

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 TÀM BÓP
(*P. angulata*) VÀ THÙ LỪ NHỎ (*P. minima*), HỌ CÀ - SOLANACEAE**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

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

2. PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Đỗ Thị Thảo và PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án hoàn toàn trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả;

Phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Phạm Thị Hải Yến

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Trung tâm Ứng dụng và Triển khai Miền Trung, Viện nghiên cứu khoa học miền Trung thuộc viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam cùng với sự hỗ trợ kinh phí thực hiện của đề tài nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên mã số 104.01-2016-26-Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia - Nafosted đã cấp kinh phí cho việc thực hiện luận án.

Trong quá trình thực hiện luận án, tác giả đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ vô cùng quý báu từ các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS. Đỗ Thị Thảo và PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh là những người đã hướng dẫn tận tình, chu đáo và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin được chân thành cảm ơn Viện Công nghệ sinh học và Viện nghiên cứu khoa học miền Trung thuộc Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi về thiết bị, hỗ trợ kinh phí hóa chất và thực hiện các thí nghiệm liên quan trong quá trình làm luận án.

Tôi xin được chân thành cảm ơn tới ban lãnh đạo và các cán bộ Phòng thử nghiệm sinh học, Trung tâm Ứng dụng và Triển khai Miền Trung đã giúp đỡ tôi tách chiết, nuôi cấy tế bào và thử hoạt tính của hợp chất trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin được trân trọng cảm ơn lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Ban Giám hiệu trường Đại học Văn hóa, Thể thao và Du lịch Thanh Hóa đã hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin được gửi lời biết ơn chân thành nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn quan tâm, động viên và khích lệ trong suốt quá trình thực hiện.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả

Phạm Thị Hải Yến

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	4
1.1. Một vài nét về viêm và ung thư.....	4
1.1.1. Viêm và tiềm năng kháng viêm của các hợp chất từ thực vật.....	4
1.1.2. Ung thư và tiềm năng kháng tế bào ung thư của các hợp chất từ thực vật.....	11
1.1.3. Mối liên quan giữa viêm và ung thư.....	18
1.1.4. Vai trò sinh lý của Oxit nitric (NO) trong ung thư và viêm.....	20
1.1.5. Apoptosis trong ung thư và viêm.....	24
1.2. Sơ lược về chi <i>Physalis</i>.....	28
1.2.1. Đặc điểm thực vật chi <i>Physalis</i>	28
1.2.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi <i>Physalis</i>	29
1.2.3. Giới thiệu về loài Tầm bóp (<i>P. angulata</i>).....	29
1.2.4. Giới thiệu về loài Thù lù nhỏ (<i>P. minima</i>).....	38
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	43
2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.....	43
2.1.1. Mẫu loài Tầm bóp (<i>P. angulata</i>).....	43
2.1.2. Mẫu loài Thù lù nhỏ (<i>P. minima</i>).....	43
2.1.3. Vật liệu nghiên cứu.....	43
2.1.4. Hoá chất và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	44
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	45
2.2.1. Phương pháp xử lý tạo cao chiết methanol và các cao phân đoạn.....	45

	<i>của các mẫu P.angulata và P.minima</i>	45
2.2.2.	<i>Phương pháp phân lập các hợp chất từ loài P. angulata</i>	45
2.2.3.	<i>Phương pháp phân lập các hợp chất từ loài P. minima</i>	48
2.3.	Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất	50
2.3.1	<i>Phương pháp sắc ký dùng để phân lập các hợp chất từ mẫu thực vật</i> ...	50
2.3.2.	<i>Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân</i>	52
2.3.3	<i>Phương pháp phổ khối lượng</i>	53
2.3.4	<i>Phương pháp đo độ quay cực $[\alpha]_D$</i>	53
2.4.	Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học	53
2.4.1.	<i>Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro</i>	53
2.4.2.	<i>Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư (cytotoxic assay)</i>	54
2.4.3.	<i>Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào sử dụng tế bào đại thực bào RAW 264.7</i>	55
2.4.4.	<i>Phương pháp Western Blot</i>	55
2.4.5.	<i>Phương pháp đánh giá tác động cảm ứng apoptosis</i>	56
2.5.	Phương pháp phân tích thống kê	57
	CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	58
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	58
3.1.1.	<i>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</i>	58
3.1.2.	<i>Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ hai loài P. angulata và P. minima</i>	60
3.2.	Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P. angulata và P. minina	63
3.2.1.	<i>Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P. angulata</i>	63
3.2.2.	<i>Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài P.</i>	

<i>minima</i>	78
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 <i>P. angulata</i>	88
3.3.1. <i>Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất phân lập từ loài P. angulata</i>	88
3.3.2. <i>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</i>	93
3.3.3. <i>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</i>	94
3.3.4. <i>Kết quả đánh giá cảm ứng apoptosis của hợp chất PA6 trên dòng tế bào ung thư phổi (A549)</i>	103
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 <i>P. minima</i>	110
3.4.1. <i>Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế NO của các hợp chất phân lập từ loài P. minima</i>	110
3.4.2. <i>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</i>	112
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	116
KẾT LUẬN	116
KIẾN NGHỊ	117
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	118
DANH MỤC CÁC CÔNG BỐ KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	119
TÀI LIỆU THAM KHẢO	120
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
^{13}C -NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13 đồng vị
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Chemical Shift Correlation	Phổ tương tác proton-proton
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
δ_{C}	Carbon chemical shift	Độ dịch chuyển hóa học Carbon
δ_{H}	Proton chemical shift	Độ dịch chuyển hóa học Proton
A549	Human lung adenocarcinoma epithelial cell line	Tế bào ung thư biểu mô phổi người dòng A549
brs	Broad singlet	Tín hiệu đơn rộng
brt	Broad triplet	Tín hiệu ba rộng
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ COSY
COX-2	Enzyme cyclooxygenase 2	
d	Doublet	Tín hiệu đôi
dd	Doublet of doublet	Tín hiệu đôi đôi
ddd	doublet of doublet of doublet	Tín hiệu đôi đôi đôi
dt	doublet of triplet	Tín hiệu ghép đôi ba
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid	Axit Deoxyribo Nucleic
HeLa	Human epithelial cervical cancer cell line	Tế bào ung thư cổ tử cung người dòng Hela

HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell	Tế bào ung thư biểu mô gan người dòng HepG2
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrum Spectroscopy	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	NO synthase cảm ứng
IL	Interleukin	
<i>J</i>	Coupling constant	Hằng số ghép
LPS	lipopolysaccharide	
m	Multiplet	Tín hiệu đa
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line	Tế bào ung thư vú người dòng MCF-7
NO	Oxit nitric	
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ NOESY
NOS	Nitric oxide synthase	
<i>P. angulata</i>	<i>Physalis angulata</i>	Loài tâm bóp
<i>P. minima</i>	<i>Physalis minima</i>	Loài thù lù nhỏ
PGE2	Prostaglandin E2	

PANC-1	Human pancreatic cancerous cell line	Tế bào ung thư tụy ở người dòng PANC-1
RAW 264.7		Đại thực bào
s	Singlet	Tín hiệu đơn
SK-LU-1	Human lung adenocarcinoma cells	Tế bào ung thư phổi người dòng SK-LU-1
t	Triplet	Tín hiệu ba
TNF	Tumor necrosis factors	Yếu tố hoại tử khối u
TGF	Transforming Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng khối u
KRAS	Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog	Gen sinh ung thư

DANH MỤC CÁC BẢNG

		Trang
<i>Bảng 2.1.</i>	Các cao chiết từ loài <i>P. angulata</i> và <i>P. minima</i>	45
<i>Bảng 3.1.</i>	Số liệu phổ NMR của hợp chất PA1	64
<i>Bảng 3.2.</i>	Số liệu phổ NMR của hợp chất PA6	66
<i>Bảng 3.3.</i>	Số liệu phổ NMR của hợp chất PA12	68
<i>Bảng 3.4.</i>	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 <i>P. angulata</i>	89
<i>Bảng 3.5.</i>	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 15 hợp chất lập từ cao chiết PAD của loài <i>P. angulata</i>	95
<i>Bảng 3.6</i>	Phần trăm tế bào có ngưng tụ hoặc phân mảnh nhân dưới tác động của hoạt chất PA6	105
<i>Bảng 3.7</i>	Tỉ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của PA6	106
<i>Bảng 3.8</i>	Tác động của PA6 đến khả năng sinh caspase 3 trong tế bào A549...	109
<i>Bảng 3.9</i>	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 <i>P. minima</i>	111
<i>Bảng 3.10</i>	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 6 hợp chất phân lập từ phân đoạn PMD và PME của loài <i>P. minima</i>	113

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

		Trang
<i>Hình 1.1.</i>	Con đường ngoại bào và con đường nội bào của apoptosis.....	26
<i>Hình 1.2.</i>	Các cơ chế làm giảm quá trình apoptosis và gây ung thư.....	27
<i>Hình 1.3.</i>	Thân (A), rễ (B), toàn bộ cây (C), quả và đài hoa (D) và lá (E) của loài <i>P. angulata</i>	29
<i>Hình 1.4.</i>	Cấu trúc hóa học một số hợp chất phân lập từ loài <i>P.angulate</i>	31
<i>Hình 1.5.</i>	Cấu trúc hóa học của các hợp chất: physangulide B (29), 4-O-acetylphysangulide B (30) và physangulide acetamide (31) và Physangulidine A (32) phân lập từ loài <i>P.angulata</i>	32
<i>Hình 1.6.</i>	Cấu trúc hóa học của hợp chất Physalin B (33) và Physalin F (34) phân lập từ loài <i>P.angulata</i>	33
<i>Hình 1.7.</i>	Cấu trúc hóa học một số hợp chất withanolides phân lập từ loài <i>P. angulata</i>	35
<i>Hình 1.8.</i>	Các chế phẩm thương mại khác nhau của loài <i>P.angulata</i>	36
<i>Hình 1.9.</i>	Hoa (A), Quả (B), Lá (C) và đài hoa (D) của loài <i>P.minima</i>	38
<i>Hình 1.10.</i>	Cấu trúc hóa học của các hợp chất physaminimin B (58), physaminimin E (59), withaphysalin A (60) và 2, 3-dihydrowithaphysalin C (61) phân lập từ loài <i>P. minima</i>	41
<i>Hình 2.1.</i>	Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài <i>P.angulata</i>	46
<i>Hình 2.2.</i>	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PAD của loài <i>P.angulata</i>	46
<i>Hình 2.3.</i>	Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài <i>P. minima</i>	48
<i>Hình 2.4.</i>	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PMD của loài <i>P.minima</i>	49

Hình 2.5.	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao chiết PME của loài <i>P. minima</i>	50
Hình 3.1.	Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết phân lập từ loài <i>P. angulata</i> thông qua giá trị IC ₅₀ (µg/mL)	58
Hình 3.2.	Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết phân lập từ loài <i>P. minima</i> thông qua giá trị IC ₅₀ (µg/mL)	59
Hình 3.3.	Giá trị IC ₅₀ trong thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư dòng A549 của các cao chiết từ loài <i>P. angulata</i>	62
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 <i>P. minima</i>	62
Hình 3.5.	Cấu trúc hóa học của hợp chất PA1	65
Hình 3.6.	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PA1	65
Hình 3.7	Cấu trúc hóa học của hợp chất PA6	68
Hình 3.8.	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PA6	68
Hình 3.9.	Cấu trúc hóa học của hợp chất PA12	70
Hình 3.10.	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PA12	70
Hình 3.11	Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ loài <i>P. angulata</i>	71
Hình 3.12	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM1	80
Hình 3.13	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM2	82
Hình 3.14	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM3	83
Hình 3.15	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM4	85
Hình 3.16	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM5	86

<i>Hình 3.17</i>	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất PM6	88
<i>Hình 3.18</i>	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.....	93
<i>Hình 3.19</i>	Hình ảnh tế bào A549 được nhuộm Hoechst 3334 dưới tác động của PA6 ở các nồng độ khác nhau.....	105
<i>Hình 3.20</i>	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.....	107

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 [1].

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 [2]. 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 [3]. 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 [4].

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 [5]. 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.[6]. 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 [7]. 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 [8, 9]. 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 hóa học của một số hợp chất từ hai 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 hai 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

1.1.1. Viêm và tiềm năng kháng viêm của các hợp chất từ thực vật

Hiện nay, viêm là căn bệnh rất phổ biến ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Viêm là phản ứng phức tạp của cơ thể tại mô liên kết - một mô có mặt ở mọi cơ quan - khởi phát sau khi bị tổn thương tế bào. Biểu hiện bằng sự thực bào tại chỗ, có tác dụng loại trừ tác nhân gây viêm và sửa chữa tổn thương; Quá trình viêm thường kèm theo các triệu chứng sưng, nóng, đỏ và đau do các mạch máu giãn nở, đưa nhiều máu đến nơi bị tổn thương. Các bạch cầu cũng theo mạch máu xâm nhập vào mô, tiết các chất prostalandin, cytokine nhằm tiêu diệt hoặc trung hòa các tác nhân gây tổn thương. Khi viêm cấp tính không được chữa trị triệt để thì có thể chuyển biến và trở thành viêm mãn tính. Viêm không phải là một bệnh cụ thể mà là một quá trình bệnh lý, gặp ở nhiều dạng khác nhau. Viêm vừa là một phản ứng bảo vệ cơ thể chống lại yếu tố gây bệnh, vừa là phản ứng bệnh lý, khi đáp ứng viêm không phù hợp hoặc có sự gia tăng quá mức, viêm sẽ trở thành có hại cho cơ thể như tổn thương mô lành, rối loạn các chức năng cơ quan, gây ung thư [10].

Trong quá trình viêm, các đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong việc khởi động, duy trì và giải quyết tình trạng viêm [11]. Ví dụ như dưới tác động của lipopolysaccharide (LPS) là một thành phần phổ biến trên màng ngoài vi khuẩn Gram âm, các đại thực bào sẽ tiết ra các cytokine tiền viêm (interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) và các chất trung gian gây viêm (oxit nitric - NO, prostaglandin E2 - PGE2) được tổng hợp tương ứng bởi NO synthase cảm ứng (iNOS) và cyclooxygenase-2 (COX-2) [12]. NO tác động lên tế bào cơ trơn mạch máu tại vị trí viêm, làm tăng tính thấm thành mạch và đẩy nhanh sự xâm nhập của các chất trung gian gây viêm, đau, lôi kéo bạch cầu đơn nhân vào vị trí viêm. iNOS tạo ra NO từ L-arginine là chất trung gian chính của quá trình kích hoạt miễn dịch và viêm. iNOS có khả năng kích hoạt COX-2, một loại enzyme quan trọng của quá trình viêm và cảm nhận đau, do LPS gây ra trên dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 bằng cách tạo NO nội sinh [13]. Các kích thích viêm kích hoạt COX-2

cũng kích hoạt iNOS, tạo ra NO. Do đó, ức chế sự biểu hiện quá mức của iNOS và COX-2 là một giải pháp cần thiết để ngăn ngừa và điều trị các bệnh viêm [14].

1.1.1.1. Các giai đoạn của quá trình viêm

Quá trình viêm thường diễn biến qua các giai đoạn sau [10]:

- Rối loạn tuần hoàn tại ổ viêm: Rối loạn tuần hoàn tại ổ viêm xảy ra ngay khi yếu tố gây viêm tác động lên cơ thể gồm bốn hiện tượng: Rối loạn vận mạch, hình thành dịch rỉ viêm, bạch cầu xuyên mạch và bạch cầu thực bào.

- Rối loạn chuyển hóa: Tại ổ viêm, quá trình oxy hóa tăng làm tăng nhu cầu oxy, nhưng sự sung huyết động mạch chưa đáp ứng kịp. Do vậy, pH máu giảm và giảm mạnh khi bắt đầu chuyển sang sung huyết tĩnh mạch, từ đó kéo theo hàng loạt những rối loạn chuyển hóa của các glucid, lipid và protein.

- Tổn thương mô: Tại vị trí viêm có hai loại tổn thương: Tổn thương tiên phát do nguyên nhân gây viêm tạo ra và tổn thương thứ phát do những rối loạn tại ổ viêm gây nên.

- Tăng sinh tế bào - Quá trình làm lành vết thương: Viêm bắt đầu bằng tổn thương tế bào và kết thúc bằng quá trình phát triển tái tạo. Ngay trong giai đoạn đầu đã có tăng sinh tế bào (bạch cầu đa nhân trung tính, rời đơn nhân và lympho bào). Về cuối, sự tăng sinh vượt mức hoại tử khiến ổ viêm được chữa lành. Các tế bào nhu mô tại vị trí viêm có thể được tái sinh hoàn toàn khiến cấu trúc và chức năng tại mô viêm vẫn được phục hồi. Trong trường hợp tế bào nhu mô không được tái sinh hoàn toàn hoặc không tái sinh mô viêm bị thay thế bằng mô xơ (sẹo).

1.1.1.2. Các con đường tín hiệu gây viêm

Các con đường gây viêm tác động đến cơ chế bệnh sinh của một số bệnh mãn tính và liên quan đến các chất trung gian gây viêm phổ biến. Các tác nhân kích thích viêm kích hoạt các đường dẫn truyền tín hiệu nội bào, sau đó kích hoạt sản xuất các chất trung gian gây viêm. Các yếu tố kích thích gây viêm chính, bao gồm các vi sinh vật và các cytokine như IL-1 β , IL-6, TNF- α làm trung gian tình trạng viêm thông qua tương tác với IL-1, thụ thể giống Toll (TLRs), thụ thể (IL-1R), thụ thể IL-6 (IL-6R) và thụ thể TNF (TNFR). Các thụ thể kích hoạt các con đường tín hiệu

nội bào quan trọng, bao gồm: Con đường NF- κ B, con đường MAPK, con đường JAK-STAT và con đường TLR4/MyD88 [15]:

- Con đường NF- κ B:

Con đường NF- κ B đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát quá trình viêm, đáp ứng miễn dịch, sự phát triển tế bào và apoptosis. NF- κ B bao gồm năm yếu tố phiên mã liên quan: P50, p52, RelA (p65), RelB và c-Rel. Hoạt động của NF- κ B được gây ra bởi một loạt các kích thích, bao gồm các chất có nguồn gốc từ mầm bệnh, các cytokine gây viêm và nhiều loại enzym. Trong điều kiện sinh lý, các protein I κ B có trong tế bào chất ức chế NF- κ B. Các thụ thể nhận dạng khuôn mẫu (Pattern-recognition receptors - PRR) sử dụng cơ chế truyền tín hiệu tương tự để kích hoạt I κ B kinase (IKK), bao gồm hai tiểu đơn vị kinase (IKK α và IKK β) và một tiểu đơn vị IKK γ . IKK điều chỉnh sự hoạt hóa con đường NF- κ B thông qua quá trình phosphoryl hóa I κ B. Quá trình phosphoryl hóa I κ B dẫn đến sự phân hủy của nó bởi proteasome và sau đó giải phóng NF- κ B để chuyển vị vào nhân và kích hoạt phiên mã. Con đường này điều chỉnh các phản ứng tiền viêm sản sinh các chất trung gian gây viêm (NO, PGE2) và sự biểu hiện của các enzyme cảm ứng của chúng (iNOS, COX- 2) và gia tăng số lượng tế bào viêm, góp phần tăng cường phản ứng viêm [15].

- Con đường MAPK (Mitogen-activated protein kinase)

MAPK là một họ các kinase protein serine/threonine có chức năng điều hòa một số quá trình sinh lý của tế bào như sự phiên mã gen, điều chỉnh tế bào tăng sinh hay biệt hóa, hoặc cảm ứng apoptosis, kích hoạt các cytokine gây viêm (như IL-1, TNF- α và IL-6) v.v. Những chất tác hiệu xuôi dòng khác nhau được hoạt hóa bởi các thành phần cấu thành MAPK cuối cùng liên quan đến 3 lộ trình chính: lộ trình ERK1/2 kinase, lộ trình p38 và lộ trình c-Jun N – terminal kinase (JNK).

Sự hoạt hóa của các MAPK, bao gồm Erk1/2, JNK, dẫn đến quá trình phosphoryl hóa và hoạt hóa các yếu tố phiên mã p38 có trong tế bào chất hoặc nhân, khởi đầu phản ứng viêm. Họ p38 là một nhóm protein kinase kích hoạt mitogen (MAPKs), một mục tiêu quan trọng được nghiên cứu để điều trị các bệnh viêm

đường thở mãn tính, viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh Alzheimer, xơ vữa động mạch, COVID-19 và hội chứng mạch vành cấp tính v.v. Bốn đồng dạng của họ MAPK p38 là p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) và p38 δ (MAPK13). Trong đó p38 α được kích hoạt bởi nhiều kích thích viêm và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa sinh tổng hợp các cytokine tiền viêm như interleukin 1 β (IL-1 β) và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α). Sự kích hoạt p38 α cũng khiến tăng cường biểu hiện của chất gây viêm như COX-2, iNOS [15]. Như vậy, con đường p38 α MAPK khi bị kích hoạt sẽ có khả năng điều chỉnh tình trạng viêm thông qua giải phóng các cytokine gây viêm. Do đó, ức chế con đường p38 α MAPK là một trong những mục tiêu trong điều trị các bệnh lý viêm [16].

- Con đường JAK-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)

Con đường JAK-STAT hỗ trợ sự tương tác của các tyrosine kinase với các yếu tố phiên mã bằng cách tác động trực tiếp vào các yếu tố phiên mã và là con đường ngoại bào có thể kiểm soát sự biểu hiện gen. STAT là các yếu tố phiên mã thường hiện diện trong các tế bào ở trạng thái bất hoạt. Khi có các phân tử gắn với thụ thể, nó sẽ kích thích STAT gắn kết với JAK tại vùng SH2. Lúc này STAT sẽ được phosphoryl hóa, dimer hóa và đi vào trong nhân để tác động đến quá trình phiên mã gen. Quá trình phosphoryl hóa tyrosine là cần thiết cho quá trình đồng phân hóa STAT và liên kết DNA. Do đó, tín hiệu JAK/STAT cho phép chuyển đổi trực tiếp tín hiệu ngoại bào thành các phản ứng phiên mã. Ví dụ, liên kết của các thành viên họ IL-6 với các thụ thể màng sinh chất sẽ kích hoạt các protein JAK-STAT. Các protein STAT được chuyển vị trí vào trong nhân liên kết các vùng khởi động gen mục tiêu để điều chỉnh quá trình phiên mã của các gen viêm [15].

- Con đường TLR4/MyD88 (Toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response 88)

Con đường TLR4/MyD88 có vai trò quan trọng trong việc cảm ứng các con đường NF- κ B và MAPK. Thụ thể Toll-like (Toll-like receptor - TLR) là một họ các thụ thể nhận dạng phối tử và tham gia kích hoạt phản ứng viêm. Trong số các thụ

thể TLR, TLR4 được coi là thụ thể đặc hiệu cho LPS. Sau khi được kích hoạt bởi LPS, TLR4 sẽ kích hoạt quá trình oligome hóa và thu hút các phân tử tiếp hợp ở vùng dưới thông qua tương tác với các vùng thụ thể toll-IL1 (TIR) bao gồm MyD88 và TIR domain containing adaptor inducing interferon β (TRIF). MyD88 có vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu của con đường TLR. Ngoại trừ TLR3, tất cả các thụ thể TLR đều truyền tín hiệu xuôi dòng thông qua MyD88. Theo đó sự kích hoạt con đường truyền tín hiệu TLR4/MyD88 cũng sẽ tăng cường kích hoạt con đường NF- κ B và MAKP. Do đó, ngăn chặn sự nhị phân của TLR4 sẽ giảm sự thu hút protein MyD88 và ức chế con đường NF- κ B và MAKP, ngăn chặn khởi động phản ứng viêm [15].

1.1.1.3. Một số hoạt chất nguồn gốc thiên nhiên có tác dụng kháng viêm

Hiện nay các loại thuốc kháng viêm trên thị trường chủ yếu là các loại thuốc được tổng hợp hóa học hoặc thuộc nhóm corticoid, nên tiềm ẩn khá nhiều nguy cơ như thể hiện nhiều tác dụng phụ gây hại đến sức khỏe và đôi khi có chi phí sản xuất cao.

Thuốc kháng viêm có nguồn gốc thực vật là một giải pháp khả thi cho vấn đề trên. Với nhiều ưu điểm vượt trội như tính an toàn, ít gây ra các phản ứng phụ, hiệu quả lâu dài và giá thành thấp, các thuốc có nguồn gốc thực vật đã và đang mở ra những bước đi mới trong điều trị bệnh viêm.

Cơ chế kháng viêm của các hoạt chất chiết xuất từ thực vật:

- Ức chế enzyme 15-Lipoxygenase (LOX)

Nhóm enzyme lipoxygenase (5, 8, 12, và 15 LOX) đóng vai trò quan trọng trong các sinh lý bệnh viêm. Enzyme đồng phân 15-LOX là một enzyme cốt yếu tham gia vào quá trình tổng hợp leukotrienes từ axit arachidonic. Các leukotriene là chất trung gian của nhiều phản ứng tiền viêm và dị ứng, do đó việc ức chế tổng hợp leukotrienes thông qua ức chế hoạt động của 15-LOX được coi là một trong những giải pháp hiệu quả để điều trị và kiểm soát tình trạng viêm [17].

Enzym LOX có thể bị ức chế hoạt động bằng cách chuyển enzym từ dạng có hoạt tính (dạng ferric) thành bất hoạt (dạng ferrous) hoặc tạo phức chelat với ion ở vị trí hoạt động của enzym [18].

- Ức chế enzym tổng hợp oxit nitric (NOS)

NOS là một enzym quan trọng liên quan đến việc điều chỉnh viêm, trương lực mạch máu, dẫn truyền thần kinh và ung thư. NO là một gốc tự do độc hại có thể gây tổn thương mô đáng kể ở nồng độ cao. Một lượng NO tăng lên đáng kể do iNOS tổng hợp tham gia vào quá trình kích thích viêm và hoạt động hiệp đồng với các chất trung gian gây viêm khác [19]. iNOS cũng đã được báo cáo là kích hoạt COX-2 do LPS gây ra trong dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 bằng cách tạo NO nội sinh [20]. Ngoài ra, các chất ức chế iNOS làm giảm sản xuất NO cũng làm giảm sản xuất prostaglandin (PG) trong tế bào [21]. Do đó, NO được tạo ra bởi quá trình kích hoạt iNOS trong quá trình viêm dường như đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt COX-2.

- Ức chế COX-2

Cơ chế hoạt động của các thuốc này là ức chế hoạt động của các enzyme cyclooxygenase (COX), xúc tác chuyển đổi axit arachidonic thành prostaglandin (PG - yếu tố trung gian quan trọng nhất gây nên phản ứng viêm) và thromboxan. Hai dạng COX đã được xác định là COX-1 được biểu hiện ở hầu hết các mô, cơ quan, trong khi COX-2 tồn tại chủ yếu trong các tế bào và mô viêm.

COX-1 rất cần thiết để duy trì trạng thái sinh lý bình thường của nhiều mô, cơ quan, bao gồm bảo vệ niêm mạc đường tiêu hóa, kiểm soát lưu lượng máu thận, cân bằng nội môi, phản ứng tự miễn dịch, chức năng phổi và hệ thần kinh trung ương và các bệnh tim mạch. COX-2 cảm ứng bởi các cytokine thường tham gia vào phản ứng viêm và có tác dụng xúc tác tạo ra các PG yếu tố quyết định tác dụng kháng viêm của thuốc [22]. Do đó, việc ức chế các enzym COX-2 sẽ kích thích các tín hiệu nội bào như NF- κ B, p38 hoặc MAPKs, làm thay đổi sự biểu hiện của các cytokine gây viêm như interleukin 1- beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) protein kết dính và chemokine, dẫn đến kích thích và hoạt hóa các tế bào miễn dịch. Sự ức chế COX-2 đã được coi là một mục tiêu quan trọng của các loại thuốc tiềm năng trong điều trị viêm [23].

- Ức chế các cytokine chống viêm

Các loại cytokine tiền viêm khác nhau đã được biết đến khi điều chỉnh các phản ứng viêm trực tiếp hoặc bằng khả năng gây ra sự tổng hợp các phân tử kết dính tế bào hoặc các cytokine liên quan trong một số loại tế bào nhất định.

Các cytokine tiền viêm chính chịu trách nhiệm cho các đáp ứng sớm là IL-1 α , IL-1 β), IL-6 và yếu tố gây hoại tử khối u α (TNF- α). Các chất trung gian gây viêm khác bao gồm yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (LIF), oncostatin M (OSM), yếu tố tăng trưởng khối u-beta (TGF- β), yếu tố kích thích đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF), IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 và một loạt các chemokine khác có tác dụng gây viêm. Việc ức chế sự biểu hiện của các cytokine này đã được chứng minh là cơ chế tác động chống viêm của nhiều cây thuốc cũng như của các hợp chất thiên nhiên. Thuốc chống viêm steroid (SAID) như prednisolone và dexamethasone cũng được biết là làm giảm sản xuất các cytokine gây viêm này [24].

- Một số hợp chất tự nhiên có hoạt tính chống viêm

Một số hợp chất tự nhiên đã được ghi nhận có hoạt tính chống viêm như curcumin, cucurbitacins, flavonoid [25].

+ Curcumin (*Curcuma longa*): Nghiên cứu lâm sàng cho thấy curcumin có tác dụng kháng viêm. Hoạt động chống viêm của curcumin chủ yếu là do ức chế chuyển hóa cyclooxygenase (COX) [20, 26], lipoxxygenase (LOX) [21, 23], interleukin (IL), yếu tố gây hoại tử khối u α (TNF- α) [27, 28], axit arachidonic (AA) [28] và yếu tố nhân kappa B (NF- κ B) [29].

+ Cucurbitacin

Cucurbitacin ban đầu được phân lập từ các loài thuộc họ Cucurbitaceae. Theo đặc điểm cấu trúc của chúng, cucurbitacin được chia thành mười hai loại [30]. Trong đó các hợp chất cucurbitacin B, D, E, I, dihydrocucurbitacin B, cucurbitacin R và dihydrocucurbitacin D có hoạt tính kháng viêm tốt [31, 32].

Peter và cộng sự (1999) báo cáo rằng hoạt động chống viêm của cucurbitacin từ cây *Wilbrandia ebracteata* có thể liên quan đến việc ức chế sản xuất prostaglandin E2 (PGE2) [33].

+ Flavonoid

Flavonoid là một nhóm các chất tự nhiên có cấu trúc khung phenol và xuất hiện phổ biến trong giới thực vật và được tìm thấy trong trái cây, rau, ngũ cốc, vỏ cây, rễ, thân, hoa. Hơn 4000 loại flavonoid đã được xác định [1]. Pelzer và cộng sự (1998) đã nghiên cứu hoạt tính chống viêm của 30 flavonoid được phân lập từ một số cây thuộc họ Compositae và phát hiện ra rằng tất cả các flavonoid được thử nghiệm đều có hoạt tính chống viêm tùy thuộc vào cả cấu trúc của chúng và phương pháp được sử dụng để thử nghiệm [34]. Cơ chế mà flavonoid phát huy tác dụng chống viêm liên quan đến việc ức chế các hoạt động của COX và/hoặc LOX, sinh tổng hợp eicosanoid và phân hủy bạch cầu trung tính. Các flavonoid chọn lọc như quercetin ức chế hoạt động cả COX và LOX [35]. Wang và cộng sự (1999) phát hiện ra rằng anthocyanins và aglycone chiết xuất từ quả anh đào có thể ức chế hoạt động của COX-1 và COX-2 [36]. Năm 2005, Hou và cộng sự đã phát hiện ra anthocyanidins ức chế sự biểu hiện COX-2 do lipopolysaccharide gây ra bằng cách kích hoạt các con đường kích hoạt protein kinase (MAPK) mitogen. Đây là cơ sở phân tử giải thích cho các đặc tính chống viêm của anthocyanidin [37].

1.1.2. Ung thư và tiềm năng kháng tế bào ung thư của các hợp chất từ thực vật

1.1.2.1. Khái quát

Ung thư là một thuật ngữ dùng để chỉ các nhóm bệnh lý ác tính của tế bào khi bị kích thích bởi các tác nhân sinh ung thư. Lúc này, các tế bào tăng trưởng và sinh sôi một cách bất thường, không tuân theo các cơ chế kiểm soát về phát triển của cơ thể. Các tế bào ung thư sinh trưởng không ngừng, có khả năng xâm lấn đến các cơ quan và bộ phận khác nhau của cơ thể và gây tổn hại đến các tế bào bình thường, cuối cùng khiến bệnh nhân tử vong [38].

Hiện có khoảng hơn 200 loại ung thư khác nhau về nguồn gốc tế bào phát sinh và phát triển ở tất cả các cơ quan và bộ phận trên cơ thể [39]. Các loại ung thư được đặt tên theo cơ quan, mô nơi khởi phát tế bào ung thư hoặc nơi khối u ung thư xuất hiện.

1.1.2.2. Phân loại ung thư

Theo nguồn gốc tế bào ung thư được phân chia thành 5 loại sau [40]:

- Ung thư Carcinoma (Ung thư biểu mô): Là loại ung thư phổ biến nhất. Chúng được sinh ra từ các tế bào biểu mô, là loại tế bào bao phủ các bề mặt bên trong và bên ngoài của cơ thể, trong đó bao gồm các bề mặt của da và cơ quan nội tạng. Ung thư biểu mô được chia thành hai loại chính: adenocarcinoma phát triển trong một cơ quan hoặc tuyến và ung thư biểu mô tế bào vảy bắt nguồn từ biểu mô vảy.

- Ung thư Sarcoma: Là ung thư hình thành trong các mô xương và mô mềm, bao gồm cơ, mỡ, mạch máu, mạch bạch huyết và mô liên kết. Các khối u sarcoma thường giống với các mô mà chúng phát triển.

- Ung thư Leukaemia (Ung thư máu): Là dạng ung thư mà tình trạng các tế bào bạch cầu ác tính tăng lên không kiểm soát. Kèm theo các tế bào tổn thương bị rối loạn quá trình biệt hóa. Theo thời gian, các tế bào này sẽ lấn át và thay thế các tế bào khỏe mạnh, lan tràn ra hệ máu ngoại vi và các cơ quan khác.

- Ung thư Lymphomas và Myeloma: Là ung thư của các tế bào thuộc hệ thống miễn dịch như ở hệ bạch huyết, tủy xương.

- Ung thư hệ thống thần kinh: Là dạng ung thư bắt nguồn từ các khối u não và tủy sống. Những khối u này được đặt tên dựa trên loại tế bào mà chúng hình thành và nơi khối u hình thành đầu tiên trong hệ thống thần kinh trung ương.

1.1.2.3. Các đặc tính của tế bào ung thư

Ung thư xảy ra do sự đột biến trong DNA hoặc quá trình phân chia tế bào bị lỗi dẫn đến tế bào tăng sinh vô hạn, vô tổ chức, không tuân theo các cơ chế kiểm soát về phát triển của cơ thể [41]. Các tế bào ung thư tăng trưởng và phân chia với tốc độ nhanh bất thường, dẫn tới biệt hóa kém và có nhiều đặc điểm hình thái bất thường. Các tế bào ung thư thường có kích thước không đồng đều, nhiều nhân, nhân lớn khiến tế bào chất bị thu hẹp bờ nhân không đều, nhiễm sắc thể xuất hiện nhiều, dị biệt, bào tương ít, kiềm tính. Những bất thường hay đột biến xảy ra trong tế bào sẽ khiến các tế bào bình thường trải qua một quá trình biến đổi dần dần để trở thành tế bào ung thư phát triển mạnh mẽ, liên tục dẫn đến tạo thành những khối u ác tính [5].

Ung thư xảy ra thông qua một loạt các đột biến của các gen bất kỳ, nhưng chủ yếu là của các proto-oncogen, anti-oncogen. Do sự đột biến này, tế bào ung thư sẽ có những thay đổi đặc trưng trong sinh lý học tế bào như sau [42]:

- Duy trì tín hiệu tăng sinh: Các tế bào ung thư có khả năng tự phân chia, sinh sôi nảy nở không ngừng - nhờ sự kích hoạt của gen gây ung thư như ras hoặc c-myc (trái ngược với các tế bào bình thường phải cần đến các yếu tố tăng trưởng bên ngoài).

- Lấn át các tín hiệu ức chế sinh trưởng: Các tế bào ung thư bị bất hoạt các gen ức chế khối u như gen Rb. Không những thế, chúng có thể chống lại các tín hiệu ức chế đến từ các tế bào lân cận.

- Tránh được sự chết theo chương trình: Các tế bào ung thư ngăn chặn và làm bất hoạt các gen liên quan tới cơ chế đưa các tế bào vào chương trình tự chết apoptosis.

- Có khả năng tăng sinh không giới hạn: Các tế bào ung thư có các gen sinh trưởng bị kích hoạt bất thường khiến chúng trở nên bất tử, đồng nghĩa với việc liên tục tăng trưởng, phân chia không giới hạn, tạo các thế hệ tế bào mới và không đồng nhất.

- Kích thích tạo mạch: Các tế bào ung thư có khả năng khởi động các con đường tín hiệu nội bào, như các gen mã hóa yếu tố tạo mạch (Vascular endothelial growth factor - VEGF) v.v., khiến chúng có thể kích hoạt các quá trình tạo và phát triển hệ mạch máu tới nuôi các khối u sơ cấp và thứ cấp.

- Kích hoạt sự xâm lấn và di căn: Các tế bào ung thư có khả năng đặc biệt là xâm lấn tới các cơ quan và mô khác và phá hủy các cơ quan đó, kết quả là xâm chiếm khắp cơ thể. Đây là đặc tính nguy hiểm nhất của căn bệnh ung thư mà hiện tại các nhà khoa học vẫn chưa hiểu rõ để tìm ra biện pháp ngăn chặn, hạn chế tỉ lệ tử vong cho bệnh nhân.

1.1.2.4. Một số hoạt chất tiềm năng có nguồn gốc tự nhiên chữa trị bệnh ung thư

Hiện nay, các phương pháp điều trị ung thư đang sử dụng thường theo cơ chế tác dụng đơn lẻ, còn nhiều tác dụng phụ không mong muốn xảy ra đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống của người bệnh. Bên cạnh đó chi phí hàng năm dành cho bệnh ung thư ngày càng tăng cao. Vì vậy, việc tìm kiếm thử nghiệm các loại thuốc mới an toàn, hiệu quả và giảm giá thành sản phẩm luôn được chú trọng. Với mục tiêu này các hoạt chất từ tự nhiên đặc biệt là hoạt chất có nguồn gốc từ thực vật được nghiên cứu nhiều nhất [43].

- Các chất gây ức chế đối với tubulin

Tubulin là protein tham gia hình thành vi ống microtubulin trong tế bào [44]. Sợi vi ống microtubule tham gia vào việc duy trì cấu trúc tế bào và tạo thành bộ khung tế bào. Chúng có vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh lý của tế bào, trong quá trình phân bào với vai trò là thành phần chính của thoi vô sắc và có liên quan chặt chẽ đến các giai đoạn khác nhau của chu trình tế bào. Do đó, các thuốc tác động lên sợi vi ống sẽ ảnh hưởng đến chu trình tế bào và kết quả là ức chế sự tăng sinh, phát triển của tế bào [45-47].

Cơ chế hoạt động của các chất ức chế Tubulin: Tubulin chủ yếu có ba miền liên kết, đó là miền liên kết paclitaxel, vinca và colchicine là những mục tiêu tốt nhất để phát triển các loại thuốc chống ung thư [48].

* Vùng liên kết colchicine

Colchicine và các đồng phân ngăn chặn phân chia tế bào bằng cách phá vỡ vi ống. Colchicine liên kết với chuỗi β -tubulin tạo thành cấu trúc tubulin-colchicine (T-C). Cấu trúc T-C này ngăn cản quá trình polymer hóa hình thành vi ống. Cấu trúc T-C làm thay đổi về hình dạng, chặn dimer tubulin, do đó chặn sự lắp ráp để hình thành cấu trúc vi ống. Vì cấu trúc T-C làm chậm lại việc dimer hóa tubulin nên vi ống không được lắp ráp dẫn đến mất cân bằng cấu trúc suốt trung kỳ của quá trình phân bào.

* Vùng liên kết vinca

Các alkaloid vinca liên kết trực tiếp với β -tubulin ở một vùng riêng biệt gọi là miền liên kết vinca. Các vinca này liên kết với tubulin một cách nhanh chóng và liên kết này có thể đảo ngược, không phụ thuộc vào nhiệt độ (từ 0-37⁰C). Các alkaloid vinca không tạo ngay dạng phức với tubulin hoặc không polymer hóa để tạo vi ống. Tuy nhiên, chúng có khả năng tác động tới hình thái và cấu trúc vi ống. Alkaloid vinca liên kết với tubulin với ái lực cao ở đầu vi ống nhưng với ái lực thấp tại các vị trí tubulin có mặt dọc hai bên vi ống. Liên kết ở vị trí có ái lực cao thì ức chế mạnh mẽ hoạt động của tubulin ngay cả ở nồng độ thuốc thấp trong khi liên kết ở vị trí có ái lực thấp thì có hoạt tính khử polymer hóa vi ống ở nồng độ thuốc tương đối cao.

* Vùng liên kết paclitaxel

Trái ngược với colchicine và alkaloid vinca, paclitaxel thúc đẩy quá trình polymer hóa ở cả pha kéo dài và pha tạo nhân trong phản ứng polyme hóa và nó giảm nồng độ tubulin (nồng độ tubulin hòa tan ở trạng thái bền vững).

Trong số các cơ chế tác động khác nhau của hợp chất tự nhiên thì sự tương tác với protein tubulin của tế bào là một trong những cơ chế quan trọng nhất và khoảng hơn 20% ứng cử viên thuốc mới hoạt động theo cơ chế này.

Theo cơ chế này thì có 2 loại thuốc chống ung thư chính sau: loại thứ nhất là thuốc ức chế sự polymer hóa tạo chuỗi tubulin (hay ngăn chặn sự lắp ráp tubulin), gồm các alkaloid vinca và loại thứ hai là thuốc kích thích sự polymer chuỗi tubulin (kích thích sự lắp ráp tubulin thành vi ống), thuộc loại này là taxol.

Có hàng trăm hợp chất đã được báo cáo kìm hãm sự phân bào bởi tác động của chúng đối với các microtubule. Trong tất cả các trường hợp đã được nghiên cứu, cơ chế phổ biến nhất là ức chế động học lên sợi trục chính của microtubule [49, 50].

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) thuộc họ Trúc đào (Apocynaceae) là loài cây có nguồn gốc từ Madagasca được trồng chủ yếu ở các nước có khí hậu ẩm. Từ lâu, cây dừa cạn là vị thuốc dân gian được người dân các nước châu Phi và châu Á dùng để chữa trị nhiều loại bệnh như tiểu đường, cao huyết áp, làm thuốc giảm đau v.v. [51]. Alkaloid là một họ các hợp chất indole dạng nhị phân, được chiết xuất hoặc bán tổng hợp từ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), đại diện cho một trong những lớp chất chống ung thư quan trọng nhất. Hoạt tính chống ung thư của alkaloid dừa cạn được phát hiện từ những năm 50 của thế kỷ XX. Các alkaloid ức chế sự kết hợp của tubulin vào microtubules, do đó ngăn chặn quá trình phân chia tế bào. Đồng thời, chúng liên kết với β -tubulin tại các vị trí khác nhau được gọi là miền vinca của tubulin. Vì vậy, hoạt tính chống tăng sinh của các alkaloid được cho là kết quả của sự tương tác giữa chúng với các thoi phân bào. Ngoài ra, tác dụng chống ung thư của alkaloid còn do tác động đối với chuyển hóa của glutamat, aspartat và vincristin, ngăn chặn sự tổng hợp ARN, protein. Trong các nghiên cứu *in vitro*, tác dụng của vinca alkaloid trên tubulin phụ thuộc vào nồng độ. Ở nồng

độ thấp, chúng ức chế chức năng và sự hình thành của microtubules. Còn khi ở nồng độ cao, nó diệt được cả tế bào. Vì thế, chúng được sử dụng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị ung thư [52].

Năm 1971, Wani và cộng sự đã phân lập được từ cây Thông đỏ Pacific (*Taxus brevifolia*) hợp chất taxol là một diterpene amide mới không gây độc và có khả năng chữa trị ung thư [53, 54].

Taxol (tên biệt dược là paclitaxel) có khả năng liên kết không thể đảo ngược với β -tubulin, do đó khiến vi ống sẽ thay đổi cấu trúc, không thể giữ được trạng thái cân bằng động vốn có. Taxol ngăn cản sự phân chia tế bào bằng cách dính trực tiếp lên bề mặt của ống vi thể, nó kích thích quá trình ghép các dimer của vi ống thành mạng lưới vi thể và ổn định mạng lưới vi thể bằng cách ngăn chặn quá trình tháo xoắn. Từ đó ức chế sự tái tổ chức năng lượng bình thường của mạng lưới vi thể, đồng thời Taxol cũng giúp củng cố sự bền vững của ống vi thể. Do vậy, tế bào không có khả năng bước vào kì giữa của quá trình nguyên phân dẫn tới quá trình nguyên phân bị dừng lại, kéo dài trạng thái phân bào và sự chết theo chương trình của tế bào được khởi động [55].

Như vậy Taxol là một loại thuốc trị liệu hóa học, nó can thiệp vào quá trình tăng trưởng và phát triển của các tế bào ung thư. Taxol hoạt động theo một cách khác với các thuốc trị liệu hóa học khác, nó ngăn chặn sự phát triển các tế bào ung thư và giết chúng ở ngay giai đoạn sớm. Từ lâu Taxol đã là thuốc dùng để chữa ung thư buồng trứng, ung thư tinh hoàn, ung thư vú đã di căn, ung thư ở phần đầu và cổ, ung thư phổi, u hắc tố (melanoma), ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thực quản v.v.

- Các chất ức chế topoisomerase

Topoisomerase là nhóm enzyme có vai trò điều hòa sự đóng xoắn hoặc tháo xoắn của chuỗi xoắn kép DNA và nhiễm sắc thể. Để bắt đầu quá trình nhân đôi, phân tử DNA phải được tháo xoắn nhờ vào hoạt động của các enzyme topoisomerase. Enzyme này sẽ liên kết với sợi đơn hoặc sợi kép DNA và cắt liên kết phosphate của DNA. Có hai loại topoisomerase. Loại I tháo xoắn khi chúng gắn

vào phân tử DNA và cắt một trong hai mạch. Sau khi giải phóng một phân tử DNA đã được tháo xoắn, các enzyme này sẽ nối lại chỗ đứt. Các topoisomerase loại II có khả năng tháo xoắn bằng cách cắt đứt cả hai mạch DNA. Khi thiếu các topoisomerase, đặc biệt là tuýp II thì các nhiễm sắc thể không phân ly được, tế bào không phân bào được, dễ bị chết nhất là khi có tác động của kháng sinh và các thuốc gây độc tế bào (thuốc chống ung thư). Do đó, enzyme này là đích trị liệu tiềm năng trong điều trị bệnh ung thư [56].

Năm 1966, Wall và Wani đã phân lập được hợp chất 20- (S) -camptothecin (CPT) từ vỏ và thân của cây Hỷ thụ (*Camptotheca acuminata*), một loại cây có nguồn gốc từ Trung Quốc được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư trong Y học cổ truyền Trung Quốc [57]. Camptothecin và dẫn xuất liên kết với topoisomerase I, ức chế topoisomerase phá hủy DNA và gây ra apoptosis. Trải qua các thử nghiệm các nhà khoa học cũng nhận thấy CPT còn có nhiều nhược điểm như độ ổn định và độ hòa tan kém, rất nhanh mất hoạt tính do thủy phân vòng E (vòng lacton) ngay cả trong môi trường pH sinh lý và gây độc với tủy xương. Để khắc phục các hạn chế liên quan đến camptothecin, các dẫn xuất khác nhau đã được phát triển. Mặc dù một số hợp chất phân tử nhỏ và lớn hiện đang được thử nghiệm lâm sàng, chỉ có hai dẫn xuất CPT là irinotecan và topotecan được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ cấp phép làm thuốc chống ung thư. Irinotecan hiện đang được sử dụng cho ung thư đại trực tràng di căn. Topotecan đã được phê duyệt cho ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung và ung thư phổi tế bào nhỏ [58].

Hai đồng phân etoposide và teniposide được tổng hợp từ hợp chất podophyllotoxin - thành phần chính của cây Táo ma (*Podophyllum peltatum*) gây chết tế bào bằng cách ức chế topoisomerase II, do đó ngăn chặn sự phân cắt của phức hợp enzyme - DNA và kìm hãm sự sinh trưởng của tế bào. Cả 2 đồng phân này đều được sử dụng cho điều trị ung thư tinh hoàn, ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu không dòng lympho và u lympho không Hodgkin. Hiện nay Etoposide vẫn là một trong những thuốc phổ biến nhất trong điều trị ung thư di căn trên thị trường và được WHO liệt vào danh sách những thuốc an toàn và hiệu quả nhất dành cho sức khỏe [59, 60].

1.1.3. Mối liên quan giữa viêm và ung thư

Theo nghiên cứu của Mantovani và cộng sự (2008) cho thấy tế bào viêm và chất trung gian là thành phần thiết yếu của vi môi trường khối u (TME) [61]. Các tế bào viêm và các chất trung gian gây viêm có tác dụng kích thích sự tiến triển của bệnh ung thư. Một mặt, viêm tạo điều kiện cho quá trình phát sinh ung thư, biến đổi ác tính, phát triển khối u, xâm lấn và lây lan di căn. Mặt khác, viêm có thể kích thích các cơ chế tác động miễn dịch hạn chế sự phát triển của khối u [62]. Sự phát triển ung thư tăng lên do các bệnh viêm mãn tính (ví dụ, viêm gan và ung thư gan), nhiễm trùng mãn tính hoặc viêm do môi trường phơi nhiễm như amiăng hoặc khói thuốc lá. Viêm mãn tính liên quan đến ung thư do tạo điều kiện cho khả năng sao chép không giới hạn của tế bào (không phụ thuộc vào các yếu tố tăng trưởng), chống lại sự ức chế tăng trưởng, thoát khỏi sự chết tế bào theo chương trình apoptosis, tăng cường hình thành mạch, thoát khối u và di căn [42]. Hiện nay, người ta ước tính rằng có tới 20% trường hợp tử vong do ung thư có liên quan đến viêm [63]. Theo Mantovani và cộng sự (2008), mối liên hệ giữa sự hình thành khối u và viêm được thực hiện thông qua các con đường tín hiệu nội bào hoặc từ bên ngoài. Con đường nội bào được kích hoạt bởi sự thay đổi gen gây ra chứng viêm và ung thư. Những thay đổi này bao gồm kích hoạt gen sinh ung thư do đột biến, sắp xếp lại nhiễm sắc thể và bất hoạt các gen ức chế khối u. Các tế bào được biến đổi tiết ra chất trung gian gây viêm và do đó tạo ra một vi môi trường gây viêm. Con đường bên ngoài được thúc đẩy bởi tình trạng viêm hoặc nhiễm trùng làm tăng nguy cơ phát triển ung thư ở các cơ quan có nguy cơ mắc bệnh như tuyến tiền liệt, tuyến tụy, ruột kết, phổi và da [61]. Cả hai con đường can thiệp vào tế bào khối u và gây ra sự kích hoạt của một số yếu tố phiên mã như NF- κ B, STAT3 và HIF-1 dẫn đến sự hình thành các yếu tố gây viêm bao gồm chemokine, cytokine và PGHS-2 [64].

1.1.3.1. Con đường ngoại bào kết nối viêm và ung thư

Viêm ảnh hưởng đến các cơ quan như gan, tuyến tụy, dạ dày, ruột kết, tuyến tiền liệt v.v. đều có liên quan đến việc tăng nguy cơ ung thư. Các cytokine gây viêm chính (IL-1, TNF, IL-6), các yếu tố tăng trưởng tạo máu (MCSF) và yếu tố phiên mã NF- κ B có vai trò thúc đẩy các bước phát sinh ung thư sớm, sự xâm lấn và di

căn của khối u [65]. Các nghiên cứu khoa học chứng minh rằng TNF- α và IL-1 là yếu tố nguy cơ gây ung thư dạ dày và ung thư đại trực tràng [66, 67].

Theo nghiên cứu của Hanahan và cộng sự (2000) về vai trò của viêm qua trung gian NF- κ B trong quá trình hình thành khối u cho thấy NF- κ B gây ra một số thay đổi tế bào liên quan đến sự hình thành khối u bao gồm khả năng tự cung cấp tín hiệu tăng trưởng; không đáp ứng với sự ức chế tăng trưởng; chống lại các tín hiệu apoptosis tạo sự bất tử; hình thành mạch, xâm lấn mô và di căn [42]. Sự kích hoạt NF- κ B thường được quan sát thấy trong tế bào ung thư, có thể được thúc đẩy bởi các tín hiệu vi môi trường, bao gồm cytokine, tình trạng thiếu oxy và các chất trung gian oxy phản ứng (ROS) hoặc do thay đổi gen [68]. Đặc biệt, các cytokine tiền viêm (như IL-1 và TNF - α) sẽ thâm nhập vào bạch cầu, có thể kích hoạt NF- κ B trong tế bào ung thư và góp phần vào sự tăng sinh và tồn tại của chúng [69, 70].

1.1.3.2. Con đường nội bào kết nối viêm và ung thư

Con đường nội bào được kích hoạt bởi sự thay đổi gen gây ra viêm và ung thư. Những thay đổi này bao gồm sự hoạt hóa gen tiền ung thư (proto-oncogene) theo hướng đột biến, sắp xếp lại hoặc khuếch đại nhiễm sắc thể và bất hoạt các gene ức chế khối u. Các tế bào bị biến đổi tiết ra các chất trung gian gây viêm và do đó tạo ra một vi môi trường gây viêm.

Việc kích hoạt các gen tiền ung thư rất quan trọng, là sự liên quan trực tiếp giữa sinh lý bệnh viêm với ung thư. Các đột biến trong gen sinh ung thư (KRAS) đóng một vai trò quan trọng trong quá trình hình thành khối u. Nhìn chung, có tới 30% tổng số khối u ở người có đột biến gen sinh ung thư. Những đột biến gây ung thư này chủ yếu ảnh hưởng đến vị trí KRAS, là đột biến gây ung thư được phát hiện trong 25–30% của tất cả các mẫu khối u được sàng lọc [71]. Trong các tế bào khối u, sự hoạt hóa của KRAS đột biến kéo theo sau sự cảm ứng và khởi động một số con đường tín hiệu nội bào. Các con đường tín hiệu được tạo ra bởi RAS đột biến bao gồm RAF/MEK/ERK kinase, con đường PI3K/AKT và các protein RalGDS. Trước đây, người ta đã chỉ ra rằng gen sinh ung thư là chất cảm ứng trực tiếp IL-6 tiền viêm và IL-8 tiền sinh mạch cần thiết để bắt đầu quá trình viêm, tạo mạch máu mới liên quan đến khối u và thúc đẩy sự phát triển của khối u. Sự biểu hiện quá mức

của K-Ras gây ung thư trong tế bào HeLa tạo khối u gây ra tăng tiết IL-8, trong khi ức chế IL-8 làm giảm sự phát triển của các tế bào này và số lượng tế bào CD31⁺ trong mô hình khối u xenograft. Hơn nữa, tín hiệu NF- κ B đã được xác định là rất cần thiết trong các khối u đột biến KRAS. Với những quan sát này, người ta giả định rằng việc nhắm mục tiêu vào con đường tín hiệu NF- κ B có thể hiệu quả trong việc điều trị các khối u có đột biến KRAS [72]. Meylan và cộng sự (2009) đã chứng minh rằng sự ức chế NF- κ B theo con đường STAT3 trong khối u phổi làm giảm đáng kể sự phát triển của khối u [73]. STAT3 gây ra tình trạng viêm thúc đẩy ung thư và hạn chế các phản ứng miễn dịch chống khối u bằng cách chống lại biểu hiện gây ra bởi NF- κ B của các cytokine Th1 chống khối u (IL-12, IFN- γ). STAT-3 cũng gây ra sự biểu hiện của các chất trung gian kích thích khối u (cytokine, pro-angiogenic và các yếu tố tăng trưởng) và các thụ thể tương ứng của chúng, lần lượt kích hoạt điều hòa miễn dịch qua trung gian STAT3 trong vi môi trường khối u. Do đó, sự kích hoạt của STAT3 không chỉ thúc đẩy tình trạng viêm liên quan đến ung thư mà còn ngăn chặn các phản ứng miễn dịch chống khối u. Sự kích hoạt STAT3 dẫn đến việc điều chỉnh sự biểu hiện của nhiều gen để duy trì tình trạng viêm liên quan đến khối u và thúc đẩy sự phát triển của khối u. STAT3 làm giảm các phản ứng miễn dịch kháng u do NF- κ B làm trung gian trong tế bào. Ngoài ra, STAT3 kéo dài thời gian hoạt động của NF- κ B thông qua quá trình acetyl hóa RelA qua trung gian acetyltransferase p300 trong quá trình gây ung thư và viêm mãn tính bằng cách hoạt động như một yếu tố đồng phiên mã cho RelA. Do đó góp phần liên tục kích hoạt NF- κ B trong quá trình viêm mãn tính và quá trình tạo khối u ác tính. Do khả năng kích hoạt NF- κ B của STAT3 trong khối u ác tính nên càng làm gia tăng tình trạng viêm liên quan đến khối u [74, 75].

1.1.4. Vai trò sinh lý của Oxit nitric (NO) trong ung thư và viêm

NO được biết đến là một trong những gốc tự do dạng khí đơn giản nhất và đóng vai trò tín hiệu trung gian quan trọng trong cơ thể. NO tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý thông thường và cả sinh lý bệnh như trong sự dẫn truyền thần kinh, trương lực mạch máu, sự co cơ, chuyển hóa, đáp ứng miễn dịch, phiên mã gen và dịch mã mRNA, quá trình biến đổi sau dịch mã của protein v.v. [76].

1.1.4.1. Vai trò sinh lý của NO trong sinh lý bệnh viêm

NO là một phân tử tín hiệu đóng vai trò chủ yếu trong cơ chế bệnh sinh của quá trình viêm. Nó có tác dụng chống viêm trong điều kiện sinh lý bình thường. Mặt khác, NO được coi là chất trung gian tiền viêm gây ra tình trạng viêm do sản xuất quá mức trong các tình huống bất thường. NO được tổng hợp và giải phóng vào các tế bào nội mô nhờ sự trợ giúp của các NOS trong phản ứng chuyển arginine thành citrulline. NO được cho là gây giãn mạch trong hệ thống tim mạch và hơn nữa, nó liên quan đến các phản ứng miễn dịch của các đại thực bào được kích hoạt bởi cytokine, giải phóng NO ở nồng độ cao. Ngoài ra, NO là một chất dẫn truyền thần kinh mạnh tại các khớp thần kinh và góp phần điều hòa quá trình apoptosis. NO liên quan đến cơ chế bệnh sinh của các rối loạn viêm khớp, ruột và phổi. Do đó, nhiều chất ức chế NO hiện được xem là nhân tố mới, tiềm năng trong liệu pháp điều trị và kiểm soát các bệnh viêm. Các chất ức chế sinh tổng hợp NO có chọn lọc và các chất tương tự arginin tổng hợp được chứng minh là có hiệu quả và được sử dụng để điều trị chứng viêm do NO gây ra [76].

1.1.4.2. Vai trò sinh lý của NO trong ung thư

Tùy thuộc vào thời gian, vị trí và nồng độ của NO mà phân tử này vừa có tác dụng thúc đẩy tăng trưởng khối u vừa có tác dụng ức chế tăng sinh khối u. Hiện NO đã được nghiên cứu như một tác nhân để điều chỉnh các quá trình sinh lý bệnh khác nhau liên quan đến ung thư. Mặt khác, phân tử này cũng đang được báo cáo như một tác nhân chống ung thư tiềm năng [4].

- Vai trò kháng u của NO

Hoạt tính chống ung thư của NO bao gồm ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, thúc đẩy quá trình biệt hóa tế bào và giảm sự lan rộng di căn. Tác dụng ức chế khối u của NO theo các cơ chế sau: NO ức chế hô hấp tế bào và làm thay đổi quá trình chuyển hóa sắt, NO ức chế tổng hợp DNA và NO gây ra apoptosis bằng cách kích hoạt các protease của họ caspase, điều hòa lại p53, thay đổi biểu hiện của protein liên quan đến apoptosis. Relaxin, một loại hormone được sản xuất trong buồng trứng, ức chế sự tăng trưởng và thúc đẩy sự biệt hóa của các tế bào ung thư biểu mô

tuyến vú và cũng kích thích sản sinh NO. Những nghiên cứu này cho thấy rằng NO được tổng hợp trong quá trình đáp ứng qua trung gian miễn dịch với *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG) có thể là một yếu tố quan trọng trong liệu pháp chống ung thư qua trung gian *Bacillus Calmette–Guérin*. Các tế bào chịu trách nhiệm bảo vệ cơ thể, chống ung thư là các tế bào Natural killer và đại thực bào. Sự suy giảm của các tế bào Natural killer hoặc ức chế iNOS làm giảm hoạt động của khối u của các đại thực bào liên quan đến khối u trong một số dòng tế bào khối u ác tính [4].

Ngoài NO, tiền chất của nó là L-arginin và NG- hydroxy-L-arginin, cùng với polyamines, có thể tham gia vào quá trình sinh ung thư. L-arginin là cơ chất cho cả NOS và arginase, một trong những enzyme thuộc chu trình urê đã tìm thấy trong tế bào gan và trong một số loại tế bào khác. Arginase tham gia vào chu trình LPS, cAMP và một số cytokine để chuyển L-arginin thành L-ornithin và urê.

Ornithine decarboxylase (ODC) xúc tác bước đầu tiên và giới hạn tốc độ sinh tổng hợp polyamine ở người. Polyamine rất cần thiết cho sự tăng sinh tế bào và có liên quan đến các hoạt động sinh lý của tế bào, từ sự sao chép DNA đến quá trình apoptosis. Sự tích lũy quá mức của polyamine có tác dụng gây độc tế bào đối với các tế bào và mức độ hoạt động Ornithine decarboxylase tăng cao có liên quan đến sự phát triển ung thư. Gần đây người ta đã chứng minh rằng cả arginase và Ornithine decarboxylase đều có thể được điều tiết bởi các sản phẩm của phản ứng NOS. Enzyme của chu trình urê (arginase và Ornithine decarboxylase) ức chế sự phát triển khối u. Do đó, hai sản phẩm kế tiếp của hoạt động NOS là N-hydroxy-L-arginin và NO, ức chế hai enzyme liên tiếp trong chu trình urê. N-hydroxy-L-arginin là chất ức chế mạnh arginase, trong đó NO ức chế hoạt động Ornithine decarboxylase bằng S-nitrosylation. Ngoài ra, polyamine có cả tác dụng tăng sinh đối với tế bào khối u và tác dụng tạo mạch trên tế bào mạch máu. Do đó, điều hòa con đường polyamine có thể đóng vai trò quan trọng trong bệnh ung thư [40, 49].

NO là một gốc tự do và là một phân tử có khả năng phản ứng cao trong các hệ thống sinh học, có khả năng tương tác với các gốc tự do khác như oxy phân tử và kim loại nặng. Các tác động sinh học của NO có thể thông qua trung gian là các sản

phẩm của các chất chuyển hóa NO khác nhau. Ví dụ như NO nhanh chóng tham gia phản ứng nội bào để tạo thành nitrite và nitrate, S-nitroso-thiols hoặc peroxy-nitrate. Các chất chuyển hóa này được cho là đóng vai trò chính trong việc làm trung gian cho nhiều hiệu ứng gây độc hệ gen liên quan đến NO. Những ảnh hưởng này bao gồm tổn thương DNA, có thể được bắt đầu bằng quá trình khử nitrat, phá vỡ chuỗi DNA hoặc chỉnh sửa DNA. Một trong những hậu quả của sự hư hại DNA qua trung gian NO là kích hoạt tích lũy p53, gây ra sự tự chết của tế bào. Đây là một quá trình mà NO có thể gây ra cái chết của các tế bào khối u. Do đó, sự gia tăng hoạt động NOS (phát sinh từ hoạt động phiên mã tăng lên, hoặc từ hoạt động điều hòa sau phiên mã) trong các tế bào khối u có thể khiến nồng độ NO tăng cao từ đó gây ra sự ngừng tăng trưởng qua trung gian p53 và gây chết tế bào. Người ta đã chứng minh rằng sự tích lũy p53 dẫn tới việc điều chỉnh giảm biểu hiện iNOS do ức chế hoạt động của vùng khởi động iNOS. Do đó, sự tương tác giữa tích lũy NO và p53 được hình thành và có thể tạo thành một phần của cơ chế sinh lý, chịu trách nhiệm cho sự tổn thương DNA do NO nội sinh. Nhìn chung, sự ức chế tăng trưởng qua trung gian p53 này được cho là sẽ cung cấp một áp lực chọn lọc mạnh đến biểu hiện của p53 đột biến trong các tế bào khối u. Ngoài p53, NO cũng đã được chứng minh là kích hoạt poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) và nhiều ý kiến cho rằng sự kích hoạt này là do tổn thương DNA. Sự tổn hại này có thể ở dạng đứt sợi. DNA hoặc khử nitrat hóa các axit nucleic khi NO được tạo ra ở nồng độ cao. Như đã đề cập, nồng độ NO cao đã được báo cáo về khả năng gây độc thần kinh qua trung gian N-methyl-d-aspartate (NMDA) cũng như kích hoạt tế bào chống ung thư và diệt khuẩn tế bào [77].

- Vai trò tăng trưởng và tăng sinh khối u trong ung thư của NO

Sản xuất NO thông qua iNOS có thể trực tiếp gây ra đột biến GC thành AT trong gen p53, điều này có thể góp phần làm mất hoạt động chức năng gây apoptosis của p53. NO cũng trực tiếp ức chế hoạt động của các enzyme dẫn tới sự ngăn chặn quá trình tự chết apoptosis. Các tác dụng chống nhiễm trùng khác của NO dựa vào ức chế phụ thuộc NO/cGMP của việc giải phóng cytochrom c, tăng

biểu hiện Bcl-2 kiểm soát độ thấm qua ti thể, tạo ra protein sốc nhiệt Heat shock protein 70 (Hsp70) và Hsp 32, ức chế sản xuất ceramide và kích hoạt cyclooxygenase-2 [4]. NO đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của khối u bằng cách điều chỉnh sự hình thành mạch máu. NO nội sinh thúc đẩy lưu lượng máu khối u thông qua sự giãn nở của các mạch máu động mạch. Nó làm giảm tương tác kết dính bạch cầu nội mô và tăng tính thấm thành mạch [50]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular endothelial growth factor - VEGF) được sinh ra và thúc đẩy sự tạo mạch máu mới hay tăng trưởng thần kinh bởi các tế bào khối u đòi hỏi phải có sự tham gia của NO/con đường cGMP trong giai đoạn cuối. Một cơ chế khác NO thúc đẩy sự hình thành mạch bằng cách kích hoạt COX-2, kích thích sản xuất các yếu tố pro-angiogenics. NO cũng có tác dụng kích thích xâm lấn được điều hòa bởi hoạt động của matrix metalloproteinase (MMP) gồm MMP-2 và MMP-9 và điều chỉnh ngược của TIMP-2 và có thể là TIMP-3 (chất ức chế mô của MMP) [78]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng NO hạn chế sự tăng sinh tế bào bạch cầu, dẫn tới hậu quả bất lợi đối với phản ứng chống ung thư của cơ thể. Theo cách này, NO có thể tham gia vào sự phát triển và lan rộng của các khối u [4, 60].

Như vậy, NO là một yếu tố trung gian tiền viêm và cũng là một phân tử tín hiệu giữ vai trò rất quan trọng đối với quá trình hình thành bệnh viêm. NO có liên quan tới đáp ứng miễn dịch tạo ra bởi các tế bào đại thực bào kích hoạt cytokine. Nó mang lại hiệu quả chống viêm trong điều kiện sinh lý bình thường. Ngoài ra, NO còn góp phần điều hòa quá trình apoptosis. Do đó, các chất ức chế sinh tổng hợp NO hiện được xem là nhân tố mới, tiềm năng trong liệu pháp điều trị và kiểm soát các bệnh viêm và ung thư [76]

1.1.5. Apoptosis trong ung thư và viêm

1.1.5.1. Giới thiệu về quá trình apoptosis

Apoptosis là cơ chế chết tự nhiên của tế bào [79]. Quá trình apoptosis dẫn đến những thay đổi hình thái sau: mất tính gắn kết và bất đối xứng màng, co rút tế bào, sự phân mảnh nhân, sự ngưng tụ chất nhiễm sắc, sự phân mảnh DNA [80]. Cơ chế của quá trình apoptosis chủ yếu bao gồm hai con đường chính: con đường

ngoại bào phụ thuộc vào khả năng gắn với thụ thể trên bề mặt tế bào và con đường nội bào thông qua hoạt động của ty thể [81]. Cả hai con đường ngoại bào và nội bào đều sử dụng caspase để thực hiện quá trình apoptosis thông qua sự phân cắt của hàng trăm protein.

- Con đường ngoại bào [81]:

Lộ trình ngoại sinh được khởi động bởi các kích thích ngoại bào. Con đường ngoại bào được điều tiết bởi sự tương tác qua trung gian của thụ thể hay còn được gọi là thụ thể liên quan đến sự chết apoptosis. Đặc trưng của con đường này là yếu tố hoại tử khối u (TNF) và thụ thể Fas.

+ Con đường TNF- α

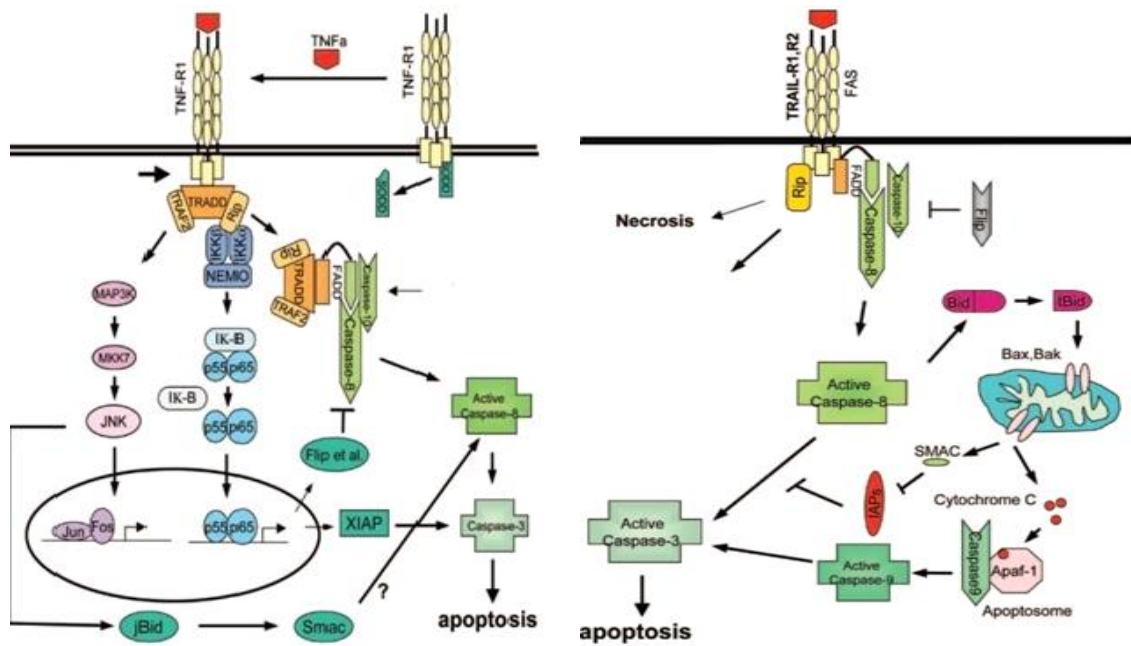
TNF- α là một cytokine được sản xuất chủ yếu bằng cách kích hoạt đại thực bào, và là chất trung gian bên ngoài chính của quá trình apoptosis. Hầu hết các tế bào trong cơ thể con người có hai thụ thể cho TNF- α : TNFR1 và TNFR2. Sự liên kết của TNF- α với TNFR1 đã được chứng minh là khởi đầu con đường dẫn đến hoạt hóa caspase thông qua các protein màng trung gian gây ra quá trình apoptosis.

+ Con đường Fas

Tín hiệu apoptosis đầu tiên - còn được gọi là Apo -1 hoặc là CD95 (là một protein xuyên màng của siêu họ protein TNF) liên kết phối tử Fas (FasL) [1]. Sự tương tác giữa Fas và FasL dẫn đến sự hình thành phức hợp truyền tín hiệu gây chết (death-inducing signaling complex - DISC), kích hoạt các enzyme caspase-8 và caspase-10. Trong tế bào, caspase-8 đã hoạt hóa sẽ trực tiếp kích hoạt các thành viên khác của họ caspase và kích hoạt quá trình apoptosis của tế bào.

- Con đường nội bào (con đường ti thể)

Trong quá trình apoptosis, cytochrome c được giải phóng khỏi ti thể thông qua hoạt động của các protein Bax và Bcl-2. Cytochrome c được giải phóng sẽ liên kết với yếu tố kích hoạt Apoptotic protease - 1 (Apaf-1) và ATP, sau đó liên kết với pro-caspase-9 để tạo ra một phức hợp protein được gọi là apoptosome. Apoptosome phân cắt pro-caspase-9 thành dạng hoạt động và hoạt hóa thác caspase truyền tín hiệu để kích hoạt caspase-3 và dẫn đến tiêu hủy tế bào do apoptosis [81].



Con đường ngoại bào của apoptosis

Con đường nội bào của apoptosis

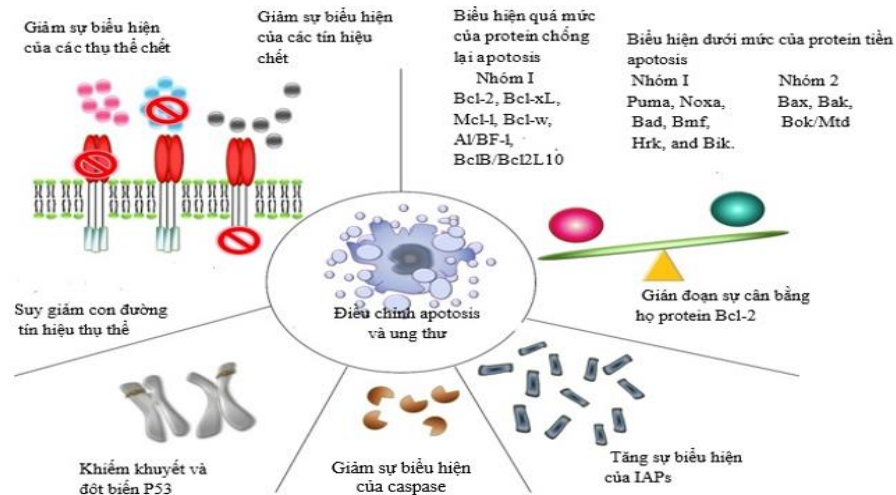
Hình 1.1. Con đường ngoại bào và con đường nội bào của apoptosis [81]

1.1.5.2. Apoptosis trong ung thư

Việc mất kiểm soát apoptosis cho phép các tế bào ung thư tồn tại lâu hơn và có nhiều thời gian tích tụ các đột biến hơn, để làm tăng khả năng xâm lấn trong quá trình phát triển của khối u, kích thích hình thành mạch, xóa bỏ điều hòa tăng sinh tế bào và cản trở sự biệt hóa. Có nhiều cách để tế bào ung thư trốn tránh quá trình chết theo chương trình như chức năng caspase có thể bị ức chế hoặc có thể vô hiệu hóa yếu tố kích hoạt quá trình tự chết. Sự điều hòa các protein Bcl-2 là những phương pháp trốn tránh chủ yếu. Bcl-2 không được coi là gen gây ung thư, nhưng các đột biến trong nó làm tăng sự khởi phát của khối u. Sự biểu hiện quá mức của protein Bcl-2 có trong hơn một nửa số trường hợp ung thư, bất kể loại nào. Điều này dẫn đến các tế bào khối u có khả năng chống lại mọi kích thích tự chết nội tại bao gồm một số loại thuốc chống ung thư.

Do đó, nhằm mục tiêu apoptosis là phương pháp điều trị ung thư không phẫu thuật mang lại hiệu quả cao. Có nhiều loại thuốc chống ung thư hướng đích có tác động vào các giai đoạn khác nhau của apoptosis theo cả con đường nội tại và ngoại sinh là kích thích các phân tử proapoptosis và ức chế các phân tử

antiapoptosis. Một số mục tiêu đã được nghiên cứu bao gồm phối tử đối với thụ thể chết, chất ức chế Bcl-2, ức chế XIAP và alkylphospholipid (APL) hoạt động như tín hiệu apoptosis [81].



Hình 1.2. Các cơ chế làm giảm quá trình apoptosis và gây ung thư [82]

1.1.5.3. Apoptosis trong viêm

Các tế bào apoptosis không chỉ có khả năng sinh miễn dịch mạnh mà còn được phát hiện là giải phóng các phân tử chống viêm khác nhau. Do đó, tế bào T biểu hiện TGF- β và giải phóng nó trong quá trình apoptosis, ức chế sản xuất cytokine tiền viêm bởi các đại thực bào. TGF- β là một cytokine chống viêm mạnh. Tác dụng chống viêm của nó được thấy rõ ở những chuột mất TGF- β dẫn đến phản ứng đa ổ tế bào viêm hỗn hợp, hoại tử mô, cuối cùng là suy các cơ quan và tử vong [81]. Tế bào apoptosis cũng có thể giải phóng IL-10. Cytokine này cùng với TGF- β gây ra phản ứng ức chế miễn dịch bằng cách thúc đẩy sự hình thành tế bào điều hòa T.

Ngoài ra, các tế bào chết do quá trình apoptosis có thể kích hoạt phản ứng chống viêm ở các tế bào khác bằng cách giải phóng một hợp chất gọi là adenosine monophosphate (AMP). Adenosine sau đó kích hoạt các thụ thể adenosine receptors (A2ARs) của đại thực bào để ngăn chặn sự hình thành NO và duy trì tác dụng chống viêm. Trong trường hợp viêm, adenosine ngăn chặn mạnh mẽ sự hình thành cytokine gây viêm do LPS của bạch cầu đơn nhân và đại thực bào bằng cách kích hoạt các thụ thể adenosine receptors (A2ARs) [83].

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*). Hiện nay, trên thế giới có khoảng 120 loài thuộc chi *Physalis*, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [84]. Các loài thuộc chi *Physalis* ngoài giá trị làm thực phẩm, nhiều loài còn được sử dụng trong y học dân gian để chữa các bệnh cảm sốt, ho nhiều đờm, tiểu đường, hen suyễn mãn tính như loài Thù lù cạnh (*Physalis angulata*), Thù lù nhỏ (*Physalis minima*), Thù lù lông (*Physalis peruviana*) v.v.

Ở Việt Nam, các loài thuộc chi *Physalis* được coi là loại cây dại, mọc hoang ở các bờ ruộng, bãi cỏ, ven rừng, ở vùng thấp và theo tác giả Võ Văn Hợp (2018), chi *Physalis* có 5 loài là *Physalis angulata* (tầm bóp, lu lu cái), *Physalis alkekengi* (thù lù kiêng), *Physalis peruviana* (thù lù lông), *Physalis cordata* Mill (Tầm bóp lá hình tim) và *Physalis minima* (thù lù nhỏ) [85].

Các loài thuộc chi *Physalis* đều là cây thân thảo có chiều cao từ 0,4 m đến 3 m, phân nhiều cành, đa số đều sống ở nơi có đầy đủ ánh sáng, khí hậu ẩm áp và chịu được nhiệt độ cao. Một số loài rất nhạy cảm với sương giá, nhưng cũng có một số loài chịu được nhiệt độ rất lạnh như loài *Physalis alkekengi*. Các loài thuộc chi này có lá mọc so le, hình bầu dục, chia thùy hay không, dài 30 – 35 mm, rộng 20 – 40 mm; cuống lá dài từ 15 – 30 mm. Hoa lưỡng tính, mọc đơn độc, có cuống mảnh, dài khoảng 1 cm. Đài hình chuông, có lông, chia ra từ phía giữa thành 5 thùy, tràng hoa màu vàng tươi hay màu trắng nhạt, có khi điểm những chấm màu tím ở góc, chia 5 thùy. Quả mọng tròn, nhẵn, nằm một phần hay nằm gọn hoàn toàn trong một vỏ mỏng có nguồn gốc từ các đài hoa, quả khi chín có màu cam và ruột quả có nhiều ngăn rộng, một số loài có quả ruột đặc và là loại quả ăn được, có tên gọi là quả anh đào đất (*Groundcherry*).

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

Thành phần hóa học và hoạt tính sinh dược học của các loài thuộc chi *Physalis* đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu từ lâu và đã có nhiều công trình công bố về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của

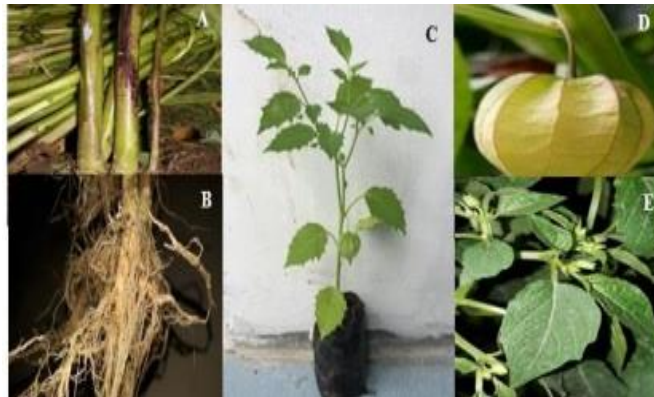
được liệu này. Các loài thuộc chi *Physalis* đã được chứng minh có tác dụng: kháng ung thư, kháng viêm, giảm đau, hạ sốt, chống tiểu đường, kháng khuẩn, kháng lao, kháng ký sinh trùng sốt rét và điều hoà miễn dịch [86].

Bằng các phương pháp sắc ký và phương pháp phân tích hợp chất hữu cơ bằng quang phổ, các nhà khoa học đã nghiên cứu tách chiết, phân lập cấu trúc hóa học, định danh được 216 hợp chất có trong các loài thuộc 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 [87].

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

1.2.3.1. Đặc điểm thực vật

Loài Tầm bóp (*P.angulata*) là cây thân thảo sống hàng năm, cao gần 50 cm. Thân có góc cạnh, mập, dòn, phân cành nhiều. Lá có lông mọc so le hình trái xoan, gốc hình nêm, đầu thuôn nhọn, mép nguyên hoặc đôi khi xẻ thùy nhỏ và gợn sóng. Hoa mọc đơn độc ở kẽ lá, rủ xuống, màu vàng tươi hoặc trắng nhạt, gốc tím, đài hình chuông, tràng hợp. Quả mọng, hình cầu, nhẵn, đỏ bao bọc bởi đài to đồng trường. Hạt nhiều, dẹt, hình thận. Ra hoa kết quả tháng 5-7 [85].



Hình 1.3: Thân (A), rễ (B), toàn bộ cây (C), quả và đài hoa (D) và lá (E) của loài *P. angulata* [88]

1.2.3.2. Dạng sống và sinh thái

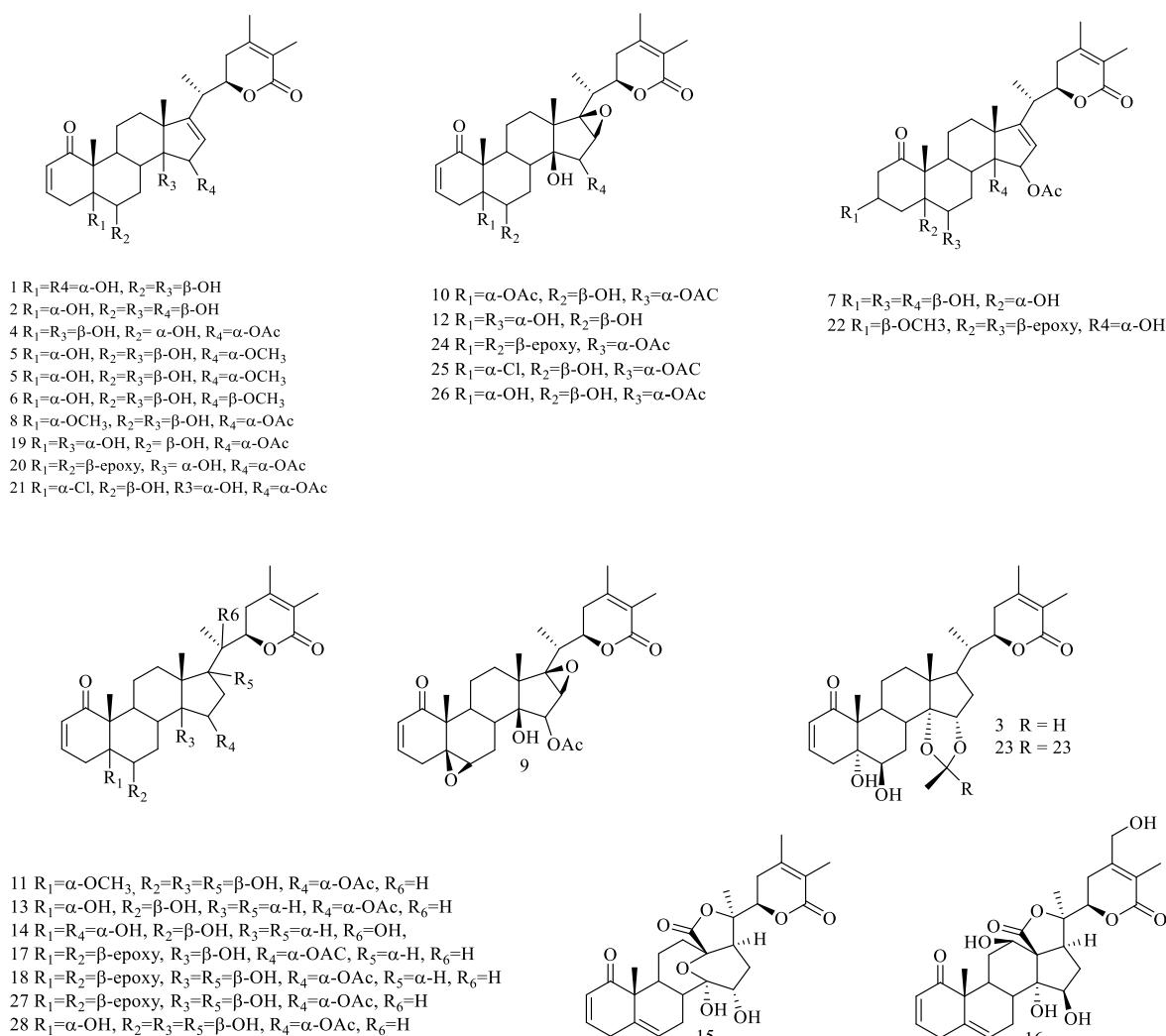
Loài Tầm bóp (*P.angulata*) có ở nhiều nước nhiệt đới Châu Á, châu Phi, châu Mỹ. Ở Việt Nam: Lạng Sơn, Bắc Giang, Ninh Bình, Gia Lai v.v. Mọc hoang ở các bờ ruộng, bãi cỏ, đất hoang, ven rừng [85].

1.2.3.3. Công dụng theo kinh nghiệm dân gian

Loài Tầm bóp (*P.angulata*) có công dụng trị cảm sốt, yết hầu sưng đau, ho nhiều đờm. Quả ăn được và dùng chữa đờm nhiệt sinh ho... Rễ tươi nấu với tim lợn, chu sa dùng ăn chữa đái tháo đường [85].

1.2.3.4. Hoạt tính chống ung thư

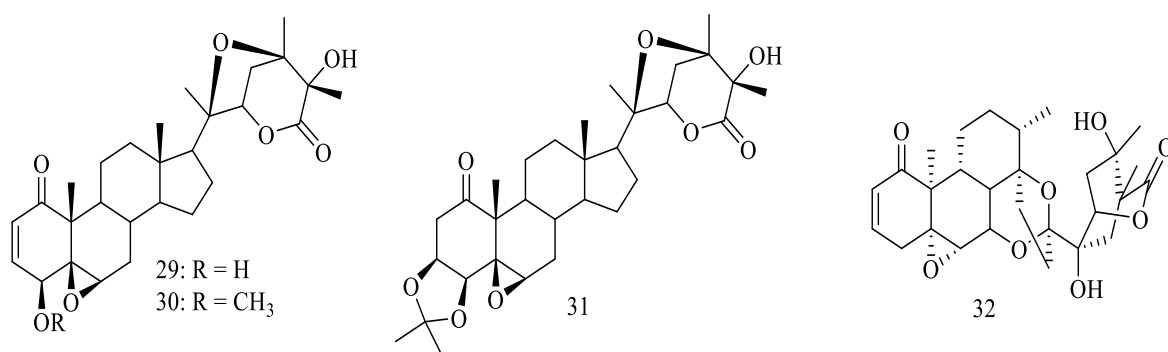
Các hợp chất phân lập được từ chi *Physalis* có tác dụng chống ung thư rất khả quan, điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng vào y học rất cao. Theo công bố của Sun và cộng sự (2016), từ thân và lá loài *P. angulata* L đã phân lập được 16 hợp chất withanolide mới (trong đó có 14 chất được đặt tên là physangulatin A-N; 2 chất được đặt tên là withaphysalin Y-Z) và 12 hợp chất đã biết khác. Các hợp chất này được đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh của các dòng tế bào ung thư người như tuyến tiền liệt (C4-2B và 22Rv1), thận (786-O, A-498, và ACHN) và u ác tính (A375-S2), cũng như khả năng ức chế sự sản sinh NO gây ra bởi lipopolysaccharide (LPS) trong đại thực bào. Kết quả cho thấy các hợp chất physangulatin **I (9)**, physagulide **I-J (27,17)**, physagulin **A-B (20-21)** và physagulin **I (25)** thể hiện hoạt tính tốt trên tất cả các dòng tế bào tế bào ung thư tuyến tiền liệt của con người (C4-2B và 22Rv1), tế bào ung thư biểu mô thận ở người (786-O, A-498 và ACHN) và tế bào u ác tính ở người (A375-S2) với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,18 - 7,43 μ M. Ngoài ra các hợp chất physangulatin **C-E (3-5)**, physangulatin **I-K (9-11)**, physagulide **I-J (27,17)**, physagulin **A-B (20-21)**, physagulin **H-I (24-25)** và physagulin **N (11)** còn có khả năng ức chế sự sản sinh NO do lipopolysaccharit (LPS) gây ra trong các đại thực bào với giá trị IC_{50} trong khoảng 1,36 - 11,59 μ M [89].



Hình 1.4. Cấu trúc hóa học một số hợp chất phân lập từ loài *P. angulata*

Maldonado và cộng sự (2015) báo cáo kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên 6 dòng tế bào ung thư người (u nguyên bào thần kinh (U-251), ung thư tuyến tiền liệt tuyến (PC-3), ung thư bạch cầu tủy mãn tính (K-562), ung thư biểu mô tuyến (HCT-15), ung thư tuyến vú (MCF-7) và ung thư phổi (SK-LU-1) của 3 hợp chất physangulide B (**29**), 4-O-acetylphysangulide B (**30**) và physangulide acetamide (**31**) được phân lập từ loài *P.angulata*. Ở nồng độ 20 μM , các hợp chất physangulide B, 4-O-acetylphysangulide B ức chế 100% sự tăng sinh của tế bào với giá trị IC_{50} của các hợp chất lần lượt được xác định đối với dòng tế bào ung thư tương ứng PC-3 ($0,43 \pm 0,03 \mu\text{M}$; $0,32 \pm 0,02 \mu\text{M}$) và SK-LU-1 ($0,35 \pm 0,01 \mu\text{M}$; $0,27 \pm 0,01 \mu\text{M}$), camptothecin được sử dụng là chất đối chứng dương ($\text{IC}_{50} = 0,12 \pm$

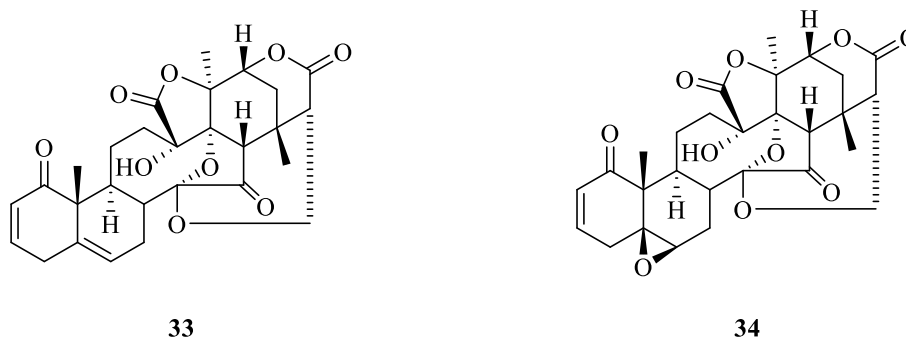
0,01 μM với dòng PC-3 và $0,15 \pm 0,009 \mu\text{M}$ với dòng SK-LU-1) cho thấy các hợp chất này có hoạt tính mạnh [90]. Thêm nữa, chất physangulidine A được phân lập từ loài *P. angulata* có thể làm rối loạn chu kỳ tế bào và gây ra sự chết của tế bào theo apoptosis, chủ yếu là do khiếm khuyết gây ra trong quá trình phân bào với dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt người (DU145) [83]. Ngoài ra hợp chất Physangulidine A (32) còn có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư tuyến tiền liệt tuyến (PC-3) ở pha G2/M với giá trị GI_{50} (Growth Inhibition - ức chế sự phát triển ở 50%) là 3,6 μM (1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và kích hoạt caspase-3, phân tách PARP-1 làm cho DNA trong nhân tế bào ung thư tuyến tiền liệt tuyến (PC-3) bị phân rã gây ra apoptosis [91].



Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các hợp chất: physangulide B (29), 4-O-acetylphysangulide B (30) và physangulide acetamide (31) và Physangulidine A (32) phân lập từ loài *P. angulata*

Hsieh và cộng sự (2006), đã chỉ ra rằng dịch chiết từ loài *P. angulata* gây ra sự bắt giữ pha G2/M trong các dòng tế bào ung thư vú ở người [92]. Wu và cộng sự (2012), đã báo cáo rằng các chất chiết xuất từ *P. angulata* gây ra apoptosis trong dòng tế bào ung thư gan (HepG2) [93]. Theo một nghiên cứu được công bố bởi Hsu và cộng sự (1992), physalin B (33) được phân lập từ loài *P. angulata*, hoạt chất có hàm lượng chính trong một loại thảo dược được sử dụng rộng rãi có hoạt tính với các dòng tế bào u ác tính A375 và A2058 (IC_{50} thấp hơn 4,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Các kết quả còn cho thấy physalin B có thể gây ra apoptosis của tế bào ung thư ác tính qua con đường trung gian NOXA, caspase-3, Bax và ti thể, nhưng không gây ra apoptosis

với các nguyên bào sợi da ở người và các tế bào cơ tim. Ngoài ra, Physalin B cũng được chứng minh là ít gây độc tế bào đối với không chỉ các tế bào CCD-966SK và T/G HA-VSMC, mà cả các tế bào H9c2 cơ tim. Do đó, physalin B có triển vọng để phát triển thành chất điều trị ung thư hiệu quả để điều trị u ác tính [94].



Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất Physalin B (33) và Physalin F (34) phân lập từ loài *P. angulata*

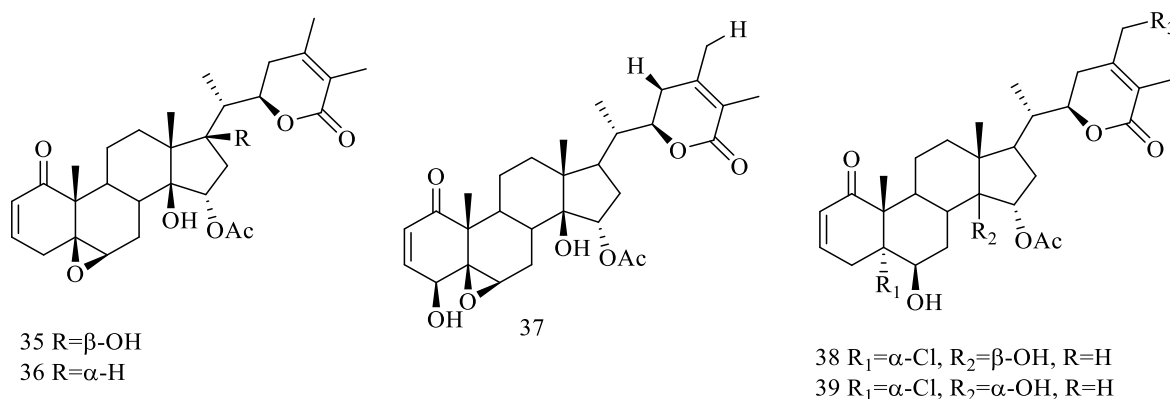
Chiang và cộng sự (1992) nhận thấy rằng Physalin B (33) và Physalin F (34), cả hai phân lập từ loài *P. angulata* đã ức chế sự tăng trưởng ở một số dòng tế bào bạch cầu K562, APM1840, HL-60, KG-1 và CTV-1. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy rằng Physalin F có độc tính tế bào chống lại các dòng tế bào ung thư thận ở người và điều này được gây ra bởi quá trình apoptosis thông qua con đường phụ thuộc vào ROS và NF- κ B [95]. Ngoài ra, Physalin F còn hoạt hóa họ protein Bcl-2, bao gồm Bcl-2 và Bcl-xL. Khi họ protein Bcl-2 được hoạt hóa chúng tập hợp lại với nhau và hình thành các oligomer nằm trên màng ngoài của ti thể, các oligomer này là các kênh giúp phóng thích cytochrome c cùng các protein ti thể khác vào tế bào chất, qua đó kích thích họ enzyme caspase và điều hòa quá trình apoptosis của tế bào. Bên cạnh đó, nghiên cứu này còn cho thấy Physalin F hoạt hóa gen p53, giảm sự biểu hiện của I κ B α và phosphoryl hóa I κ B α , ức chế chuyển vị hạt nhân của p65/p50 trong các tế bào A498, ức chế NF- κ B và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào ung thư theo cách phụ thuộc thời gian [93, 95]. Bên cạnh đó Physalin F còn có khả năng gây ra apoptosis thông qua con đường ti thể theo cơ chế: Hoạt chất Physalin F phá hủy điện thế màng ti thể dẫn đến giải phóng cytochrom c vào tế bào chất. Khi cytochrom c được giải phóng khỏi ti thể, nó là

trung gian cảm ứng kích hoạt sự điều hòa dị lập thể của yếu tố kích hoạt apoptosis-protease 1 (Apaf-1). Khi đó cytochrom c và Apaf-1 kết hợp với nhau để tạo thành apoptosome. Apoptosome hoạt hóa pro-caspase-9 và dẫn đến sự phân tách protein này thành dạng caspase-9 hoạt động và caspase -3, cuối cùng là kích hoạt quá trình apoptosis của tế bào A549 [93, 96].

Theo nghiên cứu của Hsieh và cộng sự (2006), dịch chiết methanol của loài *P. angulata* ức chế sự tăng sinh tế bào và bắt giữ tế bào ung thư vú di căn (MDA-MB-231) ở pha G2/M, ức chế tổng hợp của mRNA và làm tăng nồng độ cyclin A, giảm hoạt động Cdc2, tăng phosphoryl Cdc2, giảm Cdc25C và tăng cường biểu hiện của chất ức chế chu kỳ tế bào gồm các gen p21, p27 bằng cách gắn và bất hoạt phức hợp cyclin-CDK thông qua con đường ức chế kinase phụ thuộc cyclin p21^{waf1/cip1} và P27^{kip1}. Ngoài ra, chiết xuất methanol của *P. angulata* còn được chứng minh là có khả năng gây ra apoptosis trong các dòng tế bào ung thư vú MDA-MB 231 và MCF-7 ở người theo cơ chế kích hoạt caspase-3 gây ra sự phân cắt PARP, phá vỡ chuỗi DNA và nhiễm sắc thể [92].

Theo báo cáo kết quả nghiên cứu của Ma và cộng sự (2016) thì các hợp chất withanolide Physagulide I (**35**), Physagulide J (**36**), withangulatin A (**37**), (20*S*,22*R*)-15 α -chloro6 β , 14 β -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide (**38**), và physagulin B (**39**) được phân lập từ dịch chiết tổng từ thân cây *P. angulata* var. *villosa* có hoạt tính mạnh trên cả 3 dòng tế bào ung thư người là ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7) và ung thư xương ác tính với giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,06 - 6,73 μ M. Hợp chất Physagulide I được tách chiết từ cây này có khả năng bắt giữ các tế bào ở pha G2/M và kích hoạt các con đường gây apoptosis phụ thuộc caspase. Ngoài ra, physagulide I gây ra quá trình apoptosis trong các tế bào MG-63 có liên quan tới sự tạo thành các gốc oxy phản ứng (reactive oxygen species – ROS) và sự kích hoạt của các enzyme extracellular signal-regulated kinases (ERK) và c-Jun N-terminal kinases (JNK). Đây cũng là lần đầu tiên Physagulide I được chứng minh rằng đã cảm ứng tế bào đi vào apoptosis thông qua cơ chế ức chế MAPK trong các tế bào MG-63. Các kết quả này cho thấy hợp chất physagulide I có thể là một trong các

chất tiềm năng dùng để điều trị bệnh ung thư [82]. Cũng trong nghiên cứu này, Physagulide I làm giảm sự biểu hiện của các protein dc25C, cdc2, pcdc2 và p-cdc25C, trong khi cyclin B1 được điều chỉnh tăng. Những dữ liệu này cho thấy Physagulide I có thể bắt giữ tế bào trong pha G2/M. Physagulide I cũng gây ra rối loạn chức năng ti thể dẫn đến cytochrome c được phóng thích khỏi ti thể và cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào. Như vậy, tác dụng gây độc tế bào của Physagulide I trên các tế bào MG-63 là do sự kích hoạt của con đường apoptosis phụ thuộc caspase [97].



Hình 1.7. Cấu trúc hóa học một số hợp chất whithanolide phân lập từ loài *P. angulata*

Năm 2020, Tôn Nữ Liên Hương và cộng sự đã tiến hành khảo sát hoạt tính gây độc của các cao hexane, cao ethyl acetate, cao nước và cao ethanol tổng phân lập từ loài *P. angulata* trên năm dòng tế bào ung thư (A549, MCF-7, MDA-MB-231, KB và KB-VIN) bằng phương pháp Sulforhodamin B (SRB). Kết quả cho thấy: Ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$, cao ethanol tổng thể hiện độc tính trên cả 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Cao ethyl acetate ức chế các dòng gây ung thư phổi A459, biểu mô KB và ung thư vú di căn từ khối u phổi (MDA-MB-231) tốt nhất và cao nước lại ức chế có tính chọn lọc với dòng tế bào ung thư vú do di căn (MDA-MB-231) tốt hơn so với các dòng tế bào ung thư còn lại. Từ các kết quả trên, việc làm trà túi lọc từ loài *P. angulata* vào thực tế cuộc sống được thực hiện. Quá trình chế biến cho sản phẩm dạng gói trà túi lọc gồm lá cây loài *P. angulata* phối hợp với lá cây Cỏ ngọt theo tỷ lệ về khối lượng khô là 4:1. Kết quả khảo sát độc tính cấp *in vivo* cho thấy trà không có độc tính, độ sử dụng an toàn là 2 gói/kg thể trọng trên chuột. Các

kết quả chế biến trà là bước đầu ứng dụng loài *P. angulata* vào đời sống còn cần nhiều nghiên cứu tiếp thêm nữa [8, 98].

1.2.3.5. Hoạt tính kháng viêm

Viêm thường đóng một vai trò có lợi trong tổn thương mô để chống lại nhiễm trùng và kích thích quá trình chữa lành mô. Nhưng tình trạng viêm kéo dài có liên quan đến một số vấn đề sức khỏe [1]. Thuốc thảo dược có thể là một giải pháp phù hợp để chữa trị bệnh lý viêm. Loài thực vật *P. angulata* được biết đến với khả năng chống viêm cao. Theo truyền thống, *P. angulata* được chiết lấy nước bằng phương pháp sắc hay một số người sống ở Java - Indonesia lại đun sôi toàn bộ cây trong khoảng 30-45 phút, trong khi một số người ủ cây khô trong cốc và uống ba lần một ngày để chữa các bệnh lý liên quan đến viêm. Ngày nay, nhà nghiên cứu đã đưa ra thị trường các sản phẩm chiết xuất từ *P. angulata* dưới dạng viên nang, trà thảo mộc và thuốc xông.



Hình 1.8. Các chế phẩm thương mại khác nhau của *P. angulata* [88]

Các cơ chế chống viêm của các hoạt chất phân lập từ loài *P. angulata* là ức chế sự hoạt hóa đại thực bào, yếu tố NF- κ B, myeloperoxidase, cyclooxygenase, tổng hợp oxit nitrit cảm ứng, cytokine tiền viêm, monocytes chemoattractant protein-1 và các cytokine gây viêm. Đối với mục đích điều trị, chiết xuất từ *P. angulata* có thể được sử dụng như một tác nhân hỗ trợ hoặc đơn lẻ đối với các bệnh liên quan đến viêm ở một số hệ thống cơ quan [88].

Soares và cộng sự (2003) đã chỉ ra rằng các seco-steroides như Physalins B (33) và Physalins F (34) được phân lập từ loài *P. angulata* đã làm giảm nồng độ NO được giải phóng bởi lipopolysaccharit (LPS) trong các đại thực bào. Physalin B làm giảm đáng kể sự gia tăng nồng độ TNF- α , IL-6 và IL-12 trong các đại thực bào được cảm ứng bởi LPS. Hơn nữa, Physalin B và Physalin F có hiệu quả trong việc ngăn ngừa sốc nhiễm trùng gây ra bởi lipopolysaccharit [99].

Bastos và cộng sự (2008) đã phát hiện ra dịch chiết nước của rễ loài *P. angulata* chứa hoạt tính kháng viêm mạnh. Cụ thể là dịch chiết này làm giảm hoạt động của enzyme Adenosine deaminase (ADA) dẫn đến ức chế sự tăng sinh của tế bào T khiến cho dịch chiết này có thể tác động đến enzyme cyclooxygenase, qua sự tăng sinh lymphocyte, qua sự sản sinh NO và TGF α . AEPa ức chế iNOS, giảm hàm lượng nitrite, kích hoạt đại thực bào và giảm hoạt động ADA, dẫn đến hoạt động điều hòa miễn dịch [100]. Pinto và cộng sự (2010) thông báo kết quả thử tác dụng trên mô hình viêm da cấp tính và mãn tính trên tai chuột của hợp chất physalin E phân lập từ loài *P. angulata* gây ra bởi 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) và oxazolone. Những biến đổi về sự phù nề/độ dày trên tai, sự sản sinh các cytokine tiền viêm (TNF- α và IFN- α), sự hoạt động của enzyme myeloperoxidase (MPO), và các nghiên cứu trên hóa mô miễn dịch đã được phân tích. Số liệu thu được cho thấy hợp chất physalin E có thể là 1 tác nhân kháng viêm mạnh và có tác dụng tại chỗ dùng để điều trị các trường hợp viêm da cấp tính và mãn tính. Ngoài ra cũng theo nghiên cứu của Pinto và cộng sự (2010), physalin E không có độc tính tế bào, do đó có thể có lợi thế hơn các chất điều trị hiện đang được sử dụng trong điều trị chống viêm da [101].

Hợp chất withangulatin A được phân lập từ loài *P. angulata* có khả năng chống viêm, ngăn chặn đáng kể sự tăng sinh tế bào lympho T và ức chế các cytokine gây viêm (IL-2, IL-6 và IFN-gamma). Ngoài ra, withangulatin A còn làm giảm sự biểu hiện COX-2 thông qua các con đường tín hiệu MAPK và NF- κ B [102].

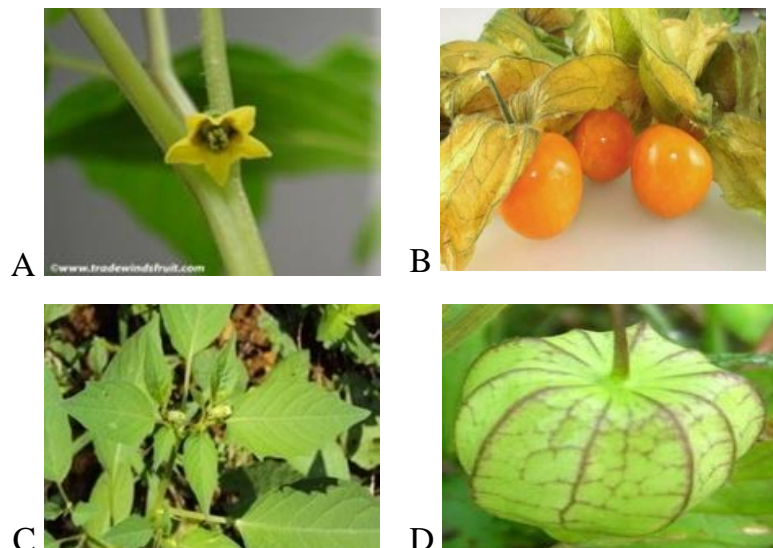
Hợp chất Physalin A phân lập được từ loài *P. angulata* có khả năng ức chế sự biểu hiện của các cytokine gây viêm (PGE-2, IL-1 β , IL-6 và TNF- α), ức chế các con

đường truyền tín hiệu viêm I κ B/NF- κ B và JNK/AP-1, ức chế sự sản xuất các yếu tố gây viêm iNOS và COX-2 và các chất trung gian gây viêm như NO và TNF- α . Ngoài ra, hợp chất physalin A cũng làm giảm các gốc oxy phản ứng (ROS), một yếu tố đóng vai trò quan trọng để gây ra stress oxy hóa và tăng cường phản ứng viêm [103].

Các hợp chất physagulin A và physagulin C và physagulin H phân lập được từ loài *P. angulata* thể hiện hoạt tính chống viêm đáng kể thông qua việc ức chế hoạt động của con đường tín hiệu NF- κ B bằng cách ức chế sự suy thoái của I κ B- α và sự chuyển vị vào nhân của p65, thay vì phụ thuộc vào con đường tín hiệu MAPKs. Ba hợp chất này đều thuộc loại hợp chất withanolide của physagulin. Một khi con đường tín hiệu NF- κ B bị ức chế bởi một trong ba hợp chất này, việc sản xuất các protein gây viêm bởi iNOS và COX-2 sẽ được điều chỉnh giảm và ức chế sự xuất hiện của các phản ứng tiền viêm. Do đó, physagulin A và physagulin C và physagulin H phát huy tác dụng chống viêm bằng cách ức chế nhiều protein đích và tiếp tục ức chế con đường tín hiệu NF- κ B. Có thể nói các hợp chất withanolide dạng Physagulin có giá trị tiềm năng lớn trong điều trị các bệnh lý viêm [104].

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

1.2.4.1. Đặc điểm thực vật



Hình 1.9. Hoa (A), Quả (B), Lá (C) và đài hoa (D) của loài *P. minima* [105]

Loài *Thù lù nhỏ* (*P. minima*) là cây thảo sống hàng năm, cao gần 50 cm. Thân, cuống lá, cọng hoa có lông đầu phủ, thân già rỗng. Lá có phiến dài 2-9 cm, rộng 1-6

cm mép thường có răng cưa thưa to, có lông mịn, gân phụ 4-5 cặp, cuống 1-6 cm. Hoa vàng vàng, tràng nhỏ, có đốm nâu nhũ vàng. Quả mọng tròn, to 12-14 mm, trong đài đồng trường mỏng, nhọn nhọn dài đến 3 cm. Hạt nhỏ hình đĩa màu vàng. Cây ra hoa tháng 6 có quả tháng 7 [85].

1.2.4.2. Dạng sống và sinh thái

Loài Thù lù nhỏ (*P.minima*) có ở nhiều nước nhiệt đới Châu Á, châu Phi, châu Mỹ. Ở Việt Nam: khu vực Bắc bộ và Nam bộ. Mọc rải rác trên các bãi hoang [85].

1.2.4.3. Công dụng theo kinh nghiệm dân gian

Toàn cây loài *P. minima* dùng trị cảm sốt, ho nhiều đờm, nhọt, mụn nhọt, hen suyễn [85].

1.2.4.4. Hoạt tính chống ung thư

Hợp chất physalin F được ghi nhận như 1 chất chống ung thư tiềm năng từ loài *P. minima*. Tác giả Ooi và cộng sự (2010) đã nghiên cứu độc tính và cơ chế gây chết tế bào có thể gây ra bởi hoạt chất này trên dòng tế bào ung thư vú ở người T-47D. Kết quả sàng lọc cho thấy physalin F có tác dụng ức chế đáng kể sự phát triển của tế bào T-47D theo phương thức phụ thuộc nồng độ, với giá trị EC₅₀ thấp hơn của dịch chiết thô (3,50 µg/mL). Phân tích biểu hiện mRNA cho thấy sự đồng điều chỉnh hoạt động các gen c-myc- và caspase-3-apoptotic trong các tế bào đã ủ mẫu với đỉnh biểu hiện tương ứng ở 9h và 12h. Cơ chế apoptosis được khẳng định thêm bằng sự phân mảnh DNA và dịch chuyển ngoại bào của phosphatidylserine. Các phát hiện này chỉ ra rằng physalin F có thể đóng vai trò là tác nhân ngăn ngừa và/hoặc điều trị ung thư bởi cơ chế kích hoạt apoptosis thông qua sự hoạt động theo con đường caspase-3 và c-myc trong tế bào T-47D [106]. Năm 2012, Wu và cộng sự cũng đã ghi nhận khả năng gây ra apoptosis trên tế bào ung thư thận người (A498) của hoạt chất này [93]. Ngoài ra, physalin F gây ra apoptosis thông qua việc kích hoạt protein p53 và p21, và sau đó phân cắt caspase 8/9/3 và PARP. Physalin F ức chế hoạt hóa NF-κB, thuộc họ các yếu tố phiên mã, đóng vai trò nòng cốt trong viêm, miễn dịch, tạo mạch, di chuyển tế bào, tăng sinh tế bào và apoptosis [75, 93]. Do đó, physalin F đã cho thấy hoạt tính tiềm năng kháng ung thư và cần được tiến hành các nghiên cứu tiền lâm sàng tiếp theo [100].

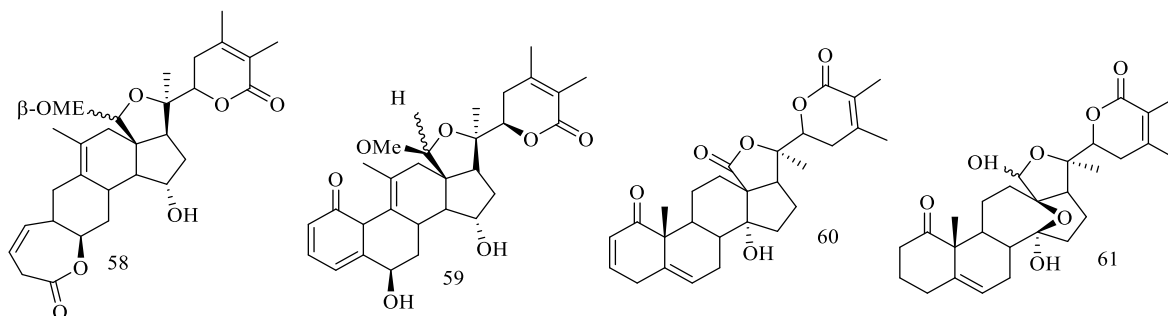
Dịch chiết chloroform (CHCl_3) loài *P. minima* đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư phổi người NCI-H23 theo phương thức phụ thuộc liều lượng và thời gian. Dịch chiết CHCl_3 cũng thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư vú người. Hoạt tính này được cho là do khả năng gây chết tế bào NCI-H23, tế bào ung thư vú theo chương trình apoptosis với các biểu hiện đặc trưng như: Sự co lại của nhân tế bào; thay đổi mức biểu hiện của các protein liên quan trong tế bào ung thư; thúc đẩy quá trình apoptosis thông qua sự hoạt hóa nhanh chóng của caspase-3, gia tăng mức độ biểu hiện của p53 và giảm mức độ biểu hiện của c-myc. Bên cạnh đó, dịch chiết CHCl_3 cũng thể hiện hoạt tính đối với dòng tế bào ung thư buồng trứng ở người. Cơ chế gây chết tế bào được xác định bằng việc sử dụng bốn phương pháp khác biệt để chứng minh tác dụng chống ung thư là do khả năng phối hợp giữa cơ chế gây chết tế bào theo apoptosis và autophagic (quá trình sinh lý bình thường trong cơ thể dẫn đến sự hủy tế bào trong cơ thể) trên tế bào ung thư Caov-3 thông qua con đường phụ thuộc vào c-myc, p53 và caspase [106, 107].

Zhanga và cộng sự (2020) cũng đã chứng minh các hợp chất Physaminilide H, physapubenolide, physagulin H, physagulide P, physangulatin I, (20*S*,22*R*)-5*β*,6*β*epoxy-4*β*,14*β*,15*α*-trihydroxy-1-oxowith-2,24-dienolide, physagulide I, physagulin C, physagulin I phân lập từ loài *P. minima* đều có hoạt tính gây độc tế bào u ác tính (A375) ở người với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 1,3 - 7,5 μM . Theo kết quả nghiên cứu trên, cho rằng nhóm 5*β*, 6*β*-epoxy hoặc liên kết đôi ở vị trí 5,6 và liên kết đôi ở vị trí 2,3 trong vòng A là nguyên nhân dẫn đến tăng cường độc tính tế bào. Bên cạnh đó, sự hiện diện của nhóm 15-acetoxy là nguyên nhân một phần gây ra độc tính tế bào mạnh [108].

1.2.4.5. Hoạt tính kháng viêm

Hai hợp chất physaminimin B (**58**) và physaminimin E (**59**) phân lập từ loài *P. minima* thể hiện khả năng ức chế mạnh sự sản sinh NO bởi các đại thực bào RAW264.7 đã cảm ứng bằng LPS được hoạt hóa với giá trị IC_{50} trong khoảng 8,04 - 10,01 mM [103, 104]. Năm 2016, Xu và cộng sự công bố về khả năng ức chế mạnh sự sản sinh NO gây ra bởi LPS trong các đại thực bào dòng RAW 264.7 của 3 hợp chất physaminimin G, H và K với giá trị IC_{50} tương ứng là $17,41 \pm 1,04 \mu\text{M}$; $36,33 \pm 1,95 \mu\text{M}$ và $21,48 \pm 1,67 \mu\text{M}$ [109].

Hai hợp chất được phân lập từ thân lá, rễ của loài *P. minima* là withaphysalin A (**60**) và 2, 3-dihydrowithaphysalin C (**61**) đều ức chế đáng kể việc sản xuất oxit nitrite (NO), prostaglandin E2 (PGE-2) và một số cytokine gây viêm, như interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) trong các đại thực bào RAW264.7 đã được kích hoạt bằng LPS theo con đường STAT3. Nghiên cứu sâu hơn chỉ ra rằng withaphysalin A và 2, 3-dihydrowithaphysalin C đã điều hòa sự biểu hiện quá mức của nitric oxide synthase cảm ứng (iNOS) và cyclooxygenase-2 (COX-2) ở mức độ mRNA và protein. Ngoài ra, withaphysalin A và 2, 3-dihydrowithaphysalin C cũng ngăn chặn sự chuyển vị vào nhân của NF- κ B p65 trong các đại thực bào đã cảm ứng bởi LPS. Kết quả này cho thấy con đường NF- κ B có liên quan đến các tác dụng chống viêm, đến sự phosphoryl hóa STAT3 và tăng biểu hiện heme oxygenase 1 (HO-1). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy biểu hiện HO-1 đã được tăng cường do tác động của withaphysalin A và 2, 3-dihydrowithaphysalin C theo phương thức phụ thuộc nồng độ trong các đại thực bào đã cảm ứng với LPS. Hơn nữa, đã có báo cáo rằng HO-1 ngăn chặn quá trình phosphoryl hóa STAT3 và dịch chuyển nhân của yếu tố NF- κ B p65, do đó ức chế sự giải phóng các chất trung gian gây viêm [110].



Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của các hợp chất physaminimin B (58), physaminimin E (59), withaphysalin A (60) và 2, 3-dihydrowithaphysalin C (61) phân lập từ loài *P. minima*

Như vậy, có thể cả withaphysalin A (**60**) và 2, 3-dihydrowithaphysalin C (**61**) đã ngăn chặn việc kích hoạt STAT3 và chuyển vị nhân của NF- κ B p65 qua tăng cường hoạt động của HO-1. Withaphysalin A cũng ức chế rõ rệt p38 phosphoryl hóa trong các tế bào RAW264.7 cảm ứng bởi LPS, dẫn đến ức chế phản

ứng viêm, ít nhất là một phần, bằng cách triệt tiêu đường dẫn tín hiệu MAPK. Ngược lại, 2, 3-dihydrowithaphysalin C không thể hiện sự tác động rõ rệt vào con đường MAPK để kiểm soát sự biểu hiện các yếu tố trung gian gây viêm mà thông qua việc điều hòa các chất trung gian gây viêm, iNOS và COX-2 ở mức độ protein và mRNA [110]. Những dữ liệu này cung cấp bằng chứng khoa học để làm sáng tỏ các thành phần hoạt tính sinh học chính và các cơ chế phân tử kháng viêm có liên quan của *P. minima*. Các kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy withaphysalin A và 2, 3-dihydrowithaphysalin C có thể là ứng cử viên tiềm năng để phát triển thành dược phẩm điều trị các bệnh về viêm. .

Theo nghiên cứu của Wu và cộng sự (2020), 5 chất withanolide mới (Physagulin N, phyperunolide E, withaminimin, Physangulatin A và Physangulatin B) cùng với 5 hợp chất đã biết ((20*S*), 22*R*) 15*α*-acetoxy-5*β*, 6*β*-epoxy-4*β*, 14*α*, 28-trihydroxy-3*β*-methoxy-1-oxowitha-16,24-dienolide, (20*S*, 22*R*) 15*α*-acetoxy-5*β*, 6*β*-epoxy-3*β*, 4*β*, 14*β*, 17*β*, 20*β*-pentahydroxy-1-oxowitha-24-enolide, (20*R*, 22*R*) 15*α*-acetoxy-4*β*, 5*α*, 6*β*, 14*α*, 20*β*-pentahydroxy-1-oxowitha -2,24-dienolide, (20*R*, 22*R*) 15*α*-acetoxy-5*α*, 6*β*, 14*α*, 20*β*-tetrahydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide, và (20*S*, 22*R*) 5*α*, 6*β*, 14*β*-trihydroxy-1,15-dioxowitha-2,16,24-trienolide), được phân lập từ loài *P. minima* L đều có tác dụng ức chế sự sản sinh NO gây ra bởi LPS trong các đại thực bào dòng RAW 264.7 với giá trị IC₅₀ từ 27,35 - 38,72 μM. Tất cả các hợp chất này cho thấy việc ức chế hoạt động sản xuất NO tiềm năng nhưng không liên quan đến độc tính tế bào của chúng [111].

Như đã trình bày trong phần mở đầu và tổng quan, hai loài Tầm bóp và Thù lù nhỏ đã được một số tác giả nghiên cứu về thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, tại Việt Nam, hai loài thực vật này chưa được nghiên cứu triệt để về thành phần hóa học theo định hướng hoạt tính sinh học kháng viêm và ức chế tế bào ung thư. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các cận chiết từ 2 loài này được sàng lọc, đánh giá hoạt tính theo định hướng hoạt tính và từ đó phân lập được những hoạt chất mới, có hoạt tính mạnh kháng viêm, ức chế tế bào ung thư cũng như những tác động ở mức phân tử của chúng trên hai hoạt tính này.

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*)

Loài *Tầm bóp* (*P. angulata*) được thu hái tại huyện Tiền Hải và huyện Đông Hưng tỉnh Thái Bình vào tháng 8 năm 2015 ở dạng tươi, được loại bỏ tạp chất, rửa sạch, phơi ở nhiệt độ phòng, sấy khô ở nhiệt độ 50-60°C và xay thành bột thô với khối lượng bột khô là 2.0 kg. Mẫu nguyên liệu thực vật được Tiến sỹ Trần Thị Phương Anh – Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định. Hiện mẫu tiêu bản (TB 14. 2015) được lưu giữ tại Viện nghiên cứu khoa học Miền Trung, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Mẫu loài *Thù lù nhỏ* (*P. minima*)

Loài *Thù lù nhỏ* (*P. minima*) được thu hái tại xã Hương Hòa, huyện Nam Đông, tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam vào tháng 9 năm 2018 ở dạng tươi, được loại bỏ tạp chất, rửa sạch, phơi ở nhiệt độ phòng, sấy khô ở nhiệt độ 50-60°C và xay thành bột thô với khối lượng bột khô là 2.6 kg. Mẫu nguyên liệu thực vật được Tiến sỹ Trần Thị Phương Anh – Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định. Hiện mẫu tiêu bản (MISR2018-18) được lưu giữ tại Viện nghiên cứu khoa học Miền Trung, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.3. Vật liệu nghiên cứu

- Các dòng tế bào:

+ Dòng RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp.

+ 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) do GS. Chi-Ying Huang, Đại học National Yang Ming Chiaio Tung, Đài Loan và GS. Maier J, trường Đại học Milan, Italia cung cấp..

- Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvat, NaHCO₃, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%), Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit của Invitrogen (Hoa Kỳ).

2.1.4. Hoá chất và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.1.4.1. Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu hóa học và chiết xuất

- Dichloromethane, ethyl acetat, methanol (MeOH), acetone, n-hexan (Trung Quốc, Merck). Các loại dung môi của Trung Quốc được chưng cất lại trước khi dùng.

- Bản sắc ký lớp mỏng Silica gel DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP₁₈ F_{254s} (Merck) tráng sẵn trên đế nhôm.

- Bản sắc ký lớp mỏng điều chế Silica gel 60G F₂₅₄.

- Silica gel 60 dùng cho sắc ký cột (Merck, cỡ hạt 0,040-0,063 mm).

- Các dung môi thông thường khác.

2.1.4.2. Hóa chất sử dụng cho thử nghiệm sinh học

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit của Invitrogen (Hoa Kỳ) và thành phần bổ sung dùng cho nuôi cấy tế bào *in vitro* của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ)

- Kit Annexin V/cell dead apoptosis của Invitrogen (Hoa Kỳ)

- Bộ kit so màu Caspase-3 của Biovision Inc. (Milpitas, CA, Hoa Kỳ)

- Các loại hóa chất: TCA, SRB, ellipticine, Lipopolysaccharides (LPS) từ *Escherichia coli*, sodium nitrite, sulfanilamide, N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride and dimethyl sulphoxide (DMSO) của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Hoa kỳ).

- Các hóa chất thông thường khác

2.1.4.3. Thiết bị nghiên cứu

- Máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, máy JASCO DIP-1000 KUY.

- Đĩa nuôi cấy tế bào sáu giếng nhựa (Corning, USA), đĩa 96 giếng nhựa và pipette (Eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (BioRad).
- Tủ ấm CO₂ (Sanyo), tủ lạnh sâu -80°C (Biobase), bình nitơ lỏng (Trung Quốc),
- Kính hiển vi soi ngược (Axiovert 40 CFL), buồng đếm tế bào (Fisher), cân phân tích (Ohaus), máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.
- Các thiết bị chiết xuất, quay cất dung môi, thiết bị sấy, nghiền mẫu thực vật.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý tạo cao chiết methanol 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°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 dichloromethane 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*

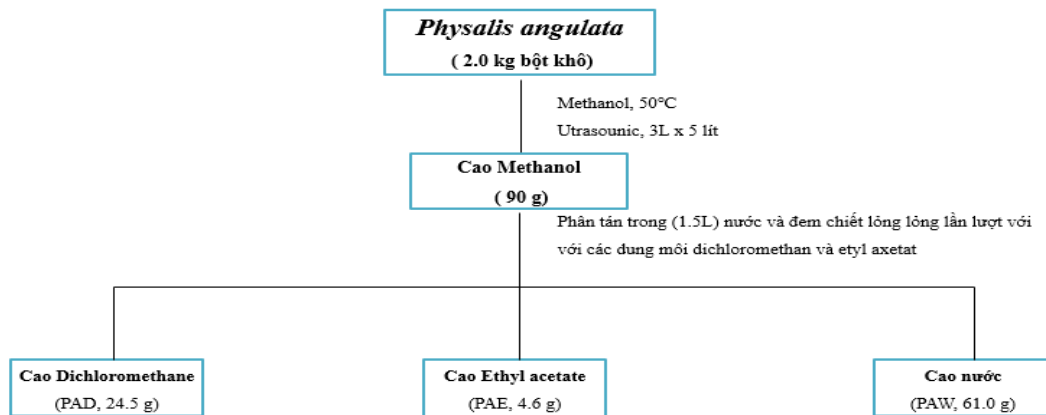
Cao chiết	Kí hiệu các cao chiết	
	<i>P.angulata</i>	<i>P.minima</i>
Cao (MeOH) tổng	PA	PM
Dichloromethane	PAD	PMD
Ethyl acetate	PAE	PME
Cao nước	PAW	PMW

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*

Loài *P. angulata* sau khi thu hái được thái nhỏ, sấy khô, rồi đem xay nhỏ thu được 2.0 kg bột khô. Bột này được ngâm chiết với methanol (3 lần x 5 lít) với sự hỗ

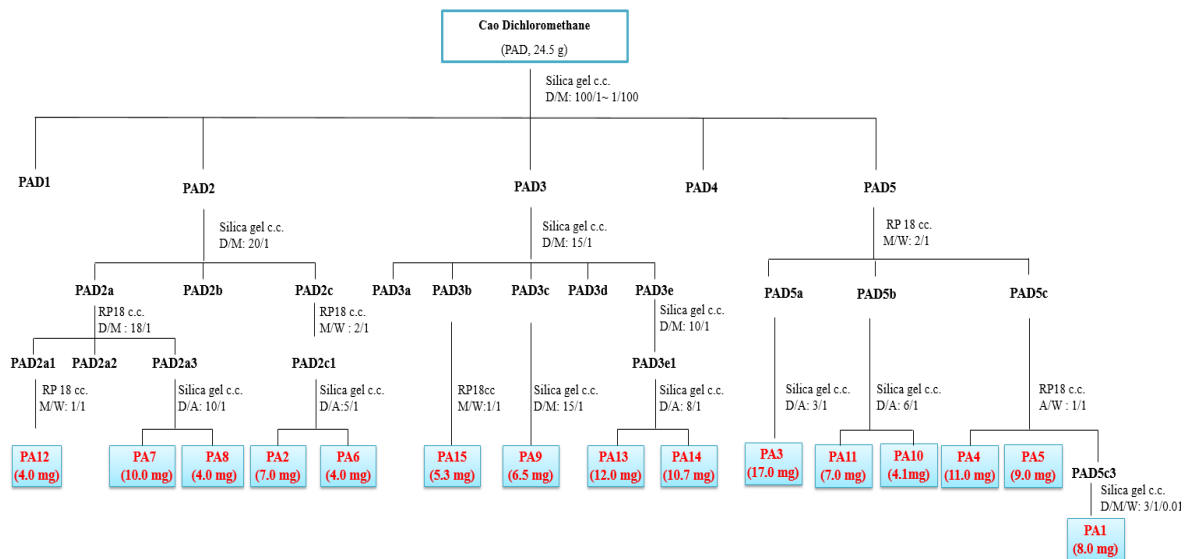
trợ của thiết bị chiết siêu âm (ở 50°C, mỗi lần 3 giờ). Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết methanol (90 g). Cao chiết này được phân tán trong (1.5L) nước và đem chiết lỏng lỏng lần lượt với với các dung môi dichloromethane và ethyl acetate có độ phân cực tăng dần. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng gồm dichloromethane (PAD, 24.5 g), ethyl acetate (PAE, 4.5 g) và nước (PAW, 61.0 g)



PA: Cao Methanol PAE: Cao Ethyl acetate
PAD: Cao Dichlomethane PAW: Cao nước

Hình 2.1. Sơ đồ điều chế các cao chiết phân lập 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*

Cao chiết dichloromethane (PAD, 24.5 g) được đưa lên cột sắc ký silica gel sau đó rửa giải bằng hỗn hợp dung môi dichloromethane/methanol với độ phân cực tăng dần (100/1 – 1/100, v/v) thu được 5 phân đoạn, (PAD1-PAD5). Phân đoạn PAD2 tiếp tục được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi rửa (dichloromethane/methanol, 20/1, v/v) thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn, (PAD2a-PAD2c). Ba phân đoạn, (PAD2a1-PAD2a3) thu được khi phân tách trên sắc ký cột pha đảo RP18 (acetone/nước, 1.8/1, v/v). Tiếp tục tinh chế phân đoạn PAD2a1 trên cột sắc ký pha đảo RP18 sử dụng hệ dung môi rửa giải (methanol/nước, 1/1, v/v) thu được hợp chất **PA12** (4.0 mg). Hợp chất **PA7** (10.0 mg) và **PA8** (8.0 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn PAD2a3 trên sắc ký cột silica gel sử dụng hệ dung môi (dichloromethanol/acetone, 10/1, v/v). Phân tách phân đoạn PAD2c bằng cột sắc ký pha đảo RP18 với hệ dung môi sử dụng hệ dung môi (methanol/nước, 2/1, v/v) sau đó tiếp tục phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi (dichloromethanol/acetone, 5/1, v/v) thu được hợp chất **PA2** (7.0 mg) và **PA6** (4.0 mg).

Phân đoạn PAD3 được đưa lên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol (15/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn, (PAD3a-PAD3e). Hợp chất **PA15** (5.3 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn PAD3b trên sắc ký cột silica pha đảo RP18 giữa giải với hệ dung môi (methanol/nước, 1/1, v/v). Tiếp tục phân tách phân đoạn PAD3c trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/acetone (15/1, v/v) thu được 1 hợp chất **PA9** (6.5 mg). Hợp chất **PA13** (12.0 mg) và **PA14** (10.7 mg) thu được khi phân tách phân đoạn PAD3e bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi (dichloromethane/methanol, 10/1, v/v) sau đó tiếp tục tinh chế trên sắc ký cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi (dichloromethane/acetone, 8/1, v/v).

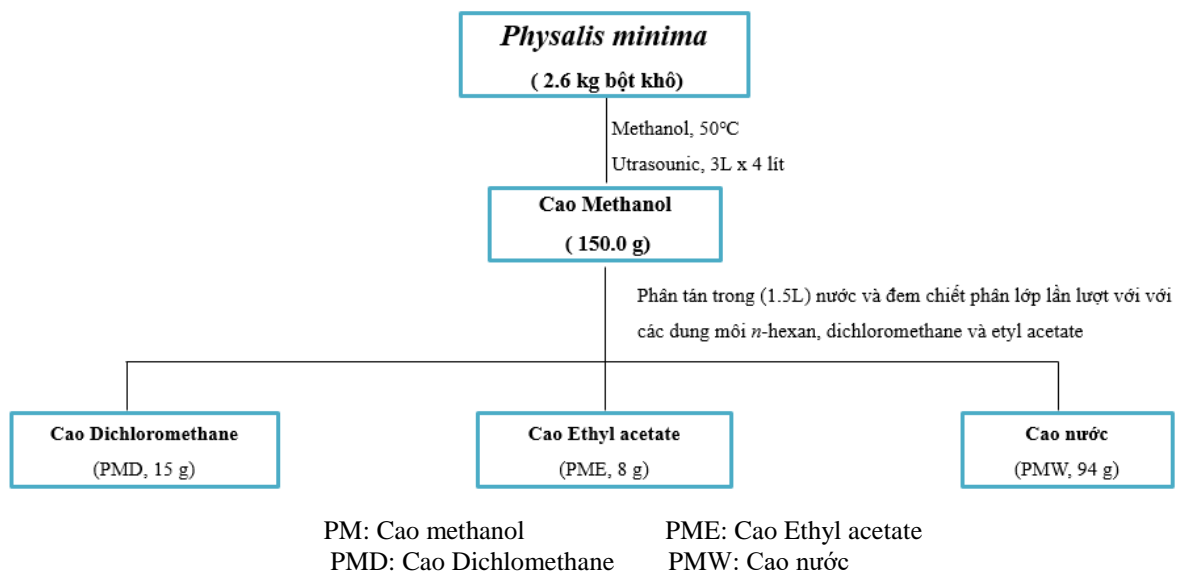
Tương tự, phân đoạn PAD5 được phân tách trên cột sắc ký pha đảo RP18 (methanol/nước, 2/1, v/v) thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn, (PAD5a-PAD5c). Tinh chế phân đoạn PAD5a bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải (dichloromethane/acetone, 3/1, v/v) thu được hợp chất **PA3** (17.0 mg). Hợp chất

PA11 (7.0 mg) và **PA10** (4.5 mg) thu được khi phân tách phân đoạn PAD5b trên cột sắc ký silica gel sử dụng hệ dung môi rửa giải (dichloromethane/acetone, 6/1, v/v). Phân tách phân đoạn PAD5c trên sắc ký pha đảo RP18 với hệ dung môi (acetone/nước, 1/1, v/v) thu được hợp chất **PA4** (11.0 mg), **PA5** (9.0 mg) và phân đoạn PAD5c3. Tinh chế phân đoạn này trên sắc ký cột pha thường đẳng dòng với hệ dung môi (dichloromethane/methanol/nước, 3/1/0.01, v/v/v) thu được **PA1** (8.0 mg).

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*

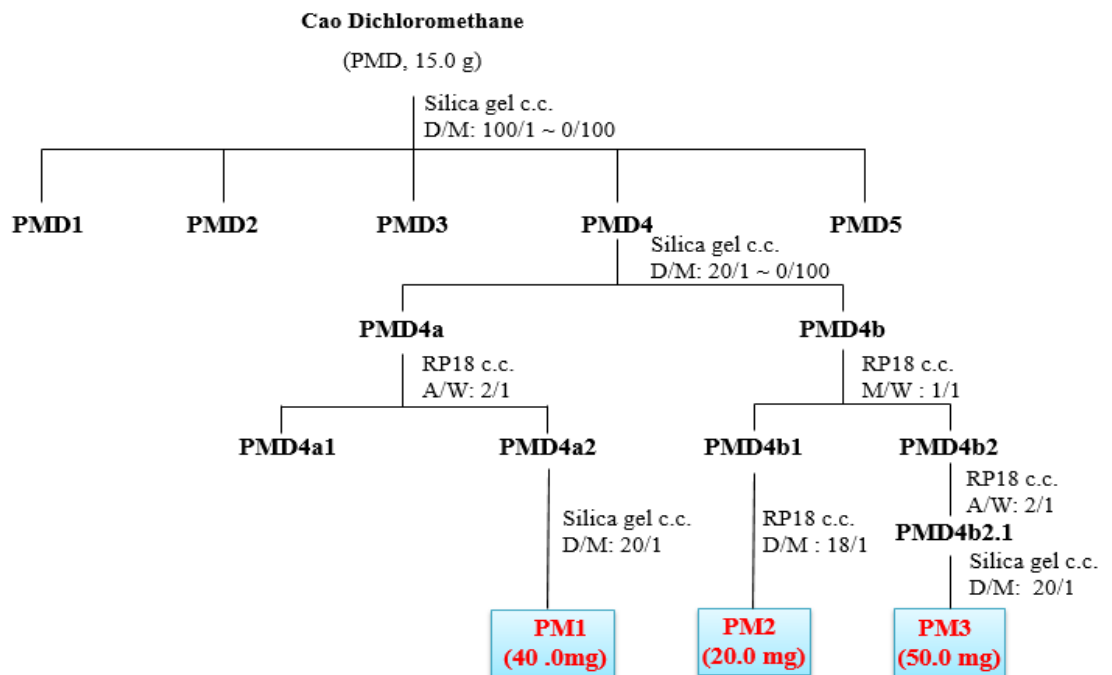
Loài *P. minima* sau khi thu hái được thái nhỏ, sấy khô, xay mịn thu được 2.6 kg bột khô. Bột này được ngâm chiết với methanol (3 lần x 4 lít) với sự hỗ trợ của thiết bị chiết siêu âm (ở 50°C, mỗi lần 3 giờ). Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất thu hồi dưới áp suất giảm thu được (150 g) cao chiết methanol. Cao chiết này được hòa tan với 1.5 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với dichloromethane, ethyl acetate. Các dịch chiết dichloromethane, ethyl acetate được loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết dichloromethane (PMD, 15.0 g), ethyl acetate (PME, 8.0 g) và lớp nước (PMW, 94.0 g).



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*

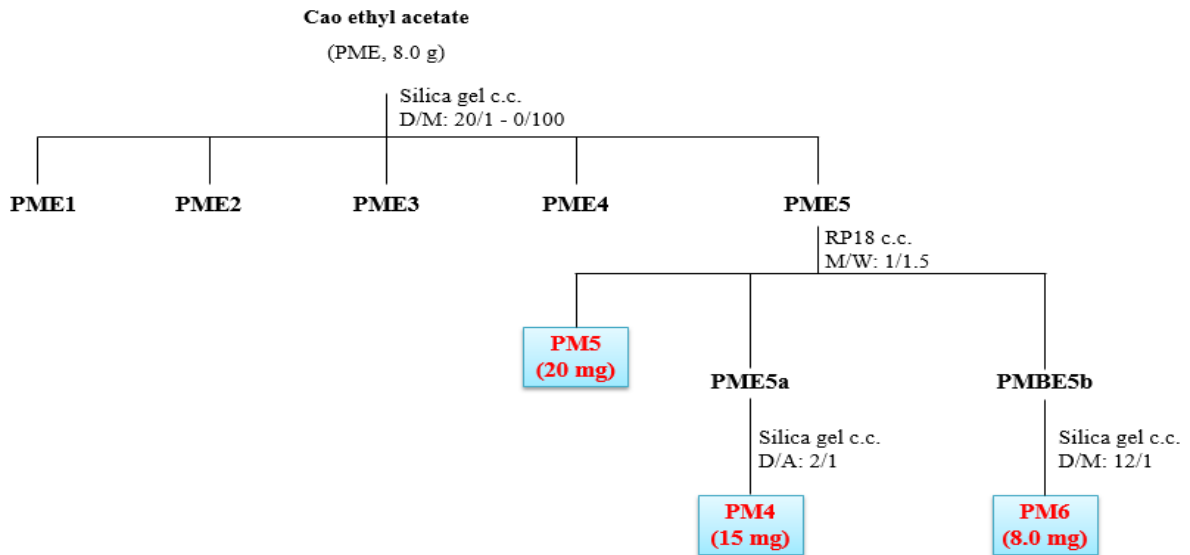
- Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ cao chiết PMD của loài *P.minima*



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

Cao chiết dichloromethane (PMD, 15.0 g) đưa lên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải gradient dichloromethane/methanol (100/1 – 1/100, v/v) thu được 5 phân đoạn chính, (PMD1- PMD5). Phân đoạn PMD4 tiếp tục được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol (20/1, v/v) thu được 2 phân đoạn nhỏ hơn PMD4a và PMD4b. Phân tách phân đoạn PMD4a bằng cột sắc ký pha đảo RP18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (2/1, v/v) thu được 2 phân đoạn PMD4a1 và PMD4a2. Hợp chất **PM1** (40.0 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn PMD4a2 trên sắc ký cột silica gel pha thường hệ dichloromethane/methanol (20/1, v/v). Phân đoạn PMD4b tiếp tục được đưa lên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol (20/1, v/v) thu được 2 phân đoạn, PMD4b1 và PMD4b2. Phân đoạn PMD4b1 được tinh chế bằng cột sắc ký pha đảo RP18 sử dụng hệ dung môi methanol/nước (1.5/1, v/v) thu được hợp chất **PM2** (20.0 mg). Phân tách phân đoạn PMD4b2 bằng sắc ký cột pha đảo RP18 giữa giải với hệ dung môi acetone/nước, (1/2, v/v) kết hợp với với sắc ký cột silica gel pha thường hệ dichloromethane/methanol (20/1, v/v) thu được hợp chất **PM3** (50.0 mg).

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



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

Cao chiết ethyl acetate (PME, 8.0 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol (20/1, v/v) thu được 5 phân đoạn (PME1 – PME5). Phân đoạn PME5 được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1.5, v/v) thu được 2 phân đoạn PME5A và PME5B và hợp chất **PM5** (20.0 mg). Phân đoạn PME5a tiếp tục được tinh chế trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/acetone (2/1, v/v) thu được hợp **PM4** (15.0 mg). Hợp chất **PM6** (8.0 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn PME5b bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol (12/1, v/v).

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

Phương pháp chung để xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất là sự kết hợp giữa việc xác định các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm:

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

Việc phân lập các chất từ các cao chiết được thực hiện bằng phương pháp sắc ký khác nhau như: Sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) và sắc ký rây phân tử.

- Sắc ký lớp mỏng: được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP₁₈ F_{254s} (Merck). TLC được sử dụng để kiểm tra và định hướng cho sắc ký cột. TLC thường được tiến hành trên bản mỏng tráng sẵn silica gel trên đế nhôm hoặc đế thủy tinh. Để tiến hành sắc ký, chất tan được chấm lên bản thành từng vết chấm nhỏ, sấy cho dung môi bay hơi hết rồi triển khai với hệ dung môi thích hợp trong một bình triển khai. Để kiểm tra vết chất có thể sử dụng thuốc thử hiện màu hoặc soi bằng đèn UV. Thuốc thử hiện màu có thể là hơi ammoniac hoặc dung dịch axit sunfuric 10%. Để hiện vết người ta nhúng bản vào thuốc thử hoặc phun lên bản mỏng sau đó hơi bản trên bếp điện hoặc sấy nóng để vết chất xuất hiện từ từ.

Tùy theo lượng chất và dạng chất mà có thể lựa chọn một trong hai phương pháp. Nếu chạy thô thì thường chất được hòa tan vào dung môi thích hợp, tẩm silica gel rồi cất loại dung môi đến khô, nghiền mịn. Nếu chạy tinh thì chất thường được hòa vào dung môi chạy cột với một lượng tối thiểu.

- Sắc ký lớp mỏng điều chế: thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60G F₂₅₄, phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 368 nm, hoặc cất rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10%, hơi nóng để phát hiện vết chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp Silica gel có chất, giải hấp phụ thu được chất cần tinh chế.

Các vết chất hiển thị trên sắc ký lớp mỏng được tiến hành gom lại và chia ra các phân đoạn đã được sắc ký. Các phân đoạn nhận được tiếp tục kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng để lựa chọn phương pháp sắc ký phù hợp phân tách thành các đoạn nhỏ hơn. Lặp lại các công việc như trên cuối cùng sẽ nhận được các chất có độ tinh khiết đảm bảo đủ để đo phổ và xác định cấu trúc.

- Sắc ký cột:

+ Sắc ký cột pha thường được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel với kích thước hạt 0,040 - 0,063 mm (240 - 430 mesh); dung môi rửa giải chủ yếu dùng các hệ dung môi như *n*-hexane: ethylacetat, *n*-hexane: dichloromethane, *n*-hexane: acetone, dichloromethane : ethylacetat, dichloromethane : methanol, dichloromethane : acetone, dichloromethane : methanol: nước với các tỉ lệ thích hợp.

+ Sắc ký cột pha đảo với chất hấp phụ là RP-18 (150 m, Fuji Silysia Chemical Ltd.) sử dụng loại YMC có kích thước hạt 30-50 μm (Fuji silysia Chemical Ltd.); Nhựa trao đổi Diaion HP-20 (Misubishi Chemical Industries Co., Ltd.).

Trong sắc ký cột, tỉ lệ đường kính cột (D) so với chiều cao cột (L) cũng đóng một vai trò rất quan trọng tới khả năng tách của cột. Tỷ lệ L/D phụ thuộc vào yêu cầu tách, tức phụ thuộc vào hỗn hợp chất cụ thể. Với mỗi chất cụ thể sẽ có 1 giá trị R_f khác nhau và dựa vào giá trị R_f này để thiết kế cột (R_f là tỷ lệ giữa quãng đường đi của chất cần tách so với quãng đường đi được của dung môi). Nếu tách thôi thì tỉ lệ này thấp (từ 1/5 đến 1/10), còn nếu tách tinh thì tỉ lệ này cao hơn và phụ thuộc vào hệ số tách (sự khác nhau về R_f) mà hệ số này dao động từ 1/20 - 1/30.

+ Sắc ký rây phân tử dùng Sephadex LH20 làm pha tĩnh với dung môi chạy cột là Metanol (MeOH) hoặc dichloromethane : methanol (CH_2Cl_2 :MeOH) với tỷ lệ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 < 10\%$. Được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường, silica gel pha đảo và diaion.

2.3.2. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear magnetic resonance spectrometry - NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer của Viện Hoá học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam. Chất nội chuẩn là TMS (Tetrametyl Silan). Các phổ cộng hưởng từ hạt nhân gồm:

- Phổ 1 chiều (1D):

+ Phổ proton ^1H -NMR: Trong phổ ^1H -NMR, độ dịch chuyển hóa học (δ) của các proton được xác định trong thang ppm từ 0 ppm đến 14 ppm tùy thuộc vào mức độ lai hóa của nguyên tử cũng như đặc trưng riêng của từng phân tử. Mỗi loại proton cộng hưởng ở một trường khác nhau và vì vậy chúng được biểu diễn bằng một độ dịch chuyển hóa học khác nhau. Dựa vào những đặc trưng của độ dịch chuyển hóa học cũng như tương tác spin coupling mà người ta có thể xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất.

+ Phổ cacbon ^{13}C -NMR: Phổ này cho tín hiệu vạch phổ của cacbon. Mỗi nguyên tử cacbon sẽ cộng hưởng ở một trường khác nhau và cho một tín hiệu phổ

khác nhau. Thang đo cho phổ ^{13}C -NMR cũng được tính bằng ppm và với dải thang đo rộng hơn so với phổ proton (từ 0 ppm đến 240 ppm).

+ Phổ DEPT: Phổ này cho ta những tín hiệu phổ phân loại các loại cacbon khác nhau. Trên các phổ DEPT, tín hiệu của cacbon bậc bốn không xuất hiện. Tín hiệu phổ của cacbon metin (CH) và metyl (CH_3) nằm ở phía trên và của cacbon metilen (CH_2) nằm ở phía dưới của phổ DEPT 135. Còn trên phổ DEPT 90 thì chỉ xuất hiện tín hiệu phổ của các cacbon metin (CH).

- Phổ 2 chiều (2D):

+ Phổ HSQC: Nhờ vào các tương tác trên phổ này có thể xác định các tín hiệu proton nào liên kết trực tiếp với nguyên tử cacbon nào.

+ Phổ HMBC: Đây là phổ biểu diễn các tương tác xa của H và C trong phân tử. Nhờ vào các tương tác trên phổ này mà từng phần của phân tử cũng như toàn bộ phân tử được xác định về cấu trúc

+ Phổ NOESY: Phổ này biểu diễn các tương tác xa trong không gian của các proton không kể đến các liên kết mà chỉ tính đến khoảng cách nhất định trong không gian. Dựa vào kết quả phổ này, có thể xác định được cấu trúc không gian của phân tử.

Dung môi được sử dụng đối với các hợp chất phân lập được từ loài *P. angulata* và *P. minima* là CD_3OD .

2.3.3. Phương pháp phổ khối lượng (Mass spectrometry - MS)

Phổ khối lượng HR-ESI-MS đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3.4. Phương pháp đo độ quay cực $[\alpha]_D$

Độ quay cực $[\alpha]_D$ được đo trên máy JASCO DIP-1000 KUY tại Viện hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.4.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro*

Các loại tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO).

Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

2.4.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư (cytotoxic assay)

Phương pháp này được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

- Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190μL) sẽ được làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid – TCA 20%.

- Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek Elx800).

- Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{\text{OD (mẫu)} - \text{OD(ngày 0)}}{\text{OD(DMSO)} - \text{OD(ngày 0)}}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 g/mL; 2 g/mL; 0,4 g/mL; 0,08 g/mL được sử dụng như là chất đối chứng dương;

- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0.05%). Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính Table Curve 2Dv4.

- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} < 5 \mu\text{M}$.

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

- Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO_2 trong 24h. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h. Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) trong 24h. Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G -Methyl- L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và $0,8 \mu\text{g/mL}$. Nitrite (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 μL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 μL Griess reagent: 50 μL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 μL 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

- Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] \times 100$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

2.4.4. Phương pháp Western Blot

Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong các đĩa petri 60mm trong môi trường DMEM ở 37°C , 5% CO_2 với 10% FBS, penicillin (100 units/mL) và streptomycin sulphate ($100 \mu\text{g/mL}$) với mật độ 5×10^5 tế bào.

Sau 24 giờ, tế bào được ủ với hợp chất pha sẵn ở các nồng độ thử nghiệm. Sau 48h, thu phần tế bào bám dính bằng trypsin và ly tâm 1000xg, 5 phút để thu cặn tế bào. Rửa cặn tế bào bằng PBS, sau đó thu protein tế bào bằng lysis buffer trong 30 phút. Dung dịch chứa protein được ly tâm (15,000 vòng/phút, 5 phút, 4°C) để loại bỏ phần không tan.

Nồng độ protein trong dịch nổi được xác định bằng dung dịch Bradford Reagent 5x (SERVA Electrophoresis GmbH, Germany). Độ hấp thụ của protein được đo bằng máy ELISA Plate Reader (Biotek Elx800) ở bước sóng 595 nm và nồng độ protein được tính dựa theo đường chuẩn BSA trong khoảng từ 0 đến 1 mg/mL. Dịch thủy phân protein được ủ ở 95°C trong 10 phút và chạy điện di bằng gel polyacrylamide 12% SDS. Sau khi chạy điện di, protein được chuyển vào màng nitrocellulose (0.45 µm) bằng transfer buffer trong 45 phút. Màng được cố định bằng skim milk 5% trong PBS-Tween 20 trong 1h ở máy lắc 100 vòng/phút, nhiệt độ phòng, sau đó rửa bằng PBS- Tween 20 3 lần (mỗi lần 10 phút). Màng được cắt theo kích thước phân tử của các protein thử nghiệm và ủ với kháng thể bậc một (Caspase-3, Bcl-2, Bax, pha loãng tỉ lệ 1:1000) qua đêm ở 4°C, 100vòng/phút. Màng được rửa với PBS- Tween 20 3 lần (10 phút/lần, 100 vòng/phút) trước khi ủ với kháng thể bậc hai tương ứng (Anti-mouse antibody, tỉ lệ 1:2000) trong 2h ở nhiệt độ phòng, sau đó tiếp tục rửa 3 lần với PBS- Tween 20, mỗi lần 10 phút. Sự biểu hiện của protein được kiểm tra bằng bộ kit tăng cường phát quang (GE healthcare, UK). Tubulin (Invitrogen, USA) được sử dụng làm đối chứng để đảm bảo lượng protein đồng đều ở các mẫu. Biểu hiện của các protein được chụp bằng máy Azure c300.

2.4.5. Phương pháp đánh giá tác động cảm ứng apoptosis

2.4.5.1. Phương pháp nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342

Tế bào được đưa ra đĩa nuôi cấy 24 giếng và nuôi cấy qua đêm trước khi ủ với mẫu nghiên cứu ở nồng độ khác nhau. Sau 48 h ủ mẫu, tế bào được nhuộm với Hoechst 33342 ở nồng độ 0,5 µg/mL trong 30 phút. Tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng Excitation/Emission (nm) là 350/461. Xác định số lượng tế bào apoptosis trong ít nhất 200 tế bào qua kính hiển vi. Tế bào apoptosis

được xác định là những tế bào có nhân sáng hơn (do nhiễm sắc chất bị cô đặc) hay nhân bị phân chia thành mảnh nhỏ.

2.4.5.2. Phương pháp đánh giá khả năng gây apoptosis bằng hệ thống phân tích dòng chảy tế bào (flow cytometry)

Thí nghiệm được thực hiện theo Kit Annexin V/cell dead apoptosis của Invitrogen như sau: 5×10^5 tế bào được ủ với mẫu thử hoặc dung môi pha mẫu 24h được thu vào ống falcon. Sau khi ly tâm loại bỏ môi trường, tế bào được rửa lại bằng PBS. Cận tế bào được hòa lại trong 100 μ L binding buffer và bổ sung thêm 5 μ L Annexin V và 1 μ L Propidium iodide (PI) (1 mg/mL). Ủ tế bào với màu nhuộm 15 phút ở 37°C sau đó thêm vào các ống tế bào 400 μ L binding buffer. Tổng số 10.000 tế bào/mẫu được phân tích bằng hệ thống flowcytometry Novocyte và phần mềm NovoExpress software (ACEA Bioscience Inc.) để xác định tỉ lệ tế bào biểu hiện apoptosis

2.4.5.3. Nghiên cứu hoạt tính cảm ứng apoptosis bằng caspase 3

Hoạt tính của caspase 3 được thực hiện bằng bộ kit so màu Caspase-3 của Biovision (Milpitas, CA, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào A549 (1×10^6 tế bào/ml) sau khi được ủ với mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 48 giờ được ly giải với 50 μ L đệm ly giải tế bào trong 10 phút để thu được tổng số protein. Sau phản ứng gồm 50 μ L dung dịch protein đã ly giải (chứa 100 μ g protein), 50 μ L DTT (10 mM) và 5 μ L DEVD-pNA (200 μ M) trong đĩa 96 giếng được ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Xác định giá trị OD thông qua hệ thống ELISA (BioTek Elx800) ở bước sóng 405 nm. Giếng tế bào với DMSO 10% được sử dụng làm giếng đối chứng âm. Camptothecin được sử dụng làm đối chứng dương. Khả năng kích thích caspase 3 của các mẫu nghiên cứu được xác định khi so sánh với đối chứng âm không ủ mẫu.

2.5. Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu được xử lý bằng Excel và phần mềm GraphPad Prism 5.0. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình (mean) \pm SD/SE); Sự khác biệt thống kê được phân tích bằng phương pháp phương sai một chiều (ANOVA một chiều). Giá trị $p < 0,05$ là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Giá trị nồng độ ức chế 50 % (IC_{50}) được tính bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

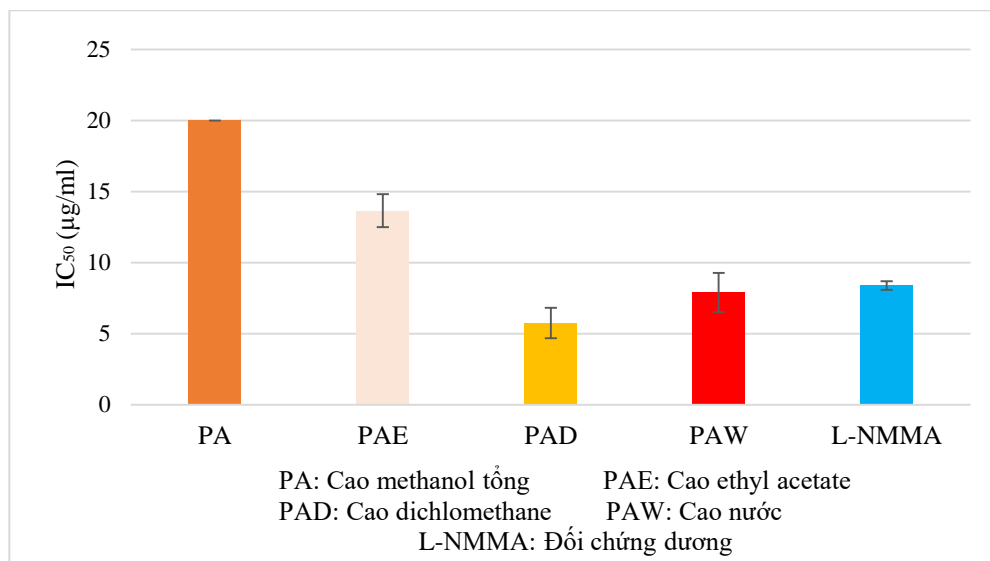
CHƯƠNG 3

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*

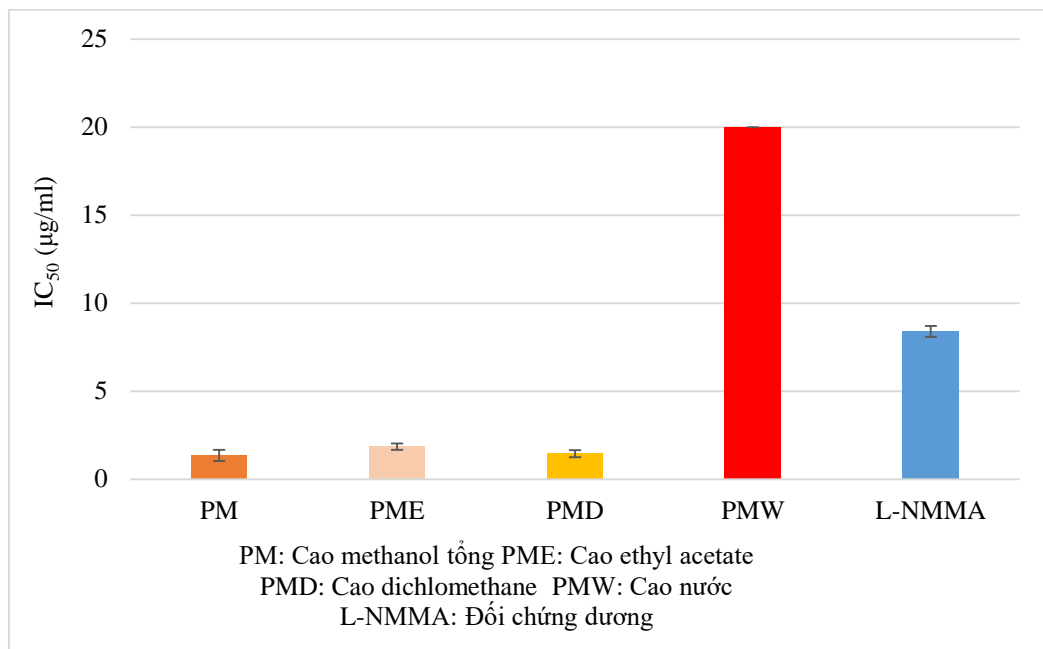
3.1.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của loài *P. angulata* và *P. minina*

Oxit nitric (NO) là một phân tử tín hiệu đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của quá trình viêm và có liên quan tới bệnh ung thư. Mặt khác, NO được coi là chất trung gian tiền viêm được sản sinh ở nhiều loại tế bào như đại thực bào, nguyên bào sợi hay tế bào gan. Sự sản sinh NO quá mức trong các tình huống bệnh lý được coi là gây ra tình trạng viêm. NO được tổng hợp và giải phóng vào các tế bào nội mô nhờ sự trợ giúp của các enzyme NOSs khi chuyển hóa arginine thành citrulline và tạo ra NO trong quá trình này [76]. Phản ứng viêm của cơ thể nếu không được kiểm soát có thể tiến triển thành viêm mãn tính [112]. Vì vậy, có thể sơ bộ đánh giá tiềm năng kháng viêm của mẫu cần nghiên cứu thông qua phương pháp xác định hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 để làm cơ sở lựa chọn cho các nghiên cứu sâu hơn tiếp theo.



Hình 3.1. Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết phân lập từ loài *P. angulata* thông qua giá trị IC₅₀ (µg/mL)

Các cao chiết PA, PAD, PAW và PAE phân lập từ loài *P. angulata* được đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ và kết quả cho thấy các cao chiết PAD, PAW 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 khi có giá trị IC_{50} là $5,75 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ so với các cao chiết PAE và PAW có giá trị IC_{50} tương ứng là $13,65 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, $7,89 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$ (Hình 3.1). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết luận của Rivera và cộng sự (2019) sau khi tiến hành nghiên cứu đánh giá khả năng ức chế sinh NO của cao chiết PAD thu được từ *P. angulata* với phần trăm ức chế sản sinh NO là $97,08 \pm 0,49\%$ (ở nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$). Khi các đại thực bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bởi LPS thì nồng độ các chất trung gian gây viêm, cytokine tiền viêm và gây viêm như NO, PGE2, IL-1 β , IL-6 và TNF α đã tăng mạnh, với mức tăng ít nhất 4 lần so với khi không bị kích thích bởi LPS ($P < 0,001$). Cao chiết PAD trong thí nghiệm này đã ức chế đáng kể sự biểu hiện của tất cả yếu tố tiền viêm, gây viêm ở trên theo cách phụ thuộc vào nồng độ, với giá trị IC_{50} dưới 20 $\mu\text{g/mL}$ [113].



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} ($\mu\text{g/mL}$)

Đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết PM, PMD, PMH và PME phân lập từ loài *P. minima* cho thấy: các cao chiết PM, PMD và PME có khả năng ức chế >50% sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7. Bằng việc so sánh giá trị IC₅₀ của cao chiết có thể thấy hoạt tính ức chế sản sinh NO tăng dần theo thứ tự PMW <PME <PMD, tương ứng với giá trị IC₅₀ giảm dần. Cụ thể giá trị IC₅₀ của cao chiết PMW là lớn hơn 20 µg/mL, của cao chiết PME là 1,84 ± 0,23 µg/mL và của PMD là 1,45 ± 0,20 µg/mL (Hình 3.2). Kết quả này phân nào phù hợp với nghiên cứu của Khan và cộng sự (2009), cho thấy dịch chiết methanol thô và phân đoạn cloroform từ loài *P. minima* có tác dụng ức chế đáng kể đối với phản ứng miễn cảm của mô hình đau do viêm [114].

Như vậy, kết quả sàng lọc ban đầu này cho phép lựa chọn ra các cao chiết có hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh nhất là PAD từ loài *P. angulata* và PME, PMD từ loài *P. minima* để tiếp tục phân lập các hợp chất tinh khiết từ cao chiết này nhằm tìm kiếm, sàng lọc, phát hiện được hợp chất tiềm năng kháng viêm.

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*

Ung thư vẫn là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới. Tỷ lệ mắc bệnh, tỷ lệ sống sót, tái phát và tiên lượng xấu của bệnh nhân ung thư luôn là những thách thức lớn trong nhiều thập kỷ [115]. Hiện nay các phác đồ điều trị ung thư không phẫu thuật truyền thống bao gồm cả hóa trị, xạ trị, hóa miễn dịch hoặc kết hợp các liệu pháp này.

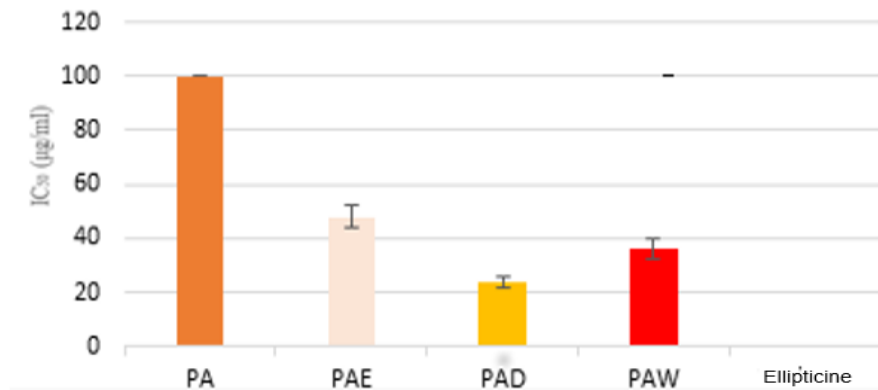
Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót của những bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh ung thư, đặc biệt là những bệnh nhân ở giai đoạn nặng, vẫn ở mức rất thấp do tình trạng kháng thuốc, độc tính cao và các tác dụng phụ lâu dài khác của các phương pháp điều trị này [116]. Điều này đã thúc đẩy các nhà khoa học tìm kiếm những chiến lược hiệu quả hơn và nỗ lực tìm kiếm, phát hiện các loại thuốc chống ung thư mới hiệu quả với ít tác dụng phụ. Các sản phẩm tự nhiên, đặc biệt là các sản phẩm từ thực vật, là nguồn dược liệu đặc biệt quan trọng cho việc khám phá ra thuốc mới

trong những thập kỷ qua [117]. Hiện tại, các loại thuốc có nguồn gốc từ thực vật đang là nguồn dược phẩm chính để điều trị ung thư như paclitaxel, vinblastine, vincristine v.v. [118]. Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) đã sàng lọc hàng trăm ngàn mẫu thực vật khác nhau cho các hoạt tính chống ung thư. Trong số đó, khoảng 3.000 loài thực vật đã chứng minh hoạt tính chống ung thư tiềm năng [119].

Ung thư phát triển qua nhiều giai đoạn, với những thay đổi đột biến trong tế bào khiến chúng không ngừng phát triển và phân chia, tránh được sự chết theo chương trình. Việc sàng lọc các hoạt chất tiềm năng dùng làm thuốc trong điều trị ung thư chủ yếu dựa trên khả năng gây độc tế bào của chúng khi sử dụng các thử nghiệm chống tăng sinh *in vitro*. Cho dù đang có thêm những tác nhân chống ung thư mới sử dụng trong hóa trị liệu thì các hoạt chất gây độc tế bào vẫn là nền tảng của liệu pháp này vì chúng có hiệu quả cao, giá thành phù hợp [120]. Thuốc gây độc tế bào lưu thông trong cơ thể để tiêu diệt các tế bào ung thư bằng cách tác động vào quá trình nhân đôi hay phát triển của tế bào, hoặc kìm hãm sự sinh trưởng và thậm chí gây chết tế bào.

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được sử dụng rộng rãi để sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Các dòng tế bào ung thư nghiên cứu được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy phù hợp có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò và các thành phần cần thiết khác ở điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂; 37°C; độ ẩm 100%; vô trùng tuyệt đối). Tùy thuộc vào đặc tính của từng dòng tế bào khác nhau, thời gian cấy chuyển cũng khác nhau. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử nghiệm [121].

Trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* từ cao chiết methanol tổng và các cận chiết của loài *P. angualata* và *P. minima* được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư phổi A549. Kết quả ở hình 3.3 và 3.4 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào của hai loài thực vật nghiên cứu có sự khác biệt lớn giữa các cận chiết và phụ thuộc vào nồng độ của các cận chiết ở các nồng độ 0,8; 4; 20 và 100 µg/mL.

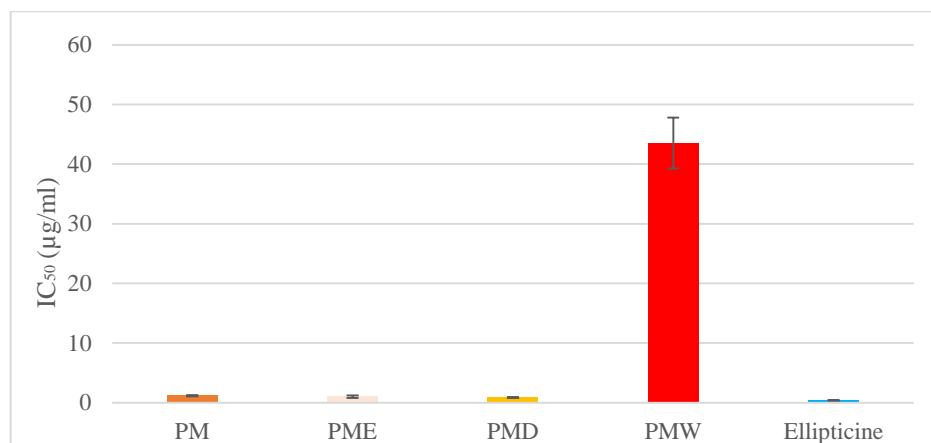


PA: Cao methanol tổng PAE: Cao ethyl acetate

PAD: Cao dichlormethane PAW: Cao nước

Ellipticine: Đối chứng dương

Hình 3.3. Giá trị IC₅₀ trong thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư dòng A549 của các cao chiết từ loài *P. angulata*



PM: Cao methanol tổng PME: Cao ethyl acetate

PMD: Cao dichlormethane PMW: Cao nước

Ellipticine: Đối chứng dương

Hình 3.4. Giá trị IC₅₀ 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 3.3 và 3.4 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào của hai loài thực vật nghiên cứu có sự khác biệt lớn giữa các cao chiết và phụ thuộc vào nồng độ của các cao chiết ở các nồng độ 0,8; 4; 20 và 100 µg/mL. Cụ thể:

Ở loài *P. angulata*, mẫu cao chiết tổng methanol không thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) ở các nồng độ nghiên cứu. Các cao chiết

dichloromethane, ethyl acetate và cao nước thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào nghiên cứu, thông qua % ức chế sự phát triển của tế bào ung thư phổi (A549) với các giá trị IC_{50} lần lượt là $23,77 \pm 2,02 \mu\text{g/mL}$; $48,07 \pm 3,81 \mu\text{g/mL}$; $35,96 \pm 3,89 \mu\text{g/mL}$. Chất đối chứng tham khảo là ellipticine cho thấy hoạt tính mạnh và ổn định với giá trị IC_{50} thu được là $0,40 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. Kết quả này cho thấy, cao chiết PAD thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất (Hình 3.3). Như vậy, bước sàng lọc này giúp định hướng nghiên cứu phân lập các chất tinh khiết từ cao chiết tiềm năng nhằm tìm kiếm, sàng lọc, phát hiện được hoạt chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt nhất của loài dược liệu *P. angulata*.

Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết phân lập từ loài *P. minima* có sự khác biệt lớn. So sánh giá trị IC_{50} của các cao chiết có thể thấy các cao chiết có mức hoạt tính gây độc như sau: $PMW < PM < PME < PMD$ (Hình 3.4).

Kết quả thu được ở trên cho thấy cao chiết PMD và PME của loài *P. minima* 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 chiết tổng PM. Do đó, cao chiết PMD và PME được chọn để tiếp tục nghiên cứu, thu nhận các đơn chất và khảo sát hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào ung thư của chúng.

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

Các hợp chất phân lập được từ loài *P. angulata* và *P. minina* được phân tích trên sắc ký bản mỏng bằng cách chấm kiểm tra trên các hệ dung môi khác nhau thì chỉ cho một vệt chất và kết hợp với số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) của các hợp chất này cho phép khẳng định rằng các hợp chất phân lập được từ loài *P. angulata* và *P. minina* là những đơn chất tinh khiết.

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

Từ cao chiết PAD phân lập được từ loài *P. angulata* thu tại tỉnh Thái Bình, đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 15 hợp chất trong đó có 03 hợp chất mới. Cấu trúc của các hợp chất này được xác định như sau:

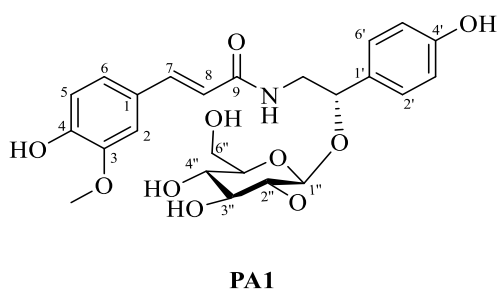
3.2.1.1. Hợp chất mới **PA1**: physalucoside ABảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PA1**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)	C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	128.2	-	4'	158.2	-
2	111.7	7.03 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	5'	115.9	6.65 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)
3	149.3	-	6'	129.2	7.15 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)
4	150.1	-	7'	81.8	4.75*
5	116.5	6.69 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	8'	46.1	3.46 (dd, <i>J</i> = 7.0, 13.5 Hz) 3.63 (dd, <i>J</i> = 6.0, 8.5 Hz)
6	123.3	6.93 (dd, <i>J</i> = 1.5, 8.5 Hz)	3-OCH ₃	56.4	3.79 (s)
7	142.4	7.34 (d, <i>J</i> = 15.5 Hz)	1''	104.5	4.40 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz)
8	118.6	6.32 (d, <i>J</i> = 15.5 Hz)	2''	75.5	3.20*
9	169.3	-	3''	78.1	3.25 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
1'	132.3	-	4''	71.5	3.18 (dd, <i>J</i> = 5.0, 9.0 Hz)
2'	129.2	7.15 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	5''	77.9	3.09 (dd, <i>J</i> = 2.5, 5.5 Hz)
3'	115.9	6.65 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6''	62.6	3.48*/3.60*

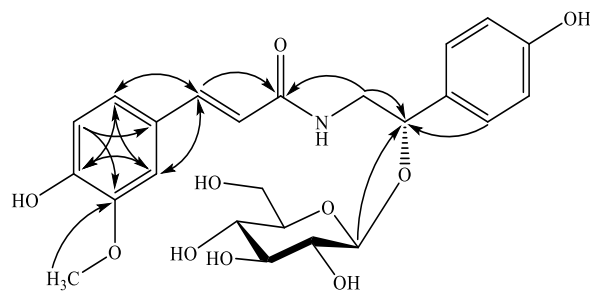
(^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * tín hiệu bị chồng lấp)

Hợp chất **PA1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của **PA1** được xác định là C₂₄H₂₉NO₁₀ bởi sự có mặt của pic ion giả phân tử [M+H]⁺ tại *m/z* = 492.1838 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức [C₂₄H₃₀NO₁₀]⁺ = 492.1850). Trên phổ ¹H-NMR của **PA1** quan sát thấy tín hiệu của ba proton thơm hệ ABX tại δ_H 7.03 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5) và 6.93 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-6) cùng với bốn proton thơm hệ AABB tại δ_H 7.15 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', H-6') và 6.65 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', H-5') cho phép xác định sự có mặt của một vòng thơm thế 1,3,4 và một vòng thơm thế 1,4. Tín hiệu của hai olefinic proton tại δ_H

7.34 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7) và 3.46 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8) xác định sự có mặt của nhóm CH=CH cấu hình *trans*. Bên cạnh đó còn quan sát thấy tín hiệu của một nhóm methylene tại δ_{H} 3.46 (1H, dd, $J = 7.0, 13.5$ Hz, H-8'a) và 3.63 (1H, dd, $J = 6.0, 8.5$ Hz, H-8'b); một nhóm methoxy tại δ_{H} 3.79 (3H, s) và một anomeric proton tại δ_{H} 4.40 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''). Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **PA1** xác định sự có mặt của 24 carbon gồm 12 carbon thuộc hai vòng thơm, một nhóm oxymethine, một nhóm methylene, hai nhóm methine, một nhóm methoxy, một nhóm carbonyl cùng sáu carbon thuộc phần đường glycopyranosyl. Sự có mặt của nhóm 2-amino ethanoyl được xác định dựa vào các tín hiệu tại δ_{H} 4.75 (1H, H-7'), 3.46 (1H, dd, $J = 7.0, 13.5$ Hz, H-8'a) và 3.63 (1H, dd, $J = 6.0, 8.5$ Hz, H-8'b) trên phổ ^1H -NMR cùng với các tín hiệu carbon tương ứng tại δ_{C} 81.8 (C-7') và 46.1 (C-8') trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC. Tín hiệu tương tác trên phổ HMBC từ H-7 (δ_{H} 7.34) đến C-2 (δ_{C} 111.7)/ C-6 (δ_{C} 123.3)/ C-9 (δ_{C} 169.3) xác định sự có mặt của nhóm feruloyl. Hơn nữa, các tương tác HMBC từ H-8' (δ_{H} 3.46, 3.63) đến C-7' (δ_{C} 81.8)/ C-9 (δ_{C} 169.3) xác định sự có mặt của nhóm 2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) ethyl amine và nhóm này liên kết với khung chất tại C-9. Vị trí của phần đường gắn kết với C-7' được xác định dựa vào tương tác HMBC từ H-1'' (δ_{H} 4.40) đến C-7' (δ_{C} 81.8). Ngoài ra, so sánh độ quay cực của **PA1** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -2.5$) với độ quay cực của N-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] ferulamide ($[\alpha]_{\text{D}} = -3$), xác định cấu hình tuyệt đối của **PA1** tại vị trí C-7' là *S*. Từ các phân tích trên, cấu trúc của **PA1** được xác định là N-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] ferulamide glucoside. Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho phép xác định đây là một hợp chất mới, hợp chất này được đặt tên là physalucoside A.



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PA1**



Hình 3.6. Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PA1**

3.2.1.2. Hợp chất mới **PA6**: *physagulin P*Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PA6**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)	C	$\delta_{Ca,b}$	$\delta_{Ha,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	208.1	-	16	35.2	1.54 (dd, 5.0, 12.5) 2.00*
2	126.5	5.99 (d, 9.5)	17	53.3	1.72*
3	142.7	7.10 (dd, 6.0, 9.5)	18	18.0	1.22 (s)
4	118.5	6.25 (d, 6.0)	19	18.5	1.44 (s)
5	160.4	-	20	39.0	2.08*
6	74.4	4.58 (t, 3.0)	21	15.3	1.06 (d, 6.5)
7	37.3	1.26 (dd, 3.5, 13.5) 2.39 (dt, 3.0, 14.0)	22	80.2	4.44 (dt, 3.5, 13.0)
8	38.2	2.31 (ddd, 2.5, 3.5, 13.0)	23	31.4	2.09 (br d, 16.5) 2.52 (br t, 16.5)
9	46.5	1.71*	24	152.8	-
10	55.6	-	25	122.2	-
11	22.1	1.46 * 1.90*	26	169.3	-
12	43.7	1.79 (br s)	27	12.4	1.85 (s)
13	47.4	-	28	20.4	1.98 (s)
14	85.7	-	29	171.2	-
15	81.3	4.92 (d, 4.5)	30	21.3	1.85 (s)

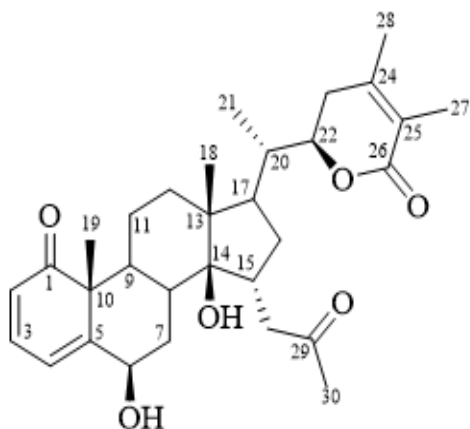
(^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * tín hiệu bị che khuất)

Hợp chất **PA6** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của **PA6** được xác định là C₃₀H₄₀O₇ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử [M+Na]⁺ tại *m/z* = 535.2639 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₀H₄₀O₇Na]⁺ = 535.2666).

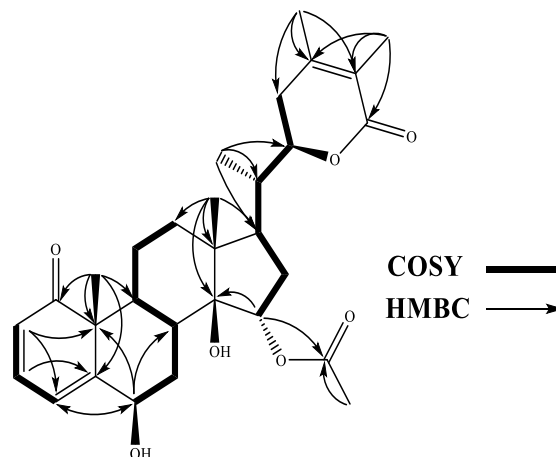
Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của năm nhóm methyl tại δ_{H} 1.22 (3H, s, H-18), 1.44 (3H, s, H-19), 1.85 (3H, s, H-27), 1.98 (3H, s, H-28), và 1.85 (3H, s, H-30); năm nhóm methylene, bao gồm một nhóm methylene của vòng lactone tại δ_{H} 2.09 (1H, brd, $J = 16.5$ Hz, Ha-23) và 2.52 (1H, br t, $J = 16.5$ Hz, Hb-23); sáu nhóm methine, bao gồm ba nhóm oxymethine tại δ_{H} 4.58 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-6), 4.92 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-15), và 4.44 (1H, dt, $J = 3.5, 13.0$ Hz, H-22); và ba olefinic proton tại δ_{H} 5.99 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 7.10 (1H, dd, $J = 6.0, 9.5$ Hz, H-3), và 6.25 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4). Các tín hiệu trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC xác định sự có mặt của 30 carbon gồm chín carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_{C} 47.4, 55.6, 122.2, 152.8, 160.4, 169.3, 171.2, 208.1; 10 nhóm methine tại δ_{C} 38.2, 39.0, 46.5, 53.3, 74.4, 80.2, 81.3, 118.5, 126.5, 142.7; năm nhóm methylene tại δ_{C} 22.1, 31.4, 35.2, 37.3, 43.7; và sáu nhóm methyl tại δ_{C} 12.4, 15.3, 18.0, 18.5, 20.4, 21.3. Trong đó, tín hiệu proton của nhóm methyl tại δ_{H} 1.85 (3H, s, H-28) cùng với tín hiệu của hai carbon tại δ_{C} 171.2 (C-29) và 21.3 (C-30) đặc trưng cho sự có mặt của nhóm acetyl. Tín hiệu của 28 carbon còn lại đặc trưng cho hợp chất physagulin khung withanolide.

Số liệu phổ NMR của **PA6** khá giống với hợp chất physagulin J phân lập từ loài *P. angulata* ngoại trừ các vị trí ở vòng A và B do sự thiếu vắng nhóm hydro tại C-5 và sự xuất hiện của liên kết đôi tại vị trí 4 (5) ở **PA6**. Sự khác nhau này được xác định lại dựa vào các tương tác trên phổ HMBC từ H-2 (δ_{H} 5.99) đến C-4 (δ_{C} 118.5)/ C-10 (δ_{C} 55.6), H-3 (δ_{H} 7.10) đến C-5 (δ_{C} 160.4), H-6 (δ_{H} 4.58) đến C-4 (δ_{C} 118.5)/ C-8 (δ_{C} 38.2)/ C-10 (δ_{C} 55.6) và H-19 (δ_{H} 1.44) đến C-1 (δ_{C} 208.1)/ C-5 (δ_{C} 160.4)/ C-9 (δ_{C} 46.5)/ C-10 (δ_{C} 55.6). Bên cạnh đó, trên phổ NOESY không xuất hiện tương tác giữa H-6 (δ_{H} 4.58) với H-19 (δ_{H} 1.44) gợi ý các proton H-6 và H-19 không cùng phía. Do đó, cấu hình của nhóm hydroxy tại C-6 được xác định là β . Sự gắn ghép các giá trị phổ tại các vị trí còn lại cũng được xác định dựa vào các tương tác trên phổ COSY và HMBC. Từ các bằng chứng phổ trên, cấu trúc của hợp chất **PA6** được xác định là $(6\beta,14\beta,15\alpha,22R)$ -22,26-epoxy-6,14-dihydroxyergosta-2,24-

diene-1,26-dione,15-yl acetate. Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho phép khẳng định đây là hợp chất mới và đặt tên là physagulin P.



Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PA6**



Hình 3.8. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất **PA6**

3.2.1.3. Hợp chất mới **PA12**: physagulin Q

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PA12**

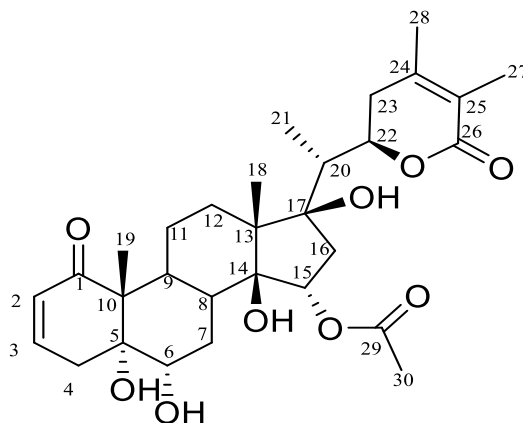
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)	C	$\delta_{Ca,b}$	$\delta_{Ha,c}$ (mult., J in Hz)
1	203.4	-	16	49.0	1.86* 2.70 (dd, 7.5, 16.0)
2	128.2	6.01 (dd, 2.0, 10.0)	17	86.6	-
3	145.0	6.88 (ddd, 2.5, 5.0, 10.0)	18	15.4	1.13 (s)
4	32.1	2.78 (d, 5.0) 2.81 (t)	19	8.0	1.17 (s)
5	78.3	-	20	43.2	2.15 (dd, 3.0, 7.0)
6	66.8	4.31 (dd, 5.0, 12.0)	21	9.7	1.06 (d, 7.0)
7	34.3	1.77 (d, 13.0) 2.56*	22	78.6	4.78 (m)
8	40.5	1.97*	23	33.0	2.52 (d, 5.0)
9	40.1	2.36 (dd, 4.0, 7.5)	24	153.3	-
10	57.7	-	25	122.0	-
11	22.7	-	26	169.3	-

12	31.4	1.38 (dd, 3.5, 12.5) 1.50 (dd, 3.0, 13.0)	27	12.4	1.85 (s)
13	51.1	-	28	20.5	1.97 (s)
14	87.2	-	29	170.9	-
15	81.5	5.05 (dd, 3.5, 13.5)	30	21.5	2.06 (s)

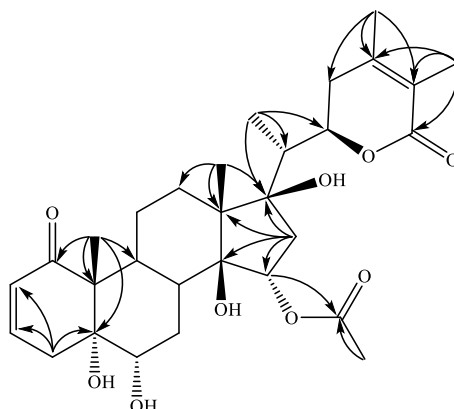
(^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * tín hiệu bị chòng lấp, # δ_C của hợp chất physagulin K đo trong CDCl₃)

Hợp chất **PA12** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của **PA12** được xác định là C₃₀H₄₂O₉ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử [M+Na]⁺ tại m/z = 569.2718 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₀H₄₂O₉Na]⁺ = 569.2721). Trên phổ ¹H-NMR của **PA12** xuất hiện tín hiệu của hai olefinic proton tại δ_H 6.01 (1H, dd, *J* = 2.0, 10.0 Hz) và 6.88 (1H, ddd, *J* = 2.5, 5.0, 10.0 Hz); sáu nhóm methyl tại δ_H 1.13 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.06 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.85 (3H, s), 1.97 (3H, s) và 2.06 (3H, s); và ba oxymethin proton tại δ_H 4.31 (dd, 5.0, 12.0), 5.05 (1H, dd, *J* = 3.5, 13.5 Hz) và 4.78 (1H, m). Các tín hiệu trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **PA12** xác định sự có mặt của 30 carbon gồm chín carbon không liên kết với hydro, chín nhóm methine, sáu nhóm methylene, và sáu nhóm methyl. Tín hiệu singlet của 3 proton tại δ_H 2.06 (H-30) cùng với hai tín hiệu carbon tại 170.9 (C-29) và 21.5 (C-30) gợi ý sự có mặt của nhóm acetyl. Các tín hiệu của 28 carbon còn lại đặc trưng cho hợp chất physagulin khung withanolid. Cấu trúc hóa học của **PA12** được xác định dựa vào các tương tác trên HMBC (hình 18). Ngoài ra, kết quả so sánh giá trị phổ NMR của **PA12** với hợp chất physagulin K phân lập từ loài *P. angulata* cho thấy giá trị phổ ở các vị trí đều phù hợp. Tuy nhiên, các tín hiệu tương tác trên phổ NOESY giữa H-18 (δ_H 1.13)/ H-19 (δ_H 1.17) và H-6 (δ_H 4.31) cùng với tín hiệu tương tác giữa H-6 (δ_H 4.31) với H-15 (δ_H 5.05) gợi ý các proton H-6, H-15, H-18 và H-19 cùng định hướng β . Do đó, định hướng của các nhóm hydroxy tại C-6 và acetyl tại C-15 được xác định là α . Từ các phân tích trên, cấu trúc hóa học của **PA12** được xác định là 5 α ,6 α ,14 β ,15 α ,17 β ,22*R*)-22,26-epoxy-5,6,14,17-tetrahydroxy-1,26-dioxoergosta-

2,24-dien-15-yl acetate. Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho phép khẳng định đây là hợp chất mới và đặt tên là physagulin Q.



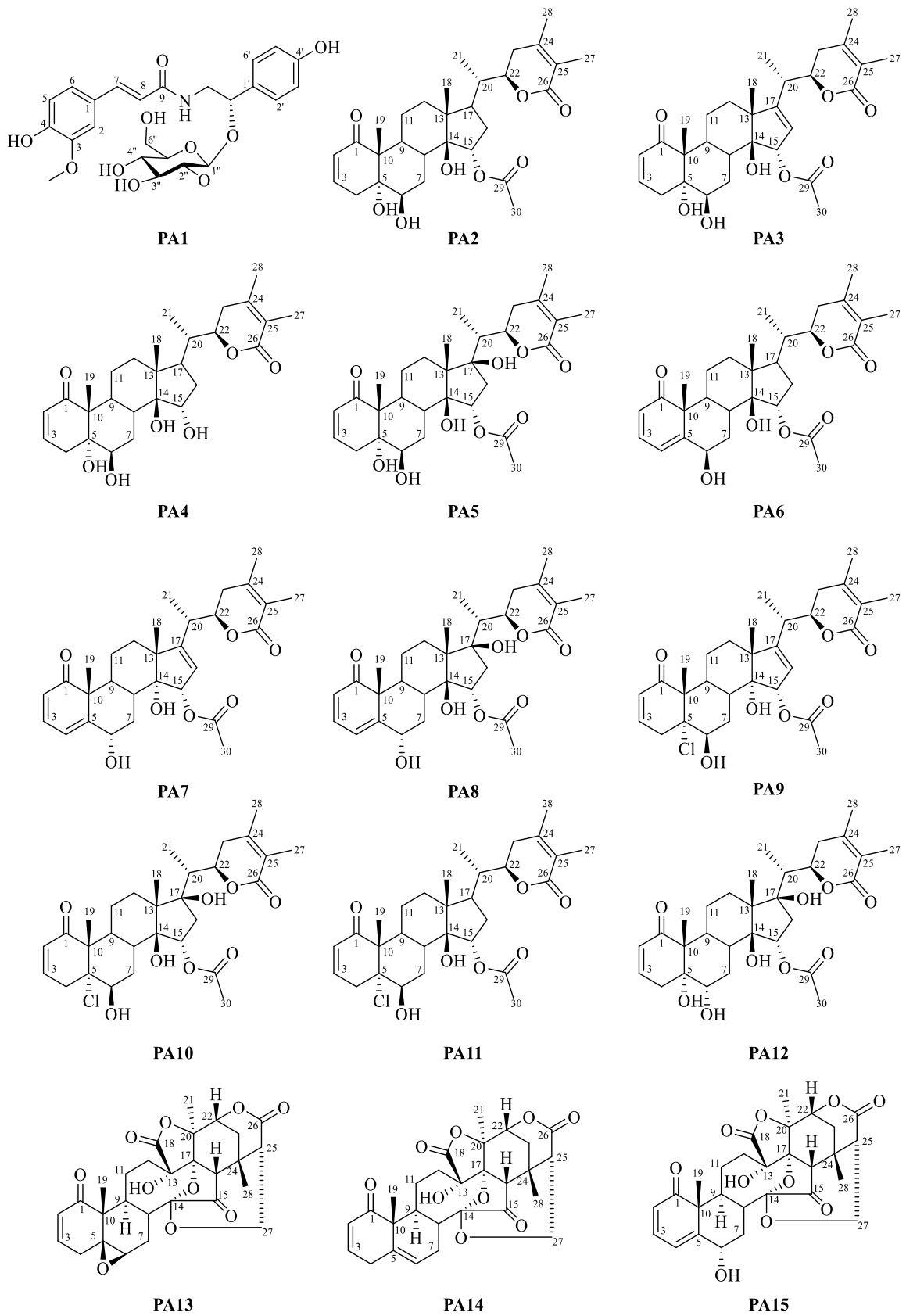
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PA12**



Hình 3.10. Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PA12**

3.2.1.4. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất còn lại

Bằng phương pháp xác định cấu trúc tương tự như đã thực hiện ở trên, kết hợp với các số liệu phổ khối, phổ NMR và so sánh với các tài liệu đã công bố, các hợp chất còn lại được xác định là physagulin J (**PA2**) [122], withaminimin (**PA3**) [123], physagulin N (**PA4**) [124], physagulin L (**PA7**) [125], physagulin M (**PA8**) [125], physagulin B (**PA9**) [124], physagulide Q (**PA10**) [126], (20*S*,22*R*)-15 α -acetoxy-5 α -chloro-6 β ,14 β -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide (**PA11**) [84], physalin F (**PA13**) [127], physalin B (**PA14**) [128], physalin G (**PA15**) [128]. Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được xác định như Hình 3.11.



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

Các dữ liệu phổ của các hợp chất physagulin J (**PA2**), withaminimin (**PA3**), physagulin N (**PA4**), physagulin L (**PA7**), physagulin M (**PA8**), 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-dienolide (**PA11**), physalin F (**PA13**), physalin B (**PA14**), physalin G (**PA15**) phân lập từ loài *P. angulata*:

Hợp chất **PA2: physagulin J**

Hợp chất PA2 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA2 được xác định là C₃₀H₄₂O₈

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): 5.80 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.66 (1H, m, H-3), 2.03 (1H, m, H-4)/ 3.26 (1H, dt, $J = 2.5, 20.0$ Hz, H-4), 3.61 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 1.85 (1H, m, H-7), 1.97 (1H, m, H-8), 2.53 (1H, m, H-9), 1.23 (1H, m, H-11)/ 2.05 (1H, m, H-11), 1.77 (1H, m, H-12)/ 2.02 (1H, m, H-12), 5.04 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-15,) 1.65 (1H, dd, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H-16)/ 1.99 (1H, m, H-16), 1.78 (1H, m, H-17), 1.18 (1H, s, H-18), 1.26 (1H, s, H-19), 2.10 (1H, m, H-20), 1.08 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 4.45 (1H, dt, $J = 3.5, 13.5$ Hz, H-22), 2.11 (1H, m, H-23)/ 2.58 (1H, m, H-23), 1.87 (1H, s, H-27), 2.00 (1H, s, H-28), 2.07 (1H, s, H-30).

¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD, ppm): 207.7 (C-1), 129.0 (C-2), 144.0 (C-3), 36.7 (C-4), 77.5 (C-5), 75.5 (C-6), 29.2 (C-7), 38.2 (C-8), 37.6 (C-9), 53.2 (C-10), 25.0 (C-11), 44.6 (C-12), 47.6 (C-13), 85.8 (C-14), 81.0 (C-15), 35.3 (C-16), 53.8 (C-17), 18.3 (C-18), 15.4 (C-19), 39.0 (C-20), 15.3 (C-21), 80.3 (C-22), 31.3 (C-23), 152.8 (C-24), 122.2 (C-25), 169.4 (C-26), 12.4 (C-27), 20.4 (C-28), 172.2 (C-29), 21.6 (C-30).

Hợp chất **PA3: withaminimin**

Hợp chất PA3 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA3 được xác định là C₃₀H₄₀O₈

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): 5.81 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.68 (1H, m, H-3), 2.05 (1H, m, H-4)/ 3.28 (1H, dt, $J = 2.5, 19.5$ Hz, H-4), 3.63 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-6), 1.95 (1H, m, H-7)/ 2.01 (1H, m, H-7), 2.07 (1H, m, H-8), 2.75 (1H, m, H-9), 1.25 (1H, m, H-11)/ 2.18 (1H, m, H-11), 1.69 (1H, m, H-12)/ 1.83 (1H, m, H-12), 5.4 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-15), 5.65 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-16),

1.14 (1H, s, H-18) , 1.29 (1H, s, H-19), 2.58 (1H, m, H-20), 1.22 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 4.42 (1H, m, H-22), 2.32 (1H, dd, $J = 3.0, 17.5$ Hz, H-23)/ 2.55 (1H, m, H-23), 1.87 (1H, s, H-27), 2.00 (1H, s, H-28), 2.04 (1H, s, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 207.7 (C-1), 129.0 (C-2), 144.1 (C-3), 36.8 (C-4), 77.6 (C-5), 75.5 (C-6), 28.2 (C-7), 37.4 (C-8), 37.1 (C-9), 53.1 (C-10), 24.6 (C-11), 39.8 (C-12), 53.7 (C-13), 83.0 (C-14), 84.2 (C-15), 122.3 (C-16), 163.0 (C-17), 17.1 (C-18), 15.4 (C-19), 36.4 (C-20), 18.1 (C-21), 80.6 (C-22), 33.5 (C-23), 152.9 (C-24), 122.0 (C-25), 169.2 (C-26), 12.4 (C-27), 20.3 (C-28), 172.2 (C-29), 21.4 (C-30).

Hợp chất PA4: physagulin N

Hợp chất PA4 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA4 được xác định là $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_9$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.81 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.68 (1H, m, H-3), 2.10 (1H, m, H-4)/ 3.26 (1H, dt, $J = 2.5, 20.0$ Hz, H-4), 3.65 (1H, m, H-6), 1.96 (1H, m, H-7)/ 2.13 (1H, m, H-7), 1.98 (1H, m, H-8), 1.59 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-9)/1.85 (1H, m, H-9), 1.25 (1H, m, H-11)/ 2.01 (1H, m, H-11), 1.71 (1H, m, H-12)/ 2.11 (1H, m, H-12), 3.98 (1H, d, $J = 3.5\text{Hz}$, H-15), 2.47 (1H, m, H-16), 1.83 (1H, m, H-17), 1.13 (1H, s, H-18), 1.30 (1H, s, H-19), 2.08 (1H, m, H-20), 1.07 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 4.44 (1H, dt, $J = 3.5, 13.5$ Hz, H-22), 2.24 (1H, m, H-23)/ 2.57 (1H, brt, $J = 16.0$ Hz, H-23), 1.88 (1H, s , H-27), 2.02 (1H, s, H-28).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 207.2 (C-1), 129.1 (C-2), 143.9 (C-3), 36.5 (C-4), 78.4 (C-5), 75.5 (C-6), 29.32 (C-7), 38.0 (C-8), 37.6 (C-9), 53.4 (C-10), 25.0 (C-11), 44.7 (C-12), 46.6 (C-13), 86.20 (C-14), 78.5 (C-15), 37.8 (C-16), 53.5 (C-17), 18.2 (C-18), 15.8 (C-19), 38.84 (C-20), 15.11 (C-21), 80.6 (C-22), 30.8 (C-23), 152.9 (C-24), 122.2 (C-25), 169.5 (C-26), 12.4 (C-27), 20.5 (C-28).

Hợp chất PA5: physagulin K

Công thức phân tử của PA5 được xác định là $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_9$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.80 (1H, dt-like, $J = 3.0, 10.5$ Hz, H-2), 6.65 (1H, m, H-3), 2.05 (1H, m, H-4)/ 3.26 (1H, dt, $J = 3.0, 20.0$ Hz, H-4), 3.61

(1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-6), 1.82 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-7)/ 1.91 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-7), 2.12 (1H, dd, $J = 3.5, 12.5$ Hz, H-8), 2.92 (1H, m, H-9), 1.38 (1H, dd, $J = 3.0, 13.0$ Hz, H-11)/ 2.29 (1H, m, H-11), 1.63 (1H, dt, $J = 3.0, 13.0$ Hz, H-12)/ 1.73 (1H, m, H-12), 5.20 (1H, dd, $J = 4.0, 9.0$ Hz, H-15), 1.91 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-16)/2.64 (1H, dd, $J = 8.5, 15.5$ Hz, H-16), 1.20 (1H, s, H-18), 1.29 (1H, s, H-19), 2.25 (1H, m, H-20), 1.10 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 4.82 (1H, m, H-22), 2.55 (1H, m, H-23), 1.86 (1H, s, H-27), 1.98 (1H, s, H-28), 2.06 (1H, s, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 207.6 (C-1), 129.2 (C-2), 143.7 (C-3), 36.9 (C-4), 77.7 (C-5), 75.6 (C-6), 27.7 (C-7), 36.4 (C-8), 36.1 (C-9), 53.4 (C-10), 23.4 (C-11), 32.2 (C-12), 52.1 (C-13), 87.2 (C-14), 80.5 (C-15), 48.5 (C-16), 86.1 (C-17), 15.8 (C-18), 15.2 (C-19), 43.2 (C-20), 9.6 (C-21), 78.8 (C-22), 33.2 (C-23), 153.1 (C-24), 122.1 (C-25), 169.2 (C-26), 12.3 (C-27), 172.1 (C-28), 20.4 (C-29), 21.4 (C-30)

Hợp chất PA7: physagulin L

Hợp chất PA7 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA7 được xác định là $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{10}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.01 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 7.12 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 6.27 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4), 4.61 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 1.46 (1H, m, H-7)/ 2.46 (1H, dt, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H-7), 2.41 (1H, brd, $J = 3.0$ Hz, H-8), 1.94 (1H, m, H-9), 1.44 (1H, m, H-11)/ 2.00 (1H, m, H-11), 1.43 (1H, m, H-12)/1.89 (1H, m, H-12), 5.24 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-15), 5.66 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-16), 1.18 (1H, s, H-18), 1.47 (1H, s, H-19), 2.58 (1H, m, H-20), 1.19 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 4.41 (1H, m, H-22), 2.29 (1H, dd, $J = 3.5, 18.5$ Hz, H-23)/ 2.54 (1H, m, H-23), 1.86 (1H, s, H-27), 1.99 (1H, s, H-28), 1.85 (1H, s, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 208.0 (C-1), 126.5 (C-2), 142.7 (C-3), 118.4 (C-4), 160.6 (C-5), 74.5 (C-6), 36.3 (C-7), 37.7 (C-8), 46.0 (C-9), 55.5 (C-10), 21.8 (C-11), 39.4 (C-12), 53.5 (C-13), 83.0 (C-14), 84.6 (C-15), 122.4 (C-16), 162.9 (C-17), 16.7 (C-18), 18.3 (C-19), 36.4 (C-20), 18.0 (C-21), 80.6 (C-22), 33.5 (C-23), 152.9 (C-24), 122.0 (C-25), 169.1 (C-26), 12.4 (C-27), 20.3 (C-28), 171.3 (C-29), 21.1 (C-30)

Hợp chất PA8: physagulin M

Hợp chất PA8 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA8 được xác định là $C_{30}H_{40}O_9$

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.01(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 7.12 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 6.27 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4), 4.61 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 1.36 (1H, m, H-7)/ 2.36 (1H, m, H-7), 2.42 (1H, m, H-8), 2.09 (1H, m, H-9), 1.54 (1H, m, H-11)/ 1.90 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, m, H-12)/ 2.63 (1H, m, H-12), 5.05 (1H, dd, $J = 3.5, 8.5$ Hz, H-15), 1.52 (1H, m, H-16)/ 1.68 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-16), 1.24 (1H, s, H-18), 1.46 (1H, s, H-19), 2.19 (1H, m, H-20), 1.07 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 4.82 (1H, m, H-22), 2.55(1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-23), 1.88 (1H, s, H-27), 1.99 (1H, s, H-28), 1.87 (1H, s, H-30).

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 208.0 (C-1), 126.5 (C-2), 142.7 (C-3), 118.4 (C-4), 160.6 (C-5), 74.5 (C-6), 36.3 (C-7), 37.7 (C-8), 46.0 (C-9), 55.5 (C-10), 21.8 (C-11), 39.4 (C-12), 53.5 (C-13), 83.0 (C-14), 84.6 (C-15), 122.4 (C-16), 162.9 (C-17), 16.7 (C-18), 18.3 (C-19), 36.4 (C-20), 18.0 (C-21), 80.6 (C-22), 33.5 (C-23), 152.9 (C-24), 122.0 (C-25), 169.1 (C-26), 12.4 (C-27), 20.3 (C-28), 171.3 (C-29), 21.1 (C-30).

Hợp chất PA9: physagulin B

Hợp chất PA9 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử của PA9 được xác định là $C_{30}H_{39}ClO_7$

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.88 (1H, dd, $J = 2.5, 10.5$ Hz, H-2), 6.79 (1H, ddd, $J = 2.0, 5.0, 10.0$ Hz, H-3), 4.00 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 5.33 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-15), 5.71 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-16), 1.14 (1H, s, H-18), 1.41 (1H, s, H-19), 1.22 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-21), 4.42 (1H, m, H-22), 1.84 (1H, s, H-27), 1.99 (1H, s, H-28), 2.05 (1H, s, H-30).

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 203.8 (C-1), 129.0 (C-2), 144.3 (C-3), 38.6 (C-4), 82.6 (C-5), 75.2 (C-6), 28.4 (C-7), 37.2 (C-8), 38.2 (C-9), 54.3 (C-10), 24.3 (C-11), 39.5 (C-12), 53.7 (C-13), 82.9 (C-14), 84.5 (C-15), 122.5 (C-16), 162.9 (C-17), 17.0 (C-18), 16.4 (C-19), 36.4 (C-20), 18.1 (C-21), 80.7 (C-22), 33.5 (C-23), 152.9 (C-24), 122.0 (C-25), 172.0 (C-26), 12.4 (C-27), 20.3 (C-28), 171.0 (C-29), 21.6 (C-30).

Hợp chất PA10: physagulide Q

Hợp chất PA10 thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử của PA10 được xác định là $C_{30}H_{41}ClO_8$

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.88 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.78 (1H, ddd, $J = 2.0, 5.0, 10.0$ Hz, H-3), 2.50 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H_a -4), 3.58 (1H, dt, $J = 2.5, 20.0$ Hz, H_b -4), 3.98 (1H, brs, H-6), 1.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H_a -7), 2.10 (1H, dd, $J = 2.5, 13.5$ Hz, H_b -7), 2.16 (1H, brd, $J = 13.5$ Hz, H-8), 2.89 (1H, dt, $J = 3.0, 12.0$ Hz, H-9), 1.37 (1H, brd, $J = 13.0$ Hz, H_a -11), 2.35 (1H, dd, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H_b -11), 1.62 (1H, dt, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H_a -12), 1.71 (1H, dt, $J = 2.5, 13.0$ Hz, H_b -12), 5.14 (1H, dd, $J = 3.5, 8.5$ Hz, H-15), 1.92 (1H, dd, $J = 3.5, 15.5$ Hz, H_a -16), 2.69 (1H, dd, $J = 8.5, 16.0$ Hz, H_b -16), 1.19 (1H, s, H-18), 1.40 (1H, s, H-19), 2.23 (1H, dd, $J = 3.0, 7.0$ Hz, H-20), 1.09 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 4.82 (1H, m, H-22), 2.55 (1H, brd, $J = 5.5$ Hz, H-23), 1.90 (1H, s, H-27), 1.98 (1H, s, H-28), 2.07 (1H, s, H-30).

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 203.6 (C-1), 129.0 (C-2), 144.1 (C-3), 38.5 (C-4), 83.0 (C-5), 75.2 (C-6), 27.9 (C-7), 36.1 (C-8), 37.2 (C-9), 54.4 (C-10), 23.1 (C-11), 31.8 (C-12), 51.8 (C-13), 87.5 (C-14), 80.6 (C-15), 48.9 (C-16), 86.9 (C-17), 16.3 (C-18), 15.9 (C-19), 43.2 (C-20), 9.8 (C-21), 78.7 (C-22), 33.0 (C-23), 153.3 (C-24), 122.0 (C-25), 169.3 (C-26), 12.4 (C-27), 20.5 (C-28), 171.7 (C-29), 21.7 (C-30).

Hợp chất PA11: (20S,22R)-15 α -acetoxy-5 α -chloro-6 β ,14 β -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide

Hợp chất PA11 thu được dưới dạng chất bột, màu trắng.

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.88 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.78 (1H, ddd, $J = 2.0, 5.0, 10.0$ Hz, H-3), 3.98 (1H, brs, H-6), 5.05 (1H, dd, $J = 4.5$ Hz, H-15), 1.18 (1H, s, H-18), 1.38 (1H, s, H-19), 1.08 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 4.15 (1H, dt, $J = 3.5, 13.0$ Hz, H-22), 1.86 (1H, s, H-27), 2.00 (1H, s, H-28), 2.07 (1H, s, H-30)

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 203.8 (C-1), 129.0 (C-2), 144.2 (C-3), 38.5 (C-4), 82.9 (C-5), 75.2 (C-6), 29.4 (C-7), 38.0 (C-8), 39.0 (C-9), 54.2 (C-10),

24.8 (C-11), 44.3 (C-12), 47.6(C-13), 85.4 (C-14), 81.0 (C-15), 35.4 (C-16), 53.7 (C-17), 18.2 (C-18), 15.3 (C-19), 38.6 (C-20), 16.4 (C-21), 80.3 (C-22), 31.3 (C-23), 152.8 (C-24), 122.2 (C-25), 169.3 (C-26), 12.4 (C-27), 20.4 (C-28), 171.8 (C-29), 21.7 (C-30).

Hợp chất PA13: physalin F

Hợp chất PA13 thu được dưới dạng tinh thể không màu. Công thức phân tử của PA13 được xác định là $C_{30}H_{30}O_{10}$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): 6.01 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.68 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.0, 10.0$ Hz, H-3), 2.24* (1H, H_a -4), 3.00 (1H, dt, $J = 3.0, 15.5$ Hz, H_b -4), 3.26 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-6), 1.85 (1H, dd, $J = 11.5, 15.5$ Hz, H_a -7), 2.57 (1H, dt, $J = 3.5, 15.5$ Hz, H_b -7), 2.26* (1H, H-8), 2.63 (1H, dd, $J = 9.5, 11.5$ Hz, H-9), 1.17 (1H, dd, $J = 10.0, 15.0$ Hz, H_a -11), 2.26 *(1H, H_b -11), 1.52 (1H, dd, $J = 12.0, 17.0$ Hz, H_a -12), 2.34 (1H, dd, $J = 5.5, 17.0$ Hz, H_b -12), 2.19* (1H, H-16), 1.30 (1H, s, H-19), 1.95 (1H, s, H-21), 4.53 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-22), 2.01 (1H, brs, H_a -23), 2.05 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H_b -23), 2.43 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-25), 3.75 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H_a -27), 4.50 (1H, dd, $J = 4.5, 13.5$ Hz, H_b -27), 1.26 (1H, s, H-28)

^{13}C -NMR (125MHz, $CDCl_3$, ppm): 205.9 (C-1), 127.8 (C-2), 146.3 (C-3), 33.3 (C-4), 61.7 (C-5), 64.8 (C-6), 37.4 (C-7), 34.3 (C-8), 50.0 (C-9), 50.8 (C-10), 23.5 (C-11), 25.7 (C-12), 79.4 (C-13), 107.0 (C-14), 207.5 (C-15), 56.2 (C-16), 80.1 (C-17), 172.2 (C-18), 15.5 (C-19), 81.0 (C-20), 21.5 (C-21), 77.0 (C-22), 33.0 (C-23), 31.1 (C-24), 50.8 (C-25), 166.7 (C-26), 60.7 (C-27), 26.5 (C-28).

Hợp chất PA14: physalin B

Hợp chất PA14 thu được dưới dạng tinh thể không màu. Công thức phân tử của PA14 được xác định là $C_{28}H_{30}O_9$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): 5.91 (1H, dd, $J = 2.0, 10.0$ Hz, H-2), 6.78 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.0, 10.0$ Hz, H-3), 2.86 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H_a -4), 3.27* (1H, H_b -4), 5.58 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6), 2.19* (1H, H_a -7), 2.37 (1H, m, H_b -7), 2.20* (1H, H-8), 2.92 (1H, m, H-9), 1.22* (1H, H_a -11), 2.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H_b -11), 1.60*(1H, H_a -12), 2.40 (1H, m, H_b -12), 2.22 (1H, brs, H-16), 1.22(1H, s, H-19), 1.97 (1H, s, H-21), 4.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-22), 2.04 (1H, m, H-23), 2.45 (1H, d,

$J = 4.0$ Hz, H-25), 3.79 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H_a-27), 4.51 (1H, dd, $J = 4.5, 13.5$ Hz, H_b-27), 1.27 (1H, s, H-28).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃, ppm): 205.7 (C-1), 127.4 (C-2), 146.2 (C-3), 32.7 (C-4), 134.0 (C-5), 124.5 (C-6), 24.2 (C-7), 40.0 (C-8), 33.2 (C-9), 52.7 (C-10), 24.8 (C-11), 25.8 (C-12), 79.67 (C-13), 107.5 (C-14), 208.1 (C-15), 56.4 (C-16), 80.3 (C-17), 172.3 (C-18), 17.9 (C-19), 81.0 (C-20), 21.5 (C-21), 76.9 (C-22), 33.1 (C-23), 31.1 (C-24), 51.0 (C-25), 166.7 (C-26), 60.7 (C-27), 26.5 (C-28).

Hợp chất PA15: physalin G

Hợp chất PA15 thu được dưới dạng tinh thể không màu. Công thức phân tử của PA15 được xác định là C₂₈H₃₀O₁₀

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): 5.92 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, H-2), 6.88 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 6.08 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-4), 4.53* (1H, H-6), 2.38* (1H, H_a-7), 1.53* (1H, H_b-7), 2.69 (1H, $J = 8.5$ Hz, H-8), 2.96 (1H, m, $J = 8.5, 10.5$ Hz, H-9), 2.36* (1H, H_a-11), 1.26* (1H, H_b-11), 2.49* (1H, H_a-12), 1.56* (1H, m, H_b-12), 2.29 (1H, brs, H-16), 1.59 (1H, s, H-19), 1.94 (1H, s, H-21), 4.53* (1H, H-22), 2.06 (1H, brs, H-23), 2.45 (1H, brd, $J = 3.0$ Hz, H-25), 3.79 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H_a-27), 4.51 (1H, dd, $J = 4.5$ Hz, H_b-27), 1.27 (1H, s, H-28)

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃, ppm): 210.7 (C-1), 125.5 (C-2), 139.9 (C-3), 119.4 (C-4), 156.4 (C-5), 71.4 (C-6), 25.7 (C-7), 38.6 (C-8), 36.0 (C-9), 54.1 (C-10), 24.3 (C-11), 31.4 (C-12), 79.7 (C-13), 107.1 (C-14), 208.2 (C-15), 55.6 (C-16), 80.6 (C-17), 172.3 (C-18), 21.0 (C-19), 81.1 (C-20), 21.6 (C-21), 77.1 (C-22), 32.9 (C-23), 31.0 (C-24), 50.9 (C-25), 167.0 (C-26), 60.8 (C-27), 26.5 (C-28).

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

Từ cao chiết PMD, PME phân lập được từ loài *P. minima* thu tại tỉnh Thừa Thiên Huế, đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 06 hợp chất 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: withanolide E (**PM1**), withaperuvin C (**PM2**), 4β-hydroxywithanolide E (**PM3**), 28-hydroxywithaperuvin C (**PM4**), physaperuvin G (**PM5**). Cấu trúc của các hợp chất này được xác định như sau:

3.2.2.1. Hợp chất **PM1**: withanolide E

Dữ liệu phổ của hợp chất PM1

Hợp chất **PM1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử được xác định là $C_{28}H_{38}O_7$

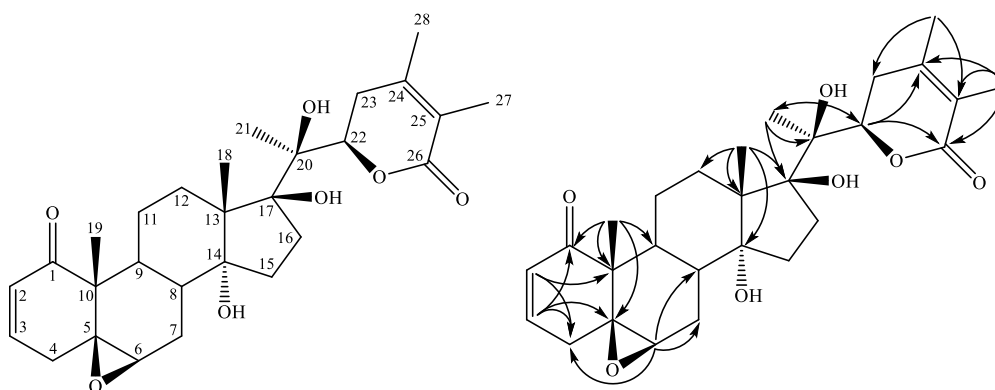
1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.01 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.98 (1H, ddd, $J = 2.5, 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 1.94 (1H, m, H-4)/ 2.97 (1H, dt, $J = 2.5, 18.5$ Hz, H-4), 3.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 1.84 (1H, m, H-7)/1.94 (1H, m, H-7), 1.95 (1H, m, H-8), 1.83 (1H, m, H-9), 1.65 (1H, m, H-11)/ 2.00 (1H, m, H-11), 1.55 (1H, m, H-12)/ 1.70 (1H, m, H-12), 1.30 (1H, m, H-15)/ 2.28 (1H, m, H-15), 1.58 (1H, dd, $J = 8.5, 14.0$ Hz, H-16)/ 2.58 (1H, m, H-16), 1.11 (1H, s, H-18), 1.25 (1H, s, H-19), 1.39 (1H, s, H-21), 4.86 (1H, $J = 3.5$ Hz, H-22), 2.53 (1H, m, H-23)/ 2.66 (1H, dd, $J = 3.5, 18.5$ Hz, H-23), 1.87 (1H, s, H-27), 1.98 (1H, s, H-28)

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 205.4 (C-1), 129.9 (C-2), 146.7 (C-3), 33.7 (C-4), 63.3 (C-5), 65.1 (C-6), 27.5 (C-7), 35.2 (C-8), 38.4 (C-9), 49.8 (C-10), 24.3 (C-11), 33.3 (C-12), 55.6 (C-13), 84.4 (C-14), 31.5 (C-15), 37.4 (C-16), 88.7 (C-17), 21.0 (C-18), 15.1 (C-19), 79.8 (C-20), 19.4 (C-21), 82.9 (C-22), 35.7 (C-23), 153.4 (C-24), 122.0 (C-25), 169.1 (C-26), 12.3 (C-27), 20.5 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất PM1

Hợp chất **PM1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ 1H -NMR của hợp chất **PM1** quan sát thấy tín hiệu của 5 nhóm methyl tại δ_H 1.11 (3H, s), 1.25 (3H, s), 1.39 (3H, s), 1.87 (3H, s) và 1.98 (3H, s); 2 olefinic proton tại δ_H 6.01 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz) và 6.98 (1H, ddd, $J = 2.5, 6.0, 10.0$ Hz); 2 oxymethine proton tại δ_H 3.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 4.86 (1H, d, $J = 3.5$ Hz). Phân tích tín hiệu phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **PM1** xác định sự có mặt của 28 carbon gồm 10 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 49.8, 55.6, 63.3, 79.8, 84.0, 88.7, 122.0, 153.4, 169.1 và 205.4; 6 nhóm methine tại δ_C 35.2, 38.4, 65.1, 82.9, 129.9 và 146.7; 7 nhóm methylene tại δ_C 24.3, 27.5, 31.5, 33.3, 33.7, 35.7 và 37.4; 5 nhóm methyl tại δ_C 12.3, 15.1, 19.4, 20.5 và 21.0. Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của **PM1** khá giống với hợp chất withanolide E [36]. Các tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 6.01) với C-4

(δ_C 33.7)/ C-10 (δ_C 49.8), H-3 (δ_H 6.98) với C-1 (δ_C 205.4)/ C-4 (δ_C 33.7)/ C-5 (δ_C 63.3) và H-19 (δ_H 1.25) với C-1 (δ_C 205.4)/ C-5 (δ_C 63.3)/ C-9 (δ_C 38.4)/ C-10 (δ_C 49.8) xác định sự có mặt của phần 2,3-en-1-one tại vòng A. Tín hiệu của proton H-6 tại δ_H 3.24 (d, $J = 2.0$ Hz) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-5 (δ_C 63.3), C-6 (δ_C 65.1) cho thấy sự có mặt của nhóm $5\beta,6\beta$ -epoxy tại vòng B [129]. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H-18 (δ_H 1.11)/ H-21 (δ_H 1.39) với C-17 (δ_C 88.7) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-17 (δ_C 88.7) cho phép xác định sự có mặt của nhóm hydroxy tại vị trí này. Từ các phân tích phổ trên, kết hợp với so sánh số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của **PM1** với tài liệu tham khảo [124], hợp chất **PM1** được xác định là withanolide E. Theo tra cứu của chúng tôi, đây là lần đầu tiên hợp chất withanolide E được phân lập từ loài *P. minima*.



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM1**

3.2.2.2. Hợp chất **PM2**: withaperuvin C

Dữ liệu phổ của hợp chất **PM2**

Hợp chất **PM2** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử được xác định là $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.00 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 7.09 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 6.23 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4), 4.6 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-6), 1.64 (1H, m, H-7)/1.95 (1H, dt, $J = 3.0, 14.0$ Hz, H-7), 2.47 (1H, m, H-8), 1.80 (1H, m, H-9), 1.67 (1H, m, H-11)/ 1.72 (1H, dd, $J = 4.5, 12.5$, H-11), 1.37 (1H, m, H-12)/ 2.22 (1H, dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, H-12), 1.54 (1H, m, H-15)/ 1.82 (1H, m, H-15), 1.59 (1H, m, H-16)/ 2.57 (1H, m, H-16), 1.21 (1H, s, H-18), 1.49 (1H, s, H-

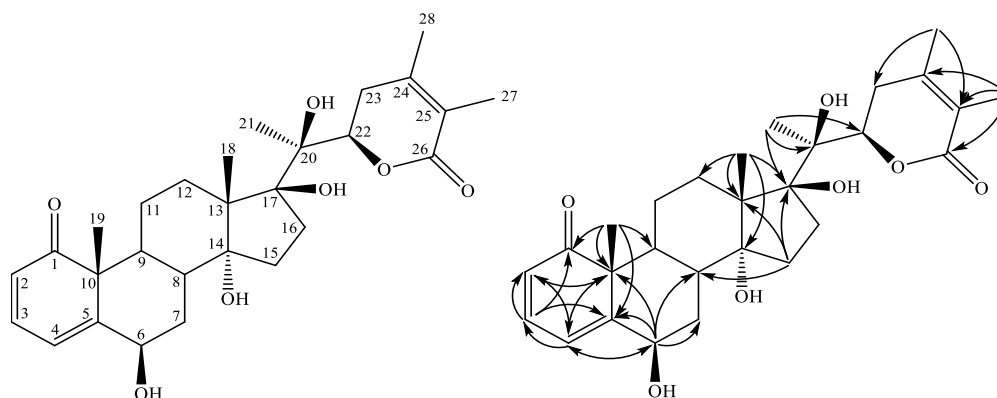
19), 1.39 (1H, s, H-21), 4.83 (1H, m, H-22), 1.54 (1H, m, H-23)/ 1.68 (1H, dd, $J = 2.5, 18.5$ Hz, H-23), 1.85 (1H, s, H-27), 1.99 (1H, s, H-28)

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 208.2 (C-1), 126.7 (C-2), 142.9 (C-3), 118.4 (C-4), 160.4 (C-5), 75.0 (C-6), 37.6 (C-7), 35.8 (C-8), 44.2 (C-9), 55.7 (C-10), 22.6 (C-11), 31.5 (C-12), 55.6 (C-13), 84.7 (C-14), 33.4 (C-15), 37.5 (C-16), 88.5 (C-17), 21.2 (C-18), 18.7 (C-19), 79.8 (C-20), 19.4 (C-21), 82.8 (C-22), 35.7 (C-23), 153.4 (C-24), 121.9 (C-25), 169.0 (C-26), 12.3 (C-27), 20.6 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất PM2

Hợp chất **PM2** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ ^1H -NMR của **PM2** quan sát thấy tín hiệu của 3 olefinic proton tại δ_{H} 6.00 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.23 (1H, d, $J = 6.0$ Hz) và 7.09 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz); 2 oxymethine proton tại δ_{H} 4.60 (t, 3.0) và 4.83 (m); 15 proton thuộc 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1.21 (3H, s), 1.39 (3H, s), 1.49 (3H, s), 1.85 (3H, s) và 1.99 (3H, s). Phân tích các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **PM2** xác định sự có mặt của 2 nhóm carbonyl, 8 carbon không liên kết với hydro, 7 nhóm methine, 6 nhóm methylen và 5 nhóm methyl. Số liệu phổ ^1H 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 có mặt của nhóm 2(3),4(5) dien ở vòng A được xác định dựa vào các tín hiệu tương tác trên phổ HMBC từ H-2 (δ_{H} 6.00) đến C-4 (δ_{C} 118.4)/ C-10 (δ_{C} 55.7), H-3 (δ_{H} 7.09) đến C-1 (δ_{C} 208.2)/ C-2 (δ_{C} 126.7)/ C-5 (δ_{C} 160.4) và H-4 (δ_{H} 6.23) đến C-2 (δ_{C} 126.7)/ C-3 (δ_{C} 142.9)/ C-6 (δ_{C} 75.0)/ C-10 (δ_{C} 55.7). Các tương tác HMBC từ H-6 (δ_{H} 4.60) đến C-4 (δ_{C} 118.4)/ C-5 (δ_{C} 160.4)/ C-7 (δ_{C} 37.6)/ C-8 (δ_{C} 35.8)/ C-10 (δ_{C} 55.7) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-6 (δ_{C} 75.0) xác định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-6. Ngoài ra, kết quả so sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của **PM2** và withaperuvin C cho thấy giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon ở tất cả các vị trí đều trùng khớp ngoại trừ các giá trị độ dịch chuyển hóa học tại C-2/C-4 và C-12/C-15/C-23 có sự hoán chuyển giữa tài liệu tham khảo và **PM2**. Sự sai khác này được xác định lại dựa vào các tương tác từ H-4 (δ_{H} 6.23) đến C-6 (δ_{C} 75.0), H-18

(δ_H 1.21) đến C-12 (δ_C 31.5), H-15 (δ_H 1.54) đến C-8 (δ_C 35.8)/ C-13 (δ_C 55.6)/ C-17 (δ_C 88.5) và H-28 (δ_H 1.99) đến C-23 (δ_C 35.7). Từ các phân tích trên hợp chất **PM2** được xác định là withaperuvin C. Hợp chất này được Sahai và cộng sự thông báo phân lập lần đầu tiên vào năm 1982 từ loài *P. peruviana* [130]. Tuy nhiên đây là lần đầu tiên hợp chất withaperuvin C được phân lập từ loài *P. minima*.



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM2**

3.2.2.3. Hợp chất **PM3**: 4 β -hydroxywithanolide E

Dữ liệu phổ của hợp chất **PM3**

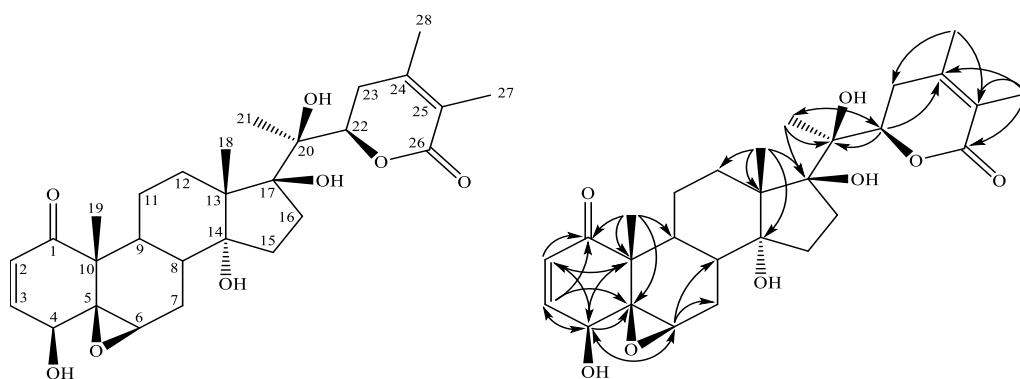
Hợp chất **PM3** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.20 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, H-2), 7.07 (1H, dd, $J = 6.5, 10.0$ Hz, H-3), 3.68 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-4), 3.24 (1H, brs, H-6), 1.90 (1H, t-like, $J = 12.0$ Hz, H-7)/ 2.01 (1H, m, H-7), 1.83 (1H, m, H-8), 1.52 (1H, m, H-9), 1.57 (1H, m, H-11), 1.55 (1H, m, H-12)/ 1.72 (1H, td, $J = 8.5, 12.0$ Hz, H-12), 1.28 (1H, m, H-15)/ 2.23 (1H, td, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-15), 1.58 (1H, m, H-16)/ 2.56 (1H, m, H-16), 1.09 (1H, s, H-18), 1.41 (1H, s, H-19), 1.39 (1H, s, H-21), 4.83 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-22), 2.54 (1H, m, H-23)/ 2.65 (1H, dd, $J = 3.0, 8.5$ Hz, H-23), 1.86 (1H, s, H-27), 1.98 (1H, s, H-28)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 204.2 (C-1), 133.4 (C-2), 145.0 (C-3), 71.1 (C-4), 64.8 (C-5), 62.0 (C-6), 27.2 (C-7), 35.3 (C-8), 38.4 (C-9), 49.9 (C-10), 22.2 (C-11), 33.2 (C-12), 55.5 (C-13), 83.8 (C-14), 31.0 (C-15), 37.4 (C-16), 88.6 (C-17), 20.7 (C-18), 16.6 (C-19), 79.8 (C-20), 19.4 (C-21), 82.8 (C-22), 35.6 (C-23), 153.4 (C-24), 121.9 (C-25), 169.1 (C-26), 12.31 (C-27), 20.5 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất **PM3**

Hợp chất **PM3** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PM3** quan các tín hiệu đặc trưng của hợp chất withanolide gồm 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1.09 (3H, s, H-18), 1.41 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, s, H-21), 1.86 (3H, s, H-27) và 1.98 (3H, s, H-28); 3 oxymethine proton tại δ_{H} 3.68 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-4), 3.24 (1H, br s, H-6) và 4.83 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-22); 2 olefinic proton tại δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 7.07 (1H, dd, $J = 6.5, 10.0$ Hz, H-3). Phân tích các tín hiệu trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **PM3** xác định sự có mặt của 5 nhóm methyl, 6 nhóm methylene, 7 nhóm methine và 10 carbon không liên kết với hydro bao gồm 2 nhóm carbonyl. Số liệu ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của **PM3** khá giống với **PM1** ngoại trừ sự dịch chuyển về vùng trường trung bình của tín hiệu C-4 (δ_{C} 71.1) của **PM3** so với tín hiệu C-4 (δ_{C} 33.7) của **PM1**. Điều này cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **PM3** giống với **PM1** ngoại trừ sự có mặt nhiều hơn 1 nhóm hydroxy tại C-4 ở **PM3**. Bên cạnh đó, tương tác HMBC từ H-2 (δ_{H} 6.20) đến C-1 (δ_{C} 204.2)/ C-4 (δ_{C} 71.1)/ C-10 (δ_{C} 49.9), H-3 (δ_{H} 7.07) đến C-1 (δ_{C} 204.2)/ C-4 (δ_{C} 71.1)/ C-5 (δ_{C} 64.8) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-4 (δ_{C} 71.1) góp phần khẳng định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-4 (hình 24). Ngoài ra, hằng số tương tác của proton H-4 ($J = 6.5$ Hz) cho phép xác định H-4 nằm ở vị trí α và nhóm hydroxy tại C-4 nằm ở vị trí β . Từ các phân tích trên hợp chất **PM3** được xác định là 4 β -hydroxywithanolide E, hợp chất này được Sakurai và cộng sự thông báo phân lập được lần đầu tiên vào năm 1976 từ loài *P.peruriana* [131]. Tuy nhiên đây là lần đầu tiên hợp chất 4 β -hydroxywithanolide E được phân lập từ loài *P. minima*.



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM3**

3.2.2.4. Hợp chất **PM4**: 28-hydroxywithaperuvin C

Dữ liệu phổ của hợp chất PM4

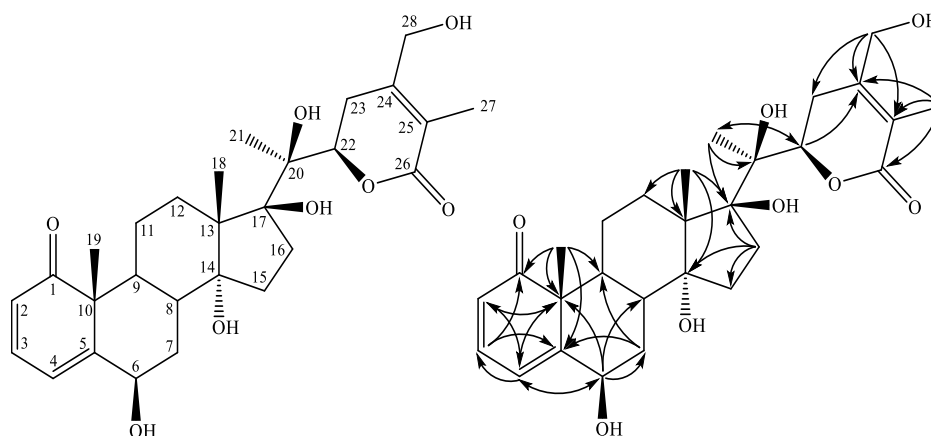
Hợp chất **PM4** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử được xác định là $C_{28}H_{38}O_8$

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): 6.00 (1H, dd, $J = 9.5$ Hz, H-2), 7.09 (1H, dd, $J = 6.0, 9.5$ Hz, H-3), 6.23 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-4), 4.6 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-6), 1.95 (1H, dt, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H_a -7), 2.59 (1H, m, H_b -7), 2.50 (1H, td, $J = 3.0, 16.5$ Hz, H-8), 1.81 (1H, m, H-9), 1.67 (1H, m, H_a -11), 1.72 (1H, m, H_b -11), 1.45 (1H, m, H_a -12), 2.20 (1H, m, H_b -12), 1.55 (1H, dd, $J = 3.5, 12.5$ Hz, H_a -15), 1.85 (1H, m, H_b -15), 1.63 (1H, m, H-16), 1.23 (1H, s, H-18), 1.49 (1H, s, H-19), 1.41 (1H, s, H-21), 4.83 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-22), 2.41 (1H, m, H_a -23), 3.09 (1H, dd, $J = 2.5, 18.0$ Hz, H_b -23), 1.87 (1H, s, H-27), 4.19 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H_a -28), 4.40 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H_b -28).

^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD , ppm): 208.2 (C-1), 126.7 (C-2), 142.9 (C-3), 118.4 (C-4), 160.5 (C-5), 75.0 (C-6), 37.6 (C-7), 35.8 (C-8), 44.3 (C-9), 55.7 (C-10), 22.6 (C-11), 31.4 (C-12), 55.8 (C-13), 84.8 (C-14), 33.4 (C-15), 37.5 (C-16), 88.6 (C-17), 21.1 (C-18), 18.7 (C-19), 79.9 (C-20), 19.5 (C-21), 83.9 (C-22), 30.5 (C-23), 154.9 (C-24), 122.3 (C-25), 169.1 (C-26), 11.8 (C-27), 61.6 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất PM4

Hợp chất **PM4** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Số liệu phổ NMR thu được của **PM4** khá giống với hợp chất **PM2** ngoại trừ các vị trí C-23, C-24 và C-26. Sự mất đi nhóm tín hiệu của 1 nhóm methyl (δ_H 1.99, δ_C 20.6) ở **PM4** và thay thế bằng các tín hiệu của 1 nhóm oxymethylene (δ_H 4.19/4.40, δ_C 61.6) ở **PM4** cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **PM4** tương tự **PM2** ngoại trừ vị trí C-28 được thay thế bằng nhóm oxymethylene. Dự đoán trên được xác thực dựa vào các tương tác trên phổ 2 chiều HMBC bởi sự xuất hiện của các tương tác từ H-28 (4.19, 4.40) đến C-23 (30.5)/ C-24 (154.9)/ C-25 (122.3). Từ những phân tích trên hợp chất **PM4** được xác định là 28-hydroxywithaperuvin C. Hợp chất này được phân lập lần đầu tiên từ loài *P.viscosa* L. (1985) [132]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất 28-hydroxywithaperuvin C được thông báo phân lập từ loài *P. minima*.



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM4**

3.2.2.5. Hợp chất **PM5**: *physaperuvin G*

Dữ liệu phổ của hợp chất PM5

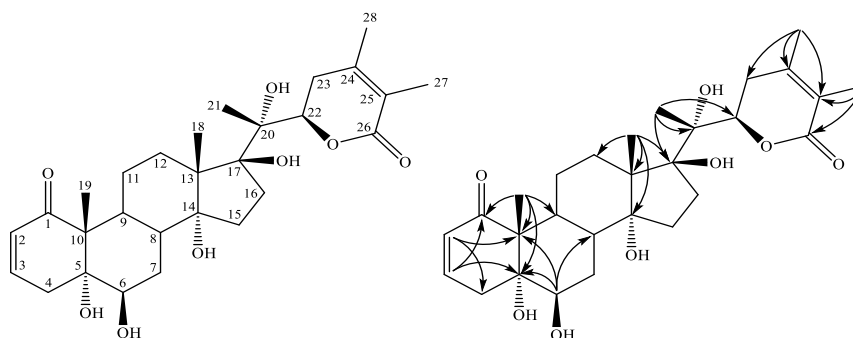
Hợp chất **PM5** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Công thức phân tử được xác định là:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.78 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz, H-2), 6.66 (1H, dd, $J = 2.0, 10.0$ Hz, H-3), 2.06 (1H, dd, $J = 5.0, 20.0$ Hz, H_a -4), 3.27 (1H, dt, $J = 2.5, 20.0$ Hz, H_b -4), 3.60 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 1.49 (1H, brd, $J = 10.0$ Hz, H_a -7), 2.12 (1H, dd, $J = 3.0, 13.5$ Hz, H_b -7), 3.55 (1H, m, H-8), 2.25 (1H, dt, $J = 4.5, 12.5$ Hz, H-9), 1.52 (1H, m, H_a -11), 2.31 (1H, m, H_b -11), 1.31 (1H, m, H_a -12), 2.40 (1H, dt, $J = 4.5, 12.0$ Hz, H_b -12), 1.58 (1H, m, H_a -15), 1.78 (1H, dt, $J = 8.5, 13.0$ Hz, H_b -15), 1.57 (1H, m, H_a -16), 2.60 (1H, m, H_b -16), 1.17 (1H, s, H-18), 1.34 (1H, s, H-19), 1.40 (1H, s, H-21), 4.90 (1H, dd, $J = 3.0, 13.0$ Hz, H-22), 2.53 (1H, m, H_a -23), 2.67 (1H, dd, $J = 3.0, 18.5$ Hz, H_b -23), 1.88 (1H, s, H-27), 1.98 (1H, s, H-28)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 207.5 (C-1), 129.1 (C-2), 143.8 (C-3), 36.7 (C-4), 78.2 (C-5), 75.6 (C-6), 29.9 (C-7), 35.0 (C-8), 35.2 (C-9), 53.4 (C-10), 23.8 (C-11), 32.3 (C-12), 56.0 (C-13), 85.0 (C-14), 33.3 (C-15), 37.4 (C-16), 89.0 (C-17), 21.6 (C-18), 16.1 (C-19), 79.8 (C-20), 19.6 (C-21), 83.2 (C-22), 35.8 (C-23), 153.3 (C-24), 122.0 (C-25), 169.1 (C-26), 12.3 (C-27), 20.5 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất PM5

Hợp chất **PM5** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PM5** xuất hiện tín hiệu của 2 olefinic proton tại δ_{H} 5.78 (1H, dd, $J = 2.5, 10.0$ Hz), 6.66 (1H, dq, $J = 2.0, 10.0$ Hz); 2 oxymethine proton tại δ_{H} 3.60 (1H, t, $J = 2.5$ Hz), 4.90 (1H, dd, $J = 3.0, 13.0$ Hz) và 15 proton thuộc 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1.17 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.40 (3H, s), 1.88 (3H, s), 1.98 (3H, s). Bên cạnh đó các tín hiệu trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **PM5** cho phép xác định sự có mặt của 28 carbon đặc trưng của hợp chất withanolide gồm 10 carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 53.4, 56.0, 78.2, 79.8, 85.0, 89.0, 122.0, 153.3, 169.1, 207.5; 6 nhóm methine tại δ_{C} 35.0, 35.2, 75.6, 83.2, 129.1, 143.8; 7 nhóm methylene tại δ_{C} 23.8, 29.9, 32.3, 33.3, 35.8, 36.7, 37.4; và 5 nhóm methyl tại δ_{C} 12.3, 16.1, 19.6, 20.5, 21.6. Tương tác trên phổ HMBC từ H-19 (δ_{H} 1.34) với C-1 (δ_{C} 207.5)/ C-5 (δ_{C} 78.2)/ C-9 (δ_{C} 35.2)/ C-10 (δ_{C} 53.4), H-2 (δ_{H} 5.78) đến C-4 (δ_{C} 36.7)/ C-10 (δ_{C} 53.4) và H-3 (δ_{H} 6.66) đến C-1 (δ_{C} 207.5)/ C-5 (δ_{C} 78.2) xác định sự có mặt của nhóm carbonyl tại C-1, nối đôi CH=CH tại C2/C-3 và nhóm hydroxy tại C-5. Vị trí của nhóm hydroxy tại C-6 được xác định dựa vào tương tác HMBC từ H-6 (δ_{H} 3.60) đến C-5 (δ_{C} 78.2)/ C-8 (δ_{C} 35.0)/ C-10 (δ_{C} 53.4). Ngoài ra, các tương tác HMBC từ H-18 (δ_{H} 1.17) đến C-12 (δ_{C} 32.3)/ C-13 (δ_{C} 56.0)/ C-14 (δ_{C} 85.0)/ C-17 (δ_{C} 89.0) và H-21 (δ_{H} 1.40) đến C-17 (δ_{C} 89.0)/ C-20 (δ_{C} 79.8)/ C-22 (δ_{C} 83.2) cho phép xác định sự có mặt của 3 nhóm hydro tại C-14, C-17 và C-20. Các phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR của **PM5** với tài liệu tham khảo [133], hợp chất **PM5** được xác định là physaperuvín G. Tra cứu trên các cơ sở dữ liệu trực tuyến SciFinder.cas.org cho phép khẳng định đây là lần đầu tiên hợp chất physaperuvín G được phân lập từ loài *P. minima*.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM5**

3.2.2.6. Hợp chất **PM6**: 4-deoxywithaperuvin

Dữ liệu phổ của hợp chất PM6

Hợp chất **PM6** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng.

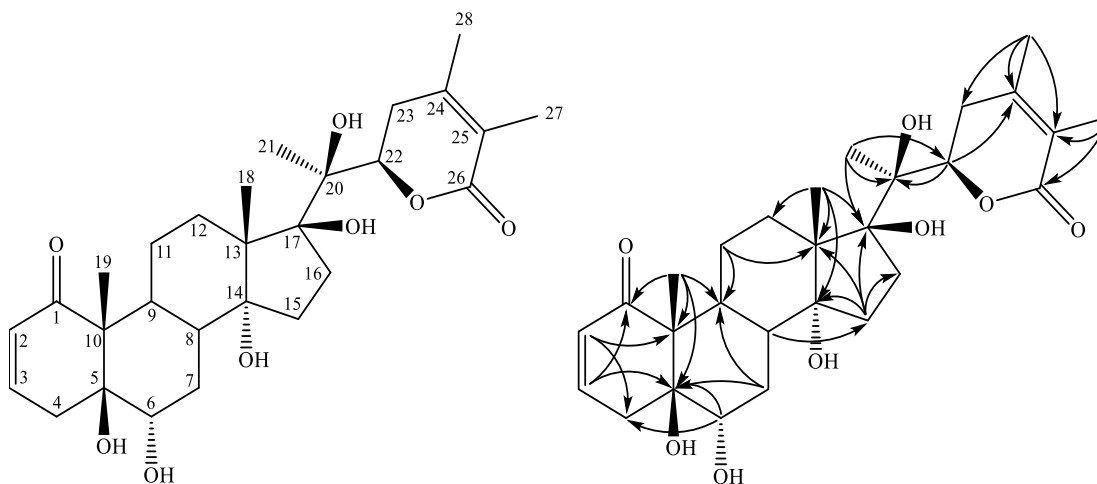
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , ppm): 5.94 (1H, dd, $J = 2.0, 10.0$ Hz, H-2), 6.88 (1H, m, H-3), 2.50 (1H, dd, $J = 5.5, 20.5$ Hz, H_a -4), 2.90 (1H, dt, $J = 2.5, 20.5$ Hz, H_b -4), 3.85 (1H, dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, H-6), 1.64 (1H, m, H_a -7), 1.83 (1H, m, H_b -7), 2.01 (1H, td, H-8), 2.25 (1H, td, $J = 4.5, 12.5$ Hz, H-9), 0.94 (1H, m, H_a -11), 1.49 (1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, H_b -11), 1.28 (1H, m, H_a -12), 2.21 (1H, td, $J = 5.0, 12.0$ Hz, H_b -12), 1.55 (1H, m, H_a -15), 1.78 (1H, dt, $J = 8.5, 13.0$ Hz, H_b -15), 1.58 (1H, m, H_a -16), 2.58 (1H, dt, $J = 3.0, 11.5$ Hz, H_b -16), 1.09 (1H, s, H-18), 1.17 (1H, s, H-19), 1.39 (1H, s, H-21), 4.79 (1H, dd, $J = 3.5, 13.0$ Hz, H-22), 2.54 (1H, m, H_a -23), 2.64 (1H, dd, $J = 3.0, 14.0$ Hz, H_b -23), 1.83 (1H, s, H-27), 1.96 (1H, s, H-28)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD , ppm): 205.3 (C-1), 127.9 (C-2), 147.0 (C-3), 31.5 (C-4), 79.6 (C-5), 73.3 (C-6), 32.9 (C-7), 38.8 (C-8), 39.1 (C-9), 56.2 (C-10), 24.1 (C-11), 31.4 (C-12), 55.9 (C-13), 84.1 (C-14), 33.1 (C-15), 37.5 (C-16), 88.6 (C-17), 21.2 (C-18), 9.3 (C-19), 79.8 (C-20), 19.4 (C-21), 82.8 (C-22), 35.7 (C-23), 153.4 (C-24), 121.9 (C-25), 169.0 (C-26), 12.3 (C-27), 20.5 (C-28).

Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất PM6

Hợp chất **PM6** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PM6** xuất hiện tín hiệu của 5 nhóm methyl singlet tại δ_{H} 1.09 (s), 1.17 (s), 1.39 (s), 1.83 (s), 1.96 (s); 2 oxymethine tại δ_{H} 3.85 (dd, 5.5, 12.0), 4.79 (dd, 3.5, 13.0) và 2 olefinic proton tại δ_{H} 5.94 (dd, 2.0, 10.0), 6.88 (m). Bên cạnh đó, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC xuất hiện tín hiệu của 5 nhóm methyl tại δ_{C} 9.3, 12.3, 19.4, 20.5, 21.2; 7 nhóm methylene tại δ_{C} 24.1, 31.4, 31.5, 32.9, 33.1, 35.7, 37.5; 6 nhóm methine tại δ_{C} 38.8, 39.1, 73.3, 82.8, 127.9, 147.0; và 10 carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 55.9, 56.2, 79.6, 79.8, 84.1, 88.6, 121.9, 153.4, 169.0, 205.3. Dựa vào các tương tác trên phổ HMBC xác định được cấu trúc của **PM6** là 5,6,14,17,20-pentahydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide. Số liệu phổ NMR của **PM6** khá giống với hợp chất **PM1** ngoại trừ các vị trí từ C-4 đến C-8 (bảng 22). Sự dịch chuyển

mạnh về vùng trường thấp hơn của 2 tín hiệu carbon tại C-5 (δ_C 79.6) và C-6 (δ_C 73.3) ở **PM6** so với các tín hiệu tương ứng C-5 (δ_C 63.3) và C-6 (δ_C 65.1) ở **PM1** gợi ý có sự mở vòng epoxy tại C-5/C-6. Tương tác trên phổ NOESY giữa H-19 (δ_H 1.09) và H-6 (δ_H 3.85) xác định được vị trí của nhóm hydroxy tại C-6 có cấu hình β . Tương tự, cấu hình của nhóm hydroxy tại C-20 được xác định là β dựa vào tương tác giữa H-21 (δ_H 1.39) và H-22 (δ_H 4.79). Từ các phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR với tài liệu đã công bố [134] [2], hợp chất **PM6** được xác định là 4-deoxywithaperuvin. Hợp chất 4-deoxywithaperuvin được Abou-Douh và cộng sự (2002) thông báo phân lập lần đầu tiên từ loài *Withania somnifera* [134]. Tuy nhiên đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Physalis*.



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **PM6**

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*

Hoạt tính ức chế sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất phân lập được từ loài *P. angulata* 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 15 hợp chất phân lập được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 3.4. 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 P. angulata

Stt	Tên hợp chất	Kí hiệu	IC ₅₀ (μM)
1	physalucoside A	PA1	2,69 ± 0,17
2	physagulin J	PA2	*
3	Withanimine	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.*

Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự sản sinh NO theo nồng độ của 15 hợp chất phân lập được cho thấy, 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 IC₅₀ từ 0,24 ± 0,09 đến 1,06 ± 0,68 μM so với chất đối chứng dương L-NMMA (IC₅₀ = 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 IC₅₀ lần lượt là 2,69 ± 0,17 μM; 69,60 ± 4,50 μM và 3,74 ± 0,29 μM. Hợp chất **PA7** và **PA8** không có tác dụng ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 với giá trị IC₅₀ > 100 μM. Mặt khác, các hợp chất

PA2, PA4, PA5, PA6 và **PA12** gây chết tế bào thử nghiệm. Kết quả này cho thấy các hợp chất **PA9, PA10, PA11, PA13, PA14** có hoạt tính ức chế mạnh sự sản sinh NO trong các tế bào RAW 264.7 dưới tác động cảm ứng của LPS.

Hợp chất **PA1** có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 với IC_{50} là $2,69 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Theo kết quả phân tích phổ cho thấy, hợp chất **PA1** là dẫn xuất của cinamic acid amide. Dẫn xuất của axit cinnamic có khả năng ức chế sản sinh NO trong các tế bào RAW264.7 gây ra bởi LPS theo con đường tín hiệu NF- κ B [135]. Mặt khác, Ribeiro và cộng sự đã đánh giá sự ức chế các enzym cyclooxygenase (COX-1 và COX-2) bằng các dẫn xuất axit cinnamic được tổng hợp. Kết quả cho thấy mối quan hệ cấu trúc - hoạt tính quan trọng hơn đối với sự ức chế COX-1 nhờ sự hiện diện của các vòng thơm được thay thế bằng một nhóm hydroxyl và một nhóm metoxyl hoặc hai nhóm hydroxyl, một nhóm amit [136].

Hợp chất **PA3**, thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO yếu hơn với giá trị IC_{50} là $69,60 \pm 4,50 \mu\text{M}$. Khi phân tích các phổ NMR cho thấy cấu trúc của hợp chất **PA3** thuộc khung withanolide steroid. Các hợp chất thuộc nhóm withanolide là những nhóm chất có hoạt tính gây độc tế bào, kháng u, kháng viêm v.v.[137]. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng cho thấy sự tương đồng với một số báo cáo khác. Theo nghiên cứu của Wu và cộng sự (2020), hợp chất **PA3** có khả năng ức chế sản xuất NO trong các tế bào RAW264.7 gây ra bởi LPS với $IC_{50} = 31,15 \pm 0,84 \mu\text{M}$ [111].

Hợp chất **PA9** thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO mạnh trong các chất phân lập từ loài *P. angulata* và có cấu trúc hóa học đặc trưng cho sự có mặt của nhóm acetyl. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sharipov và cộng sự (2021) cho rằng sự có mặt của gốc acetyl trong cấu trúc của hợp chất là nguyên nhân làm tăng hoạt tính sinh học kháng viêm [138].

PA10 thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} là $0,57 \pm 0,18 \mu\text{M}$. Ngoài ra, **PA10** có thể tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) trong các tế bào ung thư biểu mô gan (HCC) và các ROS này có tác dụng ức chế JAK2/Src-STAT3 của tế bào. Những kết quả này cho thấy **PA10** đã ức chế con đường truyền

tín hiệu STAT3 thông qua việc tạo ra ROS trong các tế bào ung thư biểu mô gan. STAT3 được phosphoryl hóa thành dạng nhị phân tử và sau đó chuyển vị vào nhân để kiểm soát quá trình phiên mã của các gen gây ung thư khác nhau như Bcl-2, VEGF v.v., điều chỉnh sự tăng sinh tế bào và quá trình tự chết apoptosis [126, 137]. Năm 2019, Theo nghiên cứu của Yang và cộng sự, hợp chất **PA10** được phân lập từ loài *P. angulata*, ức chế sự tăng sinh và gây ra quá trình tự chết apoptosis ở các tế bào HCC ở người. Cơ chế phân tử về hoạt động chống ung thư trong tế bào HCC của **PA10** có liên quan đến đường truyền tín hiệu ROS-JAK2/Src-STAT3. Con đường tín hiệu STAT3 điều chỉnh sự biểu hiện của các gen khác nhau để kiểm soát sự tiến triển của chu kỳ tế bào và quá trình chết theo chương trình của tế bào. **PA10** ức chế sự phosphoryl hóa STAT3 trên Tyr705 bằng cách ngăn chặn sự phosphoryl hóa các kinase protein liên quan như Janus kinase 2 (JAK2) và Src [139].

Hợp chất **PA11** ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} là $0,68 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Khi phân tích các phổ của hợp chất **PA11** cho thấy trong cấu trúc của hợp chất có sự xuất hiện của nhóm thế Cl ở vị trí C-4 làm tăng hoạt tính kháng viêm và sự ức chế COX và LOX [140].

Theo kết quả nghiên cứu cho thấy, các hợp chất **PA13**, **PA14** và **PA15** phân lập từ loài *P. angulata* đều là các hợp chất thuộc nhóm Physalin và có khả năng ức chế sự sản sinh NO. Năm 2003, nhóm hợp chất Physalin đã được chứng minh có hoạt tính kháng u và kháng viêm [99].

Hợp chất **PA13**, dịch chiết từ loài *Witheringia solanacea*, cũng được báo cáo là có hoạt tính chống viêm thông qua trung gian ức chế NF- κ B và quá trình apoptosis. Những kết quả này đã giúp khẳng định hoạt tính tiềm năng của hợp chất **PA13** và khả năng sử dụng nó trong điều trị viêm và ung thư. Các nghiên cứu bổ sung là cần thiết để điều tra các cơ chế phân tử liên quan đến tế bào ung thư [93].

Hợp chất **PA14** có thể ngăn chặn phản ứng viêm do LPS cảm ứng trong đại thực bào RAW264.7 bằng cách ức chế sản xuất các cytokine gây viêm thông qua con đường tín hiệu NF- κ B. TNF- α và IL-6 là các cytokine tiền viêm quan trọng trong các đại thực bào được kích hoạt bởi LPS [5, 6]. Mặc dù rất hữu ích để chống lại nhiễm trùng, các cytokine này gây viêm mạnh có thể dẫn đến phù nề, gây stress

chuyển hóa tế bào và hoại tử mô. NF- κ B, một protein hoạt hóa phiên mã, đóng vai trò trung tâm trong phản ứng viêm bằng cách liên kết với các chất trung gian để kích hoạt phiên mã các gen tiền viêm như TNF- α và IFN- γ [141].

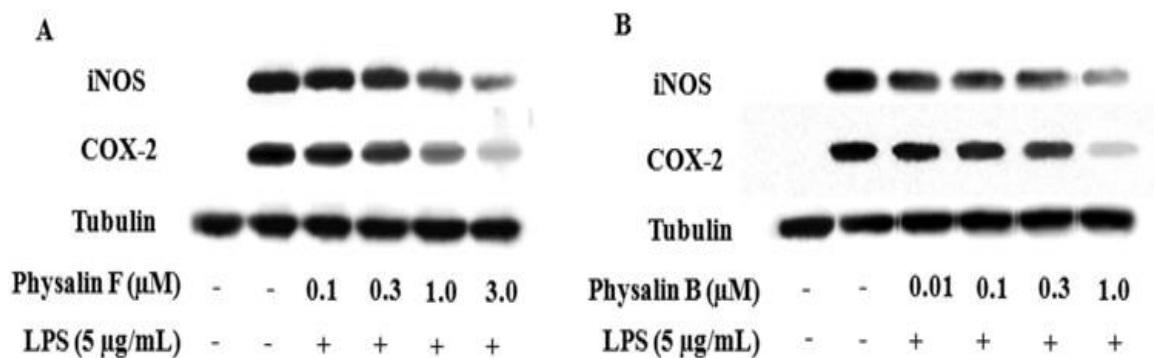
Các hợp chất **PA13** và **PA14** đã được báo cáo ức chế sự gia tăng tính thấm của thành mạch máu, gia tăng số lượng bạch cầu trung tính. Ngoài ra, physalin B và physalin F làm giảm nồng độ TNF- α , tăng nồng độ IL-10 trong các mô, trì hoãn và ngăn ngừa tử vong cho chuột thí nghiệm trong thí nghiệm gây viêm cấp tính. IL-10 đóng một vai trò quan trọng trong phản ứng viêm và đáp ứng miễn dịch. Các hoạt động sinh học của IL-10 bao gồm cả ức chế miễn dịch và các hiệu ứng kích thích miễn dịch. Ví dụ, IL-10 có thể ngăn chặn việc sản xuất các cytokine tiền viêm của bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính; giảm sự biểu hiện hoặc đồng kích thích hoạt động của các phân tử của bạch cầu đơn nhân và tế bào đuôi gai. IL-10 cũng có thể cải thiện sự tăng trưởng của tế bào B và tế bào mast, ức chế hoặc tăng cường các hoạt động của các tế bào T phụ thuộc vào điều kiện kích hoạt. Sự đa hình trong gen IL-10 đã được chứng minh kết hợp với cả hai dạng của hội chứng trẻ sơ sinh chết đột ngột (SIDS) và đột tử do nhiễm trùng. Dựa trên các chức năng của IL-10, đã có giả thiết rằng một chất đối kháng IL-10 có thể được sử dụng để tăng khả năng miễn dịch chống lại virus như EBV và bản thân phân tử IL-10 có thể được sử dụng như một thuốc chống viêm. Một khả năng khác là các chất physalin B và F gây ra sự giải phóng thêm corticosterone nội sinh và giúp tăng cường hoạt tính kháng viêm. Nhìn chung, những kết quả này cho thấy rằng các hoạt động chống viêm *in vivo* của các chất physalin B và F chủ yếu là do kích hoạt thụ thể của glucocorticoid. Do đó, các hợp chất có cấu trúc và tính chất như các steroid tự nhiên có thể là một lựa chọn điều trị mới cho các bệnh viêm [142].

Các hợp chất **PA13**, **PA14** và **PA15** cũng được báo cáo ức chế sự sản xuất một số cytokine gây viêm như interleukin IL-1 β , IL-6, IL-12, prostaglandin E2 (PGE-2) và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) bởi các đại thực bào được kích hoạt và tăng cường sản sinh IL-10. Các hợp chất **PA13**, **PA14** và **PA15** ngăn chặn quá trình phosphoryl hóa các protein κ B và làm suy giảm sự chuyển vị NF- κ B đến nhân. NF- κ B tham gia vào việc điều hòa một số gen gây viêm, và do đó ức chế hoạt

động của nó dẫn đến ức chế các chất trung gian gây viêm như IL-1 β , IL-6, IL-12, NO, PGE-2, và TNF- α . Ngoài ra các hợp chất **PA13**, **PA14** và **PA15** còn được chứng minh về khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào lympho đi kèm với việc giảm các cytokine liên quan đến việc kích hoạt và phát triển tế bào lympho dòng T như IFN- γ [143].

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*

Các hợp chất **PA9**, **PA10**, **PA11**, **PA13**, **PA14** có hoạt tính ức chế mạnh sự sản sinh NO. NO là chất trung gian gây viêm được tạo ra bởi các enzym cảm ứng iNOS và COX-2 [3]. Những chất trung gian này đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt các đại thực bào trong phản ứng viêm. Do đó, việc ức chế sản xuất NO bằng cách ức chế biểu hiện protein iNOS và COX-2 được coi là hai mục tiêu chính thường được đánh giá trong các nghiên cứu chống viêm. Tuy nhiên, **PA9**, **PA10**, **PA11** có hiệu suất phân lập quá thấp nên **PA13**, **PA14** được lựa chọn để đánh giá sâu hơn hoạt tính kháng viêm *in vitro*, nhằm có được luận chứng khoa học về hoạt tính tiềm năng kháng viêm của loài *P. angulata* trong thực tiễn. Cụ thể là tế bào RAW 264.7 được xử lý trước với **PA13**, **PA14** trong 2 giờ và sau đó được ủ với LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) trong 24 giờ. Tubulin được sử dụng làm protein nội chuẩn. Các protein iNOS và COX-2, hai enzyme điển hình cho sinh lý bệnh viêm được lựa chọn nghiên cứu và được đánh giá sự biểu hiện bằng thí nghiệm điện di trên gel SDS-PAGE, và mức độ biểu hiện của các protein iNOS và COX-2 được xác định bằng các phân tích Western-blot.



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 3.5 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 cảm ứng 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. Trong khi đó, các tế bào được ủ với **PA13** (0,1–3,0 μ M) hoặc **PA14** (0,01–0,3 μ M) đều cho thấy đã làm giảm mạnh sự biểu hiện protein iNOS và COX-2 do LPS gây ra theo phương thức phụ thuộc vào nồng độ. Mặt khác, trong thời gian ủ với LPS (1 μ g/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 phiên mã và dịch mã. Những kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây của một số tác giả như Sun và cộng sự (2017), Yang và cộng sự (2017) và cung cấp bằng chứng về đặc tính chống viêm của *P. angulata* [89, 139]. **PA13** và **PA14** cũng được chứng minh có hoạt tính ức chế con đường truyền tín hiệu NF- κ B, yếu tố phiên mã chính tham gia vào việc điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến phản ứng viêm. Yếu tố này tham gia vào nhiều quá trình sinh học của cơ thể con người và điều chỉnh sự biểu hiện của nhiều cytokine và enzym. Con đường NF- κ B được kích hoạt điều chỉnh sự biểu hiện của một loạt chất trung gian gây viêm và tăng cường sự xuất hiện của các phản ứng viêm. Vì vậy, ức chế kích hoạt NF- κ B sẽ làm giảm các phản ứng viêm thông qua ức chế sự sản sinh NO và sự biểu hiện của các enzyme cảm ứng (iNOS và COX-2). Những kết quả trên cho thấy hai hợp chất **PA13** và **PA14** đã ức chế sự sản sinh của các chất trung gian gây viêm thông qua điều hòa sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NF- κ B, một trong những con đường tín hiệu chính điều hòa tình trạng viêm [104, 144].

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*

Mười lăm hợp chất (**PA1-PA15**) phân lập được từ loài *P. angulata* được đánh giá hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư phổi (A-549), ung thư cổ tử cung (HeLa) và ung thư tụy (PANC-1) theo phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được trình bày ở phần phương pháp (mục 2.4.2). Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 15 hợp chất 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	Withanimine	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	(20 <i>S</i> , 22 <i>R</i>)-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 **PA11**, **PA13**, **PA14** thể hiện hoạt tính gây độc rất mạnh đối với dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC₅₀ từ 0,68 ± 0,05 μM đến 1,03 ± 0,09 μM, so với đối chứng dương etoposide (IC₅₀ = 2,68 ± 0,89 μM). Bên cạnh đó, **PA2**, **PA3**, **PA6**, **PA7**, **PA8**, **PA15** cũng có tác dụng gây

độc mạnh đối với dòng tế bào A549 với giá trị IC_{50} từ $6,88 \pm 2,41 \mu\text{M}$ đến $21,54 \pm 1,32 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại hầu như không thể hiện tác dụng gây độc với dòng tế bào này ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Đối với dòng tế bào ung thư HeLa, hợp chất **PA13** có tác dụng gây độc mạnh nhất ($IC_{50} = 0,23 \pm 0,03 \mu\text{M}$) mạnh hơn 10 lần so với đối chứng dương etoposide ($IC_{50} = 3,29 \pm 0,05 \mu\text{M}$), hợp chất **PA11** và **PA14** cũng gây độc mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là $29,89 \pm 1,15 \mu\text{M}$ và $13,84 \pm 1,27 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại xem như không gây độc với dòng tế bào HeLa với giá trị $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$. Ngoài ra, các hợp chất **PA3**, **PA6**, **PA7**, **PA8**, **PA11**, **PA14** thể hiện hoạt tính gây độc đáng kể đối với dòng tế bào ung thư tụy PANC-1 với giá trị IC_{50} từ $3,18 \pm 0,12 \mu\text{M}$ đến $34,06 \pm 2,08 \mu\text{M}$. 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.

Hợp chất **PA1** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Từ cấu trúc của hợp chất **PA1** (*N*-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) ethyl] ferulamide glucoside), chúng tôi nhận thấy hợp chất này được hình thành từ hai hợp phần là cinamic acid amide và ferulic acid, vì thế hợp chất **PA1** có thể gọi là dẫn xuất của cinamic acid amide. Trong cấu trúc của hợp chất **PA1** xuất hiện nhóm thế hydroxyl tại vị trí số 4 trên vòng thơm. Mặt khác, theo các kết quả nghiên cứu đã công bố cho thấy rằng các dẫn xuất của acid cynamic có chứa nhóm hydroxyl hoặc một nhóm thế metoxy hoặc không có nhóm thế nào ở vị trí số 4 trên vòng thơm thì các dẫn xuất của axit cynamic có độc tính tế bào giảm đáng kể hoặc hoàn toàn không gây độc tế bào [145]. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến kết quả hợp chất **PA1** không biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào trong các thử nghiệm được thực hiện.

Hợp chất **PA2** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào A549 (tế bào ung thư biểu mô thành ống phổi) với giá trị IC_{50} là $8,27 \pm 0,97 \mu\text{M}$ và không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào HeLa (tế bào ung thư tử cung ở người), PANC-1 (tế bào ung thư tụy ở người). Theo tổng quan tài liệu, hợp chất

PA2 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh đối với dòng tế bào A549 với giá trị $IC_{50} = 1,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ và ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bằng cách ngăn chặn con đường dẫn truyền tín hiệu PI3K-Akt-mTOR [146]. Đường truyền tín hiệu PI3K-Akt-mTOR đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển ung thư vì nó liên quan đến việc điều chỉnh sự phát triển và tồn tại của tế bào, quá trình chết theo chương trình, khả năng vận động, chu kỳ tế bào và các chức năng trao đổi chất khác nhau. Do đó, con đường này được coi là mục tiêu cho sự phát triển của các phân tử chống ung thư mới [147]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Hea và cộng sự (2007) cho thấy hợp chất **PA2** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào HCT-116 (tế bào ung thư đại trực tràng ở người), NCI-H460 (tế bào ung thư phổi không nhỏ ở người). Kết quả này khá thú vị và cho thấy **PA2** rất có thể đã thể hiện hoạt tính chọn lọc trên một số loại ung thư nhất định và cần được tiếp tục nghiên cứu sâu hơn [125].

Hợp chất **PA3** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào A549, PANC-1 với IC_{50} từ 11,8 – 34,06 μM và không có hoạt tính gây độc trên dòng tế bào HeLa. Khi phân tích các phổ NMR cho thấy cấu trúc của **PA3** là withanolide steroid và khá giống với hợp chất **PA2** ngoại trừ sự xuất hiện nhiều hơn một liên kết đôi ở **PA3** so với **PA2** ở vị trí C16-C17. Hợp chất thuộc nhóm withanolide thì liên kết đôi ở vị trí C16-C17 trong vòng D rất cần thiết cho hoạt tính gây độc tế bào [116]. Có thể nhận thấy sự xuất hiện liên kết đôi withanolide steroid ở vị trí C16-C17 đã đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng hoạt tính gây độc tế bào A549, PANC-1 của hợp chất **PA3** so với hợp chất **PA2**. Trước đó, Nagafuji và cộng sự (2004) đã chứng minh hợp chất **PA3** không gây độc tế bào HeLa với giá trị $IC_{50} > 95 \mu\text{M}$ [122].

Hợp chất **PA4**, **PA5** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Theo kết quả phân tích cấu trúc của các hợp chất cho thấy **PA4** khá giống với hợp chất **PA2** ngoại trừ sự thiếu vắng các tín hiệu đặc trưng của nhóm acetyl ở **PA4** so với **PA2**, hợp chất **PA5** khá giống với hợp chất **PA2** ngoại trừ sự có mặt của carbon không liên kết với hydro tại δ_C 87.2 và sự thay đổi giá trị độ dịch chuyển hóa học của các nhóm methyl tại C-18 (δ_C 15.8) và C-21 (δ_C 9.6) ở

PA5 so với các nhóm methyl tương ứng ở **PA2** lần lượt là δ_C 18.3, 15.3. Sự thay thế các nhóm thế và sự thay đổi giá trị độ dịch chuyển hóa học của các nhóm methyl đã ảnh hưởng đến hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA4**, **PA5** trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A-549, HeLa, PANC-1 và hợp chất **PA2** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A-549.

Khi phân tích các phổ NMR cho thấy cấu trúc hợp chất mới **PA6** khá giống với hợp chất **PA2** phân lập từ loài *P. angulata* ngoại trừ các vị trí ở vòng A và B do sự thiếu vắng nhóm hydro tại C-5, sự xuất hiện của liên kết đôi tại vị trí 4 ở **PA6**, sự thay thế nhóm thế nhóm hydro tại C-5. Sự xuất hiện của liên kết đôi tại vị trí 4 đã ảnh hưởng đến hoạt tính gây độc của tế bào của hợp chất **PA6**. Hợp chất này đã thể hiện hoạt tính tốt trên 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549 và PANC-1, trong khi hợp chất **PA2** chỉ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào dòng A549.

Khi phân tích các phổ cho thấy cấu trúc các 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**. Tuy nhiên theo kết quả thử nghiệm thì hợp chất **PA7** gây độc tế bào PANC-1 mạnh hơn hợp chất **PA3** và hợp chất **PA3** gây độc tế bào A549 mạnh hơn hợp chất **PA7**. Điều này được giải thích như sau: hợp chất **PA7** và **PA3** phân lập từ loài *P. angulata* đều là các hợp chất thuộc nhóm chất withanolide, lớp chất chính của chi *Physalis* và là những nhóm chất có hoạt tính gây độc tế bào, kháng u, kháng viêm v.v. [137]. Sự xuất hiện thêm một liên kết đôi ở vị trí C4-C5 trong cấu trúc của hợp chất **PA7** và **PA3** đã dẫn đến hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư A549 và PANC-1 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. Số liệu phổ NMR thu được của **PA8** khá giống với hợp chất **PA5** ngoại trừ sự xuất hiện nhiều hơn một liên kết đôi ở **PA8** so với **PA5**. Sự khác biệt về cấu trúc đã ảnh hưởng đến hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA8** trên 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, PANC-1 còn hợp chất **PA5** không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ tương ứng. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2020) hợp chất **PA8** cũng không gây độc trên

dòng tế bào ung thư hắc tố da (A375). Như vậy, hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA8** phụ thuộc vào dòng tế bào ung thư cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế gây độc tế bào của hợp chất **PA8** [148].

Hai hợp chất **PA9** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, HeLa và PANC-1. Tuy nhiên theo kết quả nghiên cứu của He và cộng sự (2007), hợp chất **PA9** gây độc dòng tế bào ung thư phổi (NCI-H460) và dòng tế bào ung thư đại trực tràng (HCT-116) với giá trị IC_{50} lần lượt là $2,11 \pm 0,1 \mu\text{M}$ và $0,43 \pm 0,02 \mu\text{M}$ [125]. Mặt khác, theo kết quả nghiên cứu của tác giả Ran Li và cộng sự (2022) hợp chất **PA9** gây độc tế bào MCF-7 ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} là $36,89 \pm 1,78 \mu\text{M}$ [149]. Khả năng gây độc tế bào của hợp chất **PA9** là do trong cấu trúc phân tử có sự xuất hiện liên kết đôi ở vị trí C16-C17 và có sự thay thế nhóm OH ở vị trí 5 bằng một nguyên tử Cl điều này làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA9** [116, 125]. Qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác, có thể nhận thấy rằng hợp chất **PA9** thể hiện hoạt tính gây độc chọn lọc trên một số dòng tế bào ung thư nhất định và cần được nghiên cứu sâu hơn về cơ chế gây độc tế bào.

Hợp chất **PA11** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, HeLa và PANC-1. Trong cấu trúc hợp chất **PA11** có sự thay thế nhóm OH ở vị trí 5 bằng một nguyên tử Cl điều này làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PA11** [116, 125].

Hai hợp chất **PA10** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, HeLa và PANC-1. Khi phân tích cấu trúc hóa học của hợp chất **PA10** khá giống cấu trúc của hợp chất **PA11** ngoại trừ ở hợp chất **PA10** có sự xuất hiện của một nhóm hydroxy tại vị trí C-17. Như vậy, sự xuất hiện nhóm hydroxy tại C-17 có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính gây độc tế bào. Hợp chất **PA11** thể hiện hoạt tính mạnh trên 3 dòng tế bào ung thư A549, PANC-1 và Hela. Trong khi hợp chất **PA10** không thể hiện hoạt tính trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Yang và cộng sự (2017), hợp chất **PA10** phân lập từ loài *P. angulata* L có khả năng ức chế sự tăng sinh dòng tế bào ung thư biểu mô gan

ở người (HCC). Hợp chất **PA10** gây ra bất giữ chu kỳ tế bào pha G2/M trong tế bào HCC bằng cách điều chỉnh giảm sự biểu hiện của Cdc25C, p-Cdc25C và điều chỉnh lên mức độ biểu hiện của Cyclin B1. Trong nghiên cứu này, Yang và cộng sự cũng đã chứng minh rằng **PA10** điều chỉnh tỷ lệ Bax/Bcl-2 và phân cắt caspase 9/3/7/PARP, ức chế quá trình phosphoryl hóa STAT3 để gây ra quá trình apoptosis qua trung gian ty thể ở tế bào HCC và chống tăng sinh trong các tế bào HCC bằng cách điều chỉnh con đường tín hiệu ROS-JAK2/Src-STAT3 [126].

Hai hợp chất **PA12** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, HeLa và PANC-1. Khi phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PA12** xuất hiện tín hiệu của hai olefinic proton tại δ_{H} 6.01 (1H, dd, $J = 2.0, 10.0$ Hz) và 6.88 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.0, 10.0$ Hz); sáu nhóm methyl tại δ_{H} 1.13 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.06 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.85 (3H, s), 1.97 (3H, s) và 2.06 (3H, s); và ba oxymethin proton tại δ_{H} 4.31 (dd, 5.0, 12.0), 5.05 (1H, dd, $J = 3.5, 13.5$ Hz) và 4.78 (1H, m). Các tín hiệu trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **PA12** xác định sự có mặt của 30 carbon gồm chín carbon không liên kết với hydro, chín nhóm methine, sáu nhóm methylene, và sáu nhóm methyl. Tín hiệu singlet của 3 proton tại δ_{H} 2.06 (H-30) cùng với hai tín hiệu carbon tại 170.9 (C-29) và 21.5 (C-30) gợi ý sự có mặt của nhóm acetyl. Các tín hiệu của 28 carbon còn lại đặc trưng cho hợp chất physagulin khung withanolide. So sánh giá trị phổ NMR của **PA12** với hợp chất **PA5** phân lập từ loài *P. angulata* nhận thấy giá trị phổ ở các vị trí đều phù hợp. Do vậy cấu trúc hóa học của hợp chất **PA12** giống cấu trúc hóa học của hợp chất **PA5**. Sự giống nhau về cấu trúc dẫn đến hoạt tính gây độc của hợp chất **PA5** và **PA12** và kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy hợp chất **PA12** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, HeLa và PANC-1.

Khi phân tích các phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **PA13** khá giống với hợp chất **PA6** ngoại trừ các tín hiệu lân cận C-5 và C-6 cấu hình vòng epoxy của **PA13** là $5\beta,6\beta$ -epoxy. Số liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **PA14** khá giống với hợp chất **PA13** ngoại trừ các tín hiệu liên kết đôi ở vị trí C-5, C-6, C-7, C-8 và C-9. Số liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **PA15** khá giống với hợp chất **PA14** ngoại trừ

các vị trí từ C-1 đến C-10 và C-19 do có mặt của liên kết đôi tại C-4/C-5 và nhóm hydroxy tại C-6 thay cho cầu nối $5\beta,6\beta$ epoxy ở **PA14**. Như vậy, có thể thấy sự xuất hiện cấu hình epoxy của là $5\beta,6\beta$ -epoxy, liên kết đôi ở vị trí C-5, C-6 và sự thay thế nhóm hydroxy tại C-6 thay cho cầu nối $5\beta,6\beta$ 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 với giá trị IC_{50} lần lượt là $0,68 \pm 0,05 \mu\text{M}$; $0,23 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Trong khi hợp chất **PA14** có hoạt tính trung bình trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị IC_{50} từ $0,95 \pm 0,04 \mu\text{M}$ đến $13,84 \pm 1,27 \mu\text{M}$ và hợp chất **PA15** chỉ thể hiện hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư A549 với giá trị IC_{50} là $6,88 \pm 2,41 \mu\text{M}$. Theo tổng quan tài liệu, các hợp chất physalin B, F phân lập từ loài *P.angulata* đều là các hợp chất thuộc nhóm physalin. Việc đánh giá mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính chỉ ra rằng cấu hình vòng epoxy ở vị trí $5\beta,6\beta$ -epoxy của các hợp chất physalin có hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất và liên kết đôi tại vị trí C-5, C-6 của physalin cũng ảnh hưởng mạnh mẽ tới hoạt tính này. Nhìn chung, hoạt tính gây độc tế bào của các chất physalin được chứng minh là có liên quan đến việc gây chết tế bào theo chương trình [148, 150]. Sự chết của tế bào do quá trình apoptosis được gây ra bởi các Physalin thông qua các con đường khác nhau liên quan đến protein kinase được kích hoạt bởi mitogen (MAPK). Physalin làm tăng mức độ phosphoryl hóa của ERK1/2, JNK và p38 MAPK. Sự kích hoạt ERK1/2 gây ra sự sản sinh ROS (mTOR) của ty thể, dẫn đến việc giải phóng cytochrome c, kích hoạt các caspase 3, 6, 9 và gây ra quá trình apoptosis. Sự hoạt hóa JNK thúc đẩy quá trình phosphoryl hóa c-Jun, dẫn đến sự hình thành protein hoạt hóa 1 (AP-1), một loại protein điều chỉnh quá trình phiên mã của các yếu tố pro-apoptotic và dẫn đến quá trình apoptosis. Kích hoạt P38 dẫn đến tăng mức ROS và kích hoạt p53, do đó làm tăng quá trình phiên mã của các protein pro-apoptotic, chẳng hạn như Noxa, BAX và BAK, và làm giảm sự phiên mã của protein BCL-2 chống apoptotic, dẫn đến quá trình apoptosis qua con đường ty thể. Các hợp chất **PA13** và **PA14** có thể kích hoạt quá trình apoptosis thông qua việc kích hoạt con đường nội tại bởi sự phân cắt poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [151]. Ngoài ra, các hợp chất

PA13 và **PA14** được chứng minh là những chất ức chế mạnh mẽ con đường tín hiệu Hedgehog (Hh)/GLI-1 trong dòng tế bào ung thư tụy (PANC-1) theo cơ chế liên quan đến việc ức chế protein Hedgehog, do đó gây ra gián đoạn liên kết của GLI với DNA (tác nhân của tín hiệu Hedgehog) dẫn tới sự hình thành và tiến triển của nhiều loại ung thư khi phát tín hiệu không ổn định, cũng có liên quan với việc duy trì các tế bào gốc ung thư [143].

Hợp chất **PA13** ức chế sự tăng trưởng tế bào A498 và gây ra apoptosis theo cách phụ thuộc vào nồng độ và thời gian. Quá trình chết theo chương trình của tế bào do hợp chất **PA13** gây ra được thực hiện thông qua sự phá vỡ điện thế màng ty thể dẫn đến giải phóng cytochrome c vào tế bào, và sau đó hoạt hóa caspase 3/8/9. Khi cytochrome c được giải phóng khỏi ty thể, nó làm trung gian cho sự hoạt hóa allosteric của yếu tố kích hoạt apoptosis-protease 1 (Apaf-1). Cytochrome c và Apaf-1 kết hợp với nhau để tạo nên apoptosome. Apoptosome thu nhận procaspase-9 và dẫn đến sự phân tách protein này để trở thành dạng hoạt hóa caspase 9 và kích hoạt caspase 3. Hợp chất **PA13** cũng làm tăng sinh ROS trong các tế bào A498. ROS rất quan trọng đối với các con đường chuyển hóa và dẫn truyền tín hiệu liên quan đến sự phát triển của tế bào và quá trình apoptosis. Tuy nhiên, việc sản xuất quá nhiều ROS dẫn đến stress oxy hóa và tổn thương tế bào. Những kết quả này cho thấy sự tăng sinh của ROS đóng một vai trò quan trọng trong apoptosis của tế bào A498 dưới tác dụng của **PA13** [93].

Hợp chất **PA14** cũng ức chế các dòng tế bào ung thư bằng cách tác động đến con đường MAPK [151, 152]. Các nghiên cứu đã quan sát thấy sự gia tăng mức độ phosphoryl hóa ERK1/2, JNK và p38 gây ra bởi **PA14**, theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ và thời gian. Ngoài ra, khi các chất ức chế của các protein này được sử dụng, sự đảo ngược một phần của sự phân cắt PARP và tích lũy p62 đã được ghi nhận, cho thấy rằng các con đường ERK, p38 và JNK tham gia vào cả quá trình apoptosis và autophagy được kích hoạt bởi **PA14**. Trong nghiên cứu của Boonsombat và cộng sự (2020), hợp chất **PA13** và **PA14** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A549 với IC_{50} là $5,92 \pm 0,78 \mu\text{M}$ và Hela với IC_{50} là $0,78 \pm 0,60 \mu\text{M}$. Các

hợp chất **PA13** và **PA14** là những chất ức chế mạnh mẽ con đường tín hiệu Hedgehog (Hh)/GLI-1 trong dòng tế bào ung thư tuyến tụy (PANC1) theo cơ chế liên quan đến việc ức chế protein Hedgehog, do đó gây ra gián đoạn liên kết của GLI với DNA (tác nhân của tín hiệu Hedgehog) dẫn tới sự hình thành và tiến triển của nhiều loại ung thư khi phát tín hiệu không ổn định, cũng có liên quan với việc duy trì các tế bào gốc ung thư [143].

Theo nghiên cứu của tác giả Fu và cộng sự (2021), hợp chất **PA15** phân lập từ loài *P. alkekengi* có khả năng ức chế sự tăng sinh khối u và thúc đẩy quá trình apoptosis của dòng tế bào ung thư phổi (NCI-H1975) và dòng tế bào đa u tụy (U266) bằng cách ức chế tín hiệu STAT3. STAT3 rất quan trọng trong việc khởi phát và tiến triển của các bệnh ung thư khác nhau. STAT3 được kích hoạt bằng cách phosphoryl hóa các gốc tyrosine hoặc serine bởi các tín hiệu cytokine khác nhau (IL-6, IL-7, IL-9 v.v). Hợp chất **PA15** ngăn chặn sự phosphoryl hóa Tyr705 của STAT3 trong các tế bào H1975 và U266 nhưng đã làm tăng sự phosphoryl hóa Ser727 của STAT3 trong các tế bào H1975. Những phát hiện của nghiên cứu này cơ sở khoa học để phát triển **PA15** thành một loại thuốc chống khối u tiềm năng [153].

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

Các đặc tính của tế bào ung thư bao gồm duy trì tín hiệu tăng sinh, lấn át các tín hiệu ức chế sinh trưởng, tránh được sự chết theo chương trình (apoptosis), có khả năng tăng sinh không giới hạn, kích thích tạo mạch, kích hoạt sự xâm lấn và di căn [154, 155]. Ung thư là một trong những trường hợp mà quá trình apoptosis xảy ra quá ít hoặc không xảy ra, dẫn đến các tế bào ác tính sẽ không chết [82]. Mặt khác, một trong những yếu tố góp phần vào việc kháng thuốc và có liên quan đến tiên lượng lâm sàng xấu của căn bệnh là sự ức chế quá trình apoptosis [156]. Các loại thuốc điều trị ung thư hiện nay thường không thực sự hiệu quả, chưa hoặc không giải quyết được vấn đề tái phát hoặc thậm chí có thể gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn, làm suy giảm sức chống chịu bệnh của bệnh nhân. Vì vậy, các nghiên cứu hiện nay và các nhà khoa học đều đang hết sức nỗ lực tìm kiếm những hoạt chất tiêu diệt các tế bào ung thư mà không gây ra những tổn thương

không cần thiết cho các tế bào bình thường để phát triển thuốc chống ung thư mới, hiệu quả hơn. Do thiên nhiên nói chung hay các loài thực vật nói riêng luôn là nguồn dược liệu dồi dào, phong phú, nên việc sàng lọc, tìm kiếm các hoạt chất từ thực vật có khả năng kích hoạt quá trình apoptosis trong tế bào ung thư là khả thi và đầy tiềm năng [157].

Physagulin P (**PA6**) là một hợp chất có cấu trúc mới, được phân lập từ loài *P. angulata* thuộc chi *Physalis* ở Việt Nam. Với những sàng lọc đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư ban đầu, hoạt chất này đã chứng minh khả năng gây độc tế bào A-549 với giá trị $IC_{50}=13,47 \pm 2,73 \mu\text{M}$. Trong nghiên cứu này, **PA6** được lựa chọn để khảo sát hoạt tính cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào ung thư phổi A549 qua ba phương pháp đó là nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342, phương pháp phân tích dòng chảy tế bào và khả năng kích hoạt caspase-3.

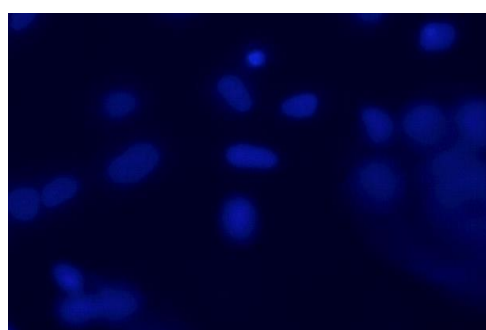
3.3.4.1. Xác định khả năng cảm ứng apoptosis nhờ nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342

Quá trình apoptosis đặc trưng bởi sự thay đổi hình thái tế bào, sự cô đặc chất nhiễm sắc, sự phân cắt DNA và sự phân mảnh nhân. Các đặc điểm hình thái điển hình này của tế bào apoptosis có thể được quan sát qua quá trình nhuộm bằng Hoechst 33342. Vì vậy, trong nghiên cứu này, tế bào ung thư phổi (A549) ở người được ủ với hợp chất **PA6** tại nồng độ 15, 10 và 5 $\mu\text{g/mL}$ để đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis và sự thay đổi hình thái tế bào thông qua phương pháp nhuộm nhân tế bào A549 với Hoechst 33342. Kết quả cho thấy các tế bào ung thư phổi A549 ở người bị ức chế khi được xử lý với hợp chất **PA6** và tùy thuộc vào nồng độ mẫu thử mà số tế bào xảy ra quá trình apoptosis với những thay đổi hình thái điển hình như tế bào cô đặc lại, phân mảnh nhân có tỉ lệ khác nhau (Hình 3.19). Khi tăng nồng độ chất thử **PA6** từ 5 $\mu\text{g/mL}$ lên 15 $\mu\text{g/mL}$ 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, ở nồng độ 0.5 μM đã thể hiện khả năng gây ra sự cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào với % tế bào có nhân cô đặc đạt 23,21%. 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

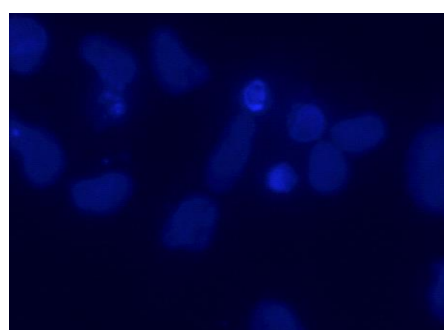
PA6 cho thấy khả năng cảm ứng apoptosis và làm thay đổi hình thái tế bào ung thư thử nghiệm.

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

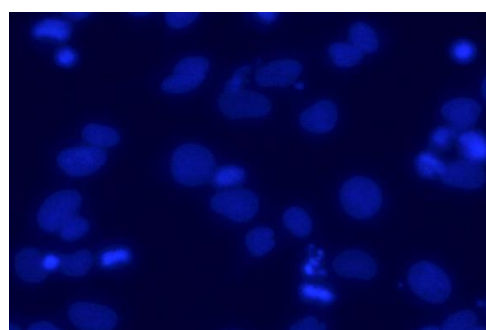
% tế bào có hình thái nhân bị apoptosis				
PA6 (5 µg/mL)	PA6 (10 µg/mL)	PA6 (15 µg/mL)	Camptothecin (0,5 µM)	Đối chứng (-)
4,89 ± 0,91	7,36 ± 1,76	16,01 ± 2,26	23,21 ± 3,24	3,79 ± 1,03



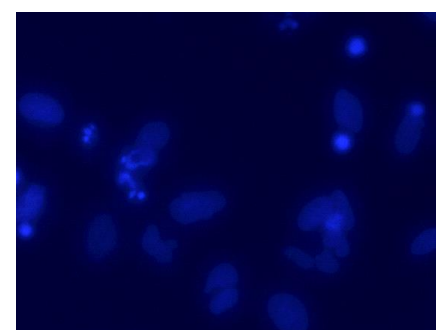
Đối chứng âm



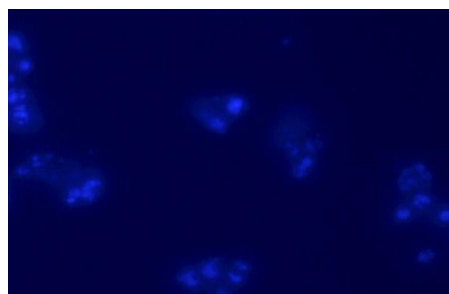
PA6 (5 µg/mL)



PA6 (10 µg/mL)



PA6 (15 µg/mL)



Camptothecin (0.5 µM)

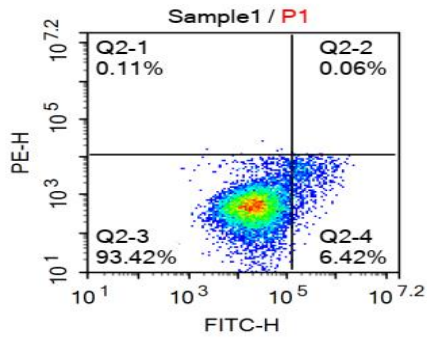
Hình 3.19. Hình ảnh tế bào A549 được nhuộm Hoechst 33342 dưới tác động của **PA6** ở các nồng độ khác nhau

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

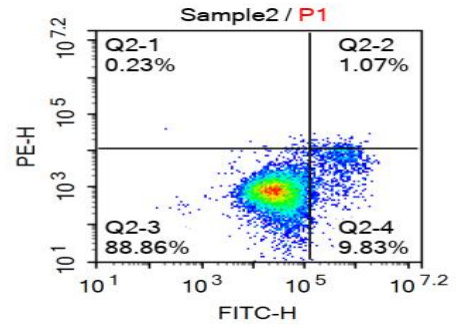
Apoptosis là một quá trình chết theo cơ chế tự nhiên của tế bào xảy ra ở các sinh vật đa bào để duy trì cân bằng nội môi của mô và hoạt động như một chiến lược phòng thủ để loại bỏ các tế bào bị nhiễm bệnh, bị hư hỏng hoặc bị đột biến [158]. Như vậy, apoptosis là một mục tiêu tiềm năng cho liệu pháp điều trị ung thư. Một trong những biểu hiện sớm của apoptosis đó là sự dịch chuyển của phân tử phosphatidylserine (PS) của màng từ phía trong màng nguyên chất ra bề mặt tế bào. Annexin V là một protein gắn với phospholipid phụ thuộc vào ion Ca^{++} có ái lực mạnh với PS. Vì vậy, annexin V gắn với chất hiện màu huỳnh quang FITC được sử dụng để xác định sự biểu hiện của PS thông qua phương pháp flow cytometry, từ đó xác định phần trăm tế bào có biểu hiện của apoptosis. Bên cạnh đó, sự dịch chuyển của PS thường xảy ra trước khi màng tế bào bị phá hủy trong quá trình chết của tế bào do apoptosis hoặc hoại tử. Vì vậy, nhuộm annexin V thường kết hợp với propidium iodide (PI) để xác định apoptosis sớm và muộn. Thông qua phương pháp này, những tế bào sống không nhuộm với bất kỳ loại màu nhuộm nào. Tế bào biểu hiện apoptosis sớm bắt màu với FITC-annexin V, tế bào biểu hiện apoptosis muộn bắt màu với cả FITC-annexin V và PI; tế bào chết do hoại tử chỉ bắt màu với thuốc nhuộm PI.

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

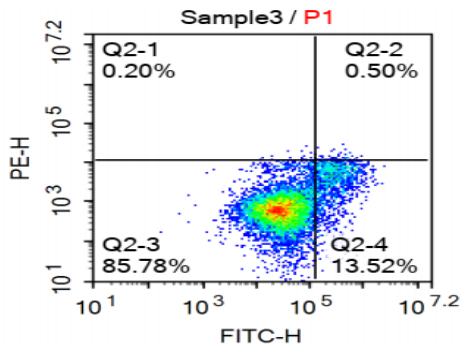
Mẫu thí nghiệm	% tế bào sống (Q2-3)	% tế bào apoptosis sớm (Q2-4)	% tế bào apoptosis muộn (Q2-2)	% tế bào hoại tử (Q2-1)
ĐC	93,42	6,42	0,11	0,06
PA6 (5 $\mu\text{g/mL}$)	88,86	9,83	1,07	0,23
PA6 (10 $\mu\text{g/mL}$)	85,78	13,52	0,50	0,20
PA6 (15 $\mu\text{g/mL}$)	80,17	15,92	3,26	0,65
Camptothecin (0,5 μM)	80,61	18,67	0,30	0,41



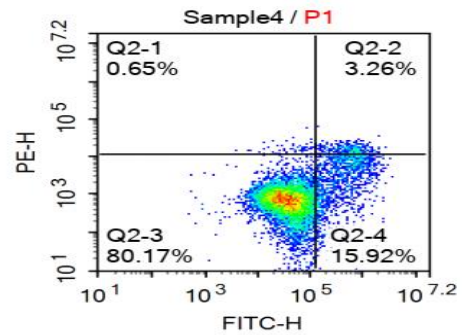
Tế bào ủ với 0.5% DMSO
trong 48h



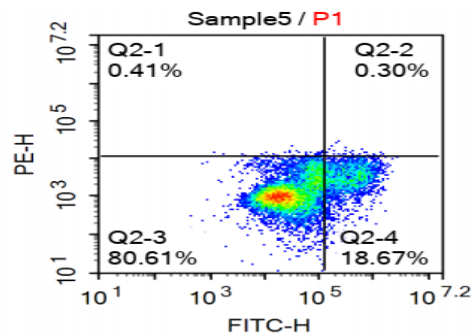
Tế bào ủ với mẫu **PA6**
(5 $\mu\text{g/mL}$) trong 48h



Tế bào ủ với mẫu **PA6**
(10 $\mu\text{g/mL}$) trong 48h



Tế bào ủ với mẫu **PA6**
(15 $\mu\text{g/mL}$) 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 thử nghiệm khả năng cảm ứng apoptosis của hợp chất **PA6** lên tế bào ung thư phổi A549 khi sử dụng phương pháp nhuộm với FITC-annexin V/PI thể hiện ở bảng 3.7 và hình 3.20 cho thấy hợp chất **PA6** tại nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ và 15 $\mu\text{g/mL}$ thể hiện khả năng cảm ứng apoptosis ở các giai đoạn sớm và muộn trong dòng tế bào A549 sau 24 giờ ủ mẫu. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng hợp chất **PA6** làm tăng đáng kể tỉ lệ tế bào apoptosis và phụ thuộc nồng độ. Cụ thể là **PA6** tại nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$ đã cảm ứng tăng tỉ lệ tế bào apoptosis sớm lên 9,83% và apoptotis muộn lên 1,07% (so với 6,42% và 0,11%, một cách tương ứng ở đối chứng âm không ủ mẫu). Khi tăng nồng độ hợp chất **PA6** lên 15 $\mu\text{g/mL}$ thì tỉ lệ tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm (15,92%), apoptois muộn (3,26%) và tế bào hoại tử (0,65%) đều tăng rõ rệt so với đối chứng âm (6,42%; 0,11%; 0,06%), một cách tương ứng. Như vậy hợp chất **PA6** thể hiện rõ khả năng gây chết tế bào A549 thông qua quá trình apoptosis, đặc biệt là trong giai đoạn sớm apoptosis (đạt 15,92%) và cũng có tác động gây chết tế bào theo dạng hoại tử, mặc dù không đáng kể (0,65%).

Các mẫu thử được phân tích bằng hệ thống trắc lưu tế bào. Trục x thể hiện mức độ nhuộm màu FITC-Annexin V, trục y thể hiện mức độ nhuộm màu PI theo đơn vị Log. Q2-1: tế bào chết do hoại tử (necrosis) (Annexin V-FITC (-)/PI (+)); Q2-2: tế bào chết do apoptosis giai đoạn muộn (Annexin V-FITC (+)/PI (+)); Q2-3: tế bào khỏe mạnh (Annexin V-FITC (-)/PI (-)); Q2-4; tế bào biểu hiện apoptosis giai đoạn sớm (Annexin V-FITC (+)/PI (-))

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

Quá trình tự chết của tế bào chủ yếu được thực hiện bởi một họ protease được gọi là caspase. Các enzyme này đóng một vai trò thiết yếu trong việc duy trì cân bằng nội môi thông qua việc điều chỉnh quá trình chết và viêm của tế bào. Caspase thường được phân loại theo các chức năng đã biết của chúng trong quá trình apoptosis (caspase-2, caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9 và caspase-10) và trong bệnh viêm (caspase-1, caspase-4, caspase-5 và caspase-12) ở người. Các caspase liên quan đến quá trình chết của tế bào apoptosis đã được phân

nhóm dựa trên vị trí và cơ chế hoạt động của chúng là caspase khởi đầu (caspase-8, caspase-9 và caspase-10) hoặc caspase thực hiện (caspase-3, caspase-6, và caspase-7) [158, 159]. Có hai con đường chính liên quan đến sự cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào là con đường ngoại bào và con đường nội bào. Con đường ngoại bào đề cập đến con đường trung gian thông qua các thụ thể chết “death receptors” (DRs) và con đường nội bào là con đường trung gian ty thể [160, 161]. Cả hai con đường gây ra sự chết tế bào bằng cách kích hoạt caspase. Trong số đó, caspase-3 là một protease gây chết được kích hoạt thường xuyên, xúc tác sự phân cắt nhiều protein quan trọng của tế bào. Vì vậy, caspase-3 được coi là enzyme quan trọng cho sự cảm ứng apoptosis trong các tế bào. Caspase-3 kích hoạt endonuclease DNase, làm rối loạn DNA của nhiễm sắc thể bên trong nhân tế bào, làm ngưng tụ chất nhiễm sắc và phân mảnh DNA [150]. Khả năng kích hoạt caspase-3 đã được đánh giá cho hợp chất **PA6** tại nồng độ 5 μM , 10 μM và 15 μM (Bảng 3.8).

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 $\mu\text{g/mL}$	2,59 **	0,26
PA6 10 $\mu\text{g/mL}$	2,00 ***	0,06
PA6 5 $\mu\text{g/mL}$	1,30	0,22
Camptothecin (0,5 μM)	3,23***	0,06
Đối chứng âm	1,00	0,06

Ghi chú: **P<0,01; ***P<0,001 so với đối chứng âm

Kết quả thử nghiệm cho thấy hoạt chất **PA6** làm tăng đáng kể hoạt độ enzyme caspase-3 so với đối chứng âm (P<0,01 và P<0,001) và phụ thuộc nồng độ. Cụ thể là hoạt độ caspase-3 tăng từ 2,00 lần lên 2,59 lần khi nồng độ **PA6** tăng từ

10 μM lên 15 μM . Mức cảm ứng tăng hoạt độ caspase -3 tăng đều ở mức có sai khác thống kê so với đối chứng ($P < 0,01$ ở mức nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ và $P < 0,001$ ở mức nồng độ 15 $\mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên, mức cảm ứng caspase 3 được xử lý bằng **PA6** ở nồng độ 5 μM giảm xuống 1,30 lần, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. 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 ung thư phổi (A549) và sau đó dẫn đến sự chết của tế bào.

Từ kết quả nghiên cứu khả năng cảm ứng apoptosis thông qua phương pháp nhuộm Hoechst 33342, kỹ thuật flow cytometry, cảm ứng caspase-3 cho thấy hợp chất **PA6** kích hoạt quá trình apoptosis của các tế bào A549 và sau đó dẫn đến sự ức chế sự tăng sinh. Đây là một tác động mới và chưa từng được báo cáo về hoạt tính này của hoạt chất **PA6**. Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi ghi nhận rằng hoạt chất **PA6** tại nồng độ 15 $\mu\text{g/mL}$ làm tăng tỉ lệ tế bào có apoptosis sớm và muộn cao nhất từ 9,83% lên 15,92% và từ 1,07% lên 3,26%, một cách tương ứng. Những kết quả này đã chứng minh tiềm năng gây ra quá trình apoptosis đáng chú ý của hợp chất **PA6**, đối với tế bào ung thư phổi dòng A549. Bên cạnh đó, hoạt chất **PA6** đã kích hoạt con đường caspase để kích hoạt quá trình apoptosis với hàm lượng caspase -3 tăng đáng kể, gấp 2,59 lần so với đối chứng âm. Với hoạt tính đáng chú ý này, **PA6** cần được nghiên cứu sâu hơn về phương thức tác động ở mức phân tử tới các con đường truyền tín hiệu trong tế bào để có thể đưa lên nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng trong tương lai.

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 *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.

Sáu hợp chất phân lập từ *P. minima* được khảo sát hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7. Kết quả thử nghiệm đã được thể hiện trong bảng 3.9 cho thấy:

Hợp chất **PM1** thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 0,15 ± 0,02 μM, mạnh hơn nhiều lần so với chất đối chứng dương L-NMMA (IC₅₀ = 7,84 ± 0,87 μM). Hợp chất **PM5** thể hiện hoạt tính yếu với IC₅₀ là 70,25 ± 2,43 μM. Các hợp chất còn lại xem như không có hoạt tính do IC₅₀ > 100 μM (**PM2**, **PM4**) hoặc gây chết tế bào thử nghiệm (**PM3**). Kết quả này cho thấy hợp chất **PM1** có hoạt tính mạnh nhất và cần được đánh giá sâu hơn (ví dụ như hoạt tính ức chế PGE2, COX-2 v.v.) để khẳng định hoạt tính kháng viêm tiềm năng.

Hợp chất **PM1** có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ là 0,15 ± 0,02 μM. Tín hiệu của proton H-6 tại δ_H 3.24 (d, J = 2.0 Hz) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-5 (δ_C 63.3), C-6 (δ_C 65.1) cho thấy sự có mặt của nhóm 5β,6β-epoxy tại vòng B. Theo Wu và cộng sự (2020) các withanolides có nhóm 5β, 6β-epoxy có thể có hoạt tính chống viêm tốt hơn và giả thiết này là phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi [111]. Hợp chất **PM1** thuộc lớp chất withanolides mà được biết đến như một loại hormone thực vật, có thể được sử dụng

thay thế cho hormone sinh lý của con người. Withanolides có khả năng điều chỉnh các hoạt động và các quá trình sinh lý của cơ thể. Khi các hormone thực vật này tiếp xúc với tế bào, chúng sẽ liên kết ái lực với thụ thể hoạt động trên màng tế bào và không cho phép các hormone nội mô, các enzyme sinh lý v.v. liên kết với các thụ thể này để thực hiện hoạt động chức năng. Ví dụ như enzyme COX-2 bị chiếm giữ thụ thể của nó bởi các withanolide khiến cho lớp chất này ức chế tốt hoạt động của COX-2 và do vậy đã thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh. Withanolides cho thấy tương tác chọn lọc với COX-2 tốt hơn COX-1. Với đặc tính này, các withanolides có thể là những dược chất tiềm năng để phát triển các thuốc kháng viêm không steroid [162]. Hợp chất **PM2**, **PM4**, **PM6** không có tác dụng ức chế sự sản sinh NO ($IC_{50} > 100 \mu M$). Hợp chất **PM3** cho thấy độc tính cao, gây chết tế bào thử nghiệm nên không xác định được hoạt tính ức chế sinh NO trên mô hình tế bào RAW 264.7. NO hoạt động như một chất trung gian gây viêm. Do vậy, các chất ức chế sản sinh NO có thể có tác dụng điều trị chứng viêm do sự sản sinh quá mức NO [163].

Hợp chất **PM5** có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} khá cao là $70,25 \pm 2.43 \mu M$. Theo nghiên cứu của tác giả Sang-ngern và cộng sự (2016), hợp chất **PM5** được phân lập từ các bộ phận trên mặt đất của loài *P. peruviana* không có hoạt tính ức chế NO trong tế bào đại thực bào RAW 264.7 được kích hoạt bởi LPS. Ngoài ra, hợp chất **PM5** cũng không có khả năng ức chế hoạt động của yếu tố TNF- α và NF- κB trên tế bào ung thư biểu mô thận. Những kết quả này cho thấy hợp chất **PM5** có thể không phải là hợp chất kháng viêm tiềm năng [133].

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* được trình bày ở mục 2.4.2. 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	4β-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 với giá trị IC₅₀ từ 0,051 ± 0,004 μM và 0,86 ± 0,09 μM, mạnh gấp 3 đến 50 lần so với đối chứng dương etoposide. Các hợp chất **PM2** và **PM6** thể hiện hoạt tính yếu hơn với giá trị IC₅₀ từ 11,74 ± 1,01 và 65,33 ± 4,06 μM. Hai hợp chất **PM4** và **PM5** với giá trị IC₅₀ > 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 withanolide (**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.

Theo các kết quả nghiên cứu đã công bố về hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **PM1** thì hoạt tính này có liên quan đến sự xuất hiện nhóm 5β,6β-epoxy tại vòng B [164]. 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 mạnh cho tế bào HepG2, SK-LU-1, MCF7 với IC₅₀ lần lượt là 0,051 ± 0,004 μM; 0,056 ± 0,003 μM; 0,059 ± 0,006 μM. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nassra và cộng sự (2017) khi báo cáo hợp chất **PM1** gây độc tế bào HepG2, MCF7

với giá trị IC_{50} thấp hơn 1 $\mu\text{g/mL}$ [165]. Mặt khác, hợp chất **PM1** đã được chứng minh là chất cảm ứng TRAIL hiệu quả nhất, nhưng ít độc nhất, trong số các withanolide được phân lập từ chi *Physalis*. TRAIL là một thành viên nhóm phối tử TNF, gây ra quá trình apoptosis trong tế bào khối u nhưng không phải trong tế bào lành, do đó mang lại lợi ích điều trị các khối u ác tính khác nhau. **PM1** cảm ứng tăng cường con đường tự chết phụ thuộc vào thụ thể bên ngoài thay vì con đường nội tại của ty thể. Tác dụng quan trọng nhất của nó là làm giảm nhanh chóng protein yếu tố ức chế FLICE của tế bào (cFLIP). cFLIP là phân tử ức chế chính của quá trình apoptosis qua trung gian Fas và TRAIL. Nó tương đồng với caspase-8 và caspase -10 nhưng thiếu hoạt tính protease do không có nhóm NH_2 tại vị trí hoạt động. Như vậy, cFLIP là phân tử quan trọng điều hòa tín hiệu TRAIL và việc sụt giảm hoặc ngừng hoạt động cFLIP có thể dẫn đến tăng cường hoạt động của quá trình tự chết do TRAIL gây ra [166].

Số liệu phổ ^1H 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 và cho thấy mức hoạt tính 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-7 của hợp chất **PM3** yếu hơn hợp chất **PM1** với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 0,80 - 0,86 μM . Theo nghiên cứu của Zhen-Nan Ye và cộng sự (2019), hợp chất **PM3** gây ra quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào G0/G1 và cảm ứng quá trình apoptosis qua trung gian caspases, dẫn đến ức chế sự tăng sinh tế bào. **PM3** ức chế sự biểu hiện của các gen mục tiêu c-Myc, Axin2, cyclin D1 và Survivin Wnt trong các mô khối u, cũng như cảm ứng sự phosphoryl hóa Ser33/Ser37/Thr41 của β -catenin. **PM3** giảm sự phát triển của khối u, ngăn chặn tín hiệu Wnt/ β -catenin [167].

Hợp chất **PM4** không thể hiện hoạt tính trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Số liệu phổ NMR thu được của **PM4** khá giống với hợp chất **PM2** ngoại trừ các vị trí C-23, C-24 và C-26. Sự mất đi nhóm tín hiệu của 1 nhóm methyl (δ_H 1.99, δ_C 20.6) ở **PM4** và thay thế bằng các tín hiệu của 1 nhóm oxymethylene (δ_H 4.19/4.40, δ_C 61.6) ở **PM4** cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **PM4** tương tự **PM2** ngoại trừ vị trí C-28 được thay thế bằng nhóm oxymethylene. Điều này có thể lý giải vì sao hợp chất **PM2** thể hiện hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư HepG2, SK-LU-1 và MCF-7 còn hợp chất **PM4** không thể hiện hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm tương ứng.

Hợp chất **PM5** không thể hiện hoạt tính trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Hợp chất **PM5** lần đầu tiên được phân lập từ loài *P. minima*. Các nghiên cứu trước đây chưa có nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này.

Số liệu phổ NMR của **PM6** khá giống với hợp chất **PM1** ngoại trừ các vị trí từ C-4 đến C-8 và có thể những thay đổi này làm giảm hoạt tính gây độc tế bào của **PM6** so với hợp chất **PM1**. Theo kết quả nghiên cứu thu được thì hoạt tính gây độc tế bào HepG2, SK-LU-1 và MCF-7 của **PM6** với IC_{50} trong khoảng là 56,22 – 65,33 μM , đã thấp hơn so với hoạt chất **PM1**.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

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 mới 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**), (20S, 22R)-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 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 $IC_{50} = 0,15 \pm 0,02 \mu M$. 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*)-15 α -acetoxy-5 α -chloro-6 β ,14 β -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 μ M). Hợp chất **PA13** có tác dụng gây độc mạnh nhất trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) với $IC_{50} = 0,23 \pm 0,03 \mu$ M. Các hợp chất Withanimine (**PA3**), physagulin P (**PA6**), physagulin L (**PA7**), physagulin M (**PA8**), (20*S*,22*R*)-15 α -acetoxy-5 α -chloro-6 β ,14 β -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 μ M. 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 apoptosis 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 4 β -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 μ M. 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 *Physalis angulata* là physalucoside A (**PA1**), physagulin P (**PA6**), physagulin Q (**PA12**). Từ loài *Physalis 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 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 Xuân, 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-inflammatory 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 Công nghệ Sinh học* 20(1):81-87

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray (2021), "*Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*", *A Cancer Journal for Clinicians*. 71(3), p. 209-249.
2. G. Landskron, M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, and M.A. Hermoso (2014), "*Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment*", *Journal of Immunology Research*. 2014, p. 1-20.
3. Z. Tan, H. Xue, Y. Sun, C. Zhang, Y. Song, and Y. Qi (2021), "*The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer*", *Frontiers in Pharmacol.* 12, p. 1-13.
4. W. Kooti, K. Servatiari, M. Behzadifar, M. Asadi-Samani, F. Sadeghi, B. Nouri, and H. Z. Marzouni (2017), "*Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2*" , *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 22, p. 1-14.
5. A. G. Desai, G. N. Qazi, R. K Ganju, M. El-Tamer, J. Singh, A. K. Saxena, Y. S Bedi, S. C. Taneja, and H. K. Bhat (2008), "*Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention*", *Current drug metabolism*. 9. p. 581-91.
6. T. Khan, M. Ali, A. Khan, P. Nisar, S. A. Jan, S. Afridi, and Z. K. Shinwari (2019), "*Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects*", *Biomolecules*. 10 (47), p. 1-31.
7. Viện Dược Liệu (2016), "*Danh lục cây thuốc Việt Nam*", Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.
8. T. N. L. Huong, L. A. Van, N. D. Thanh, N. T. T. Suong, N. H. Phuong, and N. Đ. C. Tien (2016), "*Chemical constituents of Physalis angulata L. (Family solanaceae)*", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2, p. 46-49.

9. H. T. Hoa, N. T. Dong, T. T. Oanh, L. V. Dung, H. Đ. Khoa, and Đ. T. T. Hien (2017), "*Flanovid phân lập từ cây tầm bóp*", Tạp chí dược liệu. 22(2), p. 72-77.
10. V. Đ. Hoa and N.N. Lanh (2015), "*Sinh lý bệnh và miễn dịch*", Nhà xuất bản y học. p.19-29.
11. N. Fujiwara and K. Kobayashi (2005), "*Macrophages in Inflammation*", Current Drug Targets - Inflammation & Allergy. 4 (3), p. 281-286.
12. H. J. An, I. T. Kim, H. J. Park, H. M. Kim, J. H. Choi, and K. T. Lee (2011), "*Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from Rosa rugosa, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ b pathway in RAW 264.7 macrophages*", International immunopharmacology. 11 (4), p. 504-510.
13. S. F. Kim, D. A. Huri, and S. H. Snyder (2005), "*Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2*", Science. 310 (5756), p. 1966-1970.
14. J. Shi, H. Li, S. Liang, S. E. Evivie, G. Huo, B. li, and F. Liu (2022), "*Selected lactobacilli strains inhibit inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages by suppressing the TLR4-mediated NF- κ B and MAPKs activation*", Food Science and Technology. 42, p. 1-12.
15. L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, and L. Zhao (2015), "*Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*", Oncotarget. 9 (6), p. 7204-7218 .
16. T. R. Machado and P.G. Pascutti (2021) , "*The p38 MAPK Inhibitors and Their Role in Inflammatory Diseases*, ChemistrySelect. 6(23), p. 5729-5742.
17. C. S. Nworu and P. A. Akah (2015), "*Anti-inflammatory medicinal plants and the molecular mechanisms underlying their activities*", African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines. 12, p. 52-61.
18. K. Tsujimoto, A. Hayashi, T. J. Ha, and I. Kubo (2007), "*Anacardic Acids and Ferric Ion Chelation*", Journal of biosciences. 62(9-10), p. 710-716.

19. S. O. Otimenyin (2018), "*Chapter 15 - Antiinflammatory Medicinal Plants: A Remedy for Most Disease Conditions*", Natural Products and Drug Discovery II Antiinflammatory Medicinal Plants. p. 411-431.
20. H. P. Ammon, H. Safayhi, T. Mack, and J. Sabieraj (1993), "*Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids*", Journal of Ethnopharmacology. 38(2), p. 113-119.
21. E. Skrzypczak-Jankun, N. P. McCabe, S. H. Selman, and J. Jankun (2000), "*Curcumin inhibits lipooxygenase by binding to its central cavity: Theoretical and X-ray evidence*", International journal of molecular medicine. 6 (5), p. 521-526.
22. K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee, and P. Isakson (1994), "*Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain*", Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America. 91(25), p. 12013-12017.
23. C. S. Williams, M. Mann, and R. N. DuBois (1999), "*The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*", Oncogene. 18 (5), p. 7908-7916.
24. G. Yuan, M. L. Wahlqvist, G. He, M. Yang, and D. Li (2006), "*Natural products and anti-inflammatory activity*", Asia Pacific Journal Clinical Nutrition. 15(2), p. 143-152.
25. K. C. Srivastava, A. Bordia, and S. K. Verma (1995), "*Curcumin, a major component of food spice turmeric (Curcuma longa) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets*", Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 52(4), p. 223-227.
26. H. Jiang, C. S. Deng, M. Zhang, and J. Xia (2006), "*Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2*", World Journal of Gastroenterology. 12(24): p. 3848-3853.

27. T. Kobayashi, S. Hashimoto, and T. Horie (1997), "*Curcumin inhibition of Dermatophagoides farinae-induced interleukin-5 (IL-5) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) production by lymphocytes from bronchial asthmatics*", *Biochemical Pharmacology*. 54(7), p. 819-824.
28. B. Y. Kang, S. W. Chung, W. Chung, S. Im, S. Y. Hwang, and T. S. Kim (1999), "*Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated macrophages by curcumin*", *European Journal of Pharmacology*. 384(2), p. 191-195.
29. P. Bremner and M. Heinrich (2005), "*Natural Products and their Role as Inhibitors of the Pro-Inflammatory Transcription Factor NF- κ B*", *Phytochemistry Reviews*. 4 (1), p. 27-37.
30. P. Rungeler, V. Castro, G. Mora, N. Goren, W. Vichnewski, H. L. Pahl, I. Merfort, and T. J. Schmidt (1999), "*Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 7 (11), p. 2343-2352
31. M. C. Recio, M. Prieto, M. Bonucelli, C. Orsi, S. Mnez, R. M. Giner, M. Cerd-Nicols, and J. L. Ros (2004), "*Anti-inflammatory Activity of Two Cucurbitacins Isolated from Cayaponia tayuya roots*", *Planta medica*. 70 (5), p. 414-420.
32. C. S. Park, H. Lim, K. J. Han, S. H. Baek, H. O. Sohn, D. W. Lee, Y. G. Kim, H. Y. Yun, K. J. Baek, and N. S. Kwon (2004), "*Inhibition of nitric oxide generation by 23,24-dihydrocucurbitacin D in mouse peritoneal macrophages*", *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 309(2), p. 705-710.
33. R. R. Peters, T. F. Saleh, M. Lora, C. Patry, A. J. Brum-Fernandes, M. R. Farias, and R. M. Ribeiro-do-Valle (1999), "*Anti-inflammatory effects of the products from Wilbrandia ebracteata on carrageenan-induced pleurisy in mice*", *Life Sciences*. 64 (26), p. 2429-2431.

34. L. E. Pelzer, T. Guardia, A. O. Juarez, and E. Guerreiro (1998), "*Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids*", *Farmacologia*. 53(6): p. 421-424.
35. S. P. Hehner, T. G. Hofmann, W. Droge, and M. L. Schmitz (1999), "*The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase complex*", *Journal of immunology*. 163 (10), p. 5617-5623.
36. H. Wang, M. G. Nair, G. M. Strasburg, Y. C. Chang, A. M. Booren, J. I. Gray, and D. L. DeWitt (1999), "*Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries*", *Journal of Natural Products*. 62(2), p. 294-296.
37. D.X. Hou, T. Yanagita, T. Uto, S. Masuzaki, and M. Fujii (2005), "*Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved*", *Biochemical pharmacology*. 70(3), p. 417-25.
38. G. Mathur, S. Nain, and P. K. Sharma, (2015), "*Cancer: An overview*", *Academic Journal of Cancer Research*. 8(1), p. 01-09.
39. Q. Song, S. D. Merajver, and J.Z. Li (2015), "*Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems*", *Hum Genomics*. 9(27), p. 1-8.
40. S. Rashid (2017), "*Cancer and Chemoprevention: An Overview*", *Springer Nature*.16, p. 35-50
41. L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu, and J. K. Bao (2012), "*Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*", *Cell Proliferation*. 45(6), p. 487-498.
42. D. Hanahan and R.A. Weinberg (2011), "*Hallmarks of cancer: the next generation*", *Cell*.144(5), p. 646-674.
43. J. Iqbal, B. A. Abbasi, T. Mahmood, S. Kanwal, B. Ali, S. A. Shah, and A. T. Khalil (2017), "*Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach*", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(12), p.1129-1150.

44. M. Kavallaris (2010), *Microtubules and resistance to tubulin-binding agents*, Nature Reviews Cancer. 10(3): p. 194-204.
45. K. Gerald, J. Iwasa, and W. Marshall (2005), "*Cell and Molecular Biology: concepts and experiments*", Publisher Wiley. p. 299-309.
46. C. A. López and J. C. Menendez (2008), "*Anticancer Drugs Targeting Tubulin and Microtubules*", Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 25 (8), p. 229-249.
47. V. D. Vaart, B. A. Akhmanova, and A. Straube (2009), "*Regulation of microtubule dynamic instability*", Biochem Society Transactions. 37(5), p. 1007-1013.
48. Z. Cheng, X. Lu, and B. Feng (2020), "*A review of research progress of antitumor drugs based on tubulin targets*", Transl Cancer Res. 9(6), p. 4020-4027.
49. V. Srivastava, A. S. Negi, J. K. Kumar, M. M. Gupta, and P S Khanuja (2005), "*Plant-Based Anticancer Molecules: A Chemical and Biological Profile of Some Important Leads*", Bioorganic & medicinal chemistry. 13(21), p. 5892-5908.
50. P. J. O'Dwyer, B. Leyland-Jones, M. T. Alonso, S. Marsoni, and R. E. Wittes (1985) "*Etoposide (VP-16-213). Current status of an active anticancer drug*", New England Journal of Medicine. 312(11), p. 692-700.
51. I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, and J. P. Burnett (1963), "*The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents*", Cancer Research. 23(8), p. 1390-1427.
52. P. D. Uma (1996), "*Basics of carcinogenesis*", Drug and chemical toxicology. 19(3), p. 133-148.
53. M. Jacoby (2005), "*Taxol*", Chemical & Engineering News. 83(25), p.120.
54. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail (1971), "*Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*", Journal of the American Chemical Society. 93(9), p. 2325-2327.

55. M. A. Jordan and L. Wilson (2004), "*Microtubules as a target for anticancer drugs*", *Nature Reviews Cancer*. 4(4), p. 253-265.
56. J. L. Delgado, C. M. Hsieh, N. L. Chan, and H. Hiasa (2018), "*Topoisomerases as anticancer targets*", *Biochem Journal*. 475(2), p. 373-398.
57. M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, and G. A. Sim (1966), "*Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from Camptotheca acuminata*", *Journal of the American Chemical Society*. 88(16): p. 3888-3890.
58. V. J. Venditto and E. E. Simanek (2010), "*Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of the in Vivo Literature*", *Molecular Pharmaceutics*.7(2), p. 307-349.
59. J. Mann (2002), "*Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future*", *Nature Reviews Cancer*. 2(2), p. 143-148.
60. A. Bhanot, R. Sharma and M. Noolvi (2011), "*Natural sources as potential anti-cancer agents: A review*", *International Journal of Phytomedicine*. 3, p.09-26.
61. A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill (2008), "*Cancer-related inflammation*", *Nature*. 454(7203), p. 436-444.
62. G. Multhoff, M. Molls, and J. Radons (2011), "*Chronic inflammation in cancer development*", *Front Immunol*. 2(98), p. 1-17.
63. P. Pisani, D. M. Parkin, N. Muñoz, and J. Ferlay (1997), "*Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990*", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 6(6), p. 387-400.
64. F. R. Greten, L. Eckmann, T. F. Greten, J. M. Park, Z. W. Li, L. J. Egan, M. F. Kagnoff, and M. Karin (2004), "*IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*", *Cell*. 118(3), p. 285-296.

65. E. Pikarsky, R. M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. G. Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah (2004), "*NF-kB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*", *Nature*. 431(7007), 461-466.
66. M. D. Barber, J. J. Powell, S. F. Lynch, K. C. Fearon and J. A. Ross (2000), "*A polymorphism of the interleukin-1 β gene influences survival in pancreatic cancer*", *British Journal of Cancer*. 83(11), p. 1443-1447.
67. M. M. Jong, I. M. Nolte, G. J. Meerman, W. T. A. Graaf, E. G. E. Vries, R. H. Sijmons, R. M. W. Hofstra, and J. H. Kleibeuker (2002), "*Low-penetrance Genes and Their Involvement in Colorectal Cancer Susceptibility*", *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 11(11), p. 1332-1352.
68. L. Coussens and Z. Werb (2002), "*Inflammation and Cancer*", *Nature*. 420(6917), p. 860-867.
69. F. Balkwill, K. Charles and A. Mantovani (2005), "*Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*", *Cancer cell*. 7(3), p. 211-217.
70. B. B. Aggarwal and P. Gehlot (2009), "*Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients*", *Curr Opin Pharmacol*. 9(4), p. 351-69.
71. A. Ekblom (1998), "*Risk Factors and Distinguishing Features of Cancer in IBD*", *Inflammatory Bowel Diseases*. 4(3), p. 235-243.
72. S. A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford, C. Cole, C. Y. Kok, D. Beare, M. Jia, R. Shepherd, K. Leung, A. Menzies, J. W. Teague, P. J. Campbell, M. R. Stratton, and P. A. Futreal (2011), "*Cosmic: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*", *Nucleic Acids Research*. 39, p. 945-950.
73. E. Meylan, A. L. Dooley, D. M. Feldser, L. Shen, E. Turk, C. Ouyang, and T. Jacks (2009), "*Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma*", *Nature*. 462(7269): p. 104-107.

74. H. Yu, D. Pardoll, and R. Jove (2009), "*STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*", *Nat Rev Cancer*. 9(11), p. 798-809.
75. H. Lee, A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll, and H. Yu (2009), "*Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors*", *Cancer Cell*. 15(4), p. 283-293.
76. J. Sharma, A. Al-Omran, and S.S. Parvathy (2007), "*Role of nitric oxide in inflammatory disease*", *Inflammopharmacology*. 15(6), p. 252-259.
77. N. B. Đuc (2009), "*Ung thư học đại cương*", Nhà xuất bản Y học.
78. T. F. Imbert (1998), "*Discovery of podophyllotoxins*", *Biochimie*. 80(3), p. 207-222.
79. C. M. Pfeffer and A. T. K. Singh (2018), "*Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy*", *International journal of molecular sciences*. 19(2), p. 448-458
80. S. Elmore (2007), "*Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death*", *Toxicologic pathology*. 35(4), p. 495-516.
81. Z. Jin and W. El-Deiry (2005), "*Overview of cell death signaling pathways*", *Cancer biology therapy*. 4(2), p. 139-163.
82. R. S. Y. Wong (2011), "*Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment*", *Journal of experimental & clinical cancer research*. 30(1): p. 87-101.
83. Z. Szondy, Z. Sarang, B. Kiss, E. Garabuczi, and K. Köröskényi (2017), "*Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance*", *Frontiers in Immunology*. 8 (909), p. 1-10.
84. Y. Z. Li, Y. M. Pan, X. Y. Huang, and H. S. Wang (2008), "*Withanolides from Physalis alkekengi var. francheti*", *Helvetica Chimica Acta*. 91(12), p. 2284-2291.
85. V.V. Hợp (2018), "*Thực vật chí Việt Nam*", Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và công nghệ. 17, p. 42-44.

86. N. Mazova, V. Popova, and A. Stoyanova (2020), "*Phytochemical composition and biological activity of Physalis spp A mini-review*", Food Science and Applied Biotechnology. 3(1), p. 56-70.
87. W. N Zhang and W. Y. Tong (2016), "*Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus Physalis*", Chemistry biodiversity. 13(1), p.48-65.
88. K. H. Timotius, A. Tjajindra, and S. E. Sudradjat (2021), "*Potential anti-inflammation of Physalis angulata L*", International Journal of Herbal Medicine. 9(5), p. 50-58.
89. C. P. Sun, C. Y. Qiu, T. Yuan, X. F. Nie, H. X Sun, Q. Zhang, H. X. Li, L. Q. Ding, F. Zhao, L. X Chen, and F. Qiu (2016), "*Antiproliferative and Anti-inflammatory Withanolides from Physalis angulata*", Journal of natural products. 79(6), 1586-1597.
90. E. Maldonado, N. E. Hurtado, A. L. Pérez-Castorena, and M. Martínez (2015), "*Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from Physalis angulata*", Steroids. 2015. 104, p. 72-78
91. E. M. Reyes-Reyes, Z. Jin, A. J Vaisberg, G. B Hammond, and P. J Bates (2013), "*Physangulidine A, a withanolide from Physalis angulata, perturbs the cell cycle and Induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells*", Journal of natural products. 76(1), p. 2-7.
92. W. T. Hsieh, K. Y. Huang, H. Y. Lin, and J. G. Chung (2006), "*Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells*", Food and chemical toxicol. 44(7), p. 974-83.
93. S. Y. Wu, Y. L. Leu, Y. L. Chang, T. S. Wu, P. C. Kuo, Y. R Liao, C. M. Teng, and S. L. Pan (2012), "*Physalin F Induces Cell Apoptosis in Human Renal Carcinoma Cells by Targeting NF-kappaB and Generating Reactive Oxygen Species*", PloS one. 7(7): p. 1-10.
94. C. C. Hsu, Y. C. Wu, L. Farh, Y. C. Du, W. K. Tseng, C. C. Wu, and F. R. Chang (2012), "*Physalin B from Physalis angulata triggers the NOXA-*

- related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells*", Food and chemical toxicology. 50(4), p. 619-624.
95. H. C. Chiang, S. M. Jaw, and P.M. Chen (1992), "*Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro*", Anticancer Research. 12(4), p. 1155-62. .
 96. C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P. E. Puig, C. Didelot, and G. Kroemer (2006), "*Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*", Cell death and differentiation. 13(9): p. 1423-1433.
 97. T. Ma, W. N. Zhang, L. Yang, C. Zhang, R. Lin, S. M. Shan, M. D. Zhu, J. G. Luo, and L. Y. Kong (2016), "*Cytotoxic withanolides from Physalis angulata var. villosa and the apoptosis-inducing effect via ROS generation and the activation of MAPK in human osteosarcoma cells*", RSC Advances. 6(58), p. 53089-53100.
 98. T. N. L. Huong, L. N. Thao, N. T. A. Thu, P. T. Hang, and T. K. My (2020), Một số kết quả bước đầu khảo sát chế biến trà túi lọc thù lù cạnh (*Physalis angulata* L), Kỷ yếu Hội thảo quốc gia Nghiên cứu và phát triển sản phẩm tự nhiên lần 7. 1, p. 118-126.
 99. M. B. P. Soares, M. C. Bellintani, I. M. Ribeiro, T. C. B. Tomassini, and R. R. Santos (2003), "*Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from Physalis angulata L*", European journal of pharmacology. 459(1), p. 107-112.
 100. G. N. T. Bastos, A. J. A. Silveira, C. G. Salgado, D. L. W. Picanço-Diniz, and J. L. M. Nascimento (2008), "*Physalis angulata extracts exerts anti-inflammatory effects in rats inhibiting different pathways*", Journal of ethnopharmacology. 118(2): p. 246-251
 101. N. B. Pinto, T. C. Morais, K. M. B. Carvalho, C. R. Silva, G. M. Andrade, G. A. C. Brito, M. L. Veras, O. D. L. Pessoa, V. S. Rao, and F. A. Santos (2010), "*Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from Physalis angulata on experimental dermatitis in mice*", Phytomedicine. 17(10), p. 740-743.

102. L. Sun, J. Liu, D. Cui, J. Li, Y. Yu, L. Ma, and L. Hu (2009), "*Anti-inflammatory function of Withangulatin A by targeted inhibiting COX-2 expression via MAPK and NF-kappa B pathways*", Journal of cellular biochemistry. 109(3), p. 532-541.
103. Y. H. Lin, Y. H. Hsiao, Y. H. Kuo, Y. P. Lim, and W. T. Hsieh (2020), "*Physalin A attenuates inflammation through down-regulating c-Jun NH2 kinase phosphorylation/Activator Protein 1 activation and up-regulating the antioxidant activity*", Toxicology and Applied Pharmacology. 402, p. 1-48.
104. L. Wang, S. Lu, L. Wang, M. Xin, Y. Xu, G. Wang, D. Chen, L. Chen, S. Liu, and F. Zhao (2021), "*Anti-inflammatory effects of three withanolides isolated from Physalis angulata L. in LPS-activated RAW 264.7 Cells through Blocking NF- κ B Signaling Pathway*", Journal of ethnopharmacol. 276, p. 1-11.
105. P. Shah and K.S. Bora (2019), "*Phytochemical and therapeutic potential of Physalis species: a review*", Journal of pharmacy and biological sciences. 14(4), p. 34-51.
106. K. L. Ooi, T. S. T. Muhammad, C. H. Lim, and S. F. Sulaiman (2010), "*Apoptotic effects of Physalis minima L chloroform extract in human breast carcinoma T-47D Cells Mediated by c-myc, p53- ,and Caspase- 3 dependent pathways*", Integrative cancer therapies. 9(1), p. 73-83.
107. D. L. Chothani and H. Vaghasiya (2012), "*A phyto-pharmacological overview on physalis minima linn*", Indian journal of natural products and resources. 3(4): p. 477-482.
108. M. Zhang, B. Jiang, X. He, S. Cao, L. Ding, N. Kang, L. Chen, and F. Qiu (2020), "*New cytotoxic withanolides from Physalis minima*", Fitoterapia. 146, p. 104728.
109. X.M. Xu, Y. Z. Guan, S. M. Shan, J. G. Luo, and L. Y. Kong (2016), "*Withaphysalin-type withanolides from Physalis minima*", Phytochemistry Letters. 15, p. 1-6.

110. R. J. Li, C. Y. Gao, C. Guo, M. M. Zhou, J. Luo, and L. Y. Kong (2017), "*The anti-inflammatory activities of two major Withanolides from Physalis minima via acting on NF- κ B, STAT3 and HO-1 in LPS-stimulated RAW264.7 Cells*", *Inflammation*. 40(2): p. 401-413.
111. J. Wu, T. Zhang, M. Yu, H. Jia, H. Zhang, Q. Xu, Y. Gu, and Z. Zou (2020), "*Anti-inflammatory Withanolides from Physalis minima*", *ACS Omega*. 5(21), p. 12148-12153.
112. M. Gaestel, A. Kotlyarov and M. Kracht (2009), "*Targeting innate immunity protein kinase signaling in inflammation*", *Nature reviews. Drug discovery*, 8(6): p. 480-499.
113. D. E. Rivera, Y. C. Ocampo, J. P. Castro, L. Barrios, F. Diaz, and L. A. Franco (2019), "*A screening of plants used in Colombian traditional medicine revealed the anti-inflammatory potential of Physalis angulata calyces*", *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26(7): p. 1758 - 1766.
114. M. A. Khan, H. Khan, S. Khan, T. Mahmood, P. M. Khan, and A. Jabbar (2008), "*Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of Physalis minima Linn*". *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 24(3), p. 632-637.
115. W. Cao, H. D. Chen, Y. W. Yu, N. Li, and W. Q. Chen (2021), "*Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020*". *Chinese medical Journal*. 134(7), p. 783-791.
116. M. Zhang, B. Zhang, C. Guang, B. Jiang, X. He, S. Cao, L. Ding, N. Kang, L. Chen, and F. Qiu (2020), "*New withanolides from Physalis minima and their cytotoxicity against A375 human melanoma cells*", *RSC Advances*. 10(38), p. 22819-22827.
117. N. Berdigaliyev and M. Aljofan (2020), "*An overview of drug discovery and development*", *Future Medicinal Chemistry*. 12(10), p. 939-947.

118. Tilaoui, M., H. Ait Mouse, and A. Ziad (2021), "*Update and New Insights on Future Cancer Drug Candidates From Plant-Based Alkaloids*", *Frontiers in Pharmacology*. 12, p. 719694-719713.
119. J. Sharifi-Rad, A. Ozleyen, T. B. Tumer, C. O. Adetunji, N. E. Omari, A. Balahbib, Y. Taheri, A. Bouyahya, M. Martorell, N. Martins, and W. C. Cho (2019), "*Natural Products and Synthetic Analogs as a Source of Antitumor Drugs*", *Biomolecules*. 9(11), p. 679-732.
120. R. Bansal and P. Acharya (2014), "*Man-Made Cytotoxic Steroids: Exemplary Agents for Cancer Therapy*", *Chemical reviews*. 114(14), p. 6986-7005.
121. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, and A. Vaigro-Wolff (1991), "*Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines*", *Journal of the National Cancer Institute*. 83(11): p. 757-766.
122. S. Nagafuji, H. Okabe, H. Akahane and F. Abe (2004), "*Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of Physalis angulata*", *Biological and pharmaceutical bulletin*. 27(2), p. 193-197.
123. H. E. Gottlieb, M. C. Subhash, C. S. Mahendra, S. A. Bagchia, A. A. Anil and B. Raya (1987), "*Withaminimin, a withanolide from Physalis minima*", *Phytochemistry*. 26(6), p. 1801-1804.
124. K. Shingu, S. Yahara, T. Nohara, H. Okabe (1992), "*Three New Withanolides, Physagulins A, B and D from Physalis angulata L*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 40(8), p. 2088-2091.
125. Q. P. He, L. Ma, J. Y. Luo, F. Y. He, L. G. Lou, and L. H. Hu (2007), "*Cytotoxic Withanolides from Physalis angulata L*", *Chemistry Biodivers*. 4(3), p. 443-449.
126. Y. W. L. Yang, C. Zhang, and C. Y. Gao (2017), "*Physagulide Q suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*

- by regulating the ROS-JAK2/Src-STAT3 signaling pathway*", Royal Society of Chemistry Advances. 7(21), p. 12793-12804.
127. R. Niero, I. T. D. Silva, G. C. Tonial, B. D. S. Camacho, E. Gacs-Baitz, G. D. Monache, and F. D. Monache (2006), "*Cilistepoxide and cilistadiol, two new withanolides from Solanum sisymbriifolium*", Natural Product Research. 20(13): p. 1164-1168.
128. A. H. Januário, E. R. Filho, R. C. L. R. Pietro, S. Kashima, D. N. Sato, and S. C. França (2002), "*Antimycobacterial physalins from Physalis angulata L. (Solanaceae)*", Phytother Research. 16(5), p. 445-448.
129. Y. M. Xu, E. M. K. Wijeratne, A. L. Babyak, H. R. Marks, A. D. Brooks, P. Tewary, L. -J. Xuan, W. -Q. Wang, T. J. Sayers, and A. A. L. Gunatilaka (2017), "*Withanolides from aeroponically grown Physalis peruviana and their selective cytotoxicity to prostate cancer and renal carcinoma cells*", Journal of Natural Products. 80(7), p. 1981-1991.
130. M. Sahai, N. Partha, and A. B. Ray (1982), "*Structures of withaperuvin B and C, whithanolides of physalis peruviana roots*", Hêtrocycles. 19 (1), p. 37-40.
131. K. Sakurai, H. Ishii, S. Kobayashi, and T. Iwao (1976), "*Isolation of 4 β -Hydroxywithanolide E, a New Withanolide from Physalis peruviana L*" , Chemical Pharmaceutical Bulletin. 24(6), p. 1403-1405.
132. N. D. Abdullaev, O. E. Vasina, V. A. Maslennikova, and N. K. Abubakirov (1985), "*Withasteroids of Physalis. V. A study of the 1H and 13C NMR spectra of the withasteroids visconolide and 28-hydroxywithaperuvin C*", Chemistry of natural compounds. 21(5), p. 616-622.
133. M. Sang-Ngern, U. J. Youn, E. -J. Park, T. P. Kondratyuk, C. J. Simmons, M. M. Wall, M. Ruf, S. E. Lorch, E. Leong, J. M. Pezzuto, and L. C. Chang (2016), "*Withanolides Derived from Physalis peruviana (Poha) with*

- Potential Antiinflammatory Activity*", Bioorganic Medicinal Chemistry Letters. 26(12), p. 2755-2759.
134. A. M. Abou-Douh (2002), "*New withanolides and other constituents from the fruit of Withania somnifera*", Archiv der Pharmazie. 335(6), p. 267-276.
135. N. Ruwizhi and B. Aderibigbe (2020), "*Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy*", International Journal of Molecular Sciences. 21(16), p. 5712-5746.
136. D. Ribeiro, C. Proença, C. Varela, J. Janela, E. J. Tavares da Silva, E. Fernandes, and F. M. F. Roleira (2019), "*New phenolic cinnamic acid derivatives as selective COX-2 inhibitors. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationships*", Bioorganic Chemistry. 91, p. 103179- 103214.
137. M. Huang, J. X. He, H. X. Hu, K. Zhang, X. N. Wang, B. B. Zhao, H. X. Lou, D. M. Ren and T. Shen (2020), "*Withanolides from the genus Physalis: a review on their phytochemical and pharmacological aspects*", J Pharm Pharmacol. 72(5), p. 649-669.
138. A. Sharipov, K. Tursunov, S. Fazliev, B. Azimova, and J. Razzokov (2021), "*Hypoglycemic and Anti-Inflammatory Effects of Triterpene Glycoside Fractions from Aeculus hippocastanum Seeds*", Molecules. 26(13), p. 3784-3796.
139. Y. J. Yang, L. Yi, Q. Wang, B. B. Xie, Y. Dong, and C. W. Sha (2017), "*Anti-inflammatory effects of physalin E from Physalis angulata on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through inhibition of NF- κ B pathway*", Immunopharmacol Immunotoxicol. 39(2), p. 74-79.
140. R. M. Duarte de Cruz, F. J. B. Mendonça-Junior, N. Barbosa de Mélo, L. Scotti, R. S. Aquino de Araújo, R. Nóbrega de Almeida, and R. Olímpio de Moura (2021), "*Thiophene-Based Compounds with Potential Anti-Inflammatory Activity*", Pharmaceuticals. 14(7): p. 692-708.

141. Y. Yang, L. Yi, Q. Wang, and B. Xie (2018), "*Physalin B suppresses inflammatory response to lipopolysaccharide in RAW264. 7 cells by inhibiting NF- κ B signaling*", Journal of Chemistry. 4, p. 1-6.
142. A. T. Vieira, V. Pinho, L. B. Lepsch, C. Scavone, I. M. Ribeiro, T. Tomassini, R. R. Santos, M. B. P. Soares, M. M. Teixeira, and D. G. Souza (2005), "*Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury*", British journal of pharmacology. 146(2), p. 244-51.
143. C. S. Meira, J. W. C. Soares, B. P. Z. Claro Dos Reis, L. V. Pacheco, I. P. Santos, D. K. C. Silva, J. Costa de Lacerda, S. R. T. Daltro, E. T. Guimarães, and M. B. P. Soares (2022), "*Therapeutic Applications of Physalins: Powerful Natural Weapons*", Frontiers in Pharmacology. 1, p. 1-14.
144. N. J. Jacobo-Herrera, P. Bremner, N. Marquez, M. P. Gupta, S. Gibbons, E. Muñoz, and M. Heinrich (2006), "*Physalins from Witheringia s. olanacea as Modulators of the NF- κ B Cascade*", Journal of Natural Products. 69(3), p. 328-331.
145. B. A. Weber, R. K. Wolfram, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harrasi, and R. Csuk (2019), "*Unexpected cytotoxicity of a triisopropylsilylated syringaldehyde derived cinnamic acid amide*", Mediterranean Journal of Chemistry. 9(1), p. 45-51.
146. Y. Sun, T. Guo, F. B. Zhang, Y. N. Wang, Z. Liu, S. Guo, and L. Li (2020), "*Isolation and characterization of cytotoxic withanolides from the calyx of Physalis alkekengi L. var franchetii*", Bioorganic chemistry. 96(14), p. 103614-103622.
147. V. Shrihastini, P. Muthuramalingam, S. Adarshan, M. Sujitha, J. T. Chen, H. Shin, and M. Ramesh (2021), "*Plant derived bioactive compounds, their anti-cancer effects and in silico approaches as an alternative target treatment strategy for breast cancer: an updated overview*", Cancers. 13(24), p. 622-636.

148. Q. Zhang, N. N. Xu, X. Hu, and Y. Zheng (2020), "*Anti-colitic effects of Physalin B on dextran sodium sulfate-induced BALB/c mice by suppressing multiple inflammatory signaling pathways*", *Journal of Ethnopharmacology*. 259, p. 112956-113033.
149. Q. R. Li, H. J. Liang, B. L. Li, J. Yuan, Z. Y. Ao, Y. W. Fan, W. J. Zhang, X. Lian, J. Y. Chen, J. Z. Wang, and J. W. Wu (2022), "*Peruranolides A-D, four new withanolides with potential antibacterial and cytotoxic activity from Physalis peruviana L*", *Frontiers Bioscience*. 27(3), p. 98-106.
150. C. Fang, C. Chen, Y. Yang, K. Li, R. Gao, D. Xu, Y. Huang, Z. Chen, Z. Liu, S. Chen, X. Yu, Y. Li, and C. Zeng (2021), "*Physalin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in undifferentiated human gastric cancer HGC-27 cells*", *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2021. 18(3), p.224-231.
151. Y. M. Ma, W. Han, J. Li, L. H. Hu, and Y. B. Zhou (2015), "*Physalin B not only inhibits the ubiquitin-proteasome pathway but also induces incomplete autophagic response in human colon cancer cells in vitro*", *Acta pharmacologica Sinica*. 36(4), p. 517-27.
152. J. M. Shin, K. M. Lee, H. J. Lee, J. H. Yun, and C. W. Nho (2019), "*Physalin A regulates the Nrf2 pathway through ERK and p38 for induction of detoxifying enzymes*", *BMC Complementary Alternative Medicine*. 19(1), p.101-110.
153. Y. Fu, F. Zhu, Z. Ma, B. Lv, X. Wang, C. Dai, X. Ma, P. Liu, H. Lv, X. Chen, Z. Chen, and L. Shen (2021), "*Physalis alkekengi var. franchetii Extracts Exert Antitumor Effects on Non-Small Cell Lung Cancer and Multiple Myeloma by Inhibiting STAT3 Signaling*", *Onco Targets Therapy*. 14, p. 301-314.
154. J. Arbiser, M. Bonner, and L. Gilbert (2017), "*Targeting the duality of cancer*", *NPJ Precision Oncology*. 1(23), p. 1-7.

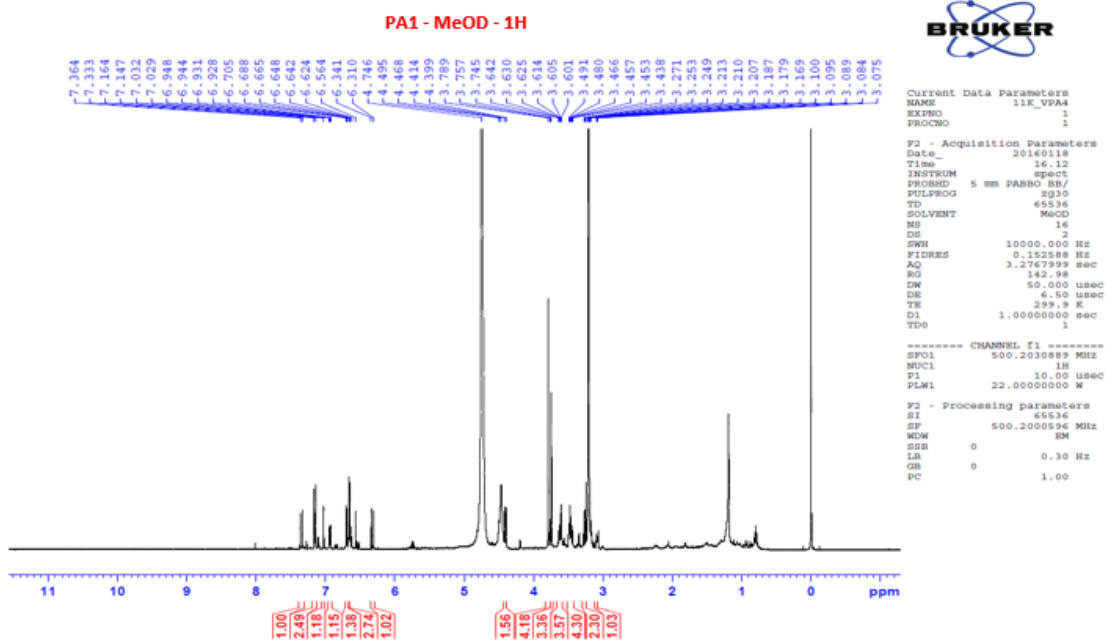
155. W. Xu, L. Jing, Q. Wang, C. C. Lin, X. Chen, J. Diao, Y. Liu, and X. Sun (2015), "*Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution*", *Oncotarget*. 6(30), p. 30017-30034.
156. Y. G Assaraf, A. Brozovic, A. C. Gonçalves, D. Jurkovicova, A. Line, M. Machuqueiro, S. Saponara, A. B. Sarmiento-Ribeiro, C. P. R. Xavier, and M. H. Vasconcelos (2019), "*The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer*", *Drug Resistance Updates*. 46, p. 100645 - 100723.
157. L. Motadi, M. Choene, and N. Mthembu (2020), "*Anticancer properties of *Tulbaghia violacea* regulate the expression of p53-dependent mechanisms in cancer cell lines*", *Scientific Reports*. 10(1), p. 12924-12935.
158. R. Farghadani and R. Naidu (2021), "*The Role of apoptosis as a double-edge sword in cancer - regulation and dysfunction of apoptosis*", *IntechOpen*. 11(4) p. 1-23.
159. G. Pistritto, D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi, and G. D'Orazi (2016), "*Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies*", *Aging*. 8(4), p. 603-619.
160. R. Jan and G. E. S. Chaudhry (2019), "*Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics*", *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 9(2), p. 205-218.
161. K. S. Negara, K. Suwiyoga, T. G. A. Pelayun, A. A. R. Sudewi, N. M. Astawa, G. N. K. Arijana, and K. Tunas (2018), "*The Role of Caspase-3, Apoptosis-Inducing Factor, and B-cell Lymphoma-2 Expressions in Term Premature Rupture of Membrane*", *Revista brasileira de ginecologia obstetrícia*. 40(12), p. 733-739.
162. M. Khodaei, M. Jafari, and M. Noori (2012), "*Remedial use of withanolides from *Withania coagulans* (Stocks) Dunal*", *Advances in Life Sciences*. 2(1), p.6-19.
163. B. Y. Yang, R. Guo, T. Li, Y. Liu, C.-F. Wang, Z. P. Shu, Z. B. Wang, J. Zhang, Y. G. Xia, H. Jiang, Q. H. Wang, and H. X. Kuang (2014), "*Five*

- Withanolides from the Leaves of datura metel L. and their inhibitory effects on Nitric Oxide production*", *Molecules*. 19(4), p. 4548-4559.
164. Q. Meng, J. Fan, Z. Liu, X. Li, F. Zhang, Y. Zhang, Y. Sun, L. Li, X. Liu, and Erbing Hua (2019), "*Cytotoxic Withanolides from the Whole Herb of Physalis angulata L*", *Molecules*. 24(8), p. 1608-1617.
165. R. Nassra, R. S. R. Mahrous, H. F. Sherif, and R. M. A. El-Khair (2017), "*Egyptian Withania somnifera L., Chemotype and Comparative in vitro Cytotoxic Activity of Extracts and Isolated Withanolides*", *European Journal of Medicinal Plants*. 21(3), p. 1-12.
166. C. J. Henrich, A. D. Brooks, K. L. Erickson, C. L. Thomas, H. R. Bokesch, P. Tewary, C. R. Thompson, R. J. Pompei, K. R. Gustafson, J. B. McMahon, and T. J. Sayers (2015), "*Withanolide E sensitizes renal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by increasing cFLIP degradation*", *Cell death & disease*. 2015. 6(2): p. 1-10.
167. Z. N. Ye, F. Yuan, J. Q. Liu, X. R. Peng, T. An, X. Li, L. M. Kong, M. H. Qiu, and Y. Li (2019), "*Physalis peruviana-Derived 4 β -Hydroxywithanolide E, a novel antagonist of Wnt Signaling, inhibits colorectal cancer in vitro and in vivo*", *Molecules*. 24(6), p. 1146-1159.

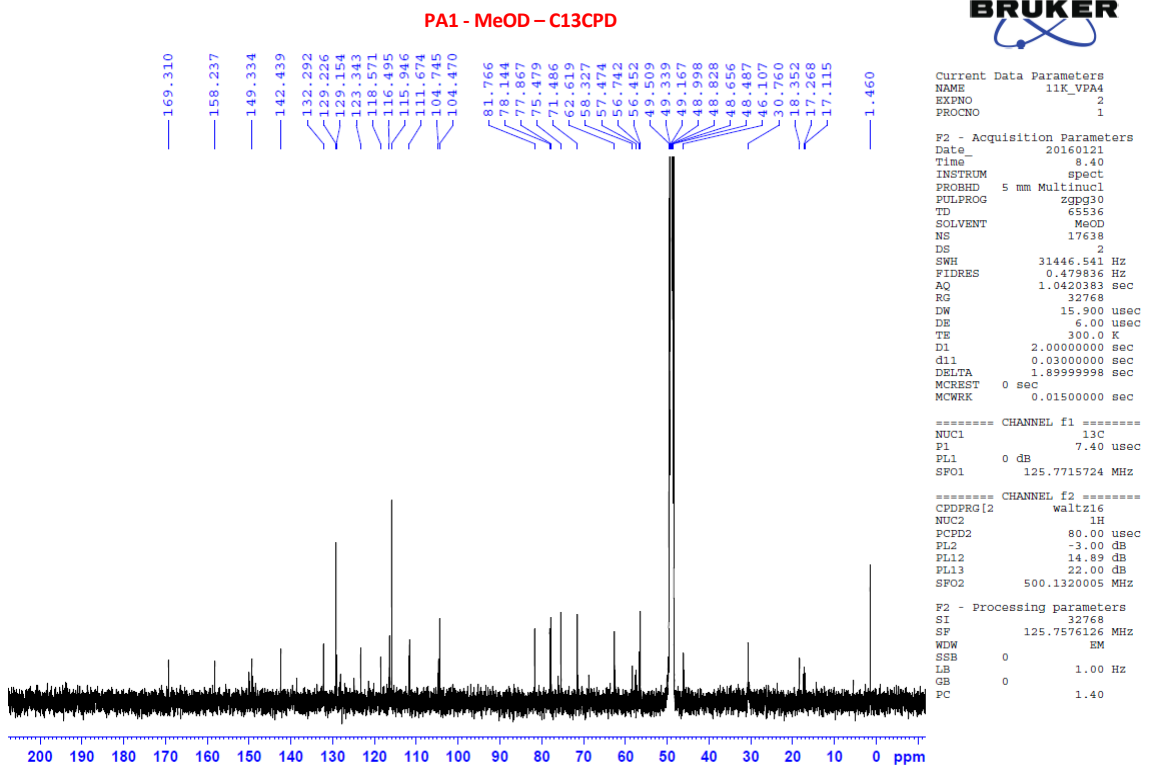
MỤC LỤC PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Các phổ của hợp chất PA1	2
Phụ lục 2. Các phổ của hợp chất PA2	5
Phụ lục 3. Các phổ của hợp chất PA3	8
Phụ lục 4. Các phổ của hợp chất PA4	11
Phụ lục 5. Các phổ của hợp chất PA5	13
Phụ lục 6. Các phổ của hợp chất PA6	15
Phụ lục 7. Các phổ của hợp chất PA7	19
Phụ lục 8. Các phổ của hợp chất PA8	21
Phụ lục 9. Các phổ của hợp chất PA9	23
Phụ lục 10. Các phổ của hợp chất PA10	24
Phụ lục 11. Các phổ của hợp chất PA11	26
Phụ lục 12. Các phổ của hợp chất PA12	27
Phụ lục 13. Các phổ của hợp chất PA13	31
Phụ lục 14. Các phổ của hợp chất PA14	33
Phụ lục 15. Các phổ của hợp chất PA15	35
Phụ lục 16. Các phổ của hợp chất PM1	37
Phụ lục 17. Các phổ của hợp chất PM2	39
Phụ lục 18. Các phổ của hợp chất PM3	41
Phụ lục 19. Các phổ của hợp chất PM4	44
Phụ lục 20. Các phổ của hợp chất PM5	46
Phụ lục 21. Các phổ của hợp chất PM6	48
Phụ lục 22. Kết quả giám định tên khoa học.....	51

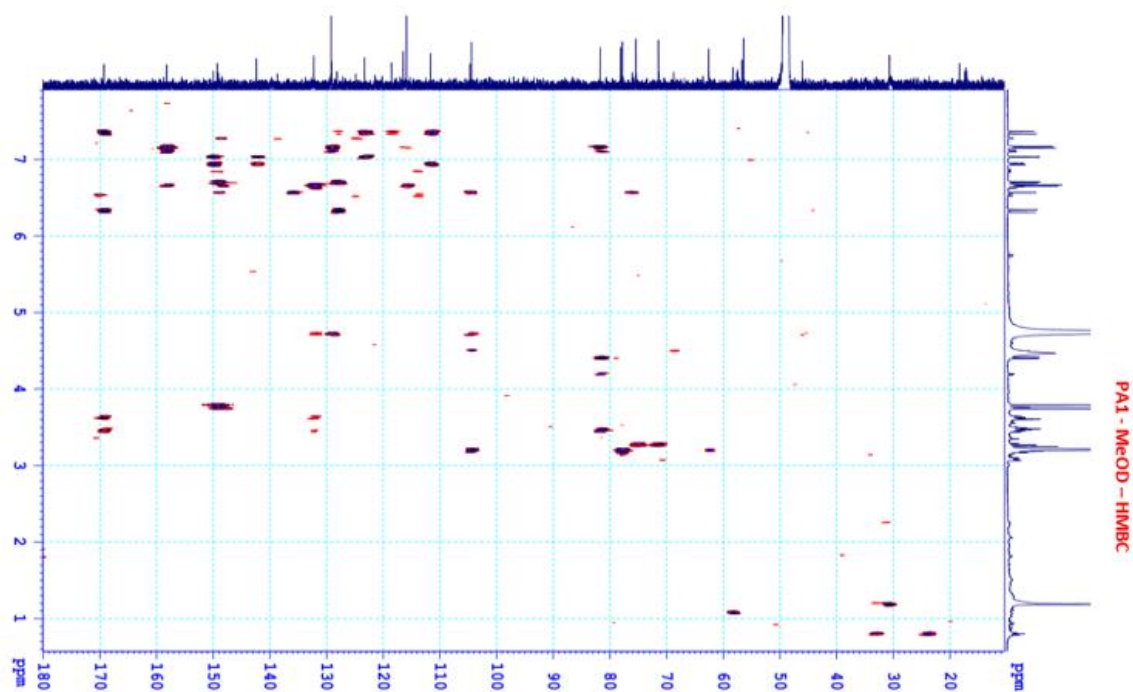
PHỤ LỤC 1. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA1



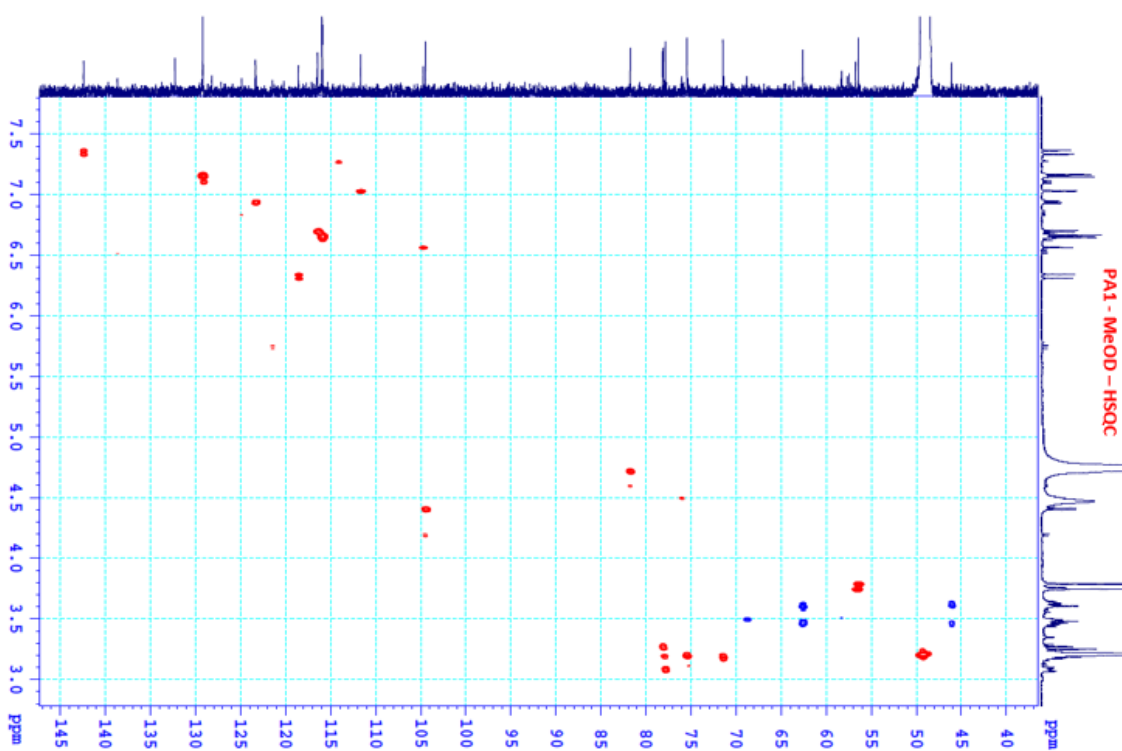
Phụ lục 1.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA1** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 1.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA1** (125 MHz, MeOD)



Phụ lục 1.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA1**(500/125 MHz, MeOD)

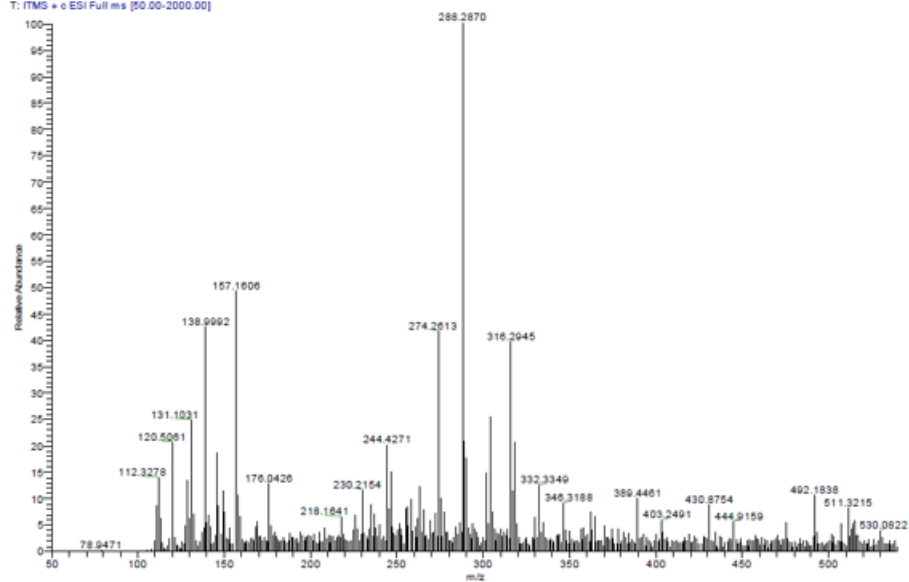


Phụ lục 1.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA1**(500/125 MHz, MeOD)

Lab: Materials chemistry, Faculty of Chemistry, HUS-VNU
19 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Ha Noi
Tel: 844.38.253.053; Fax: 844.38.241.140 Mail: Chem.vnu@edu.vn

MEOH 9/8/2016 11:55:01 AM

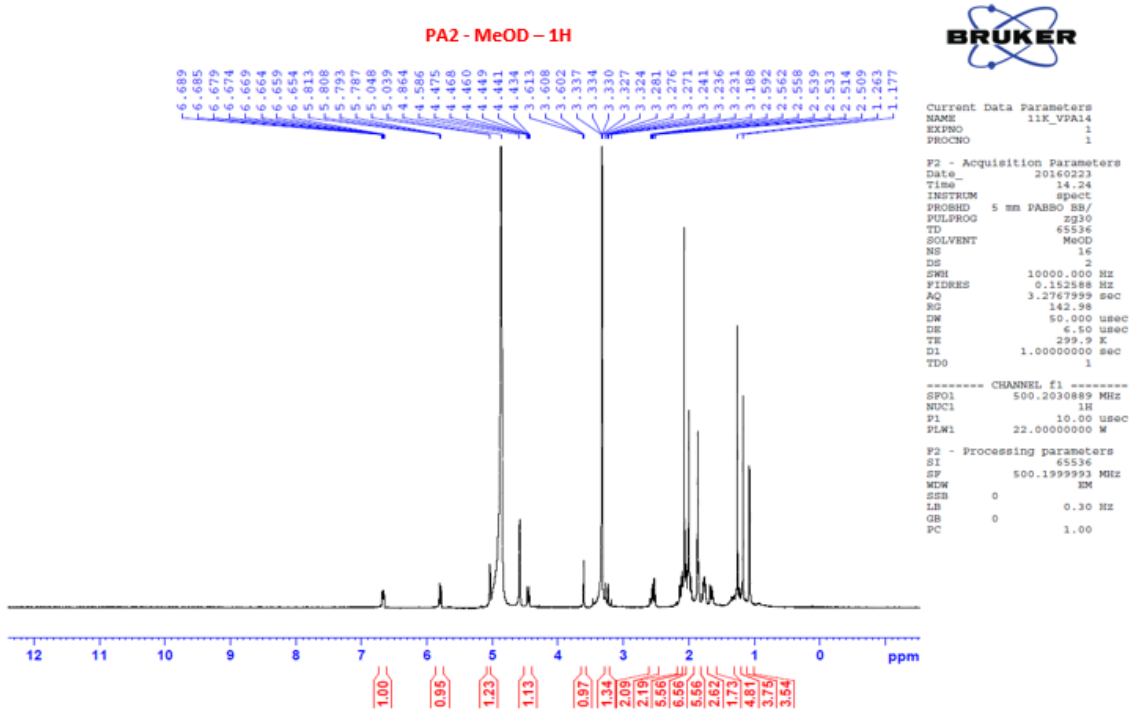
HUYEN_VPA4_160908112747 #61 RT: 0.56 AV: 1 NL: 4.86E6
T: FTMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]



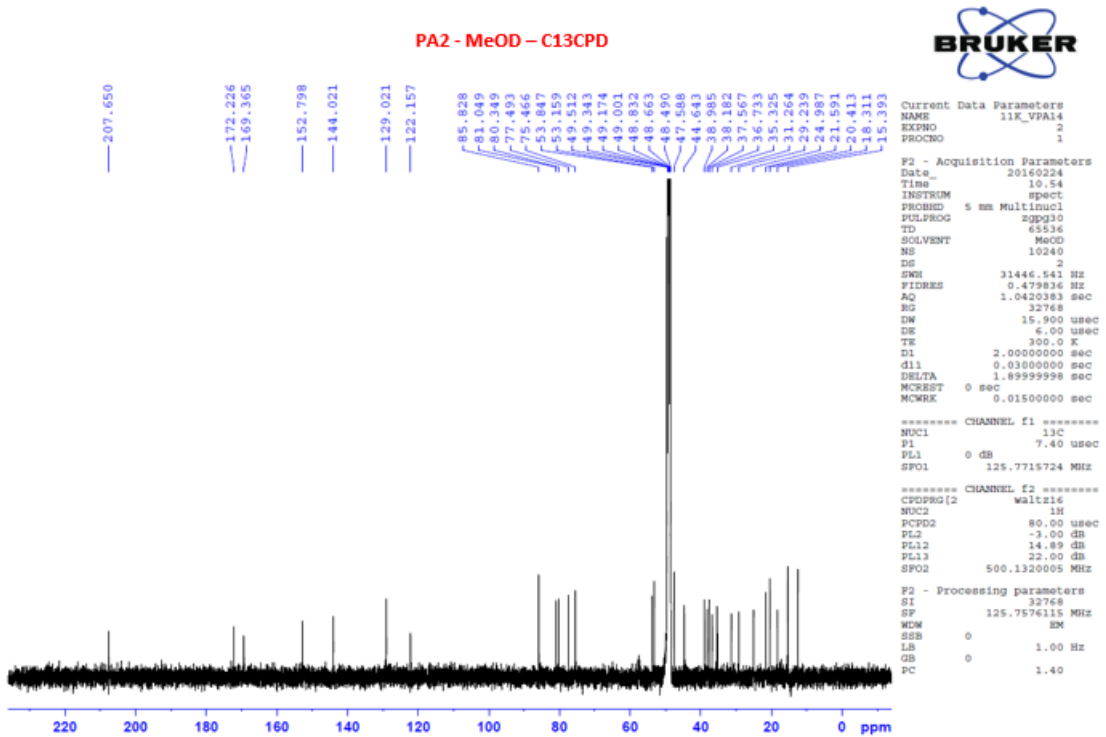
File name: PA1
Solvent: MeOH
MODE: ESI, M+H
Mass Spectrometer
LTQ Orbitrap XL™
Thermo SCIENTIFIC company
Resolution: >60 000 Da
Sensitivity: 10¹⁴
Tandem: n = 15
Mass Accuracy: $\pm 10\text{ppm}$
Operator: Ms. Dao Thi Nhung
Mobile: 0948 119 043
Email: daothinhung@yahoo.com

Phụ lục 1.5. Phổ (-)-ESI-MS của hợp chất **PA1**

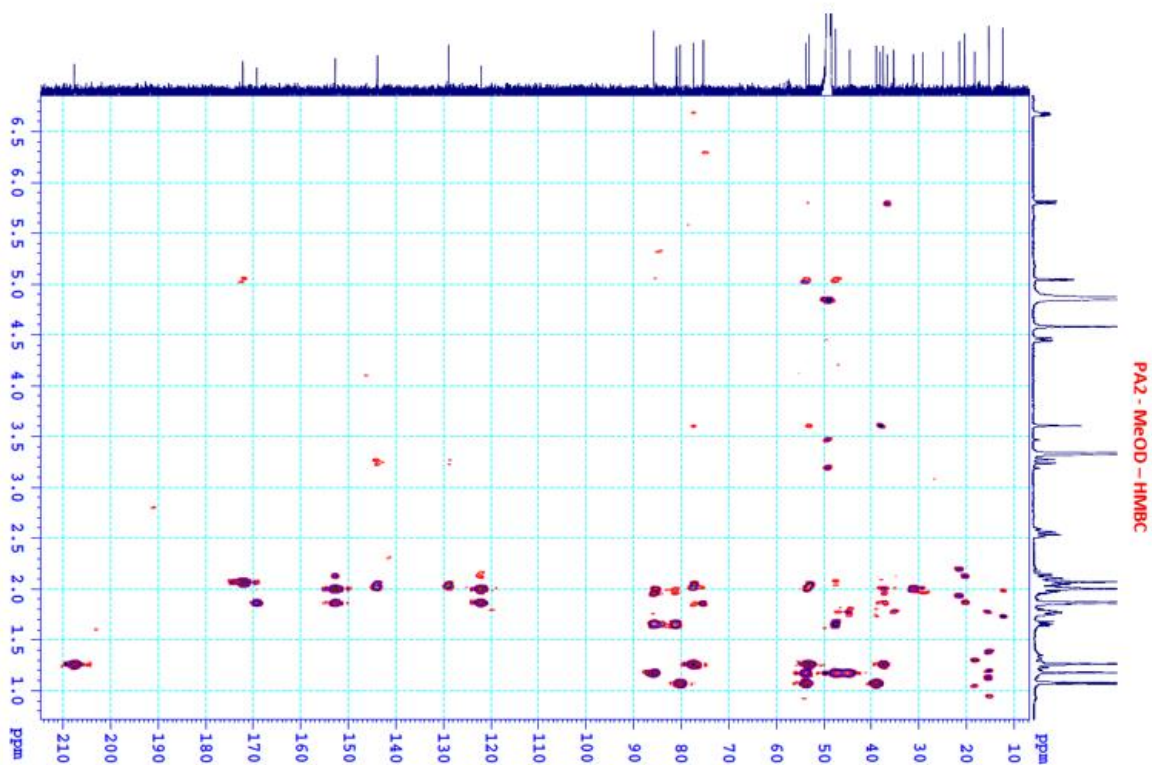
PHỤ LỤC 2. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA2



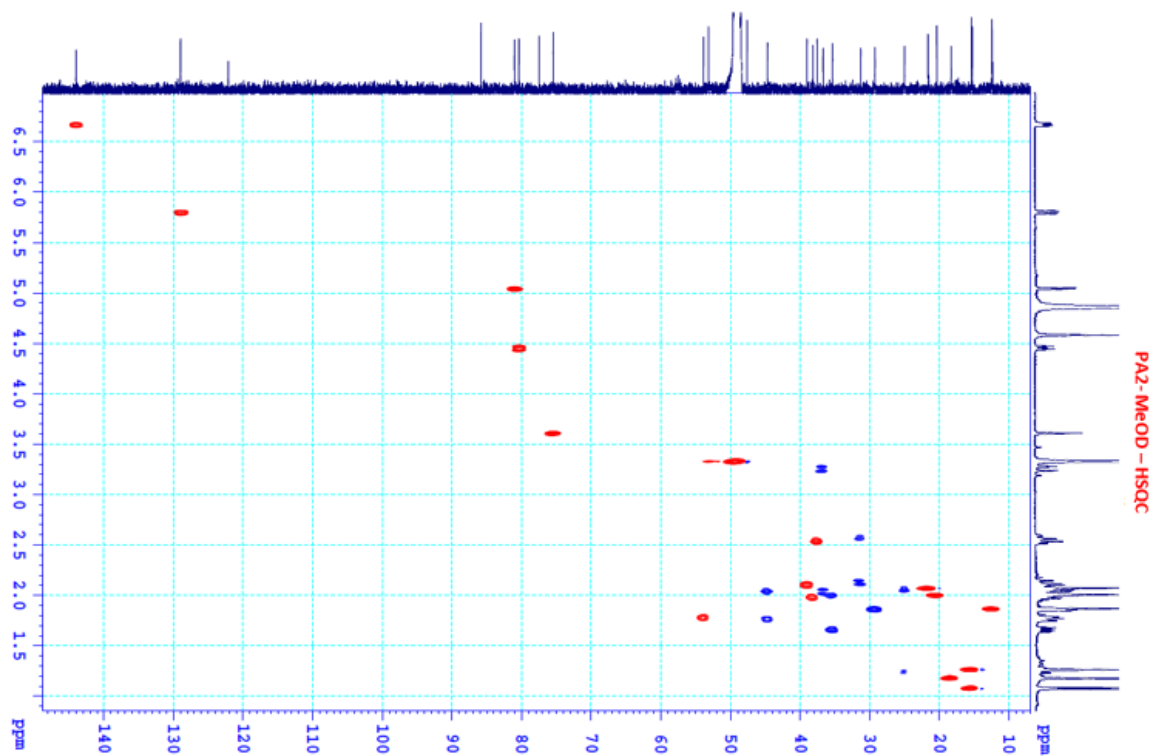
Phụ lục 2.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA2** (500 MHz, MeOD)



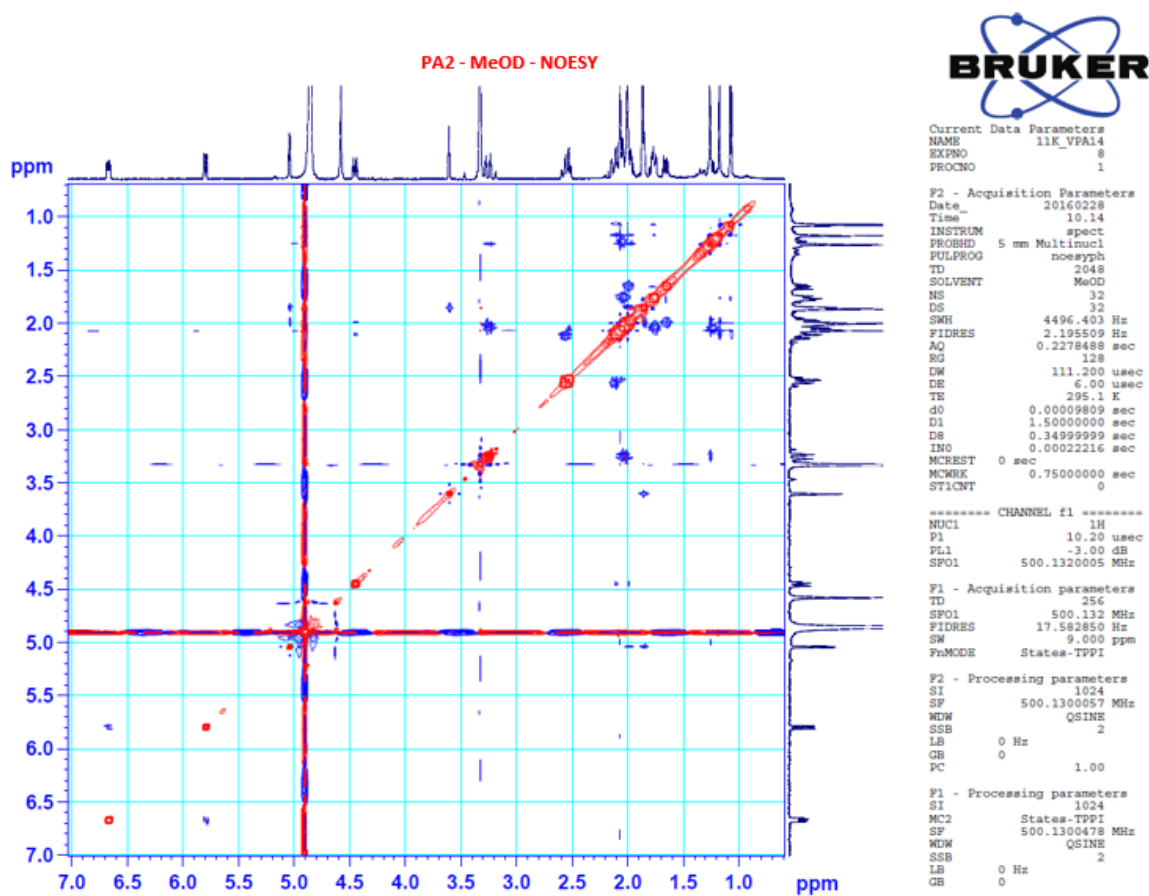
Phụ lục 2.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA2** (125 MHz, MeOD)



Phụ lục 2.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA2** (500/125 MHz, MeOD)

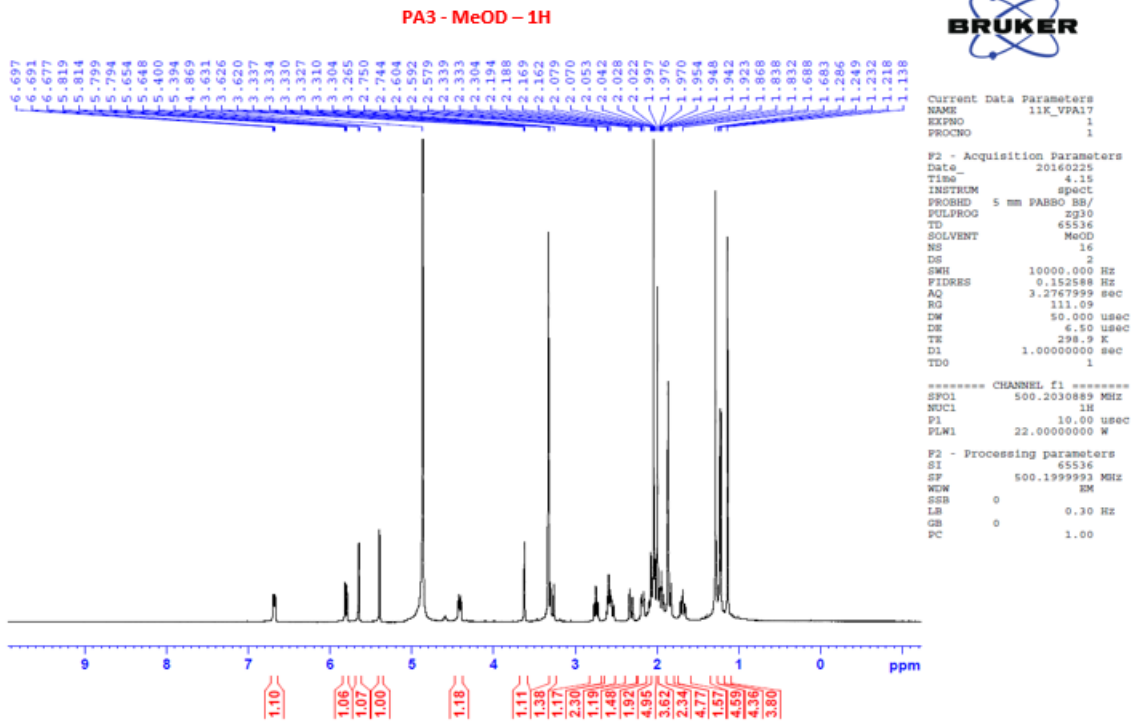


Phụ lục 2.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA2** (500/125 MHz, MeOD)

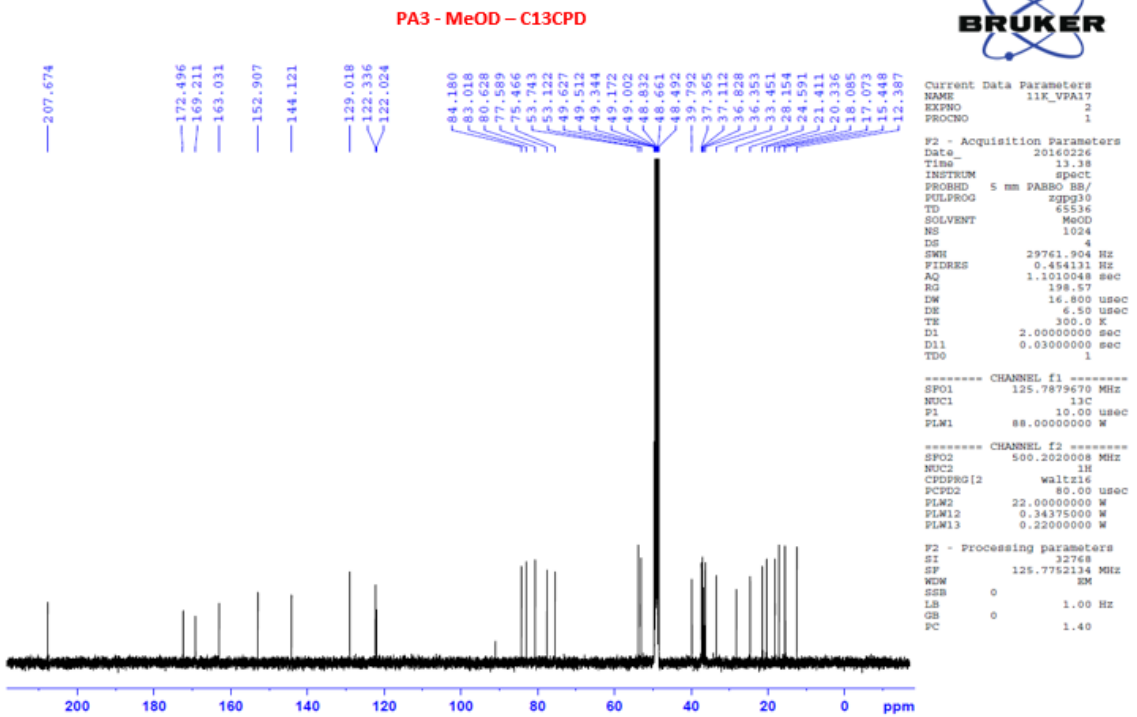


Phụ lục 2.5. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PA2** (500/500 MHz, MeOD)

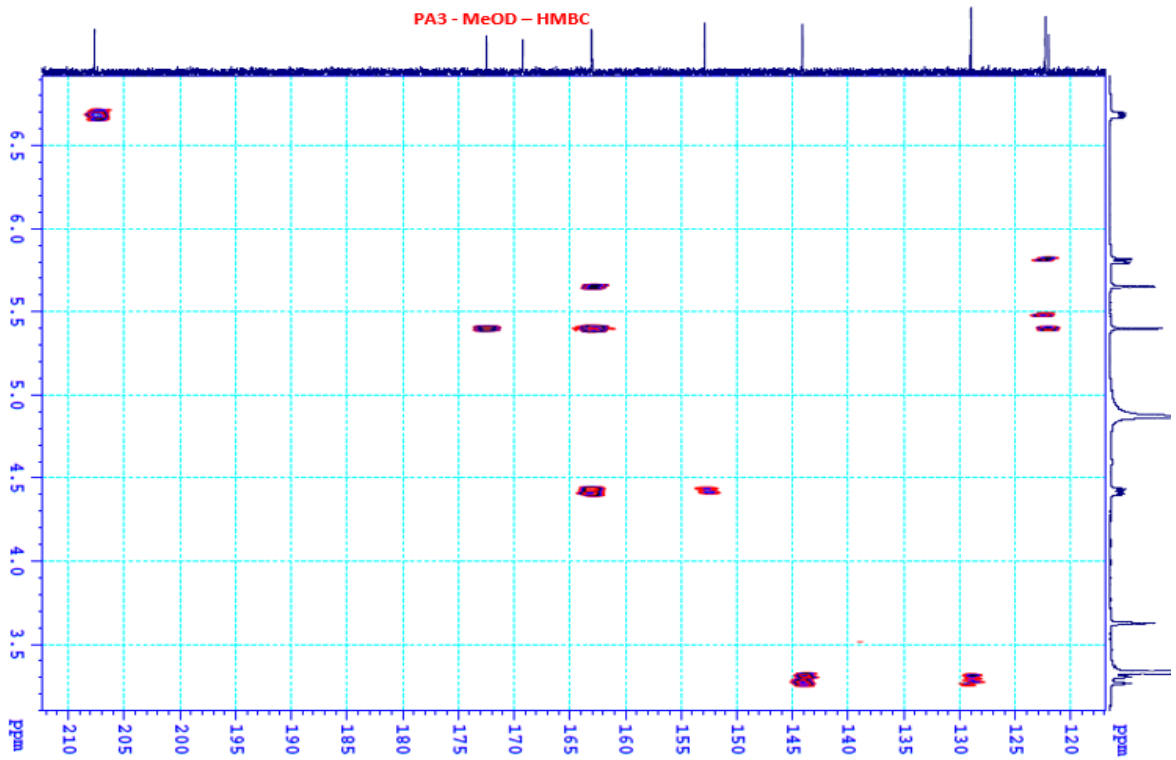
PHỤ LỤC 3. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA3



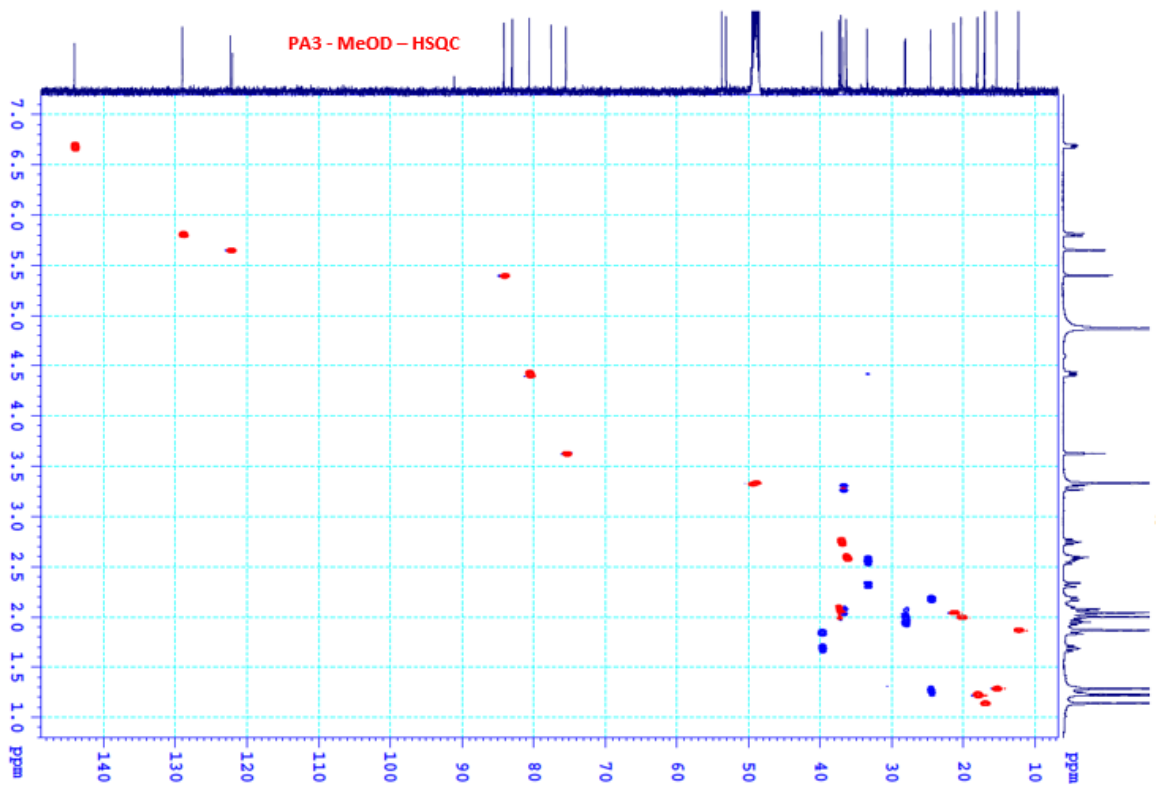
Phụ lục 3.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PA3 (500 MHz, MeOD)



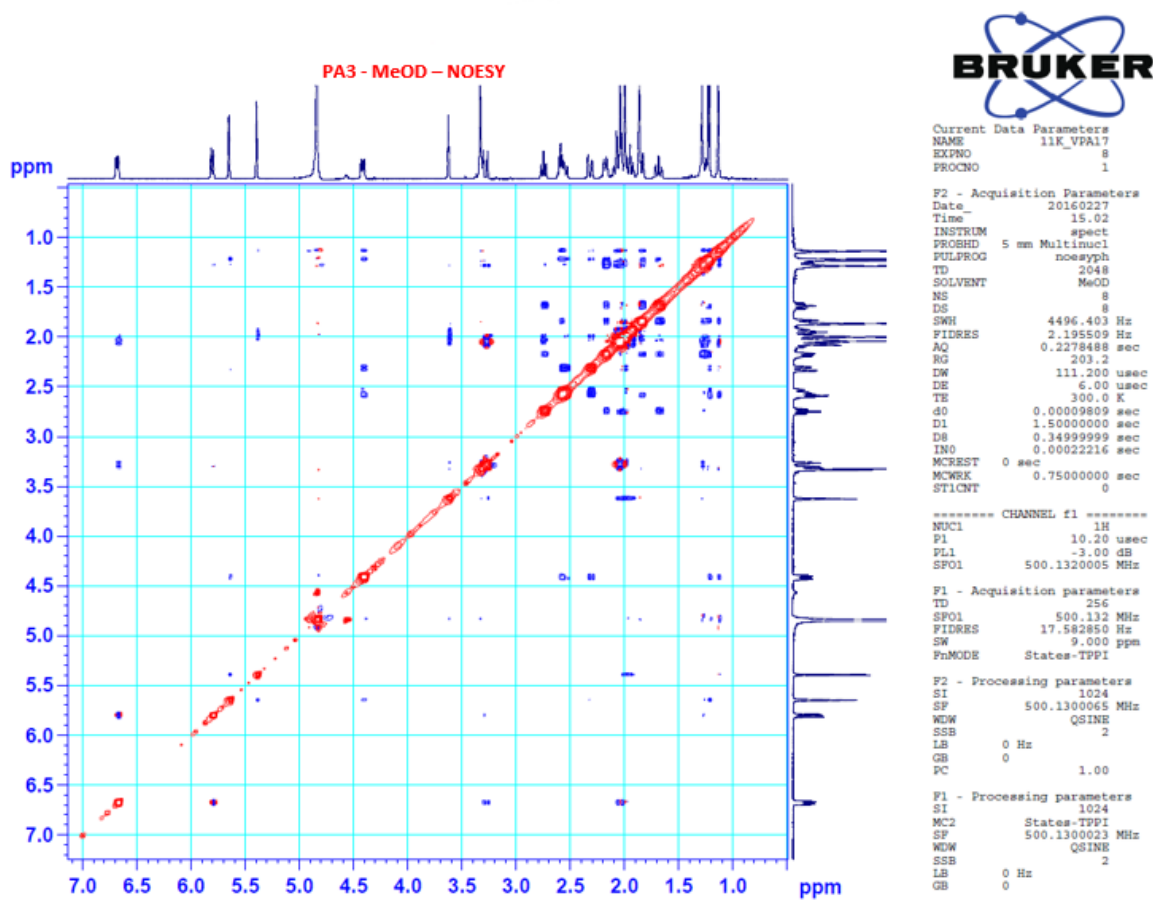
Phụ lục 3.2. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PA3 (125 MHz, MeOD)



Phụ lục 3.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA3** (500/125 MHz, MeOD)

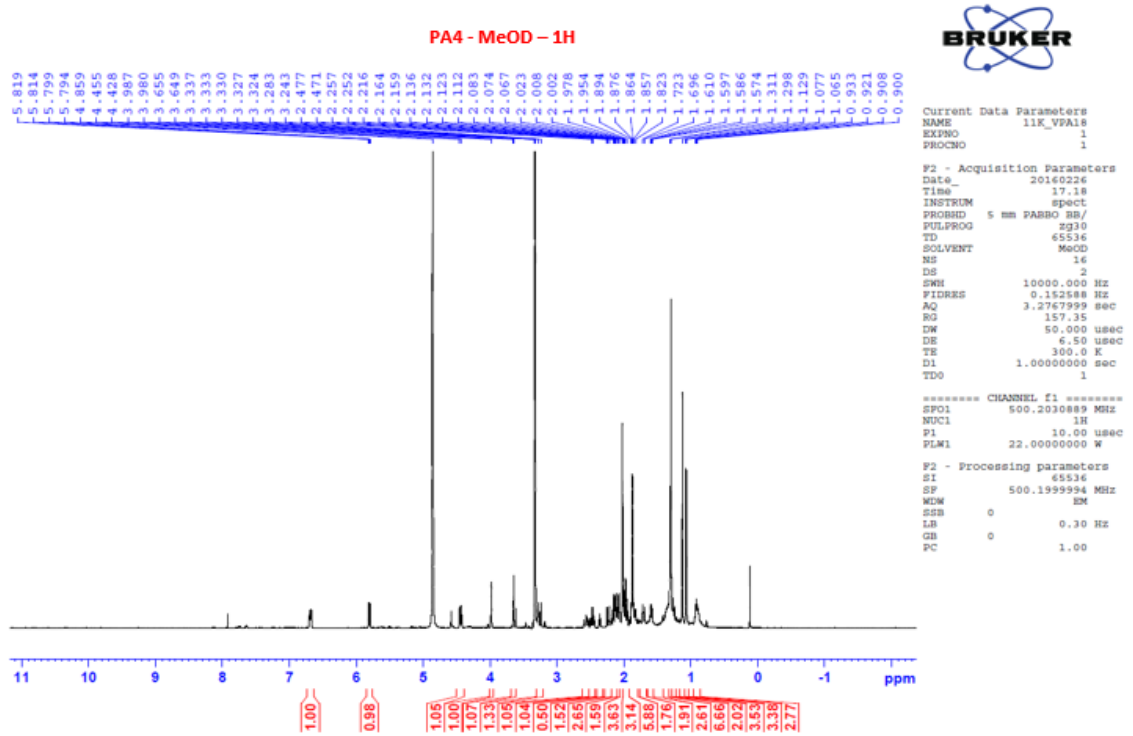


Phụ lục 3.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA3** (500/125 MHz, MeOD)

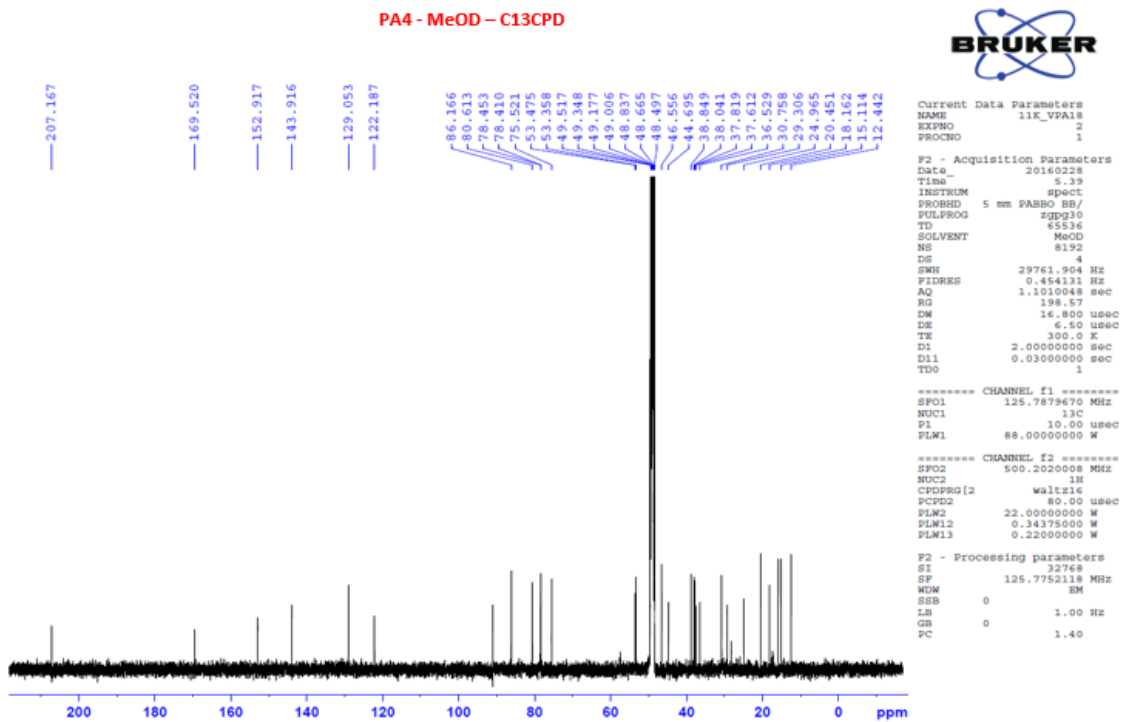


Phụ lục 3.5. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PA3** (500/500 MHz, MeOD)

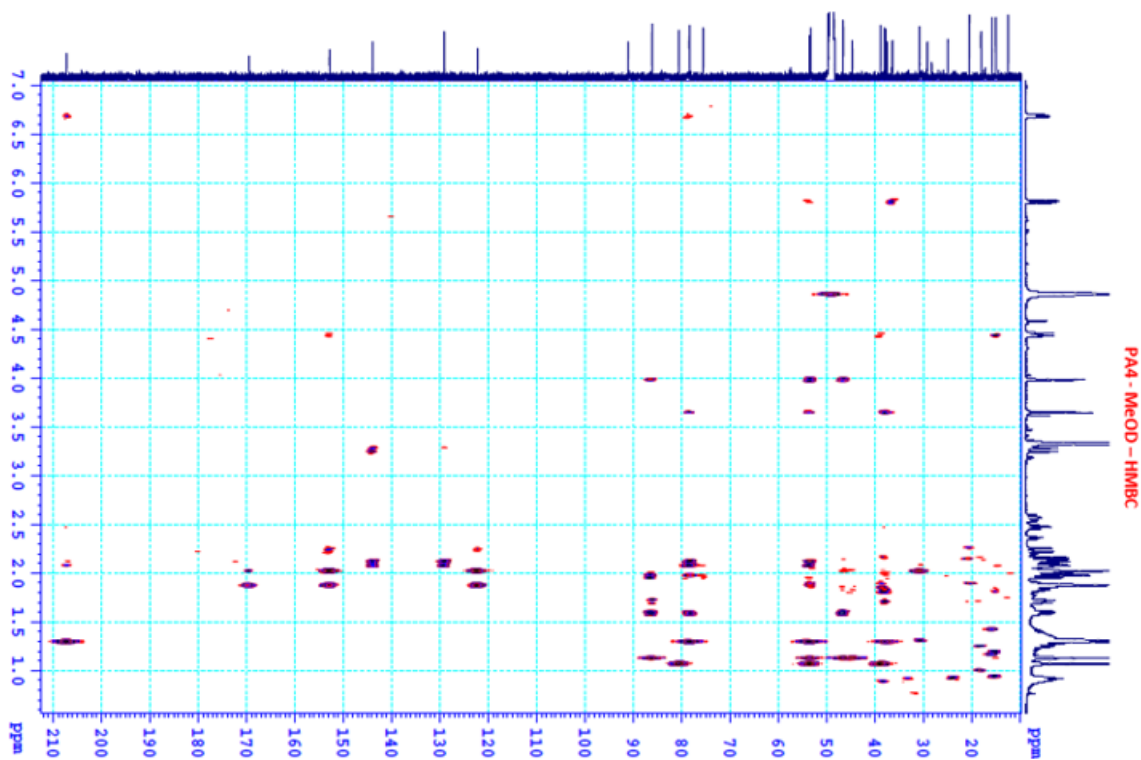
PHỤ LỤC 4. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA4



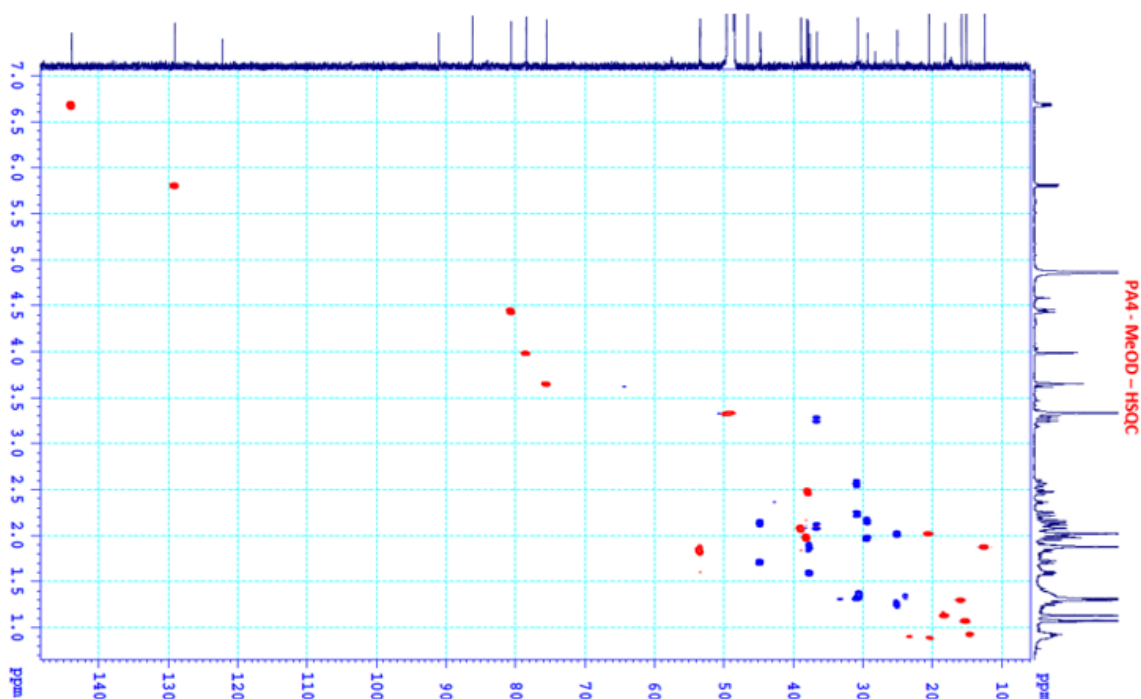
Phụ lục 4.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA4** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 4.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA4** (125 MHz, MeOD)

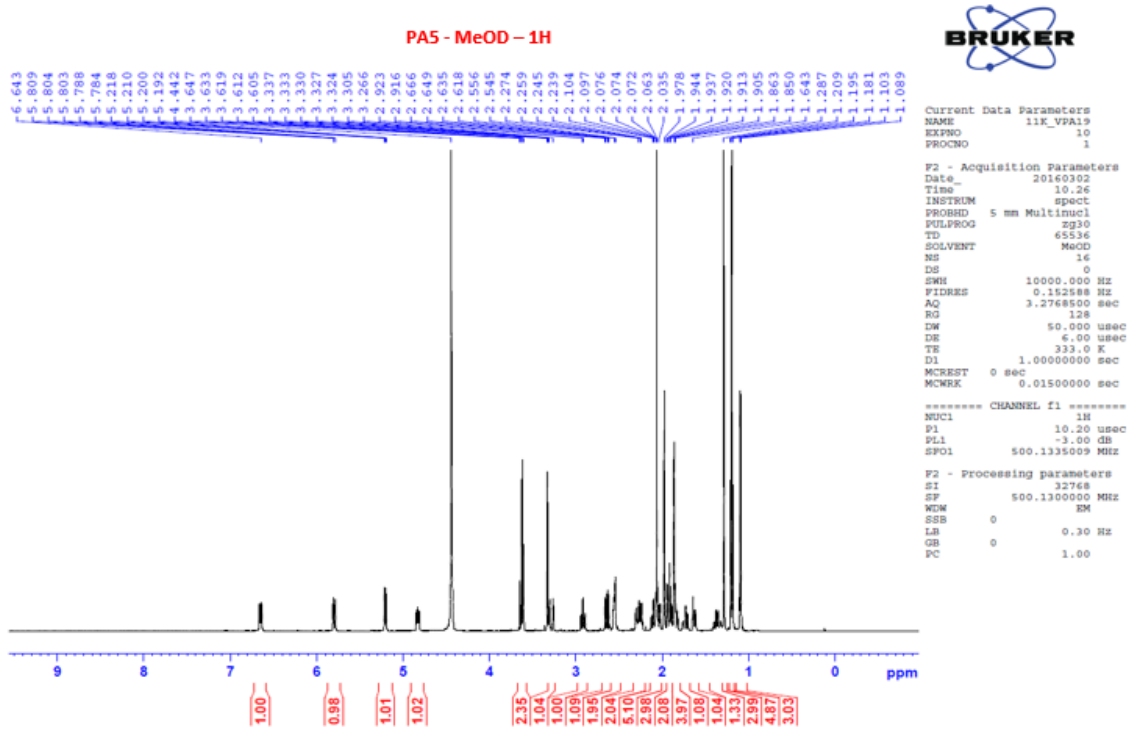


Phụ lục 4.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA4** (500/125 MHz, MeOD)

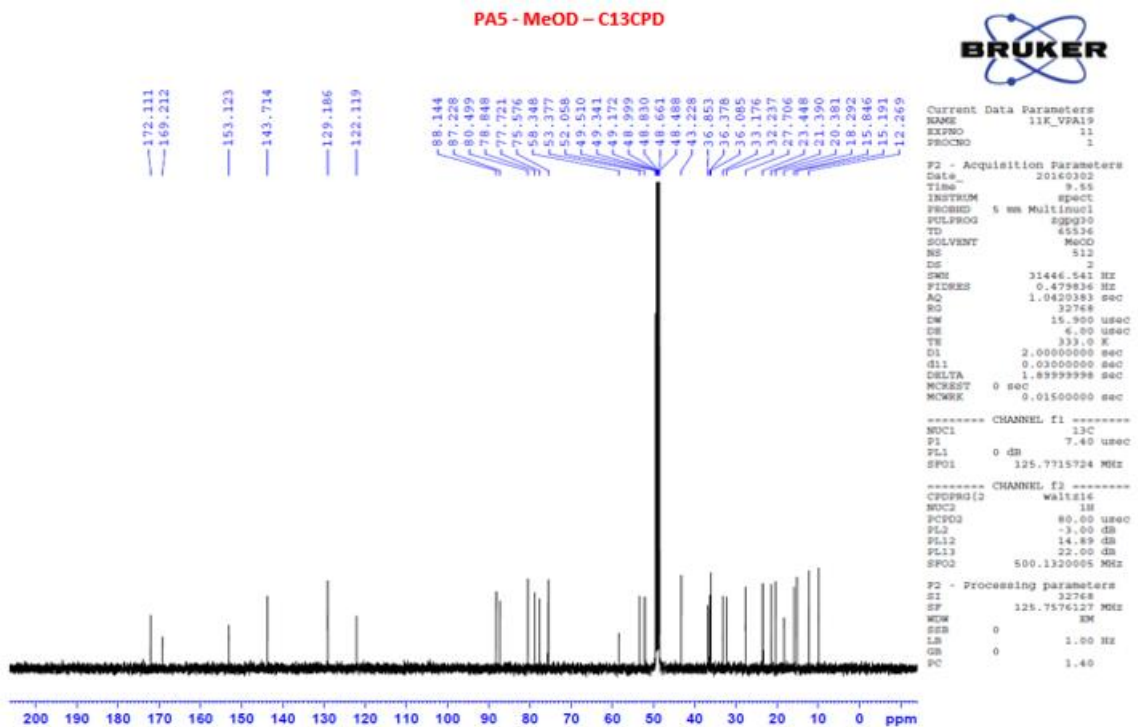


Phụ lục 4.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA4** (500/125 MHz, MeOD)

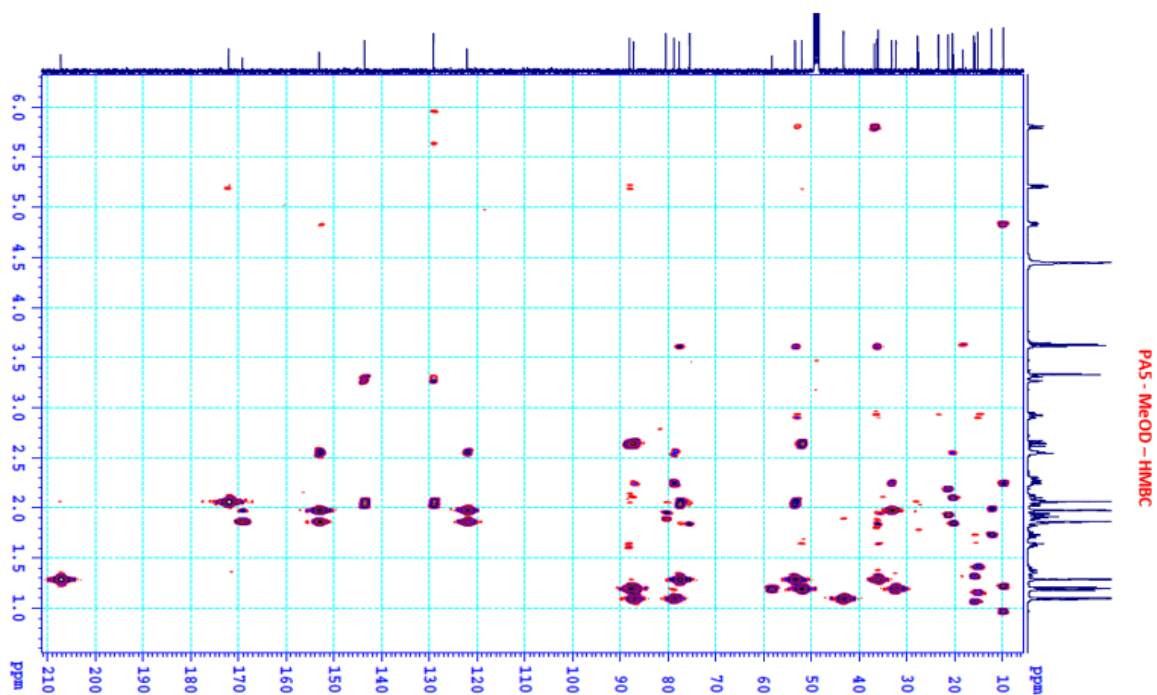
PHỤ LỤC 5. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA5



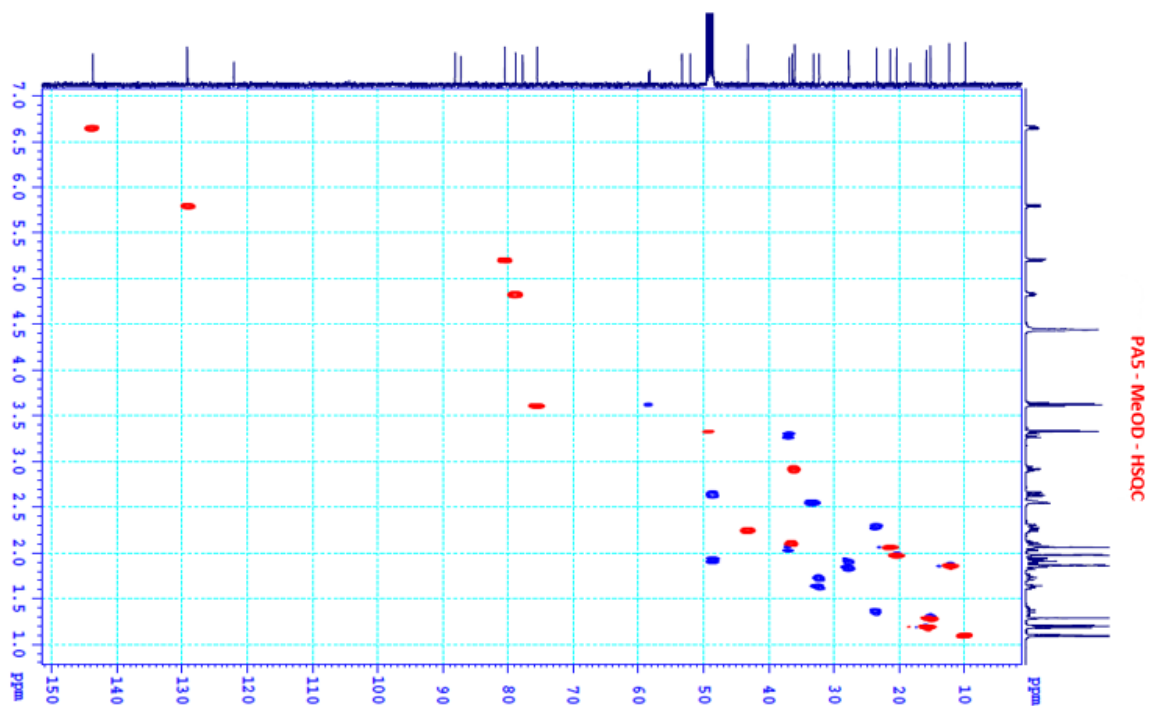
Phụ lục 5.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA5** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 5.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA5** (125 MHz, MeOD)

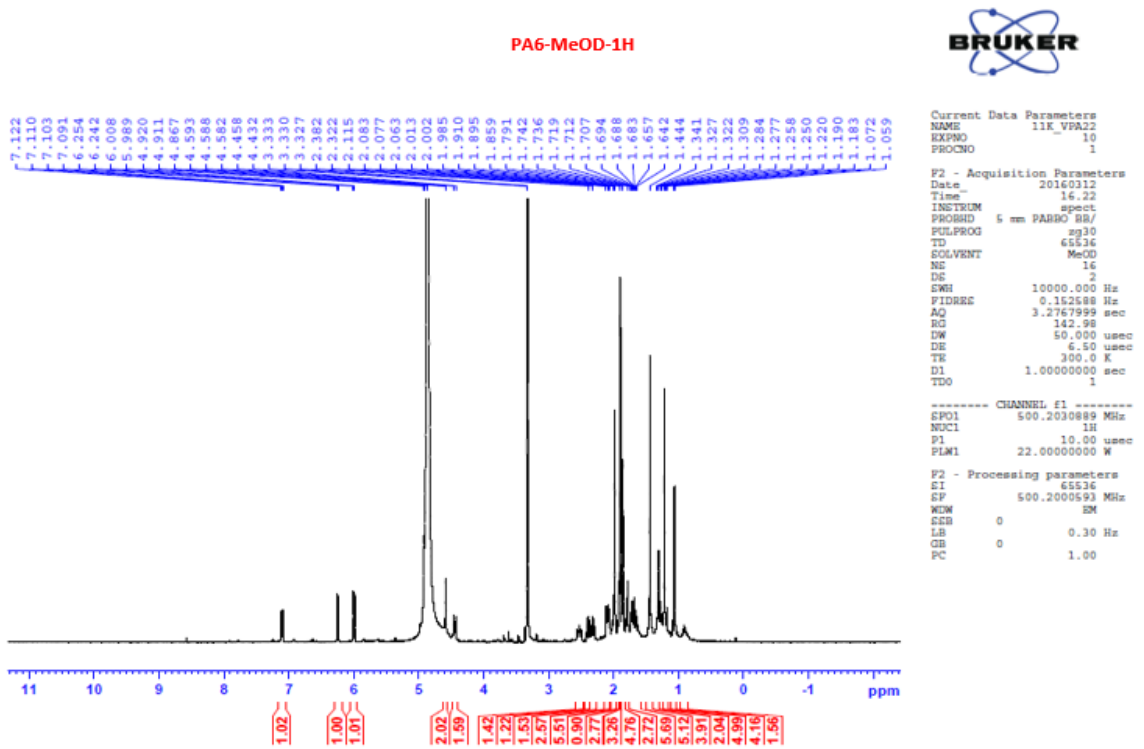


Phụ lục 5.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA5** (500/125 MHz, MeOD)

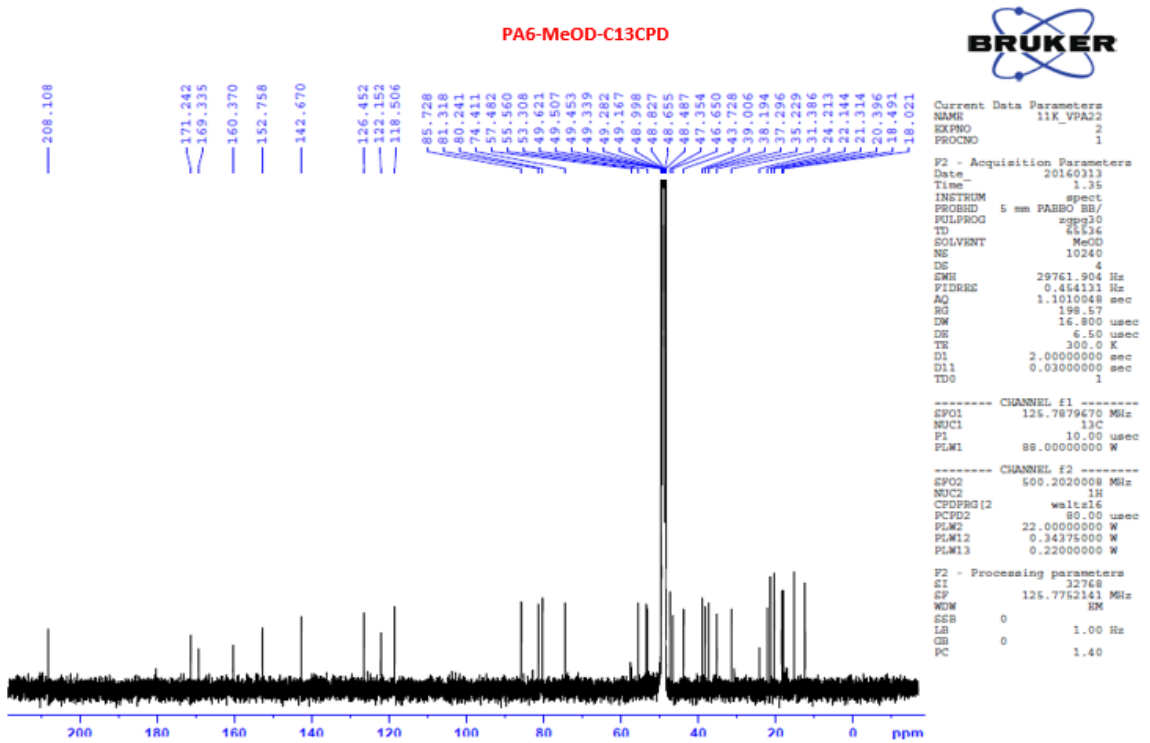


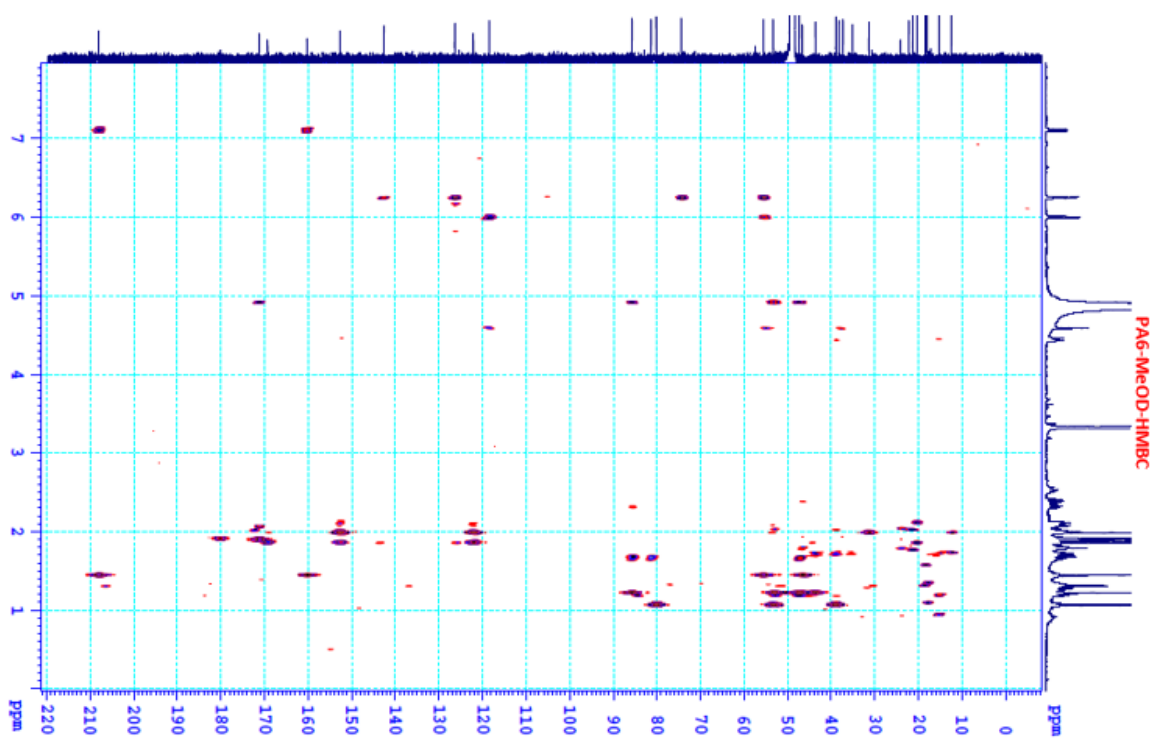
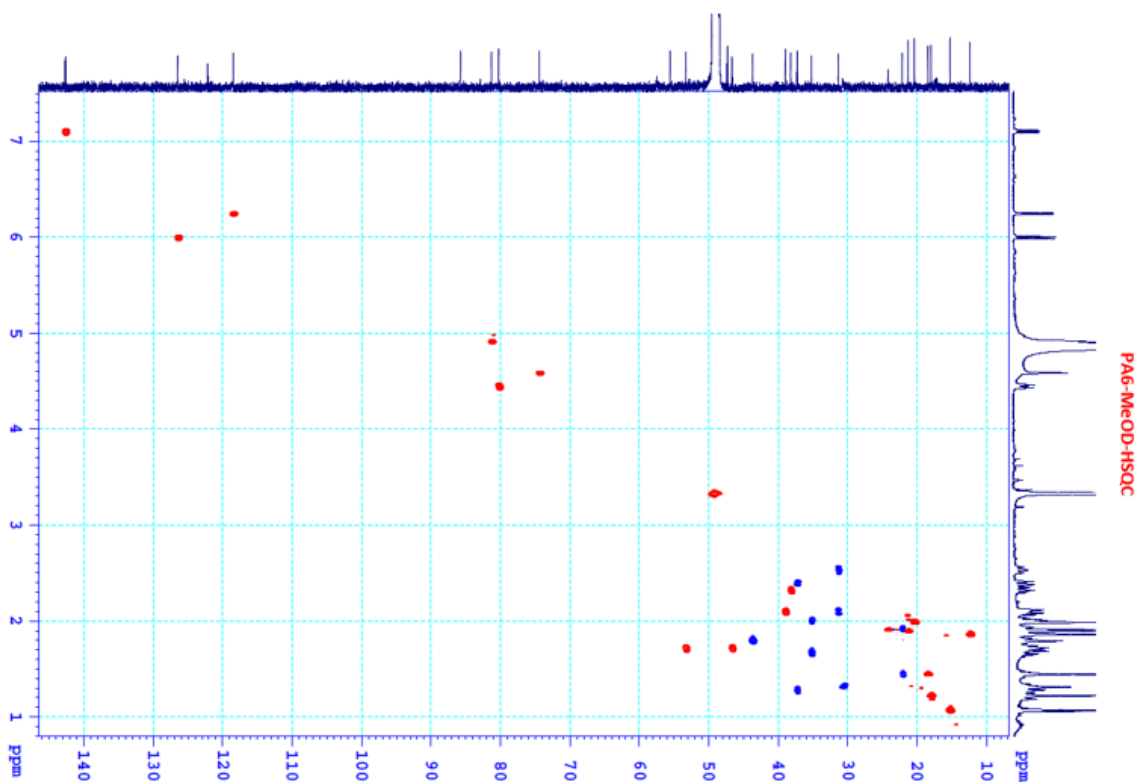
Phụ lục 5.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA5** (500/125 MHz, MeOD)

PHỤ LỤC 6. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA6

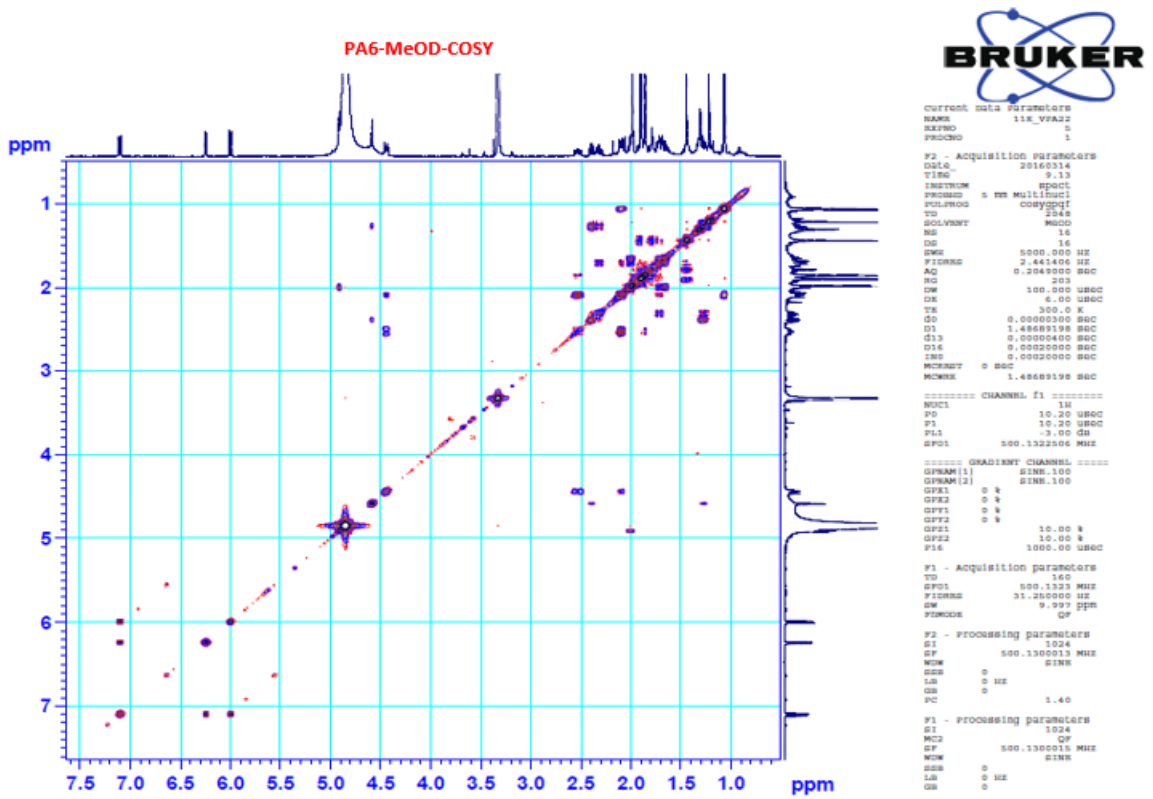


Phụ lục 6.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PA6 (500 MHz, MeOD)

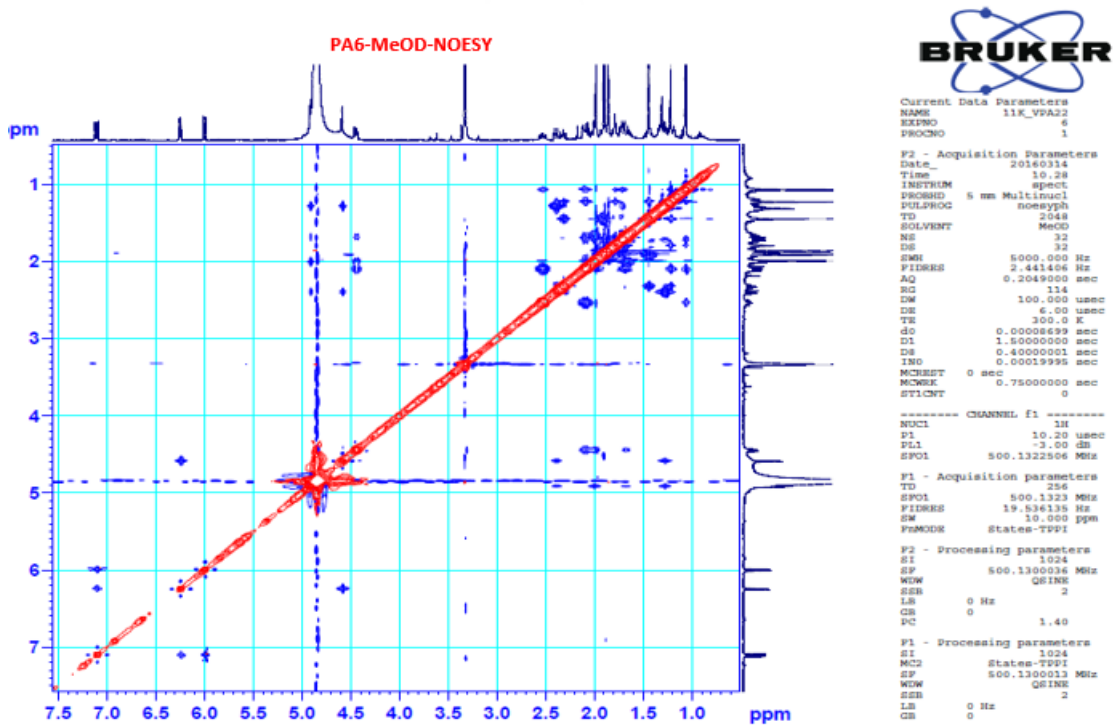


Phụ lục 6.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA6** (125 MHz, MeOD)Phụ lục 6.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA6** (500/125 MHz, MeOD)

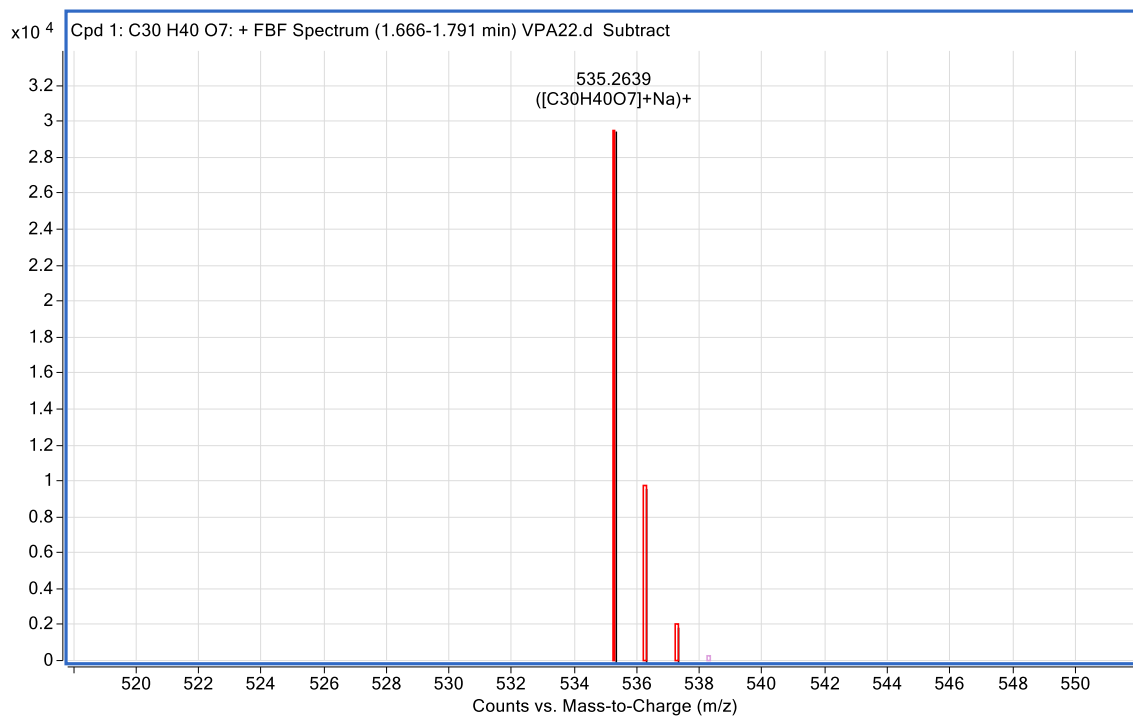
Phụ lục 6.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA6** (500/125 MHz, MeOD)



Phụ lục 6.5. Phổ COSY-NMR của hợp chất **PA6** (500/500 MHz, MeOD)

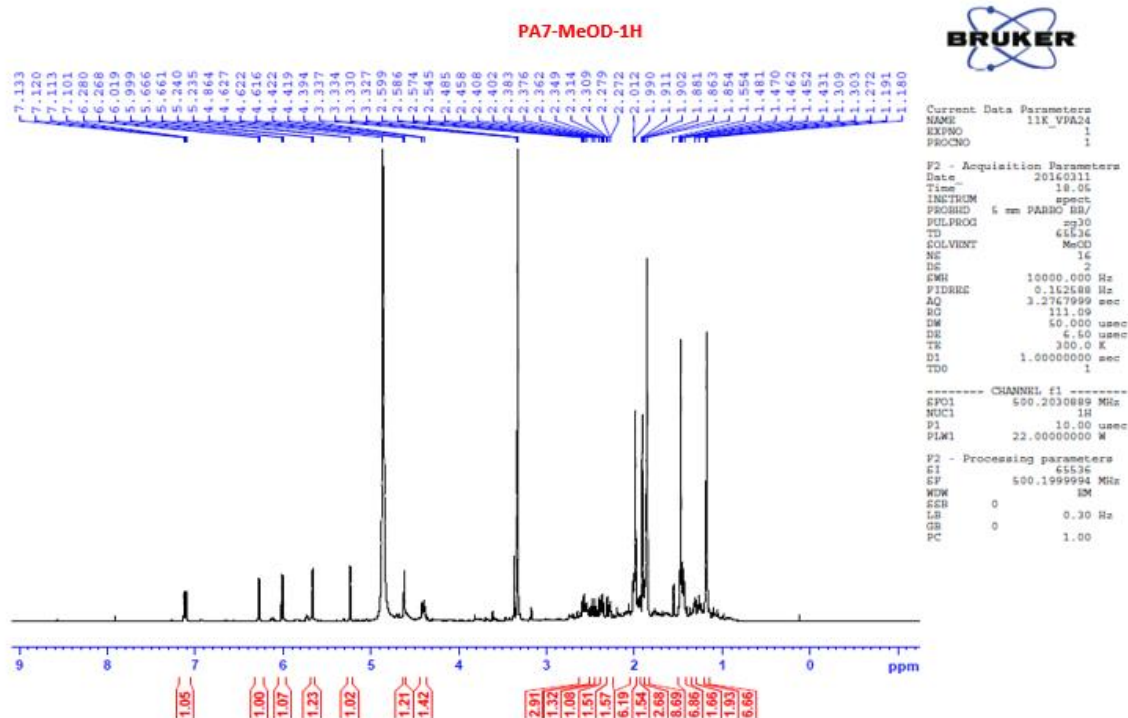


Phụ lục 6.6. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PA6** (500/500 MHz, MeOD)

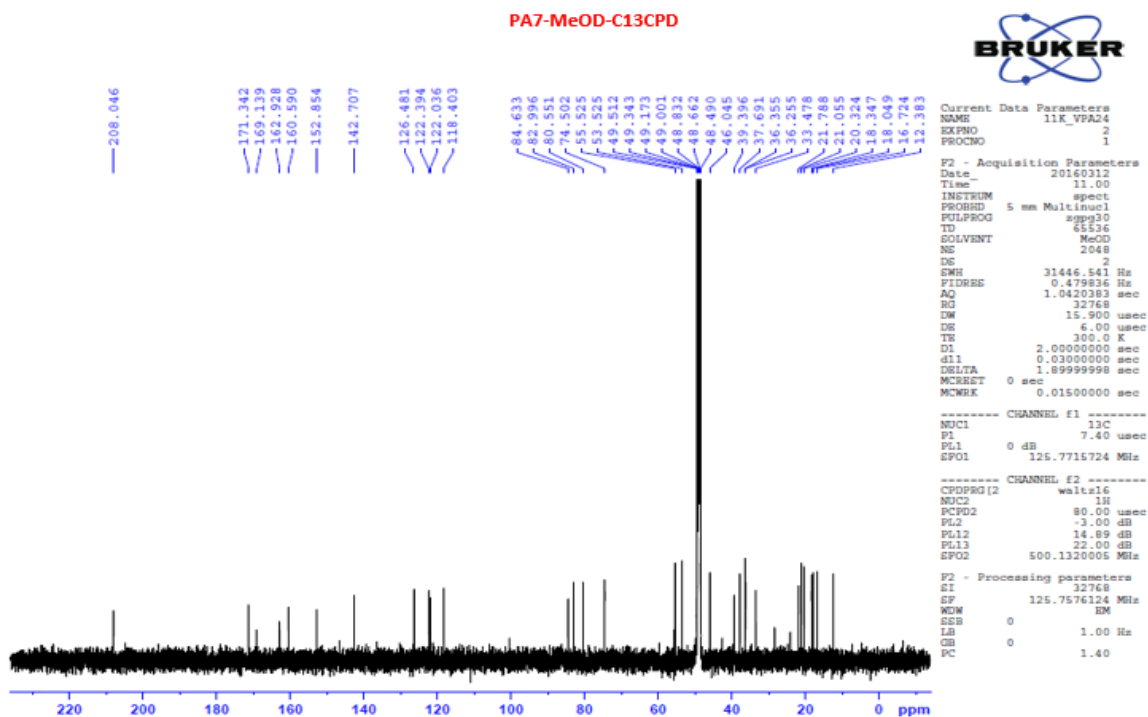


Phụ lục 6.7. Phổ (-)-ESI-MS của hợp chất **PA6**

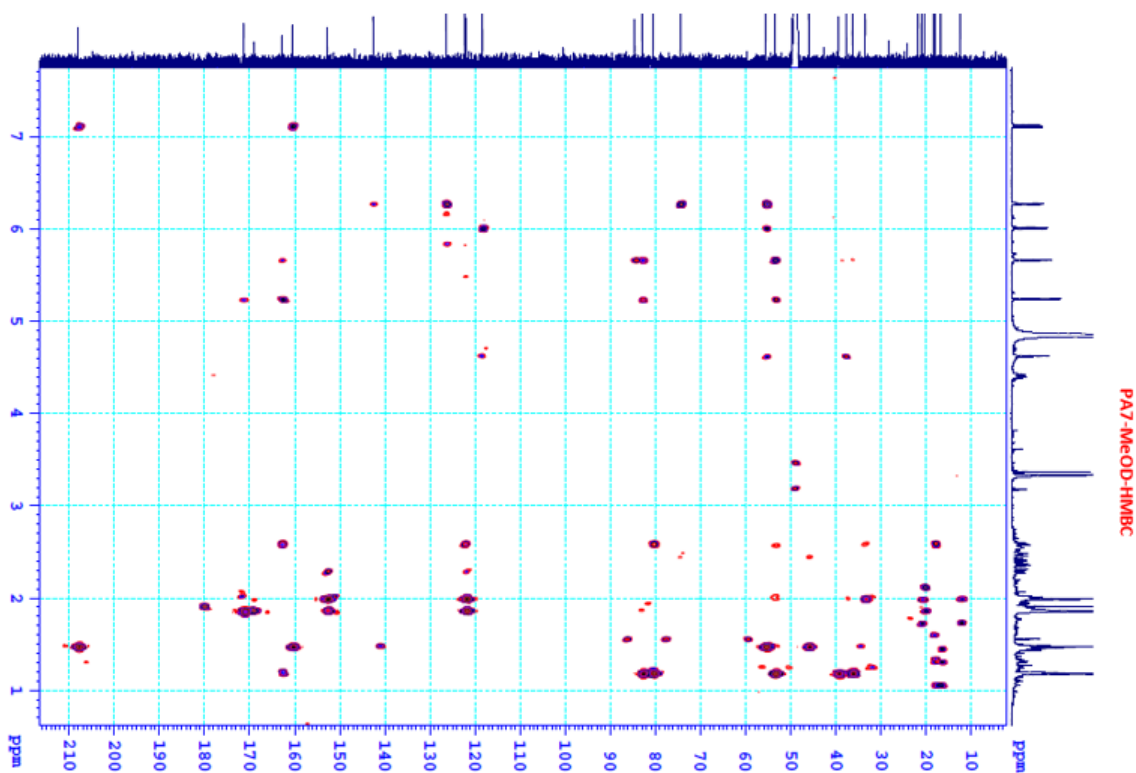
PHỤ LỤC 7. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA7



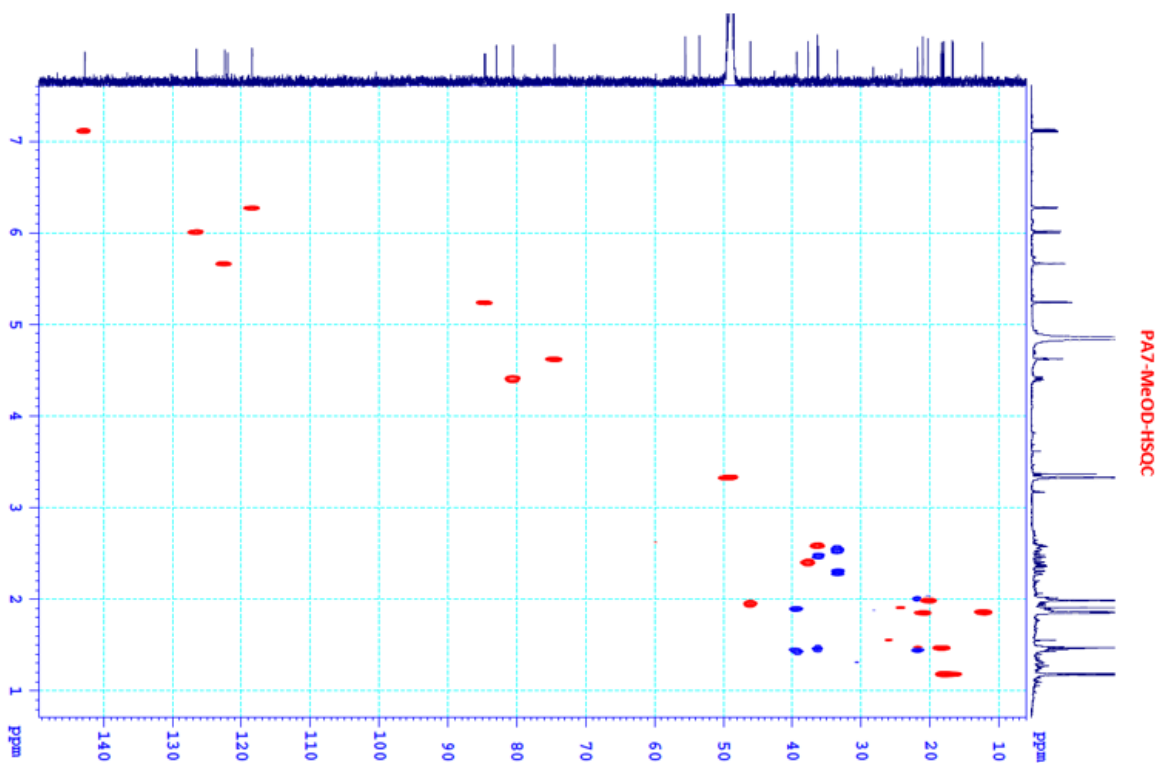
Phụ lục 7.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA7** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 7.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA7** (125 MHz, MeOD)

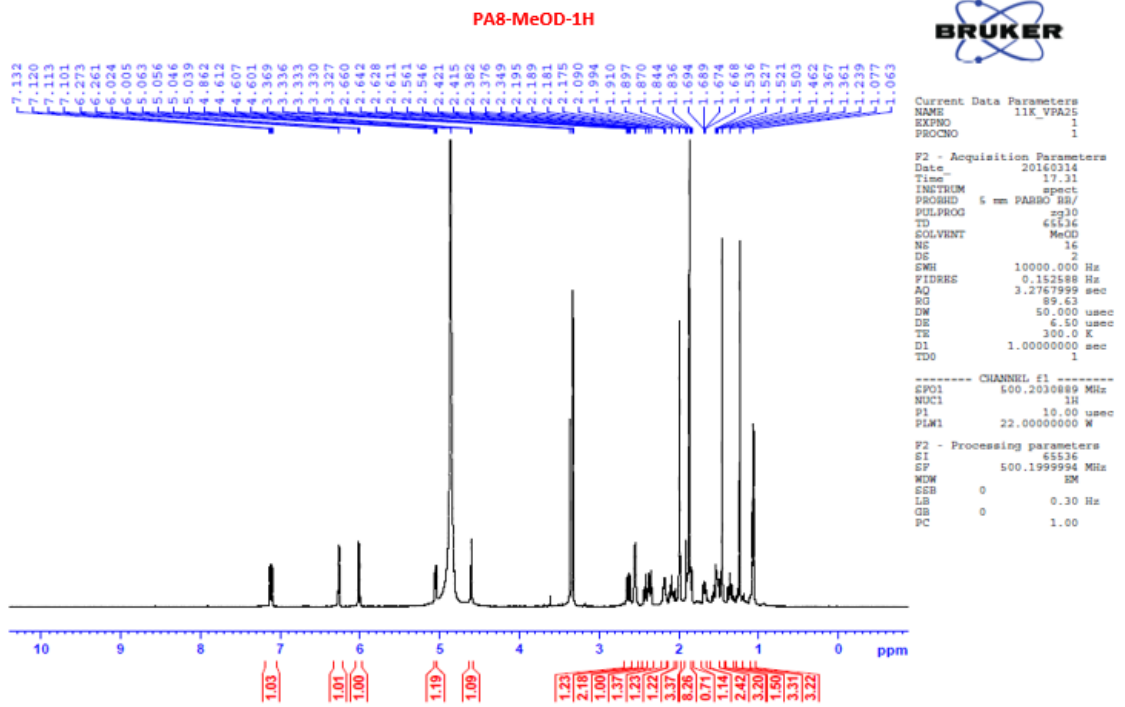


Phụ lục 7.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA7** (500/125 MHz, MeOD)

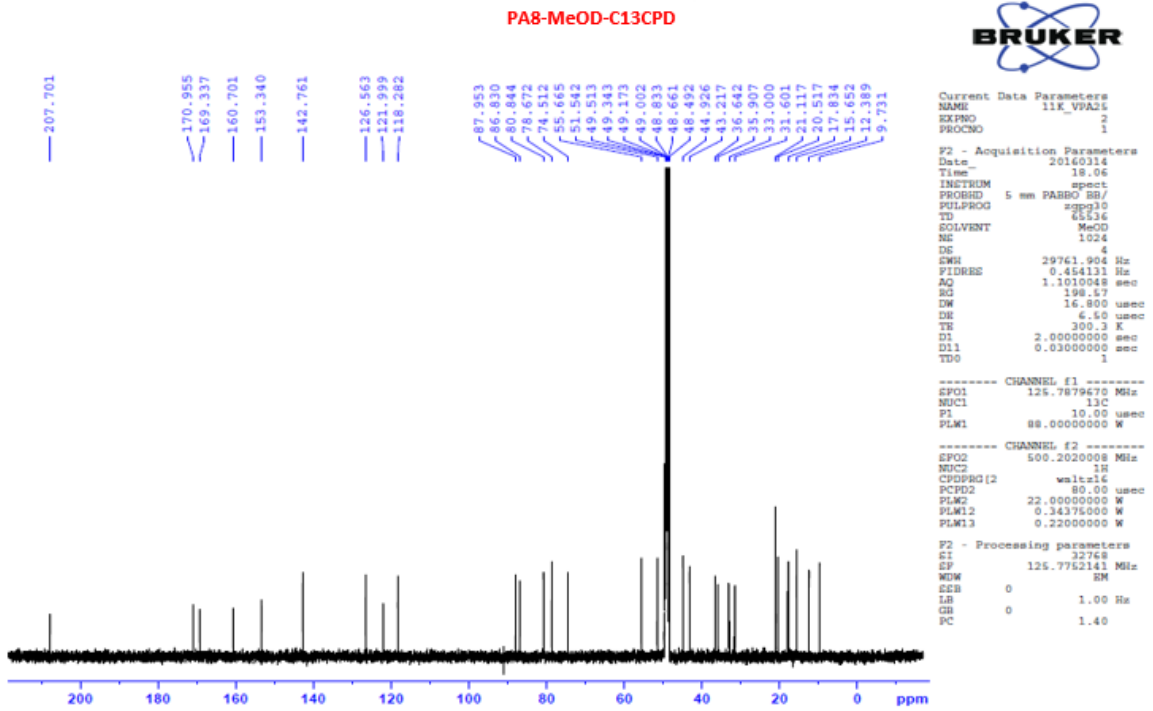


Phụ lục 7.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA7** (500/125 MHz, MeOD)

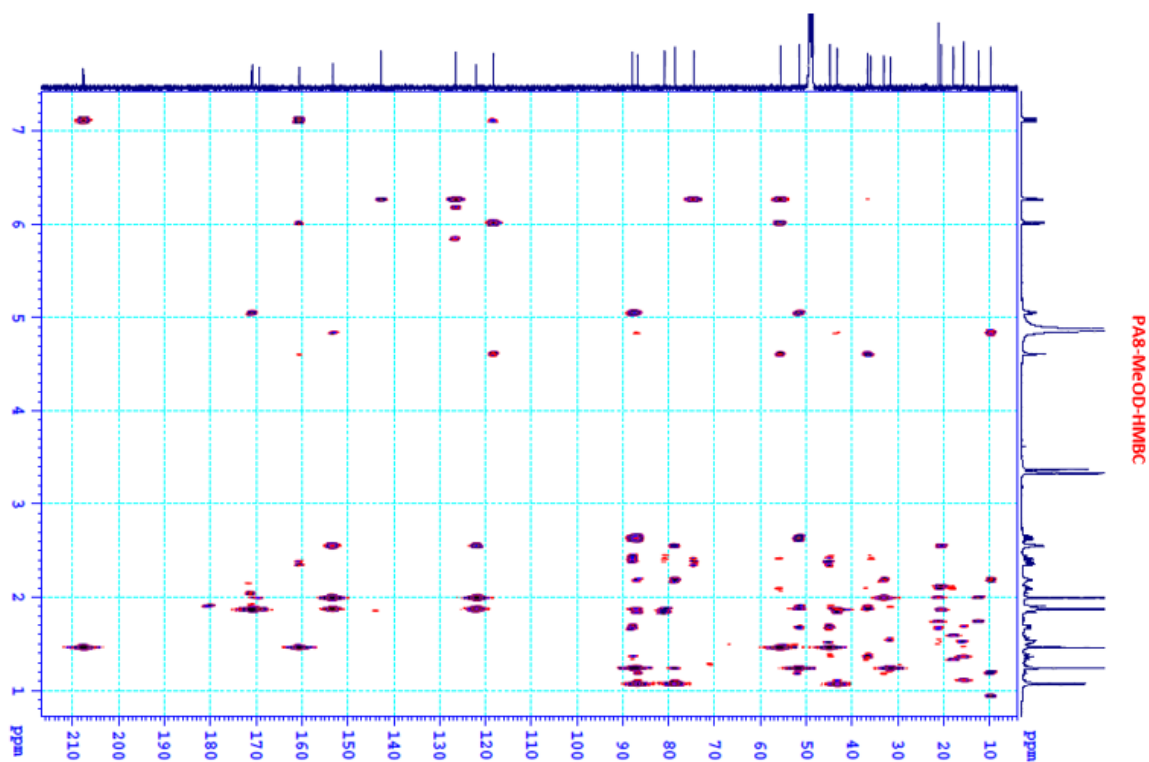
PHỤ LỤC 8. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA8



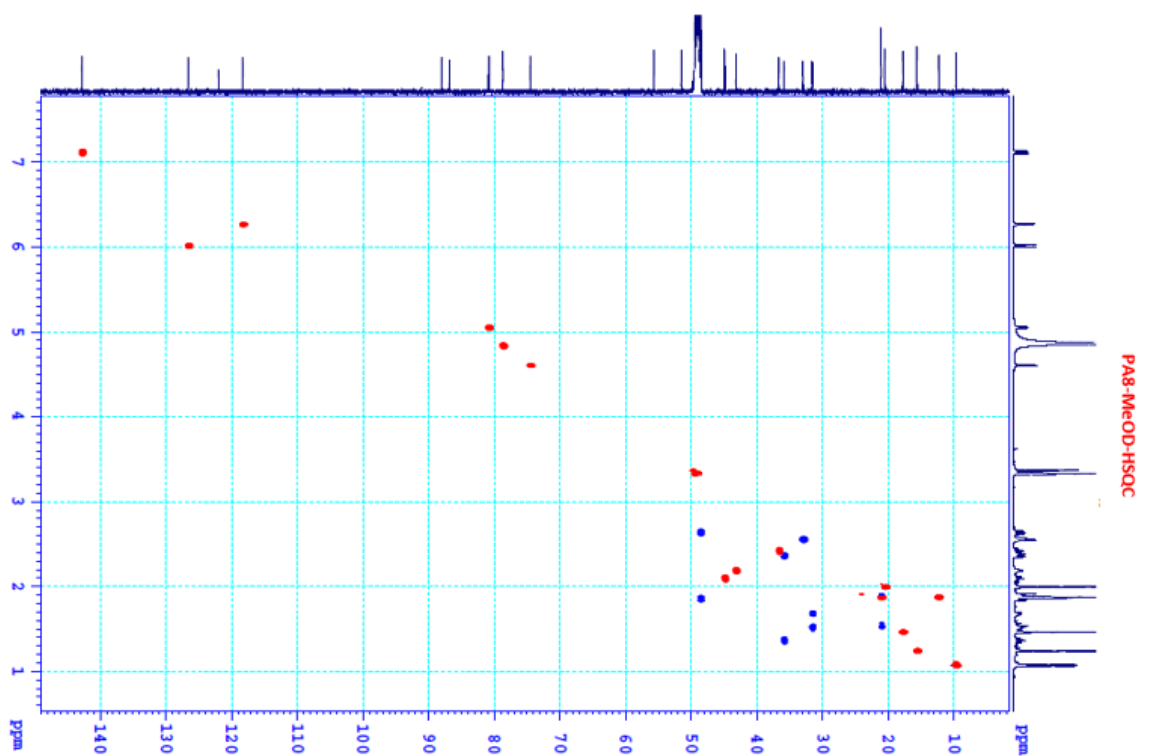
Phụ lục 8.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PA8 (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 8.2. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PA8 (125 MHz, MeOD)

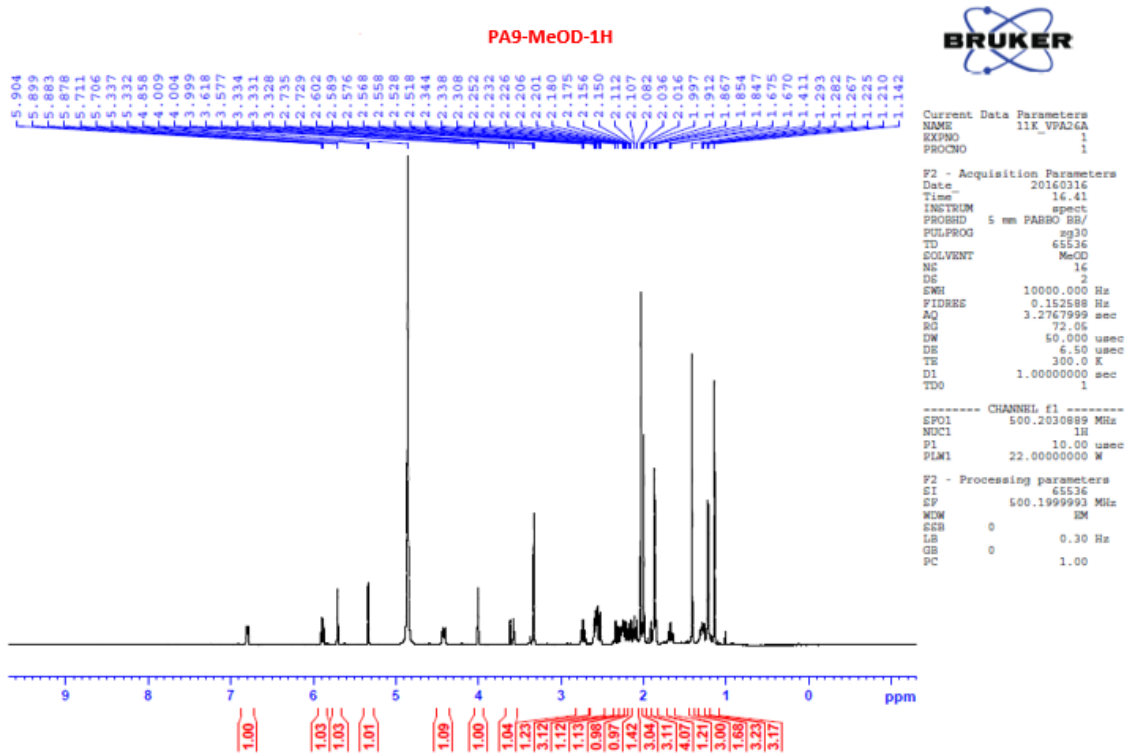


Phụ lục 8.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA8** (500/125 MHz, MeOD)

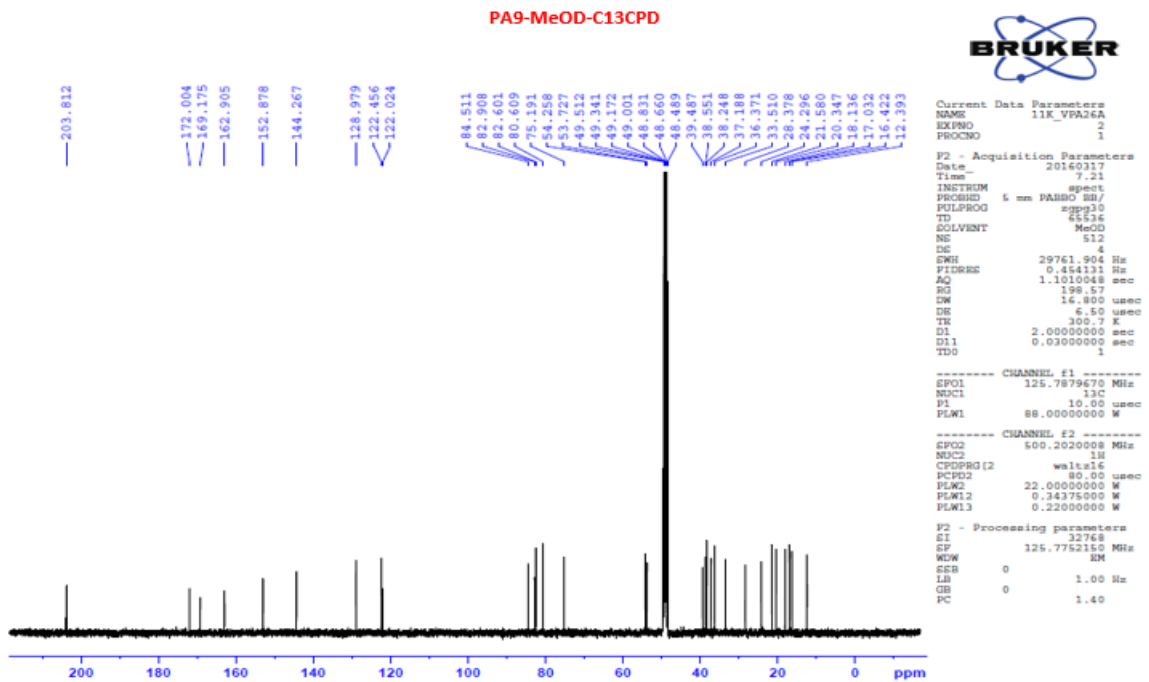


Phụ lục 8.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA8** (500/125 MHz, MeOD)

PHỤ LỤC 9. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA9

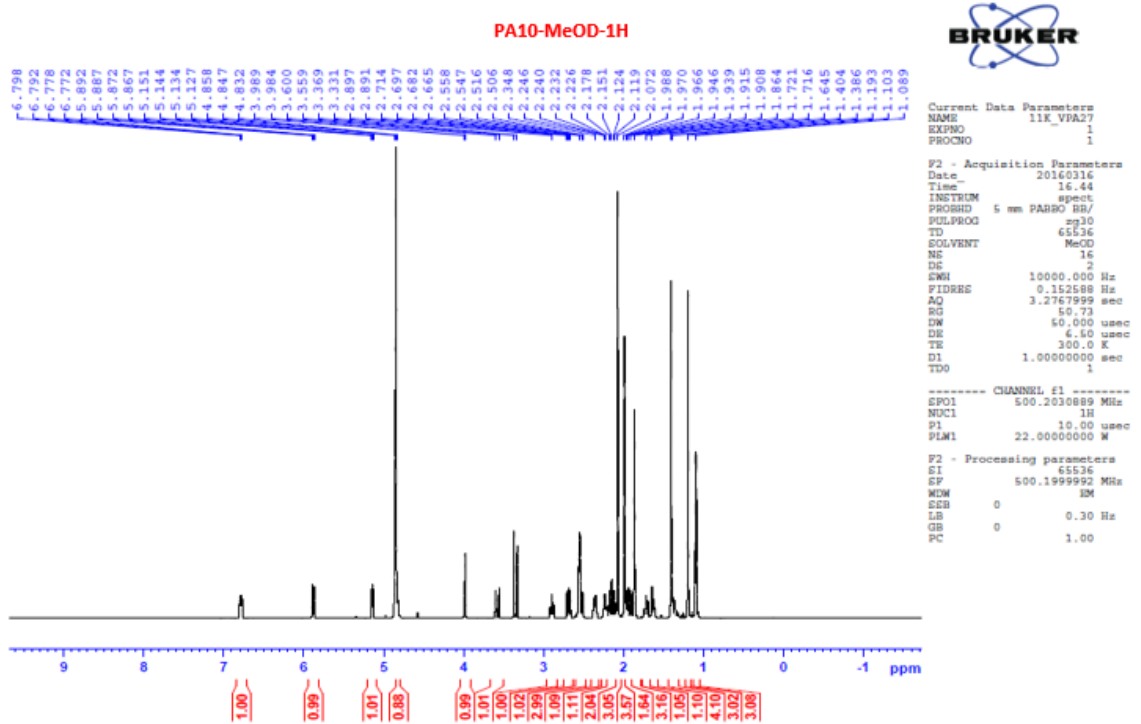


Phụ lục 9.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA9** (500 MHz, MeOD)

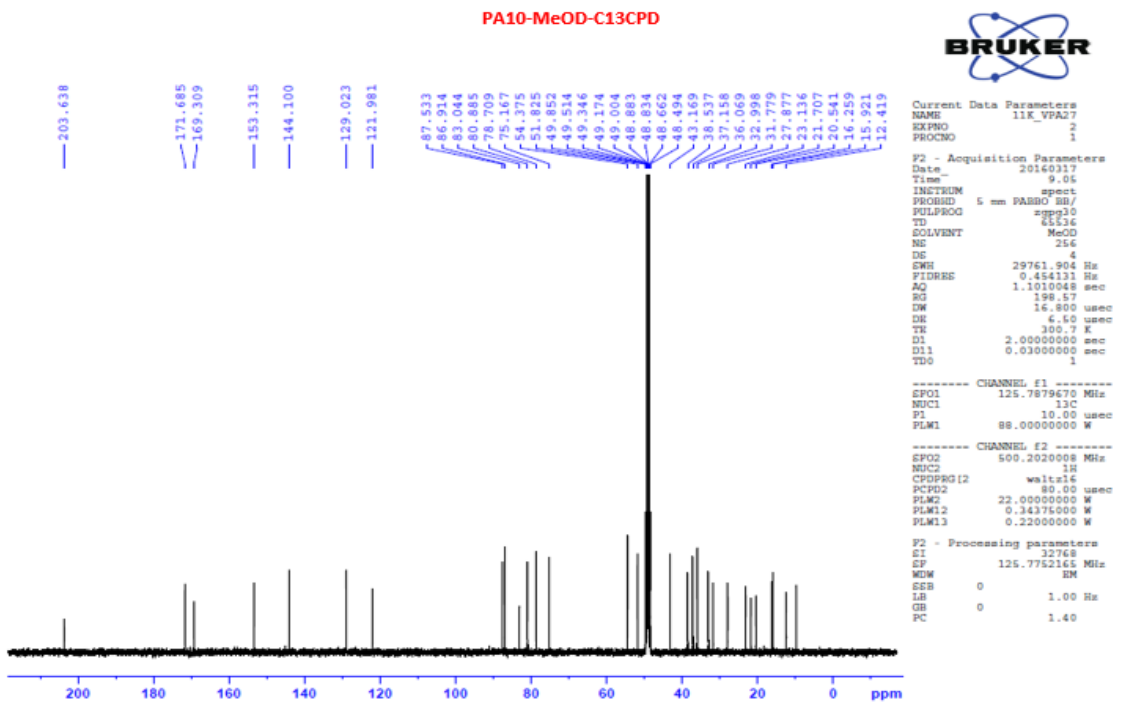


Phụ lục 9.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA9** (125 MHz, MeOD)

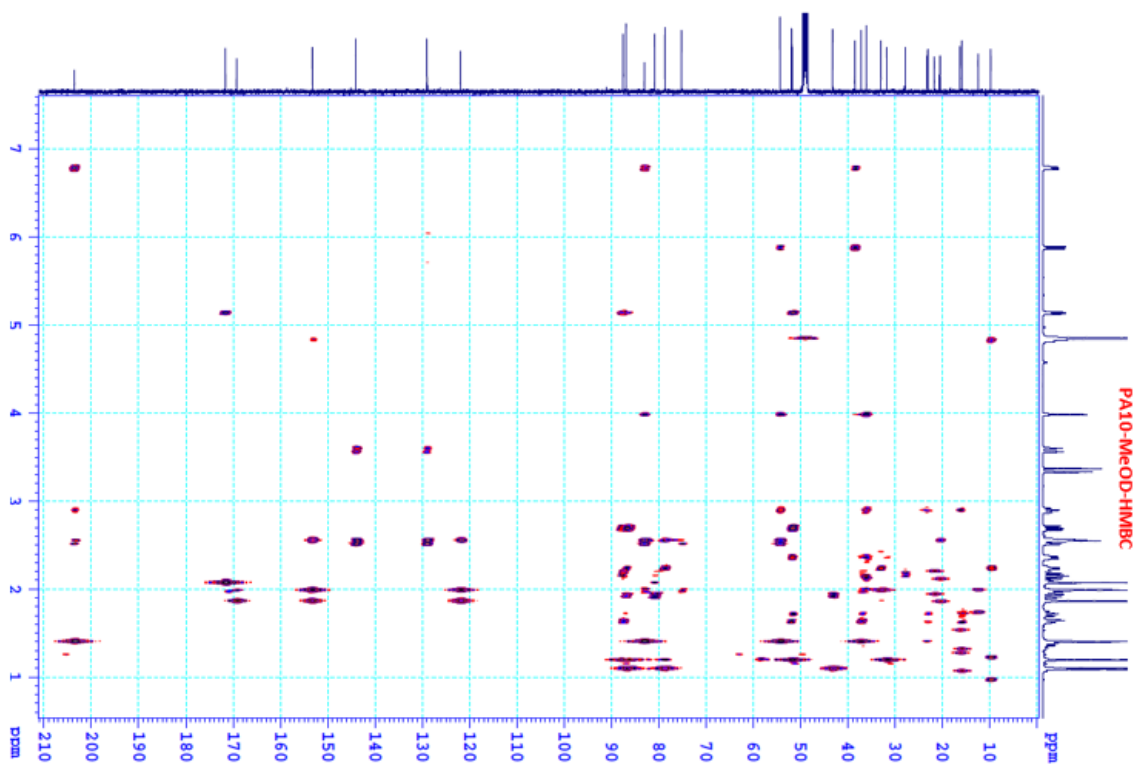
PHỤ LỤC 10. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA10



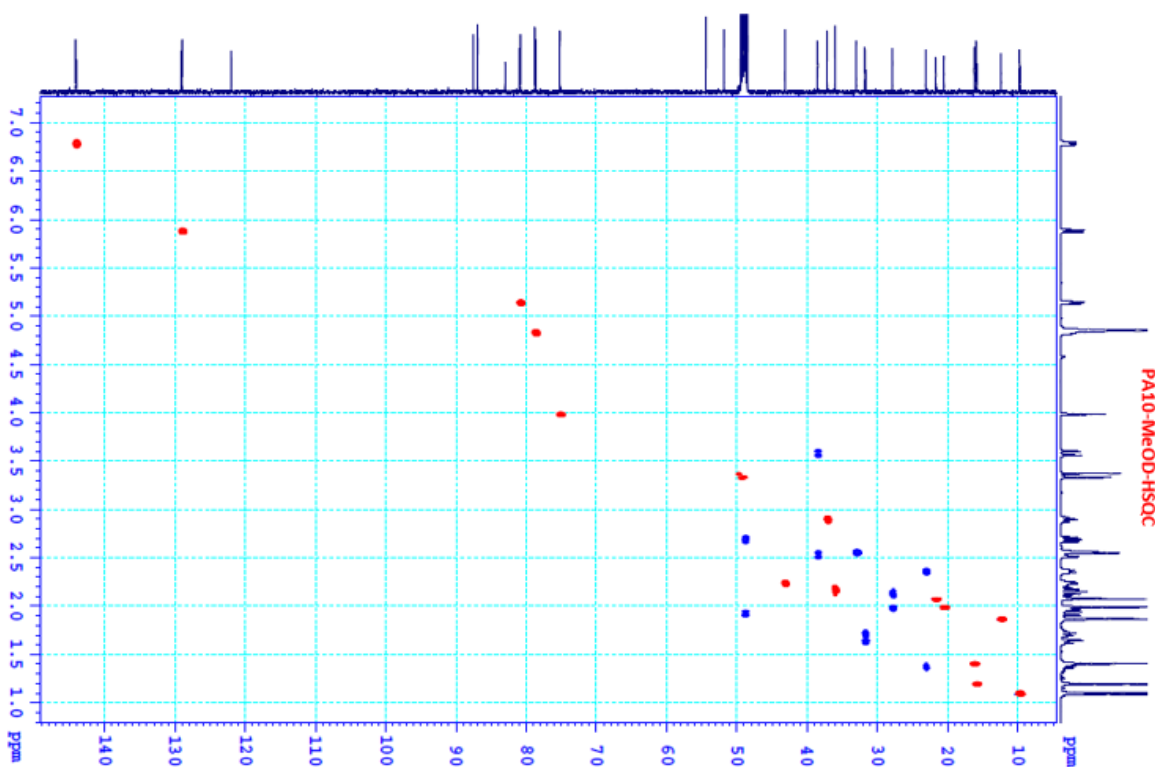
Phụ lục 10.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA10** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 10.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA10** (125 MHz, MeOD)

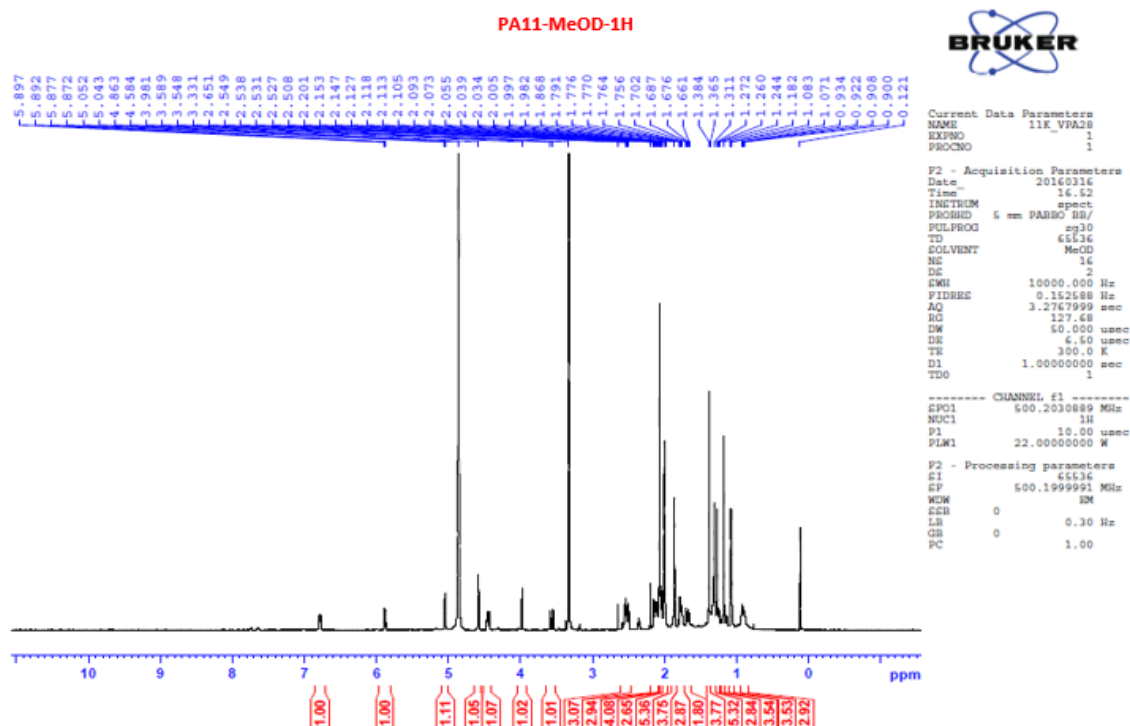


Phụ lục 10.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA10** (500/125 MHz, MeOD)

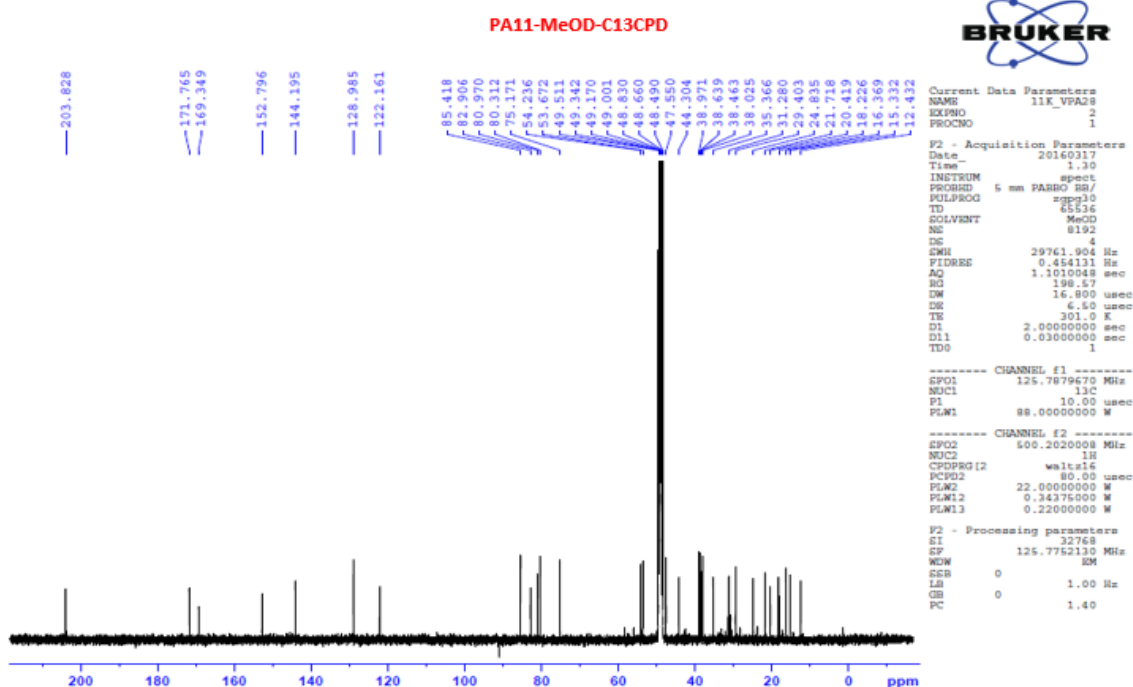


Phụ lục 10.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA10** (500/125 MHz, MeOD)

PHỤ LỤC 11. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA11

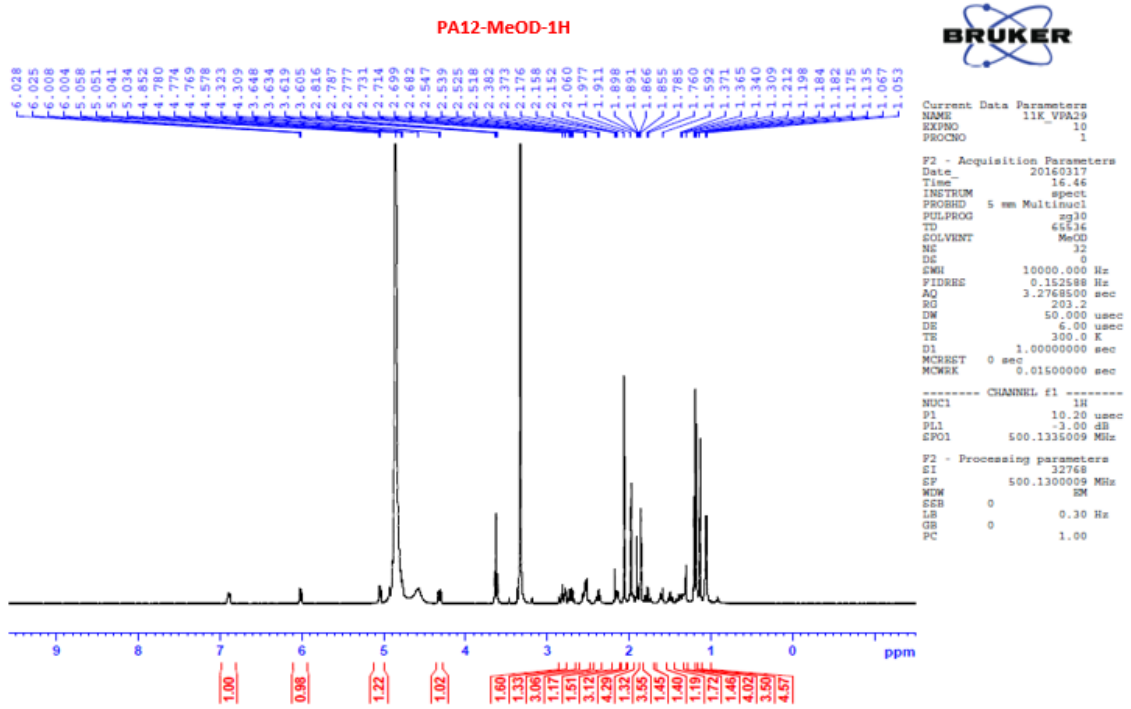


Phụ lục 11.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PA11** (500 MHz, MeOD)

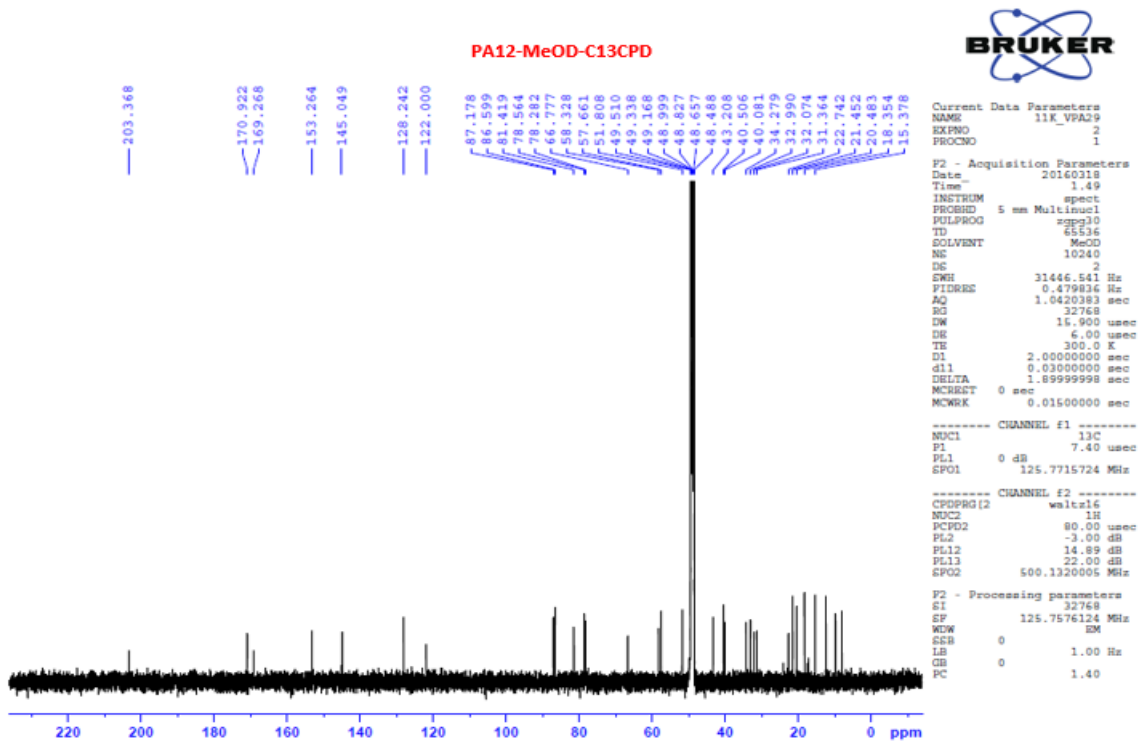


Phụ lục 11.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PA11** (125 MHz, MeOD)

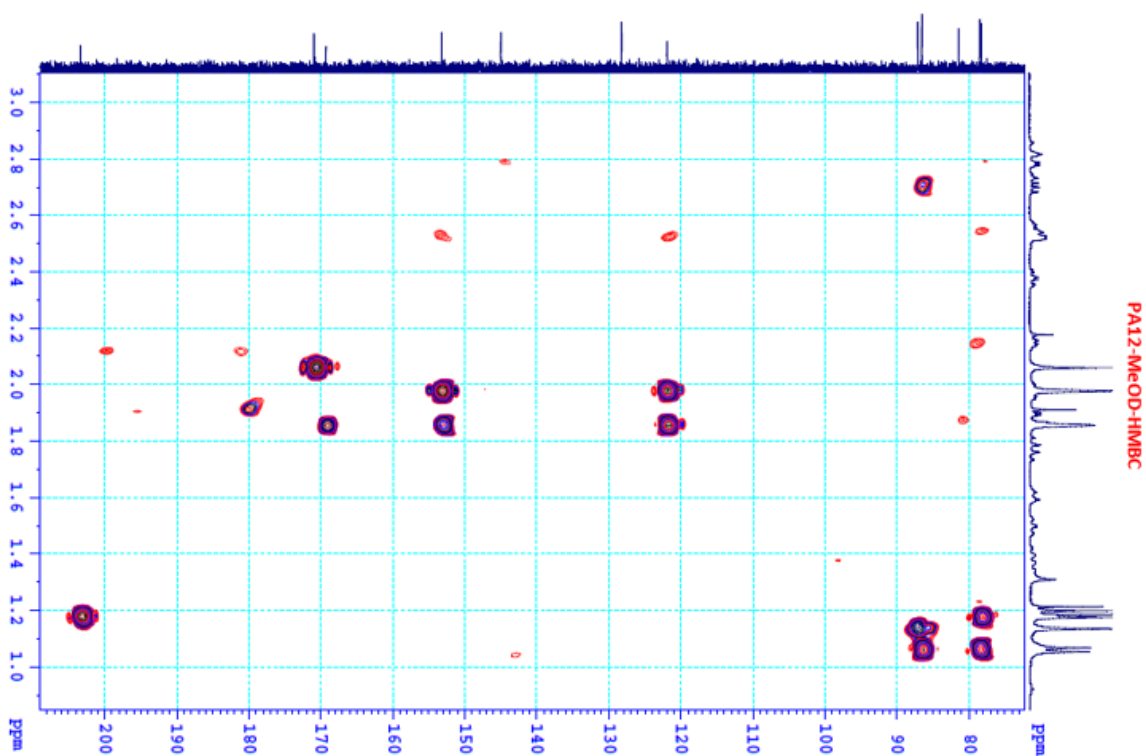
PHỤ LỤC 12. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA12



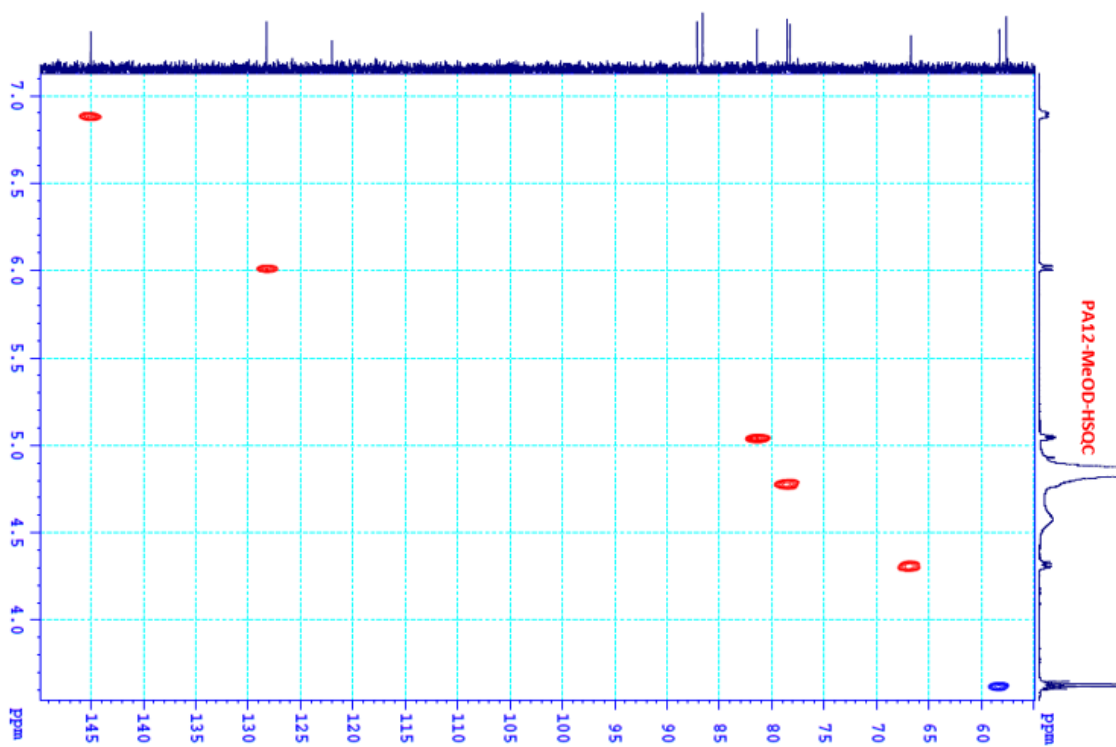
Phụ lục 12.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất **PA12** (500 MHz, MeOD)



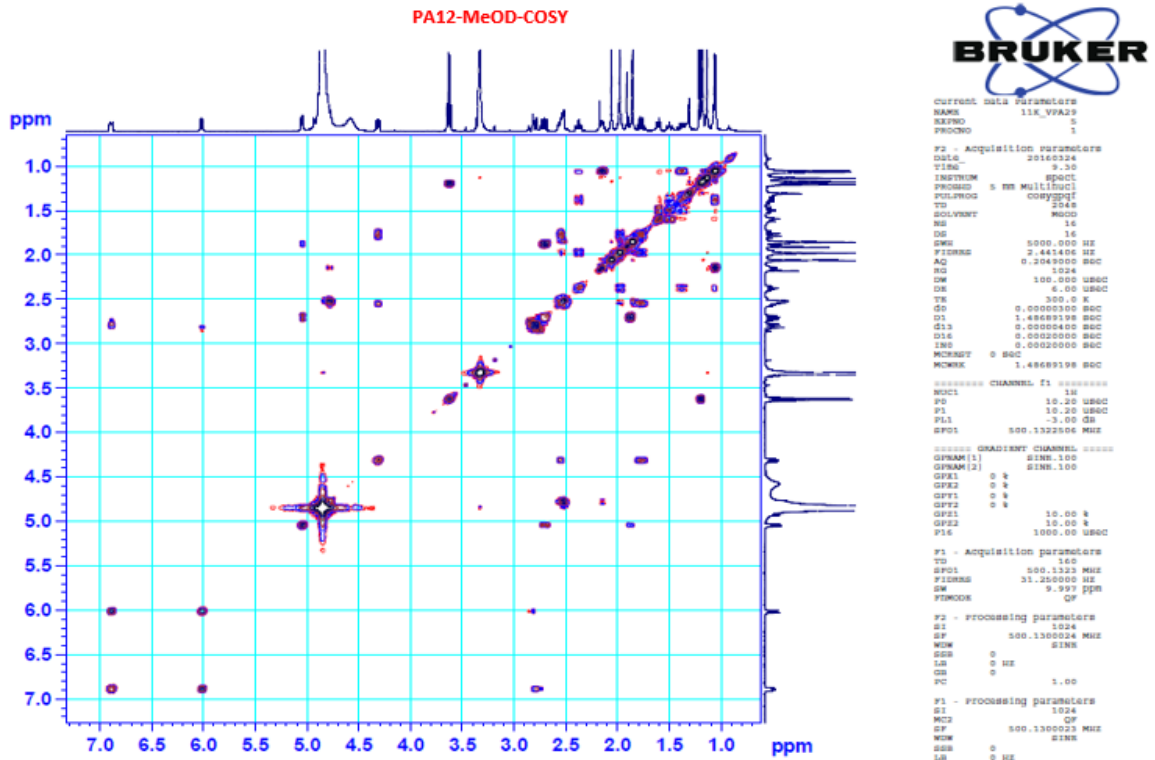
Phụ lục 12.2. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất **PA12** (125 MHz, MeOD)



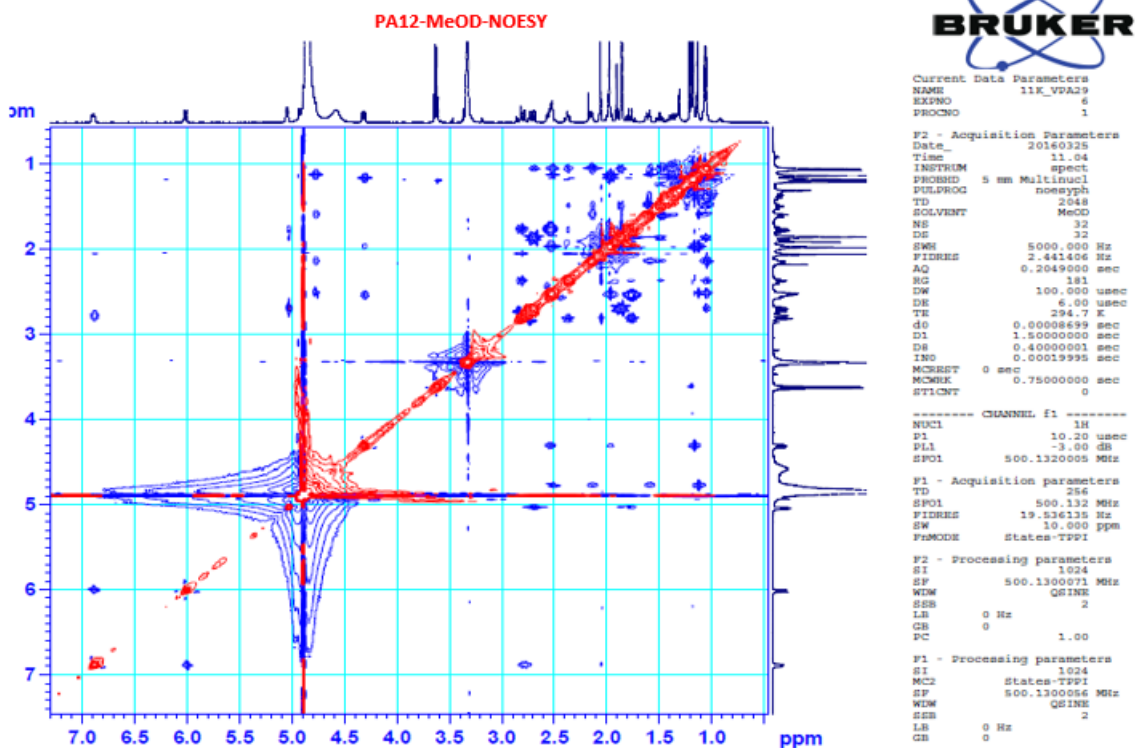
Phụ lục 12.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA12** (500/125 MHz, MeOD)



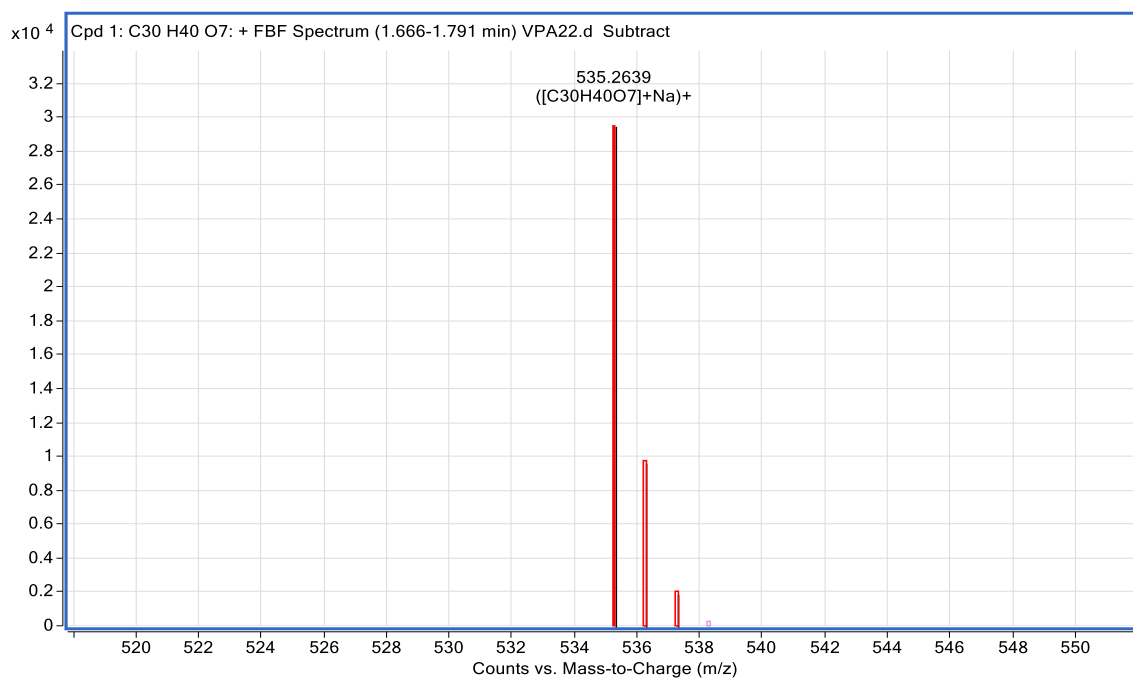
Phụ lục 12.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA12** (500/125 MHz, MeOD)



Phụ lục 12.5. Phổ COSY-NMR của hợp chất **PA12** (500/500 MHz, MeOD)

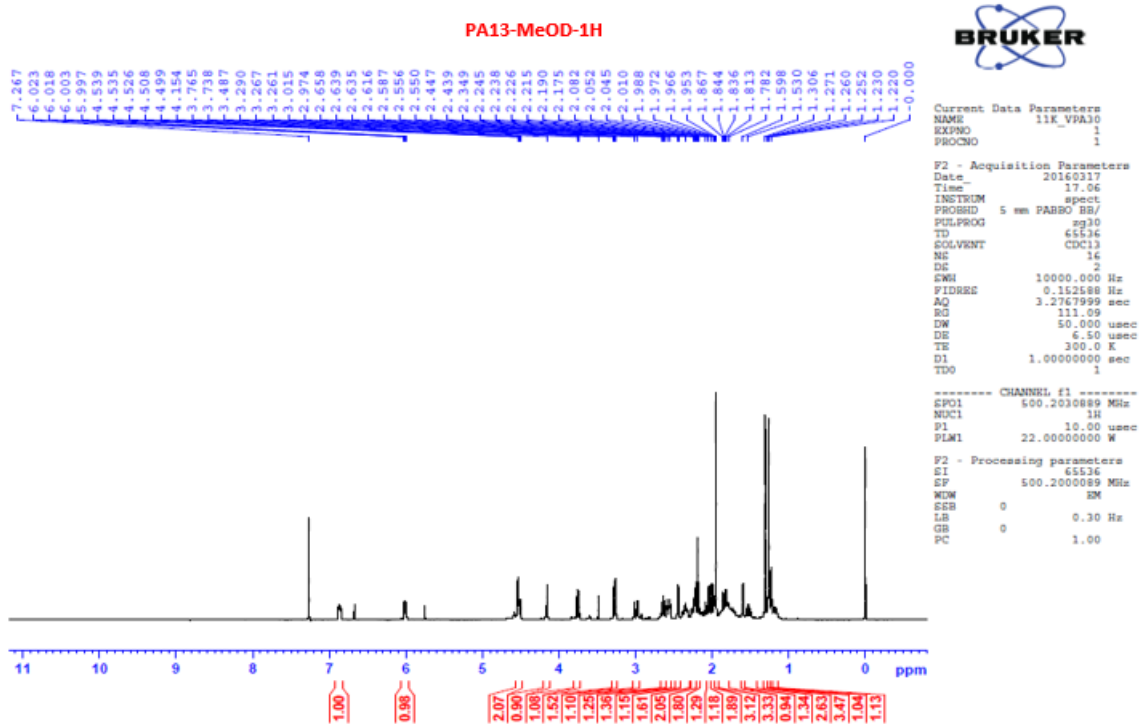


Phụ lục 12.6. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PA12** (500/500 MHz, MeOD)

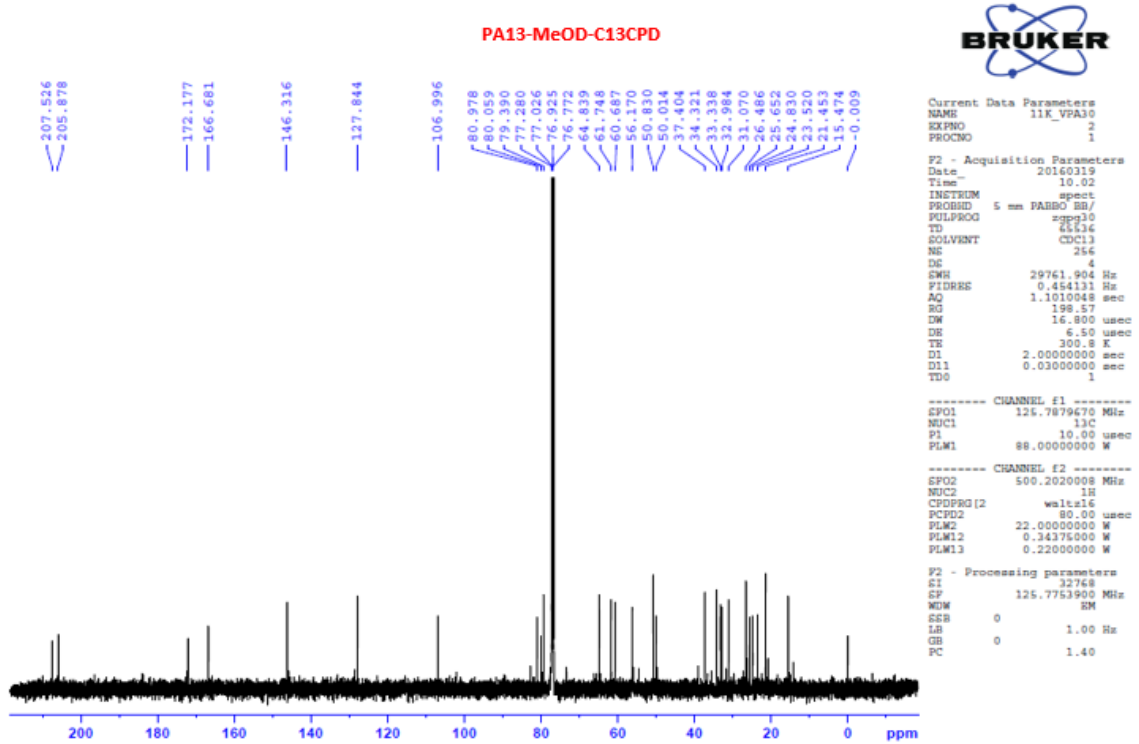


Phụ lục 12.7. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PA12**

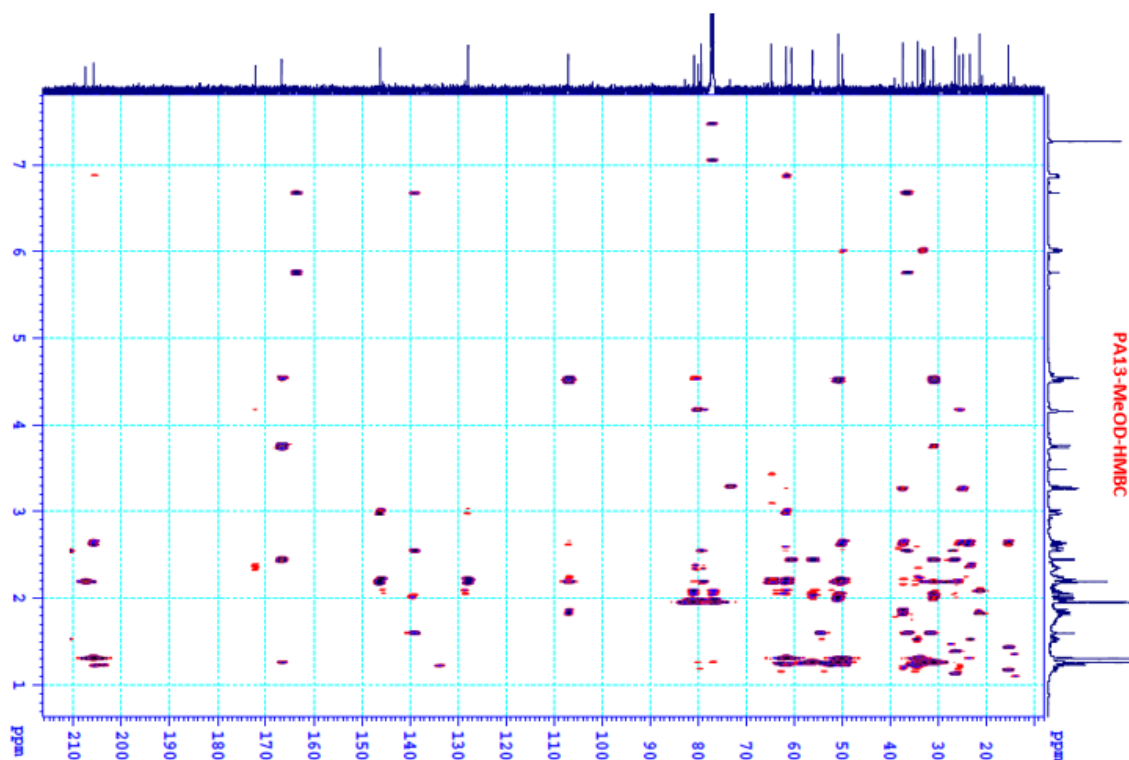
PHỤ LỤC 13. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA13



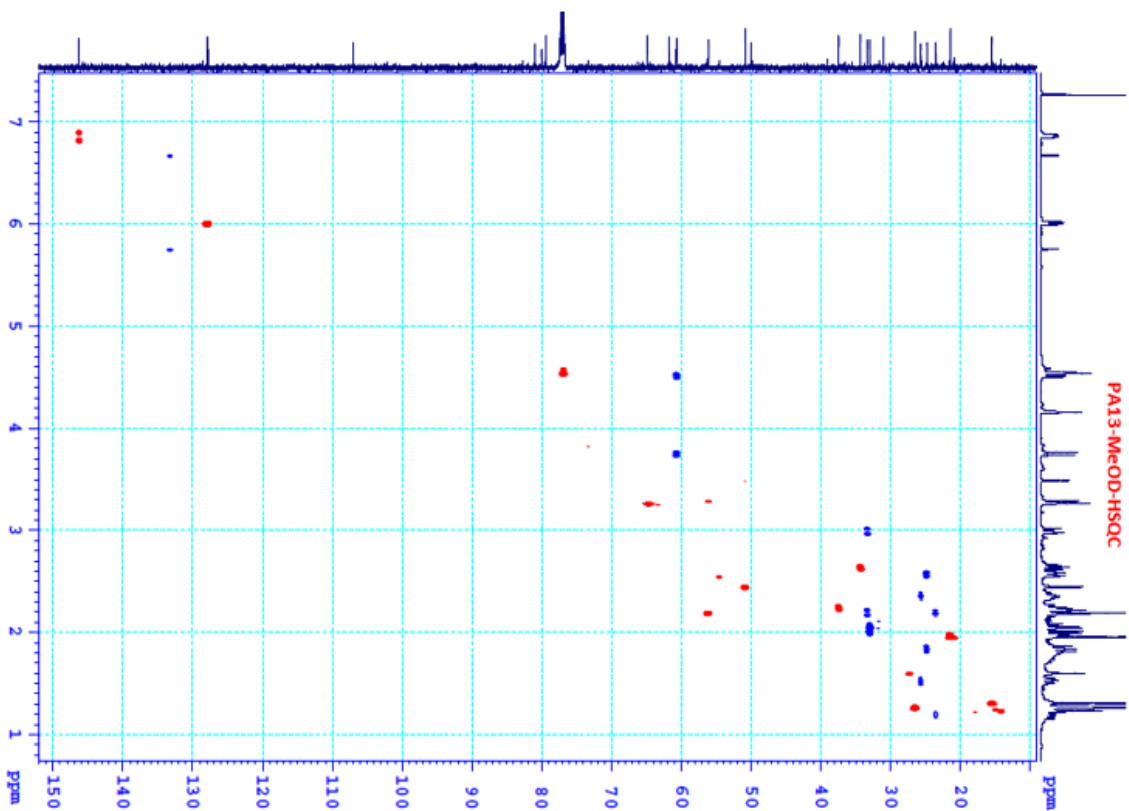
Phụ lục 13.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất PA13 (500 MHz, CDCl_3)



Phụ lục 13.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PA13 (125 MHz, CDCl_3)

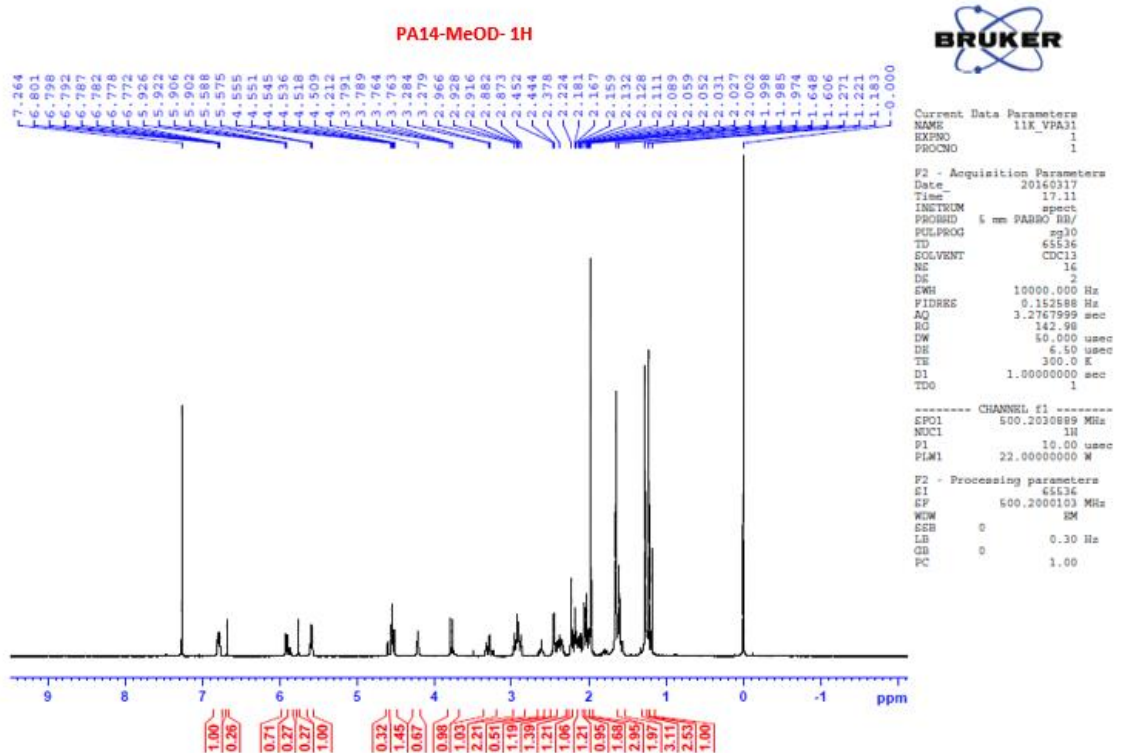


Phụ lục 13.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA13** (500/125 MHz, CDCl₃)

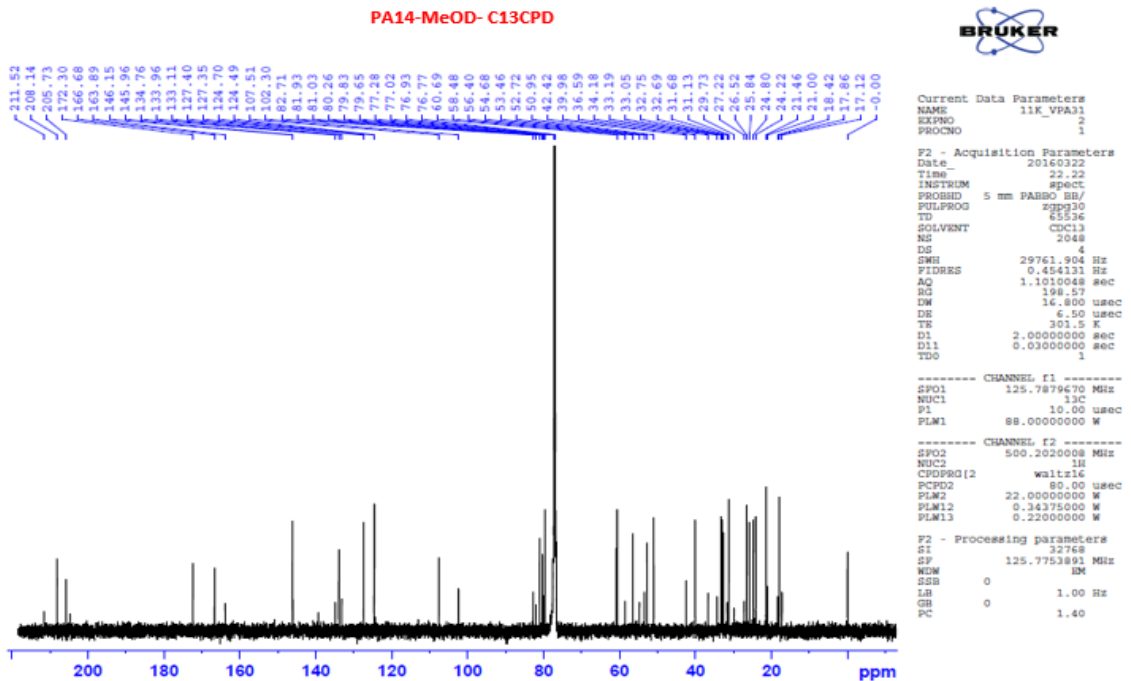


Phụ lục 13.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA13** (500/125 MHz, CDCl₃)

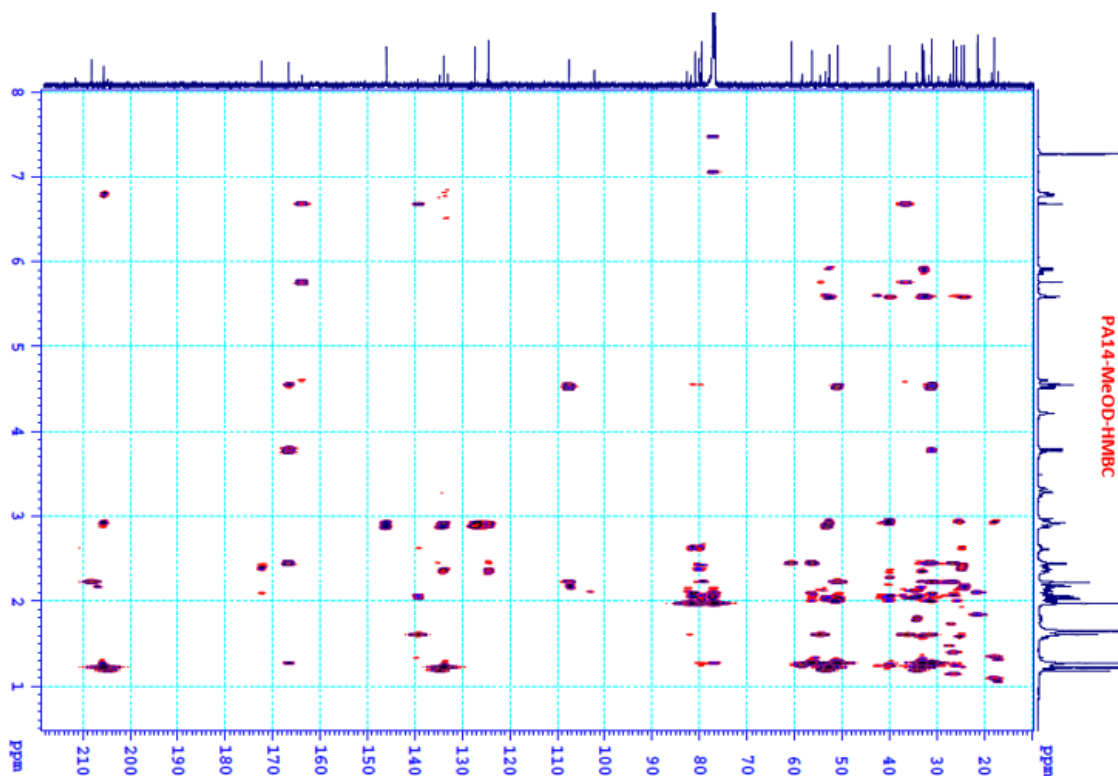
PHỤ LỤC 14: CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA14



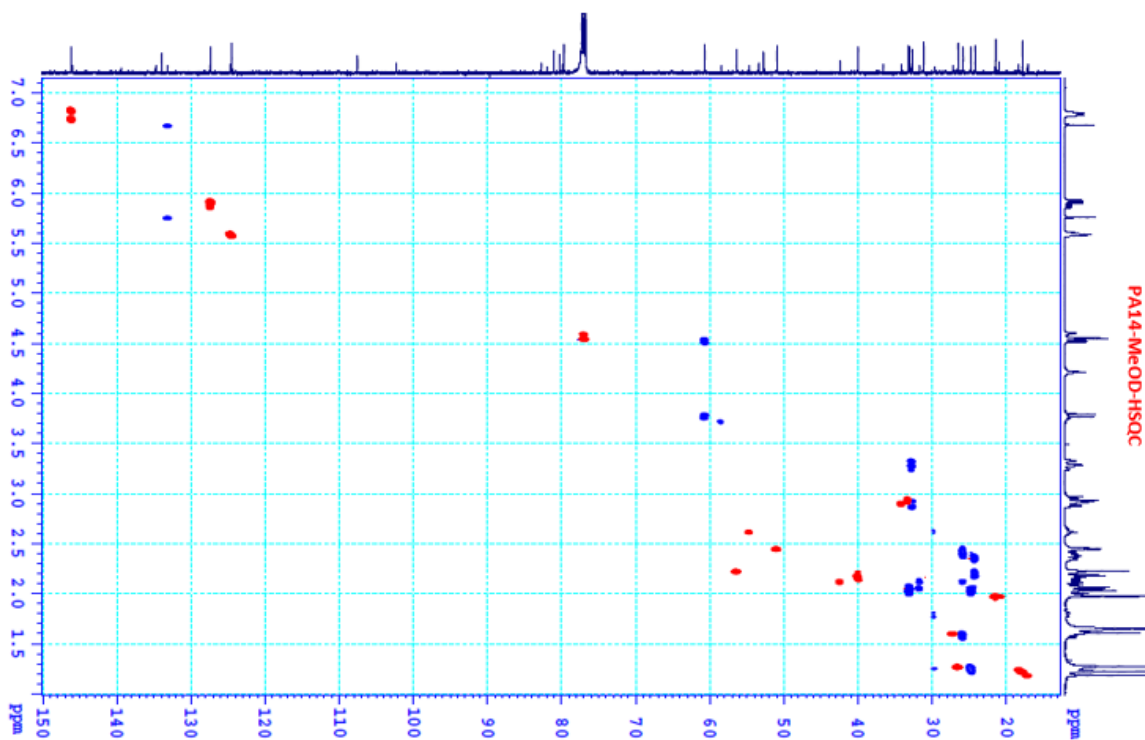
Phụ lục 14.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất **PA14** (500 MHz, CDCl₃)



Phụ lục 14.2. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất **PA14** (125 MHz, CDCl₃)

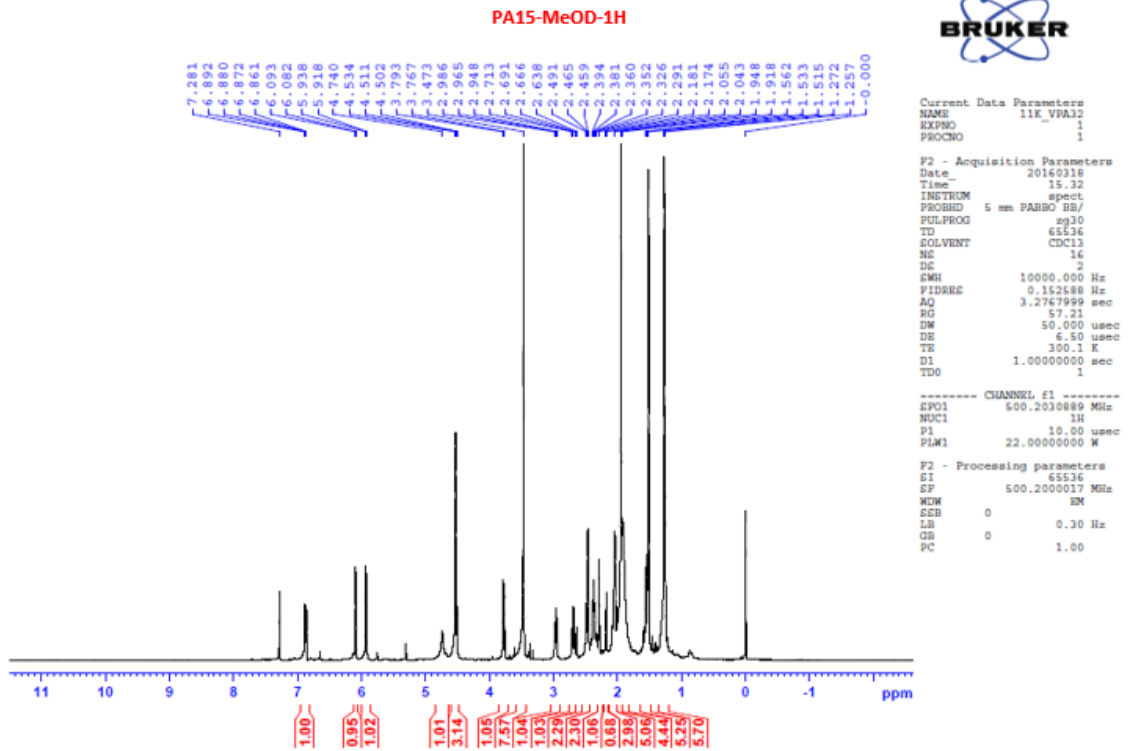


Phụ lục 14.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA14** (500/125 MHz, CDCl₃)

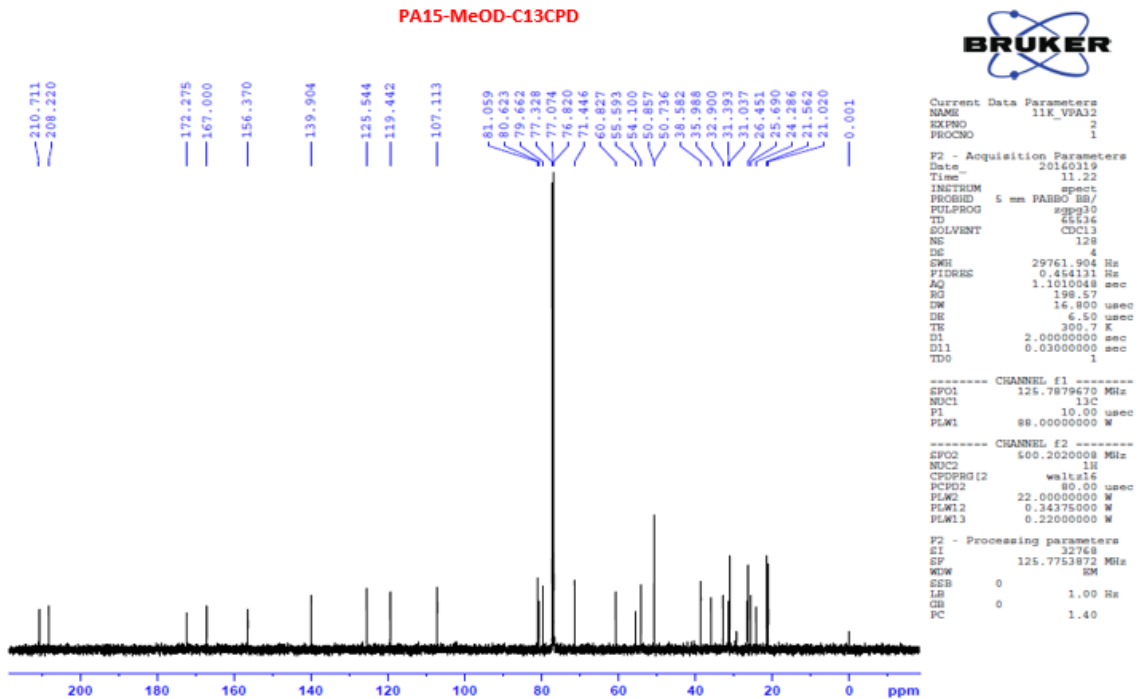


Phụ lục 14.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA14** (500/125 MHz, CDCl₃)

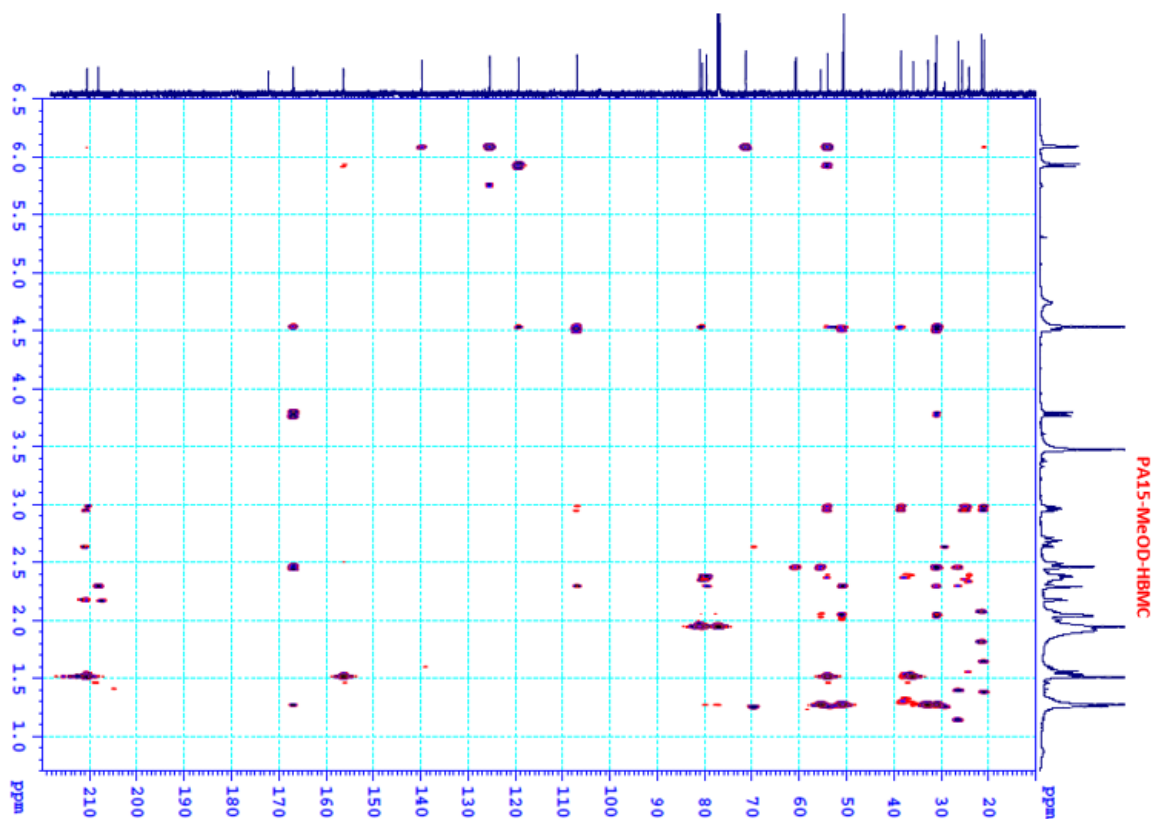
PHỤ LỤC 15. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PA15



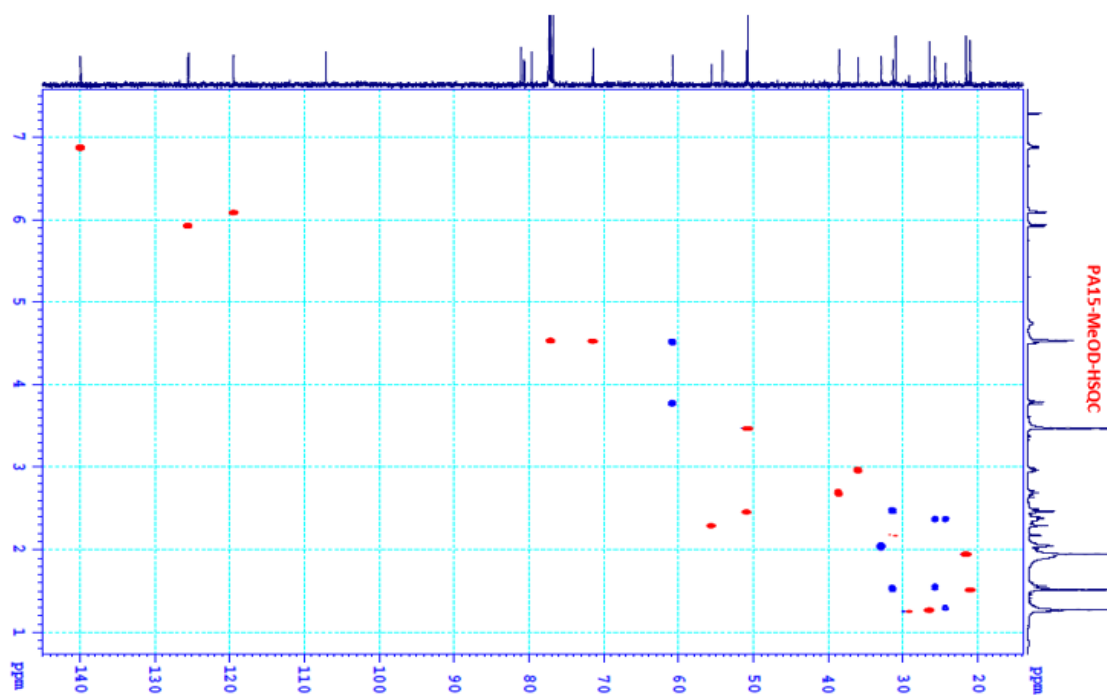
Phụ lục 15.1. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PA15 (500 MHz, CDCl₃)



Phụ lục 15.2. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PA15 (125 MHz, CDCl₃)

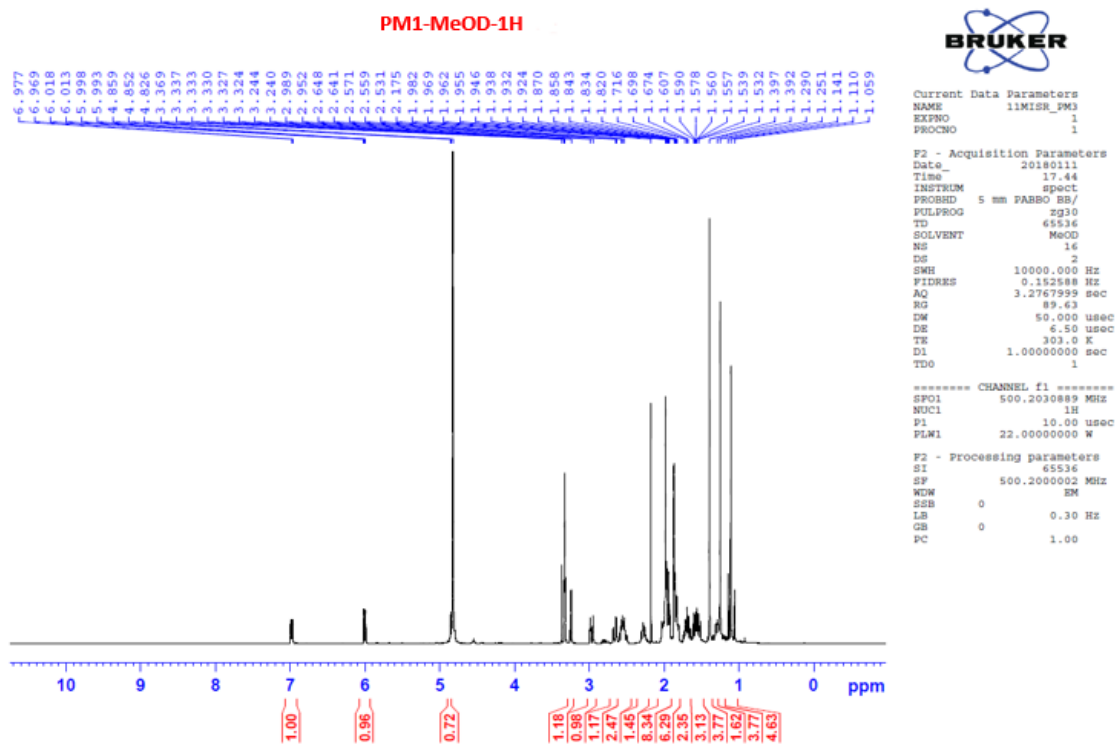


Phụ lục 15.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PA15** (500/125 MHz, CDCl₃)

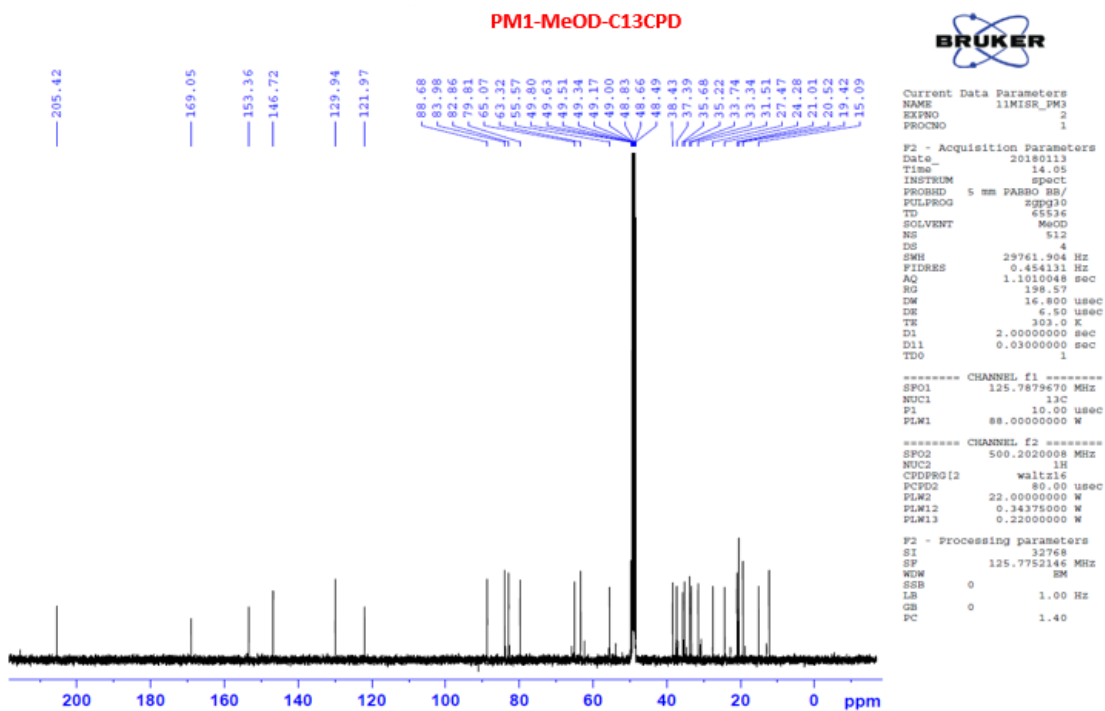


Phụ lục 15.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PA15** (500/125 MHz, CDCl₃)

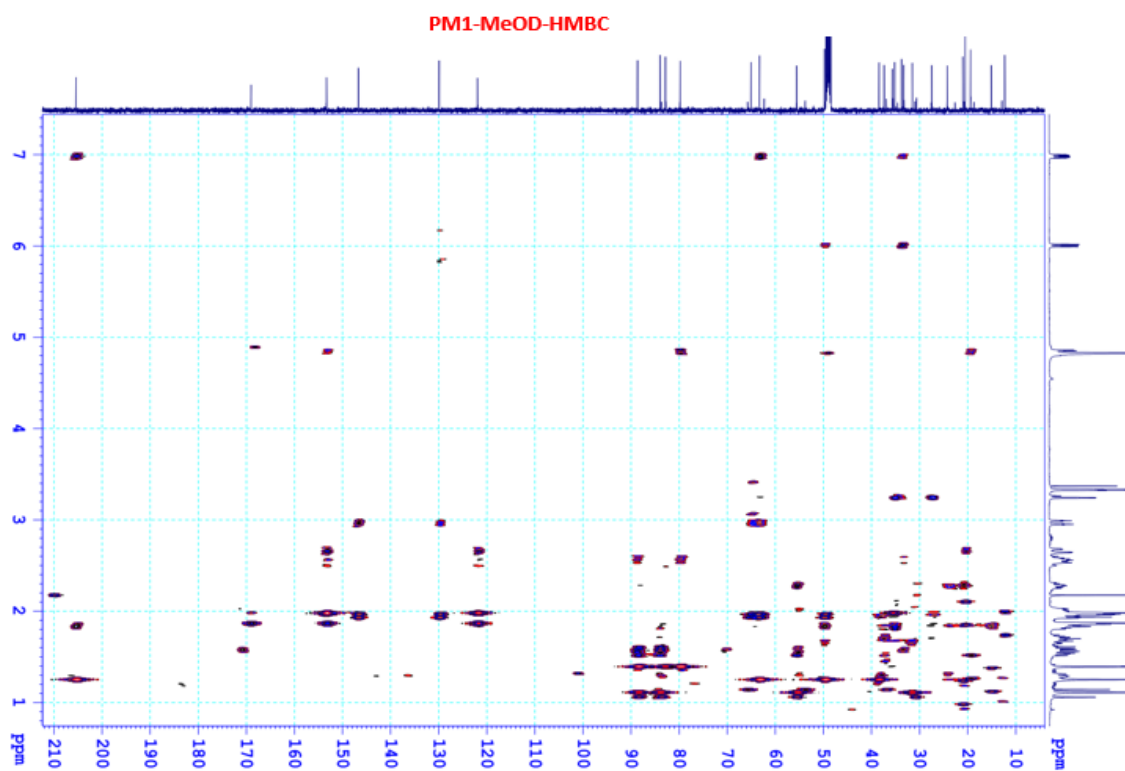
PHỤ LỤC 16. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM1



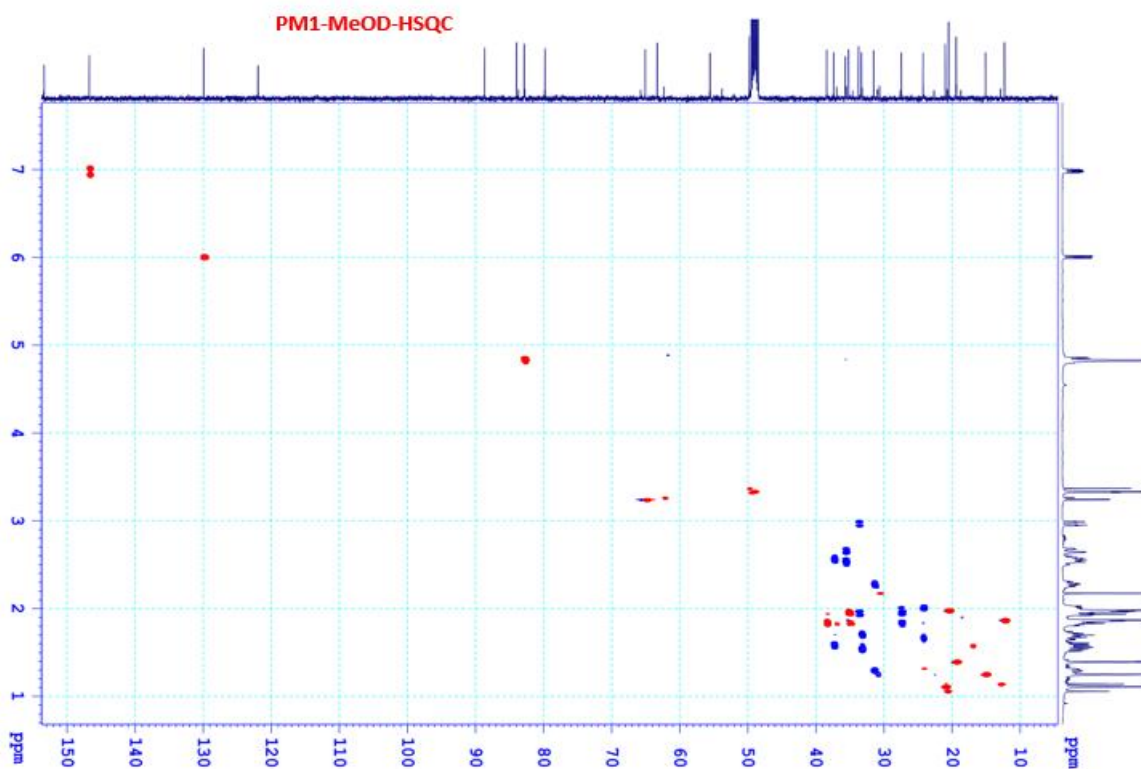
Phụ lục 16.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM1** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 16.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM1** (125 MHz, MeOD)

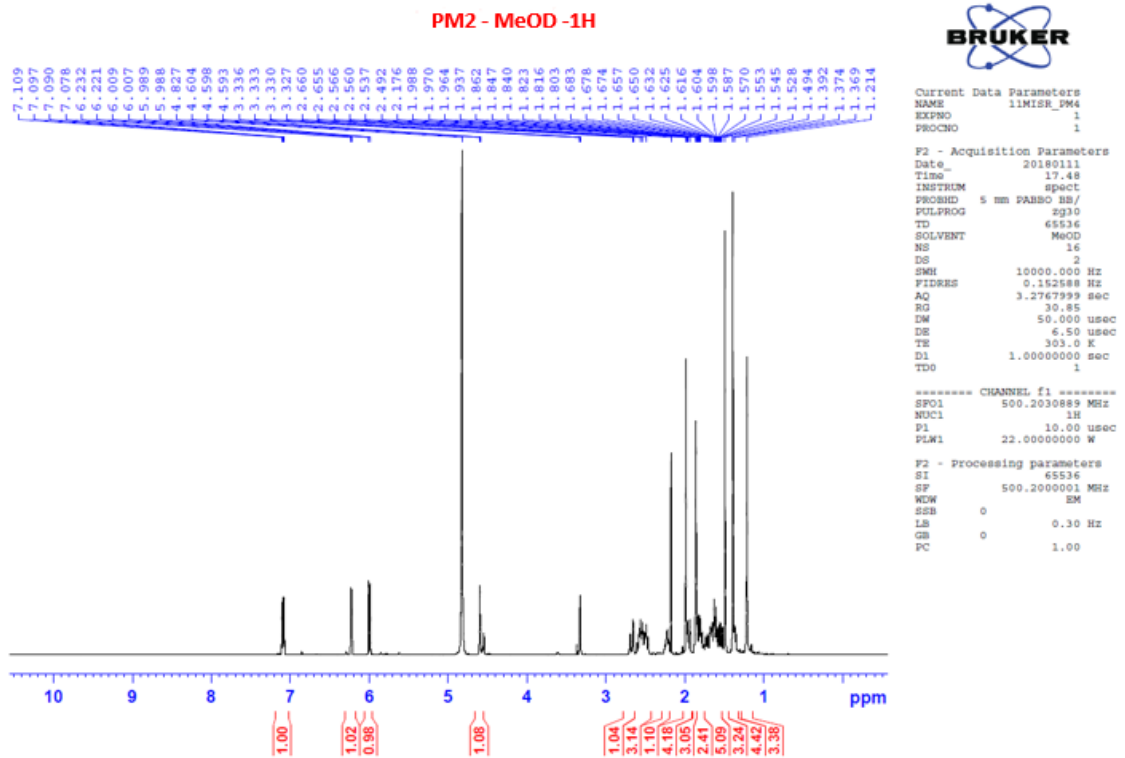


Phụ lục 16.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM1** (500/125 MHz, MeOD)

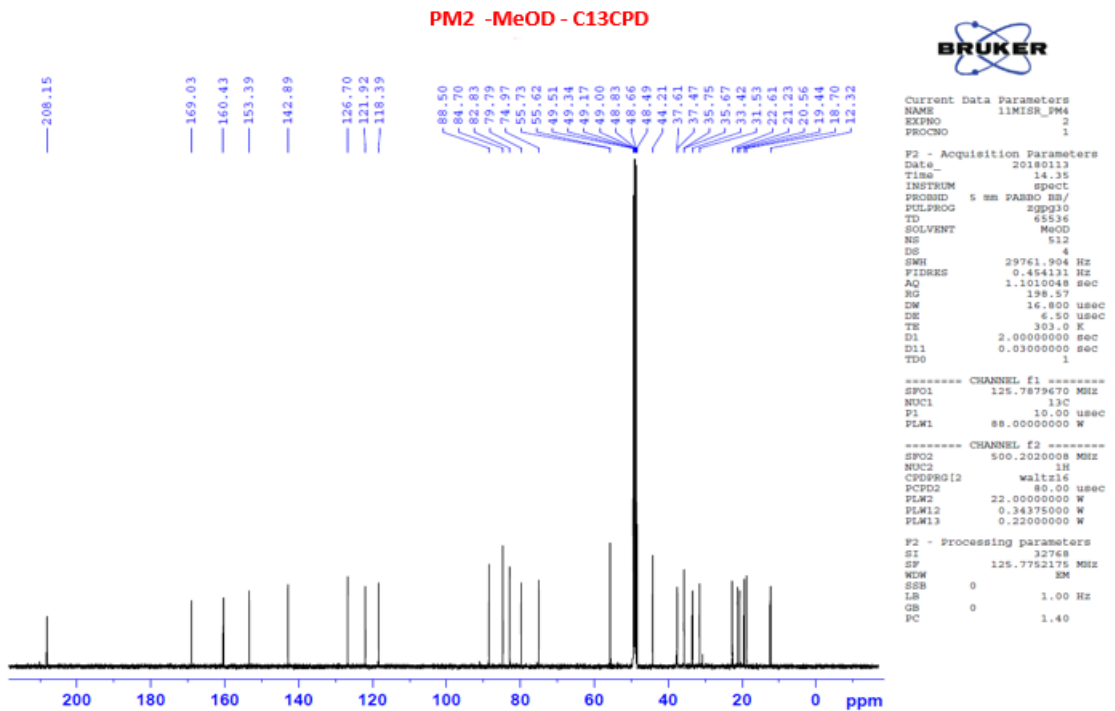


Phụ lục 16.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM1** (500/125 MHz, MeOD)

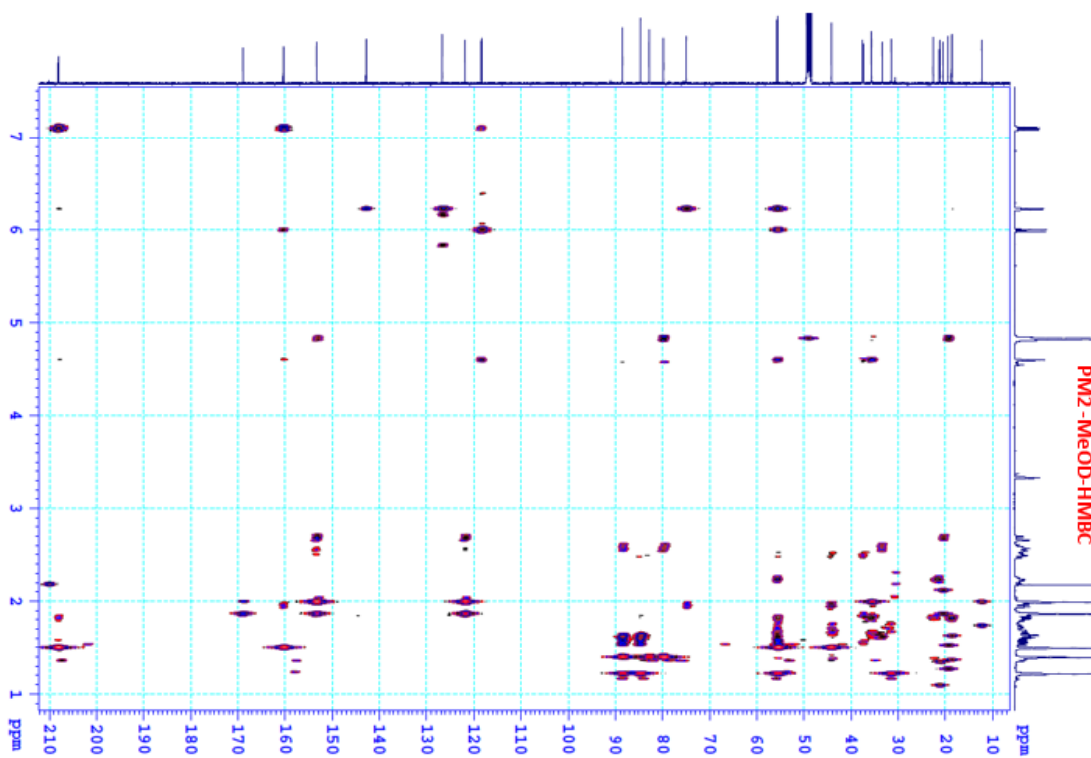
PHỤ LỤC 17. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM2



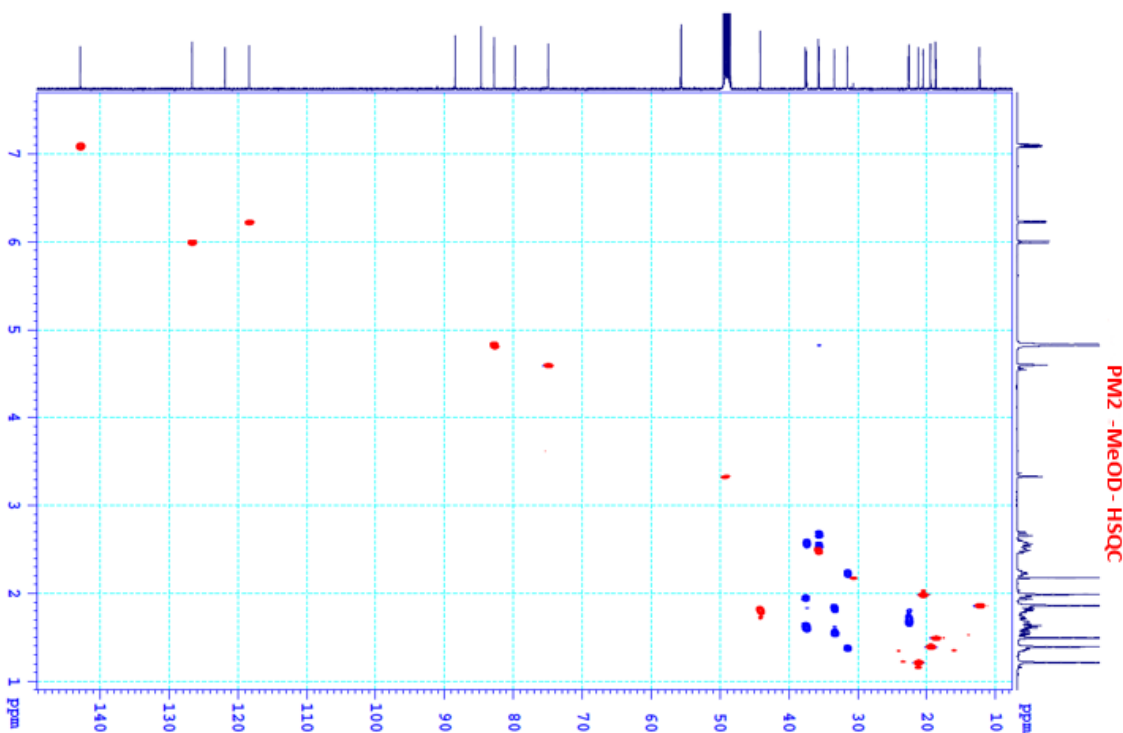
Phụ lục 17.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM2** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 17.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM2** (125 MHz, MeOD)

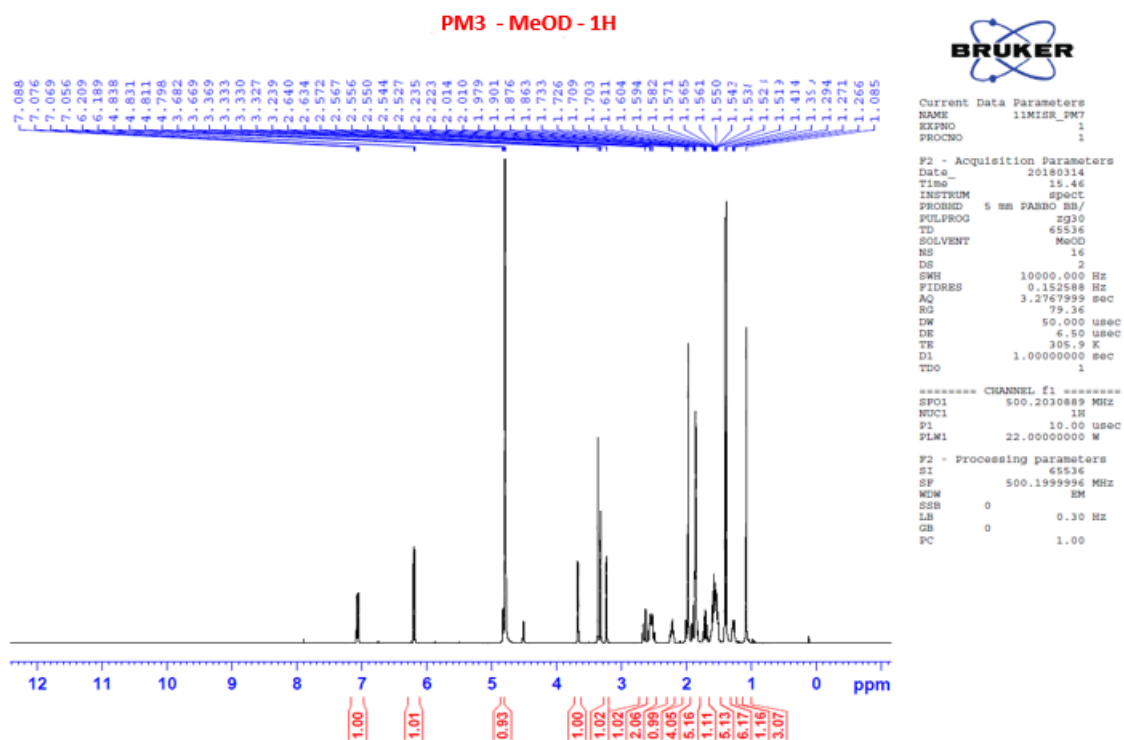


Phụ lục 17.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM2** (500/125 MHz, MeOD)

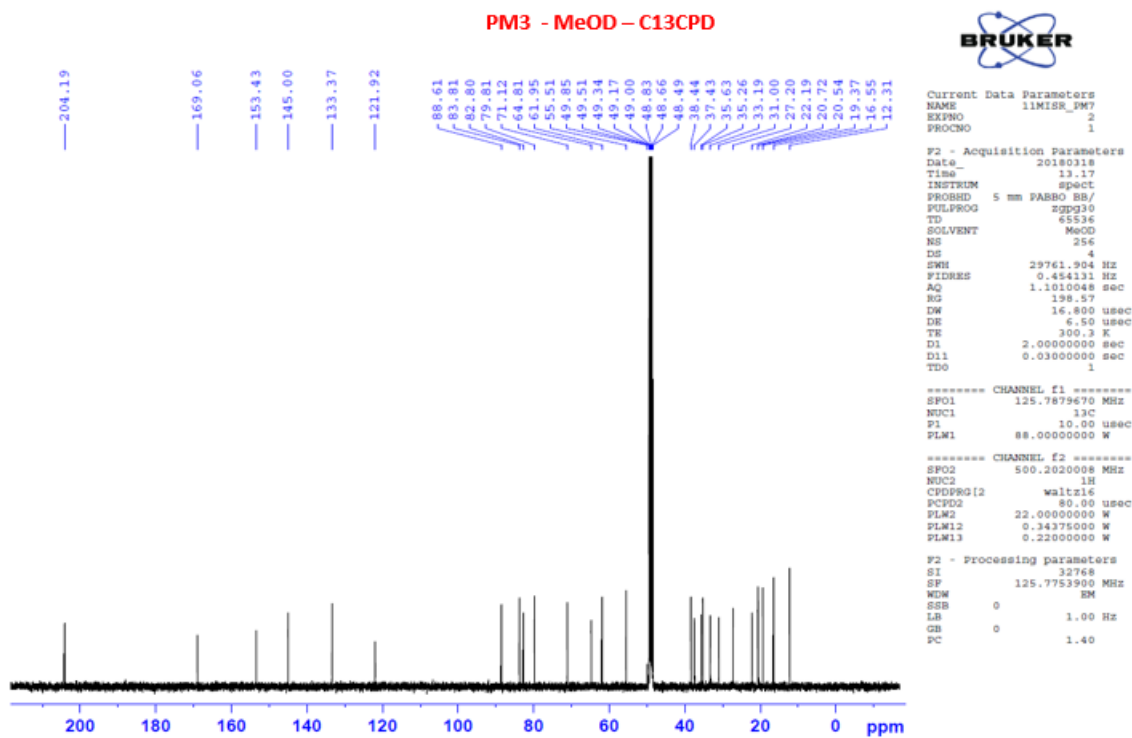


Phụ lục 17.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM2** (500/125 MHz, MeOD)

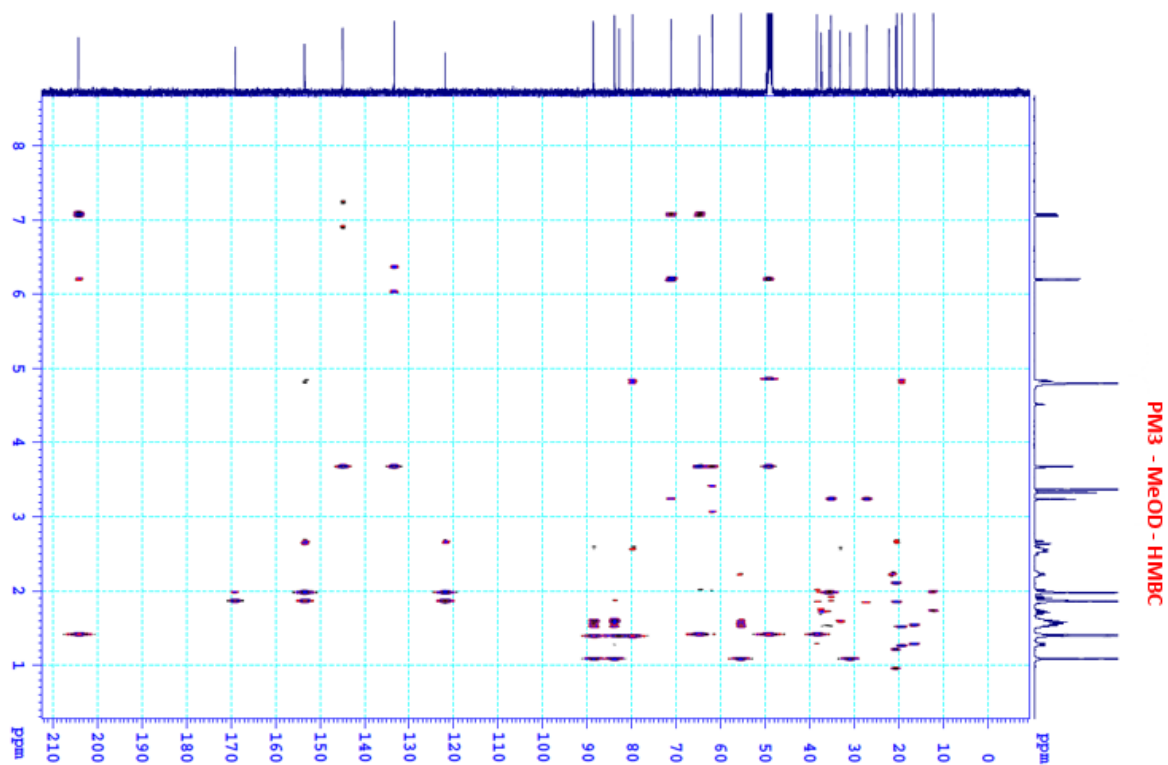
PHỤ LỤC 18. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM3



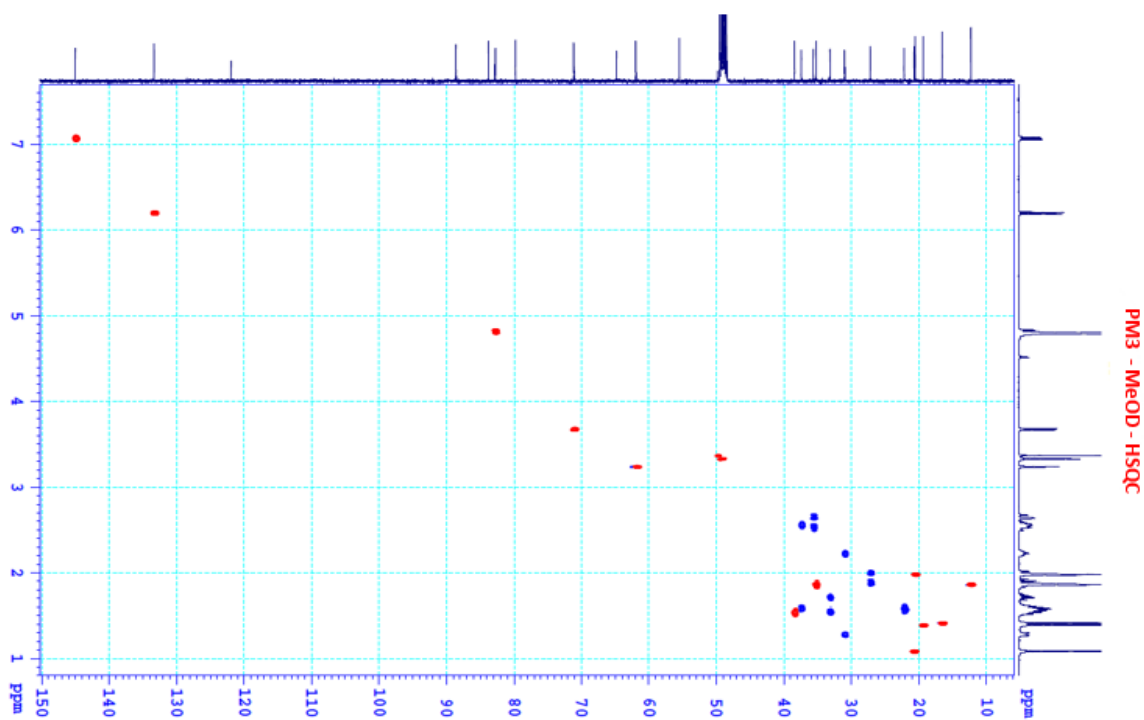
Phụ lục 18.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM3** (500 MHz, MeOD)



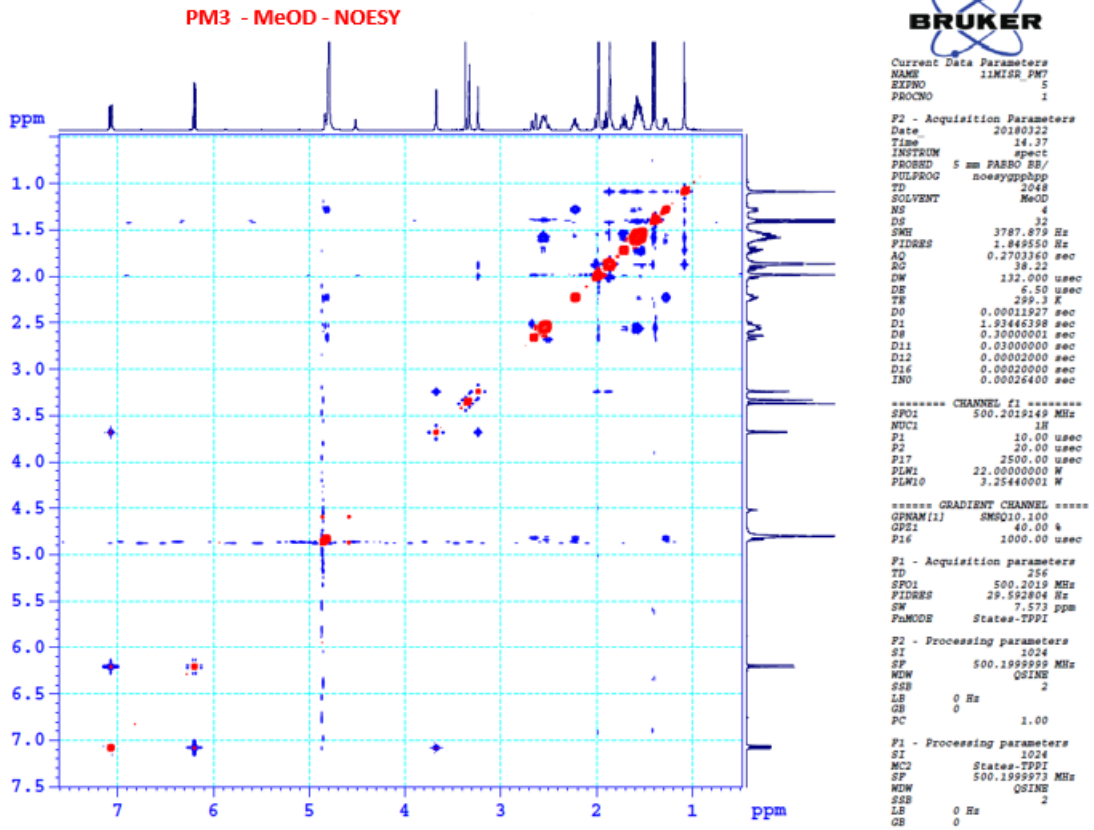
Phụ lục 18.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM3** (125 MHz, MeOD)



Phụ lục 18.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM3** (500/125 MHz, MeOD)

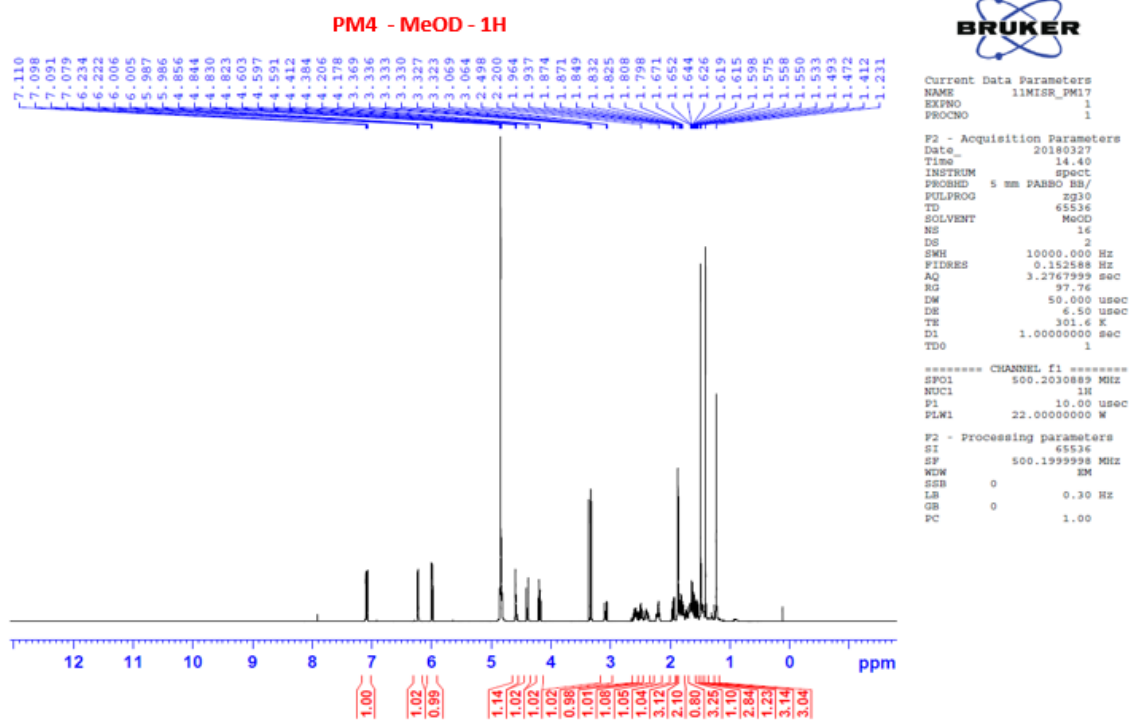


Phụ lục 18.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM3** (500/125 MHz, MeOD)

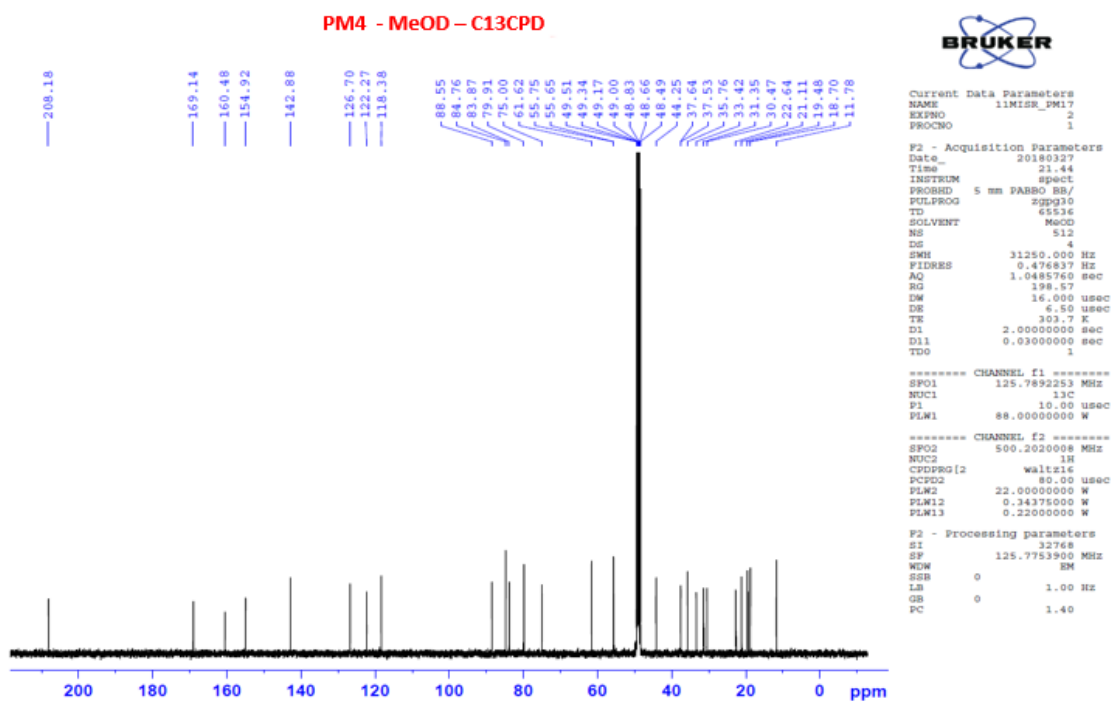


Phụ lục 18.5. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PM3** (500/500 MHz, MeOD)

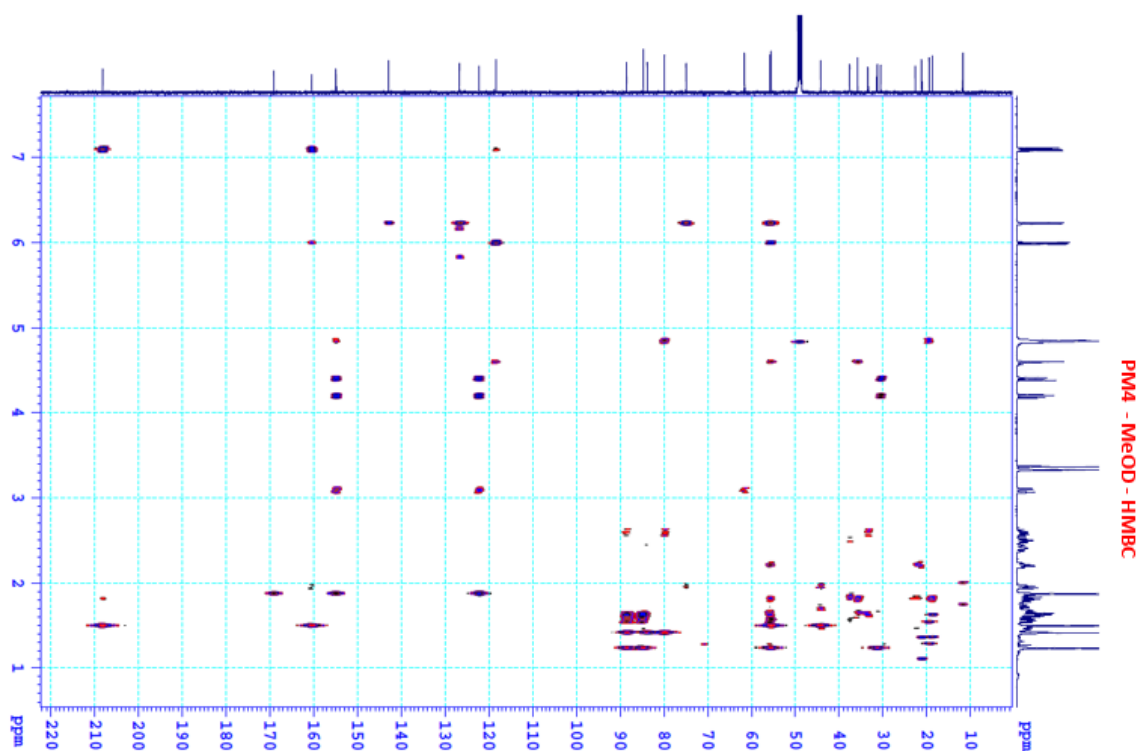
PHỤ LỤC 19. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM4



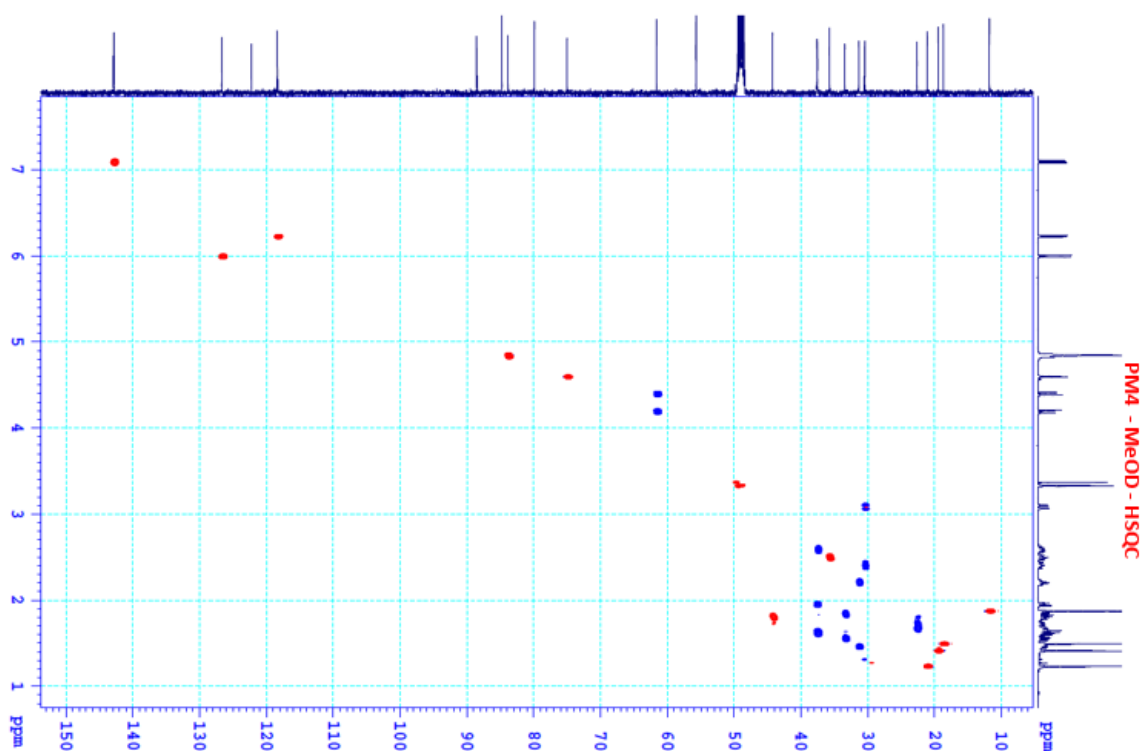
Phụ lục 19.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM4** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 19.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM4** (125 MHz, MeOD)

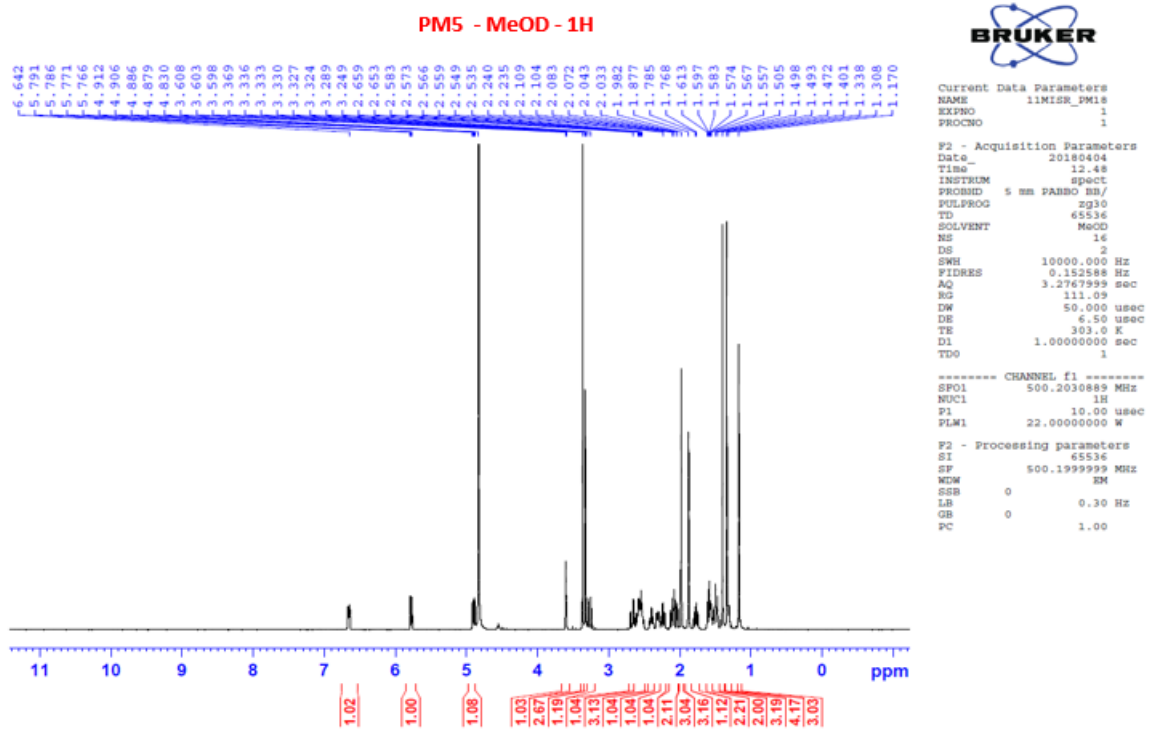


Phụ lục 19.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM4** (500/125 MHz, MeOD)

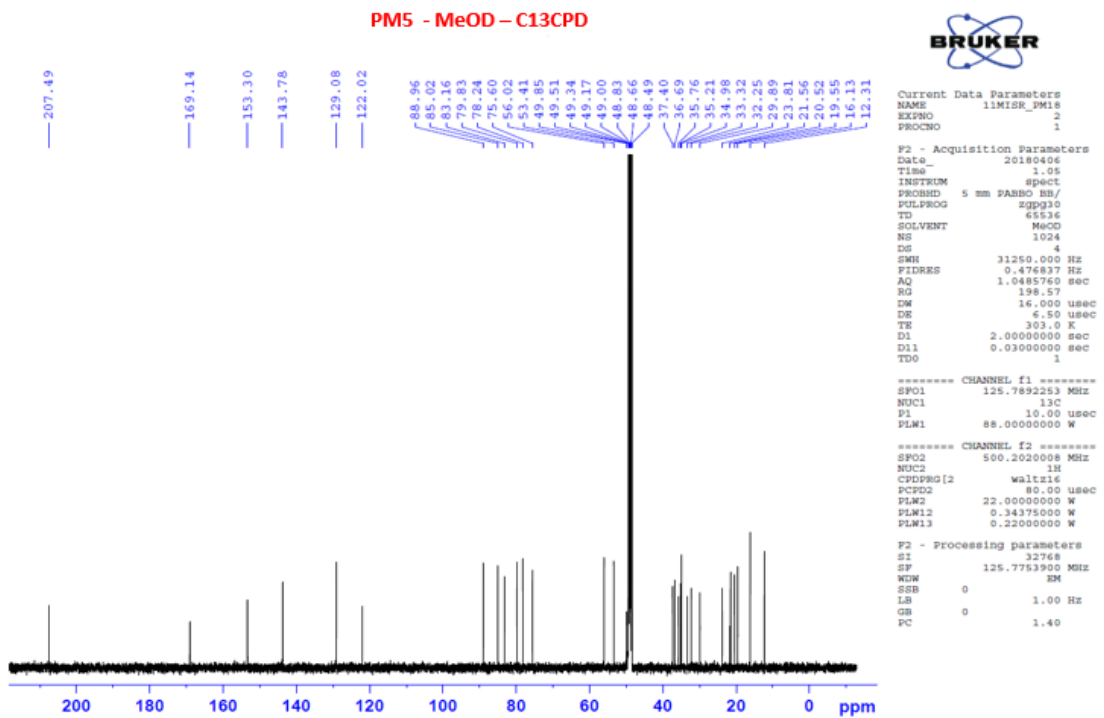


Phụ lục 19.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM4** (500/125 MHz, MeOD)

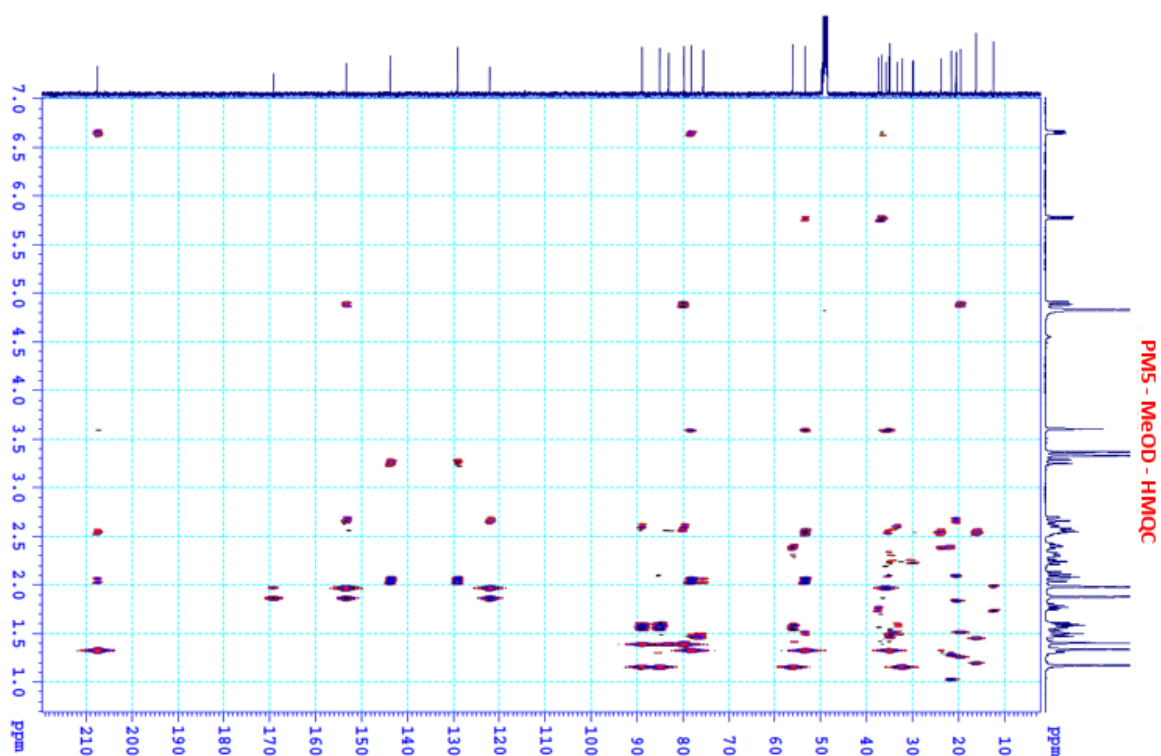
PHỤ LỤC 20. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM5



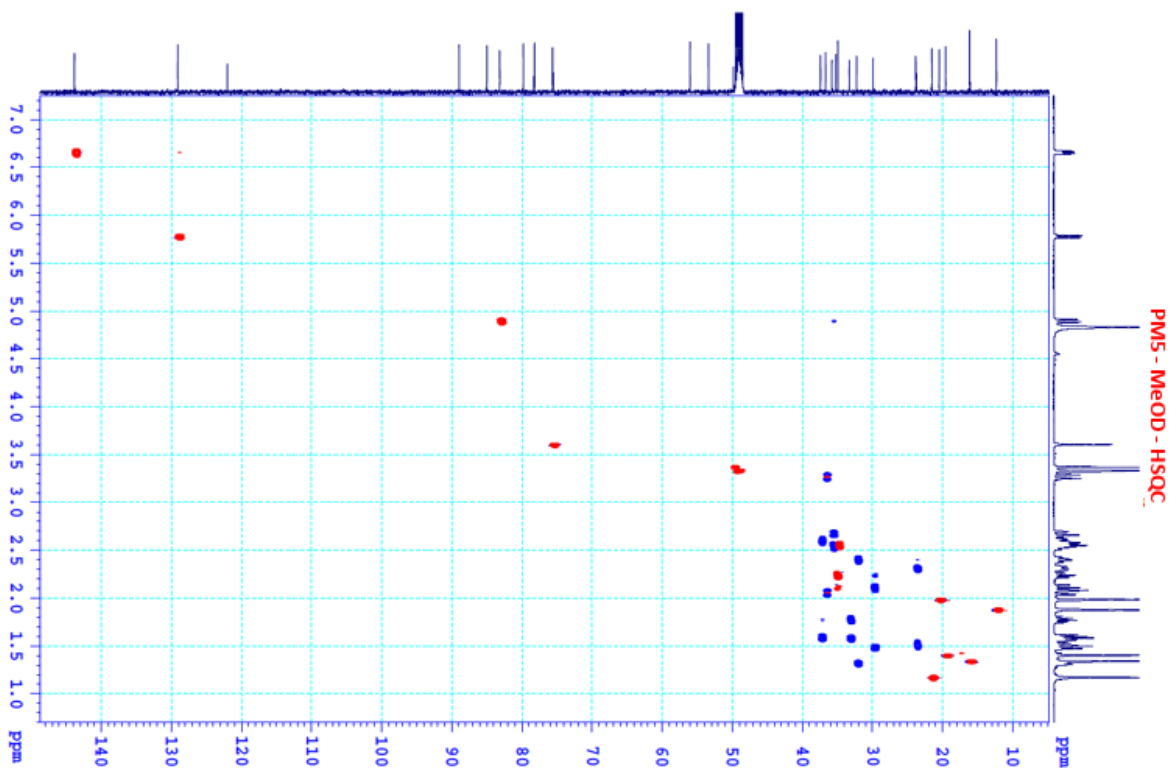
Phụ lục 20.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM5** (500 MHz, MeOD)



Phụ lục 20.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM5** (125 MHz, MeOD)

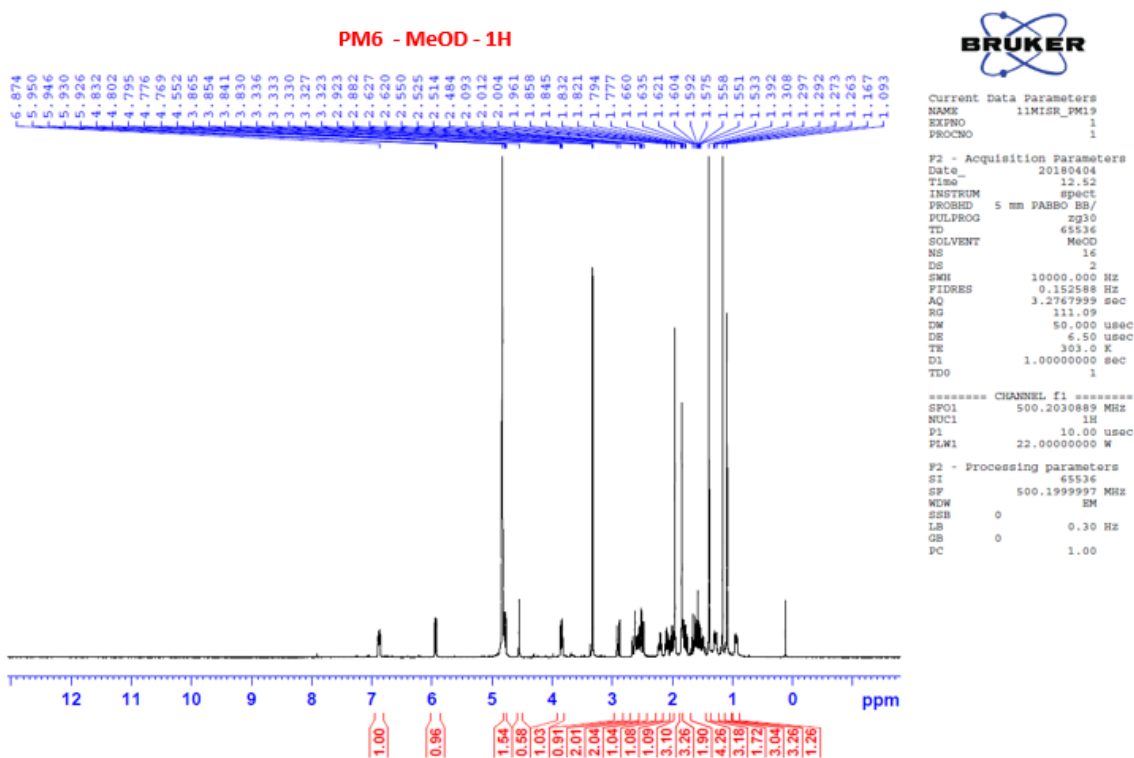


Phụ lục 20.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM5** (500/125 MHz, MeOD)

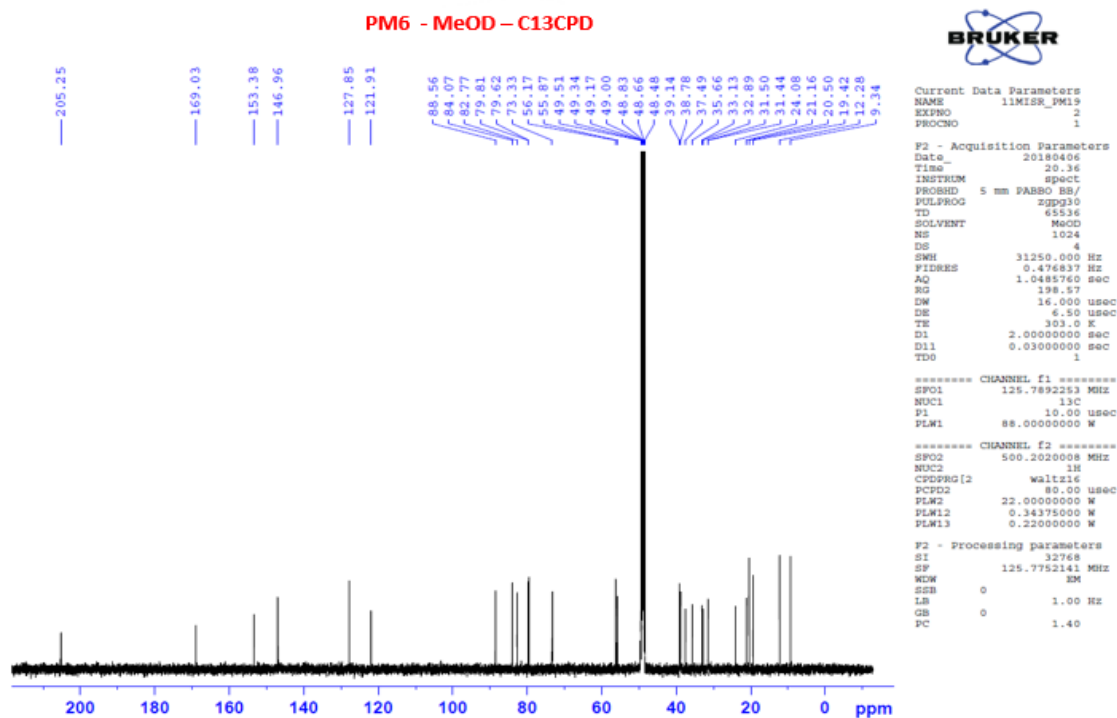


Phụ lục 20.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM5** (500/125 MHz, MeOD)

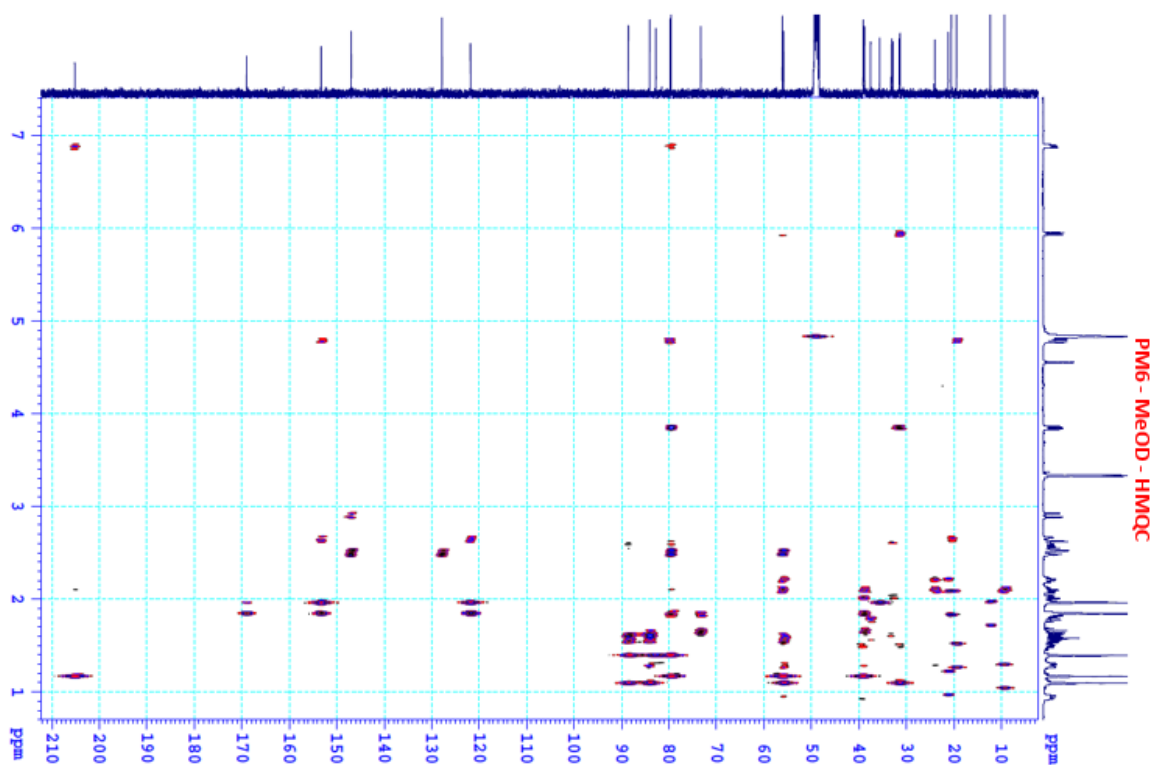
PHỤ LỤC 21. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT PM6



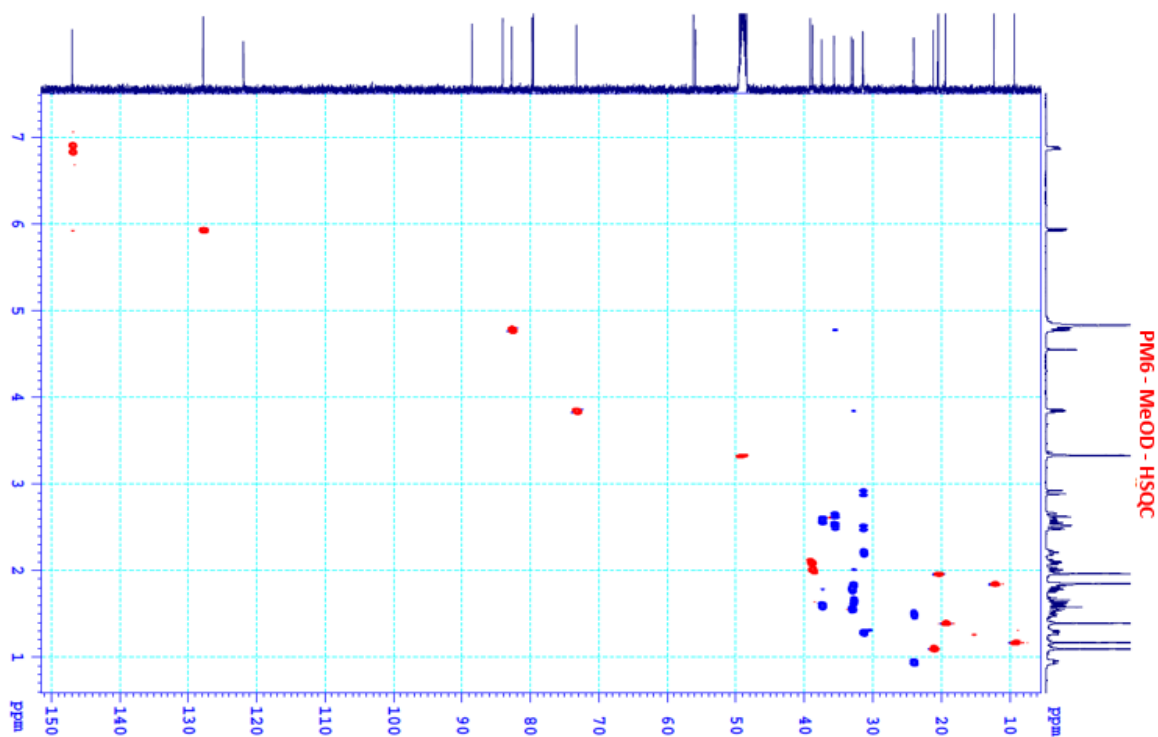
Phụ lục 21.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PM6** (500 MHz, MeOD)



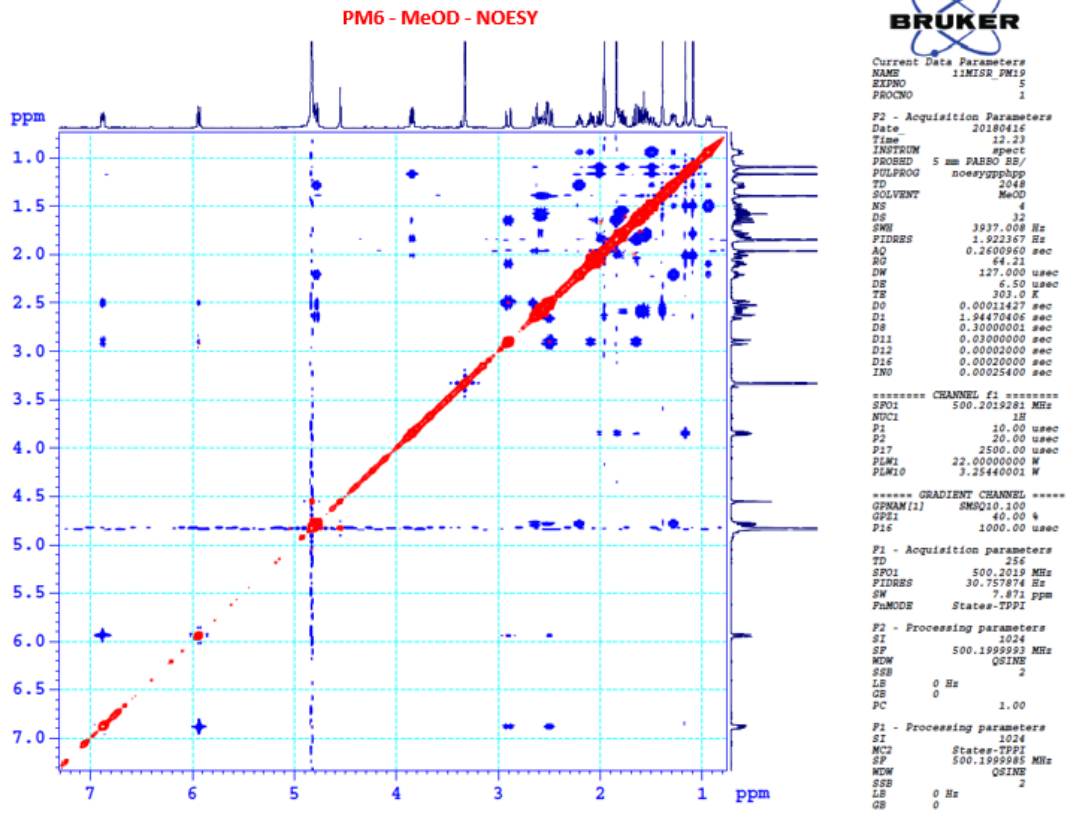
Phụ lục 21.2. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PM6** (125 MHz, MeOD)



Phụ lục 21.3. Phổ HMBC-NMR của hợp chất **PM6** (500/125 MHz, MeOD)



Phụ lục 21.4. Phổ HSQC-NMR của hợp chất **PM6** (500/125 MHz, MeOD)



Phụ lục 21.5. Phổ NOESY-NMR của hợp chất **PM6** (500/500 MHz, MeOD)

PHỤ LỤC 22. KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

---***---

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Kính gửi: ThS. Phạm Thị Hải Yến
Trường Đại học Văn hóa Thể thao Du lịch Thanh Hóa

Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho mẫu tiêu bản của ThS. Phạm Thị Hải Yến, Trường Đại học Văn hóa Thể thao Du lịch Thanh Hóa, vào ngày / /2021. Chúng tôi đã tiến hành giám định

Người giám định: **TS. Trần Thị Phương Anh**

Nơi công tác: Học viện Khoa học và Công nghệ.

Các thông tin về mẫu vật:

Mẫu vật mang số hiệu Sol-01. Nơi thu mẫu: Huyện Tiên Hải và huyện Đông Hưng, tỉnh Thái Bình, ngày thu hái: 20/08/2015, người thu hái: ThS. Đỗ Thanh Tuấn

Mẫu vật mang số hiệu Sol-02 Nơi thu mẫu: Huyện Nam Đông, tỉnh Thừa Thiên Huế, ngày thu hái: 10/09/2018, người thu hái: ThS. Lê Tuấn Anh và ThS. Phạm Thị Hải Yến.

Các mẫu tiêu bản khô, có đủ tiêu chuẩn để định loại bao gồm cơ quan sinh sản (hoa) và cơ quan sinh dưỡng (cành, lá, rễ) và các thông tin ghi chép được tại thực địa.

Kết quả giám định tên khoa học:

Mẫu hiệu Sol-01 là loài Tâm bóp (*Physalis angulata* L.) và Mẫu hiệu Sol-02 là loài Thù lù nhỏ (*Physalis minima* L.), thuộc họ Cà (Solanaceae)

Xin trân trọng kính gửi thông tin giám định.

Hà Nội, ngày tháng năm 2021

Xác nhận Học viện Khoa học và Công nghệ

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

Người giám định

TS. Trần Thị Phương Anh