

ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ RỄ CÂY BÁ BỆNH THEO CƠ CHẾ ỨC CHẾ SỰ SẢN SINH NO TRÊN DÒNG TẾ BÀO ĐẠI THỰC BÀO CHUỘT RAW264.7

Huỳnh Kim Thoa¹, Phạm Thanh Trúc¹, Phạm Văn Nguyên¹, Nguyễn Thị Lộc¹, Phan Thục Anh¹, Nguyễn Quang Thường¹, Lê Thị Kiều Nhi¹

TÓM TẮT

19 hợp chất phân lập được từ rễ cây Bá Bệnh bao gồm 9-hydroxycanthin-6-one (EL1), 9-methoxycanthin-6-one (EL2), 9,10-dimethoxycanthin-6-one (EL3), 5-methoxycanthin-6-one (EL4), canthin-6-one (EL5), 11-hydroxycanthin-6-one (EL6), 1-hydroxyl-canthin-6-one (EL7), kumujanrine (EL8), 2-hydroxyindole (EL9), tryptophan (EL10), Eurycomalide A, F, G, H (EL11-14), laurycolactone B (EL15), eurylongilactone A (EL16), scopoletin (EL17), vanillin (EL18) và ethyl ferulate (EL19) được sử dụng để đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng viêm theo cơ chế ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào chuột. Kết quả cho thấy hợp chất EL16, EL19 và EL3 có khả năng ức chế NO tốt và không gây ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào.

Từ khóa: Bá bệnh, kháng viêm, NO.

SUMMARY:

STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF COMPOUNDS ISOLATED FROM EURYCOMA LONGIFOLIA ROOT BASED ON THE MECHANISM OF INHIBITION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION ON RAW264.7 MOUSE MACROPHAGE CELLS

19 compounds, which was isolated from the roots of *Eurycoma longifolia* including 9-hydroxycanthin-6-one (EL1), 9-methoxycanthin-6-one (EL2), 9,10-dimethoxycanthin-6-one (EL3), 5-methoxycanthin-6-one (EL4), canthin-6-one (EL5), 11-hydroxycanthin-6-one (EL6), 1-hydroxyl-canthin-6-one (EL7), kumujanrine (EL8), 2-hydroxyindole (EL9), tryptophan (EL10),

Eurycomalide A, F, G, H (EL11-14), laurycolactone B (EL15), eurylongilactone A (EL16), scopoletin (EL17), vanillin (EL18) and ethyl ferulate (EL19) was used to screening anti-inflammatory activity by evaluating the inhibition effect of NO production in murine macrophage cell line. The results showed that compound EL16, EL19 and EL3 exhibited strong inhibitory effect and had no toxicity effect on cell survival.

Keywords: Eurycoma longifolia, anti-inflammatory, NO.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nhiều thập kỷ qua, thực vật không những được coi là nguồn cung cấp vitamin, protein và chất béo làm thực phẩm cho con người mà chúng còn là nguồn cung cấp dồi dào các hợp chất tự nhiên dùng trong dược phẩm, hóa chất nông nghiệp, chất màu hoặc các chất phụ gia thực phẩm có giá trị khác. Những sản phẩm này được biết như là các chất trao đổi thứ cấp, hình thành với một lượng rất nhỏ trong cây hoặc là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật [1]. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), 80% dân số thế giới sử dụng thảo dược làm thuốc chữa bệnh và chăm sóc sức khỏe. Tuy nhiên, do sự biến đổi ngày càng xấu của môi trường cũng như việc khai thác bừa bãi của con người làm cho môi trường sinh sống của thực vật ngày càng hạn hẹp, nhiều loài có nguy cơ dẫn đến tuyệt chủng. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học tích lũy trong thực vật thường rất cao [2,3]. Việc tìm kiếm các hợp chất từ thực vật sau đó

1. Trường Đại học Đại Nam

Tác giả liên hệ: phuongnguyendhd@gmail.com

» Ngày nhận bài: 25/06/2019 | » Ngày phản biện: 30/06/2019 | Ngày duyệt đăng: 06/07/2019

ngiên cứu các bước tổng hợp, bán tổng hợp hoặc nuôi cấy mô cũng được tính đến để nâng cao năng suất và tránh tổn hại đến nguồn tài nguyên thiên nhiên. Đến nay, người ta đã thành công trong sản xuất rất nhiều loại hợp chất có giá trị trên qui mô lớn như anthraquinone ở cây *Rubia akane*, vincristine ở cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), berberin ở cây *Coscinium fenestratum*, diosgenin ở cây *Dioscorea doryophora*...[4].

Cây Bá bệnh có tên khoa học là *Eurycoma longifolia*. Ở Việt Nam nhiều người còn gọi là cây Bách bệnh, cây Mật nhân. Nó là một loại thuốc dân gian nổi tiếng để tăng cường sinh lực, khả năng sinh sản và chống lão hóa. Trong những năm gần đây một số nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy thành phần trong cây là các hợp chất quassinoid, alkaloid, triterpenoid, flavonoid [5]. Trong đó quassinoid, alkaloid đóng vai trò quan trọng nhất và hoạt lực chủ yếu của cây bá bệnh với đặc tính chữa bệnh sốt rét, bệnh dị ứng, sốt và diệt khối u. *E. longifolia* cũng có khả năng làm ẩm cơ thể nhờ làm tăng nhịp tim, đẩy nhanh tốc độ lưu thông máu trong cơ thể. Nó cũng chứa tannin, polysaccharide cao phân tử, glycoprotein và mucopolysaccharide. Theo Viện Nghiên cứu lâm nghiệp Malaysia, cây bá bệnh có chứa các enzym chống oxy hóa superoxide dismutase. Các chất này có tác dụng tiêu hủy các gốc tự do có thể gây tổn hại cho những tế bào sống khác. Các thí nghiệm mới nhất cũng xác định dịch chiết cây bá bệnh làm tăng sinh nitric oxide (NO) trong cơ thể, ức chế sự hình thành TNF- α của đại thực bào đã được hoạt hóa, do đó có tác dụng chống viêm.

Viêm được coi như một cơ chế phòng vệ sinh lý chủ yếu, giúp cơ thể tự bảo vệ chống lại nhiễm trùng, bỏng, hóa chất độc hại, chất gây dị ứng hoặc kích thích độc hại khác. Viêm không kiểm soát được có thể như một yếu tố dẫn đến các bệnh mãn tính. Hiện nay, thuốc dùng để quản lý các cơn đau và viêm là các thuốc thuộc dòng narcotics, không thuộc dòng narcotics, và corticosteroids. Tất cả những loại thuốc này đều có tác dụng phụ. Ngược lại, nhiều loại thuốc có nguồn gốc thực vật đã được sử dụng từ lâu, ít có tác dụng phụ và ít gây ảnh hưởng bất lợi đến người dùng.

Trong quá trình viêm, những tế bào viêm được kích hoạt (bạch cầu trung tính, bạch cầu ái toan, thực bào đơn nhân và đại thực bào) tiết ra một lượng lớn nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) và các cytokine tiền viêm như IL-1 β , IL-6, TNF- α để giúp tiêu diệt hoặc ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật xâm nhập hoặc mô ung thư. LPS (lipopolysaccharide) là một thành phần chính của màng ngoài vi khuẩn Gram âm. Nó có thể kích hoạt các đại thực

bào tiết ra các cytokine tiền viêm và chất trung gian gây viêm như NO. Tuy nhiên việc sản sinh ra quá nhiều những chất này không chỉ gây ra sự tổn thương mô và tế bào, mà còn kích hoạt các đại thực bào trong bệnh thấp khớp và viêm gan mãn tính [6]. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được theo cơ chế ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào chuột RAW264.7.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Các hợp chất phân lập từ rễ cây bá bệnh, trong đó có 10 hợp chất thuộc khung alkaloid gồm: 9-hydroxycanthin-6-one (EL1), 9-methoxycanthin-6-one (EL2), 9,10-dimethoxycanthin-6-one (EL3), 5-methoxycanthin-6-one (EL4), canthin-6-one (EL5), 11-hydroxycanthin-6-one (EL6), 1-hydroxyl-canthin-6-one (EL7), kumujanrine (EL8), 2-hydroxyindole (EL9), tryptophan (EL10); 06 hợp chất quassinoid: Eurycomalide A, F, G, H (EL11-14), laurycolactone B (EL15), eurylongilactone A (EL16); 03 hợp chất phenolic gồm: scopoletin (EL17), vanillin (EL18) và ethyl ferulate (EL19) được sử dụng để đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng viêm theo cơ chế ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào chuột.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tế bào đại thực bào chuột (RAW264.7) được cung cấp bởi GS. Jeong-Hyung Lee, Trường ĐHQG Kangwon, Hàn Quốc. Tế bào RAW264.7 nuôi cấy ở 37°C trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100U/ml penicillin và 100mcg/ml streptomycin trong tủ nuôi cấy CO₂ 5% trong 48 giờ.

Sau đó chúng được nuôi cấy trong giếng phiên 96 với mật độ 2.5 x 10⁵ tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với LPS trong 24 giờ với sự có mặt của các hợp chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau, được pha sẵn trong DMSO. Dịch nổi của tế bào phản ứng với thuốc thử Griess. NaNO₂ ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng [7].

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá các hoạt tính *invitro* được bổ sung dung dịch MTT (5mg/ml pha trong PBS), ủ 4h ở 37°C và 5% CO₂. Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu

Bảng 1: Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ rễ cây Bá Bệnh

Hợp chất	Nồng độ (μM)	% Ức chế	Sai số	% TB sống	Sai số
EL1	30	40,00	1,01	92,11	1,59
	100	48,02	0,60	74,79	0,71
EL2	30	28,51	0,50	90,26	1,23
	100	38,96	0,73	85,22	0,56
EL3	30	55,96	0,87	93,48	2,77
	100	65,92	0,52	87,02	2,03
EL4	30	84,25	0,70	90,19	2,61
	100	97,92	0,40	83,66	0,30
EL5	30	91,67	0,20	39,56	3,01
	100	95,00	0,23	4,34	0,97
EL6	30	56,74	0,35	95,28	2,02
	100	98,40	0,60	93,67	1,45
EL7	30	6,40	2,39	98,45	1,89
	100	43,20	2,29	89,54	1,46
EL8	30	49,02	0,79	83,53	2,66
	100	61,44	1,81	71,89	1,26
EL9	30	-	-	92,68	1,68
	100	-	-	88,56	1,96
EL10	30	-	-	99,68	0,34
	100	-	-	98,35	0,57
EL11	30	3,68	1,43	90,59	1,28
	100	5,51	1,97	84,82	2,60
EL12	30	18,84	0,87	91,67	1,35
	100	59,26	1,50	86,11	1,35
EL13	30	-	-	95,35	1,36
	100	-	-	92,56	1,76
EL14	30	-	-	92,77	1,83
	100	-	-	92,44	0,89

EL15	30	9,19	0,57	94,64	2,27
	100	32,77	1,15	77,04	0,80
EL16	30	> 100,00	0,23	79,01	1,05
	100	> 100,00	1,56	70,97	1,57
EL17	30	34,75	0,71	95,99	1,26
	100	45,39	0,81	85,29	1,61
EL18	30	54,25	0,91	82,19	2,80
	100	71,90	0,17	75,33	2,17
EL19	30	73,05	0,54	82,61	1,76
	100	92,20	0,13	77,24	0,51
Cardamonin*	30	12,54	1,49	98,30	0,03
	100	87,10	0,44	97,62	1,79

* Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng

Kết quả bảng 1 cho thấy hợp chất **EL3, 4, 5, 6** và hợp chất **EL8** có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO tốt ở nồng độ thử nghiệm 100 μ M, tuy nhiên hợp chất **EL5** gây độc cho tế bào. Trong 6 hợp chất quassinoid, hợp chất **EL12** và hợp chất **EL16** thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO tốt ở nồng độ thử nghiệm 100 μ M và không gây

ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào. Bên cạnh đó, ở hai nồng độ thử nghiệm 30 μ M và 100 μ M, 2 hợp chất phenolic **EL18** và **EL19** có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO tốt và không gây độc cho tế bào.

Chúng tôi tiếp tục đánh giá giá trị IC_{50} của các hợp chất có hoạt tính (Bảng 2).

Bảng 2: Giá trị IC_{50} hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các mẫu có hoạt tính

TT	Tên mẫu	Giá trị IC_{50} (μ M)
1	EL3	23,11 \pm 2,98
2	EL4	23,44 \pm 1,14
3	EL6	23,93 \pm 0,98
4	EL8	35,48 \pm 1,56
5	EL12	32,15 \pm 1,68
6	EL16	3,03 \pm 0,73
7	EL18	21,88 \pm 1,35
8	EL19	3,56 \pm 0,43
	Cardamonin*	1,41 \pm 0,05

Kết quả bảng 2 cho thấy hợp chất **EL16** và **EL19** có hoạt động ức chế sự sản sinh NO ấn tượng với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,03 \pm 0,73 μ M và 3,56 \pm 0,43 μ M và không

gây độc cho tế bào. Các hợp chất còn lại có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO tương đối tốt với giá trị IC_{50} từ 16,98 – 35,48 μ M.

2. Bàn luận

Hợp chất **EL3** có 2 nhóm methoxy cho thấy hoạt tính kháng viêm mạnh hơn các hợp chất chỉ có một nhóm methoxy. Hiện nay, đã có nhiều báo cáo về hoạt tính kháng viêm của phân đoạn và hợp chất phân lập được từ *E. longifolia* bao gồm alkaloids và quassinoids [8, 9]. Hợp chất **EL3**, **EL16** và **EL19** cần được tiếp tục thử nghiệm đánh giá cơ chế kháng viêm ở cấp độ protein. Nghiên cứu này bước đầu cho thấy tiềm năng của rễ cây bá bệnh trong nghiên cứu thuốc chống viêm trong tương lai. Về mặt giá trị trong kinh tế được, nghiên cứu này cho thấy bá bệnh là loại dược liệu thiên nhiên dồi dào và mang lại nhiều lợi ích sức khỏe cho con người.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sơ bộ đánh giá được hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được theo cơ chế ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào chuột RAW264.7. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của 19 hợp chất phân lập được từ rễ cây Bá Bệnh cho thấy hợp chất EL16, EL19 và EL3 có khả năng ức chế NO tốt và không gây ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng về kinh tế được của rễ cây bá bệnh trong nghiên cứu thuốc chống viêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wink M, Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual plant reviews, vol 2, Sheffield Academic Press, 1999.
2. Sheper T, Advances in biochemical engineering biotechnology-plant cells, vol 72, Springer-Verlag, Berlin Heideberg, 2001.
3. Vijaya SN, Udayasri PVV, Aswani KY, Ravi BB, Phani KY, Vijay VM, Advancements in the production of secondary metabolites, *J Nat Prod.*, 3, 112-123, 2010.
4. Vanisree M, Tsay HS. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, *Int J Appl Sci Eng.*, 2, 29-48, 2004.
5. Kardono LBS, Angerhofer CK, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto LM, Kinghorn ADJ, Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod.*, 54, 1360–1367, 1991.
6. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby D. A, Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad. Sci.*, 91, 2046–2050, 1994.
7. S Hatzieremia, A I Gray, V A Ferro, A Paul, and R Plevin, The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NFκB signalling pathways in monocytes/macrophages, *Br J Pharmacol*, 149(2), 188–198, 2006.
8. Ngoc PB, Pham TB, Nguyen HD, Tran TT, Chu HH, Chau VM, et al. A new anti-inflammatory beta-carboline alkaloid from the hairy-root cultures of *Eurycoma longifolia*. *Nat Prod Res.*, 30(12), 1360-1365, 2016.
9. Tran TV, Malainer C, Schwaiger S, Atanasov AG, Heiss EH, Dirsch VM, et al. NF-kappaB inhibitors from *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod.*, 77(3), 483-488, 2014