

trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng CY có tác dụng kích thích miễn dịch, thể hiện ở khả năng làm lắng nồng độ IgG trong máu ngoại vi và tăng IL- 2 và INF α trong máu ngoại vi. Như vậy, Hồi xuân hoàn chủ yếu làm tăng các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2007), *Sinh lý bệnh và miễn dịch - Phần miễn dịch học*, NXB Y học, tr. 46- 68.
2. Nguyễn Trọng Thông (2005), "Thuốc tác dụng trên hệ thống miễn dịch", *Dược lý học lâm sàng*, NXB Y học, tr. 567- 578.
3. Bộ Y tế (2012), *Dược thư quốc gia Việt Nam*.

NXB Khoa học và kỹ thuật, tập 1, tr 189- 193.

4. Phạm Thủy Phương (2011), "Đánh giá tác dụng nâng cao thể trạng của thuốc "Bổ thận tráng dương" trên bệnh nhân HIV/AIDS", *Luận văn tốt nghiệp bác sỹ chuyên khoa II*, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

5. Vũ Đức Lợi, Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thượng Đông, Phạm Thị Văn Anh (2014), "Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của phân đoạn dịch chiết polysaccharid từ củ con của cây ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang", *Tạp chí Dược học*, số 2, tr. 12- 16.

6. Bafna A. R, Mishra S. H. (2006), "Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curculigo archioides* on immunosuppressed mice", *J. Ethnopharmacology*, 104, p. 1- 4.

(Ngày nhận bài: 18/05/2014 - Ngày duyệt đăng: 08/09/2014)

Hoạt tính gây độc tế bào của loài nuôt lá cò ke (*Casearia grewiifolia* Vent.), rum thơm (*Poikilospermum suaveolens* (Blume) Merr.) và dây lóp bóp (*Gymnosporia stylosa* Pierre) ở Việt Nam

Nguyễn Thị Thu Hà¹, Đỗ Thị Thảo², Trương Bích Ngân³, Đoàn Thị Mai Hương¹
Nguyễn Văn Hùng³, Marc Litaudon⁴, Châu Văn Minh³, Phạm Văn Cường³

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên Cộng hòa Pháp

* E-mail. thuha.vast@gmail.com

Summary

In the international project "Screening bioactivity of the flora in Vietnam", between the Institute of Natural Products Chemistry (France) and Vietnam Academy of Science and Technology, three plant species *Casearia grewiifolia* Vent., *Poikilospermum suaveolens* (Blume) Merr. and *Gymnosporia stylosa* Pierre were investigated. Following our previous investigations on their chemical constituents and preliminary screening that demonstrated the EIOAc extracts from these plants possessed a significant cytotoxic activity against KB cells at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the values of 76%; 92% and 94%, respectively, the cytotoxicity against KB, HepG2, Lu-1 and MCF-7 cell line of the isolated compounds were estimated by MTT assay. The compound Caseanigrescen D (from *C. grewiifolia*) possessed strong activities against 4 experimented cancer cell lines with the IC₅₀ values of 0.13 – 0.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The total extracts of *G. stylosa* and *P. suaveolens* exhibited higher cytotoxic activities than the separate compounds isolated therefrom. This is for the first time, these three plant species of Vietnam were researched on chemical constituents and cytotoxic activities.

Keywords: *Casearia grewiifolia* Vent., *Gymnosporia stylosa* Pierre, *Poikilospermum suaveolens* (Blume) Merr., cytotoxicity.

Đặt vấn đề

Trong khuôn khổ của Dự án quốc tế Pháp - Việt về "Sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học của thảm thực vật Việt Nam", kết quả thử nghiệm ban đầu cho thấy dịch chiết ethyl acetat (EtOAc) của 3 loài: nuốt lá cò ke (*Casearia grewiifolia* Vent.), dây lóp bóp (*Gymnosporia stylosa* Pierre) và rum thơm (*Poikilospermum suaveolens* (Blume) Merr.) đều thể hiện khả năng ức chế mạnh sự phát triển của dòng tế bào ung thư biểu mô (KB) lần lượt là 76%, 92% và 94% ở nồng độ 1 µg/ml. Do đó, ba loài thực vật này được lựa chọn để khảo sát về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học.

Trong Y học cổ truyền, cây nuốt lá cò ke dùng để chữa bệnh thủy đậu, trị vết thương, điều trị viêm trĩ cung, tác dụng gây mê, lợi tiểu. Nghiên cứu về hóa thực vật cho thấy, *C. grewiifolia* chứa chủ yếu các hợp chất clerodan diterpenes và phenolic với hoạt tính chống sốt rét, gây độc tế bào ung thư và hoạt tính chống lao rất đáng quan tâm^[1]. Cây rum thơm được sử dụng trong dân gian để trị bệnh ghê, bệnh đau mắt và diệt chấy rận^[2]. Cho đến nay, chưa có công trình nghiên cứu nào về cây rum thơm và loài dây lóp bóp được công bố ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã công bố các hợp chất được phân lập từ 3 loài thực vật trên^[3-6]. Ở bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất trên 4 dòng tế bào là ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep G2), ung thư phổi (LU-1) và ung thư vú (MCF7).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Các hợp chất phân lập được từ lá cây nuốt lá cò ke, thân cây rum thơm và thân cây dây lóp bóp

Từ cặn chiết CH_2Cl_2 và methanol của lá cây nuốt lá cò ke, chúng tôi thu được 7 hợp chất là caseanigriscen D (1), dearabinosylpneumonanthosid (2), 4-hydroxybenzaldehyd (3), acid 4-hydroxybenzoic (4), acid 3,4-dihydroxybenzoic (5), methyl 3,4-dihydroxybenzoat (6) và tritnacontan-1-ol (7)^[2]

Từ cặn chiết CH_2Cl_2 và methanol của thân cây rum thơm, chúng tôi thu được 12 hợp chất là

erythrinasinat (8), 3-keto-13(28)-epoxy-ursan-11-en (9), stigmastan-3,6-dion (10), stigmast-4-en-3,6-dion (11), acid uncaric (12), acid musangic (13), acid ursolic (14), acid 2 α ,3 α ,23-trihydroxy-12-oleanen-28-oic (15), isoscopoletin (16), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (17), 2-carbonyl-3-(2-hydroxypropanyl) phenyl (18) và 3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin (19)^[4,5].

Từ cặn chiết EtOAc của thân cây dây lóp bóp, chúng tôi thu được 8 hợp chất là abruslacton A (20), β -amyrin (21), canophyllol (22), 28,29-dihydroxyfriedelan-3-on (23), friedelin (24), syringaldehyd (25), acid syringic (26) và acid 3,4-dihydroxybenzoic (5)^[6].

Các dòng tế bào

Các dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATCC: ung thư biểu mô KB (*human epidermic carcinoma* CCL - 17TM), ung thư gan HepG2 (*hepatocellular carcinoma* HB - 8065TM), ung thư phổi LU-1 (*human lung carcinoma*), ung thư vú MCF7 (*human breast carcinoma* HTB - 22TM).

Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)^[7]. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím đen) bởi hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể. Hòa tan formazan trong DMSO rồi đo mật độ quang OD. Nếu chất thử nghiệm có hoạt tính gây độc tế bào, số lượng tế bào sống giảm và giá trị OD sẽ giảm. Kết quả đánh giá hoạt tính của chất thử qua giá trị IC₅₀ (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào).

Các dòng tế bào được lưu giữ trong nitơ lỏng, đông hóa và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng như DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7-10% FBS (Fetal Bovine Serum) và một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37°C, vô trùng tuyệt đối) và được cấy chuyển 1-2 lần trước khi thí nghiệm. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Mẫu thử được hòa tan bằng dung môi DMSO 100% với nồng độ ban đầu là 20 mg/ml, sau đó tiến hành pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Chất tham khảo là Ellipticine pha trong DMSO với nồng độ 0,01 mM.

Thử nghiệm bắt đầu bằng việc trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp đó, pha tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm (khoảng $3-5 \times 10^4$ tế bào/ml tùy theo từng dòng tế bào). Lấy vào mỗi giếng 10 μ l chất thử và 190 μ l dung dịch tế bào chuẩn bị sẵn ở trên. Đĩa thí nghiệm được ủ ở điều kiện tiêu chuẩn trong 72 giờ. Mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10 μ l MTT (5mg/ml) trong 4 giờ.

Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 100 μ l DMSO 100%. Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Genios Tecan. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

Xử lý kết quả thực nghiệm

Giá trị IC_{50} được xác định bằng phần mềm máy tính Rawdata: $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ (với dịch chiết thô) và $IC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ (với chất tinh khiết) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào, có khả năng ức chế hoặc diệt tế bào ung thư.

Kết quả và thảo luận

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ lá cây nuốt lá cò ke

Bảng 1: Hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ cây nuốt lá cò ke

STT	Tên chất	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
		KB	Hep-G2	LU-1	MCF-7
1	Caseanigrescens D (1)	0,18	0,13	0,26	0,22
2	Dearabiosylpneumonanthosid (2)	>20	>20	>20	>20
3	4-hydroxybenzaldehyd (3)	>20	>20	>20	>20
4	Acid 4-hydroxybenzoic (4)	>20	>20	>20	>20
5	Acid 3,4-dihydroxybenzoic (5)	>20	>20	>20	>20
6	Methyl 3,4-dihydroxybenzoat (6)	>20	>20	>20	>20
7	Tritiacontan-1-ol (7)	>20	>20	>20	>20
8	Ellipticin	0,26	0,53	0,312	0,56

Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ lá cây nuốt lá cò ke cho thấy, hoạt chất caseanigrescens D (1) thể hiện hoạt tính mạnh trên cả 4 dòng tế bào ung thư thực nghiệm với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 0,13 - 0,26 $\mu\text{g/ml}$, thậm chí còn cao hơn cả chất tham khảo ellipticin. Các chất còn lại đều không thể hiện hoạt tính ở nồng độ nghiên cứu với giá trị $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ (bảng 1). Điều này chứng tỏ caseanigrescens D đóng vai trò chủ đạo trong việc tạo nên hoạt tính của loài thực vật này. Caseanigrescens D

lần đầu tiên được phân lập từ loài *C. nigrescens* và cũng thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780 với giá trị IC_{50} là 1,4 μM [8]. Mặc dù được đánh giá là có hoạt tính cao nhưng không chọn lọc trên từng dòng tế bào, caseanigrescens D nhìn chung có chức năng như một tác nhân gây độc tế bào và hoạt tính của nó được cho là phụ thuộc chủ yếu vào khung cơ bản clerodan diterpen.

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ cây rum thơm

Bảng 2. Hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ cây rum thơm

Tên chất	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	KB	Hep-G2	LU-1	MCF-7
1 Erythrasinat (8)	>20	>20	>20	>20
2 3-keto-13(28)-epoxy-ursan-11-en (9)	16,43	20	>20	>20
3 Stigmastan-3,6-dion (10)	>20	>20	>20	>20
4 Stigmast-4-en-3,6-dion (11)	3,31	>20	>20	7,14
5 Úncanc acid (12)	>20	>20	>20	>20

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

6 Musangic acid (13)	>20	>20	>20	>20
7 Ursolic acid (14)	14,4	19,56	5,16	4,48
8 Acid 2 α ,3 α ,23-trihydroxy-12-oleanen-28-oic (15)	>20	>20	>20	>20
9 Isoscopoletin (16)	>20	>20	>20	>20
10 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (17)	>20	>20	>20	>20
11 2-carbonyl-3-(2-hydroxypropanyl)-phenyl (18)	>20	>20	>20	>20
12 3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin (19)	>20	>20	>20	>20

Kết quả thử nghiệm ở bảng 2 cho thấy, trong số các chất được phân lập, acid ursolic (14) thể hiện hoạt tính gây độc mạnh nhất trên dòng tế bào MCF-7 và LU-1 với giá trị IC_{50} trong khoảng 4,48 - 5,16 $\mu\text{g/ml}$ và hoạt tính yếu hơn trên dòng ung thư KB và Hep-G2 với IC_{50} từ 14,4 - 19,56 $\mu\text{g/ml}$. Acid ursolic là một triterpenoid, khá phổ biến ở nhiều loài thực vật. Trong những năm gần đây, acid ursolic được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và được chứng minh là một tác nhân tiềm năng trong việc ngăn ngừa và điều trị nhiều loại bệnh trên mô hình *in-vitro* và *in-vivo* [9]. Hợp chất stigmasl-4-en-3,6-dion (11) thể hiện

Bảng 3: Hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ cây dây lóp bóp

Tên chất	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	KB	Hep-G2	LU	MCF-7
1 Abruslactone A (20)	>20	>20	>20	>20
2 β -amyrin (21)	>20	>20	>20	>20
3 Canophyllol (22)	>20	>20	>20	>20
4 28,29-dihydroxyfriedelin-3-on (23)	>20	>20	>20	>20
5 Friedelin (24)	8,1	14,02	>20	19,87
6 Syringaldehyd (25)	>20	>20	>20	>20
7 Acid syringic (26)	>20	>20	>20	>20
8 Acid 3,4-dihydroxybenzoic (27)	>20	>20	>20	>20

Kết quả thử nghiệm ở bảng 3 cho thấy, chỉ có hợp chất friedelin (24) thể hiện khả năng ức chế 3 dòng tế bào ung thư là KB, HepG2 và MCF7 với giá trị IC_{50} từ 8,1 - 19,87 $\mu\text{g/ml}$, không có hoạt tính trên dòng LU-1. Các hợp chất còn lại không có hoạt tính trên các dòng tế bào thử nghiệm với giá trị $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$. Như vậy, trong số các hợp chất phân lập được từ cây dây lóp bóp không có hợp chất nào thể hiện hoạt tính vượt trội trong việc ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư. Điều này giả thiết rằng hoạt tính của dịch chiết tổng (ức chế 94% dòng tế bào KB ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$) có thể nhờ vào tác dụng hiệp đồng của nhiều lớp chất có trong cây.

khả năng gây độc khá tốt trên dòng tế bào ung thư KB và MCF7 với IC_{50} trong khoảng 3,31 - 7,14 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, có cấu trúc gần giống với (11), hợp chất stigmasl-3,6-dion (10) không có hoạt tính trên 4 dòng ung thư thử nghiệm. Hợp chất 3-keto-13(28)-epoxy-ursan-11-en (9) ức chế sự phát triển của 2 dòng tế bào KB và Hep-G2 với giá trị IC_{50} từ 16,43 - 20 $\mu\text{g/ml}$. Các chất còn lại không có hoạt tính ở nồng độ < 20 $\mu\text{g/ml}$.

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ cây dây lóp bóp

Đây chính là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về dịch chiết loài thực vật này.

Kết luận

Các hợp chất phân lập từ 3 loài thuốc lá có ke, rum thơm, dây lóp bóp được đánh giá hoạt tính gây độc trên 4 dòng tế bào ung thư bằng phương pháp dùng MTT. Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam 3 loài thực vật này được nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học Công nghệ Quốc gia (Nafosted) trong đề tài mã số 104.01-2012.01 và Dự án Pháp-Việt.

Tài liệu tham khảo

1. Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Kanarsa T., Buayairaksa M. (2005), "New bioactive clerodan diterpenoids from the barks of *Caseana grewifolia*", *J. Nat. Prod.*, 68(2), 183-188.

2. Võ Văn Chí (2000), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 1001-1002.

3. Nguyễn Thị Thu Hà, Trương Bích Ngân, Trần Văn Hiếu, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Văn Hùng, Marc Litaudon, Châu Văn Minh (2013), "Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học lá cây *Caseana grewifolia* họ Mùng quân (Flacourtiaceae)", *Tạp chí Hóa học*, 51(6ABC), 54-58.

4. Trần Hữu Giáp, Nguyễn Thị Thu Hà, Phí Thị Đào, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Marc Litaudon, Nguyễn Văn Hùng, Châu Văn Minh (2011), "Nghiên cứu thành phần hóa học thân cây rum thơm ho Rum", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 49(6B), 65-70.

5. Nguyễn Thị Thu Hà, Trần Thu Trang, Phí Thị Đào, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Marc

Litaudon, Nguyễn Văn Hùng, Châu Văn Minh (2012), "Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học thân cây rum thơm ho Rum (Cecropiaceae)", *Tạp chí Hóa học*, 50(5A), 62-65.

6. Nguyễn Thị Thu Hà, Trương Bích Ngân, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Văn Hùng, Marc Litaudon, Châu Văn Minh (2014), "Thành phần hóa học thân cây dây lóp bóp *Gymnosporia Stylosa* họ Dây gỏi (Celastraceae)", *Tạp chí Hóa học*, đang chờ đăng.

7. Mosmann T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.

8. William R. B., Norris A., Miller J. S. et al (2007), "Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar", *J. Nat. Prod.*, 70, 206-209.

9. Ibrahim T. Babalola, Francis O. Shode (2013), "Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 214-222.

(Ngày nhận bài: 23/07/2014 - Ngày duyệt đăng: 08/09/2014)

✓ Bước đầu thử tác dụng bảo vệ gan của cao lophandanum trên thực nghiệm

Nguyễn Thị Liên^{*}, Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Kim Hương, Trần Việt Hùng, Đoàn Cao Sơn

Viên Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
**E-mail: nguyenvien.pharm@gmail.com*

Summary

The combination of aqueous extract from two medicinal plants *Lophatherum gracile* and *Pandanus tectorius*, named *Lophandanum* extract, was investigated to assess its hepatoprotective effects by the animal model of CCl_4 -induced liver-damage. Repeated administration of the *Lophandanum* extracts (1.5 g/kg, 3.0 g/kg or 6.0 g/kg, p.o.) significantly depressed the increase in alanine aminotransaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) induced by CCl_4 in mice. At such a low dose of 1.5 g/kg, p.o., *Lophandanum* extracts also significantly prevented toxic effects of CCl_4 on the body weight of mice. Histopathologically, *Lophandanum* extracts showed highly protective to the liver tissue structure in comparison with the untreated groups. In addition, *Lophandanum* extracts per se did not influence any normal serum biochemical indices under observation and body weight. Our findings evidently proved the *Lophandanum* a potential herb remedy for hepatic diseases.

Keywords: *Lophandanum*, *Pandanus tectorius*, *Lophatherum gracile*, hepatoprotective effects. CCl_4 .