

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG DỊ ỨNG CỦA PICEATANNOL TỪ QUẢ SIM (*RHODOMYRTUS TOMENTOSA*)

Võ Thanh Sang¹, Nguyễn Hoàng Nhật Minh¹, Ngô Xuân Quảng², Phạm Ngọc Hoài³, Bạch Long Giang¹, Lê Văn Minh⁴, Nguyễn Hữu Hùng², Nguyễn Lương Hiếu Hòa¹, Ngô Đại Hùng^{3,✉}

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Thủ Dầu Một, thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương

⁴Trung tâm Sâm và dược liệu thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hungnd@tdmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.6.2020

Ngày nhận đăng: 20.9.2020

TÓM TẮT

Piceatannol được biết đến như là một hoạt chất có nhiều hoạt tính sinh học như kháng ung thư, kháng tiểu đường, kháng oxi hóa, kháng viêm và kháng béo phì. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim ở Phú Quốc được khảo sát thông qua mô hình thí nghiệm dưỡng bào RBL-2H3. Piceatannol được tách chiết thông qua các hệ dung môi khác nhau trên hệ thống sắc ký cột silica gel và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và được nhận diện dựa theo phương pháp phổ khối lượng và cộng hưởng từ hạt nhân. Quá trình thoát bọng của dưỡng bào được khảo sát thông qua đo hàm lượng β -hexosaminidase giải phóng ra trong môi trường nuôi cấy. Hình thái tế bào được quan sát và mô tả thông qua kính hiển vi soi ngược. Độc tính của chất thử nghiệm được kiểm tra thông qua phương pháp MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Kết quả khảo sát cho thấy piceatannol có thể ức chế đáng kể lên quá trình thoát bọng và làm giảm sự giải phóng của β -hexosaminidase xuống còn 44% tại nồng độ 40 μ M. Thêm vào đó, piceatannol có thể bảo vệ tế bào chống lại sự thay đổi hình thái do tác nhân hoạt hóa calcium ionophore gây ra. Đáng chú ý, piceatannol không gây độc tính đáng kể lên tế bào RBL-2H3 tại đây nồng độ khảo sát 10-40 μ M. Vì vậy, piceatannol từ quả sim rừng Phú Quốc có thể được xem như là một tác nhân kháng dị ứng tiềm năng.

Từ khóa: Dị ứng, dưỡng bào, piceatannol, *Rhodomyrtus tomentosa*, thoát bọng

MỞ ĐẦU

Piceatannol (3, 5, 3', 4'-tetrahydroxystilbene) là một hợp chất thuộc nhóm polyphenol có nhiều trong các loại quả và thực vật như cốt khí củ (*Polygonum cuspidatum*), chanh dây (*Passiflora edulis*), đậu phụng (*Arachis hypogaea*), cây dã bò đào (*Vitis thunbergii*) và cây leo (*Ampelopsis brevipedunculata*) (Kukreja *et al.*, 2013).

Piceatannol được cấu tạo từ 2 vòng phenolic liên kết nhau bởi một liên kết styrene và có khối lượng phân tử là 224,24, không tan trong nước và có độ hấp thụ tối đa tại 322 nm (Piotrowska *et al.*, 2012). Piceatannol cũng có thể được tổng hợp thông qua benzyolphosphonate (Murias *et al.*, 2004) hoặc 3,5-dihydroxyacetophenone (Sun *et al.*, 2010). Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã chứng minh được các hoạt tính sinh học của piceatannol như kháng ung thư, kháng viêm,

kháng tiểu đường và giảm béo phì. Cụ thể, piceatannol ngăn chặn sự xâm lấn và di căn của tế bào ung thư tuyến tiền liệt thông qua ức chế sự biểu hiện của phân tử MMP-9 (Jayasooriya *et al.*, 2013), kích hoạt con đường apoptosis của tế bào gan (Kita *et al.*, 2012), ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư vú (Vo *et al.*, 2010) và ung thư bạch cầu (Szekeres *et al.*, 2008). Thêm vào đó, hoạt tính kháng tiểu đường của piceatannol cũng được chứng minh thông qua làm tăng hấp thụ glucose vào trong tế bào và làm giảm các triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân tiểu đường (Minakawa *et al.*, 2012). Trong một nghiên cứu khác, piceatannol thể hiện hoạt tính chống béo phì thông qua ức chế quá trình biệt hóa nguyên bào mỡ thành tế bào mỡ (Kwon *et al.*, 2012). Ngoài ra, hoạt tính kháng viêm của piceatannol cũng được biết thông qua ức chế sự sản sinh của TNF-alpha, IL-8, và PGE₂ (Richard *et al.*, 2005).

Sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) là một loại cây bụi thuộc họ Myrtaceae, phân bố khắp các vùng Đông Nam Á. Từ lâu, sim đã được sử dụng như là một thành phần trong bài thuốc dân gian có tác dụng ngăn ngừa tiêu chảy, kiết lỵ, dạ dày và làm lành vết thương. Nhiều nghiên cứu gần đây đã xác định sự hiện diện của các hợp chất triterpen, steroid và phenolic trong các bộ phận của cây sim (Vo, Ngo, 2019). Đặc biệt, piceatannol cũng được phát hiện với hàm lượng cao trong hạt của quả sim ở tỉnh Thái Nguyên. Lai và đồng tác giả (2014) đã tối ưu hóa được điều kiện tách chiết piceatannol với hàm lượng 7,18 mg/g mẫu khô từ hạt sim tại nồng độ ethanol 78,8%, nhiệt độ 85,3 °C và thời gian 78,8 min (Lai *et al.*, 2014). Đáng chú ý, việc nghiên cứu hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim vẫn chưa được đánh giá ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu này được triển khai thực hiện nhằm góp phần đánh giá thêm hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim thông qua mô hình thí nghiệm *in vitro*.

Dưỡng bào là một trong những tế bào bạch cầu có chứa nhiều túi bọt trong tế bào chất và đóng vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng dị ứng (Rrown *et al.*, 2008). Dưỡng bào có nhiều thụ thể của kháng thể IgE được biểu hiện

trên bề mặt của tế bào, gọi là FcεRI. Hơn nữa, liên kết chéo của kháng nguyên và kháng thể IgE đặc hiệu cho kháng nguyên đó trên thụ thể FcεRI gây ra đáp ứng dị ứng trong dưỡng bào. Quá trình đáp ứng dị ứng có thể gây ra hiện tượng thoát bọt (degranulation), làm giải phóng nhiều phân tử gây viêm khác nhau như β-hexosaminidase, histamine, cytokine, leukotriene... (Krystel-Whittemore *et al.*, 2015). Các phân tử gây viêm như β-hexosaminidase và histamine được xem như là các chỉ thị của quá trình thoát bọt của dưỡng bào và thường được đo để xác định mức độ thoát bọt của dưỡng bào. Vì vậy, dưỡng bào được sử dụng như là một mô hình thí nghiệm *in vitro* nhằm sàng lọc hoặc chứng minh cơ chế kháng dị ứng của các dược liệu thông qua đo mức độ giải phóng của các phân tử như β-hexosaminidase hoặc histamine và sự biến đổi của các tín hiệu nội bào liên quan đến con đường hoạt hóa thụ thể FcεRI (Vo *et al.*, 2012). Đặc biệt, RBL2H3 là dòng tế bào bạch cầu ưa bazơ được phân lập từ chuột cống và được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Nó có đặc tính như là một dòng dưỡng bào và được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu để sàng lọc và đánh giá hoạt tính kháng dị ứng của hợp chất tự nhiên (Passante, Frankish, 2009). Hoạt tính kháng dị ứng của hợp chất phenolic resveratrol từ vỏ quả nho đỏ đã được chứng minh thông qua khả năng ức chế sự giải phóng của β-hexosaminidase và histamine từ tế bào RBL2H3 (Han *et al.*, 2013). Thêm vào đó, Matsuda và đtg (2004) đã đánh giá hoạt tính kháng dị ứng của các hợp chất stilbenes như piceatannol, 3,5,4'-trimethylpiceatannol và trimethylresveratrol thông qua mô hình tế bào RBL-2H3. Các hợp chất phenolic trên đều có thể ức chế sự giải phóng của β-hexosaminidase, TNF-α và IL-4 từ tế bào RBL-2H3. Trong một nghiên cứu khác, tế bào RBL-2H3 cũng được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng dị ứng của các hợp chất phenolic từ trà xanh như epigallocatechin gallate, epigallocatechin, catechin và epicatechin (Matsuo *et al.*, 2007). Khảo sát đã cho thấy hợp chất epigallocatechin gallate có hoạt tính ức chế tốt nhất đối với sự giải phóng của histamine từ tế bào RBL-2H3. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng dị ứng

của piceatannol từ quả sim cũng được khảo sát dựa trên mô hình tế bào RBL-2H3.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Quả sim được thu mua từ Chợ Dương Đông, Thị trấn Dương Đông, Phú Quốc. Tất cả các hóa chất phục vụ cho nghiên cứu này được mua từ Công ty Sigma-Aldrich (Mỹ).

Quá trình tách chiết piceatannol

Quy trình tách chiết piceatannol từ quả sim được tham khảo theo Mathi và cộng sự (Mathi *et al.*, 2015) với một số điều chỉnh thích hợp. Bột sim được ngâm với ethyl acetat (EtOAc) ở 40 °C trong 24 h theo tỷ lệ 1/8 (w/v) để thu dịch chiết rồi cô quay chân không thu cao chiết (11,2 g). Cao chiết (1 g) được hòa tan trong dung môi ethyl acetat trước khi được nạp vào cột silica gel để tách rửa. Quá trình tách rửa được thực hiện lần lượt với các hệ dung môi hexan-chloroform (10:0 đến 2:8), chloroform-ethyl acetat (10:0 đến 2:8), ethyl acetat-ethanol (10:0 đến 2:8) và ethanol để thu được 16 phân đoạn. Các phân đoạn được tiêm vào cột Supelco (250 x 21,2 mm, 10 µm) của máy HPLC (Shimadzu LC 8A, Japan), sau đó được tách rửa với H₂O-acetonitril (90:10 đến 5:95) và cuối cùng được phát hiện ở bước sóng 360 nm để xác định phân đoạn nào chứa hoạt chất piceatannol với hàm lượng cao. Phân đoạn chứa piceatannol được cô quay chân không để đuổi dung môi và tiếp tục được tiêm vào máy sắc ký điều chế để thu được piceatannol dạng tinh khiết. Các chất này được nhận diện chính xác cấu trúc bằng phổ MS (MicrOTOF QII Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Bremen, Đức) và phổ NMR ¹³C và ¹H (Bruker, 20251 Hamburg, Đức).

Nuôi cấy tế bào

Dưỡng bào RBL-2H3 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Hàn Quốc) được nuôi cấy bằng môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bò bất hoạt và 1% penicillin G (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL) và được duy trì trong tủ ủ có 5% CO₂ ở 37 °C (Vo *et al.*, 2011).

Khảo sát độc tính của piceatannol

Độc tính của piceatannol đối với dưỡng bào RBL-2H3 được khảo sát theo phương pháp MTT (Husøy *et al.*, 1993). Dưỡng bào RBL-2H3 (2x10⁵ tế bào/mL) được ủ với piceatannol (10, 20, và 40 µM) trong 24 h. Tế bào sau đó được ủ với dung dịch MTT (0,5 mg/mL) trong 4 tiếng trước khi bổ sung 100 µL DMSO. Mật độ quang của hỗn hợp được đo tại bước sóng 540 nm. Tỷ lệ tế bào sống sót được xác định dựa theo mẫu chứng âm (không được ủ với piceatannol).

Khảo sát quá trình thoát bọng (degranulation)

Mức độ giải phóng của β-hexosaminidase được xem như là dấu hiệu của thoát bọng ở dưỡng bào và được đo như mô tả của Vo và đtg (2011). Dưỡng bào RBL-2H3 (2x10⁵ tế bào/mL) được ủ với piceatannol (10, 20, và 40 µM) trong 24 h và môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bởi dung dịch đệm Tyrode trước khi được kích thích với calcium ionophore (1 µM) trong 30 min ở 37 °C. Dịch nuôi cấy (50 µL) được ủ với 50 µL dung dịch p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (1 mM) trong 1 h tại 37 °C. Sau cùng, 250 µL dung dịch đệm cacbonat (pH10) được thêm vào và độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 410 nm. Phần trăm thoát bọng được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ thoát bọng} = \frac{[(OD_t - OD_b)/(OD_c - OD_b)] * 100}{}$$

Trong đó, OD_t, OD_b, và OD_c lần lượt là mật độ quang của mẫu thử, mẫu trắng và mẫu chứng.

Khảo sát hình thái tế bào

Tế bào RBL-2H3 được cấy vào đĩa 24 giếng với mật độ 1x10⁴ tế bào/mL trước khi được ủ với piceatannol (40 µM) trong 24 h. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bởi dung dịch đệm tyrode và được kích thích bởi calcium ionophore (1 µM) trong 30 min ở 37 °C. Hình thái của tế bào được chụp lại dưới kính hiển vi soi ngược ở độ phóng đại x10 (CTR 6000, Leica, Wetzlar, Đức).

Phân tích thống kê

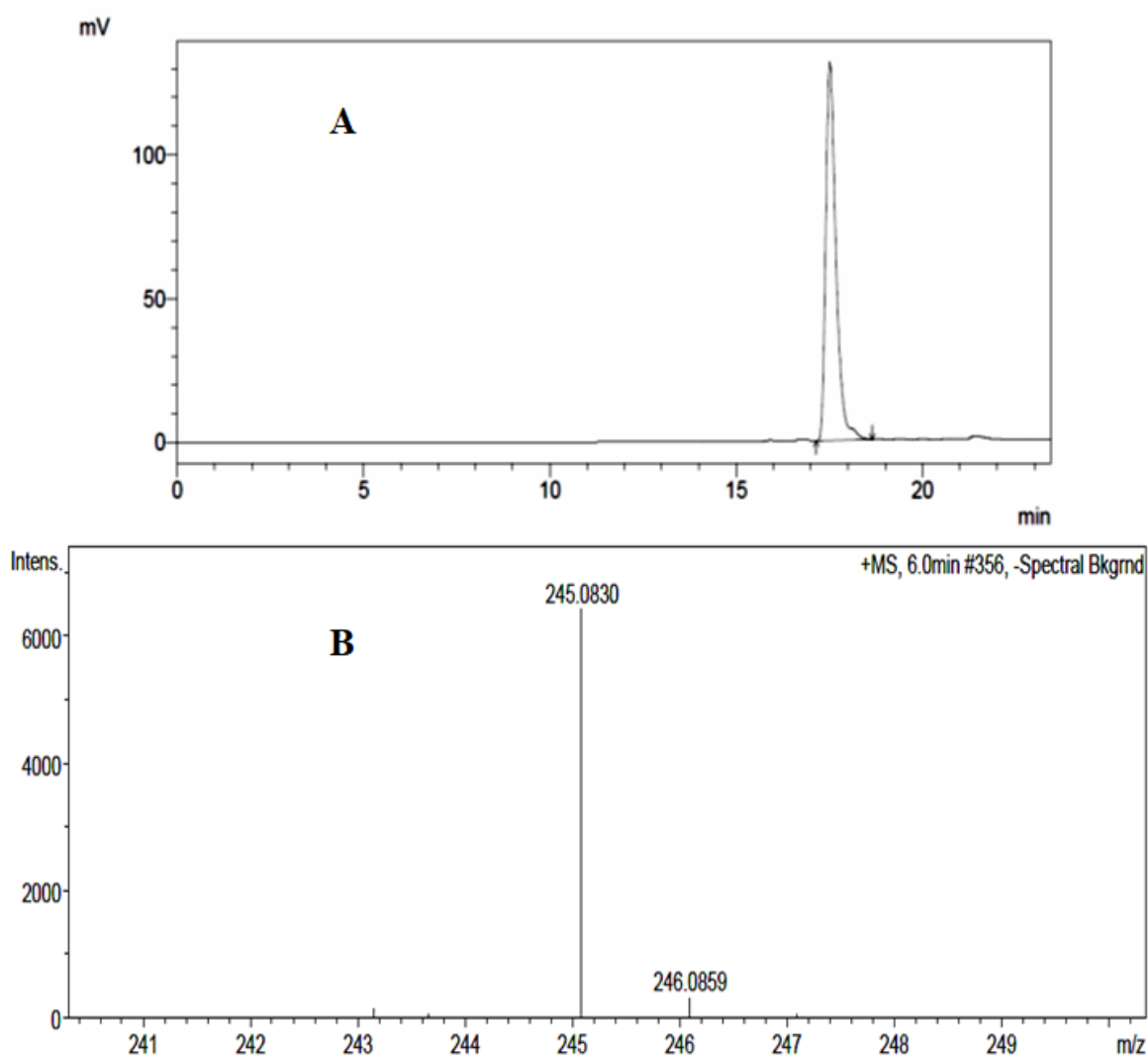
Dữ liệu được phân tích dựa vào Pair sample T test của SPSS. Sự khác nhau có tính thống kê giữa các nhóm được xem là đáng kể tại giá trị $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

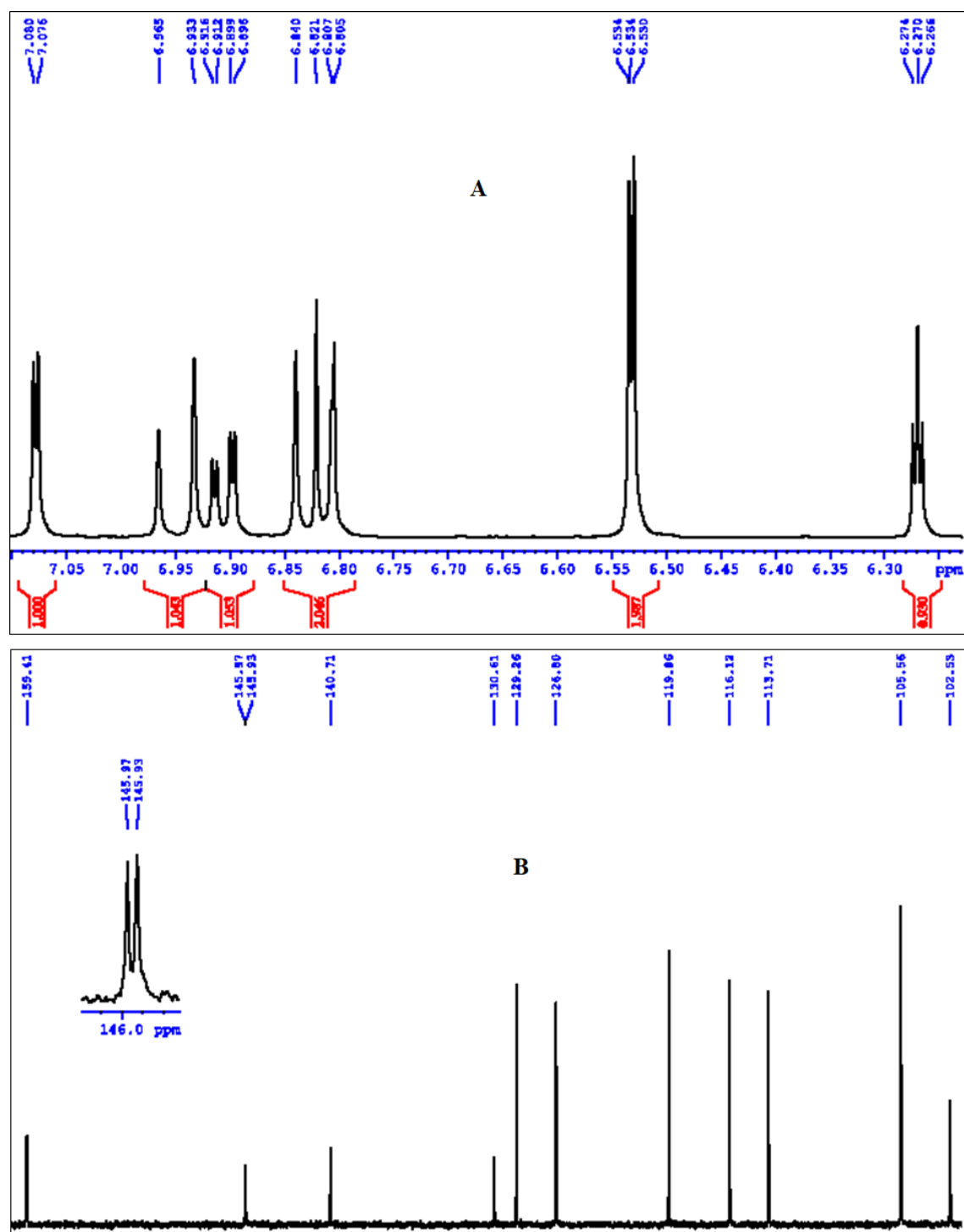
Kết quả tách chiết hợp chất piceatannol

Xuất phát từ cao chiết ethyl acetat, 16 phân

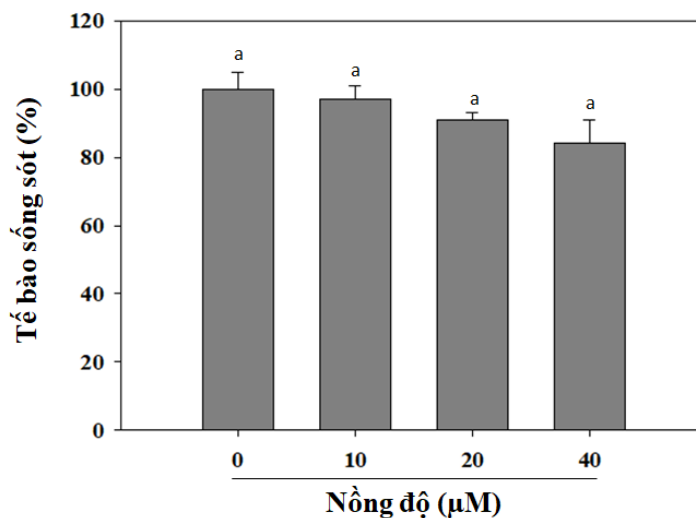
đoạn nhỏ được thu nhận thông qua quá trình chạy cột silica gel và tách rửa bởi các hệ dung môi khác nhau. Thông qua hệ thống HPLC, phân đoạn chloroform/ethyl acetat với tỉ lệ 6/4 (v/v) được xác định là có chứa hàm lượng piceatannol cao. Piceatannol dạng tinh khiết (25,2 mg) được thu nhận thông qua hệ thống sắc ký điều chế. Cấu trúc khối phổ MS và NMR của piceatannol được trình bày trong Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Thời gian lưu (A) và khối phổ MS (B) của piceatannol.



Hình 2. Phổ NMR ^1H (A) và ^{13}C (B) của piceatannol.



Hình 3. Ảnh hưởng của piceatannol đến khả năng sống sót của tế bào RBL-2H3. Dưỡng bào RBL-2H3 (2×10^5 tế bào/mL) được ủ với piceatannol (10, 20, và 40 μM) trong 24 h. Tế bào sau đó được ủ với dung dịch MTT (0,5 mg/mL) trong 4 tiếng trước khi bổ sung 100 μL DMSO. Mật độ quang của hỗn hợp được đo tại bước sóng 540 nm. Chữ cái giống nhau “a” biểu thị không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p < 0,05$).

Kết quả khảo sát độc tính của piceatannol

Trong các mô hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các hợp chất tự nhiên, việc kiểm tra thêm về độc tính của chất thử nghiệm lên đối tượng nghiên cứu là cần thiết. Thử nghiệm này nhằm xác nhận rằng hợp chất nghiên cứu tại nồng độ khảo sát không ảnh hưởng đến kết quả khảo sát. Trong nghiên cứu này, độc tính của piceatannol tại các nồng độ 10, 20 và 40 μM được khảo sát trên dòng tế bào RBL-2H3 theo phương pháp MTT (Edmondson *et al.*, 1998). Tế bào RBL-2H3 được ủ với piceatannol tại các nồng độ 10, 20 và 40 μM trong 24 h ở 37 °C và mức độ sống sót của tế bào sau khi ủ sẽ phản ánh được mức độ độc tính của chất thử nghiệm. Kết quả khảo sát cho thấy piceatannol không thể hiện độc tính đáng kể lên dòng tế bào RBL-2H3 tại các nồng độ xử lý của 10, 20 và 40 μM . Mức độ sống sót của tế bào đạt được trong khoảng từ 84% đến 97% (Hình 3). Điều đó cho thấy rằng, việc ủ tế bào RBL-2H3 với piceatannol tại các nồng độ 10, 20 và 40 μM trong 24 h không làm ảnh hưởng đáng kể đến quá trình khảo sát hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol. Tương tự như vậy, Ko và đtg (2013) cũng cho thấy rằng piceatannol từ Công ty Sigma-Aldrich (Mỹ) thể hiện độc tính không

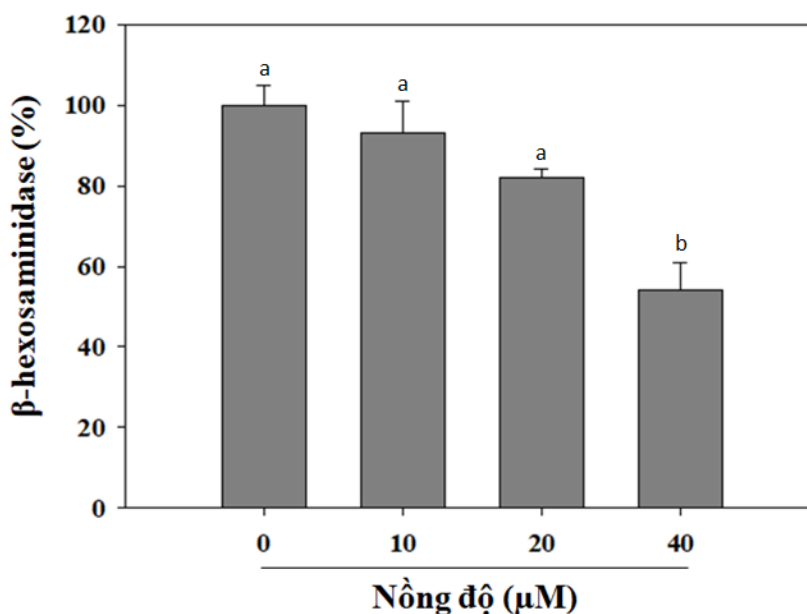
đáng kể đối với tế bào RBL-2H3 ngay cả ở nồng độ 100 μM .

Kết quả khảo sát quá trình thoát bọng của dưỡng bào

Các nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy rằng dưỡng bào đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của phản ứng viêm dị ứng (Amin, 2012). Sự hoạt hóa của dưỡng bào khởi nguồn cho nhiều chuỗi phản ứng xảy trong tế bào mà đặc biệt là quá trình thoát bọng (Galli *et al.*, 2008). Quá trình thoát bọng dẫn đến sự giải phóng của nhiều yếu tố gây viêm dị ứng như histamine, β -hexosaminidase, leukotrien, prostaglandin và cytokine. Vì vậy, việc ức chế quá trình thoát bọng sẽ góp phần đáng kể đến sự thuyên giảm của đáp ứng dị ứng như ngứa, sổ mũi, khó thở ở bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế của piceatannol lên quá trình thoát bọng được khảo sát thông qua xác định hàm lượng giải phóng của β -hexosaminidase từ tế bào RBL-2H3. Kết quả khảo sát cho thấy piceatannol có thể làm giảm sự giải phóng của β -hexosaminidase theo nồng độ xử lý (Hình 4). Cụ thể, β -hexosaminidase giảm xuống còn 83% đến 68% và 44% tại lần lượt các nồng độ 10, 20 và 40 μM của piceatannol. Tương

tự như vậy, Ko và đtg (2013) cũng chứng minh được rằng piceatannol từ Sigma-Aldrich (Mỹ) có thể làm giảm hàm lượng β -hexosaminidase giải phóng ra từ RBL-2H3 xuống còn 75% tại nồng

độ 50 μ M. Theo như trên, piceatannol từ quả sim có thể góp phần làm giảm đáng kể quá trình thoát bọng của dưỡng bào tại nồng độ không gây độc tính tế bào.

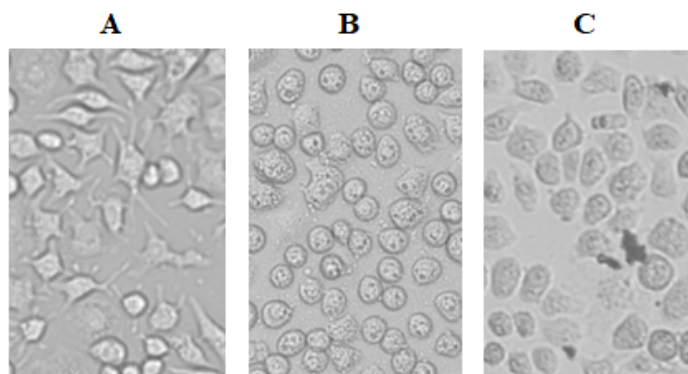


Hình 4. Hoạt tính ức chế của piceatannol đối với sự giải phóng của β -hexosaminidase từ dưỡng bào RBL-2H3. Các chữ cái khác nhau "a-b" biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p < 0,05$).

Kết quả khảo sát hình thái tế bào

Dưỡng bào chứa nhiều túi bọng trong tế bào chất để lưu trữ các chất gây viêm dị ứng. Khi dưỡng bào được hoạt hóa, các túi bọng trượt dần đến màng tế bào chất nhờ hệ thống vi ống (microtubule), sau đó dung hợp với màng tế bào chất và giải phóng các chất lưu trữ trong túi bọng ra bên ngoài dưỡng bào (Nishida *et al.*, 2005). Đáng chú ý, quá trình thoát bọng của dưỡng bào thường làm thay đổi màng tế bào và hình thái tế bào (Deng *et al.*, 2009). Để xác nhận khả năng ức chế của piceatannol đối với quá trình thoát bọng của dưỡng bào, hình thái của tế bào RBL-2H3 trong các nghiệm thức khác nhau được khảo sát dưới kính hiển vi soi ngược. Kết quả khảo sát cho thấy hình thái tế bào trong điều kiện bình thường có phân nhánh với viền khung màng tế bào sắc nét và rõ ràng (Hình 5A). Ngược lại, dưỡng bào trong điều kiện bị hoạt hóa bởi calcium ionophore trở nên

co cụm thành tế bào có hình tròn với kích thước nhỏ hơn so với lúc bình thường, biến dạng màng tế bào và xuất hiện nhiều đốm li ti trên bề mặt tế bào như là kết quả của quá trình thoát bọng (Hình 5B). Trong khi đó, hình thái của tế bào được ủ với piceatannol trước khi được hoạt hóa bởi calcium ionophore lại thay đổi không đáng kể so với nhóm tế bào bình thường (Hình 5C). Điều đó đã xác nhận rằng piceatannol có thể góp phần bảo vệ dưỡng bào chống lại quá trình hoạt hóa và thoát bọng, giúp hình thái tế bào không thay đổi đáng kể dưới tác động của chất hoạt hóa calcium ionophore. Theo nghiên cứu của Taur và Patil (2011), các hợp chất kháng dị ứng thuộc nhóm phenolic có thể làm bền màng tế bào, dẫn đến ngăn cản được quá trình thoát bọng ở dưỡng bào. Điều đó có thể đề xuất rằng hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol có thể xuất phát từ việc làm bền màng tế bào, dẫn đến làm suy yếu quá trình thoát bọng của dưỡng bào.



Hình 5. Hình thái tế bào RBL-2H3 ở độ phóng đại x10 (CTR 6000, Leica, Wetzlar, Đức). (A) Tế bào bình thường; (B) Tế bào được kích thích bởi calcium ionophore; (C) Tế bào được ủ với piceatannol trước khi được kích thích bởi calcium ionophore

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim đã được đánh giá trên mô hình dưỡng bào. Hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol được chứng minh thông qua khả năng ức chế quá trình thoát bọt và làm giảm sự giải phóng của β -hexosaminidase từ tế bào RBL-2H3. Đáng chú ý, piceatannol thể hiện hoạt tính cao tại nồng độ không gây độc tính cho tế bào thử nghiệm. Như vậy, piceatannol từ quả sim có thể được đề xuất để ứng dụng như là một thành phần quan trọng trong việc phát triển các sản phẩm có vai trò trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị dị ứng. Tuy nhiên, các nghiên cứu bổ sung liên quan đến hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim cần được mở rộng thực hiện thêm trên các mô hình thí nghiệm khác trước khi đưa vào ứng dụng thực tiễn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) dưới mã số 106-NN.02-2016.68.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amin K (2012) The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 106(1): 9-14, 2012.

Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD (2008) The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis

and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* 38(1): 4-18.

Deng Z, Zink T, Chen HY, Walters D, Liu FT, Liu GY (2009) Impact of actin rearrangement and degranulation on the membrane structure of primary mast cells: a combined atomic force and laser scanning confocal microscopy investigation. *Biophys J* 96(4): 1629-1639.

Edmondson JM, Armstrong LS, Martiner AO (1998) A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J Tissue Cult Methods* 11: 15-17.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008) The development of allergic inflammation. *Nature* 454(7203): 445-454.

Han SY, Bae JY, Park SH, Kim YH, Park JHY, Kang YH (2013) Resveratrol inhibits ige-mediated basophilic mast cell degranulation and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *J Nutr* 143(5): 632-639.

Husøy T, Syversen T, Jenssen J (1993) Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicol In Vitro* 7(2): 149-154.

Jayasooriya Rgpt, Lee YG, Kang CH, Lee KT, Choi Yh, Park SY, Hwang JK, Kim GY (2013) Piceatannol inhibits MMP-9-dependent invasion of tumor necrosis factor- α -stimulated DU145 cells by suppressing the Akt-mediated nuclear factor- κ B pathway. *Oncol Lett* 5(1): 341-347.

Kita Y, Miura Y, Yagasaki K (2012) Antiproliferative and anti-invasive effect of

- piceatannol, a polyphenol present in grapes and wine, against hepatoma AH109A cells. *BioMed Res Int* 2012(672416): 1-7.
- Ko YJ, Kim HH, Kim EJ, Katakura Y, Lee WS, Kim GS, Ryu CH (2013) Piceatannol inhibits mast cell-mediated allergic inflammation. *Int J Mol Med* 31(4): 951-958.
- Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG (2015) Mast cell: a multi-functional master cell. *Front Immunol* 6(620): 1-12.
- Kukreja A, Mishra A, Tiwari A (2013) Source, production and biological activities of piceatannol: a review. *Int J Pharm Sci* 4(10): 3738-3745.
- Kwon JY, Seo SG, Heo YS, Yue S, Cheng JX, Lee KW, Kim KH (2012) Piceatannol, a natural polyphenolic stilbene, inhibits adipogenesis via modulation of mitotic clonal expansion and insulin receptor-dependent insulin signaling in the early phase of differentiation. *J Biol Chem* 287(14): 11566-11578.
- Lai TNH, André CM, Chirinos R, Nguyen TBT, Larondelle Y, Rogez H (2014) Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology. *Sep Purif Technol* 134: 139-146.
- Mathi P, Das S, Nikhil K, Roy P, Yerra S, Ravada SR, Bokka VR, Botlagunta M (2015) Isolation and characterization of the anticancer compound piceatannol from *Sophora interrupta* bedd. *Int J Prev Med* 6(101): 1-10.
- Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Yoshikawa M (2004) Anti-allergic activity of stilbenes from Korean Rhubarb (*Rheum Undulatum* L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF-alpha and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem* 12(18): 4871-4876.
- Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M (1997) Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 52: 58-64.
- Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K (2012) Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 422(3): 469-475.
- Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Szekeres T, Jäger W (2004) Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem* 12(21): 5571-5578.
- Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, Kabu K, Hattori K, Tezuka T, Nishizumi H, Kitamura D, Goitsuka R, Geha RS, Yamamoto T, Yagi T, Hirano T (2005) Fc{epsilon}RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol* 170(1): 115-126.
- Passante E, Frankish N (2009) The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res* 58 (11): 737-745.
- Piotrowska H, Kucinska M, Murias M (2012) Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res* 750(1): 60-82.
- Richard N, Porath D, Radspieler A, Schwager J (2005) Effects of resveratrol, piceatannol, triacetoxystilbene, and genistein on the inflammatory response of human peripheral blood leukocytes. *Mol Nutr Food Res* 49(5): 431-442.
- Sun HY, Xiao CF, Cai YC, Chen Y, Wei W, Liu XK, Lv ZL, Zou Y (2010) Efficient synthesis of natural polyphenolic stilbenes: Resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol. *Chem Pharm Bull* 58(11): 1492-1496.
- Szekeres MF, Savinc I, Horvath Z, Saiko P, Pemberger M, Graser G, Bernhaus A, Kozma MO, Grusch M, Jaeger W (2008) Biochemical effects of piceatannol in human HL-60 promyelocytic leukemia cells-Synergism with Ara-C. *Int J Oncol* 33(4): 887-892.
- Taur D, Patil R (2011) Mast cell stabilizing and anti-allergic activity of *Abrus precatorius* in the management of asthma. *Asian Pac J Trop Med* 4(1): 46-49.
- Vo NT, Madlener S, Bago-Horvath Z, Herbacek I, Stark N, Gridling M, Probst P, Giessrigl B, Bauer S, Vonach C (2010) Pro- and anticarcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose dependently in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31(12): 2074-2081.
- Vo TS, Kong CS, Kim SK (2011) Inhibitory effects

of chito oligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Carbohydr Polym* 84(1): 649-655.

Vo TS, Ngo DH (2019) The health beneficial properties of *Rhodomyrtus tomentosa* as potential

functional food. *Biomolecules* 9(76): 1-16.

Vo TS, Ngo DH, Kim SK (2012) Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochem* 47(3): 386-394.

INVESTIGATION OF ANTI-ALLERGIC ACTIVITY OF PICEATANNOL FROM *RHODOMYRTUS TOMENTOSA* FRUITS

Vo Thanh Sang¹, Nguyen Hoang Nhat Minh¹, Ngo Xuan Quang², Pham Ngoc Hoai³, Bach Long Giang¹, Le Van Minh⁴, Nguyen Huu Hung², Nguyen Luong Hieu Hoa¹, Ngo Dai Hung³

¹Nguyen Tat Thanh Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City

²Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Thu Dau Mot University, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province

⁴Research Center of Ginseng and Medicinal Materials (CGMM), National Institute of Medicinal Materials, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Piceatannol is a naturally occurring polyphenolic stilbene found in various fruits and vegetables. It has been reported to possess various pharmaceutical properties and health benefit effects such as anticancer, antidiabetes, antioxidant, anti-inflammation, and anti-obesity activities. Recently, *Rhodomyrtus tomentosa* fruits have been determined to contain a large amount of piceatannol. In this study, piceatannol was extracted and isolated from *R. tomentosa* fruits collected from Phu Quoc district. Moreover, the anti-allergic activity of piceatannol was investigated using RBL-2H3 cells as an *in vitro* experimental model. Firstly, piceatannol was isolated from ethyl acetate extract of *R. tomentosa* fruit powder via using a column chromatography and high performance liquid chromatography eluted by several types of binary solvent systems with different polarity. Subsequently, the characterization of the isolated compound was identified by using the mass spectrometer and nuclear magnetic resonance methods. The degranulation of mast cells was examined via measuring the release of β -hexosaminidase in the culture supernatant. Moreover, observation of cell morphology was conducted under the inverted microscope as the RBL-2H3 cells treated with 40 μ M of piceatannol. In addition, the cytotoxic effect of piceatannol at the concentration treatment of 40 μ M was also tested via MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. As the result, piceatannol treatment significantly inhibited the mast cell degranulation via reducing the β -hexosaminidase release to 44% at the concentration of 40 μ M. Moreover, piceatannol exhibited the protective effect against calcium ionophore-induced morphological change of the RBL-2H3 cells. Notably, no significant cytotoxic effect at the concentration treatment up to 40 μ M of piceatannol was observed on RBL-2H3 cells. Therefore, piceatannol from the *R. tomentosa* fruits could be suggested as a potential anti-allergic agent for future therapeutics.

Keywords: Allergy, degranulation, mast cells, *Rhodomyrtus tomentosa*, piceatannol