

SƠ BỘ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ LOÀI THÂN MỀM VÀ DA GAI TẠI VỊNH BẮC BỘ – VIỆT NAM

Hoàng Kim Chi^{1*}, Lê Mai Hương¹, Trần Thị Như Hằng¹, Trần Thị Hồng Hà¹, Nguyễn Đình Luyện¹, Đỗ Thị Nhuận¹, Lê Hữu Cường¹, Vũ Đình Giáp¹, Đỗ Hữu Nghị¹, Đặng Thị Phương Ly¹, Andrey Imbs B.², Phạm Quốc Long¹

1. Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện HL Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Institute of Marine Biology, FEB, CHLB Nga

Abstract

Twenty one samples of phylum Mollusca and twenty five samples of phylum Echinodermata collected in regions of Gulf of Tonkin - Vietnam were evaluated for their *in vitro* cytotoxic, antimicrobial, and antioxidant activities. The results revealed that 10 out of 46 CHCl₃/MeOH extracts from the samples were cytotoxic to at least one of two cancer cell lines (Hepatocellular carcinoma, Hep-G2; and Human lung adenocarcinoma, LU-1). Results of the antimicrobial assay indicate that 41 out of 46 extracts from the species were active against at least one or more of the test organisms (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*). None of the extracts exhibited free radical scavenging ability in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) based antioxidant assay. The paper draws research attention to species belonging to Mollusca and Echinodermata as a source of bioactive compounds with potential pharmaceutical applications and supports important data for preservation purposes of these species.

Key words: Mollusca, Echinodermata, antimicrobial activity, cytotoxic activity, antioxidant activity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Biển là hệ sinh thái lớn nhất trên trái đất, bao phủ tới ¾ bề mặt hành tinh và là nơi sinh sống của khoảng 70-80% số loài sinh vật hiện biết (Kim 2015). Do có sự dồi dào về số lượng loài và sinh cảnh rộng lớn, đa dạng, mà thế giới sinh vật biển được đánh giá là một nguồn tài nguyên thiên nhiên vô cùng phong phú. Trên thực tế, hệ thống các sinh vật biển là nguồn cung cấp các chất có hoạt tính sinh học, đã và đang thu hút được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học trên thế giới.

Việt Nam nằm trong khu vực Thái Bình Dương và chịu ảnh hưởng của khí hậu nhiệt đới gió mùa. Đường bờ biển nước ta dài và thay đổi nhiệt độ theo vĩ tuyến, kết hợp với hình thái thềm lục địa đa dạng, đã tạo nên những nét đặc trưng của hệ sinh thái giữa các vùng biển ở Việt Nam. Theo Hyllenberg và Kibum (2003), biển phía Bắc Việt Nam có khoảng 2200 loài động vật thân mềm thuộc 200 họ với trên 80 loài có giá trị kinh tế cao, chủ yếu tập trung ở các họ Sò (Arcidae), Ngao (Vereridae), Phi (Psammobiidae), Bào ngư (Halitidae), Hàu (Ostreidae), v.v.. Trong khi đó, số lượng loài thuộc ngành Da gai Echinodermata là khoảng 384 loài, bao gồm nhiều họ có giá trị kinh tế cao như Hải sâm (Holothuridae) và Sao biển (Astropectinidae).

Đến nay rất nhiều hợp chất có cấu trúc rất đa dạng và có hoạt tính sinh học như: kháng vi sinh vật, kháng viêm, giảm đau, giảm huyết áp, chống khối u, chống vi rút, tan máu, v.v., đã được phân lập và tách chiết từ các sinh vật thuộc ngành Thân mềm và Da gai. Những nghiên cứu liên quan đến chất có hoạt tính sinh học từ động vật Thân mềm ban đầu chỉ tập trung ở các loài không có vỏ cứng thuộc nhóm nudibranch và opisthobranch (Kumaran và nkk. 2011), xuất phát từ giả thiết rằng các động vật thân mềm không hoàn toàn đứng (Faulkner 1992). Bên cạnh đó, các tác giả còn chứng minh được hoạt tính kháng vi sinh vật của trứng một số động vật thân mềm (Anand và nkk. 1997). Đối với nhóm các động vật thuộc ngành Da gai, khả năng tạo ra nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao như spinochromes, echinochrome A, hay các axit béo không no mạch dài và β -carotene đã được biết đến và minh chứng rõ nét (Service và Wardlaw 1984; Dincer và Cakli 2007).

Từ những thực tế trên, có thể nói việc sàng lọc hoạt tính để nghiên cứu theo định hướng hoạt tính sinh học các mẫu động vật biển, đặc biệt là các mẫu

tộng vật thuộc ngành Thân mềm (Mollusca) và Da gai (Echinodermata) là hết sức cần thiết. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nghiên cứu ba hoạt tính sinh học chính (hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng vi sinh vật, và hoạt tính chống oxy hóa) của dịch chiết hóa học các mẫu động vật thân mềm và da gai thu được tại các vùng biển thuộc khu vực phía Bắc Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ sinh vật biển, cũng như tạo tiền đề cho việc bảo tồn các loài động vật có giá trị y dược học ở Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mẫu nghiên cứu và các chủng vi sinh vật, dòng tế bào thử nghiệm

2.1.1. Mẫu thu

Các mẫu động vật biển thuộc nhóm da gai và thân mềm được thu tại một số vùng biển phía Bắc Việt Nam (Hạ Long, Cô Tô, Vân Đồn, Cửa Bạch Đằng, Bái Tử Long) trong khoảng thời gian từ tháng 12 năm 2013 đến tháng 3 năm 2015. Mẫu thu được bảo quản lạnh (nhiệt độ 0°C và -20°C) và được định danh trước khi xử lý và tách chiết hóa học. Việc định danh và phân loại mẫu được thực hiện bởi PGS. TS. Đỗ Công Thung và các cộng sự tại Viện Tài Nguyên và Môi trường Biển (Hải Phòng). Danh sách các mẫu đã được thu và phân loại được tóm tắt trong Bảng 1.

2.1.2. Chủng vi sinh vật kiểm định

Các chủng vi sinh vật kiểm định được cung cấp từ Phòng Sinh học Thực nghiệm - Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên, gồm có:

- + 02 chủng vi khuẩn Gram (+): *Bacillus subtilis* ATCC 27212 và *Staphylococcus aureus* ATCC 12222;
- + 02 chủng vi khuẩn Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923;
- + 02 chủng nấm men: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 và *Candida albicans* SH 20;

- + 02 chủng nấm mốc: *Aspergillus niger* 439 và *Fusarium oxysporum* M42.

2.1.3. Các dòng tế bào

02 dòng tế bào ung thư thực nghiệm được cung cấp từ Phòng Sinh học Thực nghiệm - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, gồm có:

- + Dòng Hep-G2: Hepatocellular carcinoma (Ung thư gan);
- + Dòng LU-1: Human lung adenocarcinoma (Ung thư phổi).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chiết mẫu

Các mẫu đã thu được nghiên nhỏ đến cỡ 1-3 mm, sau đó chiết lipid tổng theo phương pháp Folch (Folch và nnk. 1957). Lipid được chiết bằng hệ dung môi được sử dụng để chiết 10 g mẫu) (5h, 4°C) (2x30 ml). Toàn bộ dịch chiết được phân lớp bằng cách bổ sung 35 ml H₂O và 30 ml CHCl₃. Lớp lipid (lớp dưới) được làm khan bằng Na₂SO₄, lọc bỏ muối, cất loại dung môi thu được dịch thô lipid tổng. Toàn bộ phần lipid tổng được hòa tan trong CHCl₃ và được bảo quản ở nhiệt độ -18°C.

2.2.2. Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật của các mẫu chiết được tiến hành trên các phiến vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp pha loãng liên tục của Vanden Bergher và Vlietlinck (1991) đã được áp dụng tại trường Đại học Dược, Đại học Tổng hợp Illinois, Chicago, Mỹ.

2.2.3. Thử hoạt tính gây độc tế bào

Tế bào ung thư được nuôi *in vitro* theo quy trình của Skehan và nnk. (1991). Hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư được xác định theo phương pháp SRB của Likhiviyawuid và nnk. (1993) đã được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI). Phương pháp này đã được phòng Sinh học Thực nghiệm thuộc Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên áp dụng từ năm 1996.

Đa dạng sinh học và các chất có hoạt tính sinh học

Bảng 1: Danh sách mẫu động vật thân mềm và da gai thu được tại một số vùng biển phía Bắc Việt Nam

TT	Ký hiệu mẫu	Phân loại học			Địa điểm thu mẫu	Thời gian thu mẫu
		Ngành	Họ	Loài		
1	TM8	MOLLUSCA (THÂN MỀM)	Arcidae	<i>Annadara granosa</i> (Linne)	Hạ Long	12/2013
2	TM9			<i>Annadara binakayanensis</i> Faustino	Hạ Long	12/2013
3	TM10			<i>Trisidos semitoria</i> Lamarck	Hạ Long	12/2013
4	TM16		Mytilidae	<i>Modiolus vagina</i> Lamarck	Hạ Long	12/2013
5	TM01			<i>Septifer bilocularis</i> (Linne)	Cố Tô	04/2014
6	TM1		Ostreidae	<i>Ostrea cucullata</i> Born	Hạ Long	12/2013
7	TM17			<i>Ostrea cucullata</i> Born	Hạ Long	12/2013
8	TM04		Pectinidae	<i>Chlamys nobilis</i> (Reeve)	Cố Tô	04/2014
9	TM4		Potamididae	<i>Cerithidea obtusa</i> (Lamarck)	Hạ Long	12/2013
10	TM13			<i>Batillaria zonalis</i> (Bruguiere)	Hạ Long	12/2013
11	TM11		Propeamussiidae	<i>Amusium pleuronectes</i> (Linne)	Hạ Long	12/2013
12	TM02		Pinnidae	<i>Pinna bullata</i> (Gmelin)	Cố Tô	04/2014
13	TM03		Pteriidae	<i>Pteria martensii</i> (Dunker)	Cố Tô	04/2014
14	TM3		Strombidae	<i>Strombus canarium</i> Linnaeus	Hạ Long	12/2013
15	TM15			<i>Strombus urceus</i> Linnaeus	Hạ Long	12/2013
16	TM7		Turbinidae	<i>Lunella coronata granulata</i> (Gmelin)	Hạ Long	12/2013
17	TM12			<i>Lunella coronata granulata</i> (Gmelin)	Hạ Long	12/2013
18	TM2		Veneridae	<i>Gafrarium humidum</i> (Roding)	Hạ Long	12/2013
19	TM5			<i>Periglypta lacerata</i> Hanley	Hạ Long	12/2013
20	TM6			<i>Periglypta puerpera</i> Linne	Hạ Long	12/2013
21	TM14			<i>Radytapes variegata</i> (Sowerby)	Hạ Long	12/2013
22	HL-DG 02	ECHINODERMATA (DA GAI)	Astropectinidae	<i>Astropecten polyacanthus</i>	Hạ Long	08/2014
23	DG11-HDD			<i>Astropecten polyacanthus</i>	Bãi Từ Long	03/2015
24	VD-DG 01		Cucumariidae	<i>Cercodemas anceps</i> Selenka	Văn Đồn	12/2013
25	HL-DG 04			<i>Cercodemas anceps</i> Selenka	Hạ Long	08/2014
26	HS 01			<i>Colochirus quadrangularis</i> Trotschel	Cửa Bạch Đằng	10/2014
27	DG 01- BTL			<i>Cercodema anceps</i> Selenka	Bãi Từ Long	03/2015
28	VD-DG 04		Diadematidae	<i>Echinothrix diadema</i>	Văn Đồn	12/2013
29	HL-DG 04-2		Holothuriidae	<i>Holothuria scabra</i> Jaeger	Hạ Long	08/2014
30	DG 16 - CD			<i>Holothuria scabra</i> Jaeger	Cống Đó	03/2015
31	HL-DG 02-2			<i>Holothuria atra</i> Jaeger	Hạ Long	08/2014
32	DG 06		Ophiopodidae	<i>Ophioplocus imbricatus</i>	Bãi Từ Long	03/2015
33	DG 07-HDD			<i>Ophioplocus imbricatus</i>	Bãi Từ Long	03/2015
34	DG 06-HDD			<i>Ophioplocus imbricatus</i>	Cống Đó	3/2015
35	DB-DG 05		Oreasteridae	<i>Anthenea pentagonula</i> Lamarck	Hạ Long	12/2013
36	DB-DG 03			<i>Anthenea sibogae</i> Doderlein	Hạ Long	12/2013
37	HL-DG 05			<i>Anthenea sibogae</i> Doderlein	Hạ Long	08/2014
38	DG 02-DQN			<i>Anthenea sibogae</i> Doderlein	Bãi Từ Long	03/2015
39	DG 03-DQN			<i>Anthenea sibogae</i> Doderlein	Bãi Từ Long	03/2015
40	DG 02-HDD			<i>Anthenea sibogae</i> Doderlein	Cống Đó	3/2015
41	VD-DG 02		Stichopodidae	<i>Stichopus chloronotus</i> Brandt	Văn Đồn	12/2013
42	DG 12-CD			<i>Thelenota</i> sp.	Bãi Từ Long	03/2015
43	HL-DG 03		Strongylocentrotidae	<i>Strongylocentrotus intermedius</i> A. Agassiz	Hạ Long	08/2014

44	DG 08-HDD			<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Bái Tử Long	03/2015
45	DG 08-CD			<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Cống Đò	03/2015
46	DG 05-DQN		Synaptidae	<i>Synapta lamperti</i> Heding	Bái Tử Long	03/2015

2.2.4. Xác định hoạt tính chống oxy hoá

Hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết được xác định bằng thử nghiệm trên hệ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Đây là phương pháp đã được công nhận để xác định nhanh hoạt tính chống oxy hóa dựa trên khả năng bẫy các gốc tự do tạo bởi DPPH (Brand-Williams và nnk. 1995, Shela và nnk. 2003, Kumar và nnk. 2013). Chất thử được hòa trong dimethyl sulfoxide (DMSO 100%) và DPPH được pha trong ethanol 96%. Sự hấp thụ của DPPH ở bước sóng $\lambda = 515$ nm được xác định bằng máy đọc ELISA sau khi nhỏ DPPH vào dung dịch mẫu thử trên phiếu vi lượng 96 giếng. Kết quả các thử nghiệm được thể hiện là giá trị trung bình của ít nhất 3 phép thử lặp lại \pm độ lệch chuẩn ($p \leq 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* của các cận chiết các mẫu động vật thân mềm và da gai được đánh giá sơ bộ trên 2 dòng tế bào ung thư người là Hep-G2 (ung thư gan) và LU-1 (ung thư phổi). Tỷ lệ tế bào sống sót (CS, %) cũng như giá trị nồng độ IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) của các mẫu thử được thể hiện trong Bảng 2.

Theo kết quả nêu trong Bảng 2, có 10 trong tổng số 46 mẫu thử biểu hiện hoạt tính kháng ít nhất một dòng tế bào ung thư thực nghiệm, thể hiện qua tỷ lệ tế bào sống sót (Cell survival, CS) ở mức dưới 50%. Nhìn chung số lượng mẫu có hoạt tính này của nhóm đối tượng động vật thân mềm khảo sát (3/21 mẫu thử) ít hơn so với các cận chiết của nhóm mẫu động vật da gai (7/25 mẫu thử). Đặc biệt, 6 mẫu cận chiết biểu hiện hoạt tính gây độc cả hai dòng tế bào ung thư Hep-G2 và LU-1 ở nồng độ thử nghiệm (40 $\mu\text{g/ml}$) đều là các mẫu chiết từ động vật thuộc ngành Da gai (Echinodermata).

Đáng chú ý, các mẫu cận chiết biểu hiện hoạt tính chỉ tập trung ở một số nhóm phân loại nhất định: chi *Periglypta* của họ Ngao (Veneridae) (hai mẫu có ký hiệu TM5 và TM6), loài *Cercodemas anceps* và *Colochirus quadrangularis* của họ Dưa chuột biển (Cucumariidae) (các mẫu có ký hiệu VD-DG 01, HL-DG 04, HS 01, và DG 01 - BTL), loài *Holothuria (Metriatyla) scabra* của họ Hải sâm (Holothuriidae). Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với các công bố gần đây liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào và thành phần hoạt chất triterpene glycosides của loài *Holothuria scabra* (Dang và nnk. 2007), triterpene saponins của loài *Cercodemas anceps* (Cuong và nnk. 2015), triterpene glycosides của chi *Thelenota* (Aminin và nnk. 2015; Careaga và nnk. 2015) thuộc nhóm động vật da gai.

Bảng 2: Hoạt tính gây độc tế bào của cận chiết các mẫu sinh vật biển thuộc ngành Thân mềm và Da gai

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Cell survival (CS, %)		IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
			Hep-G2	LU-1	Hep-G2	LU-1
	Dung môi (DMSO)		100,0 \pm 0	100,0 \pm 0		
	Đối chứng (+)	5	2,2 \pm 1,5	3,4 \pm 0,7		
1	<i>A. granosa</i> TM8	40	79,88 \pm 1,3	92,57 \pm 1,3	-	-
2	<i>A. binakayanensis</i> TM9	40	54,97 \pm 1,8	90,31 \pm 2,5	-	-
3	<i>T. semitorta</i> TM10	40	67,53 \pm 2,4	91,18 \pm 0,7	-	-
4	<i>M. vagina</i> TM16	40	88,49 \pm 0,4	89,25 \pm 1,5	-	-
5	<i>S. bilocularis</i> TM01	40	77,67 \pm 1,7	91,78 \pm 1,2	-	-
6	<i>O. cucullata</i> TM1	40	55,62 \pm 2,6	89,46 \pm 2,6	-	-
7	<i>O. cucullata</i> TM17	40	92,7 \pm 1,8	93,72 \pm 2,3	-	-
8	<i>C. nobilis</i> TM04	40	65,88 \pm 0,3	78,87 \pm 2,9	-	-
9	<i>C. obtusa</i> TM4	40	71,81 \pm 2,6	97,04 \pm 2,5	-	-
10	<i>B. zonalis</i> TM13	40	90,15 \pm 2,3	93,33 \pm 1,5	-	-
11	<i>A. pleuronectes</i> TM11	40	22,51 \pm 2,6	67,83 \pm 2,7	20,28	-
12	<i>P. bullata</i> TM02	40	71,83 \pm 2,5	87,51 \pm 0,7	-	-
13	<i>P. martensii</i> TM03	40	89,03 \pm 1,6	95,12 \pm 0,9	-	-
14	<i>S. canarium</i> TM3	40	67,02 \pm 2,1	94,36 \pm 1,3	-	-

Đa dạng sinh học và các chất có hoạt tính sinh học

15	<i>S. urceus</i> TM15	40	87,83±2,1	92,21±2,0	-	-
16	<i>L. coronata granulata</i> TM7	40	76,12±1,7	98,22±0,9	-	-
17	<i>L. coronata granulata</i> TM12	40	86,81±1,7	98,32±1,3	-	-
18	<i>G. tumidum</i> TM2	40	59,54±2,5	90,98±1,8	-	-
19	<i>P. lacerata</i> TM5	40	46,77±2,4	83,48±1,5	30,77	-
20	<i>P. puerpera</i> TM6	40	29,90±1,9	80,47±0,7	13,52	-
21	<i>R. variegata</i> TM14	40	78,97±1,5	90,01±2,0	-	-
22	<i>A. polyacanthus</i> HL-DG 02	40	98,03±0,9	97,79±1,6	-	-
23	<i>A. polyacanthus</i> DG11-HDD	40	95,48±2,8	99,02±0,6	-	-
24	<i>C. anceps</i> VD-DG 01	40	88,55±2,6	39,21±1,0	-	36,72
25	<i>C. anceps</i> HL-DG 04	40	8,92±2,1	0	0	28,22
26	<i>C. quadrangularis</i> HS 01	40	0	0	11,01	24,27
27	<i>C. anceps</i> DG 01 - BTL	40	0	0	7,88	8,24
28	<i>E. diadema</i> VD-DG 04	40	78,60±2,7	96,37±0,7	-	-
29	<i>H. scabra</i> HL-DG 04-12	40	45,58±3,0	0	38,37	28,52
30	<i>H. scabra</i> DG 16 - CD	40	0	0	25,56	9,89
31	<i>H. atra</i> HL-DG 02-12	40	85,86±0,9	97,48±2,3	-	-
32	<i>O. imbricatus</i> DG 06	40	97,37±0,2	97,22±1,2	-	-
33	<i>O. imbricatus</i> DG 07 - HDD	40	98,05±0,5	98,36±1,3	-	-
34	<i>O. imbricatus</i> DG 06 - HDD	40	99,02±0,5	98,56±1,9	-	-
35	<i>A. pentagonia</i> DB-DG 05	40	80,99±2,2	89,14±2,4	-	-
36	<i>A. sibogae</i> DB-DG 03	40	69,46±1,3	81,31±0,8	-	-
37	<i>A. sibogae</i> HL-DG 05	40	70,31±1,4	83,12±0,1	-	-
38	<i>A. sibogae</i> DG 02- DQN	40	98,83±0,3	99,53±0,2	-	-
39	<i>A. sibogae</i> DG 03 - DQN	40	99,72±0,2	98,78±0,6	-	-
40	<i>A. sibogae</i> DG 02 - HDD	40	90,43±2,7	95,03±1,8	-	-
41	<i>S. chloronotus</i> VD-DG 02	40	82,87±0,8	61,49±0,1	-	-
42	<i>Thelenota</i> sp. DG 12 - CD	40	0	0	26,09	7,78
43	<i>S. intermedius</i> HL-DG 03	40	81,50±2,6	95,72±2,4	-	-
44	<i>S. droebachiensis</i> DG 08 - HDD	40	81,42±1,2	96,79±0,7	-	-
45	<i>S. droebachiensis</i> DG 08 - CD	40	96,77±0,2	99,30±0,5	-	-
46	<i>S. lamperti</i> DG 05 - DQN	40	71,19±2,0	69,92±2,6	-	-

Bên cạnh đó, kết quả khảo sát đã đưa ra những dữ liệu liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào của các mẫu chiết từ loài *Periglypta lacerata* và *P. puerpera* của họ Veneridae, và loài *Amusium pleuronectes* của họ Propeamussiidae (mẫu thử ký hiệu TM11). Đây đều là những kết quả mới và chưa được đề cập đến trong các nghiên cứu trước đó.

3.2 Hoạt tính kháng vi sinh vật

Hoạt tính kháng vi sinh vật của 46 mẫu dịch chiết của động vật thuộc ngành Thân mềm và Da gai

được xác định dựa trên khả năng ức chế 08 chủng vi sinh vật kiểm định (VSVKD) tại nồng độ thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong Bảng 3. Tên các chủng VSVKD được ký hiệu rút ngắn trong Bảng 3. như sau: *E* (*E. coli* ATCC 25922), *P* (*P. aeruginosa* ATCC 25923), *B* (*B. subtilis* ATCC 27212), *S* (*S. aureus* ATCC 12222), *A* (*A. niger* 439), *F* (*F. oxysporum* M42), *S* (*S. cerevisiae* ATCC 7754), và *C* (*C. albicans* SH 20).

Bảng 3: Hoạt tính kháng VSVKD của các cận chiết mẫu động vật thuộc ngành Thân mềm và Da gai

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ mẫu (µg/ml)	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, µg/ml)							
			Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
			<i>E</i>	<i>P</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>C</i>
1	<i>A. granosa</i> TM8	400	(-)	(-)	(-)	(-)	400	(-)	(-)	(-)
2	<i>A. binakayanensis</i> TM9	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	<i>T. semitoria</i> TM10	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

4	<i>M. vagina</i> TM16	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	<i>S. bilocularis</i> TM01	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	<i>O. cucullata</i> TM1	400	(-)	(-)	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)
7	<i>O. cucullata</i> TM17	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	<i>C. nobilis</i> TM04	400	100	(-)	(-)	(-)	400	(-)	(-)	(-)
9	<i>C. obtusa</i> TM4	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	<i>B. zonalis</i> TM13	400	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	<i>A. pleuronectes</i> TM11	400	200	(-)	(-)	(-)	400	(-)	(-)	(-)
12	<i>P. bullata</i> TM02	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	<i>P. martensii</i> TM03	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	<i>S. canarium</i> TM3	400	(-)	(-)	(-)	200	100	(-)	(-)	(-)
15	<i>S. urceus</i> TM15	400	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	<i>L. coronata granulata</i> TM7	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	<i>L. coronata granulata</i> TM12	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	<i>G. tumidum</i> TM2	400	(-)	(-)	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)
19	<i>P. lacerata</i> TM5	400	400	(-)	(-)	(-)	400	(-)	(-)	(-)
20	<i>P. puerpera</i> TM6	400	400	(-)	(-)	(-)	400	(-)	(-)	(-)
21	<i>R. variegata</i> TM14	400	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	<i>A. polyacanthus</i> HL-DG 02	400	100	(-)	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)
23	<i>A. polyacanthus</i> DG11-HDD	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	<i>C. anceps</i> VD-DG 01	400	100	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
25	<i>C. anceps</i> HL-DG 04	400	100	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
26	<i>C. anceps</i> DG 01 - BTL	400	(-)	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)
27	<i>C. quadrangularis</i> HS 01	400	(-)	(-)	(-)	100	100	(-)	(-)	(-)
28	<i>E. diadema</i> VD-DG 04	400	400	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
29	<i>H. scabra</i> HL-DG 04-2	400	200	(-)	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)
30	<i>H. scabra</i> DG 16 - CD	400	(-)	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)
31	<i>H. atra</i> HL-DG 02-2	400	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
32	<i>O. imbricatus</i> DG 06	400	100	(-)	(-)	200	400	(-)	(-)	(-)
33	<i>O. imbricatus</i> DG 07 - HDD	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	<i>O. imbricatus</i> DG 06 - HDD	400	100	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
35	<i>A. pentagonula</i> DB-DG 05	400	100	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
36	<i>A. sibogae</i> DB-DG 03	400	100	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
37	<i>A. sibogae</i> HL-DG 05	400	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
38	<i>A. sibogae</i> DG 02 - DQN	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
39	<i>A. sibogae</i> DG 03 - DQN	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	<i>A. sibogae</i> DG 02 - HDD	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41	<i>S. chloranotus</i> VD-DG 02	400	100	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
42	<i>Thelenota</i> sp. DG 12 - CD	400	(-)	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)
43	<i>S. intermedius</i> HL-DG 03	400	(-)	(-)	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)
44	<i>S. droebachiensis</i> DG 08 - HDD	400	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45	<i>S. droebachiensis</i> DG 08 - CD	400	400	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
46	<i>S. lamperti</i> DG 05 - DQN	400	(-)	(-)	(-)	200	100	(-)	(-)	(-)

Ký hiệu: (-) không biểu hiện hoạt tính

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, chỉ có 5 trong tổng số 46 mẫu thử không biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật, 41 mẫu thử còn lại đều biểu hiện hoạt tính kháng ít nhất một chủng VSVKĐ. Trong đó, có 3 mẫu dịch chiết biểu hiện hoạt tính kháng 3 VSVKĐ

là mẫu *A. polyacanthus* HL-DG 02, *H. scabra* HL-DG 04-2, và *O. imbricatus* DG 06. Điểm đặc biệt là 3 mẫu dịch chiết trên đều từ các động vật thuộc ngành Da gai, họ San hô (Astropectinidae), Hải sâm (Holothuriidae), và Ophiolipididae. Kết quả trên khá

tương đồng với một số nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật của động vật thuộc họ Holothuridae (Hamel và nnk. 2001; Abraham và nnk. 2002), chi *Ophioplocus* được thực hiện bởi Wang và nnk. (2004), và phù hợp với kết quả nghiên cứu về hoạt tính của loài *A. polyacanthus* (Thao và nnk. 2013).

Kết quả khảo sát trên cũng khẳng định tiềm năng khai thác các hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật từ nhóm các động vật thuộc ngành Thân mềm và Da gai, bởi tỷ lệ mẫu biểu hiện hoạt tính này của 46 mẫu dịch chiết thử nghiệm là rất lớn (41/46 mẫu thử nghiệm, tương đương 89%).

3.3. Hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH theo phương pháp của Brand-Williams và nnk. (1995), Kumar và nnk. (2013) được thể hiện trong Bảng 4.

Theo kết quả này, không có mẫu dịch chiết nào trong tổng số 46 mẫu thử biểu hiện khả năng làm sạch gốc tự do DPPH ở nồng độ thử nghiệm (400 µg/ml), thể hiện qua giá trị SC của tất cả các mẫu

thử đều ở mức dưới 50%. Điều này cho thấy khả năng tồn tại các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa trong mẫu động vật biển, cụ thể trong trong hợp các mẫu thuộc ngành Thân mềm và Da gai, còn rất khiêm tốn. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả của nhiều nghiên cứu về hoạt tính sinh học các loài sinh vật biển, theo đó chất chống oxy hóa chỉ được phát hiện ở một số loài hải tiêu, san hô, tảo biển và rong biển hay ở phần da chứa sắc tố của một số loài da gai (Miranda và nnk. 1998; Dunlap và Yamamoto 1995; Kuwahara và nnk. 2009; Zhou và nnk. 2011).

4. KẾT LUẬN

Đã tiến hành chiết tách bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH cho 21 mẫu động vật thuộc ngành Thân mềm và 25 mẫu động vật thuộc ngành Da gai. Từ đó đã đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật, gây độc tế bào và chống oxy hóa của 46 cận chiết. Kết quả cho thấy:

- 1- Có 41 trong tổng số 46 cận chiết (89%) biểu hiện khả năng kháng ít nhất 1 chủng VSVKĐ. Trong đó có 3 mẫu cận chiết có hoạt tính kháng từ 3 VSVKĐ trở lên.

Bảng 4: Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cận chiết mẫu động vật thuộc ngành Thân mềm và Da gai

STT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ đầu (µg/ml)	Scavenging capacity (SC, %)*	STT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ đầu (µg/ml)	Scavenging capacity (SC, %)*
	Chứng (+)	44	80,87 ± 0,13	22	HL-DG 02	400	3,15 ± 0,0
	Chứng (-)	-	0,0 ± 0,0	23	DG11-HDD	400	9,25 ± 0,9
1	TM8	400	9,61 ± 0,4	24	VD-DG 01	400	7,97 ± 0,6
2	TM9	400	7,76 ± 0,5	25	HL-DG 04	400	6,02 ± 1,8
3	TM10	400	10,22 ± 0,7	26	HS 01	400	0
4	TM16	400	9,28 ± 0,8	27	DG 01 - BTL	400	12,18 ± 8,7
5	TM01	400	11,87 ± 0,8	28	VD-DG 04	400	3,72 ± 1,6
6	TM1	400	4,81 ± 2,0	29	HL-DG 04-e2	400	5,39 ± 1,5
7	TM17	400	11,21 ± 0,4	30	DG 16 - CD	400	5,59 ± 0,6
8	TM04	400	16,50 ± 1,7	31	HL-DG 02-e2	400	2,97 ± 2,7
9	TM4	400	10,07 ± 0,4	32	DG 06	400	13,2 ± 1,5
10	TM13	400	6,59 ± 0,0	33	DG 07 - HDD	400	13,49 ± 0,2
11	TM11	400	7,41 ± 0,6	34	DG 06 - HDD	400	12,51 ± 0,7
12	TM02	400	11,82 ± 0,1	35	DB-DG 05	400	6,48 ± 1,6
13	TM03	400	11,87 ± 1,4	36	DB-DG 03	400	5,57 ± 8,5
14	TM3	400	3,61 ± 1,8	37	HL-DG 05	400	5,62 ± 0,4
15	TM15	400	7,44 ± 1,6	38	DG 02 - DQN	400	13,12 ± 8,7
16	TM7	400	5,21 ± 0,3	39	DG 03 - DQN	400	8,3 ± 5,9
17	TM12	400	10,87 ± 0,1	40	DG 02 - HDD	400	5,91 ± 0,3
18	TM2	400	8,11 ± 0,1	41	VD-DG 02	400	5,21 ± 0,8
19	TM5	400	6,06 ± 0,6	42	DG 12 - CD	400	1,73 ± 0,3
20	TM6	400	10,92 ± 1,6	43	HL-DG 03	400	9,36 ± 7,8
21	TM14	400	11,47 ± 0,5	44	DG 08 - HDD	400	12,08 ± 0,6
				45	DG 08 - CD	400	9,57 ± 1,5
				46	DG 05 - DQN	400	16,0 ± 8,1

* Giá trị trung bình của thí nghiệm lặp lại 3 lần

- 2- Có 10 mẫu (tương đương 21,7% tổng số mẫu thử) có hoạt tính gây độc với ít nhất 1 dòng tế bào, trong đó có 6 mẫu biểu hiện hoạt tính với 2 dòng tế bào ở nồng độ thử nghiệm.
- 3- Không có cận chiết nào biểu hiện hoạt tính chống oxy hoá trên hệ DPPH.

ĐI CẢM ƠN: Công trình được tiến hành dưới sự tài trợ của đề tài VAST.ĐAB.05/13-15, thuộc Đề án hóa học công nghệ trọng điểm cấp Viện Hàn lâm hóa học và Công nghệ Việt Nam "Nghiên cứu tiềm năng về được liệu biển vùng ĐB Việt Nam" và Grant 15-04-02686 from the Russian Foundation for Basic Research (RFBR).

ÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abraham T.J., Nagarajan J. & Shanmugam S.A. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian journal of marine sciences*, 31(2), 161-164 (2002)
- Aminin D.L., Merichinskaya E.S., Pislugin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Anticancer Activity of Sea Cucumber Triterpene Glycosides. *Marine drugs*, 13(3), 1202-1223 (2015).
- Anand T.P., Rajaganapathi J., Edward J.K.P. Antibacterial activity of marine molluscs from Portonovo region. *Ind J Mar Sci*, 26, 206-208 (1997)
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28: 25-30, (1995).
- Careaga V.P., Maier M.S. Cytotoxic Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers. In *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* (pp. 515-528). Springer International Publishing. (2015).
- Cuong N.X., Hanh T.T.H., Thao N.P., Thanh N.V., Nam N.H., Thung D.C., Van Minh, C. Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(16), 3151-3156 (2015).
- Dang N.H., Thanh N.V., Van Kiem P., Van Minh C., & Kim Y.H. Two New Triterpene Glycosides from the Vietnamese Sea Cucumber *Holothuria scabra*. *Archives of pharmacal research*, 30(11), 1387-1391. (2007).
- Dincer T. and Cakli S. Chemical composition and biometrical measurements of the Turkish Sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1): 21-26 (2007).
- Dunlap W.C., Yamamoto Y. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 105-114 (1995).
10. Faulkner D.J. *Chemical defenses of marine molluscs. In: Ecological roles of marine natural products*. New York: Cornwell University Press; p. 119-163 (1992).
11. Folch J.F., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226 497-509 (1957).
1. Hamel J.F., Conand C., Pawson D.L., & Mercier A. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): its biology and exploitation as beche-de-mer. *Advances in Marine Biology*, 41, 129-223 (2001).
 2. Hylleberg J., Kilburn R.N. *Marine Molluscs of Vietnam: Annotations, Voucher Material, and Species in Need of Verification*. Special publication, Marine Biological Center Bhuket 28 (2003).
 3. Kim Se-Kwon. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. ISBN: 978-3-642-53970-1. DOI 10.1007/978-3-642-53971-8 (2015).
 4. Kumar G.P., Navyaa K., Ramya E.M., Venkataramana M., Anand T., Anilakumar K.R. DNA damage protecting and free radical scavenging properties of *Terminalia arjuna* bark in PC-12 cells and plasmid DNA. *Free Rad. Antioxid*. 3: 35-39 (2013).
 5. Kumaran N.S., Bragadeeswaran S., Thangaraj S. Screening for antimicrobial activities of marine molluscs *Thais tiszoti* (Petit, 1852) and *Babylonia spirata* (Linnaeus, 1758) against human, fish and biofilm pathogenic microorganisms. *Afr J Microbiol Res* 5(24): 4155-4161. (2011)
 6. Kuwahara R., Hatate H., Yuki T., Murata H., Tanaka R., Hama Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthodidaris crassispina*. *LWT-Food Science and Technology*, 42(7), 1296-1300. (2009).
 7. Likhityawuid K., Angerhofer C.K., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Ruangrunsi N. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Sephania erecta*. *Journal of natural products* 56 (1), pp. 30-38 (1993).
 8. Miranda M.S., Cintra R.G., Barros S.B.M., Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 31(8), 1075-1079. (1998).
 9. Service M. and Wardlaw A.C. *Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of Echinus esculentus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 79: 161-165 (1984). [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90008-7](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(84)90008-7)
 10. Shea G., Olga, M. B., Elens, K., Antonin, L., Milan, C., Nuriá, G. M., Ratiporn, H., Yong- Seo, P., Soon-Teck, J., and Simon, T. *Bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa sweeties*.

- a new kind of citrus fruit*. J. Nutri. Biolchem. 14, 154-159 (2003).
11. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer agents*. Eur. J. Cancer 27, pp. 1162-1168. (1991),
 12. Thao N.P., Cuong N.X., Luyen B.T.T., Quang T. H., Hanh T. T. H., Kim S., Kim Y. H. *Anti-inflammatory components of the starfish Astropecten polyacanthus*. Marine drugs, 11(8), 2917-2926. (2013).
 13. Vanden B.D.A., Vlietliuck A.J. *Methods in Plant Biochemistry* 6, Academic Press, New York, pp. 47-68. (1991).
 14. Wang W. H., Hong J. K., Lee C. O., Shin S., Jung J. H., & Cho H. Y. *Bioactive Metabolites from the Brittle Star Ophioplocus japonicus*. Natural Product Sciences. (2004).
 15. Zhou D.Y., Qin L., Zhu B.W., Wang X.D., Tan H., Yang J.P., Murata Y. *Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin Strongylocentron nudus*. Food chemistry, 129(4), 1591-1597. (2011).

Liên hệ: Hoàng Kim Chi

Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên
18 - Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Email: chihoangkim@gmail.com
Điện thoại : 0936681829