

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



Trần Thị Thu Hiền

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG UNG THƯ
CỦA THÂN LÁ CÂY CỬ DÒM
(*Stephania dielsiana* Y.C. Wu)**

Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền
Mã số: 972.02.06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2022

Công trình hoàn thành tại:

- Viện Dược liệu
- Học viện Y – Dược học cổ truyền Việt Nam
- Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội
- Viện Hóa sinh biển (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)
- Viện Nghiên cứu tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Lê Thị Kim Vân
2. PGS. TS. Nguyễn Quốc Huy

Phản biện 1:**Phản biện 2:****Phản biện 3:**

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện tổ chức tại Viện Dược liệu.

Vào hồi.....giờ....., ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm đọc Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội.
- Thư viện Viện Dược liệu.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu có tên thường dùng là củ dòm, là một trong các loài thuộc chi *Stephania* Lour. đang được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Các nghiên cứu về *Stephania dielsiana* Y.C. Wu đã xác định các đặc điểm thực vật; phân lập và xác định cấu trúc của một số alkaloid có trong thân lá và củ của cây như L-tetrahydropalmin, oxostephanin, dehydrocrebanin, thailandin, crebanin; xây dựng được phương pháp định lượng chất oxostephanin và bước đầu xác định một số thông số phục vụ thiết lập chất này làm chất đối chiếu dùng trong kiểm nghiệm và nghiên cứu dược liệu củ dòm. Một số phân đoạn và chất tinh khiết được chiết xuất và phân lập từ củ dòm có tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư, tác dụng giải lo âu, an thần và chống trầm cảm, chống viêm giảm đau, ức chế acetylcholinesterase.

Trong các hoạt chất đã được phân lập từ củ dòm, oxostephanin được tập trung nghiên cứu nhiều hơn. Thử nghiệm *in vitro* cho thấy chất này có nhiều tác dụng sinh học đáng lưu ý, đặc biệt là tác dụng kháng tế bào ung thư. Hàm lượng oxostephanin trong các mẫu thân lá cao hơn nhiều lần so với mẫu củ. Sử dụng thân lá có nhiều ưu điểm hơn so với sử dụng củ vì có thể thu hái được nhiều lần trong năm, đồng thời khi thu hái một phần thân lá, cây vẫn sống và tiếp tục phát triển. Tuy nhiên hiện vẫn chưa có nghiên cứu đánh giá về việc nên thu hái thân lá vào thời điểm nào trong năm để thu được hàm lượng hoạt chất cao mà vẫn đảm bảo phát triển cây thuốc này. Bên cạnh oxostephanin và một số ít các hợp chất đã được công bố, trong thân lá củ dòm còn các hợp chất nào khác, tác dụng sinh học và cơ chế tác dụng của các hợp chất này ra sao cũng chưa được nghiên cứu và làm rõ.

Tiếp nối kết quả của các nghiên cứu trước đây, để góp phần làm rõ thêm về thành phần hoá học có trong thân lá cây củ dòm và đánh giá tác dụng cũng như cơ chế tác dụng kháng ung thư của các hợp chất, đặc biệt là oxostephanin, luận án tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá tác dụng kháng ung thư của thân lá cây củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu)”**.

2. Mục tiêu và nội dung của Luận án

2.1. Mục tiêu của Luận án

Mục tiêu 1. Chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc của một số hợp chất từ thân lá cây củ dền.

Mục tiêu 2. Bước đầu xây dựng được phương pháp phân lập và phương pháp định lượng để theo dõi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu theo thời gian thu hái.

Mục tiêu 3. Đánh giá được tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập và bước đầu nghiên cứu được cơ chế kháng ung thư của oxostephanin.

2.2. Nội dung của Luận án

- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất từ thân lá cây củ dền
 - Chiết xuất và phân lập một số hợp chất từ thân lá cây củ dền
 - Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất đã phân lập được
- Bước đầu nghiên cứu xây dựng phương pháp phân lập và phương pháp định lượng để theo dõi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu theo thời gian thu hái
 - Phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin từ thân lá cây củ dền
 - Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dền
 - Đánh giá sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái
- Đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập và bước đầu nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của oxostephanin
 - Đánh giá tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được
 - Nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của oxostephanin.

3. Những đóng góp mới của Luận án

3.1. Về hóa học

Từ thân lá loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 11 hợp chất, trong đó:

- 2 hợp chất mới là 2 alcaloid (Stedieltin A và Stedieltin B);
- 1 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Stephania* Lour.

(aristolactam)

- 4 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu (oxostephanosin, 4-hydroxybenzaldehyd; benzyl β -D-glucopyranosid, (6*R*,9*S*)-roseosid).

Luận án đã bước đầu nghiên cứu phương pháp phân lập và phương pháp định lượng oxostephanin trong dược liệu. Luận án là công bố đầu tiên về sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dôm theo thời gian thu hái.

3.2. Về tác dụng sinh học

Luận án là công bố đầu tiên về:

- Tác dụng gây độc trên 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm của các hợp chất Stedieltin A, Stedieltin B, oxostephanosin, oxocrebanin.

- Cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin trên tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 và 3 dòng tế bào thường là hUECs, UCMSCs và hFBs.

4. Ý nghĩa của luận án

Đây là một công trình nghiên cứu tổng thể, có hệ thống về thành phần hóa học và tác dụng kháng ung thư của thân lá loài củ dôm (*Stephania dielsiana* Y.C. Wu) thu hái ở Việt Nam. Các kết quả nghiên cứu của luận án đều là những đóng góp mới về cơ sở dữ liệu hóa học và sinh học của củ dôm ở Việt Nam.

Những kết quả nghiên cứu về hóa học của củ dôm đã bổ sung vào cơ sở dữ liệu các hợp chất thiên nhiên thông tin mới về 2 hợp chất alcaloid lần đầu tiên phân lập từ tự nhiên, cung cấp dữ liệu khoa học về thành phần hóa học của dược liệu củ dôm, phục vụ cho việc sàng lọc, tìm kiếm các hoạt chất có hoạt tính chống ung thư tiềm năng trong loài này.

Luận án đã thu thập và xác định được hàm lượng oxostephanin của 13 mẫu củ dôm ở 3 địa điểm khác nhau là Quán Bạ (Hà Giang), Ba Vì (Hà Nội) và thành phố Bắc Giang (Bắc Giang) theo thời gian thu hái khác nhau. Kết quả nghiên cứu về hàm lượng oxostephanin của luận án đã cung cấp cơ sở dữ liệu về thành phần hóa học đáng lưu ý của loài này ở các vùng và các thời điểm thu hái khác nhau, định hướng cho việc khai thác, bảo tồn, phát triển dược liệu củ dôm.

Ngoài ra, kết quả của luận án đã góp phần giải thích, chứng minh

công dụng của dược liệu thân lá củ dôm dựa trên căn cứ khoa học, làm sáng tỏ việc sử dụng cây thuốc này theo tri thức dân gian dưới góc nhìn khoa học hiện đại, làm tiền đề cho việc phát triển sản phẩm từ loài này, vừa phục vụ nhu cầu chăm sóc sức khỏe cộng đồng, vừa góp phần vào công tác bảo tồn, khai thác, phát triển sản phẩm từ củ dôm giúp phát triển kinh tế cho người dân ở địa phương.

5. Bố cục của luận án

Luận án có 149 trang, gồm 4 chương, 33 bảng, 61 hình, 171 tài liệu tham khảo và 6 phụ lục. Các phần chính trong luận án: Đặt vấn đề (2 trang), Tổng quan (34 trang), Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (24 trang), Kết quả nghiên cứu (62 trang), Bàn luận (25 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang).

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Đã tổng hợp và trình bày một cách hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước đến nay về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu. trên thế giới và ở Việt Nam. Ngoài ra luận án cũng đã trình bày một số mục tiêu phân tử trong điều trị ung thư, trong đó tập trung vào Aurora kinase, đặc điểm, vai trò trong ung thư và một số chất ức chế Aurora kinase.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu phục vụ các nội dung chiết xuất, phân lập và đánh giá tác dụng sinh học là thân lá của cây củ dôm thu hái tại xã Tân Lĩnh – Ba Vì (Hà Nội) vào tháng 10/2019, được giám định tên khoa học là *Stephania dielsiana* Y.C.Wu, họ Tiết dê (Menispermaceae) (mã tiêu bản SD10/2019). Mẫu được lưu tại Bộ môn Thực vật – Dược liệu, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam.

Nguyên liệu phục vụ nội dung đánh giá sự thay đổi hàm lượng hoạt chất theo thời gian thu hái được trồng tại xã Song Mai – thành phố Bắc Giang – tỉnh Bắc Giang từ nguồn giống gốc ở Ba Vì từ tháng 8/2019. Thu hái phần thân lá non (đoạn thân lá dài khoảng 1m tính từ đầu ngọn), thời gian bắt đầu từ tháng thứ 6 sau khi trồng trong khoảng từ tháng 02 – 12/2020 (ký hiệu mẫu D1 – D9). Mẫu đánh giá hàm lượng còn được thu

hái tại Quán Bạ - Hà Giang tháng 3/2019 (ký hiệu QB), Ba Vì - Hà Nội vào tháng 3/2019, tháng 5 và tháng 10/2020 (ký hiệu lần lượt là BV, BV1 và BV2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ FT-IR, UV-Vis, ESI-MS, HR-EI-MS, NMR 1 chiều và 2 chiều.
- Phân lập oxostephanin, xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng và theo dõi sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu theo thời gian thu hái bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).
- Đánh giá tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư thực nghiệm của một số hợp chất phân lập được bằng phương pháp so sánh hình thái và thử nghiệm MTS.
- Nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 của oxostephanin bằng phương pháp theo dõi tế bào theo thời gian thực, phương pháp miễn dịch huỳnh quang, đánh giá quá trình chết theo chương trình (apoptosis), phân tích khối u đa bào, RT-PCR định lượng.
- Nghiên cứu tác dụng của oxostephanin trên các dòng tế bào thường gồm hUEVCs, UC-MSCs, hFBs bằng phương pháp nhuộm SRB, thử nghiệm hình thành khuẩn lạc, phân tích sự tiết các yếu tố tăng trưởng bằng thử nghiệm Luminex, thử nghiệm chữa lành vết thương và thử nghiệm hình thành mạch.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chiết xuất, phân lập các hợp chất

3.1.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế

Dược liệu thân lá cây củ dền khô (7 kg) được nghiền nhỏ và chiết ngâm với methanol ở nhiệt độ phòng 3 lần x 3 ngày, với tỷ lệ dược liệu/dung môi = 1/7. Lọc, gộp dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 680 g cao methanol.

Hòa tan cồn methanol với 2,5 lít dung dịch HCl 10% sau đó chiết lỏng - lỏng với ethyl acetat 3 lần x 3 lít/ lần. Gộp các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cồn ethyl acetat không chứa alcaloid (SDE-I). Phần dịch còn lại được trung hòa bằng NaOH đến dung dịch có pH 10. Sau đó tiếp tục chiết lỏng - lỏng với ethyl acetat 3 lần x 3 lít/ lần.

Gộp các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn 65 g cặn ethyl acetat chứa lớp chất alcaloid (SDE-II).

Phân tách cặn SDE-II (65 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient dichloromethan/methanol (100% dichloromethan → 100% methanol) thu được 5 phân đoạn (SDE1 - SDE5). Phân tách phân đoạn trên bằng sắc ký cột pha thuận và pha đảo thu được 11 hợp chất tinh khiết ký hiệu là SD1 – SD11.

3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

Dựa vào phổ khối lượng (ESI-MS), phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều, hai chiều (NMR) và đối chiếu với các tài liệu tham khảo, đã xác định được cấu trúc của 11 hợp chất.

* **Hợp chất SD1: Stedieltin A (chất mới)** dạng bột màu nâu đỏ. Phổ khối HR-QTOF-MS m/z 354,0979 $[M + H]^+$, CTPT $C_{19}H_{15}NO_6$. **Phổ 1H -NMR** (500 MHz, DMSO- d_6) và **^{13}C -NMR** (125 MHz, DMSO- d_6) của **SD1** có nhiều điểm tương đồng với dữ liệu phổ của oxostephanin cho thấy **SD1** cũng có cấu trúc bộ khung là dẫn xuất của oxoaporphin. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy sự xuất hiện của 19 carbon, bao gồm 15 carbon vòng thơm, một carbon của nhóm methoxy gắn vào vòng thơm 8-OCH₃ (δ_C 55,9), một nhóm methylenedioxy (C-12, δ_C 101,9) và một nhóm methoxy (δ_C 51,2) của nhóm ester C=O (δ_C 167,0). Tín hiệu của nhóm carbonyl ở C-7 (δ_C 179,69) của oxostephanin đã bị thay thế bởi một tín hiệu ở δ_C 167,0, điều này cho thấy có sự biến đổi ở vòng C của khung oxoaporphin. Kết hợp với sự khác nhau của chỉ số bất bão hòa của hai hợp chất (oxostephanin: $\Delta=14$; **SD1**: $\Delta=13$) hỗ trợ cho sự mở vòng C của khung chất. Nhóm hydroxyl (-OH) được xác định dựa vào tín hiệu ở C-7a (δ_C 145,0), phù hợp với carbon thơm bị oxy hóa. Thêm vào đó, sự xuất hiện hai tín hiệu riêng biệt của hai proton của nhóm methylenedioxy (δ_H 6,14 và 6,15) ở H-12 cũng góp phần minh chứng cho sự mở vòng C. Phổ HMQC cho thấy sự tương tác giữa H-3 (δ_H 7,44) với C-3 (δ_C 102,1), giữa H-4 (δ_H 7,81, d, $J=5,5$ Hz) với C-4 (δ_C 121,9), giữa H-5 (δ_H 8,28, d, $J=5,5$ Hz) và C-5 (δ_C 139,9), giữa H-9 (δ_H 7,00, dd, $J=8,0$ Hz, 1,0 Hz) với C-9 (δ_C 111,8), giữa H-10 (δ_H 6,81, t, $J=8,0$ Hz) với C-10 (δ_C 118,1), giữa H-11 (δ_H 6,67, dd, $J=8,0$ Hz, 1,0 Hz) với C-11 (δ_C 123,7), giữa H-12 (δ_H 6,11) với C-12 (δ_C 101,9), giữa proton 7-OCH₃ (δ_H 3,14) với carbon C-7 thế -OCH₃ (δ_C 51,2).

Phổ 1H -NMR và COSY cho thấy sự xuất hiện của các hệ spin

tương tự oxostephanin, bao gồm hệ spin H-4 (δ_H 7,81)/H-5 (δ_H 8,28), H-9 (δ_H 7,00)/H-10 (δ_H 6,81)/H-11 (δ_H 6,67), đồng thời cùng với một tín hiệu singlet ở δ_H 7,44. Cụ thể hơn, phổ COSY xuất hiện một số tương tác gần, xác định được các proton cạnh nhau như H-4 (δ_H 7,81, d, $J = 5,5$ Hz) tương tác với H-5 (δ_H 8,28, d, $J = 5,5$ Hz). Hai proton này trên liên kết đôi có cấu hình dạng *cis* do hằng số tương tác giữa hai proton thấp ($J = 5,5$ Hz). Phổ COSY cũng cho thấy H-9 (δ_H 7,00, dd, $J = 8,0, 1,0$ Hz) tương tác với H-10 (δ_H 6,81, t, $J = 8,0$ Hz) và H-10 tương tác lên H-11 (δ_H 6,67, dd, $J = 8,0, 1,0$ Hz) do đó 3 proton này cạnh nhau. Về các nhóm thế trên hệ vòng thơm, các nhóm thế như methylenedioxy (δ_H 6,14 và 6,15) và methoxy (δ_H 3,83) vẫn được giữ nguyên vị trí trên vòng qua các tương tác HMBC quan trọng, cụ thể là H-12 (δ_H 6,14 và 6,15) /C-1 (δ_C 150,0), C-2 (δ_C 147,5) và 8-OCH₃ (δ_H 3,83) /C-8 (δ_H 147,5). Tuy nhiên, sự xuất hiện của tín hiệu methyl tại δ_H 3,14 và δ_C 51,2 cùng với tương tác HMBC của 7-OCH₃/ C-7 gợi ý cho sự xuất hiện của một nhóm methyl ester trong cấu trúc.

Dữ liệu phổ 1D- và 2D-NMR của **SD1** cho thấy hệ thống vòng thơm của khung oxoaporphin đã bị thay đổi ở vòng C, trong khi vòng A, B, D vẫn giữ nguyên, cụ thể là vòng C đã bị mở, và nhóm carbonyl đã được chuyển thành nhóm ester ở vị trí C-6a và một nhóm methoxy ở C-7. Đây là hợp chất mới, lần đầu có sự mở vòng tại hai vị trí C-7 và C-7a, cũng là hợp chất mới lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên và được đề xuất đặt tên là **stedieltin A**.

*** Hợp chất SD2: Stedieltin B (chất mới):** chất kết tinh hình kim, màu trắng. Phổ khối HR-QTOF-MS m/z 294,0766 [M+H]⁺, CTPT C₁₇H₁₁NO₄. **Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃ + MeOD (9/1 v/v) và DMSO-*d*₆) và **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃ + MeOD (9/1 v/v) và DMSO-*d*₆) cho thấy nhiều tín hiệu tương đồng với dữ liệu phổ của hợp chất oxostephanin, bao gồm tín hiệu đặc trưng của một nhóm methoxy tại δ_H 3,93 (3H, s) và các tín hiệu proton ở các vòng thơm bao gồm một tín hiệu singlet tại δ_H 6,91 (1H, s), hai tín hiệu proton trên liên kết đôi tại δ_H 7,06 (1H, d, $J = 6,0$ Hz) và 7,82 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), liên kết đôi này có cấu hình dạng *cis* dựa trên hằng số tương tác với giá trị trung bình ($J = 6,0$ Hz), 3 tín hiệu của 3 proton olefinic cạnh nhau tại δ_H 6,95 (1H, dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz)/ 7,10 (1H, t, $J = 8,0$ Hz)/ 7,74 (1H, dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz), một tín hiệu của nhóm methylen tại δ_H 6,20 (2H, s). Điều này cho thấy hợp chất **SD2** có khung chất tương tự aporphin với các nhóm thế bao gồm nhóm methoxy ở C-8

và nhóm methylenedioxy ở C-1 và C-2. Giả thuyết này được khẳng định thông qua các tương tác HMBC quan trọng của 8-OCH₃ (δ_{H} 3,93)/C-8 (δ_{C} 148,1) và H-12 (δ_{H} 6,20)/C-1 (δ_{C} 152,7) và C-2 (δ_{C} 140,8).

Tuy nhiên, phổ ¹³C-NMR và HSQC của **SD2** cho thấy 17 tín hiệu carbon, bao gồm một carbon sp³ của nhóm methylen, 15 carbon sp² và một carbon của nhóm methoxy. 15 carbon sp² có thể được cho là của một liên kết đôi và 2 vòng benzen có trong công thức của **SD2**. Trên phổ ¹³C-NMR của **SD2** không có tín hiệu của nhóm carbonyl như ở phổ chất tham khảo (oxostephanin). Thêm vào đó, tín hiệu C-6a và C-7a chuyển dịch về vùng trường thấp trên phổ ¹³C-NMR, gợi ý cho việc các carbon này có liên kết với nguyên tử có độ âm điện lớn như N hoặc O. Dựa trên công thức phân tử C₁₇H₁₁NO₄ và độ bất bão hòa $\Delta=13$, cho thấy rằng khác với oxostephanin, hợp chất **SD2** sẽ có vòng C là dị vòng chứa một nguyên tử oxy. Thêm vào đó, phổ HMQC cho thấy tương tác giữa H-9 (δ_{H} 6,95) với C-9 (δ_{C} 113,1), điều này khẳng định chất **SD2** không gắn nhóm thế -OCH₃ tại vị trí C-9 như oxostephanin.

Dựa trên các dữ liệu trên cho phép kết luận cấu trúc hóa học của **SD2**. Hợp chất **SD2** là hợp chất mới, lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên và được đề xuất tên là **stedieltin B**.

* **Hợp chất SD3: oxostephanin: Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm, *J*/Hz): 8,73 (1H, d, *J* = 5,0, H-5), 8,26 (1H, d, *J* = 8,0, H-11), 7,90 (1H, d, *J* = 5,0, H-4), 7,73 (1H, t, *J* = 8,0, H-10), 7,43 (1H, s, H-3), 7,25 (1H, *J* = 8,0, H-9), 6,42 (2H, s, H-12), 3,96 (3H, s, 8-OCH₃). **Phổ ¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm): 179,7 (C-7), 160,9 (C-8), 151,3 (C-1), 147,5 (C-2), 145,8 (C-6a), 143,8 (C-5), 134,5 (C-11a), 134,4 (C-3a), 134,3 (C-10), 123,0 (C-4), 121,1 (C-6b), 120,2 (C-7a), 118,8 (C-11), 112,6 (C-9), 106,7 (C-11b), 102,7 (C-3), 102,5 (C-12), 55,9 (8-OCH₃).

* **Hợp chất SD4: oxostephanosin: Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm, *J*/Hz): 13,64 (1H, s, 8-OH), 8,86 (1H, d, *J* = 5,5, H-5), 8,17 (1H, dd, *J* = 1,0; 8,0, H-11), 8,07 (1H, d, *J* = 5,5, H-4), 7,79 (1H, t, *J* = 8,0, H-10), 7,57 (1H, s, H-3), 7,09 (1H, dd, *J* = 1,0; 8,0, H-9), 6,51 (2H, s, H-12). **Phổ ¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm): 186,4 (C-7), 163,3 (C-8), 151,5 (C-1), 148,8 (C-2), 144,2 (C-5), 143,6 (C-6a), 136,7 (C-10), 134,8 (C-3a), 133,1 (C-11a), 124,7 (C-4), 122,4 (C-6b), 117,7 (C-11), 116,5 (C-9), 115,3 (C-7a), 106,0 (C-11b), 103,2 (C-3), 103,0 (C-12).

*** Hợp chất SD5: oxocrebanin: Phổ $^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm, J/Hz): 8,75 (1H, d, $J = 5,5$, H-5), 8,26 (1H, d, $J = 9,0$, H-11), 7,97 (1H, d, $J = 5,5$, H-4), 7,58 (1H, d, $J = 9,0$, H-10), 7,48 (1H, s, H-3), 6,46 (2H, s, H-12), 3,96 (3H, s, 9-OCH₃), 3,86 (3H, s, 8-OCH₃). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 180,8 (C-7), 153,3 (C-9), 151,7 (C-1), 150,0 (C-8), 146,9 (C-2), 145,6 (C-6a), 144,2 (C-5), 135,1 (C-3a), 126,0 (C-11a), 125,4 (C-7a), 123,8 (C-4), 123,5 (C-11), 121,3 (C-6b), 118,1 (C-10), 106,9 (C11b), 102,9 (C-12), 102,2 (C-3), 60,6 (8-OCH₃), 56,1 (9-OCH₃).

*** Hợp chất SD6: aristolactam: Phổ $^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm, J/Hz): 10,73 (1H, NH), 8,12 (1H, d, $J = 8,0$, H-12), 7,64 (1H, s, $J = \text{H-3}$), 7,50 (1H, t, $J = 8,0$, H-10), 7,34 (1H, s, H-7), 7,20 (1H, d, $J = 8,0$, H-9), 6,47 (2H, s, H-12), 4,00 (3H, s, 8-OCH₃). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 168,1 (C-4), 155,3 (C-8), 148,8 (C-2), 147,1 (C-1), 125,7 (C-10), 125,0 (C-11a), 124,8 (C-6b), 119,3 (C-3a), 118,7 (C-11), 111,0 (C-11b), 108,3 (C-9), 105,6 (C-3), 103,2 (C-12), 97,9 (C-7), 55,8 (8-OCH₃).

*** Hợp chất SD7: crebanin: Phổ $^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl₃, δ , ppm, J/Hz): Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu singlet của 2 nhóm methoxy tại δ_{H} 3,81 (3H, s) và 3,89 (3H, s), một nhóm methyl liên kết với nitơ tại δ_{H} 2,59 (3H, s); 3 nhóm methylen ở vùng trường cao tại δ_{H} 3,05 - 3,14 (2H), 2,62 (1H, dd, $J = 3,5$; 16,0 Hz), 2,53 (1H, td $J = 3,5$; 11,5 Hz), 3,67 (1H, dd, $J = 4,0$; 14,5 Hz) và 2,31 (1H, dd, $J = 14,0$; 14,5 Hz); 1 nhóm methin tại δ_{H} 3,05 - 3,14 (1H); 1 nhóm dioxymethylen (-OCH₂O-) tại δ_{H} 5,90 (1H, d, $J = 1,5$ Hz) và 6,04 (1H, d, $J = 1,5$ Hz); 1 proton olefin ở dạng singlet tại δ_{H} 6,51 (1H, s) và hai proton olefin cạnh nhau tại δ_{H} 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,80 (1H, d, $J = 8,5$ Hz). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 152,1 (C-9), 146,7 (C-2), 145,9 (C-8), 142,1 (C-1), 129,7 (C-7a), 126,4 (C-6b), 126,3 (C-3a), 124,6 (C-11a), 123,1 (C-11), 116,6 (C-11b), 110,4 (C-10), 106,8 (C-3), 100,6 (C-12), 61,9 (C-6a), 60,7 (8-OCH₃), 55,8 (9-OCH₃), 53,5 (C-5), 43,7 (6-NCH₃), 29,0 (C-4), 26,8 (C-7).

*** Hợp chất SD8: dehydrocrebanin: Phổ $^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl₃, δ , ppm, J/Hz): 8,64 (1H, d, $J = 9,0$, C-11), 7,01 (1H, d, $J = 9,0$, C-10), 6,88 (1H, s, C-7), 6,87 (1H, s, C-3), 6,18 (2H, s, C-12), 3,98 (3H, s, 9-

OCH₃), 3,97 (3H, s, 8-OCH₃), 3,27 (2H, t, $J = 6,0$, C-5), 3,21 (2H, t, $J = 6,0$, C-4), 3,12 (3H, s, 6-NCH₃). **Phổ ¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 152,2 (C-9), 145,2 (C-2), 143,9 (C-6a), 141,7 (C-1), 141,7 (C-8), 129,4 (C-7a), 123,4 (C-11), 118,8 (C-11a), 118,3 (C-6b), 117,5 (C-11b), 108,8 (C-10), 106,8 (C-3), 106,8 (C-7), 100,9 (C-12), 60,6 (8-OCH₃), 56,2 (9-OCH₃), 50,6 (C-5), 40,6 (6-NCH₃), 30,7 (C-4).

* **Hợp chất SD9: 4-hydroxybenzaldehyd:** chất rắn màu trắng. **Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, CD₃OD) xuất hiện hai cặp tín hiệu proton olefin tại δ_H 7,79 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-2, H-6) và 6,92 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3, H-5) đặc trưng cho hệ vòng thơm dạng AA'BB'. Ngoài ra, phổ proton cũng xuất hiện tín hiệu của nhóm aldehyd tại δ_H 9,77 (1H, s, H-7). **Phổ ¹³C-NMR** (125 MHz, CD₃OD) và DEPT cho thấy tín hiệu của 7 carbon, trong đó 6 carbon của vòng thơm tại δ_C 130,0 (C-1), 133,4 (C-2, C-6), 117,0 (C-3, C-5) và 165,7 (C-4). Tín hiệu tại δ_C 192,7 (C-7) đặc trưng cho nhóm aldehyd.

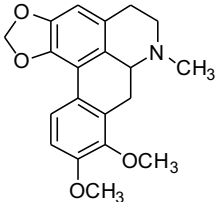
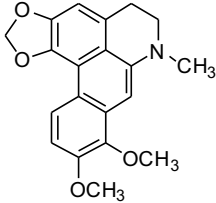
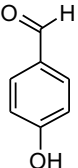
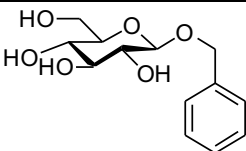
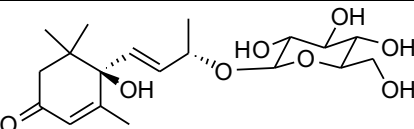
* **Hợp chất SD10: benzyl β -D-glucopyranosid:** bột vô định hình màu trắng. **Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, CD₃OD) xuất hiện tín hiệu của 5 proton thơm tại δ_H 7,41 (2H, m, H-2, H-6), 7,31 (2H, m, H-3, H-5) và 7,26 (1H, m, H-4) gợi ý sự có mặt của vòng benzen thế ở vị trí 1. Ngoài ra, trên phổ proton còn xuất hiện tín hiệu của nhóm oxymethylen tại δ_H 4,66 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-7) và 4,92 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-7). Bên cạnh đó, sự xuất hiện của gốc đường β -D-glucopyranosyl cũng được thể hiện qua tín hiệu của proton anomeric với hằng số ghép cặp lớn [δ_H 4,35 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)], proton nhóm hydroxymethylen [δ_H 3,69 (1H, d, $J = 6,0$; 12,0 Hz), 3,89 (1H, d, $J = 2,5$; 12,0 Hz)] và các proton nhóm hydroxymethin [δ_H 3,23 – 3,34 (4H, m)]. **Phổ ¹³C-NMR** (125 MHz, CD₃OD) cho thấy tín hiệu của 13 carbon trong đó 6 carbon của gốc đường β -D-glucopyranosyl [δ_C 103,2, 75,1, 77,9, 71,6, 78,0 và 62,8]. Vị trí của gốc đường này được xác định tại vị trí C-7 thông qua tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 4,35) với C-7 (δ_C 71,7).

* **Hợp chất SD11: (6R,9S)-roseosid:** bột vô định hình màu trắng. **Phổ ¹H-NMR** (500 MHz, CD₃OD) xuất hiện tín hiệu của một proton olefin dạng C=CH tại δ_H 5,89 (1H, br s, H-4) và một nối đôi khác thế hai lần (CH=CH) dạng *trans* tại δ_H 6,99 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-7) và 5,75 (1H, dd, $J = 15,5$ Hz, H-8); 3 nhóm methyl bậc 3 [δ_H 1,03 (3H, s, H-12), 1,06 (3H, s, H-11) và 1,96 (3H, d, $J = 1,5$ Hz, H-13)] và 1 nhóm methyl bậc

hai [δ_H 1,31 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-10)]; 1 nhóm methylen [δ_H 2,18 (1H, m, H-2a)/2,61 (1H, m, H-2b)]; 1 nhóm oxymethin [δ_H 4,55 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, H-9)]; một proton anomeric tại δ_H 4,29 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 2 proton hydroxymethylen tại δ_H 3,66 (1H, dd, $J = 6,0, 11,5$ Hz, H-6'), 3,87 (1H, dd, $J = 2,0; 11,5$ Hz, H-6') và các proton hydroxymethin nằm trong vùng trường 3,17 - 3,21 ppm, gợi ý sự có mặt của một gốc đường hexose. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của phân đường cùng với hằng số tương tác lớn của proton anomeric H-1'/H-2' ($J_{1'-2'} = 7,5$ Hz) gợi ý gốc đường là O- β -D-glucopyranosyl.

Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) và HSQC xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 19 carbon, bao gồm 13 carbon đặc trưng cho khung megastigman: 1 nhóm carbonyl tại δ_C 201,2 (C-3), 2 nhóm methin olefin của nối đôi (CH=CH) tại δ_C 133,7 (C-7)/133,7 (C-8), 2 tín hiệu carbon olefin khác của nối đôi CH=C tại 127,1 (C-4)/167,0 (C-5), 4 nhóm methyl tại δ_C 19,5 (C-13), 22,2 (C-10), 23,4 (C-11), 24,6 (C-12), 1 nhóm methylen tại δ_C 50,7 (C-2), 1 carbon không mang hydro liên kết với oxy tại δ_C 80,0 (C-6), nhóm oxymethin tại δ_C 74,6 (C-9) và sáu carbon đặc trưng cho gốc đường tại δ_C 101,2 (C-1') và 5 tín hiệu các nhóm oxymethin/oxymethylen trong vùng từ δ_C 62,8 - 78,3. Phổ HMBC của cho thấy vị trí của 2 nhóm methyl bậc ba tại C-1 và C-5 được xác định dựa vào tương tác giữa H₃-11/H₃-12 với C-1/C-2/ C-6, giữa H₃-13 với C-4/C-5/C-6; vị trí của 1 nhóm methyl bậc hai còn lại tại C-9 được xác định dựa vào các tương tác HMBC giữa H₃-10 với C-8/C-9. Bằng cách xác định tương tự mối tương quan giữa các tương tác, vị trí của nhóm keton (C-3) được xác định dựa vào các tương tác HMBC giữa proton H-2/H-4 với C-3. Tương tác HMBC giữa proton anomeric H-1' với C-9, xác định vị trí của liên kết của phân đường tại C-9. Cấu hình 6*R*, 9*S* được xác định dựa trên độ dịch chuyển hóa học của carbon tại các vị trí C-7, C-8 và C-9.

Các hợp chất phân lập từ thân lá cây củ dền được tóm tắt trong bảng 3.12.

7	Crebanin (SD7)	$C_{20}H_{21}NO_4$ M = 339	
8	Dehydrocrebanin (SD8)	$C_{20}H_{19}NO_4$ M = 337	
9	4-hydroxy benzaldehyd (SD9)	$C_7H_6O_2$ M = 122	
10	Benzyl β -D-glucopyranosid (SD10)	$C_{13}H_{18}O_6$ M = 270	
11	(6R,9S)-roseosid (SD11)	$C_{19}H_{30}O_8$ M = 386	

3.2. Bước đầu nghiên cứu xây dựng phương pháp phân lập và phương pháp định lượng để theo dõi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu theo thời gian thu hái

3.2.1. Phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin

Phương pháp chiết phân lập oxostephanin gồm 6 bước, chia thành 4 giai đoạn, gồm: (1) chiết xuất tạo cao tổng methanol của củ dền; (2) loại tạp tạo cao giàu alcaloid thô (bằng ethyl acetate và petroleum ether kết hợp với chuyển dạng muối chlorid – base alcaloid); (3) Tạo cặn giàu alcaloid đã làm giàu oxostephanin bằng chiết phân bố với chloroform và ethyl acetat; (4) tinh chế kết tinh tạo oxostephanin. Từ 5kg thân lá cây củ dền khô đã phân lập được 4,0 g oxostephanin. Sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin đã

phân lập theo phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ HPLC là 98,5%. Hợp chất này được sử dụng làm chất so sánh cho các nghiên cứu tiếp theo về thành phần hoá học và tác dụng sinh học.

3.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dền

Điều kiện sắc ký lựa chọn là: cột sắc ký: Supelco C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm); detector: DAD 254 nm; thể tích tiêm: 10 µl; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; pha động: MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v); nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng; thời gian chạy: 25 phút.

Điều kiện xử lý mẫu được lựa chọn là: dung môi chiết: MeOH; số lần chiết: 3 lần, sử dụng sóng siêu âm để hỗ trợ chiết xuất; tỷ lệ tổng lượng dung môi/ được liệu: 200 : 1; thời gian chiết mỗi lần: 1 giờ.

Thẩm định phương pháp phân tích đạt các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ thu hồi theo “Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích” và AOAC, xác định được khoảng nồng độ tuyến tính từ 3,125 – 100 µg/ml, LOD = 0,002441 µg/ml và LOQ = 0,0079 µg/ml.

3.2.3. Đánh giá sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái

Đánh giá sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái trong 9 mẫu thu hái tại Thành phố Bắc Giang (tỉnh Bắc Giang), so sánh với các mẫu thu tại Quận Bạ (Hà Giang) và Ba Vì (Hà Nội).

Bảng 3.23. Kết quả định lượng oxostephanin trong mẫu được liệu thu hái tại Thành phố Bắc Giang

Ký hiệu	Thời gian thu hái	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)
D1	1/2/2020	0,353	4,1
D2	29/2/2020	0,611	2,0
D3	29/3/2020	0,337	7,4
D4	3/5/2020	0,430	1,4
D5	31/5/2020	0,597	3,9
D6	6/9/2020	0,873	2,3
D7	8/10/2020	0,819	0,5
D8	14/11/2020	0,501	1,4
D9	14/12/2020	0,525	2,9

Kết quả sơ bộ có thể thấy rằng các thời điểm thu hái khác nhau có thể dẫn đến sự khác biệt về hàm lượng oxostephanin trong củ dền. Dược liệu trồng tại TP Bắc Giang thu hái tại thời điểm thích hợp nhất vào khoảng giữa tháng 9 đến giữa tháng 10. Khi đó sẽ thu được hàm lượng oxostephanin cao nhất lần lượt là 0,873 % và 0,819 % (**bảng 3.23**).

Trong khi đó, kết quả định lượng mẫu thân lá thu hái ở Hà Giang và Ba Vì cho thấy rằng: (1) oxostephanin tập trung nhiều ở lá và cao gấp khoảng 40 lần so với thân; (2) hàm lượng oxostephanin thu mẫu ở Ba Vì (0,340 % (lá) và 0,008 % (thân)), cao hơn ở mẫu thu ở Hà Giang (0,320 % (lá) và 0,004 % (thân)) là khoảng 6% đối với lá và cao gấp 2 lần đối với thân vào thời điểm thu hái 3/2019. Nhưng do trữ lượng oxostephanin trong thân thấp nên nhìn chung sự khác biệt này không đáng kể giữa hai vùng thu hái mẫu trên; (3) Đối với mẫu toàn bộ thân lá thu hái vào hai mùa tháng 5 và tháng 10 ở Ba Vì lại không cho sự khác biệt rõ ràng nào về hàm lượng oxostephanin. Nhưng lại khác biệt đáng kể so với thời điểm tương tự thu hái ở Bắc Giang.

3.3. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập và bước đầu nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của oxostephanin

3.3.1. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập

Bằng phương pháp đánh giá về hình thái và thử nghiệm MTS cho kết quả hợp chất **SD3** gây độc mạnh cho các dòng tế bào thử nghiệm. Ở nồng độ cao nhất, cả 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm đều bị ức chế đáng kể, đặc biệt trên dòng tế bào MCF7, HepG2 và OVCAR-8, làm tế bào biến dạng và mật độ giảm mạnh. Khả năng ức chế sự sống của tế bào giảm dần theo chiều giảm của nồng độ thuốc thử. Tại nồng độ $[C1] = 65,5 \mu M$ số lượng tế bào của ba dòng MCF7, HepG2 và OVCAR-8 lần lượt với A% chỉ đạt trung bình khoảng 20%, 17% và 9% và lần lượt là 23%, 22% và 16% ở nồng độ $[C2] = 32,75 \mu M$. Ở nồng độ thấp nhất, hợp chất không còn khả năng ảnh hưởng đến sự sống của tế bào, chỉ số A% đều lớn hơn 90%.

Hai hợp chất **SD4** và **SD5** chưa gây độc mạnh cho các dòng tế bào thử nghiệm, rõ nhất với dòng ung thư vú MCF7. Hai hợp chất này gây độc với các dòng tế bào ung thư cổ tử cung Hela và dạ dày N87, gây giảm đáng kể mật độ tế bào khi thử ở các nồng độ cao như $[C1]$, $[C2]$ và $[C3]$.

Với hợp chất **SD4**, tại nồng độ $[C1] = 156,4 \mu M$ số lượng tế bào OVCAR-8 chỉ đạt trung bình khoảng 28% và 40% ở nồng độ $[C2] = 78,2 \mu M$. Tác động của hợp chất **SD5** trên hai dòng OVCAR-8, HepG2 tại nồng độ cao có gây giảm về mật độ tế bào tuy nhiên mức độ giảm không đáng kể.

Ngoài ra, hai hợp chất **SD1**, **SD2** chưa có tác dụng gây độc trên cả 5 dòng tế bào thử nghiệm (Hela, HepG2, MCF7, N87 và OVCAR-8), chưa thể hiện ảnh hưởng nào lên tế bào, hình thái tế bào không có biến đổi, mật độ tế bào chiếm khá cao.

Kết quả IC_{50} của các hợp chất trên các dòng tế bào ung thư trong thử nghiệm MTS được thể hiện trong **bảng 3.25**.

Bảng 3.25. IC_{50} của các hợp chất trên các dòng tế bào ung thư trong thử nghiệm MTS (μM)

Dòng tế bào Chất thử	OVCAR-8	HeLa	HepG2	MCF7	N87
SD1	ND	ND	ND	ND	ND
SD2	ND	ND	ND	ND	ND
SD3	$3,4 \pm 0,007$ $R^2 = 0,99$	$22,4 \pm 0,7$ $R^2 = 0,99$	$3,2 \pm 0,18$ $R^2 = 0,97$	$3,1 \pm 0,06$ $R^2 = 0,99$	$33 \pm 0,08$ $R^2 = 0,98$
SD4	$30 \pm 1,4$ $R^2 = 0,98$	$97,4 \pm 4,6$ $R^2 = 0,98$	$122,9 \pm 5,7$ $R^2 = 0,98$	ND	$66,1 \pm 0,9$ $R^2 = 0,98$
SD5	ND	$160,3 \pm 9,2$ $R^2 = 0,99$	ND	ND	$115,3 \pm 1,34$ $R^2 = 0,97$

3.3.2. Nghiên cứu cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin

* Ảnh hưởng của oxostephanin đối với tế bào ung thư OVCAR-8

Oxostephanin có tác dụng tương tự VX-680 đối với sự tăng sinh tế bào; nồng độ của các hợp chất càng cao thì tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào càng lớn. Thời gian nhân đôi của các tế bào OVCAR-8 cũng bị ảnh hưởng, khi ủ với oxostephanin, phần lớn thời gian nhân đôi cao hơn so với đối chứng, cho thấy sự tăng sinh của tế bào đã bị ức chế. Các tế bào tăng kích thước, có sự gia tăng đáng kể diện tích nhân tế bào sau thời gian ủ. Ngoài ra, hình thái của nhân tế bào đã bị thay đổi, với các nhân trở nên không đồng nhất, nhiều thùy và mở rộng, không đồng nhất hoặc hình bầu dục như trong đối chứng.

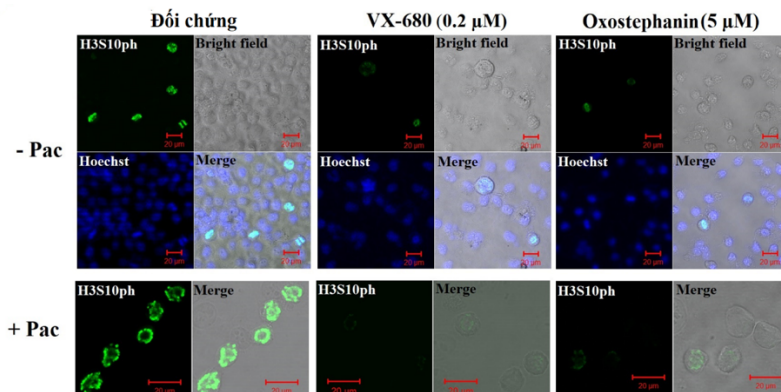
Ở nồng độ oxostephanin 5 μM , quan sát thấy sự biểu hiện của phân tử phosphatidylserine, một dấu hiệu apoptosis, liên kết với Annexin-V trên bề mặt tế bào sau 24 giờ ủ. Theo đó, tỷ lệ tế bào được xử lý với oxostephanin (5 μM) dương tính với Annexin-V là $30,4 \pm 6,8\%$, cao gấp 7,4 lần so với đối chứng ($4,1 \pm 0,8\%$). Trong khi đó, $33,7 \pm 5,1\%$ tế bào dương tính với Annexin-V khi được xử lý bằng 0,2 μM VX-680.

Khi thêm chất thử vào thời điểm chuẩn bị khối u, oxostephanin này đã ngăn chặn 70% sự hình thành khối u ở 5 μM và 58% sự hình thành hình cầu ở 1 μM . Một kết quả tương tự cũng thu được với VX-680; chỉ có 22,5% khối u có thể được hình thành ở nồng độ 0,2 μM . Hơn nữa, thể tích của các khối u được tạo thành nhỏ hơn so với thể tích của đối chứng. Điều kiện thứ hai được tiến hành khi oxostephanin được thêm vào và duy trì trong môi trường sau khi các khối u được chuyển vào đĩa thạch. Trong điều kiện này, sau 7 ngày, oxostephanin ức chế sự phát triển của các khối u, với kích thước giảm 4,3 lần ở 5 μM và 2,7 lần ở 1 μM . Tác động của oxostephanin đối với sự phát triển của hình u thậm chí còn nổi bật hơn so với VX-680 ở 0,2 μM , với sự giảm 2,1 lần về thể tích vào ngày điều trị thứ 7. Hơn nữa, hình thái của các khối u được xử lý trong cả hai điều kiện đều thấy có sự thay đổi thành các cụm tế bào lỏng lẻo với nhiều tế bào được bao bọc riêng biệt, trái ngược với các khối u có cấu trúc chặt chẽ ở đối chứng.

Oxostephanin có tác dụng như một chất ức chế Aurora kinase mới, tác động của hợp chất này lên quá trình phosphoryl hóa của H3S10ph đã được đánh giá trong các tế bào ung thư OVCAR-8. Quá trình phosphoryl hóa histone H3 ở serine 10 đã bị gián đoạn trong các tế bào ung thư OVCAR-8 được xử lý bằng oxostephanin và VX-680 thể hiện ở tín hiệu của H3S10ph bị khử khi có mặt oxostephanin (5 μM) và VX-680 (0,2 μM) trong 15 giờ (**hình 3.35**).

Aurora kinase B không biểu hiện tập trung mà có xu hướng phân tán trên toàn bộ NST và biểu hiện mRNA của Aurora kinase B cũng có sự giảm đáng kể sau khi ủ với oxostephanin.

Tóm lại, những dữ liệu này minh họa rằng việc xử lý tế bào bằng oxostephanin đã ảnh hưởng đến sự biểu hiện của Aurora B trong chu kỳ tế bào theo cách tương tự như VX-680, nhưng với hiệu quả thấp hơn.

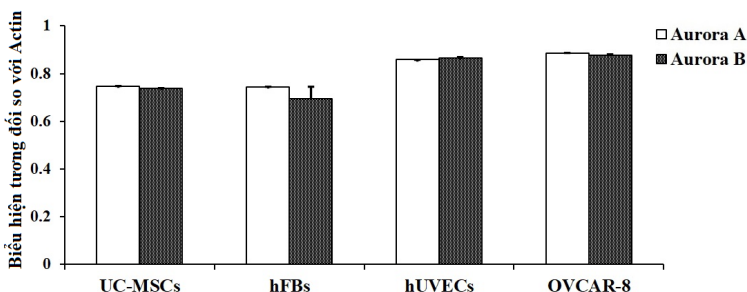


Hình 3.35. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên quá trình phosphoryl hoá của H3S10ph

*** Ảnh hưởng của oxostephanin trên các dòng tế bào thường**

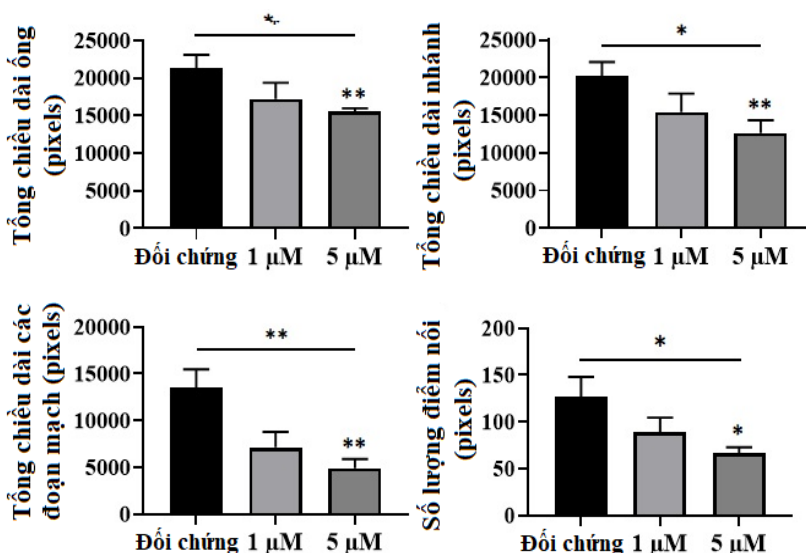
Nghiên cứu chọn ba dòng tế bào, bao gồm UC-MSCs, hUVECs và hFBs của người để kiểm tra độc tính tế bào oxostephanin. Đầu tiên, sự biểu hiện của gen kinase Aurora A và Aurora B so với gen đối chứng actin đã được kiểm tra ở tế bào bình thường và tế bào ung thư. Kết quả cho thấy những gen này được biểu hiện cao ở cấp độ mRNA, với mức cao nhất được quan sát thấy trong các tế bào hUVECs và OVCAR-8, và thấp nhất trong hFBs (**hình 3.39**).

Các giá trị IC_{50} của hUVECs lần lượt là $7,9 \pm 0,6$; $3,1 \pm 0,5$ và $1,9 \pm 0,5 \mu M$ sau 24, 48 và 72 giờ ủ. Tuy nhiên, không thể xác định giá trị IC_{50} của hFBs sau 24 và 48 giờ, nhưng là $17,1 \pm 0,8 \mu M$ sau 72 giờ ủ. Đáng chú ý, tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin trên UC-MSCs thấp hơn so với hUVECs, nhưng cao hơn trên hFBs, với giá trị IC_{50} ở 48 và 72 giờ lần lượt là $4,7 \pm 0,8$ và $5,1 \pm 0,7 \mu M$. Những dữ liệu này, cũng như kết quả của cấp độ mRNA chỉ ra rằng oxostephanin có thể độc hại hơn đối với tế bào ung thư OVCAR-8 và hUVECs, nhưng ít hơn đối với hFBs và UC-MSCs. Ảnh hưởng của oxostephanin còn được thể hiện ở khả năng làm giảm số lượng khuẩn lạc và mật độ tế bào/khuẩn lạc, giảm sự bài tiết các yếu tố tăng trưởng khi nuôi cấy các dòng tế bào hUVECs và hFBs.



Hình 3.39. Ảnh hưởng của oxostephanin lên biểu hiện mRNA của kinase Aurora A và Aurora B trong các dòng tế bào ung thư và bình thường

Oxostephanin ức chế sự di chuyển của hUVECs và hFBs trong thử nghiệm làm liền vết thương và ức chế sự tạo thành mạch trong ống nghiệm. Tổng chiều dài mạch, phân nhánh mạch, các đoạn mạch và số lượng các điểm nối đều giảm đáng kể so với nhóm đối chứng. Phần lớn các tế bào hUVECs tập hợp lại và rất ít cấu trúc dạng ống được quan sát thấy. Định lượng sự hình thành mạch khi cấy hUVECs trên Matrigel với sự có mặt của oxostephanin được thể hiện trong **hình 3.47**.



Hình 3.47. Định lượng sự hình thành mạch khi cấy hUVECs trên Matrigel với sự có mặt của oxostephanin

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

Đã có một số ý kiến bàn luận về giá trị khoa học và ý nghĩa thực tiễn về kết quả của Luận án.

KẾT LUẬN

1. Về chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết

Đã chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học 11 hợp chất từ thân lá cây củ dền *Stephania dielsiana* Y.C. Wu, bao gồm :

+ 08 hợp chất alcaloid, trong đó có: 2 hợp chất mới lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên, được đề nghị đặt tên là **Stedieltin A** và **Stedieltin B**; 01 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ các loài thuộc chi *Stephania* Lour. là aristolactam (**SD6**); 01 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ loài *S. dielsiana* là oxostephanosin (**SD4**); 01 hợp chất alcaloid lần đầu tiên được phân lập từ phần thân lá của cây củ dền (đã phân lập được từ phần củ) là oxocrebanin (**SD5**) và 03 hợp chất alcaloid oxostephanin (**SD3**), crebanin (**SD7**) và dehydrocrebanin (**SD8**).

+ 03 hợp chất không phải alcaloid gồm 4-hydroxybenzaldehyd (**SD9**); benzyl β -D-glucopyranosid (**SD10**) và (6*R*,9*S*)-roseosid (**SD11**) đều là các hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài củ dền.

2. Về xây dựng phương pháp phân lập và phương pháp định lượng để theo dõi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu theo thời gian thu hái

- Đã xây dựng phương pháp và phân lập được 4,0 g oxostephanin (độ tinh khiết 98,5 % theo diện tích pic trên HPLC) từ 5 kg thân lá cây củ dền dùng làm chất so sánh và làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

- Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dền đáp ứng được các tiêu chí của AOAC và Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích.

- Đã đánh giá được sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong dược liệu thân lá củ dền theo thời gian thu hái nằm trong khoảng 0,337 – 0,873 %, trong đó thời điểm thu hái cho hàm lượng hoạt chất cao nhất là tháng 9 và tháng 10.

3. Về đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập và nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của oxostephanin

- Đã đánh giá tác dụng ức chế các dòng tế bào ung thư HeLa, HepG2, MCF7, N87 và OVCAR-8 của các hợp chất **SD1** (Stedieltin A), **SD2** (Stedieltin B), **SD3** (oxostephanin), **SD4** (oxostephanosin) và **SD5** (oxocrebanin) bằng phương pháp nhuộm MTS: hợp chất **SD3** có tác dụng ức chế mạnh các dòng tế bào ung thư HepG2, MCF7 và OVCAR-8 với IC_{50} trong khoảng 3,1-3,4 μ M, các hợp chất **SD4**, **SD5** thể hiện tác dụng trung bình đến yếu, hợp chất **SD1**, **SD2** chưa có tác dụng gây độc trên cả 5 dòng tế bào thử nghiệm.

- Đã nghiên cứu cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin: oxostephanin là một chất ức chế Aurora kinase thông qua việc ngăn chặn sự phosphoryl hóa histone H3 ở serine 10, sự định vị sai của Aurora B và gây ra thể dị bội. Hơn nữa, oxostephanin gây độc tế bào có chọn lọc đối với tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của con người (hUVECs), trong khi ít gây độc tế bào hơn đối với nguyên bào sợi của người và tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn. Ngoài ra, oxostephanin làm giảm đáng kể khả năng di chuyển và hình thành mạch của hUVECs. Oxostephanin đóng vai trò kép trong việc ức chế hoạt động của Aurora kinase và hình thành mạch. Do đó, nó có tiềm năng sử dụng như một loại thuốc trong điều trị ung thư.

KIẾN NGHỊ

1. Xây dựng quy trình phân lập oxostephanin và thiết lập chuẩn phục vụ đánh giá dược liệu và các nghiên cứu về tác dụng tiếp theo
2. Tiếp tục đánh giá tác dụng chống ung thư của oxostephanin nói riêng và các alkaloid khác được phân lập từ củ dền trên *in vitro* và *in vivo*.
3. Tiếp tục nghiên cứu độ an toàn của cao chiết, phân đoạn hoặc hợp chất phân lập từ thân lá cây củ dền và đánh giá tác dụng khác của loài này.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tống Minh Thảo, **Trần Thị Thu Hiền**, Lê Hoàng Sơn (2019), Định lượng alcaloid trong phần trên mặt đất của cây củ dền (*Stephania dielsiana* Y.C.Wu) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Y Dược cổ truyền Việt Nam*, số 06 (25), tr. 61-65.

2. **THU-HIEN THI TRAN***, LE-DUY BA VU*, HUY QUOC NGUYEN, HANH BICH PHAM, XUAN-PHUONG THI DO, UYEN THI TRANG THAN, THU-HUONG THI PHAM, LINH DIEU DO, KIM-VAN THI LE, THAO PHUONG NGUYEN and MY-NHUNG THI HOANG (2022), Dual roles of oxostephanine as an Aurora kinase inhibitor and angiogenesis suppressor”, *International Journal of Molecular Medicine*, Published online on: September 13, 2022, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5189>