

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN HOÀNG ANH

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG ỨC
CHẾ SỰ PHÁT TRIỂN TẾ BÀO UNG THƯ CỦA LOÀI BÙM
BỤP *Mallotus apelta* (LOUR.) MÜLL. –ARG., HỌ THẦU DẦU
– EUPHORBIACEAE)**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỮU CƠ

Mã số: 9.44.01.14

Hà Nội – 2024

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

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn.....: **PGS. TS Nguyễn Xuân Nhiệm**, *Viện hoá sinh biển- Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam*
2. Người hướng dẫn.....: **PGS. TS Phạm Thế Chính**, Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên

Phản biện 1:.....

Phản biện 2:.....

Phản biện 3:.....

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

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Điều kiện tự nhiên và khí hậu đặc trưng và đa dạng giữa vùng miền, đã đem lại cho đất nước Việt Nam một hệ sinh thái thực vật phong phú. Bên cạnh đó, Việt Nam cũng là một trong những quốc gia có nền y học cổ truyền lâu đời sử dụng nhiều loại thảo dược trong điều trị bệnh và tăng cường sức khỏe. Trong vài thập kỷ trở lại đây, xu hướng đi sâu nghiên cứu các cây thuốc và động vật làm thuốc để tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao nhằm ứng dụng vào sản xuất các loại thuốc, hoặc thực phẩm chức năng phục vụ cuộc sống ngày càng được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm.

Loài bùm bụp *M. apelta* từ lâu cũng đã được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa trị nhiều loại bệnh khác nhau. Các nghiên cứu gần đây cho thấy một số hợp chất trong *M. apelta* có hoạt tính sinh học đặc biệt lý thú. Có thể kể đến malloapelta B đã được các nhà khoa học Việt Nam phân lập từ lá, cho thấy khả năng kháng ung thư thông qua việc ức chế mạnh sự hoạt hoá của yếu tố NF-kB. Một hợp chất khác, malloapeltic acid được phân lập từ rễ có tính kháng HIV. Điều này gợi ý đến tiềm năng to lớn của các hợp chất chưa biết trong *M. apelta* với việc hỗ trợ và điều trị những căn bệnh nan y. Thực tiễn cho thấy cần có các nghiên cứu nhằm phân lập đầy đủ những hợp chất của loài này, đồng thời thử nghiệm kỹ lưỡng hoạt tính sinh học của chúng. Chính vì vậy, tôi lựa chọn đề tài: “**Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư của loài Bùm bụp *Mallotus apelta* (Lour.) Müll. –Arg., Họ Thầu dầu – *Euphorbiaceae*”.**

Mục tiêu của luận án:

- Nghiên cứu sâu thành phần hóa học của loài *Mallotus apelta* ở Việt Nam.
- Nghiên cứu về tác dụng gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được.

Nội dung luận án bao gồm:

1. Phân lập 21 hợp chất từ lá loài *Mallotus apelta* ở Việt Nam bằng phương pháp sắc ký.
2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được, dựa trên các phương pháp phổ hiện đại.
3. Đánh giá hoạt tính kháng ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú và ung thư đại trực tràng của các hợp chất phân lập được. Nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư vú và tuyến tiền liệt

Những đóng góp mới của luận án:

1. Đã tiến hành phân lập và xác định cấu trúc của 14 hợp chất mới: malloapelta C và D (**MA1a**, **MA1b**, **MA2a**, **MA2b** - 2 cặp đối quang), malloapelta E - H (**MA3-MA6**), malloapelta I và II (**MA7** và **MA8**), malloapelta J-L (**MA9-MA11**) và malloflavoside (**MA12**).
2. Các hợp chất phân lập **MA1-MA8** và malloapelta B được phát hiện có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển tế bào ung thư. Hợp chất **MA2**, **MA3** và malloapelta B được phát hiện ức chế sự phát triển dòng tế bào ung thư buồng trứng TOV-21G thông qua yếu tố apoptosis và bất hoạt yếu tố nhân NF- κ B. Hợp chất **MA8** được phát hiện gây độc các dòng tế bào ung thư vú và tuyến tiền liệt, MCF-7 và PC-3, thông qua con đường ức chế ANO1.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu về chi *Mallotus*

Chi *Mallotus* (Ba bét) là chi tương đối lớn trong họ Euphorbiaceae, gồm khoảng 150 loài, phân bố rải rác ở vùng nhiệt đới Nam Á và Đông Nam Á. Các loài thuộc chi *Mallotus* thường là cây bụi hoặc cây gỗ nhỏ. Chúng mọc ở những khu rừng nguyên sinh dưới 1000 m so với mực nước biển. Ở Việt Nam, thống kê cho thấy có khoảng 40 loài thuộc chi *Mallotus* trong đó có 7 loài đặc hữu

1.1.1. Đặc điểm thực vật của chi *Mallotus*

Chi *Mallotus* (Ba bét) thuộc bộ Malpighiales (Sơ ri), họ Euphorbiaceae (Thầu dầu), phân họ Acalyphoideae (Tai tượng). Đây là chi tương đối lớn trong họ Euphorbiaceae, gồm khoảng 150 loài, phân bố rải rác ở vùng nhiệt đới Nam Á và Đông Nam Á như ở Malaysia có 75 loài, Trung Quốc có 40 loài,....

Các loài thuộc chi *Mallotus* thường là cây bụi hoặc cây gỗ nhỏ. Lá xếp xoắn ốc hoặc mọc đối. Cụm hoa đơn tính, mọc ở đầu cành hay nách lá; thường là chùm hoặc bông, ít khi là chùy. Quả nang nhẵn hoặc có lông hình sao, khi khô nứt làm 3 mảnh. Hạt gần hình cầu hay hình trứng, vỏ nhẵn, bóng màu đen. Chúng mọc ở những khu rừng nguyên sinh hoặc thứ sinh có nhiều mưa, luôn xanh tốt, độ cao dưới 1000 m so với mực nước biển. Ở Việt Nam, thống kê cho thấy có khoảng 40 loài thuộc chi *Mallotus* trong đó có 6 loài đặc hữu.

Tổng quan cho thấy có 315 chất được phân lập và xác định cấu trúc trong đó nhiều nhất là các hợp chất phenolic và terpenoid (đều 79 hợp chất), tiếp đó là flavonoid (53 hợp chất), benzopyran và coumarin (51 hợp chất), phloroglucinol (36 hợp chất), còn lại là steroid và hợp chất khác (28 hợp chất). Các loài thuộc chi *Mallotus* đã và đang sở hữu nhiều tác dụng sinh học như kháng ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, điều hòa miễn dịch và kháng vi rút.

1.2. Giới thiệu về loài *Mallotus apelta*

Loài *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.-Arg có tên thường gọi là bùm bụp, bông bét...thuộc loại cây bụi hoặc cây gỗ nhỏ cao 1 – 6 m, thường mọc hoang ở 700 m so với mực nước biển. Cây phân bố rộng rãi ở miền Nam Trung Quốc và ở các nước Đông Nam Á trong đó có Việt Nam. Tổng quan cho thấy trên thế giới đã có 51 chất được phân lập từ loài *M. apelta*, trong đó có 29 chất benzopyran và coumarin, 3 flavonoid, 5 hợp chất phenolic, 7 triterpenoid, 6 diterpenoid và 1 hợp chất khác.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá loài *Mallotus apelta* (Lour.) Mull.Arg. được thu thập tại Ngọc Thanh, Phúc Yên, Vĩnh Phúc, Việt Nam (21°22'035.4" N + 105°43'023.9" E) vào tháng 8 năm 2018 và được xác định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản (MA1808) được lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

Các phương pháp được sử dụng bao gồm sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc

Các phương pháp được sử dụng bao gồm phổ khối lượng phân giải cao, phổ cộng hưởng từ nhân (NMR), phổ lưỡng sắc tròn điện tử, phương pháp tính toán phổ CD lý thuyết và đo độ quay cực ($[\alpha]_D$)

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Các phương pháp được sử dụng bao gồm phương pháp MTT, MTS và CCK-8, phân tích tín hiệu huỳnh quang YFP, đo dòng điện ngắn mạch, đo nồng độ calcium nội bào, đánh giá hàm lượng protein, Western blot, thử nghiệm di chuyển của tế bào, đánh giá hoạt tính caspase-3 và phương pháp phân tích thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

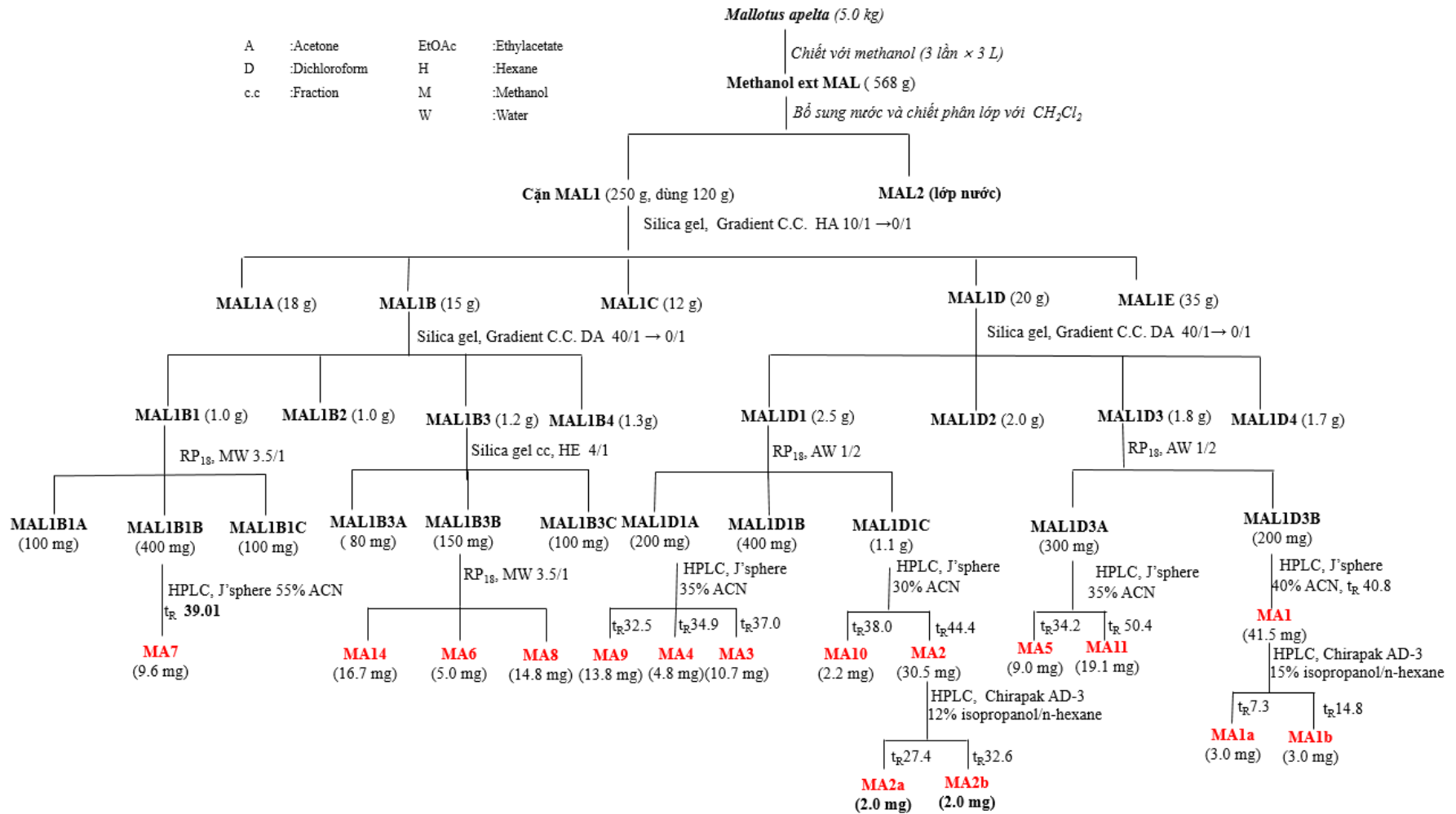
3.1. Phân lập các hợp chất

Quy trình phân lập các hợp chất từ loài bùm bụp *Mallotus apelta* được sử dụng các phương pháp sắc kí thể hiện như sau:

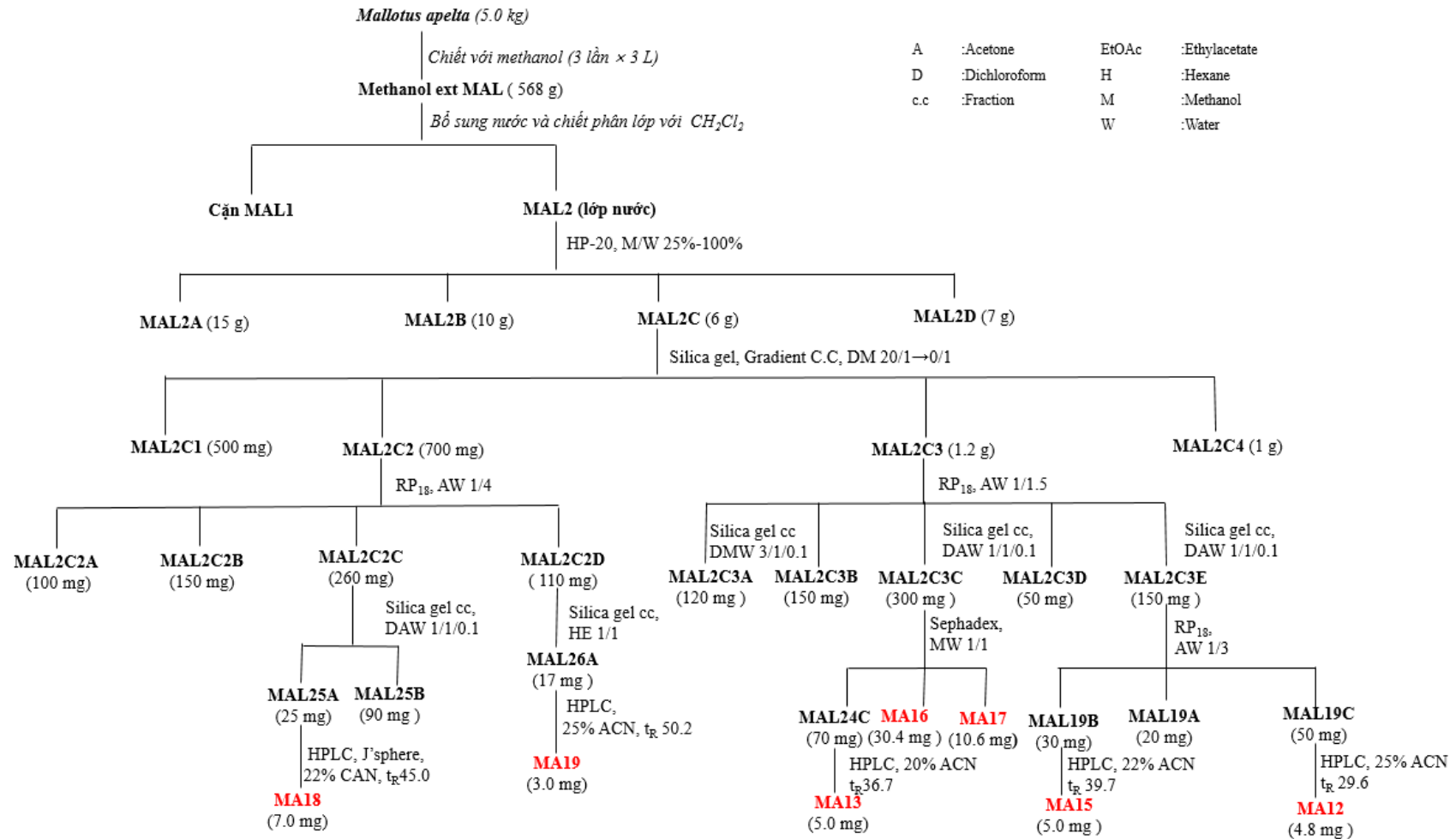
Lá của *M. apelta* sau khi phơi khô, nghiền thành bột mịn (5.0 kg) được chiết với methanol (3 lần x 8 lít) bằng thiết bị siêu âm (ở 50 °C, mỗi lần 4h). Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 568 g cặn chiết methanol. Cặn chiết này được hòa tan vào 4.0 lít nước cất, tiến hành chiết phân bố bằng dichloromethane để thu được cặn dichloromethane (MAL1, 250.0 g).

Phân đoạn MAL1 (120.0 g) được phân tách trên cột sắc kí silica gel và rửa giải gradien bằng hệ dung môi *n*-hexane - acetone (40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, v/v) thu được 5 phân đoạn MAL1A (15.0 g), MAL1B (23.0 g), MAL1C (15.0 g), MAL1D (25.0 g) và MAL1E (50.0 g).

Lớp nước (MAL2) được loại bỏ dung môi hữu cơ sau đó được phân tách trên cột Diaion HP-20 rửa giải bằng nước để loại bỏ các thành phần phân cực, sau đó tăng nồng độ methanol trong nước (25, 50, 75 và 100%, v/v) để thu được bốn phân đoạn lần lượt là MAL2A-MAL2D. MAL2C được phân tách trên silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane - methanol (20:1, 10:1.5:1, 1:1, v/v) thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn: MAL2C1 (500 mg), MAL2C2 (700 mg), MAL2C3 (1.2 g) và MAL2C4 (1.0 g).



Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài *M. apelta*, phân đoạn MAL1



Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài *M. apelta*, phân đoạn MAL2

3.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất

3.2.1. Hợp chất MA1: Malloapelta C (Hợp chất mới)

Chất bột vô định hình màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{18}H_{24}O_6$, $M = 336$.

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = 0,0$ (c 0,1 $CHCl_3$)

(**MA1a** $[\alpha]_D^{25} = +21,1$ (c 0,05 $CHCl_3$), **MA1b** $[\alpha]_D^{25} = -20,3$ (c 0,05 $CHCl_3$))

HR-ESI-MS tại m/z 337,1646 $[M+H]^+$. Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{18}H_{25}O_6]^+$, 337,1646.

1H -NMR ($CDCl_3$): 3,74 (dd, 3,0, 8,5, H-3), 4,25 (d, 3,0, H-4), 6,12 (s, H-6), 1,32 (s, H-11), 1,32 (s, H-12), 6,29 (dq, 2,0, 16,0, H-2'), 6,58 (dq, 7,0, 16,0, H-3'), 1,87 (dd, 2,0, 7,0, H-4'), 3,51 (s, H-4-OMe), 3,76 (s, H-5-OMe), 3,89 (s, H-7-OMe), 1,97 (d, 8,5, H-3-OH),

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): 77,6(C-2), 70,5(C-3), 74,6(C-4), 161,4(C-5), 88,5(C-6), 158,6(C-7), 111,0(C-8), 151,6(C-9), 102,2(C-10), 24,2(C-11), 23,3(C-12), 194,8(C-1'), 134,3(C-2'), 145,2(C-3'), 18,1(C-4'), 57,3(C-4-OMe), 55,9(C-5-OMe), 55,8(C-7-OMe),

3.2.2. Hợp chất MA14: Malloapelta B

Chất bột vô định hình màu trắng.

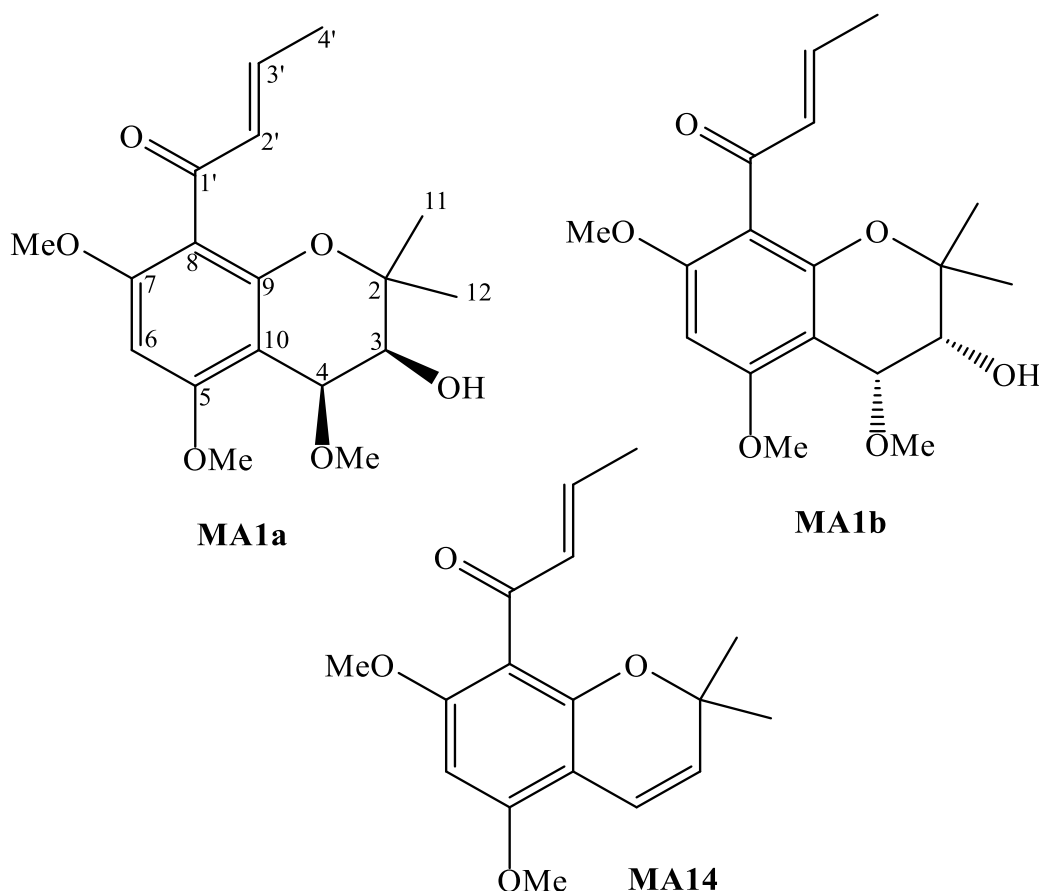
Công thức phân tử: $C_{17}H_{20}O_4$, $M = 288$.

1H -NMR ($CDCl_3$): 5,45 (d, 10,5, H-3), 6,58 (d, 10,5, H-4), 6,03 (s, H-6), 1,34 (s, H-11), 1,34 (s, H-12), 6,38 (d, 17,0, H-2'), 6,69 (dd, 17,0, 6,5, H-3'), 1,91 (d, 6,5, H-4'), 3,77 (s, H-5-OMe), 3,84 (s, H-7-OMe),

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): 76,5 (C-2), 127,1 (C-3), 116,7 (C-4), 156,5 (C-5), 88,0 (C-6), 158,1 (C-7), 111,7 (C-8), 151,9 (C-9), 104,2 (C-10), 27,7 (C-11), 27,5 (C-12), 194,2 (C-1'), 134,8 (C-2'), 144,8 (C-3'), 18,1 (C-4'), 55,9 (C-5-OMe), 55,6 (C-7-OMe),

3.3. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được

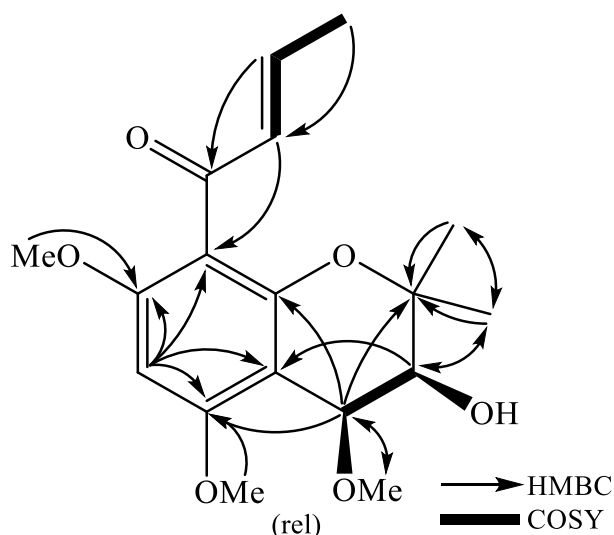
3.3.1. Hợp chất MA1: Malloapelta C (Hợp chất mới)



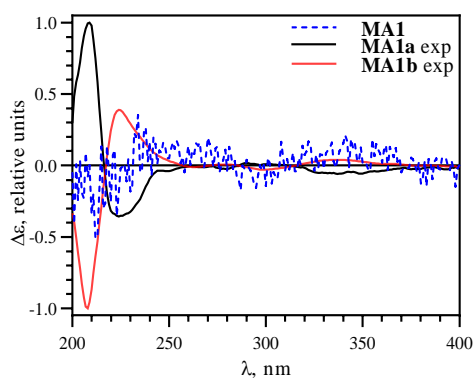
Hình.3.3. Cấu trúc hóa học của hai đối quang MA1a và MA1b và hợp chất tham khảo

Hợp chất **MA1** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng và công thức phân tử được xác định là $C_{18}H_{24}O_6$ dựa trên phổ HR-ESI-MS tại m/z 337,1646 $[M+H]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{18}H_{25}O_6]^+$, 337,1646). Phổ 1H -NMR của **MA1** (đo trong $CDCl_3$) cho thấy các tín hiệu của một proton thơm tại δ_H 6,12 (s), hai proton olefin tại δ_H 6,29 (1H, dq, $J = 2,0, 16,0$ Hz) và 6,58 (1H, dq, $J = 7,0, 16,0$ Hz), hai oxymethine tại δ_H 3,74 (1H, dd, $J = 3,0, 8,5$ Hz) và 4,25 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), ba nhóm methoxy tại δ_H 3,51, 3,76 và 3,89 (mỗi tín hiệu 3H, s), ba nhóm methyl tại δ_H 1,87 (3H, dd, $J = 2,0, 7,0$ Hz) và 1,32 (6H, s). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **MA1** xuất hiện các tín hiệu của 18 carbon, bao gồm một carbonyl tại δ_C 194,8, sáu carbon không liên kết trực tiếp với proton tại δ_C 77,6, 102,2, 111,0, 151,6, 158,6 và 161,4, năm methine tại δ_C 70,5, 74,6, 88,5, 134,3 và 145,2, sáu carbon methyl tại δ_C 18,1, 23,3, 24,2, 57,3, 55,8 và 55,9. Phân tích phổ 1H và ^{13}C -NMR cho thấy cấu trúc của **MA1** tương tự như **MA14** (malloapelta B), với sự thay thế liên kết đôi tại C-3/C-4 bởi các nhóm hydroxyl và methoxy. Điều này dựa trên các tương tác HMBC giữa H-

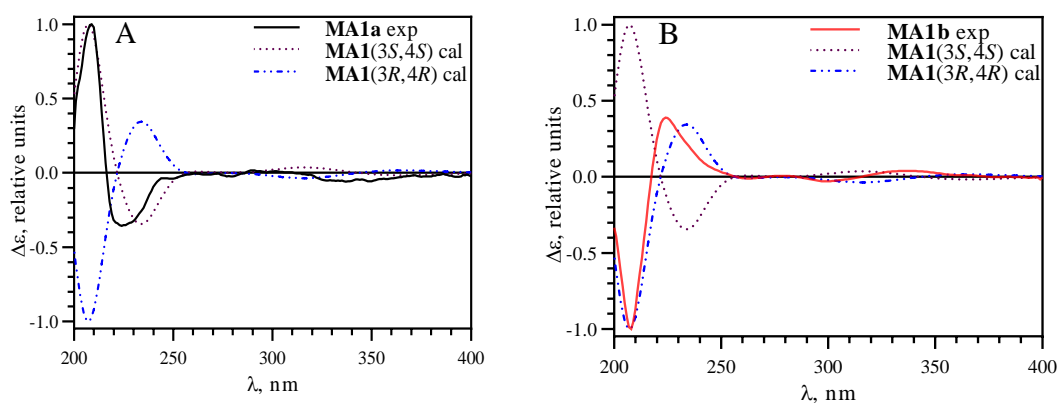
11/H-12 (δ_H 1,32) và C-2 (δ_C 77,6)/C-3 (δ_C 70,5), H-3 (δ_H 3,74) và C-2 (δ_C 77,6)/C-10 (δ_C 102,2)/C-11 (δ_C 24,2)/C-12 (δ_C 23,3), giữa H-4 (δ_H 4,25) và C-2 (δ_C 77,6)/C-5 (δ_C 161,4)/C-9 (δ_C 151,6)/C-10 (δ_C 102,2), giữa nhóm methoxy (δ_H 3,51) và C-4 (δ_C 74,6). Tương tác HMBC từ H-6 (δ_H 6,12) đến C-5 (δ_C 161,4)/C-7 (δ_C 158,6)/C-8 (δ_C 111,0)/C-10 (δ_C 102,2), từ nhóm methoxy (δ_H 3,76 và 3,89) đến C-5 (δ_C 161,4) và C-7 (δ_C 158,6) cho biết vị trí của hai nhóm methoxy tại C-5 và C-7. Hằng số ghép cặp lớn giữa H-2' và H-3' ($J = 16,0$ Hz) chứng tỏ cấu hình của liên kết đôi của nhóm 1-oxobut-2-enyl là *E*. Hơn nữa, vị trí của nhóm này tại C-8 xác định dựa trên tương tác HMBC từ H-2' (δ_H 6,29) và C-8 (δ_C 111,0). Hằng số ghép cặp nhỏ giữa H-3 và H-4 ($J = 3,0$ Hz) cho phép kết luận cấu hình *cis* của H-3 và H-4 của vòng pyran. Do đó, cấu trúc của **MA1** được xác định là (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-4,5,7-trimethoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol và được đặt tên là malloapelta C. Tuy nhiên, độ quay cực của **MA1** ($[\alpha]_D^{25} \sim 0$) và phổ CD của **MA1** không cho thấy hiệu ứng Cotton nào, gợi ý đây là một racemic. Tiếp đó, sử dụng HPLC (cột đối quang: Chirapak AD-3, ID 4,6 mm \times dài 250 mm) rửa giải bằng isopropanol/n-hexane 15% đã phân tách được hai chất đối quang [**MA1a**: $[\alpha]_D^{25} = +21,1$ (*c* 0,05, CHCl₃) và **MA1b**: ($[\alpha]_D^{25} = -20,3$ (*c* 0,05, CHCl₃)]. Phổ CD tính toán của **MA1**(3*S*,4*S*) có hiệu ứng cotton dương tại 200-220 nm, giống với phổ CD thực nghiệm của **MA1a**. Tương tự như vậy, phổ CD thực nghiệm của **MA1b** có hiệu ứng cotton âm tại 200-220 nm và trùng với phổ CD tính toán của **MA1**(3*R*,4*R*). Do đó, các cấu hình tuyệt đối của **MA1a** và **MA1b** lần lượt được xác định là (3*S*,4*S*)-malloapelta C và (3*R*,4*R*)-malloapelta C.



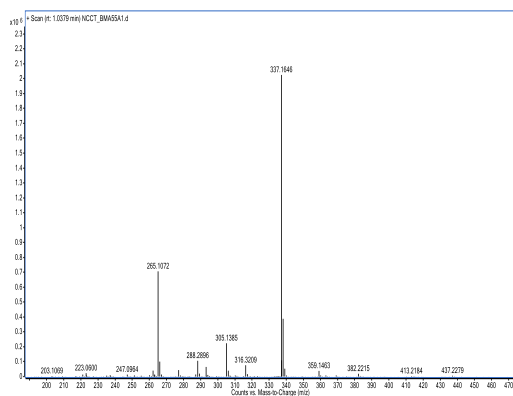
Hình 3.4. Các tương tác COSY và HMBC chính của **MA1**



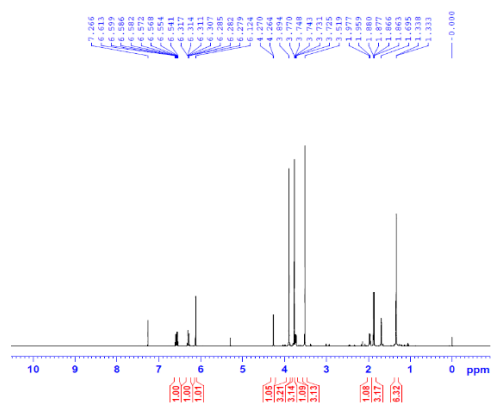
Hình 3.5. Phổ CD của MAI và các đối quang (MA1a và MA1b).



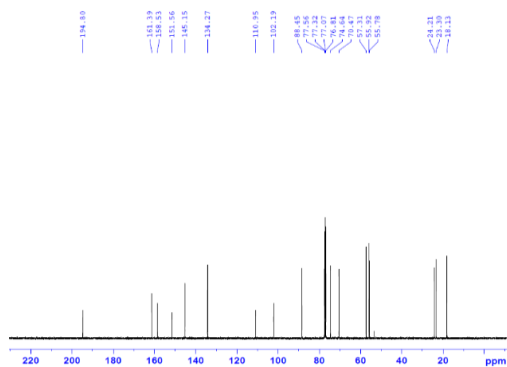
Hình 3.6. Phổ CD thực nghiệm MA1a (A), MA1b (B) và phổ CD tính toán của hợp chất MAI (3S,4S) và (3R,4R).



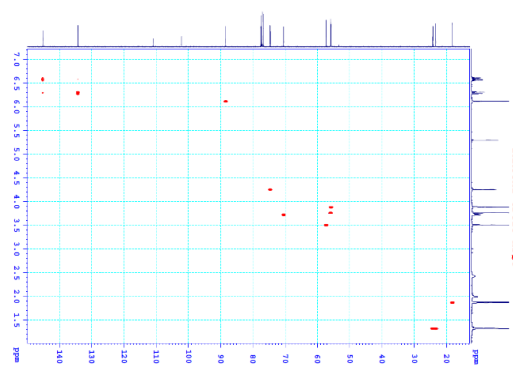
Hình 3.7. Phổ HR-ESI-MS của MAI



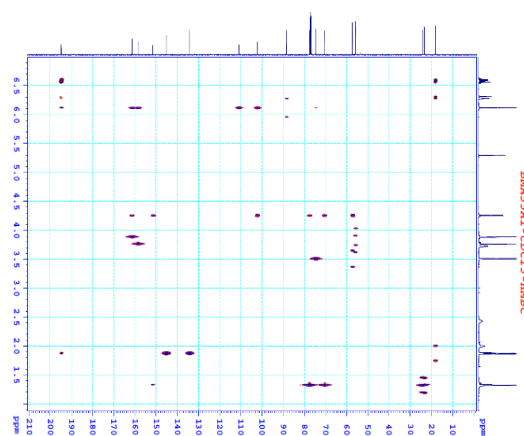
Hình 3.8. Phổ 1H-NMR của MAI



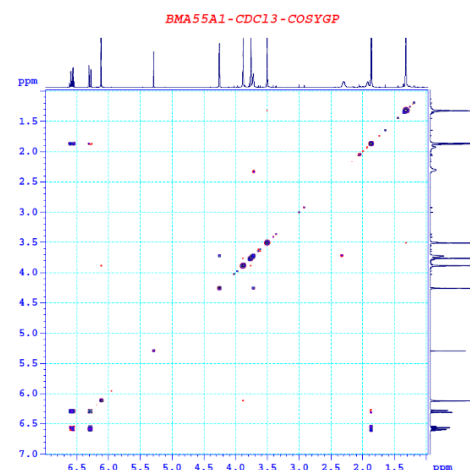
Hình 3.9. Phổ ^{13}C -NMR của MA1



Hình 3.10. Phổ HSQC của MA1

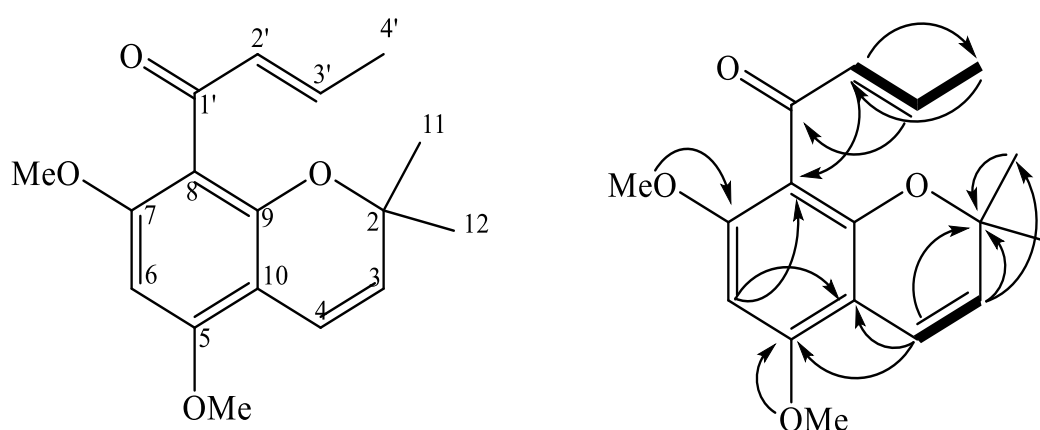


Hình 3.11. Phổ HMBC của MA1



Hình 3.12. Phổ COSY của MA1

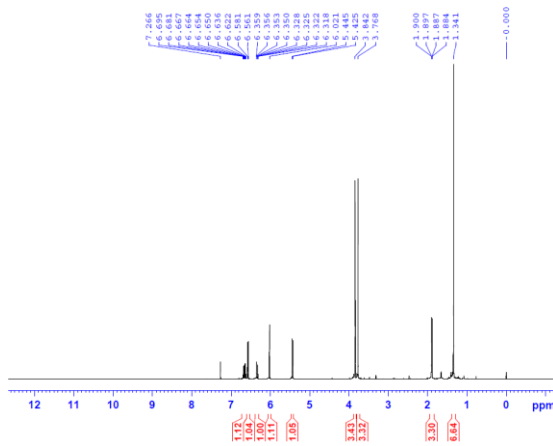
3.3.2. Hợp chất MA14: Malloapelta B



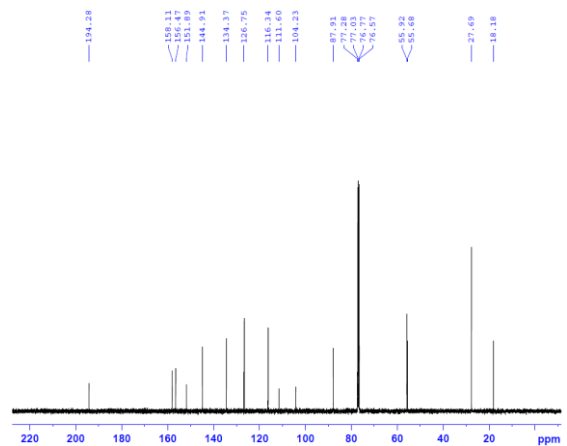
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của MA14

Hợp chất MA14 có dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS cung cấp công thức phân tử là $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$, tại m/z 289,1441 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán cho công thức $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_4$: 289,1440). Phổ ^1H -NMR (trong CDCl_3), cho tín hiệu của hai nhóm

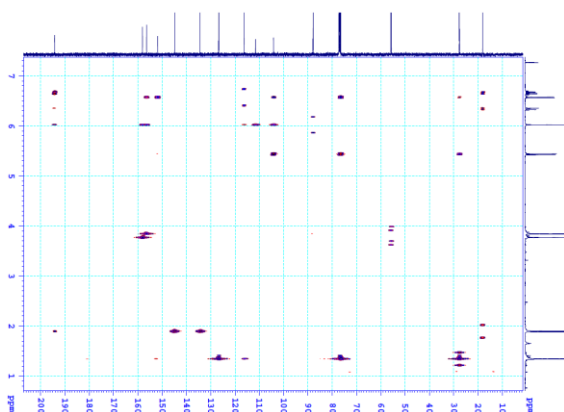
methoxy tại δ_H 3,86 (6H, s), hai nhóm methyl bậc ba tại δ_H 1,34 (6H, s), một nhóm methyl bậc hai tại δ_H 1,91 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và 5 proton olefin [δ_H 6,03 (1H, s), 5,45 (1H, d, $J = 10,5$ Hz), 6,58 (1H, d, $J = 10,5$ Hz), 6,38 (1H, d, $J = 17,0$ Hz) và 6,69 (1H, dq, $J = 17,0, 6,5$ Hz)] được thể hiện. Các tín hiệu carbon thu được từ phổ ^{13}C -NMR cho thấy sự có mặt của một nhóm carbonyl (δ_C 194,2), 5 carbon olefin bậc 4 (δ_C 104,2, 111,7, 151,9, 156,5 và 158,1), năm carbon methine olefin (δ_C 127,1, 116,7, 88,0, 134,8 và 144,8), ba nhóm methyl (δ_C 27,5, 27,7 và 18,1) và hai nhóm methoxy (δ_C 55,6 và 55,9). Độ chuyển dịch hóa học tại δ_C 76,5 (s) cho thấy nguyên tử carbon này phải liên kết với oxi. Điều này dựa trên các tương tác HMBC giữa H-11/H-12 (δ_H 1,34) và C-2 (δ_C 76,5)/C-3 (δ_C 127,1), giữa H-3 (δ_H 5,45) và C-2 (δ_C 76,5)/C-10 (δ_C 104,2)/C-11 (δ_C 27,7)/C-12 (δ_C 27,5), giữa H-4 (δ_H 6,58) và C-2 (δ_C 76,5)/C-5 (δ_C 156,5)/C-9 (δ_C 151,9)/C-10 (δ_C 104,2). Tương tác HMBC từ H-6 (δ_H 6,03) đến C-5 (δ_C 156,5)/C-7 (δ_C 158,1)/C-8 (δ_C 111,7)/C-10 (δ_C 104,2), từ nhóm methoxy (δ_H 3,51) và C-5 (δ_C 156,5)/C-7 (δ_C 158,1) cho biết vị trí của hai nhóm methoxy tại C-5 và C-7. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **MA14** với hợp chất malloapelta B thấy sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy, xác định hợp chất **MA14** chính là malloapelta B.



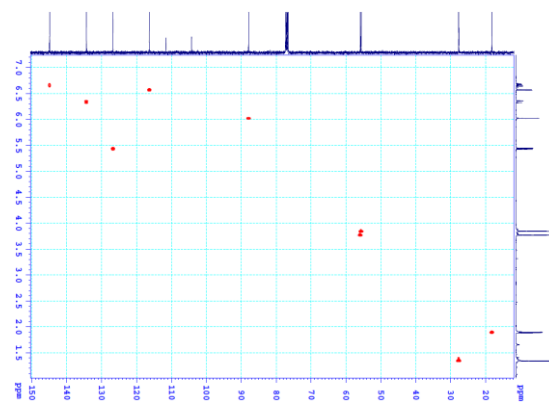
Hình 3.14. Phổ 1H-NMR của **MA14**



Hình 3.15. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **MA14**



Hình 3.16. Phổ HMBC của MA14



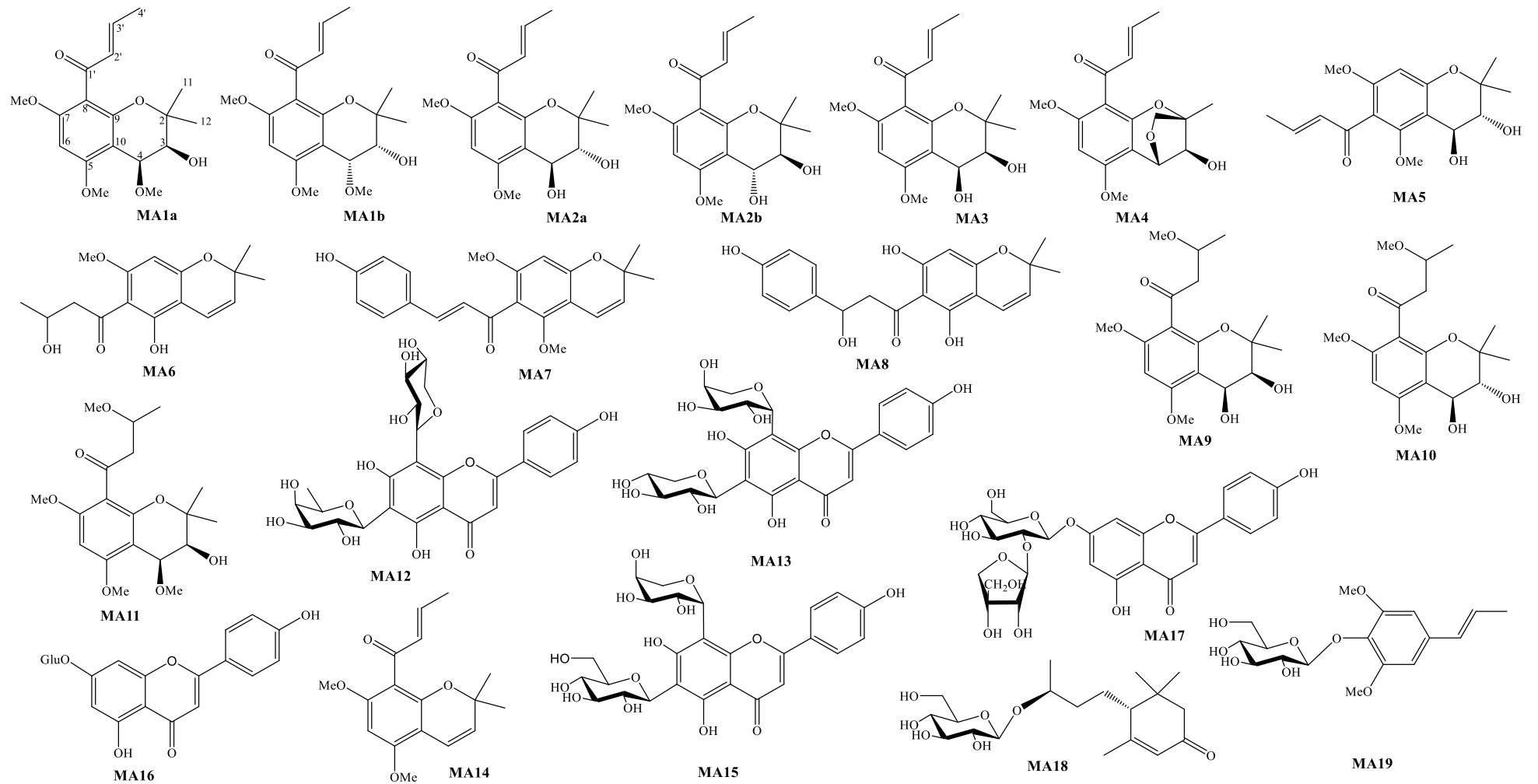
Hình 3.17. Phổ HSQC của MA14

3.4. Tổng hợp các hợp chất đã được phân lập từ loài *M. apelta*.

Như vậy, đã có 21 hợp chất được phân lập (MA1a, MA1b, MA2a, MA2b, MA3-MA19), trong đó có 14 chromene (MA1-MA11, MA14), 5 flavonoid (MA12, MA13, MA15-MA17) và hai hợp chất khác (MA18, MA19) từ loài *M. apelta*. Trong đó có 14 hợp chất mới và 7 hợp chất đã biết.

Bảng 3.1. Các hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ *M. apelta*

STT	Hợp chất	Tên gọi
1	Hai hợp chất mới MA1a và MA1b	(+)-malloapelta C (MA1a) (-)-malloapelta C (MA1b)
2	Hai hợp chất mới MA2a và MA2b	(-)-malloapelta D (MA2a) (+)-malloapelta D (MA2b)
3	Hợp chất mới MA3	malloapelta E
4	Hợp chất mới MA4	malloapelta F
5	Hợp chất mới MA5	malloapelta G
6	Hợp chất mới MA6	malloapelta H
7	Hợp chất mới MA7	malloapelta I
8	Hợp chất mới MA8	malloapelta II
9	Hợp chất mới MA9	malloapelta J
10	Hợp chất mới MA10	malloapelta K
11	Hợp chất mới MA11	malloapelta L
12	Hợp chất mới MA12	malloflavoside
13	Hợp chất MA13	apigenin 6- <i>C</i> - β -D-xylopyranosyl-8- <i>C</i> - α -L-arabinopyranoside
14	Hợp chất MA14	malloapelta B
15	Hợp chất MA15	schaftoside
16	Hợp chất MA16	apigenin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside
17	Hợp chất MA17	apigenin 7- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside
18	Hợp chất MA18	blumenol C glucoside
19	Hợp chất MA19	acantrifoside E



Hình 3.18. Cấu trúc các hợp chất được phân lập từ loài *M. apelta*

3.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất

3.5.1. Đánh giá sàng lọc hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được.

Đầu tiên, các hợp chất được sàng lọc nhằm gây độc tế bào ung thư trên 2 dòng tế bào PC-3 và MCF-7.

Tế bào PC-3 và MCF-7 được xử lý với các hợp chất ở nồng độ 30 μM trong 48 giờ và % tế bào sống được xác định bằng phương pháp MTS. Kết quả cho thấy, có tới 9 hợp chất tác dụng gây độc tế bào ung thư >50% (tức là % tế bào sống sót < 50%), gồm **MA1-MA8** và **MA14**. Các hợp chất này có tác dụng đồng thời lên cả 2 dòng tế bào PC-3 và MCF-7. Trong đó **MA8** có tác dụng tốt nhất, với tỉ lệ sống sót của cả 2 dòng lần lượt là $1.9 \pm 0.02\%$ và $10.0 \pm 0.09\%$.

Giá trị IC_{50} của **MA1-MA8**, **MA14** được tiếp tục kiểm tra trên 4 dòng tế bào PC-3, MCF-7, TOV-21G, sử dụng chất đối chứng dương là carboplatin và capecitabine.

Kết quả cho thấy, với dòng tế bào PC-3, các hợp chất ức chế mạnh nhất bao gồm **MA14**>**MA2**>**MA3**>**MA4**>**MA8**>**MA7**>**MA6**>**MA1**. Với dòng tế bào MCF-7, thứ tự được xếp **MA14** >**MA3**>**MA4**>**MA8**>**MA2**>**MA7**>**MA1**>**MA5**>**MA6**. Với dòng tế bào HT-29, thứ tự giảm dần là **MA14** >**MA3**>**MA2**>**MA7**>**MA4**>**MA1**>**MA8**>**MA6**>**MA5**. Với dòng tế bào TOV-21, do không thử nghiệm với **MA7** và **MA8** nên thứ tự là **MA2** >**MA14**>**MA3**>**MA1**>**MA5**>**MA4**>**MA6**. Qua đó, có thể thấy hợp chất **MA14**, **MA2**, **MA3** có IC_{50} rất thấp trên cả 4 dòng tế bào ung thư và nhỏ hơn 5 μM . Ngoài ra, các hợp chất **MA4**, **MA7** và **MA8** đều kháng ung thư tốt ba dòng tế bào PC-3, MCF-7 và HT-29 với $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$.

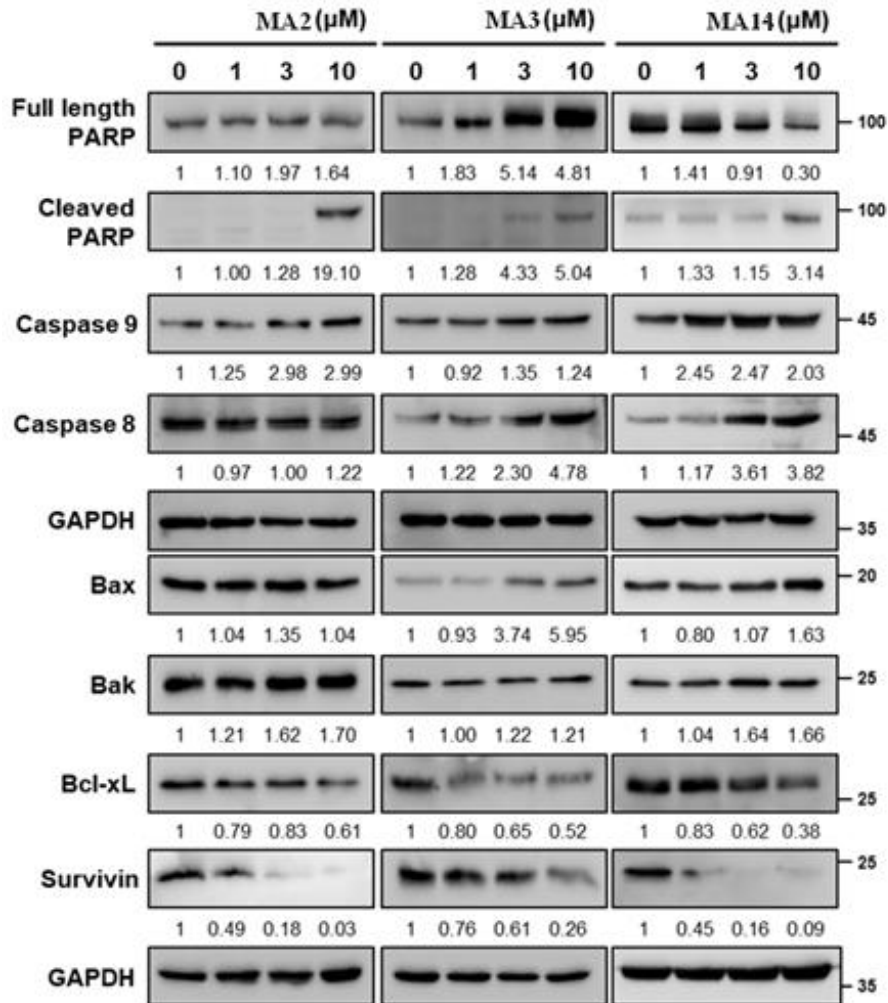
3.5.2. Đánh giá cơ chế gây chết tế bào ung thư của các hợp chất có hoạt tính mạnh thông qua apoptosis và bất hoạt yếu tố nhân NF- κB .

Quá trình ức chế sự phát triển và khả năng sống của tế bào được quan sát cho thấy sự phụ thuộc liều lượng ở thời điểm 72 giờ sau khi ủ với các hợp chất **MA1-MA5** và **MA14** với IC_{50} trong khoảng 1.62-4.02 μM , thể hiện tác dụng gây độc tế bào ung thư TOV-21G rất mạnh. Trong đó, hợp chất **MA2**, **MA3** và **MA14** cho thấy tác dụng gây độc tế bào ung thư người cao hơn hẳn các chất còn lại. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng hợp chất **MA14** không hiển thị gây độc tế bào trên tế bào đại thực bào RAW264.7 lên đến 30 μM . Do vậy, các hợp chất **MA2**,

MA3 và **MA14** được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư buồng trứng thông qua apoptosis và bất hoạt yếu tố nhân NF- κ B

3.5.2.1. Ảnh hưởng của các hợp chất **MA2**, **MA3**, **MA14** đến yếu tố apoptosis

Để xác định mức độ tự chết của tế bào gây ra bởi các hợp chất **MA2**, **MA3** và **MA14** trên dòng tế bào ung thư buồng trứng, khả năng kích hoạt con đường tín hiệu tự chết của tế bào được đánh giá bằng phương pháp Western blot sử dụng các kháng thể tương ứng.

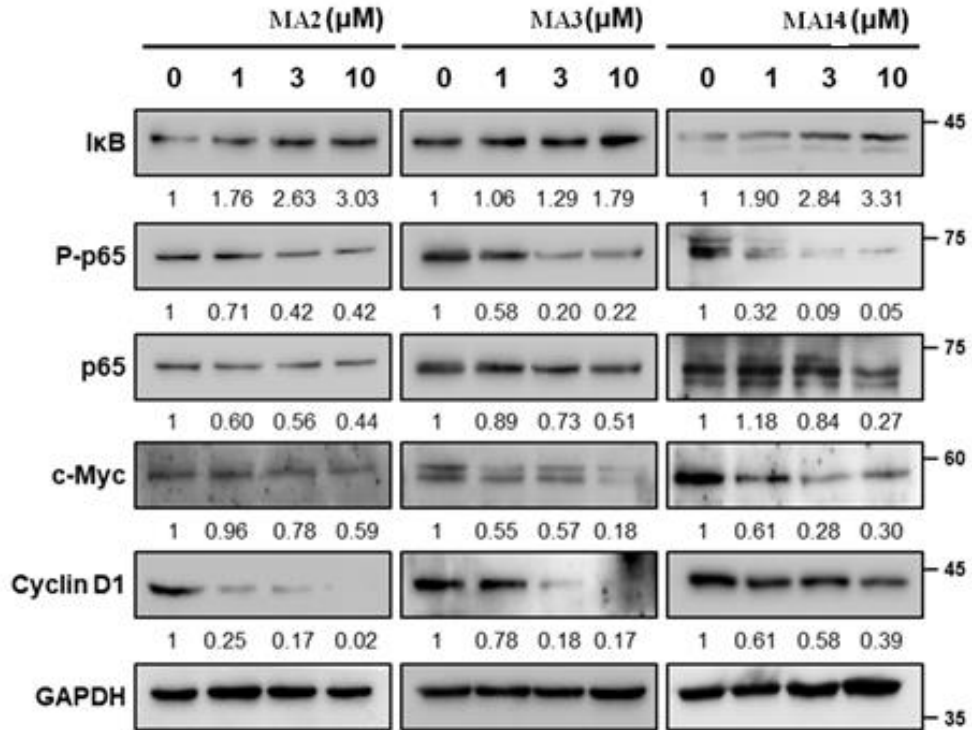


Hình 3.19. Ảnh hưởng của các hợp chất **MA2**, **MA3**, **MA14** đến yếu tố apoptosis

Kết quả cho thấy khi xử lý các tế bào TOV-21G với ba hợp chất trên đã có tác dụng kích hoạt các protein Bak và pro-apoptotic Bax giảm các biểu hiện protein Bcl-xL và kháng apoptosis survivin. Hơn nữa, những hợp chất này làm tăng mức độ biểu hiện poly (ADP ribose), polymerase (PARP), caspase 9 và caspase 8, cho thấy rằng những hợp chất này gây ra cả apoptosis bên trong và bên ngoài. Do đó, có thể thấy những hợp chất này thể hiện tác dụng chống ung thư thông qua con đường apoptosis của tế bào.

3.5.2.2. Ảnh hưởng của MA2, MA3, MA14 đến con đường tín hiệu NF- κ B

Hợp chất MA14 được biết đến như một chất ức chế sự hoạt hóa NF- κ B, gây ra bởi LPS [124]. Vì vậy, các hợp chất MA2 và MA3 được kiểm tra cùng MA14 xem có khả năng ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu NF- κ B hay không.



Hình 3.20. Ảnh hưởng của các hợp chất MA2, MA3, MA14 đến con đường tín hiệu NF- κ B

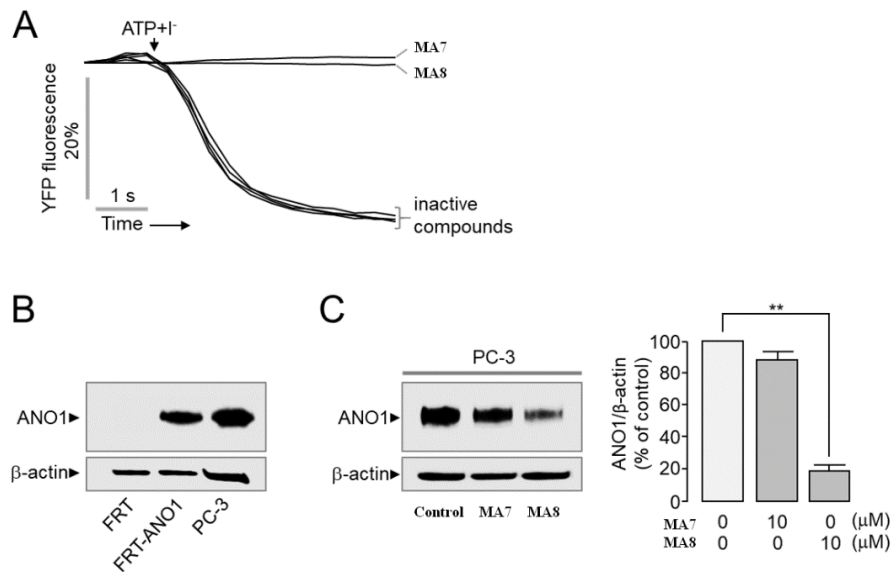
Kết quả cho thấy hợp chất MA2 và MA3 làm giảm mức độ phosphoryl hóa NF- κ B và NF- κ B tổng, trong khi các hợp chất này làm tăng mức độ ức chế NF- κ B (IκB). Các gen đích NF- κ B, c-myc và cyclin D1 đã giảm khi tế bào TOV-21G được xử lý với MA2 và MA3. Mặt khác, con đường truyền tín hiệu NF- κ B đã được báo cáo có liên quan đến sự sinh trưởng tế bào, quá trình apoptosis, viêm và hình thành khối u. Do đó, các phát hiện này cho thấy tiềm năng ứng dụng của các hợp chất MA2, MA3 và MA14 để điều trị ung thư và các bệnh viêm nhiễm thông qua việc điều chỉnh NF- κ B.

3.5.3. Đánh giá cơ chế kháng ung thư của các hợp chất có hoạt tính mạnh thông qua giảm biểu hiện ANO1

3.5.3.1. Xác định và mô tả thuộc tính của các chất ức chế ANO1

Tác dụng ức chế ANO1 của các hợp chất MA7, MA8, MA14, MA16, MA18 và MA19 được đánh giá bằng phương pháp YFP trong các tế bào FRT biểu hiện bền vững ANO1 người (Hình 3.21). Kết quả cho thấy cả hai hợp chất MA7 và MA8 đều

thể hiện tác dụng ức chế ANO1 > 99% ở nồng độ 25 μM , thể hiện ở cường độ tín hiệu huỳnh quang giảm dần và mất hoàn toàn theo thời gian sau khi được bổ sung ATP (Hình 3.21A). Biểu hiện của ANO1 ở dòng tế bào FRT, FRT-ANO1 và PC-3 được kiểm tra bằng Western blot và kết quả cho thấy chỉ có băng đặc hiệu với ANO1 được xác định ở dòng tế bào FRT-ANO1 và PC-3. Đáng chú ý, trên dòng tế bào PC-3, hợp chất **MA8** làm giảm biểu hiện ANO1 mạnh hơn so với **MA7**, mức độ biểu hiện của ANO1 khi tế bào được xử lý với **MA7** hoặc **MA8** đều giảm so với nhóm đối chứng. Ở nồng độ 10 μM , biểu hiện **MA8** ức chế biểu hiện ANO1 thấp hơn có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm đối chứng ($P < 0.01$). Ở cùng nồng độ này thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa mẫu xử lý với **MA7** và mẫu đối chứng (Hình 3.21C).



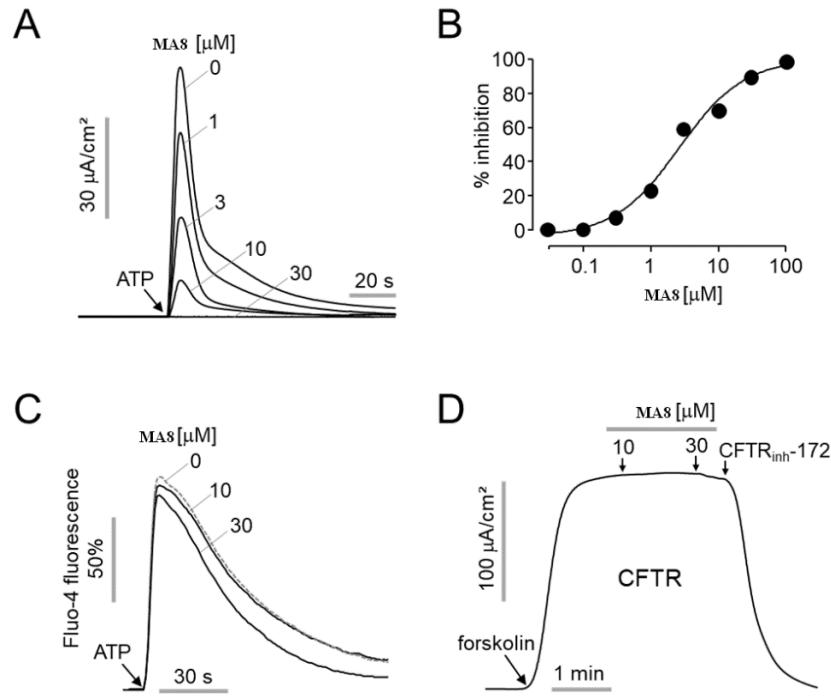
Hình 3.21. Phát hiện các chất có tác dụng ức chế ANO1.

Các hợp chất **MA7**, **MA8** và **MA14** ức chế khả năng sống của tế bào PC-3, với IC_{50} lần lượt là 8.89 ± 0.17 , 7.29 ± 0.20 và 1.60 ± 0.05 so với đối chứng dương, capecitabine. Trong số các chất này, **MA8** làm ngăn chặn mạnh hoạt động của kênh ANO1, giảm mức độ biểu hiện protein ANO1 trong tế bào và giảm cả khả năng sống của tế bào PC-3 nên được chọn để nghiên cứu sâu hơn.

3.5.3.2. Tác dụng ức chế có chọn lọc ANO1 của **MA8**

Để khảo sát tác dụng ức chế kênh ANO1 clorua của **MA8**, dòng điện trên màng đỉnh được đo trên các tế bào FRT biểu thị ANO1 người. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.22. Kết quả cho thấy hợp chất **MA8** có tác dụng ức chế mạnh đáng kể dòng điện ANO1 clorua, được kích hoạt bởi ATP với IC_{50} là 2.64 μM . Để quan sát tác dụng của **MA8** lên con đường tín hiệu canxi, các tế bào FRT thêm vào chất chỉ thị canxi huỳnh quang, Fluo-4. Tiền xử lý **MA8** không làm thay đổi đáng kể sự gia tăng nồng độ canxi trong tế bào do ATP gây ra. Để đánh giá tác dụng ảnh hưởng lên kênh clorua

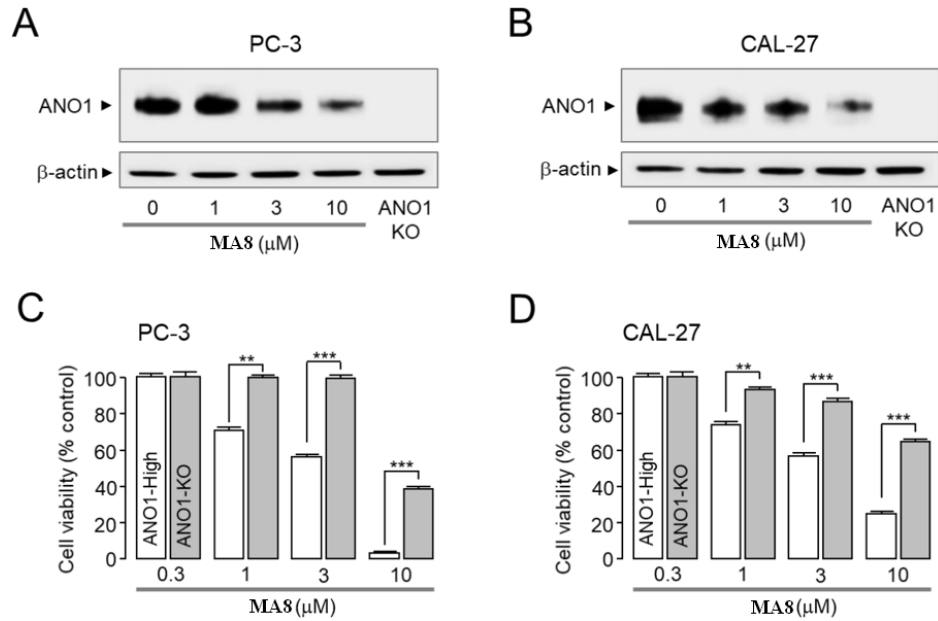
khác của **MA8**, dòng điện màng đỉnh được đo bằng bộ điều khiển truyền qua màng sợi (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) trên tế bào FRT biểu hiện ở người. Kết quả là **MA8** thể hiện tác dụng ức chế tối thiểu đối với hoạt động của kênh CFTR ở nồng độ 30 μM cho thấy sự ức chế hoàn toàn ANO1.



Hình 3.22. Tác dụng ức chế có chọn lọc của MA8

3.5.3.3. Tác dụng ức chế của MA8 đối với sự sinh trưởng và di chuyển tế bào trong tế bào PC-3 và CAL-27

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng thuốc phong tỏa ANO1 ức chế sự sinh trưởng tế bào của tế bào ung thư tuyến tiền liệt di căn và tế bào ung thư biểu mô tuyến vảy miệng. Trong nghiên cứu này, **MA8** gây ra sự giảm đáng kể biểu hiện protein ANO1 trên dòng tế bào PC-3 và CAL-27, mức độ giảm biểu hiện ANO1 tỉ lệ nghịch với nồng độ **MA8**. Biểu hiện ANO1 giảm mạnh nhất khi **MA8** ở nồng độ 10 μM đối với cả 2 dòng tế bào PC-3 và CAL-27 (Hình 3.23 A và B). Ngoài ra, **MA8** làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào trong tế bào PC-3, CAL-27 và gây độc tế nhẹ ở tế bào ANO1 KO (Hình 3.23 C và D). Đáng chú ý, **MA8** không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào ANO1 KO PC-3 ở nồng độ 3 μM cho thấy tác dụng gây độc tế bào có ý nghĩa trên tế bào PC-3 biểu hiện ANO1. **MA8** cũng làm giảm mạnh khả năng sống của tế bào CAL-27 biểu hiện ANO1, nhưng không phải trong tế bào ANO1 KO CAL-27.

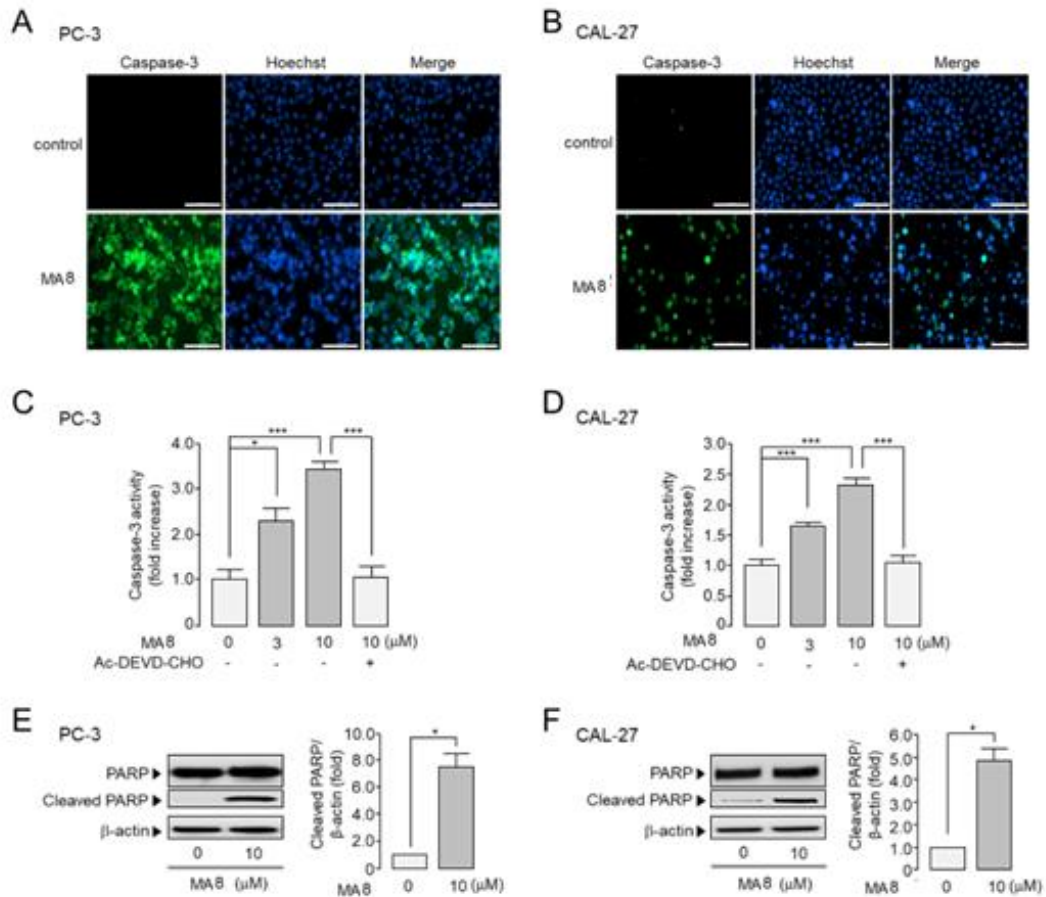


Hình 3.23. Ảnh hưởng của MA8 đối với mức độ biểu hiện của protein ANO1 và khả năng sống của tế bào trong tế bào PC-3, CAL-27.

Để xác định **MA8** có ức chế sự di chuyển của tế bào ung thư hay không, thí nghiệm chữa lành vết thương được thực hiện tiếp trên các dòng tế bào PC-3 và CAL-27. Kết quả cho thấy biểu hiện cao ANO1. **MA8** ở nồng độ 1, 3 và 10 μM ức chế mạnh sự di chuyển của các tế bào PC-3 lần lượt là 31.3, 68.0 và 88.3 %, tế bào CAL-27 lần lượt là 31.8, 64.0 và 87.5 %.

3.5.3.4. Ảnh hưởng của **MA8** đến sự tăng hoạt động Caspase-3 và sự phân tách PARP trong các tế bào PC-3 và CAL-27

Sự ức chế dược lý đối với protein ANO1 gây ra quá trình apoptosis ở các tế bào ung thư khác nhau. Để kiểm tra xem **MA8** có gây ra apoptosis ở các tế bào PC-3 và CAL-27 biểu hiện mức ANO1 cao hay không, tác động của **MA8** lên hoạt động của caspase-3 và sự phân cắt PARP đã được quan sát thấy trong các tế bào này. Kết quả cho thấy **MA8** làm tăng mạnh các tế bào dương tính với caspase-3 ở các dòng tế bào PC-3 và CAL-27 (Hình 3.24 A và B). Hoạt động của caspase-3 được tăng lên đáng kể bởi **MA8** và thể hiện sự phụ thuộc vào liều lượng trong các tế bào PC-3 và CAL-27, sự gia tăng **MA8** gây ra hoạt động caspase-3 bị ức chế hoàn toàn bởi AC-DEVD-CHO, một chất ức chế caspase-3 đặc hiệu (Hình 3.24 C và D). Ngoài ra, xử lý **MA8** làm tăng đáng kể PARP-1 bị phân cắt trong các tế bào PC-3 và CAL-27.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của MA8 đến hoạt động của caspase-3 và sự phân cắt PARP trong tế bào PC-3, CAL-27.

Các báo cáo trước đây cho thấy chất ức chế ANO1 có thể điều chỉnh sự tiến triển của ung thư thông qua điều chỉnh giảm ANO1 trong nhiều loại tế bào ung thư. Các chất ức chế ANO1 đã làm giảm khả năng sống của tế bào trong ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu - cổ và ung thư biểu mô tế bào vảy thực quản (ESCC) bằng cách ức chế hoạt động của protein kinase II phụ thuộc Ca^{2+} /calmodulin cũng như sự biểu hiện thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì Ngoài ra, sự biểu hiện quá mức của ANO1 còn có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của khối u bằng cách kích hoạt đường truyền tín hiệu AKT/SRC/ERK1/2 qua trung gian EGFR hoặc đường truyền tín hiệu Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Như vậy, ANO1 có thể là mục tiêu thuốc tiềm năng quan trọng trong điều trị ung thư thông qua sử dụng các chất ức chế ANO1 có thể đem lại kết quả khả quan làm giảm tăng trưởng các khối u ác tính.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Từ lá loài *Mallotus apelta* thu hái tại Ngọc Thanh, Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, sau khi xử lý ngâm, chiết và tiến hành phân lập bằng các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ hiện đại, đã có 21 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Cụ thể là:

- 14 hợp chất mới là (+)-malloapelta C (**MA1a**) và (-)-malloapelta C (**MA1b**), (-)-malloapelta D (**MA2a**) và (+)-malloapelta D (**MA2b**), malloapelta E (**MA3**), malloapelta F (**MA4**), malloapelta G (**MA5**), malloapelta H (**MA6**), malloapelta I (**MA7**), malloapelta II (**MA8**), malloapelta J (**MA9**), malloapelta K (**MA10**), malloapelta L (**MA11**) và malloflavoside (**MA12**). Trong đó đã sử dụng hệ thống HPLC với cột đối quang để phân tách được 4 chất đối quang là **MA1a**, **MA1b** và **MA2a**, **MA2b** từ 2 hỗn hợp racemic. Các hợp chất này đều là chất mới và xác định được cấu hình tuyệt đối bằng phương pháp phổ CD thực nghiệm kết hợp với phương pháp tính toán.

- 7 hợp chất đã biết, bao gồm: apigenin 6-*C*- β -D-xylopyranosyl-8-*C*- α -L-arabinopyranoside (**MA13**), malloapelta B (**MA14**), schaftoside (**MA15**), apigenin-7-*O*- β -D-glucoside (**MA16**), apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**MA17**), blumenol C glucoside (**MA18**) và acantrifoside E (**MA19**).

2. Đã nghiên cứu tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư của tất cả các hợp chất phân lập được từ loài *Mallotus apelta*. Kết quả thu được như sau:

- Hợp chất **MA14**, **MA2** và **MA3** kháng ung thư rất tốt trên cả 4 dòng tế bào PC-3, MCF-7, HT-29 và TOV-21G với $IC_{50} < 5 \mu M$. Bên cạnh đó, **MA4**, **MA7** và **MA8** cũng kháng tốt trên ba dòng PC-3, MCF-7 và HT-29 với $IC_{50} < 10 \mu M$.

- Các hợp chất phân lập **MA2**, **MA3** và **MA14** được phát hiện ức chế sự phát triển tế bào ung thư buồng trứng TOV-21G thông qua yếu tố apoptosis và bất hoạt yếu tố nhân NF- κ B. Điều này được kết luận dựa trên việc làm tăng biểu hiện của các protein Bak, pro-apoptotic Bax, giảm biểu hiện protein Bcl-xL và kháng apoptosis survivin. Hơn nữa **MA2** và **MA3** cũng làm giảm mức độ phosphoryl hóa NF- κ B và NF- κ B tổng, đồng thời giảm các gen đích NF- κ B, c-myc và cyclin D1.

- Cả hai hợp chất **MA7** và **MA8** đều thể hiện tác dụng ức chế ANO1 > 99% trong các tế bào FRT ở nồng độ 25 μM . Đáng chú ý, trên dòng tế bào PC-3, hợp chất

MA8 làm giảm biểu hiện ANO1 mạnh hơn so với **MA7**. Điều này phù hợp với kết quả khảo sát tác dụng ức chế kênh ANO1 clorua và con đường tín hiệu canxi. **MA8** ở nồng độ 10 μM cũng được kết luận là giảm sự sinh trưởng và di chuyển trong tế bào PC-3 và CAL-27, dựa trên kết quả thí nghiệm với các tế bào tế bào ANO1 KO. Ngoài ra **MA8** làm tăng hoạt động caspase-3 và phân cắt PARP, đây là những tín hiệu của quá trình chết theo chương trình.

KIẾN NGHỊ

Cả hai hợp chất **MA7** và **MA8** đều giảm quá trình sinh trưởng và di chuyển trong tế bào PC-3 và CAL-27, thông qua giảm biểu hiện ANO1. Ngoài ra **MA8** làm tăng hoạt động caspase-3 và phân cắt PARP, xúc tiến sự chết theo chương trình. Vì vậy, cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của hợp chất **MA8** nhằm phát hiện tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyen Hoang Anh**, Duong Thi Hai Yen, Nguyen The Cuong, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Pham The Chinh, Pham Van Cuong, Nguyen Hoai Nam, Phan Van Kiem, Su Hyeon Cho, Seon Ju Park, Nguyen Xuan Nhiem, *Three new chromanes and one new flavone C-glycoside from Mallotus apelta*, Journal of Asian Natural Products Research, 2023, 25, 18-26.
2. Yohan Seo, **Nguyen Hoang Anh**, Yunkyung Heo, So Hyeon Park, Phan Van Kiem, Yechan Lee, Duong Thi Hai Yen, Sungwoo Jo, Dongkyu Jeon, Bui Huu Tai, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh, Seung Hyun Kim, Nguyen Xuan Nhiem, Wan Namkung *Novel ANO1 Inhibitor from Mallotus apelta Extract Exerts Anticancer Activity through Downregulation of ANO1*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. 21, DOI: 10.3390/ijms21186470.
3. Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhiem, **Nguyen Hoang Anh**, Duong Thi Hai Yen, Nguyen The Cuong, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh, Pham The Chinh, Yu Hyun Jeon, Seon Ju Park, Seung Hyun Kim, So Hee Kwon, *Enantiomeric chromene derivatives with anticancer effects from Mallotus apelta*, Bioorganic Chemistry, 2020, 104, 104268.
4. **Nguyen Hoang Anh**, Seon Ju Park, Do Thi Trang, Duong Thi Hai Yen, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Phan Van Kiem, Pham The Chinh, Nguyen Xuan Nhiem, *Genus Mallotus (Euphorbiaceae): A review on traditional medicinal use, phytochemistry and biological activities*, Vietnam Journal of Science and Technology, 2022, 60, 141-174.

