

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



LÊ THỊ BÍCH HIỀN

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
HƯỚNG TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM VÀ
ĐỘC TÍNH TRÊN MỘT SỐ DÒNG
TẾ BÀO UNG THƯ *IN VITRO* CỦA LOÀI
Aspidistra triradiata N. VISLOBOKOV
Ở VIỆT NAM**

Ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền

Mã số: 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2025

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. Nguyễn Thị Hoài

PGS.TS. Trần Thị Vân Anh

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Chi *Aspidistra* thuộc họ Asparagaceae hiện có hơn 200 loài, trong đó có khoảng 80 loài được ghi nhận cho hệ thực vật Việt Nam. Các loài *Aspidistra* được ứng dụng trong y học cổ truyền làm thuốc long đờm, lợi tiểu, thuốc bổ, trị gãy xương, sung huyết... Các nhóm hợp chất phân lập từ chi này, với saponin steroid là nhóm hợp chất chính, thể hiện nhiều hoạt tính như kháng nấm, kháng virus, kháng khuẩn, kháng viêm và chống ung thư. Như vậy, có thể thấy chi *Aspidistra* rất tiềm năng trong việc tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng sinh học.

Loài *Aspidistra triradiata* được phát hiện vào năm 2015 tại Việt Nam. Kết quả sàng lọc của nhóm nghiên cứu cho thấy cao methanol và cao *n*-butanol của loài *A. triradiata* có hoạt tính gây độc 4 dòng tế bào: LU-1, HepG2, MCF7 và KB với giá trị IC_{50} 0,93 - 6,96 μ g/ml. Cao *n*-hexan ức chế sản sinh nitric oxid (NO) với giá trị IC_{50} 22,38 μ g/ml. Cho đến thời điểm luận án thực hiện, chưa có công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này. Vì vậy, việc nghiên cứu loài *A. triradiata* ở Việt Nam để tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm có khả năng đạt được những kết quả khả quan, là cơ sở khởi đầu cần thiết cho việc nghiên cứu phát triển thuốc và sản phẩm ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh lý viêm từ nguồn thực vật trong nước. Đó chính là những lý do để đề xuất thực hiện đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học hướng tác dụng kháng viêm và gây độc một số dòng tế bào ung thư *in vitro* của loài *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov ở Việt Nam”.

b. Mục tiêu nghiên cứu

1. Nghiên cứu thành phần hoá học: phân lập, xác định cấu trúc hoá học các hợp chất từ loài *Aspidistra triradiata* theo hướng tác dụng kháng viêm và gây độc một số dòng tế bào ung thư *in vitro*.

2. Nghiên cứu tác dụng sinh học:

2a. Đánh giá tác dụng gây độc một số dòng tế bào ung thư *in vitro* của các cao chiết và các hợp chất phân lập được. Đánh giá tác dụng kích hoạt apoptosis và cảm ứng caspase 3 của các hợp chất có tác dụng gây độc tế bào tiềm năng.

2b. Đánh giá tác dụng kháng viêm *in vitro* của các cao chiết và các hợp chất phân lập được.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là loài *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov được thu hái tại Hương Hóa, Quảng Trị vào tháng 3-7 năm 2020.

Phương pháp nghiên cứu

Về thành phần hoá học: Chiết cao toàn phần bằng phương pháp ngâm chiết với methanol, chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng. Định tính để xác định các nhóm chất hữu cơ chính bằng các phản ứng hoá học đặc trưng. Quá trình phân lập được tiến hành bằng phương pháp sắc ký cột hở với pha tĩnh là silica gel pha thuận, silica gel pha đảo, sephadex LH-20. Xác định cấu trúc hoá học các hợp chất phân lập bằng dữ liệu phổ IR, HR-ESI-MS, phổ NMR một chiều và hai chiều.

Về hoạt tính sinh học: Đánh giá tác dụng gây độc tế bào *in vitro* bằng phương pháp SRB. Đánh giá hoạt tính kích hoạt apoptosis bằng thuốc nhuộm Hoechst 33342, đánh giá tác dụng

cảm ứng caspase 3 bằng phương pháp đo quang. Đánh giá tác dụng kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu

Về thành phần hoá học, luận án đã phân lập được 15 hợp chất lần đầu tiên được báo cáo từ chi *Aspidistra*, trong đó có 5 hợp chất mới (aspidiata A-E). Về tác dụng sinh học, kết quả nghiên cứu là công bố đầu tiên về:

(a) hoạt tính gây độc tế bào ung thư và ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ loài *A. triradiata*;

(b) hoạt tính gây độc tế bào ung thư của 5 chất mới aspidiata A-E và của các chất reclinatosid (7), (25*R*)-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosid (8), cyrtoneosid A (9) và (25*R*)-spirostan-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (11);

(c) tác dụng kích hoạt apoptosis và cảm ứng caspase 3 trên tế bào LU-1 của các chất paris saponin VII (2), aspidiata C (5), và (8);

(d) tác dụng ức chế sản sinh NO của các chất (25*R*)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosid (3), (11) và acid 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyranyl)-2-propenoic (14).

e. Bố cục của luận án

Luận án có 155 trang được trình bày đầy đủ các phần theo quy định, gồm Mở đầu (02 trang), Tổng quan tài liệu (35 trang), Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (14 trang), Kết quả (71 trang), Bàn luận (30 trang), Kết luận (02 trang), Kiến nghị (01 trang). Luận án gồm 31 bảng và 57 hình, 176 tài liệu tham khảo gồm 11

tài liệu tiếng Việt và 165 tài liệu tiếng Anh, 22 phụ lục và 05 bài báo đính kèm công bố các kết quả của quá trình nghiên cứu.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tổng quan về chi *Aspidistra* Ker Gawl.

Chi *Aspidistra* gồm các thực vật thân thảo ở các khu rừng nhiệt đới, cận nhiệt đới ở Châu Á, trong đó nơi có mật độ phân bố cao nhất là miền Đông Nam Trung Quốc và phía Bắc Việt Nam.

2.1.1. Về thành phần hoá học

Hiện tại, trên thế giới chỉ khoảng 4 loài thuộc chi *Aspidistra* được nghiên cứu về thành phần hóa học là *A. elatior*, *A. sichuanensis*, *A. typica* và *A. letreae*. Saponin là nhóm hợp chất chính trong chi với khoảng gần 80 hợp chất đã được phân lập. Phần lớn các saponin phân lập từ chi này có cấu trúc saponin steroid, bao gồm hai khung chính là furostanol và spirostanol. Yamogenin, gentrogenin, aspidistrin, kitigenin, convallagenin-B, pentologenin, neopentologenin được xem là các aglycon chính của saponin steroid trong chi *Aspidistra*. Các loại đường điển hình có trong chi *Aspidistra* là xylose, rhamnose, galactose và glucose. Các chuỗi đường liên kết với phần aglycon chủ yếu tại C-3 đối với nhóm spirostanol; tại C-3 và C-26 đối với nhóm furostanol. Từ các loài *Aspidistra* còn phân lập được một số hợp chất thuộc nhóm coumarin, flavonoid, xanthon, lectin, nhóm phospho hữu cơ...

2.1.2. Về hoạt tính sinh học

Dịch chiết và các hợp chất từ chi *Aspidistra* đã được báo cáo thể hiện các hoạt tính sinh học có giá trị như kháng nấm, kháng virus, kháng khuẩn, gây độc tế bào, kháng viêm và chống oxy hoá.

Hoạt tính kháng viêm

Hợp chất aspidasaponin G và aspidasaponin H phân lập từ thân rễ loài *A. elatior* thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 với giá trị IC_{50} tương ứng là 82,1 và 65,9 μ M.

Hoạt tính gây độc tế bào

Các saponin (25*R*)-26-*O*- β -D-glucopyranosyl-furost-5,20-dien-3 β ,26-diol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranosid và aspidasaponin A phân lập từ thân rễ loài *A. elatior* thể hiện tác dụng gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư A549, Caski, HepG2 và MCF7 với giá trị IC_{50} 3,8 - 13,8 μ M. Typicalvon A, 1 homoisoflavon phân lập từ loài *A. typica*, có khả năng ức chế yếu với các tế bào ung thư HL-60, A549, SMCC-7721, MCF7 và SW-480. Trong nghiên cứu được thực hiện ở Việt Nam, dịch chiết methanol loài *A. letreae* cho thấy khả năng ức chế các dòng tế bào LU-1, HeLa, MDA-MB-231, HepG2 và MKN-7 với giá trị IC_{50} 52,58 - 64,78 μ g/ml. Các hợp chất aspiletrein A-C cũng thể hiện tác dụng gây độc tế bào trên các dòng tế bào này với các giá trị IC_{50} 7,69 - 20,46 μ M.

2.1.3. Công dụng trong Y học cổ truyền

Các loài *Aspidistra* được sử dụng trong Y học cổ truyền ở một số nước châu Á. Thân rễ và lá *A. elatior* có tác dụng lợi tiểu, trị đau lưng, tăng cholesterol máu, suy nhược, chấn thương, sung huyết và rắn cắn. Thân rễ *A. typica* trị gãy xương, sung huyết và rắn cắn; rễ được dùng để giảm đau, giải độc. Một số loài *Aspidistra* được biết đến trong tài liệu Danh lục cây thuốc Việt Nam, dùng làm thuốc bổ, giảm đau, tiêu viêm, chữa ly, sốt rét, phong thấp.

2.2. Tổng quan về loài *Aspidistra triradiata*

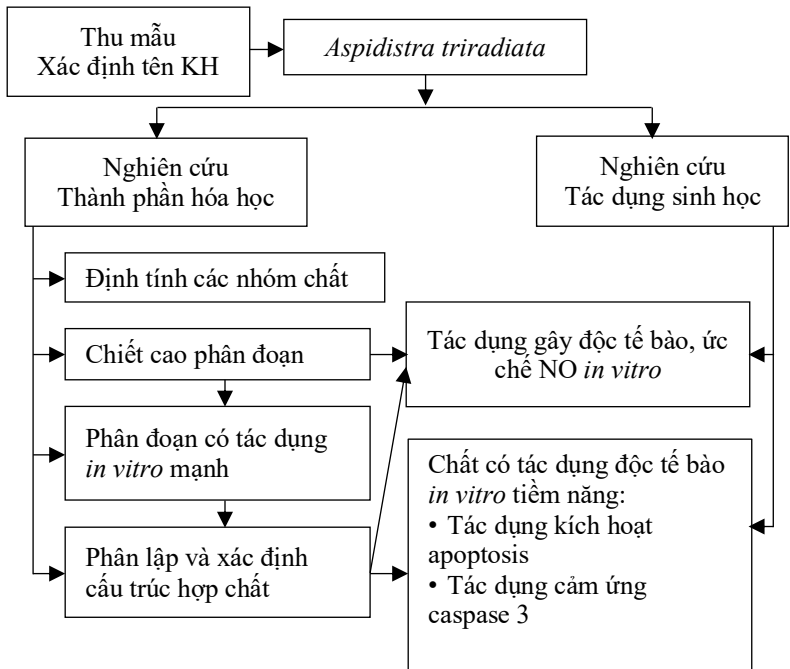
Cho đến thời điểm luận án thực hiện (năm 2020), chưa có công bố về hoá thực vật và hoạt tính sinh học của loài *A. triradiata*.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là loài *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov thu hái tại Hướng Hóa, Quảng Trị vào tháng 3-7 năm 2020.

3.2. Phương pháp nghiên cứu



Hình 3.1. Sơ đồ quy trình thực hiện nghiên cứu của luận án

3.2.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hoá học

Chiết cao toàn phần bằng phương pháp ngâm chiết với methanol, tiến hành chiết 3 đợt, mỗi đợt kéo dài 7 ngày. Chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng với các dung môi *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol. Xác định các nhóm chất hữu cơ chính trong loài nghiên cứu bằng các phản ứng hoá học đặc trưng. Quá trình phân lập được tiến hành bằng các phương pháp sắc ký cột hở với pha tĩnh là silica gel pha thuận, silica gel pha đảo, sephadex LH-20. Xác định cấu trúc hoá học các hợp chất phân lập bằng dữ liệu phổ IR, phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H NMR, ^{13}C NMR) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY).

3.2.3. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính sinh học

3.2.3.1. Phương pháp đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư *in vitro*

Tác dụng gây độc tế bào được đánh giá bằng phương pháp SRB trên các dòng tế bào: LU-1, MCF7, HepG2, KB, HT-29 và HEK-293A. Tế bào được thêm vào đĩa 96 giếng (190 μl) với mật độ phù hợp. Mẫu thử (10 μl) được thêm vào các giếng trên đĩa 96 giếng đã có tế bào để nồng độ cuối trong giếng là 100, 20, 4 và 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Mẫu đối chứng ngày 0 là mẫu không có chất thử nhưng có 190 μl tế bào ung thư và 10 μl DMSO 10 % (nồng độ DMSO trong giếng là 0,5 %). Ellipticin, DMSO 0,5 % được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng ngày 0 được cố định tế bào bằng acid trichloroacetic (TCA) 20 %. Các đĩa thí nghiệm được ủ trong tủ ấm 37 °C trong

72 giờ. Sau đó, tế bào được cố định bằng TCA 20 % trong 1 giờ, nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng acid acetic 1 %, để khô ở nhiệt độ phòng. Dung dịch tris base 10 mM được dùng để hòa tan SRB. Lắc nhẹ mẫu trong 10 phút và sử dụng máy ELISA Plate Reader (Biotek) để đo quang ở 515 nm.

Tỉ lệ % ức chế tế bào được xác định bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = 100 - \frac{OD(\text{chất thử}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(\text{đối chứng âm}) - OD(\text{ngày 0})} \times 100$$

Trong đó OD (chất thử), OD (ngày 0) và OD (đối chứng âm) là mật độ quang trung bình của mẫu thử, mẫu đối chứng ngày 0 và mẫu đối chứng âm DMSO 0,5 %. Phần mềm TableCurve 2Dv4 được sử dụng để xác định giá trị IC₅₀.

3.2.3.2. Phương pháp đánh giá khả năng kích hoạt apoptosis

Hoạt tính kích hoạt apoptosis được xác định bằng phương pháp nhuộm Hoechst 33342. Tế bào LU-1 được cho vào đĩa thí nghiệm với mật độ 5×10^4 tế bào/ml. Pha mẫu tương tự như thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào và cho mẫu thử vào giếng đã có tế bào. Sau 24 giờ ủ mẫu, cố định tế bào bằng formandehyd 4 %. Tế bào được rửa lại bằng PBS sau 30 phút và nhuộm bằng thuốc nhuộm Hoechst 33342 (0,5 µg/ml) trong 10 phút. Quan sát tế bào bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng kích thích cực đại là 350 nm và bước sóng phản xạ cực đại là 461 nm. Camptothecin 1 µM và DMSO 0,5 % được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm. Xác định số lượng tế bào apoptosis trong ít nhất 200 tế bào quan sát được qua kính hiển vi.

3.2.3.3. Phương pháp đánh giá khả năng cảm ứng caspase 3

Tế bào LU-1 được thêm vào đĩa thí nghiệm với mật độ 5×10^4 tế bào/ml. Pha mẫu tương tự như thử nghiệm gây độc tế bào

và cho mẫu thử vào giếng đã có tế bào. Sau 24 giờ ủ mẫu, tế bào được ly giải trong 10 phút. Ly tâm và thu dịch ly giải tế bào. Xác định hàm lượng protein trong dịch ly giải bằng bộ kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Pha loãng protein để được nồng độ 50 µg trong 50 µl dung dịch đệm ly giải. Tiến hành phản ứng trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng gồm: 50 µl dịch ly giải tế bào đã pha loãng, 50 µl dung dịch phản ứng 2X có chứa 10 mM DTT và 5 µl cơ chất DEVD-pNA 4 mM. Ủ đĩa phản ứng ở 37 °C trong 1 giờ. Camptothecin 0,5 µM, DMSO 0,5 % và đệm ly giải được sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm và mẫu trắng. Sử dụng máy ELISA Plate Reader (Biotek) để đọc kết quả ở 405 nm.

3.2.3.4. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO

Tế bào RAW 264.7 được cho vào đĩa 96 giếng với nồng độ 2×10^5 tế bào/ml và nuôi cấy ở điều kiện thích hợp. Mẫu thử (10 µl) được thêm vào các giếng trên đĩa 96 giếng đã có tế bào để có nồng độ cuối trong giếng là 100, 20, 4 và 0,8 µg/ml. Tế bào được ủ mẫu trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh NO bằng 10 µl LPS (10 µg/ml) trong 24 giờ. 100 µl môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang khay 96 giếng mới và được thêm vào 100 µl thuốc thử Griess. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hàm lượng nitrit được đo bằng máy microplate reader ở 540 nm. Khả năng ức chế sản sinh NO được xác định bằng công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{(\text{mẫu thử})} / \text{hàm lượng NO}_{(\text{chứng âm})}] \times 100$$

Giá trị IC₅₀ được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4. L-NMMA, DMSO 0,5 % và môi trường DMEM không có FBS được

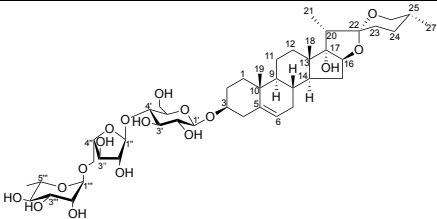
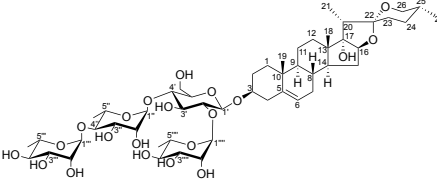
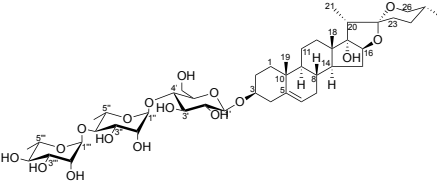
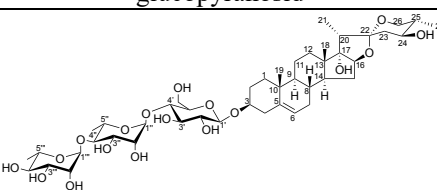
sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm và mẫu trắng. Hoạt tính ức chế sản sinh NO được đánh giá đồng thời với việc xác định khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp MTT.

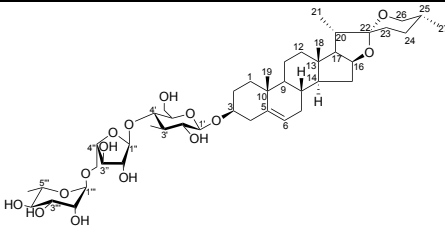
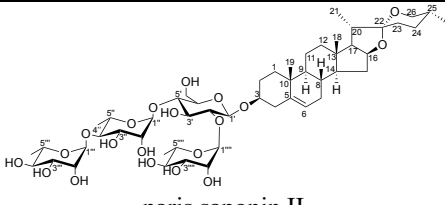
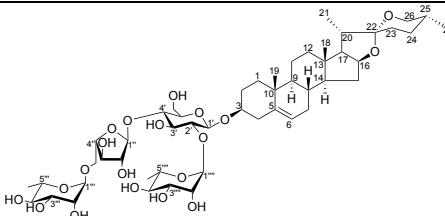
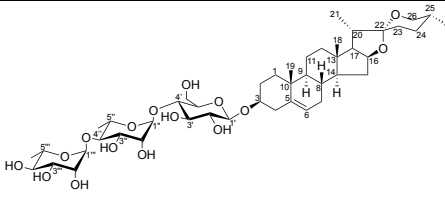
4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

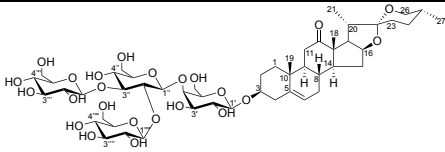
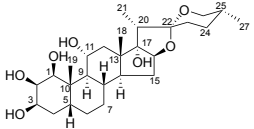
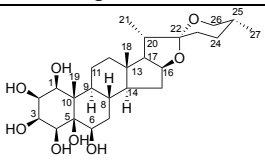
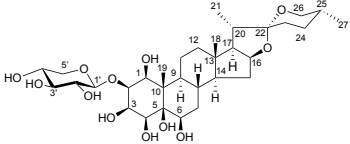
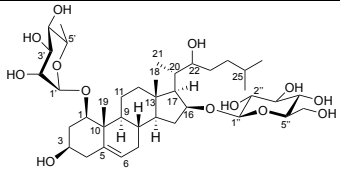
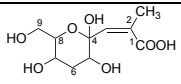
4.1. Kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học

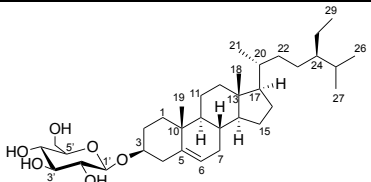
Qua các phản ứng định tính đã xác định trong loài *A. triradiata* có saponin, chất béo, steroid, acid hữu cơ và đường khử. Quá trình chiết xuất từ 3,31 kg bột loài nghiên cứu thu được 550 g cao methanol. Cao toàn phần này được chiết xuất phân đoạn thu được 21,0 g cao *n*-hexan, 92,0 g cao ethyl acetat, 201,2 g cao *n*-butanol và 203,4 g cao phân đoạn nước. Cao *n*-butanol và ethyl acetat thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt hơn các phân đoạn còn lại (giá trị IC_{50} 0,93 - 60,64 μ g/ml), đặc biệt cao *n*-butanol có hoạt tính mạnh, nên hai phân đoạn này được lựa chọn để phân lập các chất tinh khiết. Cao *n*-hexan thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} 22,38 μ g/ml. Tuy nhiên khi tiến hành phân lập hợp chất từ phân đoạn *n*-hexan, đề tài gặp nhiều khó khăn do phân đoạn này có khối lượng ít, chứa ít hợp chất, lại chứa chủ yếu là chlorophyll, nên đề tài đã phân lập được các hợp chất từ phân đoạn *n*-butanol và ethyl acetat. Từ loài *A. triradiata* luận án đã phân lập được 15 hợp chất, bao gồm 11 saponin, 2 spirostanol, 1 dẫn xuất acid propenoic và 1 steroid, trong đó có 6 hợp chất phân lập từ phân đoạn ethyl acetat (chất **3**, **10**, **11**, **13**, **14** và **15**) và 9 hợp chất phân lập từ phân đoạn *n*-butanol (chất **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** và **12**). Tất cả 15 hợp chất đều lần đầu tiên phân lập từ chi *Aspidistra*, trong đó có 5 hợp chất mới (*aspidiata* A-E, là các chất **1**, **4**, **5**, **10** và **12**).

Bảng 4.1. Các hợp chất phân lập từ loài *Aspidistra triradiata*

Ký hiệu	CTCT – Tên chất	Khối lượng (mg)	Ghi chú
1	 aspidiata B	13,6	Mới
2	 paris saponin VII	38,5	Lần đầu phân lập từ chi
3	 (25<i>R</i>)-17α-hydroxy-spirost-5-en-3β-yl α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosid	25,5	Lần đầu phân lập từ chi
4	 aspidiata D	15,5	Mới

5	 aspidiata C	21,0	Mới
6	 paris saponin II	7,0	Lần đầu phân lập từ chi
7	 reclinatosid	39,0	Lần đầu phân lập từ chi
8	 (25<i>R</i>)-spirost-5-en-3β-yl α-L-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$4)-β-D-glucopyranosid	20,0	Lần đầu phân lập từ chi

9	 cyrtanemosid A	8,0	Lần đầu phân lập từ chi
10	 aspidiata A	12,5	Mới
11	 (25<i>R</i>)-spirostan-1β,2β,3β,4β,5β,6β-hexol	20,0	Lần đầu phân lập từ chi
12	 aspidiata E	11,0	Mới
13	 16-[(β-D-glucopyranosyl)oxy]-1β,3β,22-trihydroxycholest-5-en-1β-yl α-L-rhamnopyranosid	19,0	Lần đầu phân lập từ chi
14	 acid 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyranyl)-2-propenoic	21,8	Lần đầu phân lập từ chi

15	 daucosterol	21,6	Lần đầu phân lập từ chi
----	--	------	-------------------------

4.2. Kết quả nghiên cứu về hoạt tính sinh học

4.2.1. Tác dụng gây độc tế bào ung thư *in vitro*

Bảng 4.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các cao chiết

Dòng tế bào	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Cao methanol	Cao <i>n</i> -hexan	Cao ethyl acetat
LU-1	5,25 ± 0,27	61,51 ± 3,76	46,63 ± 1,01
HepG2	5,81 ± 0,23	61,25 ± 5,50	60,64 ± 4,86
MCF7	4,64 ± 0,56	57,98 ± 1,69	56,49 ± 1,57
KB	6,96 ± 0,32	68,82 ± 2,02	58,66 ± 3,20
HEK-293A	7,65 ± 0,66	53,35 ± 5,03	43,98 ± 3,61
	Cao <i>n</i> -butanol	Cao nước	Ellipticin ^a
LU-1	0,93 ± 0,05	>100	0,38 ± 0,04
HepG2	1,06 ± 0,12	>100	0,33 ± 0,04
MCF7	1,17 ± 0,17	>100	0,37 ± 0,04
KB	1,26 ± 0,11	>100	0,41 ± 0,05
HEK-293A	6,78 ± 1,18	>100	0,27 ± 0,02

a: Đối chứng dương

Trong các phân đoạn, cao methanol và cao *n*-butanol thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh với giá trị IC₅₀ 0,93 - 6,96 µg/ml. Cao *n*-hexan và ethyl acetat thể hiện hoạt tính ở mức độ trung bình, với giá trị IC₅₀ 43,98 - 68,82 µg/ml. Cao *n*-butanol thể hiện hoạt tính chọn lọc trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm, với hệ số SI (=IC₅₀ trên tế bào thường/IC₅₀ trên tế bào ung thư) trong khoảng 5,4 - 7,3.

Bảng 4.3. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập

Dòng tế bào	IC ₅₀ (μM)			
	1	2	3	10
LU-1	>100	0,59 ± 0,06	>100	>100
HepG2	>100	0,57 ± 0,05	>100	>100
MCF7	>100	0,93 ± 0,09	>100	>100
KB	>100	1,23 ± 0,18	>100	>100
HEK-293A	-	1,23 ± 0,20	-	-
	11	13	14	
LU-1	95,81 ± 5,32	>100	>100	
HepG2	>100	>100	>100	
MCF7	>100	>100	>100	
KB	>100	>100	>100	
HEK-293A	110,78 ± 7,44	-	-	
	4	5	6	7
LU-1	>100	16,29 ± 0,63	0,65 ± 0,04	0,57 ± 0,02
HepG2	74,13 ± 4,20	12,32 ± 1,11	0,63 ± 0,03	0,81 ± 0,07
MCF7	>100	13,72 ± 0,99	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,05
HT-29	82,27 ± 3,82	16,69 ± 0,77	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,02
HEK-293A	60,10 ± 6,62	13,39 ± 0,36	0,19 ± 0,01	0,84 ± 0,04
	8	9	12	Ellipticin ^a
LU-1	38,51 ± 0,05	56,38 ± 1,29	>100	1,54 ± 0,16
HepG2	36,33 ± 1,44	64,77 ± 1,41	68,85 ± 5,36	1,34 ± 0,16
MCF7	40,55 ± 1,20	55,72 ± 2,17	83,30 ± 3,59	1,50 ± 0,16
HT-29	39,98 ± 1,98	53,99 ± 2,09	84,19 ± 5,61	1,34 ± 0,08
KB				1,66 ± 0,20
HEK-293A	33,41 ± 1,88	47,71 ± 2,72	83,56 ± 3,48	1,10 ± 0,08

a: Đối chứng dương, -: Không xác định

Kết quả cho thấy có 9 trong số 14 hợp chất thử nghiệm thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào thử nghiệm

với các giá trị IC_{50} 0,28 - 95,81 μM . Trong đó, 3 saponin **2**, **6** và **7** thể hiện tác dụng mạnh với giá trị IC_{50} 0,28 - 1,23 μM , tác dụng gây độc tế bào của 3 saponin này mạnh hơn so với đối chứng dương ellipticin. Hợp chất mới aspidiata C (**5**) thể hiện tác dụng khá tốt trên các dòng tế bào thử nghiệm với IC_{50} 12,32 - 16,69 μM . Các hợp chất **4**, **8**, **9** và **12** cho thấy tác dụng trung bình với giá trị IC_{50} 36,33 - 95,81 μM . Các hợp chất **1**, **3**, **10**, **13** và **14** không thể hiện hoạt tính trên các dòng tế bào thử nghiệm. Đối với kết quả hoạt tính trên tế bào thường HEK-293A, hợp chất **2** thể hiện tác dụng chọn lọc trên dòng tế bào LU-1 và HepG2 so với tế bào thường HEK-293A với hệ số SI trong khoảng 2,1 - 2,2, hợp chất **7** thể hiện tác dụng chọn lọc trên tế bào MCF7 và HT-29 với hệ số SI trong khoảng 2,3 - 3,0.

4.2.2. Tác dụng kích hoạt apoptosis và cảm ứng caspase 3

4.2.2.1. Hoạt tính kích hoạt apoptosis bằng phương pháp nhuộm Hoechst 33342

Bảng 4.4. Kết quả đánh giá hoạt tính kích hoạt apoptosis bằng phương pháp nhuộm Hoechst 33342

	Nồng độ thử	% Tế bào apoptosis
Hợp chất 2	0,30 μM	6,12 $\pm$ 0,84
	0,59 μM	10,77 $\pm$ 0,94
	1,18 μM	15,26 $\pm$ 1,78
Hợp chất 5	8,15 μM	5,63 $\pm$ 0,74
	16,29 μM	6,51 $\pm$ 0,87
	32,58 μM	15,48 $\pm$ 1,82
Hợp chất 7	0,29 μM	3,59 $\pm$ 0,59
	0,57 μM	5,94 $\pm$ 0,77

	1,14 μM	$6,88 \pm 0,81$
Hợp chất 8	19,26 μM	$15,94 \pm 2,12$
	38,51 μM	$20,25 \pm 3,62$
	77,02 μM	$25,02 \pm 2,51$
Camptothecin	1 μM	$37,62 \pm 4,95$
DMSO	0,5 %	$5,22 \pm 0,72$

Hợp chất **2**, **5** và **8** thể hiện hoạt tính kích hoạt apoptosis, gây ra sự cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào lần lượt với tỉ lệ từ 6,12 % đến 15,26 %, 5,63 % đến 15,48 % và từ 15,94 % đến 25,02 %, đều cao hơn so với đối chứng âm (5,22 %). Hợp chất **7** chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm.

4.2.2.2. Hoạt tính cảm ứng caspase 3

Bảng 4.5. Kết quả đánh giá hoạt tính cảm ứng caspase 3

	Nồng độ thử	% Tế bào apoptosis	SD
Hợp chất 2	0,30 μM	1,17	0,11
	0,59 μM	1,39	0,13
	1,18 μM	1,43*	0,19
Hợp chất 5	8,15 μM	1,13	0,12
	16,29 μM	1,18	0,15
	32,58 μM	1,43*	0,18
Hợp chất 7	0,29 μM	0,83	0,12
	0,57 μM	0,85	0,14
	1,14 μM	0,88	0,15
Hợp chất 8	19,26 μM	1,45*	0,14
	38,51 μM	1,86*	0,19
	77,02 μM	2,62**	0,28
Camptothecin	0,5 μM	2,56**	0,38
DMSO	0,5 %	1,00	0,12

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với đối chứng âm

Hợp chất **2** và **5** cho thấy hoạt tính cảm ứng caspase 3 tăng dần theo nồng độ và ở mức nồng độ thử nghiệm cao nhất (lần

lượt là 1,18 μM và 32,58 μM), hoạt tính caspase 3 đều tăng 1,43 lần và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng âm. Hợp chất **8** cho thấy hoạt tính mạnh: ở nồng độ 77,02 μM , hoạt tính caspase 3 tăng 2,62 lần và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với đối chứng âm. Hợp chất **7** chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm.

4.2.3. Tác dụng kháng viêm

Bảng 4.6. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết

Mẫu nghiên cứu	IC ₅₀ $\pm$ SD ($\mu\text{g/ml}$)
Cao methanol	-
Cao <i>n</i> -hexan	22,38 $\pm$ 0,83
Cao ethyl acetat	-
Cao <i>n</i> -butanol	-
Cao nước	>100
L-NMMA ^a	8,94 $\pm$ 0,66

a: Đối chứng dương, - : Không có hoạt tính

Cao *n*-hexan thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ 22,38 $\pm$ 0,83 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó, các mẫu cao còn lại chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm.

Bảng 4.7. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập

Hợp chất	IC ₅₀ $\pm$ SD (μM)
1	-
2	-
3	95,38 $\pm$ 2,41
4	-
5	-

7	-
8	-
9	-
10	-
11	120,57 ± 9,73
12	-
13	>100
14	399,03 ± 17,74
L-NMMA^a	47,48 ± 3,51

a: Đối chứng dương, - : Không có hoạt tính

Các hợp chất **3**, **11** và **14** ức chế sản sinh NO với giá trị IC₅₀ 95,38 - 399,03 µM. Các hợp chất còn lại chưa thể hiện hoạt tính.

5. BÀN LUẬN

5.1. Về thành phần hoá học

5.1.1. Kết quả chiết xuất và phân lập

Từ loài *A. triradiata*, luận án đã phân lập và xác định cấu trúc 15 hợp chất, trong đó, 5 hợp chất **1**, **4**, **5**, **10** và **12** là các hợp chất mới (*Aspidiata* A-E); 15 hợp chất đều lần đầu tiên phân lập từ chi *Aspidistra*. Các kết quả phân lập góp phần bổ sung dữ liệu cho ngành hoá học các hợp chất tự nhiên cũng như dữ liệu về hoá thực vật của chi *Aspidistra* và loài *A. triradiata*.

Trong các hợp chất phân lập được có 11 saponin (hợp chất **1** - **9**, **12** và **13**), 2 spirostanol (hợp chất **10** và **11**), 1 dẫn xuất acid propenoic (hợp chất **14**) và 1 steroid (hợp chất **15**). Như vậy, đa số các hợp chất phân lập được thuộc nhóm saponin. Trong đó có 10 saponin có cấu trúc thuộc nhóm spirostanol, 1 saponin có phần aglycon cấu trúc cholest-5-en. Điều này cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy saponin steroid là

nhóm chất chính của chi *Aspidistra* với gần 80 saponin đã được phân lập. Trong 11 saponin đã phân lập có 9 saponin được phân lập từ phân đoạn *n*-butanol, hầu hết là các saponin có độ phân cực lớn với chuỗi đường gồm 3-4 đơn vị đường; có 2 saponin (**3** và **13**) được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat với chuỗi đường lần lượt gồm 3 và 2 đơn vị đường. Trong 10 saponin khung spirostanol có 3 hợp chất phần aglycon có cấu trúc khung pennnogenin (chất **1-3**) và 4 hợp chất có cấu trúc khung diosgenin (chất **5-8**). Đối chiếu với tổng quan tài liệu, trong 27 saponin/sapogenin khung spirostanol từ chi *Aspidistra* chỉ có 1 saponin có khung diosgenin (hợp chất aspidistrin), còn lại là các khung cấu trúc khác. Như vậy kết quả phân lập của đề tài đã góp phần phát hiện các saponin khung diosgenin và khung pennnogenin bổ sung cho hoá thực vật của chi *Aspidistra*.

5.1.2. Định hướng của quá trình phân lập theo tác dụng gây độc tế bào ung thư

Theo kết quả sàng lọc tác dụng gây độc tế bào, hai phân đoạn thể hiện tác dụng tốt là cao *n*-butanol và cao ethyl acetat, trong đó cao *n*-butanol có hoạt tính mạnh với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,93 - 1,26 µg/ml. Vì vậy cao *n*-butanol và ethyl acetat được lựa chọn để phân lập các hợp chất tinh khiết. Trong 14 hợp chất tinh khiết được đánh giá tác dụng gây độc tế bào *in vitro*, có 9 hợp chất thể hiện hoạt tính từ trung bình đến mạnh. Trong đó có 8 hợp chất (hợp chất **2, 4, 5, 6, 7, 8, 9** và **12**) bao gồm 3 hợp chất có hoạt tính mạnh nhất (hợp chất **2, 6** và **7**) đều được phân lập từ phân đoạn *n*-butanol. Như vậy, đề tài cho thấy sự logic của thiết kế nghiên cứu, từ phân đoạn có tác dụng gây độc tế bào *in vitro*

tốt nhất đã phân lập được phần lớn hợp chất cho hoạt tính gây độc tế bào. Đồng thời tất cả 9 hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào đều có cấu trúc saponin/sapogenin steroid.

5.2. Về tác dụng gây độc tế bào ung thư

Các kết quả của luận án là công bố đầu tiên về hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết methanol, *n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol và nước; của 5 hợp chất mới aspidiata A-E và của các chất **7**, **8**, **9**, **11** được phân lập từ loài *A. triradiata* trên các dòng tế bào LU-1, HepG2, MCF7, HT-29 và HEK-293A. Trong đó, cao methanol và cao *n*-butanol thể hiện hoạt tính mạnh với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,93 đến 6,96 µg/ml; 3 saponin paris saponin VII (**2**), paris saponin II (**6**) và reclinatosid (**7**) thể hiện tác dụng mạnh với giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,28 đến 1,23 µM. Vì vậy có thể đề xuất thực hiện các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng gây độc tế bào đối với cao *n*-butanol cũng như một số chất phân lập được có tác dụng mạnh.

Xét về khía cạnh liên quan cấu trúc - tác dụng gây độc tế bào của các chất phân lập, có thể thấy rằng tác dụng gây độc tế bào của các saponin này phụ thuộc vào cả 2 yếu tố chính: cấu trúc của phần aglycon và đặc biệt là cấu trúc của chuỗi đường. Trong đó, các chuỗi đường có cấu trúc đa dạng, chỉ cần một thay đổi nhỏ trong cấu trúc sẽ tạo ra sự khác nhau về tác dụng gây độc tế bào ung thư. Kết quả của đề tài cũng đã đóng góp các dữ liệu về mối liên quan cấu trúc - tác dụng gây độc tế bào của các saponin khung spirostanol.

5.3. Về tác dụng kích hoạt apoptosis và cảm ứng caspase 3

Thử nghiệm kích hoạt apoptosis nhằm xác định mẫu thử có gây độc tế bào ung thư bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương

trình hay không. Từ kết quả thu được có thể thấy hợp chất **7** có hoạt tính gây độc tế bào LU-1 mạnh nhưng không gây chết tế bào theo chương trình, hợp chất **8** có hoạt tính gây độc tế bào LU-1 yếu hơn hợp chất **2** và **5** nhưng lại kích hoạt apoptosis mạnh hơn hai hợp chất này. Đồng thời có thể sơ bộ kết luận hợp chất **8** gây độc tế bào LU-1 chủ yếu bằng cơ chế apoptosis. Thử nghiệm hoạt tính cảm ứng caspase 3 góp phần cung cấp thông tin về cơ chế của quá trình apoptosis. Từ kết quả nghiên cứu có thể thấy hợp chất **2** và **5** có hoạt tính cảm ứng caspase 3 mức độ trung bình, trong khi đó hợp chất **8** kích hoạt apoptosis trên tế bào LU-1 chủ yếu theo cơ chế cảm ứng caspase 3.

5.4. Về tác dụng kháng viêm

Kết quả cho thấy cao *n*-hexan thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} 22,38 μ g/ml. 3 hợp chất **3**, **11** và **14** ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} lần lượt là 95,38, 120,57 và 399,03 μ M. Trên thực tế, một trong những nhóm thuốc kháng viêm được sử dụng phổ biến nhất trên lâm sàng là nhóm các corticosteroid. Các corticosteroid đều có cấu trúc hoá học khung steroid, bao gồm 3 vòng cyclohexan và 1 vòng cyclopentan. Hai hợp chất **3** và **11** là các saponin và sapogenin steroid, đều mang cấu trúc khung steroid, vì vậy về mặt liên quan cấu trúc - tác dụng kháng viêm, có thể lý giải hoạt tính kháng viêm của hai hợp chất này là do khung cấu trúc steroid của chúng mang lại.

Như vậy, luận án đã đóng góp những điểm mới quan trọng về thành phần hóa học, tác dụng gây độc tế bào, kích hoạt apoptosis, cảm ứng caspase 3 và kháng viêm của các cao chiết và hợp chất phân lập từ loài *A. triradiata*. Những kết quả đạt được góp phần

định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên tiềm năng trong nghiên cứu phát triển thuốc và sản phẩm điều trị bệnh ung thư từ loài *A. triradiata*.

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

6.1. Về thành phần hoá học

Đã phân lập và xác định cấu trúc hoá học của 15 hợp chất từ loài *A. triradiata* gồm: 11 saponin, 2 spirostanol, 1 dẫn xuất acid propenoic và 1 steroid. 15 hợp chất phân lập được đều lần đầu tiên được công bố từ chi *Aspidistra*, trong đó có 5 hợp chất mới: Aspidiata A-E. Đã xác định các nhóm hợp chất có trong loài *A. triradiata* bao gồm: saponin, chất béo, steroid, acid hữu cơ và đường khử.

6.2. Về hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro*

Cao toàn phần methanol, cao *n*-butanol, cao *n*-hexan và ethyl acetat có khả năng gây độc các dòng tế bào LU-1, MCF7, HepG2 và KB với giá trị IC_{50} 0,93 - 68,82 $\mu\text{g/ml}$. Các hợp chất paris saponin VII (2), paris saponin II (6) và reclinosid (7) thể hiện tác dụng gây độc tế bào mạnh với giá trị IC_{50} 0,28 - 1,23 μM ; các hợp chất aspidiata D (4), aspidiata C (5), (25*R*)-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosid (8), cyrtomosid A (9), (25*R*)-spirostan-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (11) và aspidiata E (12) thể hiện tác dụng trung bình với giá trị IC_{50} 12,32 - 95,81 μM trên 5 dòng tế bào LU-1, MCF7, HepG2, KB và HT-29.

6.3. Về tác dụng kích hoạt apoptosis và cảm ứng caspase 3

Hợp chất (2), (5) và (8) thể hiện hoạt tính apoptosis trên tế bào LU-1, gây ra sự cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào lần lượt với tỉ lệ 6,12 % - 15,26 %, 5,63 % - 15,48 % và 15,94 % - 25,02 %. Trên dòng tế bào LU-1, hợp chất (2) ở nồng độ 1,18 μM , hợp chất (5) ở nồng độ 32,58 μM có khả năng cảm ứng caspase 3 tăng 1,43 lần và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng âm; hợp chất (8) ở nồng độ 77,02 μM có khả năng cảm ứng caspase 3 tăng 2,62 lần và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với đối chứng âm.

6.4. Về hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Cao *n*-hexan ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} 22,38 $\mu\text{g/ml}$. Các hợp chất (25*R*)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosid (3), (25*R*)-spirostan-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (11) và acid 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyran-2-yl)-2-propenoic (14) ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} 95,38; 120,57 và 399,03 μM .

Kiến nghị

- Tiếp tục phân lập các hợp chất khác và xác định hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được.
- Tiếp tục nghiên cứu về cơ chế tác dụng gây độc tế bào ung thư của các hợp chất có hoạt tính *in vitro* tốt.
- Chiết xuất nguyên liệu nhiều hơn để có thể phân lập các hợp chất trong phân đoạn *n*-hexan có hoạt tính kháng viêm.
- Đánh giá hoạt tính khác của các saponin phân lập được như hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn.
- Nghiên cứu tác dụng chống ung thư *in vivo* của cao chiết phân đoạn *n*-butanol từ loài *Aspidistra triradiata*.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Hien Bich Thi Le**, Duc Viet Ho, Hien Minh Nguyen, Anh Tuan Le, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen. A new spirostanol steroid and a new spirostanol steroidal saponin from *Aspidistra triradiata* and their cytotoxic activities. *Natural Product Research*. 2023; 37(21): 3595-3604. doi: 10.1080/14786419.2022.2095635

2. **Hien Bich Thi Le**, Van Anh Thi Tran, Hien Minh Nguyen, Linh Thuy Khanh Nguyen, Duc Viet Ho and Hoai Thi Nguyen. Aspidiata E, a New Spirostanol Saponin from *Aspidistra triradiata* and its Cytotoxic Activity. *Natural Product Communications*. 2023; 18(6): 1-7. doi: 10.1177/1934578X231179412

3. **Hien Bich Thi Le**, Duc Viet Ho, Hien Minh Nguyen, Van Anh Thi Tran, Hoai Thi Nguyen. Aspidiata C and D, two new spirostanol saponins from *Aspidistra triradiata* and their cytotoxic activities. *Natural Product Research*. 2024; 38(5): 829-937. doi: 10.1080/14786419.2023.2204432

4. **Lê Thị Bích Hiền**, Hồ Việt Đức, Trần Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Hoài. Hoạt tính kháng viêm và ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ cây tỏi đá ba tia (*Aspidistra triradiata* N. Vislobokov). *Tạp chí Y Dược học*. 2023; 13(3): 13-21. doi: 10.34071/jmp.2023.3.2

5. **Lê Thị Bích Hiền**, Đoàn Quốc Tuấn, Trần Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Hoài. Thành phần hoá học tinh dầu, hoạt tính ức chế tế bào ung thư và kháng viêm của loài *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov. *Tạp chí Y Dược Huế*. 2024; Số đặc biệt 6/2024: 13-19.