

HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM CỦA 5 HỢP CHẤT CASSAINE DITERPENOIDS TỪ LÁ CÂY LIM XANH *ERYTHROPHLEUM FORDII*

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF 5 CASSAINE DITERPENOIDS ISOLATED FROM THE LEAVES OF *ERYTHROPHLEUM FORDII*

Trần Mạnh Hùng¹, Nguyễn Thị Thùy Dương², Đoàn Minh Thu², Lê Phước Cường³, Giang Thị Kim Liên^{4*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên cứu và Đào tạo Việt Anh - Đại học Đà Nẵng

³Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

^{4*}Đại học Đà Nẵng; giangkimlien@gmail.com

Tóm tắt - Trong bài báo này, 5 hợp chất tự nhiên thuộc khung cassain diterpenoid là erythrofordin A (1), erythrofordin B (2), erythrofordin C (3), pseudo-erythrosumin (4) và erythrofordin U (5) được phân lập từ lá cây lim xanh *Erythrophleum fordii* Oliver thu hái ở Quảng Nam. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng việc kết hợp các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR, phổ khối MS và so sánh với tài liệu tham khảo. Các hợp chất (1-5) được thử nghiệm hoạt tính kháng viêm trên mô hình ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 bị kích thích bởi lipopolysaccharides LPS. Erythrofordin B (2) ức chế sự sản sinh NO mạnh nhất so với các chất khác với giá trị IC₅₀ là 12,5 ± 1,8 μM. Khi tăng nồng độ erythrofordin B (2) từ 0 đến 50 μM, biểu hiện protein của hai enzyme iNOS và COX-2 đã giảm dần trong các tế bào bị kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy, erythrofordin B (2) có thể ức chế sự sản sinh NO trong quá trình viêm của tế bào.

Từ khóa - Cây Lim xanh; hoạt tính kháng viêm; Caesalpinioideae; Cassaine diterpenoid; sự sản sinh NO

Abstract - In this study, 5 cassain diterpenoids as erythrofordin A (1), erythrofordin B (2), erythrofordin C (3), pseudo-erythrosumin (4) and erythrofordin U (5) are isolated from the leaves of *Erythrophleum fordii* Oliver collected in Quang Nam province. The chemical structures of these compounds are identified by ¹H and ¹³C NMR and mass spectrum MS in comparison with reported data. The anti-inflammatory activity of these compounds is evaluated against lipopolysaccharides (LPS)-induced nitric oxide production in RAW264.7 cells *in vitro*. Among them, erythrofordin B (2) shows significant inhibitory activity against the LPS-induced nitric oxide production with an IC₅₀ value of 12.5 ± 1.8 μM. Erythrofordin B suppresses both cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expressions in protein levels. These results indicate that erythrofordin B (2) may exert anti-inflammatory activity through NO production inhibition.

Key words - *Erythrophleum fordii*; inflammatory activity; Caesalpinioideae; Cassaine diterpenoid; NO production

1. Đặt vấn đề

Cây lim xanh (*Erythrophleum fordii* Oliver) là một loài thực vật thuộc phân họ Vang (Caesalpinioideae) trong họ Đậu (Fabaceae, hoặc Leguminosae) [1]. Đây là cây gỗ lớn, cao trên 30 m, thân cây thẳng, vỏ màu nâu có nhiều nốt sần màu nâu nhạt. Về mặt sinh thái, lim xanh mọc chậm, là cây ưa sáng nhưng lại chịu bóng khi còn nhỏ. Lim xanh mọc trên đất sét hoặc sét pha sâu dày, khí hậu nhiệt đới mưa mùa, cây có khả năng tái sinh hạt và chồi tốt. Lim xanh phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Đài Loan và Trung Quốc. Lim được sử dụng làm gỗ quý, làm bóng mát, nghiên cứu khoa học, và chứa nhiều chất dùng để nhuộm. Gỗ lim một trong bốn loại gỗ tử thiết của Việt Nam (Đinh, Lim, Sến, Tấu). Gỗ lim là loài gỗ cứng, chắc, nặng, không bị mối mọt, có màu hơi nâu đến nâu thẫm, có khả năng chịu lực tốt [1, 2].

Về mặt thành phần hóa học, lim xanh là nguồn thực vật chứa nhiều hợp chất diterpenoid, triterpenoid, steroid và alkaloid có khung diterpenoid amide [3-6]. Các diterpenoid amide trong vỏ cây rất nhiều và dao động trong khoảng 0,2 và 1% khối lượng khô. Cây lim xanh là một thực vật có đồng thời cả dược tính tốt cũng như độc hại. Trong y học cổ truyền Trung Quốc, vị thuốc này được sử dụng cho thúc đẩy lưu thông máu. Gần đây, các nghiên cứu khoa học mới nhất cho thấy, lim xanh chứa alkaloid dạng khung cassaine diterpenoid amide, triterpenoid, steroid với các hoạt tính sinh học phong phú như khả năng gây độc tế bào ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, kiến tạo mạch máu [4-7]. Khung hợp chất cassaine diterpenoid được nhiều nghiên

cứu khoa học quan tâm hiện nay vì có nhiều tác dụng dược lý như chống khối u, chống sốt rét, chống viêm, chống virus, diệt khuẩn và chống trypanosomal. Cassaine diterpenoid cũng là một chủ đề phổ biến là một chủ đề nóng trong những hợp chất tự nhiên có khả năng ứng dụng để hỗ trợ điều trị và chữa bệnh từ nhiều năm gần đây. Trước đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã phân lập ra nhiều hợp chất có khung mono cassaine diterpenoid amide từ vỏ cây lim xanh thu hái ở Quảng Nam [7]. Các chất dạng mono cassaine diterpenoid này cho thấy có khả năng ảnh hưởng lên sự hình thành ống nội mô trên matrigel và có tác dụng ức chế mạnh sự hình thành cấu trúc mao mạch giống như các tế bào nội mô mạch rốn người (HUVECs) [7]. Thêm vào đó, theo phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư dẫn đường chúng tôi cũng phân lập được các diterpenoid-diterpenoid dimer amide là erythrophlesin H và erythrophlesin I [8]. Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR chỉ ra rằng, chúng bao gồm các cấu trúc dimer đối xứng qua một liên kết ester giữa hai diterpenoids cassaine. Thử nghiệm chống lại sự sinh trưởng tế bào ung thư tiền liệt tuyến PC-3 cho thấy hợp chất erythrophlesin H có tác dụng gây độc tế bào mạnh đối với dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt, hợp chất này gây nên sự chết của tế bào PC-3 theo lập trình sẵn (apoptosis) [8]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học từ lá cây lim xanh còn nhiều hạn chế. Do đó, trong nghiên cứu khoa học này, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu chiết xuất và thử nghiệm hoạt tính ức kháng viêm của các hợp chất từ lá cây lim xanh thu hái ở Quảng Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Lá lim xanh được thu hái tại xã Tiên Phước, Quảng Nam vào tháng 10 năm 2017. Mẫu thực vật được PGS TS. Phạm Thanh Huyền, Khoa tài nguyên, Viện Dược liệu trung ương, giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản (TMH-30-2017) được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Sinh Dược học, Khoa Khoa học Y Sinh, Viện Nghiên cứu và Đào tạo Việt Anh, Đại học Đà Nẵng.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Độ quay cực (optical rotation) được đo bằng máy JASCO DIP 370 digital polarimeter. Độ hấp thụ tử ngoại (ultraviolet) được đo bằng máy Thermo spectrometer. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D- và 2D-NMR được đo bằng máy Varian Unity Inova 400 MHz spectrometer với chất nội chuẩn là TMS, độ dịch chuyển hóa học được ghi ở đơn vị δ ppm. Khối lượng phân tử (MS) của các hợp chất được đo bằng máy JEOL JMS-AX 300L spectrometer. Silica gel sử dụng trong tách chiết là loại Merck cỡ hạt 63–200 μm và RP-18 loại Merck cỡ 75 μm . Bản mỏng TLC cũng sử dụng của công ty Merck loại số 60 F₂₅₄ và RP-18 F₂₅₄. Máy điều chế là loại sắc ký lỏng cao áp HPLC của hãng Gilson Trilution System với đầu dò UV detector (UV/VIS - 156), loại cột YMC-Pack ODS-A cỡ 250 \times 20 mm, 5 μm , của công ty YMC Co. Ltd., (Nhật Bản). Dung môi sử dụng cho chạy cột được cung cấp bởi công ty Samchun Co. Ltd., (Hàn Quốc), dung môi dùng cho HPLC mua từ công ty Burdick & Jackson (Mỹ).

2.3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Lá lim xanh khi thu hái về được phơi khô trong bóng râm (5,0 kg), xay nhỏ và chiết nóng hồi lưu với cồn ethanol 70% (3,0 L \times 3 lần). Dung dịch chiết sau đó được cất loại dung môi dưới áp suất âm thu được 280,5 g cặn chiết cồn 70%. Cặn chiết này được hòa tan với nước (3,0 L) rồi chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexane, methylene dichloride, và ethyl acetate thu được các cặn chiết *n*-hexane (26,5 g), methylene dichloride (CH₂Cl₂, 16,4 g), ethyl acetate (EtOAc, 107,6 g) và phần nước còn lại. Theo kết quả nghiên cứu điều tra hoạt tính ức chế NO trên mô hình tế bào đại thực bào RAW 246.7, phân đoạn CH₂Cl₂ đã cho thấy khả năng ức chế sự sản sinh NO mạnh với IC₅₀ là 112 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Do đó, phân đoạn CH₂Cl₂ được sử dụng để nghiên cứu thành phần hóa học. Tiến hành sắc ký cặn CH₂Cl₂ trên cột silica gel và rửa giải với hệ dung môi *n*-hexane : EtOAc tuyến tính 50:1 \rightarrow 1:1 (v:v) thu được 32 phân đoạn (C-1 \rightarrow C-32) dựa theo phân tích kết quả trên mẫu TLC. Phân đoạn C-8 (0,65 g) được chạy sắc ký qua cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane:EtOAc (20:1, 10:1 v:v) thu được hợp chất số (1) (12,5 mg) và (2) (10,3 mg). Phân đoạn C-15 (0,47 g) được chạy sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane:EtOAc (10:1 \rightarrow 8:1, v/v) thu được hợp chất số (3) (15,6 mg). Tiến hành sắc ký cặn phân đoạn C-20 (1,6 g) trên cột silica gel và rửa giải với hệ dung môi *n*-hexane : acetone tuyến tính (30:1 \rightarrow 1:1, v:v), sau đó sử dụng hệ dung môi *n*-hexane:acetone (20:1 \rightarrow 10:1, v:v) thu được 12 phân đoạn nhỏ (C-21-1 \rightarrow C-20-12) dựa theo phân tích kết quả trên mẫu TLC. Phân đoạn C-21-3 được tiếp tục sắc ký qua cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane : acetone (10:1, v:v) thu được hợp chất

số (4) (46 mg). Từ phân đoạn C-21-6 sau khi lắng đọng trong hệ dung môi *n*-hexane : acetone (10:1) thu được hợp chất số (5) (10,2 mg).

Chất số (1) (Erythrofordin A): Chất bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25} +30^\circ$ (*c* 0,25, MeOH); mp 138–139°C; FAB-MS *m/z* 395,2 [M+H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5,75 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-15), 3,98 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-7), 3,78 (3H, s, H-21), 3,50 (1H, dd, J = 11,5, 4,2 Hz, H-3), 2,80 (1H, m, H-14), 2,40 (1H, s, H-5), 2,65 (1H, m, H-12a), 2,30 (1H, m, H-2a), 2,15 (1H, m, H-12b), 2,07 (1H, m, H-10), 2,30 (1H, m, H-11a), 1,95 (1H, m, H-6), 1,92 (1H, m, H-2b), 1,80 (1H, m, H-11b), 1,65 (1H, m, H-1a), 1,86 (1 H, m, H-8), 1,60 (1H, m, H-9), 1,52 (1 H, m, H-2b), 1,46 (1H, m, H-1b), 1,30 (3H, s, H-19), 1,15 (3H, d, J = 8,0 Hz, H-17), 0,72 (3H, s, H-20).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 208,5 (C-6), 174,3 (C-18), 170,4 (C-16), 163,0 (C-13), 112,7 (C-15), 78,5 (C-3), 75,1 (C-7), 64,0 (C-5), 50,7 (C-21), 51,5 (C-8), 48,2 (C-4), 45,6 (C-9), 45,3 (C-10), 40,0 (C-14), 37,1 (C-1), 24,0 (C-11), 25,6 (C-2), 25,3 (C-19), 20,1 (C-12), 14,0 (C-20), 14,8 (C-17).

Chất số (2) (Erythrofordin B): Chất bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25} +40^\circ$ (*c* 0,2, MeOH); EI-MS *m/z* 437,2 [M+H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5,80 (1H, s, H-15), 3,95 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-7), 3,70 (3H, s, H-21), 3,55 (1H, dd, J = 11,0, 4,2 Hz, H-3), 2,75 (1H, m, H-14), 2,63 (1H, s, H-5), 2,40 (1H, td, J = 13,0, 3,6 Hz, H-12a), 2,20 (1H, m, H-2b), 2,16 (1H, m, H-12b), 1,90 (3H, s, H-23), 1,94 (1H, m, H-11), 1,82 (1H, m, H-1b), 1,70 (1H, m, H-8), 1,78 (1H, m, H-11), 1,68 (1H, m, H-9), 1,50 (1H, dd, J = 13,2, 3,0 Hz, H-2a), 1,27 (1H, m, H-1a), 1,30 (3H, s, H-19), 1,10 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-17), 0,86 (3 H, s, H-20).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 210,6 (C-6), 177,5 (C-22), 175,8 (C-18), 171,2 (C-16), 164,3 (C-13), 115,9 (C-15), 78,4 (C-3), 77,2 (C-7), 65,3 (C-5), 51,9 (C-21), 51,3 (C-8), 47,6 (C-9), 46,6 (C-4), 43,4 (C-10), 37,8 (C-1), 32,9 (C-12), 32,4 (C-14), 28,1 (C-11), 28,0 (C-2), 26,2 (C-19), 22,5 (C-23), 14,9 (C-20), 13,3 (C-17).

Chất số (3) (Erythrofordin C): Chất bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25} +150,2$ (*c* 0,15, MeOH); EI-MS *m/z* 395,2 [M + H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5,75 (1H, brs, H-15), 4,52 (1H, dd, J = 12,0, 1,2 Hz, H-6), 3,75 (3H, s, H-21), 3,50 (1H, dd, J = 12,2, 4,0 Hz, H-3), 2,87 (1 H, s, m, H-14), 2,47 (1 H, d, J = 14,3 Hz, H-8), 2,45 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-12a), 2,10 (1H, m, H-2b), 2,05 (1 H, m, H-12b), 1,90 (1 H, m, H-1a), 1,92 (2H, m, H-2a, H-11b), 1,70 (1H, m, H-11a), 1,68 (1H, dd, J = 12,0, 3,5 Hz, H-9), 1,58 (3H, s, H-18), 1,42 (1H, d, J = 12,5 Hz, H-5), 1,30 (1H, m, H-1b), 1,05 (3H, d, J = 6,4 Hz, H-17), 0,95 (3H, s, H-20).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 210,5 (C-7), 178,5 (C-18), 175,7 (C-16), 150,5 (C-13), 122,8 (C-15), 79,0 (C-3), 76,3 (C-6), 59,5 (C-5), 52,0 (C-8), 50,8 (C-4), 50,9 (C-21), 47,0 (C-9), 41,5 (C-14), 37,6 (C-1), 37,7 (C-10), 28,0 (C-11), 28,5 (C-2), 26,8 (C-19), 25,0 (C-12), 14,3 (C-17), 14,5 (C-20).

Chất số (4) (Pseudo-erythroamin): Dạng bột vô định hình màu vàng nhạt; $[\alpha]_D^{24}$ -30,5 (*c* 0,20, MeOH); ESI-MS *m/z*: 431,2, $[M+Na]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,76 (1H, brs, H-15), 4,52 (1H, dd, *J* = 12,0, 1,2 Hz, H-6), 3,70 (3H, s, H-21), 3,60 (3H, s, H-22), 3,75 (1H, m, H-12a), 3,25 (1H, dd, *J* = 12,2, 4,0 Hz, H-3), 2,95 (1H, s, m, H-14), 2,80 (1H, m, H-8), 2,15 (1H, m, H-2a), 2,10 (1H, m, H-11a), 2,05 (1H, m, H-12b), 1,95 (1H, m, H-1a), 1,78 (1H, m, H-2b), 1,30 (1H, m, H-11b), 1,70 (1H, dd, *J* = 12,0, 3,5 Hz, H-9), 1,65 (3H, s, H-19), 1,40 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-5), 1,30 (1H, m, H-1b), 1,15 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, H-17), 0,90 (3H, s, H-20).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 210,8 (C-7), 177,5 (C-19), 170,2 (C-16), 165,5 (C-13), 115,0 (C-15), 79,0 (C-3), 76,8 (C-6), 59,0 (C-5), 52,1 (C-8), 50,2 (C-4), 51,0 (C-21), 47,3 (C-9), 41,2 (C-14), 37,8 (C-1), 37,8 (C-10), 28,5 (C-11), 28,6 (C-2), 177,8 (C-19), 24,0 (C-12), 15,0 (C-17), 14,2 (C-20).

Chất số (5) (Erythrofordin U): Dạng dầu không màu. $[\alpha]_D^{24}$ +20,5 (*c* 0.15, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,70 (1H, m, H-1a), 1,08 (1H, m, H-1b), 1,65 (1H, m, H-2a), 1,42 (1H, m, H-2b), 2,80 (1H, m, H-3a), 1,20 (1H, m, H-3b), 1,40 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-5), 4,60 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-6), 2,62 (1H, m, H-8), 1,80 (1H, m, H-9), 2,30 (1H, m, H-11a), 2,12 (1H, m, H-11b), 5,50 (1H, t, *J* = 3,5 Hz, H-12), 2,70 (1H, m, H-14), 3,05 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-15a), 3,15 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-15b), 0,90 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H-17), 1,45 (3H, s, H-19), 0,95 (3H, s, H-20), 3,65 (3H, s, H-21), 3,75 (3H, s, H-22).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 38,5 (C-1), 20,5 (C-2), 40,5 (C-3), 45,0 (C-4), 59,0 (C-5), 78,2 (C-6), 210,5 (C-7), 48,5 (C-8), 45,0 (C-9), 35,0 (C-10), 25,2 (C-11), 125,0 (C-12), 135,8 (C-13), 32,0 (C-14), 41,6 (C-15), 175,6 (C-16), 14,5 (C-17), 30,0 (C-18), 178,6 (C-18), 14,0 (C-20), 52,5 (C-21), 52,8 (C-22).

2.4. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng viêm

Sự xác định nồng độ NO dựa trên sự chuyển đổi nitrat thành nitrite bằng enzym nitrate reductase. Phản ứng được thực hiện khi đo chất màu nitrite, một sản phẩm phản ứng Griess. Phản ứng Griess dựa trên phản ứng diazot hóa NO_2^- tạo ra một tác nhân nitrat hóa và phản ứng với axit sulfanilic để tạo ra ion diazonium. Sau đó, ion này kết hợp với ethylenediamine N-(1-naphthyl) để tạo ra dẫn xuất azo nghiêm sắc thể hấp thụ ánh sáng ở bước sóng trong khoảng 540 - 570 nm. Dòng tế bào kháng viêm macrophage RAW264.7 (ATCC, Rockville, MD, Mỹ) được nuôi trên đĩa petri trong môi trường nuôi cấy Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Sigma, St. Louis, MO, Mỹ) với 10% FBS (fetal bovine serum, Sigma, Mỹ), 100 đơn vị/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin trong tủ ấm (5% CO_2) ở nhiệt độ 37°C. Tế bào được tách ra khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy và tiến hành ly tâm với tốc độ 1000 vòng trong 3 phút. Loại bỏ môi trường giữ lại phần cần có chứa tế bào, thêm vào 10 mL môi trường DMEM-FBS 10% sau đó tiến hành đếm số lượng tế bào và pha loãng tế bào trong môi trường nuôi cấy đến mật độ thích hợp. Nồng độ của NO trong môi trường nuôi cấy được đánh giá dựa trên phản ứng của NO

với thuốc thử Griess. 100 μL dịch môi trường nuôi cấy được pha trộn với 100 μL hỗn hợp đồng thể tích của thuốc thử Griess (1% sulfanilamide pha trong 5% axit phosphoric và 0,1% naphthylethylenediamin dihydrochlorid pha trong nước). Hỗn hợp sau pha trộn được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng dưới điều kiện tránh ánh sáng. Tiến hành đo bước sóng hấp thụ tại 540 nm bằng máy đọc 96 giếng và xác định phần trăm nồng độ ức chế và nồng độ ức chế IC_{50} theo công thức bên dưới. Natri nitrit được sử dụng để xây dựng đường chuẩn của NO dựa trên nhiều nồng độ khác nhau (0; 12,5; 25,0; 50,0; và 100,0) và tiến hành đo độ hấp thụ quang ở cùng bước sóng 540 nm.

$$\text{Nồng độ ức chế (\%)} = [1 - (B - C)/(A - C)] \times 100$$

Trong đó, A: LPS (+), mẫu thử (-); B: LPS (+), mẫu thử (+); C: LPS (-), mẫu thử (-).

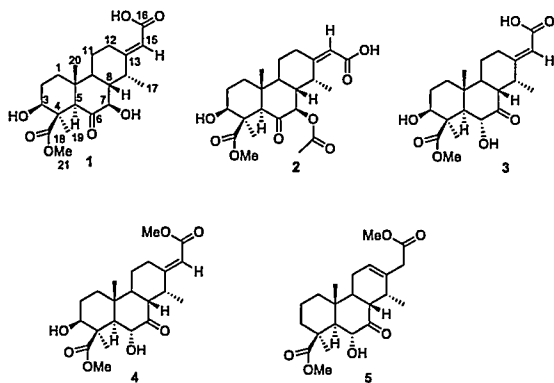
- Đánh giá nồng độ của protein iNOS và COX-2 bằng phương pháp Western blot: Tế bào RAW264.7 được rửa với PBS, ủ và ly giải với dung dịch đệm [10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3PO_4 , 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 20 mM đệm Tris (pH 7,9), 100 mM β -glycerophosphat, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA] trong đá khoảng 1 giờ. Sau đó ly tâm với tốc độ 12000 vòng trong 30 phút ở 4 °C và rửa protein nhiều lần với PBS. Sau đó hòa tan protein trong PBS lạnh chuẩn bị cho điện di gel. Tiến hành nạp 20 - 30 μg protein, phân tách các protein bằng phương pháp điện di gel với 10% SDS-PAGE. Kết thúc quá trình điện di, chuyển các protein tách được trên gel sang màng polyvinyliden difluorid. Sau khi chuyển từ gel sang màng, các protein trên màng được bất hoạt với 5% skim milk ở nhiệt độ phòng trong dung dịch Tris-buffer saline-Tween (TBST; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20). Màng sau đó được ủ với kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) anti-iNOS hoặc anti-COX2 (tỷ lệ pha loãng 1:1000) trong 5% sữa bột không béo/TBST trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng sau khi ủ với kháng thể được rửa 3 lần với TBST ở nhiệt độ phòng và ủ tiếp với kháng thể thứ cấp IgG (antimouse IgG secondary antibody, Sigma, St. Louis, MO, Mỹ) với tỷ lệ pha loãng 1:2000 trong 2,5% sữa bột không béo/TBST trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng chứa protein tiếp tục được rửa 3 lần với TBST và các phản ứng protein miễn dịch được phát hiện bằng các phản ứng quang hóa (chemiluminescence-ECL, Amersham International PLC, Buckinghamshire, Anh) sử dụng hyperfilm và các thuốc thử quang hóa. Kết quả Western blot được định lượng bằng cách đo tương quan mật độ quang so với mẫu đối chứng bằng phần mềm Fujifilm Image Reader Las-4000 (FujiFilm Corp., Tokyo, Nhật Bản).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Cấu trúc của các hợp chất hóa học phân lập được

Hợp chất số (1) thu được dưới dạng bột màu trắng, có độ nóng chảy là 139-140°C. Phổ khối FAB-MS của (1) thể hiện đỉnh ion giả phân tử tại *m/z* 395,2, đỉnh này phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_7$. Phổ $^1\text{H NMR}$ và $^{13}\text{C NMR}$ cho thấy đây là một hợp chất có đặc trưng dạng diterpenoid khung cassaine với nhóm β -carbomethoxy tại C-4 [3, 6]. Các tín hiệu phổ trên trùng khớp với hợp chất chính có khung cassain diterpenoid ở cây lim xanh có tên là

erythrofordin A dựa theo sự so sánh với thông tin từ các công bố khoa học trước [3]. Do đó, cấu trúc của (1) đã được xác định là erythrofordin A.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất (1-5)

Hợp chất số (2) được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng, có độ truyền quang $+40^\circ$ (c 0,2, MeOH). Công thức phân tử của 2 được xác định là $C_{23}H_{32}O_8$ theo tính toán từ một mũi ion phân tử được proton hóa ở m/z 437,2 $[M+H]^+$ trong phổ khối FAB-MS. So sánh của phổ 1H và ^{13}C NMR của (2) với phổ của hợp chất erythrofordin A (1) cho thấy hai hợp chất này có cấu trúc tương tự với nhau. Tuy nhiên hai hợp chất có sự khác biệt, đó là sự xuất hiện thêm một nhóm acetoxyl tại δ 1,90 (3H, s, H-23) và δ_C 177,5 (C-22), và 22,5 (C-23) trong cấu trúc của hợp chất (2). Từ dữ liệu phổ trên cùng với sự so sánh dữ liệu phổ từ các công bố khoa học trước, cấu trúc của (2) đã được xác định là erythrofordin B (2), hợp chất này đã được chiết ra từ lim xanh thu hái ở Trung Quốc [3].

Hợp chất số (3) thu được dưới dạng bột vô định hình không màu và có công thức phân tử $C_{21}H_{30}O_7$ được dựa theo phổ khối FAB-MS. Các tín hiệu phổ cho thấy, giống như chất (1) và (2), hợp chất (3) cũng là một diterpenoid có khung cassaine với nhóm β -carbomethoxy tại vị trí C-4 [3, 6]. So với chất số (1) và (2), tín hiệu proton H-5 của hợp chất số (3) được dịch chuyển lên trên δ 1,42 (1H, d, $J = 12,5$ Hz) và được ghép với proton ở δ 4,52 (1H, dd, $J = 12,0, 1,2$ Hz, H-6). Do đó, nhóm hydroxyl được chỉ định tại C-6 và nhóm carbonyl đã dịch chuyển sang vị trí C-7, vị trí này còn gọi là 6 α -hydroxy-7-keto. Đồng thời, so sánh với công bố khoa học trước đây, cấu trúc của 3 đã được xác định là erythrofordin C [3].

Hợp chất 4 thu được dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Dữ liệu phổ ESI-MS của 4 cho thấy có một đỉnh ion giả phân tử ở m/z 431,2 $[M+Na]^+$ được xác định là công thức phân tử $C_{22}H_{32}O_7$. Tương tự như 1, hợp chất 4 cũng cho thấy tín hiệu carbon và proton đặc trưng cho nhóm -carbomethoxy tại C-4. Hơn nữa, bằng chứng trên phổ 1H và ^{13}C của 4 cho thấy có một nhóm 6 α -hydroxy-7-keto giống như ở cấu trúc 3. Do đó, cấu trúc của 4 là pseudo-erythroamin [9].

Hợp chất số 5 thu được dưới dạng dầu không màu. Phổ EI-MS của 5 có một đỉnh ion phân tử xuất hiện ở m/z 392,2 $[M]^+$ gợi ý cho công thức phân tử của 5 là $C_{22}H_{32}O_6$. Phổ 1H và ^{13}C NMR của 5 cho thấy có ba tín hiệu carbonyl ở δ 210,5 (C-7), 178,6 (C-18) và 175,6 (C-16), một cặp carbon olefinic ở δ 125,0 (C-12), 135,8 (C-13), một oxymethine ở

δ 78,2 (C-6) và một exocyclic carbon metylen ở δ 41,6 (C-15). Cấu trúc của 5 được so sánh với tài liệu khoa học công bố từ trước có tên là erythrofordin U [10]. Cấu trúc của các hợp chất này được trình bày tại Hình 1.

3.2. Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất hóa học

Bảng 1. Kết quả ức chế khả năng sản sinh NO từ tế bào RAW264.7

Phân đoạn/Hợp chất	Giá trị ức chế 50% IC ₅₀ value (μ M) ^{a)}
<i>n</i> -hexane ^{b)}	> 300 μ g/mL
CH ₂ Cl ₂	112,6 \pm 15,7 μ g/mL
EtOAc	248,5 \pm 14,2 μ g/mL
1	23,5 \pm 1,6
2	12,5 \pm 1,8
3	46,5 \pm 3,7
4	45,0 \pm 2,8
5	> 100
Celastrol ^{c)}	1,0 \pm 0,1

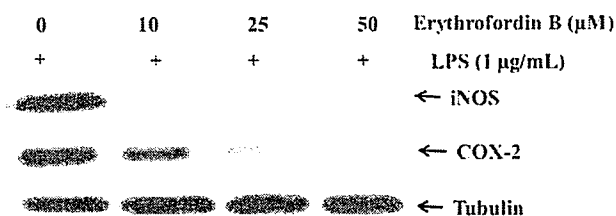
^{a)} Giá trị nồng độ ức chế 50% (IC₅₀ μ M) khi so sánh với lô đối chứng. ^{b)} Giá trị ức chế của dịch chiết đo ở nồng độ μ g/mL.

^{c)} Chất đối chứng dương. S.D $n = 3$.

Để kiểm tra tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất (1-5) lên các tế bào RAW 264.7, chúng tôi đã đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) trên các nhóm tế bào có mặt LPS và không có LPS. Kết quả cho thấy, các hợp chất (1-5) không có ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào trong các nhóm tế bào ngay cả ở nồng độ cao là 100 μ M sau 24 giờ ủ. Để kiểm tra hoạt động ức chế sản sinh NO, các tế bào RAW 264.7 được xử lý bằng các hợp chất phân lập với dải nồng độ 0-100 μ M và mức độ sản sinh NO sau khi bị gây viêm bởi LPS được xác định bằng nồng độ nitrite có trong chất nổi trên bề mặt thu được khi nuôi cấy tế bào. Theo kết quả trong Bảng 1, chất số (5) cho thấy có tác dụng rất yếu khi ức chế sản xuất NO với giá trị lớn hơn 100 μ M. Chất này được xem là không có tác dụng. Trong khi đó, các hợp chất (3) và (4) ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ tương ứng là 46,5 \pm 3,7, 45,0 \pm 2,8 μ M. Hợp chất (1) có giá trị IC₅₀ là 23,5 \pm 1,6 μ M, tuy nhiên, hợp chất (2) có giá trị ức chế mạnh nhất so với các chất khác với giá trị IC₅₀ là 12,5 \pm 1,8 μ M. Trong thí nghiệm này, celastrol, một chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên được sử dụng làm đối chứng dương, chất này ức chế sản phẩm NO do LPS gây ra với giá trị IC₅₀ là 1,0 μ M.

Hợp chất (2) cho thấy, có tác dụng ức chế mạnh đối với việc sản sinh NO do LPS tạo ra trong các tế bào RAW 264.7 khi bị gây viêm. Do đó, chúng tôi lựa chọn chất (2) để thử nghiệm kiểm soát tác dụng ức chế lên các enzyme cảm ứng nitric oxide synthase (iNOS) và cyclooxygenase-2 (COX-2). iNOS là một trong ba enzyme chính tạo ra oxit nitric (NO) từ axit amin L-arginine. NO có nguồn gốc từ iNOS đóng vai trò quan trọng trong nhiều biểu hiện sinh lý bệnh như điều hòa huyết áp, gây viêm, nhiễm trùng, và gây ra các bệnh ác tính. iNOS đã được nghiên cứu là điểm đánh dấu và là mục tiêu trị liệu trong những bệnh trên, đặc biệt là viêm. Trong khi đó, COX-2 là enzyme chịu trách nhiệm sản xuất các chất trung gian gây viêm là prostaglandins

(PG) và các chất chuyển hóa của chúng như PGE2, PGF2 α và PGD2. Nồng độ protein của cả hai enzyme iNOS và COX-2 không được phát hiện trong các tế bào RAW 264.7 khi không được kích thích với LPS. Tuy nhiên, khi tế bào bị kích thích viêm bởi LPS, các cytokine này được điều chỉnh tăng rõ rệt về mức độ protein (Hình 2). Đáng chú ý, khi tăng nồng độ hợp chất số (2) từ 0 đến 50 μ M, nồng độ protein của cả hai enzyme iNOS và COX-2 đã bị giảm dần trong các tế bào bị kích thích bởi LPS. Điều này cho thấy, hợp chất số (2) đã có tác dụng ức chế sự biểu hiện các enzyme gây viêm theo nồng độ. Để kiểm chứng, trong thời gian ủ, biểu hiện của protein alpha-tubulin không thay đổi.



Hình 2. Sự ức chế biểu hiện protein iNOS do LPS trong các tế bào RAW264.7 của erythrofordin B (2)

Các tế bào RAW264.7 được xử lý trước 30 phút với erythrofordin B (2) (0-50 μ M) sau đó được kích thích bằng LPS (1 μ g/mL) trong 24 giờ. Các protein được định vị bằng các kháng thể được chỉ định đặc hiệu. Mức độ biểu hiện của α -tubulin được sử dụng làm kiểm chứng. Các biểu hiện của iNOS và COX-2 được xác định bằng phân tích immunoblot phát hiện protein bằng điện di trên gel SDS-PAGE.

4. Kết luận

Từ phân đoạn methylene dichloride chiết xuất từ lá cây lim xanh *E. fordii* Oliver thu hái ở Quảng Nam, 5 hợp chất thuộc khung cassain diterpenoid là erythrofordin A (1), erythrofordin B (2), erythrofordin C (3), pseudo-erythrosumin (4) và erythrofordin U (5) đã được phân lập, các hợp chất này cũng đã được công bố có trong lá và rễ lim xanh của Trung Quốc. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng viêm trên mô hình ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 bị kích thích bởi LPS cho thấy, erythrofordin B (2) ức chế NO mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là

12,5 \pm 1,8 μ M. Khi tăng nồng độ hợp erythrofordin B (2) từ 0 đến 50 μ M, biểu hiện protein của hai enzyme iNOS và COX-2 đã giảm dần trong các tế bào bị kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy, hợp chất erythrofordin B (2) có thể ức chế sự sản sinh NO trong quá trình viêm của tế bào.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (Nafosted) trong đề tài mã số 104.01-2017.57.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y Học, 2005.
- [2] Qu J, Hu YC, Yu SS, Chen XG, Li Y. "New cassaine diterpenoid amides with cytotoxic activities from the bark of *Erythrophleum fordii*", *Planta Medica*, 2006, 72(5), pp. 442-449.
- [3] Tsao CC, Shen YC, Su CR, Li CY, Liou MJ, Dung NX, Wu TS. "New diterpenoids and the bioactivity of *Erythrophleum fordii*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16(22), pp. 9867-9870.
- [4] Du D, Qu J, Wang JM, Yu SS, Chen XG, Xu S, Ma SG, Li Y, Ding GZ, Fang L. "Cytotoxic cassaine diterpenoid-diterpenoid amide dimers and diterpenoid amides from the leaves of *Erythrophleum fordii*", *Phytochemistry*, 2010, 71(14-15), pp. 1749-1755.
- [5] Du D, Fang L, Qu J, Yu S, Ma S, Lv H, Liu J, Liu Y, Wang J, Wang X. "Oleanane-type triterpene saponins and cassaine-type diterpenoids from *Erythrophleum fordii*", *Planta Medica* 2011, 77(14), pp. 1631-1638.
- [6] Li L, Chen L, Li Y, Sun S, Ma S, Li Y, Qu J. "Cassane and nor-cassane diterpenoids from the roots of *Erythrophleum fordii*" *Phytochemistry* 2020, 174, pp. 112343.
- [7] Hung TM, Cuong TD, Kim JA, Tae N, Lee JH, Min BS. "Cassaine diterpene alkaloids from *Erythrophleum fordii* and their anti-angiogenic effect", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014, 24(1), pp. 168-172.
- [8] Hung TM, Cuong TD, Kim JA, Lee JH, Woo MH, Min BS. "In vitro apoptotic effect of cassaine-type diterpene amides from *Erythrophleum fordii* on PC-3 prostate cancer cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014, 24(21), pp. 4989-4994.
- [9] Huang X, Chen Z, Zhou S, Huang P, Zhuo Z, Zeng S, Wang L, Wang Y, Xu C, Tian H. "Cassaine diterpenoids from the seeds of *Erythrophleum fordii* and their cytotoxic activities", *Fitoterapia* 2018, 127, pp. 245-251.
- [10] Ha MT, Tran MH, Phuong TT, Kim JA, Woo MH, Choi JS, Lee S, Lee JH, Lee HK, Min BS. "Cytotoxic and apoptosis-inducing activities against human lung cancer cell lines of cassaine diterpenoids from the bark of *Erythrophleum fordii*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2017, 27(13), pp. 2946-2952.

(BBT nhận bài: 29/4/2020, hoàn tất thủ tục phân biên: 25/8/2020)