độc tính trên tế bào ung thư mạnh hơn curcumin.

**Bảng 1.** Giá trị IC50 thể hiện tác dụng ức chế tế bào ung thư HepG2

|  |  |
| --- | --- |
| **Mẫu thử** | **IC50 (µg/ml)** |
| **HepG2** | **HCT116** |
| PEG - CUR | 4,37 ± 1,08\* | 4,55 ± 0,51\* |
| Curcumin | 28,61 ± 3,25  | 14,49 ± 1,85 |
| Paclitaxel | 0,446 ± 0,024 \* | 0,763 ±0,0 15\* |

*Số liệu trình bày là giá trị IC50 trung bình của ba thí nghiệm độc lập ± SD. \* Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với IC50 của curcumin, p <0,05.*



**Hình 1.** Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế tăng sinh tế bào HepG2 của Curcumin và PEG – CUR. Giá trị IC50 của của Curcumin và PEG – CUR được tính dựa vào đồ thị và chuyển từ log [µg/mL] sang µg/mL



**Hình 2.** Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế tăng sinh tế bào tế bào HCT116 của Curcumin và PEG – CUR. Giá trị IC50 của của Curcumin và PEG – CUR được tính dựa vào đồ thị và chuyển từ log [µg/mL] sang µg/mL

Hình 1 và 2 cho thấy khả năng ức chế tăng sinh tế bào HepG2 và HCT116 của Curcumin và PEG – CUR. Curcumin cho thấy độc tính tế bào với dòng tế bào ung thư HepG2 có giá trị IC50 là 28,61 µg/ ml. PEG-CUR thể hiện độc tính mạnh hơn so với curcumin trên dòng tế bào ung thư HepG2 với giá trị IC50 là 4,37 µg/ ml. Đối với dòng tế bào ung thư HCT116, giá trị IC50 của curcumin và PEG-CUR tương ứng là 14,49 và 4,55 µg/ ml. Độc tính cao hơn của PEG-CUR có thể giải thích do PEG-CUR có khả năng hòa tan trong nước cao hơn curcumin, nên có thể dễ dàng đi qua màng tế bào và làm tăng độc tính với tế bào ung thư [[5](#_ENREF_5)].

Curcumin có nhiều tác dụng dược lý quan trọng như chống oxy hoá, chống viêm và chống ung thư. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng gây độc tế bào *in vitro* của curcumin trên các dòng tế bào ung thư khác nhau [[7](#_ENREF_7)]. Cơ chế tác dụng ức chế tế bào ung thư của curcumin là nhờ liên kết trực tiếp và gián tiếp vào một vài phân tử đích bao gồm các yếu tố phiên mã (NF-kB, STAT3, β-catenin, AP-1), các yếu tố tăng trưởng (EGF, PDGF, VEGF),và các enzym (COX-2, iNOS, và MMPs), các protein kinases (cyclin D1, CDKs, Akt, PKC, và AMPK), các yếu tố tiền viêm (TNF, MCP, IL-1, và IL-6), các protein (Bax, Bad, and Bak, Bcl2 và Bcl-xL) [[7](#_ENREF_7)]. Curcumin tan trong nước rất ít và nhanh chóng bị phân hủy bởi môi trường kiềm hoặc môi trường trung tính và nó có thời gian bán thải ít hơn 10 phút ở pH 7,2 [[8](#_ENREF_8)]. Nhằm cải thiện sinh khả dụng của curcumin, gần đây, các nhà khoa học đã tìm ra nhiều kỹ thuật như bào chế dưới dạng phytosome, liposome, hydrogel, tạo dẫn chất PEG hóa. Dẫn chất PEG hóa curcumin (PEG-CUR) là dẫn chất của curcumin liên kết với phân tử PEG, làm thay đổi dược tính của phân tử ban đầu. PEG-CUR có nhiều đặc tính hoá lý và dược lý ưu việt, khắc phục được các nhược điểm của curcumin. PEG - CUR đã được chứng minh cải thiện độ hòa tan trong nước và tăng sinh khả dụng của curcumin [[5](#_ENREF_5)]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Tác giả Li. và cộng sự, đã chứng minh rằng PEG-CUR ức chế hiệu quả sự tăng sinh tế bào ung thư tuyến tụy ở 5 µM, tương đương với 20 µM curcumin [[9](#_ENREF_9)]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, PEG-CUR có hiệu quả gây độc tế bào với IC50 nhỏ hơn 6,4 lần trên dòng tế bào HepG2 và 3,2 lần trên dòng tế bào HCT116 so với curcumin tự do. Tác dụng gây độc tế bào tăng lên của PEG-CUR có thể giải thích do độ hòa tan nước cao hơn và dễ hấp thụ tế bào hơn. Ngược lại, curcumin tự do có tác dụng gây độc ít hơn do tính hòa tan trong nước thấp và kém hấp thu.

**Kết luận**

Nghiên cứu đã đánh giá được tác dụng ức chế tăng sinh tế bào của PEG-CUR so với curcumin tự do trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và HCT116. Kết quả cho thấy tác dụng gây độc tế bào trên HepG2 của PEG-CUR có giá trị IC50 là 4,37 ± 1,08 µg/ml so với curcumin là 28,61 ± 3,25 µg/ml ; trên dòng tế bào HCT116, IC50 củaPEG-CUR là 4,55 ± 0,51 µg/ml so với curcumin là 14,49 ± 1,85 µg/ml. Kết quả cho thấy tác dụng ức chế tế bào ung thư của PEG-CUR lớn hơn nhiều so với curcumin tự do. Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về chống ung thư của PEG-CUR trên *in vivo*.

**Lời cảm ơn**

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Đại Học Quốc Gia Hà Nội cho đề tài mã số **QG.16.25** để thực hiện nghiên cứu này.

**Tài liệu tham khảo**

[1] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer res 23(1A) (2003) 363.

[2] Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer letters 269(2) (2008) 199.

[3] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Molecular pharmaceutics 4(6) (2007) 807.

[4] Pasut G, Sergi M, Veronese FM. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. Advanced drug delivery reviews 60(1) (2008) 69.

[5] Pandey MK, Kumar S, Thimmulappa RK, Parmar VS, Biswal S, Watterson AC. Design, synthesis and evaluation of novel PEGylated curcumin analogs as potent Nrf2 activators in human bronchial epithelial cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences 43(1–2) (2011) 16.

[6] Murphy CJ, Tang H, Van Kirk EA, Shen Y, Murdoch WJ. Reproductive effects of a pegylated curcumin. Reproductive Toxicology 34(1) (2012) 120.

[7] Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. Biofactors 39(1) (2013) 56.

[8] Wang Y-J, Pan M-H, Cheng A-L, Lin L-I, Ho Y-S, Hsieh C-Y*, et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 15(12) (1997) 1867.

[9] Li J, Wang Y, Yang C, Wang P, Oelschlager DK, Zheng Y*, et al.* Polyethylene glycosylated curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth through inactivation of Jab1. Molecular pharmacology 76(1) (2009) 81.