

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hoàng Thị Toan

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CẢM ỨNG SỰ HÌNH THÀNH
XƯƠNG CỦA CHẤT TỰ NHIÊN PHÂN LẬP TỪ CÂY BÌM BỊP
(*Clinacanthus nutans* Lindau)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ: CÔNG NGHỆ 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



Hoàng Thị Toan

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CẢM ỨNG SỰ HÌNH THÀNH
XƯƠNG CỦA CHẤT TỰ NHIÊN PHÂN LẬP TỪ CÂY BÌM BỊP
(*Clinacanthus nutans* Lindau)**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS.TS. Nguyễn Thị Mai Phương

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và nhóm nghiên cứu. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực. Tôi xin cam đoan rằng các thông tin trích dẫn trong luận văn đều đã được ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả luận văn

Hoàng Thị Toan

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Thị Mai Phương, Phòng Sinh hóa Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi có thể nâng cao kiến thức, thực hiện nghiên cứu và hoàn thành bản luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, các Thầy, Cô trong Học viện, đặc biệt là các Thầy, Cô đang công tác tại Khoa Công nghệ Sinh học đã dạy dỗ, hướng dẫn, hỗ trợ tôi rất nhiều trong thời gian theo học tại đây.

Trong quá trình thực hiện bản luận văn này, tôi cũng đã nhận được nhiều sự giúp đỡ và động viên của các Thầy, Cô giáo, các bạn đồng nghiệp, các cán bộ nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hóa học và Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội. Qua đây, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất của mình đến những cá nhân và tập thể đã giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, người thân đã luôn ở bên để hỗ trợ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm

Hoàng Thị Toan

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

MSC	Mesenchymal Stem Cells
TTX	Tái tạo xương
ALP	Alkaline phosphatase
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
TLC	Thin Layer Chromatography
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
NMR	Nuclear magnetic resonance
MS	Mass spectrophotometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MAPK	Mitogen activated protein kinases
COX	Cyclooxygenase

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iii
MỤC LỤC	iv
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Giới thiệu về bệnh loãng xương	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh loãng xương	3
1.1.2. Phân loại loãng xương	4
1.2. Các biện pháp phòng và điều trị bệnh loãng xương.....	5
1.2.1. Các biện pháp phòng bệnh loãng xương.....	5
1.2.2. Các phương pháp điều trị bệnh loãng xương.....	6
1.3. Hướng nghiên cứu cảm ứng TTX trên thế giới và Việt Nam	10
1.3.1. Hướng nghiên cứu cảm ứng TTX trên thế giới.....	10
1.3.2. Tình hình nghiên cứu bệnh loãng xương trong nước.....	12
1.4. Con đường tín hiệu MAPK trong biệt hóa nguyên bào xương	13
1.5. Cyclooxygenase (COX), prostaglandin và sự tái tạo xương	15
1.6. Cây Bìm Bịp.....	15
CHƯƠNG II - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.1. Vật liệu và hóa chất.....	18
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	18
2.1.2. Dụng cụ và thiết bị	18
2.1.3. Hóa chất	18
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết phân đoạn thực vật.....	19

2.2.2. Phân lập chất tự nhiên từ cây Bìm Bịp bằng phương pháp sắc ký cột silica gel	19
2.2.3. Phân tích thành phần các hợp chất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng	20
2.2.4. Sắc ký lỏng kết hợp với khối phổ (LC-MS)	20
2.2.5. Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)	21
2.2.6. Đánh giá độc tính tế bào	21
2.2.7. Xác định hoạt tính enzyme alkaline phosphatase (ALP)	22
2.2.8. Xác định hoạt tính khoáng hóa của tế bào xương	22
2.2.9. Xác định protein theo phương pháp Bradford	23
2.2.10. Đánh giá ảnh hưởng của chất phân lập lên biểu hiện của các protein trong con đường tín hiệu MAPK liên quan đến biệt hóa tế bào tiền tạo xương	23
2.2.11. Tìm hiểu tương tác nội phân tử của chất nghiên cứu với các enzyme COX	24
2.2.12. Xử lý thống kê.....	25
CHƯƠNG III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1. Tinh sạch chất tự nhiên từ phân đoạn chiết của cây Bìm Bịp có hoạt tính cảm ứng TTX.....	26
3.1.1. Tách chiết phân đoạn chứa chất tự nhiên có hoạt tính cảm ứng TTX.....	26
3.1.2. Tinh sạch chất tự nhiên trên cột sắc ký silica gel 1.....	26
3.1.3. Tinh sạch chất tự nhiên trên cột sắc ký silica gel 2.....	28
3.1.4. Xác định cấu trúc hóa học của chất tự nhiên phân lập được	30
3.2. Đánh giá hoạt tính cảm ứng TTX của chất β-sitosterol.....	38
3.2.1. Khả năng sống sót của tế bào tạo xương khi xử lý với β -sitosterol.....	38
3.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên hoạt tính ALP của tế bào MC3T3-E1.....	39
3.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên hoạt tính khoáng hóa xương của tế bào tạo xương MC3T3-E1	40
3.2.4. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên biểu hiện của protein trong con đường tín hiệu MAPK	41

3.2.5. Tương tác nội phân tử của β-sistosterol và enzyme COX-2	42
CHƯƠNG IV - KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
KẾT LUẬN	49
KIẾN NGHỊ	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO	50
Tài liệu URL	55

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả dự đoán khối lượng phân tử của chất F2.4.....	32
Bảng 3.2. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H và ^{13}C của chất F2.4.....	37
Bảng 3.3. Kết quả phân tích tương tác của β -sistosterol với COX-1 và COX-2	44

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc mô xương người bình thường so với người loãng xương ..	4
Hình 1.2. Quá trình tái tạo xương (remodel)	7
Hình 1.3. Quá trình biệt hóa tế bào gốc (MSC) thành	8
tế bào tạo xương [6].	8
Hình 1.4. Các protein MAPK tham gia vào quá trình biệt hóa tế bào tạo xương.....	14
Hình 1.5 Cây Bìm bịp (<i>Clinacanthus nutans</i> Lindau) [16]	16
Hình 2.1. Hình ảnh cây Bìm bịp (<i>Clinacanthus nutans</i> Lindau) đã được phơi khô để làm thuốc	18
Hình 3.1. Sắc ký đồ TLC của cao EtOAc sử dụng phương pháp sắc ký TLC ở các hệ dung môi khác nhau. A) n-hexane: acetone (2:1), B) n-hexane: acetone (3:1), C) n-hexane: acetone (4:1), D) n-hexane: acetone (5:1), E) CH ₂ Cl ₂ : acetone (3:1), F) n-hexane: methanol (3:1), G) Chlorofom: acetone (3:1). ...	27
Hình 3.2. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết ethyl acetate của cây bìm bịp với hệ dung môi rửa chiết n-hexane: acetone =5:1	27
Hình 3.3. Sắc ký đồ TLC phân đoạn F1.2 chạy ở các hệ dung môi khác nhau. A) n-hexane: dichloromethane: methanol (6:1:1), B) n-hexane: dichloromethane (6:1), C) n-hexane: EtOAc (12:1), D) n-hexane: EtOAc(10:1), E) n-hexane: EtOAc (6:1), F) n-hexane: EtOAc (7:1).....	28
Hình 3.4. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết F1.2 với hệ dung môi rửa chiết là n-hexane: ethyl acetate (7:1)	28
Hình 3.5. Sắc ký đồ TLC của các chất sạch sau khi được phân tách trong hệ dung môi n-hexane: EtOAc (7:1). A) Chất sạch F2.2. B) Chất sạch F2.3. C) Chất sạch F2.4	29
Hình 3.6.Chất F2.4 dạng tinh sạch.....	29
Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các chất sạch.....	30
Hình 3.8. Phở khối negative (A) và positive (B) của chất F2.4.....	31

Hình 3.9. Phổ cộng hưởng từ ^1H của chất F2.4	32
Hình 3.10. Phổ cộng hưởng từ ^{13}C của chất F2.4	33
Hình 3.11. Phổ DEPT135 của chất F2.4	33
Hình 3.12. Phổ COSY của chất F2.4	34
Hình 3.13. Phổ HMBC của chất F2.4	35
Hình 3.14. Phổ HSQC của chất F2.4	36
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của chất β -sitosterol ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$).....	37
Hình 3.16. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi trong môi trường DMEM được bổ sung FBS 10% khi bắt đầu nuôi cấy (A) và sau khi nuôi cấy 3 ngày (B).	38
Hình 3.17. Khả năng sống sót của tế bào MC3T3-E1 trong môi trường nuôi cấy có chứa β -sitosterol.....	39
Hình 3.18. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol của cây Bìm Bịp lên hoạt tính ALP của tế bào MC3T3-E1.....	40
Hình 3.19. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol của cây Bìm Bịp lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào MC3T3-E1.	41
Hình 3.20. β -sitosterol tăng cường biểu hiện của các dấu hiệu protein trên con đường MAPK trong MC3T3-E1. (A). Số liệu đã được chuẩn hóa với nội chuẩn β -tubulin và được trình bày theo tỷ lệ mật độ diện tích của p-ERK/ERK (B) và p-p38/p38 (C) sử dụng phần mềm Image-J.	42
Hình 3.21. Vị trí tương tác của β -sitosterol với trung tâm hoạt động của COX-1 và COX-2 protein được xác định thông qua phân tích tương tác nội phân tử.....	43

MỞ ĐẦU

Loãng xương là một trong các bệnh phổ biến nhất trên thế giới và gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người, đặc biệt là đối với phụ nữ và người cao tuổi. Vì thế, nó được xem là mối lo ngại cho sức khỏe cộng đồng toàn cầu. Theo thống kê thì trên thế giới có khoảng 200 triệu người bị loãng xương và tỉ lệ này đang có chiều hướng gia tăng cùng với sự già hóa của dân số. Các biến chứng nghiêm trọng của bệnh loãng xương là sự gia tăng gãy xương, hoặc biến chứng dẫn đến các bệnh liên quan khác, làm giảm chất lượng cuộc sống. Chi phí trực tiếp để điều trị gãy xương do loãng xương là rất lớn, lên tới gần 32 triệu Euro ở các nước châu Âu (số liệu 2016).

Việt Nam đã đạt tới điểm ngoặt của quy mô dân số già năm 2015 và bắt đầu trở thành một trong những quốc gia có tốc độ già hóa nhanh nhất thế giới (<http://vovworld.vn/vi-VN/tieu-diem/viet-nam-da-dat-toi-diem-ngoat-trong-quy-mo-dan-so-gia-vao-nam-2015-422853.vov>). Điều đó đồng nghĩa với việc chúng ta sẽ phải đối mặt với những thách thức về các bệnh tật do sự già hóa dân số gây ra trong đó có bệnh loãng xương. Tại Việt Nam, bệnh loãng xương đã vượt mức báo động với ước tính hiện có hơn 2,8 triệu người bị loãng xương, trong đó phụ nữ chiếm tới 76%.

Chính vì thế, việc nghiên cứu để tìm ra các thuốc mới, có triển vọng kích thích sự hình thành xương và/hoặc ức chế sự tái hấp thụ xương để xử lý loãng xương cũng như nhằm tạo vật liệu tiềm năng trong điều trị bệnh về xương và các bệnh rối loạn xương đã và đang nhận được rất nhiều sự quan tâm chú ý của các nhà khoa học trên thế giới. Do việc sử dụng các loại thuốc tổng hợp để điều trị loãng xương còn một số hạn chế và gây ra các tác dụng phụ khi sử dụng nên các nghiên cứu hiện nay tập trung rất nhiều vào việc tìm kiếm các chất tự nhiên, đặc biệt là các chất tự nhiên từ các cây thuốc truyền thống đã được sử dụng để điều trị các bệnh về xương khớp.

Cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) là một trong những thực vật được sử dụng làm thuốc thảo dược điều trị bệnh gãy xương truyền thống ở một

số nước châu Á, được trồng rộng rãi ở nhiều tỉnh của Việt Nam. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây này đã cho thấy có 29 hợp chất tự nhiên đã được phân lập (DNP, 2018), thuộc nhiều nhóm hợp chất khác nhau. Các chất phân lập được đã thể hiện một loạt các hoạt tính sinh học khác nhau như chống oxy hóa, kháng virus, chống viêm, chống nhiễm trùng, chống angiogen, chống tiểu đường... Tuy nhiên, việc tìm ra tác dụng của dịch chiết/hợp chất từ loài này đối với sự hình thành xương và tái hấp thu xương vẫn còn rất hạn chế. Trong khi đó, Bìm Bịp đã được sử dụng làm thuốc truyền thống nhiều năm ở Trung Quốc và Việt Nam để làm liền xương bị gãy. Chúng tôi cho rằng loài cây này có chứa các chất có khả năng cảm ứng sự tái tạo xương. Do đó, luận văn này sẽ tập trung vào nghiên cứu tác dụng cảm ứng tái tạo xương (TTX) của chất tự nhiên phân lập từ cây Bìm bịp lên quá trình biệt hóa tế bào xương để tạo xương trên mô hình *in vitro*. Các kết quả thu được sẽ giúp cung cấp những dẫn liệu khoa học về chất cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm bịp, làm cơ sở khoa học cho việc khẳng định tác dụng sinh học của cây Bìm bịp cũng như nghiên cứu phát triển các loại thuốc điều trị loãng xương và các bệnh liên quan đến xương khớp trong tương lai.

Dựa trên xu hướng nghiên cứu hiện nay cũng như để góp phần đánh giá đầy đủ tác dụng và ứng dụng nguồn nguyên liệu thực vật phong phú của nước ta vào thực tế, chúng tôi đã tiến hành “Nghiên cứu hoạt tính cảm ứng sự hình thành xương của chất tự nhiên phân lập từ cây bìm bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau)” sử dụng mô hình nghiên cứu *in vitro* trên tế bào tiền tạo xương MC3T3-E1.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về bệnh loãng xương

1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh loãng xương

Loãng xương được xác định xuất hiện từ thời Ai Cập cổ đại năm 990 – TCN khi tìm thấy các xác ướp có bướu ở người hạ cấp.

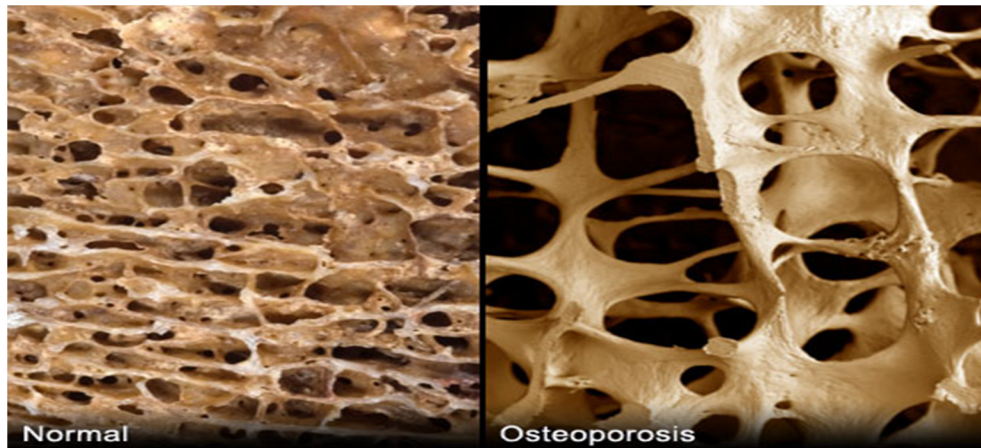
Năm 1830, Jean Lobstein phát hiện thấy rằng xương của một số bệnh nhân bị rỗng hơn thông thường và đưa ra thuật ngữ loãng xương để chỉ về trạng thái xương xốp.

Khoảng năm 1940, Fuller Albright ở bệnh viện đa khoa Massachusetts xác định bệnh loãng xương sau mãn kinh ở phụ nữ và bắt đầu điều trị bằng liệu pháp estrogen ngăn ngừa tổn thương cho bộ xương do bị mất xương.

Năm 1960, các nhà nghiên cứu đã phát triển các thiết bị xác định mật độ xương để phát hiện sự mất xương và loãng xương ở giai đoạn đầu, trước khi gãy xương xảy ra.

Năm 1984, Viện Y tế Quốc gia (National Institutes of Health – NIH) đã công khai bệnh loãng xương với lý do bệnh là mối đe dọa đáng kể đối với sức khỏe và nhấn mạnh rằng việc mất xương có thể được giảm nhẹ bằng liệu pháp estrogen, canxi, dinh dưỡng tốt và tập thể dục.

Năm 1993, tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization - WHO) chính thức đưa bệnh loãng xương vào danh sách bệnh. Theo WHO, loãng xương là một bệnh lý của xương, được đặc trưng bởi sự giảm khối lượng xương kèm theo sự thay đổi cấu trúc của xương dẫn đến tăng tính dễ gãy của xương. Năm 2001, WHO tiếp tục hoàn thiện cập nhật định nghĩa về loãng xương. Theo đó, loãng xương là tình trạng rối loạn chuyển hoá của xương được đặc trưng bởi sự thay đổi sức mạnh của xương. Sức mạnh này được bao gồm sự toàn vẹn cả về khối lượng xương và chất lượng xương (<https://sciencebeta.com/history-osteoporosis/>, June 11, 2007).



Bình thường

Loãng xương

Hình 1.1. Cấu trúc mô xương người bình thường so với người loãng xương

Trong cơ thể con người, bình thường mô xương luôn được làm mới và duy trì sự phát triển cân bằng nhờ chu trình TTX (bone remodeling), bao gồm hai hoạt động tương tác chặt chẽ với nhau là hoạt động hủy xương do tế bào hấp thụ xương (osteoclast) và hoạt động hình thành xương do tế bào tạo xương (osteoblast) thực hiện. Khi hoạt động hủy xương mạnh hơn hoạt động tạo xương sẽ gây ra sự mất cân bằng nội mô xương và dẫn đến loãng xương [1]. Các nguyên nhân gây mất cân bằng nội mô xương dẫn tới loãng xương chủ yếu là do yếu tố di truyền; chế độ dinh dưỡng nghèo nàn không đáp ứng đủ vitamin D và canxi để duy trì hệ xương khớp khỏe mạnh; lười vận động làm xương không được có giãn, đàn hồi tốt khiến xương và hệ cơ dần yếu đi; rối loạn thận mãn tính gây rối loạn chuyển hóa, cơ thể tiêu tốn canxi; dùng chất kích thích như bia, rượu, thuốc lá,... làm giảm tiến trình tạo xương và ảnh hưởng khả năng hấp thụ canxi của cơ thể.

1.1.2. Phân loại loãng xương

Loãng xương có thể được phân thành hai nhóm chính là loãng xương nguyên phát (type 1 và type 2) do tuổi tác hoặc tình trạng mãn kinh và loãng xương thứ phát do một số bệnh mạn tính hoặc liên quan đến sử dụng một số loại thuốc.

- Loãng xương nguyên phát type 1 (Loãng xương sau mãn kinh)

Loãng xương nguyên phát type 1 xảy ra ở thời kì trước và sau mãn kinh. Nhóm loãng xương này thường gặp ở phụ nữ từ 50 – 55 tuổi đã mãn kinh và tỷ lệ phụ nữ dễ bị loãng xương hơn nam giới là nam/nữ : 4/5,7 [2]. Ở kiểu loãng xương này, tổn thương chủ yếu là mất chất khoáng ở xương xốp cùng với sự huỷ xương tăng còn sự TTX diễn ra bình thường.

- Loãng xương nguyên phát type 2 (Loãng xương người già)

Loãng xương nguyên phát type 2 thường gặp ở người lớn tuổi. Nhóm loãng xương này xuất hiện ở cả 2 giới nam và nữ, độ tuổi khoảng trên 70. Kiểu loãng xương này liên quan đến việc mất khối lượng xương do sự lão hóa của xương đặc và xương xốp. Trong này sự huỷ xương tăng cao, sự tái tạo xương giảm dẫn đến bệnh loãng xương.

- Loãng xương thứ phát

Loãng xương thứ phát xảy ra ở cả hai giới và mọi lứa tuổi diễn biến sẽ nặng nề với nhiều hậu quả hơn do các nguyên nhân:

- Kém phát triển thể chất từ khi còn nhỏ khiến khối lượng khoáng xương tuổi trưởng thành thấp.
- Bị mắc một số bệnh khác nhau hoặc sử dụng một số thuốc lâu dài ảnh hưởng đến sự chuyển hóa xương.
- Lối sống không lành mạnh.

1.2. Các biện pháp phòng và điều trị bệnh loãng xương

1.2.1. Các biện pháp phòng bệnh loãng xương

Để phòng bệnh loãng xương, các liệu pháp cụ thể sau được khuyến cáo nên thực hiện thường xuyên:

i. Bổ sung canxi qua thực phẩm

Cấu tạo thành phần hoá học của xương chứa nước 25%, protein 20%, lipid 5%, một lượng nhỏ glycosaminoglycan và chất khoáng chiếm khoảng 50%, trong đó hầu hết chất khoáng là muối canxi. Vì thế, việc bổ sung canxi cho xương là rất cần thiết. Các thực phẩm giàu canxi nên sử dụng thường xuyên là sữa và các sản phẩm của sữa, xúp lơ, cải xoăn, rau xanh đậm, hạt đậu nành.

Tại mỗi thời điểm, cơ thể chỉ hấp thụ được một lượng canxi nhất định, vì vậy nên sử dụng các thực phẩm giàu canxi nhiều lần trong ngày. Ngoài ra, cũng cần bổ sung thêm vitamin D để giúp canxi được hấp thụ tốt hơn.

ii. Tập thể dục hàng ngày

Tập thể dục đều đặn 30 phút mỗi ngày sẽ giúp tăng cường sự cân bằng và duy trì độ dẻo dai của hệ thống xương, giảm nguy cơ loãng xương và gãy xương ở người lớn tuổi.

iii. Khám định kỳ

Khám định kỳ ở người trưởng thành sẽ giúp phát hiện sớm bệnh loãng xương. Ngoài ra cũng nên quan tâm đến sự giảm chiều cao là dấu hiệu đầu tiên của chứng mòn đốt sống và loãng xương.

iv. Không sử dụng các chất kích thích

Hút thuốc là một nguyên nhân dẫn đến loãng xương. Thống kê của tổ chức y tế thế giới cho thấy 1/8 phụ nữ mắc bệnh loãng xương có tiền sử hút thuốc một thời gian dài. Việc hút thuốc thường xuyên ở nam giới cũng làm tăng nguy cơ loãng xương lên 10 lần và tăng nguy cơ gãy xương cột sống và xương hông lên 2 lần. Không những thế, việc hút thuốc còn làm cho vết gãy ở xương khó phục hồi.

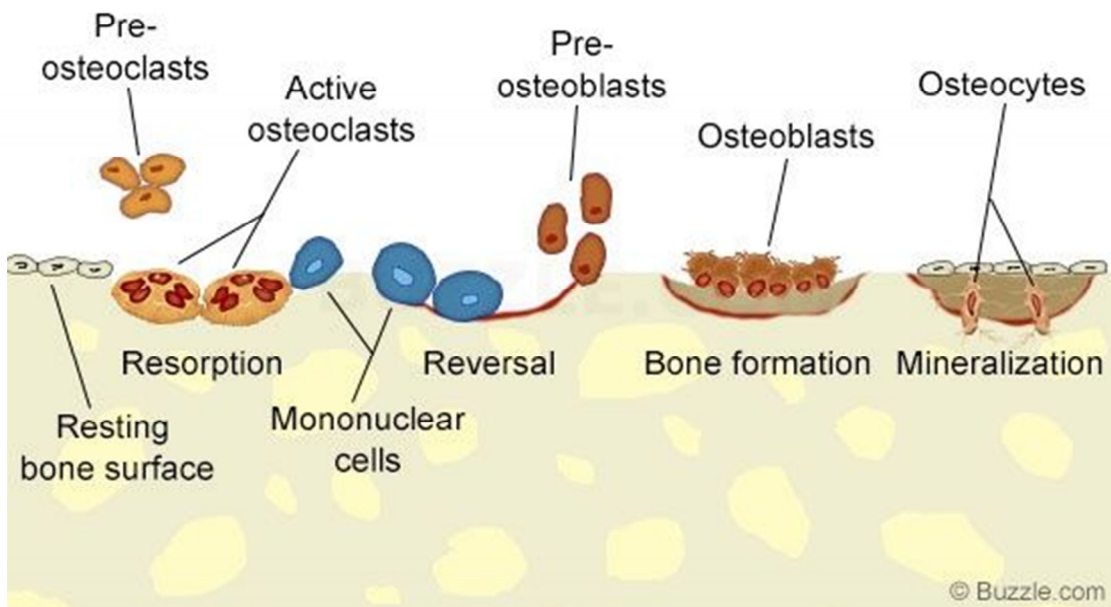
1.2.2. Các phương pháp điều trị bệnh loãng xương

Quá trình TTX hay remodel là quá trình diễn ra liên tục, suốt đời, nhưng tốc độ xảy ra giảm dần theo tuổi tác. Quá trình này giúp duy trì mật độ xương, phân hủy những mảng xương cũ hay xương bị tổn hại và thay thế bằng những mảng xương mới. Quá trình TTX xảy ra theo trình tự gồm 5 giai đoạn: hoạt hóa, hủy xương, trung gian, hình thành xương và khoáng hóa. Quá trình TTX được bắt đầu khi tế bào hấp thụ xương (tế bào hủy xương, osteoclast) được biệt hóa và hoạt động để loại bỏ xương già, hỏng. Tế bào đơn nhân (monocuclear cell) chuẩn bị bề mặt đã được phục hồi cho tế bào tạo xương (osteoblast) [3], [4]. Tiếp theo, tế bào tạo xương tổng hợp các thành phần hữu cơ và vô cơ của xương thay thế phần xương đã bị hấp thụ thông qua

quá trình biệt hóa tế bào tạo xương (osteoblast differentiation). Sự khoáng hóa xương và sự biệt hóa của một số tế bào tạo xương thành tế bào xương trưởng thành (osteocytes) là giai đoạn cuối để hoàn thành quá trình TTX [5].

Trong quá trình remodel, một số protein và các nhân tố như osterix (OSX) và Runx2 tham gia vào quá trình làm tăng sự biểu hiện của alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN) và osteocalcin (OSC). Đây là những nhân tố quyết định sự tạo ra tế bào xương trưởng thành (Hình 1.2).

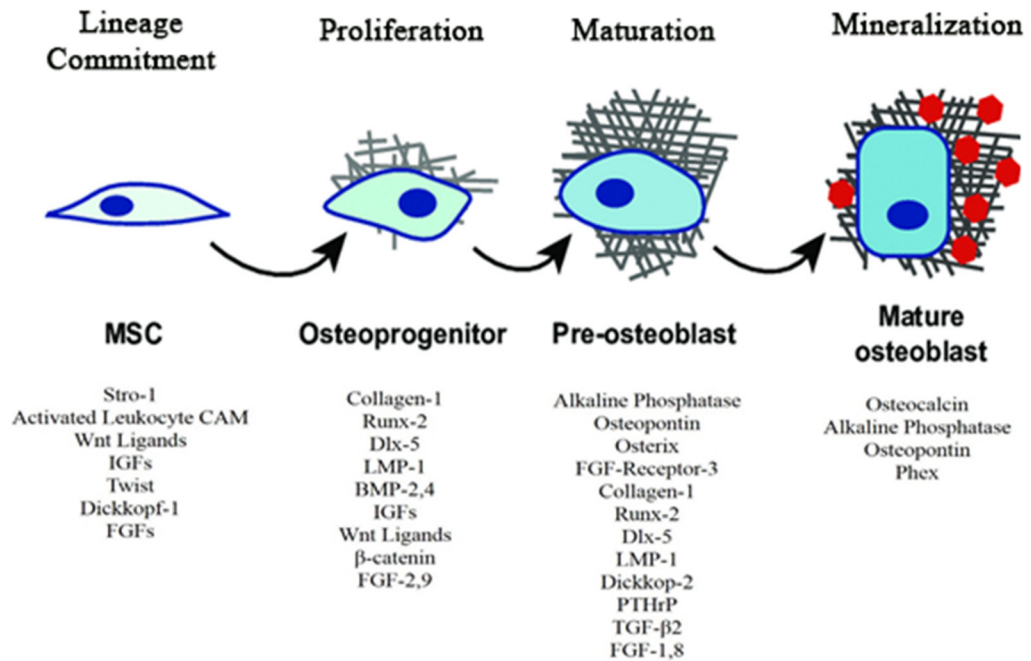
CHU KỲ TÁI TẠO XƯƠNG



Hình 1.2. Quá trình tái tạo xương (remodel)
(<https://www.pinterest.com/pin/546694842256636552/>)

Tế bào tạo xương được hình thành từ tế bào gốc trung mô từ tủy xương (MSC). Đây là dòng tế bào gốc đa tiềm năng có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, sụn và mỡ. Tuy nhiên, dòng tế bào gốc này cũng có thể biệt hóa thành tế bào gan, tế bào tim, tế bào thần kinh nhưng quá trình biệt hóa rất phức tạp và có hiệu suất thấp.

Osteoblast differentiation



Hình 1.3. Quá trình biệt hóa tế bào gốc (MSC) thành tế bào tạo xương [6].

Thuốc dùng để điều trị loãng xương sẽ tập trung vào tập hai hướng là:

- Làm ức chế sự hấp thụ xương của tế bào hủy xương (osteoclast)
- Làm gia tăng các nhân tố tái tạo xương (TTX) tham gia biệt hóa các tế bào tạo xương.

Liệu pháp đầu tiên tập trung vào việc làm giảm sự mất xương và làm tăng khối lượng xương. Liệu pháp này điều trị loãng xương bằng các loại thuốc được tổng hợp từ các chất chống mất xương nhằm mục đích làm giảm sự tái hấp thụ xương.

Các chất chống mất xương bao gồm estrogen; bisphosphonate như alendronate, risedronate, ibandronate và axit zoledronic; thụ thể estrogen chọn lọc raloxifene; các kháng thể đơn dòng của người chống lại sự liên kết của phối tử RANKL như denosumab; strontium ranelate. Tất cả các chất chống mất xương đều làm tăng khối lượng xương, nhưng chỉ alendronate, risedronate, zoledronic acid và strontium ranelate là có tác dụng điều trị cả gãy xương đốt sống và xương hông còn lại các chất khác chỉ có tác dụng đối với gãy xương đốt sống. Trong khi đó, tỷ lệ mắc bệnh, tử vong và chi phí chăm sóc sức khỏe gãy xương hông do loãng xương cao hơn so với gãy xương đốt sống do loãng xương [1].

Tất cả các thuốc chống mất xương này chỉ có thể làm chậm quá trình mất xương một cách thụ động mà không kích thích sự hình thành xương mới. Các chất này còn gây ra các tác dụng phụ tiềm ẩn khi sử dụng như đau bụng, sợ hãi, tăng nguy cơ ung thư vú. Ngoài ra, sự tuân thủ kiên trì điều trị của bệnh nhân kém đối với các liệu pháp điều trị loãng xương làm giảm sự thành công của điều trị [1].

Theo Ozra và cs [7], hiện nay đã có 16 loại thuốc được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ và Liên minh châu Âu (FDA/EU) phê chuẩn cho điều trị loãng xương, trong đó có 14 loại thuộc nhóm thuốc kìm hãm sự hấp thu xương (antiresorptive agents) và chỉ có 2 loại thuốc thuộc nhóm làm tăng TTX (anabolic agents). Ở nhóm thuốc tăng TTX có thể sử dụng thuốc Teriparatide (PTH1-34). Tế bào tạo xương có thụ thể của hormone tuyến cận giáp (PTH), khi Teriparatide được đưa vào cơ thể theo con đường tiêm dưới da hàng ngày, nó kích thích các nguyên bào xương để tạo xương mới. Teriparatide đã được chứng minh là làm tăng đáng kể mật độ xương và nguy cơ gãy xương đốt sống vừa phải đã giảm 90% [4]. Hiện nay, hầu hết những liệu pháp điều trị loãng xương tập trung vào giải pháp ức chế sự hủy xương, còn liệu pháp làm gia tăng các tác nhân tái tạo xương ít được đề cập đến. Trong khi đó, sự hình thành xương mới là chức năng chính của tế bào xương

và chức năng này rất quan trọng trong việc đẩy lùi chứng loãng xương. Vì vậy, hướng nghiên cứu và ứng dụng những nhân tố (factors) kích thích sự TTX để phục hồi, sửa chữa cấu trúc xương xốp do loãng xương rất được quan tâm. Bên cạnh đó, có thể sử dụng kết hợp giữa nhân tố kìm hãm sự mất xương với kích thích TTX để gia tăng hiệu quả điều trị cho người bệnh, đặc biệt cho những người bị loãng xương nặng và bệnh nhân có mật độ xương rất thấp, xương tiếp tục bị gãy trong khi đang điều trị.

1.3. Hướng nghiên cứu cảm ứng TTX trên thế giới và Việt Nam

1.3.1. Hướng nghiên cứu cảm ứng TTX trên thế giới.

Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) thì hàng năm có khoảng hơn 50 triệu trường hợp gãy xương có liên quan đến tình trạng loãng xương [8]. Tại Liên minh châu Âu, chi phí trực tiếp cho gãy xương do loãng xương đối với các dịch vụ y tế ước tính là 32 tỷ Euro (tương đương với hơn 828 tỷ VNĐ). Theo xu hướng hiện nay, tỷ lệ mắc bệnh loãng xương đang tiếp tục tăng vì tuổi thọ người dân ngày càng cao và chi phí cho các dịch vụ chăm sóc sức khỏe được dự đoán sẽ tăng gấp đôi vào năm 2050 [8].

Do các thuốc điều trị chống loãng xương tổng hợp gây nhiều tác dụng phụ trên bệnh nhân loãng xương, ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân nên hướng nghiên cứu tìm kiếm các tác nhân có thể làm gia tăng quá trình cảm ứng TTX ở các tế bào tạo xương được chú ý nhiều trong những năm gần đây, đặc biệt là các chất tự nhiên có nguồn gốc thảo dược [4], [9],[10].

Trong các nghiên cứu đã được công bố về các chất tự nhiên có tác dụng cảm ứng TTX, berberine được nghiên cứu khá nhiều. Đây là một chất thuộc nhóm alkaloid có trong nhiều loại cây thuốc ở Việt Nam và thế giới. Berberine có nhiều trong rễ và thân cây Hoàng đằng (*Cosciniium usitatum*), còn có tên gọi khác là Hoàng liên, Vàng đắng. Berberin đã được chứng minh là có tác dụng kép (dual action) tức là có thể làm giảm loãng xương bằng cách ức chế hoạt tính hấp thu xương của tế bào hủy xương osteoclast (bone-resorption cell) và

kích thích sự biệt hóa của tế bào tạo xương osteoblast (bone-forming cell) [8], [9]. Khi nghiên cứu về ảnh hưởng của berberine đến quá trình biệt hóa tế bào tạo xương, Lee và cs [9] đã phát hiện thấy berberine làm tăng cường biểu hiện một số gene chỉ thị (marker genes) trong quá trình biệt hóa tế bào tạo xương, bao gồm osteoponin và osteocalcin. Chất này cũng làm gia tăng hoạt tính của Runx2, là nhân tố phiên mã (transcription factor) chính trong quá trình tạo xương. Ngoài ra, berberine còn kích hoạt p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), là protein quan trọng trong con đường tín hiệu MAPK liên quan đến biệt hóa tế bào tạo xương. Nghiên cứu về dẫn xuất của berberin là Q8 (berberine bioisostere Q8) đã cho thấy chất này cũng cảm ứng biệt hóa tế bào tạo xương *in vitro*. Dẫn xuất đã làm tăng hoạt tính enzyme alkaline phosphatase (ALP), cảm ứng biểu hiện các gene mã hóa ALP, sialoprotein và osteocalcin của xương [10]. Trong quá trình biệt hóa tạo xương, Q8 làm ổn định protein Runx2 và Osterix bằng cách khóa đường hướng ubiquitin-proteasome, từ đó cảm ứng hoạt động phiên mã của Runx2 và Osterix, dẫn đến kích thích sự biệt hóa tế bào tạo xương.

Trong một công bố năm 2010, Xu và cs. [11] đã tìm thấy khả năng ngăn chặn loãng xương của berberine ở chuột bị loãng xương cảm ứng bởi glucocorticoid. Glucocorticoid được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh mạn tính như là thấp khớp và hen suyễn. Tuy nhiên liệu pháp sử dụng glucocorticoid lâu dài có thể dẫn tới các tác dụng phụ nghiêm trọng như là bệnh loãng xương.

Sanyasi và cs. [12] đã đưa ra một vật liệu hydrogel mới cho công nghệ mô xương (bone tissue engineering), trong đó carboxyl methyl tamarind polysaccharide là một polymer bán tổng hợp từ cây me. Nhóm tác giả chứng minh rằng vật liệu này là thích hợp cho sự bám dính, sự sinh trưởng của các tế bào tiền tạo xương (bone precursor cells). Số liệu thu được cũng chỉ ra vật liệu này không gây độc và thích hợp cho nuôi cấy tế bào người, vì thế nó có tiềm năng sử dụng trong công nghệ mô xương cũng như là các ứng dụng khác. Một

số nghiên cứu khác về chất cảm ứng TTX có nguồn gốc thực vật cũng đã được thực hiện. Ví dụ như lupeol, một hợp chất phytosterol; icariin, hoạt chất flavonoid glucoside; naringin, hoạt chất flavonoid đã được polymethoxyl hóa; kobophenol A, một chất stilben bậc 4; psoralen, một dẫn suất giống coumarin hay echinacoside, một hợp chất phenylethanoid glycoside [4],[13],[14],[15]. Tuy nhiên có thể thấy các nghiên cứu theo hướng này còn chưa nhiều, đặc biệt là các nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế tác dụng ở mức độ phân tử cũng như những đánh giá đầy đủ trên mô hình *in vivo* nhằm mục đích ứng dụng.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu bệnh loãng xương trong nước

Tỷ lệ người mắc bệnh loãng xương ở Việt Nam đã vượt mức báo động và thường được phát hiện muộn khi bệnh nhân đã ở giai đoạn loãng xương nặng, hay khi đã bị gãy xương, rạn xương mới phát hiện được. Theo thống kê, Việt Nam có khoảng 2,8 triệu người bị loãng xương và trên 170.000 trường hợp bị gãy xương do loãng xương.

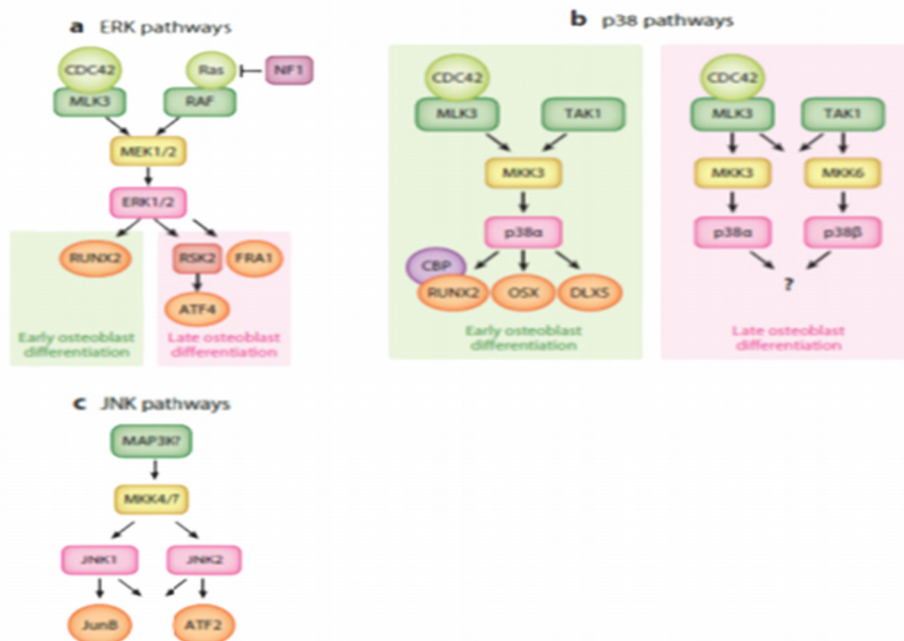
Việt Nam có nguồn tài nguyên thực vật rất phong phú trong đó có nhiều loài thực vật là nguồn dược liệu quý để chữa trị bệnh với tính an toàn và hiệu quả cao. Nhiều cây dược liệu là những vị thuốc lâu đời để điều trị các bệnh về xương khớp như *Mimosa pudica* L., *Solanum procumbens*, *Piper lolot* [16]. Tuy nhiên, việc phát hiện, khai thác và sử dụng nguồn tài nguyên này cho việc điều trị các bệnh về xương khớp còn hạn chế, đặc biệt là nghiên cứu cơ chế tác dụng để làm sáng tỏ tác dụng trị liệu của những cây thuốc đã được sử dụng rộng rãi trong dân gian. Các nghiên cứu đã công bố tại Việt Nam được thực hiện chủ yếu trên mô hình *in vivo* và với cao chiết toàn phần hay cao chiết phân đoạn. Điển hình là nghiên cứu của Trần Minh Thông và cs [17]. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát tác dụng của cao xương cá sấu hoa cà trên mô học xương đùi chuột nhắt trắng bị gây loãng xương do uống prednison (corticoid). Kết quả thu được cho thấy cao chiết này có tác dụng sửa chữa vi cấu trúc xương bị biến dạng do loãng xương, làm tăng sự hiện diện của các tế bào xương.

Một mô hình *in vivo* khác cũng được nhóm nghiên cứu của Tô Thanh Thúy triển khai sử dụng mô hình cá medaka hay zebrafish và sàng lọc các thuốc và hợp chất tự nhiên có tác dụng đến chuyển hóa xương và chống loãng xương [18]. Cá medaka chuyển gen rankl:HSE:CFP biểu hiện đồng thời Rankl (Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand) ngoại sinh và protein phát huỳnh quang CFP (Cyan Fluorescent Protein) dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng nhiệt hoạt động hai chiều dùng làm mô hình loãng xương. Rankl là yếu tố kích thích hình thành, biệt hóa và hoạt động của tế bào hủy xương. Khi cá bị sốc nhiệt, Rankl ngoại sinh được biểu hiện, kích thích sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương làm cho mô xương bị phá hủy, tạo kiểu hình giống loãng xương. Hoạt động của tế bào hủy xương có thể quan sát được sau khi sốc nhiệt cá chuyển gen kép rankl:HSE:CFP/ctsk:mCherry là con lai của cá rankl:HSE:CFP với cá chuyển gen ctsk:mCherry biểu hiện huỳnh quang màu đỏ của mCherry ở tế bào hủy xương, do vậy mật độ huỳnh quang mCherry có thể phản ánh mức độ tổn thương xương của cá này. Trong một nghiên cứu gần đây, cá medaka chuyển gene mô phỏng bệnh loãng xương được điều trị bằng hai loại thuốc là etidronate và alendronate (hai loại biphosphonates thông dụng để điều trị bệnh loãng xương trên người). Kết quả thu được cho thấy thuốc điều trị có tác dụng ức chế hoạt tính hấp thụ xương của tế bào hủy xương theo cơ chế phụ thuộc nồng độ. Mặc dù mô hình này là phù hợp để có thể sàng lọc thuốc nhưng cũng còn một số hạn chế khi sử dụng mô hình này như việc phức tạp, tốn kém về điều kiện nuôi, tính ổn định của cá so với mô hình nghiên cứu *in vitro*.

1.4. Con đường tín hiệu MAPK trong biệt hóa nguyên bào xương

Các protein kinase được kích hoạt bởi mitogen (MAPK) là một tập hợp các kinase serine / threonine làm trung gian cho phản ứng với nhiều loại kích thích. Mặc dù MAPK có mặt ở tất cả các sinh vật nhân chuẩn, bao gồm nấm men, thực vật, *Drosophila* và động vật có vú, nhưng chúng đã trải qua đột biến trong quá trình tiến hóa của động vật có xương sống. Điều này cho thấy

rằng MAPK đã thích nghi rất nhiều so với nguồn gốc của chúng trong nấm men để phục vụ các chức năng cụ thể của động vật có xương sống [19],[20]. Các protein kinase được kích hoạt bởi các protein MAPK là các chất dẫn truyền tín hiệu. Trong số các MAPK, ba nhóm protein được nghiên cứu nhiều nhất là ERK, p38 và JNK. Nghiên cứu gần đây đã cho thấy vai trò của chúng trong việc điều chỉnh khối lượng xương thông qua kiểm soát sự biệt hóa nguyên bào xương. Đặc biệt, MAPK có chức năng điều chỉnh các chất trung gian phiên mã chính của sự biệt hóa nguyên bào xương. MAPK phosphoryl hóa RUNX2, chất điều hòa chính của quá trình biệt hóa nguyên bào xương. ERK cũng kích hoạt RSK2, lần lượt phosphoryl hóa ATF4, một chất điều hòa phiên mã các gene chức năng của nguyên bào xương giai đoạn cuối. Sự khác biệt đáng kể về con đường tín hiệu MAPK ở nguyên bào xương so với các mô khác đã được tìm thấy. Do đó, việc khảo sát MAPK trong nguyên bào xương vừa cho biết các cơ chế quan trọng để duy trì khối lượng xương vừa giúp hiểu thêm về cách các thành phần riêng lẻ của con đường MAPK hoạt động phối hợp trong một hệ thống tín hiệu phức tạp.



Hình 1.4. Các protein MAPK tham gia vào quá trình biệt hóa tế bào tạo xương

1.5. Cyclooxygenase (COX), prostaglandin và sự tái tạo xương

Các enzym cyclooxygenase COX-1 và COX-2 xúc tác sự chuyển đổi axit arachidonic thành prostaglandin và thromboxan. Trong khi COX-1 được thể hiện trong hầu hết các mô thì biểu hiện COX-2 dường như chỉ xuất hiện ở các cơ quan như não, thận, xương, cơ quan sinh sản và một số u tân sinh. Vào đầu những năm 1970, người ta đã phát hiện thấy prostaglandin có thể tái hấp thu xương bào thai trong môi trường nuôi cấy [21] và aspirin, một chất ức chế COX-1 và indomethacin, chất ức chế COX-2, có thể ngăn chặn quá trình hủy xương trong nuôi cấy mô [22]. Phát hiện này đã dẫn đến một loạt các nghiên cứu về phát triển các chất ức chế COX và prostaglandin như là phương pháp chữa trị sự mất xương. Tín hiệu prostaglandin E₂(PGE₂) thông qua thụ thể EP₄ của nó đóng một vai trò quan trọng trong quá trình hủy xương bằng cách tạo ra các tế bào đơn nhân để hình thành các tế bào hủy xương trưởng thành. Trong một loạt các thí nghiệm *in vitro*, *ex vivo* và *in vivo*, Ohshiba và cộng sự [23] đã chứng minh được sự tiếp xúc trực tiếp tế bào-tế bào giữa các tế bào và nguyên bào xương gây ra sự gia tăng biểu hiện COX-2 trong các nguyên bào xương do kích hoạt NFκB và con đường protein kinase kích hoạt bằng mitogen (MAP). Điều này làm tăng COX-2 dẫn đến tăng tiết PGE₂, liên kết với các thụ thể EP₄ trên bề mặt của tế bào tạo xương. Hoạt động liên kết với thụ thể lần lượt gây ra sự tăng sản xuất RANKL qua trung gian PGE₂. Việc tạo ra RANKL đưa đến sự hình thành tế bào hủy xương osteoclast thông qua RANK. Chất ức chế COX-2 (indomethacin) và EP₄ [24], đều dẫn đến sự giảm biểu hiện của RANK dẫn đến giảm sự hình thành tế bào hủy xương trong quá trình tạo xương.

1.6. Cây Bìm Bịp.

Cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) còn gọi là cây Xương Khi hay cây Mạnh Cộng là một trong những thực vật được sử dụng làm thuốc thảo dược điều trị bệnh gãy xương truyền thống ở một số nước châu Á, trong đó có Việt Nam và được trồng rộng rãi ở nhiều tỉnh của Việt Nam. Cây Bìm bịp

mọc hoang ở rất nhiều vùng nông thôn Việt Nam và Châu Á. Tại một số địa phương, người dân có thể lấy lá non sử dụng như một loại rau trong bữa ăn truyền thống của nhiều dân tộc. Lá khô thường dùng để làm bánh (bánh mành cộng). Lá cây tươi hay phơi khô cũng được dùng để hãm lấy nước dùng hàng ngày [16].



Hình 1.5 Cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) [16]

Cây Bìm bịp chứa nhiều chất tự nhiên thuộc các nhóm hợp chất khác nhau và có nhiều hoạt tính sinh học quý như chống oxy hóa, kháng virus, chống viêm, chống nhiễm trùng, chống angiogen, chống tiểu đường [16],[25],[26]. Tuy nhiên, cho đến nay, việc nghiên cứu để tìm ra tác dụng sinh học của dịch chiết/hợp chất từ loài này đối với sự hình thành xương và tái hấp thu xương vẫn còn hạn chế. Gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi cũng chứng minh được chất lupeol, một phytosterol phân lập được từ thực vật này có hoạt tính cảm ứng TTX [13]. Vậy còn những chất tự nhiên nào khác cũng có hoạt tính này ở cây Bìm Bịp vẫn là vấn đề cần tiếp tục được tìm hiểu. Các kết quả nghiên cứu thu được sẽ giúp làm sáng tỏ cơ chế tác dụng cũng như có thể định hướng ứng dụng phát triển thuốc điều trị bệnh loãng xương và các bệnh xương khớp khác của thực vật này.

Như vậy, dựa trên các phân tích về hướng nghiên cứu đã nêu trên cũng như để góp phần đánh giá đầy đủ tác dụng và ứng dụng nguồn nguyên liệu thực vật phong phú của nước ta vào thực tế, chúng tôi đã thực hiện “Nghiên cứu hoạt tính cảm ứng sự hình thành xương của chất tự nhiên phân lập từ cây

bìm bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau)” sử dụng mô hình nghiên cứu *in vitro* trên tế bào tiền tạo xương MC3T3-E1 nhằm các mục tiêu: i) Đánh giá được ảnh hưởng của chất tự nhiên có khả năng cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) lên một số chỉ thị quan trọng của quá trình biệt hóa tế bào tạo xương; ii) Đánh giá được ảnh hưởng của chất tự nhiên có khả năng cảm ứng tái tạo xương lên biểu hiện của một số protein trong con đường tín hiệu MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) liên quan đến quá trình biệt hóa tế bào tạo xương; iii) Tìm hiểu tương tác nội phân tử của chất nghiên cứu với enzyme COX 1 và COX 2 liên quan đến quá trình biệt hóa tế bào xương. Để đạt được các mục đích này, đề tài sẽ thực hiện các nội dung nghiên cứu sau:

1. Tinh sạch chất tự nhiên từ phân đoạn chiết của cây Bìm Bịp có hoạt tính cảm ứng TTX.
2. Đánh giá hoạt tính cảm ứng TTX của chất β -sitosterol
3. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên biểu hiện của các protein trong con đường tín hiệu MAPK.
4. Tìm hiểu tương tác nội phân tử của chất nghiên cứu với enzyme COX 1 và COX 2.

CHƯƠNG II - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây Bìm Bịp được thu mẫu vào 8/2019 tại Đà Lạt sau đó được TS. Nguyễn Thanh Hương, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. định danh và lưu mẫu tại Viện.



Hình 2.1. Hình ảnh cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) đã được phơi khô để làm thuốc

2.1.2. Dụng cụ và thiết bị

- Dụng cụ: Cốc thủy tinh, ống nghiệm, cột sắc ký, giấy lọc, phễu, pipet 10-1000 μ l, bình đựng nước cất,... và các dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm.
- Thiết bị: Tủ sấy, máy lắc, tủ nuôi cấy tế bào, máy đo elisa, máy quang phổ, bộ chạy điện di, máy đo pH, máy ly tâm, máy đo khối phổ LC-MS, máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.

2.1.3. Hóa chất

- Tế bào tiền tạo xương osteoblast MC3T3-E1 được mua từ hãng Sigma (Hoa Kỳ).
- Enzyme alkaline phosphatase (ALP), một loại chỉ thị cho sự tạo xương và chất nhuộm Alizarin red S (dẫn xuất anthraquinone) được mua từ hãng Sigma (Hoa Kỳ).

- Các kháng thể ERK, pERK, p38 và pp38 được mua từ hãng Santa Cruz, Hoa Kỳ
- Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM và FBS được mua từ hãng Invitrogen (Hoa Kỳ).
- Sắc ký bản mỏng và hạt Silica gel được mua từ hãng Merck (Đức).
- Các hóa chất còn lại đều đạt mức độ tinh sạch phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết phân đoạn thực vật

Thân và lá cây Bìm Bịp được sấy khô ở nhiệt độ $< 50^{\circ}\text{C}$ rồi xay thành bột mịn. Sau đó, bột nguyên liệu được chiết với ethanol (EtOH) theo tỉ lệ 1:5, (là tỷ lệ đã được xác định là có khả năng chiết suất tốt nhất trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi [13]) bằng phương pháp ngâm kiệt ở nhiệt độ phòng trong hai tuần. Dịch chiết EtOH được thu lại bằng cách lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất thấp ($< 50\text{ atm}$) bằng máy cất quay chân không để thu cao chiết ethanol. Tiếp theo, cao EtOH được hòa trong nước và chiết lần lượt với các dung môi hữu cơ khác nhau là n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) và cất loại dung môi dưới áp suất thấp bằng máy cất quay chân không để thu nhận cao chiết phân đoạn EtOAc sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Đây là phân đoạn đã được xác định có hoạt tính cảm ứng TTX tiềm năng trong nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu.

2.2.2. Phân lập chất tự nhiên từ cây Bìm Bịp bằng phương pháp sắc ký cột silica gel

Sắc ký là phương pháp phân tách các chất dựa vào sự phân bố khác nhau của chúng giữa hai pha động và pha tĩnh.

- *Pha động*: là chất lỏng, được gọi là dung môi rửa giải.

- *Pha tĩnh*: là chất rắn, thường là albumin hoặc silica gel đã được xử lý, được nạp nán vào trong một cột có kích thước xác định được tính toán dựa trên lượng mẫu sẽ nạp lên cột.

Trong thí nghiệm này, cột sắc ký nhồi hạt silica gel có kích thước 60-230 mesh (Merck) được sử dụng để phân tách các chất trong phân đoạn EtOAc. Các phân đoạn (5 mL) thu được sau khi chạy cột được kiểm tra độ sạch bằng sắc ký lớp mỏng, đo phổ khối (LC-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

2.2.3. Phân tích thành phần các hợp chất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Việc phân tích được thực hiện trên các bản sắc ký đã được chuẩn bị sẵn có độ dày 1 mm (Silica gel 60, F₂₅₄, Merck). Hệ dung môi phân tách được thử nghiệm để lựa chọn được hệ dung môi thích hợp nhất cho phân lập chất quan tâm. Bản sắc ký được làm khô bằng máy sấy. Màu sắc các vạch sắc ký được quan sát bằng dung dịch thuốc hiện màu chứa clorua xesi và amoni molybdate.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC – thin layer chromatography) là kỹ thuật sắc ký khá nhanh gọn và tiện lợi, giúp nhận biết các nhóm chất có trong mẫu nghiên cứu.

Sắc ký được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh trên đó đã có các mẫu cần tách. Dưới tác dụng của lực mao quản, dung môi sẽ chuyển động dọc theo lớp hấp phụ và chuyển vận các cấu tử trong mẫu phân tách với các vận tốc khác nhau đưa đến việc tách các cấu tử. Sự khuếch tán các cấu tử trong lớp hấp phụ vừa theo chiều dọc, vừa theo chiều ngang.

2.2.4. Sắc ký lỏng kết hợp với khối phổ (LC-MS)

Sắc ký ghép khối phổ hay (LC-MS: Liquid chromatography–mass spectrometry) là một kỹ thuật hóa học kết hợp phân tích lý học của sắc ký lỏng (hay HPLC) với phân tích khối lượng phân tử (mass analysis). Sắc ký lỏng được tiến hành chủ yếu dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố khối lượng, trao đổi ion, loại trừ theo kích thước hoặc tương tác hóa học lập thể.

Mẫu được phân tích độ sạch và xác định khối lượng phân tử trên máy đo khối phổ LC-MS-Trap, SL. Nguyên tắc của phương pháp này là mẫu nghiên cứu được ion hóa bằng nhiệt. Các ion khi đi ra khỏi buồng ion hóa sẽ

bị bắn phá bởi điện tử có năng lượng cao thành các mảnh nhỏ. Tại đây, qua một loạt những phân tích sẽ thu được sơ đồ phân mảnh ion. Dựa vào sơ đồ kết hợp với ngân hàng dữ liệu các chất đã biết có thể dự đoán khối lượng phân tử cũng như công thức cấu tạo của mẫu.

2.2.5. Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Đối với phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân, chất nghiên cứu sau khi đưa vào từ trường nó sẽ bị phân tách thành những proton có các mức năng lượng khác nhau từ thấp đến cao. Sự khác nhau này được phản ánh thông qua tần số cộng hưởng. Tần số này được ghi lại dưới dạng các phổ proton, carbon, nhờ máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker, Avance 500 (Hoa Kỳ). Dựa vào độ dịch chuyển của các proton khi phân tích các phổ trên sẽ xác định được số nguyên tử C, H cũng như các nhóm chức có thể tham gia vào bộ khung carbon. Kết hợp với những số liệu thu được từ máy đo khối phổ cũng như các tài liệu đọc phổ chất tương tự đã công bố sẽ cho phép xác định cấu trúc hóa học của chất cần nghiên cứu.

2.2.6. Đánh giá độc tính tế bào

Khả năng sống sót của tế bào trong môi trường nuôi cấy được đánh giá bằng phương pháp MTT. Nguyên tắc của phương pháp này là đánh giá hoạt động trao đổi chất của tế bào sống thông qua hoạt động của enzyme oxidoreductase phụ thuộc NADPH. Enzyme này sẽ khử thuốc nhuộm 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) có màu vàng thành sản phẩm formazan có màu tím và không tan. Giá trị OD đo được của formazan sau khi hòa tan trong dung môi thích hợp sẽ phản ánh mức độ hoạt động của enzyme, tương ứng với độ sống sót của tế bào. Cụ thể, tế bào được nuôi cấy lặp lại 3 lần trong đĩa 96 giếng ở mật độ 5×10^3 tế bào/giếng và bổ sung các chất cần nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau, hoặc không bổ sung chất này để làm mẫu đối chứng. Sau khi ủ 24 giờ, tế bào được rửa lại và được ủ với 100 μ l MTT (1 mg/mL) trong 4 giờ. Cuối cùng DMSO (150 μ l) được thêm vào và đo độ hấp thụ OD ở bước sóng 540 nm. Khả năng sống sót của tế

bào được so sánh ở các giếng có bổ sung chất quan tâm ở các nồng độ khác nhau với mẫu không có bổ sung chất quan tâm. Từ kết quả MTT sẽ lựa chọn được nồng độ chất thích hợp mà không làm ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào cho các nghiên cứu tiếp theo [13].

2.2.7. Xác định hoạt tính enzyme alkaline phosphatase (ALP)

Để đánh giá hoạt tính ALP, tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bằng môi trường DMEM mới có bổ sung chất nghiên cứu, hoặc không bổ sung những chất này để làm đối chứng và ủ trong 48 giờ. Sau đó, tế bào được rửa với đệm PBS kết hợp với đệm carbonate buffer (pH 10.3) 25 mM có chứa Triton X-100 0.1%. Tiếp đó, tế bào được ủ trong 1 giờ ở 37°C với đệm carbonate 250 mM có chứa MgCl₂ 1.5 mM và p-NPP 15 mM. Khi có mặt của ALP, chất p-NPP sẽ được chuyển đổi thành para-nitrophenol (có màu vàng) và inorganic phosphate vô cơ [13]. Hoạt tính ALP trong các mẫu được đo ở bước sóng 405 nm bằng máy đo quang phổ. Hoạt tính ALP được xác định dựa theo công thức:

$$\text{Hoạt tính ALP (\%)} = \frac{A - A_0}{A_0} \times 100\%$$

Trong đó: - *A* là độ hấp thụ của mẫu được bổ sung chất nghiên cứu,

- *A₀* là độ hấp thụ của mẫu không bổ sung chất nghiên cứu

2.2.8. Xác định hoạt tính khoáng hóa của tế bào xương

Mức độ khoáng hóa được xác định bằng cách nhuộm alizarin red-S trong đĩa 6 giếng. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có chứa vitamin C (50 µg/ml) và β-glycerolphosphate (10 mM) trong 2 tuần cùng với nồng độ thích hợp của chất cần nghiên cứu, hoặc không có bổ sung chất nghiên cứu để làm đối chứng. Sau đó, tế bào được rửa hai lần với đệm PBS, cố định trong cồn lạnh 70% (v/v) trong 1 giờ và được làm khô trong không khí. Dung dịch ethanol 100% được dùng để cố định tế bào và chất nền được nhuộm với alizarin red-S 40 mM (pH 4.2) trong 1 giờ rồi tiếp tục rửa kỹ với nước. Tiếp

theo, tế bào được rửa trong 15 phút với cetylpyridium chloride 10% được hòa tan trong 10 mM đệm phosphate natri (pH 7.0). Sự nhuộm màu của tế bào thể hiện mức độ khoáng hóa và mật độ quang học được đo ở bước sóng 562 nm để xác định mức độ nhuộm màu của tế bào trong các mẫu nghiên cứu và đối chứng [27]. Hoạt tính khoáng hóa xương được xác định dựa theo công thức:

$$\text{Hoạt tính khoáng hóa (\%)} = \frac{A - A_0}{A_0} \times 100\%$$

Trong đó: - A là độ hấp thụ của mẫu được bổ sung chất nghiên cứu

- A_0 là độ hấp thụ của mẫu không bổ sung chất nghiên cứu

2.2.9. Xác định protein theo phương pháp Bradford

Phương pháp này xác định sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại của phức hợp thuốc nhuộm coomassie brilliant blue với mẫu protein cần định lượng. Dung dịch thuốc nhuộm ở dạng màu đỏ. Có tính acid khi chưa gắn kết với protein thì có bước sóng hấp thụ cực đại tại 465 nm và khi kết hợp với protein thì thuốc nhuộm chuyển sang màu xanh dương có hấp thụ cực đại ở bước sóng 595 nm. Albumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng làm chất chuẩn để xây dựng đường chuẩn protein. Khi cho dung dịch protein vào thuốc nhuộm, màu sẽ xuất hiện sau 2 phút. Độ hấp thụ của dung dịch mẫu tại bước sóng 595 nm được đo trên máy quang phổ và hàm lượng protein trong mẫu được tính dựa trên đường chuẩn albumin đã xây dựng [13].

2.2.10. Đánh giá ảnh hưởng của chất phân lập lên biểu hiện của các protein trong con đường tín hiệu MAPK liên quan đến biệt hóa tế bào tiền tạo xương

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất quan tâm lên con đường tín hiệu MAPK liên quan đến quá trình cảm ứng TTX gồm các protein là p-ERK, ERK, p-p38, p38 so sánh với actin/GAPDH, là các protein nội chuẩn, sử dụng kỹ thuật Western blot. Để thực hiện thí nghiệm này, tế bào được nuôi và xử lý hoặc không xử lý với chất nghiên cứu (blank) sau đó tiến hành tách chiết protein của tế bào.

+ *Tách chiết protein*: Tế bào được ly giải trong đệm RIPA có chứa Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), Nonidet P-40 0.4%, NaCl 120 mM, MgCl₂ 1.5 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 2 mM, leupeptin 80 µg/mL, NaF 3 mM và DTT 1 mM ở 4°C trong 30 phút. Hàm lượng protein trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp Bradford sử dụng albumin là chất chuẩn. Dịch chiết này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm Western blot [13].

+ *Western blot*: Thí nghiệm này được thực hiện theo quy trình như sau: dịch chiết protein (25 µg) được phân tách bằng điện di trên gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) 10% và sau đó các band protein được chuyển lên màng PVDF (Amersham Pharmacia Biotech., England, UK). Màng này được ủ cùng với skim milk 5% trước khi ủ qua đêm ở 4°C với kháng thể thứ nhất phospho-p38 (p-p38), p38 tổng số, phospho-ERK (p-ERK) và ERK tổng số (pha loãng 1:1000). Sau đó, màng sẽ được ủ cùng với kháng thể thứ hai là kháng thể IgG có mang đuôi horseradish peroxidase (tỷ lệ 1:5000) ở nhiệt độ phòng. Liên kết của các kháng thể này sẽ được phát hiện bằng các chất làm tăng phát quang hóa (chemiluminescence). Phần mềm Image –J được sử dụng để định lượng tương đối mức độ biểu hiện của protein quan tâm [13].

2.2.11. Tìm hiểu tương tác nội phân tử của chất nghiên cứu với các enzyme COX

- *Chuẩn bị protein và phối tử (ligand)*

Cấu trúc ba chiều của chất nghiên cứu được dựng sử dụng phần mềm MarvinSketch phiên bản 19.27.0 và PyMOL phiên bản 1.3r1 [27]. Việc tính toán năng lượng tự do được thực hiện bằng cách sử dụng trường lực MM2 và tính toán lượng tử hóa học được thực hiện bằng phương pháp bán thực nghiệm PM6 sử dụng phần mềm Gaussian 09 [28].

Các mục PDB được lựa chọn cho nghiên cứu liên kết 3LN1 và 3KK6 đã được tải xuống từ ngân hàng dữ liệu protein. Việc lựa chọn mục nhập 3LN1 dựa trên phức hợp chất nghiên cứu liên kết tại trung tâm hoạt động của cyclooxygenase-2 (COX-2) [29]. Mục nhập 3KK6 là tinh thể học tia X của

cyclooxygenase-1 (COX-1) với phối tử [30]. Cấu trúc protein được dựng sử dụng chương trình AutodockTools (ADT).

- *Phân tích kết nối bằng AutoDock*

Nghiên cứu liên kết phân tử sử dụng AutoDock 4.2.6 với thuật toán Lamarckian (LGA) để tìm kiếm vị trí liên kết tối ưu cùng với chức năng tính điểm để xác định ái lực liên kết. Công cụ AutoDock được sử dụng để thiết lập và thực hiện tính toán liên kết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá liên kết với giả định rằng protein đã liên kết và xem xét không gian hình dạng của các phối tử để phân tích hiệu ứng quy nạp của chất liên kết. Công cụ Autodock đã được sử dụng để dựng cấu hình protein cho mô phỏng kết nối. Các dị nguyên tử bao gồm các phân tử nước đã bị loại bỏ và các nguyên tử hydro phân cực cũng như điện tích Kollman được thêm vào thụ thể (protein). Trong phân tích kết nối, vị trí liên kết được đặt trong một hộp có rất nhiều điểm lưới (grid) theo hướng $x \times y \times z$ với khoảng cách mắt lưới là 0,375 Å. Trung tâm lưới được xác định tại các vị trí liên kết của từng protein với tọa độ x , y và z là 31.289, -23.496 và -14.356 Å đối với cyclooxygenase-2. Đối với cyclooxygenase-1 thì có tọa độ là -20.179, 50.267 và 41.487 Å

Trước tiên, AutoGrid được chạy để tạo bản đồ lưới với các nguyên tử khác nhau của phối tử và thụ thể. Sau khi hoàn thành bản đồ lưới, AutoDock được chạy sử dụng các tham số autodock như sau: Kích thước quần thể GA: 300; số lần đánh giá năng lượng tối đa: 25 000 và số lượng tạo ra: 27 000. Tối đa 50 cấu hình được xem xét cho mỗi phân tử và dung sai cụm góc-trung bình-phương (RMS) là 2,0 Å trong mỗi lần chạy. Kết quả đầu ra từ các nghiên cứu lập mô hình AutoDock được phân tích bằng các phần mềm PyMOL [27], Discovery Studio Visualizer [31] và LigPlus [32]. PyMOL được sử dụng để tính toán khoảng cách của các liên kết hydro giữa hydro và giữa các đối tác liên kết giả định.

2.2.12. Xử lý thống kê

Các số liệu được phân tích thống kê sử dụng t-test hoặc ANOVA khi so sánh nhiều mẫu với $P < 0,05$.

CHƯƠNG III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tinh sạch chất tự nhiên từ phân đoạn chiết của cây Bìm Bịp có hoạt tính cảm ứng TTX

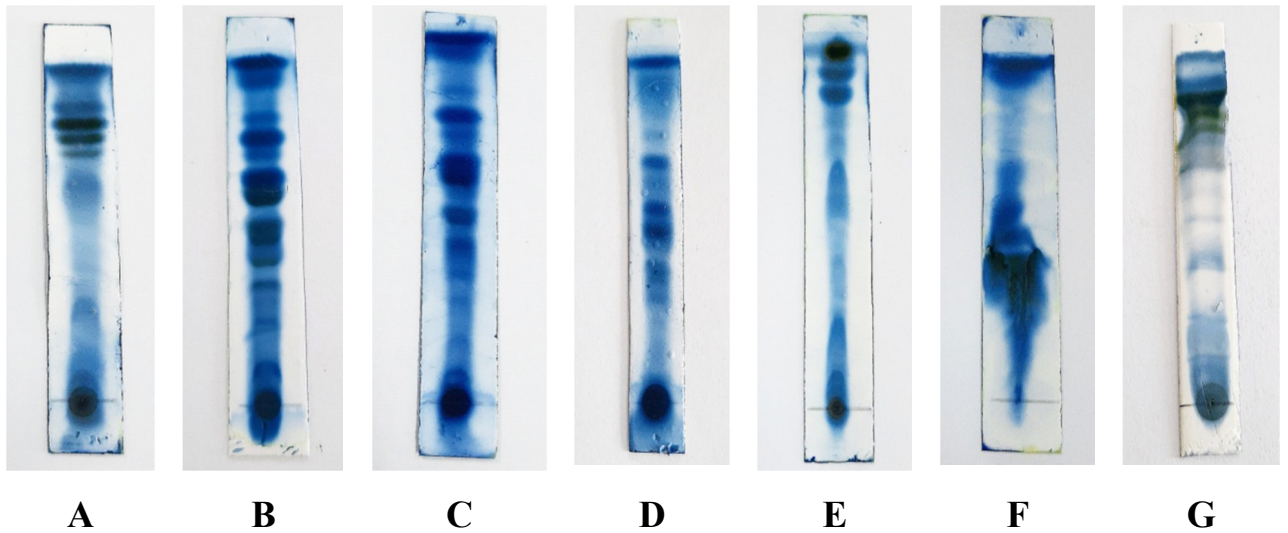
3.1.1. Tách chiết phân đoạn chứa chất tự nhiên có hoạt tính cảm ứng TTX

Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi, phân đoạn chiết EtOAc của cây Bìm Bịp đã được xác định là có hoạt tính cảm ứng TTX [13]. Vì thế, trong luận văn này chúng tôi chỉ tập trung vào phân lập chất tự nhiên có hoạt tính cảm ứng TTX từ phân đoạn chiết này.

Bột lá và thân cây Bìm Bịp (2,5 kg) được ngâm kiệt trong ethanol 96% ở nhiệt độ phòng trong hai tuần theo tỉ lệ 1kg nguyên liệu: 5 lít EtOH 96%. Quá trình chiết được lặp lại 2 lần. Dịch chiết EtOH được lọc qua giấy lọc thô và cất loại dung môi bằng máy cất quay chân không để thu cao EtOH. Tiếp theo, cao EtOH được hòa tan với 500 mL nước và chiết lần lượt 3 lần với 500 mL dung môi n-hexane và EtOAc theo tỉ lệ 1:1 (v/v). Phân đoạn chiết EtOAc sau đó được thu lại bằng máy quay cất cô chân không để thu cao chiết EtOAc (8 g) sử dụng cho các bước tinh sạch tiếp theo.

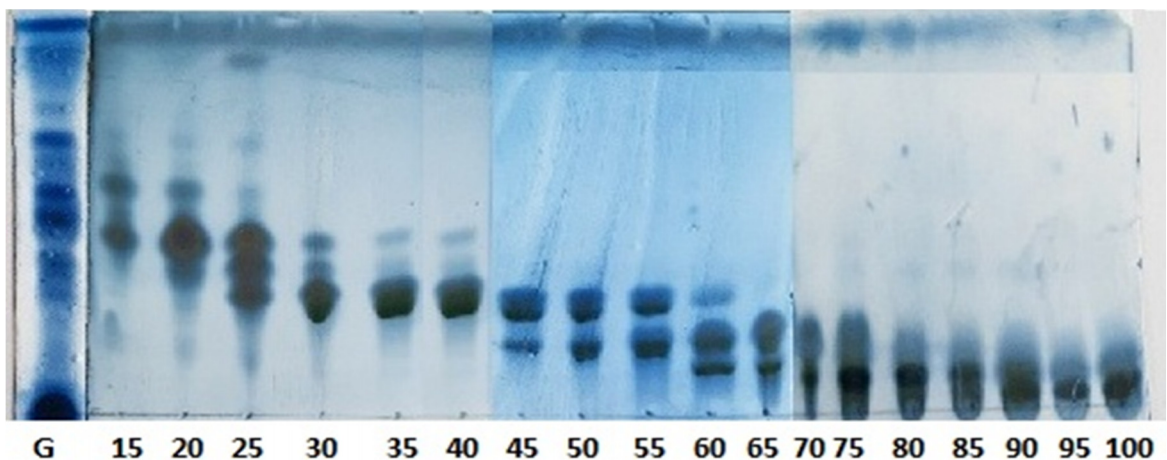
3.1.2. Tinh sạch chất tự nhiên trên cột sắc ký silica gel 1

Để tinh sạch thành công chất nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký thì việc chọn lựa được hệ dung môi sắc ký thích hợp là hết sức quan trọng. Dựa trên kinh nghiệm và tham khảo các nghiên cứu trước đây [13], [14], chúng tôi đã kiểm tra khả năng phân tách phân đoạn trên TLC sử dụng 7 hệ dung môi là n-hexane: acetone (2:1), n-hexane: acetone (3:1), n-hexane: acetone (4:1), n-hexane: acetone (5:1), CH₂Cl₂: acetone (3:1), n-hexane: metanol (3:1), chlorofom: acetone (3:1). Kết quả thu được ở hình 3.1 cho thấy hệ dung môi n-hexane: acetone (5:1) là phù hợp nhất để tinh sạch chất quan tâm từ phân đoạn chiết EtAOC của cây Bìm Bịp.



Hình 3.1. Sắc ký đồ TLC của cao EtOAc sử dụng phương pháp sắc ký TLC ở các hệ dung môi khác nhau. A) n-hexane: acetone (2:1), B) n-hexane: acetone (3:1), C) n-hexane: acetone (4:1), D) n-hexane: acetone (5:1), E) CH_2Cl_2 : acetone (3:1), F) n-hexane: methanol (3:1), G) Chlorofom: acetone (3:1).

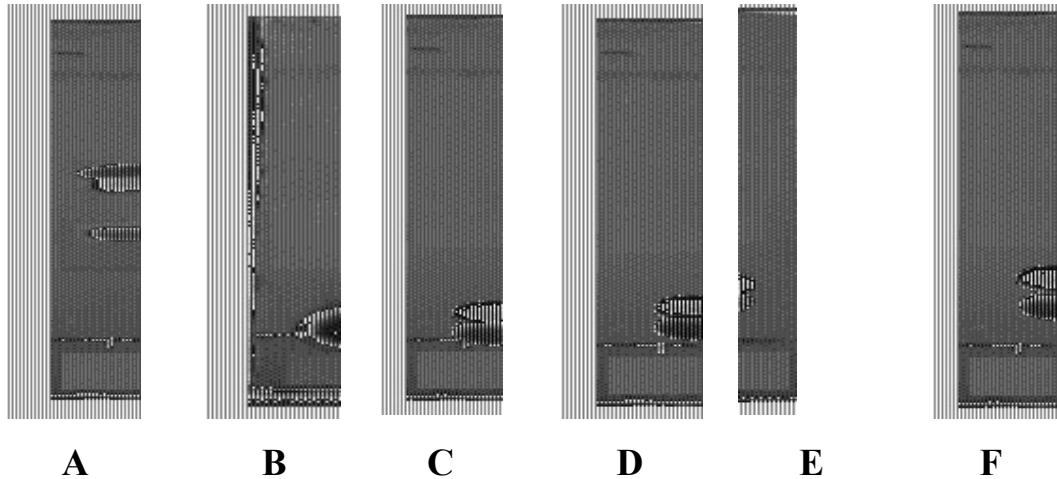
Cao phân đoạn EtOAc (4 g) được đưa lên cột sắc ký silica gel có kích thước 3 x 80 cm và được rửa chiết với hệ dung môi n-hexane: acetone = 5:1 (v/v). Sau khi thu các phân đoạn 5 mL, độ sạch của chúng được xác định bằng TLC. Kết quả cho thấy phân đoạn từ 27-44 chứa chất tự nhiên có hàm lượng cao và có thể tinh sạch được dễ dàng hơn (Hình 3.2), vì thế các phân đoạn từ 27-44 được dồn lại (**F1.2**), cô quay chân không và tiếp tục chạy sắc ký trên cột silica gel 2 để phân lập chất quan tâm trong phân đoạn này.



Hình 3.2. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết ethyl acetate của cây bìm bịp với hệ dung môi rửa chiết n-hexane: acetone = 5:1

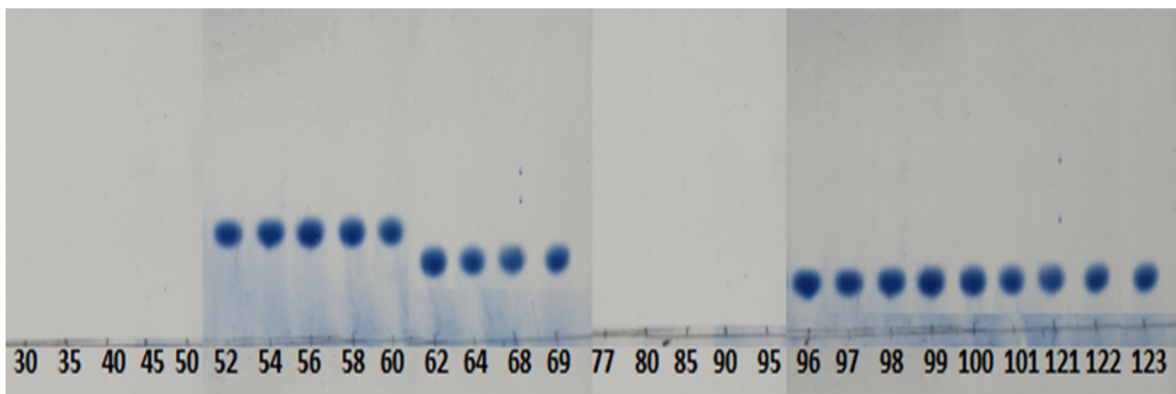
3.1.3. Tinh sạch chất tự nhiên trên cột sắc ký silica gel 2

Phân đoạn **F1.2** tiếp tục được đưa lên cột sắc ký silica gel 2 sử dụng hệ dung môi n-hexane : ethyl acetate (7:1) là hệ dung môi được xác định là phù hợp nhất dựa trên sắc ký đồ TLC của mẫu trong các hệ dung môi khác nhau (Hình 3.3).



Hình 3.3. Sắc ký đồ TLC phân đoạn F1.2 chạy ở các hệ dung môi khác nhau. A) n-hexane: dichloromethane: methanol (6:1:1), B) n-hexane: dichloromethane (6:1), C) n-hexane: EtOAc (12:1), D) n-hexane: EtOAc(10:1), E) n-hexane: EtOAc (6:1), F) n-hexane: EtOAc (7:1).

Trong quá trình chạy sắc ký trên cột silica gel 2, các phân đoạn 5 mL được thu lại và chạy TLC để theo dõi sự xuất hiện của các chất phân tách ra khỏi cột. Các phân đoạn sắc ký được dồn lại dựa trên kết quả TLC thu được (Hình 3.4).

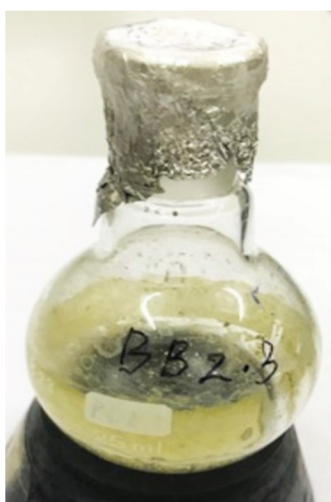


Hình 3.4. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết F1.2 với hệ dung môi rửa chiết là n-hexane: ethyl acetate (7:1)

Kết quả chạy sắc ký TLC ở hình 3.4 cho thấy từ phân đoạn 1 đến 50 không có chất nào được chiết rút ra (**F2.1**). Từ phân đoạn 52 đến phân đoạn 62 (**F2.2**) thu được một chất sạch có R_f cao. Từ phân đoạn 64 đến 78 (**F2.3**) tiếp tục thu được một chất sạch thứ 2. Từ phân đoạn 96 đến 126 (**F2.4**) là một chất sạch có R_f thấp hơn. Các phân đoạn chất sạch được thu lại và kiểm tra độ tinh sạch trên TLC (Hình 3.5). Sắc ký đồ cho thấy cả 3 chất sạch thu được đều chỉ còn 1 băng sắc ký, gợi ý các chất này đã được tinh sạch. Trong số 3 chất sạch thu được, chất F2.4 ở dạng bột màu vàng nhạt có khối lượng thu được nhiều nhất (276 mg, hình 3.6). Vì thế, chất này được sử dụng để đánh giá hoạt tính cảm ứng TTX trên mô hình *in vitro*.

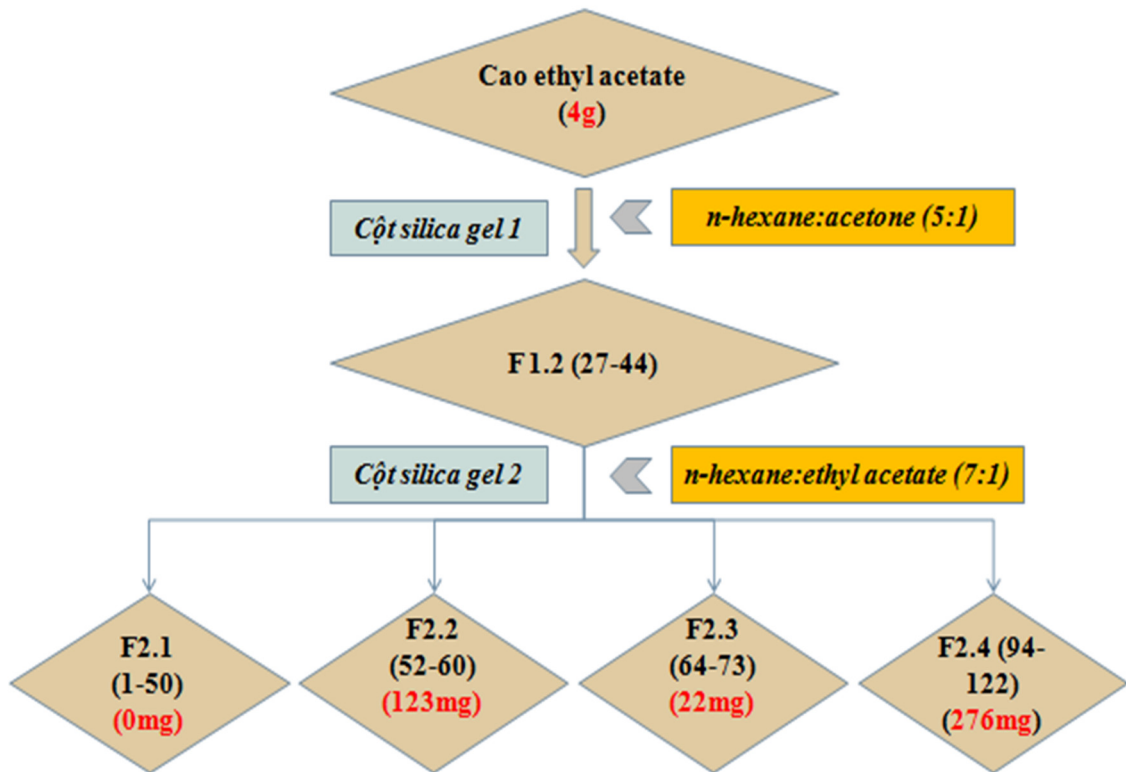


Hình 3.5. Sắc ký đồ TLC của các chất sạch sau khi được phân tách trong hệ dung môi n-hexane: EtOAc (7:1). A) Chất sạch F2.2. B) Chất sạch F2.3. C) Chất sạch F2.4.



Hình 3.6. Chất F2.4 dạng tinh sạch

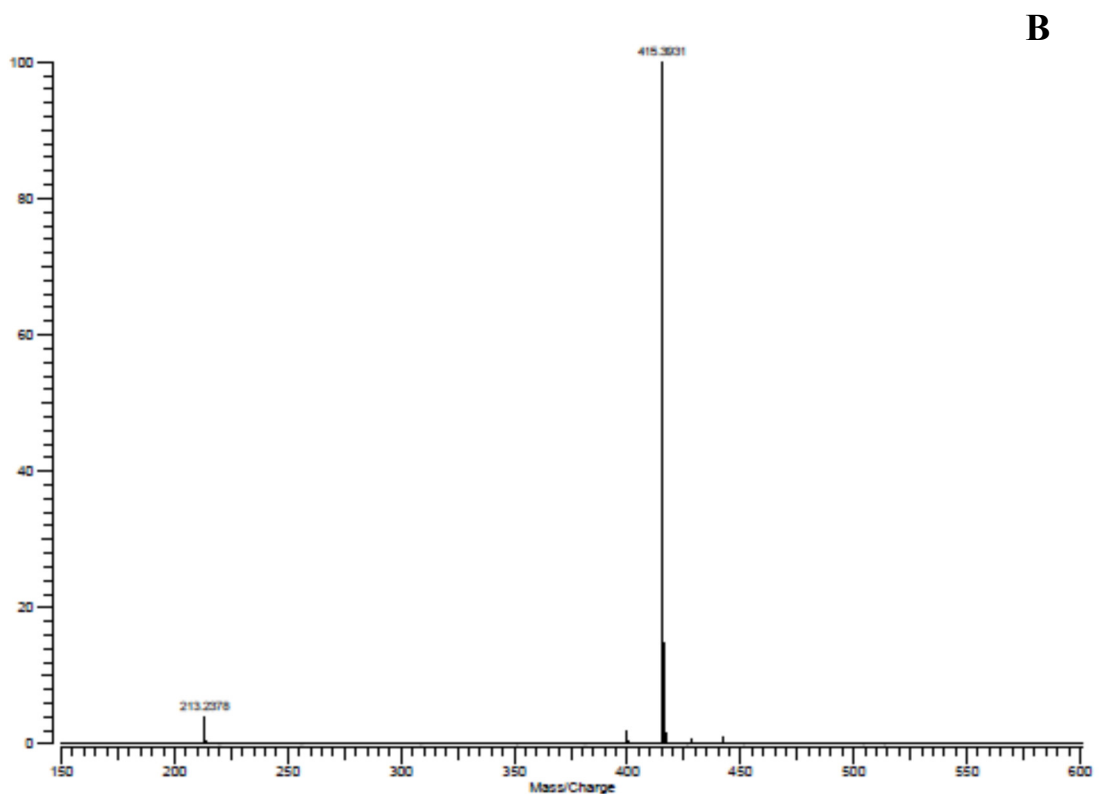
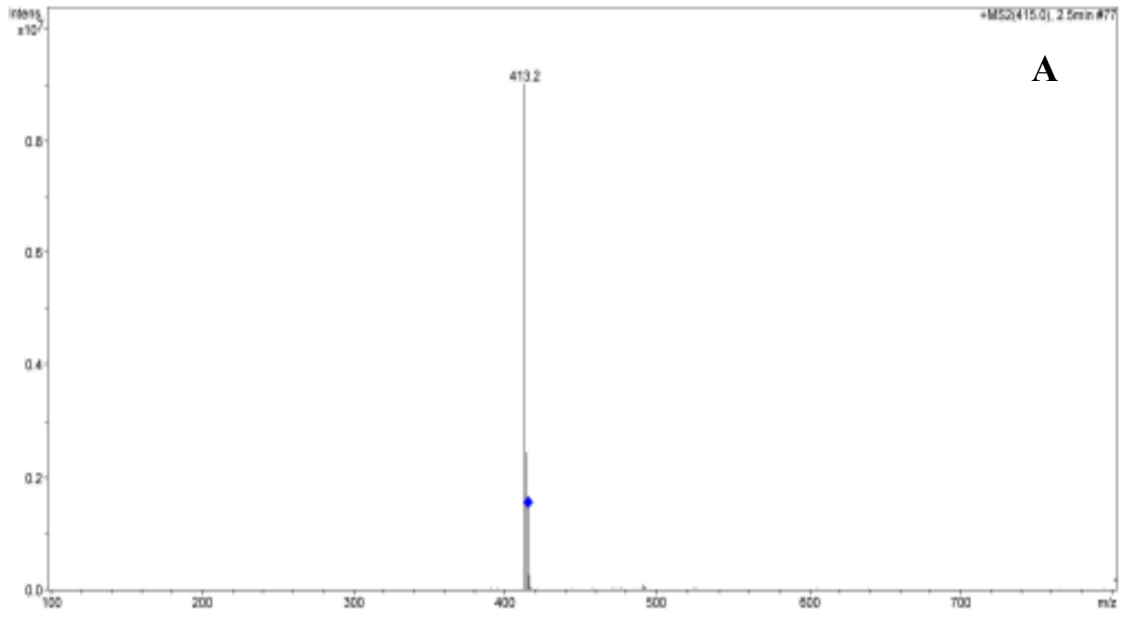
Sơ đồ quá trình tinh sạch chất F2.4 được trình bày ở hình 3.7.



Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các chất sạch

3.1.4. Xác định cấu trúc hóa học của chất tự nhiên phân lập được

Chất F2.4 đã được đo phổ khối có độ phân giải cao và cộng hưởng từ ^1H , ^{13}C , Dept135, Cosy, HMBC, HSQC trong dung môi CDCl_3 . Kết quả đo và phân tích phổ khối (Hình 3.8, Bảng 3.1) cho thấy phổ negative có khối lượng phân tử là 413 g/mol, phổ positive có khối lượng phân tử 415g/mol. Kết quả đo các phổ NMR một chiều và hai chiều gồm phổ ^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, HMBC, HSQC (Hình 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14) và giải phổ ^1H và ^{13}C (Bảng 3.2) kết hợp với phân tích và so sánh với tài liệu tham khảo đã xác định được chất này là β -sitosterol (Hình 3.15) có công thức cấu tạo là $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ và khối lượng phân tử là 414.7g/mol.



Hình 3.8. Phổ khối negative (A) và positive (B) của chất F2.4.

Bảng 3.1. Kết quả dự đoán khối lượng phân tử của chất F2.4

Elemental Composition Search Report:

Target Mass:
Target m/z = 415.3931 ± 0.002
Charge = +1

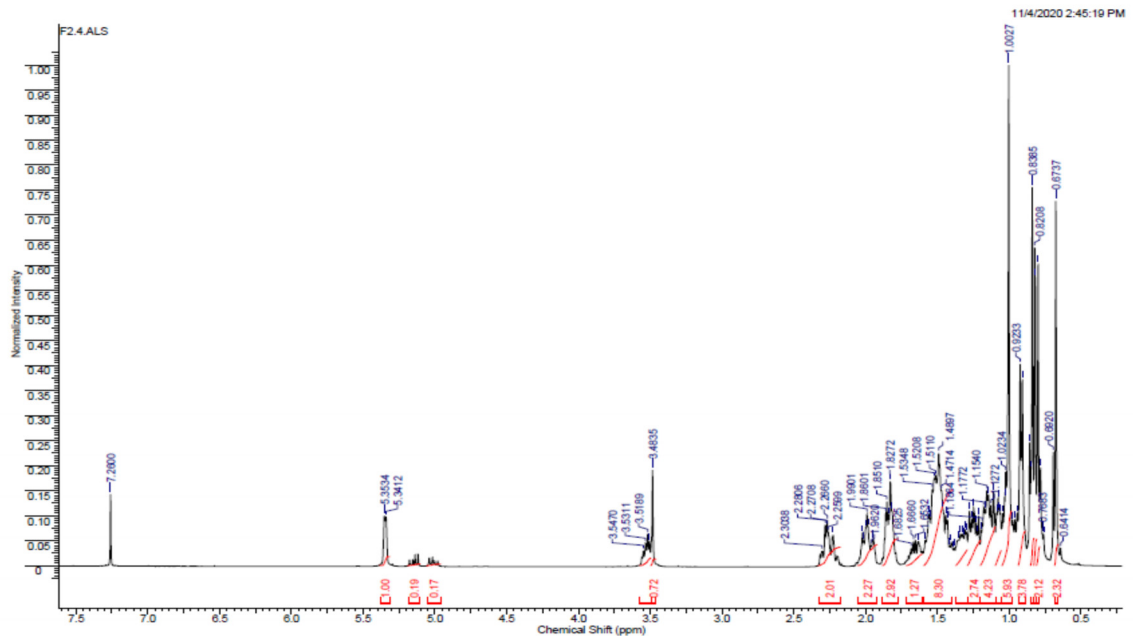
Possible Elements:

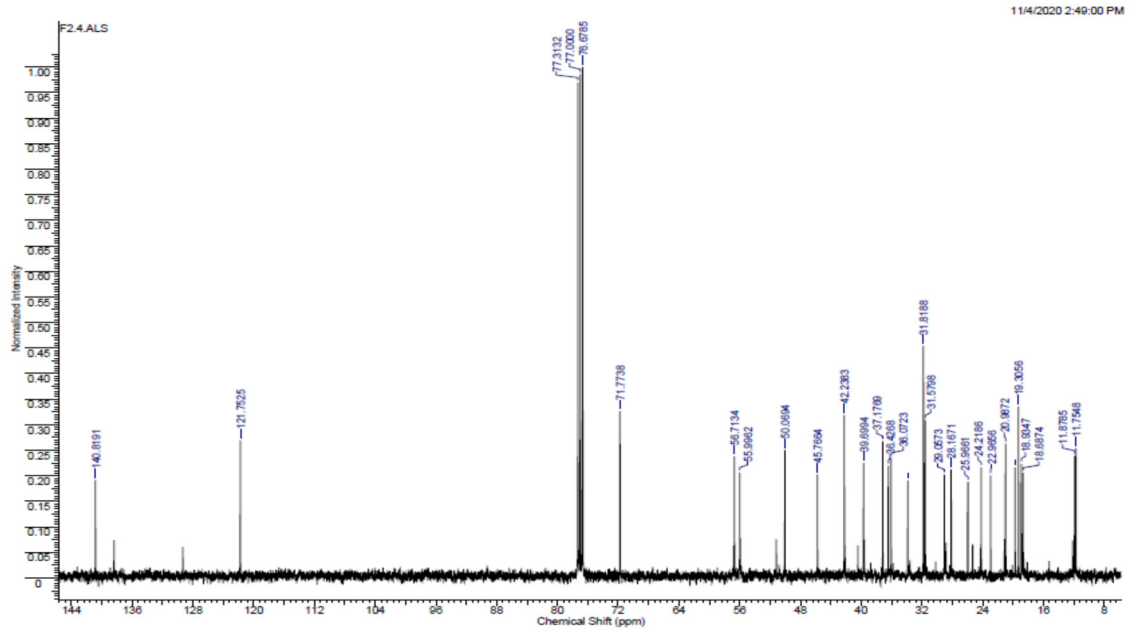
Element:	Exact Mass:	Min:	Max:
C	12.000000	0	100
H	1.007825	0	100
O	15.994915	0	100

Additional Search Restrictions:
None

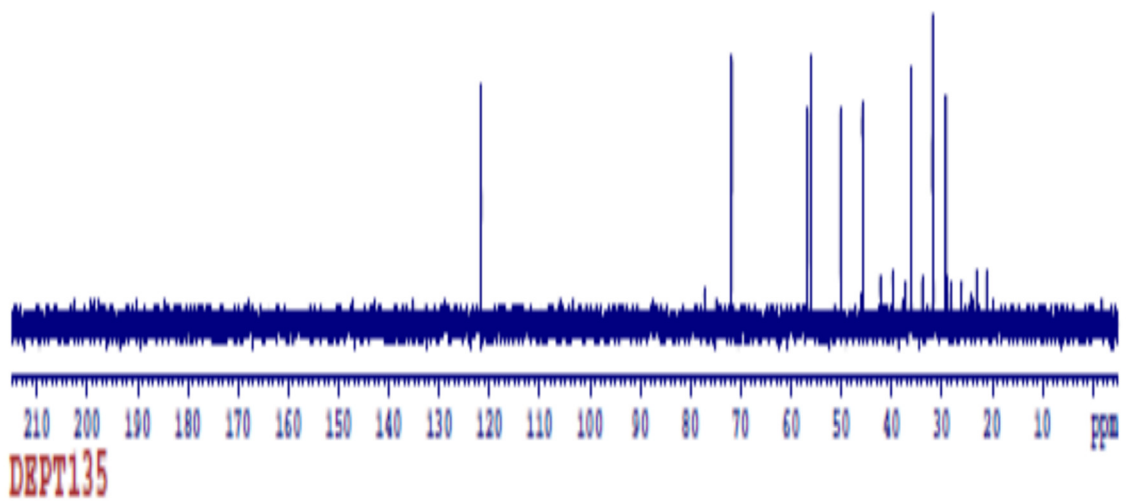
Search Results:
Number of Hits = 1

m/z	Delta m/z	DBE	Formula
415.39344	-0.00034	4.5	C ₂₉ H ₅₁ O ⁺¹

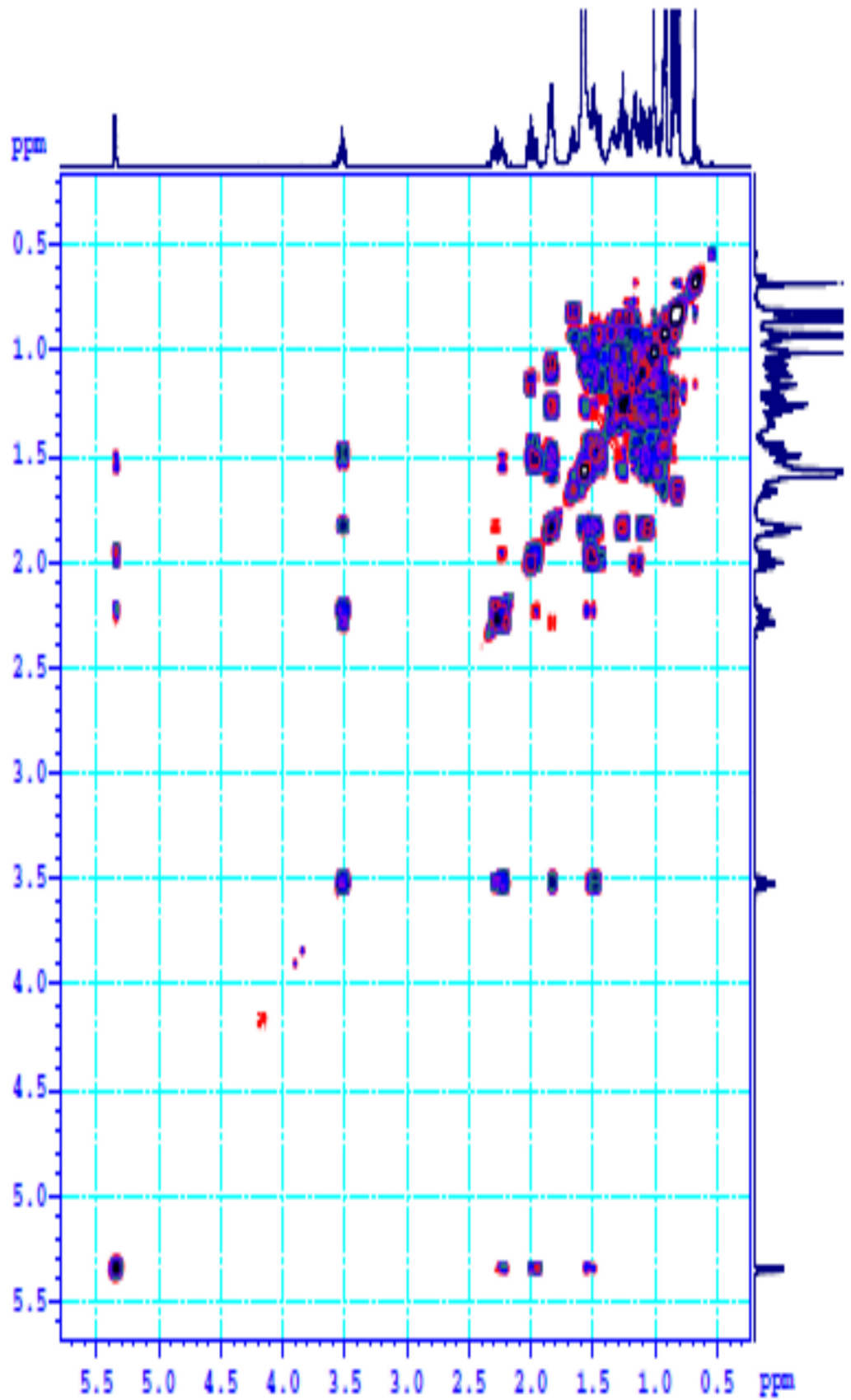
Hình 3.9. Phổ cộng hưởng từ ¹H của chất F2.4



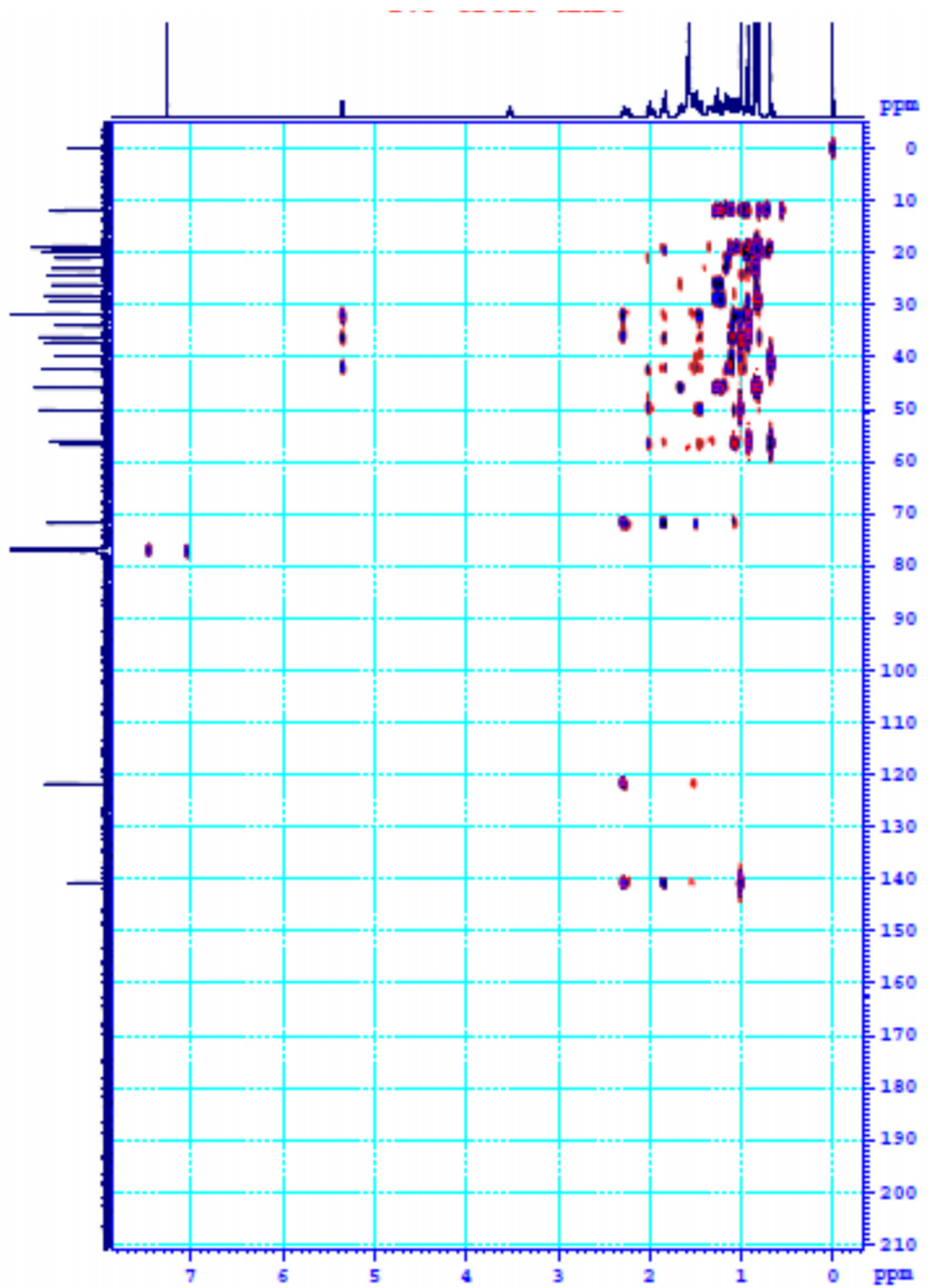
Hình 3.10. Phổ cộng hưởng từ ^{13}C của chất F2.4



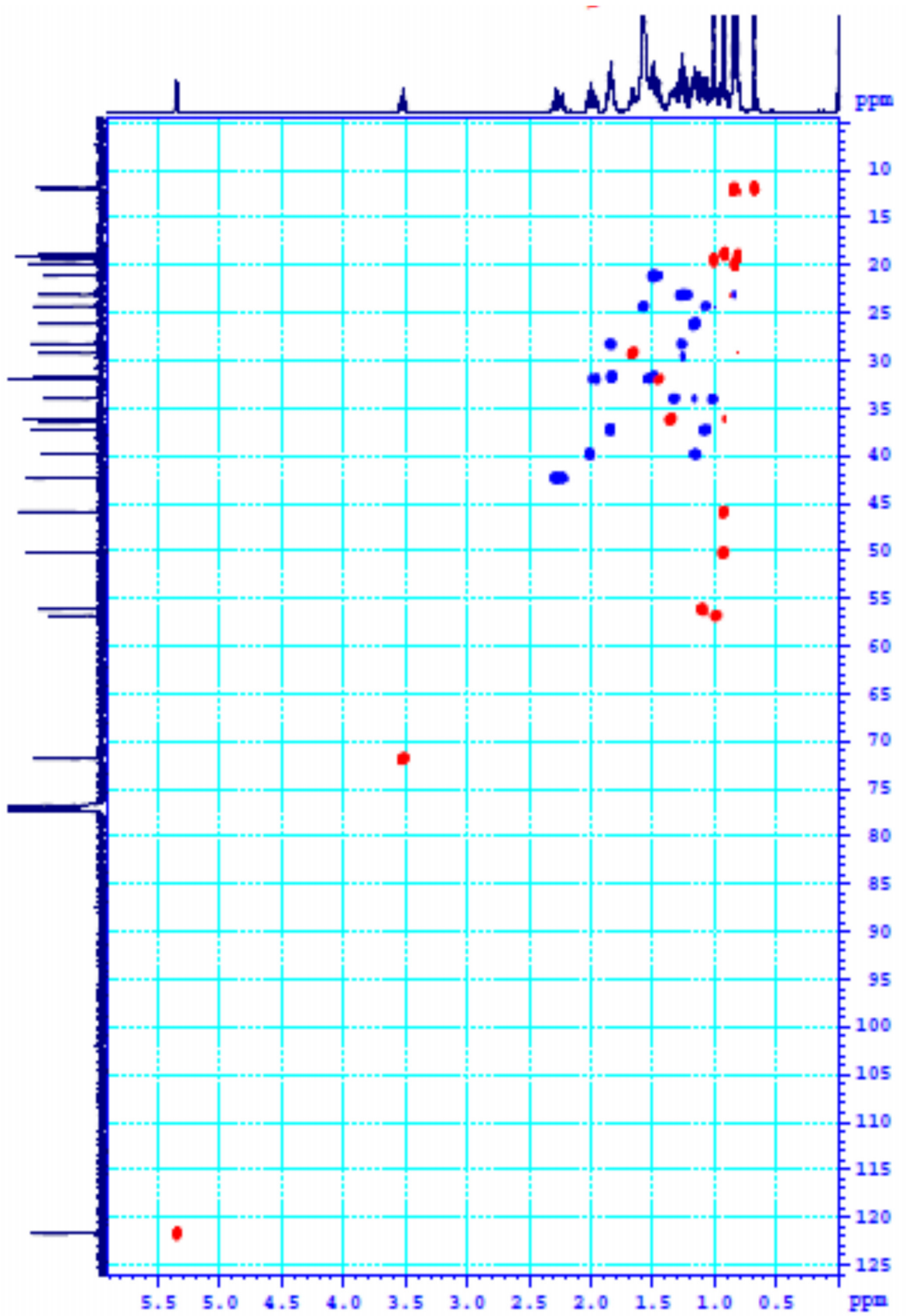
Hình 3.11. Phổ DEPT135 của chất F2.4



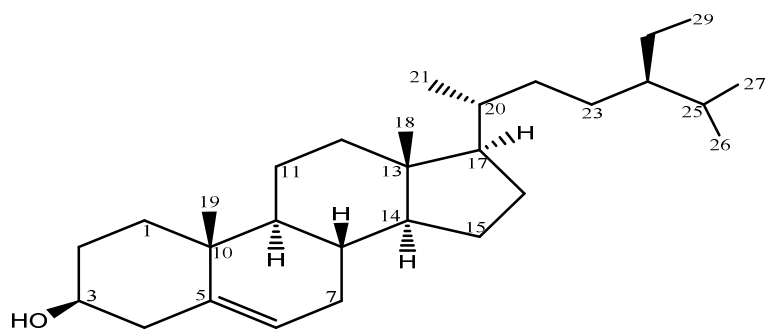
Hình 3.12. Phổ COSY của chất F2.4



Hình 3.13. Phổ HMBC của chất F2.4



Hình 3.14. Phổ HSQC của chất F2.4



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của chất β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$)

Bảng 3.2. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H và ^{13}C của chất F2.4

C	β -sitosterol		
	δ_C^*	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
1	37.2	37.2	1.06 (m); 1.85 (m)
2	31.6	31.6	1.49 (m); 1.81 (m)
3	71.8	71.8	3.52 (m)
4	42.3	42.2	2.23 (m); 2.28 (m)
5	140.7	140.8	-
6	121.7	121.7	5.35 (d, 6.5 Hz)
7	31.9	31.8	1.86 (m); 1.96 (m)
8	31.9	31.8	1.46 (m)
9	50.1	50.1	0.94 (m)
10	36.5	36.4	-
11	21.1	21.0	1.47 (m); 1.53 (m)
12	39.8	39.7	1.18 (m); 1.98 (m)
13	42.3	42.2	-
14	56.8	56.7	0.96 (m)
15	24.3	24.2	1.03 (m); 1.56 (m)
16	28.2	28.2	1.68 (m); 1.82 (m)

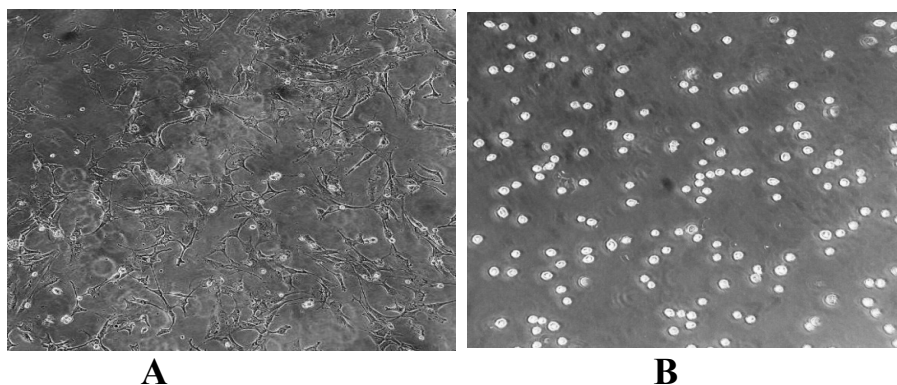
17	56.0	56.0	1.07 (m)
18	11.9	11.7	0.67 (s)
19	19.4	19.3	1.00 (s)
20	36.1	36.1	1.34 (m)
21	18.8	18.9	0.92 (d, 6.5 Hz)
22	33.9	33.8	0.97 (m); 1.24 (m)
23	26.1	26.0	0.76 (m); 1.15 (m)
24	45.8	45.7	0.96 (m)
25	29.2	29.1	1.66 (m)
26	19.8	19.7	0.81 (d, 6.5 Hz)
27	19.0	19.3	0.82 (d, 6.5 Hz)
28	23.1	23.0	1.24 (m); 1.27 (m)
29	12.0	11.9	0.84 (d, 6.5 Hz)

* δ_C – β -sitosterol đo trong $CDCl_3$

3.2. Đánh giá hoạt tính cảm ứng TTX của chất β -sitosterol

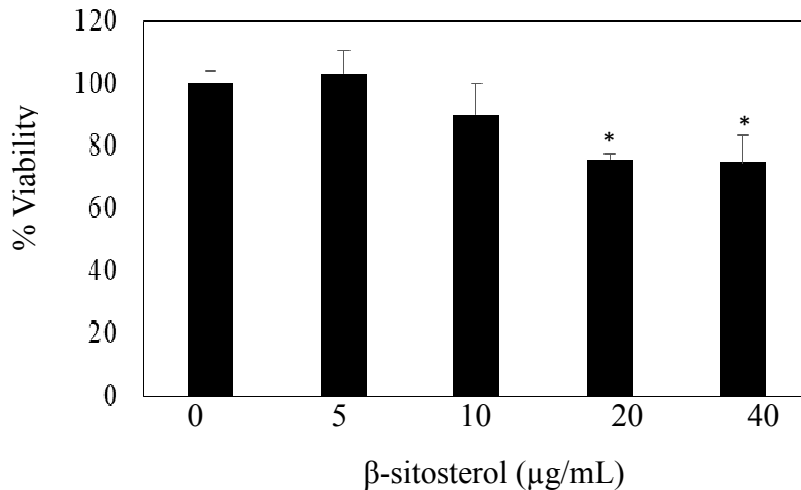
3.2.1. Khả năng sống sót của tế bào tạo xương khi xử lý với β -sitosterol

Tế bào tiền tạo xương MC3T3-E1 được nuôi cấy trong môi trường alpha-MEM có bổ sung nhân tố sinh trưởng (Hình 3.16) đã được sử dụng cho các nghiên cứu này. Đây là dòng tế bào có khả năng biệt hóa và có tính ổn định cao.



Hình 3.16. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi trong môi trường DMEM được bổ sung FBS 10% khi bắt đầu nuôi cấy (A) và sau khi nuôi cấy 3 ngày (B).

Tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong môi trường có chất β -sitosterol ở các nồng độ khác nhau. Sau 03 ngày nuôi cấy, độ sống của tế bào được đánh giá sử dụng phương pháp MTT. Từ kết quả này, nồng độ chất không làm ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào được lựa chọn cho các nghiên cứu *in vitro* tiếp theo để đánh giá ảnh hưởng của chất quan tâm đến sự biệt hóa tế bào tạo xương.



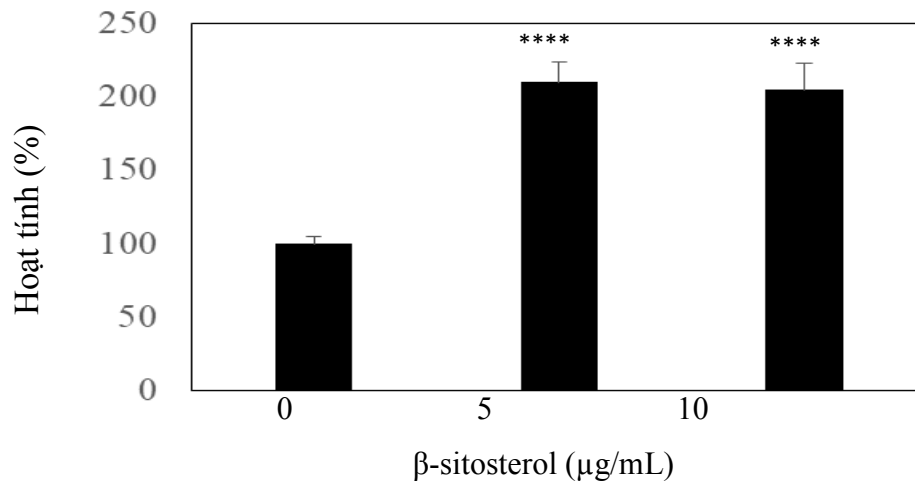
Hình 3.17. Khả năng sống sót của tế bào MC3T3-E1 trong môi trường nuôi cấy có chứa β -sitosterol.

Các kết quả thu được trong hình 3.17 cho thấy ở các nồng độ 5 và $10\mu\text{g/mL}$, β -sitosterol không làm ảnh hưởng đáng kể đến độ sống của tế bào tạo xương MC3T3-E1, vì vậy có thể tiếp tục sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chất quan tâm đến sự biệt hóa tế bào tạo xương.

3.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên hoạt tính ALP của tế bào MC3T3-E1

Quá trình biệt hóa tế bào tạo xương có thể được xác định qua ba giai đoạn: **i)** sinh trưởng của tế bào (cell proliferation); **ii)** trưởng thành của chất nền (matrix maturation); **iii)** khoáng hóa của chất nền (matrix mineralization). Giai đoạn **ii)** được xác định bằng sự biểu hiện cực đại hoạt tính ALP. Đây là chỉ thị quan trọng cho biểu hiện quá trình tái tạo xương. Kết quả trình bày ở hình 3.18 cho thấy β -sitosterol có tác dụng kích thích hoạt tính enzyme này rõ

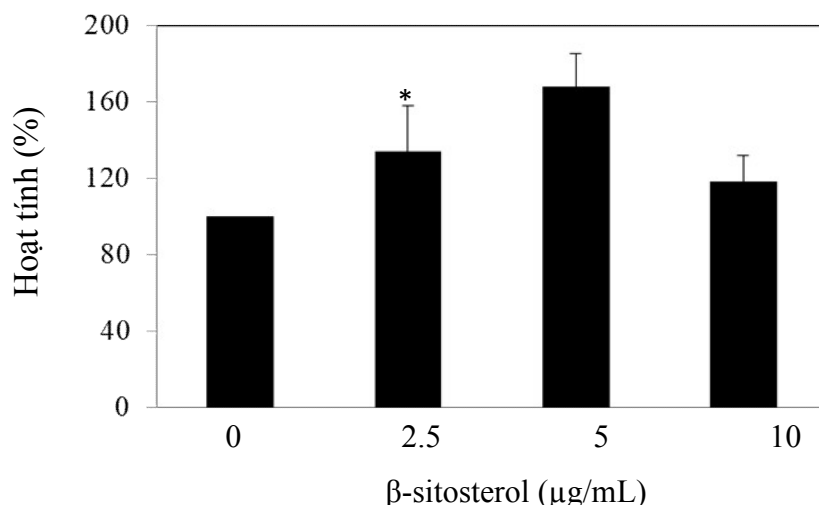
rệt, làm tăng hoạt tính lần lượt lên 210% và 204,6 % ở các nồng độ 5 và 10 $\mu\text{g/mL}$ so với đối chứng.

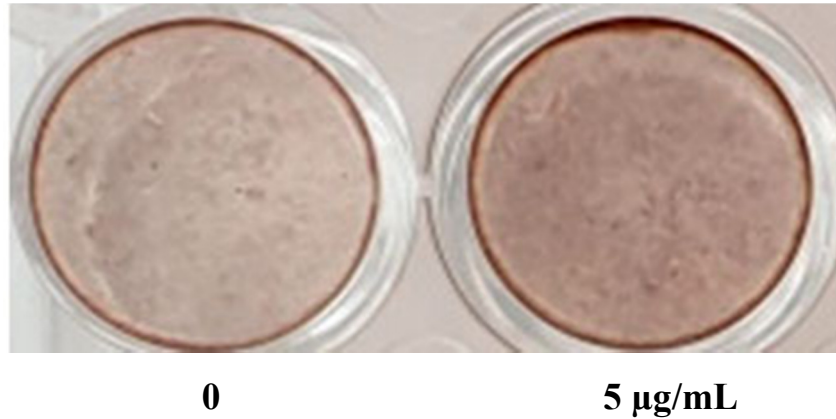


Hình 3.18. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol của cây Bìm Bịp lên hoạt tính ALP của tế bào MC3T3-E1

3.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên hoạt tính khoáng hóa xương của tế bào tạo xương MC3T3-E1

Giai đoạn khoáng hóa của chất nền (matrix mineralization) là giai đoạn cuối cùng trong quá trình biệt hóa tế bào tạo xương. Khi quá trình khoáng hóa kết thúc, có thể nhìn thấy sự lắng đọng canxi (sự khoáng hóa xương) bằng phương pháp nhuộm màu thích hợp. Kết quả thu được ở hình 3.19 cho thấy β -sitosterol làm tăng cường khoáng hóa lên 134, 168, 118% ở nồng độ 2,5; 5,0 và 10 $\mu\text{g/mL}$ so với đối chứng ($P < 0.05$).

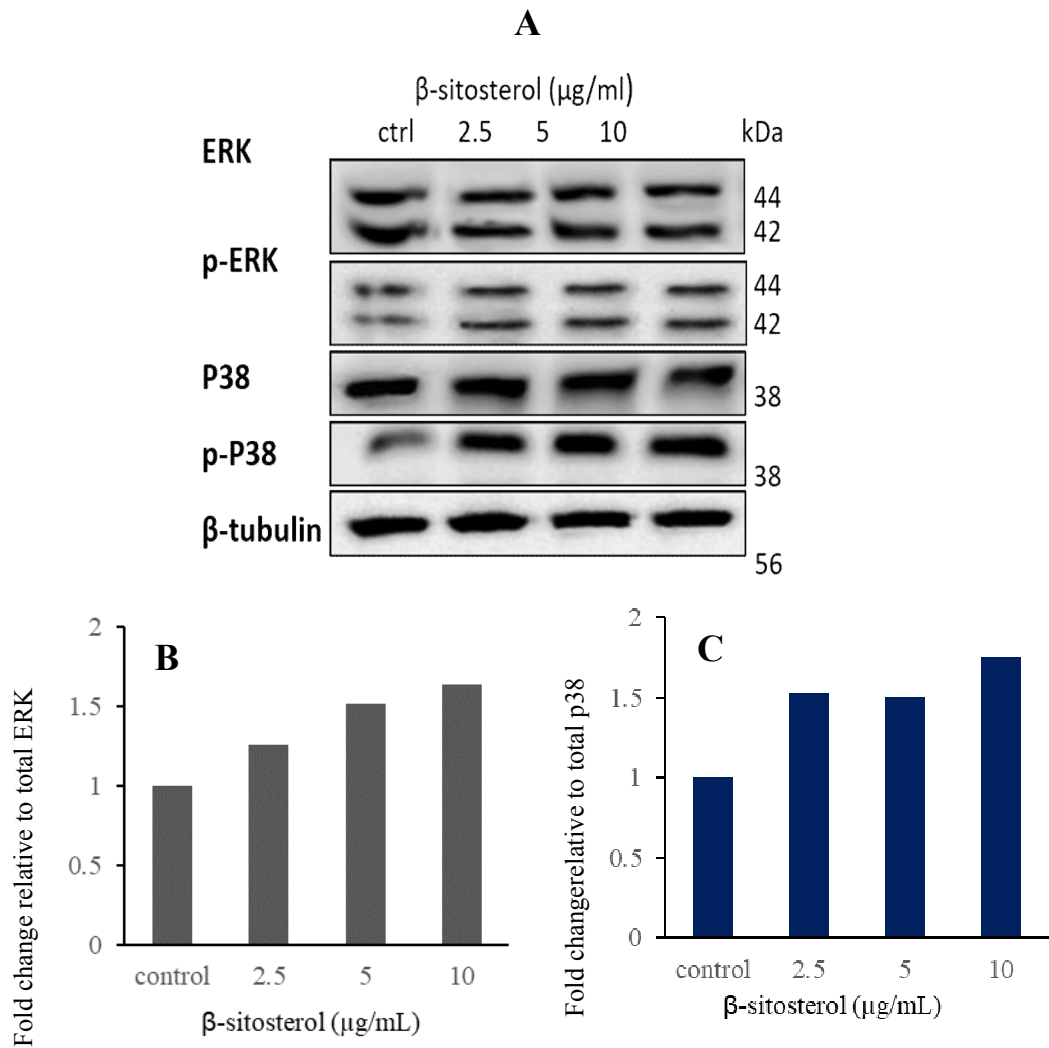




Hình 3.19. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol của cây Bìm Bịp lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào MC3T3-E1.

3.2.4. Đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên biểu hiện của protein trong con đường tín hiệu MAPK

Con đường tín hiệu MAPK đóng vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa và khoáng hóa của tế bào tạo xương. Vì vậy, ảnh hưởng của β -sitosterol lên biểu hiện của protein trong con đường tín hiệu MAPK đã được chúng tôi thực hiện. Các protein ERK (protein kinase điều hòa tín hiệu ngoại bào) và p38 của con đường tín hiệu MAPK là hai protein kinase hoạt hóa mitogen (MAP) trong một nhóm các phân tử tín hiệu đóng vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa tế bào tạo xương. Trong thí nghiệm này, ERK / p-ERK và p38 / p-p38 được chọn để kiểm tra sự biểu hiện của protein khi có mặt β -sitosterol ở các nồng độ 2,5; 5 và 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Như được trình bày trong Hình 3.20A, β -sitosterol rõ ràng đã làm tăng sự biểu hiện của các dạng protein được phosphoryl hóa là p-ERK và p-p38 so với đối chứng. Kết quả định lượng dựa trên hình ảnh Western blot bằng phần mềm Image-J (Hình 3.20B và Hình 3.20C) đã cho thấy có sự tăng cường biểu hiện của các protein kinase này lên khoảng 1,5 lần ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ so với đối chứng.

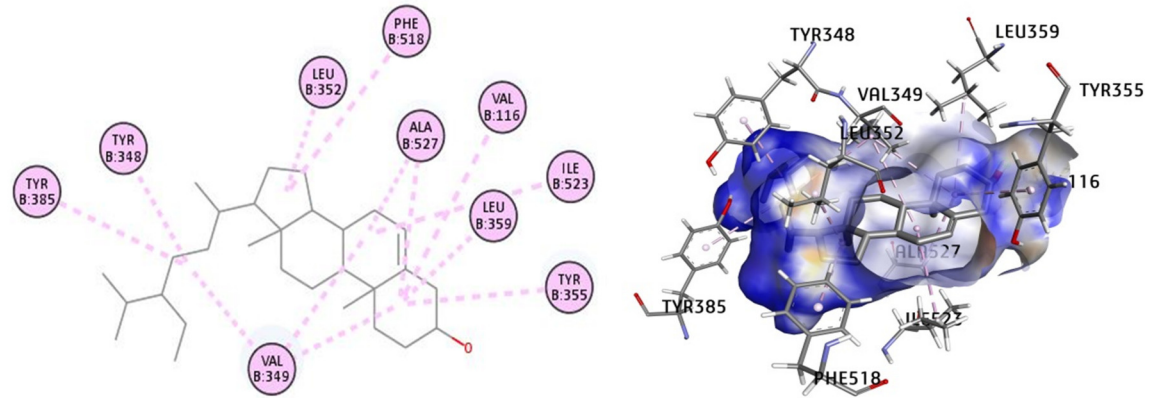


Hình 3.20. β -sitosterol tăng cường biểu hiện của các dấu hiệu protein trên con đường MAPK trong MC3T3-E1. (A). Số liệu đã được chuẩn hóa với nội chuẩn β -tubulin và được trình bày theo tỷ lệ mật độ diện tích của p-ERK/ERK (B) và p-p38/p38 (C) sử dụng phần mềm Image-J.

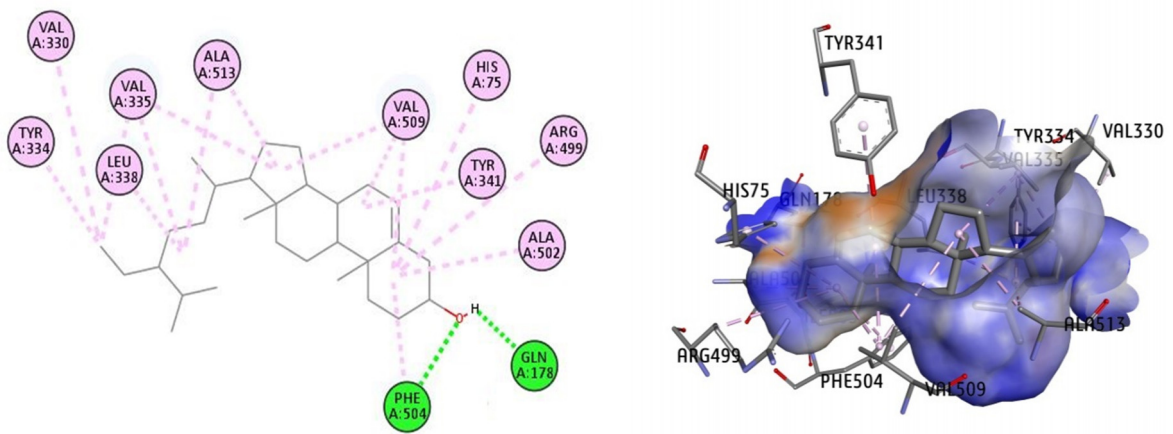
3.2.5. Tương tác nội phân tử của β -sitosterol và enzyme COX-2

Autodock4 là một gói mã nguồn mở có thể dự đoán nhanh chóng ái lực liên kết của các phối tử đối với một mục tiêu protein/enzym cụ thể. Trong tính toán này, năng lượng tự do liên kết (ΔG) được tính toán để ước tính ái lực liên kết của phức hợp đích với phối tử. Theo tiêu chí của AutoDock4, các giá trị

năng lượng tự do liên kết thấp hơn sẽ cho độ ổn định cao hơn đối với tương tác này [33],[34].



COX-1



COX-2

Interactions

- van der Waals
- Unfavorable Bump
- Salt Bridge
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Pi-Sulfur

- Pi-Sigma
- Pi-Pi T-shaped
- Alkyl
- Pi-Alkyl
- Conventional Hydrogen Bond

Hình 3.21. Vị trí tương tác của β -sistosterol với trung tâm hoạt động của COX-1 và COX-2 protein được xác định thông qua phân tích tương tác nội phân tử.

Bảng 3.3 chỉ ra rằng β -sitosterol ưu tiên liên kết với COX-1 với ái lực cao hơn so với COX-2. Chi tiết các vị trí liên kết của β -sitosterol với protein mục

tiêu được trình bày trong Hình 3.21. Phân tích định hướng liên kết của phối tử được thực hiện với COX-1 cho thấy Val116, Tyr348, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Tyr385, Phe518, Ile523, Ala527 là những axit amin chính tham gia vào tương tác kỵ nước và không có liên kết H nào được hình thành. Trong trường hợp COX-2, các túi kỵ nước được hình thành với β -sitosterol liên quan đến các gốc axit amin His75, Val330, Tyr334, Val335, Leu338, Tyr341, Arg499, Ala502, Val509 và Ala513, trong đó Gln178 và Phe504 là hai gốc thiết yếu tạo liên kết hydro với phối tử.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích tương tác của β -sitosterol với COX-1 và COX-2

Protein đích	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Các gốc tương tác
COX-1	-11.56	Val116, Tyr348, Val349, Leu352, Tyr355, Leu359, Tyr385, Phe518, Ile523, Ala527
COX-2	-12.80	His75, Gln178, Val330, Tyr334, Val335, Leu338, Tyr341, Arg499, Ala502, Phe504, Val509, Ala513

Như vậy, phân tích *In silico* gợi ý rằng β -sitosterol có thể liên kết với một số axit amin trong trung tâm hoạt động của các enzyme COX-1 và COX-2 và qua đó ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme này. Việc ức chế các enzyme COX này ở tế bào hủy xương sẽ ức chế hoạt động của tế bào hủy xương thông qua việc làm giảm quá trình tổng postaglandin, từ đó giảm tổng hợp RANKL, yếu tố chìa khóa quyết định quá trình hoạt hóa tế bào hủy xương. Ngược lại, việc hoạt hóa COX ở tế bào tạo xương lại có vai trò thúc đẩy quá trình biệt hóa các tế bào này, dẫn đến làm tăng sự hình thành xương như trong trường hợp của COX2 với berberin. Các kết quả phân tích cũng gợi ý rằng β -sitosterol cũng có thể có tác dụng kép (dual action) như tác dụng của berberin. Để khẳng định các giả thiết này thì các thực nghiệm chứng minh sự

ảnh hưởng của β -sistoserol lên hoạt tính các enzyme COX phải được tiếp tục thực hiện.

Việc tìm kiếm các chất tự nhiên mới có tác dụng gia tăng biệt hóa nguyên bào xương là một trong những hướng nghiên cứu quan trọng để phòng và điều trị các bệnh về xương. Biện pháp điều trị bằng thảo dược, đặc biệt là những thảo dược đã được sử dụng truyền thống để điều trị loãng xương và viêm xương khớp rất được quan tâm vì tính an toàn và khắc phục được những tác dụng phụ không mong muốn của các loại thuốc tổng hợp hiện nay. Trong nghiên cứu này, hoạt tính TTX của chất β -sitosterol, một chất chính được phân lập từ cây Bìm Bịp trồng ở Việt Nam đã được đánh giá trên tế bào tiền tạo xương MC3T3-E1. β -sitosterol là một phytosterol phổ biến trong thực vật và có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau. Các nghiên cứu trước đây trên các mô hình *in vitro* và *in vivo* đã chứng minh β -sitosterol có khả năng chống viêm, tạo mạch mới và có tác dụng hạ đường huyết [35],[36],[37],[38]. Tuy nhiên, hoạt tính tái tạo xương của nó vẫn chưa được xác định. Chauhan et al. [39] đã báo cáo rằng chiết xuất vỏ thân của *Bombax ceib* có tác dụng chống loãng xương trên chuột. Các tác giả cho rằng hoạt tính này là do tác dụng hiệp đồng của ba hợp chất chính có trong vỏ cây là lupeol, axit galic và các thành phần β sitosterol. Tuy nhiên, hoạt tính TTX của từng chất riêng lẻ trong chiết xuất thực vật này vẫn chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã công bố về hoạt tính TTX của lupeol phân lập từ cây Bìm Bịp trên dòng tế bào tạo xương MC3T3-E1 [13] Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục sử dụng mô hình *in vitro* này để đánh giá tác dụng TTX của một chất chính khác từ thực vật này là β -sitosterol. Để đạt được mục tiêu nghiên cứu, ảnh hưởng của β -sitosterol lên hai chỉ thị quan trọng cho quá trình biệt hóa tế bào tạo xương là hoạt tính của enzyme ALP và hàm lượng chất khoáng canxi đã được đánh giá. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của các protein trong con đường tín hiệu quan trọng liên quan đến quá trình biệt hóa tế bào xương cũng được kiểm tra. Enzyme ALP là một chỉ thị sớm và là một chỉ thị được sử

dụng thường xuyên nhất để chứng minh có sự biệt hóa của nguyên bào xương [40]. Đã có các bằng chứng gợi ý về tác dụng thủy phân cơ chất phát, giải phóng Pi và liên quan đến sự khởi đầu của khoáng hóa của ALP [41]. Kết quả thu được của chúng tôi đã cho thấy có sự gia tăng đáng kể về hoạt tính ALP của tế bào khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung β -sitosterol, ở nồng độ 5 và 10 $\mu\text{g/mL}$. Giai đoạn muộn của quá trình biệt hóa nguyên bào xương là quá trình khoáng hóa, trong đó chất nền khoáng chứa chủ yếu canxi photphat ở dạng hydroxyapatite, được các nguyên bào xương trưởng thành tiết ra và lắng đọng lại [42]. Các số liệu thực nghiệm của chúng tôi cho thấy sự lắng đọng của canxi trong chất nền khoáng là cao hơn so với đối chứng. Điều này rất cần thiết cho việc quá trình TTX, sửa chữa cấu trúc xương.

Nghiên cứu trước đây của Rodríguez-Carballo và cs [43] đã chỉ ra rằng con đường tín hiệu MAPK liên quan đặc biệt đến sự biệt hóa của các nguyên bào xương. Ảnh hưởng của β -sitosterol lên MAPK cũng đã được Sharmila và cs [44] công bố trước đây. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chất này đã tăng cường rõ rệt biểu hiện của hai protein chìa khóa trong con đường tín hiệu MAPK là p38 và ERK. Đây là bằng chứng ban đầu cho thấy chất này đã kích hoạt tín hiệu MAPK dẫn đến gia tăng sự biệt hóa của tế bào. Trên thực tế còn có các con đường tín hiệu khác liên quan đến sự biệt hóa tế bào. Do đó, việc đánh giá ảnh hưởng của β -sitosterol lên các con đường tín hiệu khác cũng như việc sử dụng thêm các chất ức chế các con đường tín hiệu này để khẳng định hoạt tính kích hoạt các con đường tín hiệu cần phải được thực hiện.

Trong số các chất tự nhiên đã nghiên cứu theo hướng này, berberine, một alkaloid tự nhiên đã được nghiên cứu khá chi tiết về cơ chế tác dụng ở mức phân tử. Lee và cs [9] đã chứng minh berberine làm gia tăng biểu hiện một số gene chỉ thị (marker genes) trong quá trình biệt hóa tế bào tạo xương, bao gồm osteoponin và osteocalcin. Chất này cũng làm gia tăng hoạt tính phiên mã của nhân tố phiên mã (transcription factor) chính trong quá trình tạo xương là Runx2. Tai và cộng sự [45] đã phân lập được chất chrysoeriol từ lá

cây Linh Lăng (*Eurya ciliata* Merr) của Việt Nam và phát hiện có tác dụng kích thích sự nhân lên của tế bào MC3T3-E1 ở nồng độ 0,2-5,0 $\mu\text{g/mL}$. Sự biệt hóa của tế bào này cũng được tăng cường thông qua việc làm tăng hoạt tính enzyme ALP tới 122% cũng như quá trình khoáng hóa ở nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$. Sáu hợp chất được phân lập từ *Prunus mume* làm gia tăng đáng kể tổng hợp collagen hoặc khoáng hóa của các nguyên bào xương, gợi ý chúng thúc đẩy quá trình biệt hóa của các tế bào tiền tạo xương MC3T3-E1. Tuy nhiên cơ chế tác dụng của chúng chưa được nghiên cứu đầy đủ [46]. Loài *Uraria crinita* cũng chứa bốn hợp chất có hoạt tính tăng cường sự hình thành xương thông qua kích hoạt BMP-2 và con đường tín hiệu Runx2 [47]. Siddiqui và cs [48] cũng chỉ ra rằng chiết xuất của *Punica granatum* đã thúc đẩy sự tăng sinh và biệt hóa của nguyên bào xương chuột thông qua sự gia tăng biểu hiện gene Runx 2. Các hợp chất tự nhiên TPF và TPE được phân lập từ *Tridax procumbens* cũng có cơ chế ảnh hưởng tương tự [49],[50]. Nghiên cứu của Yang và cs [51] về chất ligustilide, một hoạt chất sinh học chính của *Angelica sinensis* cũng cho thấy chất này thúc đẩy quá trình hình thành xương trong tế bào tạo xương và trên mô hình cá ngựa vằn thông qua con đường tín hiệu GPR30/EGFR.

Một phát hiện thú vị trong nghiên cứu này là β -sitosterol hoạt động tốt trong giai đoạn biểu hiện ALP (giai đoạn đầu của quá trình biệt hóa) còn luperol dường như hoạt động tốt trong giai đoạn lắng đọng khoáng hóa (giai đoạn muộn của quá trình biệt hóa) [13]. Đây là hai chất tự nhiên chính trong cây Bìm Bịp. Do đó, hai hợp chất chính này có thể đã đóng một vai trò quan trọng trong tác dụng làm liền xương của cây Bìm Bịp. Câu hỏi về tác dụng hiệp đồng hai chất β -sitosterol và luperol đối với quá trình biệt hóa xương và tái tạo xương cũng cần được làm sáng tỏ. Bên cạnh đó, sự kết hợp của các chất này với thuốc điều trị thương mại để nâng cao hiệu quả điều trị cũng cần được tiến hành, làm cơ sở cho ứng dụng điều trị.

Nhìn chung, có thể thấy rằng các nghiên cứu theo hướng phát triển các chất cảm ứng TTX cho mục đích ứng dụng còn hạn chế. Các nghiên cứu sâu về cơ chế tác dụng ở mức phân tử cũng như những đánh giá đầy đủ trên mô hình *in vivo* nhằm mục đích ứng dụng là vấn đề cần được thực hiện. Đối với β -sitosterol, việc đánh giá đầy đủ về cơ chế tác dụng cũng như trên mô hình *in vivo* là cần thiết để làm sáng tỏ khả năng ứng dụng của chất này cũng như của cây Bìm Bịp trên thực tế.

CHƯƠNG IV - KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Đã phân lập được chất β -sitosterol có công thức hóa học là $C_{29}H_{50}O$ và khối lượng phân tử là 414,7 g/mol từ phân đoạn chiết ethyl acetate của cây Bìm Bịp và khẳng định cấu trúc hóa học bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối kết hợp với so sánh với tài liệu tham khảo.

- Đã đánh giá được hoạt tính cảm ứng tái tạo xương của β -sitosterol trên mô hình tế bào tiền tạo xương osteoblast MC3T3-E1 với các kết quả cụ thể là: **i)** β -sitosterol làm tăng hoạt tính enzyme phosphatase kiềm (ALP) cả tế bào osteoblast lên khoảng 210% và 206,6% lần lượt ở các nồng độ 5 và 10 $\mu\text{g/mL}$ sau 3 ngày xử lý; **ii)** β -sitosterol ở các nồng độ 2,5, 5,0 và 10 $\mu\text{g/mL}$ đã làm tăng hoạt tính khoáng hóa của tế bào osteoblast lên lần lượt là 134%, 168% và 118% sau 4 tuần xử lý.

- β -sitosterol làm tăng biểu hiện của các protein tham gia con đường MAPK liên quan đến quá trình biệt hóa và khoáng hóa của tế bào tạo xương lên khoảng 1,5 lần ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ so với đối chứng.

- Phân tích *In silico* cho thấy β -sitosterol có khả năng liên kết với một số axit amin trong trung tâm hoạt động của COX-1 và COX-2, qua đó có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzyme này.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục đánh giá đầy đủ cơ chế cảm ứng tái tạo xương của các TSPS và đánh giá tác dụng trên mô hình *in vivo*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Braz J Rheum.* 2011; 51: 372–82.
2. Sözen T, Dızışik L, Çalık Başaran N (2017). An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*, 4(1), 46-56
3. Tümay Sözen, Lale Özışık, and Nursel Çalık Başaran An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017; 4(1): 46–56.
4. An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L, Chen B. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sci.* 2016; 147:46–58.
5. Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(3): 220.
6. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W. 2013. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Biomed Sci Eng* 6(8A): 32.
7. Ozra TM, Pooneh S, Patricia K, Bagher L. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru* 2017; 25: 2.
8. Reginster JY, Burlet N (2006). Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone*, 38 (2 Suppl 1), 4-9.
9. Lee HW, Suh JH, Kim HN, Kim AY, Park SY, Shin CS, Choi JY, Kim JB. Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(8):1227-37.
10. Han Y, Jin Y, Lee SH, Khadka DB, Cho WJ, Lee KY. Berberine bioisostere Q8 compound stimulates osteoblast differentiation and function *in vitro*. *Pharmacol Res.* 2017;119:463-475
11. Xu D, Yang W, Zhou C, Liu Y, Xu B. Preventive effects of berberine on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *Planta Med.* 2010;76(16):1809-13.

12. Sanyasi S, Kumar A, Goswami C, Bandyopadhyay A, Goswami L. A carboxy methyl tamarind polysaccharide matrix for adhesion and growth of osteoclast-precursor cells. *Carbohydr Polym.* 2014; 101: 1033-42.
13. Minh TH Nguyen, Quang V Ngo, Huyen TT Nguyen, Quan M Pham, Trang H Dinh, Huong TT Nguyen, Nguyen V Tinh, and Phuong T M Nguyen. Osteogenic activity of lupeol isolated from *Clinacanthus nutans* Lindau: activity and mode of action. *J Chem.* 2021; 2021.
14. Lê Văn Cường. Nghiên cứu phân lập hợp chất hóa học từ phân đoạn A của cao dịch loromethane của dược liệu Bim Bip (*Clinacanthus nutans* Acanthaceae). *Khóa luận tốt nghiệp.* 2017.Đại học Y Dược Cần Thơ.
15. Li H, Miyahara T, Tezuka Y, Namba T, Suzuki T, Dowaki R, Watanabe M, Nemoto N, Tonami S, Seto H, Kadota S. The effect of kampo formulae on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. II. Detailed study of berberine. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22(4):391-6.
16. Đỗ Tất Lợi (2010) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học
17. Trần Minh Thông, Nguyễn Thị Thu Hương, Hà Quang Thân, Nguyễn Minh Đức (2015) Khảo sát mô học tacs dụng của cao xương cá sấu hoa cà trên chuột nhắt trắng bị gây loãng xương bằng corticoid. *Tạp chí dược liệu.* 2015.; 45: 22-29.
18. To TT., PE Witten PE., Huysseune A., Winkler C., 2015, An adult osteopetrosis model in medaka reveals the importance of osteoclast function for bone remodeling in teleost fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 187: 68-75.
19. Greenblatt MB, Shim JH, and Glimcher LH. 2013. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **29**: 2.1–2.17
20. Nguyen MTH, Qian ZJ, Nguyen VT, Choi IW, Heo SJ, Oh CH, Kang DH, Kime GH, Jung WK, 2013, Tetrameric peptide purified from hydrolysates of biodiesel byproducts of *Nannochloropsis oculata* induces

osteoblastic differentiation through MAPK and Smad pathway on MG-63 and D1 cells, *Process Biochem*, 48(9): 1387-1394. **3**

21. Powles TJ, Clark SA, Easty DM, Easty GC, Neville AM: The inhibition by aspirin and indomethacin of osteolytic tumor deposits and hypercalcaemia in rats with Walker tumour, and its possible application to human breast cancer. *Br J Cancer* 1973, 28:316-321.

22. Klein DC, Raisz LG: Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970, 86:1436-1440.

23. Ohshiba T, Miyaura C, Ito A: Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 300:957-964.

24. Takahashi T, Uehara H, Bando Y, Izumi K: Soluble EP2 neutralizes prostaglandin E2-induced cell signaling and inhibits osteolytic tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2008, 7:2807-2816.

25. Tu SF, Liu RH, Cheng YB, Hsu YM, Du YC, El-Shazly M, Wu YC, Chang FR. Chemical constituents and bioactivities of *Clinacanthus nutans* aerial parts. *Molecules*. 2014. 19(12):20382-90.

26. Mai CW, Yap KS, Kho MT, Ismail NH, Yusoff K, Shaari K, Chin SY, Lim ES. Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts: inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation. *Front Pharmacol.* 2016;7:7

27. Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.

28. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B. et al. *Gaussian 09 Rev. d.01*, Wallingford, CT, 2009.

29. Wang J. L., Limburg D., Graneto M. J., Springer J., Hamper J. R. B., Liao S., Pawlitz J. L., Kurumbail R. G., Maziasz T., Talley J. J., Kiefer J. R. and Carter J. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2

inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (23) (2010) 7159-7163.

30. Rimon G., Sidhu R. S., Lauver D. A., Lee J. Y., Sharma N. P., Yuan C., Frieler R. A., Trievel R. C., Lucchesi B. R. and Smith W. L. - Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1, *Proc Nat Acad Sci.* **107** (1) (2009) 28-33.

31. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v20.1.0.19295, San Diego: Dassault Systèmes, (2020).

32. Laskowski R. A. and Swindells M. B. - LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, *J Chem Inf Model.* **51** (10) (2011) 2778-2786.

33. Le T.T.H., Tran L. H., Nguyen M. T., Pham M. Q. and Phung H. T. T. - Calculation of binding affinity of JAK1 inhibitors via accurately computational estimation. *J Biomol.Struct Dyn* (2022) 1-11.

34. Nguyen N. T., Nguyen T. H., Pham T. N. H., Huy N. T., Bay M. V., Pham M. Q., Nam P. C., Vu V. V. and Ngo S. T. - Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity. *J Chem Inf Model.* **60** (1) (2019) 204-211.

35. Mai CW, Yap KSI, Kho MT, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts: Inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation. *Front Pharmacol.* 2016; 7(7):1-11.

36. Sookmai W, Ekalaksananan T, Pientong C, et al. The anti-Papilloma virus infectivity of *Clinacanthus nutans* compounds. *Srinagarind Med J.* 2011; 26 (Suppl):240-243.

37. Yong YK, Tan JJ, Teh SS, et al. *Clinacanthus nutans* extracts are antioxidant with antiproliferative effect on cultured human cancer cell lines. *Evid-based Compl Alt Med.* 2013; 2013:1-9.

38. Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, et al. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *J Ethnopharmacol*. 2008; 116(2):234-44.
39. Chauhan S, Sharma A, Upadhyay NK, et al. *In-vitro* osteoblast proliferation and *in-vivo* antiosteoporotic activity of *Bombax ceiba* with quantification of Lupeol, gallic acid and β -sitosterol by HPTLC and HPLC. *BMC Compl Alt Med*. 2018; 18:233.
40. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica chimica acta*. 2001; 313(1-2):95-105.
41. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med*. 1951; 93:415–426.
42. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010; 339(1):189-95.
43. Rodríguez-Carballo E, Beatriz GB, Ventura F. p38 MAPK signaling in osteoblast differentiation. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4:40.
44. Sharmila R, Sindhu G. Evaluate the antigenotoxicity and anticancer role of β -sitosterol by determining oxidative DNA damage and the expression of phosphorylated mitogen-activated protein kinases', c-fos, c-jun, and endothelial growth factor receptor. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(49):95-101.
45. Tai BH, Cuong NM, Huong TT, Choi EM, Kim JA, Kim YH. Chrysoeriol isolated from the leaves of *Eurya ciliata* stimulates proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Asian Nat Prod Res*. 2009. 11(9): 817-823.
46. Kono R, Okuno Y, Inada K, et al. *Prunus mume* extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011; 75(10):1907-1911.
47. Mao YW, Lin RD, Hung HC. Stimulation of osteogenic activity in human osteoblast cells by edible *Uraria crinita*. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(24):5581-5588.

48. Siddiqui S and M Arshad. Osteogenic potential of *Punica granatum* through matrix mineralization, cell cycle progression and runx2 gene expression in primary rat osteoblasts. *DARU J Pharm Sci.* 2014; 22(1):1-8.
49. Al Mamun MA, Hosen MJ, Islam K, et al. *Tridax procumbens* flavonoids promote osteoblast differentiation and bone formation. *Biol Res.* 2015; 48(1):1-8.
50. Al Mamun MA, Hosen MJ, Khatun A, et al. *Tridax procumbens* flavonoids: a prospective bioactive compound increased osteoblast differentiation and trabecular bone formation. *Biol Res.* 2017; 50(1):1-10.
51. Yang F, Lin ZW, Huang TY, et al. Ligustilide, a major bioactive component of *Angelica sinensis*, promotes bone formation via the GPR30/EGFR pathway. *Sci Rep.* 2019; 9(1):1-10.

Tài liệu URL

<http://vovworld.vn/vi-VN/tieu-diem/viet-nam-da-dat-toi-diem-ngoat-trong-quy-mo-dan-so-gia-vao-nam-2015-422853.vov>

<https://sciencebeta.com/history-osteoporosis/>, June 11, 2007

<https://www.pinterest.com/pin/546694842256636552/>