

## NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ BẢO VỆ GAN *IN VITRO* CỦA CÁC DỊCH CHIẾT TỪ CÂY PHÈN ĐEN (*PHYLLANTHUS RETICULATES POIR.*)

Nguyễn Thị Cúc<sup>1</sup>, Nguyễn Công Thùy Trâm<sup>2</sup>, Đỗ Thị Phương<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Nga<sup>1</sup>, Gilles Truan<sup>3</sup>, Đỗ Thị Thảo<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>3</sup>Ingénieries Métabolique et Moléculaire, LISBP - INSA de Toulouse, CNRS, Pháp

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thaodo74@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 14.9.2016

Ngày nhận đăng: 20.3.2017

### TÓM TẮT

Trong y học cổ truyền Việt Nam, cây Phèn đen (*Phyllanthus reticulatus* Poir.) là một vị thuốc quý và thường được sử dụng để thanh nhiệt, giải độc, sát trùng, lợi tiểu, tiêu viêm... Tuy nhiên, các nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ gan của cây Phèn đen Việt Nam còn chưa được thực hiện. Gần đây, việc sử dụng các enzyme như CYP450 reductase (CPR) của gan trong việc xác định hoạt tính bảo vệ gan *in vitro* của các chất có nguồn gốc thực vật đang được quan tâm bởi phép thử này mang lại hiệu quả hơn với thời gian thử ngắn và hiệu suất thử cao. Trong khi đó, các phép thử chống oxy hóa *in vitro* sử dụng 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), peroxy hóa lipid (MDA) được sử dụng phổ biến và thường quy ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới để xác định hoạt tính chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu. Với thành công trong việc tách enzyme CPR (6,1 mg) từ dịch nhân nuôi (8,7 ml) chủng *Saccharomyces cerevisiae* WR1A2 (5 lít/m<sup>3</sup>), chúng tôi đã sử dụng CPR này trong thử nghiệm sàng lọc nhanh hoạt tính bảo vệ gan ở mức *in vitro* và cho thấy kết quả khá tương đồng với kết quả thu được từ thí nghiệm chống oxy hóa (phép thử DPPH và MDA). Theo đó, dịch chiết nước của cây Phèn đen đã thể hiện hoạt tính cảm ứng CPR nhằm giải độc cho cơ thể và bảo vệ gan. Đồng thời dịch chiết nước, dịch chiết EtOAc, dịch chiết tổng cũng thể hiện hoạt tính chống oxy hóa rất tốt thông qua việc trung hòa gốc tự do của DPPH và ức chế quá trình peroxy hóa lipid với SC<sub>50</sub> tương ứng là 13,84 µg/ml, 37,64 µg/ml, 28,31 µg/ml và IC<sub>50</sub> tương ứng là 5,99 µg/ml, 4,77 µg/ml, 27,58 µg/ml.

**Từ khóa:** cytochrome P450, DPPH, enzyme CPR, *in vitro*, peroxy hóa lipid, *Phyllanthus reticulatus* Poir.

### MỞ ĐẦU

Trên thế giới và tại Việt Nam hiện có một số thử nghiệm sinh học *in vitro* sử dụng 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), peroxy hóa lipid, giảm khả năng chống oxy hóa của sắt (Feric reducing antioxidant power - FRAP), khả năng chống oxy hóa tương đương của Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC)... để nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ gan của các chất hóa học có nguồn gốc tự nhiên hay tổng hợp.

Gan là cơ quan lớn nhất trong cơ thể con người và động vật với vai trò quan trọng trong chuyển hóa độc tố, thuốc... Sự chuyển hóa thuốc, các độc tố ở gan cần có sự tham gia của hệ thống các cytochrome P450. Một trong số các cytochrome P450 này là NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), một diflavoprotein

enzyme quan trọng trong quá trình chuyển hóa thuốc của cơ thể (Porter, Kasper, 1986). CPR có mặt trong hầu hết các mô cơ quan và trong lưới nội chất của tế bào gan (Simmons, Kasper, 1989). CPR chịu trách nhiệm chuyển điện tử tới các phân tử nhận điện tử, bao gồm cytochrome-b5 và các cytochrome P450 enzyme khác (Murataliev *et al.*, 2004; Guengerich, 2005). Có thể nói, hoạt động của CPR là yếu tố bắt buộc cho sự xúc tác và hoạt động của nhiều P450 khác trong cơ thể, ví dụ như CYP3A, một P450 quan trọng trong quá trình chuyển hóa thuốc và đào thải thuốc. Đã có báo cáo cho thấy việc bất hoạt hoạt động của CPR bằng kháng thể đơn dòng dẫn tới sự dừng hoạt động hoàn toàn của CYP3A (Yamazaki *et al.*, 1999; 2002). Như vậy, việc cảm ứng hoạt động CPR được xem là khởi đầu cho quá trình chuyển hóa các độc tố, các thuốc điều trị để bảo vệ gan của chính các tế bào gan, cũng như của cơ thể.

Các thử nghiệm hoạt tính bảo vệ gan đa phần được thực hiện ở mức *in vivo* như trên mô hình chuột bị gây độc cấp cho gan bởi CCl<sub>4</sub>, acetaminophen... Những thử nghiệm này thường có chi phí cao, mất nhiều thời gian và hiệu suất thử nghiệm thấp (một vài chất/1 thí nghiệm). Vì vậy, việc thiết lập thử nghiệm bảo vệ gan ở mức *in vitro* trên tế bào hay sử dụng enzyme được xem là lựa chọn thay thế hiệu quả, bởi hiệu suất cao (hàng trăm hợp chất/1 thí nghiệm) và thời gian ngắn. Vì thế, hệ enzyme cytochrome P450, cụ thể là CPR được coi là đích nghiên cứu quan trọng trong các thử nghiệm bảo vệ gan. Ronneau và đồng tác giả (1992) đã thành công trong việc biểu hiện nhiều isozyme cytochrome P450 như cytochrome P450 reductase (CPR) trong tế bào nấm men, cơ sở quan trọng cho việc thực hiện phép thử sinh học nhờ kích hoạt hệ enzyme CPR để giải độc cho cơ thể, nhằm tìm kiếm hoạt chất có hoạt tính bảo vệ gan *in vitro*.

Phèn đen (*Phyllanthus reticulatus* Poir.) thuộc chi *Phyllanthus*, là một loại cây bụi mọc nhiều nơi trên thế giới như ở Ấn Độ, Bangladesh, Trung Quốc... Ở nước ta, cây Phèn đen mọc hoang ở ven đường, ven bờ khắp cả nước. Cây Phèn đen được sử dụng phổ biến để làm thuốc chữa kiết lỵ, tiêu chảy, thanh nhiệt giải độc... Thành phần hóa học của Phèn đen gồm: tannic acid, friedelin, epifriedelinol, betulin, taraxerone, beta-sitosterol, glochidonol, octacosanol, taraxeryl acetate flavonoid, triterpenoid, coumarin, quercetin... (Sharma, Kumar, 2013). Một số nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng dịch chiết của cây Phèn đen có tác dụng chống oxy hóa (Aswatha *et al.*, 2008; Maruthappan, Shree, 2010; Yeasmin *et al.*, 2015), chống dung nạp đường huyết cũng như hạ đường huyết (Kumar *et al.*, 2008, Khatun *et al.*, 2014), có hoạt tính kháng viêm (Saha *et al.*, 2008; Khatun *et al.*, 2013), giảm đau (Rahmatullah *et al.*, 2010; Khatun *et al.*, 2013), bảo vệ gan (Bhawna, Kumar, 2009), chống virus viêm gan B (Das *et al.*, 2011). Kumar và đồng tác giả (2012) cũng chứng minh quả của cây Phèn đen có hoạt tính kháng viêm. Tuy nhiên, ở nước ta cây Phèn đen lại chưa được nghiên cứu nhiều về các hoạt tính sinh học này. Vì vậy, trong báo cáo dưới đây, chúng tôi đã nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ gan của cây Phèn đen nhằm tìm kiếm hoạt chất có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu nghiên cứu

Cây Phèn đen được thu hái vào mùa hè ở ngoại

thành Hà Nội và được phân loại bởi TS. Trần Phương Anh, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* WR1A2 đã được chuyển gen biểu hiện enzyme CPR, do Trung tâm Nghiên cứu sinh học hệ thống và Ứng dụng (INSA, Toulouse), Cộng hòa Pháp cung cấp.

Chuột thuần chủng dòng BALB/c khỏe mạnh, 6-8 tuần tuổi, không phân biệt giới, khối lượng  $26 \pm 2$  g, được nuôi tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học. Chuột được nuôi trong điều kiện cung cấp đầy đủ ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học trong suốt thời gian thí nghiệm.

Các hóa chất nghiên cứu khác được mua từ các hãng Sigma (St. Louis, MO, USA) Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Tách chiết mẫu thực vật

Lá và thân cây Phèn đen được phơi khô, chặt nhỏ và nghiền thành bột mịn, sấy khô đến khối lượng không đổi (mỗi loại có khối lượng là 3 kg). Nguyên liệu bột mịn được chiết với ethanol 96° (3 lần) bằng phương pháp ngâm dầm, lọc và cô quay loại dung môi dưới áp suất thấp và thu nhận cao tổng số. Dịch chiết n-Hexane, dịch chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dịch chiết EtOAc và dịch chiết nước được chuẩn bị bằng cách bổ sung nước và chiết phân lớp lần lượt với dung môi n-hexane, dichloromethane và ethyl acetate.

#### Xác định khả năng chống oxy hóa của dịch chiết thông qua ức chế peroxy hóa lipid (MDA)

Xác định khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ cây Phèn đen thông qua ức chế peroxy hóa lipid được thực hiện theo phương pháp của Ngô Quốc Hận và Nguyễn Thị Thu Hương (2011), Badmus và đồng tác giả (2011), cụ thể là: tách não chuột, nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (tỉ lệ 1:10) ở nhiệt độ 0-4°C. Lấy 1 ml dịch đồng thể não; thêm 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ; 0,8 ml đệm phosphate; 0,1 ml hệ Fenton (FeSO<sub>4</sub> 0.1 mM : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM, tỉ lệ 1:1). Ủ ở 37°C trong 15 phút. Thêm 1 ml TCA 10%. Ly tâm 12000 vòng trong 5 phút. Lấy dịch trong cho phản ứng với Thiobarbituric acid (TBA)(Sigma Aldrich) 0,8% (tỉ lệ 2:1). Ủ ở 100°C trong 15 phút. Làm lạnh và đo ở bước sóng  $\lambda = 532$  nm. Trolox được sử dụng làm chất đối chiếu tham khảo.

Hoạt tính chống oxy hoá (HTCO) thông qua khả năng ức chế peroxy hóa lipid (MDA) được tính như sau: HTCO (%) =  $[(OD_C - OD_T)/OD_C] \times 100$  với  $OD_C$ : Mật độ quang học của giếng đối chứng không có mẫu thử;  $OD_T$ : Mật độ quang học của mẫu thử. Giá trị  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration at 50% - nồng độ ức chế được 50% peroxy hóa lipid) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm TableCurve 2Dv4.

#### **Xác định đặc tính chống oxy hóa của dịch chiết thông qua khả năng trung hòa gốc tự do của DPPH**

Xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ cây Phèn đen thông qua khả năng trung hòa gốc tự do của DPPH được tiến hành theo phương pháp của Yuvaraj và đồng tác giả (2013) có chỉnh sửa. Trước hết DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) (Sigma Aldrich) được pha trong methanol (100%) ở nồng độ 0,25  $\mu$ M. Hút 1 ml các dịch chiết phân đoạn của Phèn đen và ascorbic acid (đối chứng tham khảo) đã pha ở các nồng độ vào các ống thủy tinh. Thêm 1 ml dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các ống đã có sẵn mẫu nghiên cứu. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Xác định độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng tại bước sóng 517 nm trên máy đọc ELISA.

Giếng có dung môi hòa mẫu nghiên cứu và dung dịch DPPH được xem là giếng đối chứng. Giếng có sử dụng ascorbic acid (Vitamin C) là chất đối chứng tham khảo.

Khả năng trung hòa gốc tự do (Scavenging Activities - SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau: % SA =  $(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) \times 100 / OD_{\text{đối chứng}}$  (%) với  $OD_{\text{đối chứng}}$  là độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử,  $OD_{\text{mẫu thử}}$  là độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử. Giá trị  $SC_{50}$  (Scavenging Concentration at 50% - nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do của DPPH) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm TableCurve 2Dv4.

#### **Thu nhận enzyme CPR từ dịch lên men chủng Saccharomyces cerevisiae WR1A2**

Chủng nấm men *S. cerevisiae* WR1A2 sau khi hoạt hóa được nhân nuôi ở bình 5 lít. Toàn bộ nấm men từ dịch nuôi cấy được thu nhận bằng cách ly tâm ở tốc độ 5000 g trong 10 phút, cặn tế bào sau đó được rửa bằng nước cất vô trùng và ly tâm một lần nữa. Tế bào được phá vỡ bằng cách hòa tan cặn trong đệm TES bổ sung hạt bead thủy tinh và lắc mạnh cho tới khi tế bào vỡ hết. Thêm 25 ml đệm

TES vào hỗn hợp tế bào-hạt bead, ly tâm hỗn dịch ở 10000 g trong 10 phút ở 4°C. Sau khi thu dịch nổi, bổ sung thêm PEG4000 vào dung dịch, lắc nhẹ, ủ hỗn hợp ở 4°C trong 120 phút sau đó ly tâm ở 10000 g, 30 phút, 4°C để thu cặn. Hòa tan cặn bằng 1 ml đệm TEG. Dùng kim và mũi tiêm uốn cong để hút và đẩy dịch enzyme trong 1 phút. Cho vào các ống Eppendorf và cất giữ ở -80°C cho những thí nghiệm tiếp theo.

#### **Xác định hàm lượng protein**

Sử dụng bộ Pierce BCA Protein Assay Kit của Thermo Scientific: Dụng đường chuẩn BSA ở các nồng độ 1 mg; 0,5 mg; 0,25 mg; 0,125 mg và 0 mg; Pha loãng mẫu từ 2 - 10 lần; Thực hiện thí nghiệm theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất kit; Đọc kết quả ở máy ELISA plate reader (Biotek) với bước sóng 562 nm.

#### **Xác định hoạt tính enzyme CPR**

Pha 10  $\mu$ l dịch enzyme thu được ở trên với 1590  $\mu$ l đệm Tris-HCl (Tris-HCL 10 mM + EDTA 2 mM); Cho dithionite vừa đủ để khử CPR, chia vào 2 cuvette, phun khí CO thật từ từ vào cuvette chứa mẫu khoảng 3 giây. Tính toán hoạt độ của CPR ở bước sóng 450 nm/480 nm sử dụng phương trình Beer's Law là  $A = \epsilon \times c \times L$  ( $\epsilon = 90$  mM/cm; c là nồng độ heme; L = 1).

#### **Thử nghiệm hoạt tính cảm ứng enzyme CPR**

Phương pháp được thực hiện theo Yim và đồng tác giả (2005), có sự điều chỉnh. Cụ thể là: 20  $\mu$ M MTT, 4 pmol CPR cùng với hệ NADPH (0,1 mM  $NADP^+$ , 1 mM glucose 6-phosphate, và 0,1 unit glucose 6-phosphate dehydrogenase/ml), 10  $\mu$ l dịch chiết các phân đoạn của cây Phèn đen, tổng thể tích của 1 phản ứng cho mỗi giếng là 200  $\mu$ l (đĩa 96 giếng). Đo mật độ quang học của phản ứng ở bước sóng 610 nm bằng máy ELISA plate reader (Biotek) tại các thời điểm.

#### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Với 3 kg mẫu bao gồm lá và thân cây Phèn đen qua quá trình chiết qua các dung môi chúng tôi đã thu được 78 g dịch chiết tổng; 19 g dịch chiết n-Hexane, 17 g dịch chiết  $CH_2Cl_2$ , 10 g EtOAc và 23 g dịch chiết nước. Các phân đoạn thu được từ cây Phèn đen ở trên được xác định khả năng chống oxy hóa và cảm ứng CPR nhằm tìm hiểu khả năng bảo vệ gan của loài thực vật này.

**Hoạt tính ức chế peroxy hoá lipid của các phân đoạn từ cây Phèn đen**

Khả năng ức chế peroxy hoá lipid của Phèn đen được thực hiện thông qua xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), sản phẩm của quá trình peroxy hoá các phân tử lipid trên màng tế bào. MDA

có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\lambda = 532$  nm. Kết quả về xác định hoạt tính chống oxy hóa thông qua ức chế peroxy hóa lipid (MDA) của các dịch chiết từ cây Phèn đen được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Hoạt tính chống oxy hóa thông qua ức chế peroxy hóa lipid của các dịch chiết từ cây Phèn đen (%).

Nồng độ (µg/ml)	% ức chế peroxy hóa lipid					
	Dịch chiết tổng	Dịch chiết Hexan	Dịch chiết CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dịch chiết nước	Dịch chiết EtOAc	Trolox
100	78,20	51,98	44,76	87,92	85,85	88,77
20	46,33	28,96	19,18	81,85	83,99	63,66
4	14,96	19,81	9,10	36,33	59,19	30,38
0,8	0,17	10,67	6,88	19,67	10,46	13,80
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>27,58</b>	<b>90,56</b>	<b>&gt;100</b>	<b>5,99</b>	<b>4,77</b>	<b>10,96</b>

Kết quả bảng 1 cho thấy dịch chiết tổng, dịch chiết nước, dịch chiết EtOAc đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh thông qua ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào với IC<sub>50</sub> tương ứng là 5,99 và 4,77 µg/ml. Với mức hoạt tính này, dịch chiết nước và dịch chiết EtOAc đã thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt và mạnh so với đối chứng Trolox (IC<sub>50</sub> = 10,96 µg/ml). Dịch chiết tổng cho thấy mức hoạt tính khá tốt trong khi dịch chiết Hexan và CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> thể hiện mức hoạt tính yếu ở các nồng độ nghiên cứu. Kết quả này cho thấy triển vọng trong việc tách chiết hoạt chất từ cây Phèn đen có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Aswatha và đồng tác giả (2008) về tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết nước và dịch chiết methanol của cây Phèn

đen thông qua việc ức chế peroxy hóa lipid IC<sub>50</sub> tương ứng là 41,91 µg/ml và 32,16 µg/ml.

**Hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng trung hòa gốc tự do của DPPH của các dịch chiết từ cây Phèn đen**

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) là một gốc tự do, có màu tím và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi có mặt của chất chống oxy hóa, DPPH bị khử thành 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), có màu vàng. Đo kết quả sau phản ứng ở bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa. Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ cây Phèn đen thông qua phép thử trung hòa gốc tự do của DPPH được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Phần trăm trung hòa gốc tự do của DPPH (%).

Nồng độ (µg/ml)	% trung hòa gốc tự do DPPH						Nồng độ (µg/ml)	Ascorbic Acid
	Dịch chiết tổng	Dịch chiết Hexan	Dịch chiết CH <sub>2</sub> Cl	Dịch chiết nước	Dịch chiết EtOAc			
100	88,00	25,82	41,90	89,46	88,70	25	90,69	
50	78,21	17,97	28,19	89,35	75,69	12,5	86,66	
25	41,04	9,74	17,27	72,14	21,35	6,25	43,79	
12,5	25,17	6,78	8,71	39,00	11,02	3,125	17,21	
6,25	13,99	6,40	5,38	19,74	0,78	1,562	5,11	
<b>SC<sub>50</sub></b>	<b>28,31</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>	<b>13,84</b>	<b>37,64</b>		<b>6,99</b>	

Kết quả bảng 2 cũng cho thấy dịch chiết tổng, dịch chiết nước, dịch chiết EtOAc đã thể hiện hoạt tính chống oxy hóa qua việc trung hòa gốc tự do của DPPH với  $SC_{50}$  tương ứng là 28,31  $\mu\text{g/ml}$ , 13,84  $\mu\text{g/ml}$  và 37,64  $\mu\text{g/ml}$ . Dịch chiết Hexan và dịch chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Như vậy, với các phép thử chống oxy hóa được thực hiện trong nghiên cứu này thì một số dịch chiết của cây Phèn đen đã thể hiện hoạt tính chống oxy hóa rất tốt là dịch chiết nước, dịch chiết EtOAc. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi là phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới như Aswatha và đồng tác giả (2008), Maruthappan và Shree (2010). Các tác giả này cũng đã ghi nhận khả năng chống oxy hóa của dịch chiết nước và dịch chiết methanol từ cây Phèn đen (*Phyllanthus reticulatus* Poir.) với  $IC_{50}$  tương ứng là 20,36  $\mu\text{g/ml}$  và 14,31  $\mu\text{g/ml}$  (phép thử DPPH).

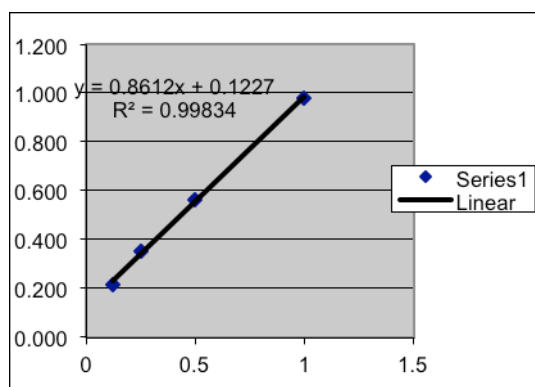
### Kết quả thử nghiệm hoạt tính cảm ứng enzyme CPR để bảo vệ gan của các dịch chiết từ cây Phèn đen

#### Thu nhận CPR tổng số

Với phương pháp thu nhận CPR microsome như đã nêu ở phần phương pháp, chúng tôi đã thu được 8,7 ml dịch enzyme CPR. Hàm lượng protein của dịch enzyme được xác định nhờ sử dụng bộ Pierce BCA Protein Assay Kit của Thermo Scientific và dụng đường chuẩn liên kết giữa hàm lượng protein BSA và giá trị OD (hình 1). Sau khi có đường chuẩn BSA chúng tôi xác định được lượng microsome chứa CPR đạt 0,702 mg/ml (Bảng 3). Như vậy, với 8,7 ml dịch enzyme CPR thu được ở trên cho tương ứng 6,1 mg CPR.

**Bảng 3.** Hàm lượng Protein thu được của dịch microsome chứa CPR.

Mẫu thí nghiệm	OD	Hàm lượng (mg/ml)	Hàm lượng BSA (mg/ml)	OD
H2O	0,060	0,000	0,125	0,214
Dịch CPR	0,726	0,702	0,250	0,351
			0,500	0,563
			1,000	0,978



**Hình 1.** Đường chuẩn liên kết hàm lượng protein BSA và giá trị OD.

Sau khi thu nhận CPR, hoạt độ của CPR được xác định thông qua phương pháp định lượng bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 450/490 nm (hình 2) và tính toán theo phương trình Beer's Law:  $C = A/(\epsilon \times L)$  (Trong đó: C là nồng độ heme (Mol/L); A (độ hấp thụ) =  $Y_{\text{max}} - Y_{\text{min}}$ ;  $\epsilon = 90 \text{ mM/cm}$ ;  $L = 1$ ). Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả xác định hoạt độ CPR.

Thông số	Giá trị
$Y_{\text{max}}$ (450)	0,0097
$Y_{\text{min}}$ (450)	-0,005
A	0,0147
Độ pha loãng	160
Hoạt độ CPR ( $\mu\text{M}$ )	26,08 $\mu\text{M}$
Hoạt độ CPR (IU) tương ứng	26,08 IU

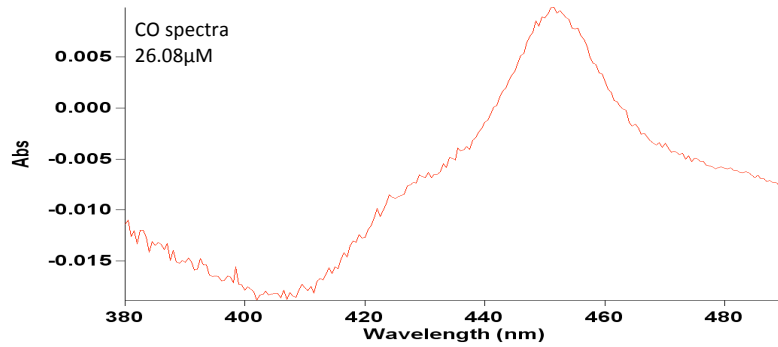
Kết quả trên cho thấy enzyme CPR thu được hoạt động tốt và ổn định với hoạt độ bằng 26,08IU. Như vậy, CPR thu được ở trên đã đáp ứng được các điều kiện để sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc nhanh nhằm đánh giá hoạt tính bảo vệ gan *in vitro* của các chất tiềm năng thông qua khả năng cảm ứng CPR.

#### Đánh giá khả năng cảm ứng CPR của các dịch chiết từ cây Phèn đen

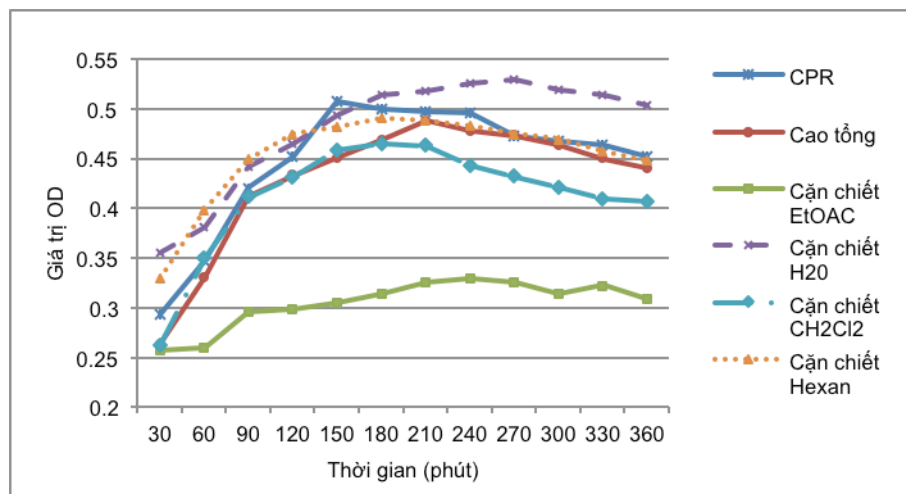
Dựa vào phương pháp đánh giá khả năng cảm

ứng CPR của Yim và đồng tác giả (2005) như đã được trình bày ở phần thực nghiệm, chúng tôi tiến

hành xác định khả năng cảm ứng CPR của các dịch chiết từ cây Phèn đen (hình 3).



Hình 2. Hoạt độ CPR đo bằng máy quang phổ của dịch lên men chủng WR1A2.



Hình 3. Khả năng cảm ứng hoạt động CPR của các dịch chiết từ cây Phèn đen theo thời gian thực nghiệm.

Kết quả ở hình 3 cho thấy các dịch chiết từ cây Phèn đen tác động đến hoạt động của enzyme CPR theo các mức độ khác nhau và thể hiện hoạt tính tối đa ở các mốc thời gian khác nhau. Theo đó, dịch chiết nước thể hiện khả năng cảm ứng mạnh nhất và đạt mức tối đa ở mốc 270 phút. Dịch chiết EtOAc lại cho thấy hoạt tính cảm ứng CPR thấp và không thể hiện rõ đỉnh cực đại của phản ứng. Các dịch chiết còn lại cũng đã phân nào cho thấy khả năng cảm ứng hoạt động của hệ enzyme CPR. Theo Yim và đồng tác giả (2005), CPR là một enzyme oxy hóa khử với chức năng chuyển điện tử từ NADPH đến các chất nhận bao gồm các enzyme cytochrome P450, cytochrome b5 và cytochrome c, đồng thời enzyme này cũng xúc tác cho các phản ứng khử điện tử của

nhiều loại thuốc. Bất kì sự gián đoạn nào trong quá trình này sẽ ức chế hoạt động của enzyme, do đó ảnh hưởng đến sự chuyển hóa các thuốc trong gan dẫn tới gây độc cho gan (Gan *et al.*, 2008; Riddick *et al.*, 2013). Trong mô hình gây độc gan trên chuột bằng CCl<sub>4</sub>, hoạt tính của các enzyme chuyển hóa thuốc như cytochrome P450, cytochrome b5 reductase, CPR giảm và được cải thiện khi được bảo vệ bằng các hoạt chất chống oxy hóa như acid galic hay vitamin E (Kujawska *et al.*, 2007; Sheweita *et al.*, 2001). Như vậy, lần đầu tiên các dịch chiết từ cây Phèn đen đã được nghiên cứu khả năng cảm ứng enzyme CPR để bảo vệ gan ở mức *in vitro* và cho thấy những kết quả khả quan, khá tương đồng với kết quả thu được từ thí nghiệm chống oxy hóa (phép

thử DPPH và MDA). Kết quả này là tiền đề cho việc sử dụng CPR tái tổ hợp trong các thử nghiệm sàng lọc nhanh, hiệu suất cao, tiết kiệm chi phí để tìm các hoạt chất tiềm năng có khả năng bảo vệ gan ở mức *in vitro*, trước khi đưa lên kiểm chứng trên mô hình động vật.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tách chiết thành công enzyme CPR từ chủng nấm men *S. cerevisiae* WR1A2 và đã thu được 8,7 ml dịch enzyme CPR chứa 6,1 mg CPR, đạt 0,702 mg/ml, hoạt độ 26,08 IU. CPR tái tổ hợp được đưa vào sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc nhanh các hoạt chất/dịch chiết tiềm năng có khả năng bảo vệ gan ở mức *in vitro*, trước khi đưa lên kiểm chứng trên mô hình động vật. Thử nghiệm CPR cho thấy đây là phương pháp đạt hiệu suất cao, tiết kiệm được chi phí, kết quả khá tương đồng với kết quả thu được từ thí nghiệm chống oxy hóa (phép thử DPPH và MDA). Với nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã chứng minh được hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ gan của các dịch chiết từ cây Phèn đen thu hái tại Hà Nội thông qua việc trung hòa gốc tự do của DPPH, ức chế quá trình peroxy hóa lipid và khả năng cảm ứng hệ enzyme NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) của gan.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về KHCN cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam năm 2015-2016, thuộc chương trình hợp tác với CNRS, Cộng hòa Pháp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aswatha RHN, Shreedhara CS, Falguni PG, Sachin BZ (2008) *In vitro* free radical scavenging potential of methanol extract of entire plant of *Phyllanthus reticulatus* Poir. *Pharmacologyonline* 2: 440-451.

Aswatha RHN, Shreedhara CS, Falguni PG Sachin B (2008) Antioxidant study of aqueous extract of *Phyllanthus reticulatus* Poir. *Pharmacologyonline* 1: 351-364.

Badmus JA, Adedosu TO, Fatoki JO, Adegbite VA, Adaramoye OA, Odunola OA (2011) Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*. *Acta Pol Pharm.* 68(1): 23-29.

Bhawna S, Kumar SU (2009) Hepatoprotective activity of some indigenous plants. *Int J Pharm Tech Res* 1(4): 1330-1334.

Das BK, Shohel M, Pavel AM, Akhter N, Yasmin T, Bhattacharjee R, Hannan JMA (2011) Anti-Hepatitis B

Viral Activity of *Phyllanthus reticulatus*. *Bangladesh J. Pharmacol* 14(1): 11-14.

Gan L, von Moltke LL, Trepanier LA, Harmatz JS, Greenblatt DJ (2009) Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 37(1): 90-96.

Khatun H, Nesa L, Alam B, Nahar L (2013) Anti-inflammatory, antinociceptive and CNS depressant activities of the methanolic extract of *Phyllanthus reticulatus* leaves. *Global J Pharmacol* 7 (2): 172-178.

Khatun MH, Nesa ML, Islam R, Ripa FA, Kadir S (2014) Antidiabetic and antidiarrheal effects of the methanolic extract of *Phyllanthus reticulatus* leaves in mice. *Asian Pac J Reprod* 3(2): 121-127.

Kujawska M, Jodynis-Liebert J, Ewertowska M, Adamska T, Matlawska I, Bylka W (2007) Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol* 45(8): 702.

Kumar S, Kumar D, Deshmukh RR, Lokhande PD, More SN, Rangari VD (2008) Antidiabetic potential of *Phyllanthus reticulatus* in alloxan-induced diabetic mice. *Fitoterapia* 79(1): 21-23.

Maruthappan V, Shree K S (2010) A report on the antioxidant activity of the powder of the entire plant of *Phyllanthus reticulatus* Poir. *Indian J Pharmacol* 4(4): 265-269.

Ngô Quốc Hân, Nguyễn Thị Thu Hương (2011) Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa theo hướng bảo vệ gan của polysaccharid chiết xuất từ nấm linh chi vàng (*Ganoderma colossus*). *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh* 15(1): 50-55.

Porter TD, Kasper CB (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* 25(7): 1682-7.

Rahmatullah M, Ghosh KC, Almamun A, Hossain MT, Ahmed S (2010) A pharmacological study on antinociceptive and anti-hyperglycemic effects of methanol extract of leaves of *Phyllanthus reticulatus* Poir. in swiss albino mice. *Adv Nat Appl Sci* 4(3): 229-232.

Riddick DS, Ding X, Wolf CR, Porter TD, Pandey AV, Zhang QY, Gu J, Finn RD, Ronseaux S, McLaughlin LA, Henderson CJ (2013) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: roles in physiology, pharmacology, and toxicology. *Drug Metab Dispos* 41(1): 12-23.

Ronneau MAP, Renaud IJP, Truan G, Urban P, Pompon D, Mansuy D (1992) Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Eur J Biochem* 207: 109-116

- Saha A, Masud MA, Bachar CS, Kundu JK, Datta BK, Nahar L, Sarker SD (2008) The analgesic and anti-inflammatory activities of extracts of *Phyllanthus reticulatus* in mice model. *Pharmaceut Biol* 45(5): 335-359.
- Sharma S, Kumar S (2013) *Phyllanthus reticulatus* Poir. - An important medicinal plant: a review of its phytochemistry, traditional uses and pharmacological properties. *Int J Pharm Sci Res* 4(7): 2528-2534
- Sheweita SA, El-Gabar MA, Bastawy M (2001) Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 169(2): 83-92.
- Simmons DL, Kasper CB (1989) Quantitation of mRNAs specific for the mixed-function oxidase system in rat liver and extrahepatic tissues during development. *Arch Biochem Biophys* 271(1): 10-20.
- Yamazaki H, Nakajima M, Nakamura M, Asahi S, Shimada N, Gillam EM, Guengerich FP, Shimada T, Yokoi T (1999) Enhancement of cytochrome P-450 3A4 catalytic activities by cytochrome b 5 in bacterial membranes. *Drug Metab Dispos* 27(9): 999-1004.
- Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M, Yokoi T (2002) Roles of NADPH-P450 reductase and apo-and holo-cytochrome b 5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 24(3): 329-37.
- Yeasmin Z, Tanvir S, Sharmin T, Rashid RB, Sikder MAA, Rashid MA (2015) Bioactivities of *Malvaviscus arboreus* var. *drummondii* and *Phyllanthus reticulatus* Poir. *Dhaka Univ J Pharm Sci* 13(2): 143-147.
- Yim SK, Yun CH, Ahn TH, Jung HC, Pan JG (2005) A continuous spectrophotometric assay for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. *J Biochem Mol Biol* 38(3): 366-369
- Yuvaraj P, Subramoniam A, Louis T, Madhavachandran V, Narasu ML (2013) Attenuation of expression of cytokines, oxidative stress and inflammation by hepatoprotective phenolic acids from *Thespesia populnea* Soland ex Correa stem bark. *Ann Phytomed* 2(2): 47-56.

## THE ANTIOXIDANT AND *IN VITRO* HEPATOPROTECTIVE ACTIVITIES OF SOME CHEMICAL FRACTIONS FROM *PHYLLANTHUS RETICULATES* POIR. PLANT

Nguyen Thi Cuc<sup>1</sup>, Nguyen Cong Thuy Tram<sup>2</sup>, Do Thi Phuong<sup>1</sup>, Vu Thi Thu Phuong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Nga<sup>1</sup>, Gilles Truan<sup>3</sup>, Do Thi Thao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>College of Education and Training, Da Nang University, Vietnam

<sup>3</sup>Ingénieries Métabolique et Moléculaire, LISBP - INSA de Toulouse, CNRS, France

### SUMMARY

The Phen-den plant (*Phyllanthus reticulatus* Poir.) has been widely used in Vietnamese traditional medicine for detoxification, antiseptic, diuretic, anti-inflammation treatments... However, there is still lack of studies on this plant's antioxidant and *in vitro* hepatoprotective activities in Vietnam. Recently, the use of liver enzymes such as CYP450 reductase (CPR) in determining the *in vitro* hepatoprotective activities of potential compounds, which are originated from herbal plants, is increasing based on its high efficiency and short duration. Furthermore, the other *in vitro* assays such as DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate) scavenging, inhibition of lipid peroxidation (MDA) are popularly employed for determination of antioxidant activities. With the success in isolation of CPR from *Saccharomyces cerevisiae* WR1A2 strain (5 litres/batch), we set up the assay for screening potential samples which could be able to induce CPR for *in vitro* hepatoprotective action. The obtained results from this CPR screening assay showed the similarity to those of other popular antioxidant assays such as DPPH or MDA. The result from our assay showed that the water extract of Phen-den plant had the highest ability to induce CPR supporting the hepatoprotective activities. Also, the water extract, EtOAc extract and total extract exhibited very strong antioxidant activities through DPPH scavenging assay and inhibition of lipid peroxidation with the SC<sub>50</sub> values ranging at 13.84 µg/ml, 37.64 µg/ml, 28.31 µg/ml and the IC<sub>50</sub> values ranging at 5.99 µg/ml, 4.77 µg/ml, 27.58 µg/ml, respectively.

**Keywords:** cytochrome P450, DPPH, enzyme CPR, *in vitro*, lipid peroxidation, *Phyllanthus reticulatus* Poir