

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC NHANH CÁC CHẤT KHÁNG KHUẨN TỪ THỰC VẬT CÓ TÁC DỤNG LÊN MÀNG TẾ BÀO

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

*Viện Công nghệ sinh học*

TRINH ANH TRÚC

*Viện Kỹ thuật nhiệt đới*

Hướng nghiên cứu và sử dụng các chất có nguồn gốc tự nhiên để ứng dụng trong y, dược học gần đây đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu. Với việc phát hiện và ứng dụng hàng loạt những chất dược phẩm có nguồn gốc tự nhiên như những chất kháng sinh, kháng khuẩn, chất chống ung thư hay chất chống đào thải miễn dịch... hướng nghiên cứu này đang mở ra những triển vọng to lớn. Vấn đề mấu chốt trong việc phát hiện những chất có hoạt tính sinh học mới là có được kỹ thuật sàng lọc thích hợp để có thể sàng lọc nhanh, hiệu quả những chất cần quan tâm từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau. Gần đây, nhóm nghiên cứu của Katz và cs. [4] đã phát triển một kỹ thuật mới để sàng lọc các dược phẩm quan tâm thông qua việc xem xét khả năng tương tác của các chất này với lớp lipit nhân tạo có thành phần cấu tạo giống với lớp lipit của màng tế bào. Một ưu điểm nổi bật của kỹ thuật này là phản ứng được thực hiện trên bản nhựa ELISA nên có thể tiến hành phản ứng đồng thời với nhiều chất khác nhau. Đây cũng là ưu thế đặc biệt để có thể phát triển thành hệ thống sàng lọc tự động HTS (high throughput screening). Do các peptide kháng khuẩn (AMPs) mang nhóm chức tích điện dương, có khả năng liên kết với các nhóm chức tích điện âm trong các phân tử phospholipit trên màng tế bào, nên nhóm nghiên cứu của Lopez-García và cộng sự [8] cũng đã sử dụng kỹ thuật này để sàng lọc các AMPs tích điện dương từ thư viện peptide tổng hợp. Cho đến nay, chưa có tác giả nào sử dụng phương pháp này để sàng lọc AMPs tự nhiên từ nguồn nguyên liệu thô như trong các mẫu dịch chiết. Dựa trên kỹ thuật đã được Kolusheva và cs., [5, 6] mô tả, chúng tôi đã tiến hành chế tạo lớp lipit kép nhân tạo, đánh giá tác dụng của một số hoạt chất thuốc với dung dịch chất mang tạo được và bước đầu sử

dụng mô hình này để sàng lọc chất kháng khuẩn, trong đó có các AMPs từ một số dịch chiết thực vật họ Đậu hoang dại. Nghiên cứu này sẽ là cơ sở để chúng tôi sử dụng mô hình lipit kép nhân tạo cho việc sàng lọc những chất có tiềm năng ứng dụng trong y học từ những nguồn nguyên liệu sinh học của Việt Nam trong tương lai.

### II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Hoá chất polydiacetylene (PDA) được mua từ hãng GFS Chemicals (Powell, OH, USA). dimystoylphosphatidylcholine (DMPC) và các hoá chất còn lại được mua từ hãng Sigma. Các mẫu hạt đậu hoang dại được sưu tầm tại trung tâm giống cây trồng, Viện Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp và tại chợ Mơ, Hà Nội, bao gồm: thảo quyết minh - *Cassia tora* L., keo dậu - *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit, củ đậu - *Pachyrhizus erosus* (L.) Vrb., bồ kết - *Gleditsia fera* (Lour.) Merr, điền thanh - *Sesbania sesban* (L.) Merr., keo tai tượng - *Acacia mangium*, keo - *Acacia difficilis*, me - *Taramindus indica* L..

#### 2. Phương pháp

- Chuẩn bị dịch chiết của các mẫu thực vật: hạt đậu được nghiền mịn và loại chất béo bằng diethyl ether sau đó chiết trong đệm Tris - HCl 20 mM pH 7,0 theo tỷ lệ 1 g mẫu khô: 9 ml dung dịch đệm. Dịch chiết được khuấy liên tục trong 3 giờ và sau đó được ly tâm với tốc độ 12.000 g trong 30 phút ở 4°C. Dịch trong thu sau khi ly tâm được dùng trực tiếp để xác định giá trị % CR.

- Chế tạo dung dịch lipit kép nhân tạo (LBM): Dung dịch lipit kép nhân tạo (lipit

bilayer model) gọi tắt là LBM hay còn gọi là dung dịch chất mang (vesicle solution) được chế tạo từ các thành phần phospholipid là DMPC và PDA. Dung dịch được chuẩn bị bằng cách hoà tan các thành phần này trong chloroform/ethanol (theo tỉ lệ 1: 1) và được polymer hoá bằng tia cực tím dưới đèn tử ngoại có cường độ ánh sáng 250 mW/cm<sup>2</sup>, hệ chiếu tia tử ngoại model F300S của hãng FUSION UV (Hoa Kỳ) tại bước sóng 254 nm trong 30-40 giây để tạo thành dung dịch chất mang có màu xanh đậm.

- *Đo tương tác của chất mang và chất nghiên cứu:* các mẫu được chuẩn bị bằng cách thêm các dung dịch nghiên cứu vào dung dịch chất mang có nồng độ lipit tổng số là 0,5 mM trong 25 mM Tris-base pH 8,0. Việc đo quang phổ được thực hiện ở 27°C và được lặp lại 3 lần cho mỗi một mẫu đọc trên máy đọc ELISA dùng cho loại bản nhựa 96 giếng (Biorad, Mỹ). Giá trị chuyển đổi màu (colormetric response) từ màu xanh (640 nm) sang màu đỏ (500 nm) của dung dịch chất mang được gọi là %CR được định nghĩa như sau:

$$\%CR = [PB_0 - PB_1] / PB_0 \times 100$$

trong đó:  $PB = A_{\text{xanh}} / (A_{\text{xanh}} + A_{\text{đỏ}})$ ; A. là số đọc hấp thụ tại bước sóng 640 nm (xanh) và 500 nm (đỏ);  $PB_0$  là tỉ số số đọc hấp thụ xanh/đỏ của mẫu đối chứng;  $PB_1$  là giá trị của dung dịch mang sau khi thêm chất nghiên cứu.

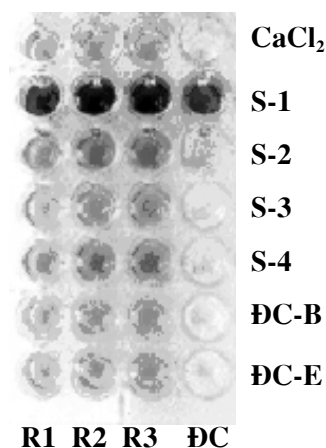
- *Xác định hàm lượng protein:* hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu được xác định theo phương pháp của Lowry sử dụng albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn [7].

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Đánh giá tác dụng của một số hoạt chất thuốc lên lớp lipit kép nhân tạo

Lớp lipit là thành phần cấu tạo cơ bản của màng tế bào, vì thế, việc nghiên cứu tác dụng của một chất quan tâm lên màng có thể thực hiện được thông qua việc theo dõi tác dụng của chúng lên lớp lipit này. Nguyên tắc của phương pháp LBM là: các nhóm chức tích điện dương trên bề mặt của chất nghiên cứu như các AMPs sẽ tương tác với các nhóm chức tích điện âm trong phân tử phospholipid, dẫn đến sự thay đổi cấu hình của màng. Sự thay đổi này được phản ánh thông qua sự biến đổi màu sắc của dung

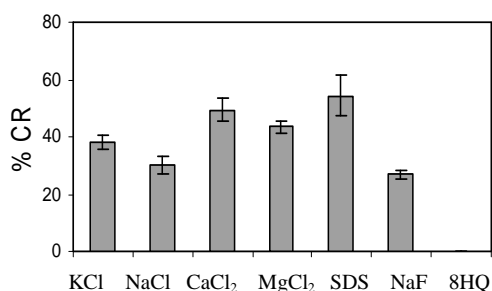
dịch. Các thí nghiệm của Katz và cs. đã sử dụng DMPC và PDA để chế tạo LBM vì chúng có cấu tạo gần giống với lipit của màng tế bào. Nhóm nghiên cứu đã chứng minh rằng hệ thống DMPC/PDA đóng vai trò như chất chỉ thị thông qua những tín hiệu thay đổi màu sắc, từ màu xanh sang màu đỏ khi có sự tương tác của các chất nghiên cứu khác nhau với hệ thống này. Sự chuyển màu được bắt đầu khi có sự liên kết của chất nghiên cứu ở bề mặt LBM, hay khi các chất này đi qua LBM. Các phân tử không liên kết với LBM sẽ không gây ra sự thay đổi màu của dung dịch. Vì thế, dung dịch LBM vẫn giữ màu xanh ban đầu. Nhìn chung, những chất thuộc nhóm tương tác với bề mặt LBM sẽ tạo thành sản phẩm có màu tím đỏ hay đỏ ở nồng độ thấp và có màu đỏ cực đại ở nồng độ cao hơn. Những chất đi qua được LBM sẽ cho sản phẩm phản ứng có màu, biến đổi từ màu xanh/tím đỏ/đỏ ở 3 nồng độ kiểm tra tăng dần. Những chất không có tác dụng lên LBM sẽ cho sản phẩm phản ứng có màu sắc không thay đổi màu (xanh/xanh/xanh hay xanh/xanh/tím đỏ) (hình 1).



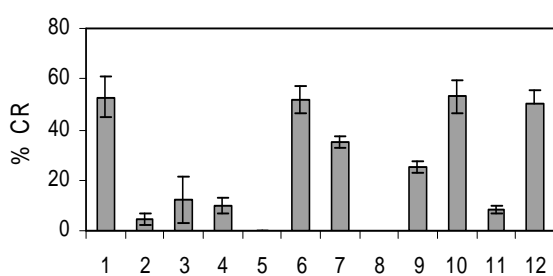
**Hình 1.** Sự chuyển màu của dung dịch LBM sau khi tương tác với chất nghiên cứu ĐC. đối chứng; R. phản ứng lặp lại; S. mẫu nghiên cứu; B. buffer; E. ethanol.

Để kiểm tra xem dung dịch LBM mà chúng tôi chế tạo được có khả năng tương tác với các chất khác nhau hay không chúng tôi đã sử dụng các hoạt chất thuốc, bao gồm cả chất có và không có tác động lên màng tế bào đã được các tài liệu trước đây công bố [7]. Đối với một số chất vô cơ chứa các cation có tác động lên

màng, như các muối  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  hay chất hoạt động bề mặt sodium dodecyl sulphate (SDS) ở nồng độ 1 mM, đều cho giá trị %CR khá cao (nằm trong khoảng từ 40 đến 55) (Hình 2). Vì thế những chất này được chúng tôi sử dụng như là những chất chuẩn trong các thí nghiệm về sau. NaF là tác nhân chống sâu răng có hiệu quả nhất hiện nay do có khả năng tác động mạnh lên màng tế bào nên cũng cho kết quả dương tính với dung dịch LBM (%CR = 26,8). Một điều thú vị là 8-hydroxyquinoline (8HQ), một chất kháng nấm và kháng khuẩn mạnh do có khả năng sinh các gốc oxi hoạt động như  $\text{O}_2$  hay  $\text{H}_2\text{O}_2$  (gây tổn thương oxi hoá tế bào mạnh [9]), lại không tương tác với dung dịch LBM. Điều đó chứng tỏ chất này không có cơ chế tác động lên màng. Đây là một bằng chứng nữa để khẳng định cơ chế tác động của 8HQ là gây tổn thương oxi hoá lên tế bào.



**Hình 2.** Giá trị %CR của một số chất có khả năng tác động lên màng tế bào ở nồng độ 1 mM Ký hiệu (I) trong đồ thị chỉ giá trị SD với  $n = 3$



**Hình 3.** Giá trị %CR của một số hoạt chất thuốc ở nồng độ 1 mM

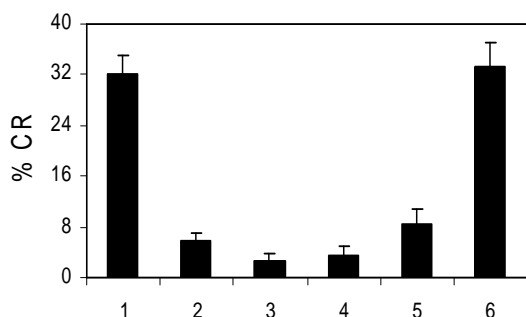
1. metohexal; 2. seduxen; 3. ibuprofen; 4. indomethacin; 5. amoxicillin; 6. becberein; 7. paoparolen; 8. cephalicine; 9. amitryptiline; 10. coumarine; 11. dịch chiết măng cụt (0,1 mg polyphenol/ml); 12.  $\text{CaCl}_2$ . Ký hiệu (I) trong đồ thị chỉ giá trị SD với  $n = 3$ .

Kết quả nghiên cứu tác dụng của một số hoạt chất thuốc lên dung dịch LBM thông qua việc xác định giá trị %CR được trình bày ở hình 3. Trong thí nghiệm này, một số hoạt chất thuốc như metohexal, becberein và coumarine (ở nồng độ 1 mM) có giá trị %CR nằm trong khoảng 45-55, tương đương với dung dịch chất chuẩn  $\text{CaCl}_2$  (ở nồng độ 1 mM). Các hoạt chất còn lại có %CR thấp hơn tương tự như kết quả của Katz và cs. [3, 4] đã công bố. Dịch chiết măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) đã được Nguyễn Thị Mai Phương và cs. [10] phát hiện thấy có khả năng kháng vi khuẩn sâu răng *S. mutans* cao lại tương tác yếu với LBM (%CR = 8,3).

Một số dịch mẫu protein thô như nọc rắn hay nọc bọ cạp đã tinh sạch một phần bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) có giá trị %CR thấp hơn đáng kể so với mẫu đối chứng  $\text{CaCl}_2$  1mM (%CR = 33,4) (hình 4). Trong số các dịch protein này, giá trị %CR của dịch nọc bọ cạp thô là 32,8, cao gần tương đương với %CR của  $\text{CaCl}_2$  1mM. Điều này có thể do nọc bọ cạp thô chứa nhiều AMPs có tác động lên các kênh ion trên màng tế bào như đã được phát hiện trong một số nghiên cứu trước đây. Các nghiên cứu của Lopez-Garci'a và cs. [8] cũng như của một vài tác giả khác, chỉ sử dụng LBM để sàng lọc các AMPs từ thư viện peptide tổng hợp sẵn có. Đây là lần đầu tiên chúng tôi thử nghiệm mô hình này trên dung dịch protein chưa tinh sạch. Điều thú vị là LBM đã phản ứng khá tốt với các dung dịch nghiên cứu mặc dù độ nhạy có thấp hơn. Tuy nhiên, với những mẫu protein chứa nhiều sắc tố hay có hàm lượng lipit cao, phương pháp này chỉ sử dụng được khi đã tiến hành loại một phần chất béo hay sắc tố ra khỏi mẫu nghiên cứu.

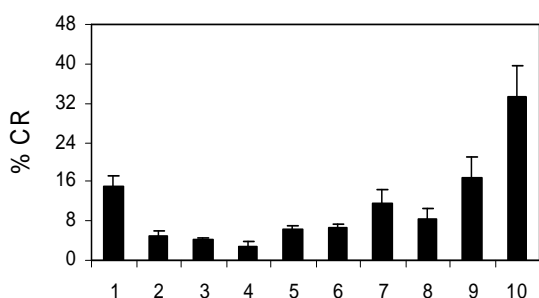
Như vậy, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp LBM để sử dụng cho việc đánh giá tương tác của các chất tác động lên màng, bao gồm cả các AMPs từ dịch protein thô như nọc bọ cạp hay nọc rắn. Phương pháp này có độ nhạy tương đương với phương pháp của tác giả trước đây đã công bố cho những hoạt chất thuốc [3] và có độ nhạy tương đối cao (mức  $\mu\text{M}$ ) đối với dịch chiết protein thô. Kết quả này là cơ sở để chúng tôi mạnh dạn áp dụng phương pháp LBM cho việc sàng lọc sơ cấp các AMPs tự nhiên trong các dịch chiết thô từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau.

## 2. Sàng lọc nhanh những thực vật họ đậu hoang dại có chứa AMPs sử dụng phương pháp LBM



**Hình 4.** Giá trị %CR của một số dịch chiết protein (1mg protein/ml)

1. Nọc bọ cạp; 2. Nọc rắn; 3, 4, 5. Phân đoạn tinh sạch nọc bọ cạp qua cột HPLC; 6. CaCl<sub>2</sub> (1mM). Ký hiệu (I) trong đồ thị chỉ giá trị SD với n = 3.



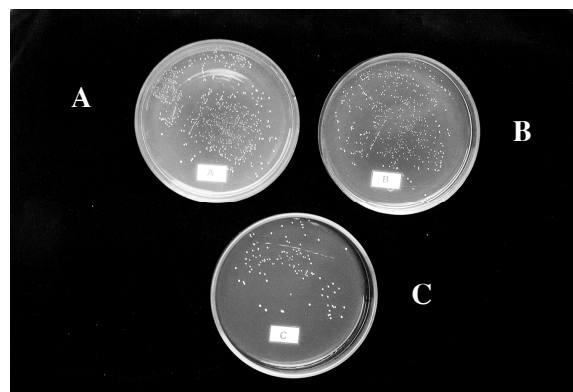
**Hình 5.** Giá trị %CR của một số dịch chiết (1 mg protein/ml) thực vật họ đậu trồng ở Việt Nam

1. Dịch chiết hạt cải (*Brassica juncea* L.); 2. Keo tai tượng *Acacia mangium*; 3. Điền thanh - *Sesbania sesban* (L.) Merr. 4. Củ đậu - *Pachyrrhizus erosus* (L.) Vrb., 5. Me - *Tarandus indica* L.; 6. Keo đậu - *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit; 7. Keo *Acacia difficilis*; 8. Bồ kết - *Gleditsia fera* (Lour.) Merr, 9. Thảo quyết minh - *Cassia tora* L.; 10. CaCl<sub>2</sub> (1 mM). Ký hiệu (I) trong đồ thị chỉ giá trị SD với n = 3.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy: hạt của các cây họ đậu có chứa nhiều protein kháng khuẩn như các chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanases, các chất kìm hãm proteinase và các protein bất hoạt ribosome (RIP) [2, 11, 12]. Hàng loạt các công bố gần đây đã phát hiện được hạt của các cây họ đậu như *Phaseolus vulgaris* L. hay *Phaseolus*

*lunatus* L có chứa những AMPs mới, có hoạt tính kháng nấm và tế bào ung thư [13, 14]. Đây được xem là những họ protein bảo vệ mới. Với mục đích tìm kiếm các AMPs tự nhiên mới, chúng tôi đã chọn những thực vật họ đậu hoang dại và sử dụng phương pháp LBM mà chúng tôi xây dựng được, để sàng lọc sơ cấp các đối tượng chứa AMPs. Trong thí nghiệm này, dịch chiết hạt cải (*Brassica juncea* L.) được sử dụng như mẫu đối chứng, vì đây là đối tượng được phát hiện có hàm lượng AMPs khá cao. Kết quả thu được cho thấy ở cùng nồng độ protein, trong số 9 dịch chiết thực vật được nghiên cứu, dịch chiết hạt cải và thảo quyết minh (TQM), là một thực vật họ đậu, có giá trị %CR cao hơn so với các dịch chiết còn lại (%CR = 15,0 và 16,8, theo thứ tự) (hình 5). Điều này gợi ý rằng trong dịch chiết hạt cải và TQM có chứa AMPs. Đối với hạt TQM, các nghiên cứu công bố trước đây mới chỉ phát hiện thấy đối tượng này có chứa antraglucozit, một glucosit có tác dụng kháng khuẩn. Cho đến nay chưa có công trình nào đề cập đến các AMPs ở thực vật này. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi với dịch chiết hạt TQM, gợi ý rằng trong đối tượng này có thể chứa AMPs mới. Đây là vấn đề rất thú vị, cần phải tiếp tục làm sáng tỏ.

## 3. Đánh giá tác dụng sinh học của dịch chiết TQM

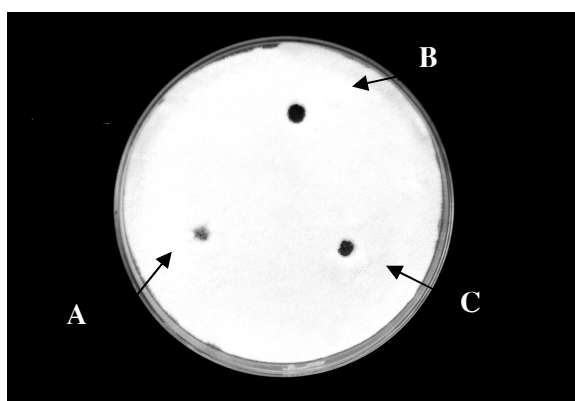


**Hình 6.** Ảnh hưởng của dịch chiết thảo quyết minh (*Cassia tora* L.) lên sự phát triển của vi khuẩn *Streptococcus mutans*

A. Đối chứng; B. dịch chiết 0,87 mg protein/ml; C. dịch chiết 1,73 mg protein/ml.

Trên cơ sở phát hiện thấy dịch chiết TQM có thể chứa AMPs mới, chúng tôi đã kiểm tra

thêm tác dụng sinh học của dịch chiết này thông qua việc kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết từ đối tượng này lên sự sinh trưởng của vi khuẩn gây sâu răng *Streptococcus mutans* và nấm gây bệnh thực vật *Fusarium oxysporum*. Số liệu thu được cho thấy dịch chiết thảo quyết minh có khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *S. mutans* ở nồng độ protein là 1,7 mg/ml (hình 6) nhưng không có khả năng kháng nấm *F. oxysporum* (hình 7) như một số AMPs khác đã được tìm thấy trước đây [13, 14]. Việc tinh sạch và tác dụng sinh học của các chất kháng khuẩn trong dịch chiết thảo quyết minh đang được tiến hành để làm sáng tỏ cơ chế tác dụng cũng như bản chất của những chất kháng khuẩn có trong thực vật họ đậu này.



**Hình 7.** Ảnh hưởng của dịch chiết thảo quyết minh (*Cassia tora* L.) lên sự sinh trưởng của nấm gây bệnh thực vật *Fusarium oxysporum*

A. Đối chứng; B. dịch chiết 0,87 mg protein/ml; C. dịch chiết 1,73 mg protein/ml.

#### IV. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp màng lipit kép và có thể sử dụng phương pháp này để sàng lọc sơ cấp những chất kháng khuẩn có tác động lên màng tế bào đặc biệt là các peptide tích điện dương từ nhiều nguồn nguyên liệu sinh học khác nhau.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến giáo sư Raz Jelinek, Đại học Ben Gurion, Beersheva, Israel và các cs. của ông đã giúp đỡ về hoá chất cho nghiên cứu này. Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Công nghệ Sinh học (tài khoá 2006) và chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học và Sự sống giai đoạn 2006-2009.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đỗ Tất Lợi**, 1986: Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
2. **Hancock R. E. W., Chapple D. S.**, 1999: Antimicrob. Agent Chermother., 43(6): 1317-1323.
3. **Katz M. et al.**, 2006: Pharmaceutical Res., 23: 580-588.
4. **Katz M. et al.**, 2003: Biochem. J., 375: 405-413.
5. **Kolusheva S. et al.**, 2000: Nat. Biotechnol., 18: 225-227.
6. **Kolusheva S. et al.**, 2000: Biochemistry, 39: 15851-15859.
7. **Lowry O. H.**, 1951: J. Biol. Chem., 193: 265-275.
8. **Lopez-Garcia B. et al.**, 2002: Appl. Environ. Microbiol., 68(5): 2453-2460.
9. **Nguyễn Thị Mai Phương và cs.**, 2003: Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, 2: 18-23.
10. **Nguyễn Thị Mai Phương và cs.**, 2004: Tạp chí Dược học, 44: 18-21.
11. **Ringsdorf H. et al.**, 1988: Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 127: 113-158.
12. **Vigers A. J. et al.**, 1991: Mol Plan Microbe Interact., 4(4): 315-323.
13. **Wong J. H., Ng. T. B.**, 2005: Peptides, 26: 2086-2092.
14. **Xia L., Ng T. B.**, 2005: Peptides, 26: 2397-2403.

# ADAPTATION OF THE VESICLE ASSAY FOR RAPID SCREENING OF THE MEMBRANE INTERACTING COMPOUNDS FROM PLANTS

NGUYEN THI MAI PHUONG, TRINH ANH TRUC

## SUMMARY

A key problem in identifying drug candidates from biological materials is a rapid and effective screening method. The goal of this work is to adapt and demonstrate that the artificial lipid bilayer model can be used as a simple colorimetric assay for rapid screening of pharmaceutical compounds, especially cationic antimicrobial peptides (AMPs) from the crude extracts of biological materials, that can interact with artificial lipid barriers. The obtained data showed that the model worked well for the evaluation of drug penetration across the lipid barrier made from a vesicles solution containing phospholipids dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and polydiacetylene (PDA), as well as mechanism of the drug action. Moreover, the system could be used for rapid screening of AMPs from different genetic resources such as plants, microorganisms, animal tissues. The different colorimetric response (CR) of the compounds to the vesicle solution was estimated by %CR value, which was calculated based on the ratio of absorbance of the indicator at the wavelength 640 nm (blue color) and 500 nm (red color). Among 9 plant crude extracts in 20 mM Tris - HCl pH 7.0 were examined, including *Brassica juncea* L. (as a positive control); *Acacia mangium*; *Sesbania sesban* (L.) Merr.; *Pachyrrhizus erosus* (L.) Vrb.; *Tarandus indica* L; *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit 3; *Acacia difficilis*; *Gleditsia fera* (Lour.) Merr; *Cassia tora* L., the extracts of *Brassica juncea* L. and *Cassia tora* L exhibited the highest values of %CR compared to the other samples suggesting that they are containing membrane interacting compounds, probably AMPs. The antifungal/antimicrobial activity of *Cassia tora* L extract was also determined in terms of the growth inhibition of the plant fungus *Fusarium oxysporum* and the dental caries bacterium *Streptococcus mutans*. The preliminary results showed that the extract at protein concentration of 1.7 mg/ml did not inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* but inhibited the growth of dental caries bacterium *Streptococcus mutans*. Further work is going on to characterize the antimicrobial agents in this plant.

Ngày nhận bài: 5-1-2007