

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA VÀ ỨC CHẾ COX-2, iNOS CỦA AMINOETHYL- CHITOOLIGOSACCHARIDES

Ngô Đại Nghiệp¹, Đinh Minh Hiệp²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

²Sở khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nhằm mục tiêu tăng cường khả năng kháng oxy hóa và ức chế enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) và inducible Nitric oxide synthase (iNOS) của chitoooligosaccharides (COS), dẫn xuất aminoethyl COS (AE-COS) được tổng hợp bằng cách gắn nhóm aminoethyl vào vị trí Carbon số 6 vòng pyranose của chitoooligosaccharides. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) proton ¹H được dùng để ứng độ thay thế của dẫn xuất AE-COS. Một số phương pháp như nâng lực khử, bắt gốc tự do DPPH, kháng oxy hóa protein màng, MTT để xác định hoạt tính kháng oxy hóa của COS và AE-COS. Khả năng ức chế một số tín hiệu trong con đường gây viêm nhiễm (như COX-2, iNOS,...) được xác định bằng phương pháp RT-PCR và Western blot sử dụng mô hình tế bào macrophages chuột (RAW 264.7) nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm cho thấy AE-COS được tổng hợp có năng lực khử, bắt gốc DPPH, kháng oxy hóa protein cao hơn COS. Đặc biệt, khả năng ức chế COX-2 và iNOS của AE-COS mạnh hơn COS ở cùng nồng độ khảo sát. Vì vậy, AE-COS có khả năng kháng oxy hóa và ngăn ngừa sự viêm nhiễm.

Từ khóa: Aminoethyl-chitoooligosaccharides (AE-COS), chitoooligosaccharides (COS), kháng oxy hóa, kháng viêm, ức chế enzyme

MỞ ĐẦU

Chitosan là một polysaccharide có nhiều chức năng và ứng dụng, được điều chế từ phản ứng N-deacetyl hóa chitin trong kiềm. Thông thường, quá trình deacetyl hóa không thể đạt được hoàn toàn, thậm chí trong những điều kiện khắc nghiệt. Độ deacetyl hóa thường thay đổi từ 70% đến 95%, phụ thuộc vào phương pháp được sử dụng. Do đó, chitosan luôn có trong lượng phân tử và độ deacetyl hóa rất đa dạng. Chitosan không tan trong nước, kiềm và các dung môi hữu cơ, nhưng lại tan trong hầu hết các dung dịch acid hữu cơ khi pH của dung dịch dưới 6 (Rinaudo, 2006).

Chitosan ứng dụng vào xử lý nước thải, hấp phụ kim loại nặng, chuyển hóa thực phẩm, cố định enzyme và tế bào, resin cho sắc ký, màng lọc năng trong công nghệ sinh học (màng bao thực phẩm, trị bỏng,...), thức ăn gia súc và các lĩnh vực khác. Kynh hướng gần đây là hướng đến các sản phẩm công nghiệp có giá trị cao như mỹ phẩm, chất mang thuốc và dược phẩm (Kim *et al.*, 2006; Rinaudo, 2006). Chitin và chitosan được biết đến có khả năng ức chế khối u, kháng oxy hóa (Prashanth và Tharanathan, 2005), kháng khuẩn, tác động tăng cường miễn dịch, giảm cholesterol (Ngô *et al.*, 2008) và tác động chống lại chứng cao huyết áp. Chitosan không có độc tính và có khả năng tự phân hủy sinh học nên có nhiều ứng dụng, tuy nhiên các ứng dụng của chitosan trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm bị giới hạn bởi bản thân tính hòa tan kém trong nước, trọng lượng phân tử và độ nhớt cao của nó. Vì vậy, để tăng tính tan của chitosan có thể dùng các phương pháp thủy phân đặc biệt là dùng enzyme để thủy phân chitosan tạo ra các chitoooligomer. Hứa hẹn là một hướng đi khá hấp dẫn trong thời gian gần đây.

Các chitoooligosaccharide (COS) được cấu thành từ các đơn vị β-(1-4)-D-glucosamine. Tính chất tốt hơn hẳn chitosan chẳng hạn như độ nhớt thấp, kích thước phân tử nhỏ hơn chitosan và chiều dài mạch ngắn với nhiều nhóm amin tự do, nên COS tan tốt trong nước. COS là hợp chất kháng oxy hóa hiệu quả, làm giảm cholesterol trong máu và điều hòa huyết áp, kiểm soát chứng viêm khớp và gia tăng các hoạt tính kháng khối u. Các chitosan có trong lượng phân tử thấp (LMWC), sản phẩm thủy phân chitosan bằng cellulase hoặc hemicellulase, có hoạt tính ức chế tăng sinh khối u ở chuột. COS có trọng lượng phân tử trung bình từ 1,5 – 5,5 kDa có hoạt tính ức chế các khối u ở cổ tử cung ở chuột BALB/c (Jeon và Kim, 2002).

Cơ thể sinh vật luôn phải đối diện và kiểm soát sự hiện diện của chất oxy hóa và chất kháng oxy hóa. Sự cân bằng giữa chúng luôn cần thiết để duy trì các chức năng sinh học cũng như sự tồn tại của tế bào. Việc chuyển cân bằng về phía gia tăng các tiền chất oxy hóa vượt quá khả năng điều hòa của các chất kháng oxy hóa được gọi là hiện tượng stress oxy hóa (Ngô *et al.*, 2012). Trạng thái stress oxy hóa có thể là kết quả của sự tổn thương các thành phần nội bào trong, dẫn đến các nhóm hợp chất mang oxy hoạt động (ROS) được tạo ra quá mức trong mô và có thể gây chết cho tế bào. Hơn nữa, ROS có mối liên hệ trực tiếp hay gián tiếp đối với quá trình oxy hóa các phân tử sinh học (lipid, protein và DNA) và có liên quan đến nhiều bệnh như ung thư, viêm khớp, tổn thương cấu trúc và chức năng của nơ-ron thần kinh (Alzheimer), tiểu đường, cao huyết áp, viêm và lão hóa (Ngô *et al.*, 2012). Hơn nữa quá trình viêm là phản ứng của mô sống với các mối nguy hại và là một phần của sự đáp ứng của sinh vật đối với các kích thích từ môi trường bên trong hay bên ngoài cơ thể. Đây là cơ chế phòng vệ nhằm đưa cơ thể trở về trạng thái bình thường. Trong trường hợp quá trình viêm trở thành mãn tính, nó có thể gây ra nhiều tác hại và diễn tiến thành bệnh. Viêm mãn tính có thể hiện diện ở nhiều bệnh như: tiểu đường, viêm khớp, ung thư, bệnh phổi và bệnh tự miễn (Ngô 2008, Canonica 2006).

Quá trình viêm được điều hòa thông qua các con đường tín hiệu tế bào khác nhau, trong đó có các cyclooxygenase (COX-1, COX-2 và COX-3; các enzyme cần cho sự tổng hợp prostaglandin) và nitric oxide synthase (eNOS, nNOS và iNOS; các enzyme cần cho quá trình sản sinh nitric oxide (NO)). AP-1 là yếu tố thường đi kèm với NF-κB trong việc điều hòa các gen này. Nitric oxide (NO) và prostaglandin là sản phẩm của các enzyme liên quan đến quá trình viêm như iNOS và COX-2. Chitosan và một số dẫn xuất của chúng cũng đã chứng minh có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng COS là dẫn xuất của chitosan để tan trong nước và tổng hợp dẫn xuất AE-COS nhằm nâng cao hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế một số tín hiệu viêm của tế bào trên mô hình tế bào macrophage chuột RAW 264.7.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và hóa chất

Chitooligosaccharide là sản phẩm thủy phân của chitosan vỏ tôm có độ deacetyl hóa trên 90% được cung cấp bởi công ty Chitoworld, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam. Các chất 2-aminoethyl hydrochloride, Tris-HCl, EDTA, FeSO₄, H₂O₂, NaBH₄, K₃[Fe(CN)₆], FeCl₃, acid 3,5-Dinitrosalicylic (DNS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl và một số hóa chất khác được mua từ công ty hóa chất Sigma (St. Louis, MO, USA). Cellulase được Công ty trách nhiệm hữu hạn Gia Tường, tỉnh Bình Dương, Việt Nam cung cấp. Các hóa chất khác đều có giá trị thương mại và độ tinh khiết cao. Dòng tế bào RAW 264.7 được cung cấp từ phòng thí nghiệm sinh hóa biển, Busan, Hàn quốc.

Chúng tôi tổng hợp dẫn xuất AE-COS theo phương pháp trước đây của chúng tôi có cải tiến (Ngo *et al.*, 2008) được tóm tắt như sau: 0,2g COS: 15 ml NaOH 3M và 40°C để tổng hợp AE-COS và hiệu suất phản ứng đạt 85%.

Phương pháp

Các phương pháp thử hoạt tính kháng oxy hóa

Xác định năng lực khử theo Yen và Chen (1995). Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH đo mật độ quang ở bước sóng 515nm theo Nanjo và cộng sự (1996), giá trị IC₅₀ được xác định tại nồng độ của chất thử nghiệm có hiệu suất bắt gốc DPPH là 50%. Phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) theo Hansen và cộng sự (1989) để xác định khả năng gây độc tế bào. Thử nghiệm kháng oxy hóa protein màng theo Ngo DH và cộng sự (2011).

Phương pháp xác định khả năng ức chế tín hiệu tế bào

Tế bào được tiền xử lý với những nồng độ khác nhau của COS và AE-COS trong 1h và sau đó được kích thích bởi LPS (1 µg/ml), tiếp tục ủ trong 24 giờ. Bàng cDNA của các mẫu được so sánh với nhau và với đối chứng dương ibuprofen 1 µg/ml (PC) hoặc với lô không xử lý LPS (blank) và lô chỉ xử lý với LPS sử dụng phương pháp RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) sử dụng các cặp mồi chuyên biệt (iNOS – mồi thuận: 5'-TTCCAGAAATCCCTGGACAAG-3', mồi ngược: 5'-TGGTCAAACCTCTGGGGTTC-3'; COX-2 – mồi thuận: 5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3', mồi ngược: 5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3').

Tế bào cũng được xử lý tương tự như trên rồi ly giải tế bào, những lượng protein bằng nhau của tế bào ly giải được phân tích bằng điện di SDS. Xác định khả năng ức chế các tín hiệu tế bào như: iNOS, eNOS, COX-1, COX-2... của COS và AE-COS bằng phương pháp Western blot với các kháng thể chuyên biệt, β-actin được dùng ở những mức độ tương ứng để xác định những lượng protein bằng nhau dùng cho điện di.

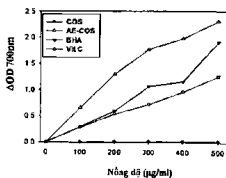
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định năng lực khử

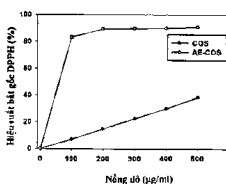
COS và dẫn xuất được pha thành những nồng độ khác nhau: 100, 200, 300, 400 và 500 µg/ml. Vitamin C và BHA được sử dụng làm chất đối chứng dương. Kết quả cho thấy, năng lực khử của COS và dẫn xuất đều tỉ lệ thuận với nồng độ khảo sát. Dẫn xuất AE-COS cho thấy có năng lực khử cao hơn so với COS ban đầu ở tất cả các nồng độ khảo sát. Ở nồng độ 500 µg/ml, dẫn xuất AE-COS có hoạt tính cao hơn COS 42 lần (Hình 1). So với vitamin C và BHA, năng lực khử của AE-COS vẫn thấp hơn 1,4 lần so với BHA và 1,7 lần so với vitamin C. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Xing và cộng sự (2005).

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của COS và AE-COS

COS và dẫn xuất AE-COS được pha thành những nồng độ khác nhau từ 100 - 1000 µg/ml. BHA và vitamin C được tiền hành song song theo phương pháp của Shimada và cộng sự (1992). Kết quả cho thấy, hiệu suất bắt gốc DPPH tăng tuyến tính với chiều tăng của nồng độ khảo sát. Dẫn xuất AE-COS có hiệu suất bắt gốc DPPH cao hơn COS ở tất cả các nồng độ khảo sát (Hình 2).



Hình 1. Tương quan giữa giá trị ΔOD của dung dịch sau phản ứng tạo phức hợp ferrocyanide với nồng độ COS và AE-COS



Hình 2. Hiệu suất bắt gốc DPPH của COS và AE-COS ở những nồng độ khác nhau

Giá trị IC₅₀ của COS là 655,9 µg/ml cao hơn dẫn xuất AE-COS là 60,46 µg/ml. Điều này cho thấy nhóm aminoethyl gắn vào vị trí C6 trên vòng pyranose của COS làm tăng hoạt tính kháng oxy hóa của dẫn xuất. Như vậy, chúng tôi đã nâng cao được hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của COS ban đầu thông qua việc gắn thêm nhóm aminoethyl vào vị trí carbon

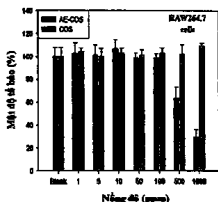
số 6 của vòng pyranose. Điều này có thể được giải thích do DPPH là một trong số các hợp chất luôn hiện hữu một gốc tự do proton có khả năng hấp thụ điển hình, tức là khả năng nhận proton khi có sự hiện diện của những hợp chất có khả năng cho proton, những chất có gốc proton (Tao *et al.* 2008). Nói một cách khác, khả năng bắt gốc tự do DPPH của các chất kháng oxy hóa phụ thuộc chủ yếu vào khả năng cho proton của chúng. Do đó, việc gắn thêm nhóm aminoethyl vào COS đã làm tăng khả năng nhường proton của COS ban đầu.

Khả năng gây độc tế bào của COS và AE-COS

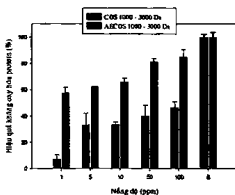
Dẫn xuất AE-COS cũng gây độc cho tế bào RAW 264.7 ở những nồng độ lớn hơn 100 ppm (Hình 9). Như vậy, chúng tôi chỉ có thể sử dụng những nồng độ nhỏ hơn hoặc bằng 100 ppm để khảo sát hoạt tính ức chế tín hiệu viêm của dẫn xuất này.

Khả năng bảo vệ protein tế bào của COS và AE-COS

Khi thử nghiệm khả năng bảo vệ protein màng của COS và AE-COS trên tế bào RAW 264.7 cho thấy AE-COS có hoạt tính mạnh hơn so với COS ban đầu. Tuy nhiên, mức độ kháng oxy hóa và bảo vệ các phân tử sinh học này thay đổi tùy theo nồng độ khảo sát (Hình 4).



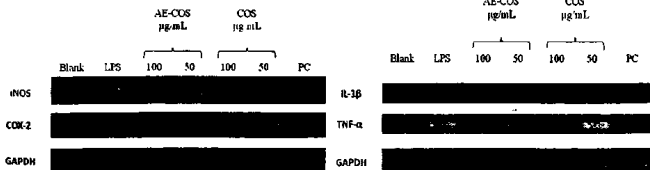
Hình 3. Một độ tế bào RAW264.7 xử lý ở các nồng độ khác nhau của COS và AECOS trong 48 giờ. Blank: là tế bào không xử lý với chất thử nghiệm, thí nghiệm được lặp lại 3 lần



Hình 4. Hiệu quả kháng oxy hóa protein màng của COS và AE-COS ở các nồng độ khác nhau. B: Đối chứng âm, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

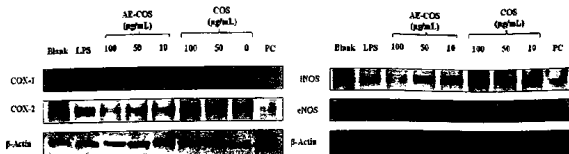
Hoạt tính kháng viêm của COS và dẫn xuất AE-COS trên tế bào RAW 264.7

Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế sự biểu hiện của mRNA iNOS, COX-2 cho thấy COS và AE-COS có hoạt tính ức chế sự biểu hiện của mRNA iNOS và COX-2, được cảm ứng bởi LPS (Hình 5). Hơn nữa, tác động ức chế của AE-COS mạnh hơn so với COS ban đầu trong việc ức chế sự biểu hiện của các gen iNOS và COX-2 ở mức độ mRNA. Khi khảo sát động trên sự biểu hiện của mRNA của các tín hiệu viêm khác như IL-1 β và TNF- α , chúng tôi nhận thấy COS và AE-COS cũng có hoạt tính ức chế sự biểu hiện ở mức độ mRNA tương tự như trên (Hình 5). Như vậy, COS và AE-COS có hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự biểu hiện của các gen iNOS, COX-2, IL-1 β và TNF- α .



Hình 5. Tác động ức chế của COS và AECOS đối với sự biểu hiện của mRNA iNOS, COX-2, TNF α và IL-1 β ở tế bào RAW 264.7. Đối chứng dương Ibuprofen (PC), là không xử lý LPS (blank) và là chỉ xử lý với LPS, GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) được dùng ở những mức độ tương ứng để xác định lượng mRNA bằng nhau cho điện di.

Tác động ức chế sự biểu hiện ở mức protein iNOS và COX-2 của COS, AE-COS có thể được quan sát ở hình 6 và AE-COS có hoạt tính ức chế mạnh hơn so với COS. Hầu như hợp chất nào có thể ức chế iNOS và COX-2 thì cũng có thể ức chế luôn eNOS và COX-1, dạng đồng phân cơ bản của chúng. Tuy nhiên, việc ức chế luôn eNOS và COX-1 lại có thể đưa đến các tác dụng phụ khi chúng là các enzyme cần thiết cho sự điều hòa bình thường của cơ thể. Hầu hết các thuốc kháng viêm có nguồn gốc steroid trước đây và thuốc kháng viêm thế hệ mới không có nguồn gốc steroid cũng không thể ức chế iNOS và COX-2 một cách chuyên biệt (Arellano *et al.* 2006). Tuy nhiên, COS và AE-COS lại cho thấy khả năng ức chế chuyên biệt đối với iNOS và COX-2 mà không làm ảnh hưởng đến sự biểu hiện bình thường của eNOS và COX-1.



Hình 6. Tác động của COS và AECOS lên sự biểu hiện của các protein COX-1, COX-2, iNOS và eNOS của tế bào RAW264.7. Blank: Đối chứng, không xử lý; LPS: Xử lý với LPS nhưng không xử lý với COS hay AE-COS; PC: chứng dương, lipopolysaccharide ($\mu\text{g/ml}$). β -actin được dùng ở những mức độ tương ứng để xác định lượng protein bằng nhau dùng cho điện di.

KẾT LUẬN

Các kết quả cho thấy dẫn xuất aminoethyl-COS (AE-COS) được tổng hợp hóa học từ chitooligosaccharides (COS) hoạt tính kháng oxy hóa và khả năng ức chế các tín hiệu tế bào tiền viêm cao hơn COS sử dụng hệ thống tế bào nuôi cấy. Vì vậy các kết quả này cho phép chúng tôi tiếp tục nghiên cứu hoạt tính sinh học khác của chúng trên hệ thống tế bào nuôi cấy để tìm hiểu con đường sinh hóa bên trong tế bào và có khả năng ứng dụng vào một số lĩnh vực khác nhau.

Lời cảm ơn

Chúng tôi cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) để tài mã số 106.03-2011.36 đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arellano FM, Yood MJ, Wentworth CE, Oliveria SA, Rivero E, Verma A and Rothman KJ (2006) Use of cyclo-oxygenase 2 inhibitor (COX-2) and prescription non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in UK and USA populations: Implications for CVD cardiovascular profile. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 15: 861-872.
- Jeon YJ, Kim SK (2002) Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J Microbiotechnol* 12: 503-507.
- Kim SK, Ngo DN and Rajapakse N (2006) Therapeutic Prospectives of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *J Chitin chitosan* 11: 10.
- Nano F, Goto K, Sato R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenylpicrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 21: 895-902.
- Ngo DH, Qian ZJ, Vo TS, Ryu BM, Ngo DN, Kim SK (2011) Antioxidant activity of gallate-chitooligosaccharides in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *Carbohydr Polym* 84: 1282-1288.
- Ngo DN, Kim MM, Kim SK (2012) Protective effects of aminoethyl-chitooligosaccharides against oxidative stress in RAW 264.7 cells. *Int J Bio Macromol* 50: 624-631.
- Ngo DN, Qian ZJ, Je JY, Kim MM, Kim SK (2008) Aminoethyl chitooligosaccharides inhibit the activity of angiotensin converting enzyme. *Process Biochem* 43: 119-123.
- Prashanth KVH and Tharanathan RN (2005) Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1722: 22-29.
- Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 31: 603-632.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K and Nakamura T (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autooxidation of soybean oil cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 40: 945-948.
- Tao S, Quian Y, Dongxuan Z, Fang M (2008) Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 5774-5776.
- Xing R, Liu S, Guo Z, Yu H, Wang P, Li C, Li Z and Li P (2005) Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorg Med Chem* 13: 1573-1577.
- Yen GC and Chen HY (1995) Antioxidant activity of anous tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agri Food Chem* 43(1): 25-32.

A STUDY ON ANTIOXIDANT ABILITY AND COX-2, INOS INHIBITION OF AMINOETHYL- CHITOOLIGOSACCHARIDES

Ngo Dai Nghiep¹, Dinh Minh Hiep²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Science, VNU-HCM, Viet Nam

²Department of Science and Technology HCMC, HoChiMinh city, Viet Nam.

SUMMARY

The aim of this study was to improve antioxidant ability and inhibition of enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible

oxide synthases (iNOS) of chitooligosaccharides (COS) and aminoethyl COS derivative (AE-COS) which were synthesized by grafting aminoethyl at C6 position on pyranose of COS. $^1\text{H-NMR}$ was used to determine substitution degree. Some methods such as reducing power, DPPH scavenging, membrane protein oxidation, MTT were used on this study to antioxidant activity determination of COS and AE-COS. Inhibitive ability on some cell signals in inflammatory pathway as COX-2, iNOS etc. was determined by RT-PCR and Western blot using mouse macrophage RAW 264.7. The results showed that AE-COS has reducing power, DPPH scavenging, protein antioxidant stronger than COS. Especially, COX-2 and iNOS inhibitive ability of AE-COS higher than COS dose dependent. Therefore, AE-COS has antioxidant effect and prevention of inflammation.

Keywords: Aminoethyl chitooligosaccharides (AE-COS), chitooligosaccharides (COS), antioxidant, antiinflammation, enzym inhibition.

* Author for correspondence: Tel. 0908283498; Email: ndnghiep@hcmus.edu.vn hoặc nghiep75@yahoo.com