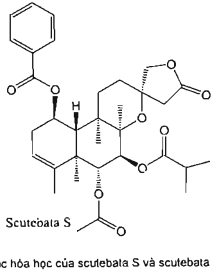
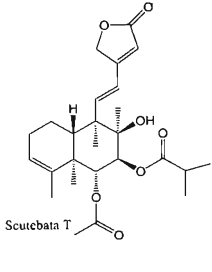
hoạt chất mới (Hình 1) phân lập từ loài thực vật này là scutebata S, scutebata T và chứng minh các hoạt chất này có hoạt tính kháng tế bào ung thư (Thao *et al*, 2014). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, lần đầu tiên, khả năng chống loãng xương *in vitro* của hai hoạt chất mới là scutebata S và scutebata T được công bố khi thử nghiệm trên dòng tế bào MC3T3-E1.





Hình 1. Cấu trúc hóa học của scutebata S và scutebata T.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Dòng tế bào MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593) được mua từ ngân hàng tế bào American Type Cell Culture – ATCC (Manassas, Virginia, USA). Môi trường nuôi cấy tế bào Alpha Modified Eagle Medium (alpha-MEM), huyết thanh phôi bò (Fetal Bovine Serum - FBS) và kháng sinh Penicillin-Streptomycin (PS) được mua từ hãng Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Alkalin phosphatase (ALP) assay kit có nguồn gốc từ hãng Abcam, Cambridge, England. Các hóa chất khác như vitamin C (ascorbic acid), β - glycerophosphate, sirius red, alizarin red S, acid picric, sulforhodamine B (SRB) v.v được cung cấp bởi Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA). Scutebata S và scutebata T được phân lập và khẳng định cấu trúc, đặc tính theo D T Thao *et al*, (2014).

Phương pháp nuôi cấy dòng tế bào MC3T3-E1

Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 được nuôi trong môi trường alpha-MEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (FBS), 1% kháng sinh PS ở điều kiện 37°C và 5% CO_2. Tế bào được cấy chuyển bằng Trypsin - EDTA (0,05 %) sau 2 ngày nuôi cấy. Để xác định khả năng biệt hóa MC3T3-E1 thành nguyên bào xương, tế bào sau khi phủ 80% bề mặt nuôi cấy, được nuôi trong môi trường biệt hóa có bổ sung 10 mM β-glycerophosphate và 50 µg/mL ascorbic acid. Hoạt chất nghiên cứu được đưa vào tế bào với các nồng độ 4 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml và 0,08 µg/ml. DMSO 10% được sử dụng làm đối chứng âm. Môi trường nuôi cấy được thay mới sau mỗi 2 đến 3 ngày.

Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào

Khả năng gây độc của hoạt chất nghiên cứu với tế bào MC3T3-E1 được thực hiện chính xác theo phương pháp SRB của (Monk *et al*., 1991, Monk *et al*., 1991).

Phương pháp xác định sự hoạt động của Alkalin phosphatase (ALP)

Hoạt động của ALP trong tế bào vào ngày thứ 7 sau khi ủ hoạt chất được xác định bằng ALP Assay Kit (Abcam, Cambridge, England) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phương pháp xác định hàm lượng Collagen

Collagen được xác định bằng cách nhuộm với Sirius red. Sau 10 ngày ủ với hoạt chất, tế bào được rửa hai lần với PBS và được cố định bằng Bouin's fluid trong 1 h. Sau khi cố định, đĩa thí nghiệm được rửa dưới vòi nước trong 15 phút và để khô. Thuốc nhuộm Sirius red 0,1% trong acid picric được đưa vào các giếng và ủ tiếp trong 1 h. Sau khi nhuộm, tế bào được rửa bằng HCl 0,01M để loại bỏ thuốc nhuộm còn dư. Cuối cùng, mẫu nhuộm đã gắn với collagen tế bào được hòa lại trong NaOH 0,1M trong

5 phút. Đo mật độ quang (OD) bằng máy đo Microplate Reader (Biorad) ở bước sóng 550 nm.

Phương pháp xác định sự tạo khoáng

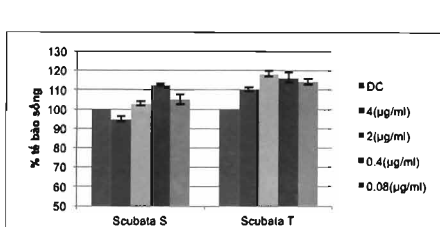
Để xác định sự lắng đọng canxi của chất nền ngoại bào trong quá trình hình thành xương, chất nền tế bào được nhuộm với alirazin red S 40 mM (pH 4,4) trong 15 phút vào ngày thứ 15 của quá trình thử nghiệm sau khi tế bào được rửa với PBS hai lần và cố định với ethanol 70% trong 1 h. Thuốc nhuộm được loại bỏ bằng nước cất khử ion. Lượng mẫu nhuộm gắn với canxi được hòa tan với cetylpyridinum chloride 10% và lắc nhẹ trong 15 phút. Đo mật độ quang học ở bước sóng 561 nm bằng máy đo Microplate Reader (Biorad).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng gây độc tế bào của hoạt chất

Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 là loại tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào tạo xương. Trong quá trình biệt hóa, tế bào MC3T3-E1 thể hiện những đặc điểm đặc trưng của nguyên bào xương như sản xuất alkalin phosphatase, tăng cường tổng hợp collagen chất nền ngoại bào từ procollagen và cuối cùng là lắng đọng khoáng trên chất nền ngoại bào (Quarles *et al.*, 1992). Vì vậy, tế bào MC3T3-E1 được xem là một công cụ hữu ích để nghiên cứu sự biệt hóa tế bào xương cũng như xác định các tác động của hoạt chất đến quá trình tạo xương. Trong một nghiên cứu khác của chúng tôi, hoạt chất scutebata S và T thể hiện khả năng gây độc với tế bào MC3T3-E1 ở nồng độ 20 µg/ml. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với hai hoạt chất scutebata S và T ở các nồng độ thấp hơn là 4 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml và 0,08 µg/ml.

Khả năng gây độc của hoạt chất nghiên cứu đối với tế bào MC3T3-E1 được thể hiện trong hình 2. Kết quả cho thấy có sự suy giảm về số tế bào sống so với đối chứng âm (DMSO 10%) khi tế bào MC3T3-E1 được ủ với scutebata S nồng độ 4 µg/ml. Tuy nhiên, scutebata T cũng như scutebata S ở các nồng độ thấp hơn (2 µg/ml đến 0,08 µg/ml) đã thể hiện khả năng kích thích sự phát triển của tế bào MC3T3-E1 với tỉ lệ tế bào sống lên đến 112,44% (scutebata S tại nồng độ 0,4 µg/ml) và 118,1 % (scutebata T tại nồng độ 2 µg/ml) tăng 18,1% so với đối chứng âm. Trong một nghiên cứu khác của chúng tôi, scutebata S cho thấy hoạt tính độc đối với một số loại tế bào ung thư vú, ung thư phổi, ung thư máu v.v song ít độc hơn trên tế bào lành NIH/3T3. Mặt khác, scutebata T ít gây độc với cả tế bào ung thư cũng như tế bào lành (Thao *et al.*, 2014)



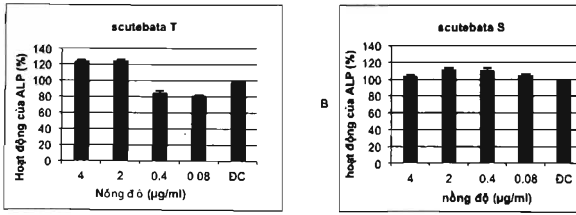
Hình 2. Sự sống sót của tế bào MC3T3-E1 dưới tác động của hoạt chất nghiên cứu.

Ảnh hưởng của hoạt chất đến hoạt động của Alkalin phosphatase (ALP) trong tế bào MC3T3-E1

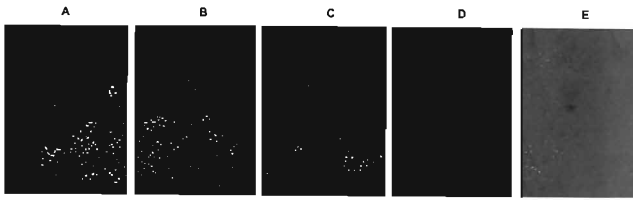
Trong xương, ALP được tổng hợp bởi tế bào tạo xương (osteoblast) và được coi là một chỉ số quan trọng đánh giá tốc độ hình thành xương cũng như chất lượng xương (Gomez *et al.*, 1995). Vì thế, ALP cũng là một dấu hiệu sinh hóa quan trọng đánh giá quá trình biệt hóa của tế bào MC3T3-E1.

Sau 5 ngày ủ mẫu, các tế bào được nuôi cấy với scutebata S cho thấy ALP có sự tăng cường hoạt động khi chỉ số này cao hơn 11,78 % so với đối

chứng (nồng độ 2 µg/ml), trong khi chỉ số này khi nghiên cứu với hoạt chất scutebata T là 25,03 % (nồng độ 2 µg/ml) và 23,94 % (nồng độ 4 µg/ml) (Hình 3). Theo Chin *et al.*, 2011), hoạt động của ALP tăng lên trong tế bào tạo xương ở giai đoạn đầu của quá trình biệt hóa và là một đặc tính của các tế bào tạo xương (Chin *et al*, 2011, Lai *et al.*, 2014). Như vậy, thông qua khả năng tăng cường hoạt động ALP, scutebata S và scutebata T đã cho thấy khả năng kích thích sự biệt hóa tế bào MC3T3-E1thành tế bào tạo xương với mức độ khác nhau ở các nồng độ khác nhau (Hình 3).



Hình 3. Tác động của các hoạt chất ở các nồng độ khác nhau đến hoạt động của ALP trong tế bào MC3T3-E1 (A) Tác động của scubata T đến hoạt động của ALP (B) Tác động của scubata S đến hoạt động của ALP



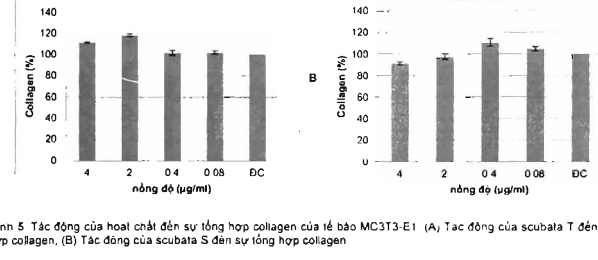
Hình 4 Tế bào được nhuộm collagen dưới tác động của hoạt chất nghiên cứu (A) Tế bào MC3T3-E1 chưa biệt hóa, (B) Tế bào MC3T3-E1 ở giếng đối chứng đã biệt hóa, (C) tế bào MC3T3E1 ủ với của scutebata T nồng độ 2 µg/ml; (D) tế bào MC3T3-E1 ủ với scutebata S nồng độ 4 µg/ml, (E) tế bào MC3T3E1 ủ với scutebata S nồng độ 0,4 µg/ml.

Ảnh hưởng của hoạt chất đến sự hình thành collagen

Bên cạnh hoạt động của ALP, sự hình thành chất nền ngoại bào cũng là một chỉ tiêu quan trọng đánh giá sự biệt hóa của tế bào MC3T3-E1. Collagen là một loại protein chính của chất nền ngoại bào và là giá thể trong quá trình lắng đọng khoáng. Vì vậy, sự hình thành của collagen chất nền ngoại bào là một điều kiện cần thiết cho sự hình thành xương (Alcantara *et al*, 2011).

Trong thí nghiệm của chúng tôi, thông qua phương pháp nhuộm với Sirius red, collagen chất nền ngoại bào có màu đỏ tươi sau khi tổ hợp với thuốc nhuộm. Kết quả trong hình 4 đã cho thấy, sau 10 ngày nuôi trong môi trường có chứa vitamin C và β-glycerophosphate, collagen ngoại bào đã được tiết ra từ tế bào MC3T3-E1 và thể hiện qua màu sắc tương tự với nền tế bào đã được biệt hóa. Phân tích nồng độ collagen đã cho thấy các hoạt chất nghiên cứu cũng ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp collagen của tế bào. Scutebata T biểu hiện khả năng kích thích

tiết collagen lên 18,02% và 11,08% so sánh với đối chứng trong khoảng nồng độ từ 2 - 4 µg/ml. Ở dải nồng độ thấp hơn (0,4 µg/ml đến 0,08 µg/ml), scutebata S cũng cho thấy khả năng kích thích tiết collagen (Hình 5) lên khoảng 10%, thấp hơn so với scutebata T.



Hình 5. Tác động của hoạt chất đến sự tổng hợp collagen của tế bào MC3T3-E1 (A) Tác động của scubata T đến sự tổng hợp collagen, (B) Tác động của scubata S đến sự tổng hợp collagen

Xác định khả năng tạo khoáng

Trong quá trình biệt hóa của tế bào MC3T3-E1 thành tế bào tạo xương, cùng với quá trình tổng hợp collagen, sự tích lũy khoáng trên chất nền ngoại bào bắt đầu vào khoảng 14 ngày sau khi nuôi cấy và đánh dấu giai đoạn cuối cùng của sự phát triển về hình thái của tế bào tạo xương (Quarles *et al*, 1992). Các muối khoáng của xương chứa đến 99% canxi (Downey, Siegel, 2006). Do đó, khả năng tạo canxi của tế bào dưới tác động của hoạt chất nghiên cứu được đánh giá thông qua phương pháp nhuộm tế bào với alizarin red S. Các hạt canxi sẽ có màu đỏ sáng khi bắt màu với alizarin red và chuyển sang màu tím khi hòa tan lại trong cetylpyridinum chloride 10%.

Kết quả thể hiện trong hình 6 chỉ ra rằng sự tạo khoáng ở tế bào MC3T3-E1 xảy ra dưới tác động của scutebata T ở tất cả các nồng độ nghiên cứu. Tại nồng độ 2 µg/ml, scutebata T kích thích tạo khoáng mạnh nhất, tăng 24,72% so với đối chứng DMSO. Trong khi đó, hoạt chất scutebata S chỉ kích thích tạo khoáng ở nồng độ 0,4 µg/ml tăng so với đối chứng là 9,57%, thấp hơn so với scutebata T.

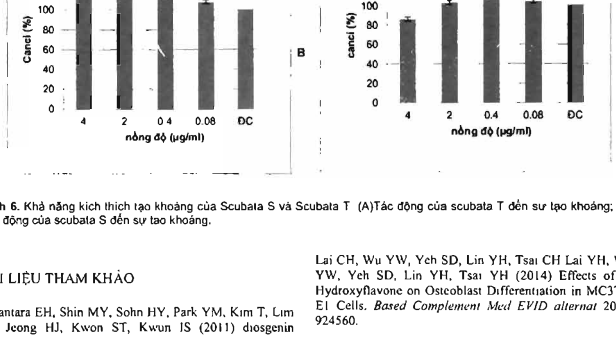
Kết quả nghiên cứu về khả năng kích thích hoạt động của ALP, tổng hợp collagen và khả năng tạo khoáng đã chứng tỏ scutebata S và scutebata T có tiềm năng chống loãng xương. Theo Balcerzak và đồng tác giả (2003), tác dụng của ALP là xúc tác cho quá trình thủy phân phosphomonoester thành phosphate vô cơ. Chính phosphate vô cơ này tham gia vào quá trình tạo thành hạt nhân của tinh thể khoáng. Trong khi đó collagen có tác dụng như giá thể để các hạt tinh thể hydroxyapaptite lắng đọng và hình thành cấu trúc vô cơ của ngoại bào (Balcerzak *et al*, 2003; Alcantara *et al*, 2011). Cả hai thành phần collagen và khoáng xương đều là những yếu tố chính của xương và ảnh hưởng đến chất lượng của xương. Trong xương, các sợi collagen sắp xếp chồng chéo và có những phân tử liên kết chéo với nhau để duy trì khoảng trống giữa các sợi lân cận tạo thành cấu trúc xốp của xương, trong khi đó sự tích lũy khoáng có tác dụng tăng cường sự rắn chắc của xương (Downey, Siegel, 2006). Trong bệnh loãng xương, khối lượng, mật độ cũng như cấu trúc của xương bị ảnh hưởng dẫn đến sự rắn chắc của xương giảm. Như vậy để phòng chống căn bệnh này, các biệt dược hay thực phẩm chức năng cần đảm bảo khả năng giúp cơ thể tăng sinh collagen, tăng cường khả năng tạo khoáng vv.

KẾT LUẬN

Hoạt tính chống loãng xương của hai hoạt chất mới là scutebata S và scutebata T đã được đánh giá thông qua khả năng kích thích tế bào MC3T3-E1 biệt hóa. Cả hai hoạt chất thể hiện khả năng kích thích sự hoạt động của alkalin phosphatase, tổng hợp collagen cũng như kích thích tạo khoáng. Ở nồng độ

2 µg/ml, scutebata T kích thích sự phát triển của tế bào MC3T3-E1, tăng cường hoạt động của ALP, tổng hợp collagen và khoáng mạnh nhất. Trong khi đó, hoạt chất scutebata S kích thích tế bào MC3T3-E1 yếu hơn so với scutebata T, và thể hiện hoạt tính mạnh nhất ở nồng độ 0,4 µg/ml.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.16-2012.87.*



Hình 6. Khả năng kích thích tạo khoáng của Scubata S và Scubata T. (A)Tác động của scubata T đến sự tạo khoáng; (B) Tác động của scubata S đến sự tạo khoáng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alcantara EH, Shin MY, Sohn HY, Park YM, Kim T, Lim JH, Jeong HJ, Kwon ST, Kwun IS (2011) diosgenin stimulates osteogenic activity by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Nutr Biochem* 22(11): 1055-63.

Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, AzzarG, Radisson J, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R (2003) The roles of annexins and alkaline phosphates in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 50:1019-38

Chin A, Yang Y, Chai L, Wong RW, Rabie AB (2011) Effects of medicinal herb salvia miltiorrhiza on osteoblastic cells in vitro. *J Orthop Res* 29(7): 1059-63.

Dai ZJ, Wang BF, WF Lu, Wang ZD, Ma XB, WL Min, Kang HF, Wang XJ, Wu WY (2013) Total flavonoids of Scutellaria barbata inhibit invasion of hepatocarcinoma via MMP / TIMP in vitro. *Molecules* 18(1): 934-50.

Downey PA, Siegel MI (2006) Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 86(1): 77-91.

Gomez B Jr, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT (1995) Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 41. 1560-1566

Lai CH, Wu YW, Yeh SD, Lin YH, Tsai CH Lai YH, Wu YW, Yeh SD, Lin YH, Tsai YH (2014) Effects of 6-Hydroxyflavone on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Based Complement Med EVID alternat* 2014: 924560.

Li M, Wang W, Wang P, Yang K, Sun H, Wang X (2010).

The pharmacological effects of Morroniside and Loganin isolated from Liuweidihuang Wan, on MC3T3-E1 Cells. *Molecules* 15: 7403-7414.

Lin J, Chen Y, Cai Q, Wei L, Zhan Y, Shen A, Sferra TJ, Peng J, Scutellaria Barbata Don D Inhibits Colorectal Cancer Growth via Suppression of Multiple Signaling Pathways *Integr Cancer Ther* 13(3). 240-248.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Campbell H, Mayo J, Boyd M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83(11): 757-66.

Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ (1992) Distinct proliferative and Differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7(6): 683-92.

Rosen CJ, Bouxsein ML (2006) Mechanisms of disease: is osteoporosis the bone of Obesity. *Nat Clin Rheumatol pract* 2(1): 35-43

Thao DT, Phuong DT, Hanh TT, Thao NP, Cuong NX, Nam NH, Minh CV (2014) Two new neoclerodane diterpenoids from Scutellaria barbata D Don Growing in Vietnam *J Asian Nat Prod Res* 16(4): 364-3699

Wang TS, Wang SQ, Xiao DL (2012) A review of phytochemistry and antitumor activity of a valuable medicinal species. Scutellaria barbata *J Med Plants Res* Vol 6(26): 4259-4275

Yin X, Zhou J, Jie C, Xing D, Zhang Y (2004) Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549 *Life Sci* 75: 2233–2244

STUDY ON *IN VITRO* ANTI-OSTEOPOROSIS ACTIVITIES OF SCUTEBATA S AND SCUTEBATA T ISOLATED FROM THE SCUTELLARIA PLANT (*Scutellaria barbata* D.DON)

Nguyen Thi Nga[1], Do Thi Phuong[1], Nguyen Thi Cuc[1], Nguyen Xuan Cuong[2], Nguyen Hoai Nam[2], Do Thi Thao[1,*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*
[2]*Institute of Marine Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Osteoporosis is the most common type of bone disease and induces serious consequences for public health The main cause of osteoporosis is an imbalance between bone reabsorption and formation caused by osteoclasts and osteoblasts, respectively. Currently, beside nutrients, pharmacotherapy is the major therapeutic option for osteoporosis treatment However, the fact that several commercialized drugs which are used to treat osteoporosis remaining side effects has raised a need for discovering new efficient and safer anti-osteoporosis compounds In our traditional medicine, the medicinal plant Ban-chi-lien (*Scutellaria barbata* D don) are widely applied to treat cancer patients In a recent study, we had reported on the two novel compounds which were scutebata S and scutebata T isolated from *S. Barbata* Those compounds had also exhibited some cytotoxic activity experimented on several cancer cell lines (Thao *et al.*, 2014) In order to explore the more potential bioactivities of those novel compounds, we submitted them into anti-osteoporosis bioassay system. Therefore, in this study, an *in vitro* anti-osteoporosis activity of the scutebata S and scutebata T have been reported through their potential effects on MC3T3-E1 cell line. Namely, both scutebata S and scutebata T could stimulate the alkaline phosphatase activity, enhance extracellular matrix collagen synthesis and mineralization in MC3T3-E1 cells. Besides, the effect of scutebata T on formation of bone is higher than that of scutebata S and depends on its concentration Especially, the middle concentration (e.g., 2 µg/ml) has showed the strongest impact of scutebata T compound on the proliferation of MC3T3-E1 cells (18.1%), enhanced ALP activity (25.03%), increased the secretion of collagen (18.02%), and induced the formation of calcium deposits (24.72%) compared with control. Whereas, scutebata S has stimulated differentiation of MC3T3-E1 cells strongest at 0.4 µg/ml

Keywords: *ALP, collagen, MC3T3-E1, mineralization, osteoporosis, scutebata S, scutebata T*

**Author for correspondence:* Tel: *+84-4-38361774*; E-mail: *thaodo@ibt.ac.vn*