

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CÁC CHẤT CHIẾT TỪ THÂN CÂY XẠ ĐEN (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor)

Vũ Thị Nguyệt¹, Nguyễn Tiên Đạt², Lê Mai Hương³, Trần Thị Hồng Hà³,
Nguyễn Hồng Chuyên¹, Nguyễn Thị Hằng⁴, Đặng Đình Kim*¹

¹Viện Công nghệ Môi trường, VAST, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, VAST, Việt Nam

³Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, VAST, Việt Nam

⁴Viện Di truyền Nông nghiệp, Việt Nam

TÓM TẮT: Bài báo đề cập đến việc đánh giá khả năng gây độc lên một số dòng tế bào ung thư của cao chiết và của một số chất phân lập được từ thân cây Xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mort. Các cao chiết phân đoạn của thân cây xạ đen đều thể hiện hoạt tính với ít nhất một dòng tế bào ung thư. Cao chiết phân đoạn *n*-hexan thể hiện hoạt tính với 3 dòng tế bào ung thư là ung thư gan (Hep-G2), ung thư vú (MCF-7) và ung thư cổ tử cung (HeLa) với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 28,3 µg/ml, 14,42 µg/ml và 18,59 µg/ml. Cao chiết phân đoạn MeOH, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn H₂O chỉ có hoạt tính với dòng tế bào MCF-7 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 16,45 µg/ml, 13,4 µg/ml và 39,78 µg/ml. Đã phân lập được 6 chất sạch từ thân cây xạ đen, bao gồm daucosterol, coniferaldehyde, methyl caffeate, 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol, oresbiasin B và axit vanillic. Chất methyl caffeate thể hiện hoạt tính đối với các dòng tế bào Hep-G2, HeLa và MCF-7 với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 2,83 µg/ml, 3,38 µg/ml và 4,4 µg/ml. Chất oresbiasin B chỉ thể hiện hoạt tính với dòng tế bào Hep G2 với giá trị IC₅₀ là 9,89 µg/ml. Ba chất còn lại coniferaldehyde, 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol và axit vanillic không có khả năng gây độc trên các dòng tế bào ung thư này. Kết quả thu nhận được cho thấy việc sử dụng các cao chiết tiềm năng của xạ đen thu từ Hòa Bình làm thực phẩm chức năng trong việc phòng và hỗ trợ điều trị ung thư là khả thi và có triển vọng.

Từ khóa: Xạ đen, methyl caffeate, oresbiasin B, hoạt tính gây độc, tế bào ung thư.

MỞ ĐẦU

Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mort) là cây dược liệu quý của tỉnh Hoà Bình, được sử dụng để điều trị và hỗ trợ điều trị nhiều bệnh như ung thư, gan, viêm nhiễm. Mặc dù được biết đến và sử dụng khá rộng rãi trong khoảng 15 năm trở lại đây nhưng các công trình nghiên cứu về thành phần hoá học của cây xạ đen còn rất ít và chưa có hệ thống. Một số công bố khoa học đáng chú ý về cây xạ đen có thể kể đến là công trình nghiên cứu của Lê Thế Trung và nnk., (2016, 2017) về tác dụng hạn chế phát triển của khối u ác tính trên động vật thực nghiệm của cây xạ đen thu hái tại Hoà Bình. Lê Thị Huyền và nnk., (2008) đã phân lập được 3 hợp chất từ cây xạ đen thu mua tại Hoà Bình. Tuy nhiên thử nghiệm cho thấy cả 3 hợp chất này không có tác dụng diệt tế bào ung thư phổi Lu và ung thư gan Hep-G2. Kuo & Kuo (1997) đã phân lập được 4 hợp chất triterpene mới là celasdin-A, celasdin-C, celasdin-B và maytenfolone-A từ mẫu cây xạ đen. Trong đó,

hợp chất celasdin-B được xác định là có hoạt tính kháng virus HIV-AIDS ở các tế bào bạch cầu H9 với giá trị EC₅₀ là 0,8 µg/mL và chất maytenfolone-A có hoạt tính gây độc tế bào dòng tế bào ung thư gan (HEPA-2B) và ung thư biểu mô (KB) với các giá trị EC₅₀ lần lượt là 2,3 và 3,8 µg/mL (Kuo & Kuo, 1997). Năm 2006, các nhà khoa học tại trường Đại học Gifu, Nhật Bản đã nghiên cứu thành phần hoá học của cây xạ đen thu hái tại Hà Nội, theo đó 8 hợp chất phenolic đã được xác định từ lá xạ đen đều có tác dụng chống oxi hoá khá tốt (Ly et al., 2006). Gần đây nhất nghiên cứu của các nhà khoa học tại Thượng Hải cho thấy thân cây xạ đen có chứa các chất diphenylpropane và macrocyclic lactone, quinoflavan. Các hợp chất này có tác dụng gây độc tế bào trung bình và yếu trên dòng tế bào ung thư phổi, ruột kết, gan và vú (Hu et al., 2014).

Các nghiên cứu trên đóng góp nhiều thông tin quan trọng để làm rõ giá trị của cây xạ đen.

Tuy nhiên, cần chứng minh cụ thể thành phần hoá học nào là quan trọng, quyết định đến tác dụng dược lý chính của cây này (ví dụ tác dụng chữa ung thư). Theo hướng nghiên cứu mối quan hệ giữa tác dụng dược học của thực vật và các hoạt chất chứa trong đó, bài báo này trình bày một số kết quả thử hoạt tính của các chất chiết từ thân cây xạ đen với các dòng tế bào ung thư gan, ung thư phổi, ung thư cổ tử cung và ung thư vú. Đây là bốn loại ung thư có tỉ lệ cao ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mort) thuộc họ Vòi voi (Borraginaceae) được thu tại xã Thượng Tiến, huyện Kim Bôi, tỉnh Hòa Bình vào tháng 9/2016. Mẫu xạ đen được PGS. TS. Vũ Xuân Phương, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định. Các tiêu bản đã được chụp ảnh và lưu giữ tại phòng Tiêu bản thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

Các dòng tế bào ung thư được cung cấp từ phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên gồm: Hep-G2 (tế bào ung thư gan người), Lu (tế bào ung thư phổi), Hela (tế bào ung thư tử cung) và MCF7 (tế bào ung thư vú).

Phương pháp tách chiết và phân lập chất từ thân cây xạ đen

Mẫu sau khi thu hái được xử lý loại tạp chất, thái nhỏ rồi phơi khô trong bóng râm hoặc sấy ở nhiệt độ 50–60°C đến khi khô giòn. Tiếp đó mẫu được xay nhỏ thành bột và ngâm chiết với dung môi thích hợp để thu cao chiết tổng. Cao chiết tổng sau đó được chiết phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau như *n*-hexan, clorofoc hay ethyl axetat để thu các cao chiết phân đoạn. Việc cất loại dung môi được tiến hành ở nhiệt độ không quá 60°C để đảm bảo thành phần hoá học không bị phân huỷ bởi nhiệt.

Phân lập các chất tinh khiết bằng các phương pháp sắc ký kết hợp gồm:

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel DC-Alufohlen 60 F254 và RP-18 F254. Phát hiện vết chất bằng đèn UV ở hai bước sóng 254 và 368 nm, và phun H₂SO₄ 10% lên bản mỏng rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột pha thường (silica gel 230–400 mesh, Merck), pha đảo (RP-18, YMC ODS),

nhựa trao đổi ion (Dianion HP20) hoặc hấp phụ cỡ hạt (Sephadex LH20).

Xác định cấu trúc các chất phân lập được bằng các phương pháp phổ hiện đại bao gồm phổ hấp thụ hồng ngoại (IR), tử ngoại (UV), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một và hai chiều (1D và 2D-NMR), phổ khối thường (MS) và phổ khối phân giải cao (HR MS).

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Tế bào ung thư *in vitro* được nuôi cấy theo phương pháp của Skehan et al., (1991). Hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư được xác định theo phương pháp SRB Likhiwitayawuid et al., (1993) đang được tiến hành tại Viện nghiên cứu Ung thư Quốc gia của Hoa Kỳ (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. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*. Phản ứng dựa vào khả năng SRB gắn vào protein của tế bào đã được cố định bởi trichloroacetic acid (TCA). SRB là chất nhuộm aminoxanthene hồng nhạt với 2 nhóm sulfonic tác dụng gắn với các chất chứa amino acid cơ bản trong điều kiện axit nhẹ và tách ra trong điều kiện kiềm. Lượng chất màu tách ra từ tế bào được nhuộm tương ứng với khối lượng tế bào. Phép xác định gồm hai bước: bước 1: Sàng lọc tìm các mẫu thử có hoạt tính; bước 2: Tìm giá trị IC₅₀, nồng độ ức chế được tính theo chương trình Table curve.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư của các cao chiết phân đoạn từ thân cây xạ đen

Mẫu thân cây xạ đen được thái nhỏ, phơi khô và nghiền nhỏ (5 kg), sau đó được ngâm chiết 3 lần với MeOH. Dịch chiết sau đó được cô đặc bằng máy cất quay dưới áp suất giảm thu được 365g cặn chiết MeOH. Cặn này được hòa vào nước (3 L) và chiết lần lượt bằng *n*-hexan và ethyl axetat (mỗi dung môi 1 L × 3) thu được các cặn *n*-hexan (119,3 g), etyl axetat (43,7 g) và cặn nước tương ứng. Như vậy, từ thân cây xạ đen, chúng tôi đã tách chiết được 4 cao chiết phân đoạn. Các cao chiết được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư và 1 dòng tế bào thường bằng 1.

Bảng 1. Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết phân đoạn

STT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ mẫu (µg/ml)	Tế bào sống sót (%)				
			Hep-G2	LU-1	HeLa	MCF-7	Vero
	Chứng (-) DMSO	10%	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	Chứng (+)	5	1,34 ± 0,6	5,66 ± 0,2	0	3,45 ± 1,2	31,21 ± 0,9
1	Thân XD-MeOH	100	67,48 ± 1,1	86,33 ± 2,0	32,08 ± 1,7	0	77,28 ± 0,4
2	Thân XD-Hexan	100	0	24,35 ± 2,5	0	0	72,53 ± 0,8
3	Thân XD-Etyl	100	18,54 ± 0,8	98,07 ± 0,6	0	0	76,36 ± 1,2
4	Thân XD-H ₂ O	100	59,92 ± 1,3	87,62 ± 0,7	13,88 ± 0,2	4,74 ± 1,7	98,74 ± 0,8

Ghi chú: DMSO là chứng (-), chứng (+) là ellipithine, Vero là tế bào lành

Theo tiêu chuẩn đánh giá, một chất được coi là có khả năng kháng ung thư nếu tỉ lệ tế bào còn sống sót phải nhỏ hơn 50%. Như vậy, kết quả thử nghiệm trong bảng 2 cho thấy, cả 4 cao chiết phân đoạn của thân cây xạ đen đều có hoạt tính gây độc với 2 dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và ung thư cổ tử cung (HeLa). Đặc biệt, các cao chiết này không gây độc cho tế bào thận khi xanh (Vero).

Cao chiết phân đoạn *n*-hexan (Thân XD-Hexan) có hoạt tính gây độc với cả 4 dòng tế bào ung thư gan, ung thư phổi, ung thư vú và

ung thư cổ tử cung nhưng lại không gây độc cho tế bào thận khi xanh là tế bào lành (Vero).

Cao chiết phân đoạn etyl axetat (Thân XD-Etyl) có hoạt tính gây độc với 3 dòng tế bào ung thư gan, ung thư vú và ung thư cổ tử cung nhưng lại không gây độc cho tế bào thận khi xanh (Vero).

Như vậy, các cao chiết phân đoạn của thân cây xạ đen có hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (IC₅₀) được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ ức chế 50% tế bào (IC₅₀) của các cao chiết phân đoạn

STT	Kí hiệu mẫu	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)				
		Hep-G2	LU-1	HeLa	MCF-7	Vero
	Chứng (+)	0,29	0,32	0,28	0,31	2,05
1	Thân XD-MeOH	-	-	71,13	16,45	>100
2	Thân XD-Hexan	28,3	89,82	18,59	14,42	>100
3	Thân XD-Etyl	55,69	-	75,17	13,4	>100
4	Thân XD-H ₂ O	-	-	62,41	39,78	>100

Kết quả bảng 2 cho thấy, các cao chiết phân đoạn đều thể hiện hoạt tính với ít nhất một dòng tế bào ung thư. Đặc biệt cao chiết phân đoạn *n*-hexan thể hiện hoạt tính với 3 dòng tế bào ung thư là ung thư gan (Hep-G2), ung thư vú (MCF-7) và ung thư cổ tử cung (HeLa) với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 28,3 µg/ml, 14,42 µg/ml và 18,59 µg/ml. Cao chiết phân đoạn MeOH, cao chiết phân đoạn ethyl axetat và cao chiết phân đoạn H₂O chỉ có hoạt tính với dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 16,45 µg/ml, 13,4 µg/ml và 39,78 µg/ml. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây của một số tác giả, cho thấy cao chiết phân đoạn của xạ đen R6 có hoạt tính ức chế tế bào ung thư vú (MCF-7) với giá trị IC₅₀ là 19,62 µg/ml (Đỗ Thị Thảo và nnk., 2008). Phạm Thanh Loan (2018), cũng cho thấy cao chiết xạ

đen thu ở Tân Lạc, Hòa Bình và cao xạ đen được di thực, trồng ở Việt Trì, Phú Thọ đều có hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan (Hep-G2) với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 26,48 µg/ml, 31,34 µg/ml (Phạm Thanh Loan, 2018). Kết quả này chứng tỏ cao chiết phân đoạn của xạ đen có hoạt tính ức chế dòng tế bào ung thư gan mạnh hơn so với Thông ba lá, *Pinus kesiya*, với IC₅₀ = 52,00 µg/ml, Thủy tùng, *Catimbiium spectrum*, với IC₅₀ = 55,70 µg/ml (Machana et al., 2011).

Hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ thân cây xạ đen Hòa Bình

Sau khi thu được các cao chiết phân đoạn, tiến hành phân lập phần cặn chiết EtOAc sử dụng sắc ký cột pha đảo YMC-RP 18, dung môi MeOH: nước (1:3, v:v) thu được 3 phân đoạn

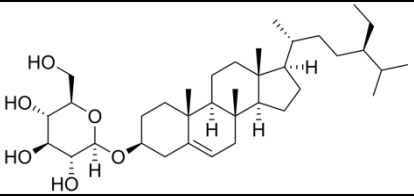
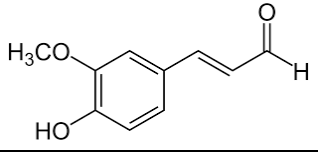
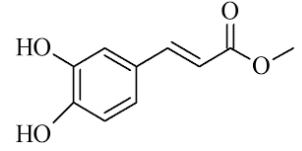
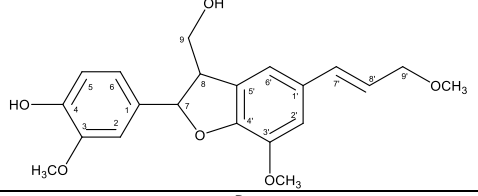
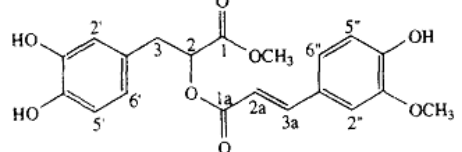
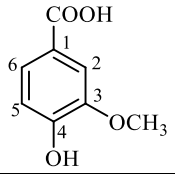
ký hiệu là E1, E2, E3. Phân đoạn E1 được tiếp tục phân tách trên cột sắc ký silica gel, sử dụng dung môi rửa giải $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{nước}$ (5:1:0,1, v:v:v) thu được hợp chất ET1 (3 mg). Phân đoạn E2 được tiến hành sắc ký cột silica gel với dung môi rửa giải là $\text{EtOAc}:\text{MeOH}:\text{nước}$ (10:1:0,2, v:v:v) thu được hai phân đoạn nhỏ E2.1 và E2.2, tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo YMC-RP 18 hai phân đoạn này với hệ dung môi rửa giải là axeton:nước (1:2, v:v) và $\text{MeOH}:\text{nước}$ (1:1, v:v) thu được hợp chất ET2 (5 mg), ET3 (4,6 mg) và ET4 (5 mg). Tiếp tục tiến hành sắc ký trên cột silica gel, dung môi

$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{nước}$ (4:1:0,1, v:v:v) thu được hai hợp chất ET5 (6 mg) và ET6 (12 mg).

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại, cụ thể là các phương pháp phổ 1D-NMR và 2D-NMR.

Hợp chất ET1 phân lập được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng, tan tốt trong các dung môi hữu cơ có độ phân cực kém và trung bình. Kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng cho thấy vết chất ET1 trùng khớp với hợp chất daucosterol, một hợp chất rất phổ biến trong thực vật (Moridi, 2017).

Bảng 3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ thân cây xạ đen Hòa Bình

TT	Ký hiệu	Tên chất	Cấu trúc hoá học
1	ET1	Daucosterol	
2	ET2	Coniferaldehyde	
3	ET3	Methyl caffeate	
4	ET4	9'-Methoxydehydrodiconiferyl alcohol	
5	ET5	Oresbuisin B	
6	ET6	axit vanillic	

Hợp chất ET2 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối lượng phun mù điện tử

xuất hiện tín hiệu tại m/z 179 $[\text{M}+\text{H}]^+$ cho phép dự đoán ET2 có khối lượng phân tử 178. Phổ

$^1\text{H-NMR}$ tại vùng trường trung bình thấp xuất hiện tín hiệu của 3 proton vòng thơm tương tác kiểu ABX tại δ_{H} 7,28 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-2), 6,88 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5) và 7,20 (1H, dd, $J = 1,5, 8,0$ Hz, H-6), và tín hiệu của 2 proton nối đôi dạng *trans* tại δ_{H} 7,62 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7) và 6,69 (1H, dd, $J = 8,0, 16,0$ Hz, H-8). Ngoài ra tín hiệu đặc trưng của một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,92 và nhóm -CHO tại δ_{H} 9,60 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-9) cũng được ghi nhận. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT của 2 cho biết sự có mặt của 10 tín hiệu trong đó có 3 nguyên tử carbon bậc 4 tại δ_{C} 125,1 (C-1), 149,5 (C-3) và 127,8 (C-4), 6 nhóm metin và một nhóm methoxy (-OCH₃) tại δ_{C} 56,5. Tại vùng trường thấp xuất hiện tín hiệu của nhóm andehit tại δ_{C} 196,1 (C-9). Kết hợp giữa sự phân tích các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất ET2 là coniferaldehyde (Sy 1999).

Hợp chất ET3 được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy sự có mặt của hệ tương tác spin ABX của vòng thơm [δ_{H} 7,05 (d, $J = 2,0$ Hz), 6,95 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz), 6,80 (d, $J = 8,0$ Hz)] và một nối đôi có cấu hình *trans* tại δ_{H} 7,56 (d, $J = 16,0$ Hz) và 6,27 (d, $J = 16,0$ Hz). Phổ carbon $^{13}\text{C-NMR}$ cho tín hiệu của 1 nhóm methyl carboxylate tại 169,7 và 51,9. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của ET3 được xác định là methyl caffeate (Zheng 2012).

Hợp chất ET4 thu được dưới dạng dầu không màu. Phổ khối lượng phun mù điện tử xuất hiện tín hiệu tại m/z 385 [$\text{M}+\text{H}^+$]⁺ phép dự đoán ET4 có khối lượng phân tử 384. Phổ $^1\text{H-NMR}$ tại vùng trường trung bình xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm trong đó có 3 tín hiệu proton vòng thơm tương tác kiểu ABX tại δ_{H} 6,96 (1H, d, $J = 2,0$, H-2), 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5) và 6,85 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6), 2 tín hiệu proton vòng thơm khác tại δ_{H} 6,97 (1H, s, H-2') và 6,99 (1H, s, H-6'). Bên cạnh đó phổ proton còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 3 nhóm methoxy (-OCH₃) tương ứng tại δ_{H} 3,82, 3,88, 3,37 (mỗi pic 3H, s, OCH₃-3, 3', 9'). Hai tín hiệu proton nối đôi dạng *trans* tại δ_{H} 6,59 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-7') và 6,18 (1H, dt, $J = 15,5, 6,0$ Hz, H-8). Hai tín hiệu nhóm metin tại δ_{H} 5,55 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-7) và 3,51 (1H, m, H-8) và 2 tín hiệu proton của 2 nhóm metilen tại δ_{H} 3,85 (2H, m, H-9) và 4,08

(2H, dd, $J = 1,0, 6,5$ Hz, H-9'). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT cho ta xác định được hợp chất ET4 có 21 nguyên tử carbon trong đó chứa 2 nhóm metilen, 9 nhóm metin, 7 nguyên tử carbon bậc bốn và 3 nhóm methoxy tương ứng tại δ_{C} 56,4, 56,7 và 57,9 (OCH₃-3, 3', 9'). Từ các dữ kiện phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất ET4 là 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol (Iizuka 2001).

Hợp chất ET5 được phân lập dưới dạng bột màu vàng sẫm. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của ET5 cũng giống chất 3 đã thu nhận sự có mặt của 6 proton thơm của hai hệ tương tác spin ABX tại δ_{H} [6,74 (d, $J = 2,5$ Hz, H-5'), 6,60 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-9'), 6,72 (d, $J = 8,0$ Hz (H-8'))] và [7,21 (d, $J = 2,0$ Hz, H-5), 6,83 (d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 7,10 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-9)], hai olefinic proton của nối đôi với cấu hình *trans*, một oxymethine proton δ_{H} 5,23 (dd, $J = 5,0; 7,5$ Hz) và hai proton của nhóm methylen δ_{H} 3,07 (m). Tuy nhiên, sự có mặt của hai nhóm methoxy tại δ_{H} 3,72 và 3,92 của ET5 đã xác định đây là một dẫn xuất của acid rosmarinic có tên là oresbuisin B (Huang, 1996).

Hợp chất ET6 thu được dưới dạng bột màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất ET6 có các tín hiệu đặc trưng của các proton hệ spin ABX vòng thơm tại δ_{H} 6,86 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,57 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và 7,58 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5$ Hz). Bên cạnh đó còn xuất hiện 1 tín hiệu đặc trưng cho proton trong nhóm -OCH₃ tại độ dịch chuyển δ 3,91 (3H, s). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 8 nguyên tử carbon, kết hợp với phổ DEPT ta nhận thấy có 1 nhóm methyl, 3 nhóm metin và 4 carbon bậc 4. Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu đặc trưng của một carbon vòng thơm chứa nhóm thế OH tại δ 152,7 ppm, tín hiệu đặc trưng của nhóm C = O axit (170,0 ppm) và một tín hiệu đặc trưng của nguyên tử carbon trong nhóm -OCH₃ (56,4 ppm). Dựa vào dữ kiện phổ trên và so sánh với các số liệu đã công bố, hợp chất ET6 được xác định là axit vanillic (Momtaz, 2010).

Như vậy, 6 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc gồm daucosterol (ET1), coniferaldehyde (ET2), methyl caffeate (ET3), 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol (ET4), oresbuisin B (ET5), axit vanillic (ET6).

Trong 6 chất sạch trên có daucosterol (ET1) là chất phổ biến không có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư (Moridi et al., 2017).

Vi vậy, chỉ lấy 5 chất còn lại đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư với 4 dòng tế bào ung thư trên. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 4 và 5.

Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ cây xạ đen Hòa Bình

TT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Tế bào sống sót (%)				
			Hep-G2	LU-1	HeLa	MCF-7	Vero
	Chứng (-) DMSO	10%	100	100	100	100	100
	Chứng (+)	5	$1,14 \pm 0,3$	$4,06 \pm 0,2$	$1,57 \pm 0,7$	$0,52 \pm 0,6$	$25,3 \pm 0,4$
1	ET2	10	100	$96,1 \pm 0,5$	$90,8 \pm 1,6$	$93,5 \pm 1,2$	$99,6 \pm 0,8$
2	ET3	10	$28,64 \pm 1,9$	$86,32 \pm 2,2$	$33,36 \pm 1,5$	$23,29 \pm 2,0$	$82,5 \pm 0,2$
3	ET4	10	$99,6 \pm 0,5$	$99,5 \pm 1,3$	$82,9 \pm 1,8$	$97,3 \pm 0,7$	$94,2 \pm 1,6$
4	ET5	10	$48,63 \pm 1,4$	$99,28 \pm 0,4$	$69,79 \pm 1,7$	$70,29 \pm 0,1$	$93,7 \pm 0,4$
5	ET6	10	$93,1 \pm 1,7$	$88,0 \pm 1,5$	$66,7 \pm 0,1$	$92,5 \pm 1,1$	$90,8 \pm 0,5$

Bảng 5. Nồng độ ức chế 50% tế bào (IC_{50}) của các chất phân lập được

TT	KH mẫu	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
		Hep-G2	LU-1	HeLa	MCF-7	Vero
	Chứng (+)	0,30	0,35	0,26	0,27	1,84
1	ET3 (Methyl caffeate)	2,83	-	3,38	4,40	>10
2	ET5 (Oresbuisin B)	9,89	-	-	-	>10

Kết quả trình bày trong bảng 4 cho thấy, chất methyl caffeate (ET3) có hoạt tính gây độc với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là Hep-G2, LU-1 và HeLa nhưng lại không gây độc cho tế bào lành (Vero). Chất oresbuisin B (ET5) có hoạt tính gây độc với tế bào Hep-G2, 3 chất còn lại coniferaldehyde (ET2), 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol (ET4) và axit vanillic (ET6) không thể hiện hoạt tính gây độc với các dòng tế bào ung thư trên.

Từ kết quả nghiên cứu này, các chất ET3 và ET5 được thử nghiệm tiếp để tìm giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (IC_{50}) với kết quả trình bày ở bảng 5.

Chất methyl caffeate (ET3) thể hiện hoạt tính với các tế bào Hep-G2, HeLa và MCF-7 với giá trị IC_{50} tương ứng là $2,83 \mu\text{g/ml}$, $3,38 \mu\text{g/ml}$ và $4,4 \mu\text{g/ml}$. Chất oresbuisin B (ET5) chỉ thể hiện hoạt tính với dòng tế bào Hep G2 với giá trị IC_{50} là $9,89 \mu\text{g/ml}$. Ba chất coniferaldehyde (ET2), 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol (ET4) và axit vanillic (ET6) không có khả năng gây độc đối với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Đáng lưu ý là cả ba hợp chất ET2, ET4 và ET6 đều không có nhóm methyl ester trong khi 2 chất ET3 và ET5 chứa nhóm methyl ester và có khả năng gây độc tế bào ung thư. Điều này gợi ý đến giả thiết khả năng kháng ung thư của methyl caffeate và oresbuisin B có thể phụ

thuộc vào nhóm methyl ester này. Nghiên cứu của Fiuza et al. (2004) cũng đã chỉ ra chất methyl caffeate kháng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa). Một số nghiên cứu của Takahashi et al. (2010) cho thấy, ngoài hoạt tính trên, methyl caffeate còn có khả năng ức chế nhẹ các enzyme sucrase và maltase, với các giá trị IC_{50} tương ứng là $1,5 \text{ mM}$ và 2 mM (Takahashi et al., 2010). Nghiên cứu của Fabrice et al. (2013) cũng cho thấy khả năng kháng tế bào ung thư vú (MCF-7) của chất methyl caffeate với giá trị $\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$ (Fabrice et al., 2013). Kết quả này gợi mở cho những nghiên cứu tiếp theo đối với các hợp chất này.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các chất phân lập từ thân cây xạ đen, *Ehretia asperula* Zoll. & Mor, có thể kết luận các cao chiết phân đoạn của thân cây xạ đen đều thể hiện hoạt tính với ít nhất một dòng tế bào ung thư. Cao chiết phân đoạn *n*-hexan thể hiện có hoạt tính đối với các dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư vú (MCF-7) và ung thư cổ tử cung (HeLa) với các giá trị IC_{50} tương ứng là $28,3 \mu\text{g/ml}$, $14,42 \mu\text{g/ml}$ và $18,59 \mu\text{g/ml}$. Cao chiết tổng MeOH, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn H₂O chỉ có hoạt tính với dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) với các giá trị IC_{50} lần lượt là $16,45 \mu\text{g/ml}$, $13,4 \mu\text{g/ml}$ và $39,78 \mu\text{g/ml}$.

Từ cao chiết phân đoạn ethyl axetat đã phân lập được 6 chất sạch, bao gồm daucosterol, coniferaldehyde, methyl caffeate, 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol, oresbiusin B và axit vanillic. Chất methyl caffeate thể hiện hoạt tính với các tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư cổ tử cung (HeLa) và ung thư vú (MCF-7) với các giá trị IC_{50} tương ứng là 2,83 $\mu\text{g/ml}$, 3,38 $\mu\text{g/ml}$ và 4,4 $\mu\text{g/ml}$. Chất oresbiusin B chỉ thể hiện hoạt tính với dòng tế bào ung thư gan (Hep G2) với giá trị IC_{50} là 9,89 $\mu\text{g/ml}$. Ba chất còn lại coniferaldehyde, 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol và axit vanillic không có khả năng gây độc tế bào ung thư. Kết quả nhận được cho thấy khả năng sử dụng các cao chiết tiềm năng của thân cây xạ đen ở Hòa Bình làm thực phẩm chức năng trong việc phòng và hỗ trợ điều trị ung thư là khả thi và có triển vọng.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ nhiệm vụ “Nghiên cứu thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính sinh học của một số hợp chất chính phân lập được từ cây xạ đen tại tỉnh Hòa Bình. Thử nghiệm tạo chế phẩm làm thực phẩm chức năng từ các cao chiết tiềm năng” do Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Hòa Bình tài trợ và Chương trình hỗ trợ NCVCC, mã số NVCC30.01/18-18 do Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fabrice B., Robert A. T., Olympe T., Nathalie J., Hubert H., Philippe C., 2013. Antiproliferative and apoptotic effects of the oxidative dimerization product of methyl caffeate on human breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(2): 574–578.
- Fiuza S. M., Gomes C., Teixeira L. J., Girão da Cruz M. T., Cordeiro M. N. D. S., Milhazes N., Borgesa F., Marquesa M. P. M., 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 3581–53589.
- Hu X. Q., Han W., Han Z. Z., Liu Q. X., Xu X. K., Fu P., Li H. L., 2014. Three new diphenylpropanes from *Celastrus hindsii*. *Arch Pharm Res.*, 37(11): 1411–51415.
- Huang H., Sun H. D., Zhao M. S., Xun S., 1996. Phenolic compounds of *Isodon oresbius*. *J. Nat. Prod.*, 59(11): 1079–1080.
- Lê Thị Huyền, Phạm Huyền Trang, Nguyễn Đình Chung, Nguyễn Văn Đậu, 2008. Hoạt tính độc tế bào của cây Xạ đen và cây Bông ổi. Hội nghị khoa học và Công nghệ hóa học hữu cơ toàn quốc lần thứ IV, 624–627.
- Iizuka M., Warashina I., Noro T., 2001. Bufadienolides and a New Lignan from the Bulbs of *Urginea maritima*, *Chem. Pharm. Bull.*, 49: 282–286.
- Kuo Y. H., Kuo L. M., 1997. Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44(7): 1275–1281.
- Likhitayawuid K., Angerhofer C. K., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Ruangrungsi N., 1993. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Sephania erecta*. *J. Nat. Prod.*, 56(1): 30–38.
- Phạm Thanh Loan, 2018. Khảo sát hoạt tính sinh học của cao chiết từ cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth). Hội nghị khoa học Quốc Gia lần thứ 3, 929–934.
- Ly T. N., Shimoyamada M., Yamauchi R., 2006. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *J Agric Food Chem*, 54(11): 3786–3793.
- Machana S., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Nonpunya A., Sripanidkulchai B., Thitimetharoh T., 2011. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line, *Chin Med*, 6(1): 39.
- Momtaz M. H., Hamada R. G., 2010. Antioxidative Effects of Acetone Fraction and Vanillic Acid from *Chenopodium murale* L. on Tomato Plant. *Weed Biol. Manag*, 10: 64–72.
- Moridi F. M., Nazarianpoor E., Rustaie A., Akhbari M., 2017. Phytochemical constituents and biological activities of *Cleome iberica* DC. *Nat Prod Res.*, 31(11): 1329–1332.

- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R., 1991. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer agents. *Eur. J. Cancer.*, 27: 1162–1168.
- Sy L. K., Brown G. D., 1999. Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*, *Phytochemistry*, 50: 781–785.
- Takahashi K., Yoshioka Y., Kato E., Katsuki S., Iida O., Hosokawa K., Kawabata J., 2010. Methyl Caffeate as an α -Glucosidase Inhibitor from *Solanum torvum* Fruits and the Activity of Related Compounds. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 74(4): 741–745.
- Đỗ Thị thảo, Đỗ Thị Phương, Đỗ Khắc Hiếu, 2008. Xác định khả năng phòng chống ung thư của một số chất chiết thực vật Việt Nam bằng phương pháp thử sinh học *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*, 30(1): 79–82.
- Lê Thế Trung, Nguyễn Liêm, Trần Văn Hanh, 1999. Kết quả nghiên cứu bước đầu về chiết xuất K10 từ cây *Celastrus hindsii* Benth họ Celastreae. Kỷ yếu công trình nghiên cứu Y học quân sự, *Tạp chí Y dược học Quân sự*, 3: 3–7.
- Zheng Q., Sun Z., Zhang X., Yuan J., Wu H., Yang J., Xu X., 2012. Clerodendranic acid, a new phenolic acid from *Clerodendranthus spicatus*. *Molecules* 2012, 17(11): 13656–13661.

EVALUATING CYTOTOXIC EFFECT OF THE EXTRACTED COMPOUNDS FROM *Ehretia asperula* Zoll. & Mor STEM ON SEVERAL CANCER CELL LINES

Vu Thi Nguyet¹, Nguyen Tien Dat², Le Mai Huong³, Tran Thi Hong Ha³,
Nguyen Hong Chuyen¹, Nguyen Thi Hang, Dang Dinh Kim^{1*}

¹Institute of Environmental Technology, VAST

²Center for Research and Transfert of Technology, VAST

³Institute of Natural Product Chemistry, VAST

⁴Agricultural genetics institute

SUMMARY

This paper reports the cytotoxic effect on several cancer cell lines of the stem extracts and of some isolated compounds from *Ehretia asperula*. All the extracts exhibited cytotoxic effects on at least one cancer cell line. The *n*-hexane extract showed potent cytotoxic activity on Hep-G2, MCF-7 and HeLa cell lines with IC₅₀ values of 28.3 μ g/ml, 14.42 μ g/ml and 18.59 μ g/ml, respectively, while the methanolic, ethyl acetate and water extracts exhibited toxicity towards MCF-7 cells with IC₅₀ values of 16.45 μ g/ml, 13.4 μ g/ml and 39.78 μ g/ml, respectively.

06 compounds have been isolated from the ethyl acetate fraction of *Ehretia asperula* stem. Methyl caffeate has a strong cytotoxicity against Hep-G2, HeLa and MCF-7 cancer cell lines with IC₅₀ values of 2.83 μ g/ml, 3.38 μ g/ml and 4.4 μ g/ml, respectively. Oresbuisin B was active against Hep-G2 with IC₅₀ value of 9.89 μ g/ml. The other compounds including coniferaldehyde, 9'-methoxydehydrodiconiferyl alcohol and vanillic acid did not have any cytotoxic effect on the tested cancer cell lines. So, the obtained results have suggested possibility of using the potential *Ehretia asperula* extracts as health food for preventing and curing cancer diseases.

Keywords: *Ehretia asperula*, methyl caffeate, oresbuisin B, Cancer cell lines.

Citation: Vu Thi Nguyet, Nguyen Tien Dat, Le Mai Huong, Tran Thi Hong Ha, Nguyen Hong Chuyen, Nguyen Thi Hang, Dang Dinh Kim, 2018. Evaluating cytotoxic effect of the extracted compounds from *ehretia asperula* Zoll. & Mor stem on several cancer cell lines. *Tạp chí Sinh học*, 40(2): 145–152. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.12955>.

*Corresponding author email: dangkim.iet@gmail.com

Received 3 May 2017, accepted 18 June 2018