

TÁC DỤNG ỨC CHẾ CỦA HOPEAPHENOL VÀ MALIBATOL A TÁCH TỪ VỎ CÂY SAO ĐEN ĐỐI VỚI ENZIM MÀNG VÀ QUÁ TRÌNH ĐƯỜNG PHÂN CỦA VI KHUẨN GÂY SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS*

NGUYỄN QUANG HUY, PHAN TUẤN NGHĨA

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG HN

Theo số liệu điều tra gần đây của Viện Răng Hàm Mặt Trung Ương, khoảng 90% dân số Việt Nam mắc các bệnh về răng miệng, trong đó phổ biến nhất là sâu răng và viêm quanh răng. Bệnh sâu răng là bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn đường miệng gây ra. Bệnh sâu răng gây ảnh hưởng tới sức khỏe của người bệnh, hơn nữa chữa trị bệnh sâu răng có chi phí cao. Trong số các vi khuẩn đường miệng *Streptococcus mutans* được coi là nguyên nhân chính gây bệnh sâu răng do vi khuẩn này có khả năng sinh axit và chịu axit [1, 4]. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, việc sử dụng chất kháng khuẩn là biện pháp hữu hiệu nhất hiện nay để phòng ngừa sâu răng và các bệnh răng miệng [8, 9]. Hiện nay, fluo vẫn được cho là một chất kháng khuẩn chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng. Tuy nhiên, tình trạng nhiễm fluo được phát hiện trong các cộng đồng dân cư đã khiến các nhà nghiên cứu phải cân nhắc việc sử dụng fluo và tìm thêm các chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluo ở nồng độ thấp mà vẫn có hiệu quả trong việc chống sâu răng.

Chất kháng khuẩn tự nhiên đã và đang thu hút được quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam [3, 8, 10]. Tại Việt Nam, kết quả điều tra cho thấy nhiều cây thuốc dân gian như sao đen, sắn thuyền, măng cụt... có hoạt tính ức chế sinh axit và diệt vi khuẩn *S. mutans* [9, 10]. Tác dụng chống sâu răng của các dịch chiết thực vật được phát hiện là có liên quan đến khả năng ức chế các enzym tham gia các quá trình sinh axit, chịu axit, tiêu thụ oxy hay các enzym chống tổn thương oxy hóa [6]. Kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi [10] cho thấy dịch chiết ethanol từ vỏ cây sao đen có tác dụng ức chế sinh axit, diệt vi khuẩn *S. mutans*. Gần đây bằng các phương pháp sắc ký,

khối phổ, cộng hưởng từ hạt nhân chúng tôi đã tách, tinh sạch và xác định được cấu trúc của hai chất thuộc nhóm polyphenol từ vỏ cây sao đen là hopeaphenol ($C_{56}H_{42}O_{12}$) và malibatol A ($C_{28}H_{20}O_7$) [11]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A tách được từ vỏ cây sao đen lên một số quá trình sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn gây sâu răng *S. mutans* GS-5. Các kết quả nghiên cứu này góp phần hiểu rõ hơn cơ chế tác dụng của hopeaphenol và malibatol A đối với *S. mutans* làm cơ sở cho việc ứng dụng các chất này vào các sản phẩm bảo vệ răng miệng.

Từ khoá: *Streptococcus mutans*, sâu răng, hopeaphenol, malibatol A.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* GS-5 là quà tặng của giáo sư Robert E. Marquis, Trường Đại học Rochester, Mỹ.

Hopeaphenol và malibatol A được tách chiết từ vỏ sao đen theo quy trình của Nguyễn Quang Huy và cs. [11].

2. Phương pháp

a. Giữ và nuôi cấy các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường thạch TSA (tryptic soy agar) của hãng Difco (Mỹ). Tế bào được nuôi tĩnh hay nuôi cấy lắc ở 37°C trong môi trường chứa 3% trypton, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucose.

b. Chuẩn bị dịch tế bào thắm

Tế bào sau khi nuôi được rửa bằng dung dịch muối khoáng 1x (50 mM KCl, 1 mM

MgCl₂) và được hoà lại trong đệm Tris- HCl 50 mM, pH 7,5 có bổ sung MgCl₂ 1 mM, KCl 50 mM sao cho mật độ tế bào tương đương OD700 = 14, bổ sung thêm 10% toluen, ủ ở 37°C trong 5 phút và rồi chuyển sang làm đông đá bằng nitơ lỏng trong 1 phút, bước làm đông-làm tan được lặp lại hai lần, toluen sau đó được loại bỏ bằng ly tâm. Kết tủa tế bào được hòa tan trở lại trong đệm Tris-HCl pH 7,5 với thể tích bằng 1/10 thể tích ban đầu. Dịch tế bào chuẩn bị được sử dụng trong các thí nghiệm với enzym.

c. Tác dụng diệt khuẩn của các chất nghiên cứu

Tác dụng gây chết đối với *S. mutans* được tiến hành theo phương pháp của Phan và cs. [12]. Tác dụng gây chết của các chất nghiên cứu được đánh giá bằng giá trị D= LogN/No, trong đó No là số vi khuẩn ban đầu, N là số vi khuẩn tại thời điểm nghiên cứu. Giá trị D tương ứng với LogN/No = -1 là thời gian cần thiết để 90% quần thể vi khuẩn bị tiêu diệt.

d. Các phương pháp nghiên cứu enzym

Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [14]. Hoạt độ enzym ATPase được xác định theo phương pháp của Sturr và Marquis [15]. Hoạt độ enzym phospho transferase system (PTS) được xác định theo phương pháp của Belli và tập thể [2]. Hoạt độ enzym pyruvate kinase (PK) được xác định như mô tả trong Phan và Marquis [13], hoạt độ lactate dehydrogenase được xác định theo phương pháp của Iwami và cs. [5].

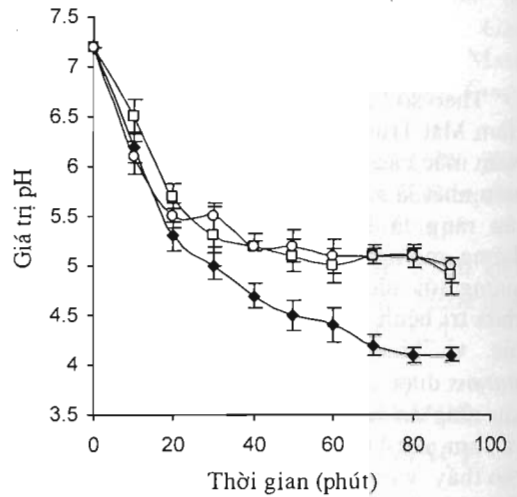
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A ức chế sinh axit và diệt vi khuẩn *S. mutans* GS-5

a. Tác dụng ức chế sự sinh axit của *S. mutans* GS-5 từ hopeaphenol và malibatol A

Khả năng gây sâu răng của *S. mutans* gắn liền với đặc tính sinh axit mạnh của nó trong môi trường dư thừa đường, chính vì vậy, tìm hiểu tác dụng ức chế khả năng sinh axit của *S. mutans* thường là một trong những thí nghiệm khởi đầu trong nghiên cứu các chất chống sâu răng. Kết quả hình 1 cho thấy hopeaphenol và malibatol A có tác dụng ức chế sinh axit của *S.*

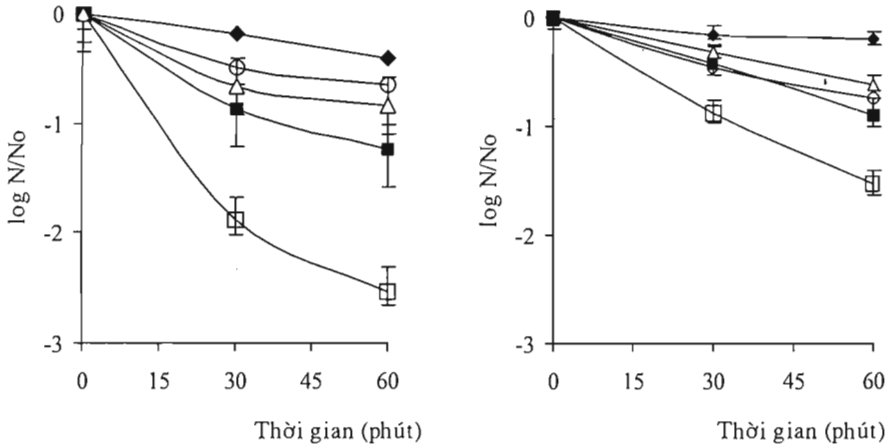
mutans GS-5. Với nồng độ 4 mM sau 90 phút thí nghiệm pH ở các mẫu nghiên cứu dao động trong khoảng từ 4,9 đến 5,1 trong khi ở mẫu đối chứng giá trị pH cuối cùng là 3,8. Hopeaphenol và malibatol A có hoạt tính ức chế sự sinh axit của *S. mutans* tương đương với các phân đoạn tách được từ dịch chiết vỏ măng cụt trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai Phương và cs. [9].



Hình 1. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên sự sinh axit của *S. mutans* GS-5. Đối chứng (◆); hopeaphenol (□); malibatol A (△).

b. Tác dụng diệt khuẩn *S. mutans* của hopeaphenol và malibatol A

Thí nghiệm diệt khuẩn *S. mutans* GS-5 được chúng tôi tiến hành tại pH 4 và pH 7. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hopeaphenol với nồng độ 3 mM có giá trị D tương ứng ở pH 4 là 45 phút và pH 7 là trên 60 phút. Với nồng độ 4 mM malibatol A có giá trị D tương ứng là 16 và 32 phút ở pH 4 và pH 7 (hình 2). Kết quả này cho thấy, hopeaphenol và malibatol A không những có tác dụng ức chế sinh axit mà còn có tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans*. Khả năng diệt *S. mutans* của hopeaphenol cũng như malibatol A ở pH 4 cao hơn so với pH 7 và tương tự như kết quả thu được từ dịch chiết vỏ sao đen [10]. Khả năng diệt *S. mutans* ở pH 4 tốt hơn so với pH 7 của hopeaphenol và malibatol A là rất đáng quan tâm vì men răng bị bào mòn trong môi trường axit do *S. mutans* sinh ra và bản thân nó lại sống được trong môi trường này.



Hình 2. Khả năng diệt *S. mutans* GS-5 tại pH 4 (trái) và pH 7 (phải) của hopeaphenol, malibatol A đối chứng (◆); hopeaphenol 0,75 mM (△), 3 mM (■); malibatol A 1 mM (○), 4 mM (□).

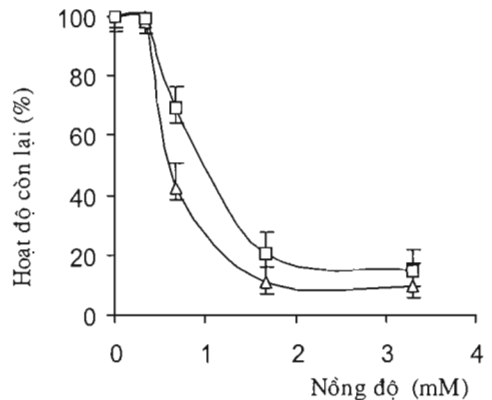
2. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên một số enzym quan trọng của *S. mutans*

Khả năng thích nghi môi trường axit của *S. mutans* liên quan đến nhiều cơ chế khác nhau, trong đó quan trọng nhất là hoạt động bơm proton của hệ thống F-ATPase. Hệ thống này có chức năng bơm proton ra ngoài, duy trì pH nội bào ổn định trong tế bào *S. mutans* khi môi trường ngoại bào bị axit hóa [1, 15]. Đường phân và khả năng sử dụng đường glucose là chức năng cơ bản của các vi khuẩn gây bệnh sâu răng giúp chúng tồn tại và sinh trưởng trong môi trường axit [2]. Việc nghiên cứu ảnh hưởng của các chất tinh sạch lên hoạt độ các enzym quá trình đường phân, vận chuyển đường sẽ là cơ sở cho việc giải thích cơ chế tác dụng của các chất này lên *S. mutans* [7, 13]. Để kiểm tra các giả thiết này, chúng tôi đã nghiên cứu tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên một số enzym quan trọng của *S. mutans* là F-ATPase, phospho transferase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase và NADH oxidase.

a. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ ATPase

F-ATPase là một enzym trên màng tế bào, có vai trò quan trọng trong quá trình vận chuyển proton qua màng, liên quan đến khả năng chịu axit của *S. mutans*. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ F-ATPase (hình 3) cho thấy

hopeaphenol nồng độ 1,3 mM hay malibatol A nồng độ 0,75 mM ức chế 50% hoạt độ ATPase của *S. mutans* GS-5. Với nồng độ hopeaphenol và malibatol A trên 3 mM hoạt độ ATPase bị ức chế tới 80%. Tác dụng ức chế ATPase của hopeaphenol và malibatol A giải thích một phần tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* GS-5 tại pH axit của dịch chiết vỏ sao đen trong nghiên cứu trước đây [10].

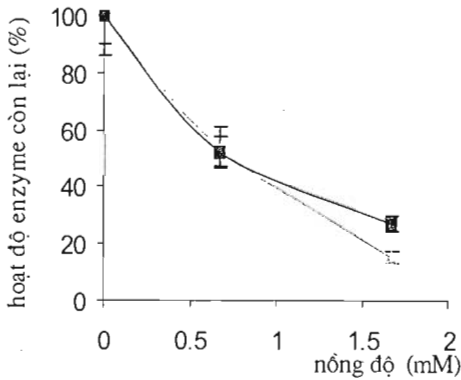


Hình 3. Ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ ATPase của *S. mutans* GS-5
Hopeaphenol (□); malibatol A (△).

b. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ phosphotransferase (PTS)

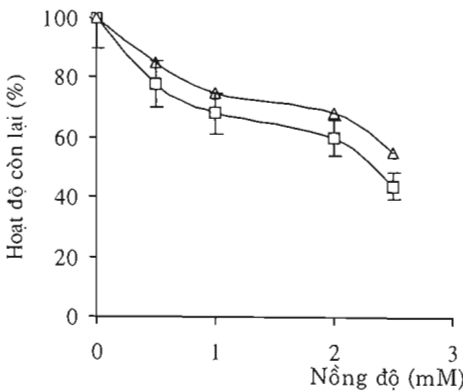
Enzym chuyển gốc phosphate (PTS) có vai trò chính trong việc phosphoryl hoá glucose ở

S. mutans. Do vậy chúng tôi đã tiến hành tìm hiểu tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ của enzym này ở *S. mutans* GS-5. Tế bào thấm được ủ với hopeaphenol hay malibatol A ở các nồng độ khác nhau trong 10 phút, sau đó hoạt độ enzym còn lại được xác định. Kết quả thí nghiệm (hình 4) cho thấy hai hợp chất này ở nồng độ 0,75 mM đã ức chế được 50% hoạt độ của PTS. Với nồng độ các hợp chất tăng trên 1,5 mM hoạt độ PTS chỉ còn lại dưới 30%. Tác dụng ức chế PTS góp phần giải thích nguyên nhân hopeaphenol và malibatol A và dịch chiết Sao đen ức chế sự sinh axit của *S. mutans* GS-5.



Hình 4. Ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ enzym phosphotransferase của *S. mutans* GS-5
Hopeaphenol (■); malibatol A (▲).

c. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ lactate dehydrogenase

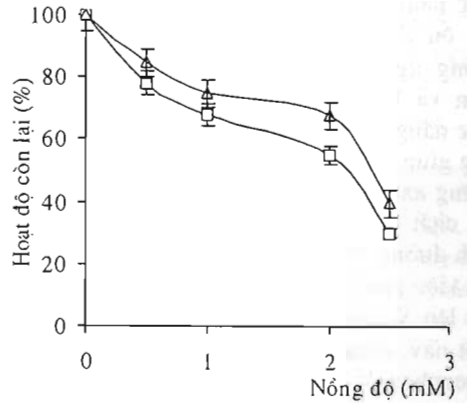


Hình 5. Ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ lactate dehydrogenase của *S. mutans* GS-5
Hopeaphenol (△); malibatol A (□).

Chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A tới lactate dehydrogenase, là enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hoá pyruvate thành lactate với sự có mặt của NADH. Khả năng ức chế hoạt độ của hopeaphenol, malibatol A đối với lactate dehydrogenase là thấp hơn so với tác dụng của chúng lên F-ATPase hay PTS. Với nồng độ tương ứng là 2,5 mM và 2,3 mM của hopeaphenol và malibatol A, 50% hoạt độ của enzym lactate dehydrogenase bị ức chế (hình 5).

d. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ pyruvate kinase

Pyruvate kinase là một trong các enzym của quá trình đường phân. Enzym này xúc tác cho phản ứng chuyển hoá phosphoenol pyruvate khi có mặt ADP thành pyruvate và ATP. Tương tự như đối với lactate dehydrogenase, ở nồng độ tương ứng 2,5 mM và 2,2 mM, hopeaphenol và malibatol A ức chế 50% hoạt độ của pyruvate kinase (hình 6). Việc ức chế pyruvate kinase của hopeaphenol, malibatol A góp phần giải thích vì sao dịch chiết Sao đen cũng như các hợp chất này đã ức chế quá trình sản xuất axit của *S. mutans* GS-5.

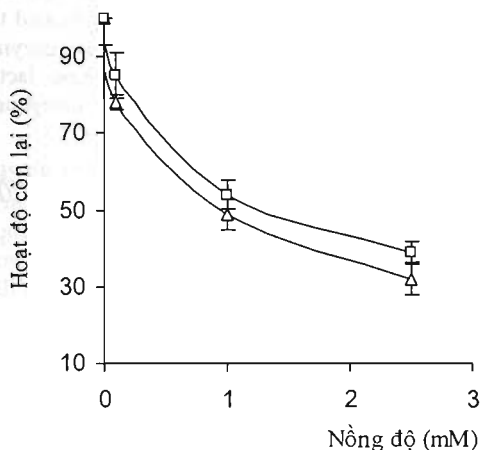


Hình 6. Ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ pyruvate kinase của *S. mutans* GS-5
Hopeaphenol (△); malibatol A (□).

e. Tác dụng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ NADH oxidase

Trong quá trình hô hấp các vi khuẩn xoang miệng sinh ra các gốc oxy hoạt động có khả năng gây tổn thương oxy hoá lên tế bào [7, 14].

Để bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hoá, hàng loạt các enzym bảo vệ đã được sinh tổng hợp trong đó có NADH oxidase (NOX). Nhờ NADH oxidase, quá trình khử đơn trị oxy được hạn chế, do đó hạn chế quá trình hình thành gốc oxy hoạt động. Do vậy, NADH oxidase là enzym chủ yếu tiêu thụ oxy của vi khuẩn *S. mutans* và được xem là có vai trò chống tổn thương oxy hoá. Kết quả thu được (hình 7) cho thấy NADH oxidase đã bị mất tới 50% hoạt độ khi có mặt hopeaphenol ở nồng độ 1,5 mM và malibatol A ở nồng độ 1 mM. Như vậy, NOX khá nhạy cảm với hopeaphenol và malibatol A



Hình 7. Ảnh hưởng của hopeaphenol và malibatol A lên hoạt độ NADH oxidase của *S. mutans* GS-5
Hopeaphenol (Δ); malibatol A (□).

III. KẾT LUẬN

Hopea phenol, malibatol A có tác dụng ức chế sinh axit và giết vi khuẩn *S. mutans*.

Cơ chế tác dụng của hopea phenol, malibatol A lên *S. mutans* có thể do các chất này ức chế hoạt độ các enzym phosphoryl hoá đường, lactate dehydrogenase, pyruvate kinase liên quan đến các quá trình sinh axit, ATPase liên quan đến quá trình

chịu axit và NADH oxidase liên quan đến quá trình tiêu thụ oxy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bender G. R. et al.**, 1986: Infect Immun., 53: 331-338.
2. **Belli W. A. and Marquis R. E.**, 1994: Oral Microbiol. Immunol., 9: 29-34.
3. **Chen C. P. et al.**, 1989: J. Ethnopharmacol., 27: 285-295.
4. **Hamada S. and Slade H. D.**, 1980: Microbiol. Rev., 44: 331-384.
5. **Iwami Y. et al.**, 1992: Oral Microbiol. Immunol., 7: 304-308.
6. **Murata R. M. et al.**, 2008: FEMS Microbiol. Lett., 282:174-181.
7. **Nguyễn Thị Mai Phương, Robert E Marquis**, 2006: Tạp chí Sinh học, 28: 66-70.
8. **Nguyễn Thị Mai Phương, Bùi Tuyết Anh**, 2007: Tạp chí Dược liệu, 12: 19-23.
9. **Nguyễn Thị Mai Phương và cs.**, 2004: Tạp chí Dược học, 44: 18-21.
10. **Nguyễn Quang Huy và cs.**, 2005: Tạp chí Dược học, 45: 13-19.
11. **Nguyễn Quang Huy và cs.**, 2007: Tạp chí Dược học, 47: 37-39.
12. **Phan T. N. et al.**, 2000: Arch. Microbial., 174: 248-255.
13. **Phan T. N. and Marquis R. E.**, 2006: Can. J. Microbiol., 52: 977-983.
14. **Pool L. B. and Claiborne A.**, 1986: J. Biol. Chem., 261: 14525-14533.
15. **Sturr M. G. and Marquis R. E.**, 1992: Appl. Environ. Microbiol., 58: 2287-2291.

EFFECTS OF HOPEAPHENOL AND MALIBATOL A ISOLATED FROM BARK OF *HOPEA ODORATA* ROXB ON MEMBRANE ENZYMES AND GLYCOLYSIS OF *STREPTOCOCCUS MUTANS*

NGUYEN QUANG HUY, PHAN TUAN NGHIA

SUMMARY

Hopeaphenol and malibatol A isolated from the bark of *Hopea odorata* Roxb were found to have a multitarget effect for the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. Hopeaphenol and malibatol A at a concentration of 4 mM inhibited acid production by *Streptococcus mutans* GS-5 in a pH-drop assay with excess glucose. Both the compounds at milimolar concentrations were also found to be highly lethal for *S. mutans* GS-5 and their lethal effect at pH 4 was stronger than that at pH 7. Our further studies indicated that hopeaphenol and malibatol A in the same range of concentrations inhibited the activity of membrane enzymes (F-ATPase, phosphoenol pyruvate: phosphotransferase system), glycolytic enzymes (pyruvate kinase, lactate dehydrogenase) and NADH oxidase of *S. mutans*. The obtained results suggested that the two compounds could have a potential use in oral care products.

Ngày nhận bài: 29-4-2009