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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

PHẠM THỊ HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM VÀ KHÁNG UNG THƯ CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ HAI LOÀI TẦM BÓP (*P. angulata*) VÀ THÙ LÙ NHỎ (*P. minima*), HỌ CÀ – SOLANACEAE

Chuyên ngành: Sinh lý học người và động vật
Mã số: 9.42.01.04

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

Người hướng dẫn khoa học: **1. PGS.TS. Đỗ Thị Thảo**

2. PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

Phản biện 1:.....

.....

Phản biện 2: .....

.....

Phản biện 3: .....

.....

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

Ung thư là căn bệnh gây tỉ lệ tử vong cao và đang trở thành gánh nặng lớn tại các quốc gia trên thế giới, đặc biệt với các nước nghèo và các nước đang phát triển. Theo số liệu của Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế (Globocan), năm 2020 trên thế giới có 19,3 triệu ca mắc mới ung thư và 10 triệu ca ung thư tử vong, trong đó Châu Á chiếm tỷ lệ mắc mới cao nhất, chiếm 49,6% số bệnh nhân ung thư mắc mới trên toàn cầu.

Tại Việt Nam, ung thư cũng là loại bệnh lý đang tăng nhanh và tăng cao. Theo thống kê của Tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế (Globocan), năm 2020 tại Việt Nam có khoảng 182.563 ca ung thư mới mắc, gần 122.690 trường hợp tử vong và hơn 353.826 người đang phải chung sống với căn bệnh ung thư. Bên cạnh đó, theo nhiều báo cáo viêm và viêm mãn tính được xem là một trong những yếu tố kích thích phát triển khối u ung thư. Các nhà khoa học đã ghi nhận sự xuất hiện của nhiều loại tế bào viêm khác nhau cùng với sự gia tăng các cytokine viêm trong vi môi trường khối u. Bởi vậy việc tìm kiếm những loại thuốc/dược chất mới đặc trị kháng u, kháng viêm cũng như hỗ trợ điều trị hoặc hỗ trợ phòng bệnh là hết sức cần thiết và cấp bách. Mặc dù trong y học hiện đại đã có những bước phát triển trong việc tổng hợp các loại thuốc điều trị bệnh ung thư, bệnh viêm, nhưng tới nay chưa có thuốc nào được cho là hoàn toàn hiệu quả và an toàn.

Thực vật và các sản phẩm (hoạt chất) có nguồn gốc thực vật hiện vẫn được xem là có hiệu quả và phù hợp trong điều trị, kiểm soát bệnh ung thư. Đó là do các hợp chất thiên nhiên có độc tính thấp, có khả năng dung nạp tốt trong cơ thể sinh vật, có khả năng diệt các tế bào u, bảo vệ được tế bào lành. Các nghiên cứu cho thấy các chất chuyển hóa thứ cấp chiết xuất từ thực vật ức chế tế bào ung thư thông qua chống tổn thương DNA, kích hoạt các enzym gây apoptosis thông qua việc ức chế các con đường truyền tín hiệu như: con đường RAS-ERK, con đường tín hiệu c-Met, con đường tín hiệu PI3K/Akt, con đường ty thể v.v. Vì vậy, ngày nay, hầu hết các công trình nghiên cứu tìm kiếm các loại thuốc ung thư hay kháng viêm mới đều hướng vào thực vật và các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật.

Việt Nam là đất nước có nguồn tài nguyên cây thuốc vô cùng đa dạng và phong phú, phân bố trên toàn lãnh thổ. Theo thống kê năm 2016, Việt Nam có khoảng 5117 loài và dưới loài thực vật bậc cao được sử dụng làm thuốc chữa bệnh trong dân gian. Điều này cho thấy tiềm năng to lớn của nguồn dược liệu Việt Nam có thể sử dụng trong nghiên cứu sàng lọc để tìm ra những chất có hoạt tính dược học quý hiếm, trong đó có các chất kháng u và kháng viêm mới có hiệu quả cao, ít hoặc không gây ra các phản ứng phụ. Trong số những loài đã được phát hiện, loài Tầm bóp (Physalis angulata) và Thù lù nhỏ (Physalis minima) thuộc chi Physalis là những loài được sử dụng nhiều trong các bài thuốc Đông y để điều trị bệnh trong đó có các bệnh lý viêm và ung thư. Trong những năm gần đây, ở Việt Nam cũng đã có một số nghiên cứu khoa học về phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất có hoạt tính sinh học của loài P. angulata và P. minima đã được công bố. Tìm hiểu về thành phần hóa học và hoạt tính kháng u, kháng viêm của hai loài này sẽ bổ sung nguồn cơ sở khoa học cho việc sử dụng trong quá trình hỗ trợ, điều trị những căn bệnh này.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài nghiên cứu **"*Nghiên cứu hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư của một số hợp chất phân lập từ hai loài Tầm bóp (P. angulata) và Thù lù nhỏ (P. minima), họ Cà - Solanaceae*"**. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ đóng góp vào việc đánh giá hoạt tính kháng tế bào ung thư, kháng viêm tiềm năng của các dịch chiết, phát hiện các hợp chất tinh khiết có tác dụng hỗ trợ, điều trị các bệnh lý viêm và ung thư được tách chiết từ loài *P. angulata* và *P. minima* phân bố ở Việt Nam. Các kết quả của đề tài là cơ sở khoa học, góp phần giải thích về hoạt tính kháng u và kháng viêm của các bài thuốc trong dân gian, nâng cao giá trị sử dụng của các loài cây này.

Mục tiêu đề tài luận án

1. Phân lập và xác định cấu trúc cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ 02 loài Tầm bóp (*P. angulata)* và Thù lù nhỏ (*P. minima)* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam;

2. Phát hiện các hợp chất có hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư tiềm năng từ 02 loài thực vật này làm cơ sở cho các nghiên cứu về dược lý tiếp theo.

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là hai loài thuộc chi *Physalis*: Loài tầm bóp (*P. angulata)* được thu hái tại tỉnh Thái Bình và loài Thù lù nhỏ (*P. minima)* được thu hái tại tỉnh Thừa Thiên Huế.

Nội dung luận án bao gồm

1. Sàng lọc các hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư từ các dịch chiết của hai loài *P. angulata* và *P. minima* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam.

2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ các dịch chiết tiềm năng của hai loài *P. angulata* và *P. minima* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam.

3. Đánh giá hoạt tính ức chế NO định hướng kháng viêm của các hợp chất được phân lập.

4. Đánh giá hoạt tính kháng ung thư của các hợp chất được phân lập.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Một vài nét về viêm và ung thư

1.2. Sơ lược về chi *Physalis*

1.2.1. Đặc điểm thực vật chi Physalis

Chi *Physalis* thuộc họ Cà (*Solanaceae*), bộ Cà (*Solanales*), lớp thực vật hai lá mầm (*Magnoliopsida*), ngành thực vật có hoa (*Magnoliophyta)*. Ở Việt Nam, chi *Physalis* có 5 loài là *Physalis angulata* (tầm bóp, lu lu cái), *Physalis alkekengi* (thù lù kiểng), *Physalis peruviana* (thù lù lông), *Physalis cordata Mill* (Tầm bóp lá hình tim*)* và *Physalis minima* (thù lù nhỏ).

1.2.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi Physalis

Về thành phần hóa học thì lớp chất chính của chi *Physalis* là các withanolides, rồi đến các labdane diterpene, các sucrose ester, các flavonoid, các ceramide và một số chất khác. Các loài thuộc chi *Physalis*

đã được chứng minh có tác dụng: kháng ung thư, kháng viêm, giảm đau, hạ sốt, chống tiểu đường, kháng khuẩn, kháng lao, kháng ký sinh trùng sốt rét và điều hoà miễn dịch.

1.2.3. Giới thiệu về loài Tầm bóp (P.angulata)

1.2.4. Giới thiệu về loài Thù lù nhỏ (P.minima)

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu loài Tầm bóp (P.angulata): Được thu hái tại huyện Tiền Hải và huyện Đông Hưng tỉnh Thái Bình vào tháng 8 năm 2015.

2.1.2. Mẫu loài Thù lù nhỏ (P.minima): Được thu hái tại xã Hương Hòa, huyện Nam Đông, tỉnh Thừa Thiên Huế vào tháng 9 năm 2018.

2.1.3. Vật liệu nghiên cứu: Các dòng tế bào: Dòng RAW 264.7; Các dòng tế bào ung thư ở người: SK-LU-1 (Ung thư phổi), A549 (Ung thư phổi), HeLa (Ung thư cổ tử cung), PANC-1 (Ung thư tụy), HepG2 (Ung thư tế bào gan) và MCF7 (Ung thư vú).

2.1.4. Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý tạo dịch chiết metanol và các cao phân đoạn của các mẫu P. angulata* và *P. minima

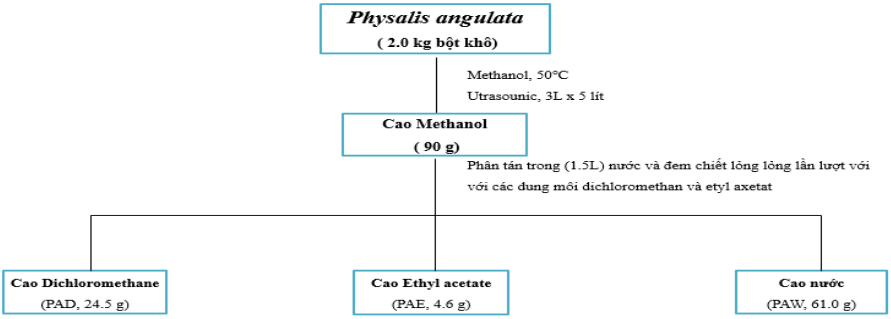
Mẫu thực vật sau khi thu hái được loại bỏ rửa sạch, phơi ở nhiệt độ phòng, sấy khô ở nhiệt độ 50-60^{0}C sau đó đem nghiền nhỏ thành bột khô. Bột khô này được ngâm chiết với methanol với sự hỗ trợ của thiết bị chiết siêu âm. Dịch chiết được thu lại, lọc qua giấy lọc rồi tiến hành cất thu hồi dung môi bằng thiết bị cất quay dưới áp suất giảm thu được cao chiết methanol chứa hầu hết các hợp chất có trong mẫu nghiên cứu. Cao methanol được hòa vào nước và chiết phân bố lỏng lỏng lần lượt với các dung môi diclomethane và ethyl acetate có độ phân cực tăng dần để tách chiết mẫu thực vật từ loài *P. angulata* và *P. minima*. Quay cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng.

Bảng 2.1. Các cao chiết từ loài *P. angulata* và *P. minima*

Phân đoạn	*Kí hiệu các cao chiết phân đoạn*	
	P. angulata	***P. minima***
Cao (MeOH) tổng	PA	PM
Dichlomethane	PAD	PMD
Ethyl acetate	PAE	PME
Cao nước	PAW	PMW

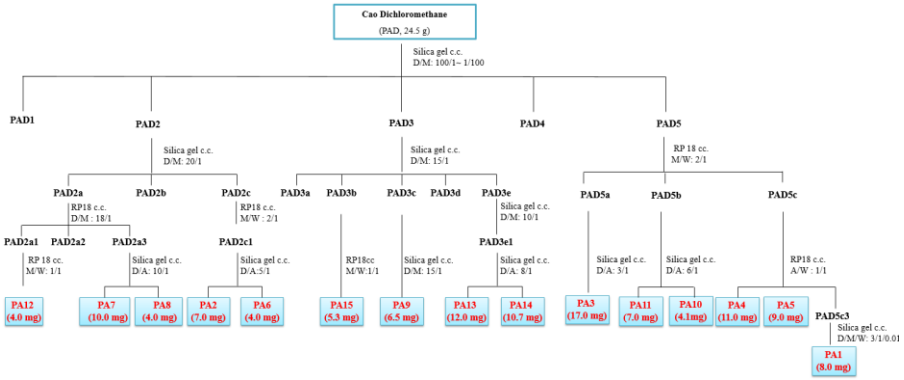
2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất từ loài P. angulata

2.2.2.1. Tạo cao chiết methanol và các cao chiết phân đoạn từ loài P.angulata



Hình 2.1. Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài *P. angulata*

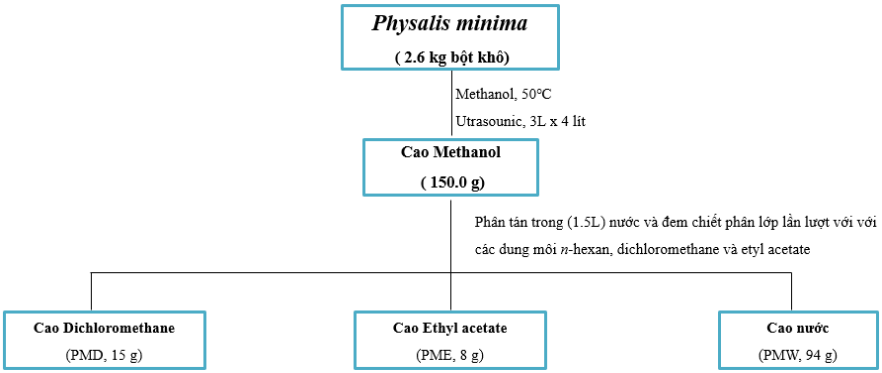
2.2.2.2. Chiết xuất, phân lập các hợp chất từ cao chiết PAD của loài P. angulata



Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PAD của loài *P. angulata*

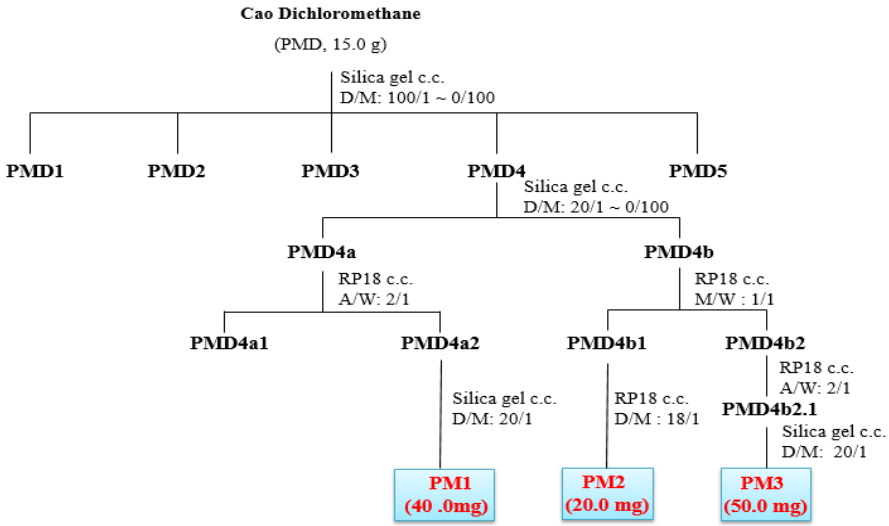
2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất từ loài P. minima

2.2.3.1. Tạo cao chiết methanol và các cao chiết phân đoạn từ loài P. minima

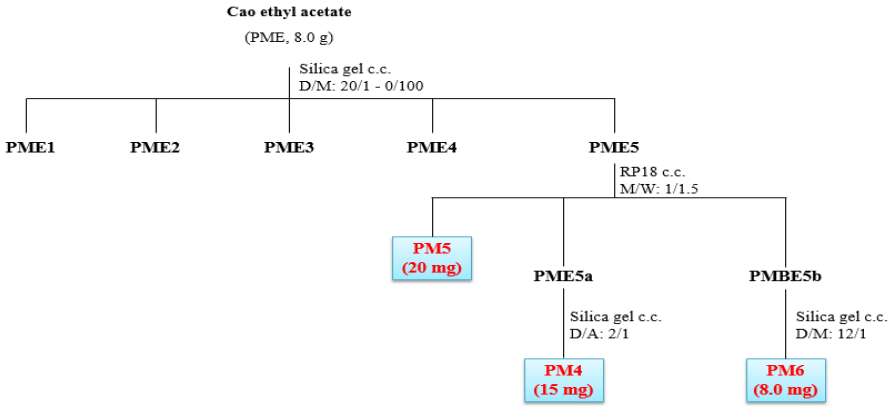


Hình 2.3. Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài *P. minima*

2.2.3.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ cao chiết PMD và PME của loài P. minima



Hình 2.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PMD của loài *P. minima*



Hình 2.5. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PME của loài *P. minima*

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

2.3.1. Phương pháp sắc ký dùng để phân lập các hợp chất từ mẫu thực vật

2.3.2. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân

2.3.3. Phương pháp phổ khối lượng

2.3.4. Phương pháp đo độ quay cực [α]D

2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.4.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

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

2.4.3. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào sử dụng tế bào đại thực bào RAW 264.7

2.4.4. Phương pháp Western Blot

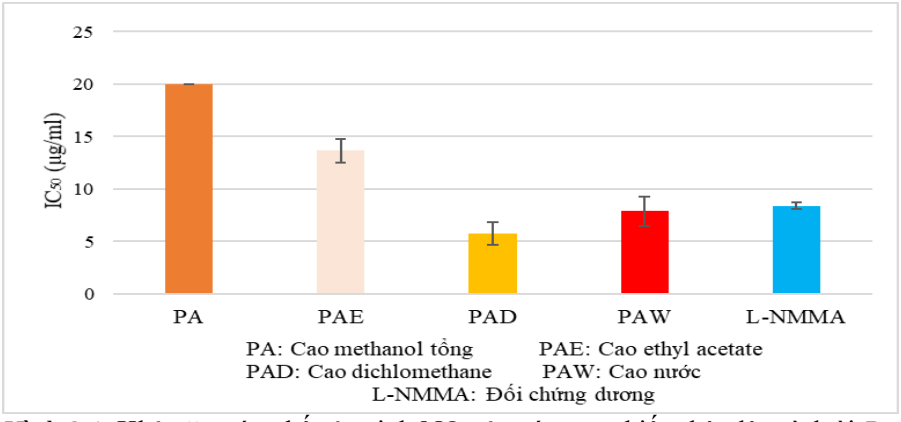
2.4.5. Phương pháp đánh giá tác động cảm ứng apoptosis

2.5. Phương pháp phân tích thống kê

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

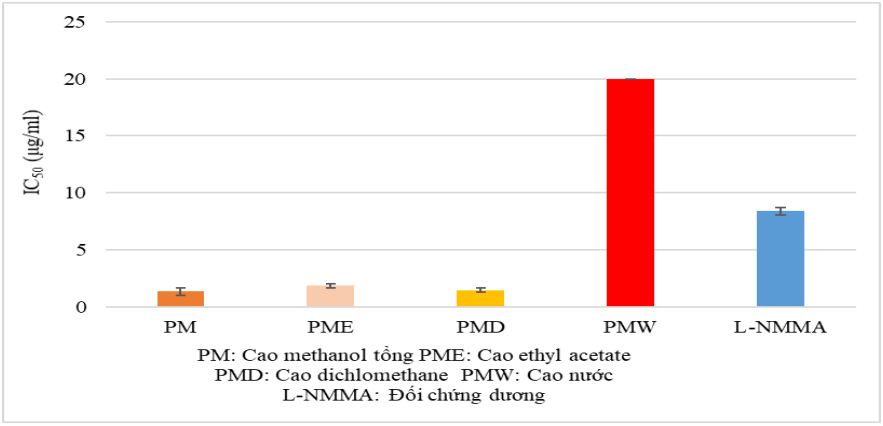
3.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 và hoạt tính gây độc tế bào của loài *P. angulata* và *P.minina*

3.1.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của các cao chiết phân lập từ loài P.angulata và P.minina



Hình 3.1. Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết phân lập từ loài *P. angulata* thông qua giá trị IC_{50} (µg/mL)

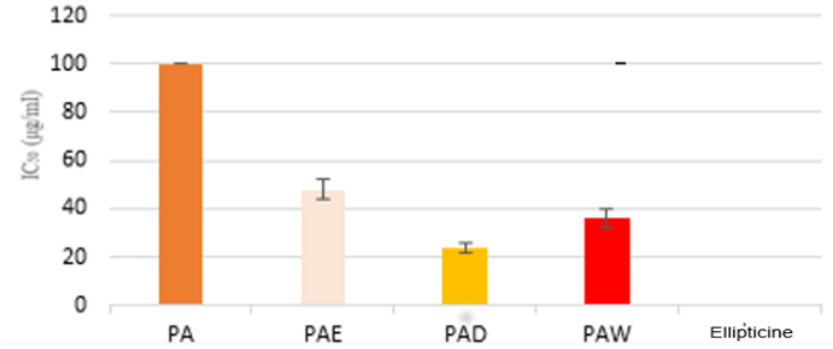
Các cao chiết PA, PAD, PMW và PAE phân lập từ loài *P. angulata* được đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO ở nồng độ 20 µg/mL và kết quả cho thấy các cao chiết PAD, PMW và PAE có khả năng ức chế >50% sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7. Các cao chiết này được tiếp tục thí nghiệm ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50}. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết PAD có tác dụng ức chế sản sinh NO mạnh nhất so với các cao chiết PAE và PAW.



Hình 3.2. Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết phân lập từ loài *P. minima* thông qua giá trị IC_{50} (µg/mL)

Đối với loài *P. minima*, bằng việc so sánh giá trị IC_{50} của các cao chiết có thể thấy mức hoạt tính ức chế sản sinh NO tăng dần theo thứ tự: PMW <PME <PMD<PM, tương ứng với giá trị IC_{50} giảm dần.

3.1.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ hai loài P. angulata và P. minima

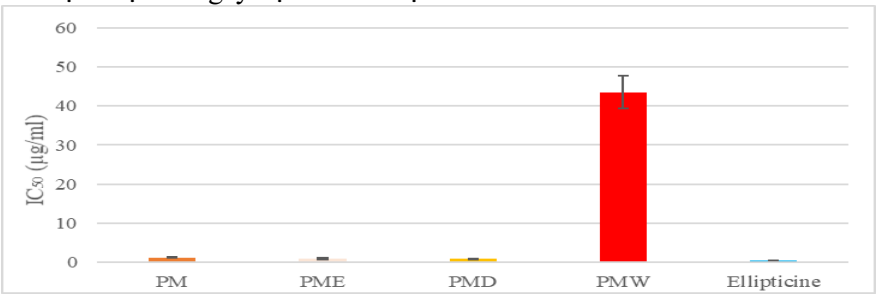


PA: Cao methanol tổng PAE: Cao ethyl acetate

PAD: Cao dichlomethane PAW: Cao nước Ellipticine: Đối chứng dương

Hình 3.3. Giá trị IC_{50} trong thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư dòng A549 của các cao chiết phân lập từ loài *P. angulata*

Như vậy, ở loài *P. angulata*, mẫu cao chiết PA không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả ba dòng tế bào thử nghiệm và cao chiết PAD thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất.



PM: Cao methanol tổng PME: Cao ethyl acetate

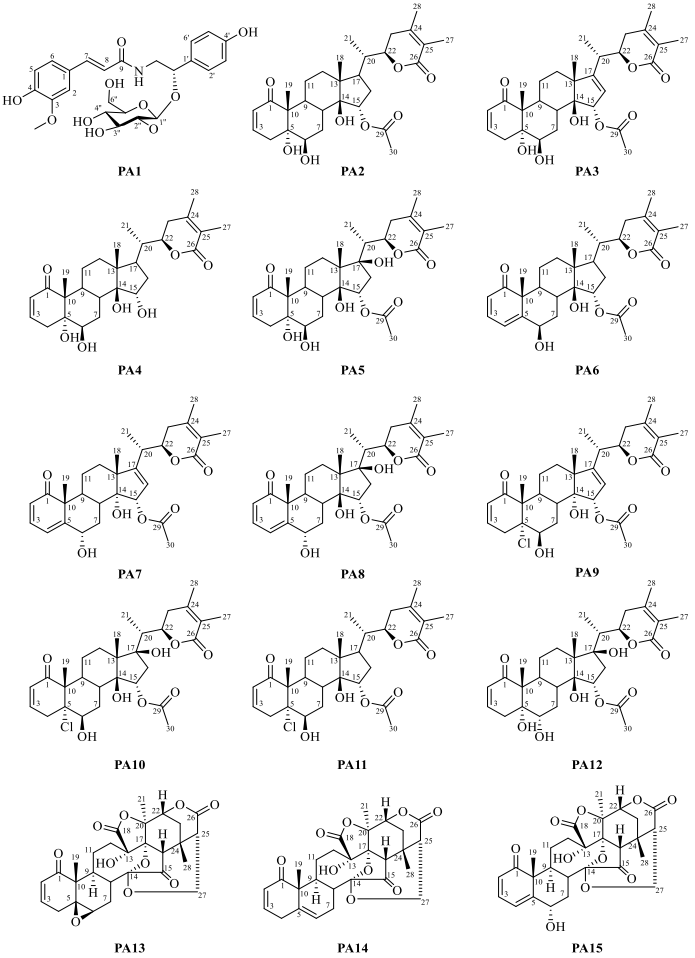
PMD: Cao dichlomethane PMW: Cao nước Ellipticine: Đối chứng dương

Hình 3.4. Giá trị IC_{50} trong thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư dòng A549 của các cao chiết phân lập từ loài *P. minima*

Kết quả ở hình 3.4 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết PMD và PME thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên các dòng thử nghiệm là mạnh hơn so với các cao PMW và cao tổng PM.

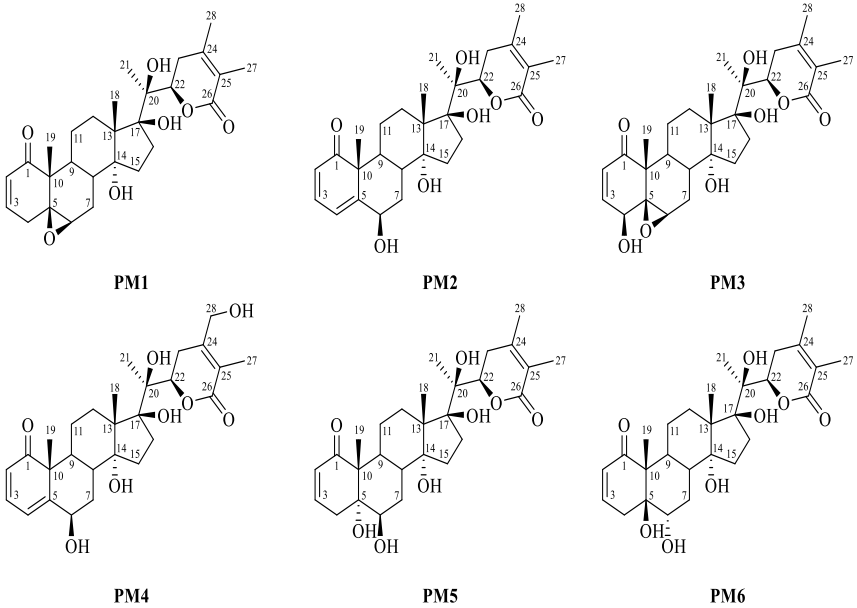
3.2. *Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P. angulata và P. minina*

3.2.1. Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P. *angulata*



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài *P. angulata*

3.2.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P. minima



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài *P.minima*

3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm và gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ loài *P. angulata*

3.3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất phân lập từ loài *P. angulata*

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của hợp chất phân lập từ *P. angulata*

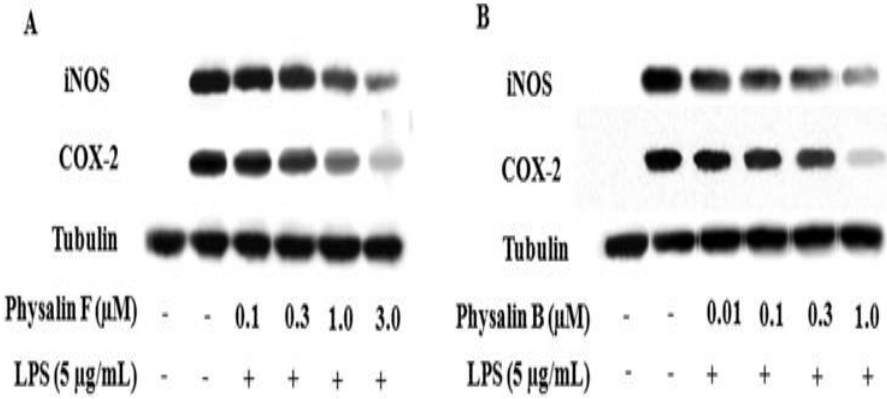
Stt	Tên hợp chất	Kí hiệu	IC_{50} (μM)
1	physalucoside A	PA1	**2,69 ± 0.17**
2	physagulin *J*	PA2	*****
3	Withaminimine	PA3	**69,6±4.5**
4	Physagulin N	PA4	*****

5	physagulin K	PA5	*****
6	physagulin P	PA6	*****
7	physagulin L	PA7	**> 100**
8	physagulin M	PA8	**> 100**
9	physagulin B	PA9	**0,24 ± 0.09**
10	Physagulide Q	PA10	**0,57 ± 0.18**
11	(20S, 22R)-15α-acetoxy-5α-chloro-6β,14β-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienonide	PA11	**0,68 ± 0.02**
12	physagulin Q	PA12	*****
13	physalin F	PA13	**1,06 ± 0,68**
14	physalin B	PA14	**0,28 ± 0,10**
15	physalin G	PA15	**3,74 ± 0,29**
L-NMMA		**7,84 ± 0,87**	

*Ghi chú: * gây chết tế bào thử nghiệm RAW264.7.*

15 hợp chất phân lập từ *P. angulata* được khảo sát hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7. Kết quả thử nghiệm cho thấy các hợp chất **PA2**, **PA4**, **PA5, PA6** và **PA12** có tính độc cao, gây chết tế bào thử nghiệm ở nồng độ nghiên cứu nên không thể hiện rõ hoạt tính ức chế sản sinh NO Trong khi đó, hợp chất **PA7** và **PA8** không có tác dụng ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} > 100 µM. Các hợp chất **PA9**, **PA10**, **PA11**, **PA13**, **PA14** có tác dụng ức chế rất mạnh sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7 với giá trị IC_{50} từ 0,24 ± 0,09 đến 1,06 ± 0,68 µM so với chất đối chứng dương L-NMMA (IC_{50} = 7,84 ± 0,87 µM). Thể hiện hoạt tính năng ức chế sự sản sinh NO yếu hơn là các hợp chất **PA1**, **PA3** và **PA15** với giá trị IC_{50} lần lượt là 2,69 ± 0,17; 69,6 ± 4,5; 12,5 ± 1,70, và 3,74 ± 0,29 µM. Kết quả này cho thấy các hợp chất **PA9**, **PA10, PA11**, **PA13**, **PA14** có hoạt tính ức chế mạnh sự sản sinh NO do LPS tạo ra trong các tế bào RAW 264.7 khi bị gây viêm.

3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính cảm ứng enzyme iNOS và COX-2 của hợp chất PA13 và PA14 phân lập từ loài P. angulata



Hình 3.18. Tác động ức chế biểu hiện protein iNOS, COX-2 của hợp chất PA13 (A) và PA14 (B) trong các tế bào RAW 264.7 đã cảm ứng viêm bằng LPS

Dữ liệu trong Hình 3.18 cho thấy các protein iNOS và COX-2 hầu như không thể phát hiện được trong các tế bào RAW 264,7 khi không được kích thích với LPS. Tuy nhiên, sau khi tế bào RAW 264.7 bị kích thích viêm bằng LPS, mức biểu hiện protein của iNOS và COX-2 đã tăng lên rõ rệt. Mặt khác, khi tăng nồng độ **PA13** từ 0,1 μM đến 3,0 μM và **PA14** từ 0,01 μM đến 1.0 μM đã khiến nồng độ protein của hai enzyme iNOS và COX-2 trong tế bào bị giảm đi đáng kể. Mặt khác, trong thời gian ủ với LPS (1 μg/ml) biểu hiện của protein tubulin không thay đổi. Điều này cho thấy rằng cả hai hợp chất **PA13, PA14** có thể điều chỉnh giảm sự biểu hiện iNOS và COX-2 do LPS gây ra ở cấp độ dịch mã.

3.3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế một số dòng tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ loài P. angulata

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 15 hợp chất phân lập từ cao chiết PAD của loài *P. angulata*

Stt	Tên hợp chất	Kí hiệu	IC_{50} (µM)		
			A-549	HeLa	PANC-1
1	physalucoside A	PA1	**> 100**	**> 100**	**> 100**
2	physagulin *J*	PA2	**8,27 ± 0,97**	**> 100**	**> 100**
3	Withaminimine	PA3	**11,8 ± 2,06**	**> 100**	**34,06 ± 2,08**
4	physagulin N	PA4	**> 100**	**> 100**	**> 100**
5	physagulin K	PA5	**> 100**	**> 100**	**> 100**
6	physagulin P	PA6	**13,47 ± 2,73**	**> 100**	**20,23 ± 1,38**
7	physagulin L	PA7	**21.54 ± 1.32**	**> 100**	**6.30 ± 1,19**
8	physagulin M	PA8	**17,47 ± 2,37**	**> 100**	**3,18 ± 0,12**
9	physagulin B	PA9	**> 100**	**> 100**	**> 100**
10	physagulide Q	PA10	**> 100**	**> 100**	**> 100**
11	(20S, 22R)-15α-acetoxy-5α-chloro-6β,14β-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienonide	PA11	**1,03 ± 0,09**	**29,89 ± 1,15**	**11,53 ± 0,36**
12	physagulin Q	PA12	**> 100**	**> 100**	**> 100**
13	physalin F	PA13	**0,68 ± 0,05**	**0,23 ± 0,03**	**> 100**
14	physalin B	PA14	**0,95 ± 0,04**	**13,84 ±1,27**	**12,77 ±1,07**
15	physalin G	PA15	**6,88 ± 2,41**	**> 100**	**> 100**
	Etoposide		**2,68 ± 0,89**	**3,29 ± 0,05**	**0,08 ± 0,11**

Kết quả trên cho thấy các hợp chất **PA1, PA4, PA5, PA9, PA10, PA12** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Các hợp chất **PA2**, **PA3**, **PA6, PA7, PA8, PA11**, **PA13**, **PA14** và **PA15** có tác dụng gây độc đối với dòng tế bào A549. Các hợp chất còn lại hầu như không thể hiện tác dụng gây độc với dòng tế bào này (IC_{50} > 100 µM). Đối với dòng tế bào ung thư HeLa, hợp chất **PA11, PA13** và **PA14** có tác dụng gây độc mạnh. Các hợp chất còn lại xem như không gây độc với dòng tế bào HeLa với giá trị IC_{50} > 100 µM. Ngoài ra, các hợp chất **PA3**, **PA6**, **PA7**, **PA8**, **PA11**, **PA14** thể hiện hoạt tính gây

độc đáng kể đối với dòng tế bào PANC-1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào cho thấy các hợp chất **PA2, PA3**, **PA6-PA8**, **PA11**, **PA13, PA14, PA15** phân lập được từ loài *P. angulata* là các hợp chất có tiềm năng và cần được nghiên cứu sâu hơn về cơ chế để định hướng ứng dụng lâm sàng.

Khi phân tích các phổ cho thấy hợp chất **PA7** và hợp chất **PA3** có cấu trúc tương tự nhau, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một liên kết đôi ở vị trí C4-C5 trong **PA7** đã dẫn đến hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư A549 và PANC-1 của **PA7** và **PA3** thay đổi khác nhau.

Hợp chất **PA8** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào A549, PANC-1 và không có hoạt tính gây độc tế bào HeLa**.**

Hợp chất **PA11** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng ung thư thử nghiệm do ở vị trí 5 xuất hiện một nguyên tử Cl điều này làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA11**.

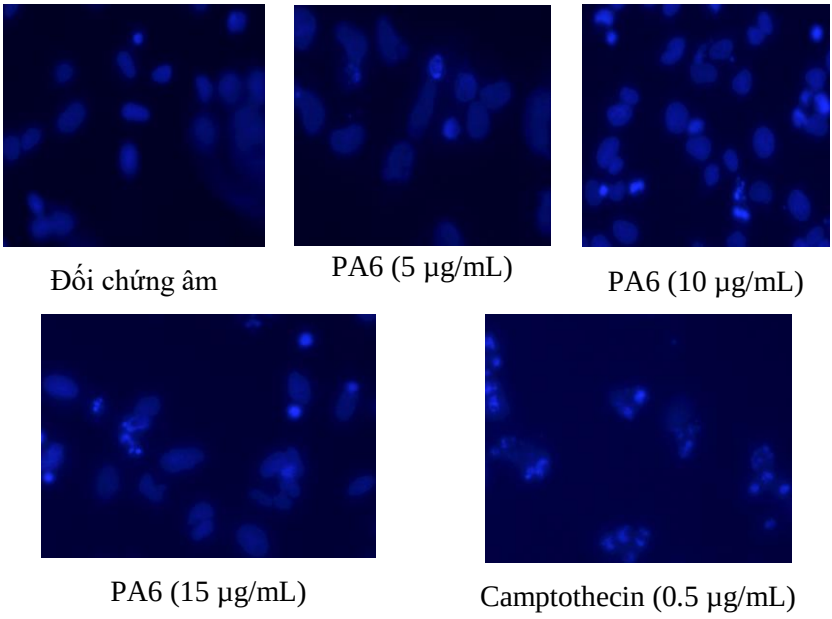
Sự xuất hiện cấu hình epoxy là 5β,6β-epoxy, liên kết đôi ở vị trí C-5, C-6 và sự thay thế nhóm hydroxy tại C-6 thay cho cầu nối 5β,6β epoxy của **PA13** có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính gây độc tế bào. Hợp chất này thể hiện hoạt tính mạnh trên 2 dòng tế bào ung thư A549 và Hela. Trong khi hợp chất **PA14** có hoạt tính trung bình trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm và hợp chất **PA15** chỉ thể hiện hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư A549.

3.3.4. Kết quả đánh giá cảm ứng apoptosis của hợp chất PA6 trên dòng tế bào ung thư phổi (A549)

3.3.4.1. Xác định khả năng cảm ứng apoptosis nhờ nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342

Bảng 3.6. Phần trăm tế bào có ngưng tụ hoặc phân mảnh nhân dưới tác động của hoạt chất **PA6**

% tế bào có hình thái nhân bị apoptosis				
PA6 (5 µg/mL)	**PA6** (10 µg/mL)	**PA6** (15 µg/mL)	**Camptothecin** (0,5 µM)	**Đối chứng** (-)
4,89±0,91	7,36±1,76	16,01±2,26	23,21±3,24	3,79±1,03



Hình 3.19. Hình ảnh tế bào A549 được nhuộm Hoechst 33342 dưới tác động của **PA6** ở các nồng độ khác nhau

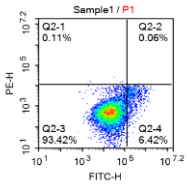
Khi tăng nồng độ chất thử **PA6** từ 5 µg/mL lên 15 µg/mL thì số lượng tế bào apoptosis tăng từ 4,89% lên 16,01% (bảng 3.6). Điều này có nghĩa khả năng cảm ứng gây cô đặc nhân của hợp chất **PA6** phụ thuộc nồng độ. Ở mẫu đối chứng dương camptothecin, tế bào có sự phân mảnh và cô đặc ở nhân rất rõ rệt. Trong khi tế bào đối chứng âm thì có nhân bắt thuốc nhuộm màu sáng, tròn và đồng nhất. Như vậy ở thử nghiệm này, hợp chất **PA6** cho thấy khả năng cảm ứng apotosis và làm thay đổi hình thái tế bào ung thư thử nghiệm.

*3.3.4.2. Xác định khả năng cảm ứng apoptosis của **PA6** bằng phương pháp Flowcytometry*

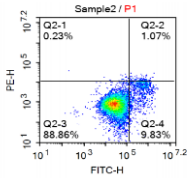
Hợp chất **PA6** tại nồng độ 5 µM, 10 µM và 15 µM thể hiện khả năng cảm ứng apoptosis ở các giai đoạn sớm và muộn trong tế bào A549 sau 24 giờ ủ mẫu.

Bảng 3.7. Tỉ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của **PA6**

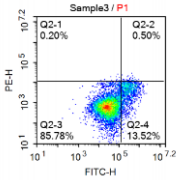
Mẫu thí nghiệm	% tế bào sống (Q2-3)	% tế bào apoptosis sớm (Q2-4)	% tế bào apoptosis muộn (Q2-2)	% tế bào hoại tử (Q2-1)
ĐC	93,42	6,42	0,11	0,06
PA6 (5 µg/mL)	88,86	9,83	1,07	0,23
PA6 (10 µg/mL)	85,78	13,52	0,50	0,20
PA6 (15 µg/mL)	80,17	15,92	3,26	0,65
Camptothecin (0,5 µM)	80.61	18,67	0,30	0,41



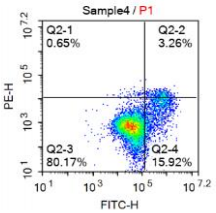
Tế bào ủ với 0.5% DMSO trong 48h



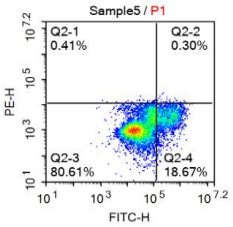
Tế bào ủ với mẫu PA7 (5 µg/mL) trong 48h



Tế bào ủ với mẫu PA6 (10 µg/mL) trong 48h



Tế bào ủ với mẫu PA6 (15 µg/mL) trong 48h



Tế bào ủ với Camptothecin (0.5 µM) trong 48h

Hình 3.20. Tác động của **PA6** ở các nồng độ đến quá trình apoptosis tế bào A549 sau 48h ủ mẫu sử dụng Kit Annexin V/cell dead apoptosis

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng hợp chất **PA6** làm tăng đáng kể tỉ lệ tế bào apoptosis và phụ thuộc nồng độ. Những kết quả này đã cho thấy khả năng cảm ứng và kích hoạt quá trình apoptosis của hợp chất **PA6**, đặc

biệt là trong giai đoạn sớm apoptosis trong tế bào A549 (đạt 15,92%) và cũng có tác động gây chế tế bào theo dạng hoại tử, mặc dù không đáng kể (0,65%).

3.3.4.3. Nghiên cứu hoạt tính cảm ứng apoptosis thông qua enzyme caspase 3

Bảng 3.8. Tác động của **PA6** đến khả năng sinh caspase 3 trong tế bào A549 (Tỷ lệ cảm ứng caspase-3 khi xử lý PA6 trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) đạt 1,30 lần (5 µM), 2,00 lần (10 µM), 2,59 lần (15 µM); camptothecin đạt 3,23 lần; **P<0,01; ***P<0,001)

Mẫu	Số lần kích thích caspase 3 so với đối chứng âm	Sai số
PA6 15 µM	2,59 **	0,26
PA6 10 µM	2,00 ***	0,06
PA6 5 µM	1,30	0,22
Camptothecin (0,5 µM)	3,23***	0,06
Đối chứng âm	1,00	0,06

Kết quả thử nghiệm cho thấy hợp chất **PA6** có khả năng cảm ứng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư A549 nhờ sản sinh caspase-3 với số lần kích thích tăng lần lượt là 2,59 lần, 2,00 lần và 1,30 lần so với đối chứng âm lần lượt ở nồng độ 15, 10 và 5 µM, một cách tương ứng. Chất đối chứng dương camptothecine với hoạt tính caspase-3 tăng 3.23 lần so với đối chứng âm và hoạt động ổn định trong thử nghiệm (P<0,01). Điều này chỉ ra rằng hoạt chất **PA6** đã kích hoạt con đường caspase để cảm ứng hoạt động của quá trình apoptosis trong các tế bào A549 và sau đó dẫn đến sự ức chế sự tăng sinh

3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm và gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ loài *P. minima*

3.4.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế NO của các hợp chất phân lập từ loài P. minima

Hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất phân lập được từ loài *P. minima* được đánh giá thông qua mô hình tế bào RAW 264.7 kích thích bởi LPS. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất phân lập được trình bày ở bảng 3.9 dưới đây:

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7 của hợp chất phân lập từ loài *P. minima*

Stt	Tên hợp chất	Kí hiệu	IC_{50} (μM)
1	withanolide E	PM1	**0,15 ± 0,02**
2	withaperuvin C	PM2	**> 100**
3	4β-hydroxywithanolide E	PM3	**NA**
4	28-hydroxywithaperuvin C	PM4	**> 100**
5	physaperuvin G	PM5	**70,25 ± 2,43**
6	4-deoxywithaperuvin	PM6	**> 100**
	L-NMMA		**7,84 ± 0,87**

NA: không xác định được do gây chết tế bào thử nghiệm RAW264.7.

Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự sản sinh NO theo nồng độ của 06 hợp chất phân lập từ loài *P. minima* cho thấy, thể hiện hoạt tính mạnh nhất là hợp chất **PM1** với giá trị IC_{50} là 0,15 ± 0,02 μM, mạnh hơn nhiều lần so với chất đối chứng dương L-NMMA (IC_{50} = 7,84 ± 0,87 μM). Hợp chất **PM5** thể hiện hoạt tính yếu với IC_{50} là 70,25 ± 2,43 μM. Các hợp chất còn lại xem như không có hoạt tính do IC_{50} > 100 μM **(PM2, PM4**) hoặc gây chết tế bào thử nghiệm (**PM3**).

Hợp chất PM1 có tác dụng ức chế sự sản sinh NO là do trong cấu trúc hóa học có mặt của nhóm 5β,6β-epoxy tại vòng B làm tăng hoạt tính chống viêm. Hợp chất PM2, PM4, PM6 không có tác dụng ức chế sự sản sinh NO. Hợp chất PM3 cho thấy độc tính cao, gây chết tế bào thử nghiệm. Hợp chất PM5 có tác dụng ức chế sự sản sinh NO chọn lọc trên từng dòng tế bào ung thư khác nhau.

3.4.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế một số dòng tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ loài P. minima

Sáu hợp chất (**PM1**-**PM6**) phân lập được từ loài *P. minima* được đánh giá hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (SK-LU-1) và ung thư vú (MCF7) theo phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 6 hợp chất phân lập từ phân đoạn PMD và PME của loài *P. minima*

Stt	Tên hợp chất	Kí hiệu	IC_{50} (μM)		
			HepG2	**SK-LU-1**	**MCF7**
1	withanolide E	PM1	**0,051 ± 0,004**	**0,056 ± 0,003**	**0,059 ± 0,006**
2	withaperuvin C	PM2	**19,50 ± 1.75**	**14.65 ± 0,82**	**11,74 ± 1,01**
3	4*β*-hydroxywithanolide E	PM3	**0,80 ± 0,05**	**0,86 ± 0,09**	**0,83 ± 0,13**
4	28-hydroxywithaperuvin C	PM4	**>100**	**>100**	**>100**
5	physaperuvin G	PM5	**>100**	**>100**	**>100**
6	4-deoxywithaperuvin	PM6	**64,44 ± 3,93**	**56,22 ± 6,22**	**65,33 ± 4,06**
	Etoposide		**2,68 ± 0,89**	**3,29 ± 0,05**	**0,38 ± 0,02**

Kết quả đánh giá cho thấy các hợp chất **PM1** và **PM3** thể hiện hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (SK-LU-1) và ung thư vú (MCF7) rất mạnh. Các hợp chất **PM2** và **PM6** thể hiện hoạt tính yếu hơn. Hai hợp chất **PM4** và **PM5** với giá trị IC_{50} > 100 μM được xem như không có hoạt tính gây độc đối với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào cho thấy 2 hợp chất steroid thuộc khung withanolde (**PM1**, **PM3**) phân lập được từ loài *P. minima* là các hợp chất có tiềm năng và cần được nghiên cứu sâu hơn về cơ chế để định hướng ứng dụng lâm sàng.

Theo kết quả phân tích cấu trúc của thì hợp chất **PM1** có mặt của nhóm 5β,6β-epoxy tại vòng B. Đây là nguyên nhân lý giải cho hợp chất **PM1** gây độc tế bào HepG2, SK-LU-1, MCF7.

Theo số liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của **PM2** khá giống với hợp chất **PM1** ngoại trừ các tín hiệu tại khu vực vòng A và vòng B bởi sự có mặt của liên kết đôi tại C-4/C-5 và mất đi cầu nối epoxy tại C-5/C-6 ở **PM2.** Sự thay thế các nhóm thế đã ảnh hưởng đến hoạt tính gây độc của tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm HepG2, SK-LU-1, MCF7 của hợp chất **PM2** yếu hơn **PM1**.

Theo phân tích phổ NMR, cấu trúc hóa học của **PM3** giống với **PM1** ngoại trừ sự có mặt nhiều hơn 1 nhóm hydroxy tại C-4 ở **PM3**. Sự thay thế nhóm thế trong cấu trúc lý giải hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư HepG2, SK-LU-1, MCF-7của hợp chất **PM3** yếu hơn hợp chất **PM1**.

Hợp chất **PM4 và PM5** không thể hiện hoạt tính trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm .

Số liệu phổ NMR của **PM6** khá giống với hợp chất **PM1** ngoại trừ các vị trí từ C-4 đến C-8 điều này làm giảm hoạt tính gây độc tế bào. Vì vậy, theo kết quả nghiên cứu chúng tôi nhận thấy rằng hoạt tính gây độc tế bào HepG2, SK-LU-1 và MCF-7 của **PM6** thấp hơn so với **PM1**.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Đã sàng lọc các hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư từ các cao chiết của 02 loài *P. angulata* và *P. minima* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam.

- Đối với loài *P. angulata* thì cao chiết PAD có hoạt tính ức chế sản sinh NO và hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh nhất.

- Đối với loài *P. minima* thì cao chiết PMD, PME có hoạt tính ức chế sản sinh NO và hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh hơn so với các cao PMW và cao chiết tổng PM.

2. Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ các dịch chiết tiềm năng của 02 loài *P. angulata* và *P. minima* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam.

- Từ mẫu loài *P. angulata* đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 15 hợp chất trong đó có 03 hợp chất mới, lần đầu tiên được ghi nhận là: physalucoside A (**PA1**), physagulin P **(PA6),** physagulin Q **(PA12)**.

- Từ mẫu loài *P. minima* đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 06 hợp chất trong đó có 01 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Physalis* là 4-deoxywithaperuvin **(PM6)** và 05 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *P.minima* gồm: là withanolide E (**PM1**), withaperuvin C (**PM2**), 4*β*-hydroxywithanolide E (**PM3**), 28-hydroxywithaperuvin C (**PM4**), physaperuvin G (**PM5**).

3. Đã đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập được từ loài *P. angulata* và *P. minima*.

- Các hợp chất physagulin B **(PA9)**, physagulide Q (**PA10)**, (20*S*, 22*R*)-15*α*-acetoxy-5*α*-chloro-6*β*,14*β*-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienonide (**PA11)**, physalin F (**PA13)**, physalin B (**PA14)** có tác dụng ức chế rất mạnh sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7. Hai hợp hợp chất physalin F (**PA13)**, physalin B (**PA14)** cho thấy rõ hoạt tính kháng viêm khi làm giảm sự biểu hiện của các protein iNOS và COX-2.

- Hợp chất withanolide E (**PM1**) thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh nhất với IC_{50} = 0,15 ± 0,02 µM. Các hợp chất còn lại chưa thể hiện hoạt tính cần nghiên cứu.

4. Đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ loài *P. angulata* và *P. minima*. Kết quả như sau:

- Hợp chất (20*S*,22*R*)-15α-acetoxy-5α-chloro-6β,14β-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienonide **(PA11)**, physalin F **(PA13)**, physalin B (**PA14)** thể hiện hoạt tính gây độc rất mạnh trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) (IC_{50} từ 0,68 đến 1,03 µM). Hợp chất **PA13** có tác dụng gây độc mạnh nhất trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) với IC_{50} = 0,23 ± 0,03 µM. Các hợp chất Withaminimine **(PA3)**, physagulin P **(PA6),** physagulin L **(PA7),** physagulin M **(PA8)**, (20*S*,22*R*)-15α-acetoxy-5*α*-chloro-6*β*,14β-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienonide (**PA11)**, physalin B **(PA14**) thể hiện hoạt tính gây độc đáng kể đối với dòng tế bào ung thư tụy (PANC-1) với IC_{50} từ 3,18 đến 34,06 µM. Các hợp chất còn lại chưa cho thấy hoạt tính ở nồng độ nghiên cứu.

- Hợp chất mới physagulin P **(PA6)** cho thấy hoạt tính cảm ứng apotosis trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) thông qua khả năng gây ra sự cô đặc/phân mảnh nhân tế bào, kích hoạt caspase-3, tăng tỷ lệ tế bào apoptosis sớm, apoptosis muộn và hoại tử.

- Hai hợp chất withanolide E **(PM1)** và 4β-hydroxywithanolide E **(PM3)** thể hiện hoạt tính gây độc rất mạnh trên dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (SK-LU-1) và ung thư vú (MCF7) với giá trị IC_{50} từ 0,051 đến 0,86 μM. Các hợp chất còn lại chưa cho thấy hoạt tính ở nồng độ nghiên cứu..

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu đã thu được của các hợp chất phân lập từ hai loài thực vật *P. angulata* và P. *minima*, chúng tôi kiến nghị:

- Hợp chất physagulin P **(PA6)** là hợp chất mới đầy tiềm năng trong việc nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ung thư phổi (A549) và ung thư tụy (PANC-1). Vì vậy, cần có những nghiên cứu sâu hơn để tìm hiểu cơ chế tác động ở mức phân tử của hai hợp chất này nhằm định hướng ứng dụng lâm sàng.

- Hợp chất withanolide E (**PM1**) cho thấy hoạt tính kháng viêm tiềm năng khi ức chế mạnh sự sản sinh NO và cần được đánh giá thêm các tác động kháng viêm thông qua khả năng ức chế các cytokine tiền viêm (TNF-α, IL-6), cytokine viêm (PGE-2) hay enzyme COX-2 v.v. để khẳng định

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Lần đầu tiên phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của ba hợp chất mới từ loài *P. angulata* là physalucoside A (**PA1**), physagulin P **(PA6),** physagulin Q **(PA12)**. Từ loài *P. minima* phân bố ở Việt Nam đã thu được 01 hợp chất mà lần đầu tiên phân lập từ chi *Physalis* là 4-deoxywithaperuvin **(PM6)**.

2. Lần đầu tiên đánh giá hoạt tính gây độc tế bào với 6 dòng tế bào ung thư và định hướng hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của 21 hợp chất phân lập từ 2 loài *P. angulata* và *P. minima.*

3. Lần đầu tiên xác định được 2 hợp chất Physalin F **(PA13)** và physalin B **(PA14)** phân lập từ loài *P. angulata* có hoạt tính ức chế enzyme gây viêm iNOS và COX-2

4. Lần đầu tiên hợp chất mới physagulin P **(PA6)** được xác định và ghi nhận tác động kích hoạt apoptosis trong tế bào ung thư phổi dòng A549.

DANH MỤC CÁC CÔNG BỐ KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoàng Lê Tuấn Anh, Đỗ Thị Thảo, Dương Thị Dung, Phan Văn Kiệm, Trần Hồng Quang, **Phạm Thị Hải Yến**, Đỗ Thanh Tuân, Phạm Việt Cường, Lê Cảnh Việt Cường, Trần Mạnh Hùng (2018), Phytochemical constituents and cytotoxic activity of *Physalis angulata* L growing in Vietnam, *Phytochemistry Letters* 27: 193-196.

2. Lê Cảnh Việt Cường, Lê Bá Vinh, **Phạm Thị Hải Yến,** Lê Thị Liên, Phạm Thị Thúy Hoài, Tôn Thất Hữu Đạt, Đỗ Thị Thảo, Bạch Long Giang, Ho Kim Young, Hoàng Lê Tuấn Anh (2019), Identification of potential cytotoxic inhibitors from *Physalis minima, Natural Product Research,* 35(12): 2082-2085. .

3. **Phạm Hải Yến**, Lê Cảnh Việt Cường, Tôn Thất Hữu Đạt, Đinh thị Quý Thủy, Đặng Thị Ngọc Hoa, Nguyễn Thị Cúc, Dương Thị Hải Yến, Đỗ Thị Thảo, Hoàng Lê Tuấn Anh (2019). Whithanolides from the whole plant of *Physalis angulata* and their anti-inflammatory activities, *Tạp chí Hóa học*, 57(3):334-338.

4. Hoàng Lê Tuấn Anh, Lê Bá Vinh, Đỗ Thị Thảo, Phan Văn Kiệm, **Phạm Thị Hải Yến,** Bạch Long Giang, Trần Mạnh Hùng, Trần Thị Phương Anh Ho Kim Young (2020), Bioactive compounds from *Physalis angulata* and their anti-inflamatory and cytotoxic activities, *Natural Products Research* 23(8): 809-818.

5. **Phạm Thị Hải Yến**, Nguyễn Thị Nga, Triệu Hà Phương, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Phương, Hoàng Lê Tuấn Anh, Đỗ Thị Thảo (2022). Determination of apoptotic inductive activities of physalin P from *Physalis angulata* plant in Vietnam, *Tạp chí Sinh học* 20(1):81-87