

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Lê Thị Viên

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH GÂY
ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI
HUỆ BIỂN *CAPILLASTER MULTIRADIATUS* (LINNAEUS,
1758) VÀ *COMANTHUS DELICATA* (AH CLARK, 1909)
Ở VÙNG BIỂN VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9.42.01.16

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2023

Công trình được hoàn thành tại: - Học Viện Khoa học và Công nghệ
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

- Viện Công nghệ sinh học

- Viện Hóa sinh biển

Người hướng dẫn khoa học 1: GS.VS. Châu Văn Minh

Cơ quan công tác: Viện Hóa sinh biển

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Xuân Cường

Cơ quan công tác: Viện Hóa sinh biển

Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Quang Huy

Phản biện 2: GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

Phản biện 3: PGS. TS. Trần Thu Hương

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ , ngày tháng năm 2023.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

- Viện Công nghệ sinh học

MỞ ĐẦU

Các đại dương bao phủ hơn 70% tổng diện tích của bề mặt trái đất và chiếm tới 90% không gian sinh sống của hành tinh. Nhiều quốc gia trên thế giới đã khai thác các chất có hoạt tính sinh học từ sinh vật biển nhằm phục vụ nghiên cứu tìm kiếm các loại thuốc chữa trị bệnh hiểm nghèo, đặc biệt là các bệnh phổ biến như ung thư và viêm. Hai căn bệnh đang có xu hướng gia tăng theo hàng năm, cướp đi sinh mạng của hàng triệu người trên thế giới mỗi năm. Cho đến nay nhiều hoạt chất bắt nguồn từ sinh vật biển đã được phát triển thành thuốc và cấp phép lưu hành điển hình như Ara-C, Trabectedin chữa ung thư; Ara-A điều trị bệnh Herpes, Ziconotide làm thuốc giảm đau... Ngoài ra còn có nhiều hoạt chất hiện đang được nghiên cứu lâm sàng và sẽ sớm có mặt trên thị trường. Để có được kết quả này, các viện nghiên cứu hàng đầu trên thế giới đã thử nghiệm, tìm kiếm, sàng lọc hoạt tính sinh học của hàng triệu hợp chất từ các loài sinh vật biển, đồng thời chi nhiều triệu đô la cũng như đầu tư thời gian cho các giai đoạn nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng.

Các động vật Da gai (Echinoderm) trong đó có huệ biển phân bố khá phổ biến ở nhiều vùng biển trên toàn thế giới, đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm vì đối tượng này vẫn còn khá mới mẻ. Khoảng 25 loài huệ biển thuộc 16 chi từ lớp huệ biển được nghiên cứu trên tổng số 190 loài và chi được chấp nhận. Việt Nam thuộc vùng Thái Bình Dương có tới trên 3.260 km đường bờ biển và các vịnh, đảo rộng lớn là khu vực rất phong phú các loài sinh vật biển. Đây chính là tiềm năng, lợi thế của nước ta so với nhiều nước khác để tìm kiếm, nghiên cứu các hợp chất tiềm năng từ biển cả. Hiện có khoảng 60 loài huệ biển ở Việt Nam, tuy vậy vẫn chưa có

một công trình nghiên cứu khoa học nào về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của huệ biển được công bố.

Do đó, đề tài: “*Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758) và *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909) ở vùng biển Việt Nam*” được lựa chọn tiến hành.

Mục tiêu của luận án:

- Xác định được thành phần hóa học của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu thập tại vùng biển Việt Nam.
- Tìm kiếm các chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm có trong các loài nghiên cứu để ứng dụng vào nghiên cứu dược học.

Nội dung luận án bao gồm:

1. Phân lập các hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* ở vùng biển Việt Nam sử dụng các phương pháp sắc ký
2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu ở vùng biển Việt Nam
3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được
4. Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Bao gồm tổng quan giới thiệu về các hợp chất thiên nhiên, hoạt tính chống ung thư và kháng viêm, đặc điểm chung của loài huệ biển; các hợp chất điển hình từ các loài huệ biển và hoạt tính sinh học của chúng.

1.1. Sơ lược về các hợp chất thiên nhiên

1.1.1. Phân loại các hợp chất thiên nhiên

1.1.2. Hợp chất thiên nhiên biển và các thuốc bắt nguồn từ sinh vật biển

1.2. Giới thiệu chung về ung thư

1.2.1. Ung thư và các phương pháp điều trị ung thư

1.2.2. Mối liên hệ giữa apoptosis và ung thư

1.3. Giới thiệu về bệnh viêm

1.3.1. Cơ chế của quá trình viêm

1.3.2. Các yếu tố chính tham gia vào quá trình viêm

1.3.3. Ước chế sự biểu hiện iNOS và COX2 trong nghiên cứu hoạt tính kháng viêm

1.4. Giới thiệu chung về huệ biển

1.4.1. Cấu tạo cơ thể

1.4.2. Sinh sản và phát triển

1.4.3. Hoạt tính sinh học các hợp chất điển hình từ các loài huệ biển

Tổng quan các công trình nghiên cứu có thể thấy huệ biển chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học quý giá. Lớp chất chủ yếu từ loài huệ biển là các anthraquinone và naphthopyrone với tác dụng chống ung thư và kháng viêm tiềm năng. Loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* đã được nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của một số hợp chất, tuy nhiên, ở Việt Nam cho tới nay chưa có một công trình nghiên cứu nào về loài này được công bố. Loài huệ biển *Comanthus delicata* theo như tra cứu tài liệu tham khảo thì cả trong và ngoài nước đều chưa có công bố khoa học nào về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học. Do đó, nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài này

sẽ đóng góp cơ sở dữ liệu khoa học cho những định hướng ứng dụng tiếp theo.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

Mẫu huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758) được thu thập tại Sơn Trà, Đà Nẵng vào tháng 8 năm 2016.



Hình 2.1. Huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

2.1.2. Loài huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)



Hình 2.2. Huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

Mẫu huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909) được thu thập tại Vân Phong, Khánh Hòa vào tháng 7 năm 2020.

Tên khoa học của các loài trên được GS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển giám định.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

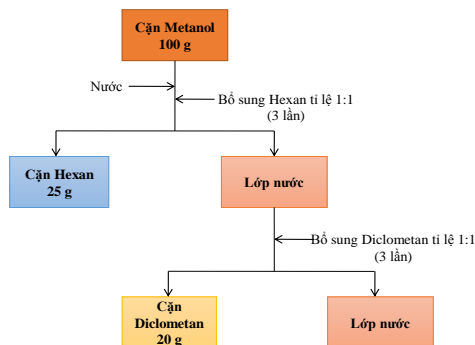
2.2.1. Quy trình xử lý, tạo cặn chiết các mẫu huệ biển

Các mẫu huệ biển thu thập được được rửa sạch với nước để loại bỏ cát, vật bám sau đó thấm khô bằng giấy thấm. Phần mẫu làm tiêu bản được cố định trong cồn 96% để trong lọ nhựa, nút kín. Phần còn lại tiến hành đông khô mẫu bằng thiết bị đông khô mẫu.

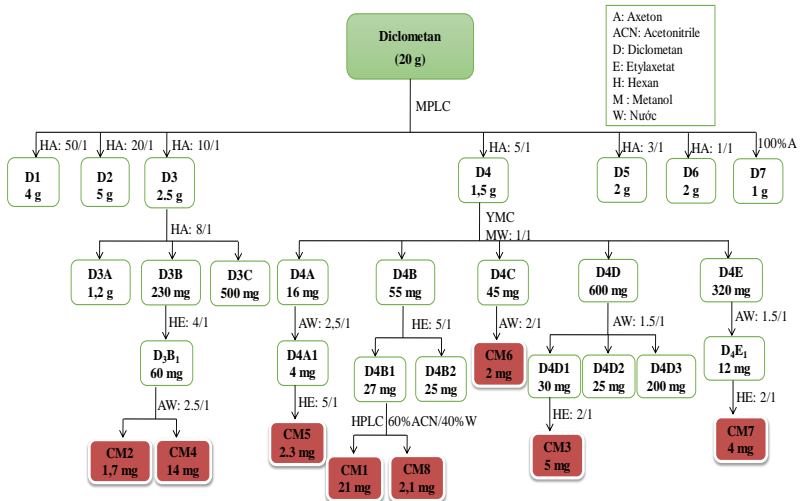
Mẫu huệ biển khô sau đó tiến hành cắt nhỏ, ngâm chiết 3 lần với methanol trên thiết bị siêu âm. Dịch chiết từng mẫu cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn chiết methanol. Cặn chiết MeOH tổng của mẫu nghiên cứu được hòa vào nước cất rồi tiến hành chiết phân bố lỏng-lỏng với các dung môi hữu cơ kém tan vào nước và tăng dần độ phân cực từ hexan, chloroform, etyl axetat.

2.2.2. Quy trình phân lập các hợp chất

2.2.2.1. Phân lập các hợp chất từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*

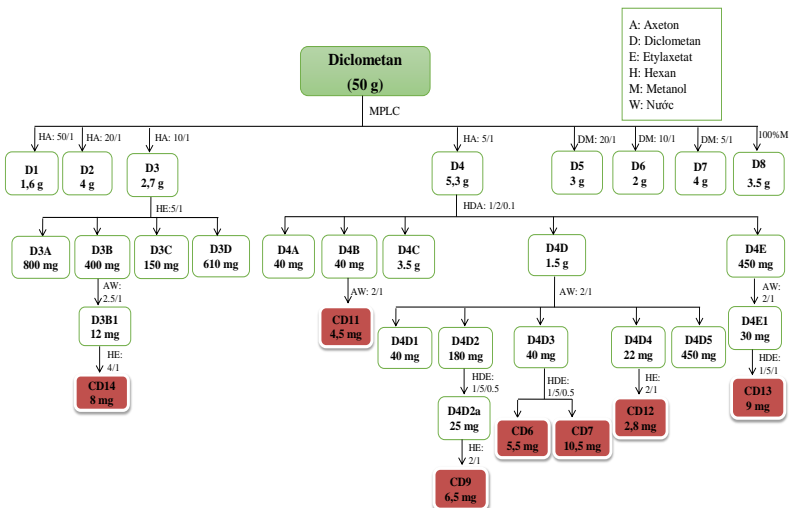


Hình 2.3. Sơ đồ chiết phân lớp mẫu *Capillaster multiradiatus*



Hình 2.4. Sơ đồ phân tích các hợp chất từ phần Diclofenac mẫu
 huệ biển *Capillaster multiradiatus*

2.2.2.2. Phân lập các hợp chất từ huệ biển *Comanthus delicata*



Hình 2.6. Sơ đồ phân tích các hợp chất từ phân đoạn D3, D4 mẫu
 huệ biển *Comanthus delicata*

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Sử dụng kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ khối lượng phân giải cao, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều, phổ lưỡng sắc tròn...

2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

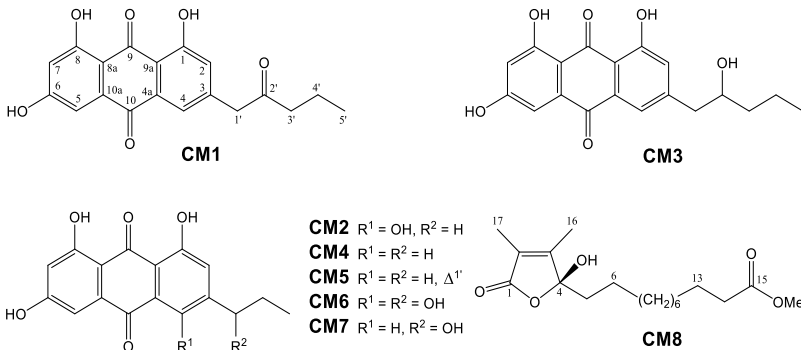
2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

3.1.1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*

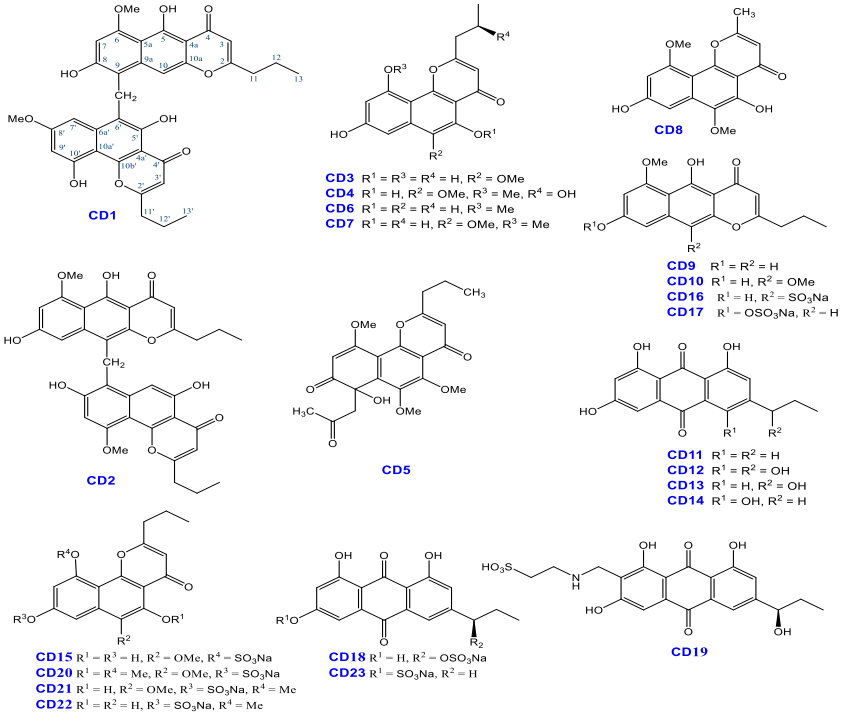
Dùng các phương pháp sắc ký, từ dịch chiết loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* 08 hợp chất được làm sạch và chứng minh cấu trúc như Hình 3.1.



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*

3.1.2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Comanthus delicata*

Dùng các phương pháp sắc ký kết hợp, 23 hợp chất sạch đã được làm sạch từ dịch chiết mẫu huệ biển *Comanthus delicata* như Hình 3.2.



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển *Comanthus delicata*

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

3.2.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Kết quả cho thấy chỉ có **CM2** và **CM5** có hoạt tính gây độc tế bào trên cả 05 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Các hợp chất khác không có biểu hiện hoạt tính ở nồng độ đã được thử nghiệm.

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Mẫu thử	IC ₅₀ (μM)				
	KB	SK-Mel-2	HepG2	LNCaP	MCF7
CM1	-	-	-	-	-
CM2	49,13±2,52	53,68±2,51	79,86±6,67	73,97±4,71	65,75±3,02
CM3	-	-	-	-	-
CM4	-	-	-	-	-
CM5	86,38±5,02	86,65±4,86	98,68±6,48	86,30±5,16	90,87±3,61
CM6	-	-	-	-	-
CM7	-	-	-	-	-
CM8	-	-	-	-	-
Ellipticine*	1,62±0,24	1,38±0,08	1,54±0,08	1,38±0,08	1,67±0,12

*: đối chứng dương; "-": không có hoạt tính

3.2.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Kết quả Bảng 3.2 cho thấy **CD1** và **CD4** có hoạt tính gây độc tế bào trên cả 05 dòng tế bào ung thư thử nghiệm; các hợp chất **CD2**, **CD7**, **CD8**, **CD10** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 2 tế bào ung thư thử nghiệm SK-Mel-2 và MCF7; các hợp chất **CD19**, **CD20**, **CD21**, **CD22** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm SK-Mel-2 và LNCaP; các hợp chất **CD3**, **CD5**, **CD6**, **CD9**, **CD15**, **CD16**, **CD17**, **CD19** chỉ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào chọn lọc trên dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2; hai hợp chất còn lại **CD18** và **CD23** không thể hiện hoạt tính với cả 05 dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Bảng 3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Mẫu thử	IC ₅₀ (µM)				
	KB	SK-Mel-2	HepG2	LNCaP	MCF7
CD1	52,20±6,01	44,45±2,86	55,53±5,16	54,53±1,82	64,28±2,03
CD2	-	11,99±0,69	-	-	14,90±2,25
CD3	-	47,03±2,66	-	-	-
CD4	80,12±3,54	8,51±0,98	79,03±2,29	63,57±2,69	39,98±4,47
CD5	-	38,15±4,24	-	-	-
CD6	-	12,03±0,54	-	-	-
CD7	-	11,68±0,88	-	-	25,76±3,85
CD8	-	10,49±1,25	-	-	84,49±7,24
CD9	-	36,01±2,08	-	-	-
CD10	-	31,46±3,36	-	-	60,26±2,81
CD15	-	76,92±5,85	-	-	-
CD16	-	74,53±7,27	-	-	-
CD17	-	64,78±1,97	-	-	-
CD18	-	-	-	-	-
CD19	-	49,96±1,74	-	-	-
CD20	-	61,98±1,45	-	20,29±2,43	-
CD21	-	70,05±4,62	-	66,16±1,26	-
CD22	-	68,86±4,73	-	54,64±4,14	-
CD23	-	-	-	-	-
Ellipticine*	1,46±0,12	1,22±0,12	1,63±0,16	1,67±0,16	1,42±0,16

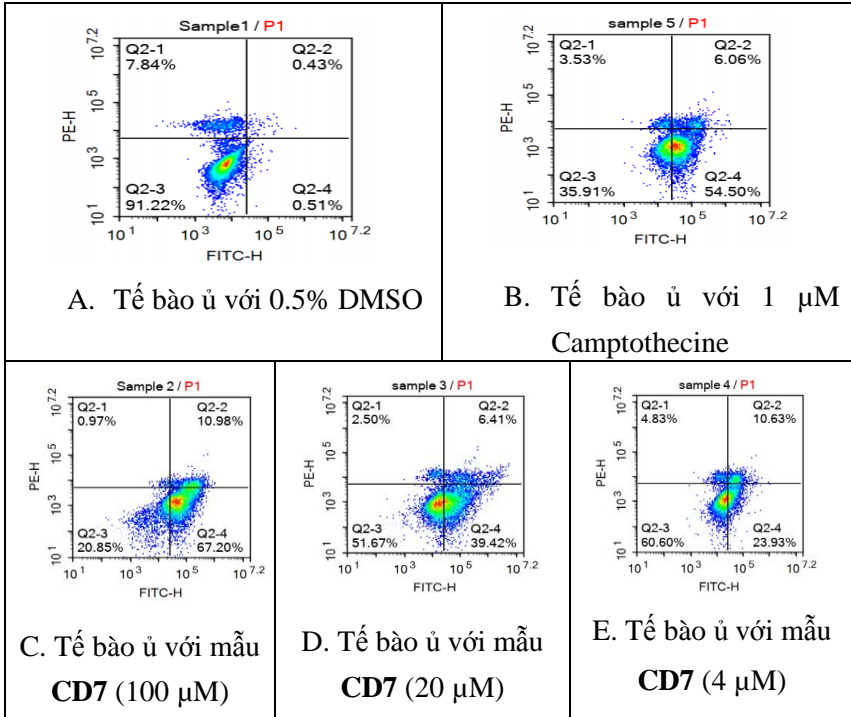
“*”: đối chứng dương; “-”: không có hoạt tính

Các hợp chất **CD11** (trùng **CM4**), **CD12** (trùng **CM6**), **CD13** (trùng **CM7**), **CD14** (trùng **CM2**) là các hợp chất phân lập được từ

loài *Capillaster multiradiatus* đã được đánh giá và trình bày ở mục 3.2.1.

3.2.3. Nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư của CD7

3.2.3.1. Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào SK-Mel-2 của CD7



Hình 3.3. Tác động của CD7 đến apoptosis ở tế bào SK-Mel-2 thông qua Kit Annexin V-FITC và PI (Trục x thể hiện mức độ nhuộm màu FITC- Annexin V, trục y thể hiện mức độ nhuộm màu PI theo đơn vị Log)

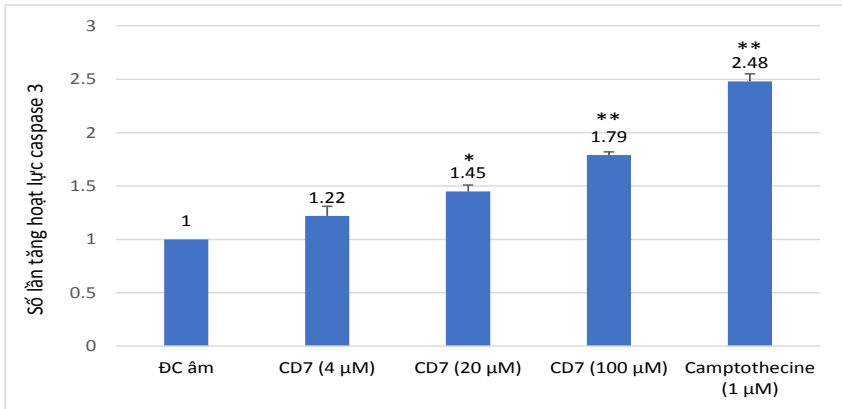
Bảng 3.3. Tỷ lệ các loại tế bào apoptosis dưới tác động của **CD7** trên dòng tế bào SK-Mel-2

Mẫu thí nghiệm	% tế bào sống	% tế bào apoptosis sớm	% tế bào apoptosis muộn	% tế bào hoại tử
Đối chứng âm	91,22	0,51	0,43	7,84
CD7 (100 μ M)	20,85	67,20	10,98	0,97
CD7 (20 μ M)	51,67	39,42	6,41	2,50
CD7 (4 μ M)	60,60	23,93	10,63	4,83
Camptothecine* (1 μ M)	35,91	54,50	6,06	3,53

“*”: đối chứng dương

Kết quả được trình bày ở Hình 3.3 và Bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ tế bào apoptosis sớm và muộn đã thay đổi dưới tác động của hợp chất **CD7**.

3.2.3.2. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh caspase-3 của **CD7**



Hình 3.4. Khả năng kích thích caspase-3 trong tế bào SK-Mel-2 dưới tác động của **CD7** (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ so với đối chứng âm)

Số lần kích thích tạo ra caspase-3 của **CD7** và các mẫu đối chứng được chỉ ra ở Hình 3.4. Theo đó, **CD7** có khả năng cảm ứng tế bào ung thư da SK-Mel-2 sản sinh caspase-3.

3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

3.3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Ký hiệu chất	Giá trị IC ₅₀ (μM)
CM1	5,89 ± 0,11
CM2	12,02 ± 0,45
CM3	20,89 ± 0,76
CM4	13,18 ± 0,15
CM5	19,05 ± 0,32
CM6	-
CM7	16,98 ± 0,98
CM8	-
Cardamonin*	2,59 ± 0,18

“*”: đối chứng dương

Hoạt tính ức chế sinh NO của 08 hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus* được thể hiện trong Bảng 3.4. Kết quả cho thấy **CM1**, **CM2**, **CM3**, **CM4**, **CM5** và **CM7** thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO. Trong khi **CM6** và **CM8** không thể hiện hoạt tính.

3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Kết quả Bảng 3.5 cho thấy **CD3**, **CD4**, **CD6**, **CD7**, **CD8** và **CD23** thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO. Trong khi đó, các hợp chất còn lại đều không thể hiện hoạt tính.

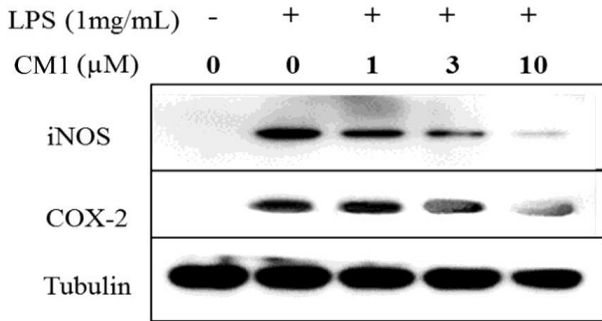
Các hợp chất **CD11** (trùng **CM4**), **CD12** (trùng **CM6**), **CD13** (trùng **CM7**), **CD14** (trùng **CM2**) là các hợp chất phân lập được từ loài *Capillaster multiradiatus* đã được đánh giá và trình bày ở mục 3.3.1.

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Ký hiệu chất	Giá trị IC ₅₀ (µM)
CD1	-
CD2	-
CD3	63,55±4,08
CD4	36,18±2,98
CD5	-
CD6	24,98±1,13
CD7	55,44±2,77
CD8	31,25±3,09
CD9	-
CD10	-
CD15	-
CD16	63,55±4,08
CD19	36,18±2,98
CD20	-
CD21	-
CD22	55,44±2,77
CD23	31,25±3,09
L-NMMA*	2,59 ± 0,18

“*”: đối chứng dương; “-”: không có hoạt tính

3.3.3. Kết quả đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của CM1



Hình 3.5. Ảnh hưởng của CM1 ở các nồng độ 1, 3 và 10 μ M đến sự biểu hiện của protein iNOS, COX-2 trên dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS

Kết quả đánh giá sự ức chế biểu hiện COX-2 và iNOS trong các tế bào RAW264.7 được chỉ ra ở Hình 3.5. Theo đó, CM1 có tác động lên sự biểu hiện của COX-2 và iNOS trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

4.1.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

Từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* đã phân lập được **08 hợp chất**. Trong đó có **03 hợp chất mới** được đặt tên là: capillasterquinone A (**CM1**), capillasterquinone B (**CM2**), capillasterolide (**CM8**) và 05 hợp chất đã biết: 3-(2'-hydroxy-n-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CM3**), 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CM4**), 3-(*trans*-prop-1'-enyl)-1,6,8-

trihydroxy-9,10-anthra-quinone (CM5), 3-(1'-hydroxypropyl)-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (CM6), 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (CM7).

4.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

Từ loài huệ biển *Comanthus delicata* đã phân lập được **23 hợp chất**. Trong đó có **10 hợp chất mới** là delicapyron A–H (CD1–CD5 và CD15–CD17), delicaquinon A (CD18) và delicaquinon B (CD19); 13 hợp chất đã biết bao gồm comaparvin (CD6), 6-methoxycomaparvin (CD7), 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-methyl-4*H*-naphtho[1,2-*b*]pyran-4-one (CD8), 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (CD9), 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (CD10), CD11 trùng với CM4, CD12 trùng với CM6, CD13 trùng với CM7, CD14 trùng với CM2), 6-methoxycomaparvin-5-methylether-8-*O*-sodium sulfate (CD20), 6-methoxycomaparvin-8-*O*-sodium sulfate (CD21), comaparvin-8-*O*-sodium sulfate (CD22) và 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone-6-*O*-sodium sulfate (CD23).

4.1.3. Tổng hợp và nhận xét về kết quả xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*, 07 trong số 08 hợp chất phân lập được là dẫn xuất anthraquinone trong đó có 2 chất mới là capillasterquinone A (CM1), capillasterquinone B (CM2) và một dẫn xuất butenolide mới là capillasterolide (CM8) (Hình 3.1). Trên thế giới, các nghiên cứu về loài huệ biển này đã công bố sự có mặt của các dẫn xuất naphthopyrone và pyrano[2,3-*f*]chromene. Tuy

nhiên, đây là lần đầu tiên các dẫn xuất anthraquinone và butenolide được phát hiện từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

Từ loài huệ biển *Comanthus delicata* trong số 23 hợp chất phân lập được (Hình 3.2) có 2 dẫn xuất bisnaphthopyrone mới là delicapyron A (**CD1**) và B (**CD2**); 8 dẫn xuất naphthopyrone trong đó có 3 chất mới là delicapyron C-E (**CD3-CD5**); 6 dẫn xuất naphthopyrone sulfate trong đó có 03 chất mới là delicapyron F-H (**CD15-CD17**) và 4 dẫn xuất anthraquinone và 3 dẫn xuất anthraquinone sulfate trong đó có 2 chất mới là delicaquinon A (**CD18**) và B (**CD19**). Hai hợp chất mới **CD1** và **CD2** có cấu trúc khung bisnaphthopyrone rất hiếm gặp chứa một đơn vị naphthopyrone góc và một đơn vị naphthopyrone thẳng liên kết với nhau qua một nhóm CH₂. Theo sự tra cứu, đây là lần đầu tiên cấu trúc này được phát hiện và công bố. Đây cũng là lần đầu tiên các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài huệ biển *Comanthus delicata* được tiến hành. Thành phần chính từ loài này đều là các dẫn xuất naphthopyrone và anthraquinone cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu về huệ biển đã công bố trên thế giới.

4.2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được

4.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được

Với 14 naphthopyrone phân lập được, 08 dẫn xuất naphthopyrone bao gồm **CD3**, **CD4**, **CD5**, **CD6**, **CD7**, **CD8**, **CD9**, **CD10** đều thể hiện hoạt tính mạnh và trung bình trên dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2, trong khi đó 06 dẫn xuất naphthopyrone sulfate gồm **CD15**, **CD16**, **CD17**, **CD20**, **CD21**, **CD22** lại thể hiện hoạt tính gây độc tế bào yếu (Bảng 3.2). Điều này gợi ý sự có mặt của nhóm

sulfate trong cấu trúc naphthopyrone có thể làm giảm hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất.

Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng **CD7** ức chế hoàn toàn TNF- α gây ra bởi NF- κ B (một yếu tố phiên mã cảm ứng có vai trò quan trọng trong sự phát triển ung thư và viêm) ở nồng độ 300 μ M bằng cách ức chế hoạt động của enzym kinase IKK β . Ngoài ra, **CD7** còn có khả năng ức chế chất vận chuyển trung gian ABCG2-một protein chống lại ung thư vú liên quan tới việc kháng thuốc hóa trị liệu. Từ huệ biển *Comanthus delicata* chúng tôi đã thu được **CD7** với khối lượng khá nhiều (10,5 mg). Dựa trên các nghiên cứu đã có về khả năng chống ung thư của hợp chất này, **CD7** được nghiên cứu thêm về khả năng cảm ứng apoptosis trên dòng TB UT da SK-Mel-2.

4.2.2. Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của CD7 trên dòng tế bào ung thư SK-Mel-2

4.2.2.1. Xác định khả năng gây apoptosis bằng kit Annexin V-FITC

Kết quả ở Hình 3.3 và Bảng 3.3 cho thấy: Ở mẫu đối chứng âm, số lượng tế bào sống cao lên đến 91,22% và chỉ có 0,94% tế bào có dấu hiệu apoptosis (Hình 3.3A). Dưới tác động của Camptothecine được sử dụng làm đối chứng dương, quần thể tế bào sống suy giảm chỉ còn 35,91%, tổng số lượng tế bào apoptosis là 60,56% (Hình 3.3B). Hợp chất **CD7** với các nồng độ thử nghiệm đều làm tỉ lệ tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm tăng mạnh, apoptosis muộn đều tăng lên so với đối chứng. Ở tế bào đối chứng, tỷ lệ % tế bào apoptosis sớm chỉ là 0,51% tuy nhiên quần thể tế bào này tăng lên đến 67,20% dưới tác động của **CD7** với nồng độ 100 μ M. Khi giảm nồng độ chất thử xuống 20 và 4 μ M thì tỷ lệ tế bào apoptosis sớm tương ứng là 39,42% và 23,93%. Tổng % tế bào apoptosis tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý hợp chất **CD7** ở nồng độ 4 μ M là 34,56% đã tăng lên 45,83%

khi sử dụng nồng độ 20 μM và tăng đến 78,18% khi nồng độ **CD7** là 100 μM .

Như vậy, hợp chất **CD7** thể hiện rõ khả năng gây chết tế bào ung thư da SK-Mel-2 thông qua quá trình apoptosis do đó được lựa chọn thử nghiệm tiếp để đánh giá khả năng kích hoạt caspase-3.

4.2.2.2. *Đánh giá tác dụng kích hoạt caspase-3 của CD7*

Kết quả Hình 3.4 cho thấy, ở nồng độ 100 và 20 μM , **CD7** đã thể hiện rõ khả năng cảm ứng caspase-3 ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$ và $P < 0,05$). Số lần kích thích sản sinh caspase-3 tăng 1,45 lần so với chất đối chứng âm khi sử dụng nồng độ **CD7** là 20 μM và tăng 1,79 lần so với chất đối chứng âm khi sử dụng nồng độ **CD7** là 100 μM . Ở nồng độ 4 μM , hợp chất **CD7** cho thấy đã làm tăng hoạt tính caspase-3 gấp 1,22 lần so với đối chứng âm nhưng chưa ở mức có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Chất đối chứng dương camptothecin (1 μM) hoạt động ổn định với hoạt tính caspase-3 tăng 2,48 lần so với đối chứng âm ($P < 0,05$).

Như vậy **CD7** gây độc tế bào ung thư da SK-Mel-2 thông qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3. Nghiên cứu của luận án lần đầu tiên công bố về tác dụng kích hoạt caspase-3 của **CD7** trên dòng TB UT da ở người SK-Mel-2. Điều này góp phần khẳng định hợp chất **CD7** là hợp chất tiềm năng cho các nghiên cứu định hướng điều trị ung thư.

4.3. **Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được**

4.3.1. *Đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO*

Hợp chất **CM4** và **CM7** theo như nghiên cứu trước đây đã được chứng minh là có tác dụng ức chế đáng kể sự tích tụ của protein iNOS gây viêm trong tế bào đại thực bào RAW264.7 được kích thích

bởi LPS. Ở nghiên cứu của luận án cũng cho thấy sự phù hợp khi hai hợp chất **CM4** và **CM7** bước đầu được đánh giá là có hoạt tính tốt khi ức chế đáng kể sự sản sinh chất trung gian tiền viêm NO.

Các hợp chất **CD20**, **CD21**, **CD22** chúng tôi phân lập được với sự xuất hiện của nhóm sulfat tại vị trí C-8 lại không thể hiện hoạt tính trong khi các hợp chất tương ứng có nhóm OH tại vị trí C-8 là 6-methoxycomaparvin 5-methyl ether, 6-methoxycomaparvin và comaparvin đã được nghiên cứu là có hoạt tính kháng viêm tiềm năng. Kết quả này gợi ý sự thay thế của nhóm sulfat tại vị trí C-8 trong các angular naphthopyrone có thể làm ảnh hưởng tới hoạt tính kháng viêm của hợp chất.

Hợp chất mới **CM1** có cấu trúc tương tự hợp chất 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone là một hợp chất đã được xác định có hoạt tính kháng viêm tiềm năng thông qua sự chức chế biểu hiện iNOS trong tế bào đại thực bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS. Với lượng chất nhận được nhiều (21 mg) và hoạt tính mạnh, hợp chất **CM1** được lựa chọn để đánh giá thêm tác dụng ức chế sự biểu hiện của các protein tiền viêm iNOS và COX-2 ở đại thực bào RAW264.7.

4.3.2. Đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của CM1

Tác động của hợp chất **CM1** lên sự biểu hiện của hai protein iNOS và COX-2 liên quan đến quá trình viêm được đánh giá bằng phương pháp Western Blot. Tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS và xử lý với hợp chất **CM1** ở các nồng độ thử nghiệm 1, 3 và 10 μM . Kết quả Western Blot cho thấy hợp chất **CM1** làm giảm dấu biểu hiện của iNOS và COX-2 theo sự gia tăng nồng độ. Trong khi đó mức độ biểu hiện của tubulin không thay đổi (Hình 3.5).

Như vậy, hợp chất **CM1** ức chế mạnh sự sản sinh NO thông qua ức chế sự biểu hiện của protein iNOS và COX-2. Do đó, **CM1** là một hợp chất có tác dụng kháng viêm tiềm năng. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính kháng viêm của hợp chất **CM1** được công bố cho tới hiện nay.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam được tiến hành về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu ở vùng biển Việt Nam.

1. Nghiên cứu thành phần hóa học

Đã phân lập và xác định cấu trúc 31 hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata*. Cụ thể:

Từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* đã phân lập và xác định cấu trúc 08 hợp chất trong đó có **3 hợp chất mới** là capillasterquinone A (**CM1**), capillasterquinone B (**CM2**), Capillasterolide (**CM8**).

Từ loài huệ biển *Comanthus delicata* đã phân lập và xác định cấu trúc 23 hợp chất trong đó có **10 hợp chất mới** là delicapyron A–H (**CD1–CD5** và **CD15–CD17**) và delicaquinon A (**CD18**) và B (**CD19**).

2. Nghiên cứu hoạt tính sinh học

+ Đã đánh giá hoạt tính gây độc bào trên 05 dòng tế bào ung thư ở người là KB, SK-Mel-2, HepG2, LNCaP và MCF7 của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả cho thấy: hợp chất **CD2** thể hiện hoạt

tính mạnh trên dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2 và ung thư vú MCF7 với giá trị IC_{50} tương ứng là $11,99 \pm 0,69$ và $14,90 \pm 2,25 \mu\text{M}$. Các hợp chất **CD4**, **CD6**, **CD7**, **CD8** thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2 với giá trị IC_{50} tương ứng là $8,51 \pm 0,98$, $12,03 \pm 0,54$, $11,68 \pm 0,88$, $10,49 \pm 1,25 \mu\text{M}$.

+ Đã xác định được hợp chất **CD7** thể hiện rõ khả năng gây chết tế bào SK-Mel-2 thông qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3.

+ Đánh giá được hoạt tính ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả cho thấy hợp chất **CM1** thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là $5,89 \pm 0,11 \mu\text{M}$.

+ Đã xác định được hợp chất **CM1** ức chế mạnh sự sản sinh NO thông qua ức chế sự biểu hiện của protein iNOS và COX-2 trên dòng tế bào RAW264.7 ở nồng độ $10 \mu\text{M}$.

KIẾN NGHỊ

Hợp chất **CD7** có tiềm năng trong cho các nghiên cứu theo hướng điều trị ung thư và hợp chất **CM1** có tác dụng kháng viêm tiềm năng do đó cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động của hai hợp chất này ở cấp độ *in vivo*.

Hợp chất **CD2** có hoạt tính ức chế mạnh sự phát triển của dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2 và ung thư vú MCF7 trong khi các hợp chất **CD4**, **CD6**, **CD8** ức chế chỉ ức chế dòng tế bào ung thư da SK-Mel-2. Như vậy, cần nghiên cứu sâu hơn về cơ chế gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư để làm rõ cơ chế tác động của chúng.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Phân lập được 13 hợp chất mới từ 2 loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu thập ở vùng biển Việt Nam, tiến hành nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của 13 hợp chất mới này.
2. Hợp chất 6-methoxycomaparvin (**CD7**) có hoạt tính gây độc tế bào ung thư thông qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3 ở tế bào ung thư SK-Mel-2; Hợp chất capillasterquinone A (**CM1**) có hoạt tính kháng viêm, ức chế sự sản sinh NO thông qua ức chế biểu hiện của các protein iNOS và COX-2 ở đại thực bào RAW264.7.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi Thanh Huong, Nguyen Hai Dang, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Do Cong Thung, Phan Van Kiem, and Chau Van Minh. Anthraquinone and butenolide constituents from the crinoid *Capillaster multiradiatus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2018, 66, 1023–1026.
2. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Tran Hong Quang, Do Thi Thao, Do Cong Thung, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Pham Van Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh. Naphthopyrone and anthraquinone derivatives from *Comanthus delicata*. **Phytochemistry Letters**, 2021, 46, 129–135.
3. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Tran Hong Quang, Do Cong Thung, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Pham Van Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh. Sulfated naphthopyrones and anthraquinones from the Vietnamese crinoid *Comanthus delicata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2022, 70(5), 408-412.
4. Châu Văn Minh, Nguyễn Hoài Nam, Phan Văn Kiệt, Nguyễn Xuân Cường, **Lê Thị Viên**, Trần Thị Hồng Hạnh, Phan Thị Thanh Hương, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Văn Thanh, Đỗ Công Thung. Hợp chất anthraquinon có hoạt tính kháng viêm và phương pháp chiết hợp chất này từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*. **Bảng độc quyền sáng chế**, 2021, số 29299.